

저혈청 배지에서 생산된 scu-PA의 tc-PA로의 전환에 관한 연구

김영남·김현구·성기돈·김현규·박영식·이현용
강원대학교 식품공학과

Kinetics of Converting Single Chain Urokinase Type Plasminogen Activator into Two Chain Plasminogen Activator in Cultivating HEK Cells with Low Serum Containing Medium

Young Nam Kim, Hyun Goo Kim, Sung Ki Don, Hyeon Gyu Kim,
Young Sik Park and Hyeon Yong Lee

Department of Food Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

A modified amidolytic assay and a fibrin plate method were used to accurately measure the concentration of single chain urokinase type plasminogen activator (scu-PA) and two-chain urokinase type plasminogen activator (tc-PA) in the spent media. 1.65×10^6 viable cells/ml of maximum cell density and 1670(IU/ml) of scu-PA concentration were obtained in 1% serum containing medium. The overall conversion ratio from scu-PA to tc-PA was less than 10%. In the results of batch cultivation in a spinner vessel, 4.43×10^6 (total cells/ml) of maximum cell density and 1560(IU/ml) of scu-PA concentration was observed. The maximum scu-PA concentration and specific scu-PA productivity were obtained in 1760(IU/ml) and 3.13×10^{-4} (IU/cell), respectively, from perfusion cultivation. The conversion ratios from batch, fed-batch and perfusion cultivations were less than 12%, which means that about 90% of scu-PA secreted from the cells can be maintained during the cultivations.

서 론

Plasmin은 비활성의 Plasminogen으로부터 활성화되어 혈전(fibrin clot)을 용해시키는 효소이다. 현재 면역학적으로 뚜렷이 구분되어지는 Plasminogen activator(PA)로서 tissue-type plasminogen activator(t-PA)와 urokinase-type plasminogen activator(u-PA)가 알려져 있으며, 이중 u-PA는 55,000 Dalton의 분자량을 지닌 Serine protease이다(1). 이들 PA는 fibrin-localized clot lysis의 효력을 지니며, 서로 다른 기작으로 작용한다. 최근에는 fibrin-specific thrombolytic activity가 강한 새

로운 혈전 용해제로 single-chain urokinase type plasminogen activator(scu-PA)가 사람의 뇌(2, 3), 혈장(4) 및 여러 가지 종류의 동물 조직세포와 신장세포 배양액(5-11), 그리고 유전적으로 재 조합된 세포배양액으로부터 발견되어 차세대 혈전 용해제로서 관심을 끌고 있으며, 대량생산이 시도되고 있다. scu-PA는 plasmin의 작용을 받아 two-chain 형태의 활성형으로 전환되므로 발견 초기에는 pro-urokinase라고 명명되었으나 분자량 55,000 Dalton의 scu-PA가 갖는 효소적 성격이나 혈전 용해(fibrinolysis)기작에 있어서 u-PA와는 차이가 있음이 밝혀져 scu-PA로 명명하게 되었다(2-11).

scu-PA는 세포배양 중, 혹은 배양액의 분리 정제과정 중에 아직까지 알려지지 않은 원인으로 해서 그 일부가 tc-PA로 전환된다. 이같이 형성된 tc-PA는 fibrin에 대한 친화도가 혈전 용해력이 극격히 감소하게 된다. 이때문에 동물세포배양을 통해 목적하는 scu-PA의 대량생산 및 생산성 향상을 위해서는 세포배양기간 중 일어나는 scu-PA의 전환에 대한 연구가 요구되나 이제까지 이에 대한 동력학적 연구가 이루어진 것이 없다. 따라서 본 논문에서는 urokinase 활성 측정에 사용되어왔던 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를(12~14) 변형하여 발색기질인 S-2444를 이용한 modified amidolytic assay와 fibrin plate method를 이용해 저혈청배지에서 다양한 형태의 배양방법으로 배양하여 생산된 scu-PA가 배양 중 또는 분리, 정제 과정 중에 일어나는 활성의 변화에 대한 동력학적 연구를 수행하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주는 Human Embryonic Kidney(HEK) cell로서 본 연구실에서 배양, 유지하고 있는 세포를 이용하였다. 배양 배지는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)과 Nutrient mixture F-12(HAM)을 1:1로 하여 3차 종류수 1ℓ에 용해시킨 후 Aprotinin 10KIU/ml를 첨가하여 0.2/μm의 세공 직경을 갖는 필터로 멸균 여과하고 Fetal Bovine serum(FBS)(Gibco, U.S.A.)을 1%로 첨가하였다.

T-Flask를 이용한 세포배양은 37℃에서 5% CO₂의 공기 조성을 갖는 CO₂ Incubator 안에서 행하였다. 세포가 confluent상태에 도달하였을 때 200(IU/ml)의 trypsin으로 떼어낸 후 약 5~7×10⁴(viable cells/ml)으로 1.2ℓ Spinner flask(Bellco, U.S.A.)에 접종하여 회분식 및 유가식배양을 하였다. Spinner flask에 세포를 접종한 후 미립담체로서 2(g/ℓ) Cytodex III(Sigma, U.S.A.)를 첨가하였다. 이어 약 2시간 가량 정치한 후 세포가 미립 담체에 접착된 것을 확인한 후에 45rpm으로 impeller를 회전 시켰으며, 5% CO₂가 포함된 공기를 head space aeration방법으로 투입하여 37℃에서 배양하였다. 유가식 배양을 위해서는 배양 초기에는 550ml의 working volume으로 회분 배양을 시작해 세포수가 일정 농도에 도달한 후 일정속도로 신선한 배지를 유입해

최종 배지농도가 1.3ℓ에 도달했을 때 배양을 멈췄다. 배양조(NBS, Celligen, U.S.A.)에서 의한 연속 배양은 pH(7.0), 용존산소(30%) 및 온도(37℃) 그리고 배양조 부피는 level probe로 1.2ℓ에서 자동 조절되며 perfusion 배양을 수행했다.

배양 중 생육 세포수는 매일 30ml의 sample을 취해 dye exclusion(15, 16) 방법으로 측정했으며, 미립담체에서 접착된 총 세포수는 nuclei count(17) 방법을 이용하였다. 배양액 중의 glucose 농도는 Glucose kit(Kyokuto Pharmaceutical, Japan)를 이용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

scu-PA의 분리 및 정제

세포 배양액을 2,000rpm으로 5분간 원심분리한 후 Ultra filtration membrane(10,000 M.W cut off, MFS, U.S.A.)으로 10배 농축시켰다. 이어 S-Sepharose fast flow(Pharmacia사, U.S.A.) column(3cm×50cm)을 0.15M NaCl/0.02M Na₂HPO₄, (pH 6.0) buffer로 평형시킨 뒤, 농축시킨 배지를 0.5ml/min의 속도로 통과시켰고, 동일 완충용액으로 충분히 세척한 뒤, 0.5M NaCl/0.02M Na₂HPO₄, (pH 6.0) buffer로 scu-PA를 용출시켰다. 유출된 분획은 280nm에서 흡광도를 측정하여 활성이 높은 분획을 모아 다시 10배 농축하고, 1M NaCl/0.02M Na₂HPO₄, (pH 7.0) buffer로 평형시킨 p-ABZ affinity resin(collaborative Research, U.S.A.)을 0.3ml/min의 속도로 통과시킨 후, pH 7.5로 조절한 동일 완충용액으로 세척한 뒤 0.1M NaCl/0.1M sodium acetate buffer로 pH 5.0에서 pH 2.0의 pH 구배를 이용하여 scu-PA를 유출시켰다.

scu-PA 활성 측정

scu-PA의 활성은 chromogenic substrate인 pyro-glu-Gly-Arg-p-Nitroanalide(S-2444, Kabi Diagnostics, Sweden)를 이용한 Amidolytic assay와 plasminogen이 함유된 fibrin plate을 이용하여 lysis zone을 측정하는 assay 방법(18~21)을 이용하였다. 매일 일정한 간격으로 모아진 배양액을 0.5M tris, 0.08N HCl, 0.8M NaCl, 0.2% tween 80을 포함한 buffer(pH 8.8)로 배양액 중의 scu-PA 농도가 0~20IU/ml가 되도록 임의적으로 회석시켜 60μl를 96-well-plate의 두 줄에 각각 넣은 후, 한쪽 시료에는 1IU/ml의 plasmin 5μl를 다른 한쪽에는 0.1% BSA 5μl를 넣어, 37℃에서 20분간 활성화시켰다. 이어 800 KIU/ml의 Aprotinin 10μl로

반응을 정지시킨 뒤 3mM의 S-2444용액 0.5ml를 증류수 4.5ml 및 buffer 1ml와 혼합시킨 용액 192 μ l를 37°C에서 90분간 반응시켰다. 이 발색반응은 50% Acetic acid 40 ℓ 로 정지된다. 발색된 시료는 405nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준으로 사용한 urokinase의 활성단위를 검정으로 하여 활성을 구하였다. 아울러 배양액 중에 존재하는 모든 형태의 u-PA의 농도를 fibrin plate 방법(22)으로 측정하여 배양액 중의 전체 u-PA(total UK)의 농도로 하였다. 따라서 이같이 측정된 total UK와 chromogenic substrate를 이용해 측정된 scu-PA의 차가 tc-PA 양이다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 1% FBS를 포함한 배지로 T-flask에서 6일간 배양한 결과이다. 약 7.2×10^4 (viable cells/ml)로 접종된 세포는 배양 최종일 1.7×10^6 (viable cells/ml)의 최대 생육 세포수를 보였으며, 95% 이상의 높은 생육도를 보였다. 생산된 scu-PA는 배양 3일째 세포가 약 1.5×10^5 (viable cells/ml)에 도달한 이후 급격히 증가하여 1670(IU/ml)의 최대 생산량을 보였다. 아울러 배양기간이 경과함에 따라 1%의 저혈청배지임에도 불구하고 tc-PA로 전환되는 양 또한 서서히 증가하였으나 전반적으로 10% 미만의 낮은 전환율을 보였다. 이는 일반적으로 5% 이상의 혈청이 포함된 배지에서 생성된 많은 양의 serine protease 계통의 단백질(주로 tPA, scu-PA 등)이 혈청 내 존재하는 proteolytic enzymes과 PA Inhibitor 등에 의해 two chain form으로 전환되는 경우에 비해 (23) 매우 낮은 수치임을 알 수 있다. 또한 Fig. 2는 Fig. 3의 실험에서 배양시간에 따라 저혈청배지에서 세포가 담체에 접착되는 과정을 나타낸 것이다. 초기에 0.7(g/l)의 미립담체와 접종된 세포는 8시간이 경과한 후에 담체표면에 접착되어 Fiber를 형성하여 갔으며, 배양 5일이 지나면서 활발하게 생육하여 담체표면에 confluent상태에 도달하였다. 따라서 0.5(g/l)의 담체를 추가 접종한 결과 Fig. 2의 D에서 볼 수 있듯이 세포는 담체에서 담체로 이동하여 생육하였다.

Spinner vessel에서의 회분식 배양에서도 Fig. 3에 나타내었듯이 세포는 배양 8일째 4.43×10^6 (total cells/ml)의 최대 세포수를 보였으며, 이후 급속히 감소하였다. 반면에 생산된 scu-PA는 총 세포 수가 약 1.9×10^5 (total cells/ml)에 도달한 배양

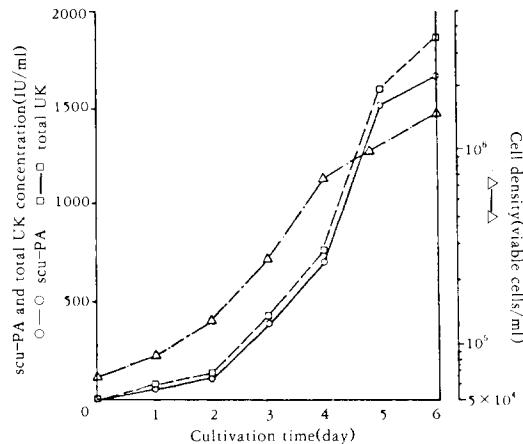


Fig. 1. The conversion of scu-PA to tc-PA according to cultivation time for the growth of HEK cells in 1% FBS containing medium.

6일 이후부터 급격히 증가하여 세포수가 감소함에도 불구하고 적은 양이기는 하나 지속적인 증가를 보였으며, 최대 1560(IU/ml)를 나타내었다. 배양기간이 경과함에 따라 tc-PA가 전환되는 양은 배양 9일 이후 조금씩 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이때의 scu-PA의 전환율은 약 12% 이하를 보였다. 배양배지 중의 가장 중요한 에너지원인 glucose의 농도는 세포수가 급격히 증가하는 배양 9일까지 급격한 감소를 보이고 있다.

Fig. 4는 유가식 배양의 결과로서 배양초기 약 6.7×10^4 (total cells/ml)로 접종된 세포는 배양 5일 까지 급격한 세포수의 증가를 보여 0.06(ml/min)의 속도로 신선한 배지를 주입시킨 결과 다소 낮은 성장율을 보였다. 배양 9일째 약 2.4×10^6 (total cells/ml)에 도달해 다시 0.08(ml/min)의 속도로 배지 유입 속도를 증가시켰으나 세포는 지속적인 증가를 보여 6.4×10^6 (total cells/ml)의 최대 세포수에 도달하였다. 배양기간이 경과함에 따라 생산된 scu-PA는 배양 2일부터 급격한 증가를 보여 배양 12일 째 1570(IU/ml)의 최대 생산량에 도달하기까지 10% 미만의 전환율을 나타내었다. 이후 약 3일간 1500(IU/ml) 정도를 유지하였으나 배지 유입속도를 0.15(ml/min)으로 증가시킨 결과 세포의 농도는 완만한 감소를 보이면서 tc-PA로 변화되는 양이 약간의 증가를 보였다. 배양중의 glucose 농도는 회분식 배양과 비슷한 결과를 나타내었다.

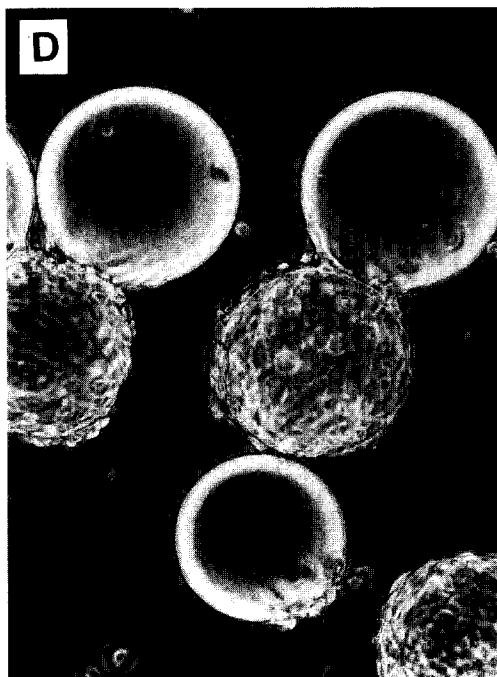
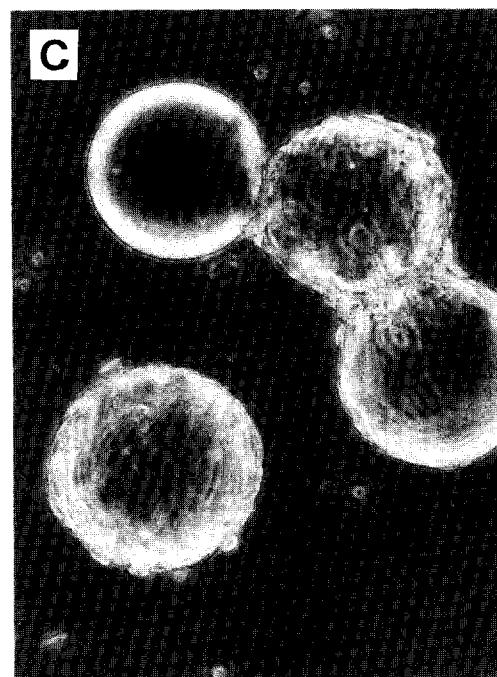
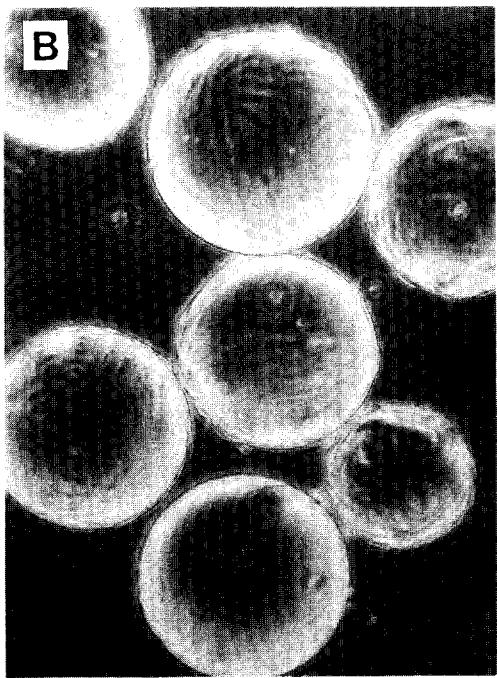
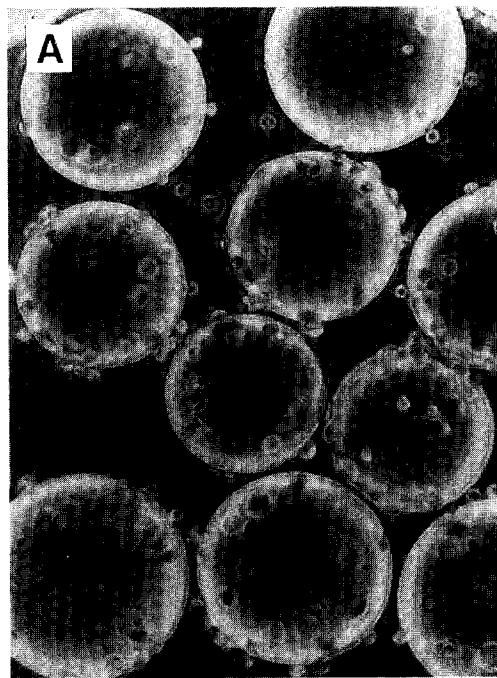


Fig. 2. The pictures of HEK cells spread on Cytodex III. Photographed at A: 8h, B: 24h, C: 96h, D: 120h.

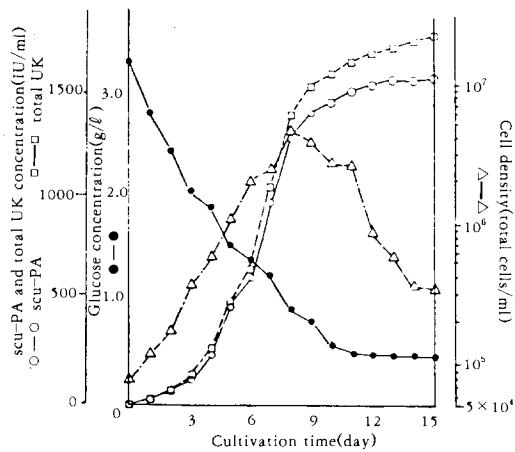


Fig. 3. Kinetics of cell growth and conversion of scu-PA to tc-PA in batch cultivation in 1% FBS containing medium by a spinner vessel.

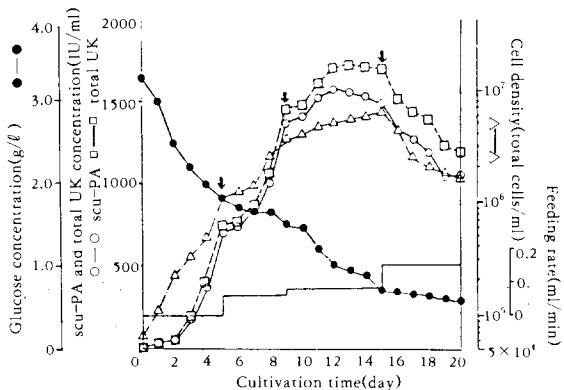


Fig. 4. The cell growth and conversion into tc-PA under fed-batch cultivation of HEK cells in 1% FBS containing medium by a spinner vessel. Arrows indicate the starting points of adding fresh medium: the first feeding rate was 0.06ml/min and the second and third feeding rate were 0.08 and 0.15ml/min. Final volume was 1.3ℓ.

Perfusion 배양의 결과를 나타낸 것이 Fig. 5로서 세포는 지속적으로 증가하여 약 1.65×10^6 (total cells/ml)에 도달한 배양 8일째에 1190(IU/ml)의 scu-PA를 생산하였고 평균 4.9%의 전환율을 나타내었다. 이는 다른 배양방식에서 보다 낮은 전환율

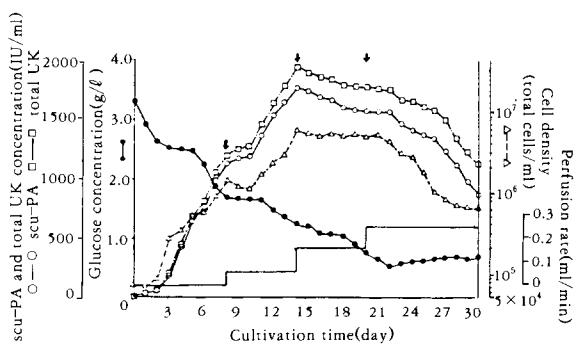


Fig. 5. The results of perfusion cultivation of HEK cells in 1% FBS containing medium by a cell-lift bioreactor. The first and second perfusion rate were 0.06 and 0.16ml/min, respectively and the third perfusion rate was 0.25ml/min. Final volume was 1.2ℓ.

을 나타내는 값이다. 이어 0.06(ml/min)의 상당히 느린 속도로 배지를 유입시킨 결과, 세포수 및 scu-PA 생산량의 지속적인 증가를 보였으며, 배양 14일에 5.7×10^6 (total cells/ml)의 최대 세포수 및 1760(IU/ml)의 최대 scu-PA 생산량을 보였다. 이후 세포수 및 scu-PA의 생산량은 완만한 속도로 감소하다가 거의 일정한 값을 유지하였으나 tc-PA로의 전환되는 양이 약간 증가하였다. 배양 20일째 배지유입속도를 0.25(ml/min)으로 증가시킨 후 세포농도는 급속한 감소를 보이며 생산된 scu-PA의 양 또한 감소하였다. 전체 배양기간을 통하여 배지 중의 glucose의 농도는 세포 성장에 따라 감소하였고 배지유입속도를 0.25(ml/min)으로 조절했던 배양기간 중에는 glucose 소비가 거의 이루어지지 않고 배양 말기에 잔류하는 glucose 양이 점차 증가하는 것으로 미루어 세포 성장이 감소하는 것을 확인할 수 있다.

Fig. 6은 각 배양방식에서 생산된 scu-PA가 tc-PA로 전환된 비율을 비교한 것이다. 각각의 배양 형태에서 모두 배양 3일째 10%에 가까운 전환율을 보이고 있으며 이는 배양 초기에 200(IU/ml) 미만의 극히 낮은 scu-PA 농도와 total UK 농도와의 차 이를 total UK 농도에 대한 비율로 정의되는 전환율을 고려할 때 다소 이해할 수 있는 현상이다. 유가식 또는 연속배양에서 배양기간에 경과함에 따라 scu-PA의 전환율이 신선한 배지의 유입 및 유출이 이루어질 때는 다소 감소하는 듯하나 회분배양에서와 마-

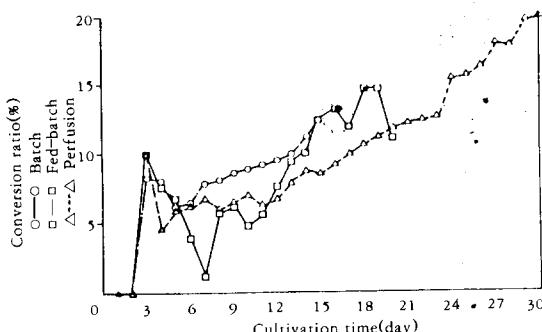


Fig. 6. Comparison of conversion ratio during cultivations of HEK cells according to different processes. Fresh medium was fed with rate of 0.06, 0.08 and 0.15ml/min at 5, 9 and 15 days of fed-batch culture and perfused with a rate 0.06, 0.16 and 0.25ml/min at 7, 14 and 20 day of perfusion culture.

Table 1. The production of scu-PA and the conversion of scu-PA into tc-PA for the different cultivation processes¹⁾.

	Maximum scu-PA concentration (IU/ml)	Maximum total UK concentration (IU/ml)	Specific scu-PA productivity (IU/cell/day)	Maximum specific growth rat. μ_{max} (1/day)	Conversion ratio (%)	Maximum cell density (Viable cells/ml)
T-flask	1670	1850	1.01×10^{-4}	0.454	9.73	1.65×10^6
Batch*	1560	1760	3.57×10^{-4}	0.461	11.40	4.43×10^6
Fed-batch**	1570	1710	2.47×10^{-4}	0.456	10.42	6.40×10^6
Perfusion***	1760	1930	3.13×10^{-4}	0.449	10.18	5.70×10^6

¹⁾Cultivated with 1% FBS containing DMEM. A modified amidolytic assay and fibrin plate method were used to determine scu-PA and total UK concentration, respectively.

*Cultivated in a 1.2ℓ spinner vessel.

**Cultivated in a 1.2ℓ spinner vessel. Initial and final volumes were 0.7ℓ and 1.3ℓ, respectively.

***Cultivated in a reactor. Working volume was controlled by level prove at 1.2ℓ.

Table 2. The results of purifying scu-PA from 1% FBS containing conditioned medium.

	Maximum scu-PA concentration (IU/ml)	Maximum total UK concentration (IU/ml)	Protein concentration (mg/ml)	Specific activity (IU/mg)	Purification yield	Concession ratio ⁺ (%)
Culture broth	1670	1850	1.3	1284.6	0	9.73
1st step						
S-sepharose*	2208	6075	0.97	2276.3	24.7	59.74
2nd step						
p-ABZ resin**	4150	6750	0.53	7830.2	19.8	31.89

*Elution buffer was 0.02M sodium phosphate buffer with 0.5M sodium chloride, pH 6.0. Flow rate was 0.03ml/min.

**Impurities were washed by gradient elution with increasingly acidic(pH 2 to 5), low salt(0.2M sodium chloride) elution buffer. Flow rate was 0.05ml/min.

⁺This ratio was calculated based upon the difference between total UK and scu-PA concentration at each step.

찬가지로 모든 배양방식에서 점차적인 증가를 보이는 경향이 있다. 각 배양방식에 따른 세포생육변수와 scu-PA의 변환율을 비교한 것이 Table 1이다. 최대 scu-PA의 농도는 모든 배양방식에서 1500 (IU/ml) 이상의 농도를 보였으며, 12% 미만의 전환율을 유지하였다. 최대비 생육속도는 T-flask에서 0.454(1/day)였으며 회분식, 유가식 및 연속배양에서 각각 0.461, 0.456, 0.449(1/day)로서 큰 차이가 없다. 또한 scu-PA의 생산성은 1.01×10^{-4} (IU/cell /day)에서 3.57×10^{-4} (IU/cell/day)의 범위 내에서 서로 비슷한 수준을 유지할 수 있었다.

또한 분리과정 중의 scu-PA의 변환율을 알기 위해 각 단계별 정제과정에서의 활성을 비교한 것이 Table 2이다. 회수 배양액 중의 총 단백질의 농도는 1.3(mg/ml)로서 정제과정을 거치면서 0.53(mg/ml)로 감소한 반면 최대 scu-PA 농도는 1670(IU/ml)에서 4150(IU/ml)로 증가하였고, 정제 단백질

의 비활성 또한 1284.6(IU/ml)에서 7830(IU/ml)으로 증가하였다. 모든 정제 과정을 통해 scu-PA는 30~60%의 다소 높은 전환율을 보이고 있으며 순수 scu-PA만의 최종 정제율은 약 3배 가량이었다. 따라서 배양과정보다 분리과정에서의 전환율이 더 높았다. 이는 분리과정에서 aprotinin을 첨가하지 않은 것과 배지의 회수, 분리시 외부와의 심한 온도 변화 등에 기인된 것으로 보다 순수하고 회수율이 높은 분리 및 정제방법의 개선이 요구되고 있다.

요 약

HEK 세포 배양액 중에 존재하는 scu-PA와 tc-PA의 보다 정확한 측정을 위해 fibrin plate법과 기존의 amidolytic 방법을 변형시킨 측정법을 이용했다. 1%의 저혈청 배지를 이용한 T-flask 배양에서 1.65×10^6 (viable cells/ml)의 최대 세포수에 도달하여 1,670(IU/ml)의 scu-PA 생산량을 보였으며 평균 10% 미만의 변환율을 보였다. 또한 Spinner vessel에서의 회분배양시 최대 세포수가 4.43×10^6 (total cells/ml)와 1560(IU/ml)의 scu-PA 생산량을 나타냈으며 평균 11.4%의 변환율을 보였다. 연속배양에서는 0.449(1/day)의 비생육속도와 3.13×10^{-4} (IU/cell/day)의 비생산속도를 보였으며 평균 10.18% 정도의 전환율을 보였다. 이는 회분식 및 유가식 배양 결과와 큰 차이가 없으며 배양공정에 관계없이 약 90% 이상의 회수율이 가능하다는 것을 의미한다.

사 사

본 연구는 생물공정연구센터와 녹십자(주)의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

- D. Collen Thromb. Haemostasis(1980), **43**, 77-89.
- S. S. Husain, V. Gurewich and B. Lipinski (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **220**, 31-8.
- D. C. Stump, M. Thienpont and D. J. Collen (1986), *Biol. Chem.*, **261**, 1267-73
- T. C. Wun, W. D. Schleuning and E. J. Reich (1982), *Biol. Chem.*, **257**, 3276-83.
- T. C. Wun, L. Ossowski and E. J. Reich (1982), *Biol. Chem.*, **257**, 7262-8.
- L. S. Nielsen, J. G. Hansen, L. Skriver, E. L. Wilson, K. Kaltoff, J. Zeuthen and K. Dano (1982), *Biochemistry*, **21**, 6410-5.
- H. Sumi, M. Maruyama, O. Matsuo, H. Mihara and N. Toki(1982), *Thromb. Haemostas.*, **47**, 297.
- T. Kohno, P. Hopper, J. S. Lillquist, R. L. Suddith, R. Greenlee and D. T. Moir(1984), *Biotechnology*, **2**, 628-34.
- D. L. Eaton, R. W. Scott and J. B. Baker (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6241-7.
- D. C. Stump, H. R. Lijnen and D. Collen (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1274-8
- A. Corti, M. L. Nolli, A. Soffientini and G. Cassani(1986), *Thromb. Haemostas.*, **56**, 219-24.
- V. Darras, M. Thienpont, D. C. Stump and D. Collen(1986), *Thromb. Haemostasis*, **56**, 411-414.
- D. J. Binnema, G. Dooijewaard and P. N. C. Turion(1991), *Thromb. Haemostasis*, **65**, 144-48.
- A. Corti, M. L. Nolli and G. Cassani(1986), *Thromb. Haemostasis*, **56**, 407-10
- J. P. Kalenbach, M. H. Kalenbach and W. B. Lyons(1958), *Exp. Cell Res.*, **15**, 112.
- R. Zan Freshney(1988), *Culture of Animal Cell, A Manual of Basic Technique*(2nd ed), Alan R. Liss, Inc., New York, **227**.
- F. Y. Tao, M. A. Bohn, G. Y. Ji, A. Einsele and W. S. Hu(1987), *J. Biotech.*, **6**, 205
- Toshio Miyake, Yasuo Aibino, You-ichi Kobayashi, Midori Yokoyama, Ken Watabe and Muneki Ohmdri(1988), *J. Biochem.*, **104**, 643.
- V. Darras, D. C. Thienpont, Stump. and D. Collen(1986), *Thromb. Haemostasis*, **20**, 411.
- G. Dooijewaard, A. de Boer, P. N. C. Turion, A. F. Cohen, D. P. Breimer and C. Kluft (1991), *Thromb. Haemostasis*, **65**(1), 82.
- D. J. Binnema, G. Dooi Jawaard and P. V. C. Turion(1991), *Thromb. Haemostasis*, **65**(2),
- P. Brakman(1967), *Fibrinolysis Amsterdam*, 1
- M. Butler(1987), *Animal Cell Technology*, p. 129, Taylor and Francis, New York.