



F1000096211B



**SUOMI-FINLAND**  
(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**  
**UTLAGGNINGSSKRIFT**

96211

**C (45) Patentti myönnetty**  
**Patent mellelat 27 05 1996**

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

C 07K 1/22 // C 12N 9/64

(21) Patentihakemus - Patentansökning	871948
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	04.05.87
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	04.05.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	08.11.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.02.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	

07.05.86 JP 61-103200 P

11.08.86 JP 61-186850 P

(71) Hakija - Sökande

1. **Mitsui Toatsu Chemicals, Incorporated**, 2-5, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Morii, Mitsuyoshi**, Mitsui Toatsu Apaato 2-4-5, 1541, Yabecho, Totsuka-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, Japan, (JP)  
 2. **Ohoka, Masaharu**, Mitsui Toatsu Iijima Apaato 2-22, 2882, Iijimacho, Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, Japan, (JP)  
 3. **Suzuki, Toshihiko**, 3-12-3, Nihonbashi Kayabacho, Chuo-ku, Tokyo, Japan, (JP)  
 4. **Suzuki, Katsuyuki**, 5-39-14-301, Kawauchi, Asaminami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima-ken, Japan, (JP)  
 5. **Kawashima, Nobuhiro**, 8587-3, Tana, Sagami-hara-shi, Kanagawa-ken, Japan, (JP)  
 6. **Morii, Noriko**, Mitsui Toatsu Apaato 2-4-5, 1541, Yabecho, Totsuka-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, Japan, (JP)  
 7. **Mori, Kunizo**, Mitsui Toatsu Iijima Apaato 4-43, 2882, Iijimacho, Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: **Ruska & Co Oy**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä yksisäikeisen kudospasminogeeniaktivaattorin (tPA) ja kaksisäikeisen tPA:n puhdistamiseksi ja eristämiseksi**  
**Förfarande för separat rening och separering av enkelkedjig vävnadspasminogenaktivator (tPA) och dubbelkedjig tPA från en blandning**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 112122 (C 12N 9/64),  
Chemical Abstracts, vol. 102, 1985, 2474f

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Seos, joka sisältää yksisäikeistä kudospasminogeeniaktivaattoria (tPA) ja/tai kaksisäikeistä tPA:ta viedään pylvääseen, jossa on immobilisoitu Erytrina trypsiini-inhibiittori affiniteettiagenttina. Adsorboituneet proteiinit eluoidaan eluenteilla, joilla on eri pH arginiinin tai bentsamidiinin kanssa tai ilman niitä, niin, että yksisäikeinen tPA saadaan eluentissa, jonka pH on vähintään 4.5 ja kaksisäikeinen tPA saadaan eluentissa, jonka pH on alle 4.5.

En komposition, som innehåller en entrådlig vävnadspasminogenaktivator (tPA) och/eller en dubbeltrådlig tPA införas i en kolonn med en immobiliserad Erytrina trypsin-inhibitor som affinitetsmedel. De adsorberade proteinerna elueras med eluenter, som har olika pH tillsammans med arginin eller benzamidin eller utan dessa så, att entrådlig tPA erhålles i en eluent, vars pH är minst 4.5 och dubbeltrådlig tPA erhålles i en eluent, vars pH är under 4.5.

Menetelmä yksisäikeisen kudospasminogeeniaktivaattorin (tPA) ja kaksisäikeisen tPA:n puhdistamiseksi ja eristämiseksi

Keksinnön taustaa

1) Keksinnön ala:

Tämä keksinnön kohteena on menetelmä yksisäikeisen ja/tai kaksisäikeisen kudospasminogeeniaktivaattorin (tästälähin merkittynä sc-TPA ja dc-TPA, vastaavasti) puhdistamiseksi seoksesta, joka sisältää sc-TPA:ta ja dc-TPA:ta.

2) Kuvaus tekniikan tasosta

tPA (kudospasminogeeniaktivaattori) on proteiini, jota kehittyä korkeamman eläimen kudoksessa, ja joka toimii aktiivolla plasminogeenin, plasmiinin prekursorin, jonka tiedetään olevan proteolyttinen entsyymi erityisesti fibriinille ja on nyt tuotu polttopisteeseen potentiaalisena trombo-lyyttisenä aineena.

tPA:lla on kaksi molekyyliämuotoa, yksisäikeinen tPA ja kaksisäikeinen tPA, joilla on sama molekyyliäpaine (noin 70000 daltonia), ja sitä saadaan seoksena tavallisissa tPA:n tuotantomenetelmissä. Kaksisäikeisellä muodolla on noin kymmenen kertaa korkeampi aktiivisuus plasminogeeniaktivointiin kuin yksisäikeisellä muodolla (patenttijulkaisu EP 112122A). Tiedetään kuitenkin, että sc-TPA:lla on voimakas kyky sitoutua fibriiniin kuin dc-TPA:lla ja sitouduttuaan fibriiniin, se muuntuu dc-TPA:ksi (D.C. Rijken et al., J. Biol. Chem. 257 (1982) 2920 - 2925). Jotta saataisiin tehokas hoito verisuonitukoksiin (tromboosiin) tPA:lla, täytyy saada aikaan tPA:n lisääntynyt sitoutumiskyky fibriiniin veren hyytymisessä käyttämällä tPA:n seosta, joka sisältää lisääntyneen määrän sc-TPA:ta tai käyttämällä preparaattia, joka sisältää ainoastaan sc-TPA:ta.

Näissä olosuhteissa ja kun tarkoituksena on tutkia tPA:n ominaisuuksia ja toimintaa yksityiskohtaisemmin, on ollut suuri tarve parantaa menetelmiä, joilla saadaan yksinomaan yksisäikeistä muotoa ja joilla eristetään yksisäikeinen ja kaksisäikeinen muoto erikseen niiden seoksesta.

Ennestään tunnetussa menetelmässä tPA:n valmistamiseksi viljellään esimerkiksi sellaisia soluja, jotka ovat syntyjään kykeneviä tuottamaan tPA:ta tai manipuloitu kantamaan tPA-geeniä, ja sitten eristetään tPA saadusta soluviljelmästä ja/tai viljelmäliuoksen supernatantista. Esimerkiksi yllämainitussa patenttijulkaisussa EP 112122A on selitetty menetelmä tPA:n puhdistamiseksi käyttäen Erytrina-trypsiini-inhibiittoria (tästä lähtien merkittynä ETI) tai immobilisoitua Kunits -inhibiittoria, joka tuotetaan Erytrina latissiman ja muissa Erytrina kasvien siemenissä ja toimii trypsiinin, plasmiinin ja tPA:n inhibiittorina, mutta ei urokinaasin inhibiittorina. Tässä menetelmässä kuitenkin ei ole otettu huomioon erillistä sc-TPA:n eristämistä dc-TPA:sta.

Aikaisemmin tunnetussa sc-TPA:n valmistusmenetelmässä proteinaasi-inhibiittori, kuten aprotiniini, lisätään elatusnesteseen estämään tPA:n muuntumista yksisäikeisestä kaksisäikeiseksi muodoksi (D.C.Rijken et al., J. Biol. Chem 256 (1981) 7035 - 7041).

Eräässä toisessa sc-TPA:n puhdistusmenetelmässä käytetään immobilisoitua monokloonista vasta-ainetta, joka adsorboi spesifisesti sc-TPA:n (BioPoolin luettelo, Ruotsi). Tämä menetelmä on kuitenkin huonompi verrattuna menetelmään, jossa ETI vastaa tPA:n adsorbtiokapasiteetista ja käytetyn pylvään stabiilisuudesta. Valitettavasti tämä menetelmä ei voi poistaa epäpuhtautta, joka on proteiini, jonka molekyylipaino on  $110000 \pm 20000$  daltonia ja potentiaalisesti toimii antigeeninä reagoidessaan anti-ihmis-tPA-vasta-aineen kanssa.

### Keksinnön yhteenveto

Useiden tutkimusten kuluessa, jotka käsittivät menetelmiä tPA:n puhdistamiseksi raaka-tPA preparaattista, neljä tämän keksinnön keksijää haki patenttia keksinnölle, joka sisältää menetelmän eristää ja poistaa proteiini, jolla on molekyyli-paino  $110000 \pm 20000$  daltonia ja joka reagoi anti-ihmis-tPA-vasta-aineen kanssa, jota syntyy elatusnesteessä, joka sisältää sikiövasikan seerumia, ja menetelmän viljellä geeni-manipuloinnilla tuotettuja transformoituja soluja ja erottaa selektiivisesti ihmissolusta peräisin oleva tPA isäntäsolusta peräisin olevasta tPA:sta (hakemusjulkaisu FI 863111).

Ja edelleen laajojen tutkimusten kuluessa, jotka koskivat sc-TPA:n ja dc-TPA:n ominaisuuksia, tämän keksinnön keksijät ovat selvittäneet, että nämä kaksi tPA:n muotoa vaihtelevat affiniteetiltään ETI:iin nähden ja ovat nyt loppuunsaattaneet tämän keksinnön kyseisen havainnon tuloksena.

Tämän keksinnön kohteena on kehittää menetelmä sc-TPA:n ja dc-TPA:n eristämiseksi niiden seoksesta tehokkaasti ja helposti.

Toinen tämän keksinnön kohde on kehittää menetelmä sc-TPA:n ja /tai dc-TPA:n eristämiseksi raaka-tPA preparaattista, joka sisältää sc-TPA:ta ja dc-TPA:ta.

Menetelmät näiden tavoitteiden saavuttamiseksi koostuvat vaiheista, joissa sc-TPA:ta ja dc-TPA:ta sisältävä seos viedään läheiseen kosketukseen immobilisoidun ETI-pylvään kanssa tPA:n adsorboimiseksi ja sitten eluoidaan selektiivisesti haluttu sc-TPA ja/tai dc-TPA muuttamalla eluentin pH:ta tPA:n eluomiseksi.

Eräessä tämän keksinnön sovellutusmuodossa voidaan eristää yhtä kahdesta muodosta yksinomaan tai kaksi muotoa toisistaan ja puhdistaa halutusti.

Eräässä toisessa tämän keksinnön sovellutusmuodossa sc-TPA ja/tai dc-TPA voidaan tehokkaammin eristää ja puhdistaa liissämällä guanidiini- tai amidiinijohdannaisia, kuten arginiinia tai bentsamidiinia, eluenttiin eluoimaan tPA pylvästä.

Tämä keksintö on käyttökelpoinen riippumatta tPA:n tuottaneesta solutyypistä. Tarkemmin sanoen sc-TPA ja/tai dc-TPA voidaan eristää mistä tahansa nisäkässoluista kuten melanoomasoluista ja ihmisen normaaleista soluista tai soluista, joihin on lisätty ihmisen tPA-geeni geenimanipuloinnilla. Lisäksi tämä keksintö tekee mahdolliseksi eristää ja puhdistaa sc-TPA ja dc-TPA seerumipitoisesta väliaineesta samoin kuin seerumivapaasta väliaineesta, siis riippumatta elatusnesteestä koostumuksesta.

Yksityiskohtainen kuvaus suositeltavista suoritusmuodoista

Eräässä tämän keksinnön muodossa sc-TPA:n ja dc-TPA:n seos ajetaan ensiksi tPA:n adsorboimiseksi pylvään läpi, jossa on kantajana immobilisoitu ETI, minkä jälkeen sc-TPA eluoidaan eluentilla, jonka pH on vähintään 4,5 ja dc-TPA eluentilla, jonka pH on alle 4,5.

Toisessa tämän keksinnön muodossa sc-TPA:n ja/tai dc-TPA:n seos ajetaan läpi pylvään, jossa on kantajana immobilisoitu ETI, ja jos halutaan yksinomaan sc-TPA:ta, pylväs käsitellään eluentilla, jonka pH on vähintään 4,5, ja jos halutaan yksinomaan dc-TPA:ta, pylväs käsitellään eluentilla, jonka pH on alle 4,5. Näin joko sc-TPA tai dc-TPA voidaan eristää ja puhdistaa tarvittaessa.

Eräässä toisessa tämän keksinnön muodossa ylläesitetty eristys- ja puhdistusmenetelmä voidaan tehokkaammin suorittaa lisäämällä amidiinijohdosta tai guanidiinijohdosta, kuten arginiinia ja bentsamidiinia eluentin lisäaineeksi. Esimerkiksi eluointikuvaja, jossa on riittävän terävä tPA-affiniteetti-piikki (piikit), voidaan aina saada erilaisissa eluointiolosuhteissa, joihin kuuluu vaihtelu pylvään koossa ja vastaavassa.

Suosittelavat tämän keksinnön mukaiset esimerkit ETI:n immobilisointikantajaksi ovat liukenematon agarooosi, dekstraani, selluloosa, polyakryyliamidi ja polyeteeniglysidyylietakrylaattipolymeeri. Suositellavat menetelmistä ETI:n immobilisoinniksi koostuvat tavallisista tunnetuista menetelmistä, kuten tyypillisesti menetelmästä sitoa ETI kantajaan, joka on esiaktivoitu syaanibromidilla, hiili-imidokoplausmenetelmästä, missä vapaa aminoryhmä sidotaan vapaaseen karbonyyliryhmään, ja glutaarialdehydikoplausmenetelmästä, missä aminoryhmä sidotaan kantajaan, joka aikaisemmin on muunnettu aminoalkyyliinimuotoon. Eräs toinen esimerkki immobilisoiduksi ETI:n kantajaksi on perjodaattiaktivoitu kantaja, missä muodostunut aldehydiryhmä reagoi ETI:n aminoryhmän kanssa pH-välillä 4 - 6 ja Schiffin emäkseksi ja sen jälkeen pelkistetään natriumboorihydridillä tai natriumsyaaniboorihydridillä. Edelleen kantajamateriaali voidaan muuntaa hydratsiinisukkinyylijohtokseksi, jossa karboksyyli-ligandi sidotaan aminoryhmään EDC:n (1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi) tai diatsonoinnin kautta. Selluloosakuidut ja hiukkaset muutetaan hydratsiinijohdoksiksi, jolloin voidaan käyttää Parikh et al. :n mukaista menetelmää (Methods in Enzymology 34. 77 - 102, julkaisija W.B. Jakobi and Wilcheck, Academic Press, N.Y.). Polyakryyliamidihiuksat voidaan sitoa suoraan glutaarialdehydikoplausmenetelmällä tai p-aminobentsamidoetyylijohtoksen tai hydratsiinijohdoksen diatsonoinnilla.

Tämän keksinnön mukaisesti eluentit tPA:n eluimiseksi ovat happoliuokset, joiden pH on alle 6, vesiliukoiset suolaliuokset ja puskuriliuokset.

Suosittelavina esimerkkeinä tällaisista happoliuoksista ovat sellaiset, jotka sisältävät vähintään yhden hapon, joka on valittu hapoista, joihin kuuluu tyypillisesti sitruunahappo, oksaalihappo, maitohappo, meripihkahappo, etikkahappo, ftaalihappo, glutamiinihappo, asparagiinihappo, adipiinihappo, fosforihappo ja vetykloridihappo.

Suosittelavina esimerkkeinä tällaisista vesiliukoisista suolaliuoksista ovat vesiliuokset, jotka sisältävät vähintään yhden suolan, joka on valittu suoloista, joita ovat tyypillisesti natriumkloridi, kaliumkloridi, litiumkloridi, ammoniumkloridi, bariumkloridi, kalsiumkloridi, magnesiumkloridi, natriumsulfaatti, ammoniumsulfaatti, kaliumnitraatti, kaliumtiosyanaatti, natriumtiosyanaatti, ammoniumtiosyanaatti.

Edelleen esimerkkinä suositeltavista puskuriliuoksista ovat natriumfosfaattipuskuri, kaliumfosfaattipuskuri, veronaalipuskuri, seokset yhdistelmistä kuten natriumfosfaatti - fosforihappo, kaliumfosfaatti - fosforihappo, sitruunahappo - natriumsitraatti, meripihkahappo - boraatti, maitohappo - natriumlaktaatti, etikkahappo - natriumasettaatti, oksaalihappo - natriumoksaalaatti, glysiini - vetykloridihappo, kaliumvetyftalaatti - natriumhydroksidi.

Nämä eluentit voivat edelleen sisältää yhden tai useamman vesiliukoisen orgaanisen liuottimen.

Käytettäessä lisäaineena amidiinijohdosta tai guanidiinijohdosta tPA:n eluimiseksi suositeltava lisäainekonsentraatio on aluella 1 mM:sta maksimiliukoisuuteen. Esimerkiksi pH:ssa välillä 4,5 - 6,0 sopiva konsentraatio pienenee suh-

teessa lähestyttäessä pH:ta 4,5, kun taas korkeimpaa koncentraatiota tarvitaan lähestyttäessä pH:ta 6,0.

Tämä keksinnön eräs suoritusmuoto käsittää vaiheet, joissa ajetaan soluviljelmän supernatantti, jossa on ihmisen tPA:ta ETI-pylvään läpi tPA:n adsorboimiseksi, poistetaan epätoivotut proteiinit pesemällä, seuraavaksi otetaan talteen pylvästä sc-TPA käyttäen eluenttia, jonka pH on 4,5 - 6,0 li-säaineen kanssa ja sitten otetaan talteen dc-TPA muuttamalla eluentin pH alle 4,5.

Alan ammattimiehet tietävät, että amidiinijohdokset tai guanidiinijohdokset sitoutuvat kilpailevasti trypsiinityypin proteinaasin aktiiviseen keskukseen dissosioimaan entsyymi-inhibiittorikompleksin. Kuitenkin on täysin uutta tekniikkaa käyttää tätä ilmiötä tällaiseen spesifiseen tapaan eristää sc-TPA ja dc-TPA tarkoituksenmukaisimmissa eristysolosuhteissa.

Jos lähtöaine, jota käsitellään tämän keksinnön mukaan, sisältää mahdollisesti pieniä määriä epätoivottuja aineita, kuten trypsiinin tapaisia entsyymejä, jne., nämä aineet voidaan adsorboida tai desorboida ETI:stä ja ne toimivat interferoivina tekijöinä tämän keksinnön mukaisessa puhdistusprosessissa. Tarvittaessa suositellaan esikäsitelyä näiden epätoivottujen aineiden poistamiseksi.

Tämä poistamisprosessi suoritetaan käyttämällä immobilisointua soijapaputrypsiini-inhibiittoria (josta tästälähin käytetään lyhennettä STI) tai jotain muuta Kunits-tyyppistä inhibiittoria, jota syntyy soijapavun siemenissä ja jolla on samanlainen molekyylipaino kuin ETI:llä ja aminohapposekvenssi 80 %:sti homologinen verrattuna ETI:in.



STI on hyvin samanlainen kuin ETI spesifisyydessään, mutta se ei inhiboi tPA:ta. Näiden kahden inhibiittorin yhdistetty käyttö johtaa selektiivisyyteen, joka on verrannollinen siihen, joka saavutetaan käytettäessä immobilisoitua ei-ihmisen tPA monokloonista vasta-ainetta. Tämä menetelmä sisältää soluviljelmäliuoksen supernatantin, joka sisältää ihmisen tPA:ta, ajamisen immobilisoidun STI pylvään läpi sitomaan osan pientä määrää epätoivottua proteinaasia, joka sisältyy viljelmän supernatanttiin, ja sitten saadun effluentin ajamisen immobilisoidun ETI-pylvään läpi sitomaan tPA:n, ETI-pylvään pesun, jotta epätoivotut proteiinit poistuvat, ja lopuksi sc-TPA:n ja dc-TPA:n eristämisen ja puhdistamisen erillisesti muuttamalla eluentin pH:ta.

Erään tämän keksinnön tärkeän muodon mukaisesti saadaan menetelmä, joka on käyttökelpoinen riippumatta tPA:ta sisältävän solun tyypistä. Tarkemmin sanoen, tämä keksintö tekee mahdolliseksi eristää ja puhdistaa sc-TPA:n ja/tai dc-TPA:n mistä tahansa solutyypistä kuten melanoomasoluista, ihmisen normaalisoluista ja soluista, jotka on transformoitu ihmisen tPA-geenillä geenimanipulaatiolla. Lisäksi tämä keksintö tekee mahdolliseksi eristää ja puhdistaa sc-TPA ja/tai dc-TPA viljelmän supernatantista, johon on lisätty seerumia samoin kuin seerumivapaasta viljelmän supernatantista, siis riippumatta elatusnesteen koostumuksesta.

Erään toisen tämän keksinnön huomattavan suoritusmuodon mukaisesti kehitetty menetelmä on sopivasti käyttökelpoinen missä tahansa sc-TPA:n ja/tai dc-TPA:n eristys- ja puhdistusvaiheessa tPA:n erilaisissa käsittelyissä tai preparatiivisessa prosessissa tPA:n valmistamiseksi. Esimerkiksi halutun sc-TPA:n ja/tai dc-TPA:n eristäminen ja puhdistaminen suoritetaan viljelemällä soluja, jotka kykenevät tuottamaan tPA:ta ja sitten käsittelemällä saatua viljelmästä peräisin olevaa seosta tämän keksinnön mukaisella menetelmällä. Viljelmästä peräisin oleva seos tarkoittaa viljelysolujen raa-

kautosta, solutonta viljelmäsupernatanttia tai niiden prosessoitua materiaalia. Mikä tahansa näistä valitaan tarvittaessa.

Muut tämän keksinnön tärkeät muodot tulevat ymmärrettäviksi seuraavista ihmisen tPA:n puhdistusmenetelmien kuvauksista.

Esimerkki 1.

Seuraavissa esimerkeissä käytetyt pylväät, joissa on kantajana immobilisoitu affiniteettiagentti, ETI tai STI, valmistettiin seuraavalla tavalla.

Erytrina latissima:n siemenet koottiin ja valmistettiin Joubert et al. menetelmän mukaan (Hoppe-Seylers's Z. Physiol. Chem. 362 (1981) 531 - 538). Jauhetut siemenet, joista rasva oli poistettu, annettiin seisoa yli yön 10 °C lämpötilassa 0,5 M NaCl liuoksessa uuttumassa. Liuos siemenineen sentrifugoitiin supernatantin keräämiseksi ja aiottu aine kerättiin supernatantista ammoniumsulfaattilla saostamalla. Näin saatu materiaali kromatografoitiin onnistuneesti Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals), DEAE-selluloosa (Phoenix Chemicals) ja DEAE-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals) -geeleillä. Saatu puhdistettu valmiste antoi elektroforeesilla 15 % polyakryyliamidigeelissä, jossa oli 0,1 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS), yhden vyöhykkeen, jonka ilmeinen molekyylipaino oli 22000 daltonia.

Kaksikymmentäkuusi milligrammaa tätä puhdistettua valmistetta sidottiin 5 ml bromisyanidiaktivoituun agarosiin (Sepharose, Pharmacia Fine Chemicals), joka oli tasapainoitettu fosfaattipuskurilla, pH 7,4, joka sisälsi 0,4 M NaCl, 0,1 % Triton X-100 (Wako Jun-yaku Co., Japani) ja 0,02 % natriumatsidia stabilisattorina, ja lopuksi pakattiin kertakäyttömuoviruiskuun muodostamaan 5 ml pylvään (tästäälähin merkittynä ETI-Sepharosepylväs).

Kaksikymmentäviisi milligrammaa kromatografisesti puhdasta STI:tä (Sigma Co.) sidottiin 5 ml bromisyanidiaktivoituun agarosiin, joka oli tasapainoitettu fosfaattipuskurilla, pH 7,4, joka sisälsi 4 M NaCl, 0,1 % Triton X-100, ja lopuksi pakattiin kertakäyttömuoviruskuun muodostamaan 5 ml pylvään (tästäälähin merkittynä STI-Sepharosepylväs).

#### Esimerkki 2.

Kaksi litraa ihmisen melanoomasoluviljelmän supernatanttia (Bowes, ATCC CRL 1224 G361), joka sisälsi 10 % lämmöllä inaktivoitua (56 °C 30 min) sikiövasikan seerumia ja 20 KIU (Kallikrein inhibittoriyksikköä)/ml aprotiniiniä stabiloitiin 0,02 % Tween 80:lla (Wako Jun-yaku Co, Japani) ja 0,4 NaCl:lla ja ajettiin STI-Sepharosepylvääseen.

STI-pylväästä saatu eluentti kerättiin ja plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus mitattiin. Noin 98 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. Eluentti stabiloitiin 0,1 M NaCl:llä (lopullinen konsentraatio) ja sitten kohdistettiin ETI-Sepharosepylvääseen.

ETI-pylväästä tullut eluentti kerättiin ja mitattiin plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus. Noin 10 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. Anti-ihmis-tPA-vasta-aineilla suoritettulla tsymografiolla, joka suoritettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen, effluentti osoitti kaksi plasminogeeniaktivaattori-fraktiota, toisen, jolla oli molekyylipaino  $110000 \pm 20000$  daltonia ja toisen jolla molekyylipaino oli 70000 daltonia. Kun kaikki eluentti oli ajettu pylvään läpi, pylväs pestiin 20 kertaisella pylvään tilavuudella nestettä, joka sisälsi 1,0 M NaCl ja 0,2 % Tween 80. Talteenotetulla nesteellä oli noin 5 % aktiivisuus pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta ja se osoitti kaksi plasminogeeniaktivaattori-

fraktiota tsymografialla, toisen, jonka molekyylipaino oli 110000 ± 20000 daltonia, ja toisen, jonka molekyylipaino oli 70000 daltonia.

Pylvääseen adsorboituneet proteiinit eluoiitiin käyttämällä lineaarista pH gradienttia välillä 5,5 - 3,0 käyttäen 0,2 M sitruunahappopuskuria, joka sisälsi 0,15 M NaCl.

Tässä eluinnista havaittiin kaksi aktiivisuuspiikkiä, toinen pH:ssa 5,2 - 4,5 eluoitunut, ja toinen pH:ssa 4,5 - 3,7 eluoitunut piikki. Näillä kahdella fraktiolla oli yhteinen 70000 daltonin molekyylipaino SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Näiden yhdistettyjen fraktioiden aktiivisuus oli 80 - 85 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta.

Nämä kaksi fraktiota, sen jälkeen, kun ne oli pelkistetty β-merkaptoetanolilla, kohdistettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesiin ja hopeavärjäysanalyysiin. Paljastui, että fraktio, joka eluoitui pH-alueella 5,2 - 4,5, osoitti vyöhykkeen, jossa molekyylipaino oli 70000 daltonia tai hitaammin migratoituvan vyöhykkeen geelillä pelkistetyksen jälkeen, kun taas fraktio, joka eluoitui pH alueella 4,5 - 3,7, osoitti vyöhykkeen, jolla oli molekyylipaino 30000 - 40000 daltonia, mutta molekyylipainon 70000 daltonia molekyylipainon vyöhyke katosi pelkistetyksen jälkeen. Näiden tulosten perusteella puskurilla pH-välillä 5,2 - 4,5 eluoitunut tPA tunnistettiin sc-TPA:ksi ja pH-välillä 4,5 - 3,7 eluoitunut tPA tunnistettiin dc-TPA:ksi.

### Esimerkki 3.

Kaksi litraa ihmisen sikiön esinahan solujen soluviljelmän supernatanttia (Flow 7000 (Flow Laboratories Inc. USA)), joka sisälsi 10 % lämmöllä inaktioitua (56 °C 30 minuuttia) sikiövasikan seerumia ja 20 KIU/ml aprotiniinia stabiloitiin 0,02 % Tween 80:llä ja 0,4 NaCl:lla ja kohdistettiin

STI-Sepharosepylvääseen samalla tavalla kuin on kuvattu esimerkissä 2.

STI-pylväästä tullut eluentti kerättiin ja plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus mitattiin. Noin 98 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. Eluentti stabiloitiin 1,0 M NaCl:llä (lopullinen konsentraatio) ja kohdistettiin sitten ETI-Sepharosepylvääseen.

ETI-pylväästä tullut eluentti kerättiin ja mitattiin plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus. Noin 45 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen anti-ihmistPA-vasta-aineella tehdyllä tsymografialla eluentti osoitti useita fraktioita tai vyöhykkeitä plasminogeeniaktivaattorille muutamia vyöhykkeitä, joissa oli molekyylipaino noin 100000 daltonia, useita vyöhykkeitä, joissa molekyylipaino oli noin 50000 - 70000 daltonia, ja yhden vyöhykkeen, jossa molekyylipaino oli noin 35000 daltonia.

ETI-Sepharosepylväs pestiin 20 kertaisella pylvään tilavuudella 1,0 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7,5, joka sisälsi 1,0 M NaCl ja 0,2 % Tween 80. Talteenotetulla nesteellä oli noin 5 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta ja se osoitti samanlaisia tsymografisia vyöhykkeitä kuin yllä on kuvattu.

Eluutio suoritettiin samalla tavalla kuin on kuvattu esimerkissä 2, paitsi että käytettiin puskuria, joka sisälsi 0,15 M NaCl ja 0,1 M glysiiniä, pH 4,5 ja 3,5.

Tuloksena saatiin samanlainen eluutiokuvaaja, kuin havaittiin esimerkissä 2. Yhdistettyjen fraktioiden aktiivisuus oli 40-50 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta. Näillä kahdella fraktiolla oli keskimääräinen molekyylipaino 70000 daltonia SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Sen jälkeen, kun nämä kaksi fraktiota oli pelkistetty  $\beta$ -merkap-

toetanolilla, niille suoritettiin elektroforeesi ja hopeavärijäysanalyysi. Paljastui, että pH 4,5:n puskurilla eluoituneella fraktiolla oli molekyylipaino 70000 daltonia eikä se osoittanut muutosta molekyylipainossa tai hitaammin migraoituvan vyöhykkeen geelillä pelkistyksen jälkeen, kun taas fraktiolla, joka eluoitui pH 3,5:n puskurilla, osoitti vyöhykkeen, jolla oli molekyylipaino 30000 - 40000 daltonia, mutta ei sellaista vyöhykettä, joka vastaisi molekyylipainon 70000 daltonin vyöhykettä pelkistyksen jälkeen. Tästä tuloksesta pH:ssa 4,5 eluoitunut tPA tunnistettiin sc-TPA:ksi ja pH 3,5:ssa eluoitunut tPA tunnistettiin dc-TPA:ksi

#### Esimerkki 4.

Kaksi litraa hiiren fibroblastisolujen, joita oli transformoitu ihmisen tPA-geenillä (hakemusjulkaisu FI 864777), soluviljelmän supernatanttia, jota oli täydennetty 2 % lämmöllä inaktivoitua (56 °C 30 min) sikiövasikan seerumia ja 20 KIU/ml aprotiniiniä, stabiloitiin 0,02 % Tween 80:lla ja 0,4 NaCl:lla ja kohdistettiin STI-Sepharosepylvääseen.

STI-pylväästä tullut eluentti kerättiin ja plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus mitattiin. Noin 98 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. Eluentti stabiloitiin 1,0 M NaCl:llä (lopullinen konsentraatio) ja kohdistettiin ETI-Sepharosepylvääseen.

Eluentti ETI-pylväästä kerättiin ja mitattiin plasminogeenisyydestä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus. Noin 10 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. Anti-ihmisen tPA-vasta-aineilla suoritettulla tsymografialla, joka suoritettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen, eluentti osoitti kaksi fraktiota plasminogeeniaktivaattoria, toisen, jonka molekyylipaino oli  $110000 \pm 20000$  daltonia ja toisen, jonka molekyylipaino oli 70000 daltonia. Kun kaikki eluentti oli ajettu pylvään läpi, pylväs pes-

tiin 20 kertaisella pylvään tilavuudella nestettä, joka sisälsi 2,0 M NaCl ja 0,2 % Tween 80. Talteenotettulla nesteellä oli noin 5 % pylväaseen käytetystä aktiivisuudesta ja se osoitti kaksi plaminogeeniaktivaattorifraktiota tsymografiolla, toisella molekyylipaino oli  $110000 \pm 20000$  daltonia, ja toisella molekyylipaino oli 70000 daltonia.

Pylväaseen adsorboitunut proteiini eluoiitiin 0,2 M natriumfosfaattiliuoksella, joka sisälsi 0,15 M NaCl, pH 4,5 ja pH 3,5. Havaittiin samanlainen eluutiokuvaaja kuin esimerkissä 2. Tuloksena saatujen kahden fraktion yhteinen aktiivisuus oli 80 % pylväaseen käytetystä aktiivisuudesta. Näillä kahdella fraktiolla oli yhteinen 70000 daltonin molekyylipaino SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla.

Näille kahdelle fraktiolle, sen jälkeen, kun ne oli pelkistetty  $\beta$ -merkaptotoetanolilla, tehtiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi ja hopeavärjäysanalyysi. Paljastui että pH:ssa 4,5 eluoitunut liuos osoitti vyöhykkeen, jolla oli molekyylipaino 70000 daltonia ja siten se ei osoittanut muu-  
tosta molekyylipainossa tai hitaammin migratoituvan vyöhykkeen geelillä pelkistetyksen jälkeen, kun taas pH 3,5 liuos osoitti vyöhykkeen, jolla oli molekyylipaino 30000 - 40000 daltonia, mutta ei sellaista vyöhykettä, joka vastaisi molekyylipainon 70000 vyöhykettä pelkistetyksen jälkeen. Tästä tuloksesta pH:ssa 4,5 eluoitunut tPA tunnistettiin sc-TPA:ksi ja pH:ssa 3,5 eluoitunut tPA tunnistettiin dc-TPA:ksi.

Esimerkki 5

Kaksi litraa ihmisen melanoomasoluviljelmän supernatanttia (Bowes, ATCC CRL 1224 G361), joka sisälsi 10 % lämmöllä inaktivoitua (56 °C 30 min) sikiövasikan seerumia ja 20 KIU/ml aprotiniinia, stabiloitiin 0,02 % Tween 80:llä ja 1 M NaCl:lla ja ajettiin ETI-Sepharosepylväaseen?

Pylväästä kerättiin eluentti ja mitattiin plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus. Noin 10 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. Anti-ihmis-tPA-vasta-aineilla suoritettulla tsymografiolla, joka suoritettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen, effluentti osoitti kaksi fraktiota plasminogeeniaktivaattoria, toisen jolla oli molekyylipaino  $110000 \pm 20000$  daltonia ja toisen, jolla molekyylipaino oli  $70000$  daltonia.

Kun kaikki eluentti oli ajettu pylvään läpi, pylväs pestiin 20 kertaisella pylvään tilavuudella nestettä, joka sisälsi 2 M NaCl ja 0,2 % Tween 80. Talteenotetulla nesteellä oli noin 5 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta ja se osoitti kaksi plasminogeeniaktivaattorifraktiota tsymografiolla, toisen, jonka molekyylipaino oli  $110000 \pm 20000$  daltonia ja toisen, jonka molekyylipaino oli  $70000$  daltonia.

Pylvääseen adsorboituneet proteiinit eluoitiin käyttämällä lineaarista pH-gradienttia 6,5 - 3,0 käyttäen 0,2 M veronaalipuskuria, joka sisälsi 0,2 M bentsamidiinia ja 0,15 M NaCl.

Tällä eluutiolla havaittiin kaksi aktiivisuuspiikkiä, yksi piikki, joka eluoitui pH-alueella 6,0 - 4,5 ja toinen pH-alueella 4,5 - 3,5. Näillä kahdella fraktiolla oli yhteinen  $70000$  daltonin molekyylipaino SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Näiden yhdistettyjen fraktioiden aktiivisuus oli 80 - 85 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta.

Sen jälkeen, kun nämä kaksi fraktiota oli pelkistetty  $\beta$ -merkaptotoetanolilla, niille tehtiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi ja hopeavärjäysanalyysi. Paljastui, että pH-alueella 6,0 - 4,5 eluoitunut fraktio osoitti vyöhykkeen, jonka molekyylipaino oli  $70000$  daltonia ja siten ei muutosta molekyylipainossa, tai hitaammin migratoituvan vyö-



hykkeen geelin pelkistuksen jälkeen, kun taas fraktio, joka eluoitui pH-alueella 4,5 - 3,5 osoitti vyöhykkeen, jolla oli molekyylipaino noin 30000 - 40000 daltonia, mutta molekyylipainon 70000 daltonia vyöhyke katosi pelkistuksen jälkeen. Näistä tuloksista puskurilla pH:ssa 6,0 - 4,5 eluoitunut tPA tunnistettiin sc-TPA:ksi ja pH alueella 4,5 - 3,5 eluoitunut tPA tunnistettiin dc-TPA:ksi.

#### Esimerkki 6.

Kaksi litraa ihmisen sikiön esinahan solujen (Flow 7000) soluviljelmän supernatanttia, joka sisälsi 10 % lämmöllä inaktivoitua (56 °C 30 minuuttia) sikiövasikan seerumia ja 20 KIU/ml aprotiniinia stabiloitiin 0,02 % Tween 80:lla ja 1 M NaCl:lla ja kohdistettiin ETI-Sepharosepylvääseen.

ETI-pylväästä kerättiin eluentti ja mitattiin plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus. Noin 45 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin.

SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen tehdyn tsymografian mukaan effluentti osoitti useita fraktioita tai vyöhykkeitä plasminogeeniaktivaattorille; muutamia vyöhykkeitä, joissa oli molekyylipaino noin 100000 daltonia ja useita vyöhykkeitä, joissa molekyylipaino oli noin 50000 - 70000 daltonia ja yhden vyöhykkeen, jossa molekyylipaino oli noin 35000 daltonia.

ETI-Sepharosepylväs pestiin 20 kertaisella pylvään tilavuudella nestettä, joka sisälsi 0,1 M dinatriumfosfaatti-natriumhydroksidipuskuria, pH 9,5, joka sisälsi 2,0 M NaCl. Talteenotetulla nesteellä oli noin 5 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta ja se osoitti samat vyöhykkeet kuin yllä tsymografialla kuvatussa.

Eluutio suoritettiin 0,1 M natriumfosfaatti-fosforihappoliuoksella, joka sisälsi 0,3 M arginiinia ja 0,15 M NaCl (pH 5,5), ja 0,2 M sitruunahappopuskurilla (pH 3,0), joka sisälsi 0,15 M NaCl.

Tuloksena saatiin eluaatista kaksi fraktiota eri pH-puskureilla. Yhdistettyjen fraktioiden aktiivisuus oli 40 - 50 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta. Näillä kahdella fraktiolla oli yhteinen 70000 daltonin molekyylipaino SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla.

Näille kahdelle fraktiolle, sen jälkeen, kun ne oli pelkistetty  $\beta$ -merkaptoetanolilla, tehtiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi ja hopeavärjäysanalyysi. Paljastui, että pH 5,5-puskurilla eluaatilla oli molekyylipainon 70000 daltonin vyöhyke ja siten se ei osoittanut muutosta molekyyli-painossa tai osoitti hitaammin migratoituvan vyöhykkeen geelillä pelkistetyksen jälkeen, kun taas pH 3,0 -puskurilla eluaatilla oli vyöhyke, jonka molekyylipaino oli 30000 - 40000 daltonia, mutta molekyylipainon 70000 vyöhykettä vastaava vyöhyke katosi pelkistetyksen jälkeen.

Tästä tuloksesta pH:ssa 4,5 eluoitunut tPA tunnistettiin sc-TPA:ksi ja pH:ssa 3,5 eluoitunut tPA tunnistettiin dc-TPA:ksi.

Esimerkki 7.

Kaksi litraa hiiren fibroblastisolujen, joita oli transformoitu ihmisen-tPA geenillä (hakemusjulkaisu FI 864777), supernatanttia, joka lisäksi sisälsi 10 % lämmöllä inaktivoitua (56 °C 30 min) sikiövasikan seerumia ja 20 KIU/ml aprotiniinia, stabiloitiin 1 M NaCl:lla ja kohdistettiin ETI-Sepharosepylvääseen.

Eluentti ETI-pylväästä kerättiin ja mitattiin plasminogeenistä riippuva fibrinolyttinen aktiivisuus. Noin 10 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin. Anti-ihmistPA-vasta-aineilla suoritettulla tsymograafialla, joka suoritettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen, effluentti osoitti kaksi fraktiota plasminogeeniaktivaattorille, toisen, jonka molekyylipaino oli noin  $110000 \pm 20000$  daltonia ja toisen, missä molekyylipaino oli noin 70000 daltonia. Kun kaikki eluentti oli ajettu pylvään läpi, pylväs pestiin 20 kertaisella pylvään tilavuudella 2 M NaCl-liuosta. Talteenotetulla nesteellä oli noin 5 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta ja se osoitti tsymografialla kaksi vyöhykettä plasminogeeniaktivaattorille, toisella oli molekyylipaino  $110000 \pm 20000$  daltonia, ja toisella molekyylipaino 70000 daltonia.

Pylvääseen adsorboituneet proteiinit eluoitiin sitten 0,1 M natriumfosfaattipuskurilla (pH6,0), joka sisälsi 0,5 M bentsamidiinia ja 0,15 M NaCl, ja 0,1 M sitruunahappopuskurilla (pH 3,0), joka sisälsi 0,15 M NaCl. Kaksi erilaista fraktiota saatiin kahdesta erilaisesta eluaatista. Saatujen kahden fraktion yhteinen aktiivisuus oli 80 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta. Näillä kahdella fraktiolla oli yhteinen 70000 daltonin molekyylipaino SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla.

Sen jälkeen, kun nämä kaksi fraktiota oli pelkistetty  $\beta$ -merkapttoetanolilla, niille tehtiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi ja sitten hopeavärjäysanalyysi. Paljastui, että pH 6,0 puskurilla eluaatti osoitti molekyylipainon noin 70000 daltonin vyöhykkeen ja siten ei muutosta muutosta molekyylipainossa tai hitaamiin migratoituvan vyöhykkeengeelillä pelkistetyksen jälkeen, kun taas pH3,0 puskurilla eluaatti osoitti vyöhykkeen, jolla oli molekyylipaino 30000 - 40000 daltonia, mutta ei sellaista vyöhykettä, joka vas-

taisi molekyylipainon 70000 vyöhykettä pelkistyksen jälkeen. Tästä tuloksesta pH:ssa 6,0 eluoitunut tPA tunnistettiin sc-TPA:ksi ja pH:ssa 3,0 eluotitunut tPA tunnistettiin dc-TPA:ksi.

#### Esimerkki 8.

Kaksi litraa kiinanhamsterin munasarjasolujen, joita oli transformoitu ihmisen tPA-geenillä (CHO-cell C1271, ATCC CRL 1616), viljelyn supernatanttia, joka sisälsi 10 % lämmöllä inaktivoitua (56 °C 30 min) sikiövasikan seerumia ja 20 KIU/ml aprotiniinia, stabiloitiin 1 M NaCl ja kohdistettiin 5 ml ETI-Sepharosepylvääseen, joka oli tasapainoitettu 0,05 M natriumfosfaattipuskurilla (pH 7,5), joka sisälsi 1,0 M NaCl. Pylväs pestiin sen jälkeen 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:lla (pH 9,5), joka sisälsi 2,0 M NaCl ja 10 mM arginiinia.

ETI-pylvään koko eluentilla oli noin 10 % pylvääseen käytetystä plasminogeenistä riippuvasta fibrinolyttisestä aktiivisuudesta, ja sillä oli tsymografiolla vyöhyke, jonka molekyylipaino oli 110000 ± 20000 daltonia ja vyöhyke, jonka molekyylipaino oli 70000 daltonia.

Pylvääseen adsorboituneet proteiinit eluoiitiin ensiksi 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - NaOH puskurilla (pH 4,5), joka sisälsi 0,01 M arginiinia ja 0,1 M NaCl. Eluaatin fibrinolyttinen aktiivisuus oli 60 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta. Pylvääseen jääneet proteiinit eluoiitiin 0,1 M sitruunahappopuskurilla (pH 3,0), joka sisälsi 0,1 M NaCl. Noin 25 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta saatiin talteen. Näillä kahdella fraktiolla oli yhteinen 70000 daltonin molekyylipaino SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla.

Sen jälkeen, kun nämä kaksi fraktiota oli pelkistetty β-merkaptotetanolilla, niille tehtiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi ja hopeavärjäysanalyysi. Paljastui, että

pelkistyksen jälkeen 4,5 pH:n eluaatti osoitti vyöhykkeen, missä oli molekyylipaino 70000 daltonia ja siten ei muutosta molekyylipainossa, tai hitaammin migratoituvan vyöhykkeen geelin pelkistyksen jälkeen, kun taas pH 3,0 puskurilla eluaatti osoitti vyöhykkeen, jolla oli molekyylipaino 30000 - 40000 daltonia, mutta molekyylipainon 70000 daltonia vyöhyke katosi pelkistyksen jälkeen. Tästä tuloksesta vahvistui, että pH:ssa 4,5 puskurilla eluoitunut tPA oli sc-TPA ja pH:ssa 3,0 eluoitunut tPA oli dc-TPA.

Kokeellisista tuloksista pH:n ja arginiinin konsentraation välinen suhde sc-TPA:n eluomiseksi paljastui seuraavaksi. pH:ssa 4,5, 1 mM - 50 mM; pH:ssa 5,0, 0,03 M tai enemmän; pH:ssa 5,5, 0,10 M tai enemmän ja pH:ssa 6,0, 0,2 M tai enemmän.

Esimerkki 9.

Yksi mooli NaCl (lopullinen konsentraatio) lisättiin 2 litraan ihmisen sikiön amnionkalvon solujen supernatanttiin (FL, ATCC CCL-62), jotka oli transformoitu ihmisen tPA-geenillä, johon oli assosioitu ihmisen sytomegalovirus (HCMV) promoottorina ihmisen tPA-ekspressioon. Soluviljelmän supernatantista puhdistettiin sitten yksisäikeinen tPA ja kaksisäikeinen tPA käyttäen ETI-pylvästä samaan tapaan kuin kuvattiin esimerkissä 8.

pH:ssa 4,5 ja 3,0 eluoituneiden fraktioiden fibrinolyytinen aktiivisuus oli noin 70 % ja noin 15 %, vastaavasti, pylväseen käytetystä aktiivisuudesta.

Esimerkki 10.

Isäntäsolut Saccharomyces cerevisiae, jotka oli transformoitu ihmisen tPA geenillä, viljeltiin tavanomaisella menetelmällä (Principles and Practice of Recombinant DNA Research

with Yeast in the Molecular Biology of Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression pp. 603 - 636, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982).

Solut rikottiin lasihelmillä ja upotettiin uutettavaksi 0,05 M natriumfosfaattipuskuriin (pH 7,5), joka sisälsi 1 M NaCl ja 0,02 % Tween 80. Suodatetulle uutteelle tehtiin tPA:n puhdistus samalla tavalla kuin esimerkissä 6.

Puskurilla pH 5,5 saadulla eluaatilla oli molekyylipaino 70000 daltonia, mikä ei muuttunut pelkistyksessä, joka tehtiin kuten yllä olevissa esimerkeissä 2 - 8, ja osoitti 85 % aktiivisuutta pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta. Puskurin pH 3,0 eluaatin molekyylipaino (70000 daltonia) muuttui pelkistyksessä, siis, vyöhyke, jolla oli molekyylipaino 70000 daltonia katosi ja vyöhyke, jolla oli molekyylipaino 30000 - 40000 daltonia, ilmestyi sen sijaan. Noin 10 % pylvääseen käytetystä aktiivisuudesta havaittiin tässä eluaatissa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä yksisäikeisen kudospasminogeeniaktivaattorin (tPA) ja kaksisäikeisen tPA:n puhdistamiseksi ja eristämiseksi erikseen niitä molempia sisältävästä seoksesta, **tunnettu** siitä, että menetelmä sisältää seuraavat vaiheet:

(a) seos, joka sisältää yksisäikeisiä ja kaksisäikeisiä tPA:ita, viedään pylvääseen, jossa on immobilisoitua Erytrina trypsiini-inhibiittoria affiniteettiaineena näiden tPA:ien adsorboimiseksi tähän pylvääseen;

(b) pylväs käsitellään eluentilla, jonka pH on alueella 4,5 - 6,0 yksisäikeisen tPA:n eluomiseksi selektiivisesti,

(c) pylväs käsitellään eluentilla, jonka pH on alle 4,5 kaksisäikeisen tPA:n eluomiseksi selektiivisesti.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eluentti sisältää amidiinijohdoksen tai guanidiinijohdoksen.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eluentti sisältää amidiinijohdoksen tai guanidiinijohdoksen, jonka konsentraatio on vähintään 1 mM.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että amidiinijohdos on bentsamidiini.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että guanidiinijohdos on arginiini.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että seos on peräisin tPA:n tuottavien solujen soluviljelmästä.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että soluviljelmän solut ovat melanoomasoluja.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että soluviljelmän solut ovat rekombinanttisoluja, jotka on transformoitu siirtämällä niihin ihmisen tPA-geeni.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että soluviljelmän solut ovat kiinanhamsterin munasarjasoluja, hiivasoluja tai hiiren fibroblastisoluja.

10. Menetelmä yksisäikeisen kudospasminogeeniaktivaattorin (tPA) puhdistamiseksi ja eristämiseksi seoksesta, joka sisältää yksisäikeistä tPA:ta ja kaksisäikeistä tPA:ta, **tunnettu** siitä, että se sisältää vaiheet, joissa tämä seos viedään pylvääseen, jossa on immobilisoitua Erytrina trypsiini-

inhibiittoria affiniteettiagenttina tämän seoksen tPA:ien adsorboimiseksi tähän pylvääseen, ja sitten eluoidaan selektiivisesti tähän pylvääseen adsorboitu mainittu yksisäikeinen tPA eluentilla, jonka pH on alueella 4,5 - 6,0.

5        11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eluentti sisältää amidiinijohdoksen tai guaniidiinijohdoksen.

10        12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eluentti sisältää amidiinijohdoksen tai guaniidiinijohdoksen, jonka konsentraatio on vähintään 1 mM.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että amidiinijohdos on bentsamidiini.

14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että guanidiinijohdos on arginiini.

15        15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että seos on peräisin tPA:n tuottavien solujen soluviljelmästä.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että soluviljelmän solut ovat melanoomasoluja.

20        17. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että soluviljelmän solut ovat rekombinanttisoluja, jotka on transformoitu siirtämällä niihin ihmisen tPA-geeni.

25        18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että soluviljelmän solut ovat kiinanhamsterin munasarjasoluja, hiivasoluja tai hiiren fibroblastisoluja.



Patentkrav

1. Förfarande för separat rening och separering av enkelkedjig vävnadsplasminogenaktivator (tPA) och dubbelkedjig tPA från en blandning, som innehåller dessa båda, **kännetecknat av**, att förfarandet består av följande steg:

(a) en blandning, som innehåller enkelkedjig och dubbelkedjig tPA, bringas i en kolonn, som innehåller en immobiliserad Erythrina-trypsininhibitor som ett affinitetsmedel för att adsorbera dessa tPA:n i kolonnen;

(b) kolonnen behandlas med ett elueringsmedium med ett pH-värde av 4,5 - 6,0 för att selektivt eluera den enkelkedjiga tPA;

(c) kolonnen behandlas med ett elueringsmedium med ett pH-värde av mindre än 4,5 för att selektivt eluera den dubbelkedjiga tPA.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat av**, att elueringsmediet innehåller ett amidinderivat eller ett guanidinderivat.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat av**, att elueringsmediet innehåller ett amidinderivat eller ett guanidinderivat med en koncentration av minst 1 mM.

4. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat av**, att amidinderivatet är bensamidin.

5. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat av**, att guanidinderivatet är arginin.

6. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat av**, att blandningen erhålls från en odling av tPA-alstrande celler.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, **kännetecknat av**, att odlingens celler är melanomceller.

8. Förfarande enligt patentkrav 6, **kännetecknat av**, att odlingens celler är rekombinantceller, som transformerats genom att införa human-tPA-gen.

9. Förfarande enligt patentkrav 8, **kännetecknat av**, att odlingens celler är äggstocksceller från kinesisk hamster, jästceller eller musfibroblastceller.

10. Förfarande för rening och separering av enkelkedjig vävnadsplasminogenaktivator (tPA) från en blandning, som innehåller enkelkedjig tPA och dubbelkedjig tPA, **kännetecknat av**, att det består av stegen i vilka denna blandning bringas

i en kolonn, som innehåller en immobiliserad Erythrina-trypsin-inhibitor som ett affinitetsmedel för att adsorbera tPA:n av blandningen i kolonnen och därefter selektivt elueras den enkelkedjiga tPA, som har adsorberats på kolonnen, med ett elueringsmedium med ett pH-värde av 4,5 - 6.0.

5

11. Förfarande enligt patentkrav 10, **kännetecknat av**, att elueringsmediet innehåller ett amidinderivat eller ett guanidinderivat.

10

12. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat av**, att elueringsmediet innehåller ett amidinderivat eller ett guanidinderivat med en koncentration av minst 1 mM.

13. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat av**, att amidinderivatet är bensamidin.

15

14. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat av**, att guanidinderivatet är arginin.

15. Förfarande enligt patentkrav 10, **kännetecknat av**, att blandningen erhålls från en odling av tPA-alstrande celler.

16. Förfarande enligt patentkrav 15, **kännetecknat av**, att odlingens celler är melanomceller.

20

17. Förfarande enligt patentkrav 15, **kännetecknat av**, att odlingens celler är rekombinantceller, som transformerats genom att införa human-tPA-gen.

25

18. Förfarande enligt patentkrav 17, **kännetecknat av**, att odlingens celler är äggstocksceller från kinesisk hamster, jästceller eller musfibroblastceller.