

유전자 재조합에 의해 제조된 히루딘의 항응고 작용

김영식*¹ · 엄은미¹ · 정정숙²
정춘식² · 정기화² · 손정훈³ · 최의성³ · 이상기³

¹서울대학교 천연물과학연구소, ²덕성여자대학교 약학대학, ³한국과학기술원 유전공학연구소

Evaluation of Anticoagulant Activity of Recombinant Hirudin

Yeong Shik KIM*¹, Eun Mi EOM¹, Chung Sook JUNG², Choon Sik JUNG²,
Ki Hwa JUNG², Jung Hoon SOHN³, Eui Sung CHOI³ and Sang Ki RHEE¹⁴

¹Natural Products Research Institute Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

²College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

³Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejeon 305-606, Korea

(Received September 2, 1993, accepted October 12, 1993)

Abstract—Hirudin is a potent inhibitor of thrombin, which was originally obtained from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). Now it is being produced through the recombinant technology on a large scale. Recombinant hirudin has been assayed for the anticoagulant activity by the measurement of clotting time and the inhibition of thrombin activity using a chromogenic substrate. The assay range of partial thromboplastin time and thrombin time is within 0.2~1.0 µg/ml. Thrombin time is more sensitive to the measurement of clot. *Ex vivo* study showed the level of hirudin in rat plasma was highest in 10 min and then it was eliminated slowly. The half-life of r-hirudin was 80~110 min depending on the assay methods. Intravenous injection of russel viper venom was used for thrombus induction combined with vena cava ligation. Inhibition of venous thrombosis was observed with i.v. hirudin. It was dependent on the concentration of hirudin.

Keywords □ recombinant hirudin, evaluation, clotting time, chromogenic substrate, *ex vivo*, venous thrombosis.

히루딘은 항응고제로 30년전에 거머리(*Hirudo medicinalis*)로부터 분리 정제되었다(Markwardt, 1957). 65개의 아미노산으로 구성된 단일 사슬의 폴리펩타이드로서 thrombin과 1:1로 결합하여 가장 강력하고 특이적인 작용저해제로 알려져 있으며(Fenton, 1989) 헤파린 대신 동물과 사람에게 대해서 새로운 항응고 및 항혈전제로서의 높은 가능성을 보여주고 있다(Review, Markwardt, 1991; Seemuller 등, 1986). 히루딘의 아미노산 서열의 규명으로 최근에 들어 유전자 재조합을 통한 기술에 의해서 히루딘(r-히루딘)의 대량생산의 길(Fortkamp 등, 1986; Harvey 등, 1986)이 트여짐에 따라 치료약으로서 임상실험 및 독성실험이 가능하게 되었다(Bichler 등, 1988). 자연의 히루딘과 r-히루딘의 명백한 차이는 r-히루딘의 경우 63번 위치의 tyrosine에 sulfate기가 없는 점이다. 응용분야는 정맥(Raake 등, 1991; Doutremepuich

등, 1990) 및 동맥의 혈전증(Kaiser 등, 1990), 체외 순환(extracorporeal circulation), 기타 혈관폐색증(Kaiser 등, 1990) 등이다. 히루딘은 헤파린과는 달리 antithrombin III(ATIII)의 protease저해제를 요하지 않고 직접적으로 thrombin을 저해시키는 작용을 하기 때문에 범발성혈관내용고증(disseminated intravascular coagulation)에도 효과를 기대할 수 있다(Nowak과 Markwardt, 1991; Zawilska 등, 1993).

본 연구는 유전공학기술을 이용해 국내에서 처음으로 만들어진 히루딘에 대해서 실험실내의 활성검색방법과 동물내에서의 활성검색방법등을 통하여 r-히루딘의 약리학적 평가에 관해 주안점을 두었다.

실험방법

재료 및 시약

R-히루딘은 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시켜 분

* To whom correspondence should be addressed.

비된 것을 HPLC에 의해 정제한 것으로 한국과학기술연구원 유전공학연구소에서 제공받았다. R-히루딘은 거머리의 습성이나 채취조건에 따라서 여러 변형체들이 발견되었다(Scharf 등, 1989). 제공받은 히루딘은 isoform으로 r-HV2이다. 이것의 thrombin 저해 활성은 13000 ATU/mg이었다. 1 ATU unit는 1 NIH unit의 α -thrombin을 중화시키는 히루딘의 양이고 정제된 히루딘의 0.075~0.083 μg 에 해당되는 양이다(Markwardt, 1970). Activated partial thromboplastin(aPTT)측정 kit, thrombin time(TT) 측정 kit, Chromozym TH(Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA), aprotinin, PEG 6000, russel viper venom(RVV, 응고유도제), thrombin, 뱀독(*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) 등은 Sigma 회사에서 구입을 하였고 대조군으로서의 recombinant 히루딘(10000 ATU/mg)은 Accurate Chemical Co(USA)의 제품을 사용하였다. Urokinase는 (주)녹십자의 제품이었고 ketamine은 유한양행의 것을 사용하였다. 사람의 혈장은 정상인 사람으로부터 채혈한 것을 서울대학교병원 혈액은행에서 구입을 하여 사용을 하였다.

실험동물

Sprague-Dawley계 흰쥐 180 g에서 250 g 이내의 수컷을 1주 이상 동물실에서 사육하여 실험에 사용하였고 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

In vitro에서 항응고작용의 측정

Activated partial thromboplastin time(aPTT) : 0.02 M CaCl_2 용액과 100 μl 의 aPTT시약을 미리 37°C 에서 각각 1분간 배양하였다. 100 μl 의 혈장(r-히루딘 포함)을 위의 aPTT시약에 넣고 정확히 3분간 배양한 다음 100 μl 의 CaCl_2 용액을 재빨리 가하자마자 loop로 시험관 벽을 자극을 주면서 응고될 때 까지의 시간을 기록하였다.

Thrombin time(TT) : 시료가 포함된 혈장 200 μl 를 2분간 37°C 에서 배양한 다음 100 μl thrombin time시약을 넣고 loop로 시험관벽을 자극을 주면서 응고될 때 까지의 시간을 측정하였다.

발색기질에 의한 thrombin 활성 측정 : 먼저 7.5 mM EDTA를 포함한 0.05M Tris-HCl완충액(pH=7.8) 400 μl , 약물을 첨가한 혈장 100 μl 를 37°C 에서 3분간 배양하고 thrombin 50 μl 를 가한 다음 30초 후에 발색기질 Chromozym TH(0.75 mM) 200 μl 를 가하고 3분 후에 50% (V/V) 빙초산을 넣어 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. r-히루딘을 넣지 않았을 때의 흡광도로부터 r-히루딘을 넣은 후 흡광도차를 그래프화하였다.

Ex vivo에서 항응고작용의 측정

무게 200~230 g Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에 0.25 mg/kg의 농도로 r-히루딘을 꼬리 정맥으로 투여하였다. 투여 후 일정한 시간 간격으로 (0.5, 10, 15, 30, 60, 120 분) 심장에서 채혈하여 3.8% 구연산나트륨 용액이 정확히 9 : 1이 되게하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여

혈소판이 없는 혈장(platelet poor plasma)를 제조하였다. 이것을 시료로 하여 aPTT, TT, 그리고 발색기질을 이용한 thrombin 활성을 측정하였다. 발색기질에 의한 thrombin 활성 측정시 완충액(0.2 M Tris-HCl, 0.025 M NaCl, pH 8.1)에 urea 0.833 M, aprotinin 0.7 TIU/ml이 되도록 만들었고 thrombin과 polybrene을 완충액에 희석시켜 "혼합시약"(thrombin 0.31 NIH unit/ml, polybrene 100 ng/ml)을 제조하였다. "혼합시약"에 시료 20 μl 를 가하고 1분간 37°C 에서 방치한 다음 발색기질(Chromozym TH) 200 μl (0.75 mM)를 가하여 3분간 반응시킨 후 50%(V/V) 빙초산을 넣어 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에 대해서 thrombin에 대한 저해율을 계산하여 aPTT, TT 결과와 함께 결과를 정리하였다.

In vivo 정맥 혈전모델에 대한 효능

보고된 방법을 수정하여서 정맥혈전 모델을 유발시켰다(Fareed, J. 등, 1985 ; Hladovec, 1986). 간단히 기술하면 일주일간 사육시킨 180~220 g의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 ether로 흡입마취시키고 ketamine 100 mg/kg으로 근육을 이완시켰다. 흰쥐 복부를 절개한 후 대퇴정맥내에 heparin 투여군은 1 mg/kg, 히루딘 투여군은 히루딘 0.25 mg/kg을 각각 주사하고 5분 후 응고유발물질인 RVV 0.01 U를 대퇴정맥내에 투여하였다. 1분 후에 신정맥 아래의 하대정맥을 결찰하고 10분 후 처음 결찰한 부위로부터 1 cm 아래를 묶고 혈관을 적출한 후 생리식염수로 세척하고 24시간 방치 후 혈전무게를 측정하였다. Heparin 이외의 대조군으로서 뱀독과 urokinase의 경우는 미리 대퇴정맥내에 RVV 0.01 U를 투여하여 혈전을 유발시키고 10분 후 약물을 투여하였고 위와 같은 조작을 통하여 정맥의 혈전에 미치는 영향을 비교 분석하였다.

통계처리

모든 실험치는 평균치와 표준편차를 계산하였고 대조군과 처리군간의 차이에 의한 통계적 유의성을 student's t-test에 의하여 평가하여 판정하였다.

실험결과

시험관 내에서 항응고작용

aPTT측정 : R-히루딘을 0 U/ml에서 20 U/ml로 희석시켜 위의 방법대로 측정을 한 결과가 Fig. 1에 나타나 있다. 위의 범위 내에서 semi-log화 하였을 때 직선화가 이루어졌고 그 이상에서는 응고 형성이 거의 이루어지지 않았다. 대조군으로 사용한 Accurate Co 제품의 히루딘과 활성면에서 거의 차이가 없는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). aPTT는 내인적 응고인자에 기인된 측정 방법으로 가장 널리 사용되어지고 있는 방법이다.

Thrombin Time 측정 : R-히루딘을 0에서 2.5 U/ml로 희석시켜 측정을 한 결과가 Fig. 2에 그려졌다. 대조군과

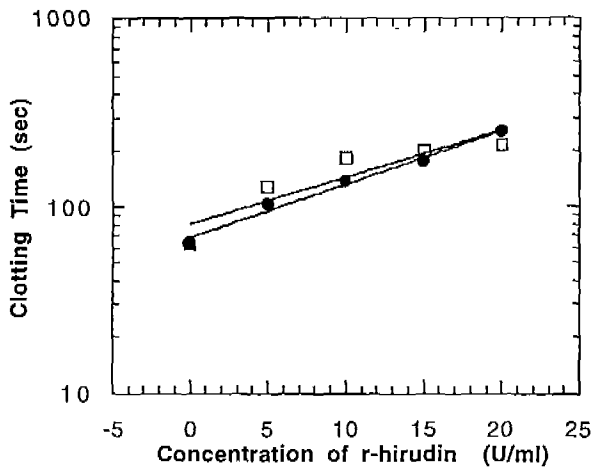


Fig. 1. *In vitro* response of recombinant hirudin by activated partial thromboplastin time assay (n=3). ●—●: homemade r-hirudin; □—□: commercial r-hirudin.

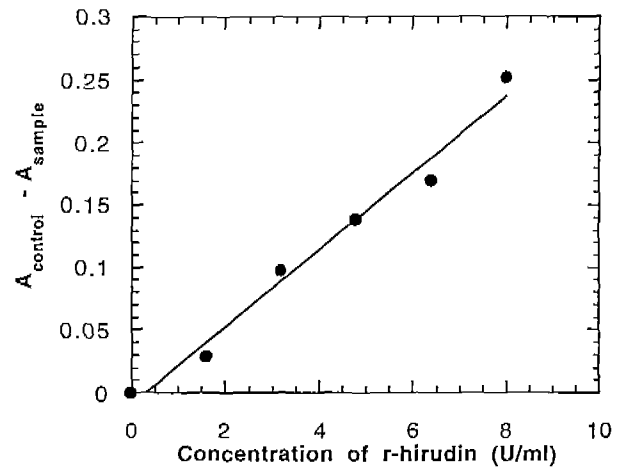


Fig. 3. *In vitro* response of recombinant hirudin by chromogenic substrate. The absorbance corresponding to each concentration was subtracted from that of control.

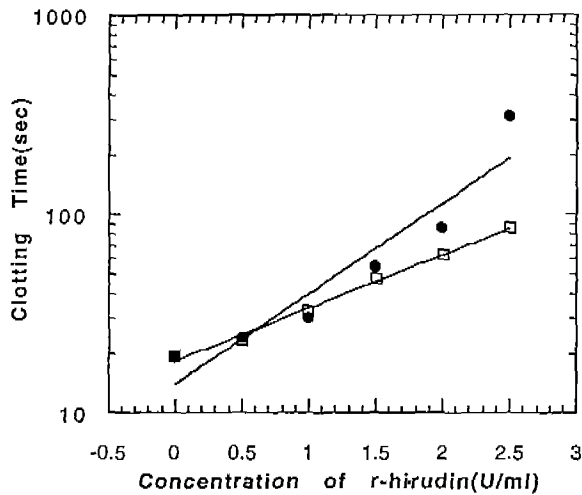


Fig. 2. *In vitro* response of recombinant hirudin by thrombin time assay (n=3). ●—●: homemade r-hirudin; □—□: commercial r-hirudin.

비교하였을 때 r-히루딘의 농도가 2.5 U/ml 이상일 때 300초 이상이 되어도 응고가 되지 않았고 대조군의 히루딘(Accurate Co)은 2.5 U/ml의 농도내에서 TT 측정이 가능하였다. APTT와 비교하였을 때 거의 10배 정도 낮은 농도에서 응고 시간을 측정할 수 있어 히루딘의 활성을 평가할 수 있는 방법으로 제시될 수 있었고 또한 히루딘이 thrombin의 특이적 저해제임을 알 수 있었다.

Thrombin 저해작용 측정: Thrombin 작용을 측정하는 방법으로 발색기질인 Chromozym TH를 이용하여 측정하였다. 히루딘의 농도는 8.0 U/ml 내에서 실험방법에 의해서 실시하였다. Fig. 3은 히루딘의 농도를 변화시키면서 thrombin 활성 저해효과를 3분간 반응시킨 후 대조군(r-hirudin이 없을 때의 흡광도)과 비교하여 흡광도 차를 나타낸 것이다. 히루딘이 증가할수록 대조군에 대

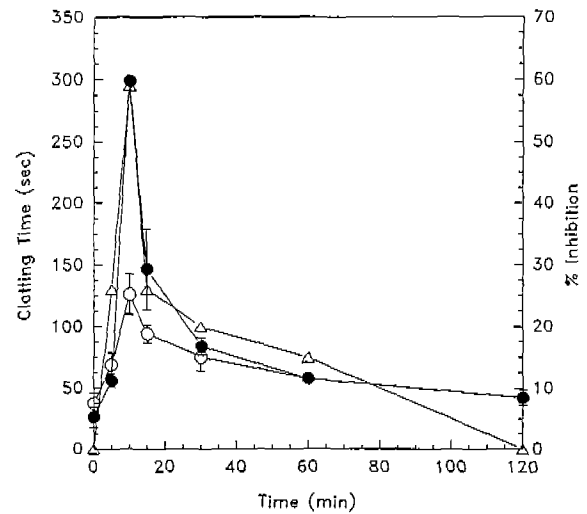


Fig. 4. *Ex vivo* effects of recombinant hirudin in the aPTT, TT and chromogenic assay. Results represent a mean ± SD (n=6 or 7).

$$\text{Percent inhibition} = \frac{A_{405}(\text{control}) - A_{405}(\text{sample})}{A_{405}(\text{control})} \times 100$$

○—○: activated partial thromboplastin time; ●—●: thrombin time; △—△: chromogenic assay.

해서 30% 정도의 thrombin 저해효과가 나타났다.

Ex vivo에서 시간별 혈중농도의 변화

흰쥐에 대해 시간별로 투여후 혈액을 채취하여 혈장 중의 히루딘에 대해서 위의 세가지 측정 방법을 이용하여 농도를 계산할 수 있었다(Fig. 4). APTT 및 TT의 응고 시간 측정에서 10분내에 최대로 히루딘의 농도가 분포되었고 점차 떨어져 2시간내에 거의 배출되는 것처럼 보였다. APTT는 10분내에서 120초의 응고시간이 측정되었는데 농도로 환산할 경우 0.5 μg/ml의 농도이다. TT는 1/3로 혈장을 희석시켜서 측정을 하였을 때 300초

Table I. Inhibition of venous thrombus formation by hirudin

Concentration (mg/kg)	Number of Animals	Thrombus weight (mean±S.D.)	% Inhibition
Control	6	0.035±0.005	
0.13 mg/kg	6	0.017±0.003*	52
0.25 mg/kg	6	0.012±0.005*	66
0.5 mg/kg	6	0.007±0.001*	80

*Significantly different from the control group (p<0.01).

Table II. Inhibition of venous thrombus formation in rats

Treatment	Number of Animals	Thrombus weight in mg (mean±S.D.)
Control	7	0.0429±0.017
Hirudin (0.25 mg/kg)	7	0.0268±0.006*
Heparin (1.0 mg/kg)	7	0.0347±0.012*
Control	6	0.0459±0.018
Snake Venom (1.25 mg/kg)	6	0.0402±0.007
Urokinase (2000 U/kg)	6	0.0258±0.007

*Significantly different from the control group (p<0.05).

이상이 되어 검량선 범위 밖으로 벗어났다. 발색기질을 이용하여 측정하였을 때도 최고 혈장 농도는 비슷한 경향을 보여 10분대에서 농도가 최고가 되었다. 반감기는 약물동력학의 noncompartment 모델에 의거해서 계산하였을 때 각각의 assay 조건에 따라서 값이 차이가 났지만 80~110 분대에 들어왔다.

In vivo 혈전모델에 대한 r-히루딘의 효과

신장의 하대정맥을 결찰시켜서 만들어진 혈전에 대해 히루딘을 용량별로 투여하였을 때의 결과는 Table I과 같다. 즉 히루딘을 0.13, 0.25, 0.5 mg/kg의 농도로 투여하였을 때 혈전의 무게는 각각 0.017, 0.012, 0.007 mg으로 용량의존적으로 감소됨을 알 수 있었다. 또한, 정맥의 혈전 억제에 관해 헤파린, urokinase, 뱀독(*Agkistrodon piscivorus piscivorus*)과 비교한 결과가 Table II와 같다. RVV만 투여하였을 때의 혈전 무게는 0.0429 mg이었으나 히루딘은 0.0268 mg으로 유의성 있는 억제효과를 보였으며 대조약물인 헤파린에 비해서 억제작용이 있음을 알 수 있었다. 작용 기전이 다른 뱀독 및 urokinase는 형성된 정맥의 혈전에 대해 통계적으로 유의성이 없었지만 용해 작용이 있음을 알 수 있었다(Table II).

고 찰

히루딘이 정제되어 최근에 들어서 효능검정의 방법적

인 면에서 많은 결과가 발표되었다. 대표적인 것이 응고시간의 측정(Walenga 등, 1991)과 발색기질을 이용한 thrombin활성의 측정이다(Spanngal 등, 1991).

혈액응고계내에서 히루딘은 내인적경로(intrinsic pathway)와 외인적경로(extrinsic pathway)에 의해서 만들어지는 thrombin과 결합하여 thrombin의 작용을 특이적으로 저해한다. 따라서 thrombin의 작용을 시험하는 방법인 응고시간의 연장을 측정할 수 있다. 특히 aPTT는 매우 흔하게 사용되는 방법으로서 쉽사리 히루딘의 역가를 측정하는 데 사용할 수 있다. 응고시간의 연장을 측정하는 방법으로는 aPTT(activated partial thromboplastin time), PT(prothrombin time), TT(thrombin time)이 널리 사용되어지고 있는데 히루딘의 경우 aPTT와 TT가 농도에 따라 상당히 민감하게 나타난다. 특히 TT측정을 이용하여 fibrinogen에 대한 응고시간이 위의 결과에서 나타난 것처럼 감도가 2.0 U/ml 내에서 추적이 가능하다. 농도로 환산하면 0에서 0.15 µg/ml의 범위에서 히루딘의 활성을 시험할 수 있다.

헤파린과 비교하였을 때 aPTT의 경우 0에서 0.3 U/ml 내에서 활성 측정이 가능하였다. 농도로 환산하면 2 µg/ml 내에서 응고를 확인할 수 있었기 때문에 히루딘이 2배에서 3배정도 적은 농도에서 가능하였다.

헤파린을 측정하는 방법중의 하나가 발색기질을 이용하여 thrombin에 의해 유리되는 발색단을 측정하는 것이다(Larsen, 1978). 이 경우는 헤파린 코팩터인 ATIII를 첨가하게 된다. 이에 반해 히루딘은 직접적으로 thrombin과 결합하여 thrombin의 작용을 저해하므로 히루딘을 측정하는 ATIII를 첨가하지 않고 직접 thrombin 활성을 측정하게 된다. 이러한 원리에 입각하여 thrombin의 농도(0~0.8 U/ml), 히루딘의 농도(0~0.8 µg/ml), 반응시간 등을 변화시키면서 가장 최적의 조건을 잡도록 하였다. 위의 응고시간 측정방법에 비해서 정량적으로 결과를 얻을 수 있는 장점이 있는 반면에 thrombin의 활성에 민감하게 작용하기 때문에 항상 대조군에 대해서 비교해야 할 것이다.

히루딘은 실험동물(흰쥐)에 투여시 약 10분내에 혈액 응고시간이 5분 이상이 되어 응고가 일어나지 않았다. 즉 10분 후에 혈중내에 최고치가 관찰되었으며 그 후에 급격히 떨어져 2시간 때에는 투여전과 비교하였을 때 응고시간이 거의 같은 것으로 보아 대부분이 2시간 내에 배출되는 것처럼 보였다. 또한 응고시간측정과 발색기질을 이용한 결과가 거의 일치하였다. 거머리로부터 분리한 히루딘이나 r-히루딘의 반감기는 여러 실험동물을 통해서 비교적 짧은 50~70분 정도인 것으로 나타나고 있다(Markwardt 등, 1987; Bichler 등, 1988; Richter 등, 1988). 본 결과에서도 거의 비슷한 경향을 보이고 있는 것으로 보아 제조된 r-히루딘이 약리학적 성질면에서 이미 보고된 것과 차이가 없다고 생각된다. 그러나, 정확한 약물동력학적 변수를 계산하기 위해서는 항원

항체 반응을 이용한 면역학적 측정방법에 의해 혈장내의 히루딘 농도를 정량적으로 측정할 필요가 있다. 히루딘이 면역학적으로 항원성이 상당히 약하지만 최근에 단일 클론 항체가 제조되었고 히루딘을 측정할 수 있는 kit가 개발되어서 히루딘의 체내에서 흡수, 분포, 배설을 정확히 측정할 수 있게 되었다(Lalitha 등, 1993).

정맥의 혈전을 일으키는 주모델은 Wessler의 방법으로 혈액응고를 활성화 시키거나 혈관의 흐름을 정지시켜서 만들 수 있고(Wessler, 1959) Hladovec은 차아(hypotonic) 생리식염수를 정맥주사하여 혈관의 상해를 일으켜 혈전 모델을 만들었다(Hladovec, 1986). 그러나, 혈전형성의 판단이 쉽지 않아 응고유발제인 RVV를 주사하여 혈전을 만들어 히루딘에 대한 억제효과를 시험하였다. 혈전을 유발시켜서 혈전의 무게와 농도와의 관계를 우선 비교하였고 헤파린, urokinase와 같이 시험을 하여 정맥의 혈전에 대하여 효과를 검토하였다. 헤파린과 히루딘에 대해서는 t-test에 의해서 유의성이 나타났지만 urokinase나 뱀독에 대해서는 유의성이 관찰되지 않았고 단지 혈전형성에 대해 저해 효과가 나타났다. Table I과 Table II에 있어서 같은 농도(0.25 mg/kg)의 히루딘을 투여하였을 때 혈전의 무게가 서로 다른 이유는 실험상의 기술적인 차이점에 기인할 수 있다.

참고문헌

- Bichler, J., Fichtl, B., Siebeck, M. and Fritz, H. (1988). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hirudin in man after single and intravenous bolus administration. *Arzneim.-Forsch.* **38**, 704-710.
- Bucha, E., Nowak, G., Markwardt, F. (1988). Prevention of experimental coronary thrombosis by hirudin. *Folia Haematol.* **115**, 52-58.
- Doutremepuich, C., Lalanne, M. C., Doutremepuich, F., Walenga, F., Farred, J and Breddin, H.K. (1990). Comparative study of three recombinant hirudins with heparin in an experimental venous thrombosis model. *Haemostasis* **21** (Suppl.1), 99-106.
- Fareed, J., Walenga, J. M. and Kumar, A. (1985). A modified stasis thrombosis model to study the antithrombotic actions of heparin and its fractions. *Sem. Thromb. Hemostas.* **11**, 155-175.
- Fenton, J.W. (1989). Thrombin interactions with hirudin. *Sem. Thromb. Hemostas.* **15**, 265-268.
- Fortkamp, E., Rieger, M., Heisterberg-Moustes, G., Schweitzer, S. and Sommer, R. (1986). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a synthetic DNAs for hirudin, the blood coagulation inhibitor in the leech. *DNA*, **5**, 511-517.
- Harvey, R. P., Degryse, E., Stefani, L., Schamber, F., Cazena, J. P., Courtney, M., Tolstochev, P and Lecocq, J. P. (1986). Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1084-1088.
- Hladovec, J. (1986). A Sensitive model of venous thrombosis in rats. *Thromb. Res.* **43**, 539-544.
- Kaiser, B., Simon, A., Markwardt, F. (1990). Antithrombotic effects recombinant hirudin in experimental angioplasty and intravenous thrombolysis. *Thromb. Haemost.* **63**, 44-47.
- Larsen, M. L., Abildgaard, U., Yein, A. N. and Gjesdal, K. (1978). Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238). *Thromb. Res.* **13**, 285-301.
- Lalitha, L., Michael, K., Omar, I., Robert, C. and Fareed J. (1993). Studies on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant hirudin (rHV2-Lys 47) after intravenous and subcutaneous administration in dogs. *Thromb. Res.* **69**, 259-269.
- Markwardt, F. (1957). Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **308**, 147-156.
- Markwardt, F. (1970). Hirudin as an inhibitor of thrombin. In *Methods in Enzymology* (Perlmann, G.E. and Lorand, L.), pp. 924-932 New York-London, Academic Press.
- Markwardt, F., Nowak, G., Sturzebecher, U., Walsmann, P. (1987). Studies on the pharmacokinetics of hirudin. *Biomed. Biochim. Acta* **46**, 237-44.
- Markwardt, F. (1991). Hirudin and derivatives as anticoagulant agents. *Thromb. Haemost.* **66**, 141-152.
- Markwardt, F., Nowak, G., and Bucha, E. (1991). Hirudin as an anticoagulant in experimental hemodialysis. *Haemostasis* **21** (Suppl.1), 149-155.
- Nowak, G. and Markwardt, F. (1991). Hirudin in disseminated intravascular coagulation. *Haemostasis* **21** (Suppl.1), 142-148.
- Raake, W. Klausner, R. J., Elling, H. and Zeiller, P. (1990). Antithrombotic action of recombinant hirudin in a venous thrombosis model. *Haemostasis* **21** (Suppl. 1), 127-132.
- Richter, M., Cryanka, U., Nowak, G. and Walsmann, P. (1988). Pharmacokinetics of ¹²⁵I-hirudin in rats and dogs. *Folia Haematol.* **115** (1-2, S), 64-69.
- Scharf, M., Engel, J. and Tripiet, O. (1989). Primary structures of new 'isohirudins'. *FEBS Letters* **235**, 105-110.
- Seemuller, U., Dodt, J., Fink, E., and Fritz, H. (1986). Proteinase inhibitors of the leech *Hirudo medicinalis* (hirudins, bdellins, eglins). In *Proteinase Inhibitors*, (Barrett A.J. and Salvesen, G. eds) pp. 337-59 Amsterdam, Elsevier.
- Spannagal, M., Bichler, H., Lill, H., and Schramm, W. (1991). A fast photometric assay for the determination of hirudin. *Haemostasis* **21** (Suppl. 1), 36-40.
- Walenga, J. M., Hoppensteadt, D., Koza, M., Wallock, M., Pifarre, R. and Fareed, J. (1991). Laboratory assays for the evaluation of recombinant hirudin. *Haemostasis* **21** (Suppl. 1), 49-63.
- Wessler S., Reimer, S. M., Sheps, M. C. (1959). Biologic assay of a thrombosis inducing activity in human serum. *J. Appl. Physiol.* **14**, 943-946.
- Zawilska, K., Zozulinska, M., furowiecka, Z., Blahut, M. Drobnik, L and Vinazzer (1993). The Effect of a long-acting recombinant (PEG-Hirudin) on experimental disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* **69**, 315-20.