



C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 28 04 1983  
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 9/64, A 61K 37/54, C 07K 13/00

(21) Patentihakemus - Patentansökning 873470  
(22) Hakempäivä - Ansökningsdag 10.08.87  
(24) Alkupäivä - Löpdag 10.08.87  
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 12.02.88  
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -  
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 15.01.93  
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet  
11.08.86 JP 61-186851 P

**SUOMI-FINLAND**

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. **Mitsui Toatsu Chemicals, Incorporated**, 2-5, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 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**, 39-14-301, Kawauchi 5-chome, Asaminami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima-ken, Japan, (JP)
5. **Kawashima, Nobuhiro**, 8587-3, Tana, Sagamihara-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, Kunizou**, 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 tPA:n puhdistamiseksi raakavalmisteista**  
**Förfarande för rengöring av tPA från råpreparat**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI B 81377 (C 12N 5/00, p. 14-15), US A 3542646 (C 07G 7/026), US A 3904480 (C 07G 7/026)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Kudosplasminogeeniaktivaattorilajit (tPA), joilla on tietty molekyyllipaino voidaan eristää puhtaassa muodossa tPA:n raakavalmisteesta, joka sisältää useita eri tPA-lajeja joilla on eri molekyyllipainot, saattamalla tPA:n raakavalmiste kosketukseen hydroksiapatiitin kanssa sekä erikseen eristämällä adsorboituneet tPA-lajit käyttäen eluenteja joiden pH-arvot ja/tai suolakonsentraatiot vaihtelevat.

Vävnadsplasminogenaktivatorarter (tPA) med en specifik molekylvikt kan isoleras i en ren form från ett rått tPA-preparat som innehåller olika tPA-arter med olika molekylvikt, genom att bringa ett rått tPA-preparat i kontakt med hydroxiapatit och genom att sedan separat eluera de adsorberade tPA-arterna med eluenter vars pH och/eller saltkoncentrationer varierar.

## Menetelmä tPA:n puhdistamiseksi raakavalmisteista

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään kudospasminogeeniaktivaattorin (tPA) puhdistamiseksi, tarkemmin sanoen menetelmään tPA:n puhdistamiseksi tPA:n raakavalmisteesta, joka sisältää useita tPA-lajeja erilaisilla molekyylipainoilla ja muita proteiinipitoisia epäpuhtauksia, saattamalla tPA:n raakavalmiste kosketuksiin hydroksiapatiitin kanssa, sekä eristämällä ja puhdistamalla eri molekyylipainoisia tPA-lajeja eluenteilla, joiden pH ja/tai suolakonsentraatiot on säädetty etukäteen, ja joihin tarpeen vaatiessa voidaan lisätä yhtä tai useampaa lisäainetta.

Hydroksiapatiitin käyttö tPA:n puhdistamiseksi on sinänsä tunnettua. Menetelmässä, jossa käytetään hydroksiapatiittia tPA:n saamiseksi tPA:n raakavalmisteesta, tPA adsorboidaan hydroksiapatiittiin, jonka jälkeen se eluoidaan tPA-kantavasta hydroksiapatiitista ammoniakkipitoisella liuoksella (ks. esim. julkinen japanilainen patenttijulkaisu nro. 76419/1986). Yllä kuvatussa eluoinnissa käytetyt olosuhteet eivät mahdollistaneet eri molekyylipainoisten tPA-lajien erottamisen toisistaan ja lisäksi tPA:n aktiviteetti saattoi laskea.

Tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota menetelmä jokaisen tPA-lajin eristämiseksi tPA:n raakavalmisteista - joilla on erilaiset molekyylipainot ja jotka reagoivat anti-humaanisen tPA:n vasta-aineen kanssa, jolloin tPA:n aktiviteetti ei muutu koko puhdistusprosessin aikana, poiketen näin yllämainitusta konventionaalisesta menetelmästä. Näihin tPA-lajeihin kuuluvat

tPA, tPA:n aktiiviset hajoamistuotteet, tPA:n polymeerit, tPA:n kompleksit ja muut proteiinit ym.

Kun tPA-tuottavia soluja viljellään tPA:n saamiseksi, on todettu että muodostunut viljelyliemi, anti-humaanisten tPA-vasta-aineiden kanssa reaktiivisia olevina proteiineina, sisältää laajan joukon tPA-lajeja joilla on erilaiset molekyylipainot, mihin joukkoon kuuluvat sellaiset tPA-lajit joiden molekyylipainot vaihtelevat 30000 - noin 45000 dalton:iin, tPA-lajit joiden molekyylipainot vaihtelevat noin 50000 noin 70000 dalton:iin sekä tPA-lajit joiden molekyylipainot ovat noin 100000 daltonia tai korkeampia.

Tämän vuoksi keksinnön kohteena olevan menetelmän tarkoituksena on tarjota menetelmä tietyn molekyylipainon omaavan tPA:n eristämiseksi ja puhdistamiseksi joukosta tPA-lajeja, joiden molekyylipainot vaihtelevat, sekä eri olomuodoissa olevista proteiinipitoisista epäpuhtauksista, kuten yllä mainittiin.

Kyseessä olevat keksijät ovat suorittaneet laajan tutkimustyön saavuttaakseen yllä mainitun tavoitteen. Tuloksena on että tPA:n adsorptioaste hydroksiapatiittin riippuu pH:sta ja/tai suolakonsentraatiosta sekä myös vaihtelee tPA:n molekyylipainon mukaan. tPA:n sidosvoimakkuus hydroksiapatiittiin kasvaa nimitäin pH:n laskiessa tai suolakonsentraation pienentyessä. Samalla pH:lla ja samalla suolakonsentraatiolla korkeamman molekyylipainon omaava tPA adsorboituu tiiviimmin.

Yllä mainittu löytö on sitten johtanut tämän keksinnön mukaisen

menetelmän loppuunsaattamiseen, missä keksinnössä joukko tPA-lajeja, joiden molekyylipainot vaihtelevat adsorboidaan hydroksiapatiittiin jonka jälkeen tämä käsitellään eluenteilla, joiden pH:t ja/tai suolakonsentraatiot vaihtelevat, jotta tiettyjen tPA-lajien eristäminen puhtaassa muodossa onnistuisi.

Yksi tämän keksinnön tarkoituksista on täten tarjota menetelmä tPA:n puhdistamiseksi tPA:n raakavalmisteesta, joka sisältää joukon tPA-lajeja joiden molekyylipainot vaihtelevat, missä menetelmässä ensin saatetaan tPA:n raakavalmiste kosketuksiin hydroksiapatiitin kanssa jolloin eri tPA-lajit adsorboituvat hydroksiapatiittiin jonka jälkeen tPA-lajit eluoidaan eluenteilla, joiden pH:t ja/tai suolakonsentraatiot vaihtelevat, jolloin saadaan eri molekyylipainoja omaavat tPA-lajit eristetyksi toisistaan.

Vaikkakin hydroksiapatiitin käyttö proteiinien puhdistamiseksi on tullut tunnetuksi, ei ole ilmoitettu että olisi voitu eristää tietty tPA-laji joukosta tPA-lajeja, niin kuin tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä.

Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä tPA voidaan saada talteen jopa 90 - 100 %:isesti aktiviteettina mitattuna ja se voidaan myös eristää yksilöllisiin tPA-lajeihin joiden molekyylipainot vaihtelevat käyttämättä nestemäistä ammoniakkia eluettina tPA:n adsorboimiseksi hydroksiapatiittiin, konventionaalisista menetelmistä poiketen.

Kudosplasminogeeniaktivaattoria (tPA) tuotetaan korkeampien

eläinten kudoksissa, ja se on proteiini joka aktivoi plasminogeenin, plasmiinin prekursorin joka on fibriinille spesifinen proteolyyttinen entsyymi.

Kyseessä oleva tPA tuotetaan viljelyväliaineessa viljelemällä ihmisen melanoomasoluja, normaaleja ihmissoluja, tai soluja jotka kantavat ihmisen tPA-geenin integroituna rekombinantti DNA-teknologian mukaisesti. tPA jota saadaan muodostuneesta viljelyliemestä käsittää laajan joukon tPA-lajeja joiden molekyylipainot vaihtelevat.

tPA:n raakavalmiste, johon kyseessä olevan keksinnön mukainen menetelmä voidaan tehokkaasti soveltaa, sisältää useita molekyyllilajeja joita on valmistettu yllä olevan esimerkin mukaisesti. Se voi esiintyä muodossa joka sisältyy viljelyliemeen tai se voi esiintyä muodossa joka saadaan osittain puhdistamalla valmiste tällaisesta viljelyliemestä. Keksintö ei kuitenkaan rajoitu näihin. Keksinnön mukaista menetelmää voidaan soveltaa jokaiseen vesipitoiseen väliaineeseen joka sisältää useita tPA-lajeja joiden molekyylipainot vaihtelevat ja jotka on valmistettu erilaisilla menetelmillä.

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä tällainen raaka tPA-valmiste saatetaan ensin kosketuksiin hydroksiapatiitin kanssa eri tPA-lajien adsorboimiseksi hydroksiapatiittiin.

Käytetyn hydroksiapatiitin suhteen ei ole rajoituksia. Yleensä on mahdollista käyttää kalsiumfosfaatista koostuvaa hydroksiapatiittia joka on valmistettu johonkin toivottuun muotoon eri-

laisia valmistusmenetelmiä käyttäen. Kromatografiaa varten valmistettu hydroksiapatiitti on erityisen suositeltavaa moniin tarkoituksiin.

Vesipitoinen väliaine, joka sisältää useita eri tPA-lajeja tPA:n raakavalmisteena saatetaan kosketuksiin sellaisen hydroksiapatiitin kanssa, että eri molekyylipainon omaavat tPA-lajit adsorboituvat. Mitkään tietyt rajoitukset eivät määrää olosuhteita yllä mainitun kosketuksen aikaansaamiseksi. Kosketus voidaan näin ollen saada aikaan yleisellä kolonnimenetelmällä tai panosmenetelmällä. Kolonnimenetelmässä vesipitoinen, tPA-lajeja sisältävä väliaine saatetaan virtaamaan joko ylä- tai alavirtaan kolonnin läpi, joka on täytetty hydroksiapatiitilla siten että tPA-lajit saatetaan kosketuksiin hydroksiapatiitin kanssa, jolloin se adsorboituu hydroksiapatiittiin. Panosmenetelmässä toisaalta, hydroksiapatiittia ja useita eri tPA-lajeja sisältävää vesipitoista väliainetta sekoitetaan keskenään, jotta tPA-lajit joutuisivat kosketuksiin hydroksiapatiitin kanssa. Erilaiset tPA-lajit, joiden molekyylipainot vaihteleva ja jotka ovat adsorboituneet hydroksiapatiittin eristetään tämän jälkeen toisistaan.

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä eluenttien pH-arvot ja/tai suolakonsentraatiot muunnellaan sen mukaan minkälainen, halutun molekyylipainon omaava tPA-laji halutaan eluoida. Saatava olla kannattavaa lisätä eluentteihin lisäaine eluoinnin ja eri molekyyli-lajien eristämisen kiihdyttämiseksi ja edesauttamiseksi.

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä alin pH-arvo eluenteille on yhtä kuin alin pH-arvo jolloin käytetty hydroksiapatiitti ei vielä liukene. Toisaalta pH-arvon yläraja on korkein pH-arvo jolloin eri molekyyllipainon omaavat tPA-lajit, jotka reagoivat anti-humaanisen tPA-vasta-aineen kanssa, voidaan vielä eristää toisistaan. Mikä tahansa eluentei näiden pH-rajojen sisällä voidaan näin ollen käyttää, mutta pH on edullisesti 5 - 10, edullisimmin 6 - 9.

Tämän lisäksi käytetään suolaa tPA:n eristämiseksi hydroksiapatiitista. Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetty suola on sellainen suola jolla ei ole kelaatiokykyä. Siten on mahdollista käyttää esimerkiksi suolaa joka sisältää kaotrooppisen ionin kuten tiosyanaatti tai perkloriatti, tai kloridi, fluoridi, fosfaatti, karbonaatti, sulfaatti, nitraatti, boraatti, asetaatti tai joku muu vastaava. Edullisista suoloista voidaan mainita natriumfosfaatti, kaliumfosfaatti, natriumkloridi, kaliumkloridi, ammoniumtiosyanaatti, natriumsulfaatti, natriumboraatti, natriumasetaatti jne.

Lisäaineena voidaan käyttää emäksisiä aminohappoja tai niiden johdannaisia kuten arginiinia, lysiinia, ornitiinia tai -aminokaproehappoa, pitoisuuksissa jotka ovat 1 mM - 0,5 M, edullisesti 5 mM - 0,3 M eluenteihin nähden. Käyttämällä tällaista lisäainetta sisältävää eluettia eluointi helpottuu vielä enemmän, ja se sallii myös tehokkaamman eristämisen tPA-lajeihin joilla on eri molekyyllipainot.

Jotta saadaan haluttu tPA-laji eristetyksi niistä useista eri

tPA-lajeista, jotka ovat adsorboituneet hydroksiapatiittin, on välttämätöntä käyttää eluenttia, jonka pH ja/tai suolakonsentraatio on säädetty siten, että halutut tPA-lajit eluoituvat selektiivisesti kuten yllä on esitetty. Eluenttiin voidaan tarpeen vaatiessa lisätä lisäaine.

Ne tPA-lajit joiden molekyylipainot ovat alhaiset eluoituvat ensin, jonka jälkeen seuraavat peräkkäin eri tPA-lajit molekyylipainon kasvaessa sitä mukaa kun eluentin pH kasvaa alemmalta tasolta ylemmälle tasolle. Käytetty suolakonsentraatio ei riipu pelkästään suolan laadusta vaan myös eluentin pH-arvosta.

Seuraava yhteys on voimassa pH:n, suolakonsentraation ja eristettävän tPA-lajin molekyylipainon välillä:

Kun eluentti sisältää 0,02 - 0,1 M fosfaattia ja sen pH on 6 - 9, voidaan eluoida ne tPA-lajit, joiden molekyylipainot vaihtelevat 30000 - noin 45000 daltonin välillä. Toisin sanoen, jotta saadaan eristettyä ne tPA-lajit joiden molekyylipainot vaihtelevat 30000 daltonin - noin 45000 daltonin välillä eluointi tapahtuu edullisesti sellaisten optimiolosuhteiden vallitessa, että fosfaattikonsentraatio on 0,02 - 0,1 M ja pH on 6 - 9. Tämän jälkeen voidaan eluoida ne tPA-lajit, joiden molekyylipainot vaihtelevat 45000 daltonin ja noin 70000 daltonin välillä, pH-arvon ollessa 7 - 9 ja fosfaattikonsentraation ollessa 0,03 - 0,1 M. tPA-lajit joiden molekyylipainot liikkuvat 70000 daltonin lähellä voidaan eluoida pH:n ollessa 6 - 9 ja fosfaattikonsentraation ollessa 0,04 - 0,3 M. Lopuksi voidaan eluoida ne tPA-lajit joiden molekyylipainot ovat 70000 daltonin



ja 100000 daltonin välillä tai 100000 daltonin yläpuolella, pH:n ollessa 6 - 10 ja fosfaattikonsentraation ollessa 0.04 - 0.5 M.

Kun eluointi tapahtuu natriumkloridia sisältävällä eluentilla on edullista suorittaa tPA-lajien adsorptio hydroksiapatiittiin NaCl-konsentraation ollessa 0.03 M tai alempi ja pH-alueella 6 - 8. tPA-lajit joiden molekyylipainot vaihtelevat 30000 daltonin ja noin 45000 daltonin välillä voidaan eluoida pH:ssa 6 - 9 ja NaCl-konsentraatiolla 0.03 - 0.15 M. Tämän jälkeen voidaan eluoida ne tPA-lajit, joiden molekyylipainot vaihtelevat 45000 daltonista noin 70000 daltoniin, pH-arvon ollessa 7 - 9 ja NaCl-konsentraation ollessa 0.05 - 0.15 M. tPA-lajit joiden molekyylipainot liikkuvat noin 70000 daltonin lähellä voidaan sitten eluoida pH:ssa 6 - 9 ja NaCl-konsentraatiolla 0.07 - 0.7 M. Lopuksi ne tPA-lajit, joiden molekyylipainot ovat 70000 daltonin ja 100000 daltonin välillä sekä 100000 daltonin yläpuolella voidaan eluoida pH:n ollessa 6 - 10 ja NaCl-konsentraation ollessa 0.07 - 1.0 M.

Kuten yllä on esitetty voidaan eristää ja saada halutun molekyylipainon omaava tPA-laji joko peräkkäisellä eluoinnilla tai selektiivisesti käyttämällä tiettyä suolaa, tiettyä suolakonsentraatiota ja tiettyä pH:ta.

Kyseessä oleva keksintö kuvataan seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1 :

Bowenin melanoomasoluja viljellään RPMI 1640 viljelyväliainees-

sa (Gibco) täydennettynä 10 % termoinaktivoitua (56°C, 30 minuuttia) vasikkasikiöseerumia (FCS, Gibco), jonka jälkeen solut kerätään ja pestään kerran. Pestyt solut viljellään siten 24 tunnin ajan seerumivapaassa väliaineessa ja muodostunut viljelysupernatantti otetaan talteen.

Ammoniumsulfaattia lisättiin nopeudella 300 g/l 2 l:aan viljelysupernatanttia. Muodostuneen seoksen pH säädettiin 7,0 ja annettiin seistä yön yli 4°C:ssa.

Muodostunut saostuma kerättiin sentrifugoimalla, liuotettiin 0,01 M fosfaattipuskuria (pH 6,0) ja dialysoitiin sitten samaa puskuria vastaan suolan poistamiseksi. Dialysoitunut liuos syötettiin tämän jälkeen kolonniin jossa oli 5 ml:aa hydroksiapatiittia, jota oli tasapainoitettu 0.01 M fosfaattipuskurilla (pH 6,0).

Kolonnineste kerättiin talteen ja sen plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Mitään aktiivisuutta ei havaittu.

Adsorboituneet proteiinit eluoitiin käyttämällä 0,03 M fosfaattipuskuria (pH 6,0).

Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 2 % kolonniin syöteystä aktiiviteetista.

Tälle eluoidulle fraktiolle tehtiin elektroforeesi SDS-poly-

akryyliamidigeelillä ja se analysoitiin symografialla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin välillä 30000 - 45000 daltonia.

Kolonni pestiin tämän jälkeen 0,05 M fosfaattipuskurilla (pH 7,5). Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 3 % kolonniin syötetystä aktiviteetista.

Tälle eluoidulle fraktiolle tehtiin elektroforeesi SDS-polyakryyliamidigeelillä ja se analysoitiin symografialla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin välillä 45000 - 70000 daltonia.

Tämän jälkeen hydroksiapatiittikolonni käsiteltiin 0,02 M fosfaattipuskurilla (pH 7,0).

Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 85 % kolonniin syötetystä aktiviteetista.

Tälle eluoidulle fraktiolle tehtiin elektroforeesi SDS-polyakryyliamidigeelillä ja se analysoitiin symografialla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin noin 70000 daltonin molekyylipainolla.

Jäljellä olevat adsorboituneet proteiinit eluointiin 0,4 M fosfaattipuskurilla (pH 7,5).

Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 5 % kolonniin syötetystä aktiviteetista.

Tälle eluoidulle fraktiolle tehtiin elektroforeesi SDS-polyakryyliamidigeelillä ja se analysoitiin symografialla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin välillä 70000 - 100000 daltonia sekä sen yläpuolella.

Esimerkki 2:

2 l viljelysupernatanttia, joka oli valmistettu ihmissikiön esinahkasoluviljelmästä, mikä viljelyväliaine sisälsi 10 % termoinaktivoitua (56°C, 30 minuuttia) vasikkasikiöseerumia ja 20 KIU/ml aproitiinia (Bayer), stabiloitiin 0,02 % "Tween 80":lla (Junsei Chemicals), jonka jälkeen se syötettiin kolonniin joka sisälsi anti-humaanista urokinaasia.

Kolonnin läpi mennyt liuos kerättiin ja sen plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Noin 60 % kolonniin syötetystä aktiviteetista oli jäljellä.

Tämä liuosfraktio analysoitiin symografialla sen jälkeen kun sitä oli analysoitu SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Useita eri nauhoja todettiin plasminogeeniaktivaattoreina molekyylipainoalueella 30000 daltonista noin 150000 daltoniin.

Todettiin että nämä nauhat vastasivat tPA:ta koska ne eivät muuttuneet käsiteltäessä anti-humaanisella urokinaasilla mutta hävisivät käsiteltäessä anti-humaanisella tPA-vasta-aineella.

Ammoniumsulfaattia lisättiin tähän liuosfraktioon nopeudella 300 g/l. Muodostuneen liuksen pH säädettiin 7,0 ja sen annettiin seistä yön yli 4°C:ssa.

Tällöin muodostunut saostuma kerättiin sentrifugoimalla, jonka jälkeen seurasi dialyysi 0,03 M fosfaattipuskuria (pH 6,8) vastaan.

Dialysoitu liuos syötettiin tämän jälkeen kolonniin jossa oli 5 ml hydroksiapatiittia 0,03 M fosfaattipuskurilla (pH 6,8) tasapainotettuna. Kolonniliuos kerättiin ja sen plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 2 % kolonniin syöteystä aktiviteetista. Tälle eluoidulle fraktiolle tehtiin elektroforeesi SDS-polyakryyliamidigeelillä ja se analysoitiin symografiolla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin välillä 30000 - 45000 daltonia.

Kolonni pestiin 0,05 M fosfaattipuskurilla (pH 7,8). Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 5 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Symograafilla saatiin näkyviin ne tPA-lajit joiden molekyylipainot ovat välillä 45000 - 70000 daltonia.

Adsorboituneet proteiinit eluointiin 0,25 M fosfaattipuskurilla (pH 6,0). Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti oli noin 80 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Sen molekyylipainoksi saatiin noin 70000 daltonia symograafil-

la.

Jäljelle jääneet adsorboituneet proteiinit eluoiitiin 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  puskurilla (pH 10,0).

Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin noin 10 % kolonniin syötetyistä aktiviteetista. Molekyylipainot liikkuivat 70000 ja 100000 daltonin välillä sekä sen yläpuolella symograafilla mitattuna.

Esimerkki 3:

2 l viljelysupernatanttia, joka oli valmistettu kiinalaisen hamsterin munasarjasoluviljelmästä (CHO) integroituna ihmisen tPA-geenin kanssa (CHO K1 ATCC CCL 61), mikä viljelyväliaine sisälsi 10 % termoinaktivoitua ( $56^\circ\text{C}$ , 30 minuuttia) vasikkasikiöseerumia ja 40 KIU/ml aproitiinia stabiloitiin 0,02 % "Tween 80":lla, jonka jälkeen sen pH säädettiin 5,0 fosforihapolla.

Muodostunut liuos syötettiin kolonniin jossa oli 50 ml karboksimeetyli (CM) Sepharoosia (Pharmacia AB) tasapainotettuna 0,05 M natriumdivetyfosfaattipuskurilla (pH 5,0), joka sisälsi 0,15 M natriumkloridia ja "Tween 80" (0,02 %).

Adsorboituneet hartsipitoiset proteiinit pestiin 0,05 M fosfaattipuskurilla (pH 6,4), minkä jälkeen tPA eluoiitiin 0,05 M fosfaattipuskurilla (pH 6,4), joka sisälsi 0,5 M natriumkloridia. Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen akti-

viteetti mitattiin. Noin 85 % kolonniin syötetystä aktiviteetista oli jäljellä.

Eluoitu fraktio analysoitiin symografiolla SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen. Useita eri tPA-nauhoja todettiin molekyylipainoalueella 30000 - noin 150000 daltonia.

Eluaatti laimennettiin kymmenkertaisella määrällä vettä ja syötettiin sen jälkeen 5 ml hydroksiapatiittia sisältävään kolonniin, joka oli tasapainoitettu 5 mM natriumfosfaattipuskurilla (pH 6,4), joka sisälsi 0,05 M natriumkloridia. Kolonniliuos kerättiin ja sen plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 3 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Tälle eluoidulle fraktiolle tehtiin elektroforeesi SDS-polyakryyliamidigeelillä ja se analysoitiin symografiolla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin välillä 30000 - 45000 daltonia.

Kolonni eluoiittiin sitten 5 mM fosfaattipuskurilla (pH 7,4), joka sisälsi 0,08 M natriumkloridia. Noin 7 % kolonniin syötetystä aktiviteetista oli jäljellä. Symograafilla analysoitaessa tämän eluidun fraktion nauhat vastasivat 45000 - noin 70000 daltonin molekyylipainoja. Kolonni käsiteltiin tämän jälkeen 5 mM fosfaattipuskurilla (pH 7,8), joka sisälsi 0,3 M natriumkloridia. Eluaatin aktiviteetti vastasi noin 80 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Symograafilla analysoitaessa eluaatin nauha vastasi noin 70000 daltonin molekyylipainoa.

Jäljelle jääneet adsorboituneet proteiinit eluoiittiin 5 mM fos-

faattipuskurilla (pH 7,8), joka sisälsi 0,5 M natriumkloridia. Eluaatin aktiviteetti oli noin 10 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Symograafilla analysoitaessa tämän eluaatin nauhat vastasivat molekyyllipainoja 70000 ja 100000 daltonin välillä sekä vielä sen yläpuolella.

**Esimerkki 4:**

Kaksi litraa viljelysupernatanttia, joka oli valmistettu hiiren fibroblastisesta soluviljelmästä (C127, ATCC CRL 1616) ja transformoitu ihmisen tPA-geenillä (Suomalainen patenttihakemus 864777), mikä viljelyväliaine sisälsi 2 % termoinaktivoitua (56°C, 30 minuuttia) vasikkasikiöseerumia ja 40 KIU/ml aprotiinia, stabiloitiin "Tween 80":lla (0,02 %).

Muodostunut liuos syötettiin kolonniin jossa oli 50 ml anti-humaanista tPA-vasta-ainetta Sepharoosilla, tasapainotettuna 0,1 M ammoniumbikarbonaatin vesiliuoksella (pH 8,0), joka sisälsi 0,15 M natriumkloridia ja "Tween 80" (0,02 %).

Adsorboituneet proteiinit pestiin ensin 0,1 M vesipitoisella ammoniumbikarbonaattiliuoksella (pH 8,0), joka sisälsi 2,0 M natriumkloridia ja "Tween 80" (0,02 %), jonka jälkeen proteiinit eluointiin 0,1 M vesipitoisella natriumbikarbonaattiliuoksella (pH 8,0), joka sisälsi 2,0 M ammoniumtiosyanaattia ja "Tween 80" (0,02 %).

Eluaatin plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Noin 90 % kolonniin syötetystä aktiviteetista oli jäljellä.



Eluoitu fraktio analysoitiin symografiolla SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen. Useita eri tPA-nauhoja todettiin molekyylipainoalueella 30000 - noin 150000 daltonia.

Tämä eluaatti laimennettiin kaksikymmenkertaisella määrällä vettä ja sen pH säädettiin 7,5. Muodostunut liuos syötettiin kolonniin jossa oli 5 ml hydroksiapatiittia tasapainotettuna 5 mM vesipitoisella ammoniumbikarbonaatilla (pH 7,5), joka sisälsi 0,1 M ammoniumtiosyanaattia, jonka jälkeen kolonni pestiin samalla puskurilla mitä käytettiin yllä mainittuun tasapainottamiseen.

Kolonniliuos kerättiin ja sen plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 5 % kolonniin syöteystä aktiviteetista. Liuos analysoitiin symograafilla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin välillä 30000 - noin 70000 daltonia.

Kolonni käsiteltiin sitten 0,1 M vesipitoisella ammoniumbikarbonaatilla (pH 8,0), joka sisälsi 0,2 M ammoniumtiosyanaattia. Eluaatin aktiviteetti oli noin 90 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Symograafilla analysoitaessa eluaatin nauha vastasi noin 70000 daltonin molekyylipainoa.

Kolonni pestiin edelleen 0,1 M ammoniumbikarbonaatin vesiliuoksella (pH 8,0), joka sisälsi 0,5 M ammoniumtiosyanaattia. Noin 5 % kolonniin syötetystä aktiviteetista mitattiin näin saadusta eluaatista. Symograafilla analysoitaessa eluaatin nauhat vasta-

sivat noin 70000 - 100000 daltonin ja sitä korkeampaa molekyy-  
lipainoa.

Esimerkki 5:

2 l viljelysupernatanttiin, joka oli valmistettu ihmisen sikiö-  
amnioottisesta soluviljelmästä (FL, ATCC CCL-62), joka kantoi  
ihmisen tPA-geenin assosioituneena ihmisen sytomegalovirukseen  
(HCMV) ihmisen tPA-ilmaisun promoottorina, mikä viljelyväliaine  
sisälsi 2 % termoinaktivoitua (56°C, 30 minuuttia) vasikka-  
sikiöseerumia ja 20 KIU/ml aprotiinia, lisättiin ammoniumsul-  
faattia nopeudella 300 g/l. Muodostuneen seoksen pH säädettiin  
arvoon 7,0 ja annettiin sen jälkeen seistä yön yli 4°C:ssa.

Näin muodostunut saostuma kerättiin sentrifugoimalla, jota  
seurasi dialyysi 0,04 M fosfaattipuskuria (pH 8,0) vastaan joka  
sisälsi 10 mM arginiinia saostuman suolanpoistamiseksi.

Näin saatu dialysoitu liuos syötettiin kolonniin jossa oli 5 ml  
hydroksiapatiittia tasapainotettuna 0,04 M fosfaattipuskurilla  
(pH 8,0), joka sisälsi 10mM arginiinia. Kolonni pestiin tasa-  
painoitukseen käytetyllä puskuriliuoksella.

Kolonniliuos kerättiin ja sen plasminogeeniriippuvainen fibri-  
nolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 5 %  
kolonniin syötetystä aktiviteetista. Liuos analysoitiin symo-  
graafilla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin  
välillä 30000 - noin 70000 daltonia.

Kolonni käsiteltiin sitten 0,2 M fosfaattipuskurilla (pH 6,0),

joka sisälsi 50 mM arginiinia. Eluaatin aktiviteetti oli noin 90 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Symograafilla analysoitaessa eluaatin nauha vastasi noin 70000 daltonin molekyyli-painoa.

Kolonni pestiin edelleen 0,5 M fosfaattipuskurilla (pH 7,8), joka sisälsi 50 mM arginiinia. Noin 5 % kolonniin syötetystä aktiviteetista mitattiin näin saadusta eluaatista. Symograafilla analysoitaessa eluaatin nauhat vastasivat noin 70000 - 100000 daltonin ja sitä korkeampaa molekyyli-painoa.

**Esimerkki 6:**

Ihmisen tPA-geenillä transformoituja isäntäsoluja (*Saccharomyces cerevisiae*) annettiin kasvaa tunnettua menetelmää käyttäen, nimittäin sillä menetelmällä jota kuvataan teoksessa Principles and Practice of Recombinant DNA Research with Yeast in The Molecular Biology of Yeast *Saccharomyces* : Metabolism and Gene Expression, sivut 603-636, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982). Muodostuneet solut jauhettiin lasihelmien kanssa. tPA uutettiin 0,01 M fosfaattipuskurilla (pH 7,0) joka sisälsi 50 mM lysiniä, 1,0 M natriumkloridia ja 0,02 % "Tween 80". Muodostunut nesteseos suodatettiin suodoksen keräämiseksi.

Suodos laimennettiin kymmenkertaisesti fosfaattipuskurilla (pH 7,5) ja syötettiin tämän jälkeen kolonniin, joka sisälsi 5 ml hydroksiapatiittia tasapainotettuna 0,01 M fosfaattipuskurilla (pH 7,0), joka sisälsi 5 mM lysiniä ja 0,1 M natriumkloridia. Kolonni pestiin tasapainotukseen käytetyllä puskuriliuksella.

Kolonniliuos kerättiin ja sen plasminogeeniriippuvainen fibrinolyttinen aktiviteetti mitattiin. Tulokseksi saatiin 15 % kolonniin syöteystä aktiviteetista. Liuos analysoitiin symograafilla. Plasminogeeniaktivaattorina nauhat tulivat näkyviin välillä 30000 - noin 70000 daltonia.

Adsorboituneet proteiinit eluoiitiin 0,2 M fosfaattipuskurilla (pH 6,5), joka sisälsi 5 mM lyysiiniä. Eluaatin aktiviteetti oli noin 80 % kolonniin syötetystä aktiviteetista. Symograafilla analysoitaessa eluaatin nauha vastasi noin 70000 daltonin molekyylipainoa.

Kolonni pestiin edelleen 0,5 M fosfaattipuskurilla (pH 7,8), joka sisälsi 5 mM lyysiiniä. Noin 5 % kolonniin syötetystä aktiviteetista mitattiin näin saadusta eluaatista. Symograafilla analysoitaessa eluaatin nauhat vastasivat noin 70000 - 100000 daltonin ja sitä korkeampaa molekyylipainoa.

Hydroksiapatiittina käytettiin ; esimerkeissä 1 & 2 HCA-100S (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), esimerkeissä 3 & 4 HA-ultrogel (LKB) ja esimerkeissä 5 & 6 Bio gel-HT (Bio Rad).

## PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä eri, vähintään 30000 daltonin molekyyli-  
paineisten kudospasminogeeniaktivaattorin (tPA) lajien seoksen  
erottamiseksi fraktioksi (1), joka sisältää tPA-lajeja joiden  
5 molekyylipaino vaihtelee noin 30000 - noin 45000 daltonin  
välillä, fraktioksi (2), joka sisältää tPA-lajeja, joiden  
molekyylipaino vaihtelee noin 45000 - 70000 daltonin välillä,  
fraktioksi (3), joka sisältää tPA-lajeja joiden molekyyli-  
paine on noin 70000 daltonia, sekä fraktioksi (4), joka sisältää  
10 tPA-lajeja, joiden molekyylipaino on vähintään noin 100000  
daltonia, **tunnettu** siitä, että

(a) mainittu tPA-lajien seos saatetaan kosketukseen hyd-  
roksiapatiitin kanssa näiden eri, vähintään 30000 daltonin  
molekyylipainoisten tPA-lajien adsorboimiseksi,

15 (b) käsitellään hydroksiapatiittia mainittujen fraktioiden  
(1) - (4) eluomiseksi peräkkäin fosfaattia tai natriumklori-  
dia sisältävillä eluenteilla (A) - (D), joiden eluenttien pH,  
suolakonsentraatiot tai sekä pH että suolakonsentraatiot  
vaihtelevat mainittujen fraktioiden (1) - (4) eluomiseksi  
20 fraktioittain, siten että:

eluentin (A) pH vaihtelee 6 - 9 välillä, fraktion (1)  
eluomiseksi;

eluentin (B) pH vaihtelee 7 - 9 välillä, fraktion (2)  
eluomiseksi;

25 eluentin (C) pH vaihtelee 6 - 9 välillä, fraktion (3)  
eluomiseksi;

ja eluentin (D) pH vaihtelee 6 - 10 välillä, fraktion (4)  
eluomiseksi;

30 siten, että mainitun eluentin fosfaatti- tai natriumklori-  
dikonsentraatiota nostetaan selektiivisesti järjestyksessä  
eluentista (A) eluenttiin (D).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-  
tä, että

35 eluentti (A) sisältää 0,02 - 0,1 M fosfaattia,

eluentti (B) sisältää 0,03 - 0,1 M fosfaattia,

eluentti (C) sisältää 0,04 - 0,3 M fosfaattia ja

eluentti (D) sisältää 0,04 - 0,5 M fosfaattia.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-  
tä, että

eluentti (A) sisältää 0,03 - 0,15 M natriumkloridia,  
eluentti (B) sisältää 0,05 - 0,15 M natriumkloridia,  
eluentti (C) sisältää 0,07 - 0,7 M natriumkloridia,  
eluentti (D) sisältää 0,07 - 1,0 M natriumkloridia.

5        4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä,  
**tunnettu** siitä, että yksi tai useampi eluenteista sisältää  
ainakin yhden yhdisteen valittuna joukosta johon kuuluvat  
emäksiset aminohapot ja niiden analogiset yhdisteet.

10        5. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä,  
**tunnettu** siitä, että yksi tai useampi eluenteista sisältää  
lysiiniä tai arginiinia.

Patentkrav

1. Ett förfarande för att separera, en blandning av olika minst 30000 daltons molekylvikts vävnadsplasminogenaktivator (tPA) sorter, till en fraktion (1), som består av tPA-sorter vars molekylvikt varierar mellan ca. 30000 - ca. 40000 dalton, till en fraktion (2), som består av tPA-sorter vars molekylvikt varierar mellan ca. 45000 - 75000 dalton, till en fraktion (3), som består av tPA-sorter vars molekylvikt är ca. 70000 dalton, samt till en fraktion (4), som består av tPA-sorter vars molekylvikt är minst ca. 100000 dalton, **kännetecknat** av, att

(a) nämnda blandning av tPA-typer förs i kontakt med hydroxapatit för att adsorbera deras olika, minst 30000 daltons molekylvikts tPA-typer,

(b) för att eluera nämnda fraktioner (1) - (4) behandlas hydroxapatitet succesivt med fosfat eller natriumklorid innehållande eluenter (A) - (D), vilka eluenter pH, saltkoncentrationer eller både pH och saltkoncentrationer varierar för att eluera nämnda fraktioner (1) - (4) fraktionsvis, sålunda att:

(A) eluentens ph varierar mellan 6 - 9, för att eluera fraktionen (1);

(B) eluentens ph varierar mellan 7 - 9, för att eluera fraktionen (2);

(C) eluentens ph varierar mellan 6 - 9, för att eluera fraktionen (3);

(D) eluentens ph varierar mellan 6 - 10, för att eluera fraktionen (4);

sålunda att nämnda eluents fosfat- eller natriumkloridkoncentration höjs selektivt i ordning från eluent (A) till eluent (D).

2. Ett förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av, att eluent (A) innehåller 0,02 - 0,1 M fosfat  
eluent (B) innehåller 0,03 - 0,1 M fosfat  
eluent (C) innehåller 0,04 - 0,3 M fosfat och  
eluent (D) innehåller 0,04 - 0,5 M fosfat.

3. Ett förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av, att

eluent (A) innehåller 0,03 - 0,15 M natriumklorid  
eluent (B) innehåller 0,05 - 0,15 M natriumklorid  
eluent (C) innehåller 0,07 - 0,7 M natriumklorid  
eluent (D) innehåller 0,07 - 1,0 M natriumklorid.

5

4. Ett förfarande enligt patentkrav 1, 2 eller 3 **kännetecknat** av, att en eller flera av eluenterna innehåller åtminstone en förening vald ur mängden till vilken hör basiska aminosyror och deras analogiska föreningar.

10

5. Ett förfarande enligt patentkrav 1, 2 eller 3 **kännetecknat** av, att en eller flera av eluenterna innehåller lysin eller arginin.