(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[5]
C07K 15/06

(45) 공고일자 1993년08월10일
(11) 공고번호 특1993-0007434

(21) 출원번호	특1985-0006891	(65) 공개번호	특1986-0002567
(22) 출원일자	1985년09월20일	(43) 공개일자	1986년04월26일
(30) 우선권주장	2904 1984년09월21일 네덜란드(NL) 601 1985년03월04일 네덜란드(NL)		
---	---
(71) 출원인	베링거 잉겔하임 인터내셔날 게엠베하 디이터 라우디인, 루돌프 호프만 독일연방공화국 데-6507 잉겔하임 암 라인
(72) 발명자	크리스티안 피터 마리아로 이텔링쉬페르거 네덜란드 왕국 6211 제이케이 마아스트리히트 루이에르스그라하트 17
(74) 대리인	이병호, 최달용

심사관 : 공민호 (책자공보 제3366호)

(54) 혈액응고 억제 단백질 제조방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

혈액응고 억제 단백질 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 세파덱스 G-100(Sephadex G-100)상에서 VAC를 겔 여과한 결과를 나타낸 그래프이다.

제2도는 VAC의 분석적 SDS-PAGE의 결과를 나타낸 것이다.

제3도는 VAC의 등전점 pH를 측정한 그래프이다.

제4도는 음전하 인지질 리포좀에 대한 VAC의 결합을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

제5도는 트롬빈 형성 억제(%)에 대한 VAC농도의 영향을 나타낸 그래프이다.

제6도는 VAC에 의한 트롬빈 형성 억제(%)에 대한 인지질 농도의 영향을 나타낸 그래프이다.

제7도는 세파덱스 G-100상에서 제대 동맥 균질물의 10,000×g 상등액을 겔 여과한 결과를 나타낸 그래프이다.

제8도는 DEAE-세라셀(Sephacel)(A) 및 세라덱스 G-75(B) 상에서 항응고제를 크로마토그래피한 결과를 나타낸 그래프이다.

제9도는 G-75 용출제의 여러 분획의 겔 전기영동도이다.

제10도 MPTT에서는 항응고제의 용량반응 곡선이다.

제11도는 항응고제의 활성에 대한 단백분해 효소의 영향을 나타낸 그래프이다.

제12도는 HTP, 인자 Xa 또는 트롬빈에 의해 M(P)TT에서 유도된 응고 시간에 대한 혈관 항응고제의 효과를 나타낸 그래프이다.

제13도는 (Xa, Va, 인지질, Ca^{2+}), (Xa, 인지질, Ca^{2+}) 및 (Xa, Ca^{2+})에 의한 프로트롬빈 활성화에 대한 항응고제의 효과이고,

제14도는 이뮤노블로츠(immunoblots)를 나타낸 것이다.

15도는 G-75로부터 용출된 용출액의 여러가지 분획의 및 겔 전기영동도 (A) 및 항응고 활성(B)를 나타낸 그래프이다.

제16도는 혈관 항응고제의 열 불활성화를 나타낸 그래프이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 혈액응고 억제 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

대부분의 포유동물에 존재하는 항응고 단백질은 세개의 그룹으로 분류될 수 있다. 이러한 분류는 단백질 활성의 상이한 메카니즘에 근거한 것이다.

1. 응고인자와 함께 복합체(complex)를 형성하여 응고인자를 불활성화 시키는 단백질 : 이들은 하기 단백질을 포함한다.

a) 항트롬빈 III(Thromb. Res. 5, 439-452(1974))

b) α_1-프로테아제 억제제(Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709(1983))

c) α_2-마크로글로블린(Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709(1883))

d) C_1-억제제(Biochemistry 20, 2738-2743(1981))

e) 프로테아제 넥신(J. Biol. Chem. 258, 10439-10444(1983))

2. 응고인자를 단백분해적으로 절단하여 응고인자를 불활성화시키는 단백질 지금까지 알려진 이러한 종류의 유일한 단백질은 단백질 C이다(J. Biol. Chem, 251, 355-363(1976)).

3. 음전하 인지질을 선별하고/하거나 가수분해시켜 혈액응고 메카니즘의 인지질-의존성반응을 억제하는 단백질 : 지금까지는 여러가지 형태의 사독으로 부터 분리된 포스포리파제만이 알려져 있다(Eur. J. Biochem. 112, 25-32(1980)).

최근에, 단계적 응고 시스템이 철저히 조사되었다. 이는 효소가 지노겐을 활성형으로 전환시키는 상이한 연속적 단백분해 반응의 다단계 시스템을 강화시킨것으로 이해된다(참조 : Jackson, C. M. and Nemerson, Y., Ann. Rev. Biochem. 49, 765-811(1980)). 이 반응의 속도는 인지질, 및 Va 인자 및 VIIIa 인자와 같은 다른 보조 인자의 존재에 의해 결정적으로 증가된다. 생체내에서, 응혈촉진 반응은 응고단계가 약간 활성화된 후에 격발성의 혈전성 외상을 방지하는 여러가지 억제 메카니즘에 의해 조절된다.

항응고 메카니즘은 다음과 같이 세분화될 수 있다(Rosenberg, R. D., Rosenberg, J. S., J. Clin. Invest. 74, 1-6(1984)) :

1. 세린-프로테아제 인자 Xa 및 트롬빈은 항트롬빈 III 또는 항트롬빈/헤파린 복합체와의 결합에 의해 불활성화된다. 프로트롬빈 활성화 및 피브린의 형성은 이러한 방법으로 억제될 수 있다. 항트롬빈 III 이외에도 또한 α_2-마크로글로불린 및 항트립신과 같은 그 밖의 여러가지 혈장-프로테아제 억제제가 있는데, 이들의 활성은 시간에 의존한다.

2. 단백질 C의 발견에 따라 또 다른 항응고 메카니즘이 발견되었다. 단백질 C가 활성화되면, 이는 X 인자를 전환시키는 효소 및 프로트롬비나제를 불활성화시키는 단백질 보조인자 Va 및 VIIIa의 선택적 단백분해에 의해 항응고제로서 작용한다.

3. 플라즈민은, 피브리노겐에 트롬빈이 작용하여 생성되는 모너머 피브린 1을 분해하여 불용성 피브린의 형성을 방지한다(Nossel, H. L., Nature, 291, 165-167(1981)).

응과과정에 포함된 상술한 천연 단백질중에서 현재는 항트롬빈 III만이 임상적으로 사용된다.
그러나, 이 단백질을 투여한 경우에 출혈 경향이 증가하는 것은 심각한 단점인 것으로 판명되었다.

지금까지 항응고제로서 사용된 모든 제제는 체내에 본래 있던 것이든지, 합성된 것이든지 간에, 일부의 경우에 응고인자를 불활성화시켜 응고 과정에 불리한 영향을 줄 수 있는 부작용을 야기시킬 수 있다.

본 발명의 목적은, 지금까지 공지된 항응고제에 수반된 응고과정에 대한 불리한 영향을 나타냄이없이 혈액응고-억제특성을 나타내는 제제를 제조하는데 있다.

놀랍게도, 혈액응고 억제활성을 가지면서 출혈의 위험은 증가시키지 않는 천연 단백질을 분리시킬 수 있음을 밝혀냈다. 또한 놀랍게도, 이들 단백질은 과다 출혈시 그들의 혈액응고 억제특성을 상실하여 통상적 응고과정이 붕괴되지 않고 진행할 수 있으므로 사망에 까지 이르는 출혈의 위험은 없다.

본 발명은 응고인자를 불활성화시키지 않는, VAC(Vascular Anti Coagulant : 혈관 항응고제)로 지칭되는 항응고 단백질에 관한 것이다. 이들 단백질은 혈관 응고촉진제 또는 Xa인자에 의해 유도된 응고를 억제할 수 있지만, 트롬빈에 의해 유도된 응고는 억제할 수 없다. 이들은 인자 Xa 및 IIa의 생물학적 및 가아미도분해(amidolytic)활성은 억제하지 않는다.

본 발명은 응고인자를 불활성화시키지 않고 다음 사항들을 억제하는 항응고 단백질에 관한 것이다.

변형된 프로트롬빈-시간 실험 및/또는 변형된 활성화 부분 트롬보플라스틴-시간 실험 및/ 또는 -비-변형된 프로프롬빈-시간 실험 및/또는 -음전하 인지질 및 Ca^{2+}의 존재하에서 응고인자 Xa에 의한 프로트롬빈 활성화 및/또는 -음전하 인지질 및 Ca^{2+}의 존재하에서 인자 IXa에 의한 고유 X-활성화 및/또는 -분리자극시킨 혈소판의 프로트롬빈 활성화 및/또는 -혈관벽에 의해 유도된 응고 및/또는 -응고-의존성 혈소판 응집.

본 발명은 응고 인자를 불활성화시키지 않는 항응고 단백질에 관한 것이며, 이의 억제활성은 인지질의 양에 따라 달라진다. 본 발명에 따른 단백질은 인자 Xa에 의한 프로트롬빈 활성화의 억제를 유도한다. 억제는 인지질 농도에 따라 달라지며 그정도는 인지질 고 농도에서 낮다. 인지질은 본 발명에 따른 단백질에 의해 가수분해 되지 않는다.

본 발명은 또한 응고인자를 불활성화시키지 않으며 2가 양이온 Ca^{2+} 및/또는 Mn^{2+} 에 의해, 예를들어 소포체, 리포좀 또는 에테로좀에서 발견될 수 있는 음전하 인지질에 결합하고/하거나, 2가 양이온 Ca^{2+} 및 Mn^{2+} 에 의해, 스페로실(Spherocil)에 커플링된 음전하 인지질에 결합되는 항응고 단백질에 관한 것이다. 음전하 인지질에 대한 단백질의 결합은 가역적이며 에틸렌디아민 테트라 아세트산(EDTA)에 의해 역전될 수 있다. 본 발명에 따른 단백질은 음전하 인지질 표면으로부터 인자 Xa 및 프로트롬빈을 치환시킬 수 있다.

본 발명은 응고인자를 불활성화시키지 않으며 분자량이 약 70×10^3, 약 60×10^3, 34×10^3 또는 32×10^3인 항응고 단백질에 관한 것이며, 이중에서 각각 34×10^3 또는 32×10^3의 분자량을 갖는 단백질을 단일 폴리펩타이드 쇄만으로 이루어진다.

본 발명은 바람직하게는 응고인자를 불활성시키지 않는 항응고 단백질에 관한 것이며 다음을 특징으로 한다.

이들은 포유동물에서 혈관벽으로 부터 분리된 후 정제되며, 이들은 당단백질이 아니고, 이들은 포스포리파제가 아니며, 이들은 pH 4.4 내지 4.6의 등전점을 갖고, 56℃에서 항응고 단백질의 활성은 열적으로 불안정하며, 시트레이트 처리된 혈장에서 항응고 단백질의 활성은 37℃에서 수시간 동안 안정하게 유지되고, 항응고단백질의 활성은 트립신 및/또는 키모트립신에 의해 완전히 파괴되지 않으며, 항응고 단백질의 활성은 콜라게나제 및/또는 엘라스타제에 의해 영향을 받지 않고, 이들은 2가 양이온 Ca^{2+} 및 Mn^{2+}에 의해 소포체, 리포좀 또는 에테로좀에서 발견될 수 있는 음전하 인지질에 결합되며, 이들은 2가 양이온 Ca^{2+} 및 Mn^{2+}에 의해, 스페로실에 커플림된 음전하인지질에 결합되고, 음전하 인지질에 대한 단백질의 결합은 가역적이고, 에틸렌디아민 테트라 아세트산(EDTA)에 의해 역전될 수 있으며, 이들은 음전하 인지질 표면으로부터 인자 Xa 및 프로트롬빈을 치환시키고, 이들은 변형된 프로트롬빈-시간 실험을 억제하며, 이들은 변형된 활성화 부분 트롬보플라스틴-시간 실험을 억제하고, 이들은 비변형된 프로트롬빈-시간 실험을 억제하며, 이들은 시험관내에서 음전하 인지질 및 Ca^{2+} 존재하에서의 응고인자 Xa에 의한 프로트롬빈 활성화를 억제하고, 이들은 인자 Xa 및 IIa의 생물학적 활성 및 가아미도분해 활성을 억제하지 않으며, 이들은 시험관내에서 음전하 인지질 및 Ca^{2+} 존재하에서의 인자 IXa에의 한 고유 X-활성화를 억제하고, 이들은 시험관내에서 분리 자극시킨 혈소판의 프로트롬빈 활성화를 억제하며, 이들은 시험관내에서 혈관벽에 의해 유도된 응고를 억제하고, 단백질에 의해 유도된 인자 Xa에 의한 프로트롬빈 활성화의 억제는 인지질의 농도에 따라 달라지며 인지질 고 농도에서 감소된다.

특히, 본 발명은 특정 동물의 조직을 거의 함유하지 않는, 특히 거의 순수한 형태의 VAC 단백질에 관한 것이다.

VAC 단백질의 분리에 적합한 출발물질은 여러가지 포유동물(예 : 소, 쥐, 말 및 인간)의 혈관벽 및 대부분이 혈관화된 조직 및, 이들 포유동물의 내피 세포 배양물이다. 소, 쥐, 말 및 인간의 동맥벽 및 인간 제대맥 및 동맥이 특히 적당하다.

본 발명은 또한 그 자체가 공지된 분리 및 정제기술을 사용하여 본 발명에 따른 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 하기 방법이 특히 바람직하다.

균질화된 출발물질을 먼자 차등 원심분리(differentjal)시킨다. 그후, 수득한 상등액을 목적하는 순서로 다음과 같이 추가로 처리한다. 원치않는 오염물질은 황산 암모늄으로 침전시킬 수 있다. 그후 상등액을 예를들면, 하이드록시 애퍼타이트를 사용한 친화성 크로마토그래피, 예를들면 DEAE-세파셀(Sephacel)을 사용한 이온 교환 크로마토그래피, 세파덱스 G-100과 같은 분자체상에서의 그래피 및 예를들면, 폴리클로날(polyclonal) 또는 모노클로날(monoclonal)항체를 사용한 면역흡착 크로마토그래피에 의해 추가로 정제한다. 출발물질의 질에 따라 이러한 정제단계를 변형시킬 수 있거나 그밖의 다른 정제방법, 예를들면 인지질 소포체를 사용한 정제가 이용될 수 있다.

고전적 항 혈정중 치료제, 즉 경구투여되는 응고제 이외에 최근에는 생합성조직-플라즈미노겐 활성화제가 명백한 혈전증의 경우에 대해 혈관내 경로를 통해 투여되었다[N. Engl. J. Med. 310, 609-513(1984)].

본 발명에 따른 단백질은 혈액응고-억제특성을 가지며, 동시에 혈소판의 응고-의존성 응집에 대한 억제효과를 갖기 때문에, 예를들어 수술하는 동안 혈전증을 방지하는데 특히 적당하다.

따라서 본 발명은 또한 항혈전증제로서의 본 발명에 따른 단백질의 용도에 관한 것이다.

본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제와 함께 본 발명에 따른 적어도 하나의 단백질을 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

소의 동맥으로 부터 VAC의 분리 및 정제를 수행하여 얻은 결과는 표 A에 나타나 있다. 100,000×g 원심분리의 상등액에서 VAC활성 수준의 측정은 응고촉진 활성의 존재때문에 오차가 발생한다. 이러한 활성에 관여하는 성분은 포화농도 35%에서 황산암모늄으로 침전될 수 있음이 밝혀졌다. 35% 황산암모늄으로 침전된 후 수득된 상등액 용액은 100% VAC 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

이 활성체를 침전시키기 위해서, 용액을 96% 포화에 도달할 때까지 황산암모늄과 혼합한다. 생성된 VAC단백질-함유 침전물을 TBS(100mM NaCl, 50mM 트리스/HCl, pH 7.5)의 존재하에 하이드록시 애퍼타

이트 컬럼에 결합시킨다. 세척후, VAC단백질을 인산염 증가 구배로 컬럼으로부터 용출시킨다. 저이온 농도에서, VAC단백질을 DEAE-세파셀 컬럼에 결합시킨다. 이 컬럼으로부터 VAC단백질의 용출은 증가하는 NaCl 농도 구배로 수행된다. 최종 정제 단계에서, 단백질은 그들의 분자량에 기초하여 세파덱스 G-100상에서 겔 여과하여 분리된다. 용출제는 VAC와 세파덱스 물질간의 상호작용을 극소화시키는 염농도가 높은 완충액이다. VAC를 컬럼의 빈 부피의 약 1.6배의 부피로 컬럼으로부터 용출시킨다(참조 : 제1도). 최종 정제후 VAC의 총수율은 35%이다. SDS-PAGE에 의해, VAC 활성을 나타내는 모든 G-100 분획은 두개의 폴리펩타이드(각각 분자량 34,000 및 32,000)를 함유하는 것으로 밝혀졌다. 몇몇 경우에서, 분자량 60,000을 갖는 추가의 분획이 VAC-활성을 나타낸다.

SDS-PAGE에 따라, 단지 138 내지 140피크(peak)분획만이 두개의 폴리펩타이드에 관하여 균일하다. 이들 분획은 본 명세서에 기술된 소 VAC의 조사와 관련한 그밖의 다른 모든 실험에 사용되는데, 단 소 VAC의 인지질 리포좀에 대한 결합을 특징화 하는 실험은 제외된다.

G-100분획 139에서는, VAC활성체의 3.4%가 1단계 응고시험(참조 : 실시예 1)에 의해 단백질 1mg당 1480단위의 특이 활성을 갖은 것으로 밝혀졌다(참조 : 표 A). 이 분획은 감지 가능한 양의 인지질을 함유하지 않으며, $A_{km}^{1\%}$ =8.5의 흡광계수는 상기와 같이 정제된 VAC제조제에 대하여 280nm에서의 흡수 및 단백질 함량으로 부터 계산된다.

VAC의 특정화

제2도로 부터 명확하듯이, 소 동맥으로 부터 정제된 단백질 물질중에 존재하며, VAC활성이 기인하는 분자량 34,000 및 32,000을 갖는 두개의 폴리펩티드는 단일쇄를 갖는 단백질이다. 염기성 푹신(fuchsin)과 함께 쉬프(Schiff)시약을 사용하여 두개의 단백질이 몇개이 탄수화물 그룹을 함유함을 입증하였다. 또한 각 단백질 에서, γ-카복시글루타메이트(Gla)잔기는 발견할 수 없었다. 동전 초점화(참조 : 실시예 1)는 두개의 단백질이 등전점 4.4 내지 4.6에 상응하는 단일 밴드로 이동함을 나타낸다(참조. 제3도).

VAC활성체는 상기 밴드를 겔로부터 용출시킴으로써 PAG 플레이트(plate)로 부터 수득한다. SDS-PAGE로 용출액을 분석하여 다시 두개의 단백질이 존재함을 알아냈다. 따라서 두 단백질이 PAG플레이트 pH구배내에서 단일밴드로 이동함을 확인할 수 있다. 이 방법을 검사하기 위해, 사람의 헤모글로빈(Hb)을 또한 등전초점화에 의해 조사하였다. 실험치 6.8은 문헌에 기재된 수치와 일치한다(제3도 참조).

결합 실험에서는 VAC활성체가 음전하 인지질 막에 결합할 수 있음을 나타낸다. 이 결합은 Ca^{2+} 및 Mn^{2+} 의 존재하에서는 일어났으나, Mn^{2+} 의 존재하 또는 이가 금속이온의 부재하에서는 일어나지 않았다(표 B 참조). 이러한 VAC활성체의 리포좀에 대한 결합은 가역적이고 EDTA시약에 의해 역전될 수 있다.

SDS-PAGE를 사용하면, 두 단백질이 Ca^{2+} 의 존재하에서 리포좀과 결합할 수 있으며, 이 결합은 EDTA첨가시에 파괴됨을 확인할 수 있다(제4도 참조). 이는 VAC활성이 이들 두 단백질에 기인할 수 있다는 또 다른 증거이다.

10% 글리세롤을 함유하는 TBS 중에서 보존할 때, VAC활성은 -70℃에서 적어도 3개월, 0℃에서 적어도 12시간 및 37℃에서 적어도 반시간 동안 안정하다. 56℃에서는 이 활성이 2분 이내에 소실되었다.

VAC의 활성

VAC는 응고반응을 소 뇌의 트롬보플라스틴(BTP)에 의해 유발시키는 일단계 응고 실험(실시예 1 참조)에서 응고 시간을 연장시킨다. 이 실험에서 BTP를 정제된 소 트롬빈 또는 정제된 소 인자 Xa로 대치시에, VAC는 인자 Xa가 응고 반응을 개시 시키는데 사용된 경우에만 응고시간을 연장시키며, 트롬빈에 의해 유도된 응고반응은 VAC에 의해 영향을 받지 않음을 보여준다. 이는 VAC가 인자 Xa 활성을 직접 억제하거나 프로트롬비나제 복잡제와 어떤 상호작용이 있음을 시사하는 것이다. 또 다른 시험에서, 정제된 소 인자 Xa 및 프로트롬빈을 사용하여 가아미도분해 트롬빈 형성시험을 수행하였다. 제5도에서는 프로트롬빈이 Ca^{2+} 및 인지질의 존재하에서 인자 Xa에 의해 활성화되어 트롬빈을 형성하는 경우에, VAC는 프로트롬빈의 활성화를 억제하고 억제정도는 VAC의 농도에 의존함을 보여준다. 게다가 VAC의 억제효과는 인지질의 농도가 낮을수록 증가한다.

제6도는 프로트롬빈 활성화의 VAC-유도된 억제의 인지질 의존성을 나타낸다. 인지질 농도가 0일때는, 인자 Xa에 의한 프로트롬빈의 활성화는 VAC에 의해 억제되지 않음은 주목할 만하다. 대조시험은 VAC자체가 측정계에 영향을 주지 않음을 보여준다.

인지질[1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포르포세린(PS)/1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(PC) 4 : 1 몰/몰] 5mcM, VAC(특이활성 1,300 단위/mg) 107mcg/ml 및 Ca^{2+} 10mM을 함께 배양하면 37℃에서 3분 이내에 응고 촉진 활성이 감소된다. 이는 VAC가 포스포리파제 활성의 없음을 보여주는 것이다.

항트롬빈 III(AT-III)과는 반대로 발색물질 S 2337(N-벤조일-L-이소로이실-L-글루타밀-L-피페콜릴-글리실-L-아르기닌-p-니트로아닐리드-디하이드로 클로라이드) 또는 S 2238(H-D-페닐알리닐-L-피페콜릴-L-아르기닌-p-니트로아닐리드-디하이드로클로라이드)을 사용하여 측정한 것으로서, VAC는 정제된 트롬빈의 가아미도분해 활성에 대해 효과가 없고 인자 Xa 활성에 대해 지속적인 효과가 없다[표 C 참조]. 표 C는 또한 AT-III에 의한 인자 Xa 및 트롬빈의 불활성화는 VAC에 의해 강화되지 않음을 보여준다. 반면에 헤파린은 AT-III의 존재하에서 트롬빈 및 인자 Xa의 불활성화를 명백히 증가시킨다. 이는 VAC가 헤파린-양 활성도 및 AT-III-양 활성도 갖지 않음을 보여준다.

신규한 인간원성 항응고제의 분리는 예를들어 인간의 제대동맥의 균질화물로 부터 동일한 분리방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 균질화물에서 본 발명에 따른 항응고제는 프로트롬빈 시간 시험에서 응고시간을 연장시키는 작용에 의해 발견되었다. 항응고 활성은 동맥균질화물을 세파덱스 G-100 분획화시킨 후에 측정가능하게 된다[실시예 IV 참조]. 또 다른 분리방법으로 부터, 이 활성은 pH 7.9에서 전반적으로 음의 전하를 갖는 수용성 물질과 관련되는 것으로 추정된다.

세파덱스 G-75분획을 겔 전기영동으로 분석한 결과는 변형된 프로트롬빈 시간 시험(MPTT)에서 측정되었듯이 분자량 32,000밴드의 강도와 응고시간의 연장사이에 정(positive)의 관계가 있음을 보여주었다[실시예 IV참조]. 폴리아크릴 아미드겔 상의 32K-밴드 부위에서만 항응고 활성체가 용출될 수 있기 때문에 32K-밴드와 항응고 활성과의 관계는 명백히 증명되었다. 본 항응고 물질이 56℃에서의 배양에 의해 그 활성을 신속히 소실하고, 또한 단백분해 효소가 그 활성을 파괴시킨다는 점을 조합하여 봄으로써 항응고제의 활성은 겉보기 분자량 32,000 달톤인 단일 단백질에 의해 나타나는 것으로 추정된다.

트립신은 프로테아제 I형과는 대조적으로 항응고제의 불활성화가 약하다. 이는 본 항응고제가 트립신이 접촉할 수 있는 리신-및 아르기닌-잔기를 단지 소량 함유한다는 것을 의미한다. 본 항응고제 활성의 특성은 응고반응을 여러가지 다른 방식으로 개시시킴으로써 연구되었다. 혈관 응고촉진제, HTP(인간원성 뇌트롬보플라스틴), 또는 인자 Xa등에 의해 유도된 응고반응은 본 항응고제로 억제되는 반면에, 트롬빈에 의해 유도된 응고 반응은 억제되지 않았다. 이러한 발견으로 부터 본 항응고제는 트롬빈의 형성은 억제하지만 트롬빈의 작용은 억제하지 않는다는 결론을 내릴 수 있다.

항응고 메카니즘에 대한 또 다른 연구에서는, 정제된 인자 및 프로트롬빈으로 부터 재구성된 프로트롬비나제가 사용되었다[실시예 IV참조]. 언급한 실험 조건하에서, 항응고제는 완전한 프로트롬비나제(인자 Xa, 인자 Va, 인지질, Ca^{2+} 및 인지질-결합된 인자 Xa(인자 Xa, 인지질, Ca^{2+})에 의한 프로트롬빈의 활성화는 억제할 수 있으나, 유리인자 Xa(인자 Xa, Ca^{2+})에 의한 활성화는 억제할 수 없다.

본 항응고제의 존재하에서 프로트롬빈 활성화의 시간 경과에 따른 변화는 프로트롬빈 활성화는 동시적 억제를 나타내며, 이는 시간이 경과해도 일정하게 유지된다. 따라서 본 항응고제는 포스포리파제 활성에 의해서도, 단백분해 활성에 의해서도 작용하지 않음을 결론내릴 수 있다. 인자 Xa 및 Ca^{2+}에 의한 프로트롬빈의 활성화가 본 항응고제에 의해 전혀 역할을 받지 않는다는 사실은 혈관성 화합물의 항응고 메카니즘이 항트롬빈 III과 같은 잘알려진 혈장 프로테아제, 억제제의 메카니즘과는 다름을 강력히 시사하는 것이다. 워커등(Walker et al.)은 문헌[(1979) Biochima, Biophys. Acta, 571, 333-342)에서 활성화 단백질 C는 인자 Xa, Ca^{2+} 및 인지질에 의한 프로트롬빈 활성화를 억제하지 못함을 예시하였으므로, 본 발명화합물이 단백질 C가 아님을 결론 내릴 수 있다.

예비적인 결합 연구에서는 혈관성 항응고제가 아마도 인자 Xa 및/또는 프로트롬빈의 지질결합을 저해함을 제시하였다. 본 항응고제의 프로트롬빈 활성화 억제 능력이 프로트롬빈 시간에 대한 그의 지속적 효과를 완전히 설명할 수 있는가의 여부는 연구의 여지로 남아있다.

본 억제제가 여러 형태의 동맥에서는 발견될 수 있으나 혈관 형생이 빈약한 조직에서는 발견되지 않는다는 사실은 혈관 수준에서 활성이 있는 지혈 및 혈전중의 생리적 조절제가 발견되었음을 시사하는 것이다.

지금까지 관찰된 VAC의 성질 및 활성에 근거하여, VAC의 영향하에서 혈액응고 메카니즘은 하기와 같이 해석될 수 있다 :

VAC는 Ca^{2+}을 통해 조직손상의 결과 및/또는 혈소판 자극으로 인하여 생성된 음전하 인지질에 결합하고, 따라서 특정 응고인자(비타민-K-의존성 응고인자)가 이러한 응고인자에 대해 촉매적 표면으로서 작용하는 음전하 인지질 표면에 결합하는 것을 감소시켜서(참조 : Biochem. Biophys. Acta, 515, 163-205(1985) ; 그 결과 인지질-의존성 혈액응고 반응이 VAC에 의해 억제된다. 이러한 활성의 메카니즘에 근거하여, VAC는 상기의 단백질 3군으로 분류될 수 있다.

그러나 결정적으로 중요한 점을 VAC와 이 군에 속하는 다른 기지의 단백질간의 차이점이다. VAC는 인지질을 가수분해시키지 않고 따라서 필수적인 막구조를 분해시키지 않는다.

VAC의 성질은 지금까지 기지의 항응고체중 어느것에서도 기술되지 않는 것으로 중요하고도 유익한 것이다.

-VAC의 항응고 효과는 응고과정에 참여하는 인지질의 양에 의존한다. 이 종속성은 예를들면, 혈관벽의 경미한 손상 및/또는 혈소판의 경미한 활성화(예 : 혈전성 과정에 의해서)에 의해 개시된 응고과정이 놀랍게도 VAC에 의해 억제될 수 있음을 나타낸다. 반면에 혈관벽의 격심한 손상에 의해 유발되며, 인지질이 고농도로 생성하는 응고 과정은 VAC에 의해, 정화하게는 고농도의 인지질때문에 억제되지 않는다. 따라서 VAC 사용시 출혈의 위험은 놀랍게도 지극히 작다. VAC는 하나 이상의 응고 인자를 불활성화시켜 출혈의 위험을 증가시키는, 지금까지 공지된 모든 항응고제와 비교해서 상기와 같은 월등한 특성을 갖는다.

-VAC는 놀랍게도 응고 인자 자체를 불활성화시키지는 않는다. 결국 응고인자는 특정 위치에 계속 존재하며 점점 더 발견되는 그들의 그밖의 다른 기능을 수행한다. 예를들어 일부의 활성 응고인자는 염증 세포에 대해 화학주성의 주요한 비-응혈 임무를 갖는다. 이들 세포는 손상된 혈관벽을 치유하는데 기여한다. 놀랍게도 VAC는 이 활동을 방해하지 않는다.

본 발명은 또한 최초로 응고 인자를 불활성화시키지 않는 신규의 항응고 단백질 그룹을 기술하고 있다. 본 발명을 설명하기 위해 사용된 실시예 및 기재된 특성은 본 발명을 어떤 방법으로든 제한하지 않는다. 당분야 숙련가는 누구든, 다른 노력없이 기술된 방법을 사용하여 응고 인자를 불활성화시키지 않고 항응고 특성을 갖는 그밖의 단백질을 수득할 수 있다. 이들 단백질도 또한 본 발명의 보호

범위내에 있다.

본 발명에서 사용된 약자는 하기 의미를 갖는다 :

VAC : 혈관 항응고체

PFP : 혈소판을 함유하지 않은 혈장

TBS : 100mM NaCl, 50mM 트리스/HCl, pH 7.5

EDTA : 에틸렌디아민 테트라아세트산

TBSE : EDTA 2mM을 함유하는 TBS

BTP : 소의 뇌로부터 얻은 트롬보플라스틴

HTP : 인간의 뇌로 부터 얻은 트롬보플라스틴

TBSA : 인간의 혈청 알부민 0.5mg/ml을 함유하는 TBS, pH 7.9

S 2337 : N-벤조일-L-이소로이실-L-글루타밀-L-피페콜릴-글리신-L-아르기닌-p-니트로아닐리드-디하이드로클로라이드

S 2238 : H-D-페닐알라닐-L-피페콜릴-L-아르기닌-p-니트로아닐리드-디하이드로클로라이드

AT-III : 인간 항트롬빈 III

S. A. : 특이활성

Ole_2Gro-p-Cho : 1,2-디올레올릴-sn-글리세로-3-포스포콜린

Ole_2Gro-p-Ser : 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포세린

혈액응고 인자의 명명법에는 Task Force on Nomenclature of Blood Clotting Zymogens and Zymogens Intermediates에 의해 추천된 명명법을 사용하였다.

물질

분석용 SDS-PAGE 및 하이드록시애퍼타이트 HTP에 대한 화학물질은 바이오-레드(Bio-red)사로부터 구입하였고, 세파덱스(Sephadex) G-100 및 G-75, DEAE-세파셀(Sephacel) 및 "저분자량 검량 킷트(Low Molecular Weight Calibration kit)"는 파마시아(Pharmacia)사로 부터 구입하였으며, 발색물질 S 2337 및 S 2238은 카비 비트럼(Kabi Vitrum)사로 부터 입수하였고, 디아플로(Diaflo) PM-10한외 여과막은 아미콘(Amicon)사로 부터 입수하였다.

[실시예 1]

VAC의 분리 및 정제

소를 도살한 뒤 30분 이내에 소의 대동맥을 취했다. 소의 혈액을 트라나트륨 시트레이트중에 수집하고(최종 농도 0.38중량%)주변 온도 및 2,000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 소수의 혈소판을 함유하는 혈장을 다시 원심분리 하였다(10,000×g에서 15분). 이렇게 해서 혈소판을 함유하지 않는 혈장을 수득하였다(PFP).

소의 대동맥을 절제한 후 즉시 TBS(100mM NaCl, 50mM 트리스/HCl, pH 7.5)로 철저히 세척한다. 내피를 대동맥으로 부터 떼어 내어 대두 트립신 억제제(16mg/ℓ) 및 벤즈아미드(1.57g/ℓ)을 함유하는 TBSE(EDTA 2mM을 함유하는 TBS)내에서 고속 균질화기, 예를들면 브라운(Braun) MM 32를 사용하여 균질화시킨다.

8개의 대동맥으로 부터 균질화된, 고체 20%(중량/부피)를 함유하는 물질을 100,000×g에서 60분 동안 원심분리한다. 상등액을 고체 황산 암모늄으로 30% 포함될 때까지 포화시키고, 30분 동안 교반한 다음 12,000×g에서 20분 동안 원심 분리한다.

침전물을 소량의 TBS에 현탁시키고 벤즈아미딘(1.57g/ℓ)을 함유하는 TBS로 투석한다. 투석된 분획을 TBS로 평형화시킨 하이드록시애퍼타이트 컬럼(1×20cm)에 적용한다. 컬럼은 4베드(bed) 부피의 TBS로 세척한다. VAC단백질을 컬럼으로부터 선형 구배 0 내지 50mM의 인산 나트륨 완충액(pH 7.5) 200ml로 용출시킨다. VAC를 함유하는 분획을 합하여 pH 7.5에서 NaCl 50ml 및 트리스/HCl 20mM로 투석한다.

동일한 완충액을 사용하여 DEAE-세파셀 컬럼(3×5cm)을 평형화시키고, 여기에서 투석된 VAC 물질을 크로마토그래피시킨다. 선형 구배 50 내지 300mM의 pH 7.5, 트리스/HCl 20mM 중의 NaCl 용액 200ml를 사용하여 컬럼으로 부터 VAC를 용출시키기 전에 컬럼을 4베드 부피의 평형 완충액으로 세척한다. VAC를 함유하는 분획을 수집해서, pH 7.5에서 NaCl 500mM 및 트리스/HCl 20mM로 투석된 다음 아미콘 농축셀에서 PM-10 한외 여과막을 사용하여 농축 시킨다. 2ml 부피의 농축액을 pH 7.5인 트리스/HCl 20mM 및 NaCl 500mM로 평형화 시킨 세파덱스 G-100 컬럼(3×80cm)에 적용시킨다.

용출액을 2ml씩의 분획으로 모아서 활성분획을 글리세롤-함유 TBS 10 부피%로 따로 투석시키고 70℃에서 보관한다. 완전한 정제는 0 내지 4℃에서 수행한다.

VAC 활성 결정

두가지 다른 방법은 VAC 활성을 결정하기 위해 사용된다.

a) 일단계 응고시험(변형된 프로트롬빈 시간 시험)

b) 트롬빈 형성 시험

일단계 응고 시험은 하기와 같이 수행된다.

실리콘 처리한 유리 접시에서, 시험할 분획 175mcl 또는 대조용으로 TBS 175mcl를 PFP 50mcl 및 묽은 BTP 25mcl와 함께 교반한다(분당 900회전). 37℃에서 3분 동안 배양한 후, pH 7.5인 트리스/HCl 10mM, NaCl 80mM 및 $CaCl_2$ 20mM을 함유하는 완충액 250mcl를 가하여 응고를 개시한다. 피브린 형성은 공지의 방법("Payton Dual Aggregation Modula")을 이용하여 광학적으로 기록한다[참조 : Hornstra, G., Phil. Trans. R. Soc. London B. 294, 355-371(1981)]. 대조군 샘플의 응고시간은 65초 이다. 이 시험을 정제 동안에 이용하여 여러가지 분획의 VAC 활성의 존재에 대해 조사한다. 정제중에 VAC 수율을 결정하기 위해, 한 단위의 VAC 활성은 상기 시험에서 응고시간을 100초 까지 지연시키는 VAC의 양으로서 정한다.

몇몇 경우에, BTP를 정제된 소 트롬빈 또는 정제된 소 인자 Xa로 대체시킨다. 이러한 반-정제된 응고 시스템에서 사용된 트롬빈 또는 인자 Xa의 양은 대조군 샘플의 응고시간이 또한 65초가 되도록 하는 양이다.

트롬빈 형성 시험은 다음과 같이 수행한다.

정제된 소 인자 Xa 20mcl(159nM), $CaCl_2$ 30mcl(100mM), 묽은 VAC 30mcl 및 PS/PC-인지질 막 30mcl (최종 농도는 제6도와 관련한 설명으로 주어진다)를 TBSA(인간 혈청 알부민 0.5mg/ml를 함유하는 TBS, pH 7.9) 181mcl를 함유하는 플라스틱 접시에 둔다.

이 혼합물을 테프론(Teflon) 교반기로 37℃에서 3분 동안 교반시킨다. 정제된 소 인자 II(33.33mcM) 9mcl을 첨가하여 트롬빈 형성을 개시시킨다. 몇시간 후, 반응 혼합물로부터 50mcl의 샘플을 취한 다음, 이를 항온기로 37℃로 조절되고 TBSE 900mcl 및 발색물질 S 2238 50mcl(5mM)을 함유하는 1ml는 용적의 플라스틱 접시의 내용물에 첨가한다. 반응 혼합물중의 트롬빈의 양은 정제된 소 트롬빈의 기지량을 사용한 검정에 의해 도시된 검량곡선을 사용하여, 콘트롤 스펙트로미터 유비콘(Kontron Spetrometer uvikon) 810으로 측정한 405nm에서의 흡광변화로 계산한다. VAC에 의해 야기된 억제율%은 다음과 정의된다.

억제율% =(1-a/b)×100%

여기서 "a"는 VAC 존재하의 트롬빈 형성 속도이고 nM IIa/min으로 나타내며, "b"는 VAC의 존재하의 트롬빈 형성 속도이고 nM IIa/min으로 나타낸다.

단백질

비타민 K-의존 인자 프로트롬빈 및 인자 Xa 는 시트레이트 처리된 소의 혈장을 정제하여 수득한다[참조 : Stenflo J. : J. Biol. Chem. 251 355-363(1976)]. 바륨 시트레이트 흡수 및 용출, 황산 암모늄에 의한 분획화 및 DEAE-세파덱스 상에서의 크로마토그래피 후에, 프로트롬빈 및 인자 IX 또는 인자 X의 혼합물을 함유하는 두개의 단백질 분획을 얻는다. 인자 X를 문헌[Fujikawa et al., Biochemistry, 11, 4882-4891(1972)]의 방법 및 RVV-X[참조 : Fujikawa et al., Biochemistry, 11, 4892-4899(1972)]을 사용하여 활성화시킨다. 프로트롬빈을 인자 IX로 부터 헤파린-아가로스 친화성 크로마토 그래피에 의해 분리한다[참조 : Fujikawa et al., Biochemistry, 12, 4938-4945)]. 헤파린-아가로스 칼럼으로부터의 프로트롬빈-함유 분획을 합하여 문헌[Owens et al., J. Biol. Chem. 249, 594-605(1974)]의 방법을 사용하여 더 정제시킨다. 프로트롬빈 및 인자 Xa의 농도를 문헌[Rosing et al., J. Biol. Chem. 255, 274-283(1980)]의 방법을 사용하여 결정한다. 문헌[Van Dam-Mieres et al. in "Blood coagulation enzymes, methods of enzymatic analysis" Verlag Chemie GmbH, Weinheim]에 기술된 통상의 방법으로 BTP를 제조한다. 단백질 농도를 문헌[Lowry et al., J. Biol. Chem. 193, 265(1951)]에 따라 결정한다.

인지질, 인지질 막 및 인지질 리포좀의 제조

1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(18 : 1시스/18 : 1시스-PC) 및 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포세린(18 : 1시스/18 : 1시스-PS)을 문헌[Rosing et al., J. Biol. Chem. 255, 274-283(1980)]에 기술된 바와같이 제조한다. 두개의 막으로 이루어진 PC 및 PS의 별도의 인지질 막을 문헌[Rosing et al., J. Biol. Chem. 255, 274-283(1980)]에 기술된 바와같이 초음파(ultrasound)를 사용하여 제조한다. 인지질 리포좀의 공급용액을 클로로포름중에 목적하는 양의 인지질을 용해시켜 제조한다. 클로로포름을 질소를 사용하여 증발시킨다. 잔류하는 인지질을 수개의 유리구슬과 3분 동안 조심스럽게 혼합시킨 5% 글리세롤 함유 TBS중에 현탁시킨 다음 10,000×g로 10분 동안 원심분리시킨다. 상기 용액을 버리고 잔류물을 5% 글리세롤 함유 TBS중에 주의해서 재현탁시킨다. 이 방법으로 인지질-리포좀 공급 용액을 수득한다. 이 리포좀을 주위온도에서 저장한다. 인지질 농도는 보트셔 등(Bottcher et al.,) (참조 : Anal. Chim. Acta. 24, 203-207(1961)에 따라 인산염 분석에 의해 결정한다.

SDS-PAGE

SDS 존재하의 플레이트 상에서의 겔 전기영동은 아크릴 아미드 10중량%, N, N^3-메틸렌-비스아크릴아미드 0.27중량% 및 SDS 0.1중량%를 함유하는 겔을 사용하여 문헌[Laemmli, Nature, 227, 680-685(1970)]에 기술된 방법에 따라 수행한다. β-메르캅토-에탄올 5중량%가 환원된 디술파이드 결합과 함께 겔 샘플중에 존재한다. 겔을 다음과 같이 염색시킨다 ; 1) 에탄올 50중량% 및 아세트산 15중량%중의 쿠마시에 블루(Coomassie Blue) R-250 0.25중량%로 염색시키고 에탄올 10중량% 및 아세트산 10중량% 중에서 탈색시키거나, 2) 문헌["Methods in Enzymology"vol.28, 54-63(1972)]에 기술된 세그레스트 등(Segrest et al.)의 방법을 사용하여 염기성 푹신(Merck)으로 부터 제조된 시프(Schiff's) 시약으로 염색시키거나, 3) 문헌[Merril et al. in Electrophoresis, 3, 17-23(1982)]에

기술된 바와같이 온으로 염색시킨다.

전기 초점조정(Electrofocussing)

단백질의 등전 pH 측정을 제조자의 지시에 따라 pH 3.5 내지 9.5에서 암폴린 담체 양쪽성 전해질(PAG 플레이트, LKB)을 함유하는 기성의 박충 폴리아크릴 아미드 겔을 사용하여 수행한다. 겔에서의 pH 구배는 음극과 양극사이의 라인을 따라 겔의 스트립을 절단시켜 전지 초점조정시킨 후 즉시 결정한다. 증류수를 사용하여 각 스트립으로부터 전해질을 용출시키고 물의 pH 값을 결합된 유리 전극으로 측정한다.

글루탐산의 결정

Gla 결정을 문헌[Kuwada et al., Anal. Biochem. 131, 173-179(1983)]의 방법을 사용하여 "뉴클레오실(Nucleosil) 5 SB" 칼럼(CHROMPACK)상의 HPLC에 의해 수행한다.

[실시예 2]

스페로실(Spherocil)에 대한 인지질의 결합

목적하는 인지질을 클로로포름에 용해시키고 스페로실 1g당 5mg의 인지질의 비율로 컬럼물질 스페로실(Messrs. Rhone-Poulenc)에 가한다. 클로로포름을 N_2 기체로 증발시킨 다음 건조 스페로실 인지질을 VAC가 현탁된 완충액으로 세척한다. 인지질의 일부가 음의 전하를 띠는 경우, VAC는 Ca^{++} 및/또는 Mn^{++}의 존재하에 스페로실-결합된 인지질의 결합한다.

[실시예 3]

50mcl의 스트레이트 처리된/혈소판을 함유하지 않는 혈장을 카올린(실제적 응고를 촉진하는 인공 표면, 이 경우에는 분쇄된 유리), 이노시틴(인지질 공급원) 및 VAC가 존재하는 완충액(25mM 트리스/HCl, pH 7.5, 100mM NaCl) 200mcl와 혼합한다. 이 혼합물을 37℃에서 3분 동안 배양한 후에, 250mcl의 Ca^{++} 완충액(200mM 트리스/HCl pH 7.5, 80mM NaCl, 20mM $CaCl_2$)를 가한다. 응고 시간을 실시예 1에서와 같이 측정한다.

[실시예 4]

인간 혈액을 정맥 천자하여 트리나트륨 시트레이트(최종농도 약 13mM의 시트레이트)중에 수집하고 실온에서 10분 동안 2000×g로 원심분리한다. 생성된 혈장을 15분 동안 10,000×g로 다시 원심분리하여 혈소판을 함유하지 않는 혈장(PFP)을 수득한다. PFP의 표준 푸울(Pool)은 여러명의 건강한 기증자로 부터 수득한 혈장을 혼합하여 제조한다.

인간의 제대를 분만후 15분 이내에 수득한다. 동맥은 즉시 빙냉시킨 TBS-완충액으로 관류시키고, 이어서 와아톤 교질(Jelly of Warton)을 없애고 월 믹서(whirl mixer ; Braun MX 32)를 사용하여 TBS중에 균질화시킨다. 그 다음 10% 균질물(w/v)을 분리 시킨다.

세파덱스 G-100 상에서 균질물을 10,000×g로 원심 분리시킨 상등액을 분획화하여, 재현 가능한 특이 프로파일(profile)를 수득하였다(제7도 참조). MPTT로 측정된, 응고 시스템에 영향을 미치는 분획이 제7도에 나타나 있다. 응고 촉진제 활성체는 공극부피와 함께 용출된다. 상기의 활성은 인간의 선천적 인자 VII-결핍혈장을 사용하는 실험에 의해 나타났듯이 단지 MPTT중의 인자 VII의 존재 하에서만 검출될 수 있다. 그러므로 상기의 응고촉진제는 조직 트롬보플라스틴으로 여겨진다.

특정의 분획은 명백한 항응고 작용을 나타낸다. 이러한 분획을 수집하고 DEAE-세파셀 크로마토그래피에 의해 더 정재한다(제8a도 참조). 항응고제는 50mM NaCl 및 50mM 트리스/HCl pH 7.9에서 DEAE-세파셀에 결합되는 것으로 나타났다. pH7.9에서 NaCl의 농도를 선형으로 변화시키며 용출시키면 150 내지 160mM NaCl에서 활성이 나타난다. 항응고 활성을 나타내는 DEAE-분획을 수집하고 세파덱스 G-75 겔 여과시킨다(제8b도 참조). 컬럼(1.5×50cm)은 TBS로 평형화시킨다. 약 30,000 내지 60,000 달톤의 분자량에 상응하는 분획에서 활성이 나타난다.

MPTT는 항응고 활성의 양을 측정하는 정량분석으로서 사용되었다(제9도 참조). 일 단위의 항응고 활성은 응고 개시제로서 HTP(최종 농도 95㎍ 단백질/ml)를 사용하여 MPTT에서 응고시간을 그의 대조값인 65s에서 100s로 연장시키는 양으로서 정의된다. 상기 분석에서, 약 1200 단위의 항응고제 활성을 갖는 2mg의 단백질이 10g의 젖은 동맥조직으로부터 단리 될 수 있음이 계산되었다.

변형된 프로트롬빈 시간 시험(MPTT)

변형된 프로트롬빈 시간 시험(MPTT)는 다음과 같이 수행한다.

실리콘화된 유리 큐벳에서 50mcl PEP를 150mcl TBS, 25mcl의 표준 HTP-희석액 및 25mcl TBS(대조용) 또는 25mcl의 동맥균질물 분획과 함께 37℃에서 교반한다. 3분간 배양한 후, 250mcl Ca-완충액(80mM NaCl, 20mM $CaCl_2$ 및 10mM 트리스/HCl pH7.9)를 가함과 동시에 응고가 시작된다. 피브린 형성은 "Parton Dual Aggregation Module"를 사용하여 광학적으로 모니터한다. Xa 인자를 사용하여 MPTT에서 응고를 개시하는 경우에는 HTP를 빼고, 25mcl의 정제된 인자 Xa를 250mcl의 Ca^{2+}-완충액과 함께 희석시킨 PEP에 가한다.

변형된 트롬빈 시간 시험(MTT)

이 분석은 Xa-제제를 25mcl의 정제된 트롬빈으로 치환시키는 것 이외에는 전술한 Xa-개시된 MPTT와 유사하게 수행한다.

단백질

프로테아제 Ⅰ형 및 트립신(EC 3. 4. 2. 1. 4)는 시그마(Sigma)사로 부터 수득한다. HTP는 문헌[Van Dam Mieras et al. (1984) Method of Enzymatic Analysis 5pp. 352-365]에 기재된 바와같이 인간의 뇌로부터 제조한다. Xa 인자, 프로트롬빈 및 트롬빈은 문헌[Rosing et al. (1980) J. Biol. Chem. 255, 274-283]에 기재된 바와같이 시트레이트 처리된 소의 혈액으로부터 정제한다. Va 인자는 문헌[Lindhout et al. (1982) Biochemistry 21,4594,5502]에 기재된 바와같이 소의 혈액으로 부터 정제된다. Va 인자는 V 인자를 트롬빈과 함께 배양하여 수득한다. 프로트롬빈의 농도는 분자량=72,000 및 $A_{280}^{1\%}$=15.5로 부터 계산되며 [참조 : 오웬(Owen) 등 (1974) J. Biol. Chem. 249, 594-605]. V 인자 농도는 분자량=330,000 및 $A_{280}^{1\%}$=9.6으로 부터 계산된다[참조 : 네샤임(Nesheim) 등 (1979) J. Biol. Chem. 254, 508-517]. Xa 인자 및 트롬빈 농도는 활성부위 적정에 의해 측정된다[참조 : Rosing et al. (1981) J. Biol. Chem. 253, 274-283]. 그밖의 다른 단백질 농도는 문헌에 기재된 바와 같이 계산된다[참조 : Lowry et al. (1981) J. Biol. Chem. 193, 265].

인지질 및 인지질 소포체의 제조

Ole_2 Gro-p-Cho(1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린) 및 Ole_2Gro-p-Ser(1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포세린)은 로싱 등[Rosing et al. (1980)에 의해 기술된 바와 같이 제조한다. Ole_2Gro-p-Ser-Ole_2 Gro-p-Cho(몰비 20 : 80)으로 구성된 단일 이중층 소포체는 초음파 처리하여 제조한다. 인지질 농도는 문헌에 개재된 방법에 따라 인산염 분석에 의해 측정한다[참조 : Bottcher et al. (1961). Anal. Chim. Acta. 24, 203-207]

프로트롬빈 활성화의 측정

트로트롬빈 활성하의 시간 경과에 따른 변화는 항응고체의 농도를 달리하여 시험한다. (Xa, Ca^{2+}), (Xa, 인지질, Ca^{2+}) 또는 (Xa, Va, 인지질, Ca^{2+})의 혼합물을 37℃에서 pH7.9인 50mM 트리스/HCl, 175mM NaCl, 0.5mg/ml 인간혈청 알부민중에서 서로 다른 양의 항응고제와 함께 교반한다. 3분 후, 프로트롬빈을 가함으로써 프로트롬빈 활성화를 개시 시킨다. 서로 다른 시간 간격에서, 25mcl의 샘플을 반응혼합물로 부터 취하여 TBS, 2mM EDTA 및 0.23mM S 2238(최종부피 : 1ml)를 함유하는 큐벳(37℃로 조절됨)에 도입한다. 콘트론 분광 광도계 유비콘 810(Kontron Spectro- photometer Uvikon 810)을 사용하여 측정된 405nm에서 흡수변화 및 기지량의 정제된 트롬빈을 사용한 분석을 기준으로 작성한 검량 곡선으로부터 생성된 트롬빈의 양을 서로 다른 농도의 항응고제에서 계산한다. 소포체로서 Ole_2Gro-p-Ser 및 Ole_2Gro-p-Cho(20 : 80의 몰비)로 구성된 인지질을 가한다.

특정화

G-75 크로마토그래피의 여러 분획을 MPTT 중에서 시험하고 SDS-PAGE로 분석한다. 결과(제10도)는 항응고제가 약 32,000 달톤의 분자량을 갖는 것으로 나타났다. 항응고제 활성과 32K-밴드 사이의 관계는 폴리아크릴아미드 겔을 분할시키고 0.5mg/ml 소의 혈청 알부민을 함유하는 TBS를 사용하여 분할체로 부터 단백질을 연속 용출시킴으로써 확인한다. 항응고제 활성은 단지 32K -밴드에서 상응하는 분할체로부터의 용출액중에서 발견되었다. 더우기, 이 활성은 56℃에서 내열성이 없는 것으로 밝혀졌으며 출발물질로서 MPTT 중에서 유사한 용량 반응 관계를 나타내었다.

최고 항응고제 활성을 함유하는 G-75 분획을 합하여 항응고제의 추가의 특성화에 사용한다. 56℃에서의 항응고제 배양은 2분 후 활성을 측정할 수정 없을 때까지 그 활성을 급속하게 감소시킨다. 항응고제는 프로테아제 타입 Ⅰ을 사용한 37℃에서의 배양에 의해 2시간 내에 완전히 그 활성을 잃으며, 반면 트립신은 3시간의 배양(제11도)후에도 항응고제를 거의 불활성화 시키지 않는다. 이들 실험에서 사용된 프로테아제 타입 Ⅰ및 트립신 농도는 15분 내에 2.5nM 트롬빈을 완전히 불활성화시킨다. 반응혼합물로부터 MPTT로 넘어간 프로테아제 타입 Ⅰ및 트립신의 양은 제어 응고(cloting) 시간에 영향을 주지 않는다.

작용형태

HTP로 개시되는 경우 및 인자 Xa로 출발하는 경우 모두에 항응고제의 존재하에서(제12도) MPTT는 연장된다. 그러나 트롬빈-유도된 응고는 억제되지 않는다. 이러한 발견으로 인하여, 본 발명자는 인자 Xa, 인자 Va, 인지질 및 Ca^{2+}에 의한 프로트롬빈의 트롬빈으로의 전환에 대한 항응고제의 효과를 연구하였다. 언급된 시험조건 하에서, 트롬빈 형성은 용량-의존적으로 항응고제에 의해 억제된다(제13a도). 인자 Va의 부재하에, 인자 Xx, 인지질 및 Ca^{2+}에 의한 프로트롬빈의 활성화도 항응고제에 의해 억제될 수 있다(제13b도). 그러나, 이러한 억제는 활성화가 인지질의 부재하에 일어나는 경우에는 관찰되지 않는다(제13c도).

[실시예 5]

VAC에 대한 폴리클로날 항체

소 VAC에 대한 폴리클로날 항체를 토끼에 유발시킨다. 실시예 1에 기술된 것과 같은 방법으로 정제된 소 VAC를 동량의 완전한 프로인트(Freund) 보조액과 혼합한다. 이 혼합물을 토끼에
피하주사한다. 4주후, 토끼에 정제된 소 VAC를 피하주사에 의해 추가 투여한다. 2주 간격으로 추가 투여를 2회 반복한다. 최종 추가투여 10일 후, 토끼를 출혈시키고 채혈하여 응고시킴으로써 혈청을 수득한다.

면역글로블린(1g)을 하기 방법에 따라 혈청으로 부터 분리시킨다.

a) 혈청을 56℃에서 30분 동안 가열한다.

b) 계속해서 혈청을 50mM 트리스, 100mM NaCl, pH8.2로 평형화시킨 DEAE-세파셀에 적용한다.

c) 비-결합된 단백질을 50% 포화상태에서 $(NH_4)_2SO_4$로 침전시킨다.

d) 침전된 단백질을 원심 분리에 의해 펠릿화시키고 펠릿을 50mM 트리스, 100mM NaCl pH7.9중에 재현탁시킨 다음 동일한 완충액에 대하여 광범하게 투석한다.

e) 생성된 단백질 혼합물은 항 -VAC Ig를 함유한다.

소의 대동맥, 소의 폐, 쥐 및 말의 대동맥, 및 사람의 제대 동맥으로 부터 VAC-활성을 나타내는 단백질 분획을 하기에 기술된 방법으로 분리시킨다.

단백질을 도데실 술페이트의 존재하 및 비-환원된 상태하에 폴리아크릴 아미드 겔 상에서 전기영동에 의해 분리한다. 전기영동이 완결된 후, 단백질을 겔로 부터 문헌[Towbin, et al. (1983) Biochemistry, 22, 2472-2432]에 기술된 것과 같은 니트로 셀룰로오스 시트로 이동시킨다. 시트를 항-VAC Ig와 함께 배양하고 완전히 세척한 후 시트를 양고추 냉이 퍼옥시다제에 결합된 염소 항-토끼 Ig와 함께 배양한다. 후자를 퍼옥시다제에 대한 기질인 디아민 벤지딘 테트라하이드로클로라이드로 가시화시킨다.

기술된 과정의 완료 후, 니트로셀룰로오스 시트상의 갈색 밴드는 염소항-토끼 Ig의 존재를 나타낸다. 또한, 항-VAC Ig 및 항-VAC Ig가 결합된 단백질이 상기 점상에 존재한다.

소의 대동맥, 소의 폐, 쥐 및 말의 대동맥, 및 사람의 제대 동맥으로부터 분리된 VAC-활성을 갖는 단백질의 이뮤노블롯(Immunoblot)이 제14도에 나타나 있다. 이들 결과로부터 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다 : 상술된 분리방법을 실제적으로 사용하여, VAC-활성을 갖는 단백질 분획을 소의 대동맥, 소의 폐, 쥐 및 말의 대동맥 및 사람의 제대 동맥으로 부터 수득할 수 있다. 더우기, VAC-활성을 갖는 분리된 단백질 분획은 토끼 몸속에서 소의 VAC에 대해 유발된 항-VAC Ig와 반응하는, 약 32,000, 약 34000 및 약 70,000의 분자량을 단백질을 함유한다.

[실시예 6]

거대부피 인지질 소포체를 사용한 VAC에 대한 정제단계

1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포세린(PS) 및 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(PC)으로 구성된 거대부피 인지질 소포체(LVV)는 문헌[P. van de Waart et al. Biochemistry(1983) 22, 2427-2432]의 공지된 방법에 의하여 제조한다.

정제단계에서 PS/PC(몰비 20 : 80)을 함유하는 LVV가 사용된다. 그러나 음전하 인지질이 존재하는 한, 다른 몰비도 유용하다. 인지질중의 지방산의 쇄길이를 또한 변화시킬 수 있다.

50mM 트리스/HCl, 100mM NaCl, pH 7.9중의 ±1mM 인지질, LVV를 VAC-활성을 갖는 동량의 단백질 분획과 혼합한다. 단백질은 50mM 트리스/HCl, 100mM NaCl, 10mM $CaCl_2$, pH 7.9중에 존재한다. 혼합물을 주위 온도에서 5분동안 정치시킨다. 계속해서, 혼합물을 20,000×g에서 30분 동안 원심분리시킨다. 펠릿을 50mM 트리스/HCl, 100mM NaCl, 10mM $CaCl_2$, pH 7.9중에 재현탁시키고 다시 원심분리시킨다. 그후, 생성된 펠릿을 50mM 트리스/HCl, 100mM NaCl, 100mM 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), pH 7.9중에 재현탁시키고 다시 원심분리 시킨다. 생성된 상등액은 VAC-활성을 갖는다.

상술된 방법은 정제된 VAC를 수득하기 위한 방법중에서 효과적인 정제단계이다.

[표 A]

소 대동맥의 내피로 부터의 VAC의 정제

정 제 단 계	단백질[a] mg	VAC[b] 단위	특이활성 단위/mg	수득율 %	정제의 정도
35%$(NH_4)_2SO_4$를 함유하는 상등액	630	19.000	31.0	100	1.0
90%$(NH_4)_2SO_4$를 함유하는 침전물	470	19.000	40.4	97	1.3
하이드록시 애퍼타이트 분획물	206	17.300	84.0	89	2.7
DEAE 분획물	35.8	13.900	388	71	12.5
세파덱스 G-100분획물 139	0.45	0.666	1480	3.4	47.7

a) 단백질의 양은 로리등의 방법을 사용하여 측정한다[참조 : Lowry, O. H. Rosebrough N. V., Farr A. L. 및 Randall R. J. J. Biol. Chem. 193(1951)265].

b) VAC단위는 일련의 시험희석에 의한 실시예 1에서 기술한 일단계 응고 시험을 이용하여 측정한다. 대조군 시료의 응고시간은 65초이다. 1단위의 VAC활성은 응고시간을 100초로 연장시키는 VAC의 양으

로서 규정된다.

[표 B]

음전하 인지질 리포좀에 대한 VAC의 금속-의존성 결합

양이온(10mm)	tc초[a] 상등액	EDTA[c]
대조군(리포좀이 존재하지 않음)	180	N.D.[d]
대조군(양이온이 존재하지 않음)	174	64.8
$CaCl_2$	64.2	134
$MgCl_2$	165	N.D.
$MnCl_2$	65.1	N.D.

a) 응고시간(tc)은 실시예 1에 기술된 일-단계 응고 시험을 이용하여 측정한다.

b) 50mcl의 인지질 리포좀의 공급용액(PS/PC : 50/50몰/mp : 1mm), 50mcl의 VAC(250mcg/ml, 특히활성=700단위/mg) 및 5% 글리세롤 및 부가양이온을 함유하고 있는 pH 7.5의 100mcl TBS를 주변온도에서 혼합한 후 15분동안 15,000×g으로 원심분리하여 수득한 25mcl의 상등액을 TBS로 희석하여 최종 용정이 175mcl로 되도록 한 다음 일단계 응고 시험에 의해 시험한다. 나머지 상등액은 SDS-PAGE로 분석한다(제4도).

c) 수득한 리포좀 침전물을 다시 5% 글리세롤 및 10mm EDTA를 함유하고 있는 pH 7.5의 TBS 150mcl에 현탁시킨다. 이 현탁액을 15분동안 15,000×g으로 원심분리한다. 상등액의 VAC활성은 b)에서 기술한 바와같이 분석한다.

d) N.D=측정되지 않음

[표 C]

인자 Xa와 인자 IIa의 가아미도 분해활성에 대한 VAC의 효과

	A_{405}/분 10^3(a)VAC	
	−	+
Xa	110.5	110.5
Xa, AT-Ⅲ	80.0	81.5
Xa, 헤파린	110.5	109.0
Xa, 헤파린, AT-Ⅲ	47.5	N.D.[b]
IIa	7.5	7.5
IIa, AT-Ⅲ	5.4	5.6
IIa, 헤파린	7.5	7.1
IIa, 헤파리, AT-Ⅲ	0.56	N.D.

a) 가아미도분해 활성은 하기와 같이 측정한다 :

인자 Xa 또는 인자 IIa를 TBSA중의 상기 언급한 제제로 희석한다. 반응 혼합물을 온도조절 장치를 사용하여 37℃로 조절한 플라스틱 접시중에서 테프론 피복된 교반기로 교반한다. 10분후, 이 접시로부터 100mcl(Xa) 또는 50mcl(IIa)의 시료를 취한다. 취한 시료를 온도조절 장치로 37℃로 조절하고 800mcl Ⅰ의 TBSE, 100mcl의 S 2337(2mM) 또는 900mcl의 S 2238(5mM)을 함유하고 있는 또 다른 접시중에 도입한다. 405nM에서의 흡수 변화를 온도조절 장치를 사용하여 온도를 37℃로 조절한 콘트론 분광광도계 유비콘 810(Kontron Spectro-photometer Uvikon 810)으로 측정한다. 이 반응혼합물 중에 있는 여러종류의 시약들의 최종 농도는 하기와 같다 : 18.7nM의 인자 Xa ; 1.5nM의 인자 IIa ; 18.7nM의 인간 AT-III; 1단위/ml의 헤파린 및 10.7mcg/ml의 VAC(특히활성 : 1300단위/mg)

b) N.D=측정되지 않음

도면에 대한 설명

제1도 : 세파덱스 G-100상에서 VAC의 겔여과

컬럼(3×80cm)은 60cm의 압력높이로 제조하며 500mM NaCl 및 20mM 트리스/HCl, pH 7.5로 평형화시킨다. DEAE 크로마토그래피 후 수득한 VAC-함유 분획을 농축시켜 2ml로 만든 다음 세파덱스 G-100상에 통과시킨다. 60cm의 압력높이를 유지시킨다. 공용적(empty volume)은 245ml(분획 70)이다. 2ml의 분획을 수집한다. 이 분획을 10% 글리세롤을 함유하고 있는 TBS로 툭석한 후, 실시예 1에서 기술한 바와같이, 일단계 응고시험에 의해 VAC활성에 대해 시험한다. 응고시간은 TBS를 함유하는 G-100분획의 1 : 10희석농도에서 관찰한 것이다. VAC부재시의 응고시간은 65초이다.

제2도 : VAC의 분석적 SDS-PAGE

10중량%의 아크릴아미드, 0.27중량%의 N, N^3-메틸렌-비스아크릴아미드 및 0.1중량%의 SDS를 함유하고 있는 겔을 사용하여 레믈리(Laemli)법에 따라 SDS-PAGE를 수행한다[참조 : Laemli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685]. x축 상에 있는 수치의 의미는 하기와 같다 :

1) 디설파이드 결합이 환원된 기지 분자량의 대조단백질

2) 25mcg의 환원된 VAC

3) 25mcg의 비-환원된 VAC

겔을 쿠마시에 블루로 염색한 후, 실시예 I에서 기술한 방법으로 탈색시킨다.

제3도 : VAC의 등전 pH의 측정

3. 5 내지 9.5범위의 pH에서 PAG의 플레이트를 사용하여 전기초점을 수행한다(참조 : 실시예 1). pH 구배를 겔중에 형성시킨 후 200mcg의 인간 H^1 및 20mcg의 VAC를 겔에 적용시킨다. 대조군으로서 인간 H_b를 사용한다(공지된 등전점 : pH 6.8).

겔을 0.7M의 트리클로로아세트산으로 30분동안 고정시킨후 쿠마시에 블루로 염색한다.

제4도 : SDS-PAGE를 사용한 음전하 리포좀에 대한 VAC의 결합분석

실시예 1에서 기술된 동일한 플레이트상에서 레믈리 법에 따라 SDS-PAGE를 수행한다[참조 : Laemli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685]. 분석한 시료를, 표 B에 대한 설명에서 언급한 바와같이 결합실험으로부터 수득한다. x축 상에 나타난 수치의 의미는 하기와 같다 :

1) 디설파이드 결합에 환원된 기지 분자량의 대조 단백질

2) 리포좀의 부재하에 VAC제제를 원심분리한 후에 수득한 상등액

3) 리포좀의 존재하에 VAC를 원신분리시킨 후 수득한 상등액

4) 리포좀 Ca^{++}의 존재하에 VAC를 원심분리시킨 후 수득한 상등액

5) 10mM EDTA를 함유하는 TBS에 재현탁시킨 상기 4)의 리포좀 침전물을 원심분리시킨 후 수득한 상등액

제5도 : 트롬빈 형성의 억제(%)에 대한 VAC농도의 영향

언급한 VAC의 농도는 시험계에 존재하는 최종농도이다. 트롬빈 형성은 $CaCl_2$를 함유하는 TBSA 10mM 중의 1mcM 프로트롬빈, 10nM Xa인자 및 0.5M(▲-▲) 또는 5M(●-●) 인지질막(PC/PS) ; 4 : 1, 몰/몰)을 사용하여 측정한다. 반응 혼합물을 프로트롬빈 없이 37℃에서 3분간 특정양의 VAC(특이활성 : 1300단위/mg)와 함께 교반한다. 실시예 I에서와 같이, 프로트롬빈을 혼합물에 가함으로써 트롬빈 형성을 개시시키고 속도를 측정한다. VAC의 부재하의 트롬빈 형성속도는 3.3nM IIa/분(▲-▲) 또는 10.9nM IIa/분(●-●)이다.

제6도 : VAC에 의한 트롬빈 형성의 억제(%)에 대한 인지질 농도의 영향

트롬빈 형성은 TBSA중의 1mcM 프로트롬빈, 10nM Xa 인자, 10.7mcg/ml의 VAC(특이활성 : 1300단위/mg) 및 여러가지 농도의 인지질 막(PC/PS ; 4 : 1, 몰/몰)을 사용하여 측정한다. Xa 인자, VAC 및 인지질을 TBSA중, 37℃에서 3분동안 교반한다. 프로트롬빈을 반응 혼합물에 가함으로써 트롬빈 형성이 개시된다. 트롬빈 형성 속도는 실시예 I에 기술한 바와같이 측정한다. 트롬빈 형성의 억제%(●-●)는 VAC부재하의 상응하는 트롬빈 형성속도(▲-▲)를 이용하여 각 인지질 농도에 대해 측정한다.

제7도 : 세파덱스(Sephadex) G-100상에서 제대 동맥 균등질의 상등액의 10,000×g의 겔여과 2ml의 10,000×g상등액을 TBS로 미리 평형시킨 세파덱스 G-100칼럼(1.5×80cm)에 충진시킨다. 칼럼을 TBS로 용출한다. 생성된 분획의 분취량을 MPTT중에서 시험한다. 특정분획(▨)은 응혈촉진활성을 나타내며 HTP, Xa인자 또는 트롬빈의 첨가없이 MPTT중에서 응고를 개시한다. HTP를 사용하여 응고를 개시시킨 다른 특정 분획(▩)은 MPTT중에서 응고시간을 연장시킨다. 이 분획을 모아서 다시 분별시킨다.

제8도 : DEAE-세파셀(Sephacel) (A) 및 세파덱스 G-75(B) 상에서 항응고제의 크로마토그래피

세파덱스 G-100칼럼으로부터 수득한 항응고제를 함유하는 푸울을 세파셀에 적용시킨다. 50mM 내지 300mM NaCl(----)의 선형구배 200ml로 용출시킨다. 분획(4ml)을 수집한다. 각 분획에 대해 A_{280}을 측정하고, 응고 개시제()로서 HTP(최종농도 95mcg 단백질/ml)를 사용하여 MPTT중에서 항응고제 활성을 분석한다. 항응고제 활성을 갖는 분획을 수집하여 농축시킨 후 세파덱스 G-75(B)에 적용시킨다. 분

획(2ml)을 수집한다. 각 분획(-) 및 항응고제 활성체(•)에 대해 A_{280}을 측정한다. V_0는 칼럼의 기공 용적을 나타낸다.

제9도 : G-75 용출제의 여러가지 분획의 겔 전기영동

G-75 용출제의 여러가지 분획의 일정량을 SDS-PAGE에 의해 분석한다.

겔을 멜리 등[Merril et al.(1982) Electrophoresis J. . 3, 17-23]에 따라서 은으로 염색시킨다. 1 래인 : 환원된 저분자량 표준물질 ; 2 내지 6래인 : G-75분획번호 각각 35, 39, 41, 43 및 50의 비환원된 분취량.

제10도 : MTPP중에서 항응고제의 용량반응

여러가지 양의 항응고제를 MPTT를 가한다. HTP(최종농도 95mcg단백질/ml)를 사용하여 응고를 개시시킨다. 대조 응고 시간은 65초이다.

제11도 : 항응고제의 활성에 대한 단백분해 효소의 효과

항응고제의 단백분해 효소(•)의 부재하에 프로테아제 I형(최종농도 0.11 단위/ml) 및 트립신(▲, 최종농도 88 BAEE 단위/ml)과 함께 37℃에서 인큐베이드 시킨다. 지정시간에 6mcg 프로틴을 함유하는 5mcl의 항응고제를 반응 혼합물로 부터 빼내 MPTT에 가한다. HPT(최종농도 18 단백질 mcg/ml)를 사용하여 응고를 개시시킨다. 대조 응고시간은 110초이다. 단백분해 효소에 대한 상기 범례에서 주어진 단위는 제조자가 제공한 값으로 부터 계산한다.

제12도 : HTP, Xa인자 또는 트롬빈에 의해 M(P)TT중에서 유도된, 응고시간에 대한 혈관 항응고제의 영향

응고개시제의 농도(HTP 18mcg 단백질/ml, 1.5nM Xa인자 또는 0.4nM트롬빈)는 대조응고 시간이 약 110초(흰막대)가 되도록 선택한다. Xa인자를 사용할 경우, Ole_2Gro-p-Ser/Ole_2 Gro-p-Cho(몰비 20 : 80)로 이루어진 인지질 소포(최종 농도 10mcM)를 반응혼합물에 가한다. 3.5mcg 단백질의 항응고제의 존재하에 지정시약에 의해 유도된 응고시간은 검은 막대로 나타낸다.

제13도 : (Xa, Va, 인지질, Ca^{2+}), (Xa, 인지질, Ca^{2+}) 및 (Xa, Ca^{2+})에 대한 프로트롬빈 활성화에 대한 항응고제의 효과

반응혼합물은(A) 12.0mg/ml의 항응고제(▨), 4.8mcg/ml의 항응고제(▲)와 함께 및 항응고제(●)없이 1mcM 프로트롬빈, 0.3nM Xa, 0.6nM Va, 0.5nM인지질 및 10mM $CaCl_2$, (B) 2.4mg/ml 항응고제(▨), 0.48mcg/ml 항응고제(△)와 함께 및 항응고제(●)없이 1mcM 프로트롬빈, 10nM Xa, 0.5mcM 인지질 및 10mM $CaCl_2$(c) 120mcg/ml 항응고제(△)와 함께 항응고제(▨)없이 1mcM 프로트롬빈, 75nM Xa 및 10mM $CaCl_2$를 함유한다. 지정시간에 시료를 꺼내 트롬빈을 측정한다.

제14도 : 이뮤노블롯(immunoblots)

블롯은 실시예 5에 기술된 공정으로 수득한다. 1래인 : 소의 대동맥으로 부터 분리된 VAC-활성을 갖는 단백질 분획. 2 래인 : 소의 대동맥으로부터 분리된 VAC-활성을 갖는 단백질 분획. 3래인 : 소의 폐로부터 분리된 VAC-활성을 갖는 단백질 분획. 4래인 : 인간의 제대 동맥으로부터 분리된 VAC-활성을 갖는 단백질 분획. 5래인 : 쥐의 대동맥으로부터 분리된 VAC-활성을 갖는 단백질 분획. 6래인 : 말의 대동맥으로부터 분리된 VAC-활성을 갖는 단뱁질 분획.

제15도 : G-75로 부터 수득한 용출제의 여러가지 분획의 겔 전기영동(A) 및 항응고제 활성(B)

G-75로부터 수득한 용출제의 여러가지 분획의 특정량을 전술한 바와같이 겔 전기영동시킨다. 하기에 기재된 방법을 사용하여 밴드를 은으로 염색시킨다[참조 : Merril C. R., Goldman D., and Van Keuren M. L. (1982) Eletrophoresis 3, 17-23]. 전기영동 1래인 : 저분자량을 갖는 표준물질, 전기영동 2 내지 6레인 : 용출용적이 증가됨에 따라, 비환원된 동등량의 G-75분획. 겔 전기영동에 의해 분석한 G-75분획의 특정량을 응도를 개시시키기 위한 HTP를 사용하여 MPTT(전술한 것 참조)에서 시험한다. 대조응고 시간은 흰막대로 나타낸다. 검은 막대하의 숫자는 제15도에서 전기영동 래인의 수에 상응한다.

제16도 : 혈관 항응고제의 열 분활성화

항응고제를 56℃에서 배양하고 여러가지 배양 기간후에 3.6mcg의 단백질을 함유하는 5mcl의 샘플을 취하여 얼음으로 즉시 냉각시킨 후 응고 개시제로서 HPT를 사용하여 MPTT중에서 시험한다. 대조샘플의 응고시간은 110초이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

혈관벽, 강력하게 혈관화된 조직 또는 내피조직 세포 배양물을 균질화 시키고 차등 원심분리시킨 다음, 상등액에 대하여

(1) 염에 의한 침전

(2) 친화성 크로마토그래피

(3) 이온 교환 크로마토그래피 및

(4) 분자체를 사용한 크로마토그래피 중에서 선택된 1가지 이상의 방법을 목적하는 순서로 수행하고, 필요에 따라 단계 (1), (2), (3) 및 (4)에 따라 수득된 생성물을 투석시킴을 특징으로 하여 항응고 단백질을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 추가의 정제를 면역흡착 크로마토그래피에 의해 수행함을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 2항에 있어서, 인지질 소포체를 사용하여 단백질을 정제함을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계(1)에서의 침전처리를 위해 황산 암모늄을 사용하고, 단계(2)에서의 크로마토그래피에는 하이드록시애퍼타이트를 사용하며, 단계(3)에서의 크로마토그래피에는 DEAE-세파셀(DEAE-Sephacel)을 사용하고, 단계(4)에서의 크로마토그래피에는 세파덱스(Sephadex) G-100 또는 G-75를 사용함을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 제조되는 항응고 단백질을 응고 인자들을 불활성화시키지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 제조되는 항응고 단백질 Xa 인자 및 IIa인자의 생물학적 활성 및 가아미도분해 활성을 억제하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 제조되는 항응고 단백질이 혈관응고제 또는 Xa 인자에 의해 유도된 응고는 억제하지만 트롬빈에 의해 유도된 응고는 억제하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 제조되는 항응고 단백질이

-변형된 프로트롬빈-시간 실험 및/또는

-변형된 활성화 부분 트롬보플라스틴-시간 실험 및/또는

-비-변형된 프로트롬빈-시간 실험 및/또는

-음전하 인지질 및 Ca^{2+}존재하에서의 응고인자 Xa에 의한 프로트롬빈 활성화 및/또는

-음전하 인지질 및 Ca^{2+} 존재하에서의 인자 IXa에 의한 고유X-활성화 및/또는

-분리 및 자극시킨 혈소판의 프로트롬빈 활성화 및/또는

-혈관벽에 의해 유도된 응고 및/또는

-혈소판의 응고-의존성 응집을 억제함을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

-제조되는 항응고 단백질의 억제 효과는 인지질의 양에 의존하고,

-항응고 단백질은 인지질을 가수분해 하지 않으며,

-단백질에 의해 유도되는 Xa인자에 의한 프로트롬빈 활성화의 억제가 인지질 농도에 의존함을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 제조되는 항응고 단백질이

-2가 양이온 Ca^{2+} 및 Mn^{2+}에 의해, 소포체, 리포좀 또는 에테로좀에서 발견될 수 있는 음전하 인지질에 결합하며,

-2가 양이온 Ca^{2+} 및 Mn^{2+}에 의해, 스페로실에 커플링된 음전하 인지질에 결합하고,

-음전하 인지질에 대한 단백질이 결합은 가역적이며,

-항응고 단백질이 음전하 인지질 표면으로부터 Xa 인자 및 프로트롬빈을 대체시킬 수 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 제조되는 항응고 단백질의 분자량이 약 70×10^3, 약 60×10^3, 약 34×10^3 또는 약

32×10^{3}임을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 제조되는 항응고 단백질에 있어서,

-항응고 단백질은 포유동물의 세포벽으로 부터 분리되어 정제된 것이며,

-항응고 단백질은 당단백이 아니고,

-항응고 단백질은 포스포리파제가 아니며,

-항응고 단백질이 pH 4.4 내지 4.6에서 등전점을 갖고,

-56℃에서 항응고 단백질의 활성은 열적으로 불안정하며,

-시트레이트 처리한 혈장내에서의 항응고 단백질의 활성은 37℃에서 수시간동안 안정하게 유지되며,

-항응고 단백질의 활성은 트립신 및/또는 키모트립신에 의해 완전히 파괴되지 않으며,

-항응고 단백질의 활성은 콜라게나제 및/또는 엘라스타제에 의해 영향을 받지않고,

-항응고 단백질은 2가 양이온 Ca^{2+} 및 Mn^{2+}에 의해, 소포체, 리포좀 또는 에테로좀에서 발견될 수 있는 음전하 인지질에 결합하며,

-항응고 단백질은 2가 양이온 Ca^{2+} 및 Mn^{2+}에 의해, 스페로실에 커플링된 음전하 인지질에 결합하고,

-음전하 인지질에 대한 단백질의 결합은 가역적이며, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)에 의해 역전될 수 있고,

-항응고 단백질은 음전하 인지질 표면으로부터 Xa 인자 및 프로트롬빈을 대체시키며,

-항응고 단백질은 변형된 프로트롬빈-시간 시험을 억제하고,

-항응고 단백질은 변형된 활성화 부분 트롬보플라스틴-시간 실험을 억제하며,

-항응고 단백질은 비-변형된 프로트롬빈-시간 실험을 억제하고,

-항응고 단백질은 시험관내에서 음전하 인지질 및 Ca^{2+} 존재하에서의 응고인자 Xa에 의한 프로트롬빈 활성화를 억제하며,

-항응고 단백질은 Xa 인자 및 IIa인자의 생물학적 활성 및 가아미도 분해활성을 억제하고,

-항응고 단백질은 시험관내에서 음전하 인지질 및 Ca^{1+} 존재하에서의 IXa인자에 의한 고유 X-활성화를 억제하며,

-항응고 단백질은 시험관내에서 분리 및 자극시킨 혈소판의 프로트롬빈 활성화를 억제하고,

-항응고 단백질은 시험관내에서 혈관벽에 의해 유도된 응고를 억제하며,

-단백질에 의해 유도되는 Xa 인자에 의한 프로트롬빈 활성화의 억제가 인지질 농도에 의존하며, 고농도의 인지질에 의해 감소됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 항응고 단백질이 인간 항응고 단백질임을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 항응고 단백질이 소 항응고 단백질임을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 항응고 단백질이 쥐 항응고 단백질임을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

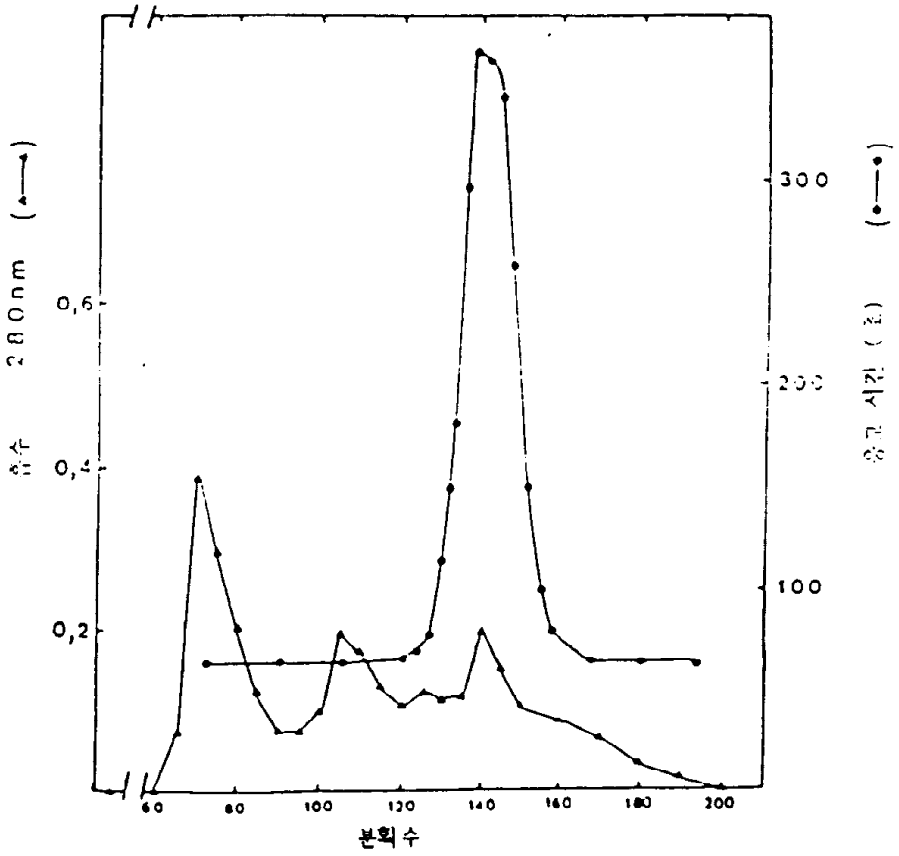
제1항에 있어서, 항응고 단백질이 말 항응고 단백질임을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

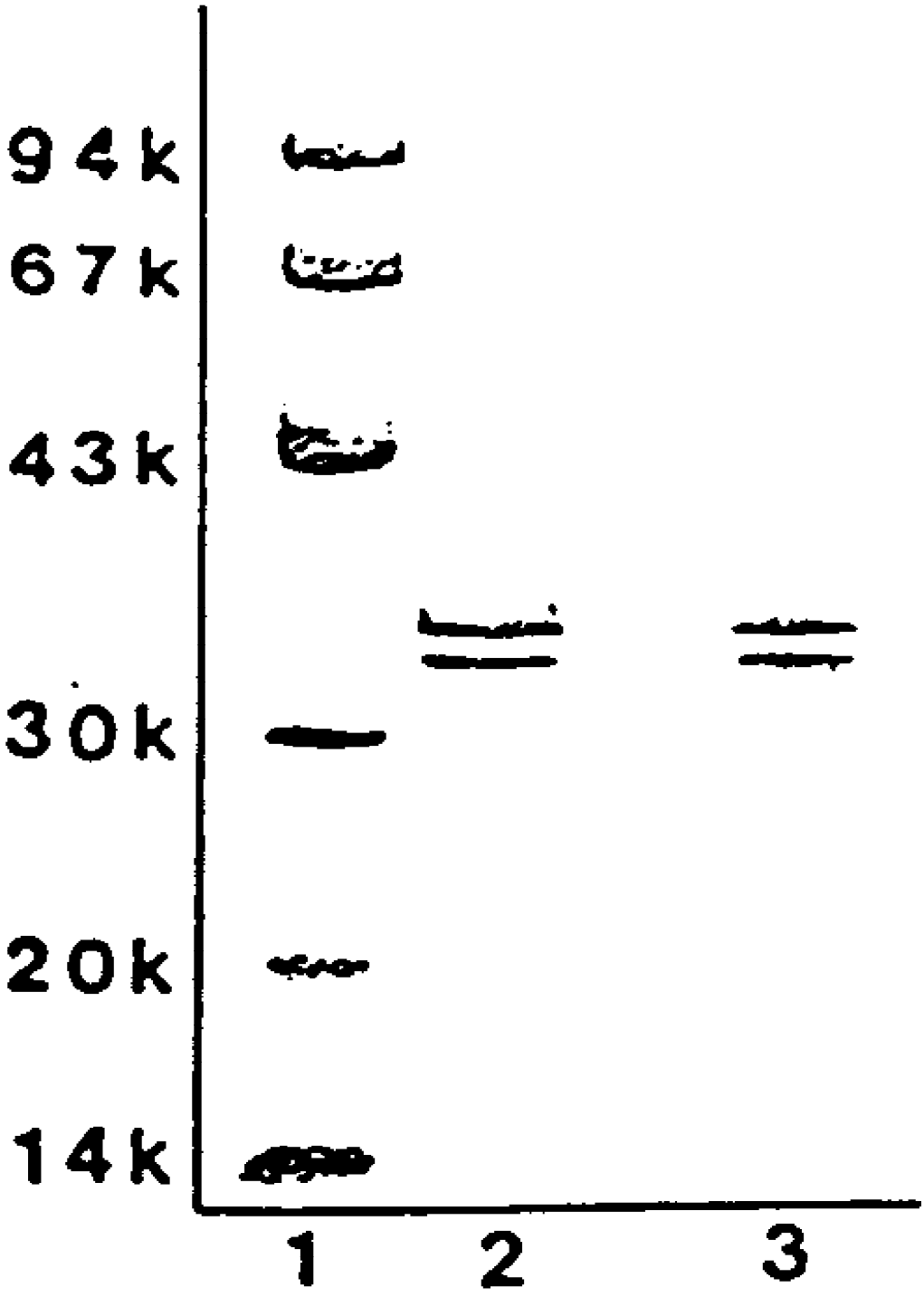
제1항 내지 16항중의 어느 하나에 따라 제조된 항응고 단백질의 유효량을 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 담체와 혼합시킴을 특징으로 하여, 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

도면

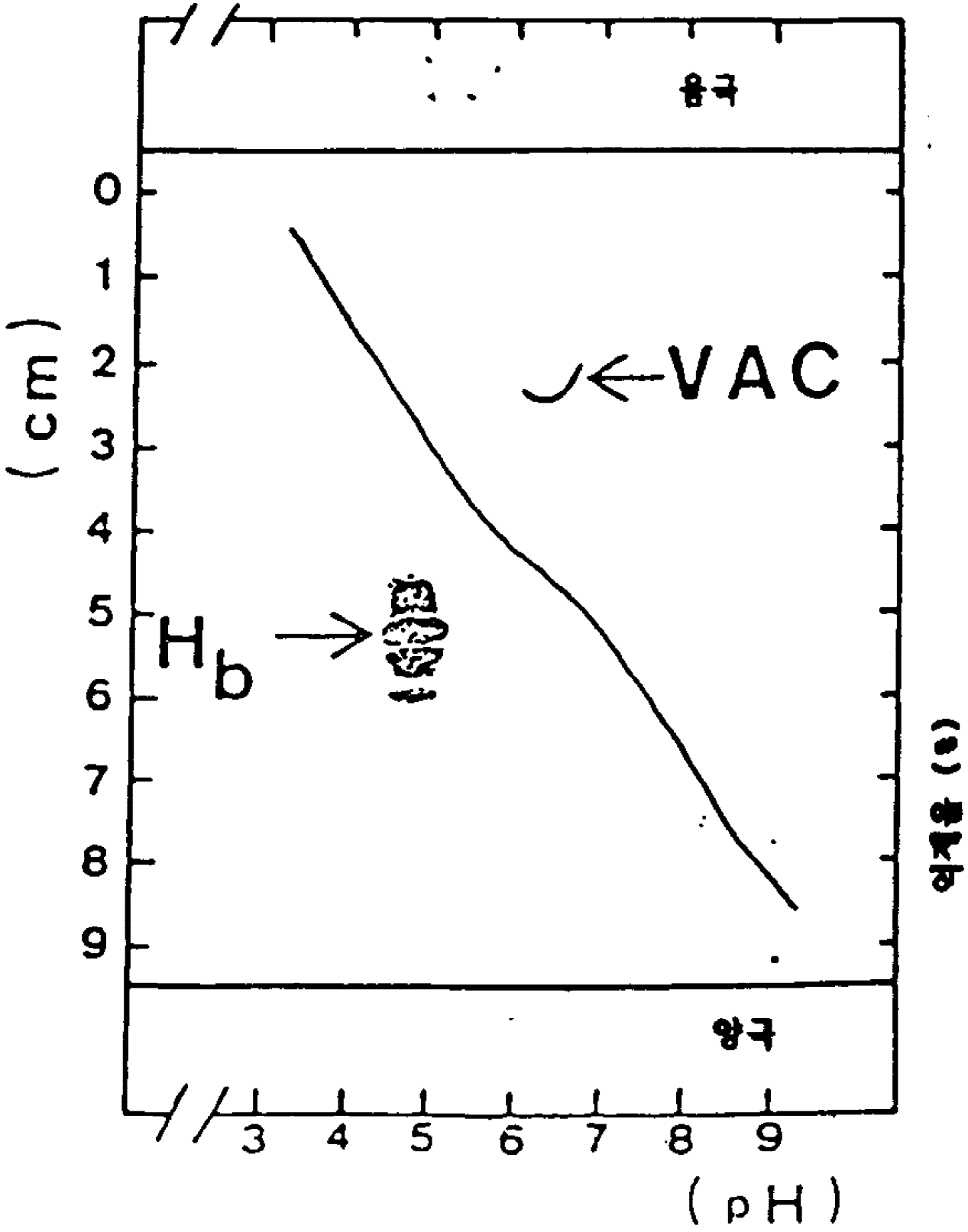
도면1



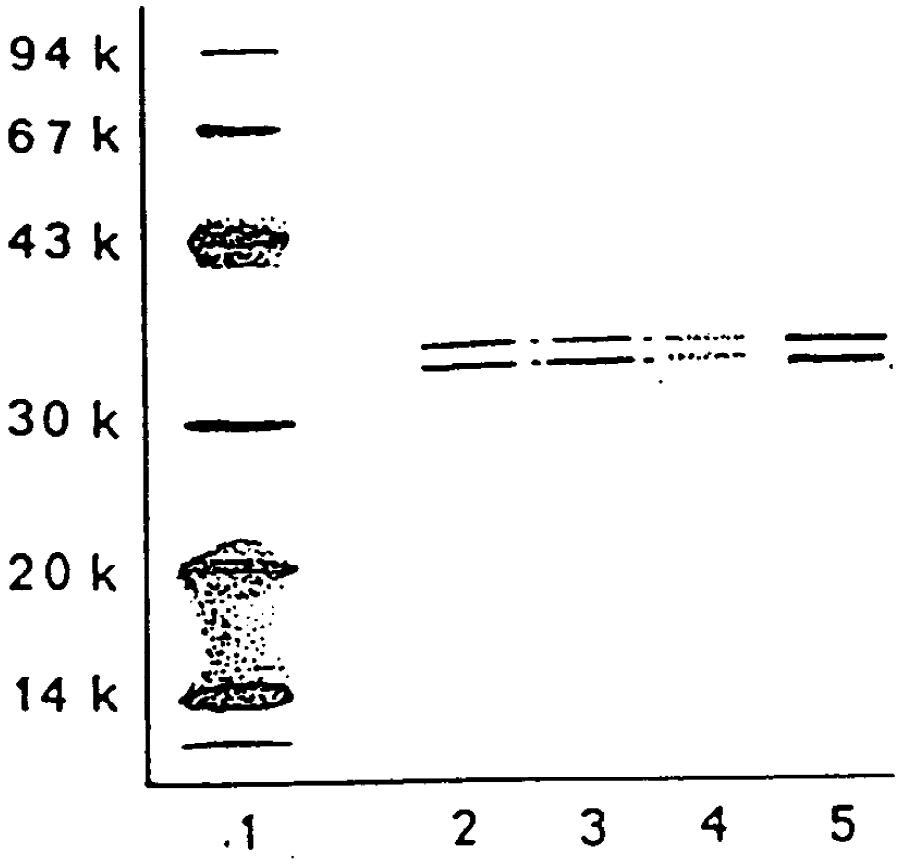
도면2



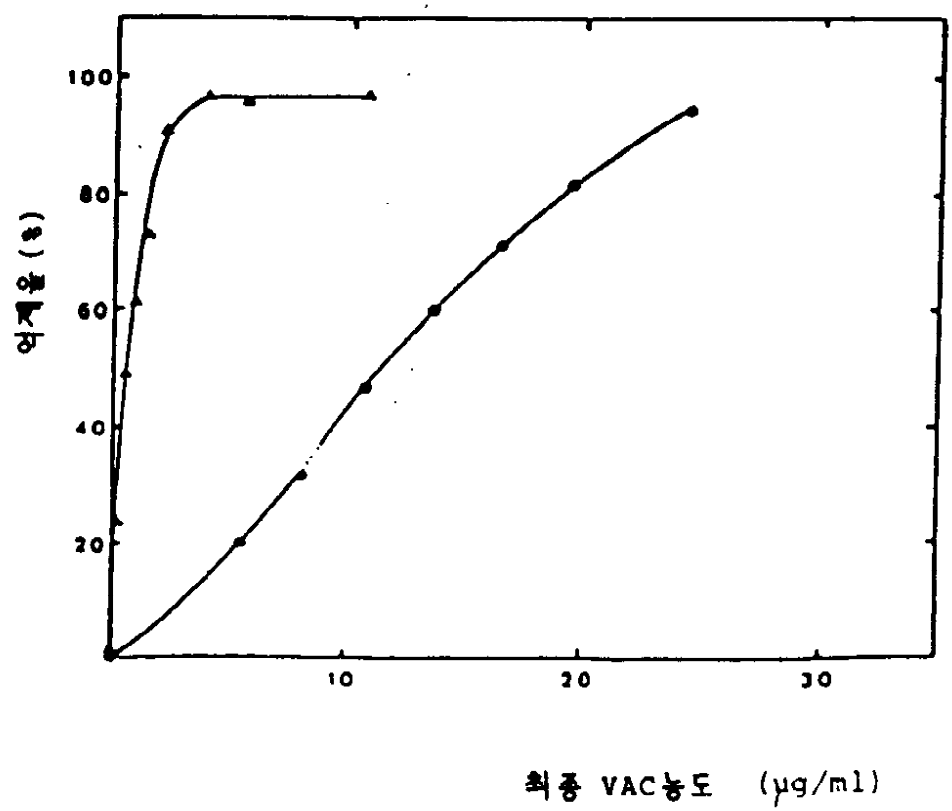
도면3



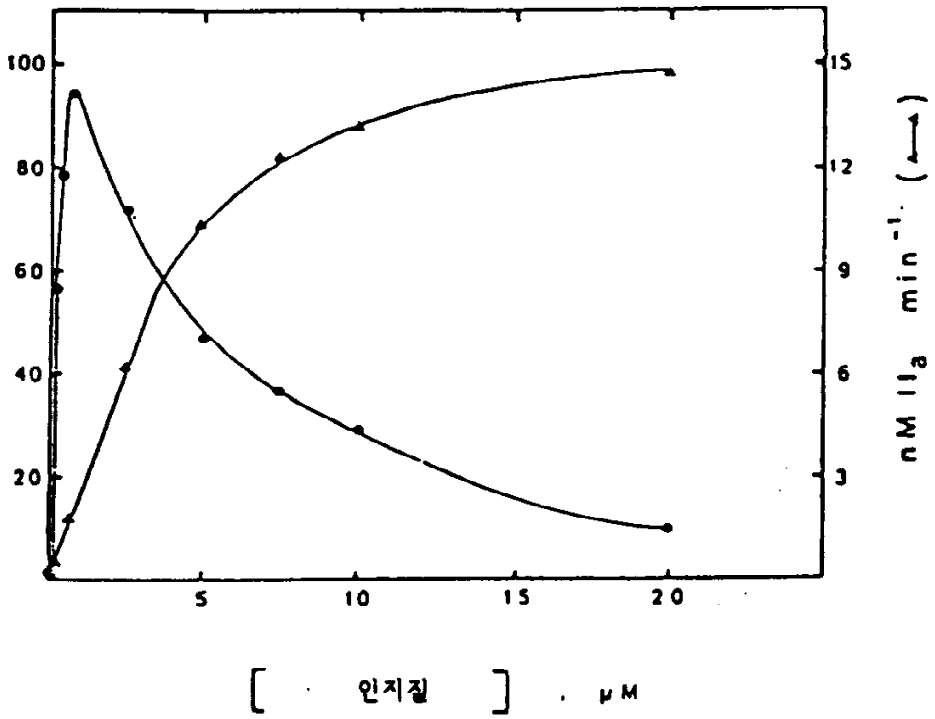
도면4



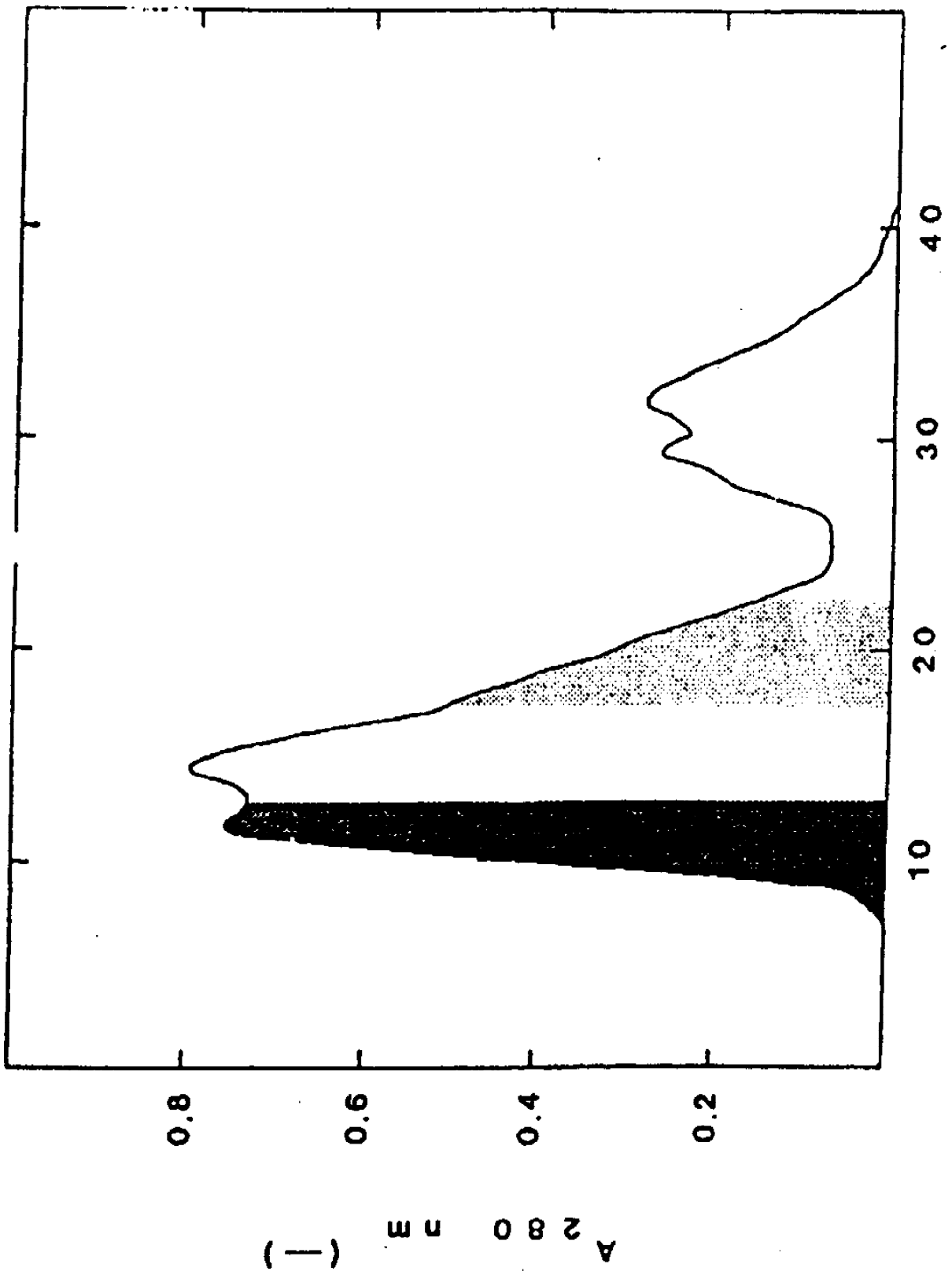
도면5



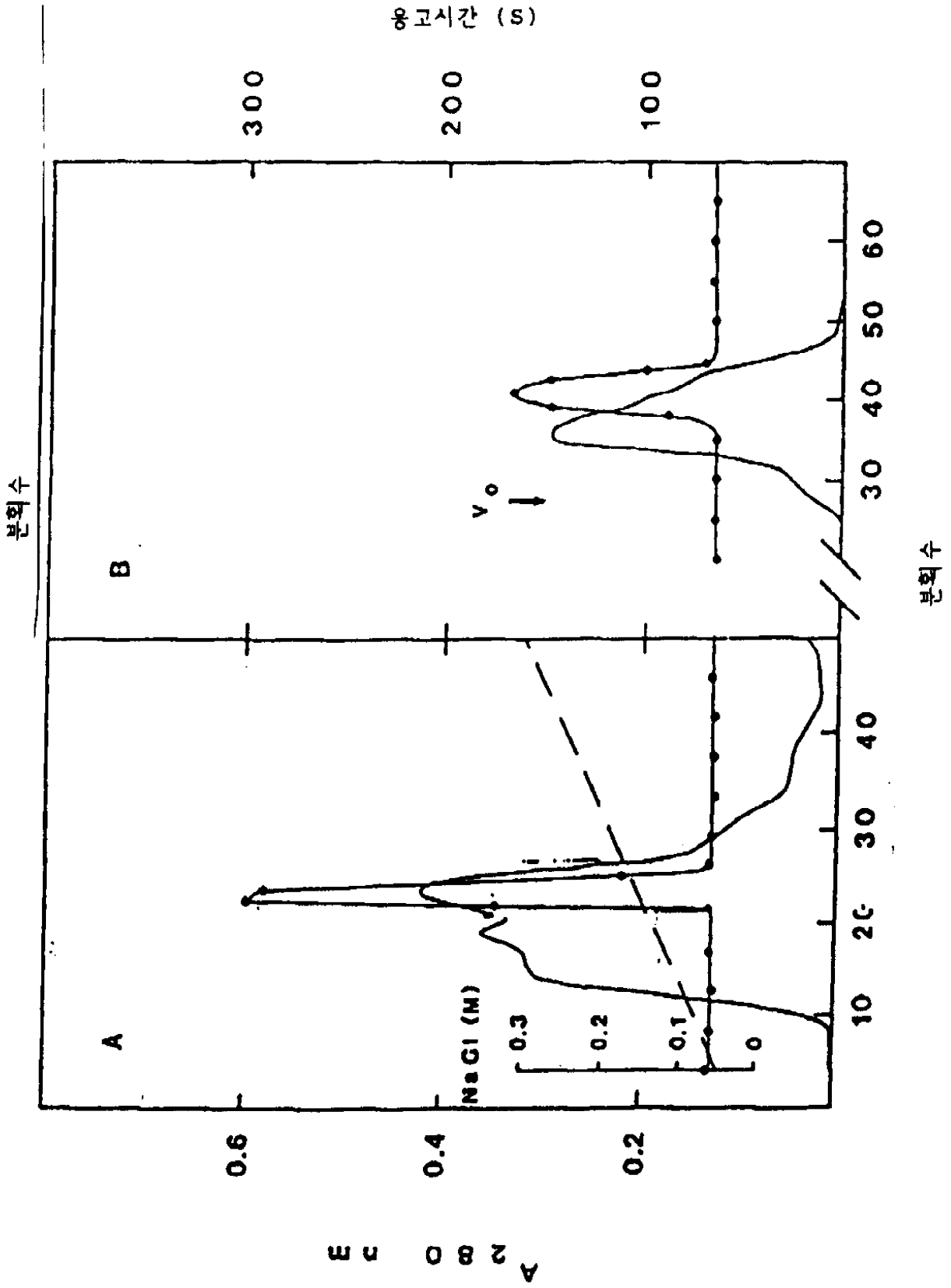
도면6



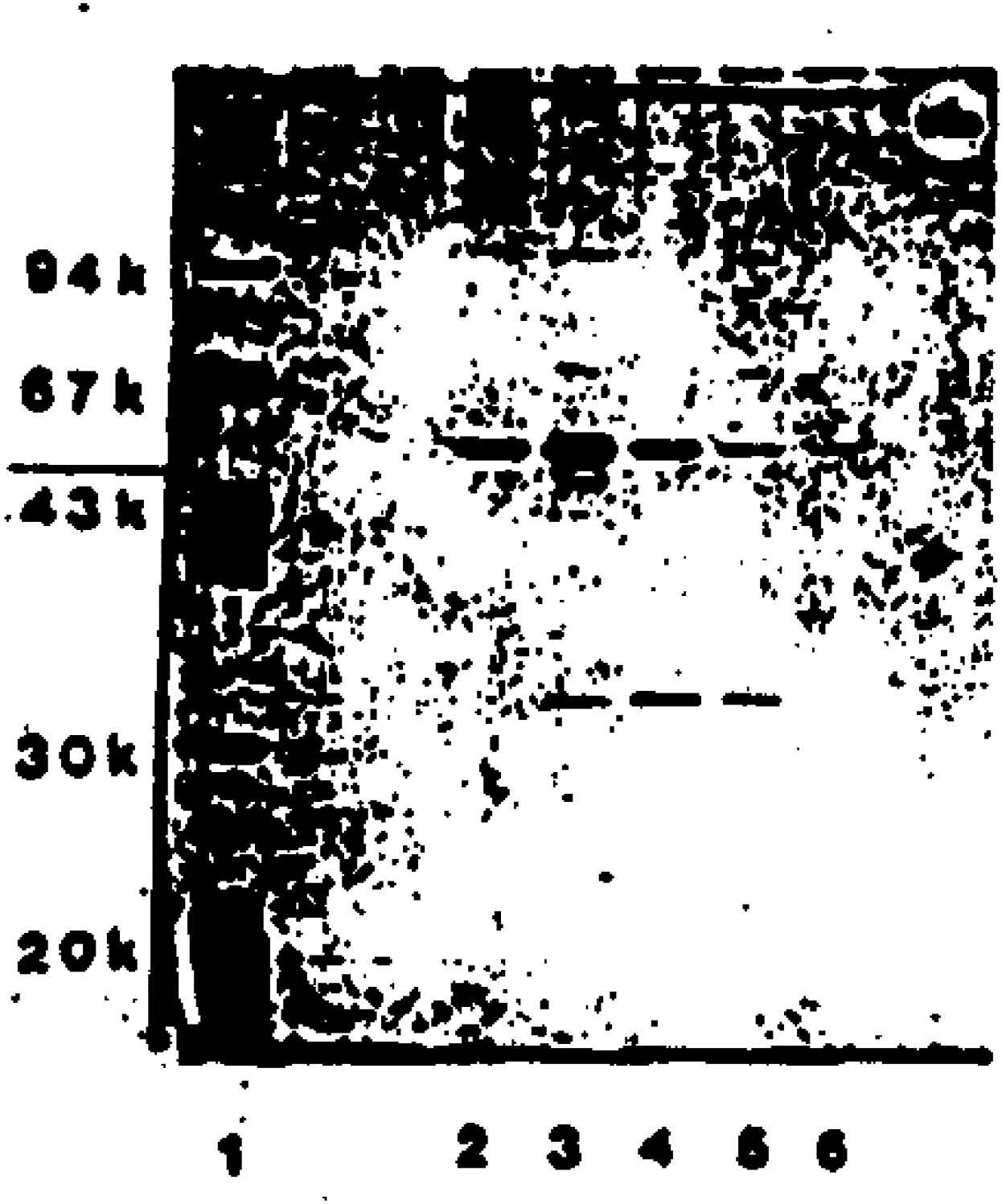
도면7



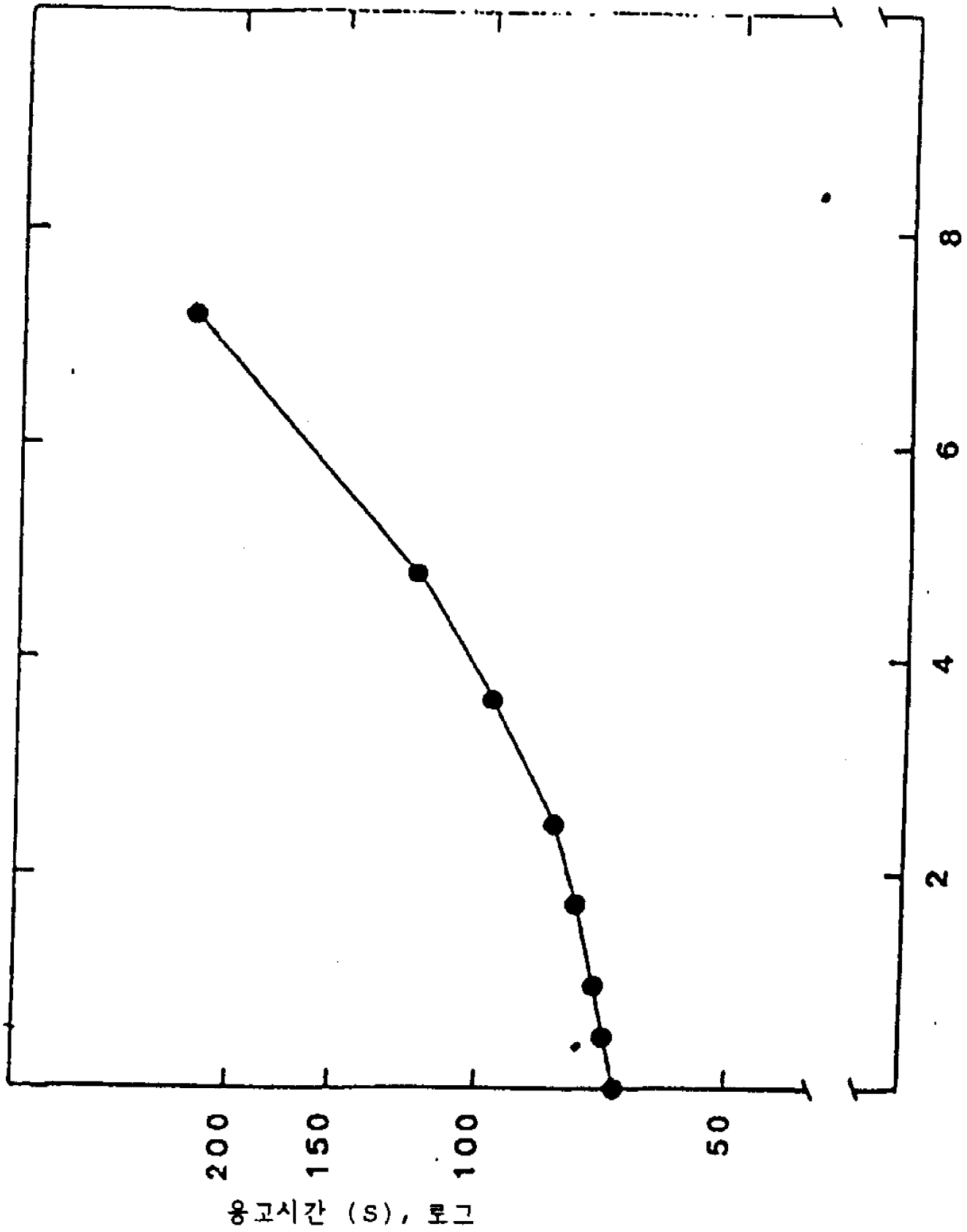
도면8


용고시간 (S)
300
200
100
분획수
B
V_o
60
50
40
30
분획수
A
NaCl (M)
0.3
0.2
0.1
0
40
30
20
10
0.6
0.4
0.2
$A_{280\,nm}$

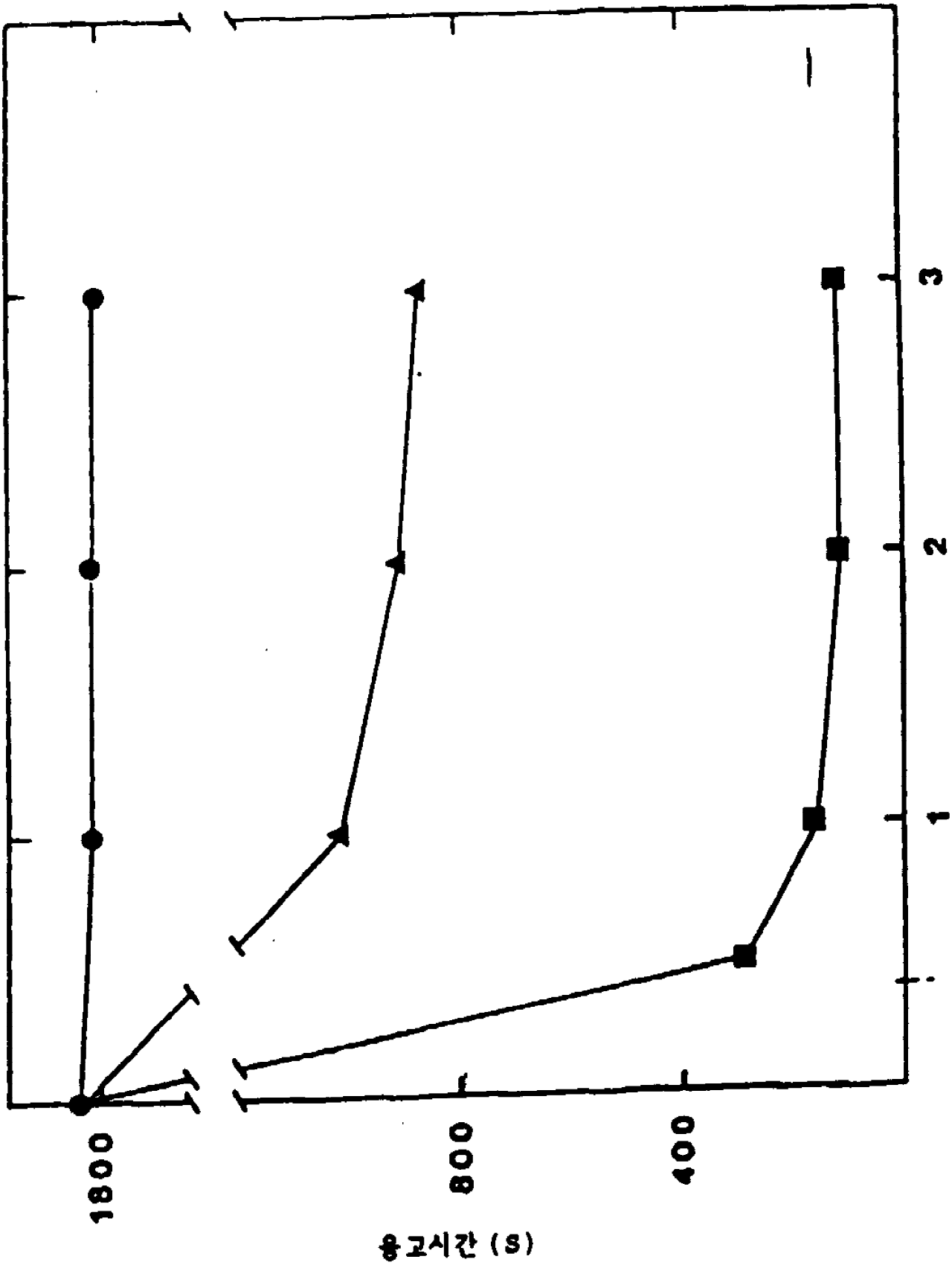
도면9



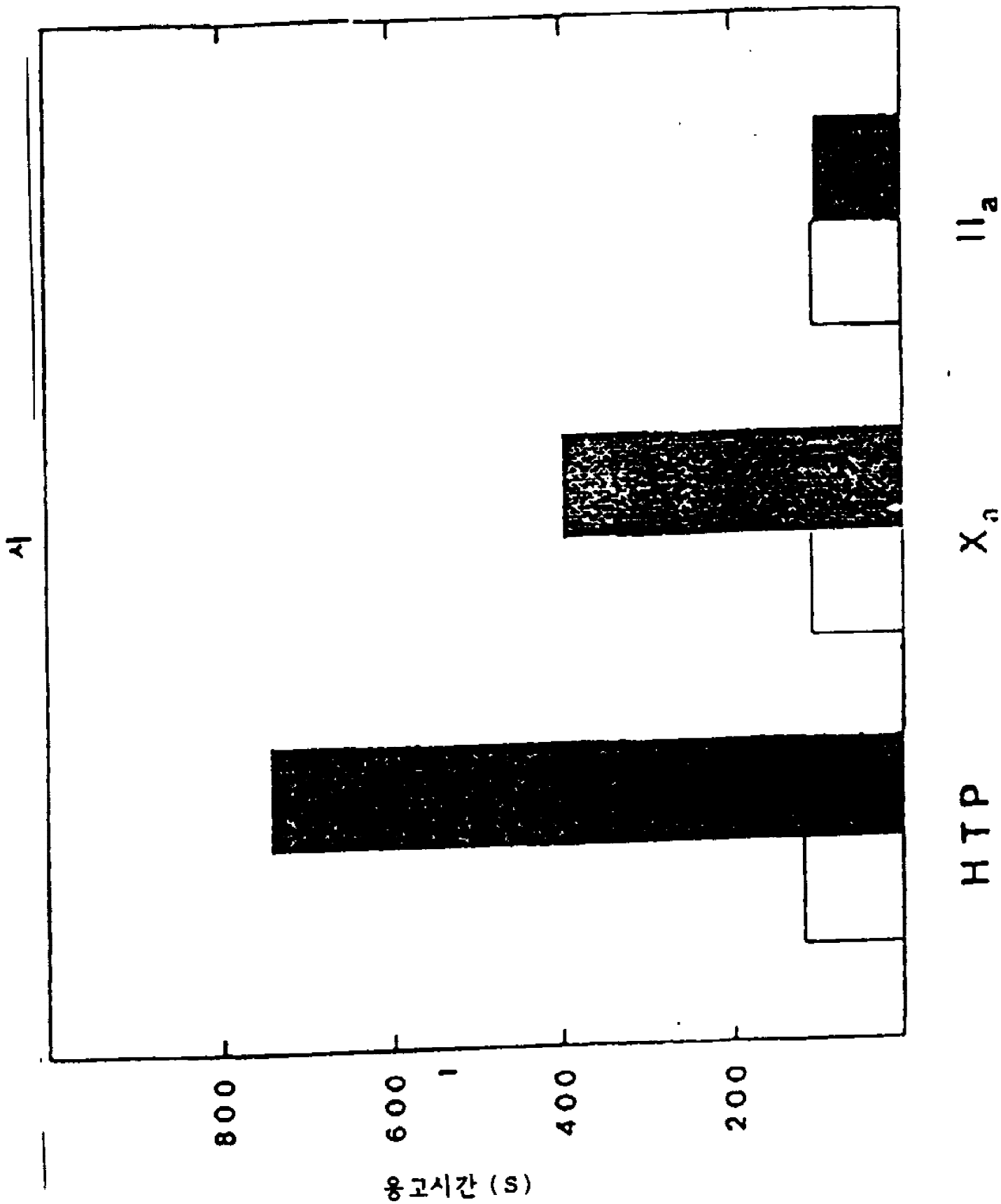
도면10



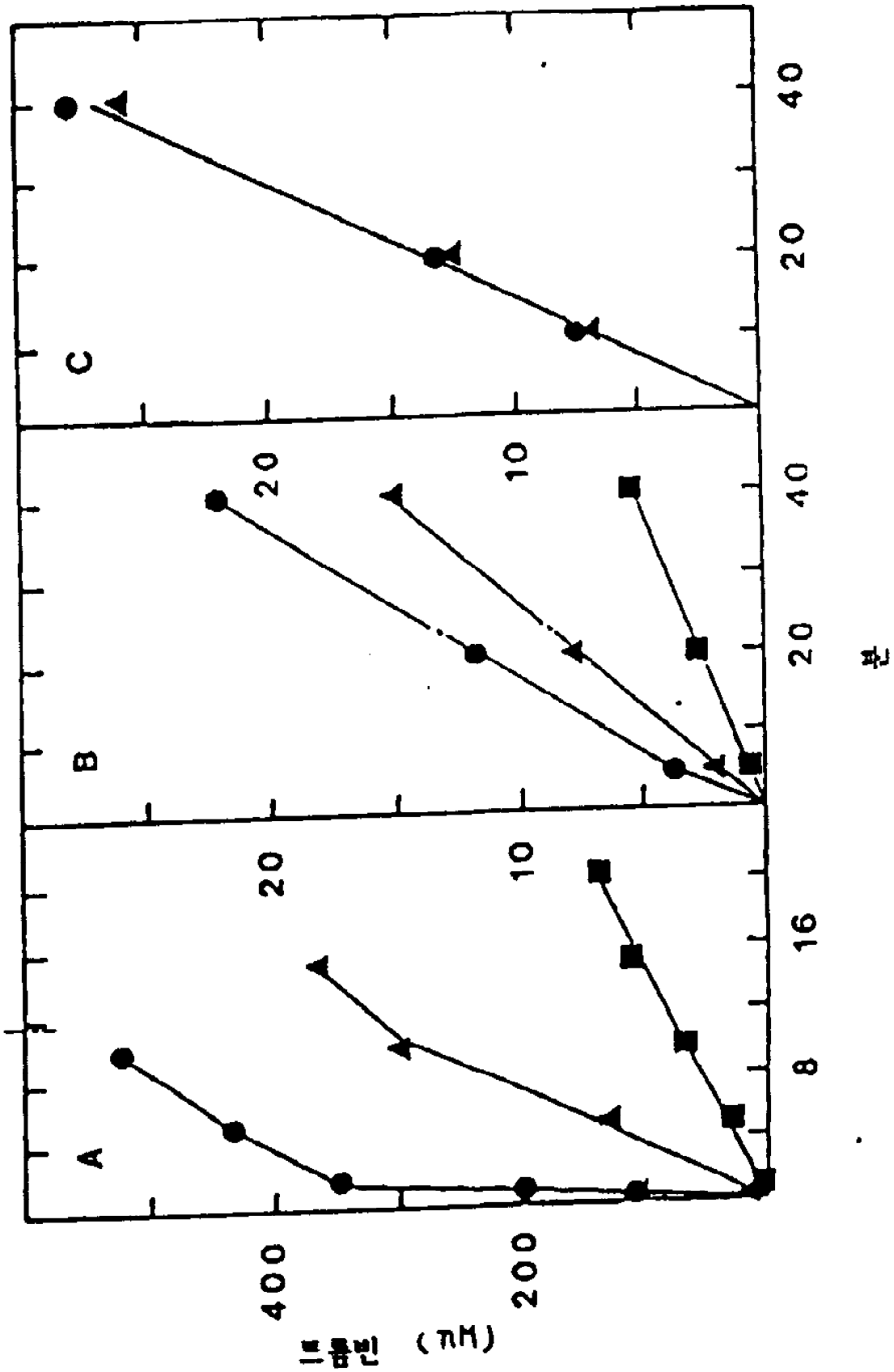
도면11



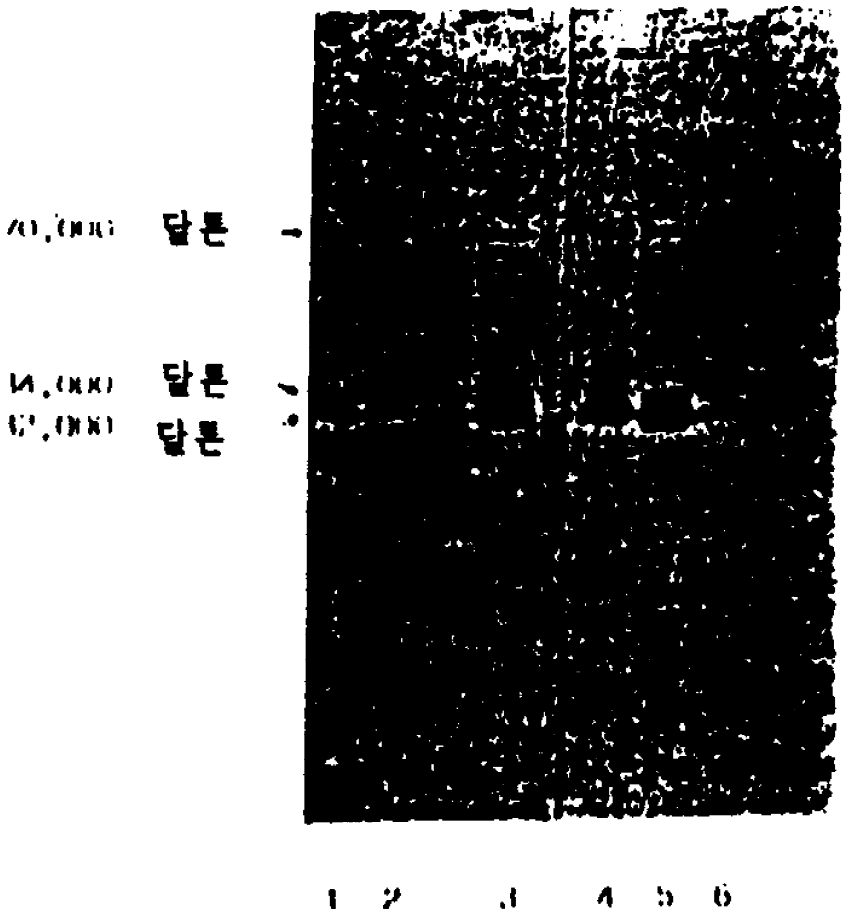
도면12



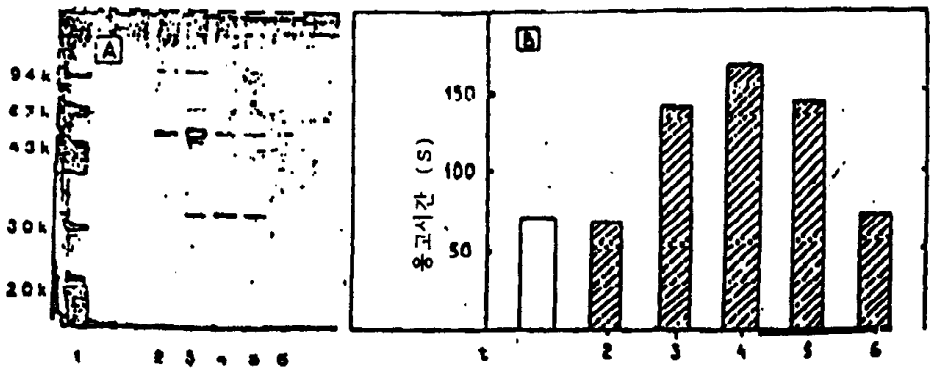
도면13



도면14


단톤
단톤
단톤
1 2 3 4 5 6

도면15


A
94k
67k
43k
30k
20k
1 2 3 4 5 6
B
용고시간 (S)
150
100
50
1 2 3 4 5 6

도면16

