



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월20일
(11) 등록번호 10-1277097
(24) 등록일자 2013년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/56 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7016992
(22) 출원일자(국제) 2005년12월20일
심사청구일자 2010년10월01일
(85) 번역문제출일자 2007년07월23일
(65) 공개번호 10-2007-0092303
(43) 공개일자 2007년09월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2005/013714
(87) 국제공개번호 WO 2006/066878
국제공개일자 2006년06월29일

(30) 우선권주장
04030593.0 2004년12월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

J. Clin. Invest. Volume 91, January 1993,
61-68

전체 청구항 수 : 총 6 항

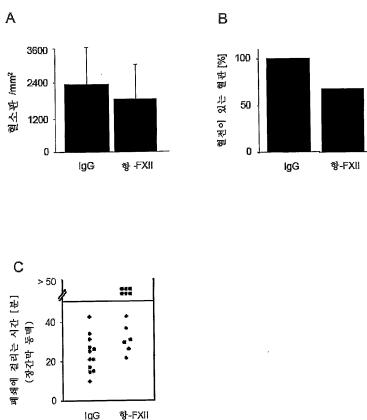
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 혈전 형성 및/또는 안정화의 예방

(57) 요약

본 발명은 인자 XII를 억제하고 3차원적 혈전의 형성 및/또는 안정화를 방지하기 위한 하나 이상의 항체 및/또는 하나 이상의 억제제의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약제학적 제형 및 인자 XII의 항-혈전 표적으로서의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

항-FXII 항체; 항-FXIIa 항체; 및 FXII, FXIIa 또는 이들 모두를 억제하는 프로테아제 억제제로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 억제제를 포함하고,

혈전의 형성, 혈전의 안정화 또는 이들 모두를 방지함으로써 3차원적 관내 (three-dimensional intraluminal) 혈전 성장을 방지하여 정맥 또는 동맥 혈전 형성 장애를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 항체가 FXII 활성화를 억제하는 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 억제제가 세린 프로테아제 억제제인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 프로테아제 억제제가 안지오텐신 전환 효소 억제제, C1 억제제, 아프로티닌 (aprotinin), 알파-1 프로테아제 억제제, 안티페인 (antipain) ([(S)-1-카복시-2-페닐에틸]-카바모일-L-Arg-L-Val-아르기날), Z-Pro-Pro-알데히드-디메틸 아세테이트, DX88, 류펩틴 (leupeptin), 프롤릴 올리고펩티다제의 억제제, 옥수수-트립신 억제제, 소 췌장 트립신 억제제의 돌연변이체, 에코틴 (ecotin), YAP (거칠가자미(yellowfin sole) 항응고 단백질), 호박 (Cucurbita maxima) 트립신 억제제-V 및 호박 (Curcurbita maxima) 동형억제제 (isoinhibitor)로부터 선택되는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 조성물이 보철 장치에 적용되는 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항, 제3항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 정맥 또는 동맥 혈전 형성 장애가 뇌졸중 또는 심근경색인 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

명세서

- [0001] 본 발명의 대상은, 가장 일반적 양태로, 3차원적 동맥 또는 정맥 혈전의 형성 및/또는 안정화의 방지에 관한 것이다.
- [0002] 상세히, 본 발명은 인자 XII 활성을 억제하고 혈전의 형성 및/또는 안정화 및 혈전 성장을 방지하기 위한 하나 이상의 항체 및/또는 억제제의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약제학적 제형 및 인자 XII의 항혈전 표적으로서의 용도에 관한 것이다.
- [0003] 혈관벽 손상은 혈소판의 갑작스런 유착 및 응집을 촉발하고, 이어서 혈장 응고 시스템의 활성화 및 피브린-함유 혈전의 형성을 유발하여, 손상 부위를 폐쇄한다. 이들 현상들은 외상후 혈액 손실을 제한하는데 중요하지만, 이는 또한 병든 혈관을 폐쇄하여 필수 기관의 허혈 및 경색을 일으킨다. 폭포 또는 캐스케이드 모델에서, 혈액 응고는, 제한된 단백질분해에 의해 지모겐 (zymogen)이 활성화되어, 급격하게 트롬빈이 생성되고, 이것이 혈장 피브리노겐을 피브린으로 전환시키고 혈소판을 강력하게 활성화시킴을 포함하는 일련의 반응에 의해 진행된다. 다시, 콜라겐- 또는 피브린-흡착성 혈소판은, 응고유발성 (procoagulant) 포스파티딜 세린 (PS)을 이의 외면에 노출시켜 응고 프로테아제 복합체의 조립 및 활성화를 증폭시키고, 혈소판 수용체와 응고 인자 사이의 직접적 상호작용에 의해 트롬빈 생성을 수십배 촉진시킨다.
- [0004] 혈관계의 외인성 (혈관벽) 또는 내인성 (혈액-유래) 성분에 의해 촉발되는 두 개의 수렴형 응고 경로가 존재한다. "외인성" 경로는, 관 표면에는 부재하나, 혈관의 내피하 층에서 강하게 발현되는 필수 응고 조인자인, 통합 막 단백질 (integral membrane protein) 조직 인자 (TF)와 혈장 인자 VII (FVII)의 복합체에 의해 개시된다. 혈중 미세소낭에서 발현된 TF는 또한, 트롬빈 생성을 활성화된 혈소판의 표면 상에서 유지함으로써, 혈전 증폭에 기여할 수 있다.
- [0005] "내인성" 또는 접촉 활성화 경로는, 인자 XII (FXII, Hageman 인자)가 고분자량의 키니노겐 (kininogen) 및 혈장 칼리크레인 (kallikrein)이 관여하는 반응에서 음전하 표면에 접촉했을 때 개시된다. FXII는 내피하 매트릭스의 고분자 성분, 예를 들어 글리코스아미노글리칸 및 콜라겐, 셀파티드, 뉴클레오티드 및 기타 가용성 다중음 이온 또는 비-생리학적 물질, 예를 들어 유리 또는 폴리머에 의해 활성화될 수 있다. 가장 강력한 접촉 활성화 제 중의 하나는 카울린이고, 이 반응은 주요 임상 응고 시험, (활성화된) 부분적 트롬보플라스틴 시간 (PTT, aPTT)에 대한 역학적 기반으로 작용한다. 혈소판에 의해 증폭된 반응에서, 활성화된 FXII는 이후 FXI를 활성화 시키고, FXIa는 다시 인자 IX를 활성화시킨다. 시험관내에서 혈액 응고를 유도하는 이의 고효능에도 불구하고, FXII-촉발된 내인성 응고 경로의 (병리)생리학적 중요성은, FXII 뿐만 아니라 고분자량의 키니노겐 및 혈장 칼리크레인의 유전적 결함이 출혈 합병증과 관련이 없다는 사실로 인해 의심받고 있다. 외인성 경로 구성분, 예를 들어 TF, FVII 또는 인자 IX가 결핍된 사람 및 마우스가 심각한 출혈을 겪는다는 관찰과 함께, 상기 사실은 피브린 형성이 생체내에서는 전적으로 외인성 캐스케이드에 의해 개시된다는 현재의 가설에 이르게 하였다 [참조문헌: Mackman.N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 24, 1015-1022].
- [0006] 모든 생리학적 기전과 마찬가지로, 응고 캐스케이드는 부적절히 활성화될 수 있으므로, 혈관 내부에 지혈전 (haemostatic plug)이 형성될 수 있다. 이에 의해, 혈관이 차단될 수 있고, 혈액 공급이 말단 기관에는 제한된다. 이러한 과정은 혈전색전증으로 알려졌으며, 높은 사망률과 관계가 있다. 추가로, 혈액과 접촉하는 보철 장치의 사용은 크게 제한되는데, 이는 응고 캐스케이드의 활성화 및 종종 이의 기능을 손상시키는 보철 표면의

피복 때문이다. 이러한 보철 장치의 예로는 혈액투석기, 심폐 바이패스 회로, 혈관 스텐트 및 유치 (in-dwelling) 카테터가 있다. 이러한 장치가 사용되는 경우에, 헤파린과 같은 항응고제를 사용하여 피브린이 표면 상에 침적하는 것을 방지한다. 그러나, 일부 환자는 헤파린에 불내성이어서 헤파린-유도된 저혈소판증 (HIT)을 일으켜, 혈소판 응집 및 생명을 위협하는 혈전증을 초래할 수 있다. 게다가, 진료소에서 사용되는 모든 항응고제의 본질적인 위험은 심각한 출혈 위험의 증가와 관련이 있다. 따라서, 이러한 합병증과 관련이 없고, 감염 환자에게서 사용될 수 있거나 또는 출혈 경향을 증가시키지 않으면서 혈전증을 예방하는 뛰어난 치료 개념으로서 사용될 수 있는 새로운 유형의 항응고제에 대한 필요성이 존재한다.

[0007] 따라서, 혈전증 및 유사한 질환의 치료 또는 예방을 위한 개선된 의약에 대한 필요성이 여전히 존재한다는 것은 명백하다. 따라서, 본 발명의 목적은 이러한 필요성을 충족시키는 것이다. 50년이 넘게, 응고 인자 XII의 결핍이 자연적 또는 손상 관련 출혈 합병증의 증가와 관련이 없는 것으로 알려져 왔다 [참조문헌: Ratnoff, O.D. & Colopy, J.E. (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 34, 602-13]. 실제로, 비록 병리학적 aPTT (응고의 내인성 경로를 설명하는 임상 응고 시험)를 나타낼지라도, FXII가 결핍된 사람은 대수술 중에도 비정상적 출혈을 겪지 않는다 [참조문헌: Colman, R. W. *Hemostasis and Thrombosis. Basic principles & clinical practice* (eds. Colman R. W., Hirsch. J., Mader V. J., Clowes A. W., & George J.) 103-122 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001)]. 반대로, FXII의 결핍은 정맥 혈전증의 위험 증가와 관련이 있다 [참조문헌: Kuhli, C, Scharrer, I., Koch, F., Ohrloff, C. & Hattenbach, L.O. (2004) Factor XII deficiency: a thrombophilic risk factor for retinal vein occlusion. *Am. J. Ophthalmol.* 137, 459-464., Halbmayer, W.M., Mannhalter, C, Feichtinger, C, Rubi, K. & Fischer, M. (1993) Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor for development of thromboembolism. Incidence of factor XII deficiency in patients after recurrent venous or arterial thromboembolism and myocardial infarction. *Wien. Med. Wochenschr.* 143, 43-50]. 이러한 견해를 지지하는 연구 및 증례 보고는 FXII 결핍증에 대한 지표 증례 (index case), 즉 폐색전증으로 사망한 존 해게만 (Mr. John Hageman)를 참고한다. FXII 결핍은 혈전유발 (prothrombotic)의 증가된 위험과 관련이 있다는 가설은 FXII 결핍과 혈전증을 관련시키는 여러 증례 보고의 최근 재평가에 의해 도전받고 있다 [참조문헌: Girolami, A., Randi, M. L., Gavasso, S., Lombardi, A.M. & Spiezio, F. (2004) The Occasional Venous Thromboses Seen in Patients with Severe (Homozygous) FXII Deficiency are Probably Due to Associated Risk Factors: A Study of Prevalence in 21 Patients and Review of the Literature. *J. Thromb. Thrombolysis* 17, 139-143]. 대부분의 경우에, 상기 저자들은 인자 FXII 결핍과 함께 공존하는 선천적 또는 후천적 혈전유발 위험 인자를 동정했으며, 이는 FXII와 독립적인 혈전 현상의 원인일 수 있다. 익히 특성이 규정된 환자들 [참조문헌: Koster, T., Rosendaal, F.R., Briet, E. & Vandebroucke, J. P. (1994) John Hageman's factor and deep-vein thrombosis: Leiden thrombophilia Study. *Br. J. Haematol.* 87, 422-424] 및 FXII-결핍 가족 [참조문헌: Zeerleder, S. et al. (1999) Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency-a study on 73 subjects from 14 Swiss families. *Thromb. Haemost.* 82, 1240-1246]를 이용한 최대규모의 역학 연구는, FXII 결핍과 어떠한 혈전유발 또는 항혈전 위험과는 아무런 관련이 없음을 나타낸다.

[0008] 놀랍게도, 당업자의 통상의 믿음과는 달리, 본 출원인은 인자 XII-유도된 내인성 응고 경로가 생체내 동맥 혈전 형성에는 필수적이지만, 정상의 조직-특이적 지혈에는 필수적이지 않다는 것을 발견하였다. 예기치 않게도, 이를 결과는, 생체내 혈액 응고가 전적으로 외인성 경로에 의해 매개된다는 오랫동안 지속되온 개념을 바꾸었으며, 인자 XII를 병리학적 혈전 형성 과정의 핵심적인 위치에 두게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 제1 대상은, 인자 XII를 억제하고 3차원적 동맥 또는 정맥 혈전의 형성 및/또는 안정화를 방지하기 위한 하나 이상의 항체 및/또는 하나 이상의 억제제의 용도이다. 항-FXII 항체 각각의 억제제는 FXII의 활성화를 억제하도록 작용하고/하거나 FXII 활성화에 결정적으로 관여하는 FXII 분자의 다른 부분을 방해할 수 있다.

[0010] 내인성 경로가 지혈에 요구되지 않는다는 사실과 함께, 상기 내용은 강력한 항혈전 요법에 대한 유망한 새로운 표적으로서 인자 XII를 확립한다. 추가로, 이들 결과는 기타 접촉 시스템-연관된 (병리)기전, 예를 들어 염증, 보체 활성화, 섬유소용해, 혈관형성 및 키닌 형성을 조절하기 위한 항-FXII 제제의 개발에 중요하다.

[0011] 따라서, 본 발명은 동맥 혈전 형성에 관한 병태 또는 질환, 즉, 뇌출증 또는 심근경색, 염증, 보체 활성화, 섬유소용해, 혈관형성 및/또는 병리학적 키닌 형성과 관련된 질환, 예를 들어 저장성 (hypotonic) 쇼크, 유전성 혈관부종을 포함한 부종, 세균 감염, 관절염, 퀘장염 또는 관절 통증의 치료 또는 예방에 있어서 상기 항체 및/

또는 억제제의 용도를 추가로 제공한다.

- [0012] 특히, FXII-유도된 혈전 형성을 억제하기 위한 하나 이상의 항-FXII 항체의 용도 (예: F1 항체 유사 (MoAb F1, Ravon et al., Blood. 1995 Dec 1;86(11):4134-43)) 및/또는 하나 이상의 프로테아제 억제제의 용도는 본 발명에 따른 것이다.
- [0013] 특히 바람직한 것은, 예를 들어 AT III 억제제, 안지오텐신 전환 효소 억제제, C1 억제제, 아프로티닌, 알파-1 프로테아제 억제제, 안티페인 (antipain) ([(S)-1-카복시-2-페닐에틸]-카바모일-L-Arg-L-Val-아르기날), Z-Pro-Pro-알데히드-디메틸 아세테이트, DX88 (Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA; cited in: Williams A. and Baird LG., Transfus Apheresis Sci. 2003 Dec: 29 (3):255-8), 류펩틴 (leupeptin), 프롤릴 올리고펩티다제의 억제제, 예를 들어 Fmoc-Ala-Pyr-CN, 옥수수-트립신 억제제, 소 췌장 트립신 억제제의 돌연변이체, 에코틴 (ecotin), YAP (거칠가자미: yellowfin sole) 항응고 단백질) 및 호박 (Curcurbita maxima) 동형억제제 (isoinhibitor)를 포함하는 호박 (Cucurbita maxima) 트립신 억제제-V로부터 선택된 프로테아제 억제제이다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 이러한 항체 및/또는 억제제의 의약으로의 용도; 및 이러한 항체 및/또는 억제제의 의약의 제조에서의 용도를 제공한다.
- [0015] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 인자 XII를 억제하는데 적합하고, 3차원적 동맥 또는 정맥 혈전의 형성 및/또는 안정화를 방지하는 하나 이상의 항체 및/또는 억제제를 포함하는 약제학적 제형이 제공된다.
- [0016] 특히, 약제학적 제형에 사용되는 항체로는 항-FXII 항체 (예를 들어, F1 항체 유사 (MoAb F1, Ravon et al., Blood. 1995 Dec 1;86(11):4134-43))이고, 억제제는 프로테아제 억제제, 예를 들어 AT III 억제제, 안지오텐신 전환 효소 억제제, C1 억제제, 아프로티닌 (aprotinin), 알파-1 프로테아제 억제제, 안티페인 ([(S)-1-카복시-2-페닐에틸]-카바모일-L-Arg-L-Val-아기날), Z-Pro-Pro-알데히드-디메틸 아세테이트, DX88 (Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA; cited in: Williams A. and Baird LG., Transfus Apheresis Sci. 2003 Dec: 29 (3):255-8), 류펩틴, Fmoc-Ala-Pyr-CN와 같은 프롤릴 올리고펩티다제의 억제제, 옥수수-트립신 억제제, 소 췌장 트립신 억제제의 돌연변이체, 에코틴, YAP (거칠가자미: yellowfin sole) 항응고 단백질) 및 호박 (Curcurbita maxima) 동형억제제 (isoinhibitor)를 포함하는 호박 (Cucurbita maxima) 트립신 억제제-V가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 상기 항체는 또한 억제 활성을 보유하는 동일 또는 모사체의 단편, 예를 들어 미국 특허 제6,613,890호, 특히 칼럼 4 내지 8에 기재된 아밀로이드 전구체의 쿠니츠 프로테아제 (Kunitz Protease) 억제제 도메인의 유사체일 수 있다. 다른 적합한 억제제는 문헌 [Harahiko Isawa et al. in The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, No. 31 (August 2, pp. 27651 - 27658, 2002)]에 기재된 하마다린 (Hamadarin)일 수 있다. 적합한 옥수수 트립신 억제제 및 이의 제조 방법은 문헌 [Zhi-Yuan Chen et al., Applied and Environmental Microbiology, March 1999, p. 1320 - 1324, 및 이곳에서 인용된 참조문헌 19]에 기재되어 있다. 인용된 모든 참조문헌은 본원에 이들의 전문이 참조로 포함된다. 마지막으로 말하자면, 예를 들어 선별을 토대로 하는 검정을 통해 각각의 FXII 및 FXIIa 억제를 사용하여 분리된 소(小) 문자뿐만 아니라, 상기 또는 하기된 이들의 각각의 용도도 본 발명의 일부이다. 이들 소 문자 FXIIa 억제제는 FXII의 결정 구조를 토대로 설계될 수 있었다. 따라서, 여러 FXII 도메인 또는 경쇄가 이.콜라이 (*E. coli*), 효모 또는 포유동물 세포와 같은 발현 시스템에서 재조합적으로 발현될 수 있다. 이때, 단백질은 FXII 기질 FXI에 대해 기재된 표준 공정을 사용하여 정제하고 결정화한다 [참조문헌: Jin L, et al. (2005) Crystal structures of the FXIIa catalytic domain in complex with ecotin mutants reveal substrate-like interactions. J Biol Chem. 280(6):4704-12]. 달리, 소 문자 세린 프로테아제 억제제는 FXII 구조를 안정화시키기 위하여 포함될 수 있다. 예를 들어, 이들 표적 단백질의 결정을 토대로 설계될 수 있는 단백질 표적의 소 문자 억제제를 포함하는 이러한 제형은 당업계에 의해 공지되었고, 예를 들어 환자에게 비경구와 같이 전신으로, 또는 경구로 또는 국소로 투여될 수 있는 약제학적 제형을 포함한다.
- [0018] 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 근육내, 동맥내 및 기관내 주사, 점적주입, 분무 적용 및 주입 기법을 포함한다. 비경구 제형은 공지된 방법에 따라, 바람직하게는 일시 주사형으로 또는 연속 주입으로 정맥내로, 또는 피하로 투여될 수 있다. 비경구용으로 의해 공지된 바람직한 액체 담체로는 멸균수, 염수 수성 텍스트로스, 당 용액, 에탄올, 글리콜 및 오일이 포함된다.
- [0019] 경구 투여용 정제 및 캡슐제는 통상의 부형제, 예를 들어 결합제, 충전제, 윤활제 및 습윤제 등을 함유할 수 있

다. 경구 액체 제제는 수성 또는 유성 혼탁액, 용액, 유탁액, 시럽, 엘리서 등의 형태일 수 있거나, 또는 사용하기 위해 물 또는 기타 적합한 비허클과 재구성되는 무수 제품으로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 통상의 첨가제, 예를 들어 혼탁제, 유화제, 비-수성 비허클 및 보존제를 함유할 수 있다.

[0020] 국소 적용에 적합한 제형은 수성 또는 유성 혼탁액, 용액, 유탁액, 젤 또는 바람직하게는 유탁액 연고의 형태일 수 있다. 분무 적용에 유용한 제형은 분무가능한 액체 또는 무수 분말의 형태일 수 있다.

[0021] 본 발명의 제3 양태에 따르면, 하나 이상의 항체 및/또는 하나 이상의 억제제에 의해 인자 XII를 억제하고 따라서 혈관 내의 3차원적 혈전의 형성 및/또는 안정화를 방지함으로써 항-혈전 표적으로서의 인자 XII의 용도가 제공된다.

[0022] 본 발명의 특질, 이점 및 추가적 특징은 아래의 수행된 실험 및 이의 결과의 상세한 설명과 함께 첨부된 도면을 참조하면, 명백해질 것이다.

[0023] 인자 XII-결핍 마우스를 사용하여, 지혈 및 혈전증에서 내인성 응고 캐스케이드의 기능을 분석하였다. 생체 (intravital) 형광 혈관경 및 초음파 유동 측정은, 혈관계의 상이한 동맥 분지 내의 3차원적 혈전의 형성 및 안정화에서 중대한 결함을 밝혀내었다. 사람 인자 XII를 가진 돌연변이 마우스의 재구성은 시험관내에서 내인성 응고 경로 및 생체내에서 혈전 형성을 복구시켰다. 기전상으로, 내인성 경로의 응고유발 활성은 활성화된 혈소판에 의해 결정적으로 촉진되었다. 이를 결과에 의해, FXII-유도된 내인성 혈액 응고 캐스케이드가 혈장 응고와 혈소판 응집을 연결하는 동맥 혈전 형성에서 중추적인 위치를 갖게 되었다.

[0024] 도 1은 FXII 결핍 마우스의 응고 분석을 나타낸다: (A) 야생형 (n=12) 및 FXII-/- (n=11) 마우스의 꼬리 출혈 시간. 각각의 기호는 하나의 개체를 나타낸다. (B) 말초 혈액 계수 (단위: 수천/ μl), 및 FXII-/- 및 야생형 마우스의 전체적인 응고 매개변수. 약어는 백혈구 계수 (WBC), 활성화된 부분적 트롬보플라스틴 시간 (aPTT) 및 프로트롬빈 시간 (PT)이다. 값은 10 마리의 각 유전자형의 평균 \pm SD이다. (C) 특이적 항체를 사용하는 웨스턴 블로팅에 의해 0.3 μl wt 및 FXII-/- 혈장 중에서 프로방된 접촉 시스템 단백질 FXII, 혈장 칼리크레인 (PK) 및 고분자량의 키니노겐 (HK). 분자량 표준은 좌측에 제공된다. (D) 재석회화 응고 시간은, 카울린 (암 칼럼) 또는 콜라겐 (명 칼럼)으로 활성화한 후 C57BL/6 및 129sv wt, FXI1-/-, FcR γ -/- 및 인테그린 α 2-결핍 마우스로부터 수득된 혈소판 부재 혈장 (상부 패널) 및 혈소판 풍부 혈장 (하부 패널)에서 측정하였다. JON/A의 효과를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체를 보충한 C57BL/6 혈장에서 분석하였다. 6회의 실험으로부터 평균 \pm STD가 제공된다.

[0025] 도 2. (A) 혈전색전증 사망률을 콜라겐 (0.8 mg/kg) 및 에피네프린 (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$)을 정맥내 주사한 후 관찰하였다. 모든 야생형 마우스가 5분 이내에 사망하였다. 챌린지 (challenge) 후 30분간 살아있던 동물은 생존개체로 간주하였다. (B) 콜라겐/에피네프린 주사 2분 후, 대조군 (n = 19), FXII-/- (n = 14) 및 FcR γ -/- (n = 5) 마우스의 혈소판 계수. (C) 야생형 및 FXII-/- 마우스로부터 수득된 혜파린처리된 혈소판 풍부 혈장을 콜라겐 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 ADP (5 μM)로 자극시키고, 광 투과를 표준 응집측정기로 기록하였다. 제시된 결과는 그룹당 6 마리의 마우스를 대표하는 것이다. (D) 콜라겐/에피네프린 주사 2분 후 지정된 마우스의 폐로부터의 혈마톡실린/에오신-염색된 절편. 시야 (eyefield)당 혈전을 20 x 배율로 계수하였다. 막대는 100개의 시야로부터의 평균 \pm SD를 나타낸다.

[0026] 도 3은 생체내에서 인자 XII가 결핍된 마우스에서 결함이 있는 혈전 형성을 보여준다. 생체내 혈전 형성은, 20% FeCl₃로 유도된 손상시, 장간막 세동맥에서 모니터하였다. (A) 단일 혈소판 유착은 모든 마우스 종에서 손상 5분 후 검출되었는데, 야생형 마우스에서는 처음 혈전이 손상 7 내지 8분 후 관찰된 반면에, FXII-/-에서는 처음 혈전이 손상 14 내지 35분 후 나타냈으며, FXI1-/-에서는 손상 5 내지 35분 후 나타났다. (B) 혈전 형성은 야생형 마우스의 장간막 세동맥의 100%에서 관찰되었으나, FXII-/- 마우스의 50%에서 그리고, FXI1-/- 마우스의 44.4%에서만 관찰되었다. (C) 야생형 마우스에서 형성된 혈전은 손상한지 평균 25분 후에 혈관을 폐쇄한 반면에, FXII 및 FXI 결핍 마우스에서 형성된 혈전은 폐쇄를 일으키지 않았다. 각각의 기호는 하나의 단일 모니터된 세동맥을 나타낸다. (D) 1회 실험의 대표적 사진.

[0027] 도 4. (A) 야생형 (n=10), FXII-/- (n= 10) 및 FXI1-/- (n= 11)를 동맥 폐쇄 모델에서 분석하였다. 겸자로 한 번 강하게 압착하여 대동맥에서 혈전증을 유도하였다. 완전히 폐쇄될 때까지, 혈류를 혈관주위 초음파 유동 프로브로 모니터하였다. 실험을 40분 후 중단하였다. 각각의 기호는 하나의 개체를 나타낸다. (B) 경동맥을 결찰하여 기계적 손상을 유도하였다. 미세섬유 제거 후, 야생형 (n= 10) 및 FXII-/- (n= 10)에서 혈전 면적을 측정하였다 (단위: μm^2). (C) 혈관경사진은 손상 2분 후의 대표적 영상을 나타낸다.

- [0028] 도 5는 사람 FXII에 의해 복구된 FXII 결핍 동물에서의 혈전 형성의 결함을 보여준다. (A) FeCl_3 유도된 손상시, 혈전 형성은 야생형 마우스뿐만 아니라, 사람 FXII를 주사한 FXII-/- 마우스에서 장간막 동맥의 100%에서 관찰되었다. (B) 형성된 혈전은, 야생형 마우스에서는 손상한 지 평균 25분 후에, 그리고 사람 FXII를 주사한 FXII-/- 마우스에서는 손상한 지 22.7분 후에 혈관을 폐쇄하였다. 각각의 기호는 하나의 개체를 나타낸다. (C) 대표적 사진이 제시된다. (D) FXII-/- 마우스에 2 mg/kg hFXII-/- 를 투여하고, 겹자로 한 번 강하게 압착하여 대동맥에서 혈전증을 유도하였다. 완전히 폐쇄될 때까지, 혈류를 혈관주위 초음파 유동 프로브로 모니터하였다. 실험을 40분 후 중단하였다. 각각의 기호는 하나의 개체를 나타낸다.
- [0029] 도 6은 생체내에서 마우스에서 혈전 형성을 억제하는 항-FXII 항체를 보여준다. 야생형 마우스에 2 mg/kg 항-FXII 항체 또는 비-면역 IgG를 정맥내로 투여한다. 15분 후, 생체내에서 혈전 형성을, 20% FeCl_3 로 유도된 손상시, 장간막 세동맥에서 모니터하였다. (A) 단일 혈소판 유착은 두 그룹 모두에서 손상 5분 후에 검출된다. 7 내지 8분 후, 대조군 IgG-처리된 마우스에서 처음 혈전이 관찰된 반면에, 항-FXII-처리된 마우스에서는 처음 혈전이 손상 12 내지 32분 후 나타났다. (B) 혈전 형성은 대조군 마우스에서 장간막 동맥의 100%에서 관찰되었으나, 항-FXII-처리된 마우스의 60%에서만 관찰되었다. (C) 폐쇄를 완료하는데 걸리는 시간이 제시된다. 각각의 기호는 하나의 개체를 나타낸다.
- [0030] 도 7은 동맥 혈전 형성의 변형된 모델을 보여준다. 초기에는, 혈관 병소의 부위에서 트롬빈 형성이 내피하 매트릭스 중의 조직 인자 (TF) 노출로 인해 우세하다. FVII와 복합체를 형성한 TF는 응고의 외인성 경로를 개시한다. 손상 부위에서 FXI를 통하여 내인성 경로를 유도하는 FXII의 트롬빈 (FII) 생성에 대한 공헌은 미미하며, 정상 지혈 면에서도 무시할만하다. 따라서, FXII-결핍된 개체는 출혈을 겪지 않는다. 생성된 트롬빈은 피브린을 형성시키고 혈소판을 활성화시킴으로써 응고 형성을 개시한다. 혈전 성장의 증폭: 성장하는 혈전에 노출된 표면에서, FXII-유도된 내인성 경로는 트롬빈 생성에 결정적으로 공헌한다. 활성화된 FXII는 FXI을 통하여 추가의 피브린을 생성시킨다. 따라서, FXII-결핍뿐만 아니라, FXI-결핍은 심각하게 혈전 형성을 손상시킨다.
- [0031] 본 발명에서, 생체내 병리학적 혈전 형성에 대한 응고의 내인성 경로의 잠재적 공헌을, 인자 XII가 결여된 마우스를 사용하는 동맥 혈전증의 모델을 생체 현미경- 및 유동 측정에 의해 평가하였다. 손상 부위에서 혈소판의 초기 유착은 돌연변이 동물에서는 변경되지 않는 반면에, 3차원적 혈전의 후속적 형성 및 안정화는 심각하게 결함이 있다. 이러한 결함은 혈관계의 상이한 분지에서 보이며, 외인성 사람 인자 XII에 의해 완전하게 복구될 수 있다. 이들 발견은 인자 XII-유도된 내인성 응고 경로를 혈전 형성의 변형된 모델에서 1차 및 2차 지혈 사이의 주요 연결고리로서 확립하였다.
- [0032] 생체내에서 응고에 대한 FXII의 기능을 분석하기 위하여, FXII-결핍 마우스를 생성시켰다. FXII-/- 마우스는 건강하고, 이들의 야생형 한배 새끼와 표현형상으로는 구별할 수 없고, 가임 능력이 있다. 상세한 조직학적 및 지혈학적 분석은, 안와후방에서 수집한 혈장 중에서 연장된 aPTT는 68 ± 17초이고 재석회화 시간은 412 ± 78초임에도 불구하고 (야생형: 23 ± 4 및 210 ± 31 초), FXII-/- 마우스에서 증가된 혈전증 또는 출혈과는 아무런 관련이 없음을 보여주었다 [참조문헌: Pauer.H.U., et al. (2004). Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. Thromb. Haemost. 92, 503-508]. FXII-결핍 사람과 유사하게, FXII-/- 마우스는, 야생형 동물에서 발견된 것들과 유사한 꼬리 출혈 시간에 의해 나타난 바와 같이 증가된 출혈 경향을 보이지 않았다 (각각, 369.5 ± 201.7 및 355.9 ± 176.1 초, n = 12/그룹, 도 1A). 돌연변이 마우스의 말초 혈액 세포 계수는 야생형 대조군과 상이하지 않았다. 특히, FXII-/- 마우스의 프로트롬빈 시간 (PT)은 야생형과 유사하였으며 (8.9 ± 1.3 대 9.1 ± 1.3 초), 이는 FXII 결핍이 외인성 응고 시스템에 의한 피브린 형성에 영향을 주지 않는다는 것을 암시한다 (도 1B). 사람과 마우스 사이의 FXII 응고유발 활성의 잠재적 차이를 평가하기 위하여, 쥐 야생형 혈장과 FXII-결핍 사람 (FXII < 1%), 또는 이와 반대로 재구성하고, 혼합물의 PTT를 측정하였다. 어느 경우나, 응고 형성은 정상화되었으며, 이는 응고에 대한 FXII 기능이 사람과 마우스에서 유사하다는 개념을 지지한다.
- [0033] 사람에서, FXII 결핍과 유사하게, 접촉 시스템 단백질 혈장 칼리크레인 (PK) 및 고분자량 키니노젠 (HK)의 결핍은, 연장된 aPTT에도 불구하고, 출혈 위험을 증가시키지 않는다. FXII-/- 마우스에서 aPTT 연장이 접촉 상 단백질의 추가적 결함으로 인한 것이 아니라는 것을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 FXII-/- 및 wt 혈장 중의 PK 및 HK를 분석하였다. 웨스턴 블로트는, HK 및 PK 수준이 돌연변이 마우스 및 야생형 마우스에서 동등하다는 것을 보여준다 (도 1C). 작용면에서, 콜라겐 또는 카올린에 노출된 FXII-/- 혈장에서, HK 발생 및 트롬빈 형성은 야생형에 비해 심하게 손상되었다.

- [0034] 혈액 응고 및 혈소판 활성화는 상보적이며, 상호 의존적 과정이다. 혈소판은 여러 응고 인자와 상호작용하여, 이들의 활성화에 기여하고, 핵심적인 응고 생성물인 트롬빈은 강력한 혈소판 활성화제이다. 따라서, 차후에, 응고 형성에 대한 혈소판 및 FXII의 기여를 보다 상세히 조사하였다. 이를 위하여, 본 발명자들은, 통상적으로 FXII를 활성화시키지만, 혈소판에는 직접적 효과를 미치지 않는 카올린, 또는 FXII 및 혈소판 둘 모두를 활성화 시키며, 이때 수많은 수용체, 가장 중요하게는 $\alpha 2\beta 1$ 인테그린 및 GPVI과 상호작용하는 콜라겐을 사용하여 응고를 유도하였다. 혈소판의 부재시가 아닌, 존재하에, 콜라겐은 야생형 혈장에서 응고 형성 면에서 카올린에 비해 우수하다 (도 1D). 반대로, 활성화-결합성 FcR γ -/- 혈소판을 함유하는 혈장에서, 카올린 및 콜라겐의 상대적 효능은 PFP와 유사하였으며, 유사한 효과가 인테그린 $\alpha 2/-$ 마우스로부터의 PRP에서 관찰되었다. 또한, 혈소판 응고유발 활성은 응고 혈장에서 효율적으로 촉발되며, 피브린 (피브리노겐) 수용체 $\alpha IIb\beta 3$ 이 이 과정에서 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌으나, 기본적인 기전은 충분히 이해되지 않았다. 이를 보고와 일치되게, $\alpha IIb\beta 3$ -기능 차단 항체 JON/A는 응고 시간에서 혈소판-의존성 감소를 주로 억제한다 (도 1D). 이를 결과는 모두, 응고유발 상태의 혈소판이 FXII-유도된 응고 형성을 촉진할 수 있다는 것을 입증하였다.
- [0035] 콜라겐-유도된 FXII 활성화가 생체내에서 기능적 중요성을 갖는지를 시험하기 위하여, 야생형 및 FXII-/- 마우스를 콜라겐 (0.8 mg/kg 체중)과 에피네프린 (60 μ g/kg 체중)의 혼합물을 주입하여 유도된 치명적 폐 혈전색전증의 모델에 적용하였다. 대조군 마우스 모두 (19/19)가 광범위하게 폐진 폐 혈전증으로 5분 이내에 사망하였고, 혈중 혈소판 중의 95% 이상의 감소를 수반하는 심장 정지를 챌린지 후 2분이내 계수한다 (도 2 A, B). 이를 실험 조건하에, FXII-/- 마우스의 35.7% (5/14)가 생존하였으나, 이들의 말초 혈소판 계수는 야생형에서와 유사하게 감소하였으며, 이는 관찰된 보호가 혈소판 활성화 결함에 의한 것 아니라는 것을 제시한다. 이러한 가정은 FXII-/- 혈소판이 주요 표면 당단백질, 예를 들어 콜라겐 수용체의 정상 수준을 발현하며, 또한 상기 세포들이 전형적인 효능제, 예를 들어 트롬빈, 아데노신 디포스페이트 (ADP), 또는 GPVI-특이적 효능제, 콜라겐-관련 웨პ티드에 의해 정상적으로 활성화될 수 있다 (인테그린 $\alpha IIb\beta 3$ 및 P-셀렉틴 발현의 활성화에 의해 측정)는 것을 보여주는 시험관내 연구에 의해 확인되었다. 이와 일치되게, FXII-/- 혈소판은 콜라겐, ADP (도 2C), PMA 또는 트롬빈에 대해 변화되지 않은 응집 반응을 나타내었다.
- [0036] 유사한 세트의 실험에서, FcR γ -/- 마우스에 콜라겐/에피네프린을 챌린지하였다. 이를 마우스는 치사로부터 완전히 보호되었으며, 혈소판 계수는 챌린지 2분 후 단지 적당히 감소되었는데, 이는 이러한 모델에서 치사에 대한 혈소판 활성화의 엄격한 요건을 확인하는 것이다. 이를 데이터는 상이한 그룹의 마우스로부터 수득한 폐 절편의 조직학적 분석에 의해 추가로 지지되었다. 대부분의 혈관은 야생형 마우스에서 폐쇄되었으며, 이는 FXII-/- 마우스 (생존자 및 비-생존자)에서 현저히 감소하였다. 이전의 보고와 일치하게, FcR γ -/- 마우스로부터의 폐에서는 실제로 혈전이 전혀 발견되지 않았다 (도 2D). 이를 결과는, 생체내 콜라겐이 혈소판 활성화 및 FXII-의존형 내인성 응고 경로 둘 모두를 촉발하며, 이 모델에서는 상승작용을 일으켜서 폐쇄성 폐 혈전을 형성시킨다는 것을 제시하였다.
- [0037] 병리학적 혈전 형성은 종종, 혈관계의 동맥 분지 내의 죽상경화판의 분열 또는 갑작스런 파열에 의해 비생리학적으로 강력한 혈소판 활성화 및 내피하 층의 표면상에서의 응고유발 활성을 유도함으로써 개시된다. 이를 과정 중의 FXII의 역할을 시험하기 위하여, 혈전 형성을 동맥 손상의 상이한 모델을 사용하여 야생형 및 FXII-/- 마우스에서 연구하였다. 제1 모델에서, 산화적 손상은 장간막 세동맥 (직경 60 - 100 μ m)에서 유도되었으며, 혈전 형성은 생체내 형광 현미경으로 검사되었다. 야생형 및 FXII-/- 마우스에게 동일한 유전자형의 형광으로 표지된 혈소판 (1 x 10⁸)을 투여하였으며, 20% 염화제2철 (FeCl₃)로 포화된 여과지를 1분 동안 국소 적용하여, 유리 라디칼의 형성을 유발하여 내피를 파열시킴으로써 손상이 야기되었다. 손상된 혈관벽과의 혈소판의 상호작용이 빠르게 시작되어, 손상 5분 후 단단하게 유착된 혈소판은 두 그룹의 마우스에서 유사하였다 (도 3A). 그러나, 야생형 마우스에서 유착 혈소판은 혈행으로부터 추가적 혈소판을 계속해서 모집하여, 응집체를 형성하였으며, 이러한 과정은 돌연변이 마우스에서는 심각하게 결여되어 있었다. 대조군 혈관의 100% (17/17)에서, 직경이 20 μ m를 초과하는 안정한 혈전은 손상 10분 후 형성되었으며, 이는 시간이 지나면서 계속 커져서, 마침내 40 분의 폐쇄 기간 내에 혈관의 94.1% (16/17)에서 완전한 폐쇄를 일으켰다 (평균 폐쇄 시간: 25.6 ± 8.9 분) (도 3). 상당히 상이하게, 돌연변이 마우스에서는, 미세응집체 또는 혈전의 형성이 혈관의 50% (7/14)에서 완전히 부재하였다. 혈관의 나머지 50% (7/14)에서, 혈전이 형성되었으나, 이는 항상 불안정하였고 혈관벽으로부터 빠르게 분리되었다. 어떠한 혈관에서도, 직경이 20 μ m를 초과하는 혈전이 1분 이상 동안 손상 부위에 부착되어 남아있지 않았다. 결론적으로, FXII-/- 마우스에서는 관찰 기간 (40분) 이내에 어떠한 혈관도 폐쇄되지 않았다. 이러한 예기치 않은 결과는, FeCl₃-손상된 세동맥에서 혈소판-풍부 혈전의 생성 및 안정화에 FXII가 요구됨을 입증하였으며, FXII-유도된 응고 경로가 관찰된 혈전 반응에 필수적으로 기여함을 제시하였다. 이러한

가정은, FXI이 결핍된 마우스가 동일한 모델에서 분석되었을 때 확인되었다. FXI은 "내인성" 캐스케이드 중의 FXII의 주요 기질이기 때문에, 혈전 형성에서 유사한 결함이 이들 마우스에서 기대될 수 밖에 없었다. 실제로, FXI-/- 마우스와 매우 유사하게, 손상 부위에서 사실상 정상 혈소판 유착이 손상된 지 처음 3분 동안에 검출된 반면에, 혈전의 형성은 혈관의 55.6% (5/9)에서 완전히 억제되었다. 나머지 혈관에서, 형성된 미세응집체 및 혈전은 불안정하였고, 계속적으로 엠볼라이징 (embolizing)되었다 (도 3). 결과로서, 관찰 기간 (40분) 내에 어떠한 혈관도 폐쇄되지 않았다. 이러한 데이터는 FXI-결핍 마우스가 경동맥의 FeCl_3 -유도된 폐쇄 모델에서 보호된다는 것을 보여준다.

[0038] FeCl_3 -유도된 동맥 혈전 형성은 혈소판 및 혈전 생성에 의존하는 것으로 알려졌으나, 이러한 유형의 손상이 병든 혈관에서 일어나는 혈전생성 환경, 예를 들어 죽상경화판의 파열시와 얼마나 유사한지는 불명확하다. 따라서, 대규모의 FeCl_3 -유도된 산화적 손상이 FXII-의존성 접촉 상 활성화에 인공적으로 유리할 수 있는 비생리학적 상태를 일으킬 수 있는 가능성을 배제하기 위하여, FXII의 기능을, 손상이 대동맥에서 기계적으로 유도되고 혈류가 초음파 유동 프로브로 모니터되는 제2의 익히-정립된 동맥 혈전증 모델에서 평가하였다. 손상 직후 일시적 증가 후, 혈류는 시험된 모든 마우스에서 수 분 동안 점진적으로 감소되었다. 시험된 모든 야생형 마우스 (10/10)에서, 이러한 감소는 손상 후 1.6 내지 11.1 분 이내에 완전하고 비가역적인 폐쇄를 가져왔다 (평균 폐쇄 시간 5.3 ± 3.0 분, 도 4A). 안정한 혈전 형성이 심하게 결핍된 FXI-/- 마우스에서 상이한 사진이 발견되었다. 모든 동물에서, 혈류의 점진적 감소가 손상 후 처음 몇 분 동안 관찰되었으나, 폐쇄는 10 마리의 마우스 중 4 마리에서만 일어났다. 게다가, 이들 마우스에서 폐쇄성 혈전은 모든 경우에 불안정하였고 빠르게 엠볼라이징 (embolizing)되어, 혈류가 폐쇄 후 10 내지 115 초 내에 재-확립되었다. 재-개방된 혈관의 어느 것도 다시 폐쇄되지 않았다. 결론적으로, 모든 FXI-/- 마우스는 관찰 기간 (40분)의 말기에는 손상된 혈관을 통한 실질적으로 정상인 유속을 나타내었다. 매우 유사한 결과가 FXI-/- 마우스에서 수득되었는데, 이 경우, 11 마리 중 9 마리가 관찰 기간 (30분) 이내에 폐쇄성 혈전을 확립할 수 없었다 (도 5A).

[0039] FXI-/- 마우스에서 동맥 혈전 형성의 심각한 결함은, 손상된 경동맥에서의 혈소판 점증을 생체내 형광 현미경으로 연구한 제3의 독립적 모델에서 확인되었다. 혈소판을 제공자 마우스로부터 정제하고, 형광으로 표지하고, 동일한 유전자형의 수령자 마우스에게 주사하였다. 혈관 손상은 경동맥을 강하게 결찰하여 유도하였으며, 이는 내피 층의 파열 및 빈번하게 내부 탄력판 (elastic lamina)의 파괴를 일으킨 다음, 손상 부위에서의 급격한 콜라겐-촉발된 혈소판 유착 및 혈전 형성을 유발하였다 [참조 문헌: Gruner et al., Blood 102:12/8/2005 2003]. 야생형 동물은 커다란 안정한 혈전 (혈전 면적: $102.821 \pm 39.344 \mu\text{m}^2$; $t = 5$ 분)을 빠르게 형성시켰으며, 이는 엠볼라이징되지 않았으나, 돌연변이 마우스에서는 작고 중간 크기의 응집체만 형성되었고, 이는 빈번히 손상 부위로부터 분리되었다 (도 4B, C). 결론적으로, 혈전 면적은 돌연변이 마우스에서는 급격하게 감소되었으나 ($8.120 \pm 13.900 \mu\text{m}^2$; $t = 5$ 분), 혈관벽에서 1차 혈소판 유착이 결여되지 않은 것으로 나타났다.

[0040] FXI-/- 마우스에서의 혈전 형성의 심각한 결함이 혈장 FXII 또는 혈소판 FXII의 결여로 인한 결과인지, 또는 아마도 FXII 결핍증의 또 다른 미확인의 효과, 예를 들어 혈관계에서의 변화의 결과인지를 시험하기 위하여, 사람 FXII ($2 \mu\text{g/g}$ 체중)을 투여한 후 FXI-/- 마우스에서 동맥 혈전 형성을 연구하였다. 이러한 처리는 PTT (27 ± 6 초)를 정상화하고, 동맥 혈전 형성을 완전히 복구하였다. FeCl_3 -손상된 장간막 세동맥의 100%에서, $20\mu\text{m}$ 를 초과하는 혈전이 손상 후 10분 이내에 형성되었으며, 모든 혈관이 관찰 기간 내에 완전히 폐쇄되었다 (도 5A-C). 미처리된 야생형 대조군 마우스에 비해, 재구성된 FXI-/- 마우스에서 더 빠르게 검출가능한 폐쇄가 일어나는 경향이 있었다 (평균 폐쇄 시간: 22.7 ± 8.2 분 대 25.6 ± 8.9 분). 손상이 대동맥에서 기계적으로 유도되었을 때, 유사한 결과가 수득되었다. 시험된 모든 혈관에서, 완전하고 비가역적인 폐쇄가 손상 후 10분 이내에 일어났으며 (도 5D), 이는 혈장 FXII의 결여가 FXI-/- 마우스에서 관찰된 혈전 결함의 원인이 된다는 것을 확인한다.

[0041] 상기 연구들은 FXII가 동맥 혈전 형성에 중요하며, 따라서 항혈전 표적으로서 작용할 수 있음을 입증하였다.

[0042] 이를 직접적으로 평가하기 위하여, 마우스를 2 mg/kg 체중 폴리클로날 래빗 (rabbit) 항-마우스 FXII 항체 또는 비-면역 래빗 항체로 처리하고, FeCl_3 -유도된 손상 후 장간막 동맥에서 혈소판 점증 및 혈전 형성을 평가하였다. 도 6A에 도시된 바와 같이, 손상 부위에서 혈소판 유착은 마우스 두 그룹 모두에서 유사하였다. 그러나, 대조군 혈관의 100%에서, $20\mu\text{m}$ 를 초과하는 혈전이 손상 후 10분 이내에 형성되었으며, 모든 혈관이 관찰 기간 내에 완전히 폐쇄되었지만 (도 6B, C), 항-FXII 항체로 처리된 동물의 혈관의 67%에서만 $20\mu\text{m}$ 를 초과하

는 혈전이 관찰되었으며, 상기 혈관의 50%에서만 폐쇄가 일어났다.

- [0043] 달리, 소분자 FXII 억제제의 효과를 시험하기 위하여, 야생형 마우스에게 FXII 억제제 옥수수 트립신 억제제 (CTI, 50 μ g/g 체중)을 주입한 지 5 분 후에 경동맥에 FeCl_3 -유도된 손상을 일으켰다 (Wang et al. (2005) J. Thromb. Haemost. 3: 695-702). 억제제 처리는 aPTT를 연장시켰으나 (62 ± 11 초, n=4), 외과 수술 중에 출혈에는 영향을 주지 않았다. 시험된 동물의 어느 것 (0/4)에서도, 혈관을 폐쇄하는 혈전이 FeCl_3 의 적용 후 30분 이내에 발생하지 않았다. .
- [0044] 이들 결과는, 항-FXII 항체 또는 소분자 FXII 억제제와 같은 항-XII 치료제가 동맥 혈전 형성에 대해 상당한 보호를 제공한다는 것을 입증하였다.
- [0045] 비록 FXII의 접촉 활성화가 50년 이상 동안 내인성 혈액 응고 캐스케이드의 출발점으로 인식되어 왔지만, 이 경로는 혈액 응고와 관련이 없는 것으로 여겨졌다. 본 발명에서, 3개의 상이한 생체내 모델을 사용하여, FXII-결핍 마우스에서 동맥 손상 부위에서의 혈소판 점증 및 혈전 형성을 원위치 비디오 (in situ video) 현미경검사 및 초음파 유동 측정에 의해 분석하였고, 안정한 3차원적 혈전을 형성할 수 없는 심각한 무능력을 밝혀내었다. 이러한 결함은 다른 구획이 아닌 혈장 중의 FXII의 결여에 의한 것인데, 이는 외인성 사람 FXII의 정맥내 주사에 의해 완전히 역전되기 때문이고 (도 6), 이에 의해 FXII 결핍의 2차 효과가 관찰된 표현형에 기여한다는 것이 배제된다.
- [0046] FXII-결핍과 정맥 혈전증의 발생 증가와의 관련성을 보여주는 몇몇 보고서 [참조문헌: Kuhli. C, Scharrer. I., Koch, F., Ohrloff.C, and Hattenbach.L.O. (2004). Factor XII deficiency: a thrombophilic risk factor for retinal vein occlusion. Am. J. Ophthalmol. 137, 459- 464; Halbmayer.W.M., Mannhalter.C, Feichtinger.C, Rubi.K., and Fischer.M. (1993). [Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor for development of thromboembolism. Incidence of factor XII deficiency in patients after recurrent venous or arterial thromboembolism and myocardial infarction]. Wien. Med. Wo- chenschr. 143, 43-50)]를 근거로 할 때, FXII는 혈전유발성 효소라기 보다는 항혈전성 효소로 간주되었기 때문에, 이들 결과는 예기치 않은 것이다.
- [0047] FXII-결핍 마우스는 정상 출혈 시간을 나타내나 (도 1A), 자연적 또는 증가된 외상후 (수술중) 출혈의 징후를 보이지 않았는데, 이는 FXII가 정상 지혈에 필요 없는 것이라는 것을 확인한다. 얼핏보기에는, 이들 결과는 결핍시 출혈 또는 혈전증과 관련이 있는 이들 인자들만이 혈액 응고와 관련이 있다는 지혈의 핵심적 원리와 모순되는 것으로 보인다. 그러나, 면밀히 살펴 볼 때, 상기 데이터는 이 원리를 문제삼는 것이 아니라, 오히려 지혈 및 동맥 혈전이 상이한 기전을 통하여 일어날 수 있다는 흥미로운 가능성을 제기한다.
- [0048] 비록 위에서 논의된 지속적 혈전 생성의 기전이 지혈 전 (hemostatic plug)을 생성시키는데 충분할 수 있더라도, 상기 데이터는 안정한 동맥 혈전의 형성이 적어도 마우스에서는 내인성 응고 경로의 추가적 활성화를 요구한다는 것을 보여준다. 종-특이적 차이가 FXII의 기능 또는 효소의 기질에 존재한다는 가능성에 대한 증거는 없다. 돌연변이 마우스의 모든 응고 매개변수 및 지혈 표현형은 사람 FXII-결핍과 일치하며, 동물에서 관찰된 모든 변화는 사람 FXII를 사용한 재구성으로 정상화되었다 (도 5). 게다가, 혈전 결함이 특정 실험 모델로 제한된다는 것이 배제되었는데, 이는 혈전 효과가 혈관계의 상이한 동맥 분지에서 발견되며, 손상의 유형과는 무관하기 때문이다. 어떠한 유형의 손상이, 급성 심혈관 증후군의 주요 촉발인자로 여겨지는 죽상경화판의 파열에 의해 생긴 혈관 병소를 가장 잘 반영하는지를 결정하는 것은 곤란할 수 있다. 죽상경화 병소에는 혈전형성 성분, 가장 중요하게는 TF 및 원섬유 콜라겐이 풍부하다. 죽종형성 (atherogenesis)의 과정에서, 내막 평활근 세포 및 섬유아세포에 의해 증가된 콜라겐 합성이 관 협착에 상당히 기여한다는 것이 밝혀졌다. 관 파열 또는 파괴로 인해 유동하는 혈액에 콜라겐 원섬유가 노출되어, 혈소판 유착 및 응집을 촉발한다. 추가로, 이들은, 혈관벽에서 발견되는 주요 콜라겐 유형인 원섬유 콜라겐 I형에 대해 본원에서 제시된 바와 같이 FXII 활성화를 유도한다. 그러나, 상기 콜라겐이 손상 부위에서 FXII의 유일한 (병)생리학적 활성화제는 아닐 것이다. 다른 후보로는 봉괴 세포로부터 유리된 또는 ECM 중에 노출된 물질, 예를 들어 HSP90 또는 가용성 및 불용성 다중음이온, 예컨대 뉴클레오솜 또는 글리코스아미노글리칸일 수 있다.
- [0049] 이들 FXII 활성화제 중에서, 콜라겐은 혈소판을 강력하게 활성화하기 때문에, 가장 월등한 혈전형성 성질을 갖는다. 손상 부위에서, 혈소판은 혈소판 GPIb-IX와 콜라겐-결합된 vWF와의 가역적 상호작용에 의해 ECM에 국한되는데, 이는 세포의 속도를 감소시켜, 다른 수용체의 결합을 허용한다. 이들 중에서, 콜라겐 수용체 GPVI이 일차적으로 중요한데, 그 이유는 이들이 인테그린 $\alpha 2\beta 1$ 및 $\alpha IIb\beta 3$ 를 활성화시킨 다음에, 안정한 유착을 매개하고 세포 활성화에 기여하기 때문이다. 추가로, GPVI/FcR γ -쇄 복합체를 통한 혈소판 활성화는 세포의 응고

유발 상태를 유도하는데, 이러한 상태는 포스파티딜세린 (PS)의 노출 및 (PS 노출) 막 수포 및 미세소낭의 생성을 특징으로 한다. 인테그린 $\alpha 2\beta 1$ 은 상기 과정을 "아웃사이드-인 (outside-in) 시그널에 의해 직접적으로 및 강화성 GPVI-콜라겐 상호작용에 의해 간접적으로 촉진한다. PS-함유 막이 응고 과정의 2종의 핵심적인 반응, 즉 테나제 (tenase) 및 프로트롬비나제 (prothrombinase) 반응을 강력하게 촉진한다는 것이 정립되었다. 본 발명은 응고유발 혈소판이, GPVI/FcR γ -쇄 복합체 및 $\alpha 2\beta 1$ 둘 모두가 관여하는 기전에 의해 시험관내에서 FXII-의존성 응고를 촉진하다는 것을 보여준다 (도 2). 이는 동맥 손상의 부위에서 변화되지 않은 혈소판 유착에도 불구하고, 왜 $\alpha 2\beta 1$ -결핍 마우스가 폐쇄성 혈전의 형성에 있어서 부분적 결함을 보이는지를 적어도 일부라고 설명할 수 있을 것이다. 콜라겐 이외에도, 응고성 혈장이 인테그린 $\alpha IIb\beta 3$ -의존성 기전에 의해 혈소판 응고 유발 활성을 강력하게 자극한다. 본 발명의 실험에서, $\alpha IIb\beta 3$ 봉쇄가 FXII-의존성 응고에서 혈소판 관여를 완전히 억제하였는데, 이는 $\alpha IIb\beta 3$ 길항제의 익히 공지된 항응고 활성이 부분적으로는 FXII-유도된 내인성 응고 경로의 억제에 기인한 것일 수 있다는 것을 암시한다. 게다가, 본 발명은 FXII-유도된 접촉 시스템 및 혈소판 활성화가 병리학적 혈전 형성에서 협력하는 상호 의존적 과정일 수 있음을 암시한다.

[0050] 상기 실험 결과를 토대로 하여, 도 7에 개략적으로 도시된 병리학적 혈전 형성의 모델이 제안되었다. 혈관 손상의 부위에서, 혈소판의 제1 층은 추가로 TF와 피브린이 풍부해진 환경에서 콜라겐과 접촉한다. 따라서, 손상된 혈관벽에 대한 혈소판의 유착이 FXII-/- 마우스에서 감소되지 않는다는 것은 놀라운 것이 아니며, 이를 세포들은 충분히 활성화되고 응고유발 상태에 있을 가능성이 매우 높을 것이다. 그러나, 커지는 혈전에서, 콜라겐은 존재하지 않으며, 미세소낭에 의해 제공된 TF 농도는 혈관벽에 비해 더 낮아질 수 있으며, 활성화된 혈소판으로부터 다량으로 방출된 TFPI에 의해 이들의 활성이 감소될 수 있다. 이를 상태하에서, 새로이 모집된 혈소판을 활성화하기 위하여 시공간면에서 트롬빈 생성을 유지하는데 추가적 기전이 요구되며, 피브린의 형성이 이들의 응고 활성을 자극한다. 안정한 혈전을 확립할 수 없는 FXII-/- 마우스의 심각한 무능력은 명백히, FXII-유도된 내인성 응고 경로가 상기 과정의 필수 요소라는 것을 입증한다. 낮은 TF-마우스가 또한 감소된 동맥 혈전증을 나타낸다는 관찰과 함께, 이들 결과는 3차원적 혈전 및 결국에는 폐쇄성 혈전의 형성을 촉진하기 위하여는, 외인성 및 내인성 경로 모두가 작동되고 상승작용을 일으켜야 한다는 것을 제시한다. 반대로, FXII-/- 마우스에서의 출혈의 결핍은, 3차원적 혈전 성장이 혈관벽의 구멍을 봉하는데 필수적이지 않을 수 있다는 것을 암시한다. 이는 피브린의 제1층 및 활성화된 혈소판을 생성시키는 외인성 경로가 정상 지혈을 매개하는데 왜 충분한지를 설명할 수 있을 것이다. 본 발명자들의 결과는 3차원적 혈전의 형성이 지혈 이외의 작용을 할 수 있다는 흥미로운 가능성을 제기한다. 이러한 것들로는, 혈류로 침입하는 병원체 또는 독소의 분포를 방지하기 위하여 조직 외상의 특정 부위에서 혈류의 정지를 들 수 있다.

[0051] 실험 절차

[0052] 동물

[0053] 모든 실험 및 감독은 지방 동물 보호 및 사용 위원회 (Animal Care & Use Committee)에 의해 승인되었다. 인자 XI (FXI-/-), 인자 XII (FXII-/-), $\alpha 2$ 인테그린 ($\alpha 2$ -/-)이 결여된 통상의 마우스 돌연변이는 문헌 [Gailani.D., Lasky.N.M., and Bro-ze.G.J., Jr. (1997). A murine model of factor XI deficiency. Blood Coagul. Fibrinolysis 8, 134-144; Pauer.H.U., Renne.T., Hemmerlein.B., Legler.T., Fritzlar.S., Adham.I., Muller-Esterl.W., Emons.G., Sancken.U., Engel.W., and Burfeind.P. (2004). Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. Thromb. Haemost. 92, 503-508; Holtkotter.O., Nieswandt.B., Smyth.N., Muller.W., Hafner.M., Schulte.V., Krieg.T., and Eckes.B. (2002). Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. J Biol Chem JID - 2985121R 277, 10789-10794]에 기재된 바와 같이 생산하였다. 대조군으로서, C57B/6J 마우스 (FXI-/-) 또는 Sv129 (FXII-/-)를 사용하였다. FcR γ -쇄 결핍 마우스 [참조문헌: Takai.T., Li1M., Sylvestre.D., Clynes.R., and Ravetch.J.V. (1994). FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. Cell 76, 519- 529]은 공급원 (Taconics, Germantown)으로부터 구입하였다.

[0054] 항-FXII 항체의 생성

[0055] 전체 세포 RNA를 129sv wt 마우스의 간으로부터 분리하고, FXII-cDNA 합성을 제조업자의 지침에 따라 "1 단계

(one-step) RT-PCR 키트" (제조원: Qiagen)를 사용하여 수행하였다. 인자 FXII 중쇄 (위치 61-1062, 잔기 21-354에 상응)를, 각각 BamH I 및 EcoR I 제한 부위를 도입한 각각의 5- 및 3-프라이머 (ttggatccccaccatggaaagactccaag 및 ttgaattcgccatgaacgaggaca g) 25 pmol을 아래의 프로토콜에 따라 사용하여 증폭하였다: 열 순환기 (Biometra, Gottingen, Germany)에서 30 사이클 동안 95°C에서 30초, 58°C에서 60초, 및 72°C에서 1분. PCR 생성물을 pGEX-2T 발현 벡터 (Pharmacia)의 BamH I 및 EcoR I 부위 속에 클로닝하였다. 서열분석 후, 단백질을 이.콜라이 (*E.coli*) 균주 BL21에서 발현시켰다. 지수적으로 성장하는 세균을 0.5 mM 이소프로필- β -D-티오갈락토파라노시드로 1 시간 동안 자극하고, 수거하고, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10 μ g/ml 벤즈아미딘 하이드로클로라이드 및 10 μ g/ml 페닐메틸설포닐 플로라이드를 함유하는 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 중에 재현탁시키고, 3분 동안 각각 15초의 펄스로 초음파처리하였다. 15,000 x g로 20 분 동안 4°C에서 원심분리한 후, 상층액을 제거하여, 정제를 위해 GST-세파로스 칼럼 (Pharmacia)으로 옮겼다. 용출된 단백질은 코마지애 (Coomassie) 염색된 SDS-PAGE로부터 추정된 바에 의하면 순도가 95%를 초과하였다. GST-중쇄 FXII에 대한 폴리클로날 항체가 표준 절차 후 래빗에서 발생되었다. 말토스 결합 단백질 (MBP)에 융합된 FXII-중쇄를 함유하는 칼럼을 사용하여 과면역혈청으로부터 항체를 선별하였다. 이들 융합 단백질을, GST-융합 작제물에 대해 기재된 바와 유사하게 pMAL-c2 발현 시스템 및 아밀로스 수지 칼럼을 사용하여 발현시키고 정제하였다.

[0056] 혈소판 준비

[0057] 마우스를 에테르 마취하에 안와후방 총 (retroorbital plexus)으로부터 출혈시켰다. 20 U/ml 혜파린을 함유하는 튜브 내에 혈액을 수집하고, 혈소판 풍부 혈장 (prp)을 300 g로 10 분간 실온 (RT)에서 원심분리하여 수득하였다. 세척한 혈소판의 경우, prp를 1000 g로 8 분간 원심분리하고, 펠릿을 프로스타사이클린 (prostacyclin) (0.1 μ g/ml) 및 아피라제 (apyrase) (0.02 U/ml)의 존재하에서 변형된 Tyrodes-Hepes 완충제 (134 mM NaCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 20 mM Hepes, 5 mM 글루코스, 0.35% 소 혈청 알부민, pH 6.6) 중에 2회 재현탁시켰다. 이어서, 혈소판을 동일한 완충제 (pH 7.0, 0.02 U/ml의 아피라제) 중에 재현탁시키고, 분석 전에 30분 이상 동안 37°C에서 항온처리하였다.

[0058] 유동 세포계수법 (flow cytometry)

[0059] 혜파린처리한 전혈을, 5 mM 글루코스, 0.35% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 1 mM CaCl₂를 함유하는 변형된 Tyrode-HEPES 완충제 (134 mM NaCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES [N-2-하이드록시에틸페페라진-N'-2-에탄설�onium], pH 7.0)를 사용하여 1:20로 희석시켰다. 샘플을 형광단-표지된 항체와 함께 15분 동안 실온에서 항온처리하고, FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) 상에서 직접 분석하였다 [참조문헌: Nieswandt.B., Schulte.V., and Bergmeier.W. (2004). Flow-cytometric analysis of mouse platelet function. Methods Mol. Biol. 272, 255-268].

[0060] 응집검출법

[0061] 혈소판 응집을 측정하기 위하여, 광 투과를 prp (200 μ L, 0.5 x 10⁶ 혈소판/ μ L 함유)를 사용하여 측정하였다. 투과를 Fibrinometer 4 채널 응집검출기 (APACT Laborgerate und Analysensysteme, Hamburg, Germany)에서 10분에 걸쳐 기록하고, 임의 단위로 표현하고, 이때 100% 투과는 혈장으로 조정한다. 콜라겐 (10 μ g/ml) 및 ADP (5 μ M)를 첨가하여, 혈소판 응집을 유도했다.

[0062] 출혈 시간 실험

[0063] 트리브로모에탄올 (Aldrich) (0.15 ml/10g의 체중)를 복강내 주사하여 마우스를 마취시키고, 꼬리 끝의 3 mm 절편을 메스로 잘라내었다. 꼬리 출혈을, 상처 부위에 접촉하지 않으면서 여과지로 혈액 방울을 부드럽게 흡수하여 모니터하였다. 15초 간격 후 여과지 상에서 혈액이 전혀 관찰되지 않았을 때, 출혈이 멈춘 것으로 결정되었다. 필요한 경우, 20분 후 출혈을 손으로 막았다. 지적된 경우, 마우스를 100 μ g/마우스의 hFXII로 처리하였다.

[0064] 생체 현미경검사를 위한 혈소판의 준비

마우스 혈액 (1 용적)을 20 U/mL 혼화린을 함유하는 0.5 용적의 Hepes 완충제 속에 수집하였다. 혈액을 250 g로 10 분간 원심분리하고, 혈소판-풍부 혈장을 조심스럽게 새로운 투브로 옮겼다. 혈소판을 5-카복시플루오레스cin 디아세테이트 석신이미닐 에스테르 (DCF)로 표지하고, 200 x 106 혈소판/250 μ l의 최종 농도로 조정하였다 [참조 문헌: Massberg,S., Sausbier.M., Klatt,P., Bauer.M., Pfeifer.A., Siess.W., Fassler.R., Ruth, P., Krombach.F., and Hofmann.F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-rnonophosphate kinase I. J Exp Med 189, 1255-1264].

[0066] FeCl₃-유도된 손상을 가진 생체내 혈전증 모델

2,2,2-트리브로모에탄올 및 2-메틸-2-부탄올 (Sigma) (2.5% 용액으로부터의 0.15 ml/10g의 체중)를 복강내 주사하여 4 내지 5주령의 수컷 및 암컷 마우스를 마취시켰다. 형광으로 표지된 혈소판을 정맥내로 주사하였다. 정중선 복부 절개를 통하여 장간막을 조심스럽게 노출시켰다. 세동맥 (35 - 50 μ m 직경)을, S-VHS 비디오 녹화기 (AG-7355, Panasonic, Matsushita Electric, Japan)에 연결된 CCD 카메라 (CV-M300) 및 100-W HBO 형광 램프 광원이 장착된 Zeiss Axiovert 200 도립 현미경 (x10)을 사용하여 가시화하였다. 혈관 손상 및 내피의 노출을 유도하는 FeCl₃ (20%)의 국소 적용 후, 40분 동안 또는 완전한 폐쇄가 일어날 때 (혈류가 1분 넘게 멈출 때)까지 세동맥을 모니터하였다. 단단한 혈소판 유착은 손상 후 5분까지 혈관벽에 침착된 형광으로 표지된 혈소판의 수로서 판정되며, 혈전은 직경이 20 μ m를 넘는 혈소판 응집체로서 특징지워 지며, 혈관의 폐쇄 시간은 적어도 1분 동안 혈액이 흐름을 멈추는데 필요한 시간으로서 특징지워 진다. 모든 실험에서, 두 개의 세동맥의 최대치가 노출의 질에 근거하여 각 마우스로부터 선택되었다. 17마리의 야생형, 14마리의 FXII/- 및 9마리의 FXI/- 세동맥 전부를 연구하였다.

[0068] 생체내 현미경검사 - 경동맥

손상된 경동맥의 생체 현미경검사를 문헌 [Massberg,S., Gawaz.M., Gruner.S., Schulte.V., Konrad.I., Zohlnhofer, D., Heinzmann.U., and Nieswandt,B. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. J Exp Med JID - 2985109R 197, 41-49)]에 기재된 바와 같이 실질적으로 수행하였다. 요약하면, 케타민/크실라진 (xylazine) (케타민 100 mg/kg, Parke-Davis, Karlsruhe, Germany; 크실라진 5 mg/kg, Bayer AG, Leverkusen, Germany)를 복강내 주사하여 마우스를 마취시켰다. 폴리에틸렌 카테터 (Portex, Hythe, England)를 우측 경동맥 속에 이식하고, 형광성 혈소판 (200 x 106/250 μ l)을 정맥내로 주입하였다. 내피 노출을 위한 경동맥 손상은 강한 결찰에 의해 유도하였다. 혈관 손상 전 및 후에, 형광성 혈소판을, 주변-조명 (epi-illumination)을 위한 100 W HBO 수은 램프가 장착된 Zeiss Axiotech 현미경 (20 x 수침 대물렌즈, W 20x/0.5, Zeiss, Gottingen, Germany)을 사용하여, 우측 총 경동맥의 생체내 비디오 현미경검사에 의해 원위치에서 가시화하였다. 혈소판 유착 및 혈전 형성을 손상 유도 후 5분 동안 기록하고, 비디오 테이프에 녹화된 영상을 컴퓨터-지원 영상 분석 프로그램 (Visitron, Munich, Germany)을 사용하여 평가하였다.

[0070] 폐 혈전색전증

2,2,2-트리브로모에탄올 및 2-메틸-2-부탄올 (Aldrich) (2.5% 용액으로부터의 0.15 ml/10g의 체중)을 복강내 주사하여 마우스를 마취하였다. 마취된 마우스에게 콜라겐 (0.8 mg/kg)과 에피네프린 (60 μ g/kg)의 혼합물을 경동맥에 주사하여 투여하였다. 생존 마우스의 절개를 봉합하고, 이들을 회복시켰다. 겸시 및 조직학적 연구를 4% 알데히드로 고정된 폐에서 수행하고, 파라핀 절편을 헤마톡실린/에오신으로 염색하였다.

[0072] 혈소판 계수

FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) 상에서 유동 세포계수에 의해 혈소판 계수를 측정하였

다. 결과는 평균 \pm S.D 또는 대조군의 %로서 표현되었다 (wt, n = 19; FXII-/-, n = 14 및 FcRγ-/-, n = 5).

[0074] 폐쇄 시간

[0075] 마취된 마우스의 복강을 종축으로 개방하고, 복부 대동맥을 찾아내었다. 초음파 유동 프로브를 대동맥 주변에 놓고, 겸자로 한번 강하게 압착하여 혈전증을 유도하였다. 완전한 폐쇄가 일어날 때까지 혈류를 모니터하였다. 45분 후 실험을 수동으로 멈추었다. 지적된 경우에, 사람 인자 XII가 실험 전에 직접 정맥내로 대체되었다.

[0076] 조직병리학적 분석

[0077] 마우스를 희생시키고, 폐를 신속히 제거하고, 4% 포르말린 (pH 7.4; Kebo) 중에 4°C에서 24 시간 동안 고정시켰다. 조직을 탈수시키고, 파라핀 (Histolab Products AB) 속에 매몰시키고, 4 μ m 절편으로 절단하고, 표본제작 (mounting)하였다. 파라핀을 제거한 후, 조직을 메이어스 헤마톡실린 (Mayers hematoxylin) (Histolab Products AB) 및 에오신 (Surgipath Medical Industries, Inc.)으로 염색하였다.

[0078] SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 웨스턴 블로팅, 및 면역프린팅

[0079] 혈장 (0.3 μ l/레인)을 1% (w/v) SDS (Laemmli, 1970)의 존재하에 12.5% (w/v) 폴리아크릴아미드 겔 전동영동에 의해 분리하였다. 단백질을 100mA에서 30 분 동안 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 4% (w/v) 분유 및 0.05% (w/v) Tween-20, pH 7.4을 함유하는 PBS로 차단하였다. 막을 MBK3에 대한 모노클로날 항체의 ml 당 0.5 μ g으로 프로빙 (probing) 하였다 (Haaseman J. Immunology 1988). 결합된 항체를, 퍼옥시다제-접합된 마우스 IgG에 대한 2차 항체 (희석 1:5000)를 사용한 후, 화학발광 검출 방법에 의해 검출하였다.

[0080] 응고 검정

[0081] 재석회화 응고 시간의 측정을 위하여, 100 μ l 시트레이트 항응고된 마우스 혈장 (0.38% 나트륨 시트레이트)을, Horm 형 콜라겐 (Nycomed, Munchen, Germany), 엘라그산 (ellagic acid), 콘드로이틴 살레이트 (두 제조원 모두 Sigma), 카올린 또는 완충제 (최종 농도 30 μ g/ml)의 각 100 μ l와 함께 KC10 "Kugelkoagulometer" (Amelung, Lemgo, Germany)에서 120 초 동안 37°C에서 항온처리하였다. FXII-의존성 응고에 대한 혈소판 활성화의 효과를 시험하기 위하여, 세척한 혈소판을, 혈소판 부재 혈장을 첨가하기 전에, 4 mM Ca²⁺ 및 5 μ M Ca²⁺-이오노포르 (ionophor) A23187 (Sigma)를 포함하는 Tyrode 완충제 중에 10분 동안 재현탁시켰다. 응고 형성은 100 μ l 25 mM CaCl₂-용액을 사용한 재석회화로 개시시켰으며, 응고가 일어날 때까지의 시간을 응고 시간 타이머 KC4 (Amelung)을 사용하여 기록하였다.

[0082] 응고 분석

[0083] 전체 및 단일 응고 매개변수를, 제조업자에 의해 상세히 설명된 사람 샘플용 프로토콜에 따라 Dade Behring 시약과 함께 자동화 혈액 응고 시스템 (BCS, Dade Behring)을 사용하여 측정하였다. BCS 검정 프로토콜의 지침은 Dade Behring's 웹 사이트 (<http://www.dadebehring.com>)에서 발견할 수 있는 Dade Behring 패키지 삽입물로부터 구할 수 있다. D-이랑체를 ELISA (제품: Asserachrom, Roche)로 측정하였다. 말초 혈액 계수를 표준 프로토콜에 따라 Sysmex XE 2100 상에서 측정하였다.

[0084] 트롬빈 측정

[0085] 다소 변형시킨 문헌 [Aronson et al. (Circulation, 1985)]의 방법에 따라 트롬빈 생성을 측정하였다. 혈소판-풍부 또는 혈소판 부재 혈장 분취량 (0.5 ml)을, Horms 형 콜라겐으로 피복한 환저 폴리프로필렌 튜브 속에 넣고 (100 μ g/ml, 24h, 4°C), 20 μ l의 1 M Ca²⁺를 첨가하여 응고를 개시시켰다. 샘플 (10 μ l)을, 90 μ l의 3.8% 나트륨 시트레이트를 함유하는 미세역가 플레이트의 웰에 2.5 내지 10 분 간격으로 60 분동안 첨가하였다. 1

mol/리터 Tris (pH 8.1) 중에 50 μmol/리터 S-2238 (H-D-Phe-Arg-NH-NO₂-HCl, 트롬빈-특이적 기질; Chromogenix, Molndal, Sweden)을 첨가함으로써 2분 동안 색이 발현되었다. 방출된 착색 생성물의 흡광도를, Vmax 미세역가 플레이트 판독기 (Easy Reader, EAR 340AT, SLT Lab Instruments GmbH, Vienna, Austria)를 사용하여 405 nm의 파장에서 분광광도측정으로 측정하였다. 측정치는 각 시점에서 3중으로 수득되었다.

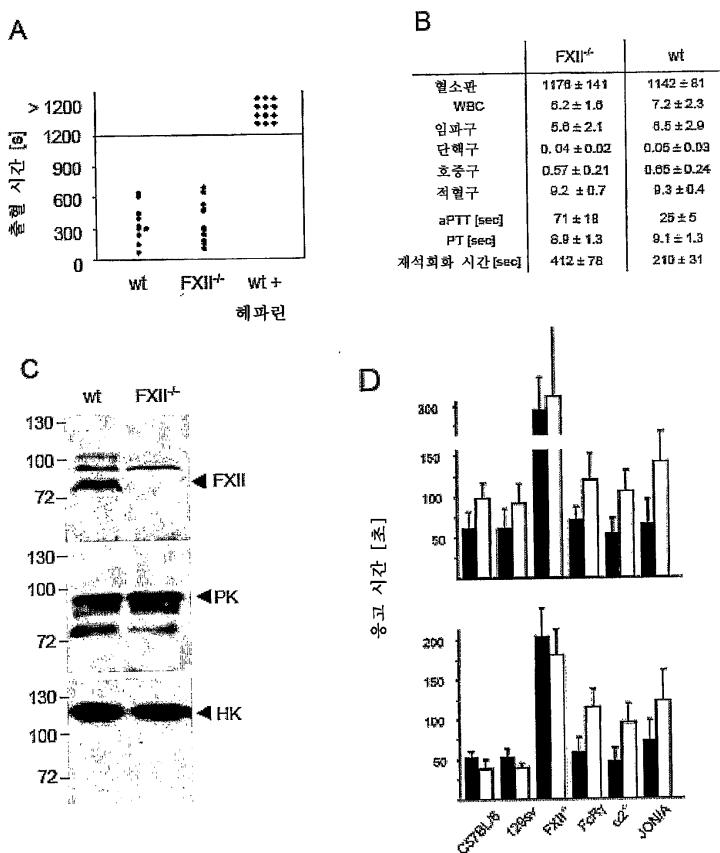
[0086] 통계 평가

[0087] 통계적 분석을 쌍을 이루지 않는 스튜던트 (Student) t 시험을 사용하여 수행하였다.

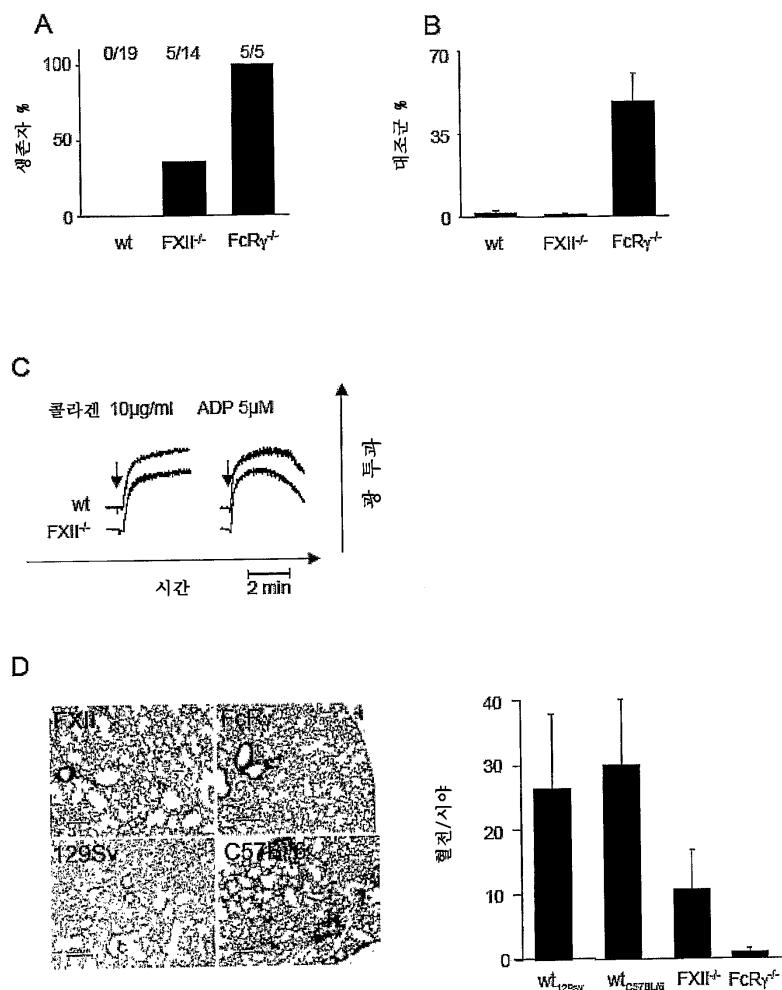
[0088] 본원에는 단지 바람직한 태양만이 구체적으로 설명되고 기재된 것이므로, 본 발명의 많은 변형 및 변화가, 본 발명의 취지 및 원하는 범위를 벗어나지 않으면서, 상기 교시 내용의 견지 및 첨부된 청구범위의 범위 내에서 가능하다는 것이 이해될 것이다.

도면

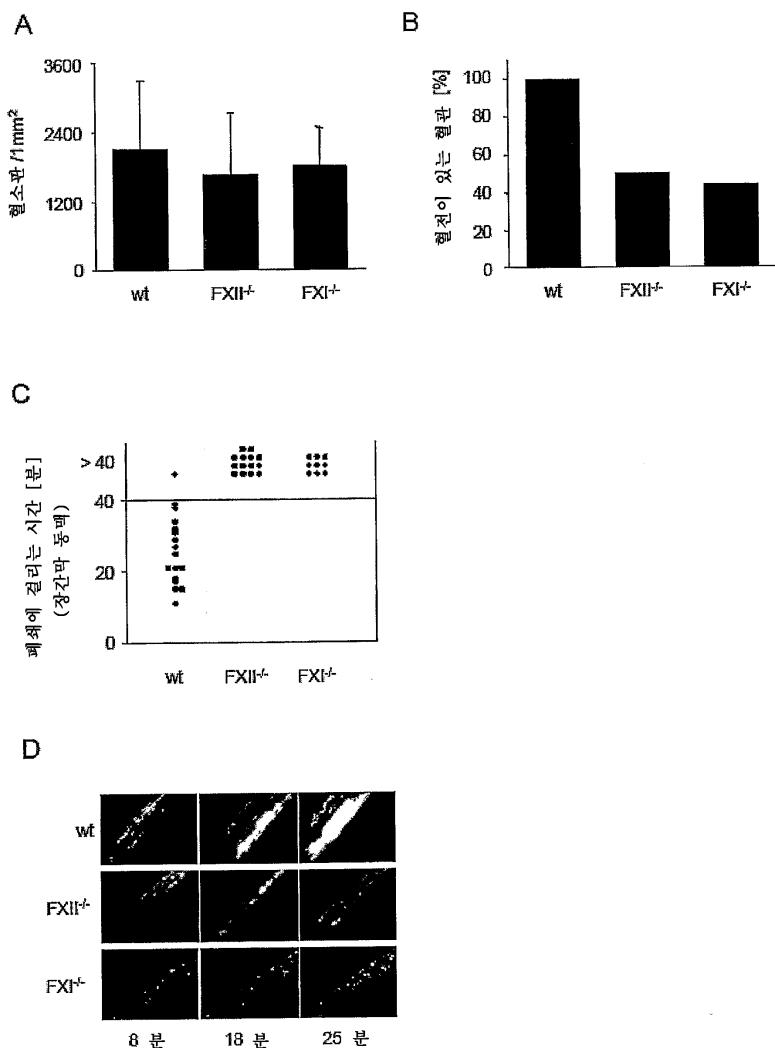
도면1



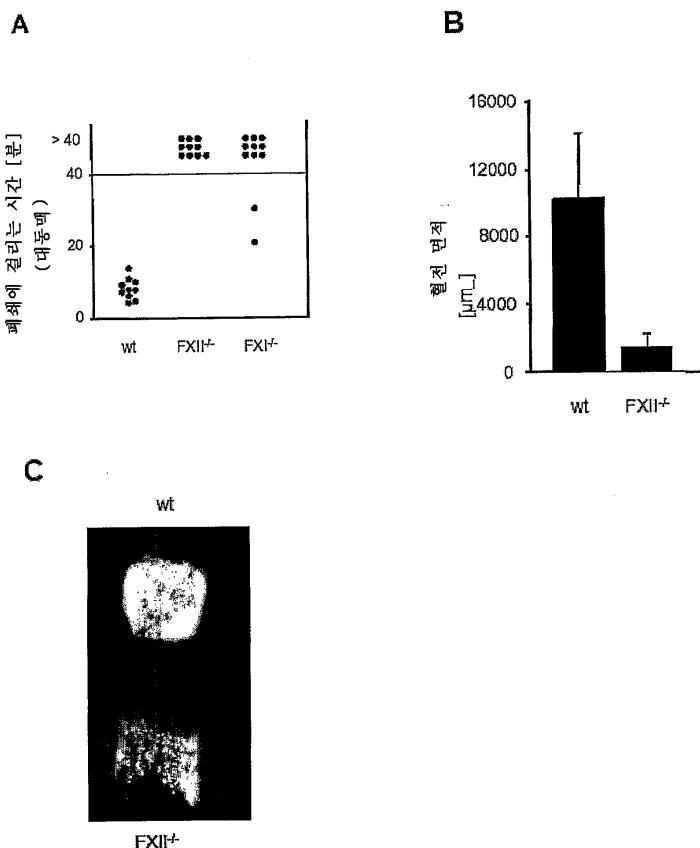
도면2



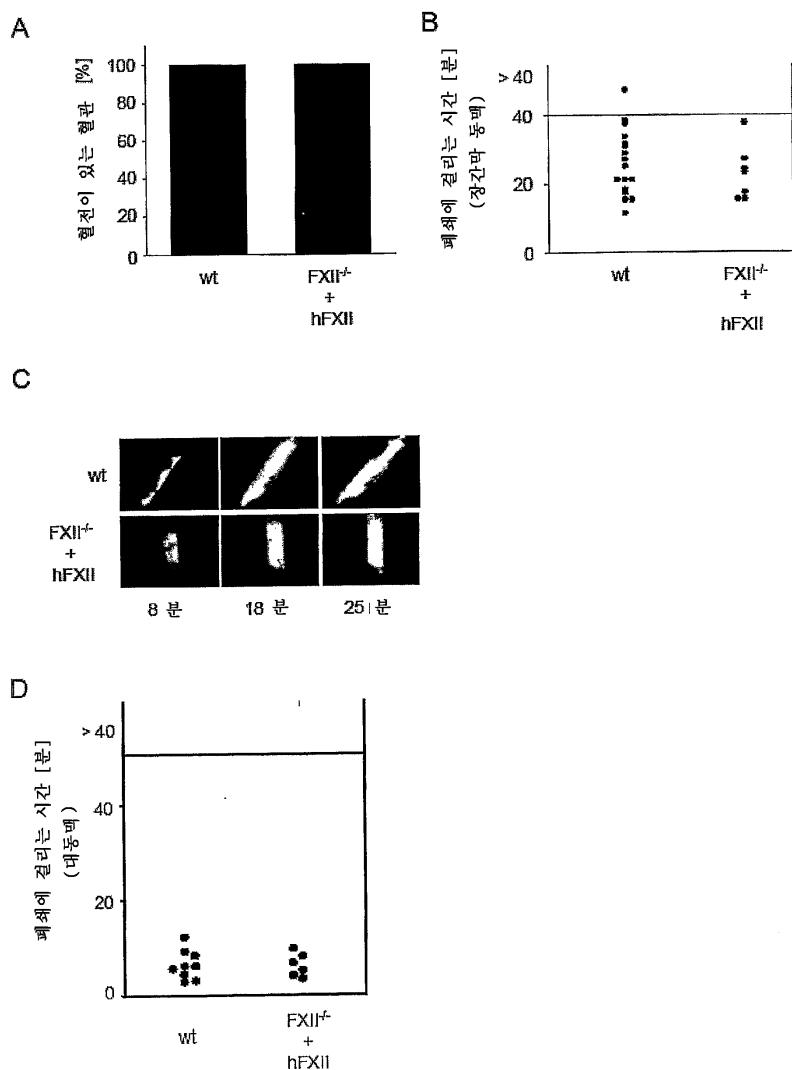
도면3



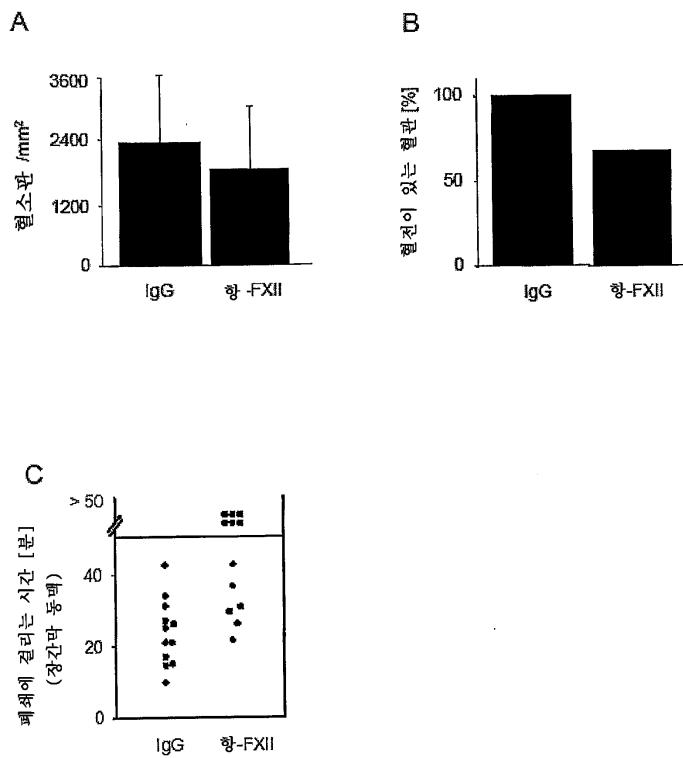
도면4



도면5

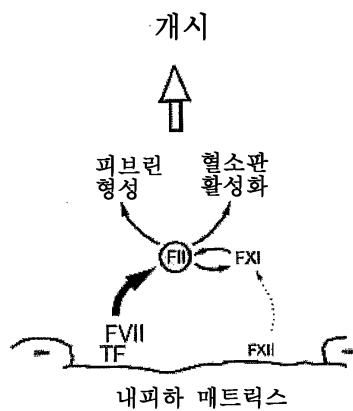


도면6



도면7

A



B

