



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년01월29일
 (11) 등록번호 10-1350528
 (24) 등록일자 2014년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7027636
 (22) 출원일자(국제) 2006년04월14일
 심사청구일자 2011년04월14일
 (85) 번역문제출일자 2007년11월27일
 (65) 공개번호 10-2008-0012905
 (43) 공개일자 2008년02월12일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/014136
 (87) 국제공개번호 WO 2006/115844
 국제공개일자 2006년11월02일
 (30) 우선권주장
 11/119,360 2005년04월28일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020010031594 A*
 WO1998041868 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아큐메트릭스, 인크.
 미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 소렌토 밸리
 불러마드 3985
 (72) 발명자
맥휴, 셴
 미국 92037 캘리포니아주 라 호야 노틸러스 스트
 리트 360 1/2
더빈, 데니스
 미국 92075 캘리포니아주 솔라나 비치 마르솔란
 애비뉴 711
 (74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 32 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **혈소판 기능 분석을 위한 아라키돈산의 안정화 방법 및시스템**

(57) 요약

본 발명은 실온에서 보관할 수 있는 일회용 아라키돈산 기재 분석 장치를 사용하여, 아스피린 사용에 기인한 전혈에서의 혈소판 억제 수준을 신속하게 측정하기 위한 방법 및 시스템을 제공한다. 혈소판을 최대한 활성화시키는데 충분한 농도로 아라키돈산을 함유하는 동결건조된 분석 시약이 사용된다. 동일한 동결건조된 분석 시약 내에서 항산화제는 아라키돈산의 산화 속도를 감소시키지만 혈소판 기능을 간섭하지 않는다. 일회용 분석 장치 패키지 내의 산소 흡수제는 패키지가 밀봉된 후 단시간 내에 불활성 환경을 생성한다. 분석 장치는 복수 개의 채널 및 복수 개의 채널 각각에 연결된 공동 혈액 샘플 도입부가 있는 하우징을 가질 수 있다. 분석 장치는 또한 혈소판을 최대한 활성화시키기에 충분한 농도로 아라키돈산을 함유하는 동결건조된 분석 시약을 포함할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

아라키돈산을 함유하는 동결건조된 분석 시약 및 동일한 동결건조된 분석 시약 내에서 아라키돈산의 산화 속도를 감소시키거나 혈소판 기능을 간섭하지 않는 항산화제를 일회용 분석 장치 패키지 내에 제공하는 단계; 및 샘플과 분석 시약을 적합한 용기 내에서 합하고, 샘플 내의 혈소판 응집을 측정하는 단계를 포함하며, 상기 일회용 분석 장치 패키지는 산소 흡수제를 추가로 포함하고, 일회용 분석 시약은 3개월 이상 동안 실온에서 안정한 것인, 피검체로부터 수집된 샘플 내 혈소판 억제 측정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 동결건조된 분석 시약이 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 또는 혈소판 수용체에 대한 항체로 코팅된 입자를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, GPIIb/IIIa 수용체 리간드가 피브리노겐, 모노클로날 항체 10E5, 모노클로날 항체 c7E3, 폰 빌레브란트 인자, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 아르기닌 글리신-아스파르트산(RGD) 서열을 갖는 리간드, 및 아르기닌 글리신-아스파르트산(RGD) 서열을 모방한 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 입자 크기가 0.1 μm 내지 20 μm 인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 입자의 밀도가 0.7 내지 1.5 g/ml인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, GPIIb/IIIa 수용체 리간드 또는 혈소판 수용체에 대한 항체가 입자에 공유적으로 결합된 것인 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제2항에 있어서, 입자가 흡착 차단 영역을 갖는 것인 방법.

청구항 9

제2항에 있어서, 입자가 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 표지가 검출 잔기인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 표지가 적외선을 흡수하는 1종 이상의 염료를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 샘플이 용액인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 샘플이 혈소판을 포함하는 체액인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 샘플의 부피가 30 μl 내지 5000 μl 인 방법.

청구항 15

제2항에 있어서, 샘플이 수성 매질로 처리되는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 극성 공-용매가 수성 매질과 함께 사용되는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 수성 매질이 1종 이상의 완충액을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 매질의 pH가 2 내지 11인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 매질의 pH가 4 내지 9인 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 매질의 부피가 25 μl 내지 500 μl 인 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 매질의 부피가 75 μl 내지 250 μl 인 방법.

청구항 22

제15항에 있어서, 샘플과 매질을 인큐베이션시켜 입자를 응집시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 입자의 응집을 측정하여 혈소판 기능 활성을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 샘플과 매질을 25 $^{\circ}\text{C}$ 이상의 온도에서 인큐베이션시키는 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 샘플과 매질을 30 $^{\circ}\text{C}$ 내지 40 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 인큐베이션시키는 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 공지된 혈소판 기능 활성 표준에 대해 측정된 입자의 응집을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제23항에 있어서, 입자의 응집이 샘플을 통과한 적외선 투과율의 증가로서 검출되는 것인 방법.

청구항 28

복수 개의 채널 및 복수 개의 채널의 각각에 연결된 공동 샘플 도입부를 갖는 하우징; 및 다른 채널에 각각 배치된, 아라키돈산을 포함하는 동결건조된 분석 시약 및 동일한 동결건조된 분석 시약 내의

항산화제를 포함하는 복수 개의 시약을
을 포함하는 혈소판 억제 측정용 분석 장치.

청구항 29

아라키돈산을 함유하는 동결건조된 분석 시약;
동일한 동결건조된 분석 시약 내에서 아라키돈산의 산화 속도를 감소시키나 혈소판 기능을 간섭하지 않는 항산
화제; 및
분석 장치 패키지 내의 산소 흡수제
를 포함하는 혈소판 억제 측정용 분석 장치.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 일회용인 분석 장치.

청구항 31

제28항 또는 제29항에 있어서, 동결 건조된 분석 시약이 GPIIb/IIIa 수용체 리간드로 코팅된 입자를 추가로 포
함하는 것인 분석 장치.

청구항 32

제1항에 있어서, 샘플이 전혈 샘플인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제6항, 제8항 내지 제27항 및 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 항혈소판 제제인 아스피린으
로 치료받은 개인으로부터 채취한 것인 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아라키돈산 (AA)을 안정화시키기 위한 방법 및 시스템, 보다 구체적으로 일회용 혈소판 기능 분석법
에서 아라키돈산을 안정화시키기 위한 방법 및 시스템에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 포유동물의 생리 기능에 있어서 혈소판의 역할은 아주 다양하지만, 그들의 일차적인 역할은 지혈을 촉진시키는
것에 있다. 많은 경우에서, 혈액의 응고 능력에 대한 평가가 요구되는데, 이는 빈번하게는 혈소판이 부착 및/

또는 응집되는 능력에 의해 조절되는 파라미터이다. 따라서, 중요한 것은 혈소판의 유착 기능의 평가이다. 예를 들어, 중요한 문제는 응집물 형성을 차단 또는 촉진하는 약물을 투여할지 여부 또는 외과적 시술 전에 혈소판 기능에 있어서의 결핍을 검출할지 여부를 포함한다. 또한, 중요한 것은 신약으로서 시험되거나 환자에게 승인된 임상 치료제로서 사용되는 혈소판 억제제의 유효성을 평가하는 것이다.

[0003] 혈소판 응집은 혈전증 및 급성 심장동맥질환의 발병기전에서 핵심 역할을 한다. 다양한 항혈소판 제제에 대응하여 혈소판 기능에 있어서 현저한 변화가 존재한다는 증거가 제시되어 있다. 특히, 아스피린은 그의 항혈소판 효과로 인해 급성 관상동맥 증후군(ACS)을 앓는 환자에 널리 사용된다. ACS에서 아스피린의 임상적 잇점은 사이클로옥시게네이즈 1 (COX-1) 효소의 비가역적 아세틸화에 의해 혈소판 응집을 일으키는 것으로 알려진 트롬복산 A2 (TXA2)를 억제하는 능력에 일부 기인한다.

[0004] 혈소판 응집은 혈소판이 서로 결합하는 것을 나타내는데 사용되는 용어이다. 시험관 내 혈소판 응집측정법은 일차 지혈전을 일으키는 응집물을 형성하는 혈소판의 생체내 능력을 평가하는데 사용되는 실험실적 방법이다. 이 방법에서, 항응고된 전혈 샘플을 혈소판이 풍부한 혈장 (PRP) 및 혈소판이 적은 혈장 (PPP) 샘플 둘 다를 생성하기 위한 다수의 조건하에서 원심분리한다. 그 다음, 응집제를 PRP에 가하여 혈소판의 응집을 광학적으로 모니터링하고, 이와 동시에 PPP 샘플을 사용하여 개별적으로 광학 측정을 한다. 그 다음, PRP 채널과 비교하기 위한 100% 응집 기준 수준으로서 PPP 채널을 사용하여 응집 백분율을 측정한다.

[0005] 실험실용 혈소판 응집측정 시스템의 제조사인 헬레나 래보러토리스(Helena Laboratories, Beaumont, TX)는 시험의 목적에 따라 적절한 응집제를 제시하는 교육용 문헌을 제공한다. 혈소판 기능에 대한 아스피린의 효과를 측정하기 위하여, 헬레나 래보러토리스는 "아라키돈산 혈소판 응집 분석법이 현재 뇌졸중 및 심장발작을 예방하는데 널리 사용되는 아스피린 요법의 효과를 모니터링하기 위한 유일한 실용적인 방법이다"라고 말한다[참조: Helena Laboratories, Evaluation of Platelet Function Wall Chart 586-25]. 아라키돈산은 인간 혈소판의 과립 및 막에 존재하는 지방산이다[참조: Marcus AJ: Platelet lipids. In Coleman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW: Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice, pg 472. JB Lippincott Company, Philadelphia 1982]. 이것은 인지질로부터 유래되며, 효소 사이클로옥시게네이즈 1 (COX-1)의 존재하에 산소와 결합하여 엔도퍼옥시드 프로스타글란딘 G2 (PGG₂)를 형성한다. 그 다음, PGG₂는 급속하게 프로스타글란딘 H₂ (PGH₂)로 전환되고, 이는 결국 혈소판 응집의 강력한 유도인자인 트롬복산 A₂로 전환된다. 아스피린 또는 아스피린-함유 화합물의 섭취는 COX-1 매개 산소 소모를 억제하고, 그 결과 혈소판 응집을 일으키는 모든 후속적인 반응을 불가능하게 한다[참조: Bye A, Lewis Y, O'Grady J: Effect of a single oral dose of aspirin on the platelet aggregation response to arachidonic acid. Br J Clin Pharmacol 7:283, 1979].

[0006] 아라키돈산을 시험관 내에서 정상 혈소판 풍부 혈장에 첨가하면 급격한 산소 소모, 트롬복산 형성 및 혈소판 응집을 초래한다[참조: Moncada S, Vane JR: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. N Eng J Med 300:1142, 1979]. 그러나, 아스피린 또는 아스피린-함유 화합물의 존재하에, 이러한 반응은 일어나지 않는다[참조: Ingerman CM, Smith JB, Shipiro S, Sedar A, Silver A, Silver MJ: Hereditary abnormality of platelet aggregation attributable to nucleotide storage pool deficiency. Blood 52:332, 1978].

[0007] 임상 환경에서 아라키돈산 사용시의 난점은 상대적으로 불안정한 화합물의 성질이다. 산소에 노출되는 경우, 아라키돈산은 자가산화라 불리는 과정을 거친다. 자가산화는 일반적으로 실온에서 대기 산소와 유기 화합물 사이에서 통상적으로 일어나는 화학 반응으로 정의된다. 자가산화 현상의 흔한 예로는 과일 및 견과류의 갈변, 금속의 녹슴 및 고무 제품의 변성이 있다. 자가산화로 인해 아라키돈산의 황화가 초래되고, 급속하게 열화된다. 전형적인 실험실에서의 사용에 있어서, 아라키돈산은 -20°C에서 밀봉된 불활성 앰플에 보관되며, 일단 해동되면 24 시간 이내에 사용하도록 권장된다[참조: Sigma-Aldrich Data Sheets A9673 및 A8798]. 대안으로, 일부 제조사는 아라키돈산의 염-기체 형태를 동결건조시키지만, 이 또한 -20°C에서 밀봉된 불활성 앰플에 보관되어야 하며, 개봉 즉시 사용되어야 한다. 임상 환경에서, 종종 시험을 할 시기를 미리 아는 경우가 없고, 해동할 물질의 양을 조절하고 그 물질을 적시에 사용하여야 하기 때문에 번거롭고 시간 소모도 크다.

[0008] 특히 혈소판 활성제로서의 용도와 관련하여 아라키돈산의 자가산화의 또 다른 측면은 아라키돈산의 생체의 자가산화는 생체내 산화에서와 같은 동일한 부산물을 반드시 생성하지는 않으며, 일부 경우에서 TXA₂를 모방한 안정한 부산물을 생산할 수 있다는 것이다. 아스피린의 효과를 평가하기 위한 분석에서 이런 식으로 분해된 아라키돈산을 사용하면 아스피린이 혈소판 응집에 아무런 효과가 없다고 잘못되게 평가될 것이다.

- [0009] 자가산화 현상은 산소 또는 다른 산화성 물질을 전체적으로 배제함으로써 방지할 수 있지만, 이는 일반적으로 실용적이지 않다. 대신에, 보다 전형적으로 행해지는 것은 반응 속도를 감소시키거나 유도 기간을 연장시키는 억제제를 이용하는 것이다. 그러나, 자가산화의 완전한 예방은 불가능할 것이다. 자가산화를 억제할 수 있는 물질을 억제제 또는 항산화제라 한다. 예방적 억제제는 개시 반응의 속도를 억제함으로써 자기산화의 속도를 감소시킨다. 진정한 의미에서 항산화제는 성장 단계를 억제할 수 있는 물질이다. 즉, 그들은 전자를 잃은 후에도 여전히 안정한 배위로 존재하기 때문에 자가산화 연쇄 반응을 방해하는 것이다. 항산화제는 통상적으로 식품을 불쾌한 냄새 발생, 갈변, 흑색점의 발생으로부터 보호하기 위해 식품 보존에 사용된다. 항산화제는 또한 일부 필수 아미노산의 손상 및 일부 비타민의 손실을 최소화한다. 식품에 사용되는 항산화제의 두 가지 일반적인 종류는 산과 페놀성 화합물이다. 산 항산화제의 예로는 아스코르브산 및 시트르산이 있으며, 페놀성 항산화제 화합물은 BHA, BHT, TBHQ, 토코페롤, 레시틴, THBP, 검(Gum) 및 글리신을 포함한다.
- [0010] 저장 및 취급의 어려움 때문에, 현재 아스피린에 반응하는 혈소판을 측정하기 위하여 아라키돈산을 사용하는 임상 혈소판 기능 분석기가 없다. 대신에, 다데 베링(Dade Behring) PFA-100® 또는 플레이틀릿웍스(Plateletworks)®와 같은 시스템은 아데노신 디포스페이트 (ADP), 콜라겐 및 에피네프린과 같은 혈소판 활성화제의 조합물을 사용한다. 그러나, 이들 시스템은 그들의 활성화 효능제가 아스피린에 의한 표적 경로에 특이적이지 않기 때문에, 혈소판 기능을 손상시키는 아스피린의 검출에 대해 불량한 감도 및 특이성을 보인다. 초기의 아큐메트릭스(Accumetrics)의 베리파이나우(Verifynow)TM 아스피린 분석법은 혈소판 효능제로서 양이온성 프로필 갈레이트(cPG)를 사용하였다. cPG는 포스포리피드 층으로부터 혈소판 결합 아라키돈산의 방출을 일으킴으로써 혈소판을 활성화시키고, 아스피린에 의한 표적 경로에 따라 민감하고 특이적인 혈소판의 활성화를 제공하는 것으로 밝혀졌다[참조: Steiskal, et al, Application of Cationic Propyl Gallate as Inducer of Thrombocyte Aggregation For Evaluation of Effectiveness of Antiaggregation Therapy]. 그러나, cPG의 한계는 PRP와 비교하여 전혈에 사용되는 경우, 추정되기로는 양이온 전하에 대한 적혈구의 효과로 인해 혈소판의 활성화가 덜 일정하다는 것이다.
- [0011] 급속 혈소판 기능 분석법이 최근에 개발되었으며, 미국 특허 제5,763,199호에 기재되어 있다. 이 분석법은 비회석된 전혈에서 당단백질 (GP)IIb/IIIa 수용체 차단을 측정한다. 피브리노겐과 같은 GPIIb/IIIa 리간드로 코팅된 소형 중합체성 비드의 응집은 비드가 차단되지 않은 활성화 GPIIb/IIIa 수용체가 있는 혈소판 함유 전혈과 접촉할 때 일어난다. 응집이 이루어지지 않는다는 것은 GPIIb/IIIa 수용체가 활성화되는 것의 실패 및/또는 GPIIb/IIIa 수용체의 차단을 의미한다. 바람직한 하나의 실시태양에서, 아라키돈산과 같은 혈소판 활성화제를 첨가함으로써 분석은 병상에서 수행하기에 충분한 만큼 급속하고 편리해지며, 활성화 수용체가 차단되지 않은 경우 편리한 공지된 시간 내에 소형 중합체성 비드의 응집이 일어난다. 분석은 수집 용기의 개봉 없이 수집 용기로부터 분석 장치로 혈액을 이동시키는 능력을 포함한다.
- [0012] 수개월 동안 실온에서 저장할 수 있는 일회용 아라키돈산 기재 분석 장치를 사용하여, 아스피린의 사용에 기인한 전혈에서의 혈소판 억제 수준을 신속하게 측정하는 방법이 요구된다.

발명의 상세한 설명

- [0013] **발명의 요약**
- [0014] 따라서, 본 발명의 목적은 수개월 동안 실온에서 저장할 수 있는 일회용 아라키돈산 기재 분석 장치를 사용하여, 아스피린의 사용에 기인한 전혈에서의 혈소판 억제의 수준을 신속하게 측정하는 방법 및 시스템을 제공하는 것이다.
- [0015] 이를 비롯한 본 발명의 기타 목적은 혈소판 기능을 측정하기 위한 일회용 분석 장치의 제조 방법으로 달성된다. 혈소판을 최대로 활성화시키기 위해 충분한 농도로 아라키돈산을 함유하는 동결건조된 분석 시약이 사용된다. 동일한 동결건조된 분석 시약 내에서 항산화제는 아라키돈산의 산화 속도를 감소시키거나 혈소판 기능을 간섭하지 않는다. 일회용 분석 장치 패키지 내의 충분한 용량을 갖는 산소 흡수제는 패키지가 밀봉된 후 단시간 내에 불활성 환경을 형성한다.
- [0016] 본 발명의 다른 실시태양에서, 혈소판 기능 측정용 분석 장치는 복수 개의 채널 및 복수 개의 채널 각각에 연결된 공동 혈액 샘플 도입부가 있는 하우징을 갖는다. 복수 개의 시약이 포함된다. 각 시약은 각 채널에 위치한다. 복수 개의 시약은 혈소판을 최대로 활성화시키기 위해 충분한 농도로 아라키돈산을 함유하는 동결건조된 분석 시약, 및 동일한 동결건조된 분석 시약 내에서 아라키돈산의 산화 속도를 감소시키고 혈소판 기능을 간섭하지

않는 항산화제를 포함한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 혈소판 기능 측정용 분석 장치가 제공되는데, 이는 혈소판을 최대한 활성화시키기에 충분한 농도로 아라키돈산을 함유하는 동결건조된 분석 시약을 포함한다. 동일한 동결건조된 분석 시약 내에서 항산화제는 아라키돈산의 산화 속도를 감소시키나, 혈소판 기능을 간섭하지 않는다. 산소 흡수제는 분석 장치 패키지 내에 충분한 용량으로 제공된다. 패키지는 분석 장치에서 단시간 내에 불활성 환경을 형성한다.

[0018] **바람직한 실시태양의 상세한 설명**

[0019] 본 발명의 다양한 실시태양에서, 아라키돈산 조성물은 전혈 샘플에서, 비제한적 예로서 아스피린을 포함하는 사이클로옥시게네이즈-1 (COX-1) 길항제에 의한 혈소판 응집의 억제를 측정함에 있어서 활성화제로서 이용된다. 따라서, 전술한 조성물은 아스피린으로 환자를 치료하는 것과 관련된 항혈소판 요법의 유효성을 측정하는데 사용될 수 있다. 상기 조성물은 GPIIb/IIIa 수용체 리간드로 코팅된 입자 및 아스피린과 같은 COX-1 억제제의 효능 분석을 수행하는데 필수적인 임의의 다른 시약과 함께 사용될 수 있다.

[0020] 전술한 활성화제 조성물 및 입자를 포함하는 동결건조된 시약 조성물이 사용될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 일정한 부피의 측정될 샘플(예컨대, 전혈)을 동결건조된 시약과 기계적으로 혼합한다. 빛 투과도의 변화를 모니터링하고 혈소판 활성 지수를 계산한다. 하나의 실시태양에서, 전혈 샘플을 전술한 동결건조된 시약이 있는 큐벳(cuvette) 또는 일체화 카트리지와 혼합한다. 장치는 분석을 수행하는데 사용될 수 있다. 장치는 샘플을 수용하는 웰을 포함할 수 있고, 웰은 동결건조된 시약 및 분석을 수행하기 위한 다른 시약을 포함한다. 추가 시약은 각종 완충액 및/또는 동결건조 안정화제 동일 수 있다.

[0021] 하나의 실시태양에서, 샘플은 아라키돈산 (AA) 길항제에 의해 영향받을 수 있다. 예를 들어, 샘플은 아스피린으로 치료 중인 환자로부터 채취한 것일 수 있다. 본 발명의 하나의 실시태양에서, 조합물이 분석 매질 중에 제공되며, 여기서 조합물은 샘플, 및 비제한적인 예로서 아스코르브산 등을 포함하는 항-산화 안정화제를 포함하는 AA의 조성물이다. AA의 최종 농도는 0.5 내지 10 mM, 바람직하게는 0.75 내지 2 mM일 수 있고, 아스코르브산의 최종 농도는 1 내지 30 mM, 및 바람직하게는 5 내지 15 mM일 수 있다.

[0022] 혈소판의 특이적 응집, 즉, 혈소판 상의 수용체와 입자 상의 화합물 사이에 특정 상호작용에 의한 혈소판의 응집을 일으킬 수 있는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약이 사용될 수 있다. 적절한 화합물은, 비제한적인 예로서 혈소판 수용체에 대한 항체 및 GPIIb/IIIa 수용체 리간드를 포함하며, 이는 혈소판 표면 상의 GPIIb/IIIa 수용체와 결합, 착화 또는 상호작용하는, 소형 유기 분자, 폴리펩티드, 단백질, 모노클로날 항체 또는 핵산일 수 있다. 혈소판 매개된 입자의 응집은, 혈소판의 표면 상의 GPIIb/IIIa 수용체가 입자 상의 GPIIb/IIIa 수용체 리간드와 결합, 착화 또는 다른 식으로 상호작용할 때 일어난다. 적절한 GPIIb/IIIa 리간드는 피브리노겐, 모노클로날 항체 10E5 (Coller, *et al.*, J. Clin. Invest. 72:325 (1983)), 모노클로날 항체 c7E3 (The EPIC Investigators, N. E. Journal of Med., 330:956 (1994)), 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자, 피브로넥틴, 비트로넥틴 및 아르기닌 글리신-아스파르트산(RGD) 서열을 갖는 리간드 또는 상기 서열을 모방한 다른 펩티드 또는 펩티도미메틱(peptidomimetic) (Cook, *et al.* Drugs of the Future 19:135 (1994))을 포함한다. 중요한 다른 화합물은 트롬빈 억제제, 저분자량 헤파린 등을 포함한다.

[0023] 화합물이 부착된 입자는 약 0.1 마이크로미터 이상 및 약 20 마이크로미터 이하이다. 하나의 실시태양에서, 입자는 약 0.1 마이크로미터 내지 약 10 마이크로미터이다. 다른 실시태양에서, 입자는 약 1 마이크로미터 이상 및 약 8 마이크로미터 미만이다. 입자는 실질적으로 임의의 형태일 수 있으나, 일반적으로 균일한 직경을 갖는 구형이다. 입자는 임의의 밀도를 가질 수 있으며, 하나의 실시태양에서 밀도는 일반적으로 약 0.7 내지 약 1.5 g/ml로 물과 유사하다. 입자는 표면에 양전하 또는 음전하, 바람직하게는 음전하를 갖거나 갖지 않을 수 있다. 입자는 그의 표면에 상기한 화합물들을 직접 또는 간접적으로 공유 결합 또는 부착시킬 수 있도록 관능화되거나 관능화될 수 있다.

[0024] 입자는 고체 (예를 들어, 유기 및 무기 중합체 또는 라텍스로 구성), 오일 소적 (예를 들어, 탄화수소, 플루오로카본, 실리콘 유체), 또는 소포 (예를 들어, 인지질과 같은 합성물 또는 세포 및 소기관과 같은 천연물)일 수 있다. 고체 입자는, 일반적으로 부가 또는 축합 중합체인 중합체이고, 이는 액체 매질 중에 용이하게 분산가능하다. 현탁 가능한 입자의 예로는 라텍스와 같은 중합체성 물질, 지질 이중층, 오일 소적, 세포 및 히드로겔이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 기타 입자 조성물은 중합체, 예컨대 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 폴리(비닐 클로라이드), 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(4-메틸부텐), 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 나일론, 폴리(비닐 부틸레

이트); 다당류, 예컨대 텍스트란 및 개질된 텍스트란 등을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 그 자체로 또는 다른 물질과 함께 사용된다. 고체 입자는 폴리스티렌, 폴리아크릴아미드, 아크릴레이트 및 메타크릴레이트 유도체의 단일중합체 및 공중합체, 특히 에스테르 및 아미드, 실리콘 등일 수 있다.

[0025] 화합물은 종종 입자에의 공유 결합 부착에 의해 입자상에 코팅된다. 이러한 공유 결합 부착은 문헌에서 통상적으로 이용가능한 공지 기술에 의해 달성될 수 있다[예를 들어, 참조: "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978) and Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970)]. 요약하면, 상기 언급한 바와 같이, 입자의 표면은 다관능성이거나 다관능화될 수 있다. 매우 다양한 관능기가 이용가능하거나 도입될 수 있다. 관능기는 카르복실산, 알데히드, 아미노기, 시아노기, 에틸렌기, 히드록실기, 페르캡토기 등을 포함한다. 매우 다양한 화합물의 표면에의 가교 방법이 공지되어 있고, 문헌(상기 참조)에 충분히 예시되어 있다. 측쇄 부분의 부착은 결합에 의해 직접적이거나, 가교기의 상호매개를 통한 간접적일 수 있다. 가교기의 길이는 측쇄 부분 및 입자의 성질에 따라 매우 광범위하다.

[0026] 입자에 대한 화합물 분자의 비율은 입자에 대한 화합물 분자의 부착으로 제어된다. 하나의 실시태양에서, 입자의 표면 상에 관능화된 부위의 수는 입자의 표면 상에 도입되는 그러한 부위의 수를 조절함으로써 제어된다. 별법으로, 또는 전술한 방법과 함께, 입자에 대한 화합물 분자의 비율은 부착을 위한 반응 매질 중 화합물의 농도를 조절함으로써 제어될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 입자 시약은 충분한 양의 물질로 처리되어 입자 상의 흡착 영역을 차단할 수 있다. 이러한 물질은 입자의 기능에 영향을 미치지 않는다. 차단 물질은 소 혈청 알부민, 소 감마 글로블린 등과 같은 단백질, 텍스트란 등과 같은 다당류를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또 다른 실시태양에서, 전술한 방법과 함께 사용될 수 있는 것으로, 부착을 위해 관능화된 부위의 수가 실질적으로 입자의 표면 상에 흡착 영역을 감소시키는 입자가 사용된다.

[0028] 입자는 이에 부착되거나 혼입되는 표지를 포함할 수 있다. 표지는 검출 목적으로 사용될 수 있는 임의의 잔기일 수 있다. 표지는 종종 신호 생성 시스템의 일원이다. 표지는 직접 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 표지는 동위 또는 비동위, 일반적으로는 비동위성일 수 있고, 염료, 형광 분자, 화학 발광 분자, 촉매, 예컨대 효소, 촉매를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 프로모터, 조효소, 효소 기질, 방사성기, 유기 소분자, 증폭가능한 폴리뉴클레오티드 서열 등일 수 있다.

[0029] 본 발명의 하나의 특정 실시태양에서, 입자는 적외선을 흡수하는 1종 이상의 염료를 포함할 수 있다. 이러한 염료는, 박테리오클로린(bacteriochlorin), 박테리오클로로피틴(bacteriochlorophytin), 메로폴리메틴(meropolymethine) 염료, 벤조아놀렌(benzoannulene), 비닐성 포르포린(vinylogous porphorin), 폴리메틴 염료, 시아닌 및 메로시아닌 등을 포함한다. 구체적인 염료는 구리(II)-테트라-tert-부틸-테트라키스(디메틸아미노)-29H-31H-프탈로시아닌 및 바나딜-테트라-tert-부틸-테트라키스(디메틸아미노)-29H-31H-프탈로시아닌이 있다. 특히 선택되는 염료는 편리함, 가용성, 안정성, 입자와의 상용성 등 중 하나를 갖는다. 이들 염료는, 중합 또는 수동 흡착을 통해 입자 자체 내에 직접 혼입될 수 있다. 염료는 개별적으로(즉, 연속으로) 또는 조합으로(즉, 동시에) 로딩될 수 있다. 별법으로, 염료는 가교 성분과 조합하여 비드에 연결될 수 있고, 이들은 표면으로부터 침출되지 않는다. 사용되는 로딩 방법과 관계없이, 입자 표면이 적절한 조건 하에 응집하는 능력에 관하여 영향받지 않는다는 조건하에 이루어진다.

[0030] 염료는 약 750 nm - 900 nm의 범위, 특히 약 750 nm - 850 nm의 범위에서 빛을 흡수할 수 있다. 높은 수준의 적혈구를 포함하는 샘플에 있어서, 빛은 옥시헤모글로빈 및 환원 헤모글로빈에 대한 등흡광점(isobestic point)인 약 800 nm ± 10 nm에서 흡수된다. 입자에 사용된 염료의 양은 관련된 빛 범위에서 염료의 흡광 계수, 요구되는 분석의 감도, 입자의 크기, 염료의 입자에의 결합 방식, 염료의 입자 매트릭스와의 상용성 등에 따라 다양하다. 혼입되는 염료의 양은 약 1 내지 20 중량%, 보다 일반적으로 5 내지 15 중량%의 범위일 수 있다. 적절한 염료는 프탈로시아닌 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 금속 유리 프탈로시아닌은 대략 700 nm (ε=162,000)에서 흡수한다. 금속 착물은 흡수 지역을 보다 짧거나 긴 파장으로 이동시키고, 대부분의 금속은 흡수를 훨씬 짧은 파장으로 이동시키나, 납과 같은 일부 금속은 금속 유리 프탈로시아닌보다 훨씬 긴 파장에서 흡수한다.

[0031] 전이 금속과 프탈로시아닌(메탈로프탈로시아닌 및 메탈로나프탈로시아닌) 사이에서 형성된 착물은 빛과 열에 대해 화학적으로 매우 안정하다. 이들은 적절한 금속의 존재 하에 오프탈로디니트릴 (ophthalodinitrile)의 축합에 의해 형성된다. 구리(Cu) 및 바나듐(V)을 제외한 메탈로프탈로시아닌의 형성에 사용되는 금속의 일일부는 마그네슘(Mg), 아연(Zn) 및 코발트(Co)이다.

- [0032] 본 발명의 하나의 특정 실시태양에서, 평탄한 흡수 최대값을 갖는 카르복실화 마이크로입자가 사용된다. 이들 마이크로입자는 805 nm에 근접한 뚜렷한 흡수 최대값을 갖는 다종의 염료를 혼입함으로써 제조된다. 이는 780-820 nm의 넓은 범위의 파장에 걸쳐 평탄한 최대 흡수 스펙트럼을 나타낸다.
- [0033] 샘플이 COX-1 길항제, 특히 아스피린으로부터 영향을 받은 경우에 분석되는 샘플은 합성 또는 천연의 임의의 용액일 수 있다. 용어 "샘플"은 숙주로부터의 체액을 포함한 생물학적 조직 등을 포함한다. 샘플은 직접 검사될 수 있거나 전처리될 수 있다. 본 발명은, 예를 들어 전혈, 혈장과 같은 혈소판-함유 혈액 분획 등과 같이 체액을 비롯하여 혈소판을 포함하는 샘플에 특히 적용된다. 하나의 실시태양에서, 본 발명은 전혈 샘플에 특히 적용된다. 샘플의 양은 샘플의 성질에 따라 다르다. 항응고된 전혈과 같은 유체 샘플에 있어서, 샘플의 양은 일반적으로 약 30 μl 내지 5000 μl , 바람직하게는, 약 100 내지 300 μl 이다. 용어 "샘플"은 환자로부터 직접 얻은 가공되지 않은 샘플 또는 임의의 사용하기 좋은 액체 매질, 일반적으로 수성 매질(예를 들어, 시트르산 나트륨)에서 전처리 및 제조된 샘플을 포함한다.
- [0034] 바람직하게는, 본 발명에 따른 분석 실시용 매질은 수성 매질이다. 다른 극성 공용매 또한 알코올, 에테르 매질 등을 포함하는, 일반적으로 탄소 원자수가 1 내지 6, 보다 일반적으로 1 내지 4개인 산소함유 유기 용매에 사용된다. 일반적으로, 이러한 공용매는 70 중량% 미만, 보다 일반적으로 30 중량% 미만으로 존재한다. 또한, 각종 보조 물질이 본 발명에 따른 방법에서 흔히 사용된다. 예를 들어, 분석 매질 및 분석 성분에 대한 안정화제 뿐만 아니라, 일반적으로 완충액; 계면활성제, 특히 비-이온성 계면활성제; 결합 증진제, 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜 등이 분석 매질에 존재한다.
- [0035] 매질에 대한 pH는 약 2 내지 약 11, 바람직하게는 약 4 내지 약 9의 범위일 수 있다. 각종 완충액은 목적하는 pH를 달성하고, 방법을 수행하는 동안에 pH를 유지하는데 사용될 수 있다. 완충액의 예로는 헤페스(HEPES), 붕산염, 포스페이트, 탄산염, 트리스(Tris), 바르비탈 등이 포함된다. 사용되는 특정 완충액은 본 방법에 결정적이지 않으나, 특정 상황에서는 하나의 완충액이 다른 것들보다 바람직할 수 있다. 일부 상황에서 헤페스(HEPES)가 바람직하고, 0.05 M 내지 약 0.001 M의 농도, 일반적으로는 약 0.01 M의 농도로 존재한다.
- [0036] 분석 매질의 부피는 약 25 내지 약 500 마이크로리터, 일반적으로 약 75 내지 약 250 마이크로리터일 수 있다. 분석은 임의의 적절한 용기에서 수행될 수 있다. 통상적으로, 용기는 분석을 수행하고 분석 결과를 측정하기 위한 장치와 함께 사용되는 큐벳 또는 카트리지이다. 반응 용기는 본 발명에 따라 활성화 개시제를 입자 시약 등과 같은 기타 시약, 안정화제 등과 함께 건조 동결건조된 형태로 함유한다.
- [0037] 샘플과 입자 시약의 조합물은 입자를 응집시키는 조건 하에 인큐베이션된다. 본 방법을 수행하는데 적당한 온도가 일반적으로 사용된다. 온도는 일정할 수 있거나 변화할 수 있다. 일반적으로 일정한 온도가 반응 단계 중에 사용된다. 온도는 약 10 내지 약 80°C, 보다 일반적으로 약 15 내지 약 45°C일 수 있고, 바람직하게 온도는 25°C 이상, 보다 바람직하게 약 30 내지 약 40°C의 범위, 일반적으로 약 37°C이다.
- [0038] 입자의 응집 정도가 측정되고, 이는 샘플 중 분석 대상의 존재 또는 양과 관련된다. 응집의 존재는 응집을 나타내는 입자의 뭉침을 육안으로 관찰함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 전술한 바와 같이, 입자는 착색되어 매트릭스의 응집 또는 뭉침을 가시화하는데 도움을 줄 수 있다. 응집의 정도는 매질의 광학 밀도의 변화 속도 등을 관찰함으로써, 분광광도법, 탁도측정법(turbidimetry), 네펠로법(nephelometry) 등으로 측정될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석은 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행된다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 피브리노겐 코팅된 입자, AA와 아스코르브산의 조성물과 조합하여 분석 매질을 형성한다. 입자 시약의 입자는 그에 혼입되는 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 조합물이 응집 조건하에 둔다. 그 다음, 매질을 적외선 영역의 빛으로 조사한다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관계된다.
- [0040] 응집 매질은 800 nm 부근에서 높은 흡수를 갖도록 선택된다. 응집 흡수 계수와 전혈 흡수 계수 사이의 비율은 800 nm에서 바람직하게는 약 4:1 초과여야 한다. 특정 분석에 있어서 흡수 비율은 응집 매질의 흡수 계수와 분석 샘플 중 응집 매질의 농도 양자의 함수이다.
- [0041] 샘플을 시약과 혼합 후, 실온 이상이지만 분석을 간섭할 수 있는 온도 미만의 온도로 가열할 수 있으며, 이는 온도가 분석 결과에 불리하게 영향을 미치지 않도록 제어되게 하기 위함이다. 바람직하게, 온도는 25°C 이상, 바람직하게 30 내지 40°C의 범위, 보다 바람직하게 37°C일 수 있다. 반응 매질은 일반적으로 시약이 샘플과 혼합될 때 반응 기간 중 서서히 교반한다. 교반은 분석 샘플에 있어서 균질성을 달성하고 유지하기에 충분하다.

영점 시간으로부터 관독의 총 시간(혼합 시간)은 약 10초 내지 10분, 보다 일반적으로 약 30초 내지 8분, 바람직하게는 약 30초 내지 3분의 범위일 수 있다. 데이터는 임의의 편리한 수단, 특히 캘리브레이터(calibrator) 및/또는 제어수단과 관련하여 데이터를 조작할 수 있는 알고리즘을 사용하여 분석될 수 있다.

[0042] 응집 수준은 시험된 샘플의 혈소판 기능의 활성에 대한 표시이다. 응집 수준은 공지된 혈소판 기능 활성 표준과 비교될 수 있다. 일반적으로 결과는 부수적으로 수행되거나 미리 수행될 수 있거나 표준 곡선으로서 제공될 수 있는, 캘리브레이터와 비교될 것이다.

[0043] 본 발명의 방법은 관련 개시 내용이 본 명세서에 포함되는 미국 특허출원번호 제09/177,884호 ('884 출원, 1998년 10월 23일 출원)에 기재된 것과 같은, 혈소판 계수에 대한 분석과 관련하여 사용될 수 있다.

[0044] 상기 분석법은 바람직하게는 본 발명에 따라 반응이 일어나도록 하고, 그 결과를 측정하는 장치 내에서 수행될 수 있다. 기기는 피브리노겐에 결합하는 활성화된 혈소판의 능력에 기초하여 혈소판 기능을 평가할 수 있다. 활성화된 혈소판이 피브리노겐-코팅된 입자와 결합하고 응집함에 따라, 빛 투과가 증가된다. 일반적으로, 분석 결과를 측정하는 기기는 응집을 측정할 수 있는 것이다. 바람직하게는, 기기는 응집에 의한 광학 신호에 있어서의 변화를 측정한다. 적절한 기기는, 비제한적 예로써, 동력학적 분광광도계인 울트라 시스템(Ultegra System)® 기기 (아큐메트릭스(Accumetrics)로부터 입수 가능함, San Diego, CA)를 포함하며, 정상 샘플에 대한 급속 혈소판 기능 활성 측정 등에 사용된다.

[0045] 울트라 시스템® 기기는 탁도측정에 기초한 광학 검출 시스템으로서, 빛 투과에 대한 증가로서 혈소판 유도된 응집을 측정한다. 시스템은 분석기, 일회용 카트리지와 및 제어수단으로 구성된다. 카트리지는 마이크로입자 응집 기술에 기초한 시약을 포함한다. 품질 제어 시스템은 전자 제어수단, 두 가지 수준의 분석된 "습식(wet)" 제어 (WQC), 카트리지-내 습도 센서, 패키지-내 온도 표시기, 두 개의 분석 채널의 병류(concurrence)에 대한 시험을 포함한다. 분석기는 분석 서열화를 제어하고, 분석 온도를 수립하고, 목적하는 지속 기간 동안 시약-샘플 혼합을 제어하고, 혈소판 기능의 정도를 측정하고, 결과를 표시하고 자가-진단을 수행한다. 본 방법의 사용을 위해 시스템의 시험 카트리지는 GPIIb/IIIa 수용체 리간드가 공유 부착된 입자, AA와 아스코르브산의 조성물 및 완충액을 포함하는 동결건조된 제제를 포함한다. 환자 샘플은 일반적으로 시트르산이 첨가된 전혈이며, 사용자에게 의해 요구되는 혈액의 취급 없이, 분석기에 의해 혈액 수집 튜브로부터 카트리지로 자동적으로 분배된다. 상호작용은 입자의 적외선 흡광도 특성에 의해 모니터링된다. 입자가 혈소판과 상호작용 함에 따라, 입자의 응집은 울테그라(Ultegra)™ 분석기의 광학 시스템을 통해 측정된다. 응집은 샘플을 통과한 적외선의 투과에 있어서 증가로서 검출된다. 반응 동력학을 분석하고, "아스피린 반응 단위(Aspirin Response Units, ARU)"로 나타낸다.

[0046] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 피브리노겐이 공유결합된 입자, AA와 아스코르브산의 조성물 및 완충액을 포함하는 동결건조된 제제를 패키징된 조합으로 포함하는 키트가 제공된다. 동결건조된 제제는 분석 기기에 사용되는 카트리지와 같은 반응 용기 내에 존재할 수 있다. 울테그라® 시스템에 있어서, 동결건조된 제제는 분석기에 사용되는 4-웰의 외부 웰에 위치할 수 있다. 키트는 또한 샘플 수집 용기 및/또는 본 방법을 수행하기 위한 장치를 포함할 수 있다. 시약의 상대적인 양은 측정 감도를 실질적으로 최적화하는 용액 중 시약의 농도로 제공되도록 광범위하게 변화된다.

[0047] 적절한 경우, 시약은 임의의 시약 활성을 유지하도록 밀폐 패키지에 위치될 수 있다. 패키지는 예를 들어, 실질적으로 습기 비-침투성인 물질로 제조된 백, 주머니 등일 수 있다. 이러한 물질은, 예를 들어 플라스틱, 알루미늄 박 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 패키지는 건조제 주머니 및 산소 흡수제를 포함하여, 건조하고 산소가 없는 환경을 유지할 수 있다. 산소 흡수제는 MGC로부터의 파마킵(Pharmakeep) KC-20 또는 이와 유사한 것일 수 있다. 산소 흡수제는 1 내지 50 mL, 이상적으로 20 내지 30 mL 범위의 흡수 용량을 가져야 한다. 혈액 샘플을 위하여, 키트는 또한 사람의 피부를 뚫는 물품, 소독제 또는 멸균 패드 등을 포함할 수 있다. 키트는 또한 캘리브레이터 또는 표준을 포함할 수 있다.

[0048] 키트는 본 발명의 분석을 수행하는데 필수적인 시약을 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 키트는 혈액 바이알, 평가되는 혈액 샘플의 pH 및 염 농도를 고체 표면의 혈소판 매개 응집에 대해 적절한 범위 내로 유지하는 완충액 및 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체 리간드로 코팅된 소형 중합체성 비드를 포함한다. 완충액은 용액이거나, 완충 조성물 단독 및 공지된 양의 물을 첨가하여 목적하는 완충 용액이 수득되는 염으로 구성될 수 있다. 임의로는, 키트는 항응고제를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 완충액은 헤페스(HEPES)이고; 항응고제는 시트레이트이고; GPIIb/IIIa 수용체 리간드는 피브리노겐이고; 소형 중합체성 비드는 폴리아크릴로니트릴 또는 카르복실화 폴리스티렌이며, 여기서 피브리노겐과 같은 펩티드 GPIIb/IIIa 수용체 리간드는 펩티드의 N-말

단과 비드 표면 상의 N-히드록시숙신이미드 또는 카르복실레이트 기 사이의 공유 결합에 의해 비드 표면에 공유적으로 결합된다. 추가의 실시태양에서, 키트는 AA와 같은 혈소판 활성화제를 추가로 포함한다.

[0049] 본 발명의 하나의 실시태양에서, AA를 함유하는 일회용 분석 시약은 3개월 이상 동안 실온에서 저장할 수 있도록 제공된다.

실시예

[0050] 실시예 1

[0051] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석을 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행하였다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 혈소판의 특이적 응집을 일으키는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약과 조합하여 분석 매질을 형성하였다. 화합물은 혈소판 수용체에 대한 항체 및 GPIIb/IIIa 수용체 리간드이다. 입자는 그에 혼입된 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 조합물을 응집 조건하에 두었다. 매질을 울테그라® 시스템을 사용하여 적외선 영역의 빛으로 조사하였다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하였으며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관련된다.

[0052] 실시예 2

[0053] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석을 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행하였다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 혈소판의 특이적 응집을 일으키는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약과 조합하여 분석 매질을 형성하였다. 화합물은 혈소판 수용체에 대한 항체 및 피브리노젠, 모노클로날 항체 10E5, 모노클로날 항체 c7E3, 폰 빌레브란트 인자, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 아르기닌 글리신-아스파르트산(RGD) 서열을 갖는 리간드, 및 상기 서열을 모방한 다른 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 선택된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드이다. 입자는 그에 혼입된 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 조합물을 응집 조건하에 두었다. 매질을 울테그라® 시스템을 사용하여 적외선 영역의 빛으로 조사하였다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하였으며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관련된다.

[0054] 실시예 3

[0055] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석을 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행하였다. 분석된 샘플의 양은 약 30 μ l 내지 5000 μ l까지, 또는 300 μ l까지 이었다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 혈소판의 특이적 응집을 일으키는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약과 조합하여 분석 매질을 형성하였다. 화합물은 혈소판 수용체에 대한 항체 및 GPIIb/IIIa 수용체 리간드이다. 입자는 그에 혼입된 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 조합물을 응집 조건하에 두었다. 매질을 울테그라® 시스템을 사용하여 적외선 영역의 빛으로 조사하였다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하였으며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관련된다.

[0056] 실시예 4

[0057] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석을 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행하였다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 혈소판의 특이적 응집을 일으키는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약과 조합하여 분석 매질을 형성하였다. 화합물은 혈소판 수용체에 대한 항체 및 GPIIb/IIIa 수용체 리간드이다. 입자는 그에 혼입된 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 완충액을 제공하였으며, pH는 약 2 내지 약 11이었다. 조합물을 응집 조건하에 두었다. 매질을 울테그라® 시스템을 사용하여 적외선 영역의 빛으로 조사하였다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하였으며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관련된다.

[0058] 실시예 5

[0059] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석을 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행하였다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 혈소판의 특이적 응집을 일으키는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약과 조합하여 분석 매질을 형성하였다. 화합물은 혈소판 수용체에 대한 항체 및 GPIIb/IIIa 수용체 리간드이다. 입자는 그에 혼입된 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 분석 매질의 부피는 약 25 내지 약 500 마이크로리터였다. 조합물을 응집 조건하에 두었다. 매질을 울테그라® 시스템을 사용하여 적외선 영역의 빛으로 조사하였다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하였으며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관련된다.

- [0060] 실시예 6
- [0061] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석을 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행하였다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 혈소판의 특이적 응집을 일으키는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약과 조합하여 분석 매질을 형성하였다. 화합물은 혈소판 수용체에 대한 항체 및 GPIIb/IIIa 수용체 리간드이다. 입자는 그에 혼입된 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 조합물을 응집 조건하에 두고, 25℃ 이상의 온도에서 인큐베이션하였다. 매질을 울테그라® 시스템을 사용하여 적외선 영역의 빛으로 조사하였다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하였으며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관련된다.
- [0062] 실시예 7
- [0063] 본 발명의 특정 실시태양에 있어서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석을 아스피린으로 치료중인 환자의 전혈로 수행하였다. 샘플을 적절한 용기, 예를 들어, 반응 큐벳 중에서 혈소판의 특이적 응집을 일으키는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약과 조합하여 분석 매질을 형성하였다. 화합물은 혈소판 수용체에 대한 항체 및 GPIIb/IIIa 수용체 리간드이다. 입자는 그에 혼입된 1종 이상의 적외선 염료를 갖는다. 조합물을 응집 조건하에 두고, 25℃ 이상의 온도에서 인큐베이션하였다. 매질을 울테그라® 시스템을 사용하여 적외선 영역의 빛으로 조사하였다. 분석 혼합물로부터 적외선의 투과율을 측정하였으며, 이때 투과 수준은 혈소판 기능 활성화와 관련된다. 입자의 응집을 샘플을 통과한 적외선의 투과율의 증가로서 검출하였다.
- [0064] 전술한 본 발명의 실시태양은 예시 및 서술할 목적으로 제시하였다. 이는 개시된 세부적인 형태로서 본 발명을 한정하거나 제한하려는 것이 아니다. 분명히, 당업자에게 수많은 수정 및 변경이 명백할 것이다. 본 발명의 범위는 하기 청구범위 및 그의 균등물에 의해 정의된다.