(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0017576
(43) 공개일자 2010년02월16일

(51) Int. Cl.
G01N 33/86 (2006.01) *C12Q 1/56* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7025187
(22) 출원일자 2008년05월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2009년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/062415
(87) 국제공개번호 WO 2008/137673
국제공개일자 2008년11월13일
(30) 우선권주장
60/915,820 2007년05월03일 미국(US)

(71) 출원인
아큐메트릭스, 인크.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 소렌토 밸리 불러바드 3985
(72) 발명자
더빈, 데니스
미국 92075 캘리포니아주 솔라나 비치 마솔란 애비뉴 711
(74) 대리인
양영준, 양영환

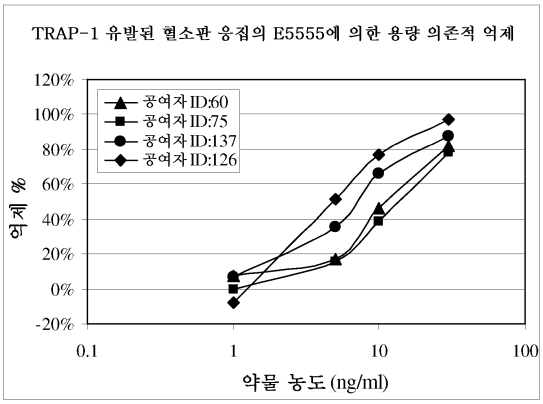
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정 방법

(57) 요 약

본 발명은 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정 방법을 제공한다. 먼저, 혈액 샘플을 트롬빈 수용체 길항제로 처리된 환자로부터 얻는다. 혈액 샘플을 고정된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는 입자와 함께 혼합한다. 이어서, 혼합물을 입자가 유착되기에 적합한 조건하에서 인큐베이션하고, 혈소판 매개된 유착을 혼합물에서 평가한다. 유착의 부재는 트롬빈 수용체 길항제 치료에 반응하여 환자의 혈소판 혈전의 형성 능력이 감소되었음을 나타낸다. 또한 입자 상에 고정된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제, 항응고제 및 완충제를 항응고된 혈액을 혈소판 응집에 적합한 상태로 유지하기 위해 포함하는, 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정을 위한 키트가 제공된다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

a) 트롬빈 수용체 길항제로 처리된 개체로부터 혈소판 함유 혈액 샘플을 제공하는 단계;

b) 상기 혈소판 함유 혈액 샘플 내 혈소판 응집을 활성화하기에 적합한 조건하에서 상기 혈소판 함유 혈액 샘플을 트롬빈 수용체 활성제와 접촉시키는 단계; 및

c) 혈소판 응집을 상기 혈소판 함유 혈액 샘플 내에서 평가하여 상기 개체의 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 존재, 부재 및/또는 그 정도를 결정하는 단계를 포함하며, 이때 상기 혈소판 응집의 부재 또는 감소는 상기 트롬빈 수용체 길항제 치료에 반응하여 개체의 혈소판 응집의 형성 능력이 감소되었음을 나타내는 것인

트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체가 PAR-1 또는 PAR-4인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 활성제가 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1) 및 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 트롬빈의 최종 농도가 약 0.01 U/ml 내지 약 0.5 U/ml인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 TRAP-1의 최종 농도가 약 0.5 μM 내지 약 10 μM인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 TRAP-4의 최종 농도가 약 50 μM 내지 약 1 mM인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 활성제가 TRAP-1을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 혈소판 함유 혈액 샘플이 전혈 샘플인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 혈소판 함유 혈액 샘플이 혈장 샘플인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 혈장 샘플이 혈소판 풍부 혈장 (PRP) 샘플인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 길항제가 트롬빈 수용체의 트롬빈 결합 영역에 대한 항체, TRAP-1의 펩티드 유도체, TRAP-4의 펩티드 유도체, TRAP-1 유도체의 펩티드 유사체, TRAP-4 유도체의 펩티드 유사체, E5555 및 SCH 530348로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 길항제가 E5555를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 길항제가 SCH 530348을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 활성제가 약 800 nm에서 피크 흡수를 가지는 분석 매질 내에 함유되는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 30℃ 내지 40℃ 범위의 온도에서 수행되고, 혈소판 함유 혈액 샘플과 트롬빈 수용체 활성제의 접촉 시간으로부터의 판독 총 시간이 약 10초 내지 약 10분인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 혈소판 함유 혈액 샘플이 1회용 분석 장치 내에서 상기 트롬빈 수용체 활성제와 접촉되는 것인 방법.

청구항 17

a) 트롬빈 수용체 길항제로 처리된 개체로부터 혈소판 함유 혈액 샘플을 제공하는 단계;

b) 상기 혈소판 함유 혈액 샘플을 입자 상에 고정된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는 입자와 상기 혈액 샘플 내 상기 혈소판에 의해 매개된 상기 입자의 유착에 적합한 조건하에서 접촉시키는 단계; 및

c) 유착을 평가하여 상기 개체의 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 존재, 부재 및/또는 그 정도를 결정하는 단계를 포함하며, 이때 상기 유착의 부재 또는 감소는 상기 트롬빈 수용체 길항제 치료에 반응하여 개체의 혈소판 응집의 형성 능력이 감소되었음을 나타내는 것인

트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체가 PAR-1 또는 PAR-4인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 활성제가 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1) 및 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 트롬빈의 최종 농도가 약 0.01 U/ml 내지 약 0.5 U/ml인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 TRAP-1의 최종 농도가 약 0.5 μM 내지 약 10 μM인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 TRAP-4의 최종 농도가 약 50 μM 내지 약 1 mM인 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 활성제가 TRAP-1을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제17항에 있어서, 상기 혈소판 함유 혈액 샘플이 전혈 샘플인 방법.

청구항 25

제17항에 있어서, 상기 혈소판 함유 혈액 샘플이 혈장 샘플인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 혈장 샘플이 혈소판 풍부 혈장 (PRP) 샘플인 방법.

청구항 27

제17항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 길항제가 트롬빈 수용체의 트롬빈 결합 영역에 대한 항체, TRAP-1의 펩티드 유도체, TRAP-4의 펩티드 유도체, TRAP-1 유도체의 펩티드 유사체, TRAP-4 유도체의 펩티드 유사체, E5555 및 SCH 530348로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 길항제가 E5555를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 길항제가 SCH 530348을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제17항에 있어서, 상기 입자가 폴리스티렌 또는 라텍스를 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제17항에 있어서, 상기 입자가 약 1 마이크로미터 내지 약 8 마이크로미터의 직경을 가지는 것인 방법.

청구항 32

제17항에 있어서, 상기 입자는 적외선 염료를 포함하며, 혈소판 함유 혈액 샘플과 입자를 접촉시켜 분석 혼합물을 형성하고, 분석 혼합물에 적외선 스펙트럼 내의 빛을 조사하여 분석 혼합물로부터의 적외선 빛의 투과를 평가함으로써 혈소판에 의해 매개된 입자의 유착을 평가하는 방법.

청구항 33

제17항에 있어서, 상기 GPIIb/IIIa 수용체 리간드가 피브리노겐, 단일 클론 항체 10E5, 단일 클론 항체 c7E3, 폰 빌레브란트 인자, 피브로넥틴, 비트로넥틴 및 아르기닌 글리신-아스파르트산 (RGD) 서열을 가지는 리간드 및 펩티드 또는 RGD 서열을 모방하는 펩티드 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제17항에 있어서, 상기 GPIIb/IIIa 수용체 리간드가 피브리노겐을 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제17항에 있어서, 상기 입자 및 트롬빈 수용체 활성제가 약 800 nm에서 피크 흡수를 가지는 분석 매질 내에 포함되는 것인 방법.

청구항 36

제17항에 있어서, 30℃ 내지 40℃ 범위의 온도에서 수행되고, 혈소판 함유 혈액 샘플과 부착된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는 입자의 접촉 시간으로부터의 판독 총 시간이 약 10초 내지 약 10분인 방법.

청구항 37

제17항에 있어서, 상기 혈소판 함유 혈액 샘플이 1회용 분석 장치 내에서 상기 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 상기 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는 상기 입자와 접촉되는 것인 방법.

청구항 38

입자 상에 고정된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는, 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제 측정용 키트.

청구항 39

제38항에 있어서, 항응고된 혈액의 pH 및 염 농도를 혈소판 응집에 적합한 범위로 유지하기 위한 완충제 및 항응고제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 40

제38항에 있어서, GPIIb/IIIa 수용체 리간드가 피브리노겐, 단일 클론 항체 10E5, 단일 클론 항체 c7E3, 폰 빌레브란트 인자, 피브로넥틴, 비트로넥틴 및 아르기닌 글리신-아스파르트산 (RGD) 서열을 가지는 리간드 및 펩티드 또는 RGD 서열을 모방하는 펩티드 유사체로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 키트.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 GPIIb/IIIa 수용체 리간드가 피브리노겐을 포함하는 것인 키트.

청구항 42

제38항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 활성제가 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1) 및 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 키트.

청구항 43

제38항에 있어서, 상기 트롬빈 수용체 활성제가 TRAP-1을 포함하는 것인 키드.

청구항 44

제38항에 있어서, 상기 입자가 폴리스티렌 또는 라텍스를 포함하는 것인 키트.

청구항 45

제38항에 있어서, 상기 입자가 약 1 마이크로미터 내지 약 8 마이크로미터 범위의 직경을 가지는 것인 키트.

청구항 46

제38항에 있어서, 상기 키트가 1회용 분석 장치를 포함하는 것인 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련 출원의 상호 참조**

[0002] 본 출원은 본원에 전체로서 참고로 도입되어 있는 2007년 5월 3일 출원된 미국 출원 제60/915,820호의 이권을 청구한다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 발명은 진단 분석 분야, 특히 항-혈소판 조성물의 효과 연구를 위한 혈액 샘플에 대한 혈소판 기능 활성의 결정, 보다 특별하게는 민감도가 증가된 E5555 (에자이(Eisai)) 및 SCH 530348 (쉐링-플라우(Schering-Plough))를 비롯한 트롬빈 수용체 억제제의 혈소판 기능 측정을 위한 혈소판 활성제, 예를 들면 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP)의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 포유동물의 생리학에 있어서 혈소판의 역할은 아주 다양하지만, 그의 일차적인 역할은 지혈을 촉진시키는 것에 있다. 많은 경우에 있어서, 혈액의 응고 능력에 대한 평가가 요구되는데, 이는 혈소판이 부착 및/또는 응집되

는 능력에 의해 흔히 조절되는 파라미터이다. 따라서, 혈소판의 부착 기능을 평가하는 것이 중요하다. 예를 들어, 중요한 문제에는 응고물 형성을 차단할 약물을 투여할지, 또는 촉진할 약물을 투여할지, 또는 외과적 수술 절차 전에 혈소판 기능 결핍을 탐지할지 여부가 포함된다. 또한, 중요한 것은 신약으로서 시험되고 있거나 환자에게 승인된 임상 치료제로서 사용되고 있는 혈소판 억제제의 효과를 평가하는 것이다.

[0006] 혈소판은 다양한 조건 및 많은 상이한 시약의 존재하에 응집되는 것으로 알려져 있다. 혈소판 응집은 혈소판들이 서로 결합하는 것을 나타내는데 사용되는 용어이다. 시험관내 혈소판 응집은 트롬빈, 아데노신 디포스페이트(ADP), 또는 콜라겐과 같은 응집-유발 약제에 의한 활성화 후에 혈소판이 그의 표면에 피브리노겐을 결합시키는 능력에 의존한다.

[0007] 혈소판은 정상적인 지혈을 유지하는데 중요한 역할을 담당한다. 손상된 혈관에 노출되는 경우, 혈소판은 노출된 내피하 매트릭스에 부착될 것이다. 초기 부착 후, 손상 부위에서 방출되거나 생성되는 다양한 인자들, 예를 들어 트롬빈, ADP 및 콜라겐이 혈소판을 활성화시킨다. 혈소판이 활성화되면, 혈소판 당단백질인 GPIIb/IIIa 수용체에서 형태 변화가 일어나, 피브리노겐 및/또는 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자와 결합할 수 있게 된다. 인접 혈소판 상에서의 GPIIb/IIIa 수용체에 의한 다가의 피브리노겐 및/또는 폰 빌레브란트 인자 분자의 이러한 결합이 손상 부위로 추가의 혈소판들을 불러모으고, 이들의 응집을 야기하여 지혈 플러그 또는 혈전을 형성하게 한다.

[0008] 시험관내 혈소판 응집의 측정은 생체내에서 응집체를 형성하여 일차 지혈 플러그를 만드는 혈소판의 능력을 평가하기 위해 실험실에서 사용되는 방법이다. 이 기법에서는 ADP 또는 콜라겐과 같은 응집체를 전혈 또는 혈소판 풍부 혈장에 첨가하고 혈소판의 응집을 모니터링한다. 혈소판 응집의 측정은 환자 진단 및 치료법의 선택을 도울 수 있는 진단 도구이다. 현재의 혈소판 응집을 측정하는 분석은 고비용에, 시간이 많이 들며, 번거롭고, 일반적으로 임상 환경에 적합하지 않다.

[0009] 고속 혈소판 기능 분석이 개발되었으며, 본원에 전체로서 참고로 도입되어 있는 미국 특허 제5,763,199호(칼러(Coller))에 기재되어 있다. 이 분석은 전혈 중 당단백질 GPIIb/IIIa 수용체 차단을 측정한다. GPIIb/IIIa 리간드, 예를 들어 피브리노겐으로 코팅된 작은 중합체 비드를 차단되지 않은 활성화된 GPIIb/IIIa 수용체를 갖는 혈소판 함유 전혈과 접촉시키면, 상기 비드들의 유착(agglutination)이 야기된다. 유착 실패는 GPIIb/IIIa 수용체가 활성화되지 못했고/거나 GPIIb/IIIa 수용체가 차단된 것을 나타낸다. 바람직한 실시양태에서, 트롬빈 수용체 활성제를 첨가하여, GPIIb/IIIa 수용체가 차단되지 않을 경우 간편하고 알려진 시간 동안 작은 중합체 비드들의 유착을 야기하는, 병상에서 수행되기에 충분히 빠르고 간편한 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석은 수집 용기를 개방하지 않고 시험될 혈액을 수집 용기로부터 분석 장치로 옮기는 능력을 포함한다. 이 혈소판 응집 분석은 헤파린화의 적절성을 평가하기 위해 수행되는 활성화된 응고 시간 (ACT)과 동시에 수행될 수 있다.

[0010] 혈소판 응집은 혈전증 및 급성 심장 동맥 질환의 발병과정에서 핵심적인 역할을 담당한다. 혈전증의 치료에 관한 하나의 접근 방법은 트롬빈 효소 활성을 억제하는 것이고, 이를 위해 사용되는 화합물에는 헤파린, 저분자량 헤파린, 히루딘, 아르가트로반, 히룰로그 등이 포함된다. 이러한 모든 화합물은 트롬빈의 효소 활성을 억제하고, 세포에 미치는 트롬빈의 영향을 특별히 억제하지 않으면서 피브린 혈액 응고 형성을 억제함으로써 작용된다. 따라서, 출혈 가능성은 진료에서 맞닥뜨리게 되는 흔한 부작용이다.

[0011] 혈전증에 있어서 트롬빈의 역할은 그의 혈액 응고 활성에 제한되지 않는다. 지혈 및 상처 치료에 있어서의 핵심적인 역할뿐만 아니라, 트롬빈은 트롬빈 수용체로서 또한 알려져 있는 두 개의 세포 표면 G-단백질-연결된-프로테아제-활성화된 수용체(G-protein-coupled protease-activated receptor), PAR-1 및 PAR-4에 결합함으로써 사람의 혈소판을 활성화시킨다. (문헌 [Kahn, *et al., Nature* 1998, 394:690-694]; [Kahn, *et al., J. Clin. Invest*. 1999, 103:879-887] 참조). 트롬빈에 대한 친화도는 PAR-1에서 PAR-4보다 높고, 따라서 소량의 트롬빈에 의한 혈소판 활성화는 PAR-1에 의해 주로 매개되는 것으로 생각된다. PAR-4는 다량의 트롬빈에 의한 지연된 혈소판 활성화를 유지하도록 제안된다. (문헌 [Covic, *et al., Biochemistry* 2000, 39:5458-5467]; [Covic, *et al., Thromb. Haemost*. 2002, 87:722-727] 참조). PAR-1 및 PAR-4 수용체의 활성화는 PKC를 활성화하는 세포내 칼슘 방출을 유발하여, 그에 의해 당단백질 IIb/IIIa를 변화시켜 인테그린 리간드 결합 부위가 혈소판 응집에 기여할 수 있도록 한다. 트롬빈-유발된 세포내 칼슘 방출은 또한 프로스타글란딘 및 트롬복산 생합성의 제1 단계인 아라키돈산을 유리하는 포스포리파아제 A2를 활성화한다.

[0012] PAR-1 및 PAR-4 모두 클론화되어 세포의 트롬빈 수용체를 타겟으로 하는 물질의 개발에 중요한 장을 열었다. (문헌 [Vu, *et al., Cell* 1991, 64:1057-1068]; [Xu, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 1998, 95:6642-6646]; [Maryanoff, *et al., Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 2003, 1(1):13-36] 참조). 이들

트롬빈 수용체의 아미노산 서열의 상세한 시험 결과, PAR-1 및 PAR-4가 둘 다세포외 영역의 특정 부위에서 트롬빈에 의해 분리되어, 수용체의 몸체에 결합되어 막간 신호 전달을 개시하는 새로운 N-말단 서열을 밝히는 것으로 알려졌다. (문헌 [Vu, *et al., Nature* 1991, 353:674-677]; [Coughlin, S.R., *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 1999, 96:11023-11027] 참조). 활성화된 트롬빈 수용체의 새로운 N-말단 서열을 재생성하는 특정 펩티드 (일반적으로 "트롬빈 수용체 활성화 펩티드" 또는 "TRAP"로 나타냄)는 가수분해되지 않은 PAR-1 및 PAR-4의 강력한 선택적 활성제이고, 트롬빈에 의해 유도되는 모든 혈소판 반응을 유발하는 것으로 나타났다. (문헌 [Kahn, *et al., J. Clin. Invest.* 1999, 103:879-887]; [Hung, *et al., J. Biol. Chem.* 1992, 267:20831?20834] 참조).

[0013] 특히 PAR-1을 활성화하는 PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1)는 아미노산 서열 SFLLRNP (NH_2-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-COOH)를 가지는 헵타펩티드이다. 이와는 다르게, 특히 PAR-4를 활성화하는 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)는 GYPGQV (NH_2-Gly-Tyr-Pro-Gly-Gln-Val-COOH)를 가지는 헥사펩티드이다. 다르게는 문헌 내에서 TRAP-4 또는 TRAP-4A로 지칭되는 TRAP-4의 보다 강력한 변형은 아미노산 서열 AYPGKF (NH_2-Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-COOH)를 가지는 것으로 보고되었다. (예를 들면, 문헌 [Soslau, *et al., J. Biol. Chem.* 2001, 276(24):21173-21183] 참조).

[0014] TRAP-1의 구조 활성 상관관계에 관한 연구는 잘려진 TRAP-1 펜타펩티드 Phe-Leu-Leu-Arg-Asn이 트롬빈 또는 TRAP-1에 의해 활성화되는 혈소판 트롬빈 수용체에 대한 약한 길항제임을 제시한다. (문헌 [Vassallo, *et al., J. Biol. Chem.* 1992, 267:6081-6085] 참조). 트롬빈 수용체 길항 작용에 대한 상이한 접근법이 현재까지 조사되었다. 이들 접근법 중 하나는 트롬빈 수용체의 트롬빈 결합 영역에 대한 항체를 제조하는 것이다. 이러한 항체는 트롬빈에 의한 혈소판의 활성화를 특이적으로 및 효과적으로 억제하고, 따라서 트롬빈 수용체 길항제로서 작용한다. (문헌 [Hung, *et al., J. Clin. Invest*. 1992, 89:1350-1353] 참조). 또 다른 접근법은 TRAP의 펩티드 유도체를 개발하는 것이다. (문헌 [Bernatowicz, *et al., J. Med. Chem.* 1996, 39:4879-4887]; [Hoekstra, *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8:1649-1654]; [McComsey, *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, 9:255-260] 참조). 또 다른 접근법은 다양한 높은 처리량 스크리닝 분석을 사용하여 저분자 트롬빈 수용체 길항제에 대해 조사하는 것이다. (문헌 [Ahn, *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, 9:2073-2078] 참조). 치환된 3환 트롬빈 수용체 길항제가 미국 특허 제6,063,847호, 제6,326,380호, 제6,645,987호, 제6,894,065호 및 제7,037,920호에 개시되어 있다.

[0015] 트롬빈이 사람의 혈소판에 대한 가장 강력한 활성제이기 때문에, 트롬빈 수용체 길항제는 혈소판이 풍부한 동맥 혈전증에서 강력한 항혈전 효능을 발휘할 것이다. 트롬빈 수용체 길항 작용이 트롬빈의 피브린 형성 능력을 억제하지 않기 때문에, 이러한 약제는 통상의 항응고제보다 출혈을 덜 야기할 것이다. 트롬빈 수용체에 길항 작용을 가지는 화합물은 트롬빈과 관련된 질환의 치료 또는 예방에 우수한 효능을 보일 것으로 기대되고, 따라서 예를 들면, 혈전증, 혈관재협착, 심부정맥혈전증, 폐색전증, 뇌경색증, 심장질환, 파종혈관내응고, 고혈압, 염증성질환, 류마티즘, 천식, 사구체신염, 골다공증, 신경계장애 및 악성종양의 효과적인 치료 또는 예방에 전망이 있다.

[0016] E5555 (에자이사(Eisai Co., Ltd.), 미국 특허 제7,244,730호 및 제7,304,083호 참조)는 프로테아제-활성화된 PAR-1 트롬빈 수용체에 길항 작용을 하여 혈소판 응집을 억제하는 2-이미노피롤리딘 유도체이다. E5555는 기니피그 혈전증 모델에 대해 항혈전 효과를 가지고, 래트 풍선 손상 모델에서의 신생혈관내막 증식에 및 토끼 거미막하 출혈 모델에 있어서 트롬빈-유발된 수축성 반응에 억제 효과를 가지는 것으로 나타났다. (문헌 [Kogushi, et al., *J. Thromb. Haemost*. 2007, 5(Supp. 1):P-M-059]; [Kay, *et al., Stroke* 2007, 38(12):3259-65] 참조). 사람 세포에서, 급성 관상동맥증후군 (ACS) 환자에게서 높은 발병 위험과 관련 있는 E5555는 염증성 표지, 예를 들면 IL-6, CD40 리간드 및 P-셀렉틴의 트롬빈-유발된 방출 또는 발현에 대한 억제 효과를 가지는 것으로 나타났다. (문헌 [Kogushi, *et al.*] 참조). 관상동맥질환 및 급성 관상동맥증후군에 대한 임상 시험이 미국에서 현재 진행되고 있다.

[0017] 힘바신(호주 목련속 나무의 껍질로부터 유래된 천연 화합물)의 치환된 3환 동족체(analog)인 SCH 530348 (쉐링-플라우사(Schering-Plough Corp.), 미국 특허 제6,063,847호, 제6,326,380호, 제6,645,987호, 제6,894,065호 및 제7,037,920호 참조)은 PAR-1 트롬빈 수용체에 대한 강력한 억제를 보이는 또 다른 신규의 연구중인 항혈소판제이다. 단계 II 임상 시험에서 SCH 530348로 치료된 환자에게서 출혈 시간의 증가 또는 응고 시간의 지연이 나타나지 않았다. (예를 들면, 문헌 [O' Donnell, *et al.*, "Antiplatelet Therapy for Secondary Prevention of Noncardioembolic Ischemic Stroke-A Critical Review," *Stroke*, published online before print March

27, 2008] 참조). 관련된 약동학 및 약 역학 분석에서 SCH 530348이 비-급성 경피적 관상동맥 중재술 (PCI)을 받은 환자로부터의 혈액 샘플에서 지속적이고, 용량 의존적이며, 특정 작용제-유발된 혈소판 응집 억제를 나타냈음을 보였다. 상기 화합물에 대해 급성 관상동맥증후군에 대한 및 죽상혈전성 허혈성 질환의 예방에 대한 단계 III 임상 시험이 현재 진행중이다.

[0018] 트롬빈 수용체 길항제, 예를 들면 E5555 및 SCH 530348이 심장혈관 및 다른 장애가 있는 많은 환자에게 사용될 것으로 기대되기 때문에, 트롬빈 수용체 길항제에 대한 내성의 검출 및 트롬빈 수용체 길항제 치료의 효능의 평가가 유익할 것이다. 따라서, 환자에 대한 트롬빈 수용체 길항제의 민감도 및 치료의 효능에 대한 정보를 제공할 수 있는 분석의 개발이 필요하다.

[0019] **발명의 요약**

[0020] 따라서, 본 발명의 목적은 혈소판 활성제로서 트롬빈 수용체 활성제, 예를 들면 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1), 또는 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)를 사용하여 측정되는 트롬빈 수용체 길항제에 의한 작용을 받은 혈액 샘플을 분석하기 위한 방법 및 키트를 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 이 목적 및 다른 목적은 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정 방법에 의해 이루어진다. 먼저, 트롬빈 수용체 길항제로 처리된 개체로부터 혈소판 함유 혈액 샘플을 얻는다. 다음으로, 혈소판 함유 혈액 샘플 내 혈소판 응집을 활성화하기에 적합한 조건하에서 상기 혈액 샘플을 트롬빈 수용체 활성제와 접촉시킨다. 마지막으로, 혈소판-매개된 유착을 상기 혈소판 함유 혈액 샘플 내에서 평가하여 개체의 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 존재, 부재 및/또는 그 정도를 결정한다. 혈소판 응집의 부재 또는 감소는 트롬빈 수용체 길항제 치료에 반응하여 개체의 혈소판 혈전의 형성 능력이 감소되었음을 나타낸다.

[0022] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제를 측정하는 대안 방법이 제공된다. 먼저, 트롬빈 수용체 길항제로 처리된 개체로부터 혈소판 함유 혈액 샘플을 얻는다. 다음으로, 상기 혈액 샘플을 입자 상에 고정된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는 입자와 혈소판 함유 혈액 샘플 내 혈소판 응집을 활성화하기에 적합한 조건하에서 접촉시킨다. 마지막으로, 혈소판-매개된 유착을 혈소판 함유 혈액 샘플 내에서 평가하여 개체의 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 존재, 부재 및/또는 그 정도를 결정한다. 혈소판 응집의 부재 또는 감소는 트롬빈 수용체 길항제 치료에 반응하여 개체의 혈소판 혈전의 형성 능력이 감소되었음을 나타낸다.

[0023] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 입자 상에 고정된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는, 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정을 위한 키트가 제공된다. 바람직한 실시양태에서, 항응고된 혈액의 pH 및 염 농도를 혈소판 응집에 적합한 상태로 유지하기 위한 완충제 및 항응고제가 또한 제공된다.

발명의 상세한 설명

[0025] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 업계의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미로 사용된다. 본원에 언급된 모든 특허, 특허 출원(공개 또는 미공개), 및 다른 공보는 전체로서 참고로 도입되어 있다. 이 부분에 기재된 정의가 본원에 참고로 도입된 특허, 출원, 공개된 출원 및 다른 공보와 반대되거나 또는 모순되는 경우, 이 부분에 기재된 정의가 본원에 참고로 도입된 것의 정의에 우선한다.

[0026] 공보 또는 문헌의 인용은 이러한 공보 또는 문헌이 선행 기술이라는 허가를 받는 것이 아니며, 이들 공보 또는 문헌의 내용 또는 날짜에 대해 어떤 허가를 구성하지도 않는다.

[0027] 본원에 사용된 "하나(a 또는 an)"는 "적어도 하나" 또는 "1 이상"을 의미한다.

[0028] 본원에 사용된 용어 "개체(individual)"는 특정 종 또는 샘플 유형에 제한되지 않는다. 예를 들면, 용어 "개체"는 환자, 흔히 사람 환자를 나타낼 수 있다. 그러나, 이 용어는 사람에 제한되지 않으며, 따라서 다양한 포유류 종을 포함한다.

[0029] 본원에 사용된, "치료"는 상태, 장애 또는 질환의 증상을 개선하거나 또는 이롭게 변형하는 임의의 방법을 의미한다. 치료에는 또한 본원의 조성물의 임의의 제약학적 용도가 포함된다.

[0030] 본원에 사용된, "질환 또는 장애"는 확인가능한 증상에 의해 특성화되고, 예를 들면 감염 또는 유전적 결함으로부터 기인하는 유기체 내의 병리학적 상태를 나타낸다.

[0031] 본원에 사용된 용어 "트롬빈"은 가용성 피브리노겐을 불용성인 피브린 가닥으로 변환시키고, 다수의 다른 응고-관련 반응을 촉매하는 세린 프로테아제를 나타낸다. 이 용어는 달리 명시되지 않는 한 종 특이성이 없다. 상기 용어는 트롬빈의 자연 형태인 α-트롬빈, 및 그의 혈소판 활성화 능력을 많이 보유한 α-트롬빈으로부터 생성된 비응고 유도체인 γ-트롬빈을 포함한다. γ-트롬빈이 피브리노겐에 대해 효소적으로 비활성이기 때문에, 그의 농도는 대개 α-트롬빈의 경우에서처럼 유닛/ml(U/ml)으로 표현되지 않는다. 그러나, 10 내지 20 nm의 γ-트롬빈이 0.05 내지 0.1 U/ml의 α-트롬빈과 동일하다는 것이 문헌에 보고되어 있다. (예를 들면, 문헌 [Soslau, *et al., J. Biol. Chem.* 2001, 276(24):21173-21183] 참조).

[0032] 본원에 사용된 용어 "트롬빈 수용체"는 트롬빈에 의해 활성화되는 G-단백질-연관된 수용체의 프로테아제 활성화된 수용체 (PAR) 군의 임의의 구성원을 나타낸다. 이 용어는 달리 명시되지 않는 한 종 특이성이 없다. 현재까지 PAR 군의 4개의 구성원이 PAR-1, PAR-2, PAR-3 및 PAR-4로 특성화되었다. (문헌 [MacFarlane, *et al.*, "Proteinase Activated Receptors," *Pharmacol. Rev.* 2001, 53:245-282] 참조). 이들 4개의 수용체 중, PAR-2가 트립신에 의해 활성화되는 반면, PAR-1, PAR-3 및 PAR-4는 트롬빈에 의해 활성화된다. 따라서, 용어 "트롬빈 수용체"는 본원에서 광범위하게 PAR-1, PAR-3 및 PAR-4를 나타낸다. 그러나, PAR-3 발현이 사람의 혈소판에서는 검출되지 않기 때문에, 현재 알려진 프로테아제 활성화된 수용체 중 오직 PAR-1 및 PAR-4만이 본 발명에 관련이 있다.

[0033] 본원에 사용된 용어 "트롬빈 수용체 활성제"는 PAR-1 및/또는 PAR-4 트롬빈 수용체에 의해 매개되는 세포내 칼슘 방출을 비롯한 세포내 신호 전달을 활성화하는 능력이 있는 임의의 분자를 의미한다. 일부 트롬빈 수용체 활성제, 예를 들면 트롬빈은 단백질 가수분해에 의해 PAR-1 및/또는 PAR-4를 활성화할 수 있고; 다른 것들, 예를 들면 TRAP-1 및 TRAP-4는 가수분해되지 않은 PAR-1 및 PAR-4를 각각 활성화할 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "트롬빈 수용체 활성제"는 트롬빈 수용체 활성화의 특정 방식에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0034] 본원에 사용된 용어 "TRAP-1"은 특히 PAR-1를 활성화하는 헵타펩티드 SFLLRNP (NH_2-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-COOH) 및 펩티드 유사체(peptidomimetic) 및 그의 관능적 유도체를 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "TRAP-4"는 PAR-4를 특이적으로 활성화하는 천연의 헥사펩티드 GYPGQV (NH_2-Gly-Tyr-Pro-Gly-Gln-Val-COOH) 및 최적화된 헥사펩티드 AYPGKF (NH_2-Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-COOH, 종종 TRAP-4A로 나타냄), 및 펩티드 유사체 및 그의 관능적 유도체를 나타낸다.

[0035] 본 발명의 다양한 실시양태에서, 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1), 또는 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)는 혈액 샘플에서 트롬빈 수용체 길항제, 예를 들면 E5555 및 SCH 530348에 의한 혈소판 응집 억제의 측정에서 트롬빈 수용체 활성제로서 이용된다. 따라서, 앞서 언급한 조성물이, 예를 들면 2-이미노피롤리돈 유도체, 예를 들면 E5555, 또는 치환된 3환 힘바신 유도체, 예를 들면 SCH 530348로 환자를 치료하는 것을 수반하는 항-혈소판 치료의 유효성을 결정하는데 사용될 수 있다. 상기 조성물은 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 길항제의 효능에 대한 분석을 수행하기 위해 필요한 그 외 다른 시약으로 코팅된 입자와 함께 사용될 수 있다. 동결건조된 시약 조성물을 사용하여 상기 언급된 활성제 조성물 및 입자를 구성할 수 있다. 하나의 접근 방법으로, 전혈과 같이 측정되어야 하는 샘플의 계량된 부피만큼을 동결건조된 시약과 기계 교반시킨다. 빛 투과율의 변화를 모니터링하고, 혈소판 활성의 지표를 계산한다. 일 측면에서, 전혈 샘플을 큐벳 또는 유닛화된 카트리지 내에서 상기 언급된 동결건조된 시약과 결합한다. 상기 분석을 수행하기 위한 장치가 사용될 수 있다. 상기 장치는 동결건조된 시약 및 상기 분석을 수행하기 위한 다른 시약을 함유하는 샘플 수용 웰을 포함한다. 추가 시약은 다양한 완충제 및/또는 동결건조 안정화제일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시양태에서, 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 측정 방법이 제공된다. 먼저, 트롬빈 수용체 길항제로 처리된 개체로부터 혈소판 함유 혈액 샘플을 얻는다. 다음으로, 혈소판 함유 혈액 샘플 내 혈소판 응집을 활성화하기에 적합한 조건하에서 상기 혈액 샘플을 트롬빈 수용체 활성제와 접촉시킨다. 마지막으로, 혈소판-매개된 유착을 상기 혈소판 함유 혈액 샘플 내에서 평가하여 개체의 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 존재, 부재 및/또는 그 정도를 결정한다. 혈소판 응집의 부재 또는 감소는 트롬빈 수용체 길항제 치료에 반응하여 개체의 혈소판 혈전의 형성 능력이 감소되었음을 나타낸다.

[0037] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제를 측정하는 대안 방법이 제공된다. 먼저, 트롬빈 수용체 길항제로 처리된 개체로부터 혈소판 함유 혈액 샘플을 얻는다. 다음으로, 상기 혈액 샘플을 입자 상에 고정된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 트롬빈 수용체 활성제를 포함하는 입자와 혈소판 함

유 혈액 샘플 내 혈소판 응집을 활성화하기에 적합한 조건하에서 접촉시킨다. 마지막으로, 혈소판-매개된 유착을 혈소판 함유 혈액 샘플 내에서 평가하여 개체의 트롬빈 수용체 길항제에 의한 혈소판 응집 억제의 존재, 부재 및/또는 그 정도를 결정한다. 혈소판 응집의 부재 또는 감소는 트롬빈 수용체 길항제 치료에 반응하여 개체의 혈소판 혈전의 형성 능력이 감소되었음을 나타낸다.

[0038] 일 측면에서, 평가되는 트롬빈 수용체는 PAR-1 또는 PAR-4이다. 따라서, 또 다른 측면에서, 트롬빈 수용체 활성제는 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1) 및 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)로 구성된 군으로부터 선택되는 물질을 포함할 수 있다. 트롬빈의 최종 농도는 전형적으로 약 0.01 유닛/ml (U/ml) 내지 약 0.5 U/ml, 바람직하게는 약 0.05 U/ml 내지 약 0.1 U/ml이다. TRAP-1의 최종 농도는 전형적으로 약 0.5 μM 내지 약 10 μM, 바람직하게는 약 1 μM 내지 약 5 μM이다. TRAP-4의 최종 농도는 일반적으로 약 50 μM 내지 약 1 mM, 바람직하게는 약 0.1 mM 내지 약 0.5 mM이다. 중요하게, TRAP-4A 변형 (AYPGKF)이 야생형 TRAP-4 (GYPGQV)보다 더 강력하여, 예를 들면 0.5 mM TRAP-4 및 0.1 mM TRAP-4A로 유사한 수준의 혈소판 응집이 얻어질 수 있다고 알려져 있다.

[0039] 일 측면에서, 본 발명은 전혈 샘플에서 혈소판 기능 활성에 대한 분석을 수행하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 혈소판 기능 활성 분석은 혈장 샘플에서 수행될 수 있다. 또 다른 측면에서, 혈소판 기능 활성 분석은 혈소판 풍부 혈장 (PRP) 샘플에서 수행될 수 있다.

[0040] 일 실시양태에서, 샘플은 트롬빈 수용체 길항제에 의해 작용받는 것이다. 예를 들면, 샘플은 트롬빈 수용체 길항제, 예를 들면 PAR-1 또는 PAR-4 길항제에 의한 치료를 받는 환자로부터의 것일 수 있다. 일 측면에서, 트롬빈 수용체 길항제는 트롬빈 수용체의 트롬빈 결합 영역에 대한 항체를 포함한다. 또 다른 측면에서, 트롬빈 수용체 길항제는 TRAP-1 또는 TRAP-4를 비롯한 TRAP 펩티드의 펩티드 유도체 또는 펩티드 유사체를 포함한다. 또 다른 측면에서, 트롬빈 수용체 길항제는 2-이미노피롤리딘 유도체, 예를 들면 E5555 (에자이사, 미국 특허 제7,244,730호 제7,304,083호 참조), 또는 치환된 3환 힘바신 유도체, 예를 들면 SCH 530348 (쉐링-플라우사, 미국 특허 제6,063,847호, 제6,326,380호, 제6,645,987호, 제6,894,065호 및 제7,037,920호 참조)를 포함한다.

[0041] 또한 본 방법에 사용되는 것은 혈소판의 특이적 유착, 즉 혈소판 상의 수용체와 입자 상의 화합물 사이의 특이적 상호 작용에 의한 혈소판의 유착을 야기할 수 있는 화합물로 코팅된 입자를 포함하는 시약이다. 이러한 화합물에는 혈소판 표면 상의 GPIIb/IIIa 수용체와 결합, 착물화되거나 또는 상호 작용하는 작은 유기 분자, 폴리펩티드, 단백질, 단일 클론 항체 또는 핵산일 수 있는 GPIIb/IIIa 수용체 리간드 및 혈소판 수용체에 대한 항체를 포함하며 이는 예시적인 것이며, 이에 제한되지 않는다. 입자의 혈소판 매개된 응집은 혈소판 표면 상의 GPIIb/IIIa 수용체가 입자 상의 GPIIb/IIIa 수용체 리간드와 결합, 착물화되거나 또는 상호 작용할 때의 결과이다. 전형적인 GPIIb/IIIa 리간드에는 피브리노겐, 단일 클론 항체 10E5 (Coller, *et al., J. Clin. Invest.* 1983, 72:325), 단일 클론 항체 c7E3 (The EPIC Investigators, *N.E. J. Med.* 1994, 330:956), 폰 빌레브란트 인자, 피브로넥틴, 비트로넥틴 및 아르기닌 글리신-아스파르트산 (RGD) 서열을 가지는 다른 리간드 또는 다른 펩티드 또는 이 서열을 모방하는 펩티드 유사체가 포함된다 (Cook, *et al., Drugs of the Future* 1994, 19:135). 중요한 다른 화합물에는 저분자량 헤파린 등이 포함될 수 있다.

[0042] 화합물이 부착된 입자는 약 0.1 마이크로미터 이상 약 20 마이크로미터 이하이다. 일 실시양태에서, 입자는 약 0.1 마이크로미터 내지 약 10 마이크로미터이다. 또 다른 실시양태에서, 입자는 약 1 마이크로미터 이상 약 8 마이크로미터 미만이다. 입자는 사실상 어떤 형태든 가능하지만, 일반적으로 일정한 직경을 가지는 구형이다. 입자는 어떤 밀도도 가질 수 있지만, 바람직하게는 물에 근접한 밀도, 일반적으로는 약 0.7 내지 약 1.5 g/ml의 밀도를 가진다. 입자는 표면에 양 또는 음, 바람직하게는 음전하를 가질 수도 있고, 가지지 않을 수도 있다. 입자는 그들의 표면에서 직접 또는 간접적으로 이러한 구성원을 수동적으로 결합 또는 부착시킬 수 있도록 기능화되거나, 또는 기능화될 수 있다.

[0043] 입자는 고체 (예를 들면, 유기 및 무기 중합체 또는 라텍스(latex)로 구성됨), 기름 방울 (예를 들면, 탄화수소, 탄화플루오르, 규소 유체), 또는 액포(vesicle) (예를 들면, 인지질과 같은 합성물 또는 세포 및 세포기관과 같은 자연물)일 수 있다. 고체 입자는 일반적으로 중합제이고, 액체 매질에서 쉽게 분산될 수 있는 첨가 또는 축합 중합체 중 하나이다. 현탁가능한 입자의 예는 라텍스, 지방 이중층, 기름 방울, 세포 및 히드로겔과 같은 중합체성 물질이다. 다른 입자 조성물에는 중합제, 예를 들면, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 폴리(염화비닐), 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(4-메틸부텐), 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 나일론, 폴리(비닐 부티레이트), 폴리사카라이드, 예를 들면 덱스트란 및 개질된 덱스트란 등이 포함되며, 단독으로 또는 다른 물질과 함께 사용된다.

고체 입자는 폴리스티렌, 폴리아크릴아미드, 동질중합체, 아크릴레이트 및 메타크릴레이트의 유도체, 특히 에스테르 및 아미드의 공중합체, 실리콘 등으로 이루어질 수 있다.

[0044] 상기 언급한 바와 같이, 화합물이 입자에 코팅된다. 대개, 화합물은 입자에 수동적으로 결합된다. 이러한 수동적 부착은 일반적으로 문헌에서 이용 가능한 공지된 기술에 의해 이루어진다. (예를 들면, 문헌 ["Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978)]; [Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.* 1970, 245:3059] 참조). 간략히, 상기 언급한 바와 같이, 입자의 표면은 다관능일 수 있거나 또는, 다관능화될 수 있다. 다양한 관능기가 가능하거나 또는 도입될 수 있다. 관능기에는 카르복실산, 알데히드, 아미노기, 시아노기, 에틸렌기, 히드록시기, 머캅토기 등이 포함된다. 다양한 화합물의 표면에의 결합 방법이 공지되어 있고, 문헌 (상기 참조)에 상세하게 나타나 있다. 부 구성원의 부착은 결합에 의해 직접적으로 또는 결합기의 중개를 통해 간접적으로 될 수 있다. 결합기의 길이는 매우 다양하고, 부 구성원 및 입자의 특성에 따라 달라진다.

[0045] 입자에 대한 화합물의 비율은 입자에 대한 화합물 분자의 부착으로 제어된다. 하나의 접근 방식으로, 입자의 표면 상에 관능화된 부위의 수는 입자의 표면에 도입된 이러한 부위의 수를 조절함으로써 제어할 수 있다. 별법으로, 또는 상기와 관련하여, 입자에 대한 화합물 분자의 비율은 부착을 위한 반응 매질 내 화합물의 농도를 조절함으로써 제어할 수 있다. 다른 접근 방식이 상기의 가르침과 관련하여 당업자에게 제안될 것이다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 입자 시약은 입자 상의 흡착 면적을 차단하기에 충분한 양의 물질로 처리될 수 있다. 이러한 물질은 본 발명에서 의도된 그의 목적을 위해 입자의 기능화에 영향을 주지 않을 것이다. 차단 물질에는 단백질, 예를 들면 소혈청 알부민, 소 감마 글로불린 등, 폴리사카라이드, 예를 들면 덱스트란 등이 포함된다. 상기와 관련하여 이용될 수 있는 또 다른 접근 방식으로, 부착을 위해 관능화된 부위의 수가 입자의 표면 상의 흡착 면적을 실질적으로 감소시키는 입자가 사용된다.

[0047] 일반적으로 입자는 그에 부착되거나 또는 도입된 라벨을 포함한다. 라벨은 검출 목적으로 사용될 수 있는 임의의 일부분일 수 있다. 라벨은 종종 신호 생성 시스템의 일부이다. 라벨은 직접 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 라벨은 동위원소 또는 비동위원소일 수 있고, 일반적으로는 비동위원소일 수 있고, 염료, 형광 분자, 화학발광 분자, 촉매, 예를 들면 효소, 촉매를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 프로모터, 조효소, 효소 기질, 방사성기, 작은 유기 분자, 확장될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열 등일 수 있다.

[0048] 본 발명의 하나의 특이적 실시양태에서, 입자는 적외선에 흡수되는 1 이상의 염료를 함유한다. 이러한 염료에는 박테리오클로린, 박테리오클로로피틴, 메로폴리메타인 염로, 벤조아눌렌, 비닐로구스 포르피린, 폴리메타인 염료, 시아닌 및 메로시아닌 등이 포함된다. 중요한 특정 염료는 구리 (II)-테트라-tert-부틸-테트라키스(디메틸아미노)-29H-31H-프탈로시아닌 및 바나딜-테트라-tert-부틸-테트라키스(디메틸아미노)-29H-31H-프탈로시아닌이다. 선택된 특정 염료는 편리하고, 용이하고, 안정적이고, 입자와 혼화되는 것이다. 이들 염료는 입자 자체에 중합 또는 수동적 흡착에 의해 직접 혼입될 수 있다. 염료는 하나하나 (즉, 순차적으로) 또는 함께 (즉, 동시에) 적재될 수 있다. 별법으로, 염료는 연결 성분과 함께 비드에 연결되어 표면으로부터 침출되지 않는다. 사용되는 적재 방법에 상관없이, 조건은 입자 표면이 적절한 조건하에 유착되는 능력에 대해서는 영향을 받지 않도록 한다.

[0049] 염료는 약 750 nm 내지 약 900 nm의 범위, 바람직하게는 약 750 nm 내지 약 850 nm의 범위의 적외선 빛을 흡수한다. 높은 수준의 적혈구가 있는 샘플의 경우, 빛은 산화 헤모글로빈 및 환원된 헤모글로빈에 대한 등흡광점인 약 800 ± 10 nm이다. 입자와 함께 염료의 양은 중요한 범위의 빛에서의 염료의 흡광 계수, 요구되는 분석의 민감도, 입자 크기, 입자에의 염료의 결합 방식, 입자 매트릭스와 염료의 혼화성 등에 따라 달라진다. 대개, 혼입되는 염료의 양은 약 1 내지 20 중량%, 보다 바람직하게는 대개 5 내지 15 중량%이다. 본 발명에서 특정 용도를 발견한 염료는 프탈로시아닌이다. 금속 비함유 프탈로시아닌은 대략 700 nm (e=162,000)에서 흡수한다. 금속 복합물은 흡수를 더 짧거나 또는 더 긴 파장으로 이동시키고, 대부분의 금속은 흡수를 더 짧은 파장으로 이동시키지만, 납과 같이 일부는 금속 비함유 프탈로시아닌보다 흡수를 더 긴 파장으로 이동시킨다.

[0050] 전이금속 및 프탈로시아닌 사이에 형성된 복합물 (메탈로프탈로시아닌 및 페탈로나프탈로시아닌)은 화학적으로 빛 및 열에 매우 안정하다. 이들은 적절한 금속의 존재하에 o-프탈로디니트릴의 축합에 의해 형성된다. 메탈로프탈로시아닌의 형성에 사용되는 금속의 일부는 구리 (Cu) 및 바나듐 (V) 및 마그네슘 (Mg), 아연 (Zn) 및 코발트 (Co)이다.

[0051] 본 발명의 하나의 특정 실시양태에서, 일정한 최대 흡수를 가지는 카르복실화된 마이크로입자가 사용된다. 이

들 마이크로입자는 805 nm에 근접한 상이한 최대 흡수를 가지는 복수의 염료를 도입하여 제조한다. 이 결과 780 내지 820 nm의 넓은 범위의 파장에 걸쳐 일정한 최대 흡수 스펙트럼이 얻어진다.

[0052] 샘플은 트롬빈 수용체 길항제, 특히 E5555 또는 SCH 530348로부터 영향을 받아 분석되어야 하는 임의의 합성 또는 천연 용액일 수 있다. 샘플에는 수용자로부터의 신체 유체를 비롯한 생물학적 조직 등이 포함된다. 샘플은 일반적으로 바로 시험될 수 있거나, 또는 예비 처리될 수 있다. 본 발명은 신체 유체, 예를 들면 전혈, 혈소한 함유 혈액 분획물, 예를 들면 혈장 등을 포함하여 혈소판을 포함하는 샘플에 특별히 적용된다. 일 실시양태에서, 본 발명은 전혈 샘플에 특별히 적용된다. 샘플의 양은 샘플의 특성에 따라 달라진다. 유체 샘플, 예를 들면 항응고된 혈액에 있어서, 샘플의 양은 대개 약 30 μl 내지 5 ml, 바람직하게는 약 100 내지 300 μl이다. 용어 "샘플"에는 환자로부터 바로 얻은 미처리된 샘플 또는 임의의 편리한 액체 매질, 일반적으로는 수성 매질(예를 들면, 구연산나트륨) 내 예비 처리되고 제조된 샘플이 포함된다.

[0053] 바람직하게는, 본 발명과 관련하여 분석을 수행하기 위한 매질은 수성 매질이다. 다른 극성 공용매가 또한 매질 내에 사용될 수 있고, 일반적으로 1 내지 6개의 탄소 원자, 보다 일반적으로는 알코올, 에테르 등을 비롯한 1 내지 4개의 탄소 원자로부터 산소첨가된 유기 용매가 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 공용매는 약 70 중량% 미만, 보다 일반적으로는 약 30 중량% 미만으로 존재한다. 추가적으로, 다양한 보조 물질이 본 발명과 관련된 방법에 흔히 사용된다. 예를 들면, 분석 매질 및 분석 성분에 대한 안정화제; 계면활성제, 특히 비이온성 계면활성제, 결합 증진제, 예를 들면 폴리알킬렌 글리콜 등 뿐만아니라 완충제가 분석 성분 내에 일반적으로 존재한다.

[0054] 매질에 대한 pH는 대개 약 2 내지 약 11, 바람직하게는 약 4 내지 약 9이다. 다양한 완충제를 사용하여 원하는 pH에 도달할 수 있고, 방법을 사용하는 중에 그 pH를 유지할 수 있다. 예시적인 완충제에는 HEPES, 보레이트, 포스페이트, 카르보네이트, 트리스, 바르비탈 등이 포함된다. 사용되는 특정 완충제는 본 방법에 있어서 중요하지 않지만, 하나의 완충제가 특정 환경 내에서 다른 완충제에 비해 바람직할 수 있다. 일부 환경에서는, HEPES가 바람직하고, 약 0.001 M 내지 약 0.05 M, 전형적으로는 약 0.01 M의 농도로 존재한다.

[0055] 분석 매질의 부피는 약 25 μl 내지 약 500 μl, 일반적으로는 약 75 μl 내지 약 250 μl이다. 분석은 임의의 적합한 용기 내에서 수행될 수 있다. 편리하게, 용기는 분석을 수행하고 분석 결과를 측정하기 위한 장치와 사용되는 큐벳 또는 카트리지이다. 반응 용기는 일반적으로 본 발명과 관련된, 동결건조된 형태의 활성화 개시제를 다른 시약, 예를 들면 입자 시약, 안정화제 등과 함께 함유한다.

[0056] 샘플 및 입자 시약의 혼합물을 입자 유착 조건하에서 인큐베이션한다. 본 방법을 수행하기 위해 일반적으로 적당한 온도를 사용한다. 온도는 일정하거나 변할 수 있다. 일반적으로, 일정한 온도가 반응 단계 중에 사용된다. 사용되는 온도는 일반적으로 약 10 내지 약 80℃, 보다 일반적으로는 약 15 내지 약 45℃, 바람직하게 상기 온도는 25℃ 이상이고, 보다 바람직하게는 약 30 내지 약 40℃의 범위, 일반적으로는 약 37℃이어야 한다.

[0057] 입자의 유착 정도가 결정되고, 이는 샘플 내 트롬빈 수용체 길항제의 존재 및/또는 그 양에 관련된다. 유착의 존재는 유착을 나타내는 입자의 응괴를 관찰함으로써 시각적으로 결정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 언급된 바와 같이 유착 또는 매트릭스의 응괴의 시각화를 돕기 위해 입자를 착색할 수 있다. 유착의 정도는 분광광도법, 탁도법, 혼탁법 등으로 매질의 광학 밀도 등의 변화율을 관찰함으로써 측정될 수 있다.

[0058] 본 발명의 특정 실시양태에서, 혈소판 기능 활성화에 대한 분석은 E5555 또는 SCH 530348로 치료를 받은 환자로부터의 전혈 샘플 상에서 수행된다. 샘플을 적합한 용기, 예를 들면 반응 큐벳 내에서 피브리노겐 코팅된 입자 및 트롬빈 수용체 활성제, 예를 들면 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1), 또는 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)와 합쳐 분석 매질을 형성한다. 입자 시약의 입자들은 그 안에 도입된 1 이상의 적외선 염료를 가진다. 혼합물을 유착 조건하에 둔다. 이어서, 매질에 적외선 영역의 빛을 조사한다. 투과율이 혈소판 기능 활성과 관련된 경우, 분석 혼합물로부터의 적외선 빛의 투과를 측정한다.

[0059] 유착 매질은 약 800 nm에서 피크 흡수를 갖도록 선택된다. 유착 매질 흡수 계수 및 전혈 흡수 계수 사이의 비는 바람직하게는 800 nm에서 약 4:1보다 커야 한다. 특정 분석에 있어서 흡수비는 분석 샘플 내 유착 매질의 흡수 계수 및 유착 매질의 농도 둘 다의 함수이다.

[0060] 샘플이 시약과 합쳐진 후, 온도가 분석 결과에 거스르는 영향을 주지 않게 제어될 수 있다고 확신하도록, 바람직하게는 상온보다 높지만 분석을 방해하게 되는 온도 미만으로 가열될 것이다. 바람직하게, 온도는 25℃ 이상, 바람직하게는 30 내지 40℃의 범위, 보다 바람직하게는 약 37℃이어야 한다. 일반적으로 반응 기간 동안에 시약을 샘플과 합쳐 반응 매질을 천천히 교반한다. 교반은 분석 샘플내 균일성을 이루고 유지하기에 충분하

다. 제로 타임 (혼합 시간)으로부터의 판독 총 시간은 약10초 내지 10분, 보다 일반적으로는 약 30초 내지 8분, 바람직하게는 약 30초 내지 3분일 수 있다. 데이터는 임의의 편리한 방법, 특히 눈금 측정기 및/또는 대조군과 관련하여 데이터를 다룰 수 있는 알고리즘을 사용하여 분석될 수 있다.

[0061] 유착의 수준은 시험한 샘플의 혈소판 기능 활성의 지표이다. 유착의 수준은 공지된 혈소판 기능 활성의 표준과 비교할 수 있다. 일반적으로, 결과는 수반되어 수행될 수 있거나 이전에 수행되었을 수 있거나 표준 곡선으로서 제공될 수 있는 눈금 측정기와 비교된다.

[0062] 본 발명의 방법은 관련된 부분이 본원에 참고로 도입되어 있는, 1998년 10월 23일에 출원된 미국 특허 제09/177,884호 및 1999년 10월 20일에 출원된 국제 출원 제PCT/US1999/24670호 (공개번호 제WO/2000/025140호)에 기재된 바와 같이 혈소판 계수에 대한 분석과 함께 사용될 수 있다.

[0063] 상기 분석은 바람직하게는 본 발명에 따른 반응이 일어날 수 있게 하고, 그의 결과를 측정하는 장치 내에서 수행될 수 있다. 장치는 피브리노겐을 결합시키는 활성화된 혈소판의 능력에 기초하여 혈소판 기능을 평가해야한다. 활성화된 혈소판이 피브리노겐 코팅된 입자를 결합시키고 유착시킴에 따라, 빛 투과율이 증가한다. 일반적으로, 분석 결과를 측정하기 위한 장치는 유착을 측정할 수 있는 것이다. 바람직하게, 장치는 유착으로 인한 광학 신호의 변화를 측정한다. 적합한 장치에는 동력학 분광 광도계 베리피나우(VERIFYNOW)™ 시스템 장치 (미국 캘리포니아주 샌디애고 소재의 어큐메트릭사(Accumetrics, Inc.)로부터 시판 중이고, 정상 샘플에서의 고속 혈소판 기능 활성 측정에 사용됨)가 포함되고, 이는 예시적인 것이며 이에 제한되지 않는다.

[0064] 베리피나우™ 시스템 장치는 빛 투과율의 증가에 따라 혈소판 유발된 응집을 측정하는 탁도에 기초한 광학 검출 시스템이다. 이 시스템은 분석기, 1회용 카트리지 및 대조군을 포함한다. 카트리지는 마이크로입자 유착 기술에 기초한 시약을 포함한다. 품질 제어 시스템에는 전자 제어, 2개의 수준의 분석된 "습윤된" 대조군 (WQC), 카트리지 내 습도 센서, 패키지 내 온도 표시자, 2개의 분석 채널의 동시 작용에 대한 시험이 포함된다. 분석기에 의해 분석 순서를 제어하고, 분석 온도를 확립하고, 필요한 기간 동안의 시약-샘플 혼합을 제어하여 혈소판 기능의 정도를 결정하고 결과를 나타내고 자기-진단을 수행한다. 본 방법에서의 사용을 위해 이 시스템의 시험 카트리지는 수동적으로 결합된 GPIIb/IIIa 수용체 리간드, 트롬빈 수용체 활성제 및 완충제와 입자를 포함하는 동결건조된 제제를 함유한다. 환자 샘플은 일반적으로 분석기에 의해 자동적으로 혈액 수집 튜브로부터 카트리지로 계량분배되는 구연산화된 전혈이고, 사용자에 의한 혈액 처리가 필요없다. 입자의 적외선 흡수 특징에 의해 상호 작용을 모니터링한다. 입자가 혈소판과 상호 작용함에 따라, 입자의 유착이 베리피나우™ 장치의 광학 시스템을 통해 측정된다. 샘플을 통한 적외선 빛의 투과율이 증가함에 따라 유착이 검출된다.

[0065] 본 발명의 또 다른 실시양태는 수동적으로 결합된 피브리노겐, 트롬빈 수용체 활성제, 예를 들면 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1), 또는 PAR-4 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4), 및 완충제와 입자를 포함하는 동결건조된 제제를 패키지화된 혼합물에 포함하는 키트이다. 동결건조된 제제는 반응 용기, 예를 들면 분석 장치에 사용되는 카트리지 내에 존재할 수 있다. 상기 언급된 베리피나우™ 시스템에 있어서, 동결건조된 제제는 분석기에 사용되는 4-웰 카트리지의 바깥 웰에 위치할 수 있다. 키트는 또한 본 방법을 수행하기 위한 샘플 수집 용기 및/또는 장치를 포함할 수 있다. 시약의 상대적인 양은 측정의 민감도를 실질적으로 최적화하는 시약의 용액 내 농도를 제공하기 위해 광범위하게 변할 수 있다.

[0066] 적절하게는, 시약은 임의의 시약의 활성을 보존하기 위해 기밀 패키지 내에 둘 수 있다. 패키지는, 예를 들면 백, 파우치 등의 실질적으로 습기를 통과시키지 않는 재료로 제조된 것이다. 이러한 재료에는 플라스틱, 알루미늄 호일 등이 포함되고, 이는 예시적인 것이며 이에 제한되지 않는다. 혈액 샘플에 있어서, 키트는 사람의 피부를 뚫는 물품, 살균제 또는 소독 패드 등을 또한 포함한다. 키트는 또한 눈금 측정기 및 기준을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 키트는 또한 혈소판 계수를 위한 분석을 수행하기 위한 1 이상의 시약을 포함할 수 있다.

[0067] 키트는 본 발명의 분석을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 키트는 평가되는 혈액 샘플의 pH 및 염 농도를 고체 표면 및 혈소판 GPIIb/IIIa 수용체 리간드로 코팅된 작은 중합체성 비드의 혈소판 매개된 유착에 적합한 상태로 유지하는 완충제, 혈액 바이알을 포함한다. 완충제는 용액일 수 있거나, 또는 완충 조성물 및 원하는 완충 용액을 제공할 수 있도록 알려진 양만큼의 물이 첨가된 염으로만 구성될 수 있다. 임의적으로, 키트는 또한 항응고제를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 완충제는 HEPES이고; 항응고제는 구연산염이고; GPIIb/IIIa 수용체 리간드는 피브리노겐이고; 작은 중합체성 비드는 폴리아크릴로니트릴 또는 카르복실화된 폴리스티렌이며, 펩티드 GPIIb/IIIa 수용체, 예를 들면 피브리노겐은 펩티드와 비드 표면의 관능기 사이의 소수성 결합 및/또는 수소 결합에 의해 비드 표면에 수동적으로 결합되어 있다. 추가의 실시양태에서, 키트는 트롬빈 수용체 활성제, 예를 들면 트롬빈, PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1), 또는 PAR-4 트

롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-4)를 추가로 포함한다.

실 시 예

[0068] 다음의 실시예 및 제조는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 그의 범위를 제한하지 않는다. 부 및 퍼센트는 달리 나타내지 않는 한 중량부 및 중량%를 의미한다.

[0069] 베리피나우™ IIb/IIIa 분석 (캘리포니아주 샌디애고 소재의 어큐메트릭스사) 및 혈소판 활성제로서 PAR-1 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (TRAP-1)를 이용한 PAR-1 길항제 E5555 (에자이사)에 의한 용량 의존적 혈소판 억제를 결정하기 위해 실험을 수행하였다.

[0070] 용량 의존적 시험을 3.7 μM의 TRAP-1으로 수행하였다. E5555를 최종 농도 30 ng/ml, 10 ng/ml, 5.0 ng/ml 및 1.0 ng/ml로 사용하였다. 각각의 원액 20 μL를 전혈 2.0 ml에 스파이크하고 (1:100 희석), 조심스럽게 혼합하여 용혈을 방지하였다. 혼합 후, 혈소판 억제 시험에 앞서 혈액 샘플을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0071] 4명의 사람 공여자로부터의 혈액 샘플로 기준선에서 두 번씩, 4개의 E5555 농도에서 수행하였다. 기대했던 바와 같이, 주어진 E5555 농도에서 측정된 혈소판 억제의 수준에 있어서 공여자들 사이에 변화가 있었다. 제공된 E5555의 각 농도에서 기대된 억제 수준에 기초하여, 실제 결과는 4명의 공여자에 대해 기대된 것보다 평균적으로 약간 낮았다. 각 공여자의 그들의 상응하는 기준치와 비교한 혈소판 억제율을 도 1 및 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

사람 공여자로부터의 혈액 샘플 내 E5555에 의한 용량 의존적 혈소판 억제

억제 %	30 ng/ml E5555	10 ng/ml E5555	5 ng/ml E5555	1 ng/ml E5555
공여자 ID: 60	82%	46%	17%	7%
공여자 ID: 75	78%	39%	15%	-1%
공여자ID: 137	88%	66%	35%	7%
공여자ID: 126	97%	77%	51%	5%
평균	**86%**	**57%**	**30%**	**5%**
예상	100%	70-100%	40-80%	10-50%

[0072]

[0073] 도 1 및 표 1에 나타낸 바와 같이, 상기 시약 및 시스템은 상이한 용량의 트롬빈 수용체 (PAR-1) 길항제로 처리된 혈액 샘플로부터의 혈소판 응집의 정도를 성공적으로 검출하였다. 따라서, 상기 결과로부터, 트롬빈 수용체 길항제에 노출되어 영향을 받은 혈액 샘플 내 혈소판 응집의 측정을 위한 간단하고 빠른 방법이 본 발명에 의해 제공됨이 증명된다.

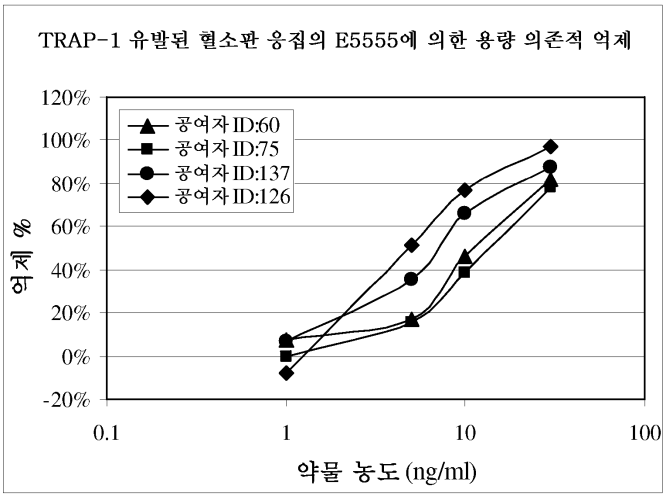
[0074] 상기 실시예는 오직 예시 목적으로 포함되며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다. 상기 기재된 실시예의 많은 변형이 가능하다. 상기 기재된 실시예의 변형 및 변경이 당업자에게 명백할 것이기 때문에, 본 발명은 첨부된 청구항에 의해서만 제한된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 4명의 공여자로부터의 혈소판 함유 혈액 샘플의 4개의 상이한 E5555 농도에 대한 용량 의존적 반응을 나타낸다.

도면

도면1


TRAP-1 유발된 혈소판 응집의 E5555에 의한 용량 의존적 억제
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
억제 %
0.1
1
10
100
약물 농도 (ng/ml)
공여자 ID:60
공여자 ID:75
공여자 ID:137
공여자 ID:126