

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3881036号
(P3881036)

(45) 発行日 平成19年2月14日(2007.2.14)

(24) 登録日 平成18年11月17日(2006.11.17)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	L
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 D
GO 1 N 33/86	(2006.01)	GO 1 N 33/86	

請求項の数 16 (全 18 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平10-540869 (86) (22) 出願日 平成10年3月20日(1998.3.20) (65) 公表番号 特表2002-511925(P2002-511925A) (43) 公表日 平成14年4月16日(2002.4.16) (86) 国際出願番号 PCT/US1998/006044 (87) 国際公開番号 W01998/041868 (87) 国際公開日 平成10年9月24日(1998.9.24) 審査請求日 平成17年3月4日(2005.3.4) (31) 優先権主張番号 08/820,999 (32) 優先日 平成9年3月20日(1997.3.20) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 アクューメトリックス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国92121カリフォルニア州 サンディエゴ、ソレント・バレー・ブルバード3985番 (74) 代理人 弁理士 青山 稔 (74) 代理人 弁理士 岩崎 光隆 (74) 代理人 弁理士 中嶋 正二 (74) 代理人 弁理士 小島 一晃</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液の凝集計量アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

フィブリノーゲンに結合し、赤外光吸収染料を含む粒子を含有する凝集化システムを用いて、サンプル中の血小板結合機能を測定する方法であって、
 血小板を含有する血液サンプルと、該凝集化システムとを組合せて、アッセイ混合物を形成すること；

該アッセイ混合物を、該染料によって吸収されることが知られている選択された赤外領域の波長を有する光により照射すること、ここで該波長の赤外光レベルは、該アッセイ混合物を通して透過される；そして

該アッセイ混合物を通った該波長の赤外光の透過レベルを決定すること、ここで、透過レベルまたは時間と共に透過レベルにおける変化が、フィブリノーゲンと結合する該粒子に対するサンプル中の該血小板の結合機能の指標である；

からなる、方法。

【請求項2】

血液サンプルがアッセイ混合物中で5倍以下に希釈される、請求項1の方法。

【請求項3】

波長が750 - 900 nmである、請求項2の方法。

【請求項4】

粒子の直径が1から10 μmの範囲にある、請求項1の方法。

【請求項5】

10

20

粒子の直径が0.1から50μの範囲にある、請求項1の方法。

【請求項6】

粒子が、アミノ酸配列RGDまたはKGDを含有するタンパク質またはペプチドで被覆されている、請求項5の方法。

【請求項7】

タンパク質がフィブリノーゲンまたはフォンヴィルブランド因子である、請求項6記載の方法。

【請求項8】

粒子が炭素粒子である、請求項1記載の方法。

【請求項9】

粒子が少なくとも1種の赤外吸収染料を含む、請求項1記載の方法。

【請求項10】

凝集化システムが血小板活性化化合物を含む、請求項1記載の方法。

【請求項11】

トロンピンを含有する血液サンプルがアミノ酸配列Gly-Pro-Arg-Proを有するオリゴペプチドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項12】

請求項1記載の方法に使用するための、

0.1から50μの範囲のサイズであり、赤外光吸収染料を含み、フィブリノーゲンと結合する粒子；および

少なくとも1種の追加の構成成分を含むキットであり、該構成成分が、

少なくとも1種のGP1Ib/IIIa阻害剤に対する抗体、血小板アクチベーター、

凝血を阻害する量の抗凝血剤を含有するヴァキュエイナー（登録商標）、

トロンピンと、サイズが0.1から50μの範囲であり、赤外光吸収染料を含む粒子との混合物、および/または、

混合内容を有するアッセイ混合物ホルダー、である、キット。

【請求項13】

結合成分がフィブリノーゲン、またはアミノ酸配列RGDまたはKGDを含有するペプチドである、請求項12記載のキット。

【請求項14】

粒子が炭素粒子である、請求項12記載のキット。

【請求項15】

血小板アクチベーターがTRAP、イソ-TRAP、ADP、コラーゲン、アラキドン酸およびリステチンからなる群より選ばれる、請求項12記載のキット。

【請求項16】

抗凝固剤がクエン酸塩である、請求項12記載のキット。

【発明の詳細な説明】

背景

人体の健康状態、薬剤の用量レベル、違法な薬剤の使用、遺伝子配列などを知るために、医療産業が生理体液中の種々の内容物を測定する技術に依存することが多くなっている。生理体液サンプルを採取し、特定の成分の存在について迅速に分析する能力が、医療行為を益々効率的にし、よい結果を増加せしめている。

多くの場合、全血を一つの源として用い、患者の健康を診断したり、患者に投与した薬剤の効力を監視したりしようとする。しかし、これらのパラメーターを測定するための源として、血液には多くの欠点がある。血液を直接用いたとき、あるいは緩衝液で希釈して用いたときの欠点は、血液がすぐに凝固すること、血液が多くの光吸収物質および蛍光物質を含有していること、血液の組成が多様性を示すこと、血液の性質がアッセイに用いた試

10

20

30

40

50

薬によって変化すること、血液が酸素の存在の有無で多様性を示すことである。これらの性質は診断を目的とする場合にサンプルとしての血液の使用を複雑にするので、問題を軽減あるいは無くするために種々の技術が用いられて来た。例えば、高度の希釈、抗凝固剤の添加、血漿と細胞成分への血液の分離などである。しかし、このような操作の間、診断アッセイに影響を及ぼしかねない赤血球分解あるいはヘモグロビン放出を回避するために、大きい注意をなさねばならない。サンプル培地として血液の使用には問題があるにもかかわらず、多くの場合、血液は興味深い情報を提供する唯一の源である。従って、構成成分による影響を軽減して、全血を用いて調べる方法は非常に望ましいものである。

従って、診断目的に血液を用い、扱うための新しい方法を考案することは実質的な利益がある。特に興味深い一つの分野は、血小板機能を判定するための血液の利用である。哺乳動物の生理における血小板の役割は驚くべきほど多様であるが、第一の役割は血栓形成の促進である。多くの状況において、血液の凝血能を検査することが望まれる。この凝血能は、血小板の接着および/または凝集する能力によって頻繁に調節されるパラメーターである。それで血小板の接着機能を判定しようとする。例えば、投与薬剤が凝血形成を阻害するのか、促進するのかを知りたいわけであるし、また外科処置の前に血小板機能の欠損を調べる必要がある。他の例として、血小板阻害剤を新薬として試験したり、あるいは患者の臨床処置に用いて評価するのに大きい関心がある。

従って、上記のことを行うために、新しい診断アッセイは非常に価値のあるものとなる。

関連文献

米国特許第5,455,228およびPCT出願W096/10749には、それぞれペプチド抵抗性リガンドおよび血小板遮断アッセイについて記載されている。さらに参照：Coller, B.S.の心臓血管の血栓症および血栓崩壊における血小板：Fozzard et al., eds. *The Heart and Cardiovascular System*, 2nd ed., New York, NY: Raven Press; 1992:219-273。赤外吸収染料について、参照Fabian et al., *Chem. Rev.* 92:1196-1226(1992)。

血小板および/または血小板機能の測定を教示している他の技術には次のものがある。PCT出願W094/12664、W094/22018、W092/08982、W089/00200、米国特許5,427,913、5,306,632、5,523,238、5,266,462、5,246,832、5,114,842およびEPA 0 165 68。興味深い文献として、Beerらの血小板糖タンパク質IIb/IIIa受容体の構造プローブとして種々の長さの免疫化Arg-Gly-Asp(RGD)ペプチド、*Blood* 79:117-128(1992)；Collerらのコラーゲン-血小板相互作用：コラーゲンと血小板GPIIb/IIIaとの直接作用および接着タンパク質により調節された血小板GPIIb-IIIaとの間接作用の証明、*Blood* 74:182-192(1989)；Collerらの接着血小板のルミナル表面に対する活性GPIIb-IIIa受容体の研究、*J. Clin Invest.* 92:2796-2806(1993)；およびPfuellerらのヒト血小板と粒子との相互作用における血漿タンパク質の役割、*Thrombosis Research* 12:979-990(1978)。

発明の概要

赤外部で光を吸収する粒子を用いた凝集計量アッセイについて記載する。粒子の凝集がサンプル培地の赤外吸収の変化により検出される。このアッセイは、対象の成分の存在や機能を測定するのに、また、成分の量を測定するのに用いることができる。方法の実施では、血漿よりもむしろ全血または少し希釈した血液が用いられる。方法は、粒子試薬、適量追加の試薬およびサンプルを混合し、培地の赤外線吸収の変化を測定することを含む。定量的ために結果をコントロールと比較する。

【図面の簡単な説明】

図1は、可視部または赤外部で光を吸収する粒子についての起点速度に対する血液の酸素化効果を表すグラフである。血液の酸素化はヘモグロビン吸収状態を変え、この吸収変化は可視部での血液の吸収を変えることになるので、アッセイに顕著な影響がある。血液のブルー・ビード酸素化は凝集反応速度を非常に増加する。他方、IR域の光を吸収する粒子を用いると、血液の酸素化は効果がない。従って、観測される速度は血液の酸素化と無関係である。

図2は、Searle化合物54701Bについて迅速血小板機能アッセイ(RPFA)の結果

10

20

30

40

50

を示すグラフである。R P F Aを実施し、実験の部に記載した最大能を測定した。6人の別個のドナーからの平均および個々の結果を本図および次図に示す。

図3は、20 μ MのADPアゴニストを用いてSearle化合物54701Bについて光学血小板凝集アッセイの結果を示すグラフである。光学血小板凝集は実験の部に記載のように行った。示した結果は、最大勾配データ(凝集変化%/分)であり、規準化した値でない。

図4は、市販の系を用いて得た血小板凝集(血小板凝集計量法)結果をR P F Aで得た血小板能に対してプロットして比較したグラフである。2種のパネルが示され、夫々、異なるセットの染料粒子で実施したR P F Aを表す。上のパネルでは、粒子はIR部で吸収する。下のパネルでは、粒子は可視部で吸収する。上のグラフのデータは、6人について3日間の用量反応曲線から得られた平均値と標準誤差を表す。相関係数は0.99であり、偏りは最小である(0.4%)。下のグラフのデータは、ブルー染料で染めたビードを用いて同様に行った実験から得られたものである。相関係数は0.94であり、有意の偏り(10.7%)が存在する。

図5は、G P I I b / I I I a 阻害化合物であるSearle化合物54701BおよびSearle化合物57101Aについて、これらの化合物に対するウサギ抗血清による中和を示す。示した結果は規準化勾配データ(薬物も抗血清も加えないときの起点に対する%)である。

図6は、血液サンプルのゲル濾過によるG P I I b / I I I a 阻害の逆転を、G P I I b / I I I a 阻害剤での処置について示すグラフである。示したグラフは規準化勾配データ(非処置血液サンプルの起点速度に対する%)である。X軸のリガンドは、1:非処置血液、2:ゲル濾過後の非処置血液、3:100 nMのSearle化合物54701Bでの処置血液、4:ゲル濾過後の100 nMのSearle化合物54701Bでの処置血液、5:500 nMのSearle化合物57101Bでの処置血液、6:ゲル濾過後の500 nMのSearle化合物57101Bでの処置血液。

図7は、トロンピン誘発凝集反应用量対応曲線を示すグラフである。光散乱培地(10 mMのH E P E S、150 mMのN a C l、2 mg/mlのB S A、0.05%のT w e e n 2 0 中の0.5 μ mポリスチレン中心体の1%固体懸濁液、全血の光散乱性に擬態する)中の既知濃度のトロンピンを含有する混合物の160 μ lアリコットをイソ-T R A Pおよび微粒子を含有するプラスチック製クベットに加えた。機械的混合サイクルを1分間行い、光学読みとりを1秒間に16の速度で調べた。ミクロ凝集反応を一定の間隔で溶液の光学密度変化の速度によって測定した。アッセイにおけるトロンピン濃度に対するmV/秒でのトロンピン誘発凝集反応の勾配として表す。

図8は、G l y - P r o - A r g - P r o (G P R P) ペプチドによるI Rビードのトロンピン誘発凝集反応の阻害を表す。

具体的な実施態様の説明

本発明によれば、サンプルの特性は、赤外部で光を吸収する粒子とサンプルとを組合せると、粒子の凝集速度および/または凝集度合いがそのサンプルの特性によって変わることから測定される。通常、サンプルの特性は、対象となる成分の存在や量に関連する。他の状況では、その特性が、ある事象、例えば、凝血に対する効果についてサンプル活性と関連することもある。アッセイの成分やプロトコルの性質にもよるが、他の試薬が存在していてもよい。凝集が起こるのに十分な時間が経過後、アッセイ混合物に赤外光を照射し、吸収変化を測定する。得られた値をサンプル中の成分量の定量測定用標準と比較する。この方法は、順応性があり、サンプル中の成分の存在、サンプルの特性、更には、サンプル中の幾つかの成分の二次(penultimate)凝集反応に対する複合効果を含む幾つかのパラメーターを評価するのに使用できる。しかしながら、本説明では、あくまでも説明の目的で、サンプルの特性よりもむしろ対象となる成分やその機能的活性について言及する。本方法ではいかなるサンプルでも使用できる。特に、赤外以外の波長で分光光度測定を干渉し得る内容物を含有するサンプルの場合に有利である。このサンプルは、あらゆる生理体液、環境液、加工液、排出液または流入液であり得る。本方法は、生理体液、より具体的には、全血または血漿で直ちに応用される。本方法を用いることにより、血漿の調製に

10

20

30

40

50

必要な手間は少なくなる。放出されるヘモグロビンや他の金属または非金属ポリフィリンは赤外部で吸収が低下するので、本方法においてその干渉が低減されるからである。

本方法に使用できる具体的なサンプルには、指摘したように、血液、血漿、脳髄液、唾液、尿などがあり、さらに具体的には、約300nmから約700nmの範囲で光を吸収または放射する干渉物質を含むようなサンプルがある。それ故に、本方法は、特に、赤外光を採用することによって全血で使用でき、この場合、サンプルから発せられるシグナルは、サンプルの酸素化変化から生じる吸収の変化にはさほど影響されない。

本方法に採用したサンプルは、サンプルの性質にもよるが、前処置することもできる。一般に、サンプルは、大した操作を行わずとも使用できるが、希釈や、濃縮、抽出、クロマトグラフィー、電気泳動などにかけてもよい。サンプル操作は最少であることが望ましい。本発明では、全血を使用でき、これを約10倍以下、通常、約5倍以下に希釈し、好ましくは約1倍以下、より好ましくは0.5倍以下に希釈する。血液は、一般に、様々な抗凝固剤を用いて凝血を防ぐよう処理される。ここで使用できる抗凝固剤には、クエン酸塩、ヘパリン、トロンピン阻害剤、例えば、ヒルジン、ヒルログ、p-バック、アルガトロバンなどがある。便宜上、クエン酸塩が全血サンプル容量に対して少量使用される。一般に約25%v/v以下、普通は約10%v/v以下であり、約1%v/v以下の使用でもよい。しかしながら、このシステム中の1種以上の成分がクエン酸感受性である場合、ヘパリンまたは1種以上の直接トロンピン阻害剤を使用するのが適切である。

粒子の凝集を阻害または増強するのに役立つ成分ならどれでも採用できる。よって、対象となる化合物は、直接的または間接的に、粒子表面の化合物と相互作用して凝集を増強または阻害するような化合物であることができ、対象となる化合物が直接的または間接的に凝集を増強または阻害するのに役立つ試薬と反応することを間接的に意図している。間接反応の場合、酵素阻害剤が考えられる。例えば、トロンピン阻害剤は、トロンピンと反応して、トロンピンとフィブリノーゲンとの反応を阻害するものである。粒子をフィブリノーゲンで被覆する場合、阻害剤は、粒子上でのトロンピンとフィブリノーゲンの反応度合いを下げることによって凝集量を下げる。フィブリノーゲンのフィブリンへの変換に最終的に影響を与える他の血液因子の阻害剤なら、間接法において同様に働くであろう。

このように、対象となる化合物は、一般に約100~5000Da、より普通には約100~2000Daの低分子であり、例えば、合成薬、殺生物剤、例えば、農薬、除草剤等、抗生物質、天然リガンドまたは天然化合物のフラグメント、アミノ酸、糖類、脂質、ヌクレオシドおよびヌクレオチド、およびそれらのオリゴマー、特にオリゴペプチド、オリゴ糖類またはトリゴヌクレオチドおよびその組合せである。

対象化合物の例には、濫用される薬剤、例えば、テトラヒドロカンナビノール、モルヒネ、ヘロイン、コカインおよびメタンフェタミン、バルビツール酸塩、精神安定薬および抗鬱薬、例えば、リブリウム、ジアゼパンおよびトリサイクリック、ジフェニルヒダントイン、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリンおよびFK506、心血管薬、例えば、ジギトニン、ニトログリセリン等、凝血阻害剤、例えば、ワルファリン、ヘパリン、低分子量ヘパリン、凝集アクチベーター、例えば、TRAPまたはイソ-TRAP、これは、例えば外科手術中の血小板損失の測定や投与前の血小板バックのスクリーニングに有用である、鎮痛薬、麻酔薬、抗高血圧薬、例えば、レニン阻害剤、脂質A、毒素、RGDおよびKGDベースのペプチドおよびペプチド模擬体などの化合物を含むIIb-IIIaアンタゴニスト、これらの化合物の1サブセット、例えば、Searle化合物54701、Searle化合物57101、Reopro(Centacor)、インテグリン(Cor)、Roche Ro440-3888、Hoechst S1197、Merck L-738,167、TAK 029(Tap Holdings)、Boehringer Ingelheim BIBU 52ZW、アスピリン感受性の測定や監視、高濃度での例えば、外科手術中の血小板損失の測定や投与前の血小板バックのスクリーニングに有用なADP、コラーゲン、アラキドン酸、その他がある。

対象の化合物は、分子量が少なくとも約5kD、より普通には少なくとも10kD、一般には約1ミリオンkD以下、より普通には約600,000kD以下の高分子化合物であってもよい。これらの化合物には、様々な天然または合成ポリマーが含まれ、例えば、ポ

10

20

30

40

50

リペプチド、核酸、多糖類、リグニン、ポリ脂質、複合体、例えば、ムコ多糖類、糖タンパク質、スルホン化多糖類、リボ多糖類などがある。

高分子化合物の例には、インスリン、血液因子、例えば、因子V、VI、VII、VIIIc、VIIIvw、IX、X、XIおよびXII、可溶性組織適合性抗原、例えば、sHLA、 α -アミロイド、HIV gp120およびp41、CD3、CD28、B7、グルタミン酸、デヒドロゲナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、コロニー刺激因子：G、MおよびGM、ペルフォリン、補体タンパク質、細菌および真菌タンパク質、原生生物タンパク質、ウイルスタンパク質などがある。

最後に、対象の化合物は、1種以上の異なるカテゴリーの化合物の組合せであってもよく、例えば、ウイルス、ミトコンドリアなどの細胞小器官、原核生物および真核生物、例えば、細菌、真菌、原生生物、クラミジア、哺乳動物細胞、たとえば、血小板、癌細胞、例えば、白血病やリンパ腫などである。対象となるウイルスには、HIV、HTLV、パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、アデノウイルス、ライノウイルスなどがある。

本方法に採用される粒子は、一般に約50 μ 以下、より普通には約25 μ 以下、普通は少なくとも約0.1 μ 、好ましくは約1~10 μ 、より好ましくは約2~8 μ である。粒子の組成は、適当な組成でよく、例えば、バイオガラス、合成有機ポリマー、例えば、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、炭素ベース、これらの組合せ、またはその類似物、あるいは、それ自身が赤外部で光を吸収するかまたは赤外線吸収色素で光を吸収できる別の素材である。バイオガラスベースや有機ポリマーベースの粒子の場合、赤外線吸収色素を含まない粒子組成物は、対象の赤外部で広範囲にわたって有意に吸収しないと考えられ、普通、赤外線吸収色素を加えた粒子と比べ、その領域で、総吸収光の約25%以下の吸収である。また、粒子組成が実質的に透過性となる可視領域に多くの領域がある。普通、少なくとも50重量%、好ましくは少なくとも約75重量%が、指定範囲内のサイズまたは直径である。

特に好ましい実施態様では、採用した粒子は、上記指定サイズ範囲内の多孔性または非多孔性のいずれかである炭素粒子である。使用できる炭素粒子は、球状または非球状、好ましくは球状であり、一般に、赤外線吸収色素を加えなくとも赤外部の広範囲にわたって光を吸収する。上記の粒子と同様、炭素粒子は様々な方法で修飾でき、そうして様々なシステム成分、例えば、タンパク質をその粒子に共有または非共有結合させることが可能である。ここで使用できる炭素粒子は、当分野で知られた方法により調製してもよく、また市販のもの(Sigma Aldrich Supelco, Bellefonte, PA)を入手してもよい。その他の実施態様では、粒子は炭素粒子ではない。

ここで使用できる粒子は、様々な方法で修飾できる。粒子は、化学的に活性であるかまたは粒子表面に官能基を与えることにより化学的に活性化でき、また、粒子の凝集に採用および/または必要とされるならば、実質的に不可逆的に(処理およびアッセイ条件下で)赤外線吸収色素に結合するのに役立つ化合物、例えばタンパク質で被覆できる。この被覆化合物は、粒子の凝集に必要な結合成分、または他の化合物、普通はタンパク質であり得る。粒子表面を対象化合物で被覆するために、粒子自身が化学的反応性の官能基をその表面に持っているかまたは容易に化学的反応性の官能基へと変換できる部位を持つ場合、それらの化学的反応性部位を介して、共有結合によりその化合物を粒子表面に直接共有結合させてもよい(例えば、米国特許第5,503,933、Afeyan等、参照)。化合物を共有結合させることにより化学的反応性部位を提供する官能性化または官能性化可能なラテックス組成物で粒子表面を被覆することもできる。ラテックス組成物を調製し、粒子表面にかかる組成物で被覆する方法は、当分野でよく知られている(例えば、米国特許第5,324,752参照)。あるいは、粒子の性質にもよるが、これらの粒子は、化学的活性基を持っていないものでもよく、また持たせてもよいが、むしろ能動吸着により化合物を非共有結合させるのもであってよい。更に、粒子形成条件下、例えば押出成形で安定な赤外線吸収色素を粒子形成前にポリマーと混合させると、粒子全体にわたって色素の分布した粒子が形成される。

10

20

30

40

50

結合成分は、粒子凝集用の粒子表面に結合させることができる。粒子凝集は、別の粒子上での、または培地中の作用物質による、結合成分と同一または異なる成分との相互作用の結果であり、この作用物質とは、対象化合物、特異的結合対の構成成分、または触媒物質、例えば酵素などであって、結合成分と相互作用して、通常は反応して結合成分を改変し、凝集を引き起こすようなものであり得る。特異的結合対は、通常、結合成分および対象化合物、結合成分に結合する対象化合物と競合する試薬、または対象化合物に結合する試薬からなる。これらの例には、例えば、(1) 抗原と、結合成分としての抗原に結合する抗体、(2) 結合成分としての Fab に結合する対象化合物の二量体、および(3) フィブリノーゲンおよびトロンピンがある。粒子表面に結合させた結合成分は、採用した対象化合物やプロトコールによるが、その性質に関して広範囲に変化する。

10

結合成分は、前述した低分子、またはより高い分子量の分子、更にある場合には、ウイルスまたは細胞フラグメントまたは無傷ウイルスまたは細胞などの複合体であることができる。前記の化合物はいずれも結合成分として働く。凝集用に特異的結合対を採用する1つのアッセイグループでは、対象の天然または合成の成分に結合させる目的で、天然受容体などの特異的受容体、例えば、酵素、レシチン、膜表面タンパク質等、または抗体、血清またはモノクローナル抗体のいずれかを採用できる。その他のアッセイでは、様々なタンパク質に結合できる天然の特異的結合対の1構成成分、例えば、フィブリン(アッセイ培地中でフィブリノーゲンから調製)を採用してもよい。続いて、フィブリノーゲンと血小板タンパク質 GPIIb/IIIa との併用について詳細に説明する。その他の実施態様では、結合成分は、アミノ酸配列 RGD または KGD からなる多数の異なるオリゴヌクレオチド、またはそのペプチド模擬体であり、GPIIb/IIIa 受容体またはフォンビルブランド因子または特異的受容体分子が結合可能なそのフラグメントへの結合に対する特異性を持つものである。様々なインテグリンが様々な接着性タンパク質と併用でき、逆もまたおなじである。抗体をアッセイすることもでき、その場合、粒子に結合させた抗体に結合するエピトープを持つ。このエピトープは、合成有機分子またはオリゴペプチドなどの低分子として存在するか、または培地中の1種以上の抗体が抗原の様々なエピトープに結合するようなポリエピトープ性分子であり得る。対象となる成分がモノエピトープ性である場合、試薬としてモノエピトープ性化合物の二量体またはより高次のものを採用でき、これらの試薬は架橋の役目を果たすものである。抗イディオタイプ抗体も使用できる。核酸に関係する場合、対象となる化合物上の異なる部位に結合する粒子に結合させたオリゴヌクレオチドを用意すればよい。あるいは、対象の核酸化合物と競合できる試薬として同じ配列の繰返しを持つ鎖を調製し、粒子を架橋させることもできる。また、前述のように、天然特異的結合対、例えば、CD4 と gp120、P-セレクトインと L-セレクトインおよびそれらの相関ホーミング受容体、CD3 と MHC、インテグリン接着受容体とその接着性リガンド、成長受容体と成長因子、サイトカインとその細胞表面受容体の組合せを使用してもよい。

20

30

本発明の更に別の実施態様では、アッセイ前に粒子表面を結合成分で特異的に被覆せずに、むしろそれに接触させておいた血液サンプル中に存在するフィブリノーゲンを自然に粒子表面に吸着させて、結合成分を提供することもできる。

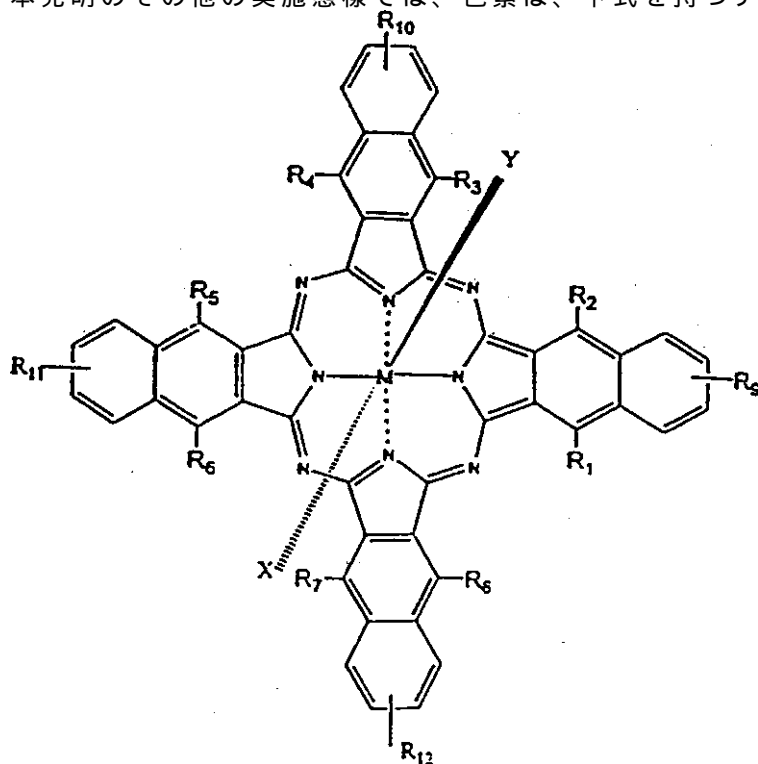
吸収色素の使用が望まれるならば、赤外部で吸収する色素を粒子に充填する。ここで使用できる色素は、好ましくは、800 nm 辺りで吸収能を示すものであり、高い吸収係数を持ち、および/または広い吸収スペクトルを示す。これらの特性を持つ様々な色素が報告されている。例えば、Fabian et al., Chem. Rev. 92:1197-1226 (1992) 参照。これらの色素には、例えば、バクテリオクロリン、バクテリオクロロフィチン、メロポリメチン色素、ベンゾアニユレン、ピニロガスポリフィリン、ポリメチン色素、シアニンおよびメロシアニン、その他がある。特定の色素は、便利さ、有用性、安定性、粒子との融和性などから選択する。対象となる具体的な色素には、フタロシアニン、ナフタロシアニン、金属化ナフタロシアニン色素および修飾天然バクテロクロリンといった種類の色素がある。ここで使用できる具体的な色素の例には、IR-132、IR-140、1,1'-ジエチル-4,4'-ジカルボシアニンヨージド、1,1'-ジエチル-2,2'-キノトリカルボシアニンヨー

40

50

ジド、バナジル 3,10,17,24-テトラ-tert-ブチル-1,8,15,22-テトラキス(ジメチルアミノ)-2,9H,3,1H-フタロシアニン、I R A 8 0 0 (Exciton社製)、ProJet 8 3 0 N P (Zeneca社製)、2,3-ジシアノ-4-[4-(ジメチルアミノ)フェニルイミノ]-1,4-ナフトキノン、9-[4-(ジメチルアミノ)フェニルエチニル]-チオキサントニリウムペルクロレート、2-[4-(4-ジメチルアミノフェニル)-1,3-ブタジエニル]-4-フェニル-1-ベンゾチオピリウムペルクロレート、2-[2-[2-クロロ-3-[2-(1,3-ジヒドロ-1,3,3-トリメチル-2H-インドル-2-イリデン)エチリデン]1-シクロヘキセン-1-イル]エテニル]-1,3,3-トリメチル-3H-インドリウムペルクロレート、N-[4-[5-(4-ジメチルアミノフェニル)-3-フェニル-2-ペンテン-4-イン-1-イリデン]-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン]-N,N-ジメチルアンモニウムペルクロレート、N,N-ジエチル-N-[4-[1,5,5-トリス(4-ジエチルアミノフェニル)-2,4-ペンタジエニリデン]-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン]アンモニウムペルクロレート、1-エチル-4-[5-(1-エチル-4(1H)-キノリニリデン)-1,3-ペンタジエニル]キノリニウムヨージドおよび1-エチル-4-[3-クロロ-5-9]-エチル-4(1H)-キノリニウムヨージドがある。これらの色素は、重合により粒子自身に直接取り込ませたり、粒子表面への直接共有結合または粒子表面上でのラテックス沈積または能動吸着のいずれかにより、粒子に共有結合させることができる。あるいは、色素を結合成分と組合せてビーズに連結させ、それらが表面から溶脱しないようにすることもできる。ここで使用できる色素は、所望により、色素の1以上のメチルおよび/またはエチル基を、20以上の炭素原子を含むアルキル鎖、多くの場合100以上の炭素原子を含むアルキル鎖で置換することにより、ラテックスへの組込みに備えてより疎水性にすることができ、これらの置換基は、色素の赤外線吸収プロフィールに大した逆影響を及ぼさないと予想されるものである。

本発明のその他の実施態様では、色素は、下式を持つナフトロシアニンであり得る：



式中

Mは、Si、Al、Sn、Ge、VおよびTiからなる群から選択され；

R₁ないしR₁₂は、水素、1から20の炭素原子を持つアルキルおよびアルコキシからなる群から選択され、

XおよびYは、同一かまたは異なり、一方または両方が無いこともあり、OR、OArおよびOs i (R)₃からなる群から選択され、Rは、R₁ないしR₂₀の定義を持つ。

好ましくは、MがAlのとき、Yは単独でMに結合すべきであり、Xは無く、Rは直接ま

10

20

30

40

50

たはヘテロ原子を介して結合した1から20の炭素原子を持つアルキルまたはアルコキシ基である。XとYは、色素の溶解性を向上しつつ芳香族環系の積み重ねを低減する役目を果たす。R₁ないしR_{1,2}は、直接または他のヘテロ原子を介して結合でき、全体または一部だけに存在できる。

色素は、約750～900nm、特に約750～850nmの範囲の光を吸収する。高レベルの赤血球を含むサンプルの場合、光は約800nm±10nmであり、これは、酸素ヘモグロビンおよび還元ヘモグロビンの等吸収点である。粒子と共に用いられる色素の量は、対象光範囲での色素の消光係数、必要なアッセイ感度、粒子サイズ、粒子に対する色素の結合様式、粒子マトリクスと粒子との融和性などで変わる。普通は1ないし20重量パーセント、より普通には5ないし15重量%の範囲である。

10

既に示唆したように、他の試薬が存在してもよい。特に、モノエピトープ性化合物が対象の化合物である場合である。モノエピトープ性化合物では、特異的結合対が架橋に関与しており、架橋させるには、少なくともかかる成分の二量体またはその模擬類似体が必要である。普通、その試薬は、多くて約5つの架橋エピトープを持つ。このポリエピトープ性試薬では、対象となる化合物不在で凝集が起こる。対象化合物の量を増やせば、凝集量と凝集速度は低下する。あるいは、結合成分および対象化合物と交差反応する多重結合受容体を使用してもよい。対象化合物は、受容体の結合部位をふさいで架橋を妨げ、再度、凝集量と凝集速度を低下させる。こうして、モノエピトープ性化合物を検出できる。

天然であろうと合成であろうと、触媒、特に、結合成分を活性化して凝集を引き起こすことができる酵素、例えば、トロンビンおよびフィブリノーゲン、カゼインまたはフィブロン

20

ネクチンおよびトランスアミダーゼ等を活性化または阻害する化合物をアッセイすることもできる。存在してもよい他の試薬には、対象となる化合物を修飾できる物質がある。例えば、特定の細胞機能を活性化したり、特定の膜表面タンパク質の発現をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションしたり、粒子上で結合成分に対して対象の化合物と競合したり、競合物質に関連する偽陽性を回避するため粒子上に存在する結合成分への結合に関して対象化合物と競合する物質、例えば対立遺伝子、アイソタイプ等によって結合を遮断したりする等の修飾である。この追加試薬は、対象化合物の性質、アッセイプロトコールなどに応じて選択される。

それぞれの場合で、他の試薬の量は経験的に決められる。対象のモノエピトープ性化合物と競合させるためにポリエピトープ性試薬を使用するならば、その試薬として、対象の変動範囲にわたって最高感度を与えるようなものを選択する。これは、化学量論的量より少なくすることも多くすることもでき、容易に決定できる。試薬の濃度は対象化合物の最低予想濃度から最高予想濃度まで変わり得る。1または2つの中間点を選択して、これらの中間点での最大感度を決定してもよい。結果をグラフ化することにより、変動範囲にわたって最も高感度の結果をもたらす試薬濃度を決定できる。変動範囲の高部よりも低部において、より高い反応が必要とされる。

30

本方法を実施する際、サンプル、これは前処理しておいてもよい、を必要な試薬と穏やかに攪拌しながら合わせる。サンプルの様々な常用調製法を採用できる。サンプルの性質によるが、サンプルを空気から保護したり、または空気と接触させてもよい。空気からの保護は、密閉容器を用いれば実現でき、容器を隔膜で閉鎖し、隔膜を介して針でサンプルを導入し、受容器から空気を抜くか、または不活性ガスを封入する。所望により、室内の水分情報を得るために湿度インジケータを密閉容器内に設けてもよい(例えば、米国特許第4,793,180参照)。このようなインジケータも、Humidial Corp. Colton, CAから市販されている。

40

適宜、比較的多量または少量のサンプルを採取し、ほんの少しずつアッセイに使用する。アッセイ容量は、約5μlから500μl、普通は約25μlから250μl、好ましくは約25μlから150μlである。

粒子が迅速にサンプル中に分散するような条件下で、サンプルを粒子や他の試薬と合わせる。粒子および他の試薬は、乾燥組成物として存在するか、または少量の液体で分散させ

50

ることができる。普通、粒子や試薬の容量は、多くてもサンプル容量とほぼ等しく、好ましくはサンプル容量の約50%以下、より好ましくはサンプル容量の約25%以下である。

読取りは、有意な凝集の起こっていない値である0値を得るために、時間0か、または適宜間隔をあけて行う。次いで、経時的に読取りを行う。自動器械を用いて、サンプルと粒子や他の試薬とを混合し、アッセイ混合物を所望の温度まで加熱し、アッセイ中に必要な操作を行って、最初の読取りのためにアッセイ混合物を監視することができ、例えば、サンプルが所望温度に達したら適宜、読取りを行い、次いでサンプルについてのアッセイ結果をサンプルに関連する他の説明情報と共に算出できる。

培地中の粒子濃度は、対象化合物の性質、対象化合物の変動範囲、サンプル培地の性質などに従い最適化する。粒子量は経験的に決められる。一般に、凝集培地吸収係数は、サンプルの吸収係数の少なくとも2倍、好ましくは少なくとも3倍、より好ましくは約4倍であるべきであって、10倍以上であってもよい。赤外部の実質的なバックグラウンドの不在下では、有効比率はない。

混合時間は、広範囲に変えることができ、普通、少なくとも1秒、多くても約5分であり、普通は多くても約2分、好ましくは約5秒から1分である。特定の攪拌法は、本発明にとって重要でなく、凝集形成を妨げることなく混合できればよい。所望ならば、アッセイ中、穏やかな攪拌状態を維持し、凝集が妨げられないことを保証しながら、粒子および他の粒状物が均一に分布している状態を確保する。

アッセイ温度は、対象となる化合物の性質に応じて、広範囲に変えることができる。便宜上、周辺温度を採用するが、制御かつ維持できる高めの温度が好ましい。核酸を含む場合は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー度を高めるために、温度を上げててもよい。そのため、温度は、約15~90で変わり、核酸以外の場合、温度は一般に約25~40で変わる。普通、核酸の場合、温度は、一般に約20~90の範囲であり、より普通には約30~85の範囲である。

核酸の場合、ストリンジェンシーは、塩、有機溶媒などを用いて実現できる。しかしながら、核酸以外の場合は、普通は添加物があったとしても緩衝液のみであり、緩衝液は、pHが約5~10、普通には約6~9の範囲、濃度が約10~500mM、普通には約25~250mMである。

アッセイ時間は、測定の方法によって変わる。ゼロ時間が注意深く制御される場合、異なる時間間隔で1または2種の測定を行い、その時間間隔で絶対赤外線透過を測定するか、または凝集形成速度を測定できる。あるいは、アッセイ時間経過に合わせて複数の測定を行い、混合時間から固定時間で始まる勾配を分析してもよい。そのデータは常法で分析でき、特に、キャリブレーターおよび/またはコントロールに関してデータを操作できるアルゴリズムを用いる。ゼロ時間(混合時間)から始まる読取り総時間は、約10秒から5分、普通には約30秒から5分、好ましくは約30秒から2分の範囲である。

普通、その結果をキャリブレーターと比較する。キャリブレーターは、付随して実施されるか、予め実施しておいたか、または標準曲線として準備され、対象となる化合物の性質によって変わる。既知量の対象化合物を持つサンプルを準備し、アッセイを実施し、その結果をチャートにして、サンプルで得られた測定値を標準曲線と並進させることができる。基本値がサンプル源によって変わるような幾つかの例ではコントロールを用いる。特定のコントロールはサンプルや対象化合物と関連する。

本発明は、血小板および血小板機能の測定に関して特別に応用できる。血小板接着機能は、血小板の様々な因子に対する感度において本方法の最高の試験である。第1に、血小板は、血液の物理的操作により、また血管が静脈穿刺の際に損傷すると誘発される各因子の放出により、様々な度合いまで活性化させることができる。第2に、採血と試験との間の時間効果である：血漿を必要とする技術の場合、この時間は必然的にもっと長くなるので、さらに不都合である。また、赤血球から血漿を分離するのに要する機械的行為は、様々な度合いまで血小板を活性化し、また多様な細胞再生をもたらすことがある。血小板接着機能阻害剤の効果を測定する場合、相対的に迅速な速度離脱(off-rate)の問題がある。阻

10

20

30

40

50

害剤の迅速な速度離脱は、サンプルがアッセイ前に希釈されると、ある場合では、たとえ希釈がアッセイ中に起こるとしても、阻害剤の効果が過少評価されることになる。また、血小板凝集、フィブリノーゲン結合、ある場合では、阻害剤結合がカルシウム依存性であるため、抗凝固剤の選択は血小板機能レベルを正確に測定するのに重要であり得る。抗IIb/IIIa薬の吸収、代謝等における多様性は、薬物動態において大きな差異を導くこともある。本方法は、血小板接着機能阻害の効果的レベルおよび/または血小板凝集能の迅速な測定を可能にする。この情報から、血餅形成阻害を目的とする抗血小板薬の投与時機および頻度を正確に決定できる。

血小板凝集を測定する場合、各個人の血小板の状態が問題となるのであり、自然の状態かまたは薬剤の投与がもたらした状態にあるが、サンプルは、事実上、約50%以下、好ましくは約20%以下に希釈しておいた全血である。

10

この全血は、望ましくは、実質的に無空気の状態で採血する。便宜上、血液サンプルを入手および確保するためにヴァキュテナーを採用する。このヴァキュテナーは、望ましくは、少容量のクエン酸ナトリウム溶液(または他の抗凝固剤)を容量範囲約0.05~0.5mlの約3~5%クエン酸ナトリウムの範囲で含む。血液サンプルは、先端なしの末梢静脈注入から入手する方がよい。便宜上、針は、少なくとも約21ゲージである方がよい。回収用の最初の管は廃棄し、第2の管または複数の管を順次使用する。ヴァキュテナーを単にゆっくりと逆さにすることで穏やかに攪拌し、抗凝固剤とサンプルとを確実に混合させる。各容器中のサンプルは、約1~10ml、より普通には約1~8ml、便宜上、約1~5mlの範囲である。サンプルは、過度に長期間貯蔵すべきではなく、一般に、アッセイ前の一般的な貯蔵期間は、1時間を越えてはいけない。

20

その後、少量のサンプルを測定用クベットに移す。一般に、その容量は、約25~500 μ l、より普通には約75~250 μ lの範囲である。便宜上、クベットには、フィブリノーゲンまたはその他の結合化合物で被覆した粒子を入れる。血小板の活性化に役立つ様々な薬剤を添加して血小板を活性化できる。その薬剤の例としては、イソ-TRAP(米国特許第5,455,228参照)、TRAP、ADP、コラーゲン、トロンビン、リストセチン、アラキドン酸、またはそれらの組合せがある。適切なアクチベーターならどれでも使用できる。イソ-TRAPは、約1ないし5、好ましくは約2 μ mol/Lの範囲の濃度で使用できる。ADPは、GPIIb/IIIaアンタゴニストとして約20 μ Mで、またはアスピリン、チクロピジン(ticlopidine)および/またはクロプリドゲル(clopidogrel)の監視用にはもっと低濃度で使用できる。活性化剤は、ビーズ試薬と共に組込み、その中へ血液サンプルを添加する。ビーズとその他の試薬はサンプルを希釈しないために乾燥したものでよいが、ある場合では、少量の液体が存在していてもよく、望ましくはサンプル容量の約25%以下である。

30

粒子は、便宜上、サイズ範囲約2ないし8ミクロンのポリスチレン粒子であり、常法に従い、また上記のとおり、能動吸着または共有結合によりフィブリノーゲンで被覆したものである。一般に、粒子重量に対するフィブリノーゲン重量は、約1:1000から1:10の範囲である。

ビーズの量は、800nmで約4:1以上、一般に800nmで多くて約10:1の凝集培地吸収係数と全血吸収係数との比率を提供するものである。最適吸収比率は、凝集培地の光吸収特性とアッセイサンプル中の凝集培地の濃度の両方を設定することにより実現できる。

40

抗凝血化した全血、粒子および活性化剤の混合物を穏やかに攪拌して、均一性を確保し、凝集形成を妨げることなく均一性を維持するように穏やかな攪拌を続ける。培地の温度は一定温度に保つ。一般に30秒以下、普通約10秒以下という短時間の後、サンプルに約800nmで光を照射することにより読取りを開始する。総読取り時間は、一般に約5分以下、普通は3分以下であり、経時的な勾配変化を測定するために変化速度を測定するとき、秒当りのデータポイント数は、約0.01から100、より普通には約1から50の範囲である。そのため、約0.01秒から約1.5秒、普通は約0.02秒から1秒の一定間隔で読取りを実施できる。その他には、適宜データポイントを採っていてもよく、少な

50

くとも1データポイント、より普通には少なくとも2データポイント、頻繁には1分当り1ポイント以上である。経時的な透過能の変化は、適切な技術で測定し、便宜上、常用の赤外線用分光光度検出器を採用する。

コントロールとして、凝集阻害剤を含む血液を、ある試薬、便宜上、阻害剤を完全に中和する抗体またはそのフラグメントで処理する。血小板活性の起点は、患者ごとに、また患者間で経時的に広範囲に変わり得ることが分かった。

そのため、阻害剤を中和することにより、特定のサンプルについて血小板活性用の起点値を得ることができる。次いで、これをサンプルで得られた結果との比較に用い、阻害剤存在下の血小板活性を測定できる。阻害剤として使用できる化合物の例には、強力なIIb/IIIa機能遮断剤であるSearle化合物54701Bおよび57101Aがある。抗血清またはモノクローナル抗体またはその結合フラグメントを使用して阻害剤の作用を遮断することができ、その結果、阻害されなかったサンプルをコントロールとして使用した。コントロールはサンプルと同様に使用され、コントロールにもサンプルで採用したのと同じ条件を採用して同時に処理してもよい。

採用される阻害剤中和剤の量は、阻害剤の完全な中和をもたらすものであり、過剰量を使用してもよく、患者への投与量から予想されるように、サンプルを有意に希釈することなく、普通は約50%希釈以下、普通は約25%希釈以下で、普通は多くても阻害剤の最高濃度の約5倍過剰である。抗血清またはそのフラグメントを用いる場合、高親和性力価を用いるのがよく、望ましくは、50%最大結合が、少なくとも約1:10,000、おそらく1:100,000以上、好ましくは少なくとも約1:25,000の範囲の力価である方がよい。この技術を用いると、起点速度、またはその他いかなるIIb/IIIa機能試験起点パラメーターでも確立できる。

代理の血小板コントロールまたはキャリブレーターとして働くフィブリノーゲンなしの対象粒子は、適切な緩衝培地中でトロンピンおよび/またはGly-Pro-Arg-Pro(GPRP; フィブリン重合のペプチド阻害剤)と合わせることができる。次いで、これらの試薬を、サンプルと同様にして、フィブリノーゲンで被覆した粒子と合わせてもよい。所望ならば、緩衝培地を粒子凝集に関与しない血液成分、例えば、赤血球、血清アルブミン、免疫グロブリンまたは他の重要な血液成分などで増やしてもよい。適切な緩衝培地は、1~5mg/mlタンパク質、例えばBSAを含むHEPES-塩化ナトリウム緩衝液である。

その他の実施態様では、別のコントロールまたはキャリブレーターを採用してもよい。例えば、フィブリノーゲン被覆粒子と約0.5から10NIH単位/ml、好ましくは約0.6NIH単位/mlのヒトトロンピンを上記のような適切な緩衝培地中で合わせることで、コントロールの起点(100%最大アッセイ速度)レベルを提供しつつ、およそ50%レベル(最大アッセイ速度の約50%)のコントロールを提供するが、そこではフィブリノーゲン被覆粒子を、上記のような適切な緩衝培地中で約0.5から10NIH単位/ml、好ましくは約0.6NIH単位/mlのヒトトロンピンおよび約15から約30、好ましくは約23µg/mlのGPRPオリゴヌクレオチド、即ちフィブリン重合のペプチド阻害剤と合わせている。好ましくは、100%レベルのコントロールは、10mM HEPES緩衝塩水、2mg/mlBSA、0.2%トレハロース、0.4%ツイーン20、0.5µmポリエチレンラテックス0.9%中、約0.6NIH単位/mlを含む。

別のコントロールでは、ヒトフィブリノンの鎖における分子内架橋部位を模擬するためにペプチド免疫原に対して生み出され、かつフィブリノーゲンと合成フィブリノーゲンベースのオリゴヌクレオチドの両方と反応するネズミモノクローナル抗体4A5(G. Matsueda, Princeton University)を用いてもよい。具体的には、4A5が2~3µmポリスチレンラテックスの表面に被覆されているとき、その複合体は、添加された4A5被覆ラテックスの量と凝集速度との間に直接相関が存在するような方法で、フィブリノーゲン被覆ラテックス粒子を凝集させることができる。

別のコントロールでは、ポリスチレンラテックス粒子の表面上に被覆した単離血小板原形質膜も使用できる。このような膜被覆粒子は、添加された膜被覆粒子の量と凝集速度との間に直接相関が存在するような方法で、フィブリノーゲン被覆粒子を凝集させることがで

10

20

30

40

50

きる。所望ならば、G II b / III a 阻害剤を様々な濃度で用いてもよい。

上記のコントロールは、対象アッセイとは独立して実施してもよく、また対象アッセイと共に実施してもよい。コントロールが対象アッセイと共に実施される場合、対象アッセイで用いたものとは別の異なる装置で行ってもよく、また対象アッセイで使用したのと同じ装置で行ってもよいが、ただし、その装置は試験およびコントロールアッセイに使用できる少なくとも2つの別個の小室を持つ。

所望ならば、この技術を改変したものをトロンビン活性化および凝集に関連する様々な血中タンパク質の活性の評価に使用することもできる。これらのタンパク質には、F V、F V III c、F I X および前述の他の因子がある。そのため、乾燥物で再生の必要があるか、または濃縮溶液であって、測定対象の因子以外の凝血に必要な血液因子、およびフィブリノーゲン被覆粒子を含有する準備済み混合物に血液サンプルを添加することによって、凝集速度の変化がサンプル中の対象因子の活性に関連付けられる。次いで、この結果を既知量の対象因子を持つキャリブレーターと関連させればよい。

サンプルを試薬と合わせた後、所望ならば、室温以上であるが、アッセイを干渉する温度以下で加熱し、アッセイ結果に望ましくない影響を与えることなく温度を制御できるようにする。所望ならば、温度は、少なくとも25℃、好ましくは30~40℃の範囲、より好ましくは約37℃がよい。必須ではないが、好ましくはインキュベーションおよび凝集測定中、サンプルを穏やかに攪拌する。攪拌する場合、金属ビーズを上下に動かしたり、磁気ビーズをゆっくりした速度で、または穏やかな攪拌に用いた他の手段で振り動かしてもよい。

サンプル容量は、かなり少なくても構わず、普通は約100μl以上、より普通には約250μl以上、望ましくは多くて約1ml、好ましくは多くて約500μl、より好ましくは多くて約250μlである。

便宜上、本発明に使用できる数種または全ての試薬を含むキットを提供できる。このキットには、対象の成分と共に用いる粒子が入っている。更に、コントロールとして役立つために、サンプル中の阻害剤の除去用に中和免疫グロブリンを準備することができる。適切な結合成分を含む粒子を、測定量またはバルクのいずれかでアッセイに関連する他の試薬と、所望ならば、対象成分源と混合する場合には、キャリブレーターを用意してもよい。血小板凝集の場合、トロンビンおよび/またはG P R P と非被覆粒子との組合せを供給できる。また、便利なものとして、1~5M抗凝固剤、例えば、クエン酸ナトリウム、トロンビン阻害剤0.1~1mlを含むヴァキュエーターがある。キット用として特に重要なのは容器であり、アッセイ操作工程を減らすために1種以上の適切な試薬を含む。例えば、クベットなどの容器の中に、粒子と、適切ならば、他のアッセイ用試薬を入れたものを提供できる。

本発明のその他の実施態様は、サンプル中に低濃度で存在する対象分子、例えば、心臓トロポニンIおよびP-セレクチンなどの存在を高感度に検出し、かつ、定量測定できるアッセイとそれに役立つキットに関する。これらのアッセイでは、標準法を用いて第1粒子の表面に受容体分子、好ましくは抗体またはその抗原結合フラグメントを結合させることができる。この受容体分子はサンプル中に低濃度で存在する対象分子に対するものであり、その場合、対象分子は好ましくはタンパク質またはペプチドである。対象の分子を受容体被覆第1粒子の表面に結合させても、第1粒子の赤外部での吸収または放出能力にはさほど影響がない。しかしながら、第2粒子、好ましくは固有の赤外線吸収および/または放出能力を殆どまたは全く持たない粒子を添付する。この第2粒子は白色ラテックス粒子などであって、かつ対象分子上の異なる部位に対する受容体分子、好ましくは抗体またはその結合フラグメントで被覆されているものである。この場合、この第2粒子は、第1粒子に既に結合した、あるいは結合する対象分子へ結合させ、それによって、第1粒子の赤外線吸収および/または放出特性を変化させるのに有効であり、この赤外線吸収および/または放出の変化は、経時的に検出および定量できる。サンプルは、第2粒子をサンプルに添加する前、添加と同時に、または添加後に、第1粒子と合わせることができ、その合わせる順序は本発明にとって重要ではない。ここで使用できる粒子は、上記のとおりである。

10

20

30

40

50

本発明の更に別の実施態様は、血小板数の基準として対象となるサンプル中の血小板受容体総数を検出および定量的に計測するためのアッセイおよびアッセイに役立つキットに関する。具体的には、上記のように粒子を受容体分子、好ましくは、例えば GPIIb、GPIIb/IIIa などの血小板関連タンパク質に対する抗体または抗体フラグメントで被覆し、対象のサンプルと合わせる。このシステムが経時的に赤外部で吸収する能力の変化は、サンプル中の血小板受容体総数に関する情報を与え、これは血小板数と相関し得る。

下記の実施例は、本発明を例示するために提供するものであって、本発明を限定するものではない。

実験の部

次の実験で用いるビードは下記のように調製した。

10

ヒト・フィブリノーゲン被覆ラテックス・ビード

15 mL ポリプロピレン三角管中の DI 水 8.369 mL に 0.96 M リン酸ナトリウム 0.208 mL を pH 7.2 で 0.02% アジ化ナトリウムとともに加える。ヒト・フィブリノーゲン (Enzyme Research Laboratories, South Bend, Indiana; cat # Fib 3 から) 423 μ L を 7.8 mg/mL で加え、緩やかに攪拌する。最後に 5.5 ミクロンのラテックス・ビード (Bangs Laboratories から、5.5% DV B および 5% メタクリル酸を有するポリスチレン) 1 mL を 10% で加え、混合物を室温で保管庫で 2 時間インキュベートする。次いで、1540 g で 5 分間振動回転器で遠心分離する。上澄液をとり、緩衝液 C (1 mg/mL の BSA および 0.02% アジ化ナトリウムを有する 10 mM の HEPES、pH 7.5) 10 mL を加え、ビードを再懸濁する。混合物を遠心分離し、上記操作を繰り返す。最後の遠心分離後、上澄液をとり、緩衝液 A 6.67 mL を加えて、ビードを再懸濁する。ビード濃度は通常 1.38×10^8 ビード/mL である。ピシンコン酸 (BCA) アッセイ (Pierce, Rockford, IL) の修飾法を用いて、ビード上に被覆したフィブリノーゲンの量を測定する。ヒト・フィブリノーゲン被覆ブルー・ラテックス・ビードの調製は、6 ミクロンのブルー・ラテックス・ビード (PolySciences から、カルボキシレート基を持つポリスチレン) を用いた以外、同様に行う。

20

IR-140 染料溶液の調製

IR-140 の 45 mg をガラス管中で塩化メチレン 9 mL に溶かす。ガラス製ジャー中で 2-プロパノール 38 mL と混合し、緩衝液 B (0.02% アジ化ナトリウムを有する 20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.5) 53 mL を加える。混合物を Cole Palmer 攪拌モデル 50002-30 で 15 分間、激しく混和し、均等の染料溶液を得る。

30

IR-140 染色ヒト・フィブリノーゲン被覆ラテックス・ビードの調製

ヒト・フィブリノーゲン被覆ラテックス・ビード (1×10^9 ビード) 1 ペレットを上記 IR 140 染料溶液 10 mL に加え、渦状に攪拌する。混合物を室温で保管庫で 5 分間インキュベートし、50 mL ポリプロピレン三角管に移し、緩衝液 A 50 mL を加える。1540 g で 5 分間遠心し、上澄液を採取した後、上記の染料充填工程の第 2 回を実施する。遠心分離と上澄液の採取後、緩衝液 B を加え、渦状に攪拌し、7.8 mg/mL ヒト・フィブリノーゲン 0.25 mL を加え緩やかに攪拌する。混合物を 45 秒間、音波処理する。精製 (緩衝液 C の使用と遠心分離) を、ヒト・フィブリノーゲン被覆ラテックス・ビードの場合と同様に行う。

40

次の実験において、血小板凝集阻害能を有する化合物である Searle 化合物 54701 B について主な実施方法を行う。用いた方法は次の通り。

全般的な方法

クエン酸処理血液を、専用の微粒子およびトロンビン受容体活性ペプチド (イソ-TRAP) を含有するカートリッジに加える。混合物を機械的に混合しながら、ミクロ凝集反応を光学的に監視する。血小板活性の測定を溶液の光学密度の変化速度で行う。このアッセイの結果を血小板に富む血漿 (PRP) についての光学的血小板凝集計法での結果と比較する。

方法:

標本の収集と調製:

50

ヒトの血液(40.5 ml)を、6人のタバコを吸わないアスピリン非服用のボランティアから21ゲージ針でヴァキュテナー・システム(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)を用いて、クエン酸5.0 ml含有(3.8%)の管に採取した。第1管を捨て、残りをポリプロピレン容器に集め、室温に保つ。集めた血液5 mlアリコットを12 x 75 mmポリプロピレン容器に移し、血液250 µlを引き出して捨てた。Searle化合物54701 Bを10 mMのHEPES、150 mMのNaCl、pH 7.4で希釈し、50 µlを各管に加えて、最終濃度を10、25、35、50および75 nMとした。1000 nMで最小凝集サンプルを全てのサンプルについて調製した。最大凝集を判定するためのコントロールのサンプルを、アンタゴニストの代わりに加えたHEPES/塩類緩衝液250 µlでもって同時に調製した。

10

阻害剤(2.0 ml)を有する全血のアリコットを取り、迅速血小板機能アッセイ(RPFA)のために別個のポリプロピレン製の管に入れた。管中の血液の残りを110 x Gで12分間遠心分離し、血小板に富む血漿(PRP)を別個のポリプロピレン製の管に採取した。血小板に乏しい血漿(PPP)は、血液の別個のアリコットを1540 x Gで15分間遠心分離して調製した。血小板機能についてのアッセイを血液採取から1時間以内に始めた。

図4に示す同様の研究において、連続の3日間6人のドナーを用いた以外、上記と同様にして血液を採取し、処置した。結果は3日間で得たデータの平均で表す。

血小板凝集計量法:

PRP(400 µl)を、テフロン被覆攪拌棒を含有するシリコン処理クベットにピペットで入れた。クベットをChromo-Log model 490 D光学血小板凝集計量器に入れ、30秒間で起点を確定した。200 µMのADP(44 µl)を最終ADP濃度20 µMになるように加えた。凝集を2分間監視し、最大凝集を記録した。

20

迅速血小板機能アッセイ:

RPFAのために上記で調製した阻害剤または緩衝液を有する全血160 µlアリコットを、凍結乾燥イソ-TRAPおよび微粒子を含有するプラスチック製のクベットに加えた。機械的混合サイクルを70秒間行い、1秒間に16の速度で光学読みを実施した。ミクログ凝集反応の測定を一定の間隔で溶液の光学密度の変化速度で行った。

RPFAモニターは、805 nmでピーク波長、50 nmのスペクトルバンド幅および15 mWの照射出力を有するIRダイオードを用いる。伝導シグナルを、0.6 A/Wの805 nmに感受を有する高い広幅バンド-光学検出増幅ハイブリッドで検出する。アッセイのカートリッジに全血サンプル160 µLを追加して、モーター可動混合機が70秒間、240サイクル/分で回転する。この混合期間中に、検出器シグナル出力を16 Hzの速度で調べる。混合が完成すると、粗時間ドメインデータが進行し、血小板阻害の測定がなされる。

30

結果

図1にみられるように、6 µmのフィブリノーゲン被覆ブルー・ラテックス・ビードの凝集反応速度は、約650 nmでのLED光源を用いたシステムで監視したところ、暗静脈全血の全面酸素化において、2倍の増加が認められた。一方、5.5 µmのIR-140染色フィブリノーゲン被覆ラテックス・ビードの凝集反応速度は、約817 nmでのLED光源を用いたシステムで監視したところ、変化がなかった。

40

本明細書で引用したすべての公表文献および特許出願は、各々を特定的にあるいは個々に引用することにより本明細書の一部とするのと同じように、本明細書の一部とする。

上記の発明について、理解をたやすくする目的でかなり詳細に説明および例示を行ってきたが、当業者が本発明の教示を参考にして、本請求項の精神あるいは範囲から逸脱することなしに、何らかの変更および修飾を行い得ることは明らかである。

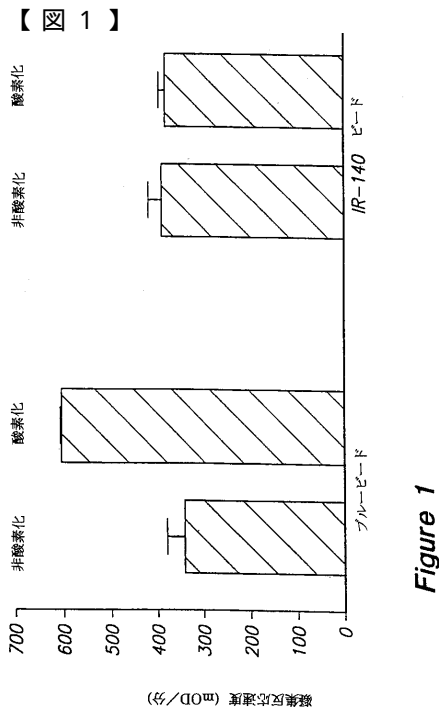


Figure 1

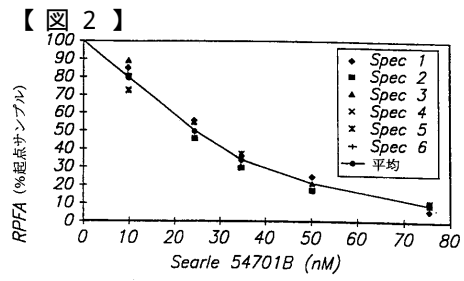


Figure 2

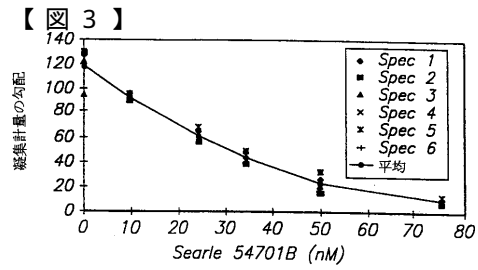


Figure 3

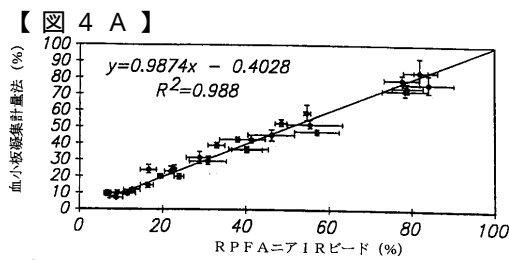


Figure 4A

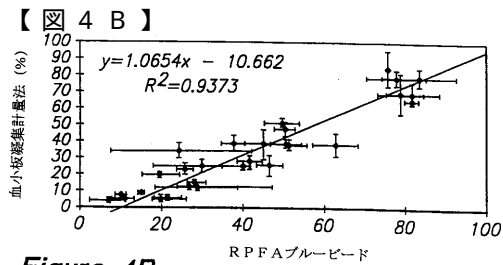


Figure 4B

【 図 5 】

サンプル	抗体	% 起点	SD	N
HBS		100.000	16.40337	6
2201		102.3643	15.42936	6
2237		103.9405	18.43019	6
IgG		100.5838	20.47064	6
500 nM SC 54701B		0.622592	1.174004	6
500 nM SC 54701B	2201	109.4279	15.28864	6
500 nM SC 54701B	IgG	2.340047	2.962593	6
500 nM SC 57101		4.670169	3.770276	6
500 nM SC 57101	2237	112.5511	19.57767	6
500 nM SC 57101	IgG	2.772913	2.440345	6

リガンド: HBS - Hepes 緩衝液
 2201 - ウサギ IgG, 抗-SC 54701B
 2237 - ウサギ IgG, 抗-SC 57101
 IgG - 非特異的ウサギ IgG

Figure 5

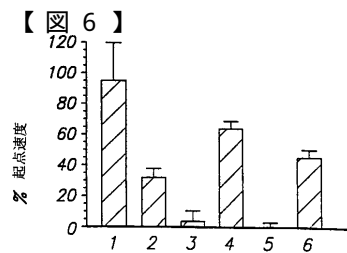


Figure 6

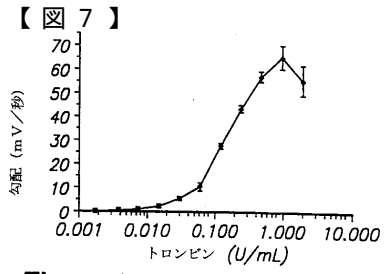


Figure 7

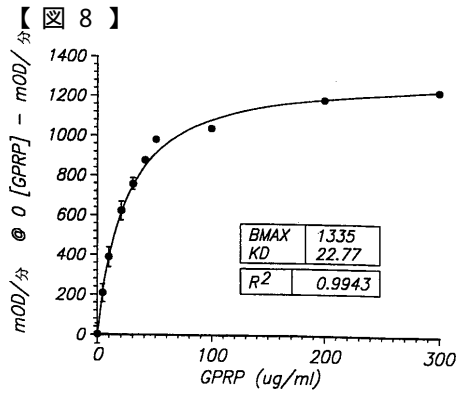


Figure 8

フロントページの続き

- (72)発明者 ダービン, デニス・エイ
アメリカ合衆国92075カリフォルニア州 ソラナ・ビーチ、マーソラン・アベニュー711番
- (72)発明者 リー, セオドア・ティ
アメリカ合衆国92067カリフォルニア州 ランチョ・サンタ・フェ、ポスト・オフィス・ボックス9405
- (72)発明者 ラトニコフ, ボリス・アイ
アメリカ合衆国92127カリフォルニア州 サンディエゴ、アベニダ・デ・ロス・ロボス10876番
- (72)発明者 ヒルマン, ロバート・エス
アメリカ合衆国92130カリフォルニア州 サンディエゴ、ヒドゥン・デューン・コート4963番
- (72)発明者 スミス, ジェフリー・ダブリュー
アメリカ合衆国92130カリフォルニア州 サンディエゴ、カーメル・カントリー・ロード12602 6番

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開昭54-108693(JP, A)
特表昭57-501493(JP, A)
米国特許第04760030(US, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/53 - 579