

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 510610

(P2003 - 510610A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ド* ( 参考 )
G 0 1 N 33/49		G 0 1 N 33/49	Z
33/53		33/53	N
33/566		33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 31数 )

(21)出願番号 特願2001 - 527230(P2001 - 527230)

(86) (22)出願日 平成12年9月26日(2000.9.26)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月26日(2002.3.26)

(86)国際出願番号 PCT/US00/26438

(87)国際公開番号 W001/023895

(87)国際公開日 平成13年4月5日(2001.4.5)

(31)優先権主張番号 60/156,564

(32)優先日 平成11年9月28日(1999.9.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 オウクラホウマ、メディカル、リサーチ、  
ファウンデーション  
アメリカ合衆国オウクラホウマ州73104、オ  
ウクラホウマ、ノースイースト・スア-テ  
ィ-ーンズ・ストリート 825番

(72)発明者 エマスン、ナオミ、エル  
アメリカ合衆国オウクラホウマ州73111、オ  
ウクラホウマ・シティ、ノース・ストウン  
ウォール・ドライブ 5800番

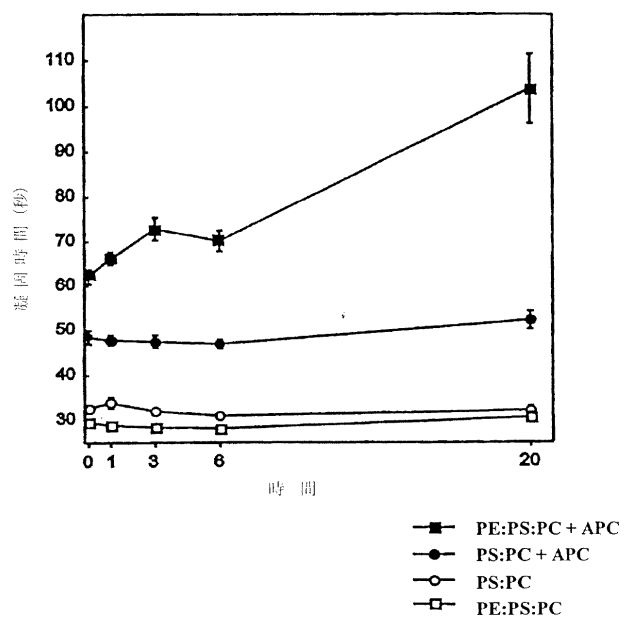
(74)代理人 弁理士 真田 雄造 ( 外 2名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酸化リン脂質を使用する血栓症発現危険性検定

(57)【要約】

血栓症の危険性を評価するための、リン脂質を含む酸化脂質を凝固検定で膜ソースとして使用し、結果を、活性化タンパク質C (「APC」)の存在及び非存在で非酸化リン脂質を膜ソースとして使用する検定と比較する。検定は、APCの抗凝固機能を酸化依存的又は非依存的な方法で特異的に妨げる抗体の患者における存在を監視することができる。これは、静脈血栓症又は動脈血栓症の症状を発現する患者の傾向を指示することができる。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 リン脂質を試薬として使用する、患者の血栓症危険性の傾向を決定するための凝固検定において、酸化リン脂質試薬を使用して前記検定を実施して第一の結果を得、非酸化リン脂質試薬を使用して前記検定を実施して第二の結果を得、前記第一及び第二の結果を比較する凝固検定。

【請求項2】 酸化リン脂質を含む凝固検定で使用するための試薬。

【請求項3】 前記酸化リン脂質がホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項2記載の試薬。

【請求項4】 ホスファチジルセリンをさらに含む、請求項3記載の試薬。

【請求項5】 ホスファチジルコリンをさらに含む、請求項4記載の試薬。

【請求項6】 前記試薬が、ホスファチジルエタノールアミン40%、ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項5記載の試薬。

【請求項7】 患者血漿サンプル中の、酸化脂質の作用を選択的に封鎖する抗体の存在を決定するための検定であって、

(a) 前記サンプルの第一のアリコートを得、活性化タンパク質Cを提供し、酸化リン脂質試薬を提供し、凝固を誘発し、凝固時間を計測して第一の凝固時間を得ることによって凝固検定を実施することと、

(b) 同時又は後で、前記サンプルの第二のアリコートを得、活性化タンパク質Cを提供し、非酸化リン脂質試薬を提供し、凝固を誘発し、凝固時間を計測して第二の凝固時間を得ることによって凝固検定を実施することと、

(c) 前記第一の凝固時間を前記第二の凝固時間と比較し、前記第一の凝固時間が前記第二の凝固時間と本質的に同じであるならば、患者サンプルが、酸化脂質の機能を非酸化脂質よりも大きな程度に封鎖する抗体を含有する可能性があることと決定することとを含む検定。

【請求項8】 ベースライン凝固値を得ることをさらに含み、前記ベースライン凝固値を、酸化リン脂質の存在で、ただし活性化タンパク質Cの添加なしで前記サンプルの第三のアリコートの凝固時間を計測し、第三の凝固時間ベースラ

イン値を得、非酸化リン脂質の存在で、ただし活性化タンパク質Cの添加なしで前記サンプルの第四のアリコートの凝固時間を計測し、第四の凝固時間ベースライン値を得ることによって得て、それにより、所与の患者サンプルが、活性化タンパク質Cの非存在で、正常血漿サンプルと比べて延長した凝固時間を示すかどうかを決定し、工程(a)及び(b)にしたがって凝固時間を活性化タンパク質Cの存在で試験したとき、前記患者サンプルが、凝固時間の延長を説明づけることができる他の成分を有するかもしれないと結論づける、請求項7記載の検定。

【請求項9】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項7又は8記載の検定。

【請求項10】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項9記載の検定。

【請求項11】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項10記載の検定。

【請求項12】 前記リン脂質試薬それぞれが、ホスファチジルエタノールアミン40%、ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項11記載の検定。

【請求項13】 患者が血栓症を発現する傾向を決定するための検定であって、前記患者から採取した血漿サンプルの第一の凝固時間を活性化タンパク質C及び酸化リン脂質試薬の存在で計測し、前記患者から採取した血漿サンプルの第二の凝固時間を活性化タンパク質C及び非酸化リン脂質試薬の存在で計測し、結果を分析し、前記第一の凝固時間が前記第二の凝固時間と比べて延長していないならば、前記患者が血栓症を発現する傾向を有すると決定することによる検定。

【請求項14】 前記血漿サンプルから患者免疫グロブリン画分を得、前記免疫グロブリン分を前記凝固時間計測に使用する、請求項13記載の検定。

【請求項15】 前記第一及び第二の凝固時間を計測する前に、前記血漿サンプル又はその免疫グロブリン画分を適量の正常血漿で希釈することをさらに含む、請求項13又は14記載の検定。

【請求項16】 前記正常血漿の適量が、患者血漿サンプル1部に対して3部である、請求項15記載の検定。

【請求項17】 前記正常血漿の適量が、前記免疫グロブリン濃度を約0.6 mg/mlにするのに充分である、請求項15記載の検定。

【請求項18】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項13又は14記載の検定。

【請求項19】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項18記載の検定。

【請求項20】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項19記載の検定。

【請求項21】 前記リン脂質試薬それぞれが、ホスファチジルエタノールアミン40%、ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項20記載の検定。

【請求項22】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項15記載の検定。

【請求項23】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項22記載の検定。

【請求項24】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項23記載の検定。

【請求項25】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項24記載の検定。

【請求項26】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項16又は17記載の検定。

【請求項27】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項26記載の検定。

【請求項28】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項27記載の検定。

【請求項29】 前記リン脂質試薬それぞれが、ホスファチジルエタノールアミン40%、ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項28記載の検定。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## 発明の技術分野

本発明は、血栓症発現の危険性を示す凝血診断検定の分野に関する。

**【0002】**

## 発明の背景

生理的な凝血は、負の電荷を帯びたリン脂質からなる膜の存在を要することが十分に認識されている。(Mann, K. G., Jenny R. J., and Krishnaswamy, S. 1988. "Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes," *Ann. Rev. Biochem.* 57:915-956及びFurie, B. and Furie, B. C. 1988. "The molecular basis of blood coagulation," *Cell.* 53:505-518)で考察されているように、酵素、普通はビタミンK依存性タンパク質が補因子、普通は非ビタミンK依存性タンパク質と結合して基質、普通はビタミンK依存性タンパク質を活性化すると、酵素原活性化が急速に起こる。これらの反応は、凝固促進性である反応及び抗凝固性である反応の両方を含む。

**【0003】**

正味負電荷に加えて、リン脂質先頭基の性質が触媒及び結合効率に貢献すると思われる。一般には、ホスファチジルセリン(P S)がもっとも重要なリン脂質であると見なされている(Pei, G., Powers, D. D., and Lentz, B. R. 1993. "Specific contribution of different phospholipid surfaces to the activation of prothrombin by the fully assembled prothrombinase," *J. Biol. Chem.* 268:3226-3233及びMann, K. G., Jenny R. J., and Krishnaswamy, S. 1988. *Ann. Rev. Biochem.* 57:915-956)。ホスファチジルエタノールアミン(P E)又はカルジオリピンの存在が、活性化タンパク質C(A P C)複合体による因子V aの不活性化の速度を潜在的に増すことがわかった(Smirnov, M. D. and Esmon, C. T. 1994. "Phosphatidylethanolamine incorporation into vesicles selectively enhances factor Va inactivation by activated protein," *C. J. Biol. Ch*

em. 269:816-819)。A P Cは、致命的な血栓症を防ぐために要する決定的な天然抗凝固因子である。A P C複合体による因子V a及びV I I I aの不活性化は凝固の規制においてきわめて重要であり、この反応が障害をきたす場合に認められる重篤な臨床的問題によって証明されるとおりである (Esmon, C. T. and Schwarz, H. P. 1995. "An update on clinical and basic aspects of the protein C anticoagulant pathway," Trends Cardiovasc. Med. 5:141-148)。また、リン脂質小胞中の不飽和脂肪酸の存在が因子V aの不活性化を増強することがわかった (Smirnov, M. D., Ford, D. A., Esmon, C. T., and Esmon, N. L. 1999. "The effect of membrane composition on the hemostatic balance," Biochemistry 38:3591-3598)。また、因子V I I I結合 (Gilbert, G. E. and Arena, A. A. 1995. "Phosphatidylethanolamine induces high affinity binding sites for factor VIII on membranes containing phosphatidyl-L-serine," J. Biol. Chem. 270:18500-18505)、因子Xの組織因子 - 因子V I I a活性化 (Neunschwander, P. F., Bianco-Fisher, E., Rezaie, A. R., and Morrissey, J. H. 1995. "Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine," Biochemistry 34:13988-13993) 及びプロトロンビン活性化 (Smeets, E. F., Comfurius, P., Bevers, E.M., and Zwaal, R. F. A. 1996. "Contribution of different Phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles," Thromb. Res. 81:419-426及びBilly, D., Willems, G. M., Hemker, H. C., and Lindhout, T. 1995. "Prothrombin contributes to the assembly of the factor Va-factor Xa complex at phosphatidylserine-containing phospholipid membranes," J. Biol. Chem. 270:26883-26889) におけるP Eの役割が報告されている。これら後者の研究では、P Eの影響は、A P C複合体に対する影響とは定性的及び定量的に異なるものであった (検討のために (Smirnov, M. D., Ford, D. A., Esmon, C. T., and Esmon, N. L. 1999. Biochemistry 38:3591-3598) を参照)。

## 【0004】

血栓症の危険性が高い患者の一つのグループは、PTT（部分トロンボプラスチン時間）又はAPTT（活性化部分トロンボプラスチン時間）技術に基づく凝固検定で使用されるアニオンリン脂質に結合する抗体であるループス抗凝固因子を有する患者である。The Merck Manual (16th Ed. 1992)の1225、J. E. Ansell, Handbook of Hemostasis and Thrombosis (Little, Brown & Co., Boston)の19 (1986)を参照。ループス抗凝固因子を有する患者に典型的なPTT試験結果は、PTT技術（因子XII、XI、X及びVII）によって計測される、患者血漿と正常血漿との1：1混合物で矯正することができない凝固時間の延長、正常又はわずかに延びたPT（プロトロンビン時間）及びこれらの凝固因子の非特異的機能低下である。ループス抗凝固抗体はまた、カルジオリピンと反応することができるため、カルジオリピンを試薬として使用する検定を妨げることができる。たとえば前出のThe Merck Manualを参照。抗カルジオリピン又は抗ホスファチジルエタノールアミン抗体は互いに交差反応することができるが、凝固促進性リン脂質が抗凝固因子になるのに十分な親和力で相互作用することはできない。リン脂質に対するAPC複合体の特異性のため、そのような抗体は、「ループス抗凝固因子」の存在を診断するために使用されるAPCの非存在で実施される凝固試験に影響することなく、APC抗凝固活性を選択的に抑制するであろう。

## 【0005】

インビトロでの凝固試験における凝固促進性リン脂質に対するループス抗凝固抗体の妨害にもかかわらず、抗体を有する人は、静脈又は動脈の血栓症の危険性が増大していると報告されている。さらには、妊娠期間の初期1/3期間における自然流産の繰り返しが報告されている。同上。患者は、血栓症の可能性を減らすために長期的な抗凝固治療を受けているが、そのような治療の有効性を監視するのに適切な技術が開発されていない。また、ループス抗凝固因子の試験で必ずしも陽性にならない他の患者が、現在の凝固試験によっては検出されない抗体の存在によって血栓症の危険にあるかもしれないことにも注目すべきである。さらには、ループス抗凝固因子又は他の危険因子を有するすべての人が同一の血栓症

傾向を有するわけではない。

【0006】

血栓症の危険にある患者を特定しようとするため、標準的凝固試験を患者血漿に対して実施した。抗凝固治療は一部の患者で有意な危険を伴うため、患者がそのような治療の恩恵を受ける可能性があるかどうかを決定することが非常に望ましい。PTT及び/又はPT試験結果が正常に見えない、上記のようなさらなる試験、たとえば正常血漿を添加するか、過剰なリン脂質をさらに添加して試験を繰り返すことが提案されている。以前、狼瘡患者及び血栓症を発症する傾向がもっとも高い他の患者の間で区別するための技術が開発された。この方法は、以下で論じる米国特許第5,472,852号で開示され、特許請求されたものである。

【0007】

以前、ループス抗凝固因子の少なくとも部分母集団が、プロトロンビン活性化よりも効果的にAPC抗凝固活性を抑制することができることを確認した(Smirnov, M. D., Triplett, D. T., Comp, P. C., Esmon, N. L., and Esmon, C. T. 1995. "On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies," J. Clin. Invest. 94:309-316)。この差は、膜二分子層中のPEの存在によって劇的に増強される(Smirnov, M. D., Triplett, D. T., Comp, P. C., Esmon, N. L., and Esmon, C. T. 1995. J. Clin. Invest. 95:309-316及びRauch, J., Tannenbaum, M., Tannenbaum, H., Ramelson, H., Cullis, P. R., Tilcock, C. P. S., Hope, M. J., and Janoff, A. S. 1986. "Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems," J. Biol. Chem. 261:9672-9677)。

【0008】

「Assay For Detection of Selective Protein C Inhibition by Patients」と題する米国特許第5,472,852号には、血栓症を発症する患者の傾向を測定する方法が開示されている。有効量のホスファチジルエタノールア

ミン(PE)及び有効量のホスファチジルセリン(PS)を含む膜ソースを検定に使用した。好ましくは、PE10~50%及びPS5~50%を検定に使用した。残り分の%を充足するためにホスファチジルコリン(PS)を検定で使用した。852特許で開示され、特許請求された検定では、外因性活性化タンパク質C(APC)の存在及び非存在で患者血漿及び対照血漿を検定した。外因性APC及び最適なリン脂質を含むサンプルの凝固時間と、それらを含まないサンプルの凝固時間とを比較することにより、血栓症の危険性を評価することができる。

#### 【0009】

凝塊形成の過程で、白血球が成長中の血栓に補充され、活性化される。これらの活性化された白血球が、リン脂質を酸化させるとして知られる物質である、過酸化水素及び超酸化水素などの潜在的な酸化剤を放出すると報告されている。Malech, H. L. and Gallin, J. I. 1987. "Neutrophils in human diseases," N. Engl. J. Med. 317:687-694、McCord, J. M. 1985. "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury," N. Engl. J. Med. 312:159-163。

#### 【0010】

リン脂質は凝固及び上記で論じたような凝固検定で重要な役割を有することが立証され、リン脂質の特定のパラメータに関するいくつかの報告が上記で論じたように報告されているが、そのような検定で使用される試薬を改良することによって血栓症の危険性を測定するための検定を改良する必要性が絶えずある。加えて、白血球からの酸化剤の放出に関する報告が、膜酸化が血栓症に關与するかもしれないと推測しているが、APC活性に対する脂質酸化の示差効果が報告又は予測されたことはない。

#### 【0011】

今、酸化されたリン脂質が、凝塊促進反応にほとんど影響せず、APCの抗凝固特性を選択的に増強することがわかった。また、抗リン脂質抗体の部分集合が酸化リン脂質増強を選択的に解消することがわかった。本明細書には、酸化リン脂質及び非酸化リン脂質を別個の試薬として使用することによって血栓症発現の危険性を評価するのに有用な検定を開示する。各試薬を並行検定で使用するこ

とにより、サンプルを凝固に関して試験する。結果を、正常血漿を使用して得られた結果と比較して、サンプル血漿が血栓症の指示物質を含有するかどうかを評価する。

#### 【0012】

##### 発明の詳細な説明

今、脂質酸化が、活性化タンパク質C（「APC」）複合体の抗凝固活性を増強することによって血栓をより非トロンボゲン形成性にするための機構であることを見いだした。その結果、酸化リン脂質に対する抗体を有する患者は、血栓拡張を十分に防ぐことができない可能性が高く、付随して、深静脈血栓症及び動脈血栓症をより起こしやすい。これらの抗体の特異性が、血栓が凝塊促進性になるのを防いで凝塊抑制性にする。

#### 【0013】

最近のデータが、現在の検定によって特定される抗体の多くが部分的又は完全に脂質又はタンパク質抗原いずれかの酸化形態を標的にしていることを示した（たとえば（Horkko, S, Miller, E., Dudi, E., Reaven, P., Curtiss, L. K., Zvaifler, N. J., Terkeltaub, R., Pierangeli, S. S., Branch, D. W., Palinski, W. et al. 1996. "Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein," J. Clin. Invest. 98:815-825を参照）。驚くことに今、ホスファチジルエタノールアミン（PE）を含む酸化リン脂質が因子Va不活性化複合体におけるAPCの活性をさらに高めることがわかった。加えて、ループス抗凝固抗体又は抗リン脂質抗体の少なくとも一クラスの、APC活性を抑制する能力が酸化リン脂質の存在によって増強される。患者血漿は、引用例として本明細書に含める米国特許第5,472,852号に記載の方法にしたがって、活性化タンパク質Cの存在又は非存在における一段階検定で検定することにより、スクリーニングすることができる。この852号特許の方法は、PEを含む有効量の酸化リン脂質を含む膜ソースを使用することによって変形することができる。

## 【0014】

さらなる手法が本発明の検定又はそれから導出されるデータの解釈に役立つかもしれない。APCの存在における検定で試験される特定のサンプルの特性をより良好に評価するため、例2に記載するように、酸化リン脂質試薬を非酸化リン脂質試薬と比べて使用して、APCの非存在で患者サンプルのベースライン凝固値を決定することが望ましいかもしれない。望ましいかもしれないもう一つの手法は、免疫グロブリンである患者血漿の精製したサブポーシオン又は画分の凝固時間を検定する手法である。患者血漿又は血清からの免疫グロブリンを精製する手法が例3に記載されており、同様に用いることができる、当該技術で公知の精製法が他にもある。患者血漿又は患者精製免疫グロブリンを試験サンプルとして使用するとき使用することができるもう一つのさらなる手法は、既知の正常血漿中で試験サンプルを希釈する手法である。本発明の検定で使用するのに適切な希釈は、標準的技術、たとえば、試験サンプルの連続希釈物を調製し、種々の希釈度で本明細書に記載する凝固検定を実施し、どの希釈度が、望ましい検定条件、たとえば凝固時間を提供し、生じるかもしれない差違を作業員が測定することを許すかを決定して、そのような差違がサンプル中の種々の因子の可能な高い濃度又は異例に低い濃度（疾病又は投薬の過程で起こりうる）によって隠蔽されないようにすることによって決定することができる。加えて、希薄すぎるサンプルは、検定において検出可能な差違を示さないかもしれない。正常血漿中の患者血漿の好ましい希釈は、およそ正常血漿3部に対して患者血漿1部、およそ1:4の希釈であることがわかった。免疫グロブリン患者サンプルの場合、約0.6mg/mlの濃度がもっとも好ましいことがわかった。

## 【0015】

本発明の検定では、適切な酸化脂質を含む試薬を使用する。適切な酸化脂質は、好ましくは他のリン脂質、もっとも好ましくはホスファチジルセリン（PS）と組み合わせられたPEを含む。もう一つの実施態様では、本発明の検定に使用される試薬は、PE及びホスファチジルコリン（PC）を含む。もっとも好ましくは、本発明で有用な試薬は、PE、PS及びPCを含む。好ましくは、試薬を製造するためには天然の脂質ソースを使用するが、合成脂質から製造される小胞が

、正常血漿の凝固時間を計測する検定で、天然ソース脂質から製造された小胞と十分に類似した挙動を示すならば、合成脂質を使用してもよいことが考えられる。

#### 【0016】

異なる組成のリン脂質を含む他の脂質試薬は、使用するリン脂質の割合を変更することによって同様な方法で製造することができる。好ましくは、米国特許第5,472,852号に記載の組成の脂質試薬を使用する。具体的には、正常（対照）血漿と血栓症を発現する傾向のある患者からの血漿との間の検出可能な示差効果ならびに凝固検定で前記PEを補うのに有効な量のPSを提供するのに有効な量のPEを含むリン脂質成分を使用する。好ましくは、リン脂質成分は、PE約10%～約50%、PS約5%～約50%を含み、残余がPC又は両性であり、中性pHで正味電荷を有しないリン脂質である。好ましくは、PS成分は、リン脂質成分の約5%～約25%である。非常に好ましい実施態様では、膜ソースのリン脂質成分は、リン脂質成分の重量に基づき、PE約40%、PS約20%及びPC約40%を含む。

#### 【0017】

脂質試薬を製造するために使用されるリン脂質は、使用前には実質的に非酸化状態であるべきであり、調製中は、酸化試薬を製造することが望まれるまでリン脂質を非酸化状態に維持するよう注意を払うべきである。リン脂質の供給業者の選択は、非酸化対照中に存在する酸化の程度における一つの変数であることがわかった。たとえば、Avanti Polar Lipids社から購入されるものが、業者の供述及び銅触媒酸化の後で認められたAPC活性の増強の両方に基づくと、他の供給元から購入されるものよりも酸化の程度がずっと低いことがわかった。酸化に関してリン脂質を試験するために利用可能な方法がいくつかある。一つの方法は、肉眼でリン脂質を観察してリン脂質が変色しているように見えるかどうかを決定する方法である。酸化リン脂質は、非酸化リン脂質と比べるとさえない色又は黄色に見える。これは、PE及びPSに特に当てはまる。加えて、簡単な分光光度試験が利用可能である。UVスペクトルにおける233ナノメートルと215ナノメートルとの吸収バンドの比は、Klein, R. A., Biochim Biophys Act

a, 210:486 (1970)の手順にしたがって計測することができる。Klein法によると、0.02の比が約0.1%酸化生成物に相当する。本発明で有用な脂質試薬の場合、試薬中で使用され、酸化脂質を試薬として使用する場合に得られる結果に照らして試験されると、APCの存在で、表Iに見られるような正常血漿の凝固時間において有意な差を示す、実質的に非酸化状態の脂質を使用することが望ましい。

#### 【0018】

酸化の防止は、リン脂質をアルゴン又は窒素ガス下に維持することによって達成することができる。したがって、リン脂質を、広くガス抜きした緩衝剤、好ましくはChelex 100樹脂 (Biorad) で前処理した緩衝剤に入れて窒素又はアルゴン下でうず回転させて希釈することが、脂質を非酸化状態に保持する方法である。

#### 【0019】

##### 例1

##### 非酸化リン脂質試薬及び酸化リン脂質試薬を調製する方法

PE 40%、PS 20%及びPC 40%を含む、本発明の検定で有用な試薬を調製した。ウシ脳から導出した(したがって、天然の脂肪酸で構成される)個々のリン脂質をAvanti Polar Lipids社から取得した。Klein分光光度検定を使用してそれらを試験すると、1%未満しか酸化されていないことがわかった。脂質を前記の重量比で混合し、アルゴン下に乾燥させ、3時間凍結乾燥させて有機溶媒を除去した。次に、アルゴン下で再構成し、0.15M NaCl、10mM HEPES、pH 7.5又は0.15M NaCl、20mM トリスHCl、pH 7.4中にうず回転によって5mg/ml全脂質まで懸濁させた。使用前に、緩衝剤をChelex 100樹脂 (BioRad) で処理し、アルゴンで飽和させた。使用するリン脂質の割合を変えることにより、異なる組成のリン脂質を含む他の試薬を同様な方法で製造してもよい。

#### 【0020】

リポソームを、100nmポリカーボネートフィルタ (Nucleopore) に通して押し出すことによって調製した。このようにして調製した非酸化リポソームは、す

ぐに使用することもできるし、貯蔵することもできる。非酸化リポソームは、検定に必要なまで又は酸化が望まれるまで、室温で約3日までの間、アルゴン下に貯蔵することができる。本発明の検定では比較目的のために非酸化リポソームが必要であるため、酸化を防ぐのに有効な安定剤を、非酸化形態で検定に使用される非酸化リポソームの量まで加えることが望ましいかもしれない。そのような安定剤は、EDTA及び酸化防止剤、たとえばBHT又はその等価物を含む。具体例では、1mM EDTAを、リポソームを非酸化状態で保存するための上記方法にしたがって製造した調製物に加えた。以下に記す方法を使用して酸化リポソームにまでさらに処理される非酸化リポソームの場合、安定剤を加えることは望ましくない。

#### 【0021】

本発明の検定で使用するための酸化リポソームは、非酸化リポソームの空気への暴露を許すことによって製造することもできるし、酸化反応を使用することによって製造することもできる。ある程度の制御を処理に加えることができるよう、酸化反応を使用することが好ましい。酸化のためには、ガラス管中で10mM  $\text{CuSO}_4$  1  $\mu\text{l}$ をリポソーム1ml (200 $\times$ g/ml)に加えて $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ を得た。銅イオンがリン脂質の空気酸化のための触媒として作用する。次に、懸濁液を37  $^{\circ}\text{C}$ でうず回転させて空気を溶液に導入した。経験的観測による決定で小胞が崩壊しないように制御される限り、他の酸化方法、たとえば引用例(Chatterjee, S. N. and Agarwal, S. 1988. "Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation," *Free Radical Biology and Medicine* 4:51-72及びGoni, F. M. and Alonso, A. 1989. "Studies of phospholipid peroxidation in liposomes," In *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, J. Miquel, Quintanilha, A. T., and Weber, H., editors. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 103-122)で論じられている方法を使用してもよい。空気による酸化のみを使用することもできるが、上記に挙げた酸化反応を使用して酸化脂質を生成することが好ましい。いずれの方法においても、反応は、触媒を封鎖するのに効果的なキレート化剤又は酸化防止剤、たとえばBHTを加えることによ

り、望みどおりに阻止することができる。酸化脂質の適性は、凝固検定を含む予備的滴定試験によって評価することができる。この環境で、凝固検定の当業者に公知の条件を使用して、APCの存在における予備的滴定試験で、非酸化脂質を使用する凝固検定と比べて凝固の延長が起こるかどうかを決定することができる。

#### 【0022】

##### 例2

APCの非存在におけるベースライン凝固値の測定及びAPCの存在における値との比較

ST4凝固計 (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ) を使用して、一段階凝固検定として凝固検定を実施した。APC及び/又は免疫グロブリン (正常又は患者サンプル) を省いた検定の場合、緩衝剤 (0.1M NaCl、0.02M トリスHCl、pH7.5、1mg/mlゼラチン) で量を充足した。

#### 【0023】

APCの存在又は非存在における凝固検定に対する脂質酸化の影響をリン脂質酸化時間の関数として測定した (図1)。溜めておいた正常血漿 (50 µl) を反応容器に配置し、以下の試薬を括弧内に示す最終濃度で加えた。ラッセルクサリヘビ蛇毒 (C. T. Esmon, Dissertation, Washington University, St.

Louis, 1973) 又はAmerican Diagnostica, Greenwich, CN) から得られた因子X活性化酵素 (0.1 ~ 0.15 nM、APCの非存在で30秒の凝固時間を出すのに十分)、リン脂質 (10 µg/ml)、APC (0.2 µg/ml)、最終量を200 µlにするための緩衝剤。37 °C で1分間のインキュベーションののち、CaCl<sub>2</sub> (6.25 mM) で凝固を誘発した。

#### 【0024】

PEの存在又は20時間の銅触媒脂質酸化のいずれも、APCの非存在における凝固検定に対して有意な影響を及ぼさなかった。PS及びPCのみを含有する小胞の酸化は、小胞がAPC抗凝固活性を支持する能力を増強しなかった。小胞を含有するPEの酸化は、APCの抗凝固活性を劇的に増強した。

#### 【0025】

酸化又は非酸化脂質を使用してA P Cの非存在における凝固時間を計測することにより、既知の正常血漿と比較した血漿試験サンプルのベースライン凝固値を得ることができる。この測定は、強力なループス抗凝固活性又は患者サンプル中の他の未知成分の、凝固時間の延長に対する可能な貢献を説明づける。A P Cの非存在における患者サンプルの凝固時間がA P Cの非存在における正常血漿の凝固時間よりも数秒（たとえば5秒超）長いと測定するならば、A P Cの存在における患者サンプルの凝固時間は、脂質ソースが酸化されているかいないかにかかわらず、正常血漿の凝固時間よりもずっと長いと予想される。

#### 【0026】

加えて、例2の方法は、上記で論じたさらなる手段の一つ、たとえば例3で論じるように、患者サンプルからの免疫グロブリンの検定又は精製の前に、正常血漿中での患者サンプルの希釈を利用することによって変更することができる。

#### 【0027】

### 例3

凝固障害と診断された患者の血漿からのI g Gと比較した正常血漿導出I g Gの評価

この研究で使用した患者を表Iに記載する。以下のようにして患者1～7を評価した。二重遠心分離したクエン酸塩添加血漿をすべての凝固検定に使用し、Sietnes, K. E., Gravem, K., and Wisloff, F. 1992. "Preparation of plasma for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies." *Thromb. Res.* 66:43-53の方法にしたがって調製した。試験血漿と正常血漿との50:50混合物中、市販のP T T試薬（Staclot（登録商標）LA, Diagnostica Stago）を使用した場合の凝固時間の延長により、ループス抗凝固因子の存在又は明らかな非存在を決定した。事前に立証しておいた対照母集団の95%を超える凝固時間を示す血漿にさらなる試験を実施した。六方（I I）相リン脂質の存在における凝固時間（8秒）の正規化及び有意修正によって診断を確認した。血清サンプル（Quanta Lite aCL IgG、IgM、Inova Diagnostics, San Diego, CA）に対する市販のE L I S A法によって抗カルジオリピンI g G及びI g Mを試験した。プロトロンビン、タンパク質

S及び2糖タンパク質Iに対する抗体を前記のようにELISAによって分析した(Safa, O., Crippa, L., Della, V.P., Sabbadini, M. G., Viganò, D. S., and D'Angelo, A. 1999. "IgG reactivity to phospholipid-bound beta(2)-glycoprotein I is the main determinant of the fraction of lupus anticoagulant activity quenched by addition of hexagonal (II) phase phospholipid in patients with the clinical suspicion of antiphospholipid-antibody syndrome." *Haematologica* 84:829-838)。

#### 【0028】

患者8～13は、医療記録からの事前報告(登録以来、抗凝固治療を受けた患者の場合)又は希釈ラッセルクサリヘビ蛇毒検定のための市販キット(American Diagnostica, DVVT #810及びDW Confirm #815)のいずれかを使用して、ループス抗凝固活性に関して評価した。抗カルジオリピンIgG及びプロトロンビン、タンパク質S、2糖タンパク質I及びAnnexin VIに対する抗体を、2糖タンパク質Iに関して前記した標準ELISA技術によって測定した(Merrill, J. T., Shen, C., Lahita, R. G., and Mongee, A. B. 1997. "High prevalence of antiphospholipid antibodies in patients taking procainamide." *J. Rheum.* 24:1083-1088)。

#### 【0029】

先に、狼瘡患者の少なくとも部分集合から導出された血漿又は免疫グロブリンが、ホスファチジルエタノールアミン依存的な方法で、APC機能を選択的に抑制することができることを示した。Smirnov, M. D., Triplett, D. T., Comp, P. C., Esmon, N. L., and Esmon, C. T. 1995. "On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies." *J. Clin. Invest.* 95:309-316及びSmirnov, M. D., Ford, D. A., Esmon, C. T., and Esmon, N. L. 1999. "The effect of membrane composition on the hemostatic balance," *Biochemistry* 38:3591-3598)。アルゴン下での貯蔵及びリポソーム調製から1週間以内の使用をはじめとして、酸化に対しては

通常の注意を払ったが、これらの研究で使用したリン脂質の酸化状態は詳細にはわからなかった。

#### 【0030】

酸化脂質の使用が凝固時間に影響するかどうかを試験するため、狼瘡及び血栓症患者の選択群からのIgGを、酸化リポソームと非酸化リポソームとの間で、APCに対する活性に関して試験した。

#### 【0031】

血栓症患者から標準的な手法によって免疫グロブリン(IgG)を精製した。血漿又は血清を50%NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>で沈殿させた。沈殿物を再懸濁させ、0.1M NaCl、0.02トリスHCl、pH7.5に対して透析した。次に、この物質をタンパク質Gカラム(Amersham-Pharmacia)に塗布し、緩衝剤で洗浄し、0.1Mグリシン、pH2.5で溶離させた。溶離物を1M トリスHCl、pH9ですぐに中和し、緩衝剤に対して透析した。免疫グロブリンを0.6mg/mlの最終濃度まで凝固検定に加えた。

#### 【0032】

これらの検定の結果を表Iに示す。実施したとおり、この検定は、ループス抗凝固活性に対して比較的に感度が低く(5秒の延長)、提示されるデータの簡素化を可能にし、APCの存在における凝固時間の延長のみが示される。患者1~7は凝固サービスから来た患者であったが、ループス抗凝固陽性としても選択した。全身性エリテマトーデスの患者8~13は、リウマチ科クリニックから来た患者であった。血栓症が発生している両グループで、APC活性の酸化特異的抑制を示す免疫グロブリンが見られる(患者1、2、4及び10)。これらの免疫グロブリンは、非酸化リン脂質に対するAPC抗凝固活性に対してほとんど影響を及ぼさなかった。各グループの患者(患者6、7及び12)は、両方の脂質調製物に対する活性の低下を示した。患者7及び特に患者12の場合、酸化脂質と非酸化脂質とで活性の差が本質的に維持された。

#### 【0033】

したがって、APCの存在における検定で患者血漿サンプルを試験し、酸化脂質試薬を使用することによって第一の凝固時間を得、非酸化脂質試薬を使用する

ことによって第二の凝固時間を得ることが、患者血漿中の抗体機能的活性を細分類する方法を提供する。第一の凝固時間が第二の凝固時間と本質的に同じであるならば、患者サンプルが、酸化脂質の機能を非酸化脂質よりも大きな程度に封鎖する抗体を含有すると予想することができる。このデータは、血栓症又は血栓症状再発の傾向を予測するのに有用であるかもしれない。

【0034】

血漿が正常である、すなわちそのような抗体を含有しないならば、酸化リン脂質試薬を使用した場合、非酸化リン脂質試薬の場合と比べて長い凝固時間を予想するであろう。(表I、規準1及び規準2を参照)。

【0035】

【表1】

表 I. 患者の特性決定

患者番号 <sup>1</sup>	性別	病歴 <sup>2</sup>	LA <sup>3</sup>	ACA <sup>4</sup>	他の抗体反応性 <sup>5</sup>	酸化リン脂質を用いた凝固時間(秒) <sup>6</sup>	非酸化リン脂質を用いた凝固時間(秒) <sup>7</sup>
1	F	DVT, EM	+	+++ (IgG)	PrS, β2	34.1	33.7
2	F	DVT; 3 流産	+	+++ (IgG)	Pt, PrS, β2	31.2	34.0
3	F	DVT; 狼瘡様症候群	+	-	Pt	54.4	35.6
4	M	MI; 虚血性発作	+	+++ (IgG)	Pt, β2	35.2	34.0
5	F	多発性動脈炎	+	+ (IgM) +/- (IgG)	- Pt, PrS, β2 (+/-)	56.9	27.1
6	F	狼瘡様脱髄症候群	+	+++ (IgG)	Pt, β2	25.0	28.7
7	F	DVT, SLE	+	+ (IgG)	Pt, β2	36.0	27.0
8	F	SLE	+	+++ (IgG)	Pt	82.0	37.1
9	F	SLE; DVT; 2 胎児死亡	-	++ (IgG)	Pt, PrS	90.7	39.6
10	F	SLE; 2 DVTs; 3 胎児死亡	+	-	Pt, PrS, β2	41.5	39.0
11	F	SLE; 壊死性脈管炎	+	-	PrS, β2 (+/-)	90.3	41.5
12	F	SLE; CVA; 1 心臓前症; 静脈炎	+	++ (IgG)	Pt, AnV	56.8	30.1
13	F	4 胎児死亡	-	* (IgG)	Pt, PrS	92.8	39.8
規準 1						66.7	32.6
規準 2						99.0	44.0

<sup>1</sup>規準 1 = 患者 1 ~ 7 に対する健常な対照、規準 2 = 患者 8 ~ 13 に対する健常

な対照

<sup>2</sup> D V T = 深静脈血栓症、E M = 肺動脈塞栓症、M I = 心筋梗塞、S L E = 全身性エリテマトーゼス、C V A = 脳血管障害

<sup>3</sup> L A = ループス抗凝固因子。患者1～7はStaclot（登録商標）L A検定（Diagnostica Stago社から市販）基準、患者8～13はAmerican Diagnosticaの希釈ラッセルクサリヘビ蛇毒時間（d R V V T）検定基準。

<sup>4</sup> A C A = 抗カルジオリピン抗体。患者8～13ではI g Mは計測せず。

<sup>5</sup> すべてのサンプルをプロトロンビン（P t）、タンパク質S（P r S）及び2糖タンパク質I（2）に対する反応性に関してE L I S Aで試験。アネキシンV（A n V）に対しては患者8～13のみを試験。

<sup>6</sup> 検定結果は、A P Cの存在で酸化リポソームを用いて計測した凝固時間からA P Cの非存在で酸化リポソームを用いた凝固時間を差し引いたものとして報告。

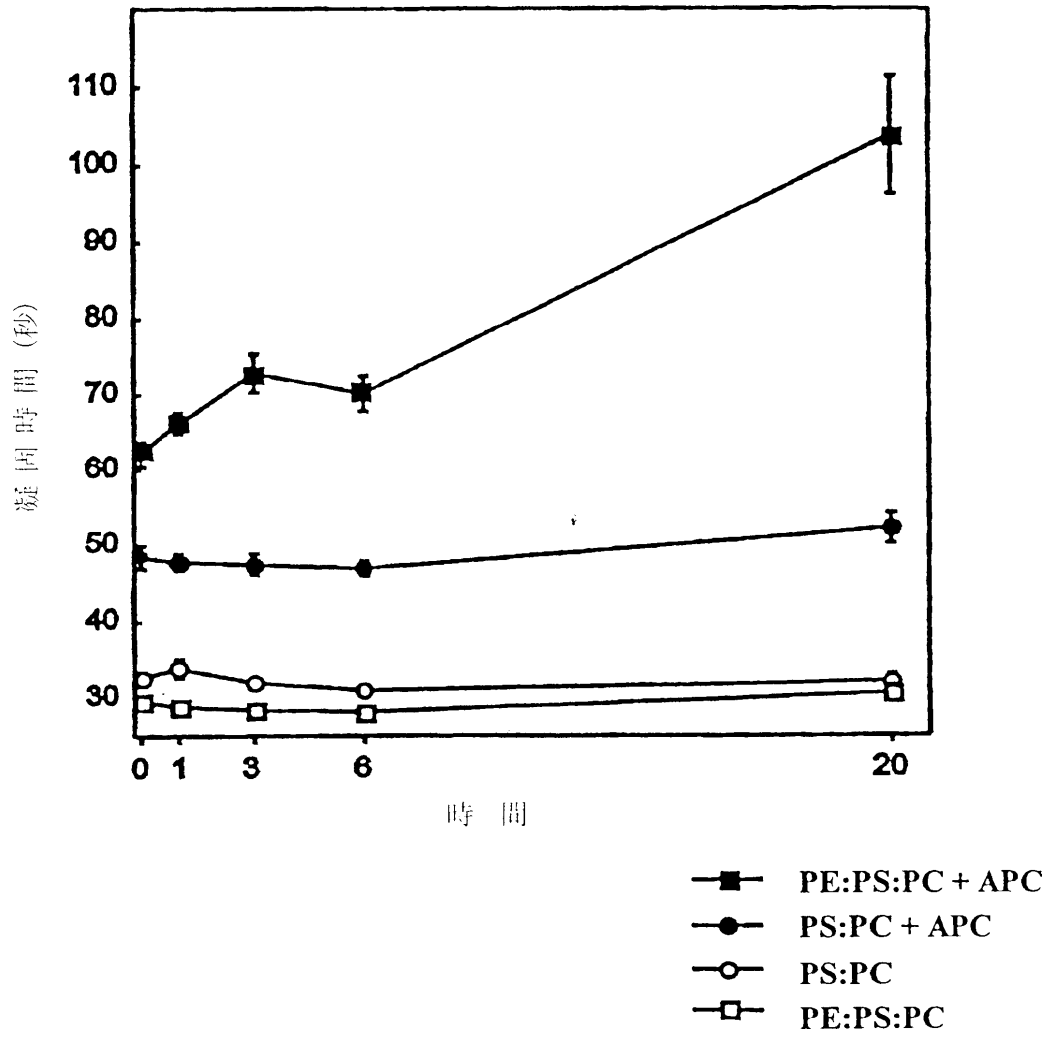
<sup>7</sup> 検定結果は、A P Cの存在で非酸化リポソームを用いて計測した凝固時間からA P Cの非存在で非酸化リポソームを用いた凝固時間を差し引いたものとして報告。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

リン脂質の酸化時間の関数として測定されるA P Cの存在又は非存在における凝固検定に対するリン脂質酸化の影響を示すグラフである。検定は、A P Cを含むP E : P S : P C（塗りつぶした四角）及びA P Cを含まないP E : P S : P C（塗りつぶしていない四角）ならびにA P Cを含むP S : P C（塗りつぶした円）及びA P Cを含まないP S : P C（塗りつぶしていない円）で実施した。小胞を含有するP Eの酸化は、A P Cの抗凝固活性を劇的に増大させた。

【図1】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年10月29日(2001.10.29)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 リン脂質を試薬として使用する、患者の血栓症危険性の傾向を決定するための凝固検定において、酸化リン脂質試薬を使用して前記検定を実施して第一の結果を得、非酸化リン脂質試薬を使用して前記検定を実施して第二の結果を得、前記第一及び第二の結果を比較し、前記第一の結果が前記第二の結果と比べて延長しているならば、前記患者は正常である可能性が高いと結論づけ、前記第一の結果が前記第二の結果と本質的に同じであるならば、前記患者は、酸化リン脂質の機能を非酸化リン脂質よりも大きな程度に封鎖する抗体を有する可能性が高いと結論づける凝固検定。

【請求項2】 233及び215ナノメートルにおける吸収バンドの比による測定で1種以上の実質的に酸化されていないリン脂質を含む第一の試薬であって、酸化防止ガス下に維持され、ガス抜きされた緩衝剤で希釈されている第一の試薬と、実質的に酸化されていないリン脂質の出発原料から調製され、制御される酸化に付される酸化リン脂質を含む第二の試薬とからなる、凝固検定で使用するための試薬セット。

【請求項3】 前記リン脂質がホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項2記載の試薬セット。

【請求項4】 前記リン脂質がホスファチジルセリンをさらに含む、請求項3記載の試薬セット。

【請求項5】 前記リン脂質がホスファチジルコリンをさらに含む、請求項4記載の試薬セット。

【請求項6】 前記リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン40%、

ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項5記載の試薬セット。

【請求項7】 患者血漿サンプル中の、酸化脂質の作用を選択的に封鎖する抗体の存在を決定するための検定であって、

(a) 前記サンプルの第一のアリコートを得、活性化タンパク質Cを提供し、酸化リン脂質試薬を提供し、凝固を誘発し、凝固時間を計測して第一の凝固時間を得ることによって凝固検定を実施することと、

(b) 同時又は後で、前記サンプルの第二のアリコートを得、活性化タンパク質Cを提供し、非酸化リン脂質試薬を提供し、凝固を誘発し、凝固時間を計測して第二の凝固時間を得ることによって凝固検定を実施することと、

(c) 前記第一の凝固時間を前記第二の凝固時間と比較し、前記第一の凝固時間が前記第二の凝固時間と本質的に同じであるならば、患者サンプルが、酸化脂質の機能を非酸化脂質よりも大きな程度に封鎖する抗体を含有する可能性があることと決定することとを含む検定。

【請求項8】 ベースライン凝固値を得ることをさらに含み、前記ベースライン凝固値を、酸化リン脂質の存在で、ただし活性化タンパク質Cの添加なしで前記サンプルの第三のアリコートの凝固時間を計測し、第三の凝固時間ベースライン値を得、非酸化リン脂質の存在で、ただし活性化タンパク質Cの添加なしで前記サンプルの第四のアリコートの凝固時間を計測し、第四の凝固時間ベースライン値を得ることによって得て、それにより、所与の患者サンプルが、活性化タンパク質Cの非存在で、正常血漿サンプルと比べて延長した凝固時間を示すかどうかを決定し、工程(a)及び(b)にしたがって凝固時間を活性化タンパク質Cの存在で試験したとき、前記患者サンプルが、凝固時間の延長を説明づけることができる他の成分を有するかもしれないと結論づける、請求項7記載の検定。

【請求項9】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項7又は8記載の検定。

【請求項10】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項9記載の検定。

【請求項11】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項10記載の検定。

【請求項12】 前記リン脂質試薬それぞれが、ホスファチジルエタノールアミン40%、ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項11記載の検定。

【請求項13】 患者が血栓症を発現する傾向を決定するための検定であって、前記患者から採取した血漿サンプルの第一の凝固時間を活性化タンパク質C及び酸化リン脂質試薬の存在で計測し、前記患者から採取した血漿サンプルの第二の凝固時間を活性化タンパク質C及び非酸化リン脂質試薬の存在で計測し、結果を分析し、前記第一の凝固時間が前記第二の凝固時間と比べて延長していないならば、前記患者が血栓症を発現する傾向を有すると決定することによる検定。

【請求項14】 前記血漿サンプルから患者免疫グロブリン画分を得、前記免疫グロブリン分を前記凝固時間計測に使用する、請求項13記載の検定。

【請求項15】 前記第一及び第二の凝固時間を計測する前に、前記血漿サンプル又はその免疫グロブリン画分を適量の正常血漿で希釈することをさらに含む、請求項13又は14記載の検定。

【請求項16】 前記正常血漿の適量が、患者血漿サンプル1部に対して3部である、請求項15記載の検定。

【請求項17】 前記正常血漿の適量が、前記免疫グロブリン濃度を約0.6 mg/mlにするのに充分である、請求項15記載の検定。

【請求項18】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項13又は14記載の検定。

【請求項19】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項18記載の検定。

【請求項20】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項19記載の検定。

【請求項21】 前記リン脂質試薬それぞれが、ホスファチジルエタノールアミン40%、ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項20記載の検定。

【請求項22】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項15記載の検定。

【請求項23】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項22記載の検定。

【請求項24】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項23記載の検定。

【請求項25】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項24記載の検定。

【請求項26】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項16又は17記載の検定。

【請求項27】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルセリンをさらに含む、請求項26記載の検定。

【請求項28】 前記リン脂質試薬それぞれがホスファチジルコリンをさらに含む、請求項27記載の検定。

【請求項29】 前記リン脂質試薬それぞれが、ホスファチジルエタノールアミン40%、ホスファチジルセリン20%及びホスファチジルコリン40%を含む、請求項28記載の検定。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/26438										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/86												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	AVIRAM M ET AL: "OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN REDUCES PLASMA COAGULATION IN-VITRO" SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION, vol. 51, no. 1, 1991, pages 17-22, XP000991385 ISSN: 0036-5513	1-6										
Y	the whole document --- -/-	1,7-29										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.											
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family											
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 20 March 2001		Date of mailing of the international search report 02/04/2001										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hart-Davis, J										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/US 00/26438

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARROWCLIFFE T W ET AL: "PHOSPHO LIPID REAGENTS USED IN COAGULATION 2. FACTORS INFLUENCING THEIR SENSITIVITY TO HEPARIN" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 46, no. 3, 1981, pages 634-637, XP000991386 ISSN: 0340-6245 page 636, column 1, paragraph 1 page 637; table 1 ---	2-6
X	BARROWCLIFFE T W ET AL: "PHOSPHO LIPID REAGENTS USED IN COAGULATION 1. SOME GENERAL PROPERTIES AND THEIR SENSITIVITY TO FACTOR-VIII" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 46, no. 3, 1981, pages 629-633, XP000991384 ISSN: 0340-6245 page 631, column 2, paragraph 2 page 632, column 1, paragraph 3 ---	2-6
Y	US 5 472 852 A (SMIRNOV MIKHAIL D ET AL) 5 December 1995 (1995-12-05) cited in the application the whole document ---	1,7-29
A	JAIN S K: "IN-VIVO EXTERNALIZATION OF PHOSPHATIDYLSERINE AND PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE IN THE MEMBRANE BILAYER AND HYPERCOAGULABILITY BY THE LIPID PEROXIDATION OF ERYTHROCYTES IN RATS" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 76, no. 1, 1985, pages 281-286, XP000991383 ISSN: 0021-9738 the whole document ---	1,7,13
A	LESNIK PHILIPPE ET AL: "Tissue Factor Pathway Inhibitor Activity Associated With LDL Is Inactivated by Cell- and Copper-Mediated Oxidation." ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 15, no. 8, 1995, pages 1121-1130, XP000991388 ISSN: 1079-5642 the whole document ---	1,7,13

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/26438

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SMIRNOV MICHAEL D ET AL: "The effect of membrane composition on the hemostatic balance." BIOCHEMISTRY, vol. 38, no. 12, 23 March 1999 (1999-03-23), pages 3591-3598, XP002163434 ISSN: 0006-2960 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>HORKKO SOHVI ET AL: "Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids: Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 98, no. 3, 1996, pages 815-825, XP002163435 ISSN: 0021-9738 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	
P, A	<p>ESMON NAOMI L ET AL: "Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway." JOURNAL OF AUTOIMMUNITY, vol. 15, no. 2, 2000, pages 221-225, XP000992142 ISSN: 0896-8411 page 223</p> <p>-----</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/26438

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5472852 A	05-12-1995	AU 695553 B	13-08-1998
		AU 7729394 A	03-04-1995
		CA 2171721 A	23-03-1995
		DE 69403088 D	12-06-1997
		DE 69403088 T	18-12-1997
		EP 0719415 A	03-07-1996
		WO 9508121 A	23-03-1995

フロントページの続き

(72)発明者 セイファ、ジャミラバディ、オウミド  
アメリカ合衆国オウクラホウマ州73120、  
オウクラホウマ・シティ、ブラーズァ・テ  
ラス 13321番 #285

专利名称(译)	使用氧化磷脂评估血栓形成风险		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003510610A</a>	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001527230	申请日	2000-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	甬类侯马医学研究发现日山		
申请(专利权)人(译)	Oukurahouma, 医疗, 科研, 小鹿日山		
[标]发明人	エマスンナオミエル セイファジャミラバディオウミド		
发明人	エマスン, ナオミ, エル セイファ, ジャミラバディ, オウミド		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/86		
CPC分类号	G01N33/86 G01N2405/04		
FI分类号	G01N33/49.Z G01N33/53.N G01N33/566		
优先权	60/156564 1999-09-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

为了评估血栓形成的风险，在凝结测定中将包括磷脂在内的氧化脂质用作膜源，并在存在和不存在活化蛋白C (“APC”) 的情况下分析了未氧化磷脂的结果。与用作膜源的测定法进行比较。该测定法可以监测患者中以氧化依赖性或非依赖性方式特异性干扰APC的抗凝功能的抗体的存在。这可以表明患者倾向于出现静脉血栓形成或动脉血栓形成的症状。

