

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-163412

(P2004-163412A)

(43) 公開日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl.⁷

G01N 33/53

F I

G O 1 N 33/53

L

テーマコード (参考)

審査請求 有 請求項の数 3 O L 外国語出願 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-301543 (P2003-301543)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成15年8月26日 (2003.8.26)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	10239821.6		F. HOFFMANN-LA ROCHE
(32) 優先日	平成14年8月29日 (2002.8.29)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
			グレンツアーヘルストラツセ124
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(72) 発明者	エンノ アデマ
			ドイツ連邦共和国 69117 ハイデル
			ベルク, ツィーゲルガッセ 18アー

(54) 【発明の名称】 アンチトロンビン測定における特異性の改善

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 試料中に阻害因子が存在していたとしても、信頼性の高いアンチトロンビンIII (AT)の定量方法および定量検出試薬を提供する。

【解決手段】 (a)試料をAT結合パートナーを含む第1の試薬R1とAT結合パートナーが本質的にATとは相互作用しないが、阻害因子とは相互作用する条件下で、接触させる。(b)AT結合パートナーの遊離のフラクションの1回目の測定のための第2の試薬R2を添加する。(c)AT結合パートナーがATと相互作用する条件を変化させる第3の試薬R3を添加し、AT結合パートナーの遊離のフラクションの2回目の測定を実施する。(d)AT結合パートナーの遊離のフラクションの1回目と2回目の測定の相違から、試料中のAT量を決定する。また定量方法に適した試薬を具備する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、阻害因子を含む可能性がある試料中のアンチトロンビン III (AT) を検出する方法：

- (a) 試料を AT 結合パートナーを含む第 1 の試薬 R 1 と AT 結合パートナーが本質的に AT とは相互作用しないが、阻害因子とは相互作用をする条件下で、接触させる
- (b) AT 結合パートナーの遊離のフラクションの 1 回目の測定のための第 2 の試薬 R 2 を添加する
- (c) AT 結合パートナーが AT と相互作用する条件を変化させる第 3 の試薬 R 3 を添加し、AT 結合パートナーの遊離のフラクションの 2 回目の測定を実施する、そして
- (d) AT 結合パートナーの遊離のフラクションの 1 回目と 2 回目の測定の相違から、試料中の AT 量を決定する。

10

【請求項 2】

第 1 の試薬 R 1 がトロンビン及び Xa 因子から選ばれる AT 結合パートナーを含むことを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

第 1 の試薬 R 1 が AT 結合パートナーとしてトロンビンを含むことを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

第 2 の試薬 R 2 が遊離の AT 結合パートナーの測定用の発色性基質を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5】

第 2 の試薬 R 2 が遊離の AT 結合パートナーを測定するための抗体を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

第 3 の試薬 R 3 が AT と AT 結合パートナー間の相互作用促進剤を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

第 3 の試薬が促進剤としてヘパリンを含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

第 1 の試薬 R 1 が AT と AT 結合パートナー間の相互作用促進剤のアンタゴニストをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

第 1 の試薬 R 1 がヘパリンアンタゴニストとしてポリブレンを含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

第 3 の試薬 R 3 がまたさらなる AT 結合パートナーを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

AT 結合パートナーの測定が速度論的測定を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 12】

アンチトロンビン III (AT) 結合パートナーと AT 間の相互作用の測定に基づいて試料中の AT を検出する方法であって、AT 結合パートナーの 1 回目の測定が AT 相互作用なしに実施され、それに続く 2 回目の測定が AT 相互作用のもとで実施され、試料中の AT 量が 1 回目と 2 回目の測定の相違から決定されることを特徴とする、前記方法。

【請求項 13】

以下を含む、試料中のアンチトロンビン III (AT) の定量的検出用試薬キット：

- (a) AT 結合パートナーを含む第 1 の試薬 R 1
- (b) 遊離の AT 結合パートナーを測定するための第 2 の試薬 R 2、及び

50

(c) A TとA T結合パートナー間の相互作用促進剤を含む第3の試薬R3であって、該第3の試薬R3が第1の試薬R1と隔離されている、前記第3の試薬R3。

【請求項14】

第2の試薬R2がA T結合パートナーの発色測定に適していることを特徴とする、請求項13に記載の試薬キット。

【請求項15】

第2の試薬R2がA T結合パートナーの免疫学的測定に適していることを特徴とする、請求項13に記載の試薬キット。

【請求項16】

請求項1～12のいずれか1項に記載の方法における請求項13から15のいずれか1項に記載の試薬キットの使用。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アンチトロンビンIII(A T)結合パートナーを試料に添加し、遊離のA T結合パートナーを測定することにより、体液中のA Tを測定する方法に関する。また、本発明は前記方法に適した試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

A Tは、制御的役割を担う血液凝固系の因子である。血液凝固は種々のプロテアーゼの 20
カスケード的相互作用によって開始される。連続的活性化工程の最後は、血栓形成に関わるフィブリンモノマーを生成するトロンビンの放出である。最も重要な制御因子は、トロンビン、また血液凝固に関わる他のプロテアーゼと複合体を形成でき、活性中心をブロックするA Tである。健康人の血液中のA T量は比較的狭い範囲にある。A T量の減少は消耗性凝固障害 (consumptive coagulopathy) や重症肝障害が原因であることもあれば、遺伝的であることもある。今日、A T量の減少は一般に血栓症のリスクになると考えられている。そんなわけで急性血栓症ではA T量が減少している場合もある。したがって、A T量は臨床診断における重要なパラメーターである。

【0003】

A T結合パートナーと試料中に存在するA Tとの相互作用が可能な条件下で、A T結合 30
パートナーを添加し、次いで遊離のA T結合パートナーの量を測定する、種々のA T検出方法が既に公知である。そのような検出は例えば免疫学的方法又は発色性基質に基づいている。後者の場合、トロンビン又は活性化されたX因子は、例えば試料に添加され、当該試料中に存在するA Tと相互作用する。次いで、過剰のトロンビンは、トロンビンの作用によって着色物質を形成する発色性基質とのインキュベーション、及びA T量が着色物質形成と間接的に比例した発色を評価することにより測定される。

【0004】

A Tを測定する方法は、例えば、Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis, 3rd edition, "Verlag Chemie", vol. 5, p. 441 - 448; I. Witt, ed., "Neue Methoden der Gerinnungsanalyse mit chromogenen Substraten", Stormorcken, "Neue Methoden der Gerinnungsanalyse", page 119 - 121; Odegard et al., Haemostasis 7: 202-209 (1978); 40
Fareed et al., Chromogenic Peptide Substrates (eds. M.F. Scully and V.V. Kakkar) Churchill Livingstone (1979) 183-191 and Abildgaard et al., Thromb. Res. 11, 549-553 (1977)中に記載されている。

【発明の開示】

【0005】

トロンビンを添加してA Tを測定する公知の方法の欠点は、阻害因子 (例えばそれ自身がトロンビンと相互作用しうるヒルピンのような医薬品) が存在すると、誤って高いA T値が得られることである。

【0006】

この欠点はトロンビンの代りに活性化された X a 因子を用いることにより防止することができる。しかしながら、いくつかの X a 因子阻害剤が現在治療用剤として開発中である (Ostrem et al., Biochemistry 37 (1998), 1053-1059; US Patent 5,783,421; US Patent 5,721,214; WO 96/40679; US Patent 5,693,641; WO 97/46523; JP-96-191434 etc.)。これらの製剤が市場に出るとき、トロンビンに基づく試験のように、X a 因子に基づく検出方法に伴って、同様の問題が生じるだろう。

【0007】

それゆえ、本発明の目的は公知の検出方法を改良し、たとえ試験される試料中に阻害因子が存在していたとしても、信頼性のある測定結果に結びつく方法を提供する。

【0008】

この目的は、以下の工程を含む、阻害因子を含む可能性がある試料中のアンチトロンビン III (AT) を検出する方法によって達成される：

- (a) 試料を AT 結合パートナーを含む第 1 の試薬 R 1 と AT 結合パートナーが本質的に AT とは相互作用しないが、阻害因子とは相互作用をする条件下で、接触させる
- (b) AT 結合パートナーの遊離のフラクションの 1 回目の測定のための第 2 の試薬 R 2 を添加する
- (c) AT 結合パートナーが AT と相互作用する条件を変化させる第 3 の試薬 R 3 を添加し、AT 結合パートナーの遊離のフラクションの 2 回目の測定を実施する、そして
- (d) AT 結合パートナーの遊離のフラクションの 1 回目と 2 回目の測定の相違から、試料中の AT 量を決定する。

【0009】

本発明の方法は、AT 結合パートナーと試料中に存在する AT との相互作用の測定に基づく、試料中 (特に血液又は血漿のような体液中) の AT を検出であって、AT 結合パートナーの 1 回目の測定は AT 相互作用なしに実施され、それに続く 2 回目の測定は AT 相互作用のもとで実施され、試料中の AT 量が 1 回目と 2 回目の測定の相違から決定される前記検出に関する。

【0010】

本発明の方法は、異なった条件下における、試料中の AT 結合パートナーの遊離のフラクションの測定に基づく。AT 結合パートナーの 1 回目の測定は AT との相互作用なしに実施される。つまり、存在する AT は本質的に AT 結合パートナーと反応しない、すなわち全く相互作用しないか、例えば AT が活性型で存在しないため実質的に測定を妨害しない程度までしか相互作用しない。次いで、試料中に存在する AT が AT 結合パートナーと相互作用しうるように、例えば AT と AT 結合パートナー間の複合体形成のような総合作用が促進されるような条件を設定する適当な試薬を添加することによって、条件を変化させる。これに続く 2 回目の残った遊離 (及び活性) の AT の測定は、試料中の AT 量の推定を可能にする。

【0011】

遊離の AT 結合パートナーは基本的に任意の方法で測定される。活性の発色測定としては、例えばトロンビン又は X a 因子のような AT 結合パートナーのタンパク分解活性を測定するか、あるいは、例えば、(AT と) 複合体化していない AT 結合パートナーに対して特異的に誘導され、かつ後の AT と AT 結合パートナーとの複合体形成を阻害しない抗体を用いた免疫学的測定を実施することによって測定することが好ましい。

【0012】

特に好ましい本発明の方法の実施形態は、AT 結合パートナーのタンパク分解活性の測定を含む。本方法では、阻害因子との反応後に残っている AT 結合パートナーのタンパク分解活性を、試料中に存在する AT が反応できないか、あるいは AT 結合パートナーとほんのわずかに反応できるような条件下で測定する。次いで、例えば AT を活性化することにより、AT と AT 結合パートナー間の複合体形成を促進させる。複合体は本工程において活性化 AT と結合パートナーから形成される。そのような複合体化した結合パートナーは本質的にもはやタンパク分解活性をもたない。次に、結合パートナー活性を再度測定す

10

20

30

40

50

る。1回目と2回目の活性の相違は試料中のAT量に関連する。

【0013】

AT結合パートナーは検出可能な物質であり、好ましくは、その阻害にATと複合体を形成しうるタンパク分解酵素活性をもった物質である。好適なAT結合パートナーの例は、トロンビン及びXa因子である。トロンビンは特に好ましく用いられる。

【0014】

AT結合パートナーは、AT結合パートナーの作用により着色物質を形成する発色性基質と結果的な発色の測定によって、好適に検出される。好ましい基質の例はペプチド性基質、例えば、トロンビンをTos-Gly-Pro-Arg-OH及びp-ニトロアニリンによって置換したトロンビン基質Tos-Gly-Pro-Arg-p-ニトロアニリン (Chromozym (登録商標) TH) である。しかしながら、対応するAT結合パートナーによって許容される他の基質も、もちろん好適である。

10

【0015】

先行技術の方法とは対照的に、本発明の方法において、AT結合パートナーの活性の1回目の測定は、試料中に存在するATが結合パートナーと複合体を形成できないか、あるいはほんのわずかな程度だけ複合体を形成し、その活性を阻害できない条件下で行われる。すなわち、1回目の測定はATとAT結合パートナー間の複合体形成を促進させるヘパリンのような物質の存在しない状態で実施されることが適切である。ヘパリンアンタゴニストのような促進剤のアンタゴニスト、例えばポリブレンなどを、必要であれば添加することができる。ヘパリンアンタゴニストの添加は、患者が以前にヘパリン治療を受け、試料中に存在する(低い)ヘパリン濃度により、ATとAT結合パートナー間の複合体形成の望ましくない促進が生じた場合に、特に好適である。

20

【0016】

遊離のAT結合パートナーの1回目の測定後、別な試薬を好ましくはヘパリンのような複合体形成促進剤を含む反応混合物に添加する。次いで、試料中に存在するATがAT結合パートナーと複合体形成をしうる条件下で、2回目の活性を測定する。試料中のAT量は1回目と2回目の測定の相違から決定しうる。測定されたシグナルは試料中のAT濃度に反比例する。もし必要であれば、第3の試薬は追加のAT結合パートナーを含んでいてもよい。もしあまりに多くの基質が最初の測定ですでに消費されてしまった場合は、さらに追加の基質を別な工程でピペットで加えてもよい。

30

【0017】

AT結合パートナーは、例えばRoche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany製のアンチトロンビンIII試験など、基本的に公知の方法によって測定される。

【0018】

本発明はまた、以下を含む、試料中のATの定量的検出用試薬キットに関する：

- (a) AT結合パートナーを含む第1の試薬R1
- (b) 遊離のAT結合パートナーを測定するための第2の試薬R2、及び
- (c) ATとAT結合パートナー間の相互作用促進剤を含む第3の試薬R3であって、該第3の試薬R3が第1の試薬R1と隔離されている、前記第3の試薬R3。

【0019】

第1の試薬R1は相互作用(例えばATとAT結合パートナー間の複合体形成)の促進剤を含まない。第1の試薬は必要であればまたそのような促進剤としてアンタゴニストを含んでいてもよい。AT結合パートナーを測定するための第2の試薬R2は、例えばAT結合パートナーの基質を含む、発色測定に適した試薬であってもよい。さらに、第2の試薬はまた免疫学的測定に適したものであってもよく、例えば遊離の未結合型AT結合パートナーに対する抗体や、必要に応じて、例えばラテックス試験などの免疫学的試験を実施するための他の試薬を含んでいてもよい。第3の試薬R3は第1の試薬R1とは隔離されており、ATとAT結合パートナーの間の複合体形成のような相互作用の促進剤であり、好ましくはヘパリンである。

40

【0020】

50

測定は、日立製（例えば、Hitachi model 911）やインテグラ製の従来の自動分析機で実施される。

【実施例】

【0021】

本発明の方法をさらに以下の実施例によって説明する：

Lepirudinの存在下におけるアンチトロンビンIIIの測定

1. 反応スキーム

3 μ lの試料溶液を測定キュベット内にピペティングした。175 μ lの試薬R1をピペットで加えた。試薬R1は100 mM Tris-HCl, 270 mM NaCl, 12mM EDTA, 10 g/l ポリエチレングリコール6000、1g/l ウシ血清アルブミン、0.5 NIH/ml ウシトロンビンからなり、
10 適量のフィブリン重合阻害剤、例えば、GPAP, pH 8.10を含む。次に、5分間インキュベートし、75 μ lの試薬R2 (Chromozym TH 1.9 mM)を加えた。次に、415 及び 700 nm (一次及び二次波長)における連続二色測定 (continuous bichromatic measurement) による速度論的試験で1回目のトロンビン活性を測定した。

【0022】

最終的に175 μ lの試薬R3 (100 mM Tris-HCl, pH 8.1; ヘパリン 2 USP-U/ml; ウシトロンビン(3.5 NIH/ml; 140 mM NaCl))を添加し、連続測定による速度論的試験で2回目のトロンビン活性を測定した。AT量は、Roche Diagnostics GmbH, MannheimのアンチトロンビンIIIキットの指示書にしたがい、2回目と1回目のトロンビン活性の相違から決定した。
20

【0023】

この測定は異なる量(0, 1, 2, 4 and 8 μ g/ml)のヒルピン(Lepirudin(登録商標), Behringwerke)中で実施した。結果を下表に示す。

【表1】

LepirudinR (μ g/ml)	確認されたAT量 (%) (本発明)	本発明の試験における 偏差 (%)	先行技術における 偏差 (%)
0	100	--	--
1	100	0	5
2	99.9	0	10
4	102.5	3	25
8	130.0	30	52

30

表はLepirudin(登録商標)阻害は4 μ g/ml濃度までは完全に除かれていることを示している。Lepirudin(登録商標)を投与するときの治療的濃度は通常この範囲内で実施され、したがって本発明の方法は潜在的阻害能を有する薬剤の存在下でもAT量を信頼性高く測定する。

【手続補正書】

【提出日】平成15年10月9日(2003.10.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、阻害因子を含む可能性がある試料中のアンチトロンビンIII(AT)を検出する方法：

(a) 試料をAT結合パートナーを含む第1の試薬R1とAT結合パートナーが本質的にATとは相互作用しないが、阻害因子とは相互作用をする条件下で、接触させる

(b) A T 結合パートナーの遊離のフラクションの 1 回目の測定のための第 2 の試薬 R 2 を添加する

(c) A T 結合パートナーが A T と相互作用する条件を変化させる第 3 の試薬 R 3 を添加し、A T 結合パートナーの遊離のフラクションの 2 回目の測定を実施する、そして

(d) A T 結合パートナーの遊離のフラクションの 1 回目と 2 回目の測定の相違から、試料中の A T 量を決定する。

【請求項 2】

アンチトロンビン III (A T) 結合パートナーと A T 間の相互作用の測定に基づいて試料中の A T を検出する方法であって、A T 結合パートナーの 1 回目の測定が A T 相互作用なしに実施され、それに続く 2 回目の測定が A T 相互作用のもとで実施され、試料中の A T 量が 1 回目と 2 回目の測定の相違から決定されることを特徴とする、前記方法。

【請求項 3】

以下を含む、試料中のアンチトロンビン III (A T) の定量的検出用試薬キット：

(a) A T 結合パートナーを含む第 1 の試薬 R 1

(b) 遊離の A T 結合パートナーを測定するための第 2 の試薬 R 2、及び

(c) A T と A T 結合パートナー間の相互作用促進剤を含む第 3 の試薬 R 3 であって、該第 3 の試薬 R 3 が第 1 の試薬 R 1 と隔離されている、前記第 3 の試薬 R 3。

【外国語明細書】

2004163412000001.pdf

专利名称(译)	提高抗凝血酶测定的特异性		
公开(公告)号	JP2004163412A	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2003301543	申请日	2003-08-26
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	エンノアダマ		
发明人	エンノ アデマ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/86		
CPC分类号	G01N33/86 G01N2333/745 G01N2333/8128		
FI分类号	G01N33/53.L		
代理人(译)	松任谷裕子		
优先权	10239821 2002-08-29 DE		
其他公开文献	JP3833642B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：即使样品中存在抑制剂，也要提供高度可靠的抗凝血酶III (AT) 定量方法和定量检测试剂。 解决方案：(a) 使样品与含有AT结合伴侣和AT结合伴侣的第一试剂R1接触，条件是AT结合伴侣基本上不与AT相互作用而是与抑制剂相互作用。(b) 添加第二种试剂R2，用于首次确定AT结合伴侣的游离级分。(c) 添加第三试剂R3，该试剂改变AT结合伴侣与AT相互作用的条件下，并进行AT结合伴侣的游离部分的第二次测量。(d) 根据AT结合伴侣的游离部分的第一次和第二次测量之间的差确定样品中的AT量。此外，它配备有适合定量方法的试剂。[选择图]无

LepirudinR ($\mu\text{g/ml}$)	確認されたAT量 (%) (本発明)	本発明の試験における 偏差(%)	先行技術における 偏差(%)
0	100	--	--
1	100	0	5
2	99.9	0	10
4	102.5	3	25
8	130.0	30	52