(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4463460号
(P4463460)

(45)発行日　平成22年5月19日(2010.5.19)　(24)登録日　平成22年2月26日(2010.2.26)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/86	(2006.01)	G01N	33/86	
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z

請求項の数 3　(全 8 頁)

(21)出願番号	特願2001-535051 (P2001-535051)
(86)(22)出願日	平成12年10月28日 (2000.10.28)
(65)公表番号	特表2003-513280 (P2003-513280A)
(43)公表日	平成15年4月8日 (2003.4.8)
(86)国際出願番号	PCT/EP2000/010646
(87)国際公開番号	WO2001/033217
(87)国際公開日	平成13年5月10日 (2001.5.10)
審査請求日	平成19年10月16日 (2007.10.16)
(31)優先権主張番号	60/163,161
(32)優先日	平成11年11月2日 (1999.11.2)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	9930535.1
(32)優先日	平成11年12月23日 (1999.12.23)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　397056695
サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
ドイツ連邦共和国デー－６５９２９フランクフルト・アム・マイン．ブリユニングシユトラーセ５０
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100091731
弁理士　高木　千嘉
(74)代理人　100080355
弁理士　西村　公佑

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｘａ因子阻害剤の活性をモニターするためラッセルクサリヘビ蛇毒誘導血漿Ｘａ因子活性の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ａ）哺乳動物からの血漿試料において、

ｂ）前記血漿試料を小部分に分け、一つの部分を対照血漿として保持しそして他の部分にＦＸａ阻害剤の連続希釈液を添加し、

ｃ）ラッセルクサリヘビ蛇毒（ＲＶＶ－Ｘ）の溶液をｂ）で定義した血漿試料のそれぞれに添加し、

ｄ）対照血漿について測定したＦＸａ活性をＦＸａ阻害剤を添加した他の血漿試料について測定した残存ＦＸａ活性と比較し、

ｅ）ＦＸａ阻害剤により誘導されるＲＶＶ－Ｘの用量依存阻害の標準曲線を作り、

ｆ）ＦＸａ阻害剤の濃度を標準曲線を使用することにより評価する、

各段階からなる、ＦＸａ阻害剤の効果をモニターする方法。

【請求項２】

ａ）哺乳動物からの血漿試料において、

ｂ）前記血漿試料を小部分に分け、一つの部分を対照正常血漿として保持しそして他の部分にＦＸａ阻害剤の連続希釈液を添加し、

ｃ）ラッセルクサリヘビ蛇毒の溶液をｂ）で定義した血漿試料のそれぞれに添加し、

ｄ）ＦＸａ阻害剤のない対照血漿試料について測定した凝血時間をＦＸａ阻害剤を添加した血漿試料についてのそれと比較し、

ｅ）用量依存凝血時間延長曲線を作りそして対照血漿凝血時間より２倍長く凝血時間を

延長するために必要なＦＸａ阻害剤の濃度を求める、
各段階からなる、ＦＸａ阻害剤の効果をモニターする方法。
【請求項３】
直接又は間接のＦＸａ阻害剤の活性の定量のための請求項１又は２に記載の方法の使用であって、ＦＸａ阻害剤が３－（４′－Ｎ－オキソピリジルフェノイル）－３－メチル－２－（ｍ－アミジノベンジル）－プロピオン酸メチルである上記の使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明はＸａ因子活性の測定に関する。そのような活性は血液凝固時間又は色素産生性基質を使用して測定することができる。本発明はＦＸａ阻害剤の活性を測定するための定量方法に関する。より詳しくは、本発明は個体の内在ＦＸａ活性を誘発しそしてＦＸａ阻害剤の効果を測定するためラッセルクサリヘビ蛇毒（以後“ＲＶＶ－Ｘ”で表す）の使用に関する。血漿中のＦＸａ活性を測定する方法は凝血時間及び色素産生方法による。
【０００２】
刊行物（Clinical Chemistry, 26巻／7号、885-890ページ、1980年）はＸ因子がラッセルクサリヘビ蛇毒により直接活性化されるＸ因子の定量法を開示しており、アルコール中で（13巻、6号、539-545ページ、1996年）Ｘ因子及びＸａ因子に与えるアセトアルデヒドの影響を記述している。症例報告においてＩｇＧが無傷のＸ因子の軽鎖に結合しそしてこれによりＸ因子の活性化を阻害すると報告している（Thrombosis & Haemostasis 72巻（3号）、363-371ページ、1994年）。
【０００３】
ＡＰＴＴ及びＰＴのような定量法が血液凝固時間を測定するため以前から使用されてきた。しかしながら、そのような定量法は直接Ｘａ因子（以後“ＦＸａ”で表す）阻害剤の投与における投薬量の差異を検出するに十分な感度を持たない。本発明は直接ＦＸａ阻害剤の安全性及び効力をモニターする問題に関する。本発明の方法はすべての種において静脈内又は経口投与により活性のＦＸａ阻害剤の安全性及び効力をモニターするために使用することができる。本発明の方法はトロンビン阻害剤及び間接ＦＸａ阻害剤例えば凝血カスケードの上流の因子に対する抗凝血剤及びヘパリン、より特定すると低分子ヘパリンの安全性及び効力を測定するために使用することもできると考えられている。本方法は患者の前血栓症状態を予測するために使用することができる。ＦＸａ阻害剤の活性を測定するための改良された定量方法を開発するための研究の中で、今回これがＦＸａ阻害剤の活性により生ずる凝血時間の延長を測定するためラッセルクサリヘビ蛇毒（以後“ＲＶＶ－Ｘ”で表す）の使用により達成できることを発見した。
【０００４】
特許請求の範囲に説明されているように、本発明はＸａ因子阻害剤の効果をモニターする方法により目的を達成し、前記方法は
ａ）ＦＸａ阻害剤、抗凝血薬、抗血栓症薬、又はそれらのいずれかの組合せの投与を受けた患者から血漿試料を集め、
ｂ）ラッセルクサリヘビ蛇毒の溶液を血漿試料に添加し、そして
ｃ）凝血時間又は色素産生変化を測定する
各段階からなる。
【０００５】
本発明の別の目的はＸａ因子阻害剤の効果をモニターする方法であり、前記方法は
ａ）哺乳動物から血漿試料を集め、
ｂ）正常血漿試料を連続希釈するために使用するため同じ種のＸ因子欠如血漿試料を準備し、
ｃ）ａ）及びｂ）で定義した血漿試料にラッセルクサリヘビ蛇毒の溶液を添加し、
ｄ）哺乳動物からの血漿試料について測定した凝血時間をＸ因子欠如血漿で希釈した血漿試料について測定した凝血時間と比較し、
ｅ）ＦＸａ活性％（正常な血漿含量に比例する）の標準曲線を作りそして凝血時間延長を

測定し、
ｆ）ＦＸａ阻害剤処置を受けた個体の凝血時間を知り、そして残存ＦＸａ活性％又はＦＸａ阻害％を標準曲線から求める
各段階からなる。
【０００６】
本発明の別の目的はＸａ因子阻害剤の効果をモニターする方法であり、前記方法は
ａ）哺乳動物から血漿試料を集め、
ｂ）前記血漿試料を小部分に分け、一つの部分を対照正常血漿として保持しそして他の部分にＸａ因子阻害剤の連続希釈液を添加し、
ｃ）ラッセルクサリヘビ蛇毒の溶液をｂ）で定義した血漿試料に添加し、
ｄ）Ｘａ因子阻害剤のない血漿試料について測定した凝血時間をＸａ因子阻害剤を添加した血漿試料について測定した凝血時間と比較し、
ｅ）用量依存凝血時間延長曲線を作りそして対照血漿凝血時間より２倍長い凝血時間に延長するために必要なＦＸａ阻害剤の濃度を求める
各段階からなる。
【０００７】
哺乳動物はヒト又はウシ、ヒツジ、ウサギ、マウス又はラットのような動物である。Ｘａ因子阻害剤は血液凝固酵素、特にＸａ因子の阻害剤である化合物である。用語「患者」はヒト又は哺乳動物である。
【０００８】
本発明の別の目的は残存ＦＸａ活性を色素生産により測定することによるＸａ因子阻害剤の効果をモニターする方法であり、前記方法は
ａ）哺乳動物から血漿試料を集め、
ｂ）前記血漿試料を小部分に分け、一つの部分を対照正常血漿として保持しそして他の部分にＸａ因子阻害剤の連続希釈液を添加し、
ｃ）ラッセルクサリヘビ蛇毒（ＲＶＶ－Ｘ）の溶液をｂ）で定義した血漿試料に添加し、
ｄ）Ｘａ因子阻害剤のない血漿試料について測定したＦＸａ活性をＸａ因子阻害剤を添加した血漿試料について測定した残存ＦＸａ活性と比較し、
ｅ）ＦＸａ阻害剤により誘導されるＲＶＶ－Ｘの用量依存阻害の標準曲線を作り、
ｆ）標準曲線を使用することによりＦＸａ阻害剤治療の間の種々の時点の患者におけるＦＸａ阻害剤の濃度を評価することができる
各段階からなる。
【０００９】
本発明の別の目的は血漿試料の取り扱いによる凝血時間の測定における変動を減らすか又は最小にすることである。これは血漿試料にセファリンを添加することにより達成される。好ましいセファリン源はウサギ脳に由来する。ＦＸａ活性の定量に好ましい色素産生性化合物はSpectrozyme FXa(R) である。他のＦＸａ色素産生性基質も使用することができる。本発明の方法は好ましくは７ないし８のｐＨの緩衝剤中で実行する。好ましい緩衝剤は塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）及びポリエチレン グリコール－８０００（ＰＥＧ－８０００）を含むトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝剤（Ｔｒｉｓ）である。好ましい濃度はＴｒｉｓ、ＮａＣｌ及びＰＥＧ－８０００につきそれぞれ１０mMないし２００mM、２０mMないし６００mMそして０.０２％ないし１％である。
【００１０】
本発明の別の目的はＦＸａ阻害剤測定のための診断検査のため本発明の方法を使用するためのキットを提供することである。
本発明の別の目的はＸａ因子阻害剤の活性を測定するため本発明の方法の使用である。特に好ましいＦＸａ阻害剤は３－（４′－Ｎ－オキソピリジルフェノイル）－３－メチル－２－（ｍ－アミジノベンジル）－プロピオン酸メチルである。
【００１１】
実施例においてはＲＶＶＴプロトコルが凝血時間により血漿中のＲＶＶ－Ｘ誘導ＦＸａ活

性を測定するために有用であることを示している。第二のプロトコル、ＲＶＶＣプロトコルは色素生産関連方法により血漿中のＲＶＶ－Ｘ誘導ＦＸａ活性を測定するために有用である。ＲＶＶＴはＦＸａ阻害剤による凝血時間の用量依存延長を示す。ＲＶＶＣはＦＸａ阻害剤による用量依存ＦＸａ阻害を示す。二つの方法はヒト患者から採取したエックスビボ血漿試料におけるＦＸａ阻害剤の濃度の変動を識別するために成功裏に使用される。

【００１２】

本発明の方法を以下の実施例において詳しく説明する。

実施例１

ラッセルクサリヘビ蛇毒誘発凝血時間（ＲＶＶＴ）プロトコル

試薬：

ＦＸａ緩衝液：

０.０５Ｍ Tris、０.１５Ｍ ＮａＣｌ、０.１％ ＰＥＧ－8000、ｐＨ７.５

Tris ６.０６ｇ、ＮａＣｌ ８.７７ｇ、ＰＥＧ－8000 １.０ｇを８００mlの水に添加し、ｐＨを濃塩酸を使用してｐＨ７.５に調節する。水で１Ｌにする。

ＲＶＶ－Ｘ：

Enzyme Research Lab.

ＦＸａ緩衝液で１mg／mlとし、次いで同じ緩衝液で１／400に希釈する。

ＲＶＶ－Ｘ使用溶液（ＲＶＶ－Ｃａ）：

２mlの１／400 ＲＶＶ－Ｘ＋１８mlの０.００３５Ｍ $CaCl_2$

ＲＶＶ－Ｘの濃度はこの段階で０.２５μg／mlである。

ＦＸ欠如血漿：

American Diagnostica Inc.

【００１３】

手順：

すべての試薬は使用するまで４℃（氷－水混合物使用）に保たれなければならない。

標準

１．正常なプールした血漿又は患者血漿をＦＸ欠如血漿で１～１／256の２倍連続希釈を行う。

２．ＦＸａ緩衝液 ０.２ml、血漿希釈物０.１mlをキュベットに、次いで０.１mlのＲＶＶ－Ｃａ（ＭＬＡ－800クロッターをこの試薬に自動的に添加する）を添加する。

３．凝血時間を測定する。

４．標準曲線を作成する。

【００１４】

化合物３－（４′－Ｎ－オキソピリジルフェノイル）－３－メチル－２－（ｍ－アミジノベンジル）－プロピオン酸メチル（以後“ＲＰＲ”で表す）又はＲＰＲのトリフルオロ酢酸塩による用量依存凝血時間延長曲線：

１．ＦＸａ緩衝液０.１ml、ＲＰＲの連続希釈液０.１ml正常合プールした漿又は患者血漿０.１mlをキュベットに、次いで０.１mlのＲＶＶ－Ｃａ（ＭＬＡ－800クロッターをこの試薬に自動的に添加する）を添加する。

２．凝血時間を測定する。

３．用量依存凝血時間延長曲線を作成する。

４．２×ＲＶＶＴにつき濃度を計算する。

【００１５】

実施例２

色素産生により測定する血漿中のラッセルクサリヘビ蛇毒誘導ＦＸａ（ＲＶＶＣ）プロトコル

ＲＶＶＣ定量方法

色素産生により測定する血漿中のＲＶＶ誘導ＦＸａ活性

Ａ）試薬

ＰＥＧ－Ca^{++}緩衝液：

０．０５M Tris、０．１５M ＮａＣｌ、０．０１M $CaCl_2$、０．１％ ＰＥＧ－8000、ｐＨ７．５０
Tris ６．０６ｇ、ＮａＣｌ ８．７７ｇ、ＰＥＧ－8000 １ｇ、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ １．４７ｇを８００mlの水に添加し、濃塩酸を使用してｐＨ７．５に調節し、水で１Ｌにする。
ＲＶＶ－Ｘ（ラッセルクサリヘビ蛇毒）：
４４μlのＰＥＧ－Ca^{++}緩衝液を５０μlのＲＶＶ－Ｘストック（Enzyme Research Labs、１．８８mg／ml）に添加して１mg／mlの溶液を作り、常に氷上に保存する。
１mg／mlのストックを１／１０→１／１０→１／４（＝１／400）に希釈する。希釈はＰＥＧ－ＣＡＥ緩衝液で行う。

【００１６】

基質 Spectrozyme $FXa^{(R)}$：
５０μ moleのSpectrozyme FXa、 American Diagno sticを５mlの無菌水に溶解して１０mMのストック溶液を作る。
Spectrozyme $FXa^{(R)}$ １．６mM使用溶液：
０．８mlの１０mM ストック溶液を４．２mlのＰＥＧ－Ｃａ緩衝液に添加する。

【００１７】

Ｂ）手順：
１．試薬を次の順序でマイクロタイタープレート又は試験管に添加する：

【表１】

試　薬	試料	対照１	対照２
１．ＰＥＧ－Ca^{++}緩衝液	120μl	120μl	145μl
２．対照血漿	—	5μl	5μl
３．臨床試料（血漿）	5μl	—	—
４．Spectrozyme FXa^R １．６mM	50μl	50μl	50μl
５．ＲＶＶ－Ｘ（１mg／ml）１／400希釈液	25μl	25μl	—

２．次いで５分間動力学的に反応させる。

【００１８】

Ｃ）計算：
初速度を測定し、しかしながら、遅れ期間を無視する。一般に時間経過の直線部分の初速度を測定する。
異なる時点における臨床試料の初速度を使用しそして次に投与前対照と比較して阻害％を計算する。
血漿中に加えられた種々濃度の化合物ＲＰＲをＰＴ、ＡＰＴＴ及びＰＶＶＴ延長につき分析した。表１の結果はＦＸａ阻害剤としての化合物ＲＰＲの効果に関してＲＶＶＴが３つの凝血時間定量法の中で最も感度の高い指標であることを示唆している。
ＲＶＶ－Ｘ誘導凝血時間（ＲＶＶＴ）定量法は患者の内在血漿ＦＸａに対するＲＰＲの効果をモニターするのに都合よく使用することができる。

【００１９】

【表２】

表　1

フォールド変化に対するＲＰＲの効果

	ＲＰＲの濃度（μg／ml）		
試験系	50μg／ml	166μg／ml	322μg／ml
ＲＶＶＴ	1,33	2,66	4,41
ＰＴ	1,08	1,16	1,25
ＡＰＴＴ	1,08	1,41	1,5

【００２０】
実施例３
ラッセルクサリヘビ蛇毒誘導凝血時間（ＲＶＶＴ）プロトコル（II）
試薬：
ＦＸａ緩衝液：
０．０５Ｍ Tris、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．１％ ＰＥＧ－8000、ｐＨ７．５
Tris ６．０６ｇ、ＮａＣｌ ８．７７ｇ、ＰＥＧ－8000 １．０ｇを８００mlの水に添加し、～２mlの濃塩酸を使用してｐＨ７．５に調節する。水で１Ｌにする。
ＲＶＶ－Ｘ：
Enzyme Research Lab. ＦＸａ緩衝液で１mg／mlとし、次いで同じ緩衝液で１２００に希釈する。
２mlの１／２００ ＲＶＶ－Ｘ＋１８mlの０．００３５Ｍ $CaCl_2$、ＲＶＶ－Ｘの最終濃度はこの段階で０．５μg／mlである。
【００２１】
ウサギ脳
Centerchem
セファリン
ＦＸａ緩衝液中０．００３５Ｍ $CaCl_2$の３．１２５mlを加えて元に戻し、１．６mg／mlの最終濃度にする。
ＲＶＶ－Ｘ ＲＢ セファリン使用溶液（ＲＶＶ－Ｃａ－セファリン）：
等量の０．５μg／ml ＲＶＶ－Ｘを等量の１．６mg／mlのウサギ脳セファリンと混合する。この段階で試薬貯蔵液中のＲＶＶ－Ｘ及びセファリンの最終濃度はそれぞれ、０．２５μg／ml及び０．８mg／mlである。
【００２２】
手順：
すべての試薬は使用するまで４℃（氷－水混合物使用）に保たれなければならない。
投与前血漿 正常ＲＶＶＴ
１．ＦＸａ緩衝液 ０．２ml、投与前血漿０．１mlをキュベットに、次いで０．１mlのＲＶＶ－Ｃａ－セファリンを添加する（ＲＶＶ－Ｘ及びセファリンの最終濃度はそれぞれ、０．０６２５μg／ml及び０．２mg／mlである）。
２．凝血時間を測定する。
結果：ＲＶＶＴのフォールド変化を計算する。
【００２３】
ＲＶＶＴに与えるウサギ脳セファリンの効果
セファリンの希釈液を添加したＲＶＶ誘導血漿（プールしたＧＫ血漿及びドナーＤＮ、ＲＢ、ＴＤ）凝血時間（ｎ＝２）
【表３】

	凝血時間(秒)			
ウサギ脳セファリンの最終濃度(mg／ml)	プールしたGeorgeKing血漿(＃99x1)	血漿ＤＮ	血漿ＲＢ	血漿ＴＤ
0	28.9	55.1	65.3	86.4
0.0049	28.4	40.9	44.3	52.5
0.0098	28.5	38.1	39.5	47.1
0.0195	27.1	33.4	33.2	39.1
0.039	25.5	29.9	28.9	33.9
0.078	24.7	27.7	26.4	31.6
0.156	25.1	27.4	25.3	29.8
0.312	27.2	30.4	26.1	31.6

【００２４】

結論：

試料取り扱いによるＲＶＶＴの変動は反応混合物に～０．２mg／mlのウサギ脳セファリンの添加により少なくすることができる。

フロントページの続き

(72)発明者　ヴァレリア・チュー・フーン－フウェイ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９４５４．ノースウェールズ．タングルウッドドライブ１３３３

審査官　淺野　美奈

(56)参考文献　特開平１１－１１８８０７（ＪＰ，Ａ）
特開平０８－０８９２９３（ＪＰ，Ａ）
特開平７８－２２００９１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 33/86
G01N 33/15
G01N 33/50