



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년08월14일  
(11) 등록번호 10-0912424  
(24) 등록일자 2009년08월10일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/37 (2006.01) C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7009476

(22) 출원일자 2002년11월27일

심사청구일자 2007년06월27일

(85) 번역문제출일자 2004년06월17일

(65) 공개번호 10-2004-0090959

(43) 공개일자 2004년10월27일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2002/013371

(87) 국제공개번호 WO 2003/052130

국제공개일자 2003년06월26일

(30) 우선권주장

01830770.2 2001년12월17일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

US19874649134 A1\*

W01999012935 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

젠티엄 에스피에이

이태리 코모 가르디아 빌라 22079 피아자 엑스엑스 세템브레 2

(72) 발명자

포르타,로베르토

이탈리아, 아이-22012 세르노비오, 1, 비아 아퀼레이아

카타니오,프랭코

이탈리아, 아이-21055 고를라 미노레, 비아 쥐. 베르디 47

페로,로라

이탈리아, 아이-20100 밀라노, 24/6, 피아자 브레라

(74) 대리인

정홍식

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 허주형

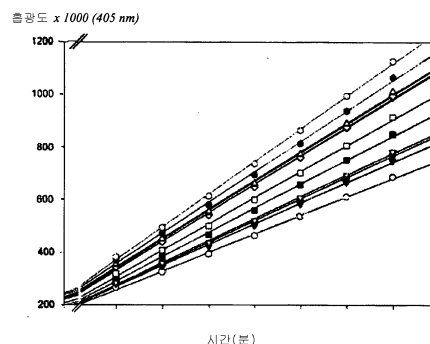
(54) 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법

(57) 요약

디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하는 효소 방법이 기술되어 있다. 플라스민의 효소 활성을 가능하게 하는 디파이브로타이드의 능력을 기준으로 한 이 방법은, a) 디파이브로타이드와, 플라스민(plasmin)과, 플라스민과의 반응을 통해 측정 가능한 생성물을 제공하는 플라스민에 특정한 기질(substrate)을 접촉시키는 단계와, b) 연속해서 형성된 생성물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1

디파이브로타이드로 활성화되거나 활성화되지 않은 플라스민을 통해, 기질 S-2251로부터 pNA의 방출 반응 속도론을 나타낸 도면 (농도 0 - 100 $\mu$ g/ml, 0 - 20분).



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

디파이브로타이드(defibrotide)의 생물학적 활성을 측정하는 방법으로서,

반응 매질 중에서 디파이브로타이드, 플라스민(plasmin) 및 플라스민용 기질인 화학식이 A1-A2-A3-X인 화합물을 혼합하여 X를 생성하는 단계; 및

상기 생성된 X의 양을 측정하는 단계;를 포함하고,

상기 화학식에서 상기 A1과 상기 A2는 비극성 아미노산이고, 상기 A3는 리신 또는 아르기닌인,

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 플라스민은 포유류의 플라스민인 것인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 X는 p-니트로아닐린 또는 2-나프틸아민인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

### 청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 플라스민용 기질은 H-D-발릴-L-류실-L-리신-p-니트로아닐린인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 플라스민의 농도는 0.0064 내지 0.050 I.U./ml이고, 상기 플라스민용 기질의 농도는 2.5 내지 3.5mM인 것인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

### 청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 플라스민의 농도는 0.0125 I.U./ml이고, 상기 플라스민용 기질의 농도는 3mM인 것인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 생성된 X는 분광 광도 측정법을 통해 측정되는 것인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 반응 매질은 pH 7 내지 8로 완충된 수용액인 것인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 측정 방법에서 온도는 35 내지 39℃로 유지되는 것인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 플라스민용 기질의 농도는 0.3 내지 4mM인 것인

디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 12

제 5항에 있어서,

a) 디파이브로타이드의 각 시료에 대해, 표준물질과 시험용 타입 모두의 효소 반응 경로 중에 반응 생성물의 방출 속도를 측정하는 단계, 및

b) 상기 방출 속도와 해당하는 디파이브로타이드를 상호 관련시키는 단계; 및

c) 상기 디파이브로타이드 시험용 시료의 생물학적 활성을 구하는 단계;를 포함하고,

상기 (b)의 상호 관련시키는 단계는 그래프를 이용하거나 다음의 수학식을 이용하는 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법:

플라스민의 농도는 0.0125 I.U./ml, 플라스민용 기질의 농도는 3mM, 기질은 H-D-발릴-L-류실-L-리신-p-니트로아닐린, 완충액은 pH 7.4의 트리스(하이드록시메틸)아미노 메탄 하이드로클로라이드, 반응 온도는 37℃, 분광광도 측정 파장은 405nm의 조건에서

#### 수학식 1

$$pNA(\mu M/분) = a + b \log X$$

에 따라, p-니트로아닐린(pNA) 방출의 반응속도론을 나타내고, 상기 [수학식 1]에서,

$$a = 0.6908 \pm 0.0291,$$

$$b = 0.31490 \pm 0.0437,$$

X = 디파이브로타이드의 농도 ( $\mu g/ml$ )이다.

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

## 청구항 16

삭제

## 청구항 17

삭제

## 명세서

<1> 본 발명은 디파이브로타이드(defibrotide)의 생물학적 활성을 측정하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하는 간접적인 효소 방법에 관한 것이다.

## 기술 분야

<2> 디파이브로타이드 (머크 인텍스, 1996년, 제 2915호)는 동물 기관으로부터 추출하여 얻어지고 분자량이 작은 폴리디옥시리보뉴클리오타이드의 나트륨 염에 의해 만들어진 천연 물질이다.

<3> 디파이브로타이드는 여러 약리학적인 연구 보고서의 주제로, 이들 연구 보고서는 치료시 디파이브로타이드를 항혈전제로 사용할 것을 제안했다 (US 3,829,567호).

<4> 또한, 디파이브로타이드는 말초 동맥질환, 급성 신장 기능부전 (US 4,694,134호), 또는 급성 심근 국소빈혈 (US 4,693,995호) 치료시에도 성공적으로 사용되었다.

<5> 추출에 의해 얻어진 다른 생물학적 물질과 마찬가지로, 디파이브로타이드 또한 조성물의 변이성이 제한되며, 이러한 제한된 변이성(limited variability)은 천연 생체 고분자에서 전형적인 것이다. 이러한 상황의 전형적인 한 가지 예가 헤파린 (heparin)인데, 사슬의 길이, 분자량, 조성, 황산화도 (degree of sulphatation) 등에 관해서 배치마다의 변이성이 알려져 있다. 그 결과는, 중량을 기준으로 한 동일한 양의 디파이브로타이드라도 특정한 생물학적 활성 면에서 사실상 동일하지 않다는 것이다.

<6> 이러한 생체 고분자의 고유성질 때문에, 추출, 분리 및 정제 공정은 본질적으로 생성물의 절대적인 재현성을 보장할 수 없다. 그러나, 잘 조절한다면, 이러한 변이성을 줄일 수 있다; 이 때문에, 예를 들어 미국 특허 US 4,985,552호에 기술된 것과 같이, 기관으로부터 추출을 통해 디파이브로타이드를 분리시키는 규격화된 산업 공정이 연구되어 왔다.

<7> 앞에서 명시한 공정에 따라 얻어진 생성물은, 예를 들어 전기영동 이동성, 흡광 계수, 광학 회전력 및 가역적인 흡광 증가 현상과 같은, 특정한 몇몇 물리 화학적 파라미터의 측정을 특징으로 한다. 그러나, 이러한 파라미터는 본질적으로 디파이브로타이드의 구조에 좌우되고 그 생물학적 활성에 관한 정보는 제공할 수가 없다.

<8> 우리가 아는 한, 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하기 위해 지금까지 사용한 것으로 보고된 유일한 방법은 섬유소 판 시험 (fibrin plate test)과, 유글로불린 용해 시간 (euglobulin lysis time)의 혈전탄성그래프 기록 (thromboelastographic recording) 이다 [Prino G., Mantovani M., Niada R., Coccheri S., Butti A., Indagini preliminari sull'attività fibrinolitica, nell'animale e nell'uomo, di una nuova sostanza presente in diversi organi ani-mali, Simposio Internazionale: La ricerca scientifica nell'industria farmaceutica in Italia, Rome, 1975년 10월 2일 - 4일 - II Farmaco, Ed. Prat. (1969년), 24, 552 - 561].

<9> 그러나, 앞에서 명시된 방법은, 상당한 실험적인 복잡성, 만족스럽지 않은 재현성과 정확성 및, 열전탄성그래프를 기록하는 특정한 경우, 매우 제한된 농도 범위에 한정되는 반응의 직선성을 특징으로 한다.

<10> 따라서, 지금까지, 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하는데 있어 유효하고, 정확하며, 재현성 있는 방법이 알려지지 않았다.

<11> 본 출원인은 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하기 위한 간단하고 신뢰성 있는 방법을 개발했고, 이 방법은 추출을 통해 얻어진 시료를 조절할 수 있도록 해서, 디파이브로타이드를 조성분으로 한 약제 (medicinal preparation)가 규격화될 수 있도록 한다.

<12> 본 발명이 관련된 방법은, 높은 정확도, 속도 및 재현성으로 표준 물질 (reference standard)과 비교해서 디파

이브로타이드의 특정한 생물학적 활성이 측정될 수 있도록 한다.

### 발명의 상세한 설명

- <13> 따라서, 본 발명은 디파이브로타이드 시료의 특정한 생물학적 활성을 측정하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은,
- <14> a) 디파이브로타이드와, 플라스민(plasmin)과, 플라스민과의 반응을 통해 측정 가능한 생성물을 제공하는 플라스민에 특정한 기질(substrate)을 접촉시키는 단계 및,
- <15> b) 연속해서 형성된 생성물의 양을 측정하는 단계를 포함한다.
- <16> 본 발명의 방법은 디파이브로타이드의 활성을 측정하는 간접적인 생체 외 방법으로, 이 방법은 디파이브로타이드와 플라스민과의 기능적인 상호작용을 기초로 한다.
- <17> 플라스민은 섬유소, 섬유소원(fibrinogen) 및 다른 플라즈마 단백질을 분해할 수 있는 응고/섬유소용해(fibrinolysis) 다단계의 단백분해 효소라는 사실이 문헌으로부터 알려져 있다.
- <18> 플라스민의 효소 활성은 일반적으로 여러 가지 표준 생체 외 시험을 통해 측정된다. 가장 일반적으로 사용되는 방법 중 한 가지는 적절한 기질에서 플라스민의 작용에 의해 유리되는 색소 또는 형광 화합물의 분광 광도 측정법이나 형광 측정법에 의한 측정이다 [지혈작용(Haemostasis), 1978년, 7, 138 - 145]. 화학식이  $A_1-A_2-A_3-X$ 인 펩타이드 기질이 보통 사용되는데, 이 식에서  $A_1$ 과  $A_2$ 은 주로 비극성인 아미노산이고,  $A_3$ 은 리신 또는 아르기닌이며, X는 검출 가능한 유리 화합물, 예를 들어 p-니트로아닐린 (pNA) 또는 2-나프틸아민 (NA)을 나타낸다 [지혈작용, 1978년, 7, 146 - 149]. 앞에서 명시한 펩타이드 기질 외에, 예를 들어 p-니트로벤질-p-톨루엔설포닐-L-아르기닌과 같이 보다 단순한 다른 화합물을 사용해서 성공이 이루어졌다 [지혈작용, 1978년, 7, 105 - 108].
- <19> 이러한 시험에서, 화합물 X가 배양 매질로 방출되는 속도는 시료에 존재하는 플라스민의 활성 (국제 단위)에 비례한다.
- <20> 앞에서 기술한 플라스민 측정 시험에서, 디파이브로타이드가 그 농도에 비례해서 화합물 X의 방출 속도를 증가시킨다는 사실이 현재 밝혀졌고, 이러한 점은 본 발명이 기초로 하는 원리이다.
- <21> 본 발명에 관련된 방법은 다른 무엇보다 디파이브로타이드 시료, 플라스민, 플라스민용 기질을 서로 접하게 한다.
- <22> 본 발명에 따른 측정에 사용된 디파이브로타이드 시료는 일반적으로, 예를 들어 이미 앞에서 명시한 미국 특허 US 4,985,552호에 기술된 바와 같은 알려진 절차에 따라 기관으로부터 추출을 통해 제조된다.
- <23> 보통 산업적으로 제조된 디파이브로타이드 배치는 기준 시료(표준물질)로 선택되고, 본 발명의 방법에 따라 검정 곡선을 작성하는데 사용되었다.
- <24> 일반적으로, 본 방법은, 예를 들어 RNA, 헤파린, 분해된 디파이브로타이드 (퓨린이나 피리미딘이 제거된 디파이브로타이드) 또는 에탄올과 같은 오염물질 존재시에도 디파이브로타이드의 정밀하고 정확한 측정을 제공한다 (시스템을 손상시키지 않을 정도로, 일반적으로 10 중량% 미만의 농축물인 경우).
- <25> 디파이브로타이드의 측정을 허용하는 외에, 이 방법은 또한 디파이브로타이드로부터 유도된 생물학적으로 동일한 다른 물질 (예를 들어, 탈아미노화 디파이브로타이드, 즉 보다 간단하게는 가열을 통해 변성된 디파이브로타이드와 같은)을 측정할 수 있도록 한다.
- <26> 본 발명은 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (측정 시스템의 최종 농도) 이하의 디파이브로타이드 농도를 검출할 정도로 감도가 충분하고, 일반적으로 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 최대 농도 값까지 우수한 상호관계를 나타낸다.
- <27> 사용된 플라스민은, 예를 들어 소, 돼지 또는 인간의 플라스민과 같은 임의의 포유류 플라스민인데, 인간의 플라스민이 바람직하다.
- <28> 그러나, 플라스민은 선택 효소일지라도, 동등한 다른 효소 시스템 (예를 들어, 플라스미노젠과 같은 플라스민 선구물질), 또는 화학적으로 연관이 있고 유사한 기능성을 갖는 플라스민 유사 효소의 사용은 본 발명의 범위 내에 있다.
- <29> 본 발명의 방법에서, 플라스민용 기질은, 본 발명의 조건에서, 검출 가능한 가수분해 생성물 X를 유리시키는 플라스민에 특정한 임의의 기질인 것으로 이해될 수 있다.

- <30> 검출 가능한 작용기 X의 성질에 따라, 당업자에게 일반적으로 알려져 있는 대안적인 검출 시스템이 동일하게 잘 선택될 수 있다. 분광 광도 측정 또는 형광 측정 검출 시스템이 특히 유리하고, 특히 분광 광도 측정 시스템이 유리하다.
- <31> 일반적으로 사용된 기질은 플라스민에 특정한 기질이다. 화학식이  $A_1-A_2-A_3-X$ 인 펩타이드를 사용하는 것이 바람직한데, 이 식에서  $A_1$ 과  $A_2$ 은 주로 비극성인 아미노산이고,  $A_3$ 은 리신 또는 아르기닌이며, X는 검출 가능한 기 (group)이다. 이러한 기질의 예는, Val-Leu-Lys-pNA, Val-Phe-Lys-pNA 또는 파이로Glu-Phe-Lys-pNA으로, 분광 광도 측정법을 통해 검출될 수 있는 기 X는 p-니트로아닐린 (pNA)이다. 이와 다른 적절한 기질, 예를 들어 Val-Gly-Arg-2NA는 2-나프틸아민을 함유하고, 이는 형광 측정법을 통해 측정될 수 있다. 특히 바람직한 기질은 화합물 H-D-발릴-L-류실-L-리신-p-니트로아닐린 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA)이다.
- <32> 디파이브로타이드 측정에 사용된 플라스민과 특정 기질은 일반적으로 상업용으로 구매 가능하다.
- <33> 본 발명의 측정 방법은, 특정 pH와 몰농도인 수용액에 시약과 디파이브로타이드 시료를 넣음으로써 수행된다.
- <34> 특히, 플라스민의 농도는, 일반적으로 0.0016 내지 0.20 I.U./mL, 바람직하게는 0.0064 내지 0.050 I.U./mL, 보다 바람직하게는 약 0.0125 I.U./mL로 변할 수 있다.
- <35> 그러나, 플라스민용 기질에 관해서, 색소 기질의 경우에는 0.3 내지 4 mM, 바람직하게는 2.5 내지 3.5 mM, 유리하게는 3 mM의 농도로 일반적으로 사용되는 반면, 형광 기질의 경우에는 0.05 내지 0.15 mM의 농도로 사용되었다.
- <36> 본 발명의 측정 방법은, 다른 효소 방법과 마찬가지로, 매질의 pH에 민감하다.
- <37> 사실상, 이 방법은 효소 시스템이 활성화되지 않는 극단적인 pH 값에서는 보통 적용될 수 없다.
- <38> 또한, 측정을 수행하는 중에는 항상 매질의 pH가 변하지 않는 것이 바람직하고, 이에 따라 용액은 플라스민 측정 시험에 보통 사용되는 것으로부터 선택된 완충 시스템으로 보통 완충된다. 적절한 완충 시스템은, 예를 들어 인산염 완충액, 구연산염 완충액 또는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드(TRIS) 완충액일 수 있다. TRIS 존재시 작업을 수행하는 것이 바람직하다.
- <39> 본 방법에서, 매질의 pH는 약 7 내지 8, 보다 바람직하게는 약 7.4로 유지하는 것이 보통 바람직하다.
- <40> 또한, 완충액 시스템의 농도를 10 내지 200mM, 바람직하게는 약 50mM의 범위 안에 유지하는 것이 바람직하다.
- <41> 디파이브로타이드를 측정하는 본 발명의 방법은, 플라스민, 플라스민용 기질, 디파이브로타이드가 혼합되는 단계를 제공한다. 특히, 이 방법에 의해 제공된 측정이 올바르게 수행될 수 있도록 하기 위해서, 측정 단계를 시작하기 전, 디파이브로타이드 시료를 함유하는 완충 시스템에, 플라스민 또는 특정 기질, 또는 이 두 가지 모두를 첨가하는 것이 바람직하다. 플라스민용 기질은 마지막으로 첨가하는 것이 바람직하다.
- <42> 본 측정 방법의 중요한 파라미터는 온도이다. 전체 측정 시간 중 내내 동일한 온도가 유지되고, 모든 시료가 기준물질 곡선의 작성에 관해 측정되고 측정 단계 중 측정되는 것이 바람직하다. 이를 위해, 온도 제어 장치를 사용하는 것이 바람직하고, 또한, 필요한 경우, 시스템이 최대한의 열적 균일성을 갖는다는 사실을 보장하기 위해 시료의 위치를 적절히 바꾸면서 여러 개의 측정 세트로 진행할 수 있다.
- <43> 일반적으로, 이러한 측정 방법은, 예를 들어 25 내지 40℃, 바람직하게는 35 내지 39℃, 더 바람직하게는 37℃의 온도 범위에서 적용된다.
- <44> 본 발명에 따라, 플라스민의 작용에 의해 매질에서 방출된 화합물 X의 농도 측정은 모든 시약이 첨가되었을 때 시작해서, 미리 결정된 시간 동안 미리 결정된 주파수에서 X의 화학적 성질과 검출 시스템의 함수로 진행된다.
- <45> 생물학적인 측정의 다른 방법과 유사하게, 본 발명의 방법은 가능한 한 실험적인 가변성 빈도를 줄이기 위해 동시에 수행하는 것이 바람직한 검정 단계와 측정 단계를 또한 제공한다.
- <46> 검정 단계는, 알고 있는 디파이브로타이드 (표준물질)의 증가 농도에서 시료에 관한 흡광도 데이터를 얻는 단계와, 이러한 데이터를 통계적으로 재처리하는 단계와, 본 발명의 효소 반응 속도의 증가와 매질에 존재하는 디파이브로타이드의 농도 사이의 상호관계를 나타내는 검정 곡선의 외삽 단계를 포함한다. 측정 단계에서, 검정 단계에서 얻은 상호관계 때문에, 동일 조건에서 측정 및 처리된 흡광도 값을 기준으로 디파이브로타이드 시료의 미지의 생물학적 활성을 측정할 수 있다.



- <47> 보다 상세하게, 실험적인 프로토콜은 일반적으로, 디파이브로타이드의 여러 알려진 농도에서, 표준과 미지 모두의 여러 시료를 제공한다. 디파이브로타이드 시료는 미리 결정된 희석 인자에 따라 모액(母液)의 점진적인 희석을 통해 제조된다.
- <48> 본 방법에서, 표준 물질의 각 농도에 대해, 이와 유사하게 시험용 시료의 각 농도에 대해 (일반적으로 모액을 연속해서 1:2로 희석하기 위한), 5개의 복제물 (replicate), 또 바람직하게는 10개의 복제물을 제조해서, 적어도 5가지 농도의 표준물질과 5가지 농도의 시험용 시료를 제조하는 것이 바람직하다.
- <49> 디파이브로타이드의 표준물질과 시험용 시료 농도 모두는 일반적으로 0.1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 바람직하게는 0.3 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 보다 유리하게는 0.5 내지 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다.
- <50> 시험용 시료의 농도는 표준물질의 농도와 크기 자리수가 같은 것이 바람직하다.
- <51> 상기 설명에 따라, 각 농도에 대한 측정은 두 개의 마이크로플레이트(microplate)에서 수행하는 것이 바람직한데, 각각의 시료인 표준물질과 시험용 시료 각각의 해당 농도에서의 위치는 플레이트마다 바뀌는 것이 바람직하다. 시료의 배열에 대한 이번 안에 따라 (실험 파트에서 보다 상세하게 설명됨), 표준물질과 시험용 시료 디파이브로타이드 모두의 각 농도에 대해, 적어도 5개 또 바람직하게는 10개의 흡광도 값이 항상 측정된다.
- <52> 앞에서 기술된 한 세트의 측정은 미리 결정된 시간, 즉 우선 다른 무엇보다 시간 ( $t_0$ ), 즉 본 발명의 효소 반응이 시작되기 전, 모든 성분이 첨가되었을 때 수행되고, 이어서 정확한 시간 간격으로, 필요한 데이터를 얻는데 충분한 시간 동안 수행된다.
- <53> 흡광도 측정은 1 - 10분마다 측정값을 재면서 최대 90분까지 진행하는 것이 바람직하다. 시간  $t_0$ 에서 측정값을 재고, 이어서 20분부터 50분까지 5분마다 측정값을 재는 것이 보다 유리하다. 광도 흡광 측정은 효소 가수분해 반응 경로에서 유리된 검출 가능한 작용기 X의 성질에 의존하는 과정에서 수행된다. X가 p-NA인 특정한 경우, 흡광도는 405nm에서 측정된다.
- <54> 표준물질과 미지의 디파이브로타이드 시료의 흡광도 측정값 (원 데이터로 알려져 있음)은 일반적으로 측정 작업을 제공하는 동일한 기기로부터 직접 나타난다; 이들 측정값은 흡광도 값이 항상 잘 표시될 수 있는 방식으로 표로 작성된다.
- <55> 다음으로 원 데이터는, 예를 들어 스프레드시트 마이크로소프트 엑셀(등록상표)을 사용해서 처리된다. 이러한 첫 번째 처리 작업은 매번 각각의 측정값 세트에서 평균 흡광도 및 관련 표준 편차를 계산하고, 각각의 측정값 세트는 표준물질과 시험용 시료 디파이브로타이드 모두의 각 농도에 대해 적어도 5개, 바람직하게는 10개의 복제물을 포함한다.
- <56> 데이터의 통계학적인 추가 처리는 시그마 플롯 컴퓨터 프로그램(등록상표) 타입 (미국 시카고의 SPSS)의 프로그램을 이용해서 수행되는데, 이 프로그램은 디파이브로타이드 농도의 각 세트에 대해, 시료의 흡광도 값과 시간 사이에 존재하는 수학적 관계를 구해서 직선을 얻고, 이 직선의 기울기는 디파이브로타이드의 농도에 비례한다.
- <57> 보다 정확하게 말하자면, 반응 직선성이 존재하는, 바람직하게는 20분 내지 50분의 간격에서, 동일한 농도의 5개 또는 바람직하게는 10개의 복제물 각각에 대해, 프로그램은 선형 회귀 계수 "b", 결정 계수 " $r^2$ ", 절편 "a"를 특징으로 하는 회귀 직선 (regression line)을 계산한다.
- <58> 본 절차에 따라 생성된 직선은 일반적으로 높은  $r^2$  값 (일반적으로 0.97 이상, 바람직하게  $r^2 \geq 0.99$ )으로 표시된 우수한 상호관계를 갖는다.
- <59> 프로그램에 의해 생성된 데이터는 표로 작성된 디지털 데이터로 재생되거나 각 농도 세트에 대해 그래프로 표시될 수 있다.
- <60> 도 1에 도시된 바와 같이, 시간을 가로좌표에 두고 흡광도를 세로좌표에 둬으로써, 기울기 "b"가 효소 반응 속도에 비례하는 직선이 얻어질 것이고, 디파이브로타이드의 농도를 증가시킴으로써, 가수분해 속도와, 이와 비례해서 "b"의 값이 증가할 것이다.
- <61> 마지막으로, 표준물질인 디파이브로타이드와 시험용 시료인 디파이브로타이드 복제물의 각 세트에 대해 앞에서 기술한 바와 같이 계산된 기울기 값은 이 값이 관련된 디파이브로타이드 농도의 십진 로그와 서로 관련되어 있

다.

- <62> 그래프에서, 이러한 상호 관계는 표준물질에 대한 S자형 곡선과 시험용 시료에 대한 S자형 곡선을 나타낸다 (도 2); 이러한 S자형 곡선의 중심부에는 두 개의 직선이 있고, 이 직선은 일반적으로 서로 평행하고 이 사이의 거리는 시험용 시료와 표준물질과의 생물학적 활성 차의 함수이다.
- <63> 직선성의 이러한 간격에서, 표준물질의 파워(power)와 비교된 미지 디파이브로타이드 시료의 파워는, 피니 디제이 (Finney DJ)의 “생물학적 분석에서의 통계 방법” (제 2판, Ch. Griffin, 런던)에 기술된 평행선의 생물학적인 측정 방법론에 따라 측정된다.
- <64> 이러한 방법론은, 본 발명에서와 같이, 생물학적인 반응이, 측정하고자 하는 해당 물질 농도의 선형 로그 함수이고, 표준물질 및 각각 미지의 농도와 관련된 직선 사이에 평행성과 직선성이 존재할 경우 적용될 수 있다.
- <65> 데이터의 통계적인 처리와, 파워비(power ratio)의 계산 및, 이에 따른 디파이브로타이드의 미지 활성의 측정은 앞에서 명시한 방법론을 기준으로 만들어진 전용 소프트웨어를 사용해서 수행하는 것이 바람직하다.
- <66> 그러나, 일반적인 화학 분석시, 보다 구체적으로는 본 방법에서 오류 발생률과 실험적인 가변성이 최소화될 수 있도록 하는 통계적인 데이터 처리는 본 발명의 방법에 한정되지 않고, 당업자에게 잘 알려져 있고 해당 분야에서 일상적으로 사용되는 결과 평가 방법을 간단하게 나타낸다.
- <67> 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하는 키트에 관한 것으로, 이 키트는 적어도,
- <68> a) 앞에서 한정된 플라스민용 기질의 측정량과,
- <69> b) 플라스민의 측정량을 포함한다.
- <70> 바람직한 키트는 플라스민 단위 당 플라스민에 특정한 20 내지 30mg의 기질, 보다 바람직하게는 플라스민 단위 당 25mg의 기질을 포함한다.
- <71> 본 발명에 따라, 플라스민과 인간의 플라스민에 특정한 기질로 H-D-Val-Leu-Lys-pNA를 포함한 키트가 특히 유리하다.
- <72> 본 발명에 따른 키트는 또한 수성 완충 용액, 바람직하게는 TRIS.HCl 50mM로 pH 7.4에서 완충된 용액을 함유할 수 있다.
- <73> 선택적으로, 본 발명의 키트는 대조군 측정(control measurement)을 허용하기 위해 디파이브로타이드(표준물질)의 측정량을 또한 포함한다.
- <74> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 표준물질 용액과, 측정하고자 하는 디파이브로타이드 시료 용액이 마이크로플레이트의 각 웰(well) 안으로 주입된다. 플라스민 용액은 사용시 제조되고, 디파이브로타이드를 함유한 웰에 뿌려지고, 마지막으로, 플라스민용 기질을 함유한 용액이 첨가된다. 다음으로, 마이크로플레이트는 항온 리더(thermostated reader)에 위치하고, 빠르게 교반한 후, 미리 결정된 간격에서 미리 결정된 시간 동안 시스템의 흡광도가 측정된다. 다음으로 이렇게 얻어진 원 데이터가 처리되어, 디파이브로타이드 시료의 미지의 활성을 측정한다.
- <75> 본 발명의 이러한 양상 및 이와 다른 양상은 다음 예에서 더 상세히 설명되지만, 이러한 예는 본 발명을 한정하는 것으로 간주되지는 말아야 한다.

## 실시예

- <76> 아래 제시된 실시예에는 다음 재료가 사용되었다.
- <77> 기기
- <78> - 96개의 웰 MRX TCII (미국, 버지니아, 샹틀리, 다이넥스 테크놀로지)를 갖는 마이크로플레이트용 검출기 항온을 이루고 효소의 반응속도 프로그램 (enzymatic kinetics program)이 설치되어 있음,
- <79> - 밀면이 편평한 96개의 웰을 갖는 마이크로플레이트 (오스트리아, 크레문스터, 그레이너 엘., cat. 655101),
- <80> - 연속 부피 조절 피펫 P200 (30-200 $\mu$ l)과 8 $\times$ 200 (20-200 $\mu$ l)과 200- $\mu$ l 팁 (보증된 품질의)을 갖춘 피펫 (이탈리아, 밀란, 길슨),



<81> - pH 미터 PHM85 복사계 (radiometer) (이탈리아, 밀란, 아날리티카 드 모리).

<82> 프로그램

<83> - 마이크로소프트 엑셀(등록상표) (미국, 워싱턴, 레드몬드, 마이크로소프트 코포레이션),

<84> - 시그마 플롯 컴퓨터 프로그램(등록상표) (미국, 시카고, SPSS).

<85> 기질

<86> - 디파이브로타이드 (젤티움),

<87> - 인간의 플라스민, 1 단위, P-4895 (이탈리아, 밀란, 시그마 알드리찌),

<88> - 색소 기질 S-2251, 820332-39 (이탈리아, 밀란, 크로모제닉 인스트루먼테이션 레보러토리 에스.피.에이.),

<89> - 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(TRIS), 255285-9 (이탈리아, 밀란, 시그마 알드리찌),

<90> - 1N HCl 1090571000 (머크),

<91> - 1N NaOH 1091411000 (머크)

<92> 용액

<93> TRIS-HCl 완충액

<94> 2.42g의 TRIS를 증류수에 녹이고 100ml의 부피까지 희석시킨다. 이 용액에 16ml의 1N HCl을 첨가한 다음, 보다는 많은 증류수를 통해 최종 부피가 400ml가 되도록 한다. 이 최종 용액의 pH는 7.40이다. 만일 이 값이 다르다면, 1N의 HCl 또는 1N의 NaOH를 가해서 원하는 값이 되도록 pH를 보정한다.

<95> 플라스민 용액

<96> 1 단위 (1 I.U.)의 인간의 플라스민을 0℃에서 4ml의 TRIS-HCl 완충액에 녹인다. 얼음을 넣고 이를 행할 경우에는 항상, 용액을 10ml의 플라스틱 시험관에 -20℃로 보존된 200μl의 엘리퀴트로 나누어 사용한다.

<97> 색소 기질 S-2251 용액

<98> 25mg의 S-2251을 15.15ml의 증류수에 녹이고 +4/+8℃에서 보존한다.

<99> 표준 디파이브로타이드 용액

<100> 표준 용액의 제조

<101> · 0.1 내지 100μl/ml의 (최종) 농도

<102> 60mg의 디파이브로타이드를 3ml의 TRIS-HCl 완충액에 녹이고, TRIS-HCl 완충액으로 1:15로 희석한다. 이렇게 제조된, 농도가 1.333mg/ml인 용액은 연속적인 1:2 희석을 거쳐, 농도가 666μg/ml, 333μg/ml 및 166μg/ml인 디파이브로타이드 용액을 제조한다. 모액으로 사용되는 이 최종 용액은 더 희석되어, 농도가 83.33μg/ml, 41.67μg/ml, 33.33μg/ml, 25μg/ml, 16.66μg/ml, 8.33μg/ml, 5μg/ml, 2.5μg/ml, 1.66μg/ml, 0.83μg/ml, 0.5μg/ml 및 최종적으로 0.16μg/ml인 용액을 제조한다.

<103> · 0.5 내지 8μg/ml의 (최종) 농도

<104> 60mg의 디파이브로타이드를 3ml의 TRIS-HCl 완충액에 녹이고, TRIS-HCl 완충액으로 1:1500으로 희석한다. 이렇게 제조된, 농도가 13.33μg/ml인 용액은 연속적인 1:2 희석을 거쳐, 농도가 각각 6.66μg/ml, 3.33μg/ml 및 1.66

$\mu\text{g/ml}$  및  $0.83\mu\text{g/ml}$ 인 디파이브로타이드 용액을 제조한다.

<105> 공정

<106> 앞에서 기술한 표준 디파이브로타이드 용액 각각을  $150\mu\text{l}$ 를 취해서 마이크로플레이트의 웰에 주입한다.

<107>  $0^\circ\text{C}$ 에서  $3.8\text{ml}$ 의 TRIS-HCl 완충액을  $0.2\text{ml}$ 의 인간의 플라스민 용액을 함유한 시험관에 가함으로써, 플라스민 용액이 신속하게 제조된다. 용해가 이루어질 때까지 이 전체를 부드럽게 교반하고,  $50\mu\text{l}$ 를 취해서 마이크로플레이트의 웰에 주입한 다음, 각각의 웰에 대해 S-2251  $50\mu\text{l}$ 를 취한다.

<108>  $37^\circ\text{C}$ 로 설정된 MRX TCII 리더에 위치한 마이크로플레이트를 약 10초 동안 교반한다.  $405\text{nm}$ 에서, 초기 시간( $t_0$ )과, 이어서 10 내지 20분의 간격에서 2분마다, 효소 반응속도 프로그램에 따라, 흡광도 측정을 수행한다.

<109> 다음으로, 0.1 내지  $100\mu\text{g/ml}$ 의 디파이브로타이드 농도에 대해 측정된 실험 데이터를 처리하고 (엑셀과 시그마 플롯 프로그램), 다음 도 1과 도 2의 실시예를 통해 도시되어 있는 그래프 (회귀 직선)로 나타낸다.

<110> 디파이브로타이드의 표준물질과 시험용 시료에 해당하는 직선의 각 계수 b (기울기)의 값 (도 1)이 디파이브로타이드 농도에 관해 도면에 작성된다 (로그 스케일) (도 2).

<111> 그래프에서 볼 수 있는 바와 같이, 직선을 확인할 수 있도록 하는 선형 반응이 곡선 중심부에서 얻어진다. 직선성의 이러한 간격에서, 미지의 디파이브로타이드 시료의 파워는, 피니 디제이 (Finney DJ)의 “생물학적 분석에서의 통계 방법” (제 2판, Ch. Griffin, 런던)에 기술된 평행선의 생물학적인 측정 방법론에 따라, 표준물질과 비교해서 측정된다. 이러한 방법론을 적용할 수 있도록 하기 위해서, 표준물질과, 각각, 시험하고자 하는 디파이브로타이드에 관한 직선 사이에, 직선성 외에 평행성이 존재하는 것이 중요하다.

<112> 표준 디파이브로타이드와 비교해서 미지의 디파이브로타이드 시료의 생물학적인 활성을 측정하는 시험은, 앞에서 측정된 S자형 곡선의 직선부를 형성하는 농도를 사용함으로써 수행하는 것이 바람직하다. 특히, 0.5 내지  $8\mu\text{g/ml}$  범위의 표준과 미지 디파이브로타이드 농도가 바람직하다.

<113> 플레이트의 웰에, 시험 중인 표준물질과 시료에 대해 여러 개의 디파이브로타이드 농도 복제물을 배열하는 것이 다음에 나타나 있다.

	표준 디파이브로타이드						시험 시료					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	0.5	8.0	4.0	2.0	1.0	1.0	2.0	4.0	8.0	0.5	-
C	-	1.0	0.5	8.0	4.0	2.0	2.0	4.0	8.0	0.5	1.0	-
D	-	2.0	1.0	0.5	8.0	4.0	4.0	8.0	0.5	1.0	2.0	-
E	-	4.0	2.0	1.0	0.5	8.0	8.0	0.5	1.0	2.0	4.0	-
F	-	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<114>

<115> 표준 디파이브로타이드 용액은 열 2-6에 위치한 반면, 측정하고자 하는 디파이브로타이드의 시료는 열 7-11에 위치하며, 이 곳에 농도가 표시되어 있다. 두 번째 플레이트에서, 시료의 위치는 바뀌는 것이 바람직하다.

<116> 마이크로플레이트의 바깥쪽 열과 라인에 측정 방법에 사용되지는 않지만, 시스템 전체에서 최대한의 온도 균일성을 보장하기 위해 물로 채워져 있다.

<117>  $37^\circ\text{C}$ 로 설정된 MRX TCII 리더에 위치한 마이크로플레이트는 약 10초 동안 교반된다.  $405\text{nm}$ 에서, 초기 시간( $t_0$ )과, 이어서 20 내지 50분 동안 5분마다, 효소 반응속도 프로그램에 따라, 흡광도 측정을 수행한다.

<118> 다음으로, 측정된 흡광도 값이 가공되고 (엑셀과 시그마 플롯 프로그램), 표로 작성되며, 그래프로 표시된다

(회귀 직선).

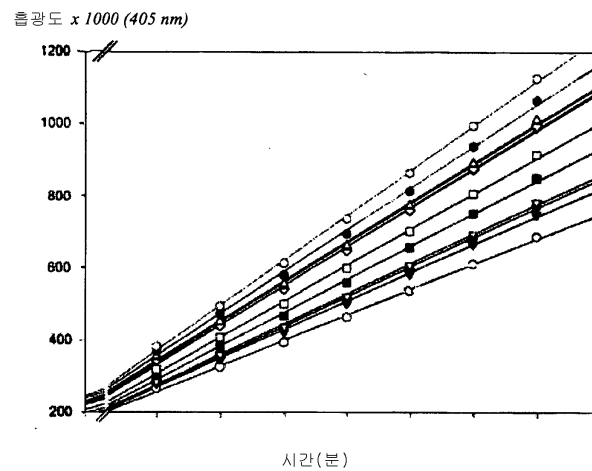
<119> 다음으로, 앞에서 기술한 것과 동일한 계산 시스템을 이용해서, 표준 물질과 비교된 디파이브로타이드 미지 시료의 파워비를 계산하고 그 활성을 측정할 수 있도록 했다.

<120> 실시예를 통해, 각각  $0.5\mu\text{g/ml}$ ,  $2.0\mu\text{g/ml}$  및  $8.0\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 시험한 디파이브로타이드 시료에 관한 표 (1,2 및 3)와 그래프 (도 3,4 및 5)가 다음에 나타나 있다.

## 도면

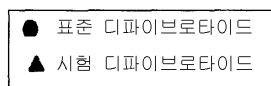
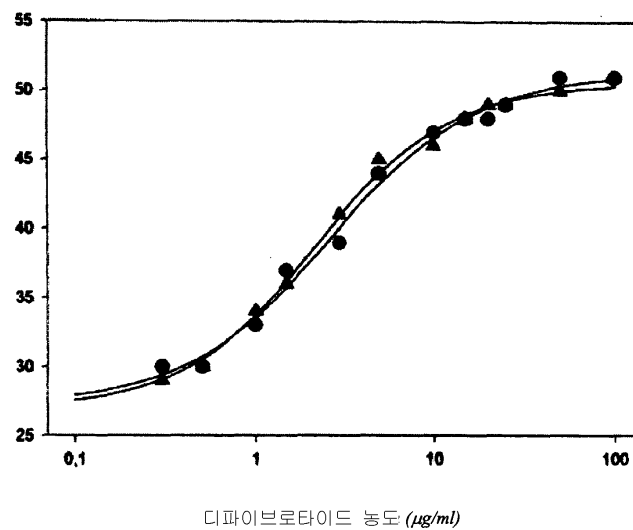
### 도면1

디파이브로타이드로 활성화되거나 활성화되지 않은 플라스민을 통해, 기질 S-2251로부터 pNA의 방출 반응 속도론을 나타낸 도면 (농도 0 -  $100\mu\text{g/ml}$ , 0 - 20분).



### 도면2

기울기



도면3

디파이브로타이드 존재시 플라스민을 통해, 색소 기질 S-2251로부터 pNA의 방출 반응 속도론을 나타낸 도면 (농도 0.5 $\mu$ g/ml, 5개의 복제물).

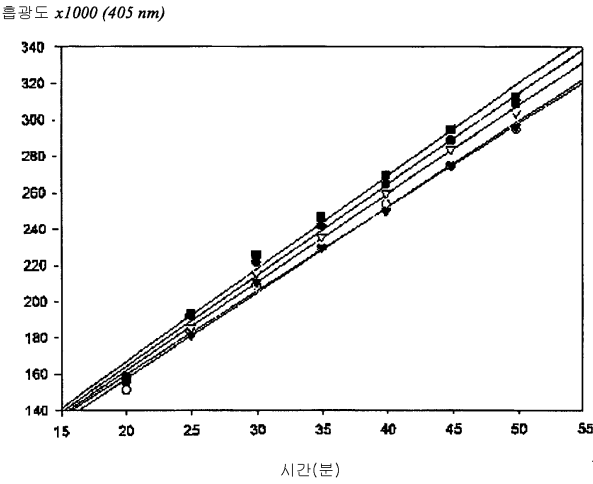


표 1

	시료	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
●	1	64,92	4,95	0,9898
○	2	63,42	4,68	0,9947
▼	3	68,10	4,56	0,9974
▽	4	65,25	4,82	0,9967
■	5	65,42	5,05	0,9894

도면4

디파이브로타이드 존재시 플라스민을 통해, 기질 S-2251로부터 pNA의 방출 반응 속도를 나타낸 도면 (농도 2.0μg/ml, 5개의 복제물).

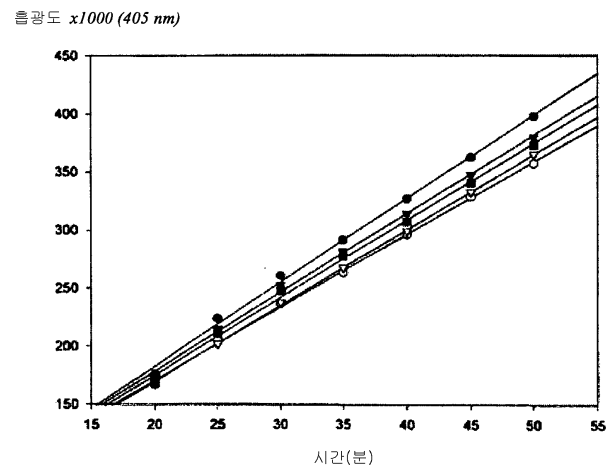


표 2

	시료	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
●	1	37,39	7,28	0,9973
○	2	44,07	6,32	0,9987
▼	3	42,03	6,84	0,9977
▽	4	38,28	6,57	0,9997
■	5	40,86	6,71	0,9973

도면5

디파이브로타이드 존재시 플라스민을 통해, 기질 S-2251로부터 pNA의 방출 반응 속도론을 나타낸 도면 (농도 8.0 $\mu$ g/ml, 5개의 복제물).

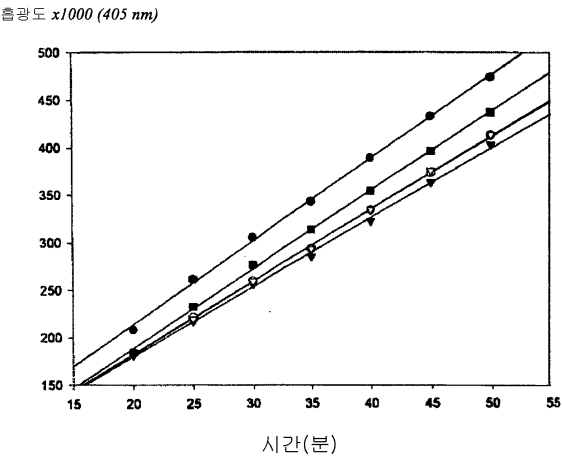


표 4

	시료	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
●	1	38,21	8,76	0,9987
○	2	30,21	7,61	0,9995
▼	3	33,57	7,31	0,9983
▽	4	28,21	7,67	0,9994
■	5	21,89	8,32	0,9991