

(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 - 507712**

(P2003 - 507712A)

(43)公表日 平成15年2月25日(2003.2.25)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	L 2 G 0 4 5
21/78		21/78	C 2 G 0 5 4
33/86		33/86	

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 27数 )

(21)出願番号	特願2001 - 517174(P2001 - 517174)	(71)出願人	ノヴェンパー アクティエンゲゼルシャフト ゲゼルシャフト フューア モレクラ ーレ メディツィーン NOVEMBER AKTIENGE SELLSCHAFT GESELLSC HAFT FUR MOLEKULAR E MEDIZIN ドイツ連邦共和国 エルランゲン 91056 ウルリッヒ - シャルク - シュトラーセ 3 A
(86)(22)出願日	平成12年8月11日(2000.8.11)	(74)代理人	弁理士 小笠原 史朗
(85)翻訳文提出日	平成14年2月8日(2002.2.8)		
(86)国際出願番号	PCT/DE00/02748		
(87)国際公開番号	W001/013123		
(87)国際公開日	平成13年2月22日(2001.2.22)		
(31)優先権主張番号	199 37 654.9		
(32)優先日	平成11年8月14日(1999.8.14)		
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		
(31)優先権主張番号	199 41 447.5		
(32)優先日	平成11年8月31日(1999.8.31)		
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血液凝固状態の間接的測定方法

(57)【要約】

本発明は、血液の凝固状態を間接的に測定するための方法に関する。本発明の方法は、a) ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性可能なプロテインを含む体液を採取するステップ、b) カルボキシル化プロテインの第1の濃度C1、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度C2、およびカルボキシル化プロテインと脱カルボキシル化プロテインとの総濃度C3からなる群から選ばれる少なくとも2つの濃度を測定するステップであって、これにより第1の濃度C1は第1の抗体A1を用いて測定され、第2の濃度C2は第2の抗体A2を用いて測定され、第3の濃度C3は第3の抗体A3を用いて測定され、c) 第1C1と第2の濃度C2とから第1の比率Q1を生成するステップ、または第3C3と第1の濃度C1とから第2の比率Q2を生成するステップ、または第3C3と第2の濃度C2とから第3の比率Q3を生成するステップであって、これにより、ステップb)で測定されず、かつ第1Q1、第2Q2、または第3Q3の比率の生成に必要な濃度C1、C2、C3を次の関係に従って計算し、 $C3 - C2 = C1$ 、d) 第1、第2、または第3の比率Q1、Q2、Q3を血液の凝固状態と相関させるステップを備える。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 血液の凝固状態を間接的に測定する方法であって、

a) ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性可能なプロテインを含む体液を除去するステップ、

b) カルボキシル化プロテインの第1の濃度(C1)、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度(C2)、およびカルボキシル化プロテインと脱カルボキシル化プロテインとの総濃度(C3)からなる群から選ばれる少なくとも2つの濃度を測定するステップであって、第1の濃度(C1)は第1の抗体(A1)を用いて測定され、第2の濃度(C2)は第2の抗体(A2)を用いて測定され、第3の濃度(C3)は第3の抗体(A3)を用いて測定され、

c) 第1と第2の濃度(C2)とから第1の比率(R1)を構成するステップ、または

第3(C3)と第1の濃度(C1)とから第2の比率(R2)を構成するステップ、または

第3(C3)と第2の濃度(C2)とから第3の比率(R3)を構成するステップであって、第1(R1)、第2(R2)、または第3(R3)の比率の構成に必要であり、かつステップb)で測定されない濃度(C1、C2、C3)を以下の関係に従って計算し、

$$C3 - C2 = C1、$$

d) 第1、第2、または第3の比率(R1、R2、R3)を血液の凝固状態と相関させるステップを備える、方法。

【請求項2】 さらにステップb)において、少なくとも、第1の濃度(C1)測定に第1のコンペティタ(K1)を使用し、第2の濃度(C2)測定に第2のコンペティタ(K2)を使用し、または第3の濃度(C3)測定に第3のコンペティタ(K3)を使用することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 抗体(A1、A2、A3)の少なくとも1つ、またはコンペティタ(K1、K2、K3)の少なくとも1つを標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役させることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 ステップb)で少なくとも2つの濃度を測定する代わりに、それらに相関する合成信号を生成して、その信号を、第1(A1)、第2(A2)、および第3(A3)の抗体からなる群から選ばれる2つの抗体と、必要であれば少なくとも1つのコンペティタ(K1、K2、K3)とを使用して測定し、血液の凝固状態と直接的に関連づけることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 合成信号は、特に蛍光色素、フォルスター効果により誘発される蛍光信号、または蛍光信号内の消光剤により引き起こされる還元により生成される合成色であることを特徴とする、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 体液は血漿、血液、唾液、尿などであることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 第1(C1)、第2(C2)、および/または第3の濃度(C3)、または合成信号の測定は、免疫学的方法で行われることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 免疫学的方法において、抗体(A1、A2、A3)の少なくとも1つは、支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜によって固定化されることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 第1(C1)、第2(C2)、および/または第3の濃度(C3)、および/または合成信号は、色反応あるいは蛍光検出によって測定されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性可能なプロテインは、プロトロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、ネフロカルシン、またはオステオカルシンであることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 上記請求項のいずれかに記載の方法を実行するためのキットであって、カルボキシル化プロテインの第1の濃度(C1)を免疫学的に測定するための第1の抗体(A1)と、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度(C2)を免疫学的に測定するための第2の抗体(A2)と、カルボキシル化およ

び脱カルボキシル化プロテインの総濃度(C3)を免疫学的に測定するための第3の抗体(A3)からなる群から選ばれる少なくとも2つの抗体を含むことを特徴とする、キット。

【請求項12】 少なくとも、第1の濃度(C1)を測定するための第1のコンペティタ(K1)、第2の濃度(C2)を測定するための第2のコンペティタ(K2)、または第3の濃度(C3)を測定するための第3のコンペティタ(K3)をさらに含むことを特徴とする、請求項11に記載のキット。

【請求項13】 抗体(A1、A2、A3)の少なくとも1つ、またはコンペティタ(K1、K2、K3)の少なくとも1つは、標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役されていることを特徴とする、請求項11または12に記載のキット。

【請求項14】 第1(A1)および第2の抗体(A2)は、支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜によって固定されることを特徴とする、請求項11から13のいずれかに記載のキット。

【請求項15】 支持体が試験用ストリップであり、第1(A1)および第2の抗体(A2)をそれぞれ試験用ストリップの異なる領域に吸収させることを特徴とする、請求項14に記載のキット。

【請求項16】 標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役させた第3の抗体(A3)が含まれることを特徴とする、請求項14または15に記載のキット。

【請求項17】 第3の抗体(A3)が前記、または別の支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜により固定化されることを特徴とする、請求項11から16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 支持体が前記、または別の試験用ストリップであり、第3の抗体(A3)をその試験用ストリップの領域に吸収させることを特徴とする、

請求項17に記載のキット。

【請求項19】 標識化物質、特に酵素、蛍光色素、または消光剤に共役させた第1(A1)および第2の抗体(A2)が含まれ、これら標識化物質は共に合成信号、特に合成色、フォルスター効果により誘発される蛍光信号、または蛍光信号内の消光剤により引き起こされる還元を生成できるように選ばれることを特徴とする、請求項17または18に記載のキット。

【請求項20】 プロテインはプロトンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、ネフロカルシン、またはオステオカルシンであることを特徴とする、請求項11から19のいずれかに記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、血液の凝固状態を間接的に測定する方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

血液の凝固状態は、ヒト体液中のプロトロンビン濃度を測定することにより間接的に測定され得る。プロトロンビンは、主にヒト血漿中に生じるプロテインである。このプロテインは、ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性され得る。プロトロンビンが血液凝固の原因の一端であり、フィブリノゲン（繊維素原）をフィブリン（繊維素）に転換する。

**【0003】**

この、プロトロンビンにより誘起されるフィブリノゲンの転換は、プロトロンビンが自然状態のカルボキシル化された場合にのみ起きる。カルボキシル化は、カルボキシラーゼが補助因子であるビタミンKと結合することにより、肝臓において引き起こされる。カルボキシラーゼ活性はビタミンKの濃度により左右される。カルボキシラーゼ活性が減少すると、異常状態で脱カルボキシル化され、凝固活性を有さないプロトロンビンが生成される。

**【0004】**

健康体においては、プロトロンビンは自然状態、すなわちカルボキシル化された状態にある。カルボキシル化の際に、ビタミンKは補助因子の役割を果たす。病人、特に肝臓疾患あるいは抗凝固剤投与者においては、プロトロンビンは異常状態で生じる。

**【0005】**

カルボキシル化プロトロンビンは、 $Ca^{2+}$ イオンが予め結合している場合にのみ凝固を引き起こす。カルボキシル化プロトロンビンは、その場合に初めて血液の血小板の膜と結合して凝固を引き起こすようになる。プロトロンビンは、カルボキシル化状態でのみカルシウム結合が可能である。このように、血液の凝固状態は、カルボキシル化プロトロンビンの含有量によって推定可能である。

## 【0006】

米国特許第4,769,320号に開示の方法では、カルボキシル化プロトロンビンの含有量は、免疫測定法で抗体を使用して測定される。これら抗体は、カルシウムが存在する状態でカルボキシル化プロトロンビンに特異なものであり、脱カルボキシル化プロトロンビンには結合しない。血漿サンプル中のカルボキシル化プロトロンビンのレベルを測定し、このような抗体を含むキットが説明されている。

## 【0007】

米国特許第5,252,712号では、脱カルボキシル化プロトロンビンに特異なモノクローナル抗体を開示している。免疫測定法でこの抗体を使用することで、脱カルボキシル化プロトロンビンの濃度測定が可能になる。さらに、血液凝固の状態に関する情報を得ることも可能になる。

## 【0008】

米国特許第4,780,410号では、脱カルボキシル化プロトロンビンを定量するためのサンドイッチ免疫測定法を開示している。この方法では、脱カルボキシル化プロトロンビン向けの固定化モノクローナル抗体が使用され、この抗体に結合した脱カルボキシル化プロトロンビンは、プロトロンビン向けの第2の抗体によって検出される。この方法を実行するためのキットも説明されている。

## 【0009】

コーンバーグ A等、"Circulation 88(1993)"、第454~460頁では、コンペティタを使用する、サンプル中のカルボキシル化プロトロンビンの濃度測定法を開示している。この場合、抗プロトロンビン固定化抗体との結合に対して、ペルオキシダーゼで標識化されたプロトロンビンが、サンプル中のプロトロンビンとコンペティタとして競合的に反応する。抗プロトロンビン抗体に結合した、ペルオキシダーゼで標識化されたプロトロンビンは、酵素反応により検出され得る。この結果生成される信号の大きさは、サンプル中のプロトロンビン濃度に対して反比例する。

## 【0010】

特開平5-284994号公報では、3種類のモノクローナル抗体を開示して

いる。第1の抗体は、ヒト脱カルボキシル化プロトロンビンに特異的に結合し、第2の抗体は、ヒトプロトロンビン、ヒトトロンビン、およびヒト脱カルボキシル化プロトロンビンに特異的に結合し、第3の抗体は、ヒト脱カルボキシル化プロトロンビン、およびヒトプロトロンビンに特異的に結合する。

#### 【0011】

モノクローナル抗体を用いての、エライサ(ELISA)による血液中の脱カルボキシル化プロトロンビンの測定法は、フォン・クリース R等、"Thrombosis and Haemostatis 68(1992)"、第383~387頁に開示されている。

#### 【0012】

##### 【発明が解決しようとする課題】

従来例における問題は、分析用サンプルがその採取後、直ちに分析されるとは限らない点にある。サンプルの輸送に1、2日かかる場合もある。血液凝固に関与する因子のほとんどが高感度であり、かつすぐに不活性化してしまう。この間、主にサンプル中のカルボキシル化、および脱カルボキシル化プロトロンビンが分解してしまう。その結果、血液凝固の状態が事実と反するものとなる。

#### 【0013】

本発明の目的は、従来例の不都合を解消することにある。特に、プロトロンビンの含有量の測定法を利用して、血液凝固の状態をより正確に測定することにある。さらに、血液凝固の状態のより正確な測定を可能にするキットを提供することにある。

#### 【0014】

##### 【課題を解決するための手段および発明の効果】

本目的は、請求項1および11の特徴により達成される。本発明の好適な成果は、請求項2~10、および12~20の特徴により明らかである。

#### 【0015】

本発明によれば、血液の凝固状態を間接的に測定する方法であって、

a) ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性可能なプロテインを含む体液を除去するステップ、

b) カルボキシル化プロテインの第1の濃度、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度、およびカルボキシル化プロテインと脱カルボキシル化プロテインとの総濃度からなる群から選ばれる少なくとも2つの濃度を測定するステップであって、第1の濃度は第1の抗体を用いて測定され、第2の濃度は第2の抗体を用いて測定され、第3の濃度は第3の抗体を用いて測定され、

c) 第1と第2の濃度とから第1の比率を構成するステップ、または第3と第1の濃度とから第2の比率を構成するステップ、または第3と第2の濃度とから第3の比率を構成するステップであって、第1、第2、または第3の比率の構成に必要であり、かつステップb)で測定されない濃度を以下の関係に従って計算し、

$$C3 - C2 = C1、$$

d) 第1、第2、または第3の比率を血液の凝固状態と相関させるステップを備える、方法。

#### 【0016】

ここで、ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性可能なプロテインは、血液の凝固状態に応じて、カルボキシル化、および脱カルボキシル化状態の両方に比例して存在するプロテインであってもよい。このプロテインは、患者からの採取が容易なプロテイン、例えば唾液からのプロテインであってもよい。また、このプロテインは、プロトロンビンと同比率で低変性されたプロテインであってもよい。抗体は、本発明における目的のために、カルボキシル化プロテイン、脱カルボキシル化プロテイン、またはその両方に対して結合特異性を有する抗体、抗体フラグメント、またはその他物質であってもよい。

#### 【0017】

本発明における方法によれば、変性可能なプロテインの含有量に基づいて、血液の凝固状態を正確に測定することが可能になる。この血液の凝固状態測定法による誤差は、カルボキシル化プロテインの含有量と脱カルボキシル化プロテインの含有量との両方とこれら2つのプロテイン含有量の関連を考慮に入れることにより、さらに最小化される。

#### 【0018】

本発明の一実施形態によれば、さらにステップb)において、少なくとも、第1の濃度測定に第1のコンペティタを使用し、第2の濃度測定に第2のコンペティタを使用し、または第3の濃度測定に第3のコンペティタを使用する。ここでいうコンペティタは、抗体の1つと結合するために、カルボキシル化プロテイン、または脱カルボキシル化プロテイン、またはカルボキシル化/脱カルボキシル化プロテインと競合的に反応する物質である。このコンペティタは、カルボキシル化プロテインまたは脱カルボキシル化プロテインのどちらであってもよく、いずれの場合においても、標識化物質が付与される。完全なプロテインの代わりに、このプロテインのフラグメントをコンペティタとして使用することもできる。

#### 【0019】

これら抗体の少なくとも1つ、またはこれらコンペティタの少なくとも1つを標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役させるのが好ましい。酵素的反応により検出可能な酵素であれば、酵素として使用し得る。金粒子で抗体を標識化すれば、結合抗体がプラズモン共鳴法で検出可能になる。

#### 【0020】

ステップb)で少なくとも2つの濃度を測定する代わりに、それらに相関する合成信号を生成して、その信号を、第1、第2、および第3の抗体からなる群から選ばれる2つの抗体と、必要であれば少なくとも1つのコンペティタとを使用して測定し、血液の凝固状態と直接的に関連づけることも可能である。合成信号は、それぞれ異なる信号が共に作用することによって生成され、第1、第2、または第3の比率に対応する。ステップc)におけるこれら比率の構成が不要になるため、この方法のより素早い簡便な実行が可能になる。合成信号は、特に蛍光色素、フォルスター効果により誘発される蛍光信号、または蛍光信号内の消光剤により引き起こされる還元により生成される合成色であってもよい。さらに、この合成色は、それぞれ特有の色反応に触媒作用を及ぼす2つの酵素によって生成されてもよい。フォルスター効果は、励起された第1の蛍光体から、隣接する第2の蛍光体への無放射エネルギー移動に関与する。その結果、第2の蛍光体が励起されて蛍光を発している間、第1の蛍光体は基底状態に移行する。、本発明の

方法によれば、例えば、第1および第2の抗体を、第1の効果を実現するこれら蛍光体と共役させることも可能である。フォルスター効果により誘発される蛍光信号により、第1の抗体と、隣接する第2の抗体との結合が実現できる。蛍光体から消光剤への無放射エネルギー移動がなされると、その蛍光体は消光される。従って、測定可能な総蛍光信号が低減する。

#### 【0021】

便宜上、体液は血漿、血液、唾液、尿などでもよい。原則的に、変性可能なプロテインを測定可能な含有量含んでいれば、どの体液も好適である。

#### 【0022】

本発明の進歩的特徴によれば、第1、第2、および/または第3の濃度、または合成信号の測定は、免疫学的方法で行われる。この場合の免疫学的方法は、支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜によって固定化される、少なくとも1つの抗体に關与する。プラスチックの形状は、試験用チューブ、試験用ストリップ、プラスチック粒子、または微量定量プレートのくぼみであってもよい。

#### 【0023】

第1、第2、および/または第3の濃度、および/または合成信号は、色反応あるいは蛍光検出によっても測定可能である。この場合、血液の凝固状態を特に素早く簡便に測定することができる。

#### 【0024】

好ましくは、ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性可能なプロテインは、脱カルボキシル化の状態において「ビタミンK拮抗作用、または欠乏により誘起されるプロテイン」と称される、凝固因子(PIVKA因子)、すなわちプロトロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子のうちの1つ、またはネフロカルシンあるいはオステオカルシンである。ビタミンK依存性カルボキシラーゼによってカルボキシル化され、経口用の抗凝固薬により同様に作用し得る他のプロテインでも、血液の凝固状態の測定に使用することができる。例えば、ネフロカルシンは、尿中などで検出可能である。その際、このプロテイン用に血液を採取する必要はない。そのため、血液の凝固状態の絶え間ないモニタリングを

必要とする患者の苦痛を著しく緩和できる。

【0025】

さらに、本発明の方法を実行するためのキットが提供され、このキットには、カルボキシル化プロテインの第1の濃度を免疫学的に測定するための第1の抗体と、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度を免疫学的に測定するための第2の抗体と、カルボキシル化および脱カルボキシル化プロテインの総濃度を免疫学的に測定するための第3の抗体からなる群から選ばれる少なくとも2つの抗体が含まれる。

【0026】

第1、第2、および第3の抗体は従来技術で既知の抗体であってよい。それら抗体は、例えば、米国特許第5,252,712号、および米国特許第4,769,320号に開示されており、その内容は参照目的でここに援用する。

【0027】

キットは、少なくとも、第1の濃度を測定するための第1のコンペティタ、第2の濃度を測定するための第2のコンペティタ、または第3の濃度を測定するための第3のコンペティタをさらに含んでいてもよい。このキットに含まれるこれら抗体またはコンペティタのうちの少なくとも1つは、標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役させるのが好ましい。

【0028】

第1および第2の抗体は、好ましくは支持体により固定化される。支持体はプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜であってよい。支持体が試験用ストリップである場合、第1および第2の抗体をそれぞれ試験用ストリップの異なる領域に吸収させる。好ましくは、このキットには、標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役させた第3の抗体が含まれる。その場合、例えば試験用ストリップ上の色反応により、それぞれの含有量の測定がとりわけ簡便化される。

【0029】

本発明のさらなる成果によれば、第3の抗体は上記、または別の支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜により固定化される。支持体が上記、または別の試験用ストリップである場合、第3の抗体をその試験用ストリップの領域に吸収させることが可能になる。好ましくは、このキットには、いずれも標識化物質、特に酵素、蛍光色素、または消光剤に共役させた第1および第2の抗体が含まれ、これら標識化物質は共に合成信号、特に合成色、フォルスター効果により誘発された蛍光信号、または蛍光信号内の消光剤により引き起こされる還元を生成できるように選ばれる。合成信号は第1の比率に対応する。

#### 【0030】

好ましくは、プロテインはプロトロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、ネフロカルシン、またはオステオカルシンである。

#### 【0031】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の方法について、以下に図面を参照して説明する。

図1は、血液の凝固状態とcPT/dcPTとの関連を示し、

図2は、血液の凝固状態とdcPT/cPTとの関連を示し、

図3は、血液の凝固状態とdcPTとの関連を示す。

#### 【0032】

図1は、血液凝固状態INRに対する、カルボキシル化、および脱カルボキシル化プロトロンビンの濃度の比率を示すグラフである。この場合の濃度はOD値として測定される。血液凝固状態INRは、測定比率が0.5である場合、3.8である。

#### 【0033】

図2は、血液凝固状態INRに対する脱カルボキシル化、およびカルボキシル化プロトロンビンの濃度の比率を示すグラフである。この場合の比率は、特に血液凝固状態INRとよく相関していることが判る。

#### 【0034】

図3は、血液凝固状態INRと、従来技術のdcPTとの関連性を示すグラフ

であり、サンプル採取者の年齢が高くなるにつれて変化する。

【0035】

(実施例1)

微量定量プレートを使用する、いわゆるエライサ(ELISA)が連続測定には特に適している。

【0036】

a) サンプルの準備

微量定量プレート(Maxisorb、NUNC)のくぼみを、それぞれ50  $\mu$ lの抗体(炭酸塩緩衝液中で10  $\mu$ g/ml)で一晩、4℃の温度でコーティングする。その後、くぼみをPBSで3回洗浄する。そのくぼみごとに、非特異的な結合部をPBS中で1%BSAを50  $\mu$ lで1時間、室温で飽和させる。その後、くぼみをPBS/0.05%トウイーン(Tween)20で3回洗浄する。

【0037】

次に、PBS/0.1%BSA(くぼみごとに50  $\mu$ l)で1:50に希釈した以下のサンプルを微量定量プレートにそれぞれ載せる。

キャリブレーション血漿、

正常血漿、

患者の血漿、および

プロトンピン欠乏血漿(陰性対照)。

【0038】

微量定量プレートを室温で1時間培養させる。その後、くぼみをPBS/0.05%トウイーン20で3回洗浄する。くぼみごとに、ウサギ抗完全プロトンピンを50  $\mu$ l(10  $\mu$ g/ml)添加する。次に、微量定量プレートを室温で1時間培養させる。その後、くぼみをPBS/0.05%トウイーン20で3回洗浄する。ビオチンに共役させた(Dionova、PBS/0.1%BSAで1:20000)ヤギ抗ウサギ抗体をくぼみごとに50  $\mu$ l添加する。その微量定量プレートを室温で1時間培養させる。その後、くぼみをPBS/0.05%トウイーン20で3回洗浄する。

## 【0039】

ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体をくぼみごとに50 $\mu$ l添加する(Roche Diagnostics、共役緩衝液中で1:1000)。その微量定量プレートは室温で1時間培養させる。その後、くぼみをPBS/0.05%トウエン20で3回洗浄する。

## 【0040】

進歩的反応を実現するために、くぼみごとにABTS溶液(Roche Diagnostics、1mg/ml)を50 $\mu$ l添加する。その後、微量定量プレートを室温で30分から1時間培養させる。吸収度(OD値)をエリサ(ELISA)読み取り装置で測定する。

## 【0041】

結合プロトロンビンの検出に使用する抗プロトロンビン抗体が、ペルオキシダーゼなどの酵素を標識化物質としてすでに含んでいる場合、この方法が著しく短縮され得ることは自明である。この方法をさらに短縮するには、蛍光体などの直接検出可能な標識化物質を使用する。そのような標識化物質を使用する場合、進歩的反応は必要ない。

## 【0042】

## b) 評価

下記のもので測定される。

aa) 完全プロトロンビンのOD値(くぼみはモノクローナル抗完全プロトロンビン抗体でコーティングされる)

bb) 脱カルボキシル化プロトロンビンのOD値(くぼみはモノクローナル抗脱カルボキシル化プロトロンビン抗体でコーティングされる)

cc) カルボキシル化プロトロンビンのOD値(完全プロトロンビンのOD値と、脱プロトロンビンのOD値との差)。

## 【0043】

その後、キャリブレーション血漿の測定OD値(図1~3、ポイントA、B、CおよびD参照)、および患者の測定血漿のINRに基づいて、キャリブレーショングラフを構成する。

## 【0044】

凝固状態は、ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより変性可能な、プロトロンビン以外のプロテインの対応濃度を測定することによっても測定できることは自明である。例えば、第VII因子、第IX因子、第X因子、ネフロカルシン、またはオステオカルシンなどのプロテインである。

## 【0045】

## (実施例2)

微量定量プレート(Maxisorb、NUNC)の各くぼみを、カルボキシル化および脱カルボキシル化プロトロンビン向けの抗体、または脱カルボキシル化プロトロンビン向けの抗体(炭酸塩緩衝液中で $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) $50\mu\text{l}$ で、一晩、 $4^\circ\text{C}$ の温度でコーティングする。その後、くぼみをPBSで3回洗浄する。そのくぼみごとに、非特異的な結合部をPBS中で1%BSAを $50\mu\text{l}$ で1時間、室温で飽和させる。その後、くぼみをPBS/0.05%トウイン20で3回洗浄する。

## 【0046】

次に、ペルオキシダーゼで標識化された脱カルボキシル化プロトロンビンを、以下のサンプル、すなわちPBS/0.1%BSAで1:50に希釈し、最終的な濃度が $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のサンプルと共に、くぼみが抗体でコーティングされた微量定量プレートに載せる(くぼみごとに $50\mu\text{l}$ )。

キャリブレーション血漿、

正常血漿、

患者の血漿、および

プロトロンビン欠乏血漿(陰性対照)。

## 【0047】

その微量定量プレートを室温で1時間培養させる。その後、くぼみをPBS/0.05%トウイン20で3回洗浄する。、そのくぼみごとに、ABTS溶液(Roche Diagnostics、 $1\text{mg}/\text{ml}$ ) $50\mu\text{l}$ を添加する。その後、微量定量プレートを30分から1時間室温で培養させる。この微量定量プレートのかくぼみにおけるOD値を、エリサ(ELISA)読み取り装置で測

定する。くぼみのOD値が高いほど、その特定サンプル中のプロトロンビン濃度が低いことを示す。患者の血漿中のプロトロンビン濃度を、キャリブレーション血漿を利用して構成したキャリブレーショングラフにより測定する。カルボキシル化、および脱カルボキシル化プロトロンビン向けの抗体でコーティングされたくぼみは、カルボキシル化および脱カルボキシル化プロトロンビンの総濃度測定に使用する。脱カルボキシル化プロトロンビン向けの抗体でコーティングされたくぼみは、脱カルボキシル化プロトロンビンの濃度測定に使用する。カルボキシル化および脱カルボキシル化プロトロンビンの測定総濃度と、脱カルボキシル化プロトロンビンの濃度との比率が判る。キャリブレーション血漿の比率に基づいて、この比率から凝固状態を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、血液の凝固状態とcPT/dcPTとの関連を示す。

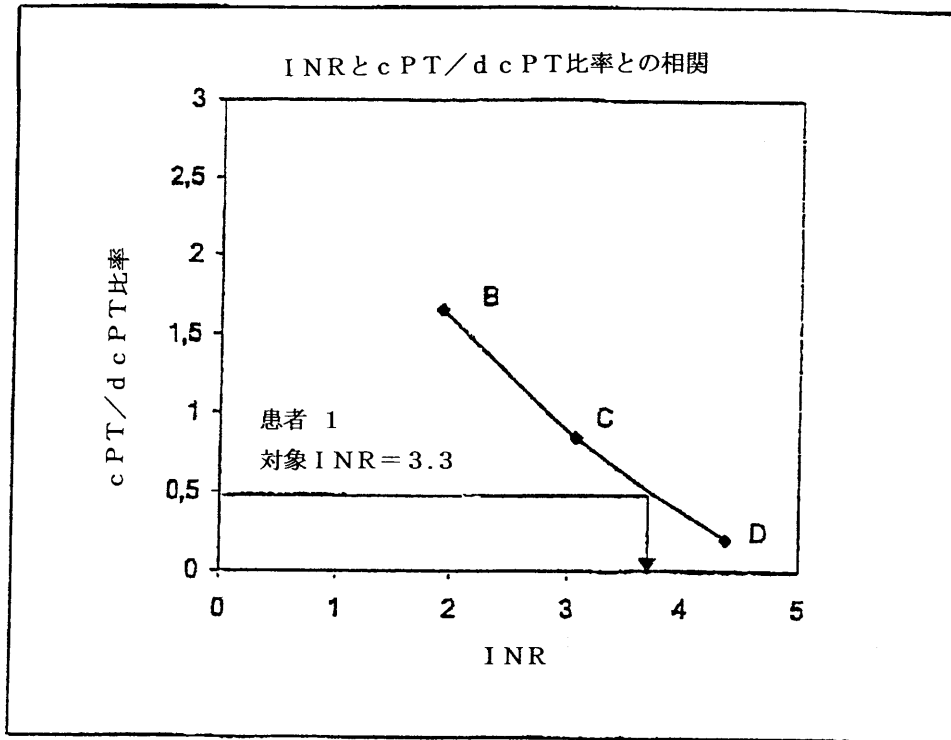
【図2】

図2は、血液の凝固状態とdcPT/cPTとの関連を示す。

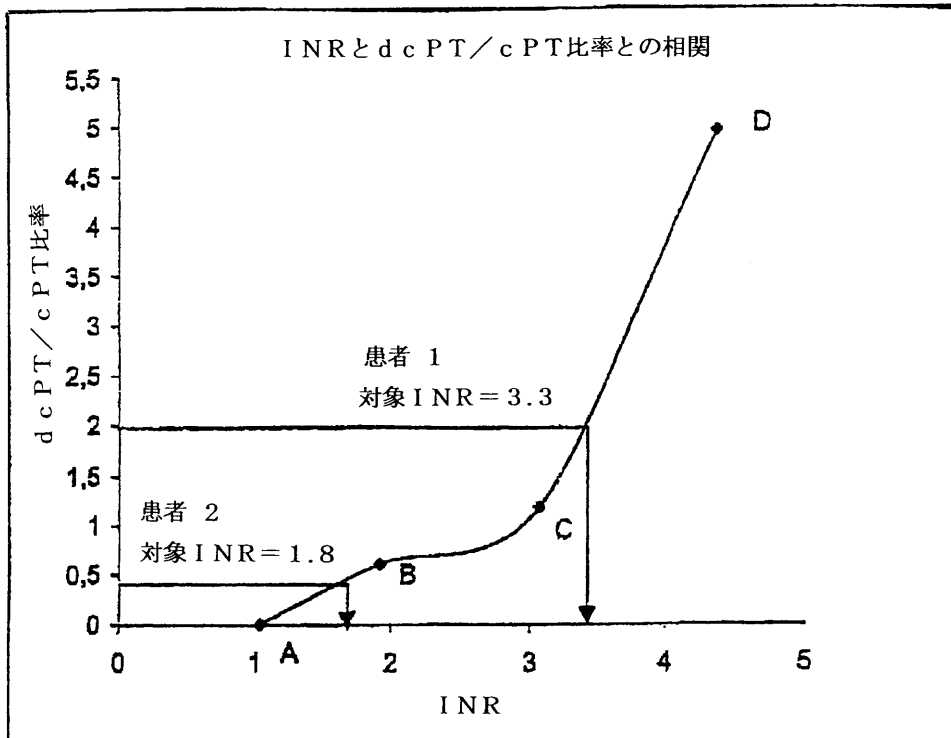
【図3】

図3は、血液の凝固状態とdcPTとの関連を示す。

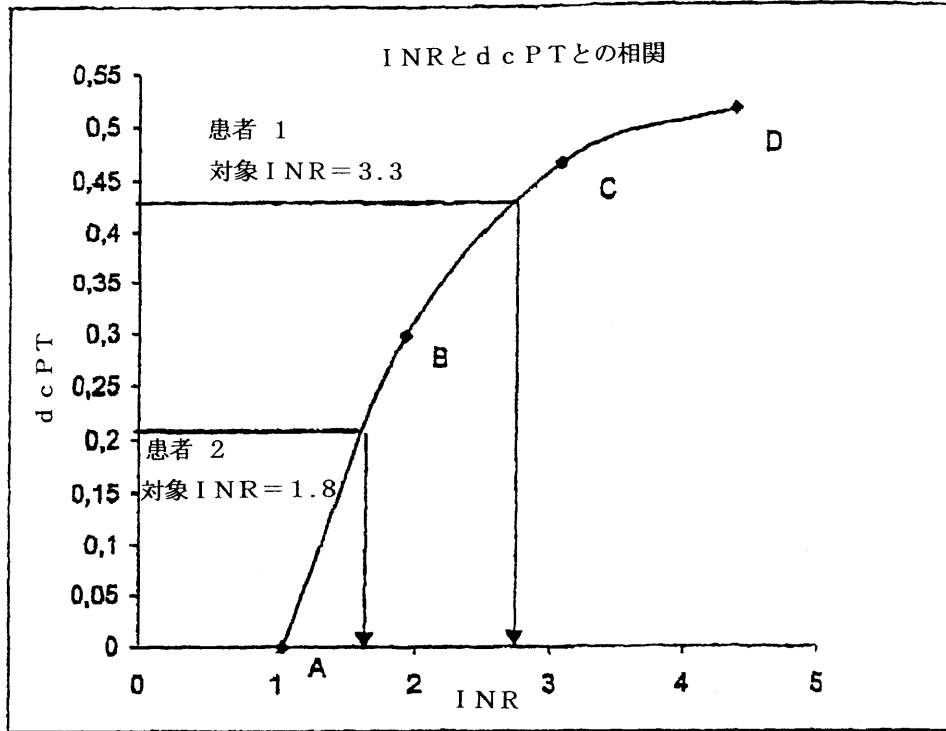
【図1】



【図2】



【図3】



【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11月9日(2001.11.9)

【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】 血液の凝固状態を間接的に測定する方法であって、

a) ビタミンK依存性 カルボキシラーゼにより変性可能なプロテインを含む体液のサンプルを準備するステップ、

b) カルボキシル化プロテインの第1の濃度(C1)、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度(C2)、およびカルボキシル化プロテインと脱カルボキシル化プロテインとの総濃度(C3)からなる群から選ばれる少なくとも2つの濃度を測定するステップであって、第1の濃度(C1)は第1の抗体(A1)を用いて測定され、第2の濃度(C2)は第2の抗体(A2)を用いて測定され、第3の濃度(C3)は第3の抗体(A3)を用いて測定され、

c) 第1と第2の濃度(C2)とから第1の比率(R1)を構成するステップ、または

第3(C3)と第1の濃度(C1)とから第2の比率(R2)を構成するステップ、または

第3(C3)と第2の濃度(C2)とから第3の比率(R3)を構成するステップであって、第1(R1)、第2(R2)、または第3(R3)の比率の構成に必要であり、かつステップb)で測定されない濃度(C1、C2、C3)を以下の関係に従って計算し、

$$C3 - C2 = C1、$$

d) 第1、第2、または第3の比率(R1、R2、R3)を血液の凝固状態と相関させるステップを備える、方法。

【請求項2】 さらにステップb)において、少なくとも、第1の濃度(C

1) 測定に第1のコンペティタ(K1)を使用し、第2の濃度(C2)測定に第2のコンペティタ(K2)を使用し、または第3の濃度(C3)測定に第3のコンペティタ(K3)を使用することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 抗体(A1、A2、A3)の少なくとも1つ、またはコンペティタ(K1、K2、K3)の少なくとも1つを標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役させることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 ステップb)で少なくとも2つの濃度を測定する代わりに、それらに相関する合成信号を生成して、その信号を、第1(A1)、第2(A2)、および第3(A3)の抗体からなる群から選ばれる2つの抗体と、必要であれば少なくとも1つのコンペティタ(K1、K2、K3)とを使用して測定し、血液の凝固状態と直接的に関連づけることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 合成信号は、特に蛍光色素、フォルスター効果により誘発される蛍光信号、または蛍光信号内の消光剤により引き起こされる還元により生成される合成色であることを特徴とする、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 体液は血漿、血液、唾液、尿などであることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 第1(C1)、第2(C2)、および/または第3の濃度(C3)、または合成信号の測定は、免疫学的方法で行われることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 免疫学的方法において、抗体(A1、A2、A3)の少なくとも1つは、支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜によって固定化されることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 第1(C1)、第2(C2)、および/または第3の濃度(C3)、および/または合成信号は、色反応あるいは蛍光検出によって測定されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 ビタミンK依存性 カルボキシラーゼにより変性可能なプ

ロテインは、プロトロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、ネフロカルシン、またはオステオカルシンであることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 上記請求項のいずれかに記載の方法を実行するためのキットであって、カルボキシル化プロテインの第1の濃度(C1)を免疫学的に測定するための第1の抗体(A1)と、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度(C2)を免疫学的に測定するための第2の抗体(A2)とを含み、

第1(A1)および第2の抗体(A2)はいずれも標識化物質に共役され、標識化物質は合成信号を共に生成できるよう選択されることを特徴とする、キット。

【請求項12】 標識化物質は、酵素、蛍光色素、または消光剤であることを特徴とする、請求項11に記載のキット。

【請求項13】 合成信号は、合成色、フォルスター効果により誘発される蛍光信号、または蛍光信号内の消光剤により引き起こされる還元であることを特徴とする、請求項11または12に記載のキット。

【請求項14】 プロテインはプロトロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、ネフロカルシン、またはオステオカルシンであることを特徴とする、請求項11から13のいずれかに記載のキット。

【請求項15】 請求項1から10に記載の方法を実行するためのキットの使用であって、キットは、

カルボキシル化プロテインの第1の濃度(C1)を免疫学的に測定するための第1の抗体(A1)と、脱カルボキシル化プロテインの第2の濃度(C2)を免疫学的に測定するための第2の抗体(A2)と、カルボキシル化および脱カルボキシル化プロテインの総濃度(C3)を免疫学的に測定するための第3の抗体(A3)からなる群から選ばれる少なくとも2つの抗体を含むことを特徴とする、キットの使用。

【請求項16】 さらに、少なくとも、第1の濃度(C1)を測定するための第1のコンペティタ(K1)が存在し、第2の濃度(C2)を測定するための第2のコンペティタ(K2)が存在し、または第3の濃度(C3)を測定するた

めの第3のコンペティタ(K3)が存在することを特徴とする、請求項15に記載の使用。

【請求項17】 抗体(A1、A2、A3)の少なくとも1つ、またはコンペティタ(K1、K2、K3)の少なくとも1つは、標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役されていることを特徴とする、請求項15または16に記載の使用。

【請求項18】 第1(A1)および第2の抗体(A2)は、支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜によって固定されることを特徴とする、請求項15から17のいずれかに記載の使用。

【請求項19】 支持体が試験用ストリップであり、第1(A1)および第2の抗体(A2)をそれぞれ試験用ストリップの異なる領域に吸収させることを特徴とする、請求項18に記載の使用。

【請求項20】 標識化物質、特に酵素、蛍光色素、消光剤、金粒子、ラテックス粒子、ビオチン、ストレプトアビジン、またはアビジンと共役させた第3の抗体(A3)が含まれることを特徴とする、請求項18または19に記載の使用。

【請求項21】 第3の抗体(A3)が前記、または別の支持体、特にプラスチック、磁気粒子、ラテックス粒子、金粒子、試験用ストリップ、または膜により固定化されることを特徴とする、請求項15から20のいずれかに記載の使用。

【請求項22】 支持体が前記、または別の試験用ストリップであり、第3の抗体(A3)をその試験用ストリップの領域に吸収させることを特徴とする、請求項21に記載の使用。

【請求項23】 プロテインはプロトンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子、ネフロカルシン、またはオステオカルシンであることを特徴とする、請求項15から22のいずれかに記載の使用。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/DE 00/02748
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/86 G01N33/58 G01N33/543		
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	US 5 252 712 A (FURIE BRUCE E ET AL) 12 October 1993 (1993-10-12) cited in the application the whole document	1-20
X	US 4 769 320 A (FURIE BRUCE E ET AL) 6 September 1988 (1988-09-06) cited in the application the whole document	1-20
	--- -/--	
<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:		
*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		*&* 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 19 February 2001		Date of mailing of the international search report 27/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 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/DE 00/02748

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEINSTOCK DAVID M ET AL: "Comparison of plasma prothrombin and factor VII and urine prothrombin F1 concentrations in patients on long-term warfarin therapy and those in the initial phase." AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 57, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 193-199, KP002092275 ISSN: 0361-8609 abstract ---	1-20
X	DE 40 08 546 A (TAKARA SHUZO CO) 20 September 1990 (1990-09-20) claims 1-6 ---	1-20
X	WO 99 09058 A (KAEKOENEN SANNA MARIA ;VAEAENAENEN H KALERVO (FI); HELLMAN JUKKA ( ) 25 February 1999 (1999-02-25) page 27, line 1 - line 10 ---	1-20
E	WO 00 58732 A (KAEKOENEN SANNA MARIA ;VAEAENAENEN H KALERVO (FI); LOEVGREN TIMO ( ) 5 October 2000 (2000-10-05) the whole document ---	1-20
A	US 4 780 410 A (MOTOHARA KUNIHICO ET AL) 25 October 1988 (1988-10-25) cited in the application the whole document -----	1-20

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members				International Application No PCT/DE 00/02748	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5252712	A	12-10-1993	US 4769320	A	06-09-1988
			AT 52141	T	15-05-1990
			DE 3577233	D	23-05-1990
			EP 0182495	A	28-05-1986
			JP 1761807	C	28-05-1993
			JP 4041000	B	06-07-1992
			JP 61117457	A	04-06-1986
US 4769320	A	06-09-1988	AT 52141	T	15-05-1990
			DE 3577233	D	23-05-1990
			EP 0182495	A	28-05-1986
			JP 1761807	C	28-05-1993
			JP 4041000	B	06-07-1992
			JP 61117457	A	04-06-1986
			US 5252712	A	12-10-1993
DE 4008546	A	20-09-1990	JP 2242696	A	27-09-1990
			JP 7039439	B	01-05-1995
WO 9909058	A	25-02-1999	EP 1003778	A	31-05-2000
WO 0058732	A	05-10-2000	NONE		
US 4780410	A	25-10-1988	JP 1843365	C	12-05-1994
			JP 5043357	B	01-07-1993
			JP 60060557	A	08-04-1985
			AT 48037	T	15-12-1989
			CA 1234045	A	15-03-1988
			DE 3480494	D	21-12-1989
			EP 0142634	A	29-05-1985
			KR 8801338	B	25-07-1988
			NO 843591	A, B,	14-03-1985

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ベルトリンク ウォルフ

ドイツ連邦共和国 エルランゲン 91056

マイゼンヴェーク 22

Fターム(参考) 2G045 AA25 BA01 CA25 CA26 CB03  
CB07 DA36 DA77 FA18 FB03  
FB07 FB11 FB17 GC10 JA01  
2G054 AA02 AA06 AB04 BA01 CA23  
CE01 EA03 EA04 EA07 GB04  
GE06 JA07

专利名称(译)	血液凝固状态的间接测量方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003507712A</a>	公开(公告)日	2003-02-25
申请号	JP2001517174	申请日	2000-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	诺凡贝尔分子医学股份公司		
申请(专利权)人(译)	Novenba股份公司AG Fuyua Morekurare Meditsuin		
[标]发明人	ベルトリンクウォルフ		
发明人	ベルトリンク ウォルフ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78 G01N33/86		
CPC分类号	G01N33/86 G01N2333/974		
FI分类号	G01N33/53.L G01N21/78.C G01N33/86		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BA01 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA18 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB11 2G045/FB17 2G045/GC10 2G045/JA01 2G054/AA02 2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/BA01 2G054/CA23 2G054/CE01 2G054/EA03 2G054/EA04 2G054/EA07 2G054/GB04 2G054/GE06 2G054/JA07		
优先权	19937654 1999-08-14 DE 19941447 1999-08-31 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种间接测定血液的凝结状态的方法。本发明的方法包括：  
 a) 收集含有可以被维生素K依赖性 $\gamma$ -羧化酶变性的蛋白质的体液的步骤，  
 b) 羧化蛋白质的第一浓度C1，脱羧化蛋白质的第二浓度C2，并且测量选自羧基化蛋白质和脱羧化蛋白质的总浓度C3的至少两个浓度，从而使用第一抗体A1测量第一浓度C1。使用第二抗体A2测量第二浓度C2，使用第三抗体A3测量第三浓度C3，  
 c) 来自第一C1的第一浓度和第二浓度C2。产生比率Q1的步骤，从第三C3和第一浓度C1产生第二比率Q2的步骤，或从第三C3和第二浓度C2产生第三比率Q3的步骤。这将在步骤b) 中进行测量，根据以下关系计算产生第一Q1，第二Q2或第三Q3比率所需的浓度C1，C2，C3： $C3-C2 = C1$ ，  
 d) 第一，第二或第三比率 提供使Q1，Q2，Q3与血液的凝结状态相关联的步骤。

1】

