(19) DANMARK

(12) **PATENTSKRIFT** (11) **166587 B1**

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: **4274/85**

(22) Indleveringsdag: **20 sep 1985**

(41) Alm. tilgængelig: **22 mar 1986**

(45) Patent meddelt: **14 jun 1993**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **21 sep 1984 NL 8402904 04 mar 1985 NL 8500601**

(51) Int.Cl.5 **C 07 K 15/06**
C 07 K 3/28

(73) Patenthaver: ***BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH; Ingelheim am Rhein, DE**

(72) Opfinder: **Christian Peter Maria *Reutelingsperger; NL**

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau**

(54) Blodkoagulationshæmmende proteiner, fremgangsmåde til deres fremstilling samt deres anvendelse

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Biological Abstracts bind 55 (1973) nr. 53441
Chemical Abstracts bind 100 (1984) nr. 83398t

(57) Sammendrag:

4274-85

Blodkoagulationshæmmende proteiner, der ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne.
Proteinerne kan vindes ud fra blodkarvægge, stærkt vasculatiseret væv eller endothelcellekulturer stammende fra forskellige pattedyr, navnlig kvæg, musefamilien, heste og mennesker.
Proteinerne virker blodkoagulationshæmmende uden at forøge blødningsfaren.

Den foreliggende opfindelse angår proteiner, der hæmmer blodkoagulation, samt en fremgangsmåde til fremstilling af disse proteiner og deres anvendelse.

Blodkoagulationshæmmende proteiner, der findes hos de fleste pattedyr, kan opdeles i tre grupper. Denne opdeling beror på forskellen i proteinvirkningsmekanisme.

1. Proteiner, der danner et kompleks med koagulationsfaktoren og derved gør koagulationsfaktoren uvirksom. Hertil hører proteinerne:
   a) Antithrombin-III (Thromb. Res. 5, 439-452 (1974)
   b) α_1-Protease-inhibitor (Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709 (1983))
   c) α_2-Makroglobulin (Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709 (1983))
   d) C_1-Inhibitor (Biochemistry 20, 2738-2743 (1981))
   e) Protease Nexin (J. Biol. Chem. 258, 10439 - 10444 (1983)).
2. Proteiner, der spalter en koagulationsfaktor proteolytisk og derved deaktiverer koagulationsfaktoren. Som eneste protein af denne art er hidtil beskrevet Protein C (J. Biol. Chem. 251, 355-363 (1976)).
3. Proteiner, der afskærmer og/eller hydrolyserer de negativt ladede phospholipider, således at blodkoagulationsmekanismens phospholipid-afhængige reaktioner hæmmes. Hidtil er kun beskrevet phospholipaser, der er isoleret fra forskellige slangegiftarter(Eu. J. Biochem. 112, 25-32 (1980)).

Det trinsvis forløbende koagulationssystem er i de senere år undersøgt intensivt. Det opfattes som et selvforstærkende flertrinssystem af forskellige indbyrdes forbundne, proteolytiske reaktioner, ved hvilket et enzym overfører et zymogen i den aktive form (jfr.

Jackson, C.M., Nemerson, Y., Ann. Rev. Biochem. 49, 765-811 (1980)). Hastigheden af denne reaktion forøges på afgørende måde ved tilstedeværelsen af phospholipider og andre cofaktorer, såsom faktor V_a og faktor VIII_a. In vivo reguleres prokoagulationsreaktionerne af forskellige inhibitionsmekanismer, der forebygger et eksplosivt thrombotisk trauma efter en ringe aktivering af koagulationskaskaden.

US patentskrift nr. 4.347.243 angår et proteinholdigt middel fremstillet af blodkarvægge fra heste.

DE offentliggørelsesskrift nr. 2.253.318 angår en plasminoaktivator.

Bulletin of the Academy of Science of Georgian SSR, bind 65 (1972), side 221-224 beskriver et ekstrakt fra blodkarvægge mod høj koagulationshæmmende aktivitet.

Blood & Vessel bind 14 (1983), side 439-442 beskriver et koagulationshæmmende middel fra celler fra humane navlestrenge, hvilket middel hæmmer faktor Xa's aktivitet.

Antikoagulationsmekanismerne kan inddeles på følgende måde (Rosenberg, R.D., Rosenberg, J. S., J. Clin. Invest. 74, 1-6 (1984)):

1. Serin-protease-faktoren X_a og thrombin inaktiveres som følge af deres binding til henholdsvis antithrombin III og antithrombin/heparin-komplekset. Både prothrombin-aktiveringen og dannelsen af fibrin kan hæmmes på denne måde. Foruden antithrombin III findes også forskellige andre plasma-protease-inhibitorer, såsom α_2-makroglobulin og antitrypsin, hvis virkning er tidsafhængig.
2. Opdagelsen af Protein C førte til afsløringen af en yderligere antikoagulationsmekanisme. Hvis Protein C først er aktiveret, virker det som antikoagulant gennem den selektive proteolyse af proteinfaktorerne V_a og VIII_a, hvorved prothrom-

binasen og det enzym, der omdanner faktoren X, inaktiveres.

3. Plasmin spalter monomert fibrin 1, et produkt fra indvirkningen af thrombin på fibrinogen, hvorved dannelsen af et uopløseligt fibrin forebygges (Nossel, H. L., Nature, 291. 165-167 (1981)).

Blandt de ovennævnte, i koagulationsprocessen indgribende naturligt forekommende proteiner finder for nærværende kun antithrombin III klinisk anvendelse. En betydelig ulempe ved anvendelsen af dette protein er imidlertid den derved optrædende stigning af blødningstendensen.

Alle hidtil som antikoagulanter anvendte midler, hvad enten de er naturligt forekommende eller af syntetisk art, gør på en eller anden måde koagulationsfaktorerne uvirksomme og fører derved til bivirkninger, der kan have en ugunstig indvirkning på koagulationsprocessen.

Den foreliggende opfindelse har til opgave at tilvejebringe et middel, der udviser blodkoagulationshæmmende egenskaber, men uden at have de med de hidtil kendte antikoagulanter forbundne, på koagulationsprocessen ugunstigt indvirkende egenskaber.

Overraskende har der nu kunnet isoleres naturligt forekommende proteiner, der udviser blodkoagulationshæmmende egenskaber, men ikke forøger blødningsfaren. Som yderligere overraskende egenskab mister disse proteiner ved større blødninger deres hæmmende egenskaber, således at de sædvanlige koagulationsprocesser kan forløbe uforstyrret, og der ikke består nogen fare for forblødning.

Den foreliggende opfindelse angår følgeligt blodkoagulationshæmmende proteiner, der er ejendommmelige ved, at:

- de kan isoleres fra stærkt vaskulariseret væv,
- de ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne,

- de ikke hydrolyserer phospholipiderne,
- de binder reversibelt til negativt ladede phospholipider via de divalente kationer Ca^{2+} og/eller Mn^{2+},
- de er i stand til at fortrænge faktor X_a og prothrombinerne fra en negativt ladet phospholipidoverflade, og
- de hæmmer ikke den biologiske og amidolytiske aktivitet af faktorerne X_a og II_a.

Den foreliggende opfindelse angår som nævnt ovenfor blodkoagulationshæmmende proteiner, der ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne og hæmmer:

- det modificerede prothrombin-tid-forsøg og/eller
- det modificerede, aktiverede, partielle thromboplastin-tid-forsøg og/eller
- det ikke-modificerede prothrombin-tid-forsøg og/eller
- prothrombin-aktiveringen ved koagulationsfaktoren X_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} og/eller
- den interne X-aktivering ved faktoren IX_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} og/eller
- prothrombin-aktiveringen af isolerede, stimulerede blodplader og/eller
- den af karvæggene inducerede koagulation og/eller
- den koagulations-afhængige blodpladeaggregation.

Den foreliggende opfindelse angår også blodkoagulationshæmmende proteiner, der ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne, og hvis hæmmende virkning afhænger af mængden af phospholipider. De omhandlede proteiner inducerer prothrombin-aktiveringshæmningen ved faktoren X_a. Hæmningen er afhængig af phospholipidkoncentrationen og er mindre ved høje phospholipidkoncentrationer. Phospholipiderne hydrolyseres ikke af de omhandlede proteiner.

Den foreliggende opfindelse angår endvidere blodkoagulationshæmmende proteiner, der ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne, og som over de divalente kationer Ca^{2+} og/eller Mn^{2+} bindes til negativt ladede phospholipider, der f.eks. findes i vesikler, liposomer eller etherosomer, og/eller over de divalente kationer Ca^{2+} og Mn^{2+} bindes til negativt ladede phospholipider, der er koblet med Spherocil®. Bindingen af proteinerne til de negativt ladede phospholipider er reversibel og kan ophæves af ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA). De omhandlede proteiner er i stand til at fortrænge faktoren X_a og prothrombinerne fra en negativt ladet phospholipidoverflade.

Den foreliggende opfindelse angår navnlig blodkoagulationshæmmende proteiner, der ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne, og som udviser molekylvægte på ca. 70×10^3, 60×10^3, 34×10^3 eller 32×10^3, hvoraf proteinerne med henholdsvis molekylvægten 34×10^3 og 32×10^3 hver kun består af en enkelt polypeptidkæde.

Den foreliggende opfindelse angår fortrinsvis blodkoagulationshæmmende proteiner, der ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne, og som er ejendommelige ved, at

- de er isoleret og renset fra pattedyrs blodkarvægge,
- de ikke er glycoproteiner,
- de ikke er phospholipaser,
- de har et isoelektrisk punkt ved pH 4,4 - 4,6,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende proteiner er termolabil ved 56°C,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende proteiner i citreret plasma ved 37°C forbliver stabil i nogle timer,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende proteiner ikke ødelægges fuldstændigt af trypsin og/eller chymotrypsin,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende prote-

iner ikke påvirkes af collagenase og/eller elastase,

- de bindes over de divalente kationer Ca^{2+} og Mn^{2+} med negativt ladede phospholipider, der findes i vesikler, liposomer eller etherosomer,
- de bindes over de divalente kationer Ca^{2+} og Mn^{2+} med negativt ladede phospholipider, der er koblet med Spherocil,
- proteinernes binding til de negativt ladede phospholipider er reversibel og kan ophæves af ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA),
- de hæmmer det modificerede thrombin-tid-forsøg,
- de hæmmer det modificerede, aktiverede, partielle thromboplastin-tid-forsøg,
- de hæmmer det ikke-modificerede prothrombin-tid-forsøg,
- de hæmmer prothrombin-aktiveringen ved koagulationsfaktoren X_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} in vitro,
- de hæmmer den interne X-aktivering ved faktor IX_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} in vitro,
- de hæmmer prothrombin-aktiveringen af isolerede, stimulerede blodplader in vitro,
- de hæmmer den af karvæggen inducerede koagulation in vitro, og
- den af proteinerne inducerede prothrombin-aktiveringshæmning ved faktor X_a er afhængig af phospholipidkoncentrationen og er mindre ved høje phospholipidkoncentrationer.

Den foreliggende opfindelse angår navnlig VAC-proteiner, der er i det væsentlige frie for ethvert dyrisk væv, fortrinsvis i en i det væsentlige ren form.

Egnede udgangsmaterialer til isolering af VAC-proteinerne er blodkarvægge samt stærkt vaskulariseret væv fra forskellige pattedyr, f.eks. kvæg, rotter, heste

og mennesker, samt endothelcellekulturer fra disse pattedyr. Navnlig egner sig arterievægge fra kvæg, rotter, heste og mennesker samt humane navlestrengsvener og -arterier.

Den foreliggende opfindelse angår også en fremgangsmåde til fremstilling af blodkoagulationshæmmende proteiner, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at blodkarvægge, stærkt vaskulariseret væv eller endothelcellekulturer

a) homogeniseres og centrifugeres differentielt, og supernatanten i vilkårlig rækkefølge udsættes for én eller flere af følgende rensningsbehandlinger:

b) fældning med salt,

c) affinitetschromatografi,

d) ionbytterchromatografi,

e) chromatografi over en molekylsigte,

hvorhos produkterne opnået ifølge trin b), c), d) og e) om ønsket kan dialyseres.

Særligt egnet er følgende fremgangsmådeskema:

Det homogeniserede udgangsmateriale bliver først udsat for en differentialcentrifugering. Den vundne supernatant kan derefter i vilkårlig rækkefølge viderebehandles på følgende måde. Med ammoniumsulfat kan uønskede iblandinger fældes. Supernatanten bliver derefter renset yderligere ved affinitetschromatografi, f.eks. over hydroxyapatit, ionbytterchromatografi, f.eks. over DEAE-Sephacel®, chromatografi over en molekularsigte, såsom Sephadex® G-100, og immunadsorptionschromatografi, f.eks. med polyklonale eller også monoklonale antistoffer. Alt efter kvaliteten af udgangsmaterialet kan dette behandlingsskema ændres, eller der kan også anvendes andre rensningsmetoder, f.eks. rensning med phospholipidvesikler.

Foruden den klassiske antithrombosebehandling, den orale antikoagulation, bliver der nu og dage i tilfælde af en manifest thrombose, intravasculært indgivet

biosyntetisk væv-plasminogenaktivator (N. Engl. J. Med. 310, 609-613 (1984)).

De omhandlede proteiner er, navnlig på grund af de blodkoagulationshæmmende egenskaber, glimrende egnet til samtidigt med hæmningen af den koagulationsafhængige blodpladeaggregation at forebygge en thrombose, f.eks. ved operationer.

Opfindelsen angår derfor også anvendelse af de omhandlede proteiner til fremstilling af et antithrombotisk farmaceutisk præparat.

Resultaterne ved VAC-isolering og -rensning fra kvæg-aorter er vist i Tabel A. Bestemmelsen af mængden af VAC-aktivitet i supernatanten fra 100.000 xg centrifugeringen var irrelevant på grund af en prokoagulantaktivitet. De for denne aktivitet ansvarlige bestanddele kunne udfældes med ammoniumsulfat ved en mætningsgrad på 35%. Det fremgik, at ovennævnte opløsning efter fældningen med 35% ammoniumsulfat indeholdt 100% VAC-aktivitet. Til koncentrering blev der til opløsningen sat ammoniumsulfat indtil en mætning på 90%. Bundfaldet, indeholdende VAC-proteinerne, blev i nærværelse af TBS bundet til en hydroxyapatit-søjle. Efter vask blev VAC-proteinerne elueret fra denne søjle med en stigende phosphatgradient. Ved en lav ionstyrke blev VAC-proteinerne bundet til en DEAE-Sephacel®-søjle. Elueringen af VAC-proteinerne fra denne søjle foregik med en stigende NaCl-koncentrationsgradient. Ved slutrensningen blev proteinerne fraskilt på grundlag af deres molekylvægt ved gelfiltrering over Sephadex® G-100. Elueringsmidlet var en højsaltholdig puffer for at holde interaktionen mellem VAC og Sephadex-materialet ved et minimum. VAC eluerede fra denne søjle i et volumen på ca. 1,6 gange det tomme søjlevolumen (se Fig. 1). Totaludbyttet af VAC-aktivitet efter denne slutrensning androg 35%. Ifølge SDS-PAGE indeholdt alle G-100 fraktioner, der viste VAC-aktivitet, to polypeptider (mol-vægt henholds-

vis 34.000 og 32.000). I nogle tilfælde viste også en fraktion med mol-vægt 60.000 VAC-aktivitet.

Ifølge SDS-PAGE er kun spidsfraktionerne 138-140 homogene i henseende til begge polypeptider.

I Tabel A er samlet rensningsdata fra kvægsorter. De G-100-fraktioner, der var homogene i henseende til begge polypeptiderne, blev anvendt til alle yderligere forsøg i den foreliggende beskrivelse, med undtagelse af forsøgene til karakterisering af bindingen af VAC til phospholipid-liposomer.

I G-100-fraktionen 139 fandtes 3,4% af VAC-aktiviteten med en specifik aktivitet på 1480 enheder/mg protein, som fastslået ved éttrins-koagulationsforsøget. Denne fraktion indeholdt ingen påviselig mængde af phospholipid, og ud fra absorptionen ved 280 nm og proteinindholdet blev der for dette rensede VAC-præparat beregnet en ekstinktionskoefficient på

$$A^{1\%}_{1cm} = 8,5.$$

Karakterisering af VAC

Som det fremgår af Fig. 2, er de to polypeptider med en mol.vægt på 34.000 og 32.000, som findes i det rensede proteinmateriale, og som tilskrives VAC-aktiviteten, proteiner med en enkelt kæde. Som fastslået med det Schiff'ske reagens med basisk fuchsin indeholder begge proteiner kun få carbonhydratgrupper. Endvidere kunne der i ingen af proteinerne påvises nogen Gla-grupper. Af den isoelektriske fokusering fremgik, at begge proteiner vandrer i et enkelt bånd, hvilket svarer til et isoelektrisk punkt på 4,4 til 4,6 (jfr. Fig. 3).

VAC-aktiviteten vandtes fra PAG-pladen ved eluering af dette bånd fra gelen. En analyse af dette eluat med SDS-PAGE viste igen tilstedeværelse af begge proteiner. Herved kunne det bekræftes, at begge proteiner vandrer i et enkelt bånd i pH-gradienten for PAG-pladen.

Til kontrol af metoden blev humant hæmoglobin (Hb) ligeledes undersøgt ved hjælp af den isoelektriske fokusering. Den bestemte værdi på 6,8 stemte overens med angivelserne i litteraturen (jfr. Fig. 3).

Af bindingsforsøg fremgik, at VAC-aktiviteten kan bindes til negativt ladede phospholipid-membraner. Denne binding foregår i nærværelse af Ca^{2+} og Mn^{2+}, men ikke i nærværelse af Mg^{2+} og i fravær af divalente metalioner (jfr. Tabel D). Denne binding af VAC-aktiviteten til liposomer er omvendelig og kan ophæves med reagenset EDTA.

Ved hjælp af SDS-PAGE kunne det påvises, at begge proteiner i nærværelse af Ca^{2+} kan binde til liposomer, og at denne binding ved tilsætning af EDTA igen dissocieres (jfr. Fig. 4). Dette viser igen, at VAC-aktiviteten kan tilskrives disse to proteiner.

Ved opbevaring i TBS indeholdende 10% glycerol er VAC-aktiviteten stabil i mindst 3 måneder ved -70°C, ved 0°C i mindst 12 timer og ved 37°C i mindst en halv time. Ved 56°C er aktiviteten forsvundet i løbet af to minutter.

Virkning af VAC

VAC forlænger koagulationstiden ved éttrins-koagulationsforsøget, ved hvilket koagulationen udløses med BTP. Udskiftning af BTP med det rensede kvægthrombin eller den rensede kvægfaktor X_a i dette forsøg viser, at VAC kun forlænger koagulationstiden, når faktor X_a anvendes til udløsning af koagulationen, og at den af thrombin inducerede koagulation ikke påvirkes af VAC. Dette tyder på, at VAC direkte hæmmer faktor X_a-aktiviteten, eller af der optræder en interaktion med prothrombinase-komplekset. Til yderligere undersøgelse anvendtes det amidolytiske thrombin-dannelsesforsøg med den rensede kvægfaktor X_a og prothrombin.

Fig. 5 viser, at når prothrombin i nærværelse af Ca^{2+} og phospholipid aktiveres med faktor X_a til throm-

bin, hæmmer VAC prothrombin-aktiveringen, og at inhibitionsgraden er afhængig af VAC-koncentrationen. Endvidere er den hæmmende virkning af VAC stærkere ved en lavere phospholipidkoncentration.

Fig. 6 viser phospholipid-afhængigheden for den af VAC inducerede inhibition af prothrombinaktiveringen. Det er bemærkelsesværdigt, at thrombin-aktiveringen med faktor X_a, ved en phospholipidkoncentration på nul, ikke hæmmes af VAC. Ved kontrolforsøg viste det sig, at VAC selv ikke påvirker målesystemet.

Inkubationen af 5 µM phospholipid (PS/PC, 1:4 mol/mol) med 107 µg/ml VAC (spec. aktivitet 1.300 enheder/mg) og 10 mM Ca^{2+} gav i løbet af tre minutter ved 37°C en forringelse af prokoagulant-aktiviteten. Dette viser, at VAC ikke besidder nogen phospholipase-aktivitet.

I modsætning til AT-III har VAC ingen indvirkning på den amidolytiske aktivitet af det rensede thrombin og ingen vedvarende indvirkning på faktor X_a-aktiviteten, som målt med de chromogene substrater henholdsvis S 2238 og S 2237 (jfr. Tabel C). I denne tabel er også vist, at inaktiveringen af faktor X_a og thrombin/AT-III ikke forstærkes af VAC, hvorimod hepratin forøger AT-III-aktiviteten betydeligt. Dette viser, at VAC hverken har en hepratin-agtig eller en AT-III-agtig aktivitet.

Isoleringen af et hidtil ukendt humant blodkoagulationshæmmende protein kunne opnås ved en i princippet tilsvarende fremgangsmåde ud fra homogenatet af humane navlestrengarterier.

Antikoagulanten fandtes ved hjælp af dens evne til af forlænge koagulationstiden ved et prothrombintid-forsøg. Denne evne var målelig efter en Sephadex® G-100-fraktionering af et arterie-homogenat. På grundlag af videre isoleringstrin kan det antages, at aktiviteten kan føres tilbage til ét eller flere vandopløselige stoffer, der ialt bærer en negativ ladning ved et pH på 7,9.

Analysen af en Sephadex® G-75-fraktion (det sidste hidtil gennemførte rensningstrin) ved hjælp af gelelektroforese viser en korrelation mellem intensiteten af molekylvægtbåndet ved 32.000 og forlængelsen af koagulationstiden målt i MPTT (Fig. 15). Relationen mellem 32K-båndet og antikoagulationsaktiviteten er ubetvivlelig, da der kun fra dette 32K-bånd fra polyacrylamidgelen kan elueres en blodkoagulationshæmmende aktivitet. I forbindelse med de resultater, at antikoagulanten hurtigt mister sin aktivitet ved inkubation ved 56°C, og at proteaser kan ødelægge dens aktivtet, må det antages, at antikoagulationsaktiviteten fremkaldes af et enkelt protein med en tydelig molekylvægt på 32.000 Dalton.

Trypsin er, i modsætnming til protease type 1, en dårlig inaktivator for antikoagulanten. Dette tyder på, at antikoagulanten kun indeholder få lysin- og arginingrupper, der er tilgængelige for trypsin.

Arten af den blodkoagulationshæmmende aktivitet blev undersøgt, idet koagulationen blev udløst på forskellig måde. Den enten med den vasculære prokoagulant HTP eller med faktor X_a udløste koagulation hæmmes af antikoagulanten, hvorimod den af thrombin inducerede koagulation ikke hæmmes. Heraf kan udledes, at antikoagulanten ikke spiller en rolle ved thrombindannelsen, men derimod ved virkningen af thrombinet.

Til yderligere belysning af det omhandlede proteins antikoagulationsmekanisme anvendtes prothrombinase (2). Ved forsøgsbetingelserne kan antikoagulanten hæmme aktiveringen af prothrombin med den fuldstændige prothrombinase (faktor X_a, faktor V_a, phospholipid, Ca^{2+}) og med den phospholipid-bundne faktor X_a (faktor X_a, phospholipid, Ca^{2+}), men ikke den frie faktor X_a (faktor X_a, Ca^{2+}).

Tidsforløbet for prothrombin-aktiveringen i nærværelse af antikoagulationsmidlet tyder på en øje-

blikkelig inhibition af prothrombin-aktiveringen, der forbliver tidsmæssigt konstant. Det kan derfor fastslås, at antikoagulanten hverken virker ved en phospholipase-aktivitet eller ved en proteolytisk aktivitet. Den kendsgerning, at aktiveringen af prothrombin med faktor X_a og Ca^{2+} slet ikke påvirkes af antikoagulanten, tyder stærkt på, at antikoagulationsmekanismen for det vaskulære protein er forskellig fra mekanismen for de alment kendte plasmaproteaseinhibitorer, såsom antithrombin III. Som påvist af Walker et al. (8), hæmmer det aktiverede Protein C ikke prothrombin-aktiveringen med faktor X_a, Ca^{2+} og phospholipid, og det omhandlede protein er derfor heller ikke identisk med Protein C.

De første bindingsforsøg tyder på, at det vasculære antikoagulationsmiddel muligvis interfererer med lipidbindingen af faktor X_a og/eller af prothrombin. Om antikoagulantens evne til at hæmme prothrombin-aktiveringen er fuldstændigt ansvarlig for forlængelseseffekten ved prothrombin-tid-forsøget, får stå hen.

Den kendsgerning, at det omhandlede materiale kan vindes fra forskellige arter af arterier og ikke fra moderat vasculariseret væv, kunne tyde på, at det omhandlede protein er en fysiologisk moderator for hæmostase og thrombose og aktivt på det vasculære niveau.

På baggrund af de fundne egenskaber og virkningen af VAC kan blodkoagulationsmekanismen under VAC-indvirkning forklares på følgende måde:

VAC binder over Ca^{2+}-ioner med negativt ladede phospholipider, der optræder ved beskadigelse af væv og/eller stimulerede blodplader, og forringer derved bindingen af bestemte koagulationsfaktorer (vitamin K-afhængige koagulationsfaktorer) med de negativt ladede phospholipidoverflader, der for disse koagulationsfaktorer virker som en katalytisk overflade (Biochem. Biophys. Acta, 515, 163-205 (1978)), med det resultat, at de phospholipid-afhængige blodkoagulationsreaktioner

hæmmes af VAC. På grund af virkningsmekanismen kan VAC indordnes i proteingruppe 3 (se ovenfor).

Af afgørende betydning er imidlertid den i forhold til proteinerne i denne gruppe foreliggende forskel, at VAC ikke hydrolyserer phospholipiderne og derfor ikke kan dekomponere nogen væsentlige menbranstrukturer.

Endvidere er de for VAC beskrevne egenskaber, der ikke er angivet for noget hidtil kendt antikoagulationsmiddel, af særlig betydning og fordel, nemlig:

- VAC's antikoagulationseffekt er afhængig af mængden af phospholipider, der tager del i koagulationsprocessen. Denne afhængighed bevirker, at koagulationsprocessen, der f.eks. udløses af en ringe karvægbeskadigelse og/eller en ringe blodpladeaktivering, f.eks. ved en thrombotisk proces, overraskende kan hæmmes af VAC. På den anden side bliver imidlertid den koagulationsproces, der udløses af en drastisk karvægbeskadigelse, og ved hvilken phospholipidder optræder i stor koncentration, ikke hæmmet af VAC netop på grund af denne høje phospholipidkoncentration. Faren for en blødning ved anvendelse af VAC er derfor overraskende yderst ringe.
  Disse overlegne egenskaber findes hos VAC i modsætning til alle hidtil kendte antikoagulationsmidler, der gør én eller flere koagulationsfaktorer uvirksom og derved forøger faren for blødning.
- VAC inaktiverer overraskende ikke selve koagulationsfaktorerne. Herved er det også muligt for koagulationsfaktorerne at opfylde deres andre opgaver, af hvilke stadigt flere afsløres. Mange aktive koagulationsfaktorer har f.eks. den vigtige ikke-hæmostatiske opgave i forbindelse med chemotaxien for inflammatorcellen. Denne

celle bidrager til helingen af en beskadiget karvæg.

Denne proces bliver overraskende ikke forstyrret af VAC.

Den foreliggende opfindelse beskriver for første gang en hidtil ukendt klasse af blodkoagulationshæmmende proteiner, der ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne.

De i forbindelse med den foreliggende opfindelse anvendte forkortelser har følgende betydninger:

VAC:	Vasculær antikoagulant
PFP:	Blodpladefrit plasma
TBS:	100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
EDTA:	Ethylendiamintetraeddikesyre
TBSE:	TBS med 2 mM EDTA
BTP:	Thromboplastin fra kvæghjerner
HTP:	Thromboplastin fra humane hjerner
TBSA:	TBS med 0,5 mg/ml humant serum-albumin, pH 7,9
S 2337:	N-Benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-pipecolyl-glycyl-L-arginin-p-nitroanilid-dihydrochlorid
S 2238:	H-D-Phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginin-p-nitroanilid-dihydrochlorid
AT-III:	Humant antithrombin III
S.A.:	Specifik aktivitet
Ole_2Gro-P-CHO:	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
Ole_2Gro-P-Ser:	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserin
Gla:	γ-Carboxy-glutaminsyre.

Til nomenklaturen for blodkoagulationsfaktorerne er anvendt den i "Task Force on Nomenclature of Blood Clotting Zymogens and Zymogens intermediates" anbefalede nomenklatur.

Materialer

Kemikalierne til den analytiske SDS-PAGE og hydroxyapatit HTP stammede fra Bio-Rad, Sephadex® G-100 og G-75, DEAE-Sephacel® og det anvendte "Low Molecular

Weight Calibration Kit" fra Pharmacia, de chromogene substrater S 2337 og S 2238 fra Kabi Vitrum, og Diaflo PM-10 ultrafiltreringsmembranen fra Amicon.

Eksempel 1

Isolering af og rensning af VAC.

Inden for en halv time efter slagtning blev aorterne udtaget fra kvæg. Kvægblodet blev samlet i trinatriumcitrat (slutkoncentration 0,38 vægt%), og centrifugeret 10 minutter ved stuetemperatur og 2000 x g. Det kun få blodplader indeholdende plasma blev derefter igen centrifugeret (15 minutter ved 10.000 x g). På denne måde vandtes blodpladefrit plasma (PFP).

Dyrenes aorter blev umiddelbart efter deres fjernelse skyllet grundigt med TBS. Intima blev løsgjort fra aorterne og homogeniseret under anvendelse af en hurtigroterende homogenisator, f.eks. med Braun MX 32, i TBSE, der indeholdt sojabønnetrypsin-inhibitor (16 mg/l) og benzamidin (1,57 g/l).

Det fra 8 aorter homogeniserede materiale, der indeholdt 20% (vægt/volumen) af faststof, blev centrifugeret 60 minutter ved 100.000 x g. Supernatanten blev mættet med fast ammoniumsulfat til 30%, omrørt 30 minutter og derefter centrifugeret 20 minutter ved 12.000 x g. Den resulterende væske blev mættet med fast ammoniumsulfat til 90%, omrørt i 30 minutter og derefter centrifugeret 20 minutter ved 12.000 x g. Det faste stof blev suspenderet i et lille volumen TBS og dialyseret mod benzamidin-holdigt (1,57 g/l) TBS. Den dialyserede fraktion blev overført til en hydroxyapatit-søjle (1 x 20 cm), der var ækvilibreret med TBS. Søjlen blev vasket med 4 lagvoluminer TBS. VAC-proteinerne blev elueret fra søjlen med 200 ml natriumphosphatpuffer (pH 7,5) med en lineargradient på 0-500 mM. De VAC-holdige fraktioner blev samlet og dialyseret mod 50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5.

Den samme puffer anvendtes også til ækvilibrering af en DEAE-Sephacel®-søjle (3x5 cm), på hvilken det dialyserede VAC-materiale blev chromatograferet. Søjlen blev vasket med 4 lagvoluminer af ækvilibreringspufferen, før VAC blev elueret fra søjlen med 200 ml NaCl-opløsning i 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, med en lineargradient på 50-300 mM. De VAC-holdige fraktioner blev samlet, dialyseret mod 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 og derefter koncentreret i en Amicon®-koncentreringscelle under anvendelse af en PM-10 ultrafiltreringsmembran. Koncentratet med et volumen på 2 ml blev overført til en Sephadex®-søjle G-100 (3 x 80 cm), der var ækvilibreret med 500 mM NaCl og 20 mM Tris/HCl, pH 7,5.

Eluatet blev samlet i fraktioner på hver 2 ml, de aktive fraktioner blev separat dialyseret mod 10 vol% glycerol-holdigt TBS og opbevaret ved -70°C. Den totale rensning blev gennemført ved 0-4°C.

Bestemmelse af VAC-aktivitet

Til bestemmelse af VAC-aktiviteten blev der anvendt to forskellige metoder:

a) Éttrins-koagulationsforsøget (modificeret prothrombin-tid-forsøg),

b) et thrombindannelsesforsøg.

Éttrins-koagulationsforsøget blev udført på følgende måde:

I en kuvette af siliconiseret glas blev der omrørt 175 µl af den fraktion, der skulle undersøges, eller 175 µl TBS som kontrol, sammen med 50 µl PFP og 25 µl fortyndet BTP (900 r.p.m.). Efter en inkubationstid på 3 minutter ved 37°C blev koagulationen udløst ved tilsætning af 250 µl puffer, der indeholdt 80 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$ og 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. Fibrin-dannelsen blev registreret optisk ved anvendelse af et "Payton Dual Aggregation Module" (Hornstra, G., Phil. Trans. R. Soc. London B. 294, 355-371 (1981)). Koagulationstiden

for kontrolprøven var på 65 sekunder. Dette forsøg blev under rensningen anvendt til prøvning af de forskellige fraktioner for tilstedeværelse af VAC-aktivitet. Til bestemmelse af VAC-udbyttet under rensningen blev én enhed af VAC-aktivitet defineret som den mængde VAC, der forlængede koagulationstiden ved ovennævnte forsøg til 100 sekunder.

I nogle tilfælde blev BTP erstattet med renset kvægthrombin eller renset kvægfaktor X_a. I dette halvrensede koagulationssystem blev mængden af thrombin eller faktor X_a valgt således, at koagulationstiden for kontrolprøven ligeledes var 65 sekunder.

Thrombindannelsesforsøget blev udført på følgende måde:

20 µl Renset kvægfaktor X_a (150 nM), 30 µl $CaCl_2$ (100 mM), 30 µl fortyndet VAC og 30 µl PS/PC-phospholipid-membraner (slutkoncentrationerne er anført i teksten på tegningerne) blev indført i en formstofkuvette, der indeholdt 181 µl TBSA.

Blandingen blev omrørt tre minutter ved 37°C med en teflonomrører. Thrombindannelsen blev udløst ved tilsætning af 9 µl renset kvægfaktor II (33,33 µM). Efter forskellige tidsrum blev der fra reaktionsblandingen udtaget prøver på 50 µl, der blev sat til indholdet i en formstofkuvette på 1 ml, som med en termostat blev holdt ved 37°C og indeholdt 50 µl af det chromogene substrat S 2238 (5 mM). Ud fra ekstinktionsændringen ved 405 nm, målt med et Kontron Spektrometer Uvikon 810, blev mængden af thrombin i reaktionsblandingen beregnet under anvendelse af en målekurve, der var tilvejebragt ud fra de kendte mængder af renset kvægthrombin. Procentmængden af den af VAC forårsagede inhibition blev defineret på følgende måde:

$$\% \text{ Inhibition} = (1 - \frac{a}{b}) \times 100\%$$

hvor "a" er hastigheden for thrombindannelsen i fravær af VAC, i nM II_a/min., og "b" er hastigheden for thrombindannelsen i fraværelse af VAC, i nM II_a/min.

Proteiner

De af vitamin K afhængige faktorer prothrombin og faktor X_a vandtes ved rensning af det citrerede kvægplasma (jfr. Stenflo, J., J. Biol. Chem. 251, 355-363 (1976)). Efter bariumcitrat-adsorption og eluering, fraktionering med ammoniumsulfat og DEAE-Sephadexchromatografi forelå to proteinfraktioner, der indeholdt henholdsvis en prothrombin/faktor IX-blanding og faktor X. Faktor X vandtes ved metoden ifølge Fujikawa et al., Biochemistry, 11, 4882-4891 (1972) og blev aktiveret ved anvendelse af RVV-X (Fujikawa et al., Biochemistry, 11, 4892-4899 (1972)). Prothrombin blev skilt fra faktor IX ved en heparin-agarose-affinitetschromatografi (Fujikawa et al., Biochemistry, 12, 4938-4945). De prothrombinholdige fraktioner fra heparin-agarose-søjlen blev samlet og renset yderligere ved metoden ifølge Owens et al., J. Biol. Chem. 249, 594-605 (1974)). Koncentrationen af prothrombin og faktor X_a blev bestemt ved metoden ifølge Rosing et al., J. Biol. Chem. 255, 274-283 (1980). BTP blev fremstillet ifølge en normalmetode, der er beskrevet af Van Dam-Mieres et al., "Blood coagulation enzymes, Methods of Enzymatic Analysis", Verlag Chemie GmbH., Weinheim. Proteinkoncentrationerne blev bestemt ifølge Lowry et al., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

Fremstilling af phospholidid, phospholipid-vesikel og phospholipid-liposom.

1,2-Dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholin ($18:1_{cis}/18:1_{cis}$-PC) og 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphoserin ($18:1_{cis}/18:1_{cis}$-PS) blev fremstillet, som beskrevet af Rosing et al., J. Biol. Chem 255, 274-283 (1980). Separate, af to lag bestående phospholipid-vesikler af PC og PS blev fremstillet under anvendelse af ultralyd, som beskrevet af Rosing et al., J. Biol. Chem. 225, 274-283 (1980). En forrådsopløsning af phospholipid-liposomer blev fremstillet ved at opløse den nødvendige mængde phospholipid i chloroform. Chloroformen blev fordampet med nitrogen. Det tilbageværende phospholipid blev suspenderet i 5% glycerol-holdig TBS, blandet forsigtigt 3 minutter med nogle små glaskugler og derefter centrifugeret 10 minutter ved 10.000 xg. Supernatanten blev bortkastet, og resten blev igen forsigtigt suspenderet i 5% glycerol-holdig TBS. På denne måde vandtes phospholipid-liposom-forrådsopløsningen. Disse lipposomer blev opbevaret ved stuetemperatur. Phospholipid-koncentrationerne blev bestemt ved phosphatanalyse ifølge Böttcher et al., Anal. Chim. Acta, 24, 203-207 (1961).

SDS-PAGE

Gel-elektroforese på plader i nærværelse af SDS blev udført ved den af Laemmili, Nature, 227, 680-685 (1970), beskrevne metode under anvendelse af en gel, der indeholdt 10 vægt% acrylamid, 0,27 vægt% N/N^3-methylen-bisacrylamid og 0,1 vægt% SDS. 5 vægt% β-Mercaptoethanol forelå i gelprøver med reducerede disulfidbroer. Gelerne blev farvet på følgende måde:

1) med 0,25 vægt% Coomassie Blue R-250 i 50 vægt% ethanol og 15 vægt% eddikesyre og affarvet i 10 vægt% ethanol og 10 vægt% eddikesyre,
2) med Schiff'sk reagens, fremstillet ud fra det

basiske fuchsin (Merck) ved metoden ifølge Segrest et al., beskrevet i "Methods in Enzymology", bind 28, 54-63 (1972), eller

3) med sølv, som beskrevet af Merril et al., i Electrophoresis, 3, 17-23 (1982).

Elektrofokusering

De isoelektriske pH-bestemmelser af proteiner blev udført med de færdige tyndtlags-polyacrylamidgeler, der indeholdt Amfolin-bærer-ampholyter (PAG-plader, LKB), ved et pH i området 3,5-9,5, efter fabrikantens forskrift. pH-Gradienten i gelen blev straks efter elektrofokuseringen bestemt ved udskæring af en strimmel fra gelen langs en linie mellem anoden og katoden. Elektrolytterne blev elueret fra hver strimmel med destilleret vand, og pH-værdien af vandet blev målt med en kombineret glaselektrode.

Glutaminsyrebestemmelse

Gla-Bestemmelsen blev udført ved HPLC på en "Nucleosil 5SB"-søjle (CHROMPACK) ved metoden ifølge Kuwada et al., Anal. Biochem. 131, 173-179 (1983).

Eksempel 2

Kobling af phospholipider til Sphérocil

De nødvendige phospholipider blev opløst i chloroform og sat til søjlematerialet Sphérocil® (Rhone-Poulenc) i et forhold på 5 mg phospholipid pr. gram Sphérocil. Chloroformen blev fordampet med N_2-gas, og det tørre Sphérocil®-phospholipid blev derefter vasket med pufferen, hvori VAC var suspenderet. VAC binder til Sphérocil®-phospholipid i nærværelse af Ca^{++} og/eller Mn^{++}, når en del af phospholipiderne er negativt ladede.

Eksempel 3

50 µl Citreret/blodpladefrit plasma blev blandet med 200 µl puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl), hvori var indeholdt kaolin (kunstig overflade, der katalyserer den væsentlige koagulation, i dette tilfælde formalet glas), inositin (phospholipid-kilde) og VAC. Denne blanding blev inkuberet tre minutter ved 37°C, hvorefter der blev tilsat 250 µl Ca^{++}-puffer (200 mM Tris/HCl, pH 7,5, 80 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$).

Koagulationstiden blev målt som i Eksempel 1.

T A B E L A

Resumé af rensning af VAC fra intima fra kvægaorter.

Rensnings-trin	Protein[a] mg	VAC[b] Enheder	specifik aktivitet enheder/mg	Udbytte %	Rensningsgrad
Supernatant med 35% $(NH_4)_2SO_4$	630	19.500	31,0	100	1,0
Bundfald med 90% $(NH_4)_2SO_4$	470	19.000	40,4	97	1,3
Hydroxyapatitfraktion	206	17.300	84,0	89	2,7
DEAE-fraktion	35,8	13.900	388	71	12,5
Sephadex®-G-100 fraktion 139	0,45	,666	1480	3,4	47,7

a) Mængden af protein blev bestemt ved metoden ifølge Lowry et al., (Lowry, O.H., Rosebrough,

N.V., Farr., A.L. og Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193 1951) 265).

b) VAC-Enhederne blev bestemt ved det i Eksempel 1 beskrevne éttrinskoagulationsforsøg på en række prøvefortyndinger. Den fortynding, der forlænger koagulationstiden for kontrolprøven (65 sek.) til 100 sekunder, indeholder ifølge definitionen én VAC-enhed.

T A B E L B

Den metalafhængige binding af VAC til negativt ladede phospholipid-liposomer.

Kation (10 mM)	t_c sekunder a) supernatant	EDTA c)
Kontrol (ingen liposom)	180	N.D.d)
Kontrol (ingen kation)	174	64,8
$CaCl_2$	64,2	134
$MgCl_2$	165	N.D.
$MnCl_2$	65,1	N.D.

a) Koagulationstiderne t_c blev bestemt ved det i Eksempel 1 beskrevne éttrins-koagulationsforsøg.

b) 50 µl Forrådsopløsning af phospholipid-liposom (PS/PC, 50/50 mol/mp: 1 mM), 50 µl VAC (250 µg/ml, S.A. = 700 enheder/mg og 100 µl TBS, der indeholdt 5% glycerol og den anførte kation, pH 7,5, blev blandet ved stuetemperatur og centrifugeret 15 minutter ved 15.000 xg, 25 µl af den vundne supernatant blev fortyndet med TBS til 175 µl og derefter prøvet ved éttrins-koagulationsforsøget. Restmængden af supernatanten blev analyseret med SDS-PAGE (Fig. 4).

c) Det vundne liposom-bundfald blev pâny suspenderet i 150 µl 5% glycerol-holdig TBS og 10 mM EDTA, pH 7,5. Suspensionen blev centrifugeret 15 minutter ved 15.000 xg. VAC-Aktiviteten af supernatanten blev analyseret som beskrevet under b).

d) N.D. = ikke bestemt.

T A B E L C

Indvirkning af VAC på den amidolytiske aktivitet af faktor X_a og faktor II_a.

	$A_{405}/min.10^3$ a)	
	-	+
X_a	110,5	110,5
X_a, AT-III	80,0	81,5
X_a, Heparin	110,5	109,0
X_a, Heparin, AT-III	47,5	N.D.[b]
II_a	7,5	7,5
II_a, AT-III	5,4	5,6
II_a, Heparin	7,5	7,1
II_a, Heparin, AT-III	0,56	N.D.

a) Den amidolytiske aktivitet blev målt på følgende måde:
Faktor X_a eller faktor II_a blev fortyndet med de nævnte midler i TBSA. Reaktionsblandingen blev med en med teflon belagt omrører omrørt i en formstofkuvette, der ved hjælp af en termostat holdtes ved 37°C. Efter 10 minutter blev en prøve på 100 µl (X_a) eller 50 µl (II_a) udtaget fra kuvetten. Denne prøve blev indført i en anden formstofkuvette, der med en termostat holdtes ved 37°C, og som indeholdt 800 µl TBSE og henholdsvis 100 µl S 2337 (2mM) eller 900 µl S 2338 (5 mM). Absorptionsændringen ved 405 nM

blev målt med et Kontron Spectrophotometer Uvikon® 810, der med en termostat holdtes ved 37°C. Slutkoncentrationen af de forskellige midler i reaktionsblandingen var som følger: 18,7 nM faktor X_a, 1,5 nM faktor II_a, 18,7 nM AT-III, 1 enhed/ml heparin og 10,7 µg/ml VAC (S.A. 1300 enheder/mg).

Eksempel 4

Det ved venepunktion opsamlede humane blod blev samlet i en trinatriumcitratopløsning (slutkoncentration ved ca. 13 mM citrat) og centrifugeret 10 minutter ved 2000 xg og stuetemperatur. Det således vundne plasma blev pånyt centrifugeret 15 minutter ved 10.000 xg for at vinde blodpladefrit plasma (PFP). Som standard tjenende PFP blev fremstillet ved blanding af plasma fra forskellige raske donorer.

Humane navlestrenge vandtes 15 minutter efter fødslen. Arterierne blev straks skyllet med iskold TBS-puffer, derefter fripræpareret fra "Jelly von Warton" (Warton'sk gel) og homogeniseret i TBS under anvendelse af en homogenisator af typen Braun® MX32. Et 10% homogenisat (vægt/vol.) blev derefter fraktioneret.

Fraktioneringen af supernatanten fra det ved 10.000 xg centrifugerede homogenisat med Sephadex® G-100 gav en reproducerbar specifik elueringsprofil (se Fig. 7).

De fraktioner, der opvirkede koagulationssystemet ved måling i MPTT, er vist i Fig. 7. En prokoagulantaktivitet eluerede med forløbet. Denne aktivitet kunne i MPTT kun påvises i nærværelse af faktor VII ved forsøg, ved hvilke der anvendtes humant kongenitalfaktor-VII-deficient plasma. Denne prokoagulant må derfor betragtes som væv-thromboplastin.

Bestemte fraktioner havde en udpræget antikoagulationsaktivitet. Disse fraktioner blev samlet og ren-

set yderligere ved DEAE-Sephacel®-chromatografi (Fig. 8A). Antikoagulanten var blevet bundet til DEAE- Sephacel'et ved en saltkoncentration på 50 mM NaCl og 50 mM Tris/HCl, pH 7,9. Eluering af aktiviteten med en lineær NaCl-gradient ved pH 7,9 blev gennemført med 150-160 mM NaCl. De DEAE-fraktioner, der indeholdt antikoagulant-aktiviteten, blev samlet og underkastet en gelfiltrering med Sephadex® G-75. Søjlen (1,5 x 50 cm) blev ækvilibreret med TBS. Aktiviteten optrådte i fraktionerne med en molekylvægt på 30.000-60.000 Dalton. MPTT anvendtes som kvantitativ prøve til bestemmelse af mængden af antikoagulant-aktivitet (Fig. 9). Én enhed antikoagulant-aktivitet blev defineret som den mængde, der forlænger koagulationstiden i MPTT, ved anvendelse af HTP som udløser for koagulationen (slut-koncentration 95 µg protein/ml), fra kontrolværdien på 65 sekunder til 100 sekunder. Ved hælp af denne prøve blev det udregnet, at der ud fra 10 g vådt, arterielt væv blev vundet ca. 2 mg protein med på det nærmeste 1200 enheder antikoagulant-aktivitet.

Modificeret prothrombin-tid-forsøg

Det modificerede prothrombin-tid-forsøg (MPTT) blev gennemført på følgende måde. I en kuvette af siliconiseret glas blev 50 µl PFP ved en temperatur på 37°C omrørt med 150 µl TBS, 25 µl af en norm-HTP-fortynding og 25 µl TBS (kontrol) eller med 25 µl af en fraktion af det homogeniserede arteriemateriale. Efter en inkubation på 3 minutter blev koagulationen udløst ved tilsætning af 250 µl Ca^{2+}-puffer (80 mM NaCl, 20 mM $CaCl_2$ og 10 mM Tris/HCl, pH 7,9). Fibrindannelsen blev registreret med et "Payton Dual Aggregation Module" (13). Hvis der i nævnte MPTT anvendtes faktor X_a til udløsning af koagulationen, blev HTP udeladt, og 25 µl renset faktor blev sammen med mængden på 250 µl Ca^{2+}-puffer sat til det fortyndede PFP.

Modificeret thrombin-tid-forsøg

Det modificerede thrombin-tid-forsøg (MTT) blev udført på samme måde som beskrevet ovenfor med den forskel, at X_a-præparatet blev erstattet med 25 µl renset thrombin.

Proteiner

Protease type I og trypsin (EC 3.4.2.1.4) stammede fra Sigma. HTP blev fremstillet ved den af Van Dam-Mieras et al., (14) beskrevne metode ud fra menneskehjerner. Faktor X_a, prothrombin og thrombin blev renset fra citreret kvægblod ved den af Rosing et al., (2) beskrevne metode. Faktor V vandtes ved den af Lindhout et al. (13) beskrevne metode ud fra kvægblod. Faktor V_a vandtes ved inkubation af faktor V med thrombin (15). Prothrombin-koncentrationen blev beregnet ud fra M_r = 72.000 og $A_{280}^{1\%}$ = 15,5 (16). Faktor V-koncentrationen blev beregnet ud fra M_r 330.000 og $A_{280}^{1\%}$ = 9,6 (17).

Faktor X_a- og thrombin-koncentrationerne blev bestemt ved titrering af de aktive steder (2). De øvrige proteinkoncentrationer blev bestemt som beskrevet af Lowry et al. (18).

Fremstilling af phospholipider og phospholipid-vesikel

Ole_2Gro-P-Cho og Ole_2Gro-P-Ser blev fremstillet ved metoden ifølge Rosing et al. (2). Ved hjælp af ultralyd blev enkelte dobbeltlagsvesikler fremstillet ud fra Ole_2Gro-P-Ser/Ole_2Gro-P-Cho (molforhold 20:80) (2).

Phospholipid-koncentrationerne blev bestemt ved phosphat-analyse ifølge Böttcher et al. (19).

Måling af Prothrombin-aktivering

Tidsforløbet for prothrombin-aktiveringen blev undersøgt ved forskellige koncentrationer af antikoagulationsmidlet. Blandingerne af (X_a,ca^{2+}), (X_a,Phospholipid, Ca^{2+}) eller (X_a,V_a,phospholipid,Ca^{2+}) blev sammen med forskellige mængder af antikoagulationsmidlet ved 37°C i 50 mM Tris/HCl, 175 mM NaCl, 0,5 mg/ml humanserum-albumin omrørt ved en pH-værdi på 7,9. Efter tre minutter blev reaktionen udløst ved tilsætning af prothrombin. Prøver på 25 µl blev med forskellige tidsmæssige afstande indført i en kuvette (termostateret ved 37°C), der indeholdt TBS, 2 mM EDTA og 0,23 mM S2238 (det totale volumen androg til slut 1 ml). Ud fra absorptionsændringen ved 405 nm, målt med et Kontron Spectrophotometer Uvikon® 810, og en målekurve, der var tilvejebragt på grundlag af kendte mængder af renset thrombin, blev mængden af dannet thrombin ved forskellige antikoagulationsmiddel-koncentrationer beregnet. Phospholipidet blev tilsat som vesikel af Ole_2Gro-P-Ser og Ole_2Gro-P-Cho med et molforhold på 20:80.

Karakterisering

Forskellige fraktioner fra chromatografi over G-75 blev prøvet i MPTT og analyseret med SDS-PAGE. Resultaterne (se Fig. 10) tyder på, at antikoagulationsmidlet har en molekylvægt på ca. 32.000. Relationen mellem antikoagulant-aktiviteten og 32K-båndet blev bekræftet, idet polyacrylamidgelen blev ituskåret og proteinerne derefter elueret fra strimlen med TBS, der indeholdt 0,5 mg/ml kvægserumalbumin. En antikoagulantaktivitet foreligger kun i den strimmel, der kan tildeles 32K-båndet. Yderligere viste det sig, at denne aktivitet er termolabil ved 56°C og udviser en lignende dosis/virkning i MPTT som udgangsmaterialet. De G-75-fraktioner, der viste de højeste antikoagulationsaktiviteter, blev samlet og anvendt til den videre karak-

terisering. Inkubationen af antikoagulationsmidlet ved 56°C viser en hurtig formindskelse af aktiviteten, indtil der efter 2 minutter ikke længere kan måles nogen aktivitet (se Fig. 16). Antikoagulationsmidlet mister sin aktivitet fuldstændigt inden for 2 timer ved inkubation ved 37°C med protease type I, medens trypsin knap inaktivere antikoagulationsmidlet inden for en inkubationsperiode på 3 timer (se Fig. 11). De ved disse forsøg anvendte koncentrationer af protease type I og trypsin inaktiverer 2,5 nM thrombin i løbet af 15 minutter. De mængder af protease type I og trypsin, der blev overført fra reaktionsblandingerne til MPTT, viste ingen indvirkning på kontrolkoagulationstiden.

MPPT blev forlænget både i nærværelse af anti-koagulationsmidlet (se Fig. 12) og ved aktiveringen med HTP og ved udløsning med faktor X_a. En af thrombin induceret koagulation hæmmes derimod ikke.

På baggrund af disse erfaringer blev effekten af antikoagulationsmidlet på omsætningen af prothrombin til thrombin ved hjælp af faktor X_a, faktor V_a, phospholipid og Ca^{2+} undersøgt. Under de nævnte forsøgsbetingelser blev thrombindannelsen hæmmet på dosis-afhængig måde af antikoagulationsmidlet (se Fig. 13A). Aktiveringen af prothrombinet med faktor X_a, phospholipid og Ca^{2+} i fravær af faktor V_a kan ligeledes hæmmes af antikoagulationsmidlet (se Fig. 13B). Denne inhibition observeredes derimod ikke, når aktiveringen foregår i fravær af phospholipid (se Fig. 13C).

Eksempel 5

Polyklonale antistoffer over for VAC

Polyklonale antistoffer over for kvæg-VAC blev stimuleret i kaniner. Kvæg-VAC, der var renset ved den ovenfor beskrevne metode, blev blandet med lige så mange dele af komplet Freund's Adjuvant. Blandingen blev

injiceret subcutant på kaniner. Efter 4 uger blev der foretaget en opfriskning, idet kaninen pâny fik renset kvæg-VAC injiceret s.c.. Denne stimulations-injektion blev gentaget to gange med et mellemrum på 2 uger. 10 dage efter den sidste stimulationsinjektion blev kaninen blodtappet, og blodet blev bragt til koagulation for at vinde serum'et.

Immunoglobuliner (Ig) blev isoleret fra serum'et efter følgende skema:

a) Serum'et blev opvarmet 30 minutter ved 56°C.

b) Derefter blev serum'et overført til DEAE-Sephacel®, der var ækvilibreret med 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,2.

c) Det ikke-bundne protein blev fældet med $(NH_4)_2SO_4$ ved 50%'s mætning med $(NH_4)_2SO_4$.

d) De udfældede proteiner blev pelleteret ved centrifugering, den vundne pellet blev gensuspenderet i 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,9 og dialyseret grundigt mod den samme puffer.

e) Den vundne proteinblanding indeholdt Ig'et.

Ud fra kvæg-aorta, kvæg-lunge, rotte- og hesteaorta og humane navlestrengsarterier blev der ved den beskrevne fremgangsmåde isoleret proteinfraktioner, der viste VAC-aktivitet. Proteinerne blev fraskilt ved elektroforese på en polyacrylamidgel i nærværelse af dodecylsulfat og under ikke-reducerende betingelser. Efter endt elektroforese blev proteinerne overført fra gelen til nitrocellulosestrimler, som beskrevet af Towbin et al. (21). Strimlerne blev inkuberet med anti-Vac-Ig og efter intensiv vask inkuberet med gede-anti-kanin-Ig, hvortil der var koblet peberrodsperoxidase. Dette blev gjort synligt med diamin-benzidintetrahydrochlorid, et substrat for peroxidasen. Efter afslutning af den nævnte fremgangsmåde viste et brunt bånd på nitrocellulosestrimlen tilstedeværelse af et gede-kanin-Ig. Yderligere forelå på denne plet anti-VAC-Ig og proteiner, hvortil anti-VAC-Ig'et binder.

Immunoblotter for proteinerne med VAC-aktivitet, isoleret fra kvæg-aorta, kvæg-lunge, rotte- og heste-aorta og humane navlestrengarterier, er vist i Fig. 14.

Disse resultater viser følgende: Ved anvendelse af det beskrevne isoleringsskema kan der vindes en protein-fraktion med VAC-aktivitet ud fra kvæg-aorter, kvæg-lunger, rotte- og heste-aorter og humane navlestrengarterier. Endvidere indeholder de isolerede proteinfraktioner med VAC-aktivitet proteiner med molekylvægte på ±34.000 og ±70.000, der reagerer med anti-VAC-Ig, der er stimuleret mod renset kvæg-VAC i kanin.

Eksempel 6

Rensningstrin for VAC under anvendelse af phospholipid-vesikel med stort volumen

Phospholipid-vesikel med stort volumen (LVV), sammensat af 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserin (PS) og 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (PC) blev fremstillet som beskrevet af P. van de Waart et al. (20). Til rensningstrinnet blev der anvendt LVV, der indeholdt PS/PC (molforhold 20:80). Der kan imidlertid også anvendes andre molforhold med den begrænsning, at der skal foreligge negativt ladede phospholipider. Ligeledes kan kædelængder for fedtsyrerne i phospholipiderne varieres.

Fremgangsmåde:

LVV, ± 1mM phospholipid i 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,9, blandes med samme volumen af en protein-fraktion, der indeholder VAC-aktivitet. Proteinerne er opløst i 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, pH 7,9. Blandingen holdes 5 minutter ved stuetemperatur. Derefter centrifugeres blandingen 30 minutter ved 20.000 xg. Den vundne pellet gensuspenderes i 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, pH 7,9 og centrifugeres pany. Den vundne pellet gensuspenderes derefter i 50 mM Tris/

HCl, 100 mM NaCl, 10 mM ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA), pH 7,9, og centrifugeres igen. Den vundne supernatant indeholder VAC-aktiviteten. Den ovenfor beskrevne metode er et effektivt rensningstrin ved fremgangsmåden til udvinding af renset VAC.

Figurbeskrivelse

Fig. 1: Gelfiltrering af VAC på Sephadex® G-100.

Søjlen (3 x 80 cm) blev fremstillet med en trykhøjde på 60 cm og ækvilibreret med 500 mM NaCl og 20 mM Tris/HCl, pH 7,5. De VAC-holdige fraktioner, der vandtes efter DEAE-chromatografi, blev koncentreret til 2 ml og derefter overført til Sephadex® G-100. Trykhøjden på 60 cm blev opretholdt. Det tomme volumen var 245 ml (fraktion 70). Herefter blev fraktionerne på 2 ml samlet. Fraktionerne blev dialyseret mod 10% glycerolholdig TBS, hvorefter de blev prøvet for VAC-aktivitet ved éttrins-koagulationsforsøget, som beskrevet i Eksempel 1. Koagulationstiderne fandtes ved fortyndinger på 1:10 af G-100-fraktionerne med TBS. Koagulationstiden i fravær af VAC var 65 sekunder.

Fig. 2: Analytisk SDS-PAGE af VAC.

SDS-PAGE med geler, der indeholdt 10 vægt% acrylamid, 0,27 vægt% N,N^3-methylenbisacrylamid og 0,1% SDS, blev udført ifølge Laemli (Laemli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685). Betydningen af tallene på x-aksen er følgende:

1) Materialer med normmolekylvægt, hos hvilke disulfidbindingerne er reduceret,
2) 25 µg reduceret VAC.
3) 25 µg ikke-reduceret VAC.

Gelen blev farvet med Coomassie Blue og affarvet på den i Eksempel 1 beskrevne måde.

Fig. 3: Bestemmelse af det isoelektriske pH for VAC.

Elektrofokuseringen udførtes med PAG-plader indenfor pH-området 3,5-9,5 (jfr. Eksempel 1). 200 µg humant H_b[1] og 20 µg VAC blev bragt på gelen, hvorefter pH-gradienten i gelen var dannet. Humant H_b tjente som reference med det kendte isoelektriske punkt ved pH 6,8. Før gelen blev udsat for farvning med Coomassie Blue, blev gelen fikseret i 30 minutter med 0,7 M trichloreddikesyre.

Fig. 4: Analyse af bindingen af VAC til negativt ladede phospholipid-liposomer med SDA-PAGE.

SDS-PAGE blev udført ifølge Laemli (Laemli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685) på de samme småplader som beskrevet i Fig. 2. De analyserede prøver vandtes fra bindingsforsøgene, som nævnt i forklaringen til Tabel B. Betydningen af tallene på x-aksen er følgende:

1) Materialer med norm-molekylvægt, hos hvilke disulfidbindingerne er reduceret,
2) supernatant vundet efter centrifugering af et VAC-præparat i fravær af liposomer,
3) supernatant vundet efter centrifugering af VAC i nærværelse af liposomer,
4) supernatant vundet efter centrifugering af VAC i nærværelse af liposomer og Ca^{++}, og
5) supernatant vundet efter centrifugering af liposom-bundfaldet fra 4), der påny var suspenderet i 10 mM EDTA-holdig TBS.

Fig. 5: Indvirkning af koncentrationen af VAC på inhibitionen (%) af thrombin-dannelsen.

De nævnte koncentrationer af VAC er de til slut i forsøgssystemerne foreliggende koncentrationer. Thrombin-dannelsen måltes ved 1 µM prothrombin, 10 nM faktor X_a og 0,5 M (▲-▲) eller 5 M (·-·) phospholipid-membran (PC/PS, 4:1, mol/mol) i 10 mM $CaCl_2$-holdig TBSA. Reak-

tionsblandingen blev sammen med de nævnte mængder af VAC (S.A. 1300 enheder/mg) omrørt 3 minutter ved 37°C uden prothrombin. Ved tilsætning af prothrombin til blandingen blev thrombin-dannelsen udløst som i Eksempel 1, og hastigheden for dannelsen måltes. Hastigheden af thrombin-dannelsen i fravær af VAC var henholdsvis på 3,3 nM II_a/min. (▲-▲) og 10,9 nM II_a/min (·--·).

Fig. 6: Indvirkning af phospholipid-koncentrationen på inhibitionen (%) af thrombin-dannelsen med VAC.

Thrombin-dannelsen måltes ved 1 µM prothrombin, 10 nM faktor X_a, 10,7 µg/ml VAC (S.A. 1300 enheder/mg) og forskellige koncentrationer af phospholipid-membran (PC/PS, 4:1, mol/mol) i TBSA. Faktor X_a, VAC og phospholipid blev omrørt 3 minutter ved 37°C i TBSA. Thrombin-dannelsen blev udløst ved tilsætning af prothrombin til reaktionsblandingen. Hastigheden for thrombin-dannelsen blev målt, som beskrevet i Eksempel 1. Den procentuelle inhibition af thrombin-dannelsen (·--·) måltes for hver phospholipid-koncentration med den tilsvarende hastighed for thrombin-dannelse ved fravær af VAC (▲-▲).

Fig. 7: Gelfiltrering af en 10.000 xg supernatant fra et navlestrengarterie-homogenat på Sephadex® G-100.

2 ml 10.000 xg Supernatant blev overført til en Sephadex® G-100-søjle (1,5 x 80 cm), der var præ-ækvilibreret med TBS. Søjlen blev elueret med TBS. Aliquoter af de vundne fraktioner blev testet i MPTT. Bestemte fraktioner (▭) viser en prokoagulant-aktivitet og udløste koagulationen i MPTT, uden tilsætning af HTP, faktor X_a eller thrombin. Andre fraktioner (▭) forlænger koagulationstiden i MPTT ved anvendelse af HTP som udløser for koagulationen. Disse fraktioner blev samlet og viderefraktioneret.

Fig. 8: Chromatografi af antikoagulanterne på DEAE-Sephacel® (A) og Sephadex® G-75 (B).

Pool'en fra Sephadex® G-100-søjlen, indeholdende antikoagulanten, blev overført til DEAE-Sephacel. Eluering blev foretaget med 200 ml af en lineær gradient på 50 mM - 300 mM NaCl (---). Fraktioner (4 ml) blev opsamlet og undersøgt for A_{280} (-) og antikoagulant-aktivitet i MPTT under anvendelse af HTP (slutkoncentration 95 µg protein/ml) som starter for koagulationen (●). Fraktionerne med antikoagulant-aktivitet blev samlet, koncentreret og derefter overført til Sephadex G-75 (B). Fraktioner på 2 ml blev opsamlet og undersøgt for A_{280} (-) og antikoagulant-aktivitet (•). V_o kendetegner søjlens tomvolumen.

Fig. 9: Dosis-afhængighed for antikoagulanten i MPTT.

Varierende mængder af antikoagulant blev sat til MPTT. Koagulation blev udløst med HTP (slutkoncentration 95 µg protein/ml). Kontrol-koagulationstiden var 65 sekunder.

Fig. 10: Gel-elektroforese af forskellige fraktioner af G-75-eluatet.

En bestemt mængde af forskellige fraktioner af G-75-eluatet blev, som beskrevet, underkastet en gel-elektroforese. Gelerne blev, som beskrevet af Merril et al. (12), farvet med sølv (12). Spalte 1: reduceret lav-molekylær standard; spalte 2-6; ikke-reducerede aliquoter af G-75-fraktioner med numrene 35, 39, 41, 43 og 50.

Fig. 11: Indvirkning af proteolytiske enzymer på aktiviteten af antikoagulanten.

Antikoagulanten blev ved 37°C inkuberet sammen med protease type I (■ , slutkoncentration 0,11 enheder/ml), trypsin (▲ , slutkoncentration 88 BAEE enheder/ml

og uden proteolytiske enzymer (•). Til de angivne tider blev der fra reaktionsblandingen udtaget 5 µl, indeholdende 6 µg antikoagulant-protein, og sat til MPTT. Koagulationen blev udløst med HTP (slutkoncentration 18 µg protein/ml). Kontrolkoagulationstiden var på 110 sekunder. De angivne enheder for de proteolytiske enzymer er udledt af fabrikantens angivelser.

Fig. 12: Indvirkningen af den vasculære antikoagulant på koagulationstiden, der i M(P)TT blev induceret enten med HTP, faktor X_a eller thrombin.

Koncentrationen af koagulationsstarteren (HTP 18 µg protein/ml, 1,5 nM faktor X_a eller 0,4 nM thrombin) blev valgt således, at kontrolkoagulationstiden var på ca. 110 sekunder (åbne bjælker). Ved anvendelse af faktor X_a blev phospholipid-vesikler (slutkoncentration 10µM), der var sammensat af Ole_2Gro-P-Ser/Ole_2Gro-P-Cho (molforhold 20:80), sat til reaktionsblandingen. Koagulationstider, der fandtes med de anførte midler i nærværelse af 3,5 µg antikoagulant-protein, er vist som schatterede bjælker.

Fig. 13: Indvirkning af antikoagulanten på prothrombinaktiveringen med X_a, V_a, phospholipid, Ca^{2+}), (X_a, phospholipid, Ca^{2+}) og (X_a,Ca^{2+}).

Reaktionsblandingerne indeholdt: (A) 1 µM Prothrombin, 0,3 nM X_a, 0,6 nM V_a, 0,5 µM phospholipid og 10 mM $CaCl_2$ med 12,0 µg/ml antikoagulant (■), 4,8 µgg antikoagulant (▲) og ingen antikoagulant (•). (B) 1 µM Prothrombin, 10 nM X_a, 0,5 µM phospholipid og 10 mM $CaCl_2$ med 2,4 µg/ml antikoagulant (■), 0,48 µg/ml antikoagulant (▲) og ingen antikoagulant (•).

Til de angivne tider blev prøver udtaget, og thrombinet blev bestemt, som beskrevet.

Fig. 14: Immunoblotter.

Blotterne blev opnået som ovenfor beskrevet.

Spalte 1: Protein-fraktion med VAC-aktivitet, isoleret fra kvæg-aorta.

Spalte 2: Protein-fraktion med VAC-aktivitet, isoleret fra kvæg-aorta.

Spalte 3: Protein-fraktion med VAC-aktivitet, isoleret fra kvæg-lunge.

Spalte 4: Protein-fraktion med VAC-aktivitet, isoleret fra humane navlestrengarterier.

Spalte 5: Protein-fraktion med VAC-aktivitet, isoleret fra rotte-aorta.

Spalte 6: Protein-fraktion med VAC-aktivitet, isoleret fra heste-aorta.

Fig. 15: Gel-elektroforese (A) og antikoagulationsaktivitet (B) for de forskellige fraktioner af eluatet fra G-75.

Bestemte mængder af de forskellige fraktioner af eluatet fra G-75 blev udsat for gel-elektroforese, som beskrevet i det foregående. Båndene blev farvet med sølv ved metoden ifølge Merrill, C.R., Goldman, D., & Van Keuren, M.L. (1982). Electrophoresis 3, 17-23. Elektroforese-bane 1: Normmateriale med en lav molekylvægt; Elektroforese-baner 2-6: ikke-reducerede ens mængder af G-75-fraktionerne, ved stigende elueringvoluminer. Bestemte mængder af G-75-fraktionerne, der var analyseret med gel-elektroforesen, blev undersøgt i MPTT (se ovenstående beskrivelse) under anvendelse af HTP til udløsning af koagulationen. Kontrol-koagulationstiden er vist ved den åbne bjælke. Tallene under de skraverede bjælker svarer til tallene for elektroforesebanerne i Fig. 15A.

Fig. 16: Varme-inaktivering af det vasculære antikoagulationsmiddel.

Antikoagulationsmidlet blev inkuberet ved 56°C, og efter forskellige inkubationstider blev der udtaget en prøve på 5 µl, der indeholdt 3,6 µg protein, hvilken prøve straks blev afkølet med is og derefter undersøgt i MPTT under anvendelse af HPT som koagulationsudløser. Koagulationstiden for kontrolprøven var 110 sekunder.

Litteratur

1. Jackson, C.M. & Nemerson, Y (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 765-811

2. Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemslag, J.W.P., Zwaal, R.F.A. & Hemker, H.C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 274-283

3. Dieijen, G. van, Tans, G., Rosing, J. & Hemker, H.C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3433-3442

4. Rosenberg, R.D. & Rosenberg, J.S. (1984) J. Clin Invest. 74, 1-6

5. Kurachi, K., Fujikawa, K., Schmer, G. & Davie, E.W. (1976) Biochemistry 15, 373-377

6. Ellis, V., Scully, M., Macgregor, I. & Kakkar, V. (1982) Biochim. Biophys. Acta 701, 24-31

7. Stenflo, J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 355-363

8. Walker, F.J. Sexton, P.W. & Esmon, C.T. (1979) Biochim. Biophys. Acta 571, 333-342

9. Vehar, G.A. & Davie, E.W. (1980) Biochemistry 19, 401-409

10. Nossel, H.L. (1981) Nature (Lond.) 291, 165-167

11. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685

12. Merril, C.R. Goldman, D. & Keuren, M.L. van (1982) Electrophoresis 3, 17-23

13. Hornstra, G. (1981) Phil. Trans. R. Soc. Lond B 294, 355-371

14. Dam-Mieras, M.C.E. van, Muller, A.D., Dieijen, G. van &Hemker, H.C. (1984) Methods of Enzymatic Analysis, vol. 5, pp. 352-365, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, F.R.G.

15. Lindhout, T., Govers-Riemslag, J.G., Waart, P. van de, Hemker, H.C. & Rosing, F. (1982) Biochemistry 21, 4594-5502

16. Owen, W.G., Esmon, C.T. & Jackson, C.M. (1974) J. Biol. Chem. 249,594-605

17. Nesheim, E.M., Myrmel, K.H., Hibbard, L. & Mann, K.G. (1979) J. Biol. Chem. 254,508-517

18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.V., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265

19. Böttcher, C.J.F., Gent, C.M. van & Pries, C. (1961) Anal. Chim. Acta 24, 203-207

20. Waart, P. van de; Bruls, H., Hemker, H.C.; Lindhout, Th.; Biochemistry (1983), 22, 2427-2432

21. Towbin, H., Staehelin, Th., Gordon, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350 - 4354 (1979).

PATENTKRAV

1. Blodkoagulationshæmmende proteiner, kendetegnet ved, at:

- de kan isoleres fra stærkt vaskulariseret væv,
- de ikke inaktiverer koagulationsfaktorerne,
- de ikke hydrolyserer phospholipiderne,
- de binder reversibelt til negativt ladede phospholipider via de divalente kationer Ca^{2+} og/eller Mn^{2+},
- de er i stand til at fortrænge faktor X_a og prothrombinerne fra en negativt ladet phospholipidoverflade, og
- de hæmmer ikke den biologiske og amidolytiske aktivitet af faktorerne X_a og II_a.

2. Blodkoagulationshæmmende proteiner ifølge krav 1, kendetegnet ved, at de hæmmer den henholdsvis af en vaskulær prokoagulant eller af faktoren X_a inducerede koagulation, men ikke den af thrombin inducerede koagulation.

3. Koagulationshæmmende proteiner ifølge krav 1, kendetegnet ved, at de hæmmer:

- det modificerede prothrombin-tid-forsøg og/eller,
- det modificerede, aktiverede, partielle thromboplastin-tid-forsøg og/eller
- det ikke-modificerede prothrombin-tid-forsøg og/eller
- prothrombin-aktiveringen ved koagulationsfaktor X_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} og/eller
- den interne X-aktivering ved faktor IX_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} og/eller
- prothrombin-aktiviteringen af isolerede, stimu-

lerede blodplader og/eller
- den af karvæggen inducerede koagulation og/eller
- den koagulationsafhængige blodpladeaggregation.

4. Koagulationshæmmende proteiner ifølge krav 1, kendetegnet ved, at
- deres hæmmende virkning afhænger af mængden af phospholipider, og
- den af proteinerne inducerede prothrombin-aktivitetshæmning ved faktor X_a er afhængig af phospholipidkoncentrationen.

5. Koagulationshæmmende proteiner ifølge krav 1, kendetegnet ved, at de udviser en molekylvægt på fra ca. 70 x 10^3, ca. 60 x 10^3, ca. 34 x 10^3 eller ca. 32 x 10^3.

6. Blodkoagulationshæmmende proteiner ifølge krav 1, kendetegnet ved, at de kan isoleres fra arterier.

7. Blodkoagulationshæmmende proteiner ifølge krav 1, kendetegnet ved, at
- de er isoleret fra blodkarvægge fra pattedyr og renset,
- de ikke er glycoproteiner,
- de ikke er phospholipaser,
- de har et isoelektrisk punkt ved pH 4,4-4,6,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende proteiner er termisk labil ved 56°C,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende proteiner i sitreret plasma forbliver stabil i nogle timer ved 37°C,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende proteiner ikke ødelægges fuldstændigt af trypsin og/eller chymotrypsin,
- aktiviteten af de blodkoagulationshæmmende proteiner ikke påvirkes af collagenase og/eller

elastase,

- de over de divalente kationer Ca^{2+} og Mn^{2+} binder med negativt ladede phospholipider, der findes i vesikler, liposomer eller etherosomer,
- de over de divalente kationer Ca^{2+} og Mn^{2+} binder med negativt ladede phospholipider, der er koblet med Spherocil®,
- proteinernes binding til de negativt ladede phospholipider er reversibel og kan ophæves af ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA),
- de hæmmer det modificerede prothrombin-tid-forsøg,
- de hæmmer det modificerede, aktiverede, partielle thromboplastin-tid-forsøg,
- de hæmmer det ikke modificerede prothrombin-tid-forsøg,
- de hæmmer prothrobin-aktiveringen ved koagulationsfaktoren X_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} in vitro,
- de hæmmer den interne X-aktivering ved faktoren IX_a i nærværelse af negativt ladede phospholipider og Ca^{2+} in vitro,
- de hæmmer prothrombin-aktiveringen af isolerede, stimulerede blodplader in vitro,
- de hæmmer koagulationen som induceres af blodkarvæggen in vitro, og
- den af proteinerne inducerede prothrombin-aktiveringshæmning ved faktoren X_a er afhængig af phospholipid-koncentrationen og er mindre ved høje phospholipid-koncentrationer.

8. Blodkoagulationshæmmende proteiner, ifølge et eller flere af de foregående krav.

9. Blodkoagulationshæmmende proteiner hidrørende fra mennesker, ifølge et af de foregående krav.

10. Blodkoagulationshæmmende proteiner hidrørende fra kvæg, ifølge et af de foregående krav.

11. Blodkoagulationshæmmende proteiner hidrørende fra mus, ifølge et af de foregående krav.

12. Blodkoagulationshæmmende proteiner hidrørende fra heste, ifølge et af de foregående krav.

13. Fremgangsmåde til fremstilling af blodkoagulationshæmmende proteiner, k e n d e t e g n e t ved, at blodkarvægge, stærkt vaskulariseret væv eller endothelcellekulturer

a) homogeniseres og centrifugeres differentielt, og supernatanten i vilkårlig rækkefølge udsættes for én eller flere af følgende rensningsbehandlinger:

b) fældning med salt,

c) affinitetschromatografi,

d) ionbytterchromatografi,

e) chromatografi over en molekylsigte,

hvorhos produkterne opnået ifølge trin b), c), d) og e) om ønsket kan dialyseres.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at der gennemføres en yderligere rensning ved hjælp af immunoadsorptionschromatografi.

15. Fremgangsmåde ifølge krav 13 eller 14, k e n d e t e g n e t ved, at proteinerne renses ved hjælp af phospholipidvesikler.

16. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 13-15, k e n d e t e g n e t ved, at der til fældning i trin b) anvendes ammoniumsulfat, til chromatografien i trin c) anvendes hydroxyapatit, til chromatografien i trin d) anvendes DEAE Sephacel®, og til chromatografi i trin e) anvendes Sephadex® G-100 eller G-75.

17. Blodkoagulationsinhiberende protein fremstillet ifølge et vilkårligt af kravene 13-16.

18. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det foruden farmaceutisk indifferente hjælpe- og/eller bærestoffer indeholder en virksom mængde af blodkoagulationshæmmende protein ifølge et vilkårligt af kravene 1-12 og 17.

19. Anvendelse af blodkoagulationshæmmende protein ifølge et vilkårligt af kravene 1-12 og 17 til fremstilling af et antithrombotisk farmaceutisk præparat.

Fig. 1

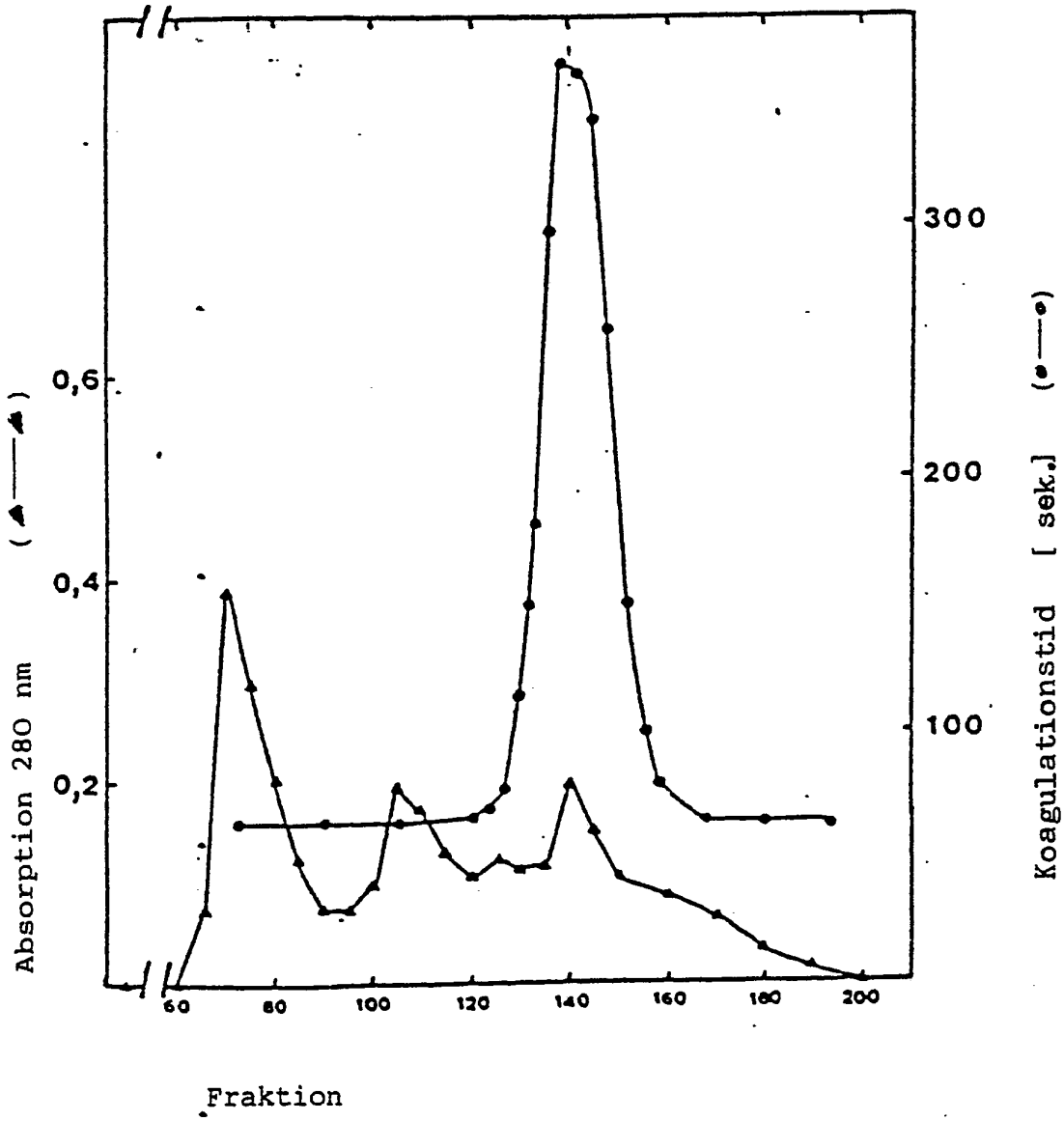

Absorption 280 nm (▲—▲)
0,6
0,4
0,2
300
200
100
Koagulationstid [sek.] (•—•)
60
80
100
120
140
160
180
200
Fraktion

Fig.2

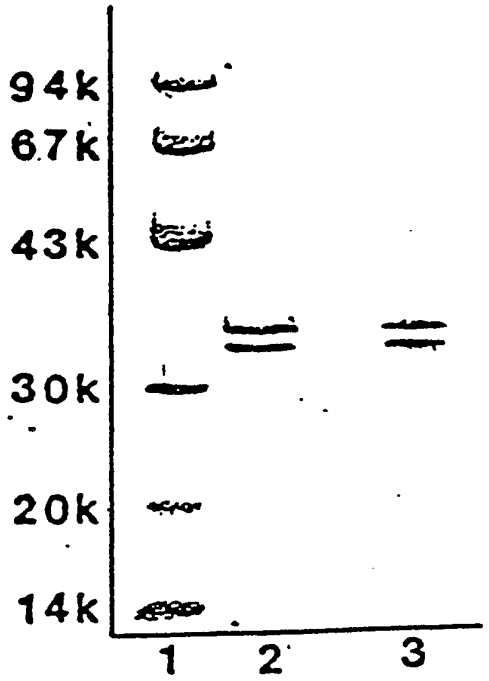

94k
67k
43k
30k
20k
14k
1
2
3

Fig.3

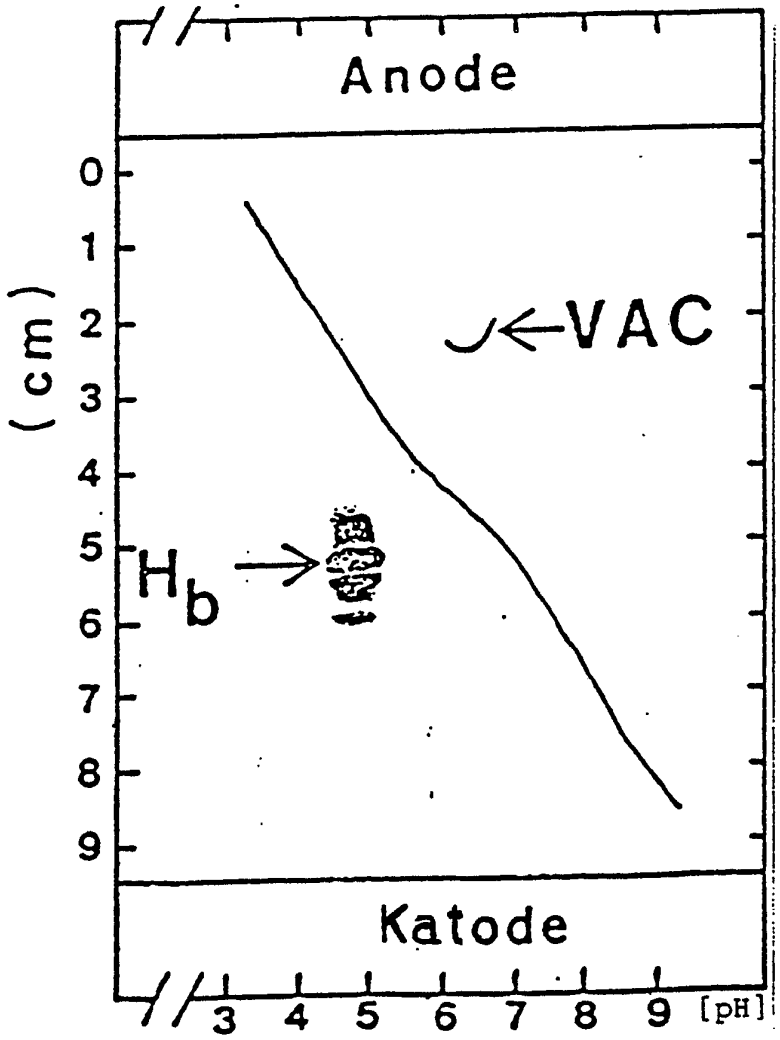

Anode
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
(cm)
VAC
Hb
Katode
3
4
5
6
7
8
9
[pH]

Fig. 4

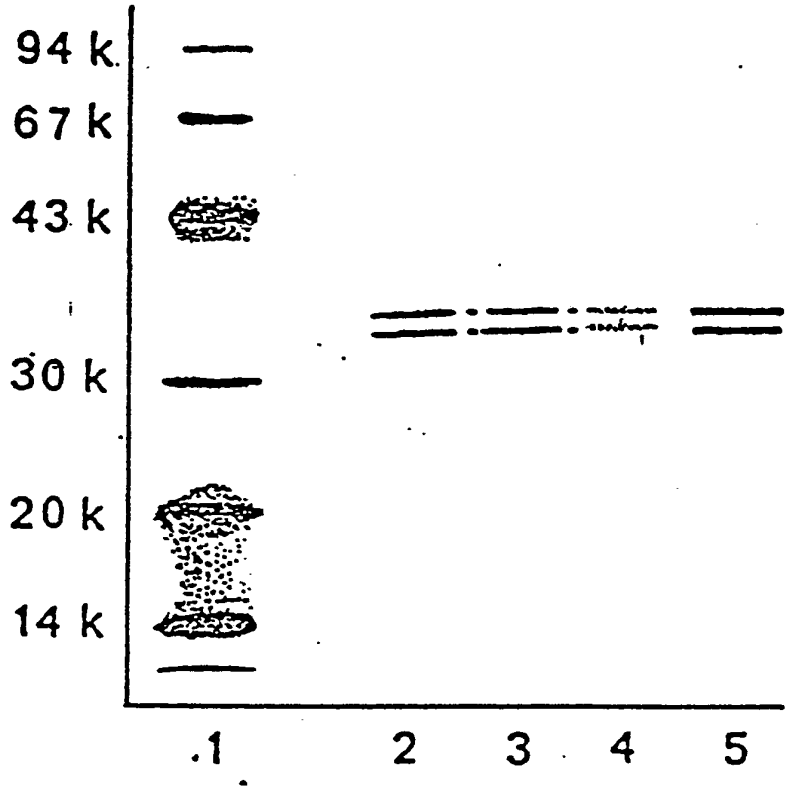

94 k
67 k
43 k
30 k
20 k
14 k
.1
2
3
4
5

Fig. 5

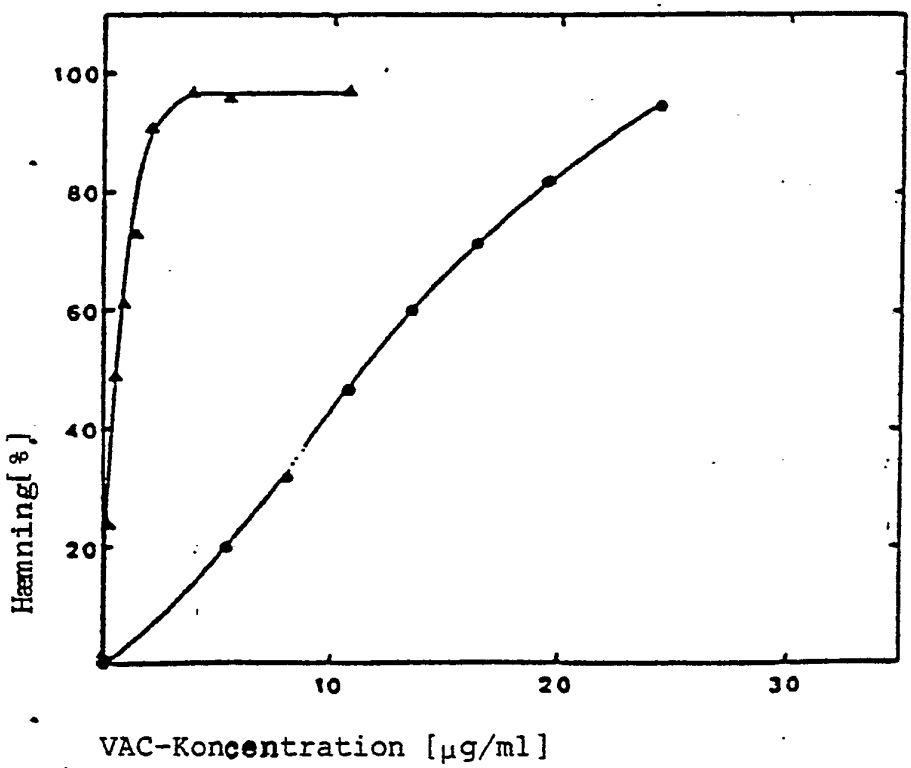

100
80
60
40
20
Hæmning[%]
10
20
30
VAC-Koncentration [µg/ml]

Fig.6

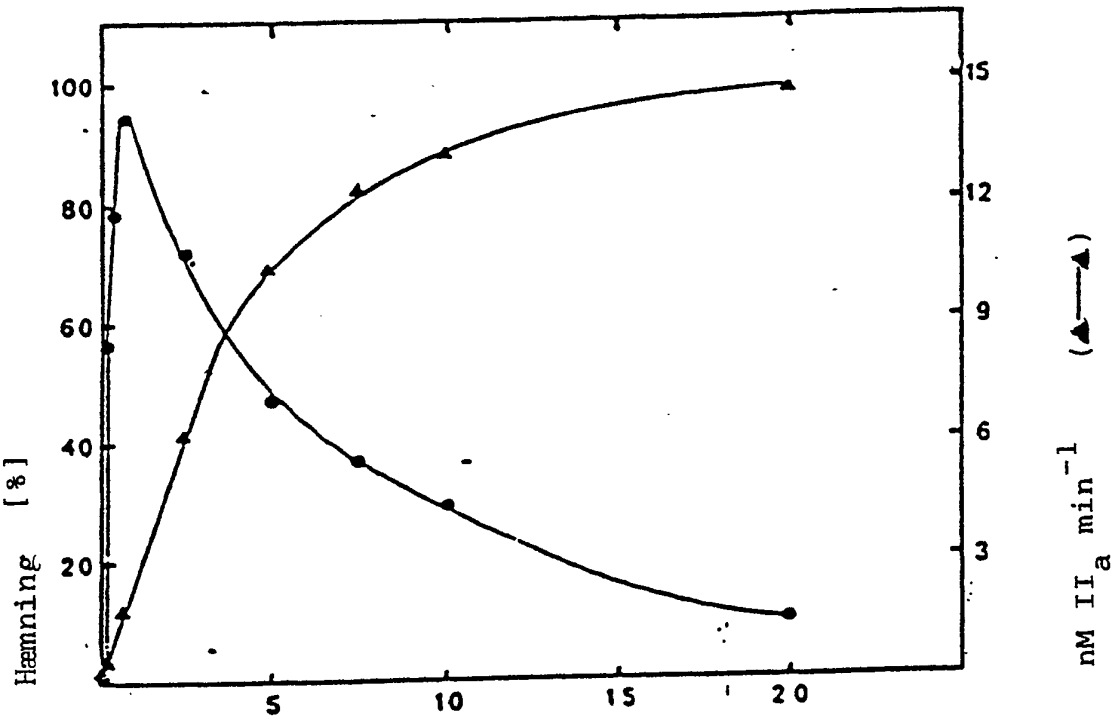

100
80
60
40
20
Hæmning [%]
15
12
9
6
3
nM II_a min^{-1} (▲—▲)
5
10
15
20
Phospholipid [μM]

Fig. 7

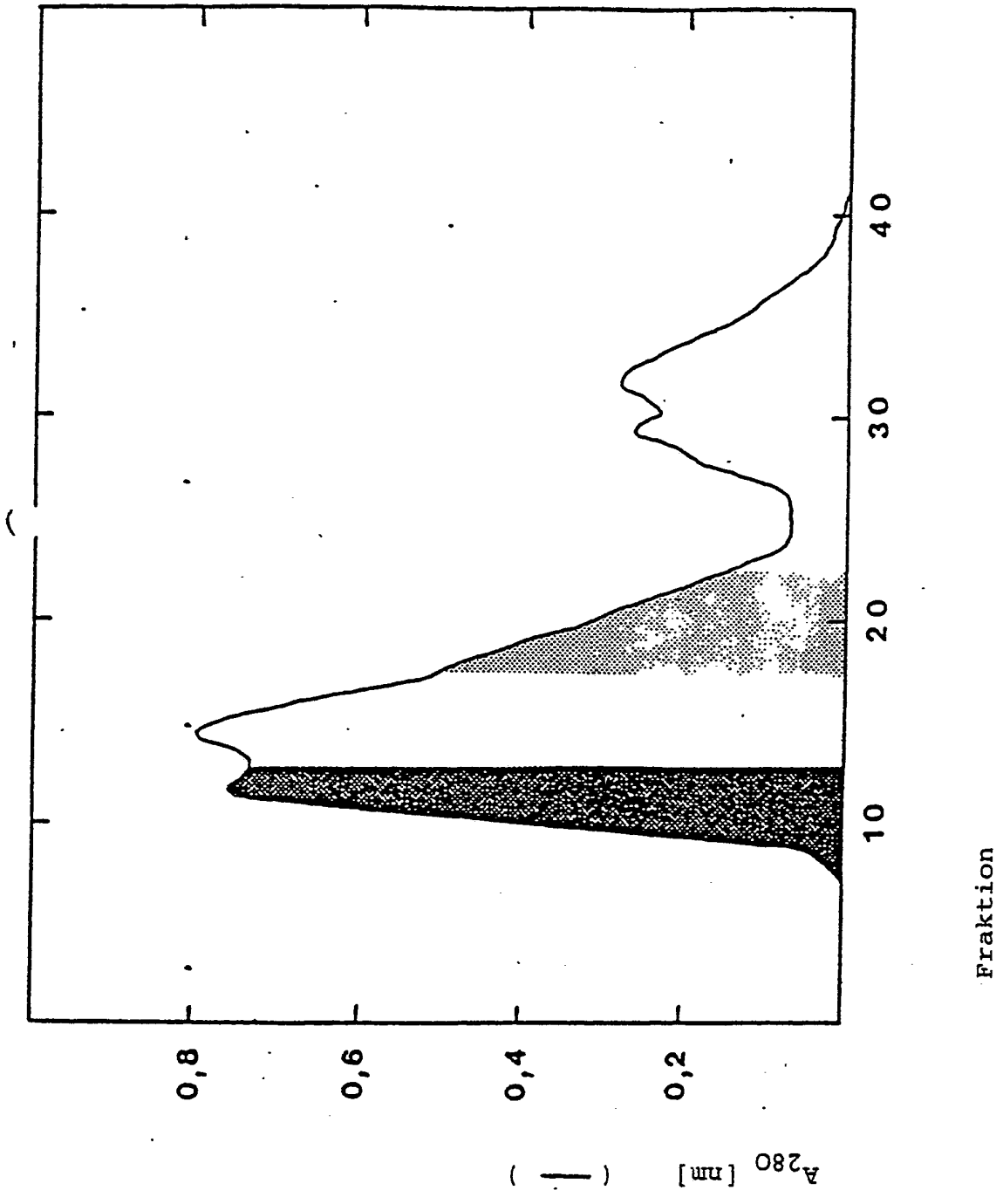


Fig. 8

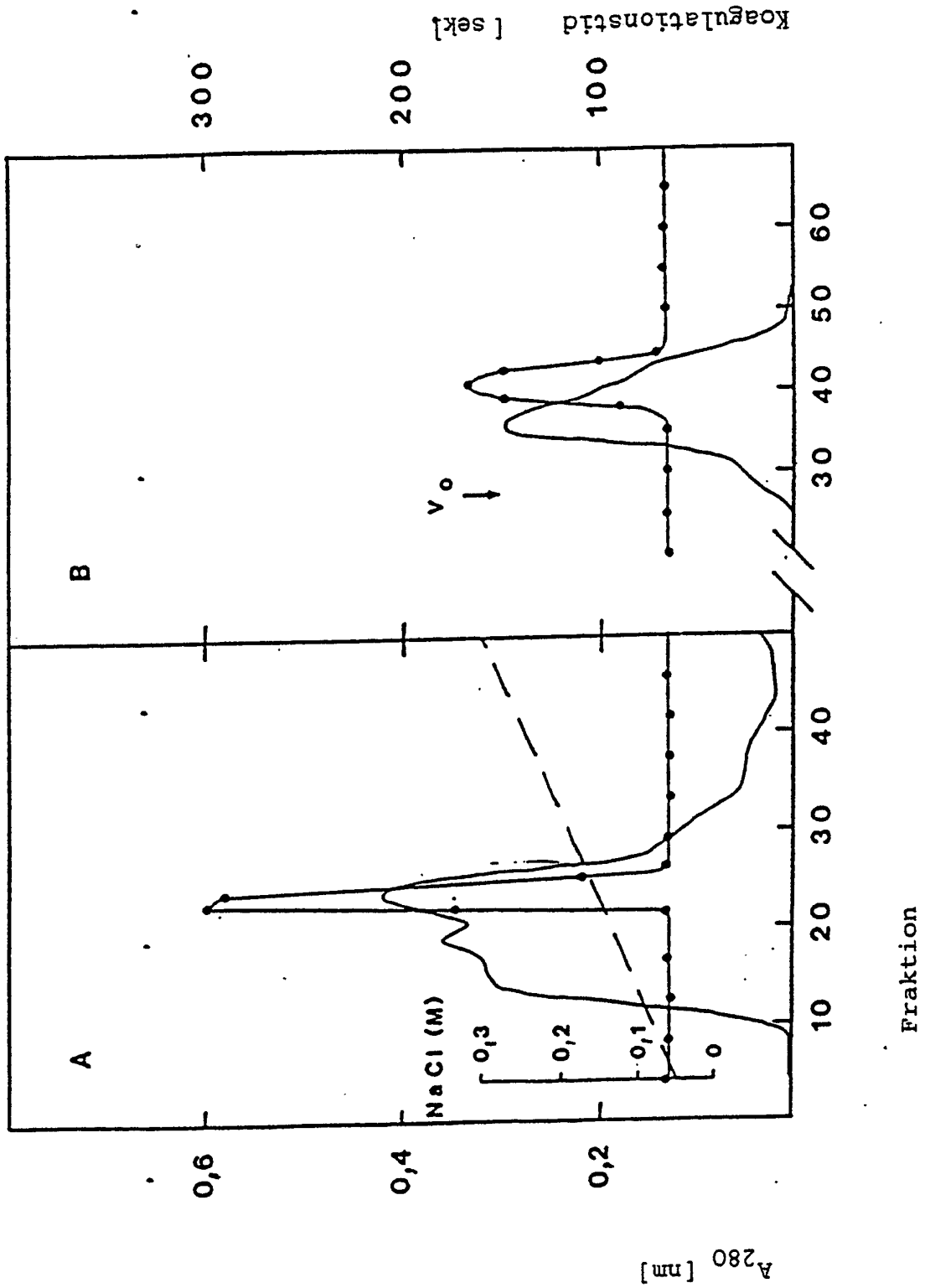

Koagulationstid [sek]
300
200
100
B
V_o
60
50
40
30
A
NaCl (M)
0,3
0,2
0,1
0
0,6
0,4
0,2
40
30
20
10
Fraktion
A_{280} [nm]

Fig. 9

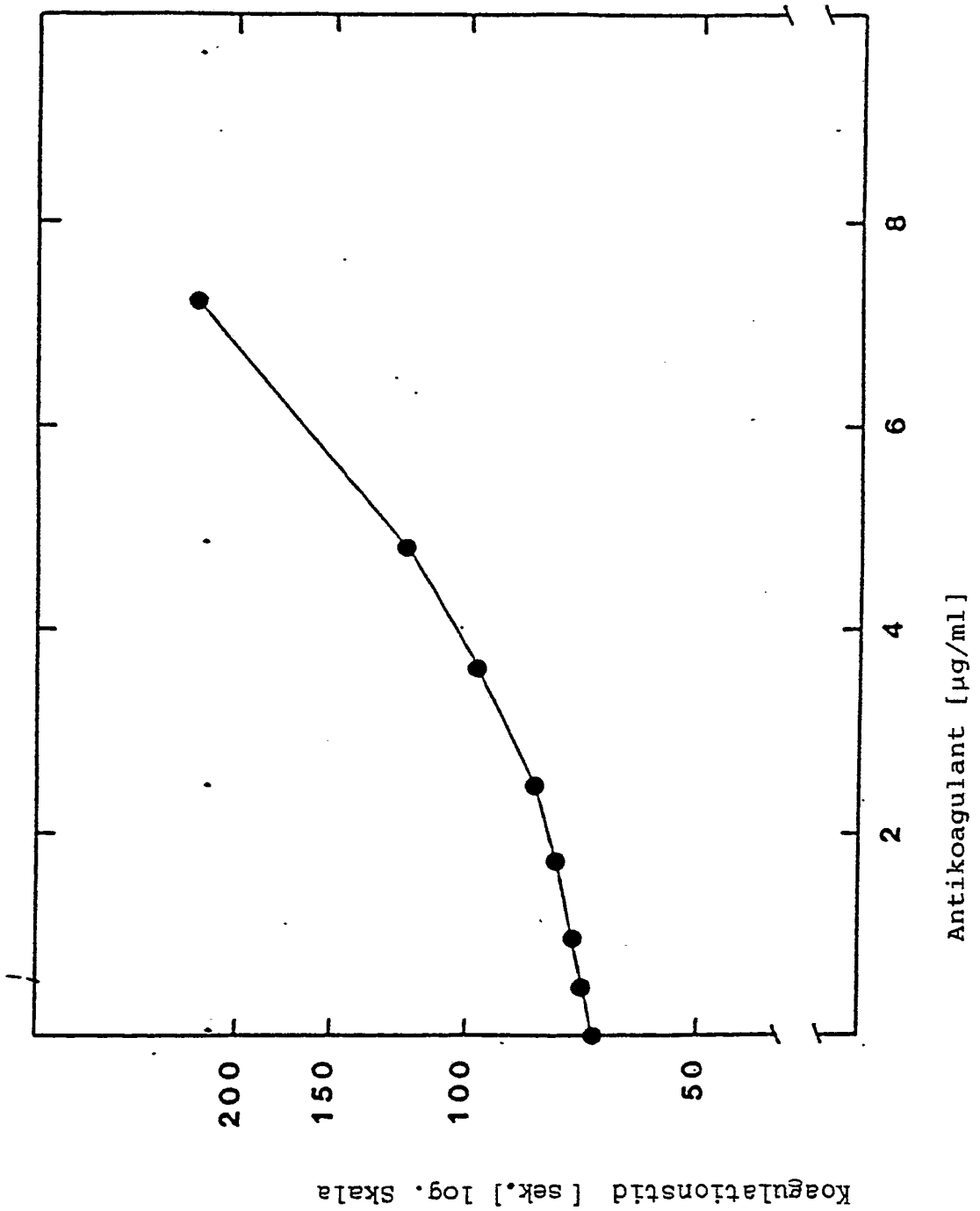

Koagulationstid [sek.] log. skala
200
150
100
50
Antikoagulant [µg/ml]
2
4
6
8

Fig. 1o

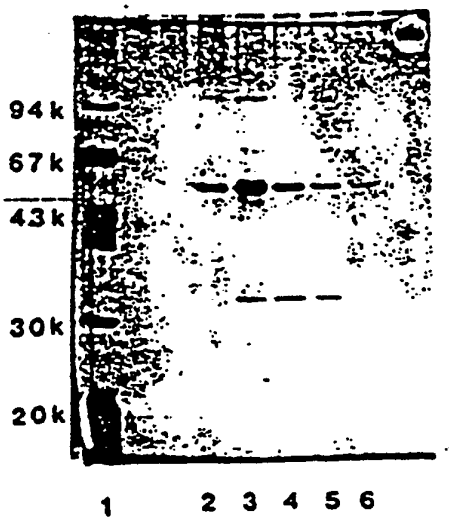


Fig.11

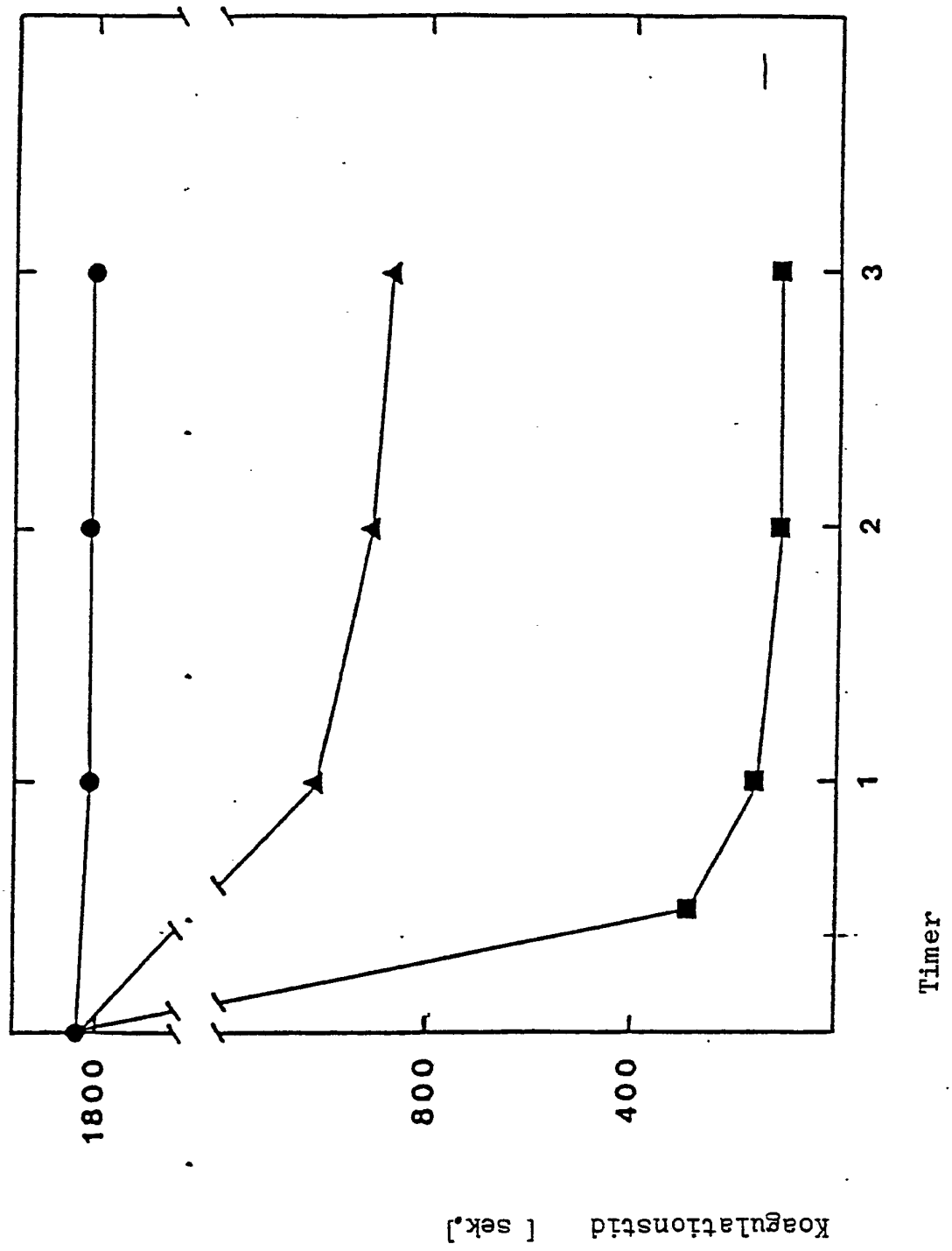


Fig.12

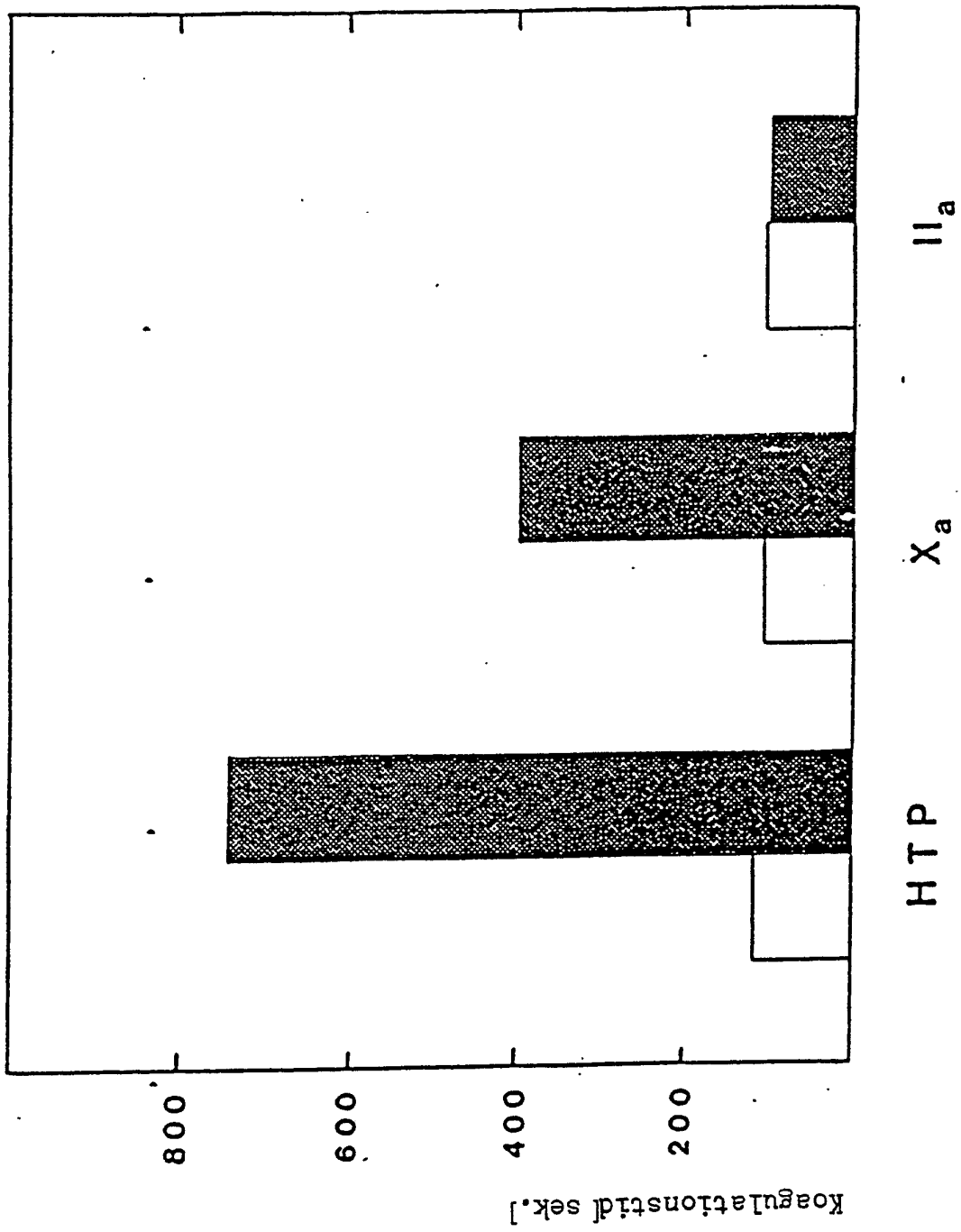


Fig.13.

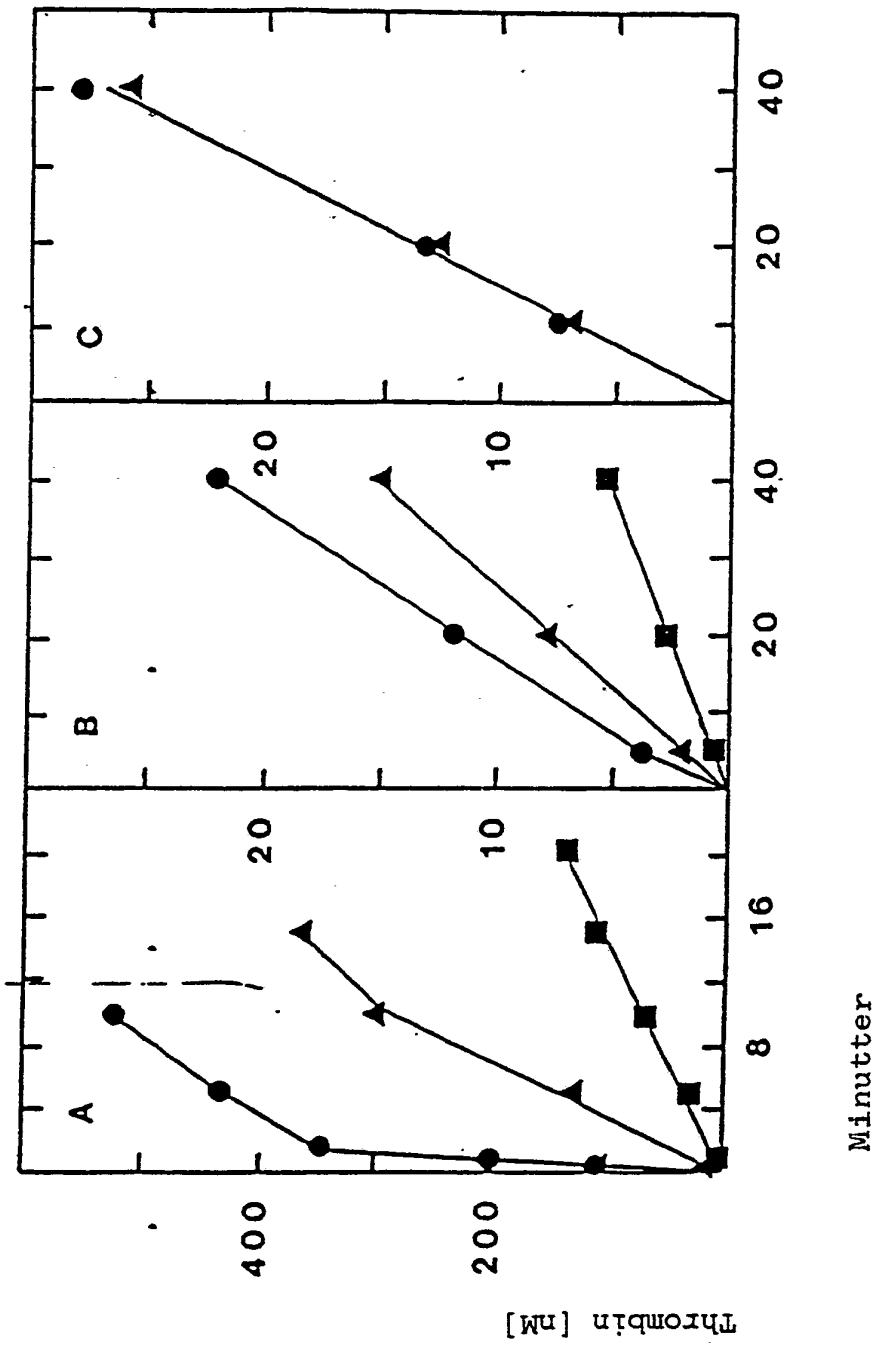


Fig. 14

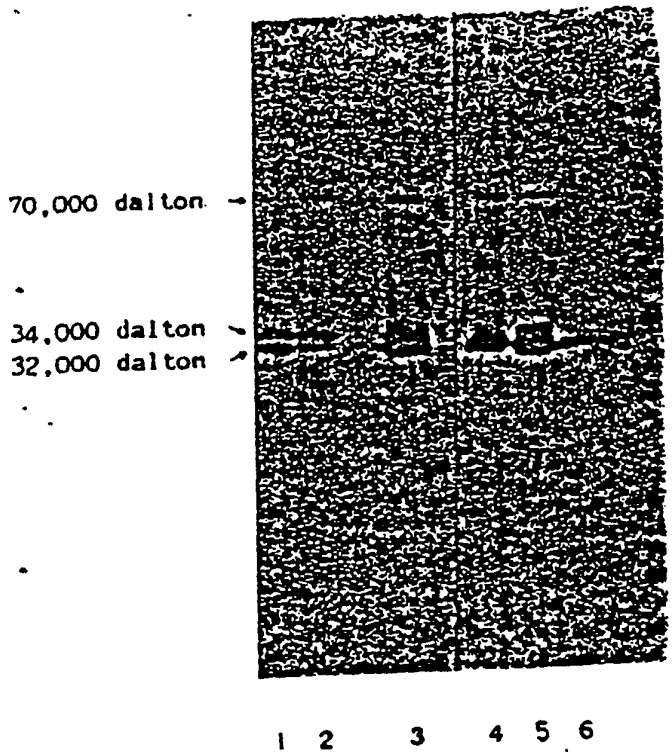


Fig. 15

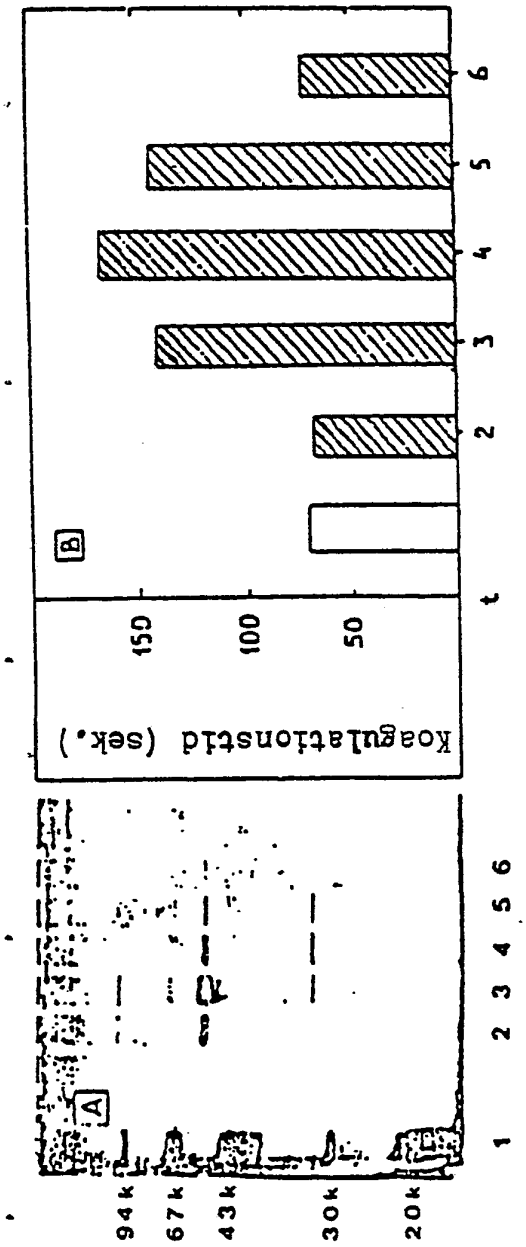
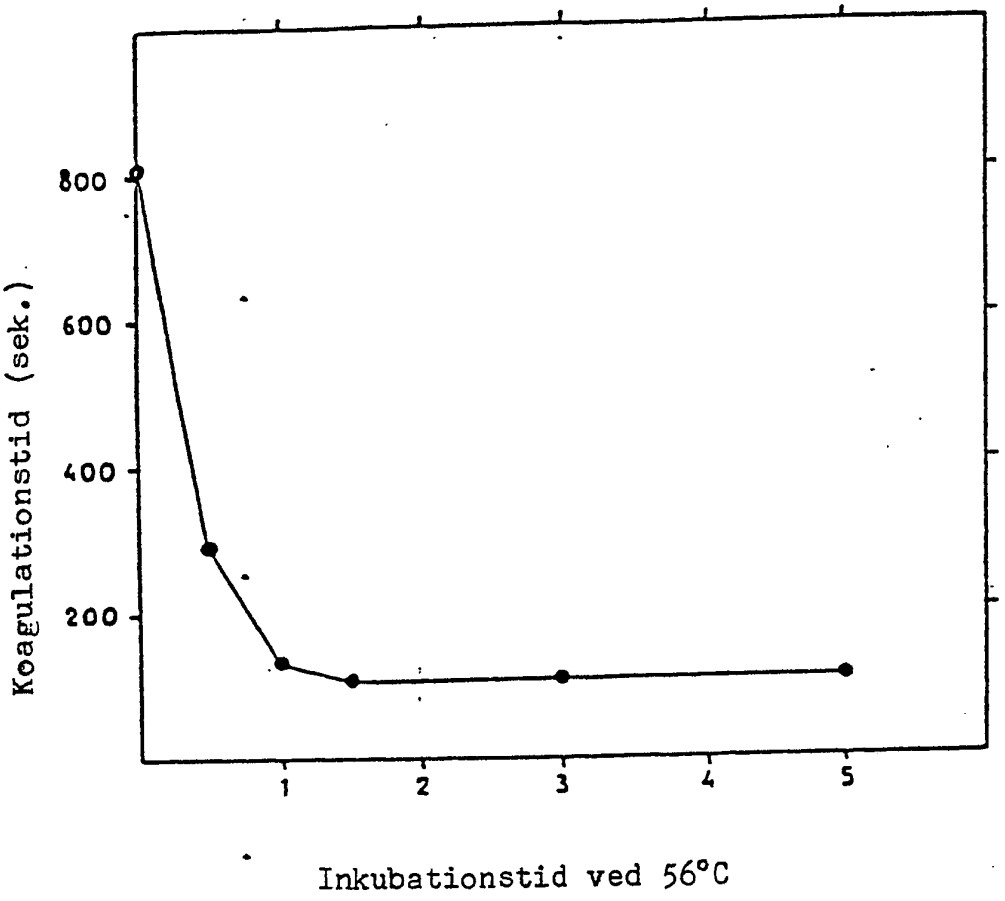

Koagulationstid (sek.)
150
100
50
t
B
1
2
3
4
5
6
A
94k
67k
43k
30k
20k
1 2 3 4 5 6

Fig. 16


800
600
400
200
Koagulationstid (sek.)
1
2
3
4
5
Inkubationstid ved 56°C