

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年1月12日(2006.1.12)

【公表番号】特表2005-512547(P2005-512547A)

【公表日】平成17年5月12日(2005.5.12)

【年通号数】公開・登録公報2005-018

【出願番号】特願2003-552997(P2003-552997)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/37 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/37

C 12 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成17年11月14日(2005.11.14)

【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】

下記工程：

a) デフィプロチド、プラスミンおよび、プラスミンとの反応によって測定可能な生成物を提供するところの、該プラスミンに特異的な基質を接触させる工程、および

b) 生成した生成物の量を経時的に測定する工程

を含む、デフィプロチドの生物学的活性を決定する方法。

【請求項2】

プラスミンが哺乳類プラスミンである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

プラスミンがヒトプラスミンである、請求項2記載の方法。

【請求項4】

プラスミンに特異的な基質が下記式の化合物：

A₁ - A₂ - A₃ - X

[式中、A₁およびA₂は非極性アミノ酸であり、A₃はリシンまたはアルギニンであり、Xは測定可能な生成物である。]である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】

測定可能な生成物Xがパラ-ニトロアニリンおよび2-ナフチルアミンから選択される、請求項4記載の方法。

【請求項6】

プラスミンのための基質がH-D-バリル-L-ロイシル-L-リシン-p-ニトロアニリンである、請求項4記載の方法。

【請求項7】

プラスミンが0.0064～0.050I.U./mlの濃度を有し、プラスミンのための基質が2.5～3.5mMの濃度を有する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

プラスミンの濃度が0.0125I.U./mlであり、プラスミンのための基質の濃

度が 3 mM である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

測定可能な生成物 X が分光測光法によって測定される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

反応媒体が、7 ~ 8 の pH に緩衝された水性溶液である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

反応媒体が、pH 7.4 に緩衝された水性溶液である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

系の温度が 35 ~ 39 で維持される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

系の温度が 37 で維持される、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

プラスミンのための基質の濃度が 0.3 ~ 4 mM である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

プラスミンのための基質の濃度が 2.5 ~ 3.5 mM である、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

プラスミンのための基質の濃度が 3 mM である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

下記段階：

a) 標品および試験用の両方のデフィブロチドのサンプルの各々について、酵素反応の間の測定可能な生成物 X の放出速度を決定する段階、

b) 上記放出速度を、対応するデフィブロチド濃度と、数学的および / またはグラフを用いて相關させる段階、および

c) デフィブロチドの試験サンプルの生物学的活性を得る段階

を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載のデフィブロチドの生物学的活性を決定する方法。

【請求項 18】

a) 測定された量の、プラスミンのための基質、および

b) 測定された量のプラスミン

を少なくとも含み、プラスミンに特異的な基質をプラスミン 1 単位当たり 20 ~ 30 mg 含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項記載のデフィブロチドの生物学的活性を決定する方法のためのキット。

【請求項 19】

プラスミンのための基質が H - D - V a l - L e u - L y s - p N A であり、プラスミンがヒトプラスミンである、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

プラスミンに特異的な基質をプラスミン 1 単位当たり 25 mg 含む、請求項 18 または 19 記載のキット。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項記載の方法に付されるとき、0.5、2.0 および 8.0 μ g / ml の濃度で夫々図 3、4 および 5 に示されるパラニトロアニリンの放出動力学を示すことを特徴とするデフィブロチド、ここで、上記放出動力学は下記実験条件下で決定される。

ヒトプラスミン濃度：0.0125 I.U. / ml；

基質：H - D - バリル - L - ロイシル - L - リシン - p - ニトロアニリン；

基質濃度：3 mM；

緩衝剤：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩、pH 7.4；

反応温度 : 37 ;

分光測光波長 : 405 nm

【請求項 22】

下記実験条件 :

ヒトプラスミン濃度 : 0.0125 I.U. / ml ;

基質 : H - D - バリル - L - ロイシル - L - リシン - p - ニトロアニリン ;

基質濃度 : 3 mM ;

緩衝剤 : トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩、pH 7.4 ;

反応温度 : 37 ;

分光測光波長 : 405 nm

の下で請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項記載の方法に付されるとき、下記式に従う、パラニトロアニリン(pNA)の放出動力学を生じることを特徴とするデフィブロチド。

pNA (μM / 分) = a + b log X

ここで、

a = 0.6908 ± 0.0291

b = 0.3140 ± 0.0437

X = デフィブロチドの濃度 (μg / ml)

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

従って、本発明は、デフィブロチドのサンプルの特異的生物学的活性を決定するための方法に関し、該方法は、下記工程：

a) デフィブロチド、プラスミンおよび、プラスミンとの反応によって測定可能な生成物を提供するところの、該プラスミンに特異的な基質を接触させる工程、および

b) 生成した生成物の量を経時的に測定する工程を含む。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

本発明の決定法は、他の酵素的方法と同様に、媒体の pH に対して感受性である。事実、酵素系が不活性化されるであろうところの極端な pH では一般に適用され得ない。また、測定が行われている間の任意の時に媒体の pH が変動を受けないことが好ましく、従って、溶液は一般に、プラスミン測定試験において一般に使用されるものから選択される緩衝剤系によって処理される。適する緩衝剤系は、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩(TRIS)緩衝液であり得る。操作は好ましくは、TRIS の存在下で行われる。本発明方法では、媒体の pH を約 7 ~ 8 の範囲、より好ましくは約 7.4 で維持することが通常好ましい。さらに、緩衝剤系の濃度を 10 ~ 200 mM の範囲、好ましくは約 50 mM で維持することが好ましい。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 5

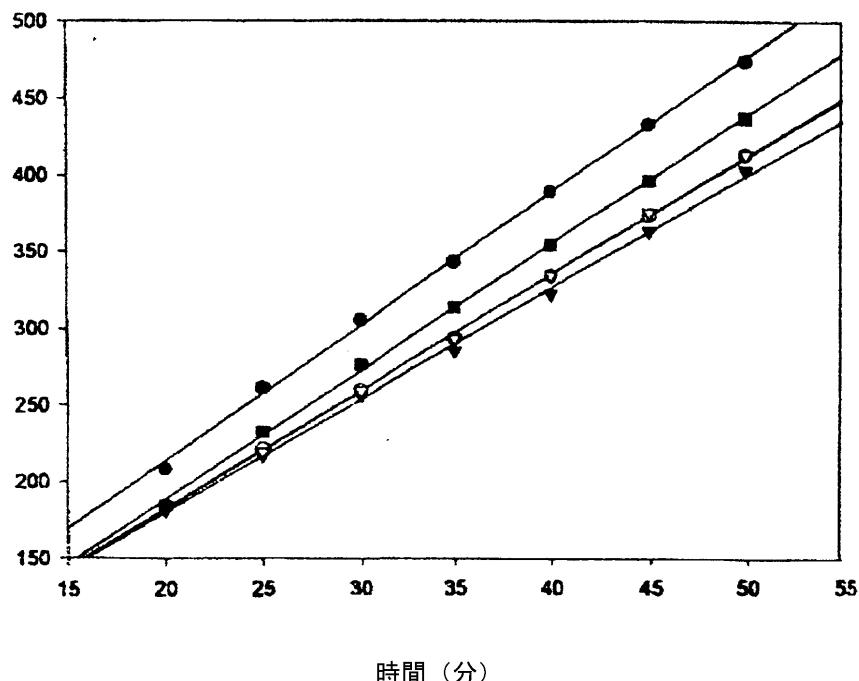
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図5】

図5

デフィブロチド（濃度 $8.0 \mu\text{g/ml}$, 5個の反復実験）の存在下でのプラスミンによる基質S-2251からのpNAの放出動力学

吸光度 $\times 1000$ (405 nm)

時間 (分)

表 3

	サンプル	a	b	r^2
●	1	38,21	8,76	0,9987
○	2	30,21	7,61	0,9995
▼	3	33,57	7,31	0,9983
▽	4	28,21	7,67	0,9994
■	5	21,89	8,32	0,9991