

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0024610
(43) 공개일자 2012년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/86 (2006.01) C12Q 1/56 (2006.01)

C07C 279/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7027191

(22) 출원일자(국제) 2010년05월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년11월15일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/003401

(87) 국제공개번호 WO 2010/134345

국제공개일자 2010년11월25일

(30) 우선권주장

JP-P-2009-121834 2009년05월20일 일본(JP)

(71) 출원인

세키스이 메디칼 가부시카이가이사

일본 도쿄도 주오구 니혼바시 3초메 13반 5고

(72) 발명자

모리카와 치즈루

일본국 이바라키켄 류가사키시 코요다이 3초메 3-1 세키스이 메디칼 가부시카이가이사 츠쿠바연구소 내

나카무라 레미

일본국 이바라키켄 류가사키시 코요다이 3초메 3-1 세키스이 메디칼 가부시카이가이사 츠쿠바연구소 내

야마모토 미츠아키

일본국 이바라키켄 류가사키시 코요다이 3초메 3-1 세키스이 메디칼 가부시카이가이사 츠쿠바연구소 내

(74) 대리인

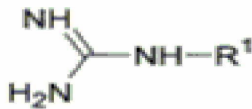
신용길

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 혈액응고시간 연장제

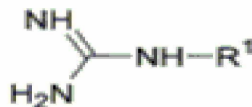
(57) 요약

혈액응고시간을 충분히 연장해, 한편 광학적 변화를 증강시켜, 혈액응고능 검사를 정확하고 고감도에 실시할 수 있는 시약을 제공한다. 본 발명은 다음 식(1)



(식중, R¹은 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다)로 표시되는 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염을 유효성분으로 하는 혈액응고시간 연장제를 제공한다.

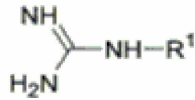
대표도



특허청구의 범위

청구항 1

다음 식(1)



(식중, R^1 은 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다)로 표시되는 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염을 유효성분으로 하는 혈액응고시간 연장제.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 피브리노겐 측정용 혈액응고시간 연장제인 혈액응고시간 연장제.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, R^1 이 수소원자, 아미노기, 알킬기, 치환기로서 카르복실기 및 아미노기를 갖는 알킬기, 또는 치환기로서 알콕시카르보닐기와 아미노기를 갖는 알킬기인 혈액응고시간 연장제.

청구항 4

청구항 1~3의 어느 1항 기재의 혈액응고시간 연장제를 함유하는 것을 특징으로 하는 혈액응고 활성화제 함유시약.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 혈액응고 활성화제가 트롬빈인 피브리노겐 측정용의 혈액응고 활성화제 함유시약.

청구항 6

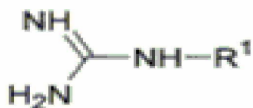
청구항 1~3의 어느 1항 기재의 혈액응고시간 연장제를 함유하는 것을 특징으로 하는 혈액응고능 측정용 검체 희석액.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 피브리노겐 측정용 검체 희석액인 혈액응고능 측정용 검체 희석액.

청구항 8

혈액응고시간을 연장시키기 위한, 다음 식(1)



(식중, R^1 은 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다)로 표시되는 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염의 사용.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 피브리노겐 측정에서 혈액응고시간을 연장시키기 위한 사용.

청구항 10

청구항 8 또는 9에 있어서, R^1 이 수소원자, 아미노기, 알킬기, 카르복실기와 아미노기가 치환한 알킬기 또는 알콕시카르보닐기와 아미노기가 치환한 알킬기인, 사용.

청구항 11

청구항 8?10의 어느 1항에 있어서, 혈액응고 활성화제와 함께 사용하는 것인 사용.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 혈액응고 활성화제가 트롬빈인 사용.

청구항 13

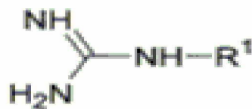
청구항 8?10의 어느 1항에 있어서, 혈액응고능 측정용 검체 희석액과 함께 사용되는 것인 사용.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 검체 희석액이 피브리노겐 측정용 검체 희석액인 사용.

청구항 15

혈장 검체에, 다음 식(1)



(식중, R^1 는 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다)로 표시되는 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염을 첨가하는 것을 포함한, 혈액응고시간을 연장하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, R^1 이 수소원자, 아미노기, 알킬기, 카르복실기와 아미노기가 치환한 알킬기, 또는 알콕시카르보닐기와 아미노기가 치환한 알킬기인 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염이 혈액응고능 측정용 검체 희석액과 함께 첨가되는 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 검체 희석액이 피브리노겐 측정용 검체 희석액인 방법.

청구항 19

청구항 15에 있어서, 상기 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염이 혈액응고 활성화제와 함께 첨가되는 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 혈액응고 활성화제가 트롬빈 함유시약인 방법.

청구항 21

아래와 같이 공정을 포함한 혈액응고능 측정 방법:

혈장 검체와 혈액응고 활성화제와 청구항 15 기재의 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염을 함유 하는 반응액을

조제하는 공정;및

반응액의 응고시간을 측정하는 공정.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 피브리노겐 측정시약으로 대표되는 혈액응고능 측정시약, 즉, 혈액응고 활성화제 함유시약 및/또는 혈액응고능 측정용 검체 희석액에 이용되는 혈액응고시간 연장제 및 이것을 이용한 혈액응고능 측정시약에 관한 다.

배경기술

[0002] 혈액응고의 기서(機序)는 일반적으로 2개의 계로 대별된다. 하나는 혈액응고 제XII인자의 이물(異物)과의 접촉 활성화에 시작하여, 다단 반응을 거쳐 최종적으로 트롬빈을 생성하는 내인계(內因系), 또 하나는 혈액응고 제VII인자와 조직 트롬보플라스틴에 의한 혈액응고 제X인자의 활성화에 시작하여 동일하게 트롬빈을 생성하는 외인계(外因系)이다(도 1). 어떠한 계도 최종적으로는 생성된 트롬빈의 작용으로 피브리노겐이 피브린으로 전화(轉化)함으로서 응고가 일어난다. 이러한 혈액응고 기서에 대해서, 이상의 유무, 또는 이상의 원인을 밝히기 위해, 혈액응고 활성화제를 이용하는 몇 개인가의 혈액응고능(血液凝固能) 검사가 있으며, 임상검사의 현장에서 널리 이용되고 있다.

[0003] 혈액응고 활성화제 및 그것을 사용한 혈액응고능 검사에는 다음과 같은 것이 있다.

[0004] 1) 트롬빈을 사용한 혈액응고능 검사

[0005] 피브리노겐 측정, ATIII 측정, 트롬빈 시간 측정

[0006] 2) 조직 트롬보플라스틴을 사용한 혈액응고능 검사

[0007] 프로트롬빈 시간 측정, 프로트롬빈 시간을 이용한 II, V, VII, X인자의 활성 측정, 복합 인자 측정(트롬보 테스트?해파플라스틴 테스트 등)

[0008] 3) 인지질을 사용한 혈액응고능 검사

[0009] 부분 트롬보플라스틴 시간 측정, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 측정, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 측정을 이용한 VIII, IX, XI, XII 인자, 프레칼리케인(prekallikrein), 고분자 키니노겐(kininogen)의 활성 측정, 사독시간(蛇毒 時間) 측정, 사독시간 측정을 이용한 X인자의 정량, 희석 사독시간 측정을 이용한 루푸스 안티코아гу란트(Lupus Anticoagulant, LA) 측정, 프로테인 C 활성 측정, 트롬보플라스틴 생성 시험

[0010] 상기 1)~3)의 어느 검사에 있어서도, 환자 검체에 혈액응고 활성화제 등을 포함한 시약을 혼합함으로써 응고의 야기로부터 최종적으로 피브리노겐이 피브린으로 전화하여 석출할 때까지의 시간을 측정한다.

[0011] 혈액응고능 검사에 있어서의 응고의 검출 방법은 역학적 검출법과 광학적 검출법으로 대별할 수 있다. 역학적 검출법이란 반응액 중에 투입한 자성물(磁性物) 등을, 자력 등에 의해 모니터하고, 응고에 의해 점성이 높아져 자성물의 움직임이 둔해지는 것을 검출하는 방법이다. 광학적 검출법이란 응고에 의해 반응액이 하얗게 탁해지는 것을 투과광 또는 산란광의 변화량으로서 검출하는 방법으로, 비교적 간편하므로 가장 광범위하게 이용되고 있다. 이들은 현재는 일반적으로 자동화 장치에 의해 검출되고 있다. 산란광 검출법으로 얻어지는 산란광의 강도 변화 곡선의 일례를 도 2에 나타낸다. 도중, A점은 혈액응고 활성화제를 포함한 시약을 혼합함으로써 응고가 야기된 점을 나타내고, 그 후 다단계 반응을 거쳐 피브린 석출이 개시함으로써, B점 이후, 산란광 강도의 변화가 나타난다. 점차 피브리노겐이 소비되어 반응액 중에서 거의 고갈하면 산란광 강도의 변화는 없어져, C점과 같이 곡선은 평탄하게 되어 응고는 종료한다. 이러한 산란광의 강도 변화 곡선을 바탕으로, 공지의 산출 파라미터에 의해 응고시간이 산출된다(특허문헌 1). 여기서, 산란광의 강도 변화량의 극대값을 ΔH 로 하면, ΔH 가 큰 쪽이 응고 검출이 예민하게 되어, 보다 정확한 검출이 가능해지는 것은 자명하다. 그러므로 사용되는 혈액응고능 측정시약은 광학적 변화량이 크게 표시되는 것 같은 특성을 가지는 것이 바람직하다. 그러나, A점으로부터 C점까지의 변화가 너무나 단시간에 일어나는 경우, 정밀도 좋게 응고시간을 측정할 수가 없다. 여기서 통상, 응고시간을 연장시키는 물질을 첨가하여, 응고시간이 소망한 시간이 되도록 조절한다. 혈액응고시간 연장제로서

특허문헌 2에서는 염화나트륨을 비롯한 알칼리 금속 또는 알칼리토류 금속의 할로겐화물염이, 특허문헌 3에서는 프로피온산 나트륨이 예시되어 있다. 그러나 이러한 종래의 혈액응고시간 연장제는 동시에 첨가량 의존적으로 ΔH 를 감소시키는 네거티브의 효과가 큰 것이 문제로 되고 있었다.

- [0012] 이들 종래법의 문제점을 해결할 목적으로, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐알코올, 고분자 다당 등의 고분자 물질을 첨가한 시약을 이용하는 방법이 제안되고 있다(특허문헌 4 및 5).
- [0013] 선행기술문헌
- [0014] 특허문헌
- [0015] [특허문헌 1] 일본국 특허공개평 8-15263호 공보
- [0016] [특허문헌 2] 일본국 특허 제2994557호 공보
- [0017] [특허문헌 3] 일본국 특허 제3330685호 공보
- [0018] [특허문헌 4] 일본국 특허 제3074611호 공보
- [0019] [특허문헌 5] 일본국 특허공개평 5-60763호 공보

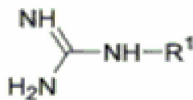
발명의 내용

해결하려는 과제

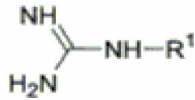
- [0020] 그러나, 시약에 고분자 물질을 첨가하는 방법은 시약 자체의 점성을 높게하여 피펫이나 시약 프로우브에 의한 시약분취 정밀도가 저하한다고 하는 문제, 미응고와 응고시의 탁도차가 충분히 얻어지지 않고, 충분한 광학적 변화의 증강이 얻어지지 않는다는 문제가 있었다.
- [0021] 따라서 본 발명의 과제는 혈액응고시간을 소망의 시간으로 연장하고, 또한 광학적 변화를 증강시키도록 하는 조성의 시약을 제공하는 것에 있다. 이것에 의해, 혈액응고능 검사의 정확성 향상에 기여할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0022] 본 발명자는 각종 화합물을 이용하여 광학적 변화를 증강시키는 혈액응고시간 연장제를 탐색한 바, 특정 구조를 가지는 구아니딘 화합물 또는 그 염이 혈액응고시간의 연장작용에 더하여져, 응고시의 광학적 변화를 증강시키는 작용을 가지며, 이것을 혈액응고능 측정시약의 첨가제로서 이용하면, 혈액응고능이 정확하고 고감도로 측정할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성했다.
- [0023] 즉, 본 발명은 다음 식(1)



- [0024]
- [0025] (식중, R^1 은 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다)로 표시되는 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염을 유효성분으로 하는 혈액응고시간 연장제를 제공하는 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 혈액응고시간 연장제를 함유하는 것을 특징으로 하는 혈액응고 활성화제 함유 시약 또는 혈액응고능 측정용 검체 희석액을 제공하는 것이다.
- [0027] 더욱이 본 발명은 상기의 혈액응고시간 연장제를 함유하고, 혈액응고 활성화제가 트롬빈인 것을 특징으로 하는 피브리노겐 측정용 혈액응고 활성화제 함유 시약 또는 피브리노겐 측정용 검체 희석액을 제공하는 것이다.
- [0028] 또한 하나의 실시 태양에 있어, 본 발명은 혈액응고시간을 연장시키기 위한, 다음 식(1)

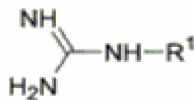


[0029]

[0030] (식중, R^1 는 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다)로 표시되는 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염의 사용을 제공하는 것이다.

[0031] 하나의 실시형태에 있어서, 상기 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염은 혈액응고 활성화제와 함께 사용된다. 다른 실시 형태에 있어서, 상기 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염은 혈액응고능 측정용 검체 희석액과 함께 사용된다.

[0032] 또한, 하나의 실시태양에 있어서, 본 발명은 혈장 검체에, 다음 식(1)



[0033]

[0034] (식중, R^1 는 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다)로 표시되는 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염을 첨가하는 것을 포함한, 혈액응고시간을 연장하는 방법을 제공하는 것이다.

[0035] 하나의 실시형태에 있어서, 상기 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염은 혈액응고능 측정용 검체 희석액과 함께 첨가된다. 다른 실시 형태에 있어서, 상기 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염은 혈액응고 활성화제와 함께 첨가된다.

[0036] 또한, 하나의 실시태양에 있어서, 본 발명은 혈장 검체와 혈액응고 활성화제와, 상기 구아니딘 화합물 또는 그 산부가염을 함유 하는 반응액을 조제하는 공정; 및 반응액의 응고시간을 측정하는 공정을 포함한, 혈액응고능 측정 방법을 제공하는 것이다.

[0037] 또한, 하나의 실시태양에 있어서, 본 발명은 이 혈장 검체를 이용한 응고시간의 측정값과 당해 혈장 검체 대신에 희석 표준액을 이용하여 동일하게 응고시간을 측정하여 얻어진 측정값을 비교하는 것에 의한, 혈장 검체중의 피브리노겐 농도를 구하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 혈액응고시간 연장제를 이용하면, 광학적 변화가 증강되기 때문에 피브리노겐 측정, PT, APTT 등의 혈액응고능이 정확하게 측정될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 임상 검사에 있어서의 혈액응고의 기서를 모식적으로 나타낸다.
- 도 2는 혈액응고능 측정때, 산란광 검출법으로 얻어지는 산란광 강도 변화 곡선의 일례를 나타낸다.
- 도 3은 각 화합물의 첨가량과 응고시간의 관계를 나타낸다.
- 도 4는 화합물의 첨가에 의해 응고시간을 조정했을 때의, 응고시간과 산란광 강도 변화량 극대값의 관계를 나타낸다.
- 도 5는 종래법 시약과 본 발명 시약에 의한 산란광 강도 변화 곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 발명의 혈액응고시간 연장제는 상기 식(1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을 유효성분으로 하는 것이다. 식

(1) 중, R¹는 수소원자, 아미노기 또는 치환기를 가지고 있어도 좋은 알킬기를 나타낸다. 여기서, 알킬기로서는 탄소수 1~6의 알킬기가 바람직하고, 특히 탄소수 2~5의 알킬기가 바람직하다. 이 알킬기에 치환할 수 있는 기로서는 카르복실기, 알콕시카르보닐기, 아미노기를 들 수 있으며, 카르복실기와 아미노기의 양자, 또는 알콕시카르보닐기와 아미노기의 양자가 치환하고 있는 경우가 바람직하다.

[0041] 식(1)로 표시되는 화합물의 구체적인 예로서는 구아니딘, 아미노구아니딘, 아르기닌, 아르기닌알킬에스테르를 들 수 있어 이 중, 광학적 변화 증강 작용이 크고, 정확한 측정을 할 수 있는 점에서 아미노구아니딘이 특히 바람직하다. 또 식(1)의 화합물의 산부가염으로서는 염산염, 황산염, 질산염, 인산염, 설��파민산염 등을 들 수 있다.

[0042] 본 발명의 혈액응고시간 연장제는 혈액응고시간을 연장시킬 뿐만 아니라, 혈액응고능 측정에 있어서의 반응액의 탁도 변화를 증강시키는 작용을 가진다. 이것은 혈액응고의 최종 산물인 피브린 망(網)의 형성 상태가 보다 강고해지는 것을 나타내고 있다. 따라서, 본 발명의 혈액응고시간 연장제는 탁도 변화를 직접 검출하는 광학적 검출법, 피브린 망의 형성 상태를 자성물 등으로 모니터링하는 역학적 검출법 등에 사용할 수 있어 광학적 검출법으로 사용하는 것이 바람직하다. 여기서, 광학적 검출법에는 산란 광량 검출법과 투과광량 검출법이 있지만, 산란 광량 검출법으로 사용하는 것이 바람직하다.

[0043] 본 발명의 혈액응고시간 연장제를 적용할 수 있는 혈액응고능 검사는 환자 검체에 혈액응고 활성화제 등을 포함한 시약을 혼합하는 것에 의한 응고의 야기로부터 최종적으로 피브리노겐이 피브린으로 진화하여 석출할 때까지의 시간을 측정하는 것이면 좋다. 예로서는 피브리노겐 측정, ATIII 측정, 트롬빈 시간 측정, 프로트롬빈 시간 측정, 프로트롬빈 시간을 이용한 II, V, VII, X인자의 활성 측정, 복합인자측정(트롬보 테스트?해파플라스틴 테스트 등), 부분 트롬보플라스틴 시간 측정, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 측정, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 측정을 이용한 VIII, IX, XI, XII 인자, 프레카리케인, 고분자 키니노겐의 활성 측정, 사독시간 측정, 사독시간 측정을 이용한 X인자의 정량, 희석 사독시간 측정을 이용한 루푸스 안티코아규란트(LA) 측정, 프로테인 C 활성 측정, 트롬보플라스틴 생성 시험, 그 외 응고 이상 검출 등을 들 수 있다.

[0044] 상기 혈액응고능 검사의 측정은 검체에, 혈액응고 활성화제 함유시약(예를 들면, 피브리노겐 측정에 대해 트롬빈 함유시약)을 첨가하여 피브린이 석출할 때까지의 시간을 측정하는 것이다. 검체는 필요에 따라서 검체 희석액으로 적당히 희석된다. 본 발명의 혈액응고시간 연장제는 측정계에 포함되어 있으면 좋고, 혈액응고 활성화제 함유시약에 함유시켜도 좋고, 검체 희석액에 함유시켜도 좋다. 즉, 본 발명의 혈액응고시간 연장제는, 예를 들면 피브리노겐 측정에 대해서는 트롬빈 함유시약에 함유시켜도 좋고, 검체 희석액에 함유시켜도 좋다.

[0045] 상기 혈액응고 활성화제함유시약은 상기 혈액응고능 검사에 사용되는 것이면 좋다. 예를 들면, 트롬빈 함유시약, 조직 트롬보플라스틴 함유시약, 인지질 함유시약 등을 들 수 있다. 또, 상기 검체 희석액은 상기 혈액응고능 검사에 사용되는 것이면 좋다. 예를 들면, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricine, Bicine, TAPS, CHES 등의 굿 완충액, 시트르산 완충액, 인산 완충액, 아세트산 완충액, 이미다졸 완충액, 바르비탈 완충액, 생리 식염액, 물 등을 들 수 있다.

[0046] 본 발명의 혈액응고시간 연장제는 혈액응고 검사에 있어서 정밀도 좋게 측정 가능한 응고시간을 얻을 수 있도록 반응액 중에 함유시키는 것이 바람직하다. 예를 들면, 피브리노겐 측정의 경우, 정상 혈장(농도 약 300 mg/dL)을 측정했을 때, 5~50초, 바람직하기로는 7~20초, 한층 더 바람직하기로는 9~15초의 응고시간을 얻을 수 있도록 반응액 중에 함유시키는 것이 바람직하다. 혈액응고시간 연장제로서 아미노구아니딘을 이용하는 경우는 피브리노겐 측정의 반응액 중의 농도, 즉, 검체 ? 검체 희석액? 트롬빈 함유시약의 혼합액 중의 농도는 10~500 mM, 바람직하기로는 20~200 mM, 한층 더 바람직하기로는 30~120 mM이다. 검체 희석액 중에 함유시키는 경우, 검체 희석액 중의 농도는 10~900 mM, 바람직하기로는 30~400 mM, 한층 더 바람직하기로는 50~200 mM이다.

[0047] 프로트롬빈 시간 측정의 경우, 정상 혈장(활성 약 100%)을 측정했을 때, 9~60초, 바람직하기로는 9~30초, 한층 더 바람직하기로는 10~16초의 응고시간을 얻어지도록 반응액 중에 함유시키는 것이 바람직하다. 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 측정에 대해 정상 혈장을 측정했을 때, 15~80초, 바람직하기로는 15~60초, 한층 더 바람직하기로는 20~50초의 응고시간을 얻을 수 있도록 반응액 중에 함유시키는 것이 바람직하다. 그 외의 혈액응고능 검사에 관해서도, 측정 방법에 적절한 응고시간이 얻어지도록 반응액 중에 함유시키면 좋다.

[0048] 혈액응고능 검사에 이용되는 검체 희석액 및 혈액응고 활성화제 함유시약을 포함한 혈액응고능 측정시약에는, 본 발명의 혈액응고시간 연장제 이외에, 공지의 고분자 다당류 및 합성 고분자류를 함유할 수 있다.

[0049] 고분자 다당류의 구체적인 예로서는 텍스트란 40, 텍스트란 70, 텍스트란 200000, 텍스트란 500000 등의 텍스트

란, 피콜 등을 예시할 수 있다. 또한, 이들 고분자 다당류는 1종 또는 2종 이상을 조합하여 이용할 수 있다. 이들 고분자 다당류의 첨가량은 상기 혈액응고능 측정시약중의 농도가 0.01~10 W/V%인 것이 바람직하고, 보다 더 바람직하기로는 0.1~5 W/V%이다.

[0050] 합성 고분자류의 구체적인 예로서는 폴리비닐알코올 500, 폴리비닐알코올 1500, 폴리비닐알코올 2000 등의 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌글리콜 1500, 폴리에틸렌글리콜 2000, 폴리에틸렌글리콜 4000, 폴리에틸렌글리콜 6000, 폴리에틸렌글리콜 8000, 폴리에틸렌글리콜 20000 등의 폴리에틸렌글리콜 및 폴리비닐 피롤리돈 등을 들 수 있다. 이들 합성 고분자류는 1종 또는 2종 이상을 조합하여 이용할 수 있다. 이들 합성 고분자류의 첨가량은 특히 한정되지 않지만, 상기 혈액응고능 측정시약중의 농도가 0.01~10 W/V%인 것이 바람직하고, 보다 바람직하기로는 0.1~5 W/V%이다.

[0051] 상기 혈액응고능 측정시약에는 본 발명의 혈액응고시간 연장제 이외에도 완충제, 칼슘 이온, 항응고약의 안타고니스트 등을 함유할 수 있다.

[0052] 완충제의 구체적인 예로서는 pH 4~9의 범위에 완충능을 가지는 완충제를 적의 선택하여 이용한다. 예를 들면, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricine, Bicine, TAPS, CHES 등의 완충제, 시트르산, 인산, 아세트산, 이미다졸, 바르비탈, GTA 등으로부터 1종 또는 2종 이상을 조합하여 선택하여 이용할 수 있다. 이들 완충제의 첨가량은 완충능을 가지는 양이면 특히 한정되지 않지만, 상기 혈액응고능 측정시약중의 농도가 1~1000 mM인 것이 바람직하고, 보다 바람직하기로는 5~500 mM이다.

[0053] 칼슘 이온으로서의 염화칼슘, 젖산칼슘, 글루콘산칼슘, 글루크론산칼슘, 타르타르산칼슘 등의 수용성의 칼슘 화합물이 이용된다. 이들 칼슘 화합물은 1종 또는 2종 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 칼슘 화합물의 사용량은 응고 반응을 보조할 수 있는 양이면 좋고, 특히 한정되지 않지만, 상기 혈액응고능 측정시약중의 농도가 5 mM~100 mM인 것이 바람직하고, 보다 바람직하기로는 10 mM~50 mM이다.

[0054] 항응고제의 안타고니스트로서는 프로타민, 폴리브렌(Polybrene)(헥사디메트린브로마이드) 등이 이용된다. 이들 항응고제의 안타고니스트는 1종 또는 2종 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 항응고제의 안타고니스트의 사용량은 검체 혈장에 포함되는 항응고제, 예를 들면 헤파린 등을 충분히 중화 할 수 있는 양이면 좋고, 특히 한정되지 않지만, 상기 혈액응고능 측정시약중의 농도가 10^{-5} ~ 10^{-2} W/V%인 것이 바람직하고, 보다 바람직하기로는 5×10^{-4} ~ 5×10^{-3} W/V%이다.

[0055] 또한, 상기 혈액응고능 측정시약은 액상품, 동결품 또는 건조품이어도 좋고, 다시 건조품은 정제수 또는 완충액을 첨가함으로써 용해된다.

[0056] 또한 상기 혈액응고능 측정시약에는 적당한 방부제를 첨가해도 좋다. 방부제로서는 시프로프록사신, 프로피온산, 벤조산나트륨, 아지드나트륨, 프로크린 300 등 중에서 1종 또는 2종 이상을 조합하여 선택해 이용할 수 있다. 또, 필요에 따라서 염화나트륨 등의 염이나, 아미노산, 당 등의 일반적인 안정화제 등을 포함시켜도 좋다.

[0057] 상기에 기재된 농도는 용액품 중의 농도를 기재하고 있지만, 건조 품 등은 사용 시에 물 또는 완충액 등으로 용해했을 때의 농도를 기재하고 있다.

[0058] 본 발명의 혈액응고능 측정시약을 이용해 혈액응고능을 측정하기에는 통상의 방법에 따르면 좋다. 피브리노겐 측정을 예로 들면, 표준액을 검체 희석액으로 5배, 10배, 20배에 희석한다(희석 배율은 적의 조정하는 것이 가능하다). 다음에 각 희석 표준액 2용(容)을 37℃에서 3분간 가온하고, 미리 37℃로 가온한 트롬빈 시약 1용을 가하여 응고시간을 측정한다. 다음에 각각의 희석 표준액의 측정값을 그래프에 플롯한다. 혈장 검체를 검체 희석액으로 10배 희석하고(희석 배율은 적의 조정하는 것이 가능하다), 희석 검체를 동일하게 측정하고, 얻어진 응고시간을 기초로, 그래프로부터 농도를 구할 수 있다.

[0059] 실시예

[0060] 이하에 실시예를 들어 본 발명을 한층 더 상세히 설명하나, 본 발명은 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0061] 실시예 1

[0062] (1) 응고시간 연장 작용의 확인

[0063] 트롬빈 시간법으로 혈장 검체중의 피브리노겐 농도를 측정하는 경우, 일반적으로 트롬빈을 혈장에 첨가하여 응고시간을 측정하고, 피브리노겐 농도 기존의 표준액에 의한 검량선으로부터 농도를 구한다. 순서로서는, 검체 혈장 10 μ l에 대해서 90 μ l의 검체 희석액을 첨가, 혼합한 후, 혈액응고 활성화제 함유시약으로서 50 μ l의 트롬빈 함유시약을 첨가하고, 응고시간을 측정한다.

[0064] 본 실시예에서는 혈장 검체로서 시판 정상혈장(코아구트론N, Sysmex 사제)을, 트롬빈 함유시약으로서 코아그피아 Fbg 트롬빈 시약(積水메디칼사제)을, 또한 응고시간 측정 장치로서 전자동 혈액응고시간 분석 장치 코아구렉스 800(Sysmex 사제)을 사용했다. 본 기기는 산란광 검출법을 채용하고 있으며, 응고시간과 함께, 산란광 강도의 경시 변화 데이터도 취득할 수 있다.

[0065] 검체 희석액으로서 HEPES 완충액(pH 7.5)를 이용했을 경우, 시판 정상 혈장은 수 초에 응고하였다(4.6초). 혈액 응고시간 연장제로서 아미노구아니딘 염산염을 HEPES 완충액(pH 7.5)에 첨가하면, 종래법인 염화나트륨 및 브롬화나트륨과 같이, 첨가 농도 의존적으로 응고시간이 연장되었다(도 3에 결과를 나타낸다). 즉, 본 발명은 종래 법과 동등의 응고시간 연장 작용을 가지는 것을 알 수 있다.

[0066] (2) 광강도 변화량의 확인

[0067] 산란광 강도 변화량의 극대값을 ΔH 로서 산출하고, 응고시간과의 관계를 도 4에 나타냈다. 응고시간이 연장하는 것에 따라, 종래법인 염화나트륨 및 브롬화나트륨에서는 ΔH 가 현저하게 저하하는데 반해, 본 발명에서는 ΔH 는 커다란 채로 유지되었다. 즉, 동일한 정도의 응고시간에 비교하면, 종래법에 비해 본 발명 쪽이 산란광 강도의 변화량이 증대하고, 응고시간을 보다 정확하게 측정할 수 있음을 알 수 있다.

[0068] 실시예 2

[0069] 동일한 정도의 응고시간이 얻어지도록, 혈액응고시간 연장제의 첨가 농도를 조절한 검체 희석액(HEPES 완충액 pH 7.5)을 이용하여 실시예 1과 동일하게 정상 시판 혈장을 측정했다. 종래법과 본 발명의 산란광 강도 변화량 극대값의 ΔH 와 측정의 동시 재현성의 비교 결과를 표 1에 나타냈다. 종래법과 비교하여 본 발명의 혈액응고시간 연장제, 즉, 아르기닌 염산염, 아르기닌메틸에스테르, 구아니딘 염산염, 구아니딘 인산염, 구아니딘 술폰산염, 아미노구아니딘 염산염이 ΔH 를 비약적으로 향상시키고, 또한 측정의 정밀도(동시 재현성 등)에 대해서도 향상시키고 있음을 확인하였다. 또한, 측정의 정밀도(동시 재현성 등) 향상 효과에 대해서는 아미노구아니딘 염산염이 특히 우수한 것이 판명되었다.

표 1

[0070]

		ΔH	응고시간	측정치의 변동계수
종래법 ①	염화나트륨:145mM	2348	10.7	4.47%
종래법 ②	브롬화나트륨:115mM	2174	11.3	*
종래법 ③	브롬화칼륨:105mM	2127	11.4	*
종래법 ④	염화칼륨:135mM	2170	10.8	*
종래법 ⑤	염화리튬:135mM	2305	10.8	*
본발명 방법 ①	구아니딘 염산염:90mM	4575	10.3	3.39%
본발명 방법 ②	구아니딘 인산염:30mM	4217	10.4	2.36%
본발명 방법 ③	구아니딘 술폰산염:55mM	5167	11.2	3.29%
본발명 방법 ④	아미노구아니딘 염산염:90mM	3480	9.7	1.94%
본발명 방법 ⑤	알기닌염산염:55mM	3529	10.3	2.77%
본발명 방법 ⑥	알기닌메틸에스테르:17mM	6130	11.0	3.22%

[0071] 종래법 ②?⑤는 1중측정, 나머지는 10중측정

[0072] * 산출불가

[0073] 실시예 3

[0074] 혈액응고시간 연장제로서 염화나트륨을 함유하는 검체 희석액을 종래법 A, 종래법 A에 다시 광강도 변화량 증감

제로서 폴리에틸렌글리콜(분자량 20000)(이하, PEG20000라고 한다)을 함유시킨 검체 희석액을 종래법 B로 하고, 혈액응고시간 연장제와 광강도 변화량 증강제를 겸한 아미노구아니딘 염산염(본 발명)을 채용한 검체 희석액과 비교했다. 또, 어느 경우도 완충액으로서 HEPES 완충액(pH 7.5)을 이용했다. 또, 종래법 B에서는 PEG20000의 첨가량이 많으면 점성이 높아져, 분취정밀도가 저하할 우려가 있으므로, 첨가 농도는 0.1%로 했다. 각각의 검체 희석액을 사용하여 실시예 1과 동일하게 시판 정상 혈장의 응고시간을 측정한 결과, 도 5에 나타난 바와 같은 산란광의 강도 변화 곡선을 얻었다. 또, 응고시간과 ΔH 를 표 2에 나타냈다. PEG20000를 첨가한 종래법 B에서는 첨가하지 않았던 종래법 A에 비해, 산란광 강도의 변화량이 커졌지만, 본 발명의 채용에 의해 산란광 강도 변화량은 한층 비약적으로 향상하고, 응고시간을 보다 정확하게 측정할 수 있음을 알았다.

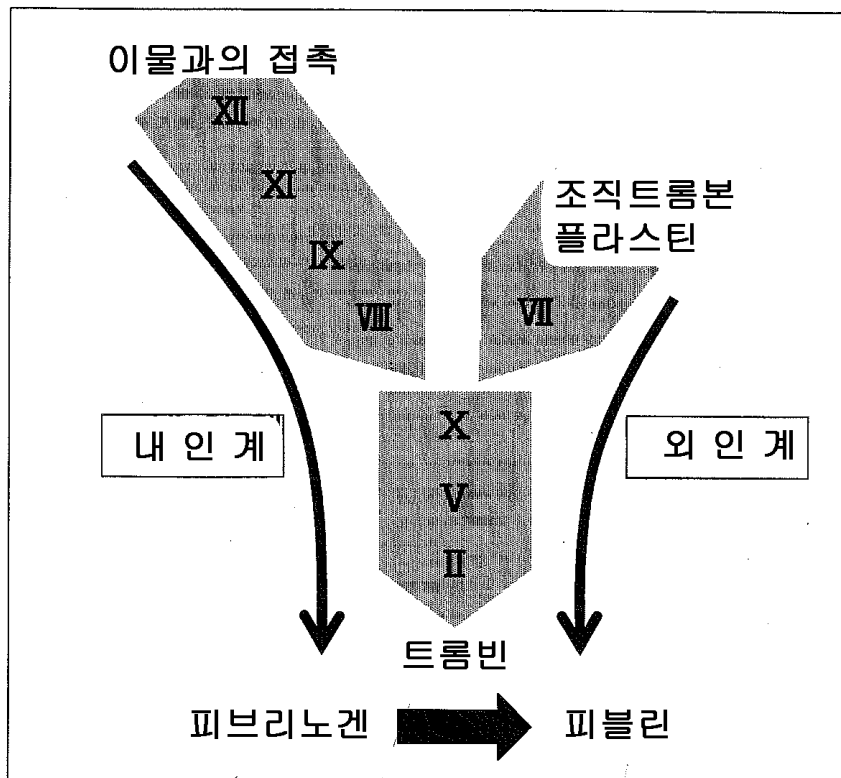
표 2

	종래법 A	종래법 B	본 발명
응고시간 연장제	NaCl 150 mM	NaCl 150 mM	아미노구아니딘 염산염
광강도 변화량 증강제	-	PEG20000 0.1%	90mM
응고시간	11.6초	10.4초	10.4초
광강도 변화량 ΔH	2194	2244	3444

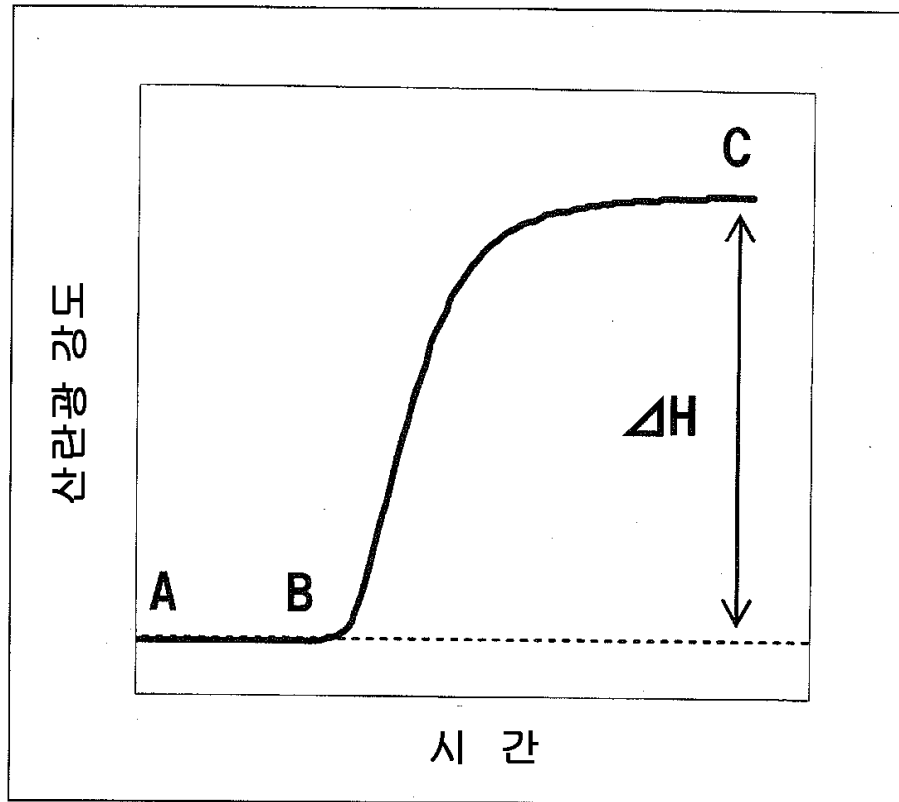
3중 측정의 평균치

도면

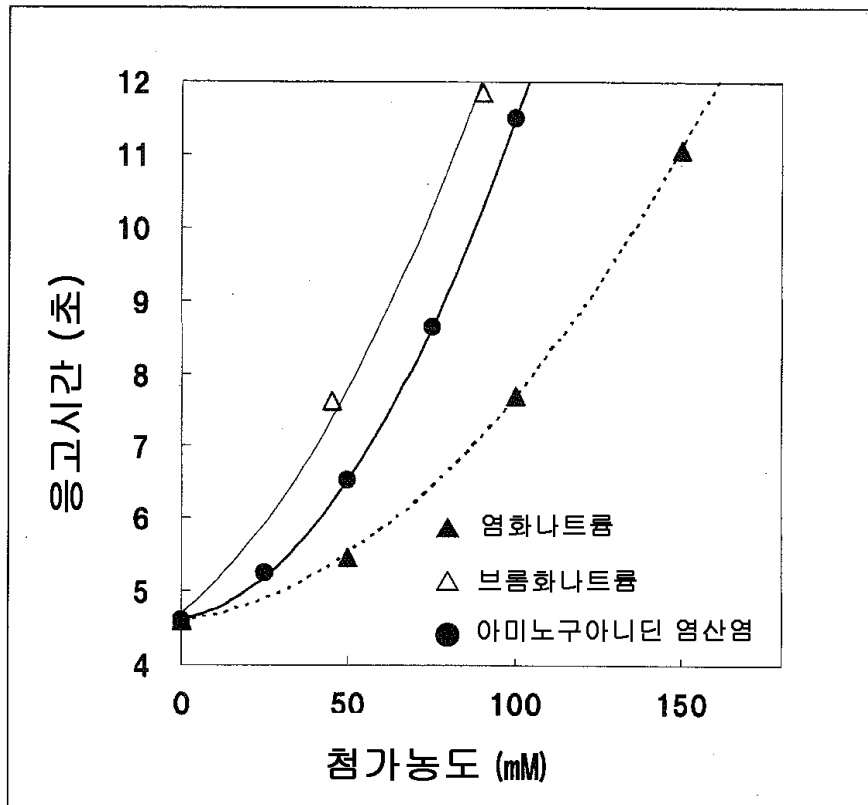
도면1



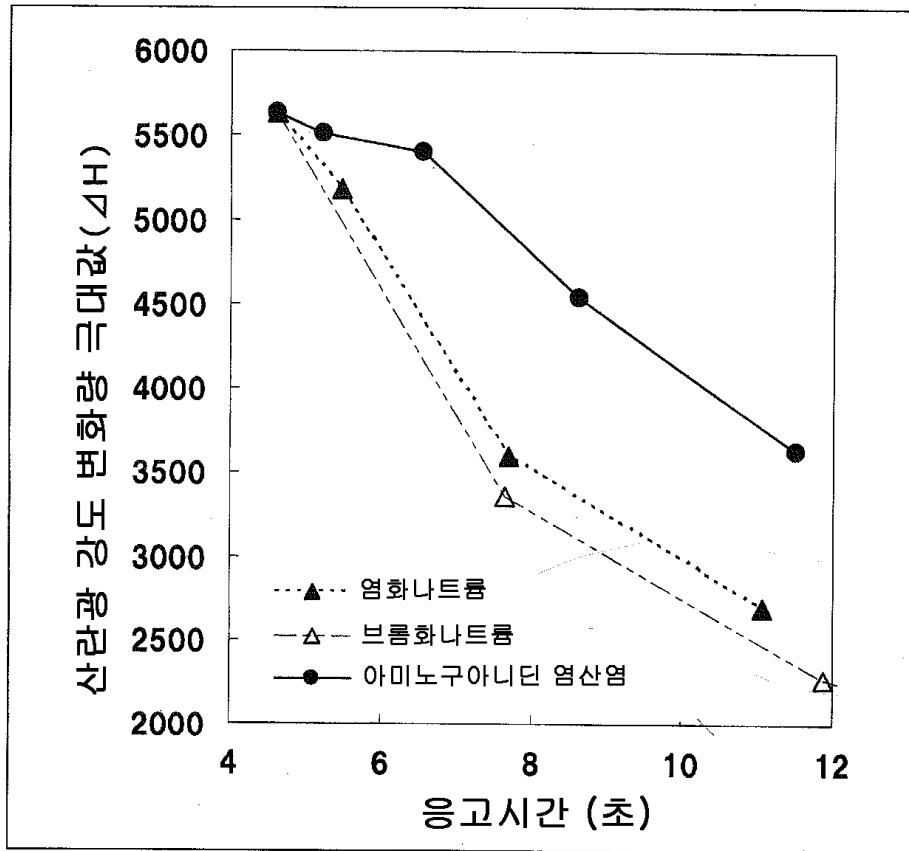
도면2



도면3



도면4



도면5

