

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-530114

(P2004-530114A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 GO 4 5
// GO 1 N 33/86	GO 1 N 33/86	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 67 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2002-566656 (P2002-566656)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成14年2月19日 (2002. 2. 19)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成15年8月20日 (2003. 8. 20)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2002/005023</p> <p>(87) 国際公開番号 W02002/066981</p> <p>(87) 国際公開日 平成14年8月29日 (2002. 8. 29)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/270, 066</p> <p>(32) 優先日 平成13年2月20日 (2001. 2. 20)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 10/028, 741</p> <p>(32) 優先日 平成13年12月20日 (2001. 12. 20)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 594003676 オクラホマ メディカル リサーチ ファ ウンデーション OKLAHOMA MEDICAL RE SEARCH FOUNDATION アメリカ合衆国 オクラホマ 73104 , オクラホマ シティ, エヌ. イー. 1 3ティーエッチ ストリート 825 825 N. E. 13th Stree t, Oklahoma City, Okl ahoma 73104, United States of America</p> <p>(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗凝固剤治療における可溶性内皮プロテインCレセプターレベルのモニタリング

(57) 【要約】

本発明による可溶性内皮プロテインCレセプター (sEPCR) のアッセイは、有効なトロンビンレベルおよび凝固能亢進状態をモニタリングするために有用である。従って、sEPCRに対するアッセイは、抗凝固剤治療の進行中の効果をモニタリングするために有用である。sEPCR ELISAアッセイは、この目的で特に有用である。患者または正常な個体における凝固能亢進の状態もまた、このようなアッセイによって同定され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗凝固剤治療を受けている患者において、有効トロンビンレベルをモニタリングするための方法であって、該方法は、可溶性内皮プロテインCレセプター（sEPCR）の循環レベルを測定する工程を包含し、ここで、低下したsEPCRレベルが、低下した有効トロンビン活性に関連する、方法。

【請求項 2】

前記抗凝固剤治療が、ビタミンKアンタゴニストを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗凝固剤治療が、ワルファリン、クマジン、プレビスカン、およびシントロームのうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記抗凝固剤治療が、ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖類、ヒルジン、ヒルジンアナログ、凝固因子インヒビター、プロテインC経路の成分、組織因子経路インヒビター、抗血小板化合物またはフィブリン溶解経路の成分の使用を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記sEPCRが、免疫アッセイによって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記sEPCRが、ELISAによって測定される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記sEPCRレベルが、血液産物、脳脊髄液または尿中のsEPCRを測定することによって決定される、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 8】

前記血液産物が、血漿または血清である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

抗凝固剤治療の有効性をモニタリングするための方法であって、該方法は、循環sEPCRレベルを測定する工程を包含し、ここで、sEPCRの減少が、該抗凝固剤治療が有効であることを示す、方法。

【請求項 10】

前記抗凝固剤治療が、ビタミンKアンタゴニストを含む、請求項 9 に記載の方法。 30

【請求項 11】

前記抗凝固剤治療が、ワルファリン、クマジン、プレビスカン、およびシントロームのうちの少なくとも1つを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗凝固剤治療が、ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖類、ヒルジン、ヒルジンアナログ、凝固因子インヒビター、プロテインC経路の成分、組織因子経路インヒビター、抗血小板化合物またはフィブリン溶解経路の成分の使用を包含する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記sEPCRが、免疫アッセイによって測定される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

前記sEPCRが、ELISAによって測定される、請求項 13 に記載の方法。 40

【請求項 15】

前記sEPCRレベルが、血液産物、脳脊髄液または尿中のsEPCRを測定することによって決定される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 16】

前記血液産物が、血漿または血清である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

凝固能亢進状態にある個体を同定するための方法であって、該方法は、可溶性内皮プロテインCレセプター（sEPCR）の循環レベルを測定する工程を包含し、ここで、上昇したsEPCRレベルが、凝固能亢進性に関連する、方法。 50

【請求項 18】

前記 s E P C R が、イムノアッセイによって測定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 s E P C R が、E L I S A によって測定される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 s E P C R レベルが、血液産物、脳脊髄液または尿中の s E P C R を測定することによって決定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記血液産物が、血漿または血清である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

凝固能亢進状態を誘発させる危険のある患者を同定するための方法であって、該方法は、可溶性内皮プロテイン C レセプター (s E P C R) の循環レベルを測定する工程を包含し、ここで、上昇した s E P C R レベルが、凝固能亢進状態の増加した危険に関連する、方法。

10

【請求項 23】

前記 s E P C R が、イムノアッセイによって測定される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 s E P C R が、E L I S A によって測定される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記患者が、凝固能亢進性に頻繁に関連する状態を有する、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 26】

前記患者が、癌、敗血症、糖尿病、心臓病、アテローム性動脈硬化症または自己免疫疾患を有する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 s E P C R が、イムノアッセイによって測定される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 s E P C R が、E L I S A によって測定される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 s E P C R レベルが、血液産物、脳脊髄液または尿中の s E P C R を測定することによって決定される、請求項 22 に記載の方法。

30

【請求項 30】

前記血液産物が、血漿または血清である、請求項 29 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

本願は、米国出願 60 / 270 , 066 (2001年2月20日出願) および米国通常出願 10 / 028 , 741 (2001年12月20日) に対する優先権の権利を主張し、これらの全内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(I . 発明の分野)

本発明は、脈管生物学および炎症の分野に関する。より詳細には、本発明は、トロンピン生成の測定として可溶性内皮プロテイン C レセプターを検出するためのアッセイに関する。

40

【0003】

(II . 関連技術)

米国において、5500万人より多くの人々が、現在、血栓症と関連する状態に罹患している。American Heart Association は、血栓症の処置のための米国ヘルスケアシステムに対する年間の直接的な費用は、2000億ドルを超えると試算している。世界規模での年間ベースでは、ほぼ200万人の患者が、このような状態を処

50

置するために、心肺バイパス手術または冠状動脈血管形成術のいずれかを受けている。血栓症および関連する疾患は、数100万人の患者を襲い、そして血栓症の発現は、有意な罹病率および死亡率の源である。

【0004】

うっ血の心配は、過剰凝固状態の病因の中心にあり、そして複数の重複する作用によって誘発され得る。これらとしては、環境効果（手術、食事、喫煙、出産、外傷）、原発性疾患の発現（心臓疾患、糖尿病、敗血症、高血圧、自己免疫疾患、悪性腫瘍）またはうっ血因子の遺伝的欠損（例えば、プロテインC、プロテインS、V因子Leiden、プロトロンビン、アンチトロンビンIII）が挙げられるが、これらに限定されない（Kearonら、2000；Careyら、1998；Laneら、2000）。臨床設定としては、汎発性血管内凝固症候群（DIC）、深静脈血栓症（DVT）、または手術時のDVT回避ならびに急性心筋梗塞、機械式人工器官心臓弁、僧帽弁逸脱症、心房性細動、リウマチ性僧帽弁疾患、および拡張型心筋症のような心臓状態が挙げられる。米国単独で、心房性細動または機械式心臓弁を有する150万人より多くの患者が、現在、予防的経口抗凝固剤治療を受け、発作および血栓形成を予防するための一助としている。

10

【0005】

血栓性疾患を有する患者に対する現在の治療アプローチは、代表的に、一連の静脈内未分画ヘパリンまたは静脈内低分子量ヘパリンで開始され、一連の経口抗凝固剤が続く。どちらの治療レジメンとも、トロンビンの活性、細胞の活性化を担う潜在的な酵素、凝血塊の基礎を形成するフィブリンの生成を低下させることを求める。北アメリカにおいて、ワルファリン（4-ヒドロキシクマリン）は、最も広範に使用される経口抗凝固剤であり、静脈血栓症または動脈血栓症および塞栓症を予防および処置するために処方される。

20

【0006】

しかし、ワルファリンは、潜在的な危険薬物である。なぜなら、その治療ウインドウは相対的に狭く、そして用量応答が、患者間で有意に異なるからである。ワルファリン治療は、処置した人の約1~8%に大きな出血を引き起こし、治療の各年の間に患者の約0.1~0.5%に頭蓋内出血を引き起こす（van der Meerら、1993；Connegietterら、1995；Levineら、NEED YEAR）。一過性虚血性発作または小さな発作を有する患者は、特に、ワルファリン治療からの出血に対して危険なようである（Laupacisら、1994；Ann. Nuerol., 1997；N. E. Jour. Med., 1995）。小規模な患者集団（0.01~0.1%）は、皮下脂肪の静脈および毛細血管の血栓症に起因してワルファリン誘導性皮膚壊死を示し得る（Chanら、2000）。これは、抗凝固剤タンパク質の欠損と関連し得るか、または前凝固剤（procoagulant）タンパク質プロトロンビン（日）と比較して、抗凝固剤プロテインSおよび/またはプロテインCの急速なワルファリン誘導性の損失（時間）に起因した、バランスのとれていないうっ血制御と関連し得る。従って、凝固状態の連続的なモニタリングが必要である。

30

【0007】

トロンビンの直接的な測定は、循環中でのその30秒の半減期に起因して実質的に不可能である。これは短い時間のようなものであるが、トロンピンは、特別に強力な酵素であり、そして30秒は、トロンピンがそのタンパク質基質および細胞レセプターに作用するのに十分すぎるほどの時間である。従って、凝固試験の設計者に課される課題とは、他のタンパク質またはインビトロパラメーターから影響を受けることなくトロンピンレベルを反映させるアッセイ、再現性がありかつ標準化され得るアッセイ、そして理想的にはトロンピンレベルのヒストリを報告するアッセイを作製することである。この後者の課題は、糖尿病患者においてヘモグロビンA1c（グリコヘモグロビン）レベルによって提供されるものと等価である。患者の遵守および治療効果は、これらの患者において、それらのヘモグロビンA1cのグリコシル化レベル（本質では、2~4ヶ月の期間にわたるそれらの血漿グルコースレベルの反映）によって測定される（Goldsteinら、1994）。経口抗凝固剤治療を受ける患者について、これらの課題パラメーターはいずれも、現在利用可能

40

50

な抗凝固剤試験によって満たされておらず、改善された方法が必要とされる。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

従って、本発明に従って、抗凝固剤治療を受けている患者において有効なトロンビンレベルをモニタリングするための方法が提供され、この方法は、可溶性内皮プロテインCレセプター(sEPCR)の循環レベルを測定する工程を包含し、ここで、低下したsEPCRレベルは、低下した有効トロンビン活性と関連する。抗凝固剤治療は、ビタミンKアンタゴニストを含み得、ワルファリン、クマジン(Coumadine)、プレビスカン(Previscan)、シントローム、ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖類、ヒルジン、ヒルジンアナログ、凝固因子インヒビター、プロテインC経路の成分、組織因子経路のインヒビター、抗血小板化合物またはフィブリン溶解経路の成分のうち少なくとも1つを含み得る。sEPCRは、免疫アッセイ(例えば、ELISA)によって測定され得る。循環sEPCRレベルは、サンプル(例えば、血液産物(血清、血漿)、髄液または尿)から決定され得る。

10

【0009】

別の実施形態において、抗凝固剤治療の効果をモニタリングするための方法が提供され、この方法は、循環sEPCRレベルを測定する工程を包含し、ここで、sEPCRの低下は、その抗凝固剤治療が有効であることを示す。抗凝固剤治療は、ビタミンKアンタゴニストを含み得、ワルファリン、クマジン、プレビスカン、シントローム、ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖類、ヒルジン、ヒルジンアナログ、凝固因子インヒビター、プロテインC経路の成分、組織因子経路のインヒビター、抗血小板化合物またはフィブリン溶解経路の成分のうち少なくとも1つを含み得る。sEPCRは、免疫アッセイ(例えば、ELISA)によって測定され得る。循環sEPCRレベルは、サンプル(例えば、血液産物(血清、血漿)、髄液または尿)から決定され得る。

20

【0010】

なお別の実施形態において、過剰凝固状態の個体を同定するための方法が提供され、この方法は、可溶性内皮プロテインCレセプター(sEPCR)の循環レベルを測定する工程を包含し、ここで、上昇したsEPCRレベルは、過剰凝固と関連する。sEPCRは、免疫アッセイ(例えば、ELISA)によって測定され得る。循環sEPCRレベルは、サンプル(例えば、血液産物(血清、血漿)、髄液または尿)から決定され得る。

30

【0011】

なおさらなる別の実施形態において、過剰凝固状態を発生する危険性のある患者を同定するための方法が提供され、この方法は、可溶性内皮プロテインCレセプター(sEPCR)の循環レベルを測定する工程を包含し、ここで、上昇したsEPCRレベルは、過剰凝固の危険性の増加に関連する。sEPCRは、免疫アッセイ(例えば、ELISA)によって測定され得る。患者は、過剰凝固としばしば関連する状態、例えば、癌、敗血症、糖尿病、心臓病、アテローム性動脈硬化症、または自己免疫疾患を有し得る。sEPCRは、免疫アッセイ(例えば、ELISA)によって測定され得る。循環sEPCRレベルは、サンプル(例えば、血液産物(血清、血漿)、髄液または尿)から決定され得る。

40

【0012】

以下の図面は、本明細書中の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせ、これらの図面の1つ以上を参照することによってより良く理解され得る。

【0013】

(発明の詳細な説明)

米国において、5500万人より多くの人々が、現在、血栓症と関連する状態に罹患している。これらの患者の多くは、抗凝固剤の投与を必要とする。一様な慢性抗凝固剤治療を可能にする優れた薬物が存在するが、これらの薬物は有害効果(例えば、過剰な出血)を有

50

する。これらの薬物に対する治療ウィンドウは狭くかつ変動性の両方であり、抗凝固状態の一定の評価が必要とされる。

【0014】

抗凝固剤経路における重要な成分は、トロンピンであり、トロンピンは、凝固カスケードの最終酵素産物であり、フィブリンの形成および血小板の活性化に必要であり、これらは両方とも、凝血塊の必須の成分である。トロンピン自体は、実質的に測定が不可能であるので、代理マーカーの使用が必要である。現在、トロンピン生成をモニターするために臨床的に使用される4種類の試験物が存在する：(a)プロトロンビン(P T)フラグメント1 + 2 (F 1 + 2)；(b)フィブリノペプチドA (F p A)；(c)トロンピン/抗トロンピン複合体(T A T)；および(d)可溶性フィブリンモノマー(S F M)。プロトロンビンフラグメント1 + 2は、プロトロンビンがプロトロンビン複合体中の第X a因子によってトロンピンに変換されたときに、生成される。これは、約90分の半減期で循環中に放出されるペプチドである。従って、F 1 + 2レベルは、急性のトロンピン生成のみを反映する。

10

【0015】

フィブリノペプチドA (F p A)は、直接的なトロンピンタンパク質分解によってフィブリノーゲンから放出される。このペプチドは血中を循環し、そして感応性E L I S Aを用いて検出され得る。F p Aレベルの主要な欠点は、これらが、静脈切開技術および血液操作慣用手順によるトロンピンのインビトロ生成に非常に感受性であるということである。数社の製造業者は、E L I S Aキットの製造を停止し、そしてほとんどの血液学試験所および凝固参照試験所が、この試験を提供していない。

20

【0016】

抗トロンピン(A T)は、トロンピンの主要なインヒビターであり、トロンピンと複合体化して(T A T)、トロンピンを循環から除去する。T A Tレベルは、E L I S Aによって測定され得る。T A Tレベルはまた、トロンピンの急性の生成も反映する。なぜなら、この複合体は、肝臓中でレセプター媒介機構によって清澄されるからであり、このことは、長期のトロンピンレベルの評価を制限する。重要なことに、F 1 + 2レベルおよびT A Tレベルの両方が、インビトロトロンピン生成および人工インビトロトロンピン生成の両方を反映する。トロンピンは、インビトロにおいて生成され得(最も一般的には、静脈切開手順によって)、人工的にF 1 + 2レベルおよびT A Tレベルを上昇させる。

30

【0017】

可溶性フィブリンモノマー(S F M)は、トロンピンがフィブリノペプチドAおよびフィブリノペプチドBをフィブリノーゲンから切断する場合に生成され、そしてこのフィブリンモノマーは、過剰なフィブリノーゲンと非共有結合的に相互作用する。次いで、トロンピンは、第X I I I a因子を生成し、このS F Mを血管壁上の局所的な血塊または全身的沈積物に架橋させる。従って、S F Mが増加するほど、トロンピンの正常な除去が飽和したかまたはもはや適切には作用しないことを示す。

【0018】

プロトロンビン時間(P T)アッセイは、血塊を生じる能力を評価するための慣用的なスクリーニング方法である。その有用性は、全経路要素における欠陥を検出することである。しかし、P Tアッセイは、凝固時間の延長を生じる因子または現象に対してより感受性である。抗凝固治療を受けた患者における延長したP T時間と出血エピソードとの間には良好な相関が存在する。しかしながら、P T値およびI N R値により判断されるように、抗凝固治療の投薬中であることを検出することは困難である。長期間の治療は、凝固能亢進状態を維持し、従って、患者は、血栓事象の危険性を知らずに保持する。s E P C Rレベルは、トロンピン活性のより確実なマーカーを提供し、そして抗凝固治療の投与中であることを報告し、かつ特定の抗凝固薬に対して応答性である。

40

【0019】

従って、現在利用可能な試験は、インビトロのトロンピン生成からの妨害を受ける。さらに、毎週または毎月のモニタリングを必要とする経口抗凝固治療中の比較的安定した患者

50

について、このような試験は、静脈切開の場合のみに、凝固状態を報告する。これらの結果は、数日間にわたって生成されたトロンビンレベルを示さず、可能性のあるトロンビン現象の危険性も示さない。

【0020】

(I. 本発明)

本発明者らは、凝固状態を測定するための新規で改善された方法を同定した。本発明者らは、可溶性内皮プロテインCレセプター (sEPCR) の血漿レベルとトロンビン生成との間に直接的な関係があることを決定した。sEPCRを測定するためのアッセイは、米国特許第5,804,392号において以前に記載されており、そして以下で考察されるように、種々の異なる実施形態において用いられ得る。

10

【0021】

第1に、本発明は、静脈内治療または経口抗凝固治療 (例えば、ヘパリン、低分子量ヘパリン、ワルファリン、クマジン (coumadin)、プレビスカン (previscan)、シントローム、凝固因子のインヒビターまたは抗血小板化合物を用いる処置) を受けている患者における、トロンビンレベル、すなわち凝固性を間接的にモニタリングするための方法に関する。この方法は一般に、患者の血漿サンプル中の可溶性内皮プロテインCレセプター (sEPCR) のレベルを測定する工程を包含する。sEPCRレベルは、sEPCRの放出を生じるプロテアーゼ活性のトロンビン誘導性上方制御に関する。この制御されたsEPCR放出は、トロンビン生成自体と比較して長い期間にわたって生じ、従って、患者および無症候個体において長期トロンビン活性および凝固能亢進状態につ

20

【0022】

さらに、本明細書中で記載されるデータは、sEPCRレベルが病的な凝固能亢進性、またはその増大した危険性を示し得ることを、示唆する。従って、抗凝固治療をモニタリングするための実質的に同じアッセイを使用して、本発明者らは、sEPCRレベルを使用して、凝固能亢進状態 (例えば、癌、敗血症、糖尿病、心臓疾患、アテローム性動脈硬化症または自己免疫疾患により引き起こされる凝固能亢進状態) の危険性を診断または評価

30

【0023】

(II. 抗凝固治療および凝固状態のモニタリング)

経口抗凝固治療の基本的な前提は、プロトロンビンの活性化に必要なビタミンK依存性凝固因子を妨害することによって、トロンビン形成を最終的に減少させることである。トロンビンは、凝固カスケードの最終酵素生成物であり、フィブリンを形成し血小板を活性化するために必要であり、これら両方は、血塊の必須成分である。しかし、トロンビンはまた、抗凝固制御系が適切に機能するために必要である。プロテインC抗凝固系は、凝固およびトロンビン形成の一次調節因子である (Esmon, 1999)。この経路によって生成される活性化プロテインCは、トロンビン形成に必要な重要な凝固因子を不活性化す

40

【0024】

内皮プロテインCレセプター (EPCR) は、最近同定され (Fukudomeら、1994)、トロンビン/トロンボモジュリン系によるこのプロテインCの活性化を促進することが示された (Stearns-Kurosawaraら、1996)。可溶性EPCR (sEPCR) は、血漿中に見出され (Kurosawaraら、1997)、レベルは、敗血症または全身性エリテマトーデスを有する患者において、上昇している (Kurosawaraら、1998)。可溶性EPCRレベルは、可溶性トロンボモジュリンのレベルと関連しなかった。可溶性トロンボモジュリンは、好中球エラスターゼタンパク質分解によって生成され、内皮損傷の容認されたマーカーである (Takahashiら、1992; T

50

a k a n o ら、1990 ; W a d a ら、2000)。しかし、s E P C R は、異なる経路によって生成される。最近の研究によって、s E P C R がメタロプロテイナーゼ活性によって膜に結合した親から生成され、そしてこの活性はトロンビンおよび炎症性メディエータによって引き起こされ得ることが証明された (X u ら、2000)。従って、止血の観点から、トロンビン生成の制御が重要であるが、その全体的な除去は、同様に有害である。

【0025】

血栓疾患を有する患者に対する現在の治療的アプローチは、代表的に、非分画ヘパリンまたは低分子量ヘパリンの静脈内コースで始まり、経口抗凝固薬のコースが続く。両方の治療レジメンは、トロンビンの活性、細胞の活性化を担う強力な酵素および血塊の基礎を形成するフィブリンの生成を減少することを試みる。北米において、ワルファリン (4 - ヒドロキシクマリン) が、最も広く使用される経口抗凝固薬であり、これは、静脈または動脈の血栓症および塞栓症を予防および処置するために処方される。ワルファリンおよび類似のクマリン誘導体は、凝固タンパク質 (プロトロンビン、第 V I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子) および抗凝固タンパク質 (プロテイン C、プロテイン S) の形成および / または作用を弱めるビタミン K アンタゴニストである (H r i s h ら、1998 ; B r e c k e n r i d g e , 1978 ; O ' R e i l l y , 1976 ; S u t c l i f f e ら、1987)。2 ~ 7 日のワルファリンの開始および作用の持続時間は、予測可能であり、これは優れたバイオアベイラビリティを有する。ワルファリンは、G I 管から迅速に吸収され、健康なボランティアにおいて 90 分で最大血液レベルに達し、そして 36 ~ 42 時間の半減期を有する。他の抗凝固薬としては、ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖類、プレビスカン、シントローム、凝固因子のインヒビター、または抗血小板化合物が挙げられる。

10

20

【0026】

抗凝固治療の間、患者の凝固状態は、A P T T (活性化部分トロンボプラスチン時間) アッセイおよび / または P T (プロトロンビン時間) 凝固アッセイを使用してモニタリングされる。A P T T アッセイは、凝固の内因的な最終的な共通の経路の完全性を試験し、従って、このアッセイは、凝固因子の減少または凝固因子インヒビターの存在に対して感受性である。P T アッセイは、凝固の外因的または開始剤の経路の有用な指標であり、従って、第 V I I 因子、ならびに共通経路の第 I I 因子、第 V 因子、第 X 因子およびフィブリノーゲンのレベルに依存する。P T アッセイは、ワルファリンを用いる抗凝固治療をモニタリングするために、スクリーニング試験として使用される。患者の凝固状態のモニタリングは、非常に重要である。なぜなら、抗凝固治療レジメンは、出血エピソードを含む有意な合併症を有し得るからである。

30

【0027】

経口抗凝固治療の患者の間隔の短いモニタリングが、必要とされ、そしてほとんどの患者は、治療範囲が達成されるまで毎日の P T 試験を受け、続いて示された安定性が毎月のモニタリングを許容するまで、7 ~ 14 日間、3 回 / 週の P T 試験を受ける。しかし、研究室間の臨床的 P T 結果の標準化は、非常に異なる。なぜなら、アッセイで使用されるトロンボプラスチン試薬は、組織源および調製方法に依存して、メーカー間で広範な可変性を示すからである。これらの可変性の源が、P T 報告の標準化を困難にし、そして患者を異常な投薬に曝していた。

40

【0028】

W H O の推奨に基づいて、国際規格化比率 (I N R) が、この標準化の問題を解決するために、1980 年代初期に採用された。この I N R は、患者の測定された P T 時間および標準的な試薬と市販のトロンボプラスチンとを比較することによって決定された国際感受性指数 (I S I) に基づく計算値である。1990 年代初期において、I N R の概念が、米国医学界に導入された。ほとんどの治療的抗凝固用途について、2 . 0 ~ 3 . 0 の範囲の I N R 値が、推奨される。現在、ほとんどの研究所は、I N R 形式を世界的に使用する。しかし、I N R の使用が可変性の問題を排除しないという一般協定がある (R i l e y ら、2000)。なぜなら、部分的に、各トロンボプラスチンのロットについてのメーカ

50

一の指定する I S I 値は、使用される機器に従って異なるからである。約 270 の異なる試薬 - 機器の組み合わせが存在するので、これは、有意な問題を残す。

【0029】

(I I I . s E P C R)

E P C R は、C D 1 / M H C クラス 1 ファミリーに対して有意な相同性を有する内皮細胞レセプターである (F u k u d o m e および E s m o n , 1 9 9 4 ; F u k u d o m e ら、1 9 9 6 ; R e g a n ら、1 9 9 6) 。プロテイン C に対する内皮細胞レセプターのクローン化および生物学的役割は、P C T / U S 9 5 / 0 9 6 3 6 に記載された。このタンパク質は、238 アミノ酸からなることが予測され、このタンパク質は、N 末端に 15 アミノ酸のシグナル配列を含み、そしてこのレセプターをタイプ 1 膜貫通タンパク質と特徴付ける 23 アミノ酸膜貫通領域を含む。E P C R は、カルシウムの存在下で、プロテイン C および A P C の両方と、類似の親和性で結合し (F u k u d o m e ら、1 9 9 6) 、そしてトロンピン - トロンボモジュリン活性化複合体に対するプロテイン C 基質を細胞表面上に提示することによって、プロテイン C の活性化を促進する (S t e a r n s - K u r o s a w a ら、1 9 9 6) 。組換え可溶性 E P C R (r s E P C R) (膜貫通ドメインの直前で切断されている) は、プロテイン C および A P C の両方に、インタクトな細胞表面で発現される E P C R について観察される親和性と類似の親和性で結合する (F u k u d o m e ら、1 9 9 6) 。

10

【0030】

(I V . イムノアッセイ)

s E P C R に対して特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、いくつかの用途において有用性を有することが理解される。これらには、診断キットの製造および s E P C R の検出方法における用途が挙げられる。従って、本発明は、s E P C R に免疫学的に結合する抗体を提供する。抗体を調製および特徴付けするための手段は、当該分野で周知である (例えば、A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , 1 9 8 8 (本明細書中に参考として援用される) を参照のこと) 。s E P C R に対する抗体は、このような標準的な技術を使用して作製されており、そして米国特許第 5 , 8 0 4 , 3 9 2 号に記載されている。

20

【0031】

(A . ポリクローナル抗血清)

ポリクローナル抗血清は、動物を本発明に従う免疫原性組成物で免疫し、そしてこの免疫された動物から抗血清を収集することによって、調製される。広範な動物種が、この抗血清の生成のために使用され得る。代表的には、抗血清の生成のために使用される動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはヤギである。ウサギの比較的多い血液量に起因して、ウサギが、ポリクローナル抗体の生成のための好ましい選択肢である。

30

【0032】

当該分野で周知のように、所定の組成物の免疫原性は異なる。従って、ペプチド免疫原またはポリペプチド免疫原をキャリアに結合することにより達成され得るように、宿主免疫系をブーストすることが、しばしば必要である。代表的な好ましいキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) およびウシ血清アルブミン (B S A) である。他のアルブミン (例えば、オポアルブミン、マウス血清アルブミンまたはウサギ血清アルブミン) もまた、キャリアとして使用され得る。ポリペプチドをキャリアタンパク質に結合するための手段は、当該分野で周知であり、そしてこれには、グルタルアルデヒド、m - マレイミドベンコイル (m a l e i m i d o b e n c o y l) - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス - ピアゾ化ベンジジンが挙げられる。

40

【0033】

当該分野で周知でもあるように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして公知の、免疫応答の非特異的刺激因子の使用によって増大され得る。例示的な好ましいア

50

ジュバントとしては、完全フロイントアジュバント（殺傷された *Mycobacterium tuberculosis* を含有する免疫応答の非特異的刺激因子）、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

【0034】

ポリクローナル抗体の生成に使用される免疫原組成物の量は、免疫原および免疫に使用される動物の性質に依存して変化する。免疫原を投与するために、種々の経路が使用され得る（皮下、筋肉内、皮内、静脈内および腹腔内）。ポリクローナル抗体の生成は、免疫後の種々の時点で免疫された動物の血液を採取することによって、モニタリングされ得る。

【0035】

第2のブースター注射もまた、与えられ得る。ブーストプロセスおよび滴定プロセスは、適切な力価が達成されるまで、繰り返される。所望のレベルの免疫原性が得られた場合、この免疫された動物を出血させ、そして血清が単離され、そして保存されるか、またはこの動物を使用して、mAbs を作製する（以下）。 10

【0036】

ウサギポリクローナル抗体の生成について、動物は、耳静脈を介して出血され得るか、あるいは心臓穿刺によって出血され得る。得られた血液を凝固させ、次いで、遠心分離して、全細胞および血餅から血清成分を分離する。この血清を、種々の用途で使用されるのと同じように使用するか、または所望の抗体画分を、周知の方法（例えば、固体マトリクスまたはプロテインAに結合した別の抗体またはペプチドを使用するアフィニティクロマトグラフィー、続く精製のための抗原（ペプチド）アフィニティカラム）によって、精製し 20

【0037】

（B．モノクローナル抗体）

mAb は、周知の技術（例えば、米国特許第4,196,265号（本明細書中に参照として援用される）に例示される技術）の使用を介して容易に調製され得る。代表的には、この技術は、適切な動物を選択された免疫原組成物（例えば、精製したか部分的に精製したsEPCRタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド）で免疫化することを含む。この免疫組成物は、抗体産生細胞を刺激するに効果的な様式で投与される。

【0038】

モノクローナル抗体（MAb）を作製するための方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製するための方法と同一のラインに沿って始まる。げっ歯類（例えば、マウスおよびラット）は、好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、サルの細胞もまた可能である。ラットの使用は、特定の利点を提供し得る（Godling, 1986, pp. 60-61）が、マウスが好ましく、BALB/cマウスが、最も慣用的に使用され、安定な融合物のより高いパーセントを一般に与えるものとして、最も好ましい。 30

【0039】

動物は、（一般的には上記されるような）抗原を注射される。抗原は、必要ならば、キャリア分子（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン）に結合され得る。抗原は、代表的には、アジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント）と混合される。同一の抗原でのブースター注射は、約2週間の間隔で生じる 40

【0040】

免疫化に続いて、抗体産生について潜在性を有する体細胞（特に、Bリンパ球（B細胞））は、MAb作製プロトコルにおける使用について選択される。これらの細胞は、生検の脾臓またはリンパ節から得られ得る。脾細胞およびリンパ節細胞が好ましい。なぜなら、脾細胞は、分裂段階の形質芽球における抗体産生細胞の豊富な供給源であるからである。

【0041】

しばしば、動物のパネルは、免疫化されており、そして最大の抗体力価を有する動物の脾臓が、取り出され、そして脾臓リンパ球が、シリンジで脾臓をホモジナイズすることによって得られる。代表的には、免疫化したマウス由来の脾臓は、約 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 50

個のリンパ球を含む。

【0042】

次いで、免疫化した動物由来の抗体産生Bリンパ球は、不死化骨髓腫細胞の細胞（一般に、免疫化された動物と同一種の細胞）と融合される。ハイブリドーマ産生融合手順における使用に適切な骨髓腫細胞株は、好ましくは、非抗体産生であり、高い融合効率を有し、次いで、所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択培地中で増殖し得なくする酵素欠損を有する。

【0043】

多くの骨髓腫細胞のいずれか1つは、当業者に公知であるように使用され得る（Goding, pp. 65 - 66, 1986; Campbell, pp. 75 - 83, 1984（各々が、本明細書中に参考として援用される）。例えば、免疫動物がマウスである場合、P3 - X63 / Ag8、X63 - Ag8.653、NS1 / 1. Ag4.1、Sp210 - Ag14、FO、NSO / U、MPC - 11、MPC11 - X45 - GTG1.7およびS194 / 5XX0 Bulが使用され得；ラットについて、R210. RCY3、Y3 - Ag1.2.3、IR983Fおよび4B210が使用され得；ならびにU - 266、GM1500 - GRG2、LICR - LON - HMy2およびUC729 - 6は、ヒト細胞融合物との結合に全て有用である。

【0044】

1つの好ましいマウス骨髓腫細胞は、NS - 1骨髓腫細胞株（P3 - NS - 1 - Ag4 - 1とも称される）であり、これは、細胞株寄託番号GM3573を請求することによってthe NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repositoryより容易に入手可能である。使用され得る別のマウス骨髓腫細胞株は、8 - アザグアニン耐性マウス骨髓腫SP2 / 0非プロデューサー細胞株である。

【0045】

抗体産生脾臓細胞またはリンパ球細胞と骨髓腫細胞とのハイブリッドを作製するための方法は、通常、体細胞を骨髓腫細胞と2 : 1の割合で混合する工程を包含するが、その割合は、細胞膜の誘導を促進する因子（化学的または電氣的）の存在下で、それぞれ約20 : 1 ~ 約1 : 1まで変動し得る。センダイウイルスを使用する融合法は、Kohler and Milstein (1975; 1976)によって記載されており、そしてGefterら。(1977)によってポリエチレングリコール（PEG）（例えば、37%（v/v）PEG）を使用する方法が記載されている。電氣的に誘導された融合法の使用はまた、適切である（Goding pp. 71 - 74, 1986）。

【0046】

融合手順は、通常、生存可能なハイブリッドを低周波数（約 1×10^{-6} ~ 1×10^{-8} ）で産生する。しかし、これは、選択培地中で培養されることによって生存可能な融合されたハイブリッドが親の注入された細胞（特に、正常には無期限に分裂し続ける、注入された骨髓腫細胞）から分化される場合に、問題を示さない。選択培地は、一般に、組織培養培地中にデノボでのヌクレオチドの合成をブロックする薬剤を含む培地である。例示的かつ好ましい薬剤は、アミノプテリン、メトトレキサートおよびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンおよびピリミジンの両方の合成をデノボでブロックするが、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキサートが使用される場合、培地は、ヒポキサンチンおよびチミジンをヌクレオチドの供給源として補充される（HAT培地）。アザセリンが使用される場合、培地は、ヒポキサンチンで補充される。

【0047】

好ましい選択培地は、HATである。ヌクレオチドサルベージ経路を操作し得る細胞のみが、HAT培地中で生存し得る。骨髓腫細胞は、サルベージ経路の主要酵素（例えば、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T））を欠失し、この細胞は生存し得ない。B細胞は、この経路を操作し得るが、培養物中での制限された寿命を有し、一般に、2週間以内に死ぬ。従って、選択培地中で生存し得る細胞のみが、骨髓腫細胞お

よび B 細胞から形成されるハイブリッドである。

【0048】

この培養は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。代表的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートでの単一クローン希釈による細胞を培養すること、続いて個々のクローン上清を、(約2~3週間後に)所望の活性について試験することによって実施される。アッセイは、感受性であり、単純であり、そして迅速であらねばならない(例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドットイムノプロットングアッセイなど)。次いで、選択されたハイブリドーマは、段階希釈され、そして個々の抗体産生細胞株にクローニングされる。次いで、このクローンは、mAbを提供するために無期限に培養され得る。細胞株は、2つの基本的方法においてmAb産生に活用され得る。

10

【0049】

ハイブリドーマのサンプルは、体細胞および骨髓腫細胞をもととの融合物(例えば、同系マウス)に提供するために使用される、組織適合性の型の動物に注入され得る。必要に応じて、動物は、炭化水素、特に、油(例えば、プリスタン(テトラメチルペンタデカン))で、注入前にプライムされる。注入された動物は、融合された細胞ハイブリッドによって産生される特定のモノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発達させる。次いで、動物の体液(例えば、血清または腹水)は、mAbを高濃度で提供するように穿刺される。

【0050】

個々の細胞株はまた、インビトロで培養され得る。ここで、mAbは、高濃度で容易に得ることができる培養培地中に天然に分泌される。いずれかの手段によって産生されるmAbは、所望ならば、濾過、遠心分離および種々のクロマトグラフィー法(例えば、HPLCまたはアフィニティクロマトグラフィー)を使用してさらに精製され得る。本発明のモノクローナル抗体のフラグメントは、酵素(例えば、ペプシンまたはパパイン)での消化、および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断を含む方法によって精製されたモノクローナル抗体から精製され得る。あるいは、本発明によって含まれるモノクローナル抗体フラグメントは、自動化ペプチド合成機を使用して合成され得る。

20

【0051】

分子クローニングアプローチがモノクローナル抗体を作製するために使用され得ることはまた、企図される。これについて、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーが、免疫化された動物の脾臓から単離されたRNAより調製され、そして適切な抗体を発現するファージミドが、抗原およびコントロール細胞(例えば、正常対腫瘍細胞)を発現する細胞を使用するパニングによって選択される。慣用的なハイブリドーマ技術を超えるこのアプローチの利点は、約 10^4 倍の多さの抗体が、単一周回で産生およびスクリーニングされ得、そして、新たな特異性が、適切な抗体を発見する機会をさらに増加させるH鎖とL鎖の組み合わせによって作製されるということである。

30

【0052】

(C. イムノアッセイ)

なおさらなる実施形態において、従って、本発明は、sEPCRを結合、定量またはさもなくば一般的に検出するための免疫検出法に関する。種々の有用な免疫検出法の工程は、学術文献(例えば、Nakamuraら(1987;本明細書中に参考として援用される))に記載されている。イムノアッセイは、そのほとんどが単純かつ直接的に感知する、結合アッセイである。特定の好ましいイムノアッセイは、種々の型の酵素免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)および免疫ビーズ捕獲アッセイである。しかし、検出が、このような技術に限定されないことは、容易に明白であり、そしてウエスタンブロットング、ドットブロットング、FACS分析などもまた、本発明と合わせて使用され得る。

40

【0053】

一般に、免疫結合法は、タンパク質、ペプチドまたは抗体を含むことが予想されるサンプルを得る工程、およびこのサンプルを、本発明に従って抗体またはタンパク質またはペプ

50

チドと接触させる工程、を包含し、この場合は、免疫複合体の形成を可能にするに効果的な条件下であり得る。

【0054】

本発明の免疫結合法は、サンプル中の反応性成分の量を検出または定量化するための方法を含み、この方法は、結合プロセスの間に形成される任意の免疫複合体の検出または定量を必要とする。ここで、本発明者らは、s E P C Rを含むことが予想されるサンプルを得、そしてこのサンプルを抗体と接触させ、次いで、特定の条件下で形成される免疫複合体の量を検出または定量する。

【0055】

選択された生物学的サンプルを、抗体または抗血清と、効果的な条件下で、そして免疫複合体の形成（一次免疫複合体）を可能にするに十分な期間にわたって接触させることは、一般に、組成物をサンプルに単に添加し、そしてs E P C Rとの免疫複合体を形成するためにこの混合物を抗体と十分な期間にわたってインキュベートする様式である。この期間の後、サンプル-抗体組成物は、一般に、洗浄して非特異的に結合した任意の抗体種を除去し、これらの抗体のみが、検出されるべき一次免疫複体内に特異的に結合することを可能にする。

10

【0056】

一般に、免疫複合体の検出は、当該分野において周知であり、多くのアプローチの適用を介して達成され得る。これらの方法は、一般に標識またはマーカの検出に基づく（例えば、任意の放射活性、蛍光、生物学的タグまたは酵素的タグあるいは当該分野における標準法）。このような標識の使用に関する米国特許としては、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号および同第4,366,241号（各々が、本明細書中に参考として援用される）が挙げられる。

20

【0057】

特定の実施形態において、一次免疫複体内に結合される最初に添加される成分は、コードされるタンパク質、ペプチドまたは対応する抗体に対して結合親和性を有する第2の結合リガンドによって検出され得る。これらの場合において、第2の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。第2の結合リガンドは、それ自体しばしば抗体であり、よってこれは、「二次」抗体と称され得る。一次免疫複合体は、二次免疫複合体の形成を可能にするに効果的な条件下で、二次免疫複合体の形成を可能にするに十分な期間にわたって、標識された第2の結合リガンドまたは抗体と接触される。次いで、第2の免疫複合体は、一般に、非特異的に結合した任意の標識二次抗体またはリガンドを洗浄して除去し、次いで、二次免疫複合体中に残存した標識は、検出される。

30

【0058】

さらなる方法は、2工程アプローチによる一次免疫複合体の検出を含む。コードされたタンパク質、ペプチドまたは対応する抗体に対する結合親和性を有する第2の結合リガンド（例えば、抗体）を使用して、上記のような二次免疫複合体を形成する。洗浄後、二次免疫複合体は、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするに効果的な条件下で、免疫複合体の形成を可能にするに十分な時間にわたって、二次抗体に対する結合親和性を有する第3のリガンドまたは抗体と接触させられる。第3のリガンドまたは抗体は、よって形成される三次免疫複合体の検出を可能にする、検出可能な標識に連結される。この系は、（所望される場合）シグナル増幅を提供する。

40

【0059】

E L I S Aとして知られる酵素免疫測定法は、本発明における特定の目的である。1つの例示的E L I S Aにおいて、本発明のコードされたタンパク質に結合する抗体は、タンパク質親和性を示す選択された表面（例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェル）上に固定化される。次いで、s E P C Rを含むことが予想される試験組成物が、このウェルに添加される。結合、および非特異的に結合した免疫複合体の洗浄の後、結合した抗原は、検出され得る。

50

【0060】

検出は、一般に、検出可能な標識に連結されている、標的タンパク質に対して特異的な二次抗体の添加によって達成される。この型のELISAは、単純な「サンドイッチELISA」である。検出はまた、二次抗体の添加、続く三次抗体の添加によって達成され得る。この三次抗体は、二次抗体に対する結合親和性を有し、この三次抗体は、検出可能な標識に連結されている。

【0061】

別の例示的ELISAにおいて、sEPCRを含むと疑われるサンプルは、ウェル表面に固定化され、次いで、本発明の抗体と接触される。結合させ、洗浄して非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した抗体を検出する。最初の抗体は、検出可能な標識に連結され、免疫複合体が直接検出され得る。繰り返して、免疫複合体は、第1の抗体に対する結合親和性を有する第2の抗体（この第2の抗体は、検出可能な標識に連結されている）を使用して、検出され得る。

10

【0062】

sEPCRが固定化される別のELISAは、検出において抗体競合の使用を包含する。このELISAにおいて、標識された抗体は、ウェルに添加され、sEPCRを結合させ、それらの標識により検出される。次いで、未知サンプルにおけるマーカー抗原の量は、コーティングしたウェルとのインキュベーション前またはインキュベーションの間に、このサンプルと標識された抗体を混合することにより決定される。このサンプル中のマーカー抗原の存在は、そのウェルに結合させるために利用可能な抗体の量を減少させるように働き、よって最終的なシグナルを減少させる。これは、未知サンプル中の抗体を検出するに適切である。ここで非標識抗体は、抗原をコーティングしたウェルに結合し、また標識抗体を結合させるに利用可能な抗原の量を減少させる。

20

【0063】

使用される形式に関係なく、ELISAは、共通した、特定の特徴（例えば、コーティング、インキュベートまたは結合、洗浄して、非特異的に結合した種の除去、および結合した免疫複合体の検出）を有する。例えば、抗原または抗体のいずれかを付いたプレートのコーティングにおいて、一般に、抗原または抗体の溶液とともにプレートのウェルを、一晚または特定の時間のいずれかにわたりインキュベートする。次いで、プレートのウェルを、洗浄して、不完全に吸着した物質を除去する。次いで、ウェルの残りの利用可能な表面の全てを、試験血清に関する抗原に中立の非特異的タンパク質を使用して「コーティング」する。これらとしては、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインおよび粉乳の溶液が挙げられる。このコーティングにより、固定化表面上の非特異的吸着部位のブロッキングが可能になり、従って、表面への抗血清の非特異的結合により引き起こされるバックグラウンドを減少させる。

30

【0064】

ELISAにおいて、直接的な手順より、二次検出手段または三次検出手段を使用することがより慣用的である。従って、ウェルにタンパク質または抗体を結合し、非反応性物質を使用してコーティングしてバックグラウンドを減少させ、洗浄して非結合物質を除去した後、固定化表面は、免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするに有効な条件下で、試験されるコントロールおよびサンプルと接触される。次いで、免疫複合体の検出は、標識された二次結合リガンドまたは二次抗体、あるいは二次結合リガンドまたは二次抗体（標識された三次抗体または三次結合リガンドと共同して）を必要とする。

40

【0065】

「免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするに有効な条件下」とは、好ましくは、溶液（例えば、BSA、ウシグロブリン（BGG）およびリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）/Tween）を使用して抗原および抗体を希釈することを包含する条件を意味する。これら添加された薬剤はまた、非特異的バックグラウンドの減少を補助する傾向がある。

【0066】

「適切な」条件はまた、インキュベーションが、有効な結合を可能にするに十分な温度お

50

よび時間にて行われることを意味する。インキュベーション工程は、代表的には、約1時間から2～4時間、好ましくは、25～27の次元の温度にて行われるか、または約4程度にて一晩行われ得る。

【0067】

ELISAにおける全てのインキュベーション工程の後に、非複合体化物質を除去するために、接触された表面を洗浄する。好ましい洗浄手順は、水溶液（例えば、PBS/Tweenまたはホウ酸緩衝液）を用いて洗浄することを含む。試験サンプルと通常結合した材料との間の特異的免疫複合体の形成、引き続き洗浄の後に、わずかな量の免疫複合体の存在すら決定され得る。

【0068】

検出手段を提供するために、第2の抗体または第3の抗体は、検出を可能とする会合標識を有する。好ましくは、これは、適切な色素原生基質とともにインキュベートした際に発色を生じる。従って、例えば、第1の免疫複合体または第2の免疫複合体を、ウレアーゼ結合体化抗体、グルコースオキシダーゼ結合体化抗体、アルカリホスファターゼ結合体化抗体、ペルオキシダーゼ（hydrogen peroxidase）結合体化抗体と一定時間かつさらなる免疫複合体形成の発生に都合のよい条件下で接触させ、これらをインキュベートする（例えば、PBS-TweenのようなPBSが含有溶液中で室温にて2時間インキュベートする）。

【0069】

標識抗体とのインキュベーション、および引き続き洗浄、非結合物質の除去の後、酵素標識がペルオキシダーゼの場合、例えば、色素原生基質（例えば、尿素とプロモクレゾールパープル、または2,2'-アジド-ジ-3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS）と H_2O_2 ）とのインキュベーションにより、標識の量が定量される。次いで、定量は、例えば、可視スペクトル分光光度計を使用して、発色の程度を測定することにより達成される。

【実施例】

【0070】

（V. 実施例）

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために含まれる。以下の実施例に開示される技術が、本発明の実施においてうまく機能することが本発明者により発見された技術を示し、従って、その実施のための好ましい態様を構成するとみなされ得ることが当業者により認識されるべきである。しかし、本開示に鑑みて、多くの変更が、開示された特定の実施形態において行われ得、本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく同様または類似の結果を得ることがなされることを、当業者は認識するべきである。

【0071】

（実施例1：結果）

可溶性EPCRを、トロンピンおよびいくつかの炎症性メディエータにより誘導されたメタロプロテイナーゼ活性によりインビトロで生成する（Xuら, 2000）。従って、本発明者らは、可溶性EPCRレベルが、インビボトロンピン生成を反映するか否かを決定することを選択した。このことを評価するために、可溶性EPCRレベルを、経口抗凝固治療に対して患者において決定し、正常な、明らかに健康な成体集団中に見出された可溶性EPCRレベルと比較した（図1Aおよび1B）。これらのサンプルを、フランスの共同研究者から得た（Dr. M. Grimeaux, Serbio/Diagnostic Astago）。可溶性EPCRレベルを、モノクローナル抗体ベースの酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELISA）を使用してアッセイした（本明細書中に参考として援用される米国特許第5,804,392号）。正常な集団（図1A）は、 $165.8 \pm 115.8 \text{ ng/ml}$ の可溶性EPCRレベルを有した。経口抗凝固治療の患者（図1B）は、 $105.3 \pm 70.8 \text{ ng/ml}$ のより顕著に低下した可溶性EPCRレベルを有した（ $p < 0.0001$; $n = 55$ ）。この患者集団内で、3種類の異なる抗凝固薬物を使用した：Coumadine、Previscan、およびシントローム。3

10

20

30

40

50

種類の機能全てが、ビタミンKアンタゴニストであるという点で、これらはアルファリン（クマリン）と類似である。Previscanは、フランスおよびドイツで使用されている主な経口抗凝固剤である。CoumadineおよびPreviscanはともに半減期が長い（数日）のに対して、シントロームの半減期は、比較的短い（約8.5時間）。使用される薬物による個々のデータの分析は、可溶性EPCRレベルが、Previscanを摂取している患者において最も低いようであることが明らかになった（図2）。しかし、薬物クリアランス速度が異なり、患者がどの程度の期間その医薬品を摂取し続けていたかが分からなかったため、統計学的分析は困難である。このことは、循環からの機能的抗凝固因子のクリアランス速度が有意に異なるので、考慮すべき事項である。第VII因子の半減期は、わずか3～5時間であるのに対し、プロトロンビンの半減期は、60～100時間である。

10

【0072】

血漿sEPCRレベルと抗凝固治療との間をさらに評価するために、サンプルを、正常な成体集団および静脈内非分画ヘパリン治療の患者から得た（図3）。このデータを、図3、4A、4Bおよび5に示し、このデータは、イタリアにいる共同研究者（Dr. Armando D'Angelo, Scientific Institute H. S. Raffaele, Milan, Italy）により譲り受けたサンプルから得た。このイタリア集団からの正常サンプルは、 $195.1 \pm 114.0 \text{ ng/ml}$ のsEPCRレベルを有し（図3左； $n = 49$ ）、これは、フランスからのサンプルにおいて認められたsEPCRレベルとは有意差がなかった（図1A）。静脈内ヘパリン治療の患者は、より低いsEPCRレベル（平均 $147.1 \pm 39.3 \text{ ng/ml}$ ）を有した（図3右； $p < 0.09$ ； $n = 10$ ）。ヘパリン処置患者サンプルの数は少ないが、血漿sEPCRレベルの減少は、経口抗凝固剤治療を受けている患者において上記で観察された傾向をたどっている。

20

【0073】

正常成体被験体におけるワルファリン処置の血漿sEPCRに対する効果は、インフォームドコンセントを受けた6名の成体ボランティアにおいて研究した（図4Aおよび4B）。これらの被験体は、ワルファリン（経口抗凝固剤）を7日間摂取し、さらに追跡期間は15日までであった。ワルファリンを開始する前に、0日目に血液を採取し、次いで、INRレベルの評価のために各日に血液を採取した。血漿を、ELISAによるsEPCRレベルの決定のために、 -80°C で保存した。各被験体の日々のINR値に基づいて、彼らについて必要であれば、ワルファリン投薬量を調節した。図4Aに示されるように、血漿sEPCRレベルは、ワルファリン処置期間の間に減少した。これは、sEPCRレベルが減少する前の24～48時間という時間的ずれが存在し、減少の程度が被験体間で変動した。ワルファリンを中断して約24～48時間後、sEPCRレベルは、全ての被験体において再び増大し始め、被験体の大部分は、15日目までに処置前の値に達した。これらサンプルのINR値は、本質的に、sEPCRレベルをそのまま映し出した（図4B）。

30

【0074】

ワルファリンの投与が、健常人におけるトロンビン生成の減少を付随することを確認するために、F1+2レベルをモニターした（図6）。F1+2のレベルは、ワルファリン投与の結果として減少し、5日目に有意に減少した（最初の値の39%へ； $P < 0.05$ ）。

40

【0075】

経時的なsEPCRの類似の減少を、経口抗凝固剤治療を開始している患者において観察した（図5）。抗凝固剤の開始前に血液を採取し、sEPCRレベルを患者らの治療の過程にわたりELISAにより決定した。心房細動を有する患者が3名、ならびに拡張型心筋症、僧帽弁疾患、心房細動+発作、ならびに深部静脈血栓症（DVT）を有する患者が1名ずつであった。研究した患者全てにおいて、sEPCRレベルは、経口抗凝固剤治療の開始後に、時間とともに減少した。正常被験体と同じように、sEPCRレベルの減少

50

の程度は、変動した。予測されるように、F 1 + 2 レベルは、ワルファリン治療の開始後に、患者の大部分において減少し、特に、より高いF 1 + 2 レベルを有する患者において減少した(図7)。

【0076】

これらの観察は、経口抗凝固剤治療がトロンビン生成を減少させるのみならず、可溶性sEPCRレベルもまた減少させることを示す。このデータは、高INR値(すなわち治療に役立つINR値)および付随する高sEPCR値を有する患者が、トロンビン生成および疾患病理に関して適切に制御されないかもしれないことをさらに示唆する。この概念は、経口抗凝固剤シントロームでの処置を受けている患者の、表1に示されるINRおよびsEPCRデータにより例示される。2名の患者は、治療に役立つINR値(2.0および2.6)を有するが、sEPCRレベルは非常に上昇していた(369および357 ng/ml)。別の2名の患者は、INRレベルが上昇しており(3.3および3.6)、このことは、シントローム投薬量が高いかまたは処置時間が長いとしても、彼らのsEPCRレベルはなお上昇したままである(198および293 ng/ml)ことを示唆する。臨床医は、INR値に依存して患者の凝固状態を評価する傾向があり、現在のデータは、INR値単独では十分ではないかもしれないことを示唆する。

10

【0077】

(表1:シントロームを摂取している患者におけるINR値およびsEPCR値)

【0078】

【表1】

20

血漿	INR	[sEPCR] ng/ml
1210234	1.5	140
1209226	1.8	135
1211214	1.9	167
1211208	2.0	369
1012210	2.6	63
1029140	2.6	357
1223106	2.7	131
1228155	2.7	92
1221210	2.8	127
1208137	3.1	59
1223193	3.1	61
928201	3.3	198
1221235	3.3	171
1228246	3.4	164
1012192	3.5	56
1208103	3.6	293
929179	4.5	172
1221195	>5.0	56
928231	>5.0	61
929212	>5.0	54
1006257	>5.0	94

10

20

30

このことに関連するのは、sEPCRレベルに関して、正常な、明らかに健常な集団内に少なくとも2つの亜集団が存在することである。研究したフランス人被験体およびイタリア人被験体両方において、大部分のsEPCRレベルは、約75~175 ng/mlの範囲内にある(図1A、1Bおよび3を参照のこと)。残りのsEPCRレベルは、200~700 ng/mlに分散している。本発明者らは、環境的要因(喫煙、食餌)も遺伝的要因(多型、性別)も排除できなかったが、ワルファリン処置の間の正常被験体におけるsEPCRレベルの観察(図4Aおよび図4B)は、異常に高いsEPCRレベルを有するこれら無症候性の個体が血栓形成事象の危険性にあり得るということを示唆する。従って、sEPCRレベルはまた、過剰凝固状態についてのマーカーであり得る。

40

【0079】

(実施例2:考察)

可溶性EPCR形成の現在の理解は、トロンピンがメタロプロテイナーゼ活性を誘導し、次いで、このメタロプロテイナーゼ活性が膜結合EPCRそのもの(parent)をタンパク質分解して可溶性レセプターを放出するようになることである。このプロセスのイ

50

ンビトロでの時間枠は、数時間である（Xuら，2000）。これを、ヘパリンの非存在下で、トロンビン-アンチトロンビン（TAT）形成に関してはわずか数分である（ヘパリンの存在下では約2300倍に促進される（Belleraら，1979））ことと比較する。従って、sEPCR形成のモニターに伴う時間枠は、トロンビン自体のものよりはるかに長い。図4Aおよび4Bに示すデータは、正常個体におけるsEPCRレベルがワルファリン開始後の24～48時間以内に低下し始め、逆に、ワルファリンを中止して24～48時間後に上昇し始めることを示す。図5で3名の患者により示されるように、数名の患者においては、この時間はより長い可能性があり、彼らのsEPCRレベルは、わずか処置の3～4日目に低下した。静脈切開の間にインビトロで生成されたトロンビン（他の試験に伴う大きな問題である）が、可溶性EPCRレベルに対してまったく効果がないということにもなる。EPCRレベルの標準化も問題ではない。なぜなら、ELISAアッセイは、ある製造業者の標準化試薬を使用するからである。

10

【0080】

可溶性EPCRアッセイに関する本発明の潜在的な用途は、経口抗凝固剤治療または他の抗凝固剤治療を受けるいずれの患者集団をもモニターすることを包含する。いくつかの現在の予測によれば、この群に、1年あたり少なくとも約200～300万人の患者が加わる。米国において、心房細動または機械的心臓弁を有する150万人を超える患者が、発作および関連する心血管の問題の予防の補助とするために、現在ある種の経口抗凝固剤または抗血小板物質を摂取している。トロンビン生成またはトロンビン活性を標的とする多くの抗凝固剤治療が、種々の患者集団において、使用中（ヘパリン、低分子量ヘパリン）であるかまたは試験中である（抗血小板化合物、第Xa因子インヒビター）。これらの患者全ての凝固状態をモニターして、過小投薬および凝固も、過剰投薬および出血も、防止しなければならない。新たなアッセイは、抗凝固剤治療の過小投薬を報告するために特に有用であり得る。なぜなら、最も一般的に使用される凝固スクリーニング法（プロトロンビン時間、PT）は、過小投薬に対しては比較的感度が低いからである。従って、多くの患者は、気付かないうちに血栓形成事象の危険性にあり得、この危険性は、彼らの抗凝固治療および抗凝固剤の選択のより良好なモニタリングにより予防され得る。逆に多くの患者（例えば、心筋梗塞）は、さらなる血栓形成の危険性はないかもしれないが、彼らは、自動的に予防目的で長期間の抗凝固治療を受け続けている。なぜなら、利用可能なマーカーがないからである。このsEPCRアッセイは、臨床医が、血栓形成の危険性が低い患者を選択する助けとなり、それにより、患者への不要な投薬、問題および費用を防止し得る。

20

30

【0081】

さらに、sEPCRアッセイを使用して、患者または正常な集団において、凝固能亢進状態を同定またはモニタリングし得る。凝固能亢進性は、原疾患がうっ血平衡を変化させる多くの患者集団において、重大な問題である。これらの集団としては、癌、敗血症、糖尿病、アテローム性動脈硬化症または自己免疫疾患を有する患者（Careyら，1998）、ならびに遺伝性および後天性の凝固障害を有する患者（Kearonら，2000；Careyら，1998；Laneら，2000）が挙げられる。sEPCRアッセイはまた、アテローム性動脈硬化症状態に対するマーカーとしての血漿コレステロールおよび低-高密度リポタンパク質（LDL、HDL）レベルの一般的な使用に類似して、無症候性の個体における凝固能亢進状態に対するマーカーとして、価値があり得る。本発明者らは、過剰に高いsEPCRレベルを有する正常な個体の亜集団を繰返し観察した。これらの個体は、約20～25%の見かけ上健康な成体集団を含み、そしてこれらの個体は、血栓事象に対する危険が増加しているかもしれない。sEPCRレベルに寄与する、トロンビン以外の要因が存在し得るが、正常な被験体におけるsEPCRレベルがワルファリン処置の間に低下するという観察は、トロンビン活性が、血漿sEPCRレベルに対して直接的な影響を有することを、強く示唆する。

40

【0082】

本明細書中に開示され、そして特許請求される組成物および方法の全ては、本開示を参照

50

して、過度に実験することなく作製および実施され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態の観点から記載されているが、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される組成物および方法、ならびにその方法の工程または工程の順序に対して、変化が適用され得ることが、当業者に明らかである。より具体的には、化学的にと生理学的にとの両方で関連する特定の薬剤は、同一または類似の結果を達成しながら、本明細書中に記載される薬剤と置換され得ることが明らかである。当業者に明らかな、このような類似の置換および改変の全ては、添付の特許請求の範囲によって規定されるような、本発明の精神、範囲および概念に入るとみなされる。

【0083】

(VI. 参考文献)

以下の参考文献は、本明細書中に記載されるものに対する例示的な手順の補充または他の詳細の補充を提供し、具体的に本明細書中に参考として援用される：

米国特許第3,817,837号

米国特許第3,850,752号

米国特許第3,939,350号

米国特許第3,996,345号

米国特許第4,196,265号

米国特許第4,275,149号

米国特許第4,277,437号

米国特許第4,366,241号

米国特許第5,804,392号

"The European Atrial Fibrillation Trial Study Group. Optimal Oral Anticoagulant Therapy in Patients Without Nonrheumatic Atrial Fibrillation and Recent Cerebral Ischemia," *N. E. Jour. Med.*, 333:5-10, 1995.

"The Stroke Prevention in Reversible Ischemia Trial (SPIRIT) Study Group. A Randomized Trial of Anticoagulants Versus Aspirin after Cerebral Ischemia of Presumed Arterial Origin," *Ann. Neurol.*, 42:857-965, 1997.

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988.

Beller⁵, "Fractionation of Low Molecular Weight Heparin Species and Their Interaction with Antithrombin," *J. Biol. Chem.*, 254:2902-2913, 1979.

Breckenridge, A. M., "Oral Anticoagulant Drugs: Pharmacokinetic Aspects," *Semin. Hematol.*, 15:19-26, 1978.

Campbell: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 第13巻, BurdenおよびVon Knippenberg (編), Elsevier, Amsterdam, pp. 71-74; 75-83, 1984.

Carey⁵, "Disseminated Intravascular Coagulation: Clinical and Laboratory Aspects," *Amer. J. Hematol.*, 59:69-73, 1998.

10

20

30

40

50

- Chan S, "Warfarin Induced Skin Necrosis," *B r . J . S u r g .*, 87:266 - 272, 2000.
- Connegieter S, "Optimal Oral Anticoagulant Therapy in Patients with Mechanical Heart Valves," *N . E . J o u r . M e d .*, 333:11 - 17, 1995.
- Esmon, C.T., "Natural Anticoagulants and Their Pathways," *Handbook of Experimental Pharmacology*, [編者: Born, G.V.R., Cuatrecasas, P., Gatlen, D., Herken, H., Starke, K., Taylor, P.], Springer-Verlag, New York; pp. 447 - 476, 1999. 10
- Fukudome および Esmon, "Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor," *J . B i o l . C h e m .* 269:26486 - 26491, 1994.
- Fukudome S, "The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor," *J B i o l C h e m .*, 271(29):17491 - 17498, 1996. 20
- Gefter S, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *S o m a t i c C e l l G e n e t*, 3(2):231 - 6, 1977.
- Goding: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第2版, Academic Press, Orlando, Fla., pp. 60 - 66, および 71 - 74, 1986.
- Goldstein S, "Is Glycohemoglobin Testing Useful in Diabetes Mellitus? Lessons from the Diabetes Control and Complications Trial," *C l i n . C h e m .*, 40:1637 - 1640, 1994. 30
- Hrish S, "Oral Anticoagulants: Mechanisms of Action, Clinical Effectiveness and Optimal Therapeutic Range," *C h e s t*, 114、補遺 445S - 469S, 1998.
- Kearon S, "Management of Patients with Hereditary Hypercoagulable Disorders," *A n n u . R e v . M e d .*, 51:169 - 185, 2000.
- Kohler および Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *N a t u r e*, 256(5517):495 - 7, 1975. 40
- Kohler および Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *E u r J I m m u n o l*, 6(7):511 - 9, 1976.
- Kurosawa S, "Identification of Functional Endothelial Protein C Receptor in Plasma," *J . C l i n . I n v e s t .*, 100:411 - 418, 1997.
- Kurosawa S, "Plasma Levels of Endothelial 50

- Protein C Receptor are Elevated in Patients with Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus: Lack of Correlation with Thrombomodulin Suggests Different Pathological Processes, "Blood, 91:725-727, 1998.
- Lane⁵, "Role of Hemostatic Gene Polymorphisms in Venous and Arterial Thrombotic Disease, "Blood, 95:1517-1532, 2000.
- Laupacis⁵, "Risk Factors for Stroke and Efficacy of Antithrombotic Therapy in Atrial Fibrillation, Analysis of Pooled Data from Five Randomized Controlled Trials, "Arch. Intern. Med., 154:1449-1457, 1994. 10
- Levine⁵, "Hemorrhagic Complications of Anticoagulant Treatment, "Chest, 114、補遺:511S-523S.
- Nakamura⁵: Handbook of Experimental Immunology (第4版), Weir, Herzenberg, Blackwell, Herzenberg, (編). 第1巻, 第27章, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987. 20
- O'Reilly, R.A., "Vitamin K and the Oral Anticoagulant Drugs, "Annu. Rev. Med., 27:245-261, 1976.
- PCT/US95/09636
- Regan⁵, 1996, J. Biol. Chem. 271:17499-17503
- Riley⁵, "Clinical Utilization of the International Normalized Ratio (INR), "J. Clin. Lab. Anal., 14:101-114, 2000.
- Stearns-Kurosawa⁵, "The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex, "Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93:10212-10216, 1996. 30
- Sutcliffe⁵, "Aspects of Anticoagulant Action: A Review of the Pharmacology, Metabolism and Toxicology of Warfarin and Coumatals, "Rev. Drug Metabol. Drug Interact., 5:225-272, 1987.
- Takahashi⁵, "Circulating Thrombomodulin as a Novel Endothelial Cell Marker: Comparison of Its Behavior with von Willebrand Factor and Tissue-Type Plasminogen Activator, "Am. J. Hematol., 41:32-39, 1992. 40
- Takano⁵, "Plasma Thrombomodulin in Health and Diseases, "Blood, 76:2024-2029, 1990.
- van der Meer⁵, "Bleeding Complications in Oral Anticoagulant Therapy: An Analysis of Risk Factors, "Arch. Intern. Med., 153:1557-1562, 1993.
- Wada⁵, "Plasma Thrombomodulin as a Marker 50

of Vascular Disorders in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Disseminated Intravascular Coagulation," Am. J. Hematol., 39:20-24, 2000.

Xu, "Metalloproteolytic Release of Endothelial Protein C Receptor," J. Bio. Chem., 275:6038-6044, 2000.

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】図1Aは、正常な見かけ上健康な成体集団におけるsEPCRレベルを示すグラフである(n=200;左)。平均および標準偏差を含める。図1Bは、抗凝固剤治療を受けている成体患者集団におけるsEPCRレベルを示すグラフである(n=55)。平均および標準偏差を示す。

【図2】図2は、抗凝固剤(クマジン、プレビスカン、シントローム)の機能下での、患者のsEPCRレベルを示すグラフである。平均および標準偏差を示す。

【図3】図3は、健康な成体集団(n=49;左)および未分画ヘパリンを用いた静脈内抗凝固剤治療を受けている患者(n=10;右)におけるsEPCRレベルを示すグラフである。平均および標準偏差を示す。

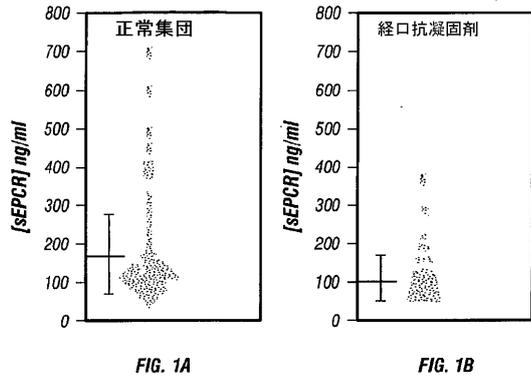
【図4】図4Aは、7日間ワルファリンを投与された6人の正常成体患者におけるsEPCRレベル、およびワルファリン停止後のさらなる7~8日の追跡期間におけるsEPCRレベルを示すグラフである。図4Bは、7日間ワルファリンを投与された6人の正常成体患者におけるINR値、およびワルファリン停止後のさらなる7~8日の追跡期間におけるINR値を示すグラフである。

【図5】図5は、経口抗凝固剤治療の開始前および治療の間の、7人の患者におけるsEPCRレベルを示すグラフである。患者の診断を示す。DVT、深静脈血栓症。

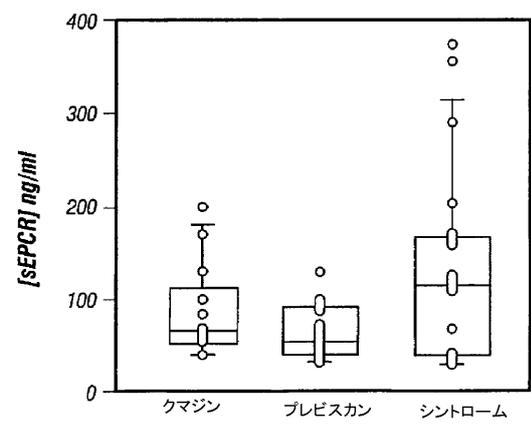
【図6】図6は、7日間ワルファリンを投与された6人の正常成体患者におけるF1+2値、およびワルファリン停止後のさらなる7~8日の追跡期間におけるF1+2値を示すグラフである。レベルは、中央値、四分位数間領域、および平均の95%信頼区間を用いて示す。

【図7】図7は、経口抗凝固剤治療の開始前および治療の間の、7人の患者におけるF1+2レベルを示すグラフである。患者の診断を示す。記号は、図5に従う。

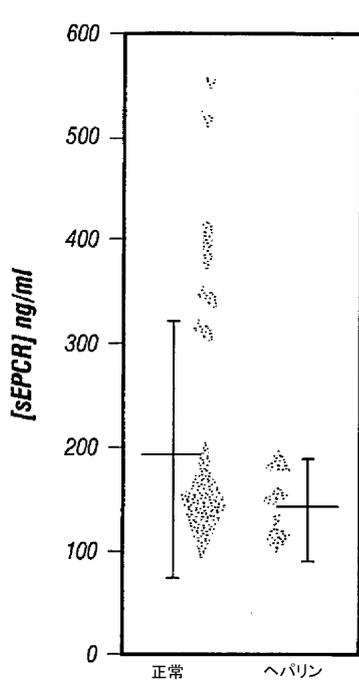
【 図 1 】



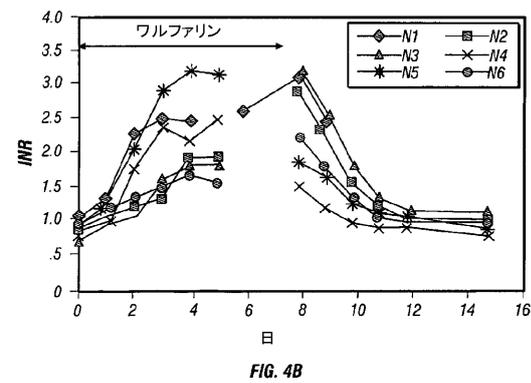
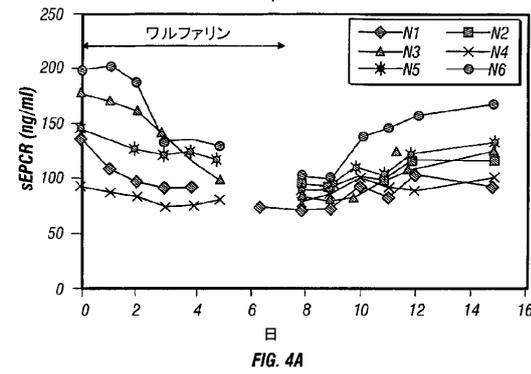
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

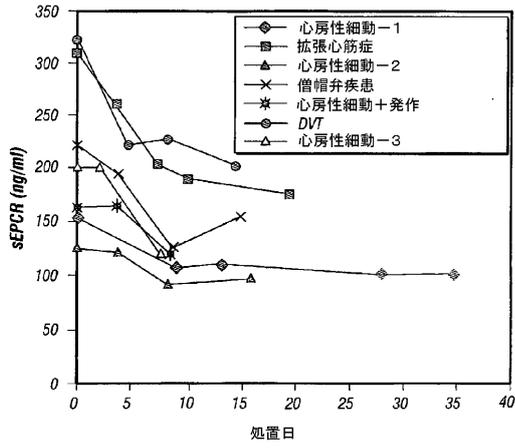


FIG. 5

【 図 6 】

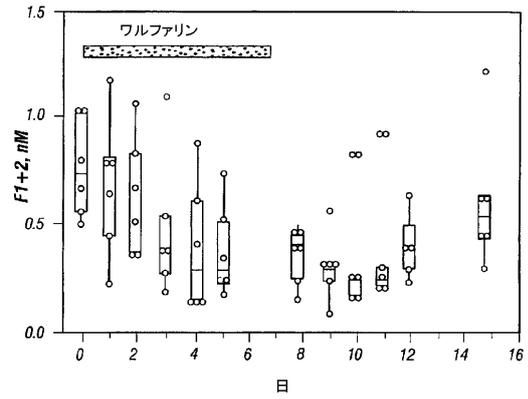


FIG. 6

【 図 7 】

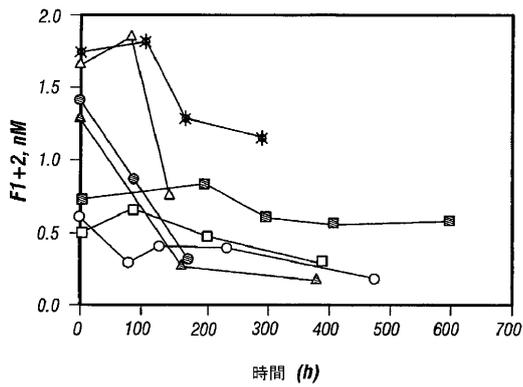


FIG. 7

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066981 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53 [US/US]; 4400 South Coltrane Road, Edmond, OK 73013 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/05023
- (22) International Filing Date: 19 February 2002 (19.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60270,066 20 February 2001 (20.02.2001) US
10/028,741 20 December 2001 (20.12.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60270,066 (CON)
Filed on 20 February 2001 (20.02.2001)
US 10/028,741 (CON)
Filed on 20 December 2001 (20.12.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION [US/US]; 825 Northeast 13th Street, Oklahoma City, OK 73104 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KUROSAWA, Shinichiro [JP/US]; 4400 South Coltrane Road, Edmond, OK 73013 (US); STEARNS-KUROSAWA, Deborah, J.
- (74) Agent: HIGHLANDER, Steven, L.; Fulbright & Jaworski L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NI, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/066981 A2

(54) Title: METHOD FOR MONITORING COAGULABILITY AND HYPERCOAGULABLE STATES

(57) Abstract: The assay of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) is useful to monitor effective thrombin levels and a hypercoagulable state. An assay for sEPCR is therefore useful to monitor ongoing effectiveness of anticoagulant therapy. A sEPCR ELISA assay is particularly useful for this purpose. A state of hypercoagulability in patents or normal individuals can also be identified by such an assay.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

DESCRIPTION**METHOD FOR MONITORING COAGULABILITY
AND HYPERCOAGULABLE STATES**

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

This application claims benefit of priority to U.S. Provisional Application Serial No. 60/270,066, filed February 20, 2001, and U. S. Regular Application Serial No. 10/028,741 filed December 20, 2001, the entire content of which is incorporated by reference herein.

10

I. Field of the Invention

The present invention relates to the fields of vascular biology and inflammation. More particularly, it relates to assays to detect soluble endothelial protein C receptor as a measure of thrombin generation.

15

II. Related Art

In the U.S., more than 55 million people currently suffer from conditions associated with thrombosis. The American Heart Association has estimated that the annual direct expense to the U.S. healthcare system for the treatment of thrombotic disease exceeds \$200 billion. On an annual basis worldwide, nearly 2 million patients will undergo either cardiopulmonary bypass surgery or coronary angioplasty to treat such conditions. Thrombosis and associated diseases affect millions of patients and their manifestations are a source of significant morbidity and mortality.

20

Perturbations of hemostasis are central to the pathogenesis of a hypercoagulable state and may be triggered by multiple, overlapping influences. These include, but are not limited to environmental effects (surgery, diet, smoking, childbirth, trauma), manifestations of a primary disease (heart disease, diabetes, sepsis, hypertension, autoimmune diseases, malignancy) or inheritable defects in the hemostatic factors (protein C, protein S, factor V Leiden, prothrombin, antithrombin III) (Kearon *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2000). The clinical settings include disseminated intravascular coagulation (DIC), deep vein thrombosis (DVT), or perioperative DVT prevention and heart conditions such as acute myocardial infarction, mechanical prosthetic heart valves, mitral valve prolapse, atrial fibrillation, rheumatic mitral

30

WO 02/066981

PCT/US02/05023

valve disease, and dilated cardiomyopathy. In the U.S. alone, more than 1.5 million patients with atrial fibrillation or mechanical heart valves are currently undergoing preventative oral anticoagulant therapy to help prevent stroke and thrombus formation.

5 The current therapeutic approach to a patient with thrombotic disease typically starts with an intravenous course of unfractionated heparin or low-molecular weight heparin, followed by a course of oral anticoagulation. Both therapeutic regimes seek to reduce the activity of thrombin, a potent enzyme responsible for activation of the cells and creation of fibrin that form the basis of a clot. In North America, Warfarin (4-hydroxycoumarin) is the most widely used oral anticoagulant, prescribed for preventing and treating venous or arterial thrombosis and embolism.

10 However, Warfarin is a potentially hazardous drug because the therapeutic window is relatively narrow and the dose-response differs significantly between patients. Warfarin therapy causes major bleeding in about 1-8% of people treated, and intracranial bleeding in about 0.1-0.5% of patients during each year of therapy (van der Meer *et al.*, 1993; Connegieter *et al.*, 1995; Levine *et al.*, **NEED YEAR**). Patients with transient ischemic attack or minor stroke appear to be particularly at risk for bleeding from Warfarin therapy (Laupacis *et al.*, 1994; *Ann. Nuerol.*, 1997; *N.E. Jour. Med.*, 1995). A small population of patients (0.01-0.1%) may exhibit Warfarin-induced skin necrosis, due to thrombosis of veins and capillaries of the subcutaneous fat (Chan *et al.*, 2000). This can be associated with deficiencies of anti-coagulant proteins, or with unbalanced hemostatic control due to the rapid Warfarin-induced loss of the anticoagulants protein S and/or protein C (hours) compared with the procoagulant protein prothrombin (days). Thus, continual monitoring of coagulation status is required.

20 Direct measurement of thrombin is virtually impossible, due to its 30-second half-life in the circulation. While this appears to be a short time, thrombin is an extraordinarily potent enzyme and 30 seconds is more than enough time for it to act on its protein substrates and cellular receptors. Thus, the challenge to coagulation test designers is to create an assay that reflects thrombin levels without interference from other proteins or *in vitro* parameters, an assay that is reproducible and can be standardized, and ideally an assay that reports a history of thrombin levels. This latter challenge is equivalent to that provided by hemoglobin A1c (glycohemoglobin) levels in diabetic patients. Patient compliance and therapeutic efficacy is measured in these patients by the glycosylation levels of their hemoglobin A1c, in essence a mirror of their plasma glucose levels over a 2-4 month period (Goldstein *et al.*, 1994). For

WO 02/066981

PCT/US02/05023

patients on oral anticoagulant therapy, none of these challenge parameters are met by the currently available anticoagulation tests, and improved methods are needed.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

Thus, in accordance with the present invention, there is provided a method for monitoring effective thrombin levels in patients undergoing anticoagulant therapy comprising measuring circulating levels of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR), wherein lowered sEPCR levels relate to lowered effective thrombin activity. The anticoagulant therapy may involve a vitamin K antagonist, may involve at least one of Warfarin, Coumadine, Previscan, Sintrom, heparin, low molecular weight heparin, pentasaccharides, hirudin, hirudin analogs, coagulation factor inhibitors, protein C pathway components, tissue factor pathway inhibitors, anti-platelet compounds or fibrinolytic pathway components. The sEPCR may be measured by an immunoassay, for example, by ELISA. The circulating sEPCR levels may be determined from a sample such as a blood product (serum, plasma), cerebrospinal fluid or urine.

In another embodiment, there is provided a method for monitoring effectiveness of anticoagulant therapy comprising measuring circulating sEPCR levels, wherein decreases in sEPCR indicate that the anticoagulant therapy is effective. The anticoagulant therapy may involve a vitamin K antagonist, may involve at least one of Warfarin, Coumadine, Previscan, Sintrom, heparin, low molecular weight heparin, pentasaccharides, hirudin, hirudin analogs, coagulation factor inhibitors, protein C pathway components, tissue factor pathway inhibitors, anti-platelet compounds or fibrinolytic pathway components. The sEPCR may be measured by an immunoassay, for example, by ELISA. The circulating sEPCR levels may be determined from a sample such as a blood product (serum, plasma), cerebrospinal fluid or urine.

In yet another embodiment, there is provided a method for identifying individuals in a hypercoagulable state comprising measuring circulating levels of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR), wherein elevated sEPCR levels relate to hypercoagulability. The sEPCR may be measured by an immunoassay, for example, by ELISA. The circulating sEPCR levels may be determined from a sample such as a blood product (serum, plasma), cerebrospinal fluid or urine.

In still yet another embodiment, there is provided a method for identifying a patient at risk of developing a hypercoagulability state comprising measuring circulating levels of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR), wherein elevated sEPCR levels relate to an increased risk of hypercoagulability. The sEPCR is measured by an immunoassay, for example, by

WO 02/066981

PCT/US02/05023

ELISA. The patient may have a condition frequently associated with hypercoagulability, such as cancer, sepsis, diabetes, heart diseases, atherosclerosis or autoimmune disease. The sEPCR may be measured by an immunoassay, for example, by ELISA. The circulating sEPCR levels may be determined from a sample such as a blood product (serum, plasma), cerebrospinal fluid or urine.

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

10

FIG. 1A is a graph showing sEPCR levels in a normal, apparently healthy adult population (n=200; left). The mean and standard deviation is included.

FIG. 1B is a graph showing sEPCR levels in an adult patient population undergoing anticoagulant therapy (n=55). The mean and standard deviation is indicated.

15

FIG. 2 is a graph showing patient sEPCR levels in a function of the anticoagulation agents Coumadine, Previscan, and Sintrom. The mean and standard deviation is indicated.

FIG. 3 is a graph showing sEPCR levels in a healthy adult population (n=49; left) and in patients undergoing intravenous anticoagulation therapy with unfractionated heparin (n=10; right). The mean and standard deviation is indicated.

20

FIG. 4A is a graph showing sEPCR levels in six normal adult subjects administered Warfarin for 7 days, with an additional 7-8 day follow-up period after cessation of the Warfarin.

FIG. 4B is a graph showing the INR values of the six normal adult subjects administered Warfarin for 7 days, with an additional 7-8 day follow-up period after cessation of the Warfarin.

25

FIG. 5 is a graph showing the sEPCR levels in seven patients before the start of oral anticoagulant therapy and during treatment. The patient diagnoses are indicated. DVT, deep vein thrombosis.

FIG. 6 is a graph showing the F1 + 2 values of the six normal adult subjects administered Warfarin for 7 days, with an additional 7-8 day follow-up period after cessation of the Warfarin.

30

Levels are shown with median, interquartile ranges, and 95% confidence intervals for the means.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

FIG. 7 is a graph showing F1 + 2 levels in seven patients before the start of oral anticoagulant therapy and during treatment. The patient diagnoses are indicated. Symbols correspond to FIG. 5.

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In the U.S., more than 55 million people currently suffer from conditions associated with thrombosis. Many of these patients require administration of anticoagulants. Though there are excellent drugs that permit even chronic anticoagulant therapy, these drugs do have adverse effects, such as excess bleeding. Because the therapeutic window for these drugs is both narrow and variable, constant assessment of coagulation status is required.

10

The key component in the coagulation pathway is thrombin, which is the final enzyme product of the coagulation cascade and is necessary to form fibrin and to activate platelets, both of which are essential components of a clot. Since thrombin itself is virtually impossible to measure, use of surrogate markers is necessary. Currently, there are four tests used clinically to monitor thrombin generation: (a) prothrombin (PT) fragment 1+2 (F1 + 2); (b) fibrinopeptide A (FpA); (c) thrombin/antithrombin complexes (TAT); and (d) soluble fibrin monomer (SFM). Prothrombin fragment 1+2 is generated when prothrombin is converted to thrombin by factor Xa in the prothrombin complex. It is a peptide released into the circulation with a half-life of about 90 min. Therefore, F1 + 2 levels will reflect only acute thrombin generation.

15

20

Fibrinopeptide A (FpA) is released from fibrinogen by direct thrombin proteolysis. The peptide circulates in the blood and can be detected using a sensitive ELISA. The major drawback of FpA levels is they are very sensitive to *in vitro* generation of thrombin by phlebotomy techniques and blood handling routines. Some manufacturers have stopped making the ELISA kits and few hematology and coagulation reference laboratories offer the test.

25

Antithrombin (AT) is the primary inhibitor of thrombin and complexes with thrombin (TAT) to remove it from the circulation. TAT levels can be measured by ELISA. TAT levels also reflect acute generation of thrombin because the complexes are cleared by receptor-mediated mechanism in the liver, limiting evaluation of long-term thrombin levels. Importantly, both F1 + 2 and TAT levels will reflect both *in vivo* and artifactual *in vitro* thrombin generation. Thrombin can be generated *in vitro*, most commonly by phlebotomy procedures, artificially elevating F1 + 2 and TAT levels.

30

WO 02/066981

PCT/US02/05023

Soluble fibrin monomers (SFM) are generated when thrombin cleaves fibrinopeptides A and B from fibrinogen, and the fibrin monomers non-covalently interact with excess fibrinogen. Thrombin then generates factor XIIIa to cross-link the SFM into a local clot or systemic deposition on vascular walls. Thus, increased SFM is more an indication that the normal removal of thrombin is saturated or no longer working properly.

The prothrombin time (PT) assay is a routine screening method to evaluate the capacity to make a clot. Its usefulness is to detect defects in the overall pathway members. However, the PT assay is more sensitive to agents or events that result in prolongation of the clotting times. There is good correlation between prolonged PT times and bleeding episodes in patients undergoing anticoagulant therapy. However, it is difficult to detect under-dosing of anticoagulant therapy as judged by PT and INR values. Chronic under-treatment maintains a hypercoagulable state, so the patients unknowingly remain at risk for thrombotic events. sEPCR levels will provide a more reliable marker of thrombin activity and report under-dosing of anticoagulant therapy, as well as response to a particular anticoagulant drug.

Thus, the current available tests are subject to interference from *in vitro* thrombin generation. Furthermore, for relatively stabilized patients on oral anticoagulant therapy who require weekly or monthly monitoring, such tests will report their coagulation status only at the moment of phlebotomy. The results will not reflect their thrombin levels generated over several days and will not reflect their risk of a possible thrombotic event.

I. The Present Invention

The present inventors have identified a new and improved method for measuring coagulation status. They have determined there is a direct relationship between plasma levels of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) and thrombin generation. Assays for measuring sEPCR have been described previously in U.S. Patent 5,804,392, and may be employed in a variety of distinct embodiments, as discussed below.

First, the present invention involves a method for indirectly monitoring thrombin levels, and hence coagulability, in patients undergoing intravenous or oral anticoagulant therapy, such as treatment with heparin, low-molecular weight heparin, Warfarin, Coumadine, Previscan, Sintrom, inhibitors of coagulation factors or anti-platelet compounds. This method generally comprises measuring levels of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) in patient plasma samples. sEPCR levels relate to thrombin-induced up-regulation of protease activity that results in release of sEPCR. This regulated sEPCR release occurs over a longer time period relative to

WO 02/066981

PCT/US02/05023

thrombin generation itself, thus providing a marker for long-term thrombin activity and a hypercoagulable state in patients and in asymptomatic individuals. Available ELISA assays with monoclonal or polyclonal antibodies to sEPCR permit measuring plasma sEPCR levels. Thus, the effectiveness of anticoagulant therapy may be monitored in patients, with particular emphasis on reporting under-dosing and response to therapy.

In addition, the data described herein suggest that sEPCR levels may indicate pathologic hypercoagulability, or elevated risk thereof. Thus, using essentially the same assays for monitoring anticoagulant therapy, the present inventors propose to use sEPCR levels to diagnose or assess risk of hypercoagulable states, for example, those induced by cancer, sepsis, diabetes, heart diseases, atherosclerosis or autoimmune disease. These and other embodiments are described in greater detail below.

II. Anti-Coagulation Therapy and Monitoring of Coagulation Status

The basic premise of oral anticoagulant therapy is that it will ultimately reduce thrombin formation by interfering with the vitamin K-dependent coagulation factors required for activation of prothrombin. Thrombin is the final enzyme product of the coagulation cascade and is necessary to form fibrin and to activate platelets, both of which are essential components of a clot. However, thrombin also is necessary for the anticoagulant regulatory system to function properly. The protein C anticoagulant system is a primary regulator of coagulation and thrombin formation (Esmon, 1999). The activated protein C generated by this pathway inactivates critical coagulation factors required for thrombin formation.

An endothelial protein C receptor (EPCR) was recently identified (Fukudome *et al.*, 1994) and shown to facilitate this protein C activation by the thrombin/thrombomodulin system (Stearns-Kurosawa *et al.*, 1996). Soluble EPCR (sEPCR) is found in plasma (Kurosawa *et al.*, 1997) and levels are elevated in patients with sepsis or systemic lupus erythematosus (Kurosawa *et al.*, 1998). The soluble EPCR levels did not correlate with levels of soluble thrombomodulin. Soluble thrombomodulin is generated by neutrophil elastase proteolysis and is an accepted marker of endothelial injury (Takahashi *et al.*, 1992; Takano *et al.*, 1990; Wada *et al.*, 2000). However, sEPCR is generated by different pathways. A recent study demonstrated that sEPCR is generated from its membrane-bound parent by metalloproteinase activity, and this activity is inducible by thrombin and inflammatory mediators (Xu *et al.*, 2000). Thus, in terms of hemostasis, control of thrombin generation is important, but elimination of it entirely may be equally detrimental.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

The current therapeutic approach to a patient with thrombotic disease typically starts with an intravenous course of unfractionated heparin or low-molecular weight heparin, followed by a course of oral anticoagulation. Both therapeutic regimes seek to reduce the activity of thrombin, a potent enzyme responsible for activation of the cells and creation of fibrin that form the basis of a clot. In North America, Warfarin (4-hydroxycoumarin) is the most widely used oral anticoagulant, prescribed for preventing and treating venous or arterial thrombosis and embolism. Warfarin and similar coumarin derivatives are vitamin K antagonists that impair the formation and/or action of coagulant proteins (prothrombin, factors VII, IX, X) and anticoagulant proteins (protein C, protein S) (Hrish *et al.*, 1998; Breckenridge, 1978; O'Reilly, 1976; Sutcliffe *et al.*, 1987). Warfarin's onset of 2-7 days and duration of action are predictable and it has excellent bioavailability. Warfarin is rapidly absorbed from the GI tract, reaches maximal blood levels in healthy volunteers in 90 min, and has a half-life of 36-42 hr. Other anticoagulants include heparin, low-molecular weight heparin, pentasaccharides, Previscan, Sintrom, inhibitors of coagulation factors or anti-platelet compounds.

During anticoagulant therapy, the patient coagulation status is monitored using the APTT (activated partial thromboplastin time) and/or the PT (prothrombin time) clotting assays. The APTT assay tests the integrity of the intrinsic and final common pathways of coagulation, so it is sensitive to decreases in the clotting factors or the presence of coagulation factor inhibitors. The PT assay is a useful measure of the extrinsic or initiator pathway of coagulation and, thus, is dependent of the level of factor VII and the common pathway factors II, V, X and fibrinogen. The PT assay is used as a screening test to monitor anticoagulation therapy with Warfarin. Monitoring patient coagulation status is extremely important because the anticoagulant therapeutic regimes may have significant complications, including bleeding episodes.

Close monitoring of patients on oral anticoagulant therapy is required and most patients have daily PT tests until a therapeutic range is achieved, followed by 3 times/week for 7-14 days, then weekly until demonstrated stability permits monthly monitoring. However, standardization of clinical PT results between laboratories has been extremely difficult because the thromboplastin reagent used in the assay exhibits wide variability between manufacturers, depending on the tissue of origin and method of preparation. These sources of variability have made standardization of PT reporting difficult and exposed patients to erratic dosing.

Based on WHO recommendations, the International Normalization Ratio (INR) was adopted in the early 1980s to address this standardization problem. The INR is a calculated value based on the patient's measured PT time and an International Sensitivity Index (ISI)

WO 02/066981

PCT/US02/05023

determined by comparison of a commercial thromboplastin with a standard reagent. In the early 1990s, the INR concept was introduced into the U.S. medical community. For most therapeutic anticoagulant applications, an INR value in the range of 2.0 to 3.0 is recommended. Most laboratories now use the INR format worldwide. However, there is general agreement that use of the INR has not eliminated the variability problems (Riley *et al.*, 2000), in part because the manufacturer-assigned ISI values for each thromboplastin lot vary according to the instrument that is used. This remains a significant problem since there are about 270 different reagent-instrument combinations.

10 III. sEPCR

EPCR is an endothelial cell receptor with significant homology to the CD1/MHC class I family (Fukudome and Esmon, 1994; Fukudome *et al.*, 1996; Regan *et al.*, 1996). The cloning and biological role of the endothelial cell receptor for protein C was described in PCT/US95/09636. The protein was predicted to consist of 238 amino acids, which includes a 15 amino acid signal sequence at the N-terminus, and a 23 amino acid transmembrane region which characterizes the receptor as a type I transmembrane protein. EPCR binds both protein C and APC with similar affinity (Fukudome *et al.*, 1996) in the presence of calcium, and facilitates protein C activation by presenting the protein C substrate to the thrombin-thrombomodulin activation complex on cell surfaces (Stearns-Kurosawa *et al.*, 1996). Recombinant soluble EPCR (rsEPCR), truncated just before the transmembrane domain, binds both protein C and APC with an affinity similar to that observed for intact cell-surface expressed EPCR (Fukudome *et al.*, 1996).

25 IV. Immunoassays

It will be understood that polyclonal or monoclonal antibodies specific for the sEPCR will have utilities in several applications. These include the production of diagnostic kits and in methods of detecting sEPCR. Thus, the invention provides antibodies that bind immunologically to sEPCR. Means for preparing and characterizing antibodies are well known in the art (See, *e.g.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporated herein by reference). Antibodies to sEPCR have already been generated using such standard techniques and are described in U.S. Patent 5,804,392.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

A. Polyclonal Antisera

Polyclonal antisera is prepared by immunizing an animal with an immunogenic composition in accordance with the present invention and collecting antisera from that immunized animal. A wide range of animal species can be used for the production of antisera. Typically the animal used for production of anti-antisera is a rabbit, a mouse, a rat, a hamster, a guinea pig or a goat. Because of the relatively large blood volume of rabbits, a rabbit is a preferred choice for production of polyclonal antibodies.

As is well known in the art, a given composition may vary in its immunogenicity. It is often necessary therefore to boost the host immune system, as may be achieved by coupling a peptide or polypeptide immunogen to a carrier. Exemplary and preferred carriers are keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA). Other albumins such as ovalbumin, mouse serum albumin or rabbit serum albumin can also be used as carriers. Means for conjugating a polypeptide to a carrier protein are well known in the art and include glutaraldehyde, m-maleimidobencoyl-N-hydroxysuccinimide ester, carbodiimide and bis-biazotized benzidine.

As also is well known in the art, the immunogenicity of a particular immunogen composition can be enhanced by the use of non-specific stimulators of the immune response, known as adjuvants. Exemplary and preferred adjuvants include complete Freund's adjuvant (a non-specific stimulator of the immune response containing killed *Mycobacterium tuberculosis*), incomplete Freund's adjuvants and aluminum hydroxide adjuvant.

The amount of immunogen composition used in the production of polyclonal antibodies varies upon the nature of the immunogen as well as the animal used for immunization. A variety of routes can be used to administer the immunogen (subcutaneous, intramuscular, intradermal, intravenous and intraperitoneal). The production of polyclonal antibodies may be monitored by sampling blood of the immunized animal at various points following immunization.

A second, booster injection, also may be given. The process of boosting and titering is repeated until a suitable titer is achieved. When a desired level of immunogenicity is obtained, the immunized animal can be bled and the serum isolated and stored, or the animal can be used to generate mAbs (below).

For production of rabbit polyclonal antibodies, the animal can be bled through an ear vein or alternatively by cardiac puncture. The procured blood is allowed to coagulate and then centrifuged to separate serum components from whole cells and blood clots. The serum may be

WO 02/066981

PCT/US02/05023

used as is for various applications or else the desired antibody fraction may be purified by well-known methods, such as affinity chromatography using another antibody or a peptide bound to a solid matrix or protein A followed by antigen (peptide) affinity column for purification.

5 **B. Monoclonal Antibodies**

mAbs may be readily prepared through use of well-known techniques, such as those exemplified in U.S. Patent 4,196,265, incorporated herein by reference. Typically, this technique involves immunizing a suitable animal with a selected immunogen composition, e.g., a purified or partially purified sEPCR protein, polypeptide or peptide. The immunizing composition is administered in a manner effective to stimulate antibody producing cells.

10 The methods for generating monoclonal antibodies (MAbs) generally begin along the same lines as those for preparing polyclonal antibodies. Rodents such as mice and rats are preferred animals, however, the use of rabbit, sheep, goat, monkey cells also is possible. The use of rats may provide certain advantages (Goding, 1986, pp. 60-61), but mice are preferred, with
15 the BALB/c mouse being most preferred as this is most routinely used and generally gives a higher percentage of stable fusions.

The animals are injected with antigen, generally as described above. The antigen may be coupled to carrier molecules such as keyhole limpet hemocyanin if necessary. The antigen would typically be mixed with adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant.
20 Booster injections with the same antigen would occur at approximately two-week intervals.

Following immunization, somatic cells with the potential for producing antibodies, specifically B lymphocytes (B cells), are selected for use in the MAb generating protocol. These cells may be obtained from biopsied spleens or lymph nodes. Spleen cells and lymph node cells are preferred, the former because they are a rich source of antibody producing cells that are in the
25 dividing plasmablast stage.

Often, a panel of animals will have been immunized and the spleen of animal with the highest antibody titer will be removed and the spleen lymphocytes obtained by homogenizing the spleen with a syringe. Typically, a spleen from an immunized mouse contains approximately
30 5×10^7 to 2×10^8 lymphocytes.

The antibody-producing B lymphocytes from the immunized animal are then fused with cells of an immortal myeloma cell, generally one of the same species as the animal that was immunized. Myeloma cell lines suited for use in hybridoma-producing fusion procedures preferably are non-antibody-producing, have high fusion efficiency, and enzyme deficiencies that

WO 02/066981

PCT/US02/05023

render them incapable of growing in certain selective media which support the growth of only the desired fused cells (hybridomas).

Any one of a number of myeloma cells may be used, as are known to those of skill in the art (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984; each incorporated herein by reference).

5 For example, where the immunized animal is a mouse, one may use P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 and S194/5XX0 Bul; for rats, one may use R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F and 4B210; and U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 and UC729-6 are all useful in connection with human cell fusions.

10 One preferred murine myeloma cell is the NS-1 myeloma cell line (also termed P3-NS-1-Ag4-1), which is readily available from the NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository by requesting cell line repository number GM3573. Another mouse myeloma cell line that may be used is the 8-azaguanine-resistant mouse murine myeloma SP2/0 non-producer cell line.

15 Methods for generating hybrids of antibody-producing spleen or lymph node cells and myeloma cells usually comprise mixing somatic cells with myeloma cells in a 2:1 proportion, though the proportion may vary from about 20:1 to about 1:1, respectively, in the presence of an agent or agents (chemical or electrical) that promote the fusion of cell membranes. Fusion methods using Sendai virus have been described by Kohler and Milstein (1975; 1976), and those using polyethylene glycol (PEG), such as 37% (v/v) PEG, by Geffer *et al.* (1977). The use of
20 electrically induced fusion methods also is appropriate (Goding pp. 71-74, 1986).

Fusion procedures usually produce viable hybrids at low frequencies, about 1×10^{-6} to 1×10^{-8} . However, this does not pose a problem, as the viable, fused hybrids are differentiated from the parental, infused cells (particularly the infused myeloma cells that would normally continue to divide indefinitely) by culturing in a selective medium. The selective medium is generally one that contains an agent that blocks the *de novo* synthesis of nucleotides in the tissue culture media. Exemplary and preferred agents are aminopterin, methotrexate, and azaserine. Aminopterin and methotrexate block *de novo* synthesis of both purines and pyrimidines, whereas azaserine blocks only purine synthesis. Where aminopterin or methotrexate is used, the media is supplemented with hypoxanthine and thymidine as a source of nucleotides (HAT medium).
30 Where azaserine is used, the media is supplemented with hypoxanthine.

The preferred selection medium is HAT. Only cells capable of operating nucleotide salvage pathways are able to survive in HAT medium. The myeloma cells are defective in key

WO 02/066981

PCT/US02/05023

enzymes of the salvage pathway, *e.g.*, hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), and they cannot survive. The B cells can operate this pathway, but they have a limited life span in culture and generally die within about two weeks. Therefore, the only cells that can survive in the selective media are those hybrids formed from myeloma and B cells.

5 This culturing provides a population of hybridomas from which specific hybridomas are selected. Typically, selection of hybridomas is performed by culturing the cells by single-clone dilution in microtiter plates, followed by testing the individual clonal supernatants (after about two to three weeks) for the desired reactivity. The assay should be sensitive, simple and rapid, such as radioimmunoassays, enzyme immunoassays, cytotoxicity assays, plaque assays, dot
10 immunobinding assays, and the like. The selected hybridomas would then be serially diluted and cloned into individual antibody-producing cell lines, which clones can then be propagated indefinitely to provide mAbs. The cell lines may be exploited for mAb production in two basic ways.

15 A sample of the hybridoma can be injected (often into the peritoneal cavity) into a histocompatible animal of the type that was used to provide the somatic and myeloma cells for the original fusion (*e.g.*, a syngeneic mouse). Optionally, the animals are primed with a hydrocarbon, especially oils such as pristane (tetramethylpentadecane) prior to injection. The injected animal develops tumors secreting the specific monoclonal antibody produced by the fused cell hybrid. The body fluids of the animal, such as serum or ascites fluid, can then be
20 tapped to provide mAbs in high concentration.

The individual cell lines could also be cultured *in vitro*, where the mAbs are naturally secreted into the culture medium from which they can be readily obtained in high concentrations. mAbs produced by either means may be further purified, if desired, using filtration, centrifugation and various chromatographic methods such as HPLC or affinity chromatography.
25 Fragments of the monoclonal antibodies of the invention can be obtained from the purified monoclonal antibodies by methods which include digestion with enzymes, such as pepsin or papain, and/or by cleavage of disulfide bonds by chemical reduction. Alternatively, monoclonal antibody fragments encompassed by the present invention can be synthesized using an automated peptide synthesizer.

30 It also is contemplated that a molecular cloning approach may be used to generate monoclonals. For this, combinatorial immunoglobulin phagemid libraries are prepared from RNA isolated from the spleen of the immunized animal, and phagemids expressing appropriate antibodies are selected by panning using cells expressing the antigen and control cells *e.g.*,

WO 02/066981

PCT/US02/05023

normal-versus-tumor cells. The advantages of this approach over conventional hybridoma techniques are that approximately 10^4 times as many antibodies can be produced and screened in a single round, and that new specificities are generated by H and L chain combination which further increases the chance of finding appropriate antibodies.

5

C. Immunoassays

In still further embodiments, the present invention thus concerns immunodetection methods for binding, quantifying or otherwise generally detecting sEPCR. The steps of various useful immunodetection methods have been described in the scientific literature, such as, *e.g.*,

10 Nakamura *et al.* (1987; incorporated herein by reference). Immunoassays, in their most simple and direct sense, are binding assays. Certain preferred immunoassays are the various types of enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIA) and immunobead capture assay. However, it will be readily appreciated that detection is not limited to such techniques; and Western blotting, dot blotting, FACS analyses, and the like also may be used in
15 connection with the present invention.

In general, immunobinding methods include obtaining a sample suspected of containing a protein, peptide or antibody, and contacting the sample with an antibody or protein or peptide in accordance with the present invention, as the case may be, under conditions effective to allow the formation of immunocomplexes.

20 The immunobinding methods of this invention include methods for detecting or quantifying the amount of a reactive component in a sample, which methods require the detection or quantitation of any immune complexes formed during the binding process. Here, one would obtain a sample suspected of containing sEPCR, and contact the sample with an antibody, and then detect or quantify the amount of immune complexes formed under the
25 specific conditions.

Contacting the chosen biological sample with the antibody or antisera under conditions effective and for a period of time sufficient to allow the formation of immune complexes (primary immune complexes) is generally a matter of simply adding the composition to the sample and incubating the mixture for a period of time long enough for the antibodies to form
30 immune complexes with sEPCR. After this time, the sample-antibody composition will generally be washed to remove any non-specifically bound antibody species, allowing only those antibodies specifically bound within the primary immune complexes to be detected.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

In general, the detection of immunocomplex formation is well known in the art and may be achieved through the application of numerous approaches. These methods are generally based upon the detection of a label or marker, such as any radioactive, fluorescent, biological or enzymatic tags or labels of standard use in the art. U.S. Patents concerning the use of such labels include 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,366,241, each incorporated herein by reference.

In certain embodiments, the first added component that becomes bound within the primary immune complexes may be detected by means of a second binding ligand that has binding affinity for the encoded protein, peptide or corresponding antibody. In these cases, the second binding ligand may be linked to a detectable label. The second binding ligand is itself often an antibody, which may thus be termed a "secondary" antibody. The primary immune complexes are contacted with the labeled, secondary binding ligand, or antibody, under conditions effective and for a period of time sufficient to allow the formation of secondary immune complexes. The secondary immune complexes are then generally washed to remove any non-specifically bound labeled secondary antibodies or ligands, and the remaining label in the secondary immune complexes is then detected.

Further methods include the detection of primary immune complexes by a two step approach. A second binding ligand, such as an antibody, that has binding affinity for the encoded protein, peptide or corresponding antibody is used to form secondary immune complexes, as described above. After washing, the secondary immune complexes are contacted with a third binding ligand or antibody that has binding affinity for the second antibody, again under conditions effective and for a period of time sufficient to allow the formation of immune complexes (tertiary immune complexes). The third ligand or antibody is linked to a detectable label, allowing detection of the tertiary immune complexes thus formed. This system may provide for signal amplification if this is desired.

Of particular interest in the present invention are enzyme linked immunosorbent assays, known as ELISAs. In one exemplary ELISA, antibodies binding to the encoded proteins of the invention are immobilized onto a selected surface exhibiting protein affinity, such as a well in a polystyrene microtiter plate. Then, a test composition suspected of containing the sEPCR is added to the wells. After binding and washing to remove non-specifically bound immunocomplexes, the bound antigen may be detected.

Detection is generally achieved by the addition of a second antibody specific for the target protein, that is linked to a detectable label. This type of ELISA is a simple "sandwich

WO 02/066981

PCT/US02/05023

ELISA." Detection also may be achieved by the addition of a second antibody, followed by the addition of a third antibody that has binding affinity for the second antibody, with the third antibody being linked to a detectable label.

5 In another exemplary ELISA, the samples suspected of containing the sEPCR are immobilized onto the well surface and then contacted with the antibodies of the invention. After binding and washing to remove non-specifically bound immunocomplexes, the bound antibody is detected. Where the initial antibodies are linked to a detectable label, the immunocomplexes may be detected directly. Again, the immunocomplexes may be detected using a second antibody that has binding affinity for the first antibody, with the second antibody being linked to a detectable label.

10 Another ELISA in which the sEPCR are immobilized, involves the use of antibody competition in the detection. In this ELISA, labeled antibodies are added to the wells, allowed to bind to the sEPCR and detected by means of their label. The amount of marker antigen in an unknown sample is then determined by mixing the sample with the labeled antibodies before or during incubation with coated wells. The presence of marker antigen in the sample acts to reduce the amount of antibody available for binding to the well and thus reduces the ultimate signal. This is appropriate for detecting antibodies in an unknown sample, where the unlabeled antibodies bind to the antigen-coated wells and also reduces the amount of antigen available to bind the labeled antibodies.

20 Irrespective of the format employed, ELISAs have certain features in common, such as coating, incubating or binding, washing to remove non-specifically bound species, and detecting the bound immunocomplexes. For example, in coating a plate with either antigen or antibody, one will generally incubate the wells of the plate with a solution of the antigen or antibody, either overnight or for a specified period of hours. The wells of the plate will then be washed to remove incompletely adsorbed material. Any remaining available surfaces of the wells are then "coated" with a nonspecific protein that is antigenically neutral with regard to the test antisera. These include bovine serum albumin (BSA), casein and solutions of milk powder. The coating allows for blocking of nonspecific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the background caused by nonspecific binding of antisera onto the surface.

30 In ELISAs, it is more customary to use a secondary or tertiary detection means rather than a direct procedure. Thus, after binding of a protein or antibody to the well, coating with a non-reactive material to reduce background, and washing to remove unbound material, the immobilizing surface is contacted with a control and sample to be tested under conditions

WO 02/066981

PCT/US02/05023

effective to allow immunecomplex (antigen/antibody) formation. Detection of the immunecomplex then requires a labeled secondary binding ligand or antibody, or a secondary binding ligand or antibody in conjunction with a labeled tertiary antibody or third binding ligand.

5 "Under conditions effective to allow immunecomplex (antigen/antibody) formation" means that the conditions preferably include diluting the antigens and antibodies with solutions such as BSA, bovine gamma globulin (BGG) and phosphate buffered saline (PBS)/Tween. These added agents also tend to assist in the reduction of nonspecific background.

10 The "suitable" conditions also mean that the incubation is at a temperature and for a period of time sufficient to allow effective binding. Incubation steps are typically from about 1 to 2 to 4 hrs, at temperatures preferably on the order of 25° to 27°C, or may be overnight at about 4°C or so.

15 Following all incubation steps in an ELISA, the contacted surface is washed so as to remove non-complexed material. A preferred washing procedure includes washing with a solution such as PBS/Tween, or borate buffer. Following the formation of specific immunecomplexes between the test sample and the originally bound material, and subsequent washing, the occurrence of even minute amounts of immunecomplexes may be determined.

20 To provide a detecting means, the second or third antibody will have an associated label to allow detection. Preferably, this will be an enzyme that will generate color development upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. Thus, for example, one will desire to contact and incubate the first or second immunecomplex with a urease, glucose oxidase, alkaline phosphatase or hydrogen peroxidase-conjugated antibody for a period of time and under conditions that favor the development of further immunecomplex formation (e.g., incubation for 2 hrs at room temperature in a PBS-containing solution such as PBS-Tween).

25 After incubation with the labeled antibody, and subsequent to washing to remove unbound material, the amount of label is quantified, e.g., by incubation with a chromogenic substrate such as urea and bromocresol purple or 2,2'-azido-di-3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and H₂O₂, in the case of peroxidase as the enzyme label. Quantitation is then achieved by measuring the degree of color generation, e.g., using a visible spectra spectrophotometer.

30

WO 02/066981

PCT/US02/05023

V. Examples

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventor to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

Example 1 - Results

Soluble EPCR is generated *in vitro* by metalloproteinase activity induced by thrombin and some inflammatory mediators (Xu *et al.*, 2000). Thus, the inventors chose to determine whether soluble EPCR levels reflected *in vivo* thrombin generation. To evaluate this, the soluble EPCR levels were determined in patients on oral anticoagulant therapy and compared with soluble EPCR levels found in a normal, apparently healthy adult population (FIGS. 1A and 1B). These samples were obtained from collaborators in France (Dr. M. Grimeaux, Serbio/Diagnostica Stago). The soluble EPCR levels are assayed using a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (U.S. Patent 5,804,392, incorporated by reference herein). The normal population (see FIG. 1A) had soluble EPCR levels of 165.8 +/- 115.8 ng/ml. The patients on oral anticoagulant therapy (see FIG. 1B) had significantly lower soluble EPCR levels of 105.3 +/- 70.8 ng/ml ($p < 0.0001$; $n = 55$). Within this patient population, three different oral anticoagulant drugs were used: Coumadine, Previscan, and Sintrom. All three function like Warfarin (coumarin) in that they are vitamin K antagonists. Previscan is a major oral anticoagulant used in France and Germany. Both Coumadine and Previscan have a long half-life (days), whereas that for Sintrom is relatively short (~8.5 hrs). Analysis of the individual data according to the drug used revealed that soluble EPCR levels appeared to be lowest in the patients taking Previscan (FIG. 2). Statistical analysis is difficult, however, because of the different drug clearance rates and it was not known how long the patients had been taking the medications. This is a consideration because the clearance rates of functional coagulation factors from the circulation differ significantly. The half-life for factor VII is only 3-5 hours, whereas that for prothrombin is 60-100 hrs.

To further evaluate the relationship between plasma sEPCR levels and anticoagulant therapy, samples were obtained from a normal adult population and from patients on intravenous unfractionated heparin therapy (FIG. 3). The data shown in FIGS. 3, 4A, 4B and 5 were obtained from samples contributed by a collaborator in Italy (Dr. Armando D'Angelo, Scientific Institute H.S. Raffaele, Milan, Italy). The normal samples from this Italian population have sEPCR levels of 195.1 ± 114.0 ng/ml (FIG. 3, left; $n = 49$), which does not differ significantly from that observed in samples from France (FIG. 1A). Patients on intravenous heparin therapy have lower sEPCR levels that averaged 147.1 ± 39.3 ng/ml (FIG. 3, right; $p < 0.09$; $n = 10$). While the number of heparin-treated patient samples is small, the reduction of plasma sEPCR levels follows the trend observed above in patients undergoing oral anticoagulant therapy.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

The effect of Warfarin treatment in normal adult subjects on plasma sEPCR levels was studied in 6 adult volunteers with informed consent (FIGS. 4A and 4B). The subjects received Warfarin (oral anticoagulation) for 7 days with an additional follow-up period to day 15. Blood was taken on Day 0 just before starting the Warfarin, then taken each day for evaluation of INR levels. Plasma was stored at -80° C for determination of sEPCR levels by ELISA. The Warfarin dosage was adjusted as needed for each subject based on their daily INR values. As shown in FIG. 4A, plasma sEPCR levels declined during the Warfarin treatment period. There was a lag time of 24-48 hours before sEPCR levels declined and the extent of decline varied between subjects. Approximately 24-48 hrs after cessation of Warfarin, sEPCR levels began to increase again in all subjects, with most reaching pre-treatment values by day 15. The INR values for these samples were essentially a mirror image of the sEPCR levels (FIG. 4B).

To confirm that administration of Warfarin is accompanied by a decrease in thrombin production in healthy people, F1 + 2 levels were monitored (FIG. 6). Levels of F1 + 2 decreased as a result of the Warfarin administration, with a significant decrease observed on day 5 (to 39% of initial values; $P < .05$).

A similar reduction in sEPCR values over time was observed in patients initiating oral anticoagulation therapy (FIG. 5). Blood was taken before the start of anticoagulation and sEPCR levels were determined by ELISA over the course of their therapy. There were 3 patients with atrial fibrillation and one patient each with dilative cardiomyopathy, mitral valve disease, atrial fibrillation + stroke, and deep vein thrombosis (DVT). In all patients studied, sEPCR levels declined with time after starting oral anticoagulant therapy. As with the normal subjects, the extent of the decline in sEPCR levels varied. As expected, F1 + 2 levels declined in most of the patients after initiation of Warfarin therapy, particularly in those with higher F1 + 2 levels (FIG. 7).

These observations indicate that not only does oral anticoagulant therapy reduce thrombin generation, it also results in decreased soluble EPCR levels. The data further suggests that a patient with a high, or even therapeutic, INR value and a concomitant high sEPCR level may not be adequately controlled in terms of thrombin generation and the disease pathology. This concept is illustrated by the INR and sEPCR data shown in Table 1 of patients undergoing treatment with the oral anticoagulant Sintrom. Two patients have therapeutic INR values (2.0 and 2.6), yet very elevated sEPCR levels (369 and 357 ng/ml). Another two patients have elevated INR levels (3.3 and 3.6), suggesting higher Sintrom dosages or longer treatment times, yet their sEPCR levels remain elevated (198 and 293 ng/ml). Clinicians tend to rely on INR

WO 02/066981 PCT/US02/05023
values to evaluate patient coagulation status and the current data suggests that INR values alone
may not be sufficient.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

TABLE 1 - INR AND SEPCR VALUES IN PATIENTS TAKING SINTROM

Plasma	INR	[sEPCR] ng/ml
1210234	1.5	140
1209226	1.8	135
1211214	1.9	167
1211208	2.0	369
1012210	2.6	63
1029140	2.6	357
1223106	2.7	131
1228155	2.7	92
1221210	2.8	127
1208137	3.1	59
1223193	3.1	61
928201	3.3	198
1221235	3.3	171
1228246	3.4	164
1012192	3.5	56
1208103	3.6	293
929179	4.5	172
1221195	>5.0	56
928231	>5.0	61
929212	>5.0	54
1006257	>5.0	94

5 Related to this is the observation that there are at least two sub-populations within the normal, apparently healthy population in terms of sEPCR levels. In both the French and Italian subjects studied, the vast majority of sEPCR levels fall within the range of ~75-175 ng/ml (see FIGS. 1A, 1B and 3). The remaining sEPCR levels are scattered from 200-700 ng/ml. While the inventors cannot rule out environmental (smoking, diet) or genetic (polymorphisms, gender) factors, the observation that sEPCR levels in normal subjects during Warfarin treatment (FIGS. 10 4A and 4B) suggests that these asymptomatic individuals with exceedingly high sEPCR levels

WO 02/066981

PCT/US02/05023

may be at risk for a thrombotic event. Thus, sEPCR levels also may be a marker for a hypercoagulable state.

Example 2 - Discussion

5

The current understanding of soluble EPCR formation is that thrombin induces metalloproteinase activity, which then proteolyzes the membrane-bound EPCR parent to release the soluble receptor. The *in vitro* time frame of this process is hours (Xu *et al.*, 2000). This compares with only minutes for thrombin-antithrombin (TAT) formation in the absence of heparin, which is accelerated approximately 2300-fold in the presence of heparin (Beller *et al.*, 1979). Thus, the time frame involved for monitoring sEPCR formation is much longer than for thrombin itself. The data shown in FIGS. 4A and 4B indicates the sEPCR levels in normal individuals begin to fall within 24-48 hours after initiation of Warfarin and, conversely, begin to rise 24-48 hours after cessation of Warfarin. In some patients this may be longer, as shown by three of the patients in FIG. 5, whose sEPCR levels dropped only after day 3-4 of treatment. It also follows that thrombin generated *in vitro* during phlebotomy, a significant problem with other current tests, will have no effect on soluble EPCR levels. Standardization of soluble EPCR levels also will not be a problem, because the ELISA assay uses standardized reagents from one manufacturer.

10

15

20

25

30

A potential use of the present invention involving the soluble EPCR assay encompasses monitoring any patient population that receives oral or other anticoagulant therapy. Some current estimates put this group in the region of at least 2-3 million patients per year. In the United States, more than 1.5 million people with atrial fibrillation or mechanical heart valves are currently taking some kind of oral anticoagulant or anti-platelet drugs to help prevent stroke and related cardiovascular problems. Many more anticoagulant therapeutics that target thrombin generation or activity are either in use (heparin, low-molecular weight heparin) or are being tested (anti-platelet compounds, factor Xa inhibitors) in various patient populations. The coagulation status of all these patients must be monitored to prevent under-dosing and clotting, or overdosing and bleeding. The new assay may be of particular use to report under-dosing of anticoagulant therapies, because the most commonly used clotting screening method (prothrombin time, PT) is relatively insensitive to under-dosing. Thus, many patients may be unknowingly at risk for thrombotic events that could be prevented by better monitoring of their anticoagulant therapy and choice of anticoagulant. Conversely, many patients (*e.g.*, myocardial

WO 02/066981

PCT/US02/05023

infarction) may not be at risk for additional thrombosis, yet they automatically continue receiving long-term anticoagulant therapy for preventative purposes because there is no marker available. This sEPCR assay may help clinicians select those patients at low risk for thrombosis, thereby preventing unnecessary medication, trouble and expense to the patient.

5 Additionally, the sEPCR assay may be used to identify or monitor a hypercoagulable state in patients or in a normal population. Hypercoagulation is a significant problem in many patient populations whose primary disease alters the hemostatic balance. These populations include patients with cancer, sepsis, diabetes, atherosclerosis or autoimmune diseases (Carey *et al.*, 1998) in addition to the heritable and acquired coagulation disorders (Kearon *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2000). The sEPCR assay may also be of value as a marker for a hypercoagulable state in asymptomatic individuals, analogous to the general use of plasma cholesterol and low-high density lipoprotein (LDL, HDL) levels as markers for an atherosclerotic state. The present inventors have repeatedly observed a sub-population of normal individuals who have exceedingly high sEPCR levels. These individuals comprise about 20-25% of an
10 apparently healthy adult population and they may be at an increased risk for a thrombotic event. There may be factors other than thrombin that contribute to sEPCR levels, but the observation that sEPCR levels in normal subjects fall during Warfarin treatment strongly indicates that thrombin activity has a direct influence on plasma sEPCR levels.
15

20

 All of the compositions and methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred
25 embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the compositions and methods, and in the steps or in the sequence of steps of the method described herein, without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it will be apparent that certain agents which are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are
30 deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

VI. References

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference:

5

U. S. Patent No. 3,817,837

U. S. Patent No. 3,850,752

U. S. Patent No. 3,939,350

U. S. Patent No. 3,996,345

10

U. S. Patent No. 4,196,265

U. S. Patent No. 4,275,149

U. S. Patent No. 4,277,437

U. S. Patent No. 4,366,241

U. S. Patent No. 5,804,392

15

"The European Atrial Fibrillation Trial Study Group. Optimal Oral Anticoagulant Therapy in Patients Without Nonrheumatic Atrial Fibrillation and Recent Cerebral Ischemia," *N.E. Jour. Med.*, 333:5-10, 1995.

20

"The Stroke Prevention in Reversible Ischemia Trial (SPIRIT) Study Group. A Randomized Trial of Anticoagulants Versus Aspirin after Cerebral Ischemia of Presumed Arterial Origin," *Ann. Nurol.*, 42:857-965, 1997.

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988.

25

Beller *et al.*, "Fractionation of Low Molecular Weight Heparin Species and Their Interaction with Antithrombin," *J. Biol. Chem.*, 254:2902-2913, 1979.

Breckenridge, A.M., "Oral Anticoagulant Drugs: Pharmacokinetic Aspects," *Semin. Hematol.*, 15:19-26, 1978.

30

Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 71-74; 75-83, 1984.

Carey *et al.*, "Disseminated Intravascular Coagulation: Clinical and Laboratory Aspects," *Amer. J. Hematol.*, 59:69-73, 1998.

Chan *et al.*, "Warfarin Induced Skin Necrosis," *Br. J. Surg.*, 87:266-272, 2000.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

- Conneiger *et al.*, "Optimal Oral Anticoagulant Therapy in Patients with Mechanical Heart Valves," *N.E. Jour. Med.*, 333:11-17, 1995.
- Esmon, C.T., "Natural Anticoagulants and Their Pathways," in *Handbook of Experimental Pharmacology*, [ed: Born, G.V.R., Cuatrecasas, P., Gaten, D., Herken, H., Starke, K., Taylor, P.], Springer-Verlag, New York; pp. 447-476, 1999.
- 5 Fukudome and Esmon, "Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor," *J. Biol. Chem.* 269:26486-26491, 1994.
- Fukudome *et al.*, "The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor," *J Biol Chem.*, 271(29):17491-17498, 1996.
- 10 Gefter *et al.*, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *Somatic Cell Genet*, 3(2):231-6, 1977.
- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, Fla., pp. 60-66, and 71-74, 1986.
- Goldstein *et al.*, "Is Glycohemoglobin Testing Useful in Diabetes Mellitus? Lessons from the Diabetes Control and Complications Trial," *Clin. Chem.*, 40:1637-1640, 1994.
- 15 Hrish *et al.*, "Oral Anticoagulants: Mechanisms of Action, Clinical Effectiveness and Optimal Therapeutic Range," *Chest*, 114 Supp. 445S-469S, 1998.
- Kearon *et al.*, "Management of Patients with Hereditary Hypercoagulable Disorders," *Annu. Rev. Med.*, 51:169-185, 2000.
- 20 Kohler and Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256(5517):495-7, 1975.
- Kohler and Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *Eur J Immunol*, 6(7):511-9, 1976.
- Kurosawa *et al.*, "Identification of Functional Endothelial Protein C Receptor in Plasma," *J. Clin. Invest.*, 100:411-418, 1997.
- 25 Kurosawa *et al.*, "Plasma Levels of Endothelial Protein C Receptor are Elevated in Patients with Sepsis and Systemic Lupus Erythmatosus: Lack of Correlation with Thrombomodulin Suggests Different Pathological Processes," *Blood*, 91:725-727, 1998.
- Lane *et al.*, "Role of Hemostatic Gene Polymorphisms in Venous and Arterial Thrombotic Disease," *Blood*, 95:1517-1532, 2000.
- 30 Laupacis *et al.*, "Risk Factors for Stroke and Efficacy of Antithrombotic Therapy in Atrial Fibrillation, Analysis of Pooled Data from Five Randomized Controlled Trials," *Arch. Intern. Med.*, 154:1449-1457, 1994.

- WO 02/066981 PCT/US02/05023
- Levine *et al.*, "Hemorrhagic Complications of Anticoagulant Treatment," *Chest*, 114
Suppl:511S-523S.
- Nakamura *et al.*, In: *Handbook of Experimental Immunology* (4th Ed.), Weir, Herzenberg,
Blackwell, Herzenberg, (eds). Vol. 1, Chapter 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford,
5 1987.
- O'Reilly, R.A., "Vitamin K and the Oral Anticoagulant Drugs," *Annu. Rev. Med.*, 27:245-261,
1976.
- PCT/US95/09636
- Regan *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271:17499-17503
- 10 Riley *et al.*, "Clinical Utilization of the International Normalized Ratio (INR)," *J. Clin. Lab.
Anal.*, 14:101-114, 2000.
- Stearns-Kurosawa *et al.*, "The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation
by the thrombin-thrombomodulin complex," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 93:10212-
10216, 1996.
- 15 Sutcliffe *et al.*, "Aspects of Anticoagulant Action: A Review of the Pharmacology, Metabolism
and Toxicology of Warfarin and Cogeners," *Rev. Drug Metabol. Drug Interact.* 5:225-
272, 1987.
- Takahashi *et al.*, "Circulating Thrombomodulin as a Novel Endothelial Cell Marker:
Comparison of Its Behavior with von Willebrand Factor and Tissue-Type Plasminogen
20 Activator," *Am. J. Hematol.*, 41:32-39, 1992.
- Takano *et al.*, "Plasma Thrombomodulin in Health and Diseases," *Blood*, 76:2024-2029, 1990.
- van der Meer *et al.*, "Bleeding Complications in Oral Anticoagulant Therapy: An Analysis of
Risk Factors," *Arch. Intern. Med.*, 153:1557-1562, 1993.
- Wada *et al.*, "Plasma Thrombomodulin as a Marker of Vascular Disorders in Thrombotic
25 Thrombocytopenic Purpura and Disseminated Intravascular Coagulation," *Am. J.
Hematol.*, 39:20-24, 2000.
- Xu *et al.*, "Metalloproteolytic Release of Endothelial Protein C Receptor," *J. Bio. Chem.*,
275:6038-6044, 2000.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

CLAIMS

1. A method for monitoring effective thrombin levels in patients undergoing anticoagulant therapy comprising measuring circulating levels of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR), wherein lowered sEPCR levels relate to lowered effective thrombin activity.
5
2. The method of claim 1, wherein the anticoagulant therapy involves a vitamin K antagonist.
- 10 3. The method of claim 1, wherein the anticoagulant therapy involves at least one of Warfarin, Coumadine, Previscan, and Sintrom.
4. The method of claim 1, wherein the anticoagulant therapy involves use of heparin, low molecular weight heparin, pentasaccharides, hirudin, hirudin analogs, coagulation factor
15 inhibitors, protein C pathway components, tissue factor pathway inhibitors, anti-platelet compounds or fibrinolytic pathway components.
5. The method of claim 1, wherein the sEPCR is measured by an immunoassay.
- 20 6. The method of claim 5, wherein the sEPCR is measured by ELISA.
7. The method of claim 1, wherein the sEPCR level is determined by measuring sEPCR in a blood product, cerebrospinal fluid or urine.
- 25 8. The method of claim 7, wherein the blood product is plasma or serum.
9. A method for monitoring effectiveness of anticoagulant therapy comprising measuring circulating sEPCR levels, wherein decreases in sEPCR indicate that the anticoagulant therapy is effective.
30
10. The method of claim 9, wherein the anticoagulant therapy involves a vitamin K antagonist.

WO 02/066981

PCT/US02/05023

11. The method of claim 9, wherein the anticoagulant therapy involves at least one of Warfarin, Coumadine, Previscan, and Sintrom.
12. The method of claim 9, wherein the anticoagulant therapy involves use of heparin, low molecular weight heparin, pentasaccharides, hirudin, hirudin analogs, coagulation factor inhibitors, protein C pathway components, tissue factor pathway inhibitors, anti-platelet compounds or fibrinolytic pathway components.
13. The method of claim 9, wherein the sEPCR is measured by an immunoassay.
14. The method of claim 13, wherein the sEPCR is measured by ELISA.
15. The method of claim 9, wherein the sEPCR level is determined by measuring sEPCR in a blood product, cerebrospinal fluid or urine.
16. The method of claim 15, wherein the blood product is plasma or serum.
17. A method for identifying individuals in a hypercoagulable state comprising measuring circulating levels of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR), wherein elevated sEPCR levels relate to hypercoagulability.
18. The method of claim 17, wherein the sEPCR is measured by an immunoassay.
19. The method of claim 18, wherein the sEPCR is measured by ELISA.
20. The method of claim 17, wherein the sEPCR level is determined by measuring sEPCR in a blood product, cerebrospinal fluid or urine.
21. The method of claim 20, wherein the blood product is plasma or serum.
22. A method for identifying a patient at risk of developing a hypercoagulability state comprising measuring circulating levels of soluble endothelial protein C receptor

WO 02/066981

PCT/US02/05023

(sEPCR), wherein elevated sEPCR levels relate to an increased risk of hypercoagulability.

23. The method of claim 22, wherein the sEPCR is measured by an immunoassay.
- 5
24. The method of claim 22, wherein the sEPCR is measured by ELISA.
25. The method of claim 22, wherein the patient has a condition frequently associated with hypercoagulability.
- 10
26. The method of claim 25, wherein the patient has cancer, sepsis, diabetes, heart diseases, atherosclerosis or autoimmune disease.
27. The method of claim 22, wherein the sEPCR is measured by an immunoassay.
- 15
28. The method of claim 27, wherein the sEPCR is measured by ELISA.
29. The method of claim 22, wherein the sEPCR level is determined by measuring sEPCR in a blood product, cerebrospinal fluid or urine.
- 20
30. The method of claim 29, wherein the blood product is plasma or serum.

1/6

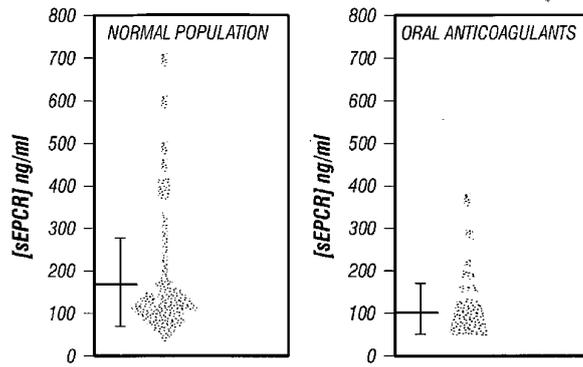


FIG. 1A

FIG. 1B

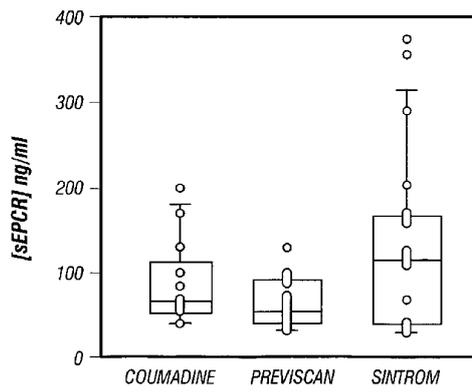


FIG. 2

2/6

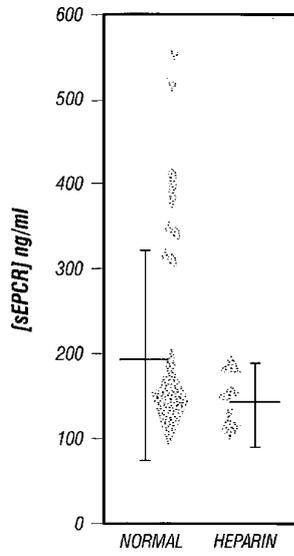
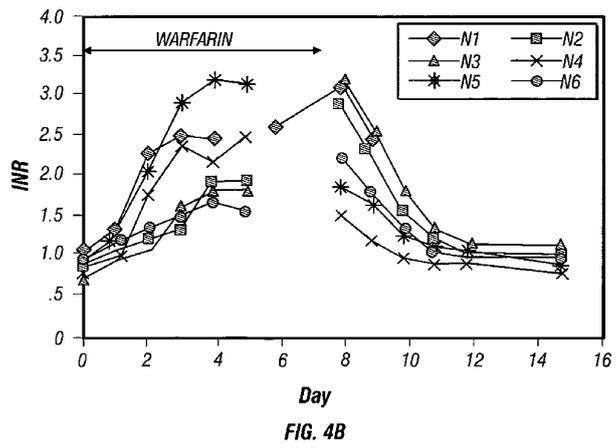
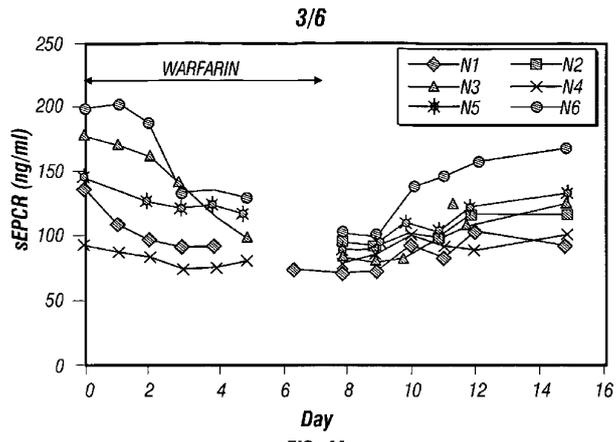


FIG. 3

WO 02/066981

PCT/US02/05023



4/6

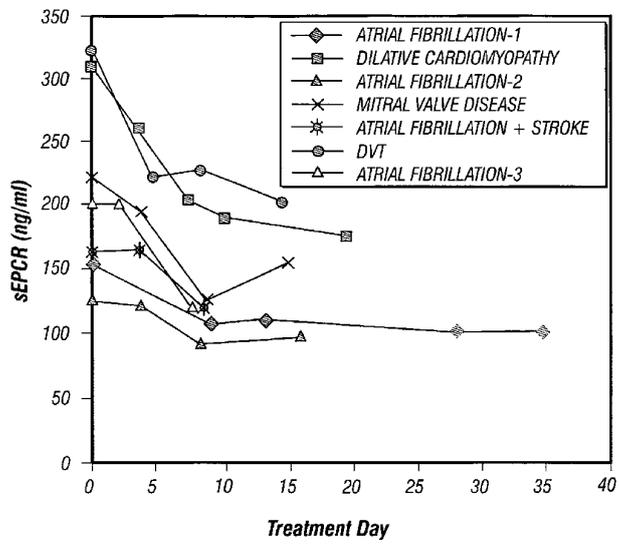


FIG. 5

WO 02/066981

PCT/US02/05023

5/6

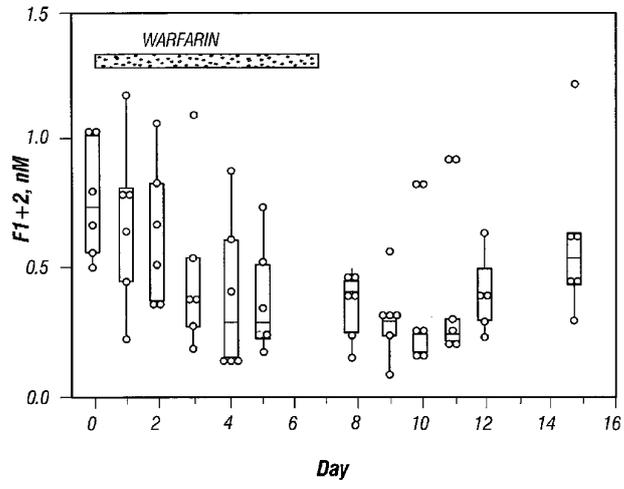


FIG. 6

6/6

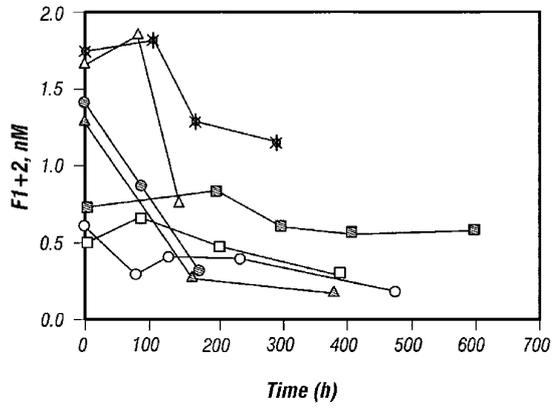


FIG. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066981 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, [US/US]: 4400 South coltrane Road, Edmond, OK 73013 (US), 33/86
- (21) International Application Number: PCT/US02/05023 (74) Agent: HIGHLANDER, Steven, L.; Felbright & Jaworski L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US).
- (22) International Filing Date: 19 February 2002 (19.02.2002)
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Priority Data:
60/270,066 20 February 2001 (20.02.2001) US
10/028,741 20 December 2001 (20.12.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/270,066 (CON)
Filed on 20 February 2001 (20.02.2001)
US 10/028,741 (CON)
Filed on 20 December 2001 (20.12.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION [US/US]: 825 Northeast 13th Street, Oklahoma City, OK 73104 (US).
Published: with international search report
(88) Date of publication of the international search report: 24 April 2003
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KUROSAWA, Shinichiro [JP/US]: 4400 South coltrane Road, Edmond, OK 73013 (US). STEARNS-KUROSAWA, Deborah, J.
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/066981 A3

(54) Title: MONITORING SOLUBLE ENDOTHELIAL PROTEIN C RECEPTOR LEVELS IN ANTICOAGULANT THERAPY

(57) Abstract: The assay of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) is useful to monitor effective thrombin levels and a hypercoagulable state. An assay for sEPCR is therefore useful to monitor ongoing effectiveness of anticoagulant therapy. A sEPCR ELISA assay is particularly useful for this purpose. A state of hypercoagulability in patients or normal individuals can also be identified by such an assay.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Interg. Application No PCT/US 02/05023
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/86		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	D. J. STEARNS-KUROSAWA ET AL.: "Plasma levels of endothelial protein c receptor respond to anticoagulant treatment" BLOOD, vol. 99, no. 2, 2002 - 15 January 2002 (2002-01-15), pages 526-530, XP002215517 the whole document --- -/--	1-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 October 2002	Date of mailing of the international search report 24/10/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Diez Schlereth, D	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 02/05023

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. KUROASAWA ET AL.: "Plasma levels of endothelial cell protein c receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes" BLOOD, vol. 91, 1998, pages 725-727, XP002215518 cited in the application	17-30
Y	the whole document	1-16
X	US 5 804 392 A (KUROSAWA SHINICHIRO ET AL) 8 September 1998 (1998-09-08) cited in the application	17-30
Y	column 3, line 30 -column 4, line 10 column 5, line 15 -column 10, line 60	1-16
X	US 6 037 450 A (KUROSAWA SHINICHIRO ET AL) 14 March 2000 (2000-03-14)	17-30
Y	column 5, line 10 -column 10, line 60	1-16
Y	J.-M. GU ET AL.: "Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein c receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo" BLOOD, vol. 95, no. 5, 2000 - 1 March 2000 (2000-03-01), pages 1687-1693, XP002215519 abstract	1-16
Y	J. XU ET AL.: "Metalloproteolytic release of endothelial cell protein c receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 8, 2000 - 25 February 2000 (2000-02-25), pages 6038-6044, XP002215520 cited in the application page 6403	1-16
A	US 5 981 285 A (CARROLL WALLACE E ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) abstract	1-30
A	US 5 935 802 A (LIND STUART E) 10 August 1999 (1999-08-10) column 1, line 5-50 column 2, line 63 -column 4, line 50	1-30

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International Application No
 PCT/US 02/05023

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5804392	A	08-09-1998	AU 748199 B2 30-05-2002
			AU 8269498 A 19-01-1999
			EP 0991946 A1 12-04-2000
			JP 2001508876 T 03-07-2001
			JP 2002193998 A 10-07-2002
			WO 9900673 A1 07-01-1999
US 6037450	A	14-03-2000	NONE
US 5981285	A	09-11-1999	WO 0007012 A1 10-02-2000
			AU 8679298 A 21-02-2000
			BR 9815975 A 04-12-2001
			EP 1101110 A1 23-05-2001
US 5935802	A	10-08-1999	NONE

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 クロサワ シンイチロウ

アメリカ合衆国 オクラホマ 73013, エドモンド, サウス コルトレーン ロード 4
400

(72) 発明者 スターンズ クロサワ, デボラ ジェイ.

アメリカ合衆国 オクラホマ 73013, エドモンド, サウス コルトレーン ロード 4
400

Fターム(参考) 2G045 AA10 AA25 CA25 CA26 CB03 DA36 DA77 FB03