

(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2019-507345

(P2019-507345A)

(43) 公表日 平成31年3月14日(2019.3.14)

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード (参考)		
GO 1 N 33/53 (2006.01)			GO 1 N 33/53			L 2 GO 4 5		
GO 1 N 33/86 (2006.01)			GO 1 N 33/86			4 HO 4 5		
GO 1 N 33/536 (2006.01)			GO 1 N 33/536			A		
CO 7 K 14/745 (2006.01)			CO 7 K 14/745					
CO 7 K 16/36 (2006.01)			CO 7 K 16/36					
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁)								
(21) 出願番号 特願2018-543373 (P2018-543373)				(71) 出願人 517019887				
(86) (22) 出願日 平成29年2月17日 (2017.2.17)				ダイアグノスティカ スターゴ				
(85) 翻訳文提出日 平成30年10月16日 (2018.10.16)				フランス国 エフ-92600 アニエー				
(86) 国際出願番号 PCT/FR2017/050354				ル シュル セーヌ アレー テレーザ				
(87) 国際公開番号 W02017/140989				3				
(87) 国際公開日 平成29年8月24日 (2017.8.24)				(74) 代理人 100116872				
(31) 優先権主張番号 1651348				弁理士 藤田 和子				
(32) 優先日 平成28年2月18日 (2016.2.18)				(72) 発明者 コンタント ジュヌヴィエーヴ				
(33) 優先権主張国 フランス (FR)				フランス国 92400 クルブボア ア				
				ヴェニュー デ ヴァネット 3				
				(72) 発明者 ボーペレ フランソワーズ				
				フランス国 95600 オーボンヌ リ				
				ュ ガンベッタ 36				
最終頁に続く								

(54) 【発明の名称】 静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法、ならびに肺塞栓症および深部静脈血栓症を診断するためのその使用

(57) 【要約】

本発明は、血液サンプルにおける血管内フィブリンの分解の結果もたらされた、静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法に関し、この方法はサンプルに含有されるDダイマーのルーチンアッセイと、そのサンプルにおけるフィブリン形成の動的測定とを含む。この方法は、患者における肺塞栓症もしくは深部静脈血栓症を除外するため、および/または患者における血栓症もしくは凝固活性化もしくは血栓形成傾向を診断するために使用されてもよい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者からの血液サンプル中の静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーをアッセイするための方法であって、前記方法は、一方では前記サンプル中の D ダイマーのレベル (Ddi_s) を得るための前記サンプル中の D ダイマーの前記アッセイを含み、他方ではこの同じサンプル中のフィブリン形成の動的測定を含み、前記動的測定は以下のステップ、

a) 前記サンプル中の凝固の活性化をトリガすることなく開始するステップと、
b) ステップ a) で得られた混合物をインキュベートし、前記インキュベートされたサンプル中でトロンビンの生成およびフィブリン血餅の形成をトリガするステップと、

c) 前記フィブリン血餅を形成する b) で得られた前記サンプルの少なくとも 1 つの特性の時間変動を測定するステップと、

d) c) で分析された前記フィブリン血餅の形成プロファイルを確認し、前記プロファイルから、プロファイル曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン形成時間 (FFT) と、フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定された前記サンプルの特性の値 ($Vp(TA)$) とを抽出するステップと、

e) 血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベル (R) を算出するステップであって、

e 1) 凝固亢進の関数として調整された D ダイマーのレベル ($Ddi_{s/Hc}$) を得るために、d) で定められた FFT を用いて前記凝固亢進によって生成された D ダイマーのレベルの関数として前記サンプルの D ダイマーのレベル (Ddi_s) を調整するステップ、および

e 2) R を得るために、d) で定められた $Vp(TA)$ を用いて炎症によって生成された D ダイマーのレベルの関数として e 1) で得られた調整 D ダイマーのレベル $Ddi_{s/Hc}$ を調整するステップによって算出するステップと、

f) e) で得られた前記フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル R を、閾値に対して、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の前記閾値に対して比較するステップと、

g) e) で得られた前記フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル R と、前記サンプルの D ダイマーのレベル (Ddi_s) とを用いて、凝固活性化状態において存在する線溶亢進によって生成されたフィブリノゲン分解産物のレベル ($FgDP_{(HF)}$) を定めるステップと、

h) g) で得られた前記 $FgDP_{(HF)}$ レベルを閾値に対して比較し、d) で得られた前記フィブリン形成時間 (FFT) を閾値に対して比較するステップを含む、方法。

【請求項 2】

ステップ e) において、初期フィブリノゲン量 (FEU) で表されるレベル R を算出するステップは、

e 1) 次の等式を用いて、凝固亢進の関数として調整された D ダイマーのレベル ($Ddi_{s/Hc}$) を算出するステップであって、

【数 1】

$$Ddi_{s/Hc} = Ddi_s \times \frac{FFT}{\text{対照時間}}$$

ここで対照時間とは、ステップ a) ~ d) に従って測定された、血栓症の疑いのない健康な患者からのサンプルの平均フィブリン血餅形成時間である、ステップ、および

e 2) 次の等式を用いてレベル R を算出するステップであって、

【数 2】

$$R = \frac{Ddi_{s/Hc}}{[Fib]_{(Vp(TA))}}$$

10

20

30

40

50

ここで $[Fib]_{(Vp(TA))}$ は、次の等式を有する標準曲線における特性の値 $Vp(TA)$ に対して演繹されるフィブリノゲン濃度であり、

$$y = a \ln(x) - b、$$

ここで

y は前記フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定された特性の値であり

x は前記フィブリノゲン濃度であり、

a および b は、前記フィブリンプラトーのレベルと前記フィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式の定数であり、

前記標準曲線は血液サンプルに対して確立されたものであり、前記血液サンプルの前記フィブリノゲン濃度が定められており、かつその特性の値 $(Vp(TA))$ がステップ $a) \sim d)$ によって定められている、ステップによって行われることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

ステップ $f)$ において、 $e)$ で得られたレベル R が前記閾値未満、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値未満であることは、前記患者における血栓症を除外することを可能にし、 $e)$ で得られたレベル R が前記閾値より高く、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値よりも高いことは、前記患者における血栓症の可能性を示すことを特徴とする、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

ステップ $g)$ は、

$g1)$ 既知のレベルの $FgDP$ および既知のレベルの D ダイマーを有する血液サンプルを用いて確立された標準曲線において、前記サンプル中の D ダイマーのレベル $(Ddis)$ に対応する $FgDP$ のレベルを定めるステップと、

$g2)$ $g1)$ で用いられた前記標準曲線において、ステップ $e)$ で得られた調整された D ダイマーのレベル (R) に対応する $FgDP$ のレベルを定めるステップと、

$g3)$ $g1)$ で得られた $FgDP$ のレベルから $g2)$ で得られた $FgDP$ のレベルを引くことによって、線溶亢進によって生成された $FgDP$ のレベル $(FgDP_{(HF)})$ を定めるステップとで構成されるステップを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5】

ステップ $h)$ は、

$h1)$ $FgDP_{(HF)}$ と閾値、特に $1 \mu g/ml$ の閾値とを比較するステップであって、 $FgDP_{(HF)}$ が前記閾値未満または陰性であることは、前記患者における血栓症を除外することを可能にし、 $FgDP_{(HF)}$ が前記閾値よりも高いことは、前記患者における血栓症の可能性を示す、ステップ、

$h2)$ FFT と閾値、特に $[e1)$ の対照時間 - 1 標準偏差] に等しい閾値、たとえば 135 秒の対照時間に対する 120 秒の閾値とを比較するステップであって、 FFT が前記閾値未満であることは、患者が血栓症を有さないが急性凝固活性化状態を有することを示し、 FFT が前記閾値よりも高いことは、前記患者における血栓症を示す、ステップで構成されるステップを含むことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 6】

- ステップ $h2)$ において血栓症が診断されたとき、静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル (Ddi_{VTE}) は、ステップ $e)$ で得られた D ダイマーのレベル R であり、

- ステップ $h1)$ および $h2)$ において血栓症が除外されたが、ステップ $e)$ で得られたレベル R は閾値より高く、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値よりも高いとき、前記方法は、次の等式を用いて静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル (Ddi_{VTE}) を算出するステップからなるステップも含み、

【数 3】

$$Ddi_{VTE} = 0.5 \times \frac{R}{Ddi_S}$$

ここで Ddi_S は、前記サンプル中の D ダイマーのレベルであることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

患者からの血液サンプル中の静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーをアッセイするための方法であって、前記方法は、一方では前記サンプル中の D ダイマーのレベル (Ddi_S) を得るための前記サンプル中の D ダイマーの前記アッセイを含み、他方ではこの同じサンプルのフィブリン形成の動的測定を含み、前記動的測定は以下のステップ、

a) 前記サンプル中の凝固の活性化をトリガすることなく開始するステップと、
b) ステップ a) で得られた混合物をインキュベートし、前記インキュベートされたサンプル中でトロニン生成およびフィブリン血餅の形成をトリガするステップと、
c) 前記フィブリン血餅を形成する b) で得られた前記サンプルの少なくとも 1 つの特性の時間変動を測定するステップと、

d) c) で分析された前記フィブリン血餅の形成プロファイルを確立し、このプロファイルから、前記プロファイルの曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン形成時間 (FFT) と、フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定された前記サンプルの特性の値 ($Vp(TA)$) とを抽出するステップと、

e') 血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベル (R) を算出するステップであって、

e' 1) 炎症に対して調整された D ダイマーのレベル ($Ddi_{S/I}$) を得るために、d) で定められた $Vp(TA)$ を用いて炎症によって生成された D ダイマーのレベルの関数として前記サンプルの D ダイマーのレベル Ddi_S を調整するステップ、および

e' 2) 低い D ダイマーレベルに対して e' 1) で得られた炎症に対して調整された D ダイマーのレベル ($Ddi_{S/I}$) を補正するステップ
によって算出するステップ、ならびに

炎症の関数として前記患者からの前記サンプルを分類するステップと、

f') e) で得られた前記フィブリンの前記分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル R を、閾値に対して、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値に対して比較するステップと、

g') 前記サンプル中の D ダイマーのレベル (Ddi_S) および e') で得られたレベル R を用いるか、または e' 1) で得られた炎症の関数として調整された D ダイマーのレベル $Ddi_{S/I}$ および e') で得られたレベル R を用いて、線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル ($Ddi_{(HF)}$) を定めるステップと、

h') g') で得られたレベル $Ddi_{(HF)}$ を閾値に対して比較し、 TA/FFT 比率を閾値に対して比較するステップであって、ここで TA は d) で得られた前記フィブリン重合プラトーに達する時間であり、 FFT は d) で得られた前記フィブリン形成時間である、ステップと

を含む、方法。

【請求項 8】

ステップ e') において、初期フィブリノゲン換算量 (FEU) で表されるレベル R は、

e' 1) 次の等式によって、炎症の関数として調整された D ダイマーのレベル ($Ddi_{S/I}$) を算出するステップであって、

【数 4】

$$Ddi_{S/I} = \frac{Ddi_S}{[Fib]_{(Vp(TA))}}$$

10

20

30

40

50

ここで $[Fib]_{(vp(TA))}$ は、次の等式を有する標準曲線における特性の値 $V_{p(TA)}$ に対して演繹されるフィブリノゲン濃度であり、

$$y = a \ln(x) - b、$$

ここで

y は前記フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定された特性の値であり

、

x は前記フィブリノゲン濃度であり、

a および b は、前記フィブリンプラトーのレベルと前記フィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式の定数であり、

前記標準曲線は血液サンプルに対して確立されたものであり、前記血液サンプルの前記フィブリノゲン濃度が定められており、かつその特性の値 $V_{p(TA)}$ がステップ a) ~ d) によって定められている、ステップ、

e' 2) e' 1) で得られたレベル $D_{dis/I}$ を次の等式によって補正するステップであって、

$$R = D_{dis/I} + [0.5 - F_{D_{dis/I}}]$$

ここで $F_{D_{dis/I}}$ は低い D ダイマーレベル ($< 4 \mu g/ml$) に対する補正因子であり、 $F_{D_{dis/I}}$ の値は次の等式を有する前記標準曲線における前記サンプルの D ダイマーのレベル (D_{dis}) に対する前記補正因子の値に対応し、

$$y = ax^2 + bx + c$$

ここで y は前記補正因子 F であり、

x は D ダイマーのレベルであり、

a 、 b および c は、前記補正因子と D ダイマーのレベルとを結び付ける多項式の定数であり、

前記標準曲線は血液サンプルに対して確立されたものであり、前記血液サンプルの D ダイマーのレベルが定められており、かつそれに対する前記補正因子が経験的に定められているため、レベル $D_{dis/I}$ が $0.5 \mu g/ml$ FEU (フィブリノゲン換算量) の前記閾値に関連付けられる、ステップ

によって得られることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ e') において、炎症の関数として前記患者からの前記サンプルを分類するステップは、

- 比率 $1/[Fib]_{(vp(TA))}$ を算出するステップであって、ここで $[Fib]_{(vp(TA))}$ は e' 1) で定められた前記フィブリノゲン濃度である、ステップ、および

- もし比率 $1/[Fib]_{(vp(TA))} > 0.20$ であれば、前記患者からの前記サンプルを炎症を有さない患者のグループ I に分類するステップ、または

- もし比率 $1/[Fib]_{(vp(TA))} \leq 0.20$ であれば、前記患者からの前記サンプルを炎症を有する患者のグループ II に分類するステップ

を含むことを特徴とする、請求項 7 または請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ f') において、e') で得られたレベル R が前記閾値未満、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値未満であることは、前記患者における血栓症を除外することを可能にし、e') で得られたレベル R が前記閾値より高く、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値よりも高いことは、前記患者における血栓症の可能性を示すことを特徴とする、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ g') において、線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル (D_{dis/H_F}) は、

$g' 1)$ 次の等式

10

20

30

40

【数 5】

$$Ddi_{HF} = (R/Ddi_S)_{patient} = \frac{R}{Ddi_S}$$

を用いて、ステップ e') で定められたレベル R と前記サンプルの D ダイマーのレベル Ddi_S との比率として算出され、

g' 2) 次の等式

【数 6】

$$Ddi_{HF} = (R/Ddi_{SI})_{patient} = \frac{R}{Ddi_{SI}}$$

10

を用いて、ステップ e') で定められたレベル R と e' 1) で得られたレベル Ddi_{SI} との比率として算出されることを特徴とする、請求項 9 または請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ h') において、

g' 1) で得られたレベル $(R/Ddi_S)_{patient}$ は、次のステップによって閾値と比較され、

h' 1) 前記サンプルのレベル Ddi_S に対して、次の等式を有する標準曲線において比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ の値を定めるステップであって、

20

$$y = ax^{-b}$$

ここで x は D ダイマーのレベルであり、

y は血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベルと、D ダイマーのレベルとの比率 (R/Ddi_S) であり、

a および b は、比率 R/Ddi_S と D ダイマーのレベルとを結び付ける等式の定数であり、

前記標準曲線は、

- 前記患者からの前記サンプルがグループ I に分類されたとき：ステップ e') によってグループ I に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用い、

30

- 前記患者からの前記サンプルがグループ II に分類されたとき：ステップ e') によってグループ II に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用いて確立されたものである、ステップ、ならびに

h' 1) g' 1) で得られた線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル $(R/Ddi_S)_{patient}$ の値と、h' 1) で得られた比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ の値とを比較するステップであって、ここで

$(R/Ddi_S)_{patient}$ が比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ 未満であることは、前記患者における血栓症を除外することを可能にし、 $(R/Ddi_S)_{patient}$ が比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ 以上であることは、前記患者における血栓症の可能性を示す、ステップであり、

40

g' 2) で得られたレベル $(R/Ddi_{SI})_{patient}$ は、次のステップによって閾値と比較され、

h' 2) 前記サンプルのレベル Ddi_S に対して、次の等式を有する標準曲線において比率 $(R/Ddi_{SI})_{standard}$ の値を定めるステップであって、

$$y = ax^{-b}$$

ここで x は D ダイマーのレベルであり、

y は血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベルと、炎症の関数として調整された D ダイマーのレベルとの比率 (R/Ddi_{SI}) であり、

50

a および b は、比率 $R / D d i s / I$ と D ダイマーのレベルとを結び付ける等式の定数であり、

前記標準曲線は、

- 前記患者からの前記サンプルがグループ I に分類されたとき：ステップ e') によってグループ I に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、ステップ a) ~ e' 1) によって得られたそのレベル $D d i s / I$ 、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用い、

- 前記患者からの前記サンプルがグループ II に分類されたとき：ステップ e') によってグループ II に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、ステップ a) ~ e' 1) によって得られたそのレベル $D d i s / I$ 、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用いて確立されたものである、ステップ、ならびに

h' 2) g' 2) で得られた線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル ($R / D d i s / I$) $p a t i e n t$ の値と、h' 2) で得られた比率 ($R / D d i s / I$) $s t a n d a r d$ の値とを比較するステップであって、ここで

($R / D d i s / I$) $p a t i e n t$ が比率 ($R / D d i s / I$) $s t a n d a r d$ 未満であることは、前記患者における血栓症を除外することを可能にし、($R / D d i s / I$) $p a t i e n t$ が比率 ($R / D d i s / I$) $s t a n d a r d$ 以上であることは、前記患者における血栓症の可能性を示す、ステップであることを特徴とする、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ h') において、比率 $T A / F F T$ を閾値に対して比較するステップは、

h' 3) 比率 $T A / F F T$ を算出するステップであって、ここで $T A$ はステップ d) で定められた前記フィブリン重合プラトーに達する時間であり、 $F F T$ はステップ d) で定められたフィブリン血餅形成時間である、ステップと、

h' 3) 前記患者からの前記サンプルがグループ I に分類されたとき：

比率 $T A / F F T$ を第 1 の閾値、特に第 1 の閾値 1.75 に対して比較するステップであって、ここで

比率 $T A / F F T$ が前記第 1 の閾値より高いことは、グループ I に分類された前記患者における血栓症を除外し、かつ血栓形成傾向または凝固活性化状態を診断することを可能にし、

比率 $T A / F F T$ が前記閾値以下であることは、グループ I に分類された前記患者における血栓症を示す、ステップ、

前記患者からの前記サンプルがグループ II に分類されたとき：

比率 $T A / F F T$ を第 1 の閾値、特に第 1 の閾値 1.65 に対して比較するステップであって、ここで

比率 $T A / F F T$ が前記第 1 の閾値より高いことは、グループ II に分類された前記患者における血栓症を除外し、かつ血栓形成傾向または凝固活性化状態を診断することを可能にし、

比率 $T A / F F T$ が前記閾値以下であることは、グループ II に分類された前記患者における血栓症を示す、ステップとを含むことを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

- ステップ h' 3) において血栓症が診断されたとき、静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル ($D d i v t e$) は、ステップ e') で得られた D ダイマーのレベル R であり、

- ステップ h' 1)、h' 2) および h' 3) において血栓症が除外されたが、ステップ e') で得られたレベル R は前記閾値より高く、好ましくは $0.5 \mu g / m l$ の閾値よりも高いとき、前記方法は、次の等式を用いて静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル ($D d i v t e$) を算出するステップで構成されるステップも含み、

【数 7】

$$Ddi_{VTE} = 0.5 \times \frac{R}{Ddi_S}$$

ここで Ddi_S は、前記サンプル中の D ダイマーのレベルであることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記血液サンプルは $1 \mu l$ から $300 \mu l$ 、好ましくは $50 \mu l$ から $200 \mu l$ の体積を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記血液サンプルは無希釈であることを特徴とする、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記サンプルの D ダイマーの前記アッセイは、免疫比濁法または免疫酵素法に従って行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ a) は、前記患者からの前記血液サンプルと組織因子と任意にはリン脂質とを混合するステップ、好ましくは前記患者からの前記血液サンプルと組織因子とリン脂質とを混合するステップによって行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ a) の前記組織因子は、 $0.5 \sim 5 \text{ pM}$ 、好ましくは 2 pM の濃度で存在することを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ a) の前記混合物はカルシウムイオンを含むことを特徴とする、請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

ステップ b) は、ステップ a) で得られた前記混合物を 30 から 40 の温度にて 20 秒から 400 秒、好ましくは 60 秒から 300 秒の時間インキュベートするステップを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ b) において、トロンビン生成およびフィブリン血餅形成をトリガするステップは、インキュベートされた前記サンプルにカルシウムイオンを加えるステップによって行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

患者からの前記血液サンプルは血漿サンプルであることを特徴とする、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記血漿サンプルは乏血小板血漿サンプルであることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

ステップ c) において、b) で得られた前記サンプルの少なくとも 1 つの特性の時間変動を測定するステップは、 $350 \sim 800 \text{ nm}$ の波長、好ましくは 540 nm の波長における光学濃度の時間変動 (DOD) を測定するステップによって行われることを特徴とする、請求項 23 および 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

ステップ c) の光学濃度の測定は、前記 D ダイマーをアッセイするために用いられるのと同じ波長である 540 nm にて行われることを特徴とする、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

患者からの前記血液サンプルは全血サンプルであることを特徴とする、請求項 1 ~ 22

10

20

30

40

50

のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記全血サンプルはクエン酸全血サンプルであることを特徴とする、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

b) で得られた前記サンプルの少なくとも 1 つの特性の時間変動を測定するステップは、トロンボエラストグラフィ、レオメトリ、または画像分析によって行われることを特徴とする、請求項 27 または請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

少なくともステップ c) および d) は、自動診断デバイスまたは遠隔生物学アナライザ、好ましくは凝固アナライザにおいて行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 31】

患者における静脈血栓塞栓症 (VTE) を診断するためのインビトロの方法であって、
 - 請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法を用いて、前記患者からの血液サンプルにおける VTE に対して特異的な Dダイマーのアッセイを行うステップと、
 - 前記患者に関する診断を提供するステップと
 で構成されるステップを含む、診断のインビトロの方法。

【請求項 32】

前記患者に関する前記診断とは (i) 血栓症の除外、(ii) 急性凝固活性化状態、または (iii) 血栓症であることを特徴とする、請求項 31 に記載の診断のインビトロの方法。

20

【請求項 33】

前記患者が高齢の個体であるか、がんである患者であるか、感染症である患者であるか、または血栓形成傾向である患者であるとき、VTE に対して特異的な Dダイマーを前記アッセイするステップは、請求項 7 ~ 14 および 15 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法を用いて行われることを特徴とする、請求項 31 に記載の診断のインビトロの方法。

【請求項 34】

前記患者に関する前記診断とは (i) 血栓症の除外、(ii) 急性凝固活性化状態、(iii) 血栓形成傾向、または (iv) 血栓症であることを特徴とする、請求項 32 に記載の診断のインビトロの方法。

30

【請求項 35】

前記患者に関する前記診断とは、重篤でない血栓症または肺梗塞の場合の血栓症であることを特徴とする、請求項 34 に記載の診断のインビトロの方法。

【請求項 36】

静脈血栓塞栓症に対して特異的な高い Dダイマーのレベル $D_{di_{VTE}}$ は、肺塞栓症または深部静脈血栓症の程度を表すものであることを特徴とする、請求項 6、14 および 15 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

親出願

本国際出願は、本明細書においてその内容を全体として引用により援用する、2016 年 2 月 18 日出願の仏国特許出願第 16 51348 号の優先権を主張するものである。

【0002】

技術分野

本発明は、血液サンプル中の静脈血栓塞栓症に対して特異的な Dダイマーをアッセイするための方法に関し、この方法は、一方ではサンプルの Dダイマーのルーチンアッセイを含み、他方ではこのサンプルのフィブリン形成の動的測定を含む。この方法は特に、血液サンプルにおける肺塞栓症および深部静脈血栓症のインビトロ診断に対して意図されるも

50

のである。

【背景技術】

【0003】

本発明の状況

静脈血栓塞栓症（VTE：Venous thromboembolism）は、主要な公衆衛生の問題である。それは、深部静脈血栓症（DVT：deep vein thrombosis）およびその即時型の生命の危険性のある肺塞栓症（PE：pulmonary embolism）の概念をグループ化したものである。VTEの病原論の基本原理はウィルヒョウ（Virchow）によって説明されており、ウィルヒョウは3つの血栓症促進因子の組み合わせにおいて血栓症の起源を定義しており、それらの血栓症促進因子とは静脈うっ血と；内皮の機能異常または障害と；凝固因子の活性化、過粘稠、抗トロンビン欠損、血栓形成傾向、ネフローゼ症候群、深刻な身体的外傷または熱傷の後の変化、播種性がん、妊娠後期、民族性、年齢、喫煙、または肥満症による凝固性亢進とである（非特許文献1）。

10

【0004】

肺塞栓症（PE）はすべての救急医に恐れられている疾患である。なぜなら肺塞栓症（PE）はしばしば非常に異なる症状によって顕在化するか、または完全に無症状であるために診断が難しく、おそらくは診断が最も困難な疾患の1つだからである。肺塞栓症は一般的な状態であるため、突然起こる任意の呼吸異常はこの診断を示唆するはずである。それは急性の恐ろしい胸部痛を引き起こす。心電図、心筋酵素（トランスアミナーゼ、トロポニンなど）のアッセイ、および肺シンチグラフィによって、それを心筋梗塞と区別する必要がある。それを、抗凝固剤の使用が禁忌となる急性心膜炎および大動脈解離と区別する必要がある。

20

【0005】

いくつかのタイプのPEが存在する。

- 急性肺性心を伴う肺塞栓症は致命的になり得るものであり、特に外科手技後の寝たきりの患者に起こる。それは最初の数時間で悪化するおそれがあり、外科手技または塞栓除去術または血栓溶解処置を必要とする。致死の転帰はなおも非常に一般的である。
- 突然死または虚脱による数分以内の死をもたらす、激しい肺塞栓症。
- あまり明白ではない肺塞栓症は非常に一般的であり、その症状はしばしば判断を誤らせる。その診断はしばしば数日後に届く。
- 心不全および呼吸不全である患者における肺塞栓症は一般的であり、その重篤性から予防的な抗凝固剤処置を必要とする。

30

【0006】

深部静脈血栓症（DVT）の臨床徴候は、しばしばあまり明白ではないか、存在すらしなないか、または進行してPEにならないために重篤性がずっと低い表在性静脈血栓症の臨床徴候に類似するものである。次のものからDVTを区別する必要がある。

- 深部血腫、なぜなら抗凝固剤処置が出血を促進することになるため、
- 脚の皮下の感染性疾患、
- 静脈炎後疾患、および
- かなり類似した臨床像を与える膝窩嚢胞の破裂。

40

【0007】

次の3つのタイプの合併症が存在する。PE、その症例の半分近くは完全に無症候性である；静脈系における血栓の伸長；および患者の3分の1近くにおける一般的な合併症である静脈炎後疾患。

【0008】

スコアによって、呼吸困難または胸部痛の存在下でのPEの臨床的確率の評価が可能になる。患者の処置を最適化するため、特に治療のアプローチを定めるための診断デシジョンツリーにおいて、スコアが用いられる。現在の診断アルゴリズムは、以下を含むアプローチに基づくものである。

50

- 臨床的確率を評価する第1のステップ：DVTのウェルズ（Wells）スコア（非特許文献2）、PEのウェルズスコアまたはジュネーブ（Geneva）スコアおよびそれらの簡略化バージョン（非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5）、いくつかの危険因子、症状および臨床徴候をグループ化したもの、

- その後大部分の場合には、非常に感受性が高いがあまり特異的な検査ではないDダイマーのアッセイが続き、それが陽性であるときにはヨウ素化造影製品の注射を伴うスパイラル胸部血管走査、またはPEにおける肺シンチグラフィ、またはDVTにおけるドップラーの実施が課される。低い臨床的確率と、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の閾値未満のDダイマーレベルとの組み合わせによって、優れた陰性の予測値によってPEまたはDVTの存在を除外することが可能になる。

【0009】

除外テストとしてDダイマーアッセイを用いることの結果として、血栓を可視化し、かつPEの場合には発症した肺動脈の数およびタイプから重篤度を診断するために、高価なイメージングテストに頼ることが必要となる。加えて、こうした検査は救急科における患者の滞在を延長し、照射の要因であり、少なからぬコストの原因となる。血管走査は、ヨウ素化造影製品に対するアレルギー反応、腎不全、および肺水腫の原因となることがある。

【0010】

図1に示されるとおり、Dダイマー抗原は、トロンビンと、凝固因子FXIIIIaと、プラスミンとの連続的作用によって形成されるフィブリンの分解の一意のマーカである。具体的には、トロンビンがフィブリノゲンを切断してフィブリンモノマーにし、このフィブリンモノマーが重合して、FXIIIIaおよびプラスミン形成に対する基質の役割をする。次いで、トロンビンがフィブリンに連結したままでフィブリンポリマーに結合したFXIIIを活性化することによってFXIIIIaを生成し、このFXIIIIaが重合フィブリンのDドメイン間の共有結合の形成を触媒する。最後に、プラスミンが重合フィブリンを分解することによって、Dダイマー-フラグメントE複合体を含有する最終生成物を含むさまざまな分子量のフィブリン分解産物（FDP：fibrin degradation products）を放出し、かつDダイマー抗原を露出し、このDダイマー抗原はプラスミンによって放出されるまでは検出不可能なままである。Dダイマー抗原は、フィブリン血餅に取り込まれる前のフィブリンに由来するFDPにも、プラスミンによる血餅の分解後に放出される高分子量複合体にも存在し得る（非特許文献6）。

【0011】

Dダイマーは、フィブリン血餅形成および線維素溶解のマーカである。線維素溶解は、血餅の安定性およびそれが血餅形成後に始まるときには血栓の危険性に重要な役割を果たす。もしそれが同時に開始されれば、トロンビン-フィブリン結合とプラスミン-フィブリン結合との間、したがってフィブリンの形成と溶解との間に競合が存在する。

【0012】

Dダイマーは可溶性フィブリンポリマーの分解から生じ、これは血管内凝固活性化のマーカである（非特許文献7）。図2に示されるとおり、凝固亢進状態および急性炎症性状態において、Dダイマーは炎症部位に局所的に存在する酵素による血管外フィブリン分解からも生じる。この概念は、がんまたは急性炎症性状態である患者においてしばしばDダイマーのレベルが高いことによって支持される（非特許文献8）。

【0013】

線維素溶解が広がって全身性になるとき（「線溶亢進」）、大過剰に生成したプラスミンによるフィブリノゲン分解が可能になる。図2に示されるとおり、それはDダイマーを含むフィブリン分解産物と、フィブリノゲン分解産物（FGDP：fibrinogen degradation products）との両方の循環に現れる。よって、がんおよび顕著な凝固活性化状態においては、高いDダイマーレベルと高いFGDPレベルとの組み合わせが生じる。

【0014】

10

20

30

40

50

現在用いられているDダイマーアッセイは同一ではない。なぜなら、Dダイマー抗原は異なるサイズのFDPに存在しており、モノクローナル抗体は異なるエピトープを認識するからである（非特許文献9）。最も一般的に用いられる方法は自動免疫比濁法であり、これは抗Dダイマー抗原モノクローナル抗体でコートされたラテックス微粒子の懸濁物の濁度の変化に基づくものである。サンプル中にDダイマーが存在することで、ラテックス微粒子が凝集し、媒体の濁度の増加を示す結果として、540nmにおける測光による吸光度の増加がもたらされる。これらの血漿アッセイは、全血における凝集テストよりも良好な感度を有する（非特許文献10）ためにVTEの除外を可能にするが、非常に特異的ということではなく、VTEの診断に用いることはできない。

【0015】

10

しかし、どの先行技術の方法も、血管内フィブリン溶解の結果もたらされるDダイマーを定めるために、サンプルのフィブリン形成の動的測定と、凝固亢進、炎症および線溶亢進によって生成されるDダイマーおよびフィブリノゲン分解産物（FgDP）とを結び付けていない。よって、どの現行法も血液サンプル中の静脈血栓症に対して特異的なDダイマーを測定できない。

【0016】

よって、Dダイマーの通常のアッセイと同様に感受性が高いが、それよりも特異性の高いインビトロ診断法を提供することは、PEまたはDVTを有する疑いがある患者における、たとえばヨウ素化造影製品の注射を伴うスパイラル胸部血管走査または肺シンチグラフィなどのイメージング検査の必要性を低減できる。こうした方法は、コストを制限し、患者、特に血栓症の危険性の高い高齢の個体およびがんである患者のより早急な処置を確実にし、かつ行われるべき処置に関する迅速な判断ができることを可能にするだろう。

20

【0017】

したがって、患者からのサンプルにおける静脈血栓症に対して特異的なDダイマーを定めるために利用可能な方法を有することが必要とされており、前記方法は図2に示されるとおり、凝固亢進、炎症および線溶亢進によって生成された前記患者のDダイマーを、血管内フィブリン溶解によってもたらされた血栓症に対して特異的なDダイマーと区別できる。加えてこうした方法は、研究室において緊急時に行うか、または患者のベッドサイドで行い得るようになるために自動化される必要がある。さらに、この方法は信頼性が高く、再現性があり、かつ簡単である必要があり、処置に関する判断を助ける必要がある。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献1】Lopez, Thromb. Res., 2009, 123 (Suppl. 4): S30 - 34

【非特許文献2】Wells, J. Thromb. Haemost., 2007, 5 (Suppl. 1): 41 - 50

【非特許文献3】Ceriani, J. Thromb. Haemost., 2010, 8 (5): 957 - 970

【非特許文献4】Klok, Arch. Intern. Med., 2008, 168 (19): 2131 - 2136

40

【非特許文献5】Le Gal, Ann. Intern. Med., 2006, 144 (3): 165 - 171

【非特許文献6】Adam, Blood, 2009, 113 (13): 2878 - 2887

【非特許文献7】Mirshahi. PLoS ONE, 2014, 9 (3): e92379, doi: 10.1371/journal.pone.0092379

【非特許文献8】Dirix, Br. J. Cancer, 2002, 86 (3): 389 - 395

【非特許文献9】Dempfle, FACT study group, Thromb.

50

Haemost., 2001, 85(4): 671-678

【非特許文献10】de Groot, Thromb. Haemost., 1999, 82(6): 1588-1592

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0019】

驚くべきことに、本発明者らは、凝固活性化、炎症および過剰な線維素溶解に由来するDダイマーを、血管内フィブリン分解に由来する血栓症に対して特異的なDダイマーと区別し、かつそれらを定量的に測定できる方法を開発した。加えてこの方法は、それらのDダイマーを自動の実験用デバイス、遠隔生物学デバイス、またはポータブルデバイスにおいて緊急の状況で定めることを可能にする。開発された方法は信頼性が高く、簡単であり、実施が迅速であり、かつ再現性がある。さらに、本発明者らはこの方法を洗練することにより、この方法の改変バージョンにおいて、この方法は年齢にかかわらずすべての患者に適用でき、かつ偽陰性の数を低減して、根底にある血栓形成傾向の事象、亜区域性または重篤でない肺塞栓症の事象、心筋梗塞の事象、がんの事象、感染症の事象、および妊娠の事象における静脈血栓症、ならびに根底に炎症の感受性を有する高齢の対象に対する静脈血栓症を検出することを可能にする。最後に、一般的なアッセイ方法とは反対に、本発明による方法は年齢の関数としての任意の調整を必要としない。

10

【0020】

本発明による方法は、3つの知見に基づくものである。凝固活性化状態とは反対に、血栓症においては凝固亢進および線溶亢進が存在しないか、または低減している。他方で、主に重要なのは炎症性態である。

20

【0021】

より具体的には、第1の側面において、本発明は、患者からの血液サンプル中の静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法の第1のバージョンに関し、前記方法は、一方ではサンプル中のDダイマーのレベル(D_{dis}: D-dimer in the sample)を得るためのサンプル中のDダイマーのアッセイを含み、他方ではこの同じサンプル中のフィブリン形成の動的測定を含み、前記動的測定は以下のステップを含む。

30

a) サンプル中の凝固の活性化をトリガすることなく開始するステップと、

b) ステップa) で得られた混合物をインキュベートし、インキュベートされたサンプル中でトロニン生成およびフィブリン血餅の形成をトリガするステップと、

c) フィブリン血餅を形成するb) で得られたサンプルの少なくとも1つの特性の時間変動を測定するステップと、

d) c) で分析されたフィブリン血餅の形成プロファイルを確立し、このプロファイルから、プロファイル曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン形成時間(FFT: fibrin formation time)と、フィブリン重合プラトーに達する時間(TA)に測定されたサンプルの特性の値(V_{p(TA)})とを抽出するステップと、

40

e) 血管内フィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベル(R)を算出するステップであって、

e1) 凝固亢進(hypercoagulation)の関数として調整されたDダイマーのレベル(D_{dis/Hc})を得るために、d) で定められたFFTを用いて凝固亢進によって生成されたDダイマーのレベルの関数としてサンプルのDダイマーのレベル(D_{dis})を調整するステップ、および

e2) Rを得るために、d) で定められたV_{p(TA)}を用いて炎症によって生成されたDダイマーのレベルの関数としてe1) で得られた調整DダイマーのレベルD_{dis/Hc}を調整するステップによって算出するステップと、

f) e) で得られたフィブリン分解の結果もたらされたDダイマーのレベルRを、閾値に対して、好ましくは0.5 μg/mlの閾値に対して比較するステップと、

50

g) e) で得られたフィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル R と、サンプルの D ダイマーのレベル (Ddi_s) とを用いて、凝固活性化状態において存在する線溶亢進 ($hyperfibrinolysis$) ($FgDP_{(HF)}$) によって生成されたフィブリノゲン分解産物のレベルを定めるステップと、

h) g) で得られた $FgDP_{(HF)}$ レベルを閾値に対して比較し、d) で得られたフィブリン形成時間 (FFT) を閾値に対して比較するステップとである。

【0022】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第 1 のバージョンは、ステップ e) において、初期フィブリノゲン換算量 ($FEU: fibrinogen equivalent units$) で表されるレベル R を算出するステップが、次のステップによって行われることを特徴とする。

e 1) 次の等式を用いて、凝固亢進の関数として調整された D ダイマーのレベル ($Ddi_{s/HC}$) を算出するステップであって、

【0023】

【数 1】

$$Ddi_{s/HC} = Ddi_s \times \frac{FFT}{\text{対照時間}}$$

【0024】

ここで対照時間 ($Control Time$) とは、ステップ a) ~ d) に従って測定された、血栓症の疑いのない健康な患者からのサンプルの平均フィブリン血餅形成時間である、ステップ、および

e 2) 次の等式を用いてレベル R を算出するステップであって、

【0025】

【数 2】

$$R = \frac{Ddi_{s/HC}}{[Fib]_{(Vp(TA))}}$$

【0026】

ここで $[Fib]_{(Vp(TA))}$ は、次の等式を有する標準曲線における特性の値 $Vp(TA)$ に対して演繹されるフィブリノゲン濃度であり、

$$y = a \ln(x) - b、$$

ここで

y はフィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定された特性の値であり、

x はフィブリノゲン濃度であり、

a および b は、フィブリンプラトーのレベルとフィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式の定数であり、

標準曲線は血液サンプルに対して確立されたものであり、この血液サンプルのフィブリノゲン濃度が定められており、かつその特性の値 ($Vp(TA)$) がステップ a) ~ d) によって定められている、ステップ。

【0027】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第 1 のバージョンは、ステップ f) において、e) で得られたレベル R が閾値未満、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値未満であることは、その患者における血栓症を除外することを可能にし、レベル R が閾値より高く、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値よりも高いことは、その患者における血栓症の可能性を示すことを特徴とする。

【0028】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第 1 のバージョンは、ステップ g) が次のステップで構成されるステップを含むことを特徴とする。

g 1) 既知のレベルの $FgDP$ および既知のレベルの D ダイマーを有する血液サンプル

10

20

30

40

50

を用いて確立された標準曲線において、サンプル中のDダイマーのレベル（ Ddi_s ）に対応するFgDPのレベルを定めるステップ、

g2) g1) で用いられた標準曲線において、ステップe) で得られた調整されたDダイマーのレベル（R）に対応するFgDPのレベルを定めるステップ、および

g3) g1) で得られたFgDPのレベルからg2) で得られたFgDPのレベルを引くことによって、線溶亢進によって生成されたFgDPのレベル（ $FgDP_{(HF)}$ ）を定めるステップ。

【0029】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第1のバージョンは、ステップh) が次のステップで構成されるステップを含むことを特徴とする。

h1) $FgDP_{(HF)}$ と閾値、特に $1\mu g/ml$ の閾値とを比較するステップであって、 $FgDP_{(HF)}$ が閾値未満または陰性であることは、その患者における血栓症を除外することを可能にし、 $FgDP_{(HF)}$ が閾値よりも高いことは、その患者における血栓症の可能性を示す、ステップ、

h2) FFTと閾値、特に[e1)の対照時間 - 1標準偏差]に等しい閾値、たとえば135秒の対照時間に対する120秒の閾値とを比較するステップであって、FFTが閾値未満であることは、患者が血栓症を有さないが急性凝固活性化状態を有することを示し、FFTが閾値よりも高いことは、その患者における血栓症を示す、ステップ。

【0030】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第1のバージョンは、次のことを特徴とする。

- ステップh2)において血栓症が診断されたとき、静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーのレベル（ Ddi_{VTE} ）は、ステップe) で得られたDダイマーのレベルRであり、

- ステップh1) およびh2)において血栓症が除外されたが、ステップe) で得られたレベルRは閾値より高く、好ましくは $0.5\mu g/ml$ の閾値よりも高いとき、この方法は、次の等式を用いて静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーのレベル（ Ddi_{VTE} ）を算出するステップで構成されるステップも含み、

【0031】

【数3】

$$Ddi_{VTE} = 0.5 \times \frac{R}{Ddi_s}$$

【0032】

ここで Ddi_s は、サンプル中のDダイマーのレベルである。

【0033】

Ddi_{VTE} レベルは肺塞栓症または深部静脈血栓症の程度を表すものであり、したがって疾患の重篤度を表す。

【0034】

加えて本発明は、患者からの血液サンプル中の静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法の第2のバージョンに関し、前記方法は、一方ではサンプル中のDダイマーのレベル（ Ddi_s ）を得るためのサンプル中のDダイマーのアッセイを含み、他方ではこの同じサンプルのフィブリン形成の動的測定を含み、前記動的測定は以下のステップを含む。

a) サンプル中の凝固の活性化をトリガすることなく開始するステップと、

b) ステップa) で得られた混合物をインキュベートし、インキュベートされたサンプル中でトロニン生成およびフィブリン血餅の形成をトリガするステップと、

c) フィブリン血餅を形成するb) で得られたサンプルの少なくとも1つの特性の時間変動を測定するステップと、

d) c) で分析されたフィブリン血餅の形成プロファイルを確立し、このプロファイル

から、プロファイル曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン形成時間 (F F T) と、フィブリン重合プラトーに達する時間 (T A) に測定されたサンプルの特性の値 ($V_p (T_A)$) とを抽出するステップと、

e') 血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベル (R) を算出するステップであって、

e' 1) 炎症 (i n f l a m m a t i o n) に対して調整された D ダイマーのレベル ($D d i s / I$) を得るために、d) で定められた $V_p (T_A)$ を用いて炎症によって生成された D ダイマーのレベルの関数としてサンプルの D ダイマーのレベル $D d i s$ を調整するステップ、および

e' 2) 低い D ダイマーレベルに対して e' 1) で得られた炎症に対して調整された D ダイマーのレベル ($D d i s / I$) を補正するステップによって算出するステップ、ならびに

10

炎症の関数として患者からのサンプルを分類するステップと、

f') e) で得られたフィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル R を、閾値に対して、好ましくは $0.5 \mu g / m l$ の閾値に対して比較するステップと、

g') サンプル中の D ダイマーのレベル ($D d i s$) および e') で得られたレベル R を用いるか、または e' 1) で得られた炎症の関数として調整された D ダイマーのレベル $D d i s / I$ および e') で得られたレベル R を用いて、線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル ($D d i (H F)$) を定めるステップと、

h') g') で得られたレベル $D d i (H F)$ を閾値に対して比較し、 $T A / F F T$ 比率を閾値に対して比較するステップであって、ここで T A は d) で得られたフィブリン重合プラトーに達する時間であり、F F T は d) で得られたフィブリン形成時間である、ステップとである。

20

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第 2 のバージョンは、ステップ e') において、初期フィブリノゲン換算量 (F E U) で表されるレベル R が、次のステップによって得られることを特徴とする。

e' 1) 次の等式によって、炎症の関数として調整された D ダイマーのレベル ($D d i s / I$) を算出するステップであって、

【 0 0 3 6 】

30

【 数 4 】

$$D d i s / I = \frac{D d i s}{[Fib]_{(V_p(T_A))}}$$

【 0 0 3 7 】

ここで $[Fib]_{(V_p(T_A))}$ は、次の等式を有する標準曲線における特性の値 $V_p (T_A)$ に対して演繹されるフィブリノゲン濃度であり、

$$y = a \ln (x) - b、$$

ここで

y はフィブリン重合プラトーに達する時間 (T A) に測定された特性の値であり、

40

x はフィブリノゲン濃度であり、

a および b は、フィブリンプラトーのレベルとフィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式の定数であり、

標準曲線は血液サンプルに対して確立されたものであり、この血液サンプルのフィブリノゲン濃度が定められており、かつその特性の値 $V_p (T_A)$ がステップ a) ~ d) によって定められている、ステップ、

e' 2) e' 1) で得られたレベル $D d i s / I$ を次の等式によって補正するステップであって、

$$R = D d i s / I + [0.5 - F_{D d i - s}]$$

ここで $F_{D d i - s}$ は低い D ダイマーレベル ($< 4 \mu g / m l$) に対する補正因子であ

50

り、この値は次の等式を有する標準曲線におけるサンプルのDダイマーのレベル (Ddi_s) に対する補正因子の値に対応し、

$$y = ax^2 + bx + c$$

ここで y は補正因子 F であり、

x はDダイマーのレベルであり、

a 、 b および c は、補正因子とDダイマーのレベルとを結び付ける多項式の定数であり、

標準曲線は血液サンプルに対して確立されたものであり、この血液サンプルのDダイマーのレベルが定められており、かつそれに対する補正因子が経験的に定められているため、レベル $Ddi_{s/I}$ が $0.5 \mu g/ml$ FEU (フィブリノゲン換算量) の閾値に関連付けられる。

10

【0038】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第2のバージョンは、ステップ e') において、炎症の関数として患者からのサンプルを分類するステップが次のステップを含むことを特徴とする。

- 比率 $1/[Fib]_{(vp(TA))}$ を算出するステップであって、ここで $[Fib]_{(vp(TA))}$ は $e'1)$ で定められたフィブリノゲン濃度である、ステップ、および

- もし比率 $1/[Fib]_{(vp(TA))} > 0.20$ であれば、その患者からのサンプルを炎症を有さない患者のグループ I に分類するステップ、または

20

- もし比率 $1/[Fib]_{(vp(TA))} \leq 0.20$ であれば、その患者からのサンプルを炎症を有する患者のグループ II に分類するステップである。

【0039】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第2のバージョンは、ステップ f') において、 e') で得られたレベル R が閾値未満、好ましくは $0.5 \mu g/ml$ の閾値未満であることは、その患者における血栓症を除外することを可能にすることを特徴とする。

【0040】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第2のバージョンは、ステップ g') において、線溶亢進によって生成されたDダイマーのレベル (Ddi_{HF}) が、次のとおり算出されることを特徴とする。

30

$g'1)$ 次の等式を用いて、ステップ e') で定められたレベル R とサンプルのDダイマーのレベル Ddi_s との比率として算出される。

【0041】

【数5】

$$Ddi_{HF} = (R/Ddi_s)_{patient} = \frac{R}{Ddi_s}$$

【0042】

$g'2)$ 次の等式を用いて、ステップ e') で定められたレベル R と $e'1)$ で得られたレベル $Ddi_{s/I}$ との比率として算出される。

40

【0043】

【数6】

$$Ddi_{HF} = (R/Ddi_{sI})_{patient} = \frac{R}{Ddi_{sI}}$$

【0044】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第2のバージョンは、次のことを特徴とする。ステップ h') において、

- $g'1)$ で得られたレベル $(R/Ddi_s)_{patient}$ は、次のステップによ

50

って閾値と比較され、

h' 1) サンプルのレベル $D d i_s$ に対して、次の等式を有する標準 (standard) 曲線において比率 $(R / D d i_s)_{standard}$ の値を定めるステップであって、

$$y = a x^{-b}$$

ここで x は D ダイマーのレベルであり、

y は血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベルと、D ダイマーのレベルとの比率 $(R / D d i_s)$ であり、

a および b は、比率 $R / D d i_s$ と D ダイマーのレベルとを結び付ける等式の定数であり、

標準曲線は、以下を用いて確立されたものであり、

- 患者からのサンプルがグループ I に分類されたとき：ステップ e') によってグループ I に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R 、ならびに

- 患者からのサンプルがグループ II に分類されたとき：ステップ e') によってグループ II に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R である、ステップ、ならびに

h' ' 1) g' 1) で得られた線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル $(R / D d i_s)_{patient}$ の値と、h' 1) で得られた比率 $(R / D d i_s)_{standard}$ の値とを比較するステップであって、ここで

$(R / D d i_s)_{patient}$ が比率 $(R / D d i_s)_{standard}$ 未満であることは、その患者 (patient) における血栓症を除外することを可能にし、 $(R / D d i_s)_{patient}$ が比率 $(R / D d i_s)_{standard}$ 以上であることは、その患者における血栓症の可能性を示す、ステップであり、

- g' 2) で得られたレベル $(R / D d i_s / I)_{patient}$ は、次のステップによって閾値と比較され、

h' 2) サンプルのレベル $D d i_s$ に対して、次の等式を有する標準曲線において比率 $(R / D d i_s / I)_{standard}$ の値を定めるステップであって、

$$y = a x^{-b}$$

ここで x は D ダイマーのレベルであり、

y は血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベルと、炎症の関数として調整された D ダイマーのレベルとの比率 $(R / D d i_s / I)$ であり、

a および b は、比率 $R / D d i_s / I$ と D ダイマーのレベルとを結び付ける等式の定数であり、

標準曲線は、次のとおりに確立されたものであり、

- 患者からのサンプルがグループ I に分類されたとき：ステップ e') によってグループ I に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、ステップ a) ~ e' 1) によって得られたそのレベル $D d i_s / I$ 、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用い、

- 患者からのサンプルがグループ II に分類されたとき：ステップ e') によってグループ II に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、ステップ a) ~ e' 1) によって得られたそのレベル $D d i_s / I$ 、およびステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用いる、ステップ、ならびに

h' ' 2) g' 2) で得られた線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル $(R / D d i_s / I)_{patient}$ の値と、h' 2) で得られた比率 $(R / D d i_s / I)_{standard}$ の値とを比較するステップであって、ここで

$(R / D d i_s / I)_{patient}$ が比率 $(R / D d i_s / I)_{standard}$

10

20

30

40

50

未満であることは、その患者における血栓症を除外することを可能にし、 $(R / D d i _ s / I) _ { p a t i e n t }$ が比率 $(R / D d i _ s / I) _ { s t a n d a r d }$ 以上であることは、その患者における血栓症の可能性を示す、ステップである。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第 2 のバージョンは、ステップ $h ')$ において、比率 $T A / F F T$ を閾値に対して比較するステップが次のステップを含むことを特徴とする。

$h ' 3)$ 比率 $T A / F F T$ を算出するステップであって、ここで $T A$ はステップ $d)$ で定められたフィブリン重合プラトーに達する時間であり、 $F F T$ はステップ $d)$ で定められたフィブリン血餅形成時間である、ステップと、

$h ' ' 3)$ 患者からのサンプルがグループ I に分類されたとき：比率 $T A / F F T$ を第 1 の閾値、特に 1 3 5 秒の対照時間に対する第 1 の閾値 1 . 7 5 に対して比較するステップであって、ここで

比率 $T A / F F T$ が第 1 の閾値より高いことは、グループ I に分類された患者における血栓症を除外し、かつ血栓形成傾向または凝固活性化状態を診断することを可能にし、

比率 $T A / F F T$ が第 1 の閾値以下であることは、グループ I に分類された患者における血栓症を示す、ステップ、

患者からのサンプルがグループ II に分類されたとき：比率 $T A / F F T$ を第 2 の閾値、特に 1 3 5 秒の対照時間に対する第 2 の閾値 1 . 6 5 に対して比較するステップであって、ここで

比率 $T A / F F T$ が第 2 の閾値より高いことは、グループ II に分類された患者における血栓症を除外し、かつ血栓形成傾向または凝固活性化状態を診断することを可能にし、

比率 $T A / F F T$ が第 2 の閾値以下であることは、グループ II に分類された患者における血栓症を示す、ステップとであり、

ここで対照時間とは、ステップ $a) \sim d)$ に従って測定された、血栓症の疑いを呈しない健康な対象からのサンプルのフィブリン血餅形成に対する平均時間である。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第 2 のバージョンは、次のことを特徴とする。

- ステップ $h ' ' 3)$ において血栓症が診断されたとき、静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル $(D d i _ { V T E })$ は、ステップ $e ')$ で得られた D ダイマーのレベル R であり、

- ステップ $h ' ' 1)$ 、 $h ' ' 2)$ および $h ' ' 3)$ において血栓症が除外されたが、ステップ $e ')$ で得られたレベル R は閾値より高く、好ましくは $0 . 5 \mu g / m l$ の閾値よりも高いとき、この方法は、次の等式を用いて静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル $(D d i _ { V T E })$ を算出するステップで構成されるステップも含み、

【 0 0 4 7 】

【 数 7 】

$$D d i _ { V T E } = 0.5 \times \frac{R}{D d i _ s}$$

【 0 0 4 8 】

ここで $D d i _ s$ は、サンプル中の D ダイマーのレベルである。

【 0 0 4 9 】

レベル $D d i _ { V T E}$ は肺塞栓症または深部静脈血栓症の程度を表すものであり、したがって疾患の重篤度を表す。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態において、本発明による方法の第 1 または第 2 のバージョンは、血

10

20

30

40

50

液サンプルが $1\ \mu\text{l}$ から $300\ \mu\text{l}$ 、好ましくは $50\ \mu\text{l}$ から $200\ \mu\text{l}$ の体積を有することを特徴とする。好ましくは、血液サンプルは無希釈である。

【0051】

サンプルの D ダイマーのアッセイは、免疫比濁法または免疫酵素法に従って行われ得る。

【0052】

いくつかの実施形態において、本発明によるアッセイ方法のステップ a) は、患者からの血液サンプルと組織因子と任意にはリン脂質とを混合するステップ、好ましくは患者からの血液サンプルと組織因子とリン脂質とを混合するステップによって行われる。ステップ a) の組織因子は、 $0.5 \sim 5\ \text{pM}$ 、好ましくは $2\ \text{pM}$ の濃度で存在し得る。ステップ a) の混合物は、トロンビン生成およびフィブリン形成をトリガするためのカルシウムイオンを含み得る。

10

【0053】

いくつかの実施形態において、本発明によるアッセイ方法のステップ b) は、ステップ a) で得られた混合物を 30 から 40 の温度にて 20 秒から 400 秒、好ましくは 60 秒から 300 秒の時間インキュベートするステップを含むことを特徴とする。

【0054】

いくつかの実施形態において、ステップ b) において、トロンビン生成およびフィブリン血餅形成をトリガするステップは、インキュベートされたサンプルにカルシウムイオンを加えるステップによって行われる。

20

【0055】

いくつかの実施形態において、本発明によるアッセイ方法において用いられる血液サンプルは、血漿サンプルである。血漿サンプルは、乏血小板血漿サンプルであり得る。これらの実施形態においては、ステップ c) において、b) で得られたサンプルの少なくとも 1 つの特性の時間変動を測定するステップは、 $350 \sim 800\ \text{nm}$ の波長、好ましくは $540\ \text{nm}$ の波長における光学濃度の時間変動 (DOD) を測定するステップによって行われる。好ましくは、ステップ c) の光学濃度の測定は、D ダイマーをアッセイするために用いられるのと同じ波長である $540\ \text{nm}$ にて行われる。

【0056】

他の実施形態において、本発明によるアッセイ方法において用いられる血液サンプルは、全血サンプルである。全血サンプルは、クエン酸全血サンプルであり得る。これらの実施形態においては、ステップ c) において、b) で得られたサンプルの少なくとも 1 つの特性の時間変動を測定するステップは、トロンボエラストグラフィ、レオメトリ、または画像分析によって行われる。

30

【0057】

いくつかの実施形態において、本発明によるアッセイ方法は、少なくともステップ c) および d) が自動診断デバイスまたは遠隔生物学アナライザ、好ましくは凝固アナライザにおいて行われることを特徴とする。

【0058】

第 2 の側面において、本発明は患者における静脈血栓塞栓症 (VTE) を診断するためのインビトロの方法に関し、この方法は次のステップで構成されるステップを含む。

40

- 本明細書に記載される VTE に対して特異的な D ダイマーをアッセイするための方法を用いて、患者からの血液サンプルにおける VTE に対して特異的な D ダイマーのアッセイを行うステップと、

- その患者に関する診断を提供するステップとである。

【0059】

本発明によるインビトロ診断方法の 1 つにおいて、その患者に関する診断とは (i) 血栓症の除外、(ii) 急性凝固活性化状態、または (iii) 血栓症である。

【0060】

患者が高齢の個体であるか、がんである患者であるか、感染症である患者であるか、ま

50

たは血栓形成傾向である患者であるような実施形態において、静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするステップは、本発明のアッセイ方法の第2のバージョンを用いて行われる。この場合、その患者に関する診断とは(i)血栓症の除外、(ii)急性凝固活性化状態、(iii)血栓形成傾向、または(iv)血栓症である。

【0061】

本発明のいくつかの好ましい実施形態のより詳細な説明が、以下に与えられる。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】凝固活性化の図である。FpA - FpB = フィブリノペプチドAおよびB；TAT = トロンビン - 抗トロンビン(thrombin - antithrombin)複合体；ならびにF1 + 2 = プロトロンビンフラグメント。

【図2】凝固亢進、炎症、および凝固活性化状態における線溶亢進、および静脈血栓塞栓症(VTE)によるDダイマー形成の動態を示す図である。

【図3】血漿または全血サンプルにおける、本発明に従うVTEに対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法の原理を示す図であって、サンプルのDダイマーの通常のアッセイと、このサンプルのフィブリン形成の動的測定とを含む図である。

【図4】この方法の第1のバージョンによる、患者からの前記サンプルにおける凝固亢進、炎症、および線溶亢進によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマーに基づく、生物学的サンプルにおけるVTEに対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法の解説を示す図である。

【図5】フィブリン血餅形成プロファイル(ステップd)を示す図である。(A)本発明の方法による、時間の関数としての光学濃度(OD)の測定による、フィブリノゲンが3.5 g/lである正常な患者(PN: normal patient)からの血漿と、フィブリノゲンが3.0 g/lである凝固亢進状態を有する患者(P Hyper)からの血漿のサンプルとの場合；および(B)本発明の方法の変形による、時間の関数としてのプラトーに達する時間における振幅のトロンボエラストメトリ測定による、フィブリノゲンレベルが2.0 g/lである正常な患者(PN)からの全血サンプルと、フィブリノゲンレベルが5.0 g/lである高フィブリノゲン血症(hyperfibrinogenemic)患者(P Hyperfib)からの全血サンプルとの場合。

【図6】炎症の関数として、血栓症の疑いのある患者からの51の血漿サンプルに対する本発明による方法によるフィブリン重合プラトーに達する時間における光学濃度の変動(DOD)を示す図であって、(A)C反応性タンパク質(CRP)のレベル；および(B)フィブリノゲン(Fib)のレベルによって表された図である。

【図7】本発明による方法によるフィブリン形成時間の関数としてのプラトーに達する時間を示す図であって、(A)既知のがんを有するか、もしくは有さない患者、または血栓症の疑いのある患者からの219サンプルに対するもの；および(B)血栓症の疑いのあるがんである患者からの34サンプルに対するものである。

【図8】サンプルのDダイマーの関数として凝固亢進によって生成されたDダイマーのレベルを示す図であって(ステップe)、(A)血栓症の疑いのある患者からの87サンプルに対するもの；および(B)活動性のがんを有する患者からの28サンプルに対するものである。

【図9】参照方法(クラウス(Claus))によって定められたフィブリノゲンのレベルの関数として、本発明の方法に従って測定したフィブリン重合プラトーに達する時間における光学濃度の変動(DOD)を示す図であって、(A)血栓症の疑いのある、がんを有するか、または有さない患者からの219サンプル；および(B)血栓症の疑いのある、活動性のがんである患者からの23サンプルにおける図である。(C)クラウスの方法によって血漿において定められたフィブリノゲンのレベルの関数としての、血栓症の疑いのある患者からの7つの全血サンプルにおける本発明による方法の変形に従って測定されたフィブリン重合プラトーに達する時間における振幅。

【図10】静脈血栓症を有する患者および有さない患者14人からのサンプルにおける、

STA Liatest (登録商標) FDPラテックス法(スターゴ)によって測定されたフィブリノゲン分解産物(FgDP)のレベルと、以下のレベルとの相関を示す図である。(A)通常のDダイマー(スターゴの方法);(B)血漿に対して行われた本発明の方法に従う、凝固亢進および炎症によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマー(スターゴの方法);ならびに(C)全血サンプルに対して行われた本発明の方法の変形に従う、凝固亢進および炎症によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマー(スターゴの方法)。

【図11】静脈血栓症を有する患者および有さない患者14人からのサンプルにおける、STA Liatest (登録商標) FDPラテックス法(スターゴ)によって測定されたフィブリノゲン分解産物(FgDP)のレベルと、以下のレベルとの相関を示す図である。(A)Dダイマー(インスツルメンテーション・ラボラトリー(Instrumentation Laboratory)ILの方法);ならびに(B)血漿サンプルに対して行われた本発明の方法に従う、凝固亢進および炎症によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマー(ILの方法)。

【図12】本発明の方法および比率[Dダイマー/フィブリノゲン]によるDダイマー(スターゴの方法)の調整の比較を示す図であって、(A)イメージングにおける静脈血栓症を有さない215人の患者からの血漿におけるもの;ならびに(B)イメージングにおけるPEおよび/またはDVTを有する21人の患者からの血漿におけるものである。(I:炎症、F:線溶亢進、Ddi:Dダイマー、Fib:フィブリノゲン)。

【図13】本発明の方法および比率[Dダイマー/フィブリノゲン]によるDダイマー(ILの方法)の調整の比較を示す図であって、(A)イメージングにおける静脈血栓症を有さない199人の患者からの血漿におけるもの;ならびに(B)イメージングにおけるPEおよび/またはDVTを有する15人の患者からの血漿におけるものである。(I:炎症、F:線溶亢進、Ddi:Dダイマー、Fib:フィブリノゲン)。

【図14】低いDダイマーのレベル($< 4 \mu\text{g/ml}$)に対する補正因子 F_{Ddi-s} と、(A)血管内フィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベルRとの相関を示す図であって、(B)血漿サンプルに対して行われる本発明の方法に従う、炎症の関数としての調整(Ddi_s / I)、およびサンプルのDダイマーのレベル(Ddi_s)の関数としての等式 $R = Ddi_s / I + [0.5 - F_{Ddi-s}]$ による低いDダイマーのレベル($< 4 \mu\text{g/ml}$)に対する補正の後に得られるものである。

【図15】i)Dダイマーのアッセイ、ii)年齢に関して調整されたDダイマーのアッセイ、iii)本発明の方法による、年齢の関数としての血栓症の除外のパーセンテージの比較を示す図であって、(A)静脈血栓症の疑いのある796人の患者に対する図;および(B)静脈血栓症の疑いのある796人の患者のうち、がんである58人の患者に対する図である。

【発明を実施するための形態】

【0063】

上述のとおり、本発明は、患者からの生物学的サンプルにおける血栓症に対して特異的なDダイマーのレベルを定めるための方法と、静脈血栓塞栓症(肺塞栓症または深部静脈血栓症)の診断または凝固活性化状態の識別におけるこの方法の適用とに関する。

【0064】

I - 静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法

本発明によるアッセイ方法は、2つの主要なステップを含む。一方はDダイマーのアッセイであり、他方はフィブリン形成の動的測定である。これらの主要ステップは、患者からの血液サンプルに対して行われる。

【0065】

A. 患者からの血液サンプル

本明細書において用いられる「患者」という用語は、ヒトを示す。「患者」という用語は特定の年齢を示さないため、小児、青年、および高齢の個体を含む成人を包含する。一般的に、患者とは肺塞栓症または深部静脈血栓症を有することが疑われる対象、たとえば

10

20

30

40

50

病院の救急科で呼吸困難および／または胸部痛の処置を受ける患者などである。さらに、こうした患者は既知の医学的状態を有さないことがある。代替的に、こうした患者は、血栓症に対する素因を有することが知られている患者（たとえば、がんである患者、妊娠中の女性または出産直後の女性、術後の段階の患者、旅行中または特に長期旅行などの旅行直後の対象など）；凝固亢進状態を呈する患者（たとえば、血栓形成傾向である患者、腎不全である患者、外傷、転倒、もしくは骨折を経験した患者、または高齢の対象など）；凝固活性化状態を呈する患者（たとえば、感染症もしくは敗血症である患者、肺疾患、気管支炎、もしくは呼吸不全である患者、炎症性疾患である患者、胃炎である患者、心筋症である患者、または脳卒中の病歴のある患者など）であることがある。本発明の状況において、「正常な患者」または「健康な患者」という用語は、その患者に血栓症の疑いがないときに用いられる。

10

【0066】

本発明による方法は、患者からの単純な血液の生物学的サンプルを使用する。血液サンプルは、血液サンプルを回収する目的のために患者の静脈から採られる。好ましくは、この血液の生物学的サンプルは無希釈でこの方法に用いられる。

【0067】

いくつかの実施形態において、本発明による方法は、全血（すなわち、すべての成分を有する血液）のサンプルに対して行われる。全血はクエン酸化されてもよい。この場合、採られた全血はクエン酸チューブに回収される。

【0068】

他の実施形態において、本発明による方法は、血液サンプルから得られた血漿サンプルに対して行われる。ヒト血液から血漿を得るための方法は、当該技術分野において公知である。好ましくは、生物学的サンプルは乏血小板血漿（PPP：platelet-poor plasma）サンプルである。この場合、この生物学的サンプルは特に、患者の血液サンプルを含むクエン酸チューブを18～22℃の温度のサーモスタット遠心機内で2000～2500gの速度にて15分間遠心分離することによって得ることができる。

20

【0069】

乏血小板血漿サンプルを保存する必要があるときは、次のステップで構成される以下のプロトコルを用いることが可能である。

- 血漿を迅速にデカントして、白血球細胞および血小板の細胞層より上の約0.5 cmの血漿を残すステップ、
- 溶血チューブまたはプラスチックチューブに血漿を回収するステップ、
- このチューブを18～22℃の温度のサーモスタット遠心機内で2000～2500gの速度にて15分間遠心分離するステップ、
- （細胞デブリを含む）チューブの底部を取らないように0.5～1 mlのフラクションにアリコートするステップ、次いで
- -70℃から-90℃、好ましくは-80℃の温度にて急速冷凍するステップ。

30

【0070】

本発明によるアッセイは、任意の適切な体積の血液サンプルに対して行われ得る。一般的に本発明においては、小体積の血液サンプルが用いられる。たとえば、血液の生物学的サンプルは、1 μlから300 μlの体積、好ましくは50 μlから200 μl、好ましくは試薬（以下を参照）の添加後の最終体積300 μlに対して約200 μlの体積、好ましくは試薬の添加後の最終体積150 μlに対して約100 μlの体積を有する。こうした体積は実際にルーチン機器における分析のために十分であるが、遠隔生物学デバイスにおいては、サンプル体積対最終体積の比（すなわち約2：3の比）が忠実にされるのであれば、その体積が低減されてもよい。ポータブルデバイスの場合に、試薬が凍結乾燥されていて患者のベッドサイドで使用時にサンプルによって再構成される場合には、同じ最終反応濃度が得られるのであれば、その体積が5 μlから20 μl、好ましくは10 μlの体積までさらに低減されてもよい。

40

【0071】

50

B．サンプルのDダイマーのアッセイ

本発明による方法において、第1の主要ステップ（血液サンプル中のDダイマーのアッセイ）は、任意の適切な方法によって行われ得る。いくつかの実施形態においては、サンプルのDダイマーの通常のアッセイが行われるだろう。「サンプルのDダイマーの通常のアッセイ」という表現は、たとえばラテックス法などの免疫比濁法、またはたとえばELISA（「酵素結合免疫吸着アッセイ（enzyme-linked immunosorbent assay）」）法もしくはELFA（「酵素結合蛍光アッセイ（enzyme-linked fluorescent assay）」）法などの免疫酵素法に従って行われるアッセイを意味することが意図される。免疫比濁法は、Dダイマーを含む溶液の濁度の変化に基づくものである。典型的に、免疫比濁法は（i）患者からの血液サンプルと、抗Dダイマー抗原モノクローナル抗体でコートされたラテックス微粒子の懸濁物とを混合するステップ（「ラテックス法」）、次いで（ii）特に所与の波長、典型的には540nmにて、混合物の濁度をモニタするステップを含む。免疫酵素法は、抗Dダイマー抗原モノクローナル抗体によって本発明のDダイマーを捕捉するステップと、次いで標識二次抗体によってそれらを明らかにするステップとを含む。

10

【0072】

C．フィブリン形成の動的測定

本発明による方法は、3つの知見に基づくものである。凝固活性化状態とは反対に、血栓症においては凝固亢進および線溶亢進が存在しないか、または低減している。他方で、主に重要なのは炎症性状態である。

20

【0073】

上に示されるとおり、本発明者らは、静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法の2つのバージョンを開発した。本発明の方法の第1のバージョンによるフィブリン形成の動的測定は、いくつかのステップ、すなわちステップa）、b）、c）、d）、e）、f）、およびg）と、診断ステップであるステップh）とを含む。本発明による方法の第2のバージョンによるフィブリン形成の動的測定は、第1のバージョンと同じステップa）、b）、c）、およびd）と、第1のバージョンのステップとは異なるステップe'）、f'）、およびg'）と、診断ステップであるステップh'）とを含む。これらのステップを、以下に詳細に説明する。

30

【0074】

方法のステップ

ステップa）

本発明によるアッセイ方法のステップa）は、血液サンプル中の凝固の活性化をトリガすることなく開始するステップで構成される。凝固活性化の開始は、当該技術分野において公知の任意の適切な方法によって行うことができ、その方法は、ハーゲマン因子または凝固因子XIIの活性化（病変血管から剥がれたコラーゲンと前記因子とが接触するとき起こること）からなる内因性の経路を介するものであってもよいし、組織病変の際に組織因子によって開始されて血液凝固をもたらす外因性の経路を介するものであってもよい。たとえば、外因性の経路を介すると、ステップa）は血液の生物学的サンプルと、組織因子と、任意にはリン脂質とを混合するステップを含み得る。いくつかの好ましい実施形態において、ステップa）は、凝固の内因性の経路の活性化をトリガすることなく開始するために、血液サンプルと、組織因子と、任意にはリン脂質とを混合するステップを含む。この場合、血液の生物学的サンプルは、組織因子（TF：tissue factor）、好ましくはヒト組織因子と、好ましくは半精製または精製されたリン脂質（PL：phospholipids）との溶液に混合される。特に遠隔生物学デバイスまたはポータブルデバイスの場合に、組織因子とリン脂質とは、好ましくは血液の生物学的サンプルによって再構成されるように凍結乾燥される。

40

【0075】

ステップa）の混合物は、混合物中に2～5μMの最終濃度のリン脂質、好ましくは約4μMの濃度を含み得る。好ましくは組織因子は、血液の生物学的サンプルとの混合物に

50

おけるその最終濃度が 0.5 ~ 20 pM、好ましくは 1 ~ 5 pM、たとえば 2 pM などになるような量で用いられる。

【0076】

加えて、ステップ a) の混合物はカルシウムイオンを含んでもよい。カルシウムイオンは 15 ~ 20 mM、好ましくは 17 mM の最終濃度にて存在してもよい。

【0077】

いくつかの実施形態において、本発明による方法のステップ a) は、次のステップを含む。

a 1) リン脂質および任意にはカルシウムイオンの溶液に組織因子を導入するステップ、次いで

10

a 2) a 1) で得られた溶液と、血液の生物学的サンプルとを混合するステップ。

【0078】

他の実施形態において、本発明による方法のステップ a) は、次のステップを含む。

a 1) 組織因子の溶液にリン脂質を導入し、任意にはカルシウムイオンを加えるステップ、次いで

a 2) 血液の生物学的サンプルによって再構成されるように、a 1) で得られた溶液を凍結乾燥するステップ。

【0079】

ステップ a) の最後に、重合プラトーまでのフィブリン形成プロファイルを定めるための、少なくとも組織因子と血漿の生物学的サンプルとの混合物、または少なくとも組織因子と全血の生物学的サンプルとの混合物が得られる。

20

【0080】

ステップ b)

ステップ b) は、ステップ a) で得られた混合物をインキュベートし、次いでインキュベートされたサンプル中でトロンビン生成およびフィブリン血餅形成をトリガするステップで構成される。トロンビン生成およびフィブリン血餅形成をトリガするステップは、当該技術分野において公知の任意の方法によって行われ得る。このトリガするステップは、内因性または内因性の経路の凝固因子の複雑なカスケードを伴い、その結果としてフィブリノゲンから重合フィブリンへの転換がもたらされることによって、フィブリン血餅が生じる。いくつかの特定の実施形態において、このトリガするステップは、得られた混合物にカルシウムイオンを加えるステップによって行われる。

30

【0081】

よってステップ b) は、ステップ a) で得られた混合物をインキュベートするステップを含む。インキュベーションは、任意の適切な時間および温度条件下で行われ得る。このインキュベーションは、典型的には 20 秒から 400 秒、好ましくは 60 秒から 300 秒、好ましくは 300 秒の時間、ルーチン機器において 30 から 40 の温度、好ましくは約 37 の温度にて行われてもよい。特に遠隔生物学機器の使用、好ましくはポータブルデバイスの使用による体積の低減に伴って、このインキュベーション時間は 60 秒未満、好ましくは 30 秒未満まで短くされ得る。

【0082】

40

次いで、インキュベートされた混合物にカルシウムイオンが加えられる。これらのカルシウムイオンは CaCl_2 溶液の形で、約 0.1 M の濃度で加えられ得る。組織因子の存在下で、カルシウムの添加を通じてトロンビン生成およびフィブリン血餅形成がトリガされる。

【0083】

ステップ c)

ステップ c) は、フィブリン血餅を形成するサンプルの少なくとも 1 つの特性の時間変動を測定するステップで構成される。この特性は、フィブリン血餅形成をモニタすることを可能にする任意の光学的または物理的特性であってもよい。

【0084】

50

いくつかの実施形態において、特に使用される生物学的サンプルが血漿サンプルである場合に、測定される特性は好ましくは光学的特性、特に少なくとも1つの波長における光学濃度 (OD: optical density) (吸光度とも呼ばれる) である。波長は350nmから800nmであってもよい。好ましくは、光学濃度測定は、Dダイマーの通常のアッセイに用いられる波長である540nmの波長にて行われる。

【0085】

よってたとえばステップc)の間、フィブリン血餅形成はたとえば2秒以下ごとに、350nmから800nmの少なくとも1つの波長、好ましくは540nmにて、1~10分、好ましくは10分の期間光学濃度を測定することによって、動的にモニタされる。したがってこの期間の間に、特にたとえば10~20秒であってもよいベース時間 (または初期時間 t_i) における光学濃度と比較した光学濃度の変動 (DOD) によって、フィブリン血餅形成が分析される。よって、分析波長 λ および測定時間 t において、 $DOD(\lambda)_t$ は、時間 t に波長 λ にて測定された光学濃度値 ($OD(\lambda)_t$) から、時間 t_i に波長 λ にて測定された光学濃度値 ($OD(\lambda)_{t_i}$) を引いたものに相当し、これは次のとおり算出される。

$$DOD(\lambda)_t = OD(\lambda)_t - OD(\lambda)_{t_i}$$

【0086】

代替的には、本発明による方法のステップc)において動的に測定される、フィブリン血餅を形成するサンプルの特性は物理的特性であり、それは濁度、弾性、粘度、粘弾性、剛性率などであってもよい。

【0087】

よって他の実施形態において、特に使用される生物学的サンプルが全血サンプルである場合に、ステップc)において動的にモニタされるフィブリン血餅の物理的特性は、好ましくはトロンボエラストグラフィ、レオメトリ、または画像分析によって測定される。一般的にフィブリン血餅形成は、フィブリン重合プラトーに達する時間における振幅に達するまでの、たとえば10分以下、好ましくは5分未満などの期間にわたる、血餅の物理的特性の時間変動によってモニタされる。

【0088】

ステップd)

本発明による方法のステップd)は、最初にステップc)において分析されたフィブリン血餅の形成プロファイルを確立するステップで構成される。

【0089】

「フィブリン血餅の形成プロファイル」という表現は、フィブリン重合プラトーまでのフィブリン形成中の時間の関数としての血餅の少なくとも1つの光学的または物理的特性の変化を意味することが意図される。

【0090】

フィブリン形成の動的測定に続いて、トロンビン生成およびフィブリン血餅形成が開始された血液サンプルの少なくとも1つの特性を時間の関数として定めることによって、次の3つのデータが提供される。

- フィブリン血餅形成時間 (FFT)、
- フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA)、および
- 時間TAにおいて測定された特性の値 ($Vp(TA)$)。

【0091】

したがってステップd)は、確立されたフィブリン血餅形成プロファイルから、曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン形成時間 (FFT) と、フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定された光学的または物理的特性の値 ($Vp(TA)$) とを抽出するステップで構成される。代替的に、光学的または物理的特性の値は重合プラトーの90%より多くに達する時間、好ましくは重合プラトーの95%より多くに達する時間、たとえば96%、または97%、または98%、または99%などに達する時間に測定され得ることを当業者は理解するだろう。

【0092】

測定される特性が光学濃度である場合、すなわち特に血漿サンプルの場合には、曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン形成時間 (FFT) と、フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定されたサンプルの $DO D_{(TA)}$ とが、フィブリン血餅形成プロファイル (プラトーを有する S 形状曲線に似たシグモイドプロファイル) から抽出される。

【0093】

トロンボエラストグラフィによって物理的特性が測定される場合、すなわち特に全血サンプルの場合には、曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン血餅形成時間 (FFT) と、フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) における振幅 ($A_{(TA)}$) とが、フィブリン血餅形成プロファイル (音叉の形状を有するプロファイル) から抽出される。

10

【0094】

レオメトリまたは画像分析によって物理的特性が測定される場合、すなわち特に全血サンプルの場合には、曲線の接線の変曲点において測定されたフィブリン形成時間 (FFT) と、フィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) における振幅 ($A_{(TA)}$) とが、フィブリン血餅形成プロファイル (プラトーを有する S 形状曲線に似たシグモイドプロファイル) から抽出される。

【0095】

このことは、以下に特に示されている。

20

- 図 5 a において、正常 (健康) な患者からの血漿および凝固亢進を有する患者からの血漿によって示され、
- 図 5 b において、正常な患者からの全血および高フィブリノゲン血症を有する患者からの全血によって示される。

【0096】

曲線の接線の変曲点において定められるフィブリン形成時間 (FFT) と、フィブリンプラトーの開始に達する時間 (TA) とは、光学濃度測定を用いる方法に対する凝固亢進性血漿、またはトロンボエラストグラフィ、レオメトリ、もしくは画像分析によって物理的特性が測定される方法に対する高フィブリノゲンレベルを有する全血のいずれによっても、凝固亢進に対して比例的に短くなる。

30

【0097】

プラトーに達する時間における $DO D_{(TA)}$ 、またはプラトーに達する時間における振幅 ($A_{(TA)}$) のいずれかによって表されるフィブリン重合プラトーのレベルは炎症によって増加し、これは図 5 のフィブリノゲンのレベルによって表されるか、または 2 つのタンパク質 (CRP およびフィブリノゲン) のアッセイが行われた患者からのサンプルにおける図 6 (A) の C 反応性タンパク質 (CRP: C-reactive protein) のレベルおよび図 6 (B) のフィブリノゲンのレベルによって表される。

【0098】

プラトーに達する時間における OD の値は、正常な患者からの血漿 (3.5 g/l) よりも凝固亢進を有する患者からの血漿の方が低く、これは含有されるフィブリノゲンが少ないためである (3.0 g/l)。

40

【0099】

プラトーに達する時間における振幅 A は、正常レベルのフィブリノゲン (2.5 g/l) を有する正常な血液よりも、高レベルのフィブリノゲン (5 g/l) を有する全血の方が高い。

【0100】

静脈血栓症を有するか否かにかかわらず活動性のがんを有さない患者に対する図 7 (A)、および活動性のがんを有する患者に対する図 7 (B) に示されるとおり、血栓症の疑いのあるすべての患者について、フィブリン重合プラトーに達する時間はフィブリン形成時間に比例する。抗凝固剤処置の不在下では、患者に関係なくこのプラトーに達する時間

50

は 8 分を超えない。

【 0 1 0 1 】

この方法の第 1 のバージョン - ステップ e)、f)、g) および h)

本発明による第 1 の方法は、静脈血栓塞栓症 (V T E) に対して特異的な D ダイマーのレベル、すなわち血管内フィブリン分解に特異的に由来する D ダイマーのレベルを定めることを可能にし、これはサンプルの D ダイマーのレベルを次のものの関数として調整することによるものである。

- トロンビンおよびフィブリン生成の開始後の、凝固亢進によって生成された D ダイマーのレベル、
- 炎症によって生成された D ダイマーのレベル、ならびに
- 線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル。

10

【 0 1 0 2 】

特に実施例 1 に記載されるとおり、こうした方法は、問題となる患者の静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベルを非常に短時間 (すなわち 10 分未満) で定めることを可能にする。具体的には、肺塞栓症を有する患者および有さない患者、深部静脈血栓症を有する患者および有さない患者、ならびに凝固活性化状態を有する患者および有さない患者のさまざまな血漿を、トロンビン生成の開始後のフィブリン血餅形成プロファイルにおいて 10 分未満で識別する。

【 0 1 0 3 】

ステップ e)

20

本発明者らが最初に開発したこの方法の第 1 のバージョンにおいて、ステップ e) は、サンプルの D ダイマーのレベルを凝固亢進によって生成された D ダイマーのレベルの関数として、および炎症によって生成された D ダイマーのレベルの関数として調整することによって、血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベルを算出するステップで構成される。より具体的には、血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベル (R) は、次のステップによって算出される。

e 1) 凝固亢進の関数として調整された D ダイマーのレベルを得るために、d) で定められた F F T を用いて凝固亢進によって生成された D ダイマーのレベルの関数としてサンプルの D ダイマーのレベル (D d i _s) を調整するステップ、および

e 2) R を得るために、d) で定められた V p (T A) を用いて炎症によって生成された D ダイマーのレベルの関数として、e 1) で算出された凝固亢進の関数として調整された D ダイマーのレベルを調整するステップ。

30

【 0 1 0 4 】

具体的には、実施例 1 に示されるとおり、血栓症を有さない患者からのサンプルに比べて、肺塞栓症 (P E) および / または深部静脈血栓症 (D V T) を有する患者からのすべてのサンプルにおいて、フィブリン形成時間 (F F T) の系統的な延長が存在することを本発明者らは観察した。凝固亢進によって生成された D ダイマーの関数として D ダイマーを調整するために、実施例 2 の線形実施例を利用する。

【 0 1 0 5 】

凝固亢進の関数として調整された D ダイマーのレベル (D d i _{s / H C}) は、サンプルの D ダイマーのレベル (D d i _s) から次の式によって定められる。

40

【 0 1 0 6 】

【 数 8 】

$$Ddi_{s/Hc} = Ddi_s \times \frac{FFT}{\text{対照時間}}$$

【 0 1 0 7 】

ここで対照時間とは、本発明による方法のステップ a) ~ d) によって測定された、血栓症の疑いを有さない正常で健康な対象からのサンプルのフィブリン血餅形成の平均時間である。

50

【 0 1 0 8 】

これは特に実施例 3 に示されている。よってステップ e) は、凝固亢進の結果もたらされる D ダイマーを考慮するようにして d) で測定されたフィブリン形成時間 (F F T) から D ダイマーを算出するステップを含む。

【 0 1 0 9 】

血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベル (R) は、凝固亢進の関数として調整された D ダイマーのレベル (D d i _S / _{H C}) を、次の式によって炎症の関数として調整することによって算出される。

【 0 1 1 0 】

【 数 9 】

10

$$R = \frac{Ddi_{S/HC}}{[Fib]_{(Vp(TA))}}$$

【 0 1 1 1 】

ここで [F i b] (_{V p (T A)}) は、次の等式を有する標準曲線における特性の値 (_{V p (T A)}) に対して演繹されるフィブリノゲン濃度であり、

$$y = a \ln (x) - b、$$

ここで

y はフィブリン重合プラトーに達する時間 (T A) に測定された特性の値であり、

x はフィブリノゲン濃度であり、

20

a および b は、フィブリンプラトーのレベル (値または振幅) とフィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式の定数であり、

標準曲線は血液サンプルを用いて確立されたものであり、この血液サンプルのフィブリノゲン濃度が定められており、かつその特性の値 (_{V p (T A)}) が本発明による方法のステップ a) ~ d) によって定められている。

【 0 1 1 2 】

よって、血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベル (R) は、初期フィブリノゲン換算量 (F E U) で表される。

【 0 1 1 3 】

上記に示されたとおり、光学濃度の測定に基づく方法の場合、たとえば血漿サンプルの場合などには _{V p (T A)} は D O D (_{T A}) 、すなわちフィブリン重合プラトーに達する時間 (T A) に測定された光学濃度であり、トロンボエラストグラフィ、レオメトリ、または画像分析によって物理的特性が測定されることに基づく方法の場合、たとえば全血サンプルの場合などには _{V p (T A)} は A (_{T A}) 、すなわちフィブリン重合プラトーに達する時間 (T A) に測定された振幅である。

30

【 0 1 1 4 】

炎症のレベル (すなわちフィブリノゲン濃度) の判定を可能にする標準曲線の例は、それぞれ D O D の測定に基づく方法の場合が図 9 (A) ~ (B) および実施例 4 に提供され、トロンボエラストグラフィによる物理的特性の測定に基づく方法の場合が図 9 (C) および実施例 4 に提供されている。

40

【 0 1 1 5 】

よって、得られた D ダイマーのレベルは、初期フィブリノゲン換算量 (F E U) で表される。

【 0 1 1 6 】

ステップ f)

本発明による方法の第 1 のバージョンのステップ f) は、患者からのサンプルにおける静脈血栓症、特に肺塞栓症 (P E) または深部静脈血栓症 (D V T) の確率を定めるために、e) で得られたフィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベルを閾値と比較するステップで構成される。好ましくは、閾値は 0 . 5 0 μ g / m l である。具体的には、好ましくは、プラスミンによって生成される D ダイマーの量は使用される 8 D 2 および

50

2.1.16 抗体によるFEU（フィブリノゲン換算量）の約50%であるため、測定の陽性閾値は $0.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。好ましくは、この閾値はDダイマーの通常のアッセイの閾値と同じである。

【0117】

e)で得られたフィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベルRが閾値（好ましくは $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の閾値）未満であることは、その患者における血栓症を除外することを可能にする。e)で得られたフィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベルRが閾値（好ましくは $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の閾値）より高いことは、その患者における血栓症の可能性を示す。

【0118】

特に、表4に示されるとおり、比率Rによって定められてFEU（フィブリノゲン換算量）で表されるe)で得られたDダイマーのレベルを有する患者のうち、血栓症を有さない患者の90%より多くが陰性レベル（すなわち $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の閾値未満）を有し、かつ血栓症を有さない患者すべてが $0.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $10.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の陽性レベル（すなわち $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の閾値より高い）を有する。血栓症を有さない患者であって、 $0.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $2.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ のレベルを有する偽陽性であることが見出された患者（ $<10\%$ ）のうち、3分の1はレベル $<0.60 \mu\text{g}/\text{ml}$ を有し、3分の1はがんを有し、3分の1は凝固活性化状態（骨折、血栓性微小血管症、妊娠、または術後）を有する。つまり、偽陽性レベルのDダイマーを有する患者の80%は、凝固亢進および炎症によって生成されたDダイマーの関数としてDダイマーを調整することによって陰性にされる。

【0119】

一般的に、ステップf)で行われる比較によってその患者における血栓症を除外することが可能になるとき、この方法はステップf)で止められ得る。もし反対が当てはまれば、この方法は続けられる。

【0120】

ステップg)

本発明による方法の第1のバージョンは次いで、凝固活性化状態において存在する線溶亢進によって生成されたフィブリノゲン分解産物（FgDP）のレベルを定めるステップg)を含む。よってステップg)は、次のステップで構成される。

g1) サンプル中のDダイマーのレベル（ D_{dis} ）からFgDPのレベルを定めるステップ、

g2) ステップe)で得られた調整されたDダイマーのレベル（R）からFgDPのレベルを定めるステップ、および

g3) g1)で得られたFgDPのレベルからg2)で得られたFgDPのレベルを引くことによって、線溶亢進によって生成されたFgDPのレベル（ $FgDP_{HF}$ ）を算出するステップ。

【0121】

具体的には、がんの場合および顕著な凝固活性化状態においては高レベルのDダイマーが生成され、大量に存在するプラスミンの作用下で形成される高レベルのフィブリノゲン分解産物（FgDP）と組み合わせられる。

【0122】

特に、図10に示されるとおり、通常のアッセイによって定められたサンプルのDダイマーのレベルと、血漿サンプルに対して行われた本発明の方法に従って凝固亢進および炎症によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマーのレベル（上記ステップe)）とは、これらのサンプルにおいてラテックス法によって測定された、線溶亢進の結果もたらされるFgDPのレベルと完璧に相関する。図11に示されるとおり、これはどのDダイマー試薬を用いてもそうである。全血サンプルに対して行われた本発明の方法に従って凝固亢進および炎症によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマーのレベルについても、同じことが当てはまる。よってFgDPのレベルは、得ら

10

20

30

40

50

れたDダイマーのレベルから線形回帰によって算出できる。

【0123】

顕著な凝固活性化状態において、本発明者らは以下のことを観察した。

- かなりの線溶亢進があり、大量のFgDPが生じる。
- フィブリノゲンから生成されたFgDPは、血栓症を有さない患者に由来するサンプルよりも、肺塞栓症(PE)および/または深部静脈血栓症(DVT)を有する患者に由来するサンプルの方が系統的に低い。よって、通常のDダイマーの関数として生成されたFgDPと、e)で得られた調整Dダイマーの関数として生成されたFgDPとの陽性の差によって、実施例6においては $1\mu\text{g}/\text{ml}$ である閾値において、血栓症を有する患者と血栓症を有さない患者とを区別することが可能になる。図11に示されるとおり、これはどのDダイマー試薬を用いてもそうである。

- 実施例1に記載されるとおり、対照時間-1標準偏差の閾値において、凝固活性化状態においてはフィブリン形成時間(FFT)が短くなる。実施例6に記載されるとおり、このことを利用して、顕著な線溶亢進の存在下での血栓症を除外し、急性凝固活性化状態に注意を向ける。

【0124】

実施例5、6、および7に示されるとおり、このことによって、患者からの前記サンプルにおける肺塞栓症または深部静脈血栓症の確率を直接的かつ迅速に定め、かつ/または凝固活性化に注意を向けることが可能になる。より優先的には、実施例8に示されるとおり、このことによって、高レベルのDダイマーの存在下でPEおよびDVTの確率を増すか、または肺塞栓症もしくは静脈血栓症の程度に注意を向けることが可能になる。

【0125】

よって、サンプルのDダイマーのレベル(D_{dis})の関数として生成されたFgDPと、e)で得られた調整Dダイマーのレベル(R)の関数として生成されたFgDPとの陽性の差によって、予め定められた閾値において、血栓症の可能性を有する患者と血栓症を有さない患者とを区別することが可能になる。以下に提供される実施例の場合、本発明者らは $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の閾値を予め定めている。

【0126】

より具体的には、ステップg)は次のステップで構成される。

g1) 既知のレベルのFgDPおよび既知のレベルのDダイマーを有する血液サンプルを用いて確立された標準曲線において、サンプル中のDダイマーのレベル(D_{dis})に対応するFgDPのレベルを定めるステップ、

g2) この同じ標準曲線において、ステップe)で得られた調整されたDダイマーのレベル(R)に対応するFgDPのレベルを定めるステップ、および

g3) g1)で得られたFgDPのレベルからg2)で得られたFgDPのレベルを引くことによって、線溶亢進によって生成されたFgDPのレベル($FgDP_{(HF)}$)を算出するステップ。

【0127】

ステップh)

最後に、本発明による方法の第1のバージョンのステップh)は、g)で得られた線溶亢進によって生成されたFgDPのレベル($FgDP_{(HF)}$)を閾値に対して比較するステップと、d)で得られたフィブリン形成時間(FFT)を閾値に対して比較するステップとを含む。

【0128】

より具体的には、ステップh)は次のステップで構成される第1のステップを含む。

h1) $FgDP_{(HF)}$ と閾値(たとえば $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の閾値など)とを比較するステップであって、 $FgDP_{(HF)}$ が閾値未満または陰性であることは、その患者における血栓症を除外することを可能にし、 $FgDP_{(HF)}$ が閾値よりも高いことは、その患者における血栓症の可能性を示す。

【0129】

10

20

30

40

50

閾値とは、多数のサンプルを用いて確立された予め定められた閾値であることを当業者は認識するだろう。調査したサンプルに基づいて、本発明者らは予め定められた閾値 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ を用いた。

【0130】

次いでステップ h) は、次のステップで構成される第 2 のステップを含む。

h 2) F F T と閾値、特に [対照時間 - 1 標準偏差] に等しい閾値、たとえば 1 3 5 秒の対照時間に対する 1 2 0 秒の閾値とを比較するステップであって、F F T が閾値未満であることは、患者が血栓症を有さないが急性凝固活性化状態を有することを示し、F F T が閾値よりも高いことは、その患者における血栓症を示し、対照時間はステップ e 1) で定められる。

10

【0131】

ここでも、閾値とは多数のサンプルを用いて確立された予め定められた閾値であることを当業者は認識するだろう。調査したサンプルに基づいて、本発明者らは 1 3 5 秒の対照時間に対する 1 2 0 秒の予め定められた閾値を用いた。

【0132】

よって、特に図 1 2 に示されるとおり、偽陽性レベルの D ダイマーを有する患者の 9 2 %、すなわち血栓症を有さない患者の 9 7 % は、ステップ h) に従う D ダイマーの調整によって陰性にされ、図 1 3 に示されるとおり、これは D ダイマーをアッセイするためのどの試薬でもそうである。

20

【0133】

好ましくは、この方法の最後に得られる静脈血栓症に対して特異的な D ダイマーのレベルが高いことは、肺塞栓症 (P E) または深部静脈血栓症 (D V T) の程度を表す。よって、本発明による方法によって患者における血栓症が診断される場合に、ステップ e) で得られる D ダイマーのレベル R を臨床的に用いられる尺度、すなわち $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の閾値に関連付けたものは、肺塞栓症または静脈血栓症の程度、したがって疾患の重篤度に比例する。実際に、重篤度の診断は通常はイメージングにおいて、発症した肺動脈の数およびタイプによって定められる。

【0134】

より具体的には、本発明による方法のステップ h 2) において患者における血栓症が診断される場合、静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル ($D d i_{VTE}$) は、ステップ e) で得られる D ダイマーのレベル R である。

30

【0135】

本発明による方法のステップ h 1) および h 2) において患者における血栓症が除外されるが、ステップ e) で得られたレベル R は閾値より高く、好ましくは $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の閾値よりも高い場合、静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベル ($D d i_{VTE}$) は次の式によって算出され、

【0136】

【数 1 0】

$$D d i_{VTE} = 0.5 \times \frac{R}{D d i_s}$$

40

【0137】

ここで R はステップ e) で得られた D ダイマーのレベルであり、 $D d i_s$ はサンプルの D ダイマーのレベルである。この算出は、静脈血栓塞栓症に対して特異的な D ダイマーのレベルを、臨床的に用いられる閾値より下のレベルに関連付けることを可能にする。

【0138】

こうしてこの方法の最後に提供される静脈血栓症に対して特異的な D ダイマーのレベルは、次いで肺塞栓症または深部静脈血栓症の程度を表す。

【0139】

「 P E の程度または D V T の場所を表すレベル」という表現は、静脈血栓症に対して特

50

異的なDダイマーのレベルが、PEの程度(すなわちその重篤度)またはDVTの場所と直接相関することを意味することが意図される。表7に示されるとおり、「高レベル」という用語は、約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ から $4\mu\text{g}/\text{ml}$ またはそれ以上のレベルを意味することが意図される。

【0140】

この方法の第2のバージョン - ステップe')、f')、g')およびh')

静脈血栓塞栓症(VTE)に対して特異的なDダイマーのレベルを定めることを可能にする本発明による方法の第2のバージョンは、第1の方法のステップと同一のステップa)、b)、c)およびd)と、第1のバージョンのステップとは異なるステップe')、f')、g')およびh')とを含む。

10

【0141】

ステップe')

ステップe)の第2の変形は、静脈血栓塞栓症(VTE)の症例の大部分(75%)におけるDダイマーのレベルが $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満であることに注目した本発明者らによって開発された。凝固活性化状態とは反対に、血栓症においては凝固亢進および線溶亢進が存在しないか、または低減している。他方で、主に重要なのは炎症性状態である。具体的には、VTEの80%に対して、半分は炎症を有さない患者の第1のグループであり(フィブリノゲン濃度: $3.0\sim 4.5\text{g}/\text{l}$)、半分は亜正常炎症を有する患者の第2のグループである(フィブリノゲン濃度: $4.5\sim 6.0\text{g}/\text{l}$)。さらに、フィブリン血餅重合プラトーに達する時間(TA)は血栓症の方が早く、VTEを凝固活性化状態または血栓形成傾向と区別することを可能にする。

20

【0142】

結果として、本発明による方法の第2のバージョンのステップe')は、次のステップで構成される。

- 血管内フィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベルを算出するステップであって、

e'1) 炎症によって生成されたDダイマーのレベルの関数としてサンプルのDダイマーのレベルを調整するステップ、および

e'2) この調整レベルを低Ddiレベル($< 4\mu\text{g}/\text{ml}$)に対して補正するステップによって算出するステップ、ならびに

30

- 炎症の関数として患者からの血液サンプルを分類するステップ。

【0143】

よってステップe)と比べると、ステップe')においては、フィブリン形成時間(FFT)を用いて凝固亢進によって生成されたDダイマーのレベルの関数としてサンプルのDダイマーのレベルを調整することが削除されている。このことは、FFTが短く(FFT<[平均対照時間-1標準偏差]、たとえば135秒の対照に対してFFT=120秒など)罹患率が1000当り2.5である血栓形成傾向が根底にある場合の血栓症を検出することを可能にする。

【0144】

低Ddiレベルに対する調整レベルの補正によって、以下の事象における血栓症を検出することが可能になる。

40

(i) Dダイマーが一般的に低く($1.5\mu\text{g}/\text{ml}$)、かつ罹患率がPEの20%の領域にある、亜区域性または重篤でない肺塞栓症の事象、および

(ii) 炎症が顕著であり($5\text{g}/\text{l}$)、かつ罹患率がPEの15%の領域にある、肺梗塞(肺塞栓症合併症)の事象。

【0145】

最後に、炎症の関数として患者からのサンプルを分類することによって、がん(患者の20%)、感染症(患者の10%)、および根底に炎症の感受性を有する高齢の個体の場合の血栓症を定めることが可能になる。

【0146】

50

より具体的には、ステップ e') において、血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベル R は、次のステップによって定められる。

e' 1) ステップ d) で定められた重合プラトーに達する時間に測定された特性の値 $V_{p(TA)}$ を用いて、サンプルの D ダイマーのレベル (D_{dis}) から炎症の関数として調整された D ダイマーのレベルである $D_{dis/I}$ を算出するステップ、および

e' 2) 血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル (R) を定めるために、D ダイマーのレベル $< 4 \mu g / ml$ に対して e' 1) で得られたレベル $D_{dis/I}$ を補正するステップ。

【 0 1 4 7 】

ステップ e' 1) 。よってステップ e' 1) は、次の等式によって、ステップ d) で定められた重合プラトーに達する時間に測定された特性の値 $V_{p(TA)}$ を用いて、サンプルの D ダイマーのレベル (D_{dis}) から炎症の関数として調整された D ダイマーのレベル $D_{dis/I}$ を算出するステップで構成される。

【 0 1 4 8 】

【 数 1 1 】

$$D_{dis/I} = \frac{D_{dis}}{[Fib]_{(Vp(TA))}}$$

【 0 1 4 9 】

ここで $[Fib]_{(Vp(TA))}$ は、等式 $y = a \ln(x) - b$ を有する標準曲線における特性の値 ($V_{p(TA)}$) に対して演繹されるフィブリノゲン濃度であり、ここで y はフィブリン重合プラトーに達する時間 (TA) に測定された特性の値であり、

x はフィブリノゲン濃度であり、

a および b は、フィブリンプラトーのレベル (値または振幅) とフィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式に対する定数であり、

標準曲線は血液サンプルを用いて確立されたものであり、この血液サンプルのフィブリノゲン濃度が定められており、かつその特性の値 ($V_{p(TA)}$) が本発明による方法のステップ a) ~ d) によって定められている。

【 0 1 5 0 】

よって、炎症の関数として調整された D ダイマーのレベル $D_{dis/I}$ は、初期フィブリノゲン換算量 (FEU) で表される。

【 0 1 5 1 】

ステップ e' 2) 。ステップ e' 2) は、低い D ダイマーのレベル ($< 4 \mu g / ml$) に対して e' 1) で得られたレベル $D_{dis/I}$ を補正することによって、血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル (R) を算出するステップで構成される。この低い D ダイマーのレベルをフィブリノゲンの関数として補正することは、比率 $D_{dis/I}$ を $0.5 \mu g / ml$ FEU (フィブリノゲン換算量) の閾値に近付けるという目的を有する。

【 0 1 5 2 】

レベル R は、次の等式を用いて算出される。

$$R = D_{dis/I} + [0.5 - F_{D_{dis}}]$$

ここで $F_{D_{dis}}$ は低い D ダイマーのレベル ($< 4 \mu g / ml$) に対する補正因子であり、この値は次の等式を有する標準曲線におけるサンプルの D ダイマーのレベル (D_{dis}) に対する補正因子の値 F に対応し、

$$y = ax^2 + bx + c$$

ここで y は補正因子 F であり、

x は D ダイマーのレベルであり、

a、b および c は、補正因子と D ダイマーのレベルとを結び付ける多項式に対する定数であり、

10

20

30

40

50

標準曲線は血液サンプルに対して確立されたものであり、この血液サンプルのDダイマーのレベルが定められており、かつそれに対する補正因子が経験的に定められているため、比率 $D d i s / I$ が $0.5 \mu g / m l$ FEU (フィブリノゲン換算量) の閾値に関連付けられる。

【0153】

本発明者らによって確立された標準曲線は、図14(B)に提供されている。

【0154】

サンプルの分類。ステップe')は、炎症の関数としてサンプルを分類するステップで構成されるステップも含む。より具体的には、このステップは、比率 $1 / [F i b]_{(v p (T A))}$ を算出するステップであって、ここで $[F i b]_{(v p (T A))}$ はe'1)で演繹されたフィブリノゲン濃度である、ステップと、患者からのサンプルを以下のとおりに分類するステップとで構成される。

- もし比率 $1 / [F i b]_{(v p (T A))} > 0.20$ (すなわち $[F i b]_{(v p (T A))} < 5 g / l$) であれば、グループI (炎症を有さない患者)、または
- もし比率 $1 / [F i b]_{(v p (T A))} \leq 0.20$ (すなわち $[F i b]_{(v p (T A))} \geq 5 g / l$) であれば、グループII (炎症を有する患者)。

【0155】

ステップf')

本発明による方法の第2のバージョンのステップf')は、e')で得られたフィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベルRを閾値に対して比較するステップで構成される。

【0156】

e')で得られたフィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベルRが閾値未満 (好ましくは $0.5 \mu g / m l$ の閾値未満) であることは、その患者における血栓症を除外することを可能にする。e')で得られたフィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベルRが閾値より高い (好ましくは $0.5 \mu g / m l$ の閾値より高い) ことは、その患者における血栓症の可能性を示す。

【0157】

ステップg')

ステップg')は、線溶亢進において、大過剰に生成されたプラスミンによってフィブリノゲンが分解されるという事実に基づいている。図2に示されるとおり、Dダイマーを含むフィブリン分解産物(FDP)と、フィブリノゲン分解産物(FgDP)とが循環に現れる。よって、がんおよび顕著な凝固活性化状態においては、高いDダイマーのレベルと高いFgDPのレベルとの組み合わせが生じる。よって、線溶亢進によって生成されたFgDPのレベル、または線溶亢進によって生成されたDダイマーのレベルを意味する区別なしに測定することが可能である。

【0158】

したがって本発明による方法は、サンプル中のDダイマーのレベル($D d i s$)と、e')で得られたフィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベル(R)とを用いるか、またはe'1)で得られた炎症の関数として調整されたDダイマーのレベル $D d i s / I$ と、e')で得られたレベルRとを用いて、凝固活性化状態において存在する線溶亢進によって生成されたDダイマーのレベルを算出するステップg')を含む。

【0159】

より具体的には、ステップg')は次のステップで構成される。

g'1) 線溶亢進によって生成されたDダイマーのレベル $D d i_{H F}$ または $(R / D d i s)_{p a t i e n t}$ を、ステップe')で定められた調整および補正されたDダイマーのレベル(R)と、サンプル中のDダイマーのレベル($D d i s$)との比率として、次の等式を用いて算出するステップ、

【0160】

【数 1 2】

$$Ddi_{HF} = (R/Ddi_S)_{patient} = \frac{R}{Ddi_S}$$

【0 1 6 1】

g' 2) 線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル Ddi_{HF} または $(R/Ddi_S)_{patient}$ を、ステップ e') で定められた調整および補正された D ダイマーのレベル (R) と、e' 1) で得られた炎症の関数として調整された D ダイマーのレベル $Ddi_{S/I}$ との比率として、次の等式を用いて算出するステップ。

【0 1 6 2】

10

【数 1 3】

$$Ddi_{HF} = (R/Ddi_{S/I})_{patient} = \frac{R}{Ddi_{S/I}}$$

【0 1 6 3】

ステップ h')

最後に、本発明による方法の第 2 のバージョンのステップ h') は、g') で得られた線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル (Ddi_{HF}) を閾値に対して比較するステップと、比率 TA/FFT を閾値に対して比較するステップとを含む。ステップ h) で用いられる FFT をステップ h') で用いられる比率 TA/FFT に置き換えることによって、凝固活性化状態および血栓形成傾向と、フィブリン血餅重合プラトーに達する時間がより急速である血栓症とを区別することが可能になる。

20

【0 1 6 4】

より具体的には、ステップ h') は最初に次のステップで構成されるステップを含む。

h' 1) サンプルのレベル Ddi_S に対して、次の等式を有する標準曲線において比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ の値を定めるステップであって、

$$y = ax^{-b}$$

ここで x は D ダイマーのレベルであり、

y は血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベルと、D ダイマーのレベルとの比率 (R/Ddi_S) であり、

30

a および b は、比率 R/Ddi_S と D ダイマーのレベルとを結び付ける等式に対する定数であり、

標準曲線は、次のとおりに確立されたものであり、

- 患者からのサンプルがグループ I に分類されたとき：本発明の方法のステップ e') によってグループ I に分類された血液サンプル、既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、および本発明による方法のステップ a) ~ e' 2) によって定められたそのレベル R を用い、

- 患者からのサンプルがグループ II に分類されたとき：本発明の方法のステップ e') によってグループ II に分類された血液サンプル、既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、および本発明による方法のステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用いる、ステップ、

40

h' ' 1) g' 1) で得られる線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル $(R/Ddi_S)_{patient}$ の値と、h' 1) で得られる比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ の値とを比較するステップであって、ここで $(R/Ddi_S)_{patient}$ が比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ よりも低いことは、その患者における血栓症を除外することを可能にし、 $(R/Ddi_S)_{patient}$ が比率 $(R/Ddi_S)_{standard}$ 以上であることは、その患者における血栓症の可能性を示す、ステップ、

【0 1 6 5】

h' 2) サンプルのレベル Ddi_S に対して、次の等式を有する標準曲線において比率 $(R/Ddi_{S/I})_{standard}$ の値を定めるステップであって、

50

$$y = a x^{-b}$$

ここで x は D ダイマーのレベルであり、

y は血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベルと、炎症の関数として調整された D ダイマーのレベルとの比率 ($R / D d i s / I$) であり、

a および b は、比率 $R / D d i s / I$ と D ダイマーのレベルとを結び付ける等式に対する定数であり、

標準曲線は、次のとおりに確立されたものであり、

- 患者からのサンプルがグループ I に分類されたとき：本発明の方法のステップ e') によってグループ I に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、本発明による方法のステップ a) ~ e' 1) によって得られたそのレベル $D d i s / I$ 、および本発明による方法のステップ a) ~ e' 2) によって得られたレベル R を用い、

- 患者からのサンプルがグループ I I に分類されたとき：本発明の方法のステップ e') によってグループ I I に分類された血液サンプル、および既知であるか、または定められたその D ダイマーのレベル、本発明による方法のステップ a) ~ e' 1) によって得られたそのレベル $D d i s / I$ 、および本発明による方法のステップ a) ~ e' 2) によって得られたそのレベル R を用いる、ステップ、

$h' 2) g' 2)$ で得られる線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベル ($R / D d i s / I$) $p a t i e n t$ の値と、 $h' 2)$ で得られる比率 ($R / D d i s / I$) $s t a n d a r d$ の値とを比較するステップであって、ここで ($R / D d i s / I$) $p a t i e n t$ が比率 ($R / D d i s / I$) $s t a n d a r d$ よりも低いことは、その患者における血栓症を除外することを可能にし、($R / D d i s / I$) $p a t i e n t$ が比率 ($R / D d i s / I$) $s t a n d a r d$ 以上であることは、その患者における血栓症の可能性を示す、ステップ。

【0166】

ステップ h') はさらに、次のステップで構成されるステップを含む。

$h' 3)$ 比率 $T A / F F T$ を算出するステップであって、ここで $T A$ はステップ d) で定められたフィブリン重合プラトーに達する時間であり、 $F F T$ はステップ d) で定められたフィブリン血餅形成時間である、ステップと、

$h' 3)$ 患者からのサンプルがグループ I に分類されたとき：比率 $T A / F F T$ を第 1 の閾値、特に 135 秒の対照時間に対する第 1 の閾値 1.75 に対して比較するステップであって、ここで

比率 $T A / F F T$ が第 1 の閾値より高いことは、グループ I に分類された患者における血栓症を除外し、かつ血栓形成傾向または凝固活性化状態を診断することを可能にし、

比率 $T A / F F T$ が第 1 の閾値以下であることは、グループ I に分類された患者における血栓症を示す、ステップ、

患者からのサンプルがグループ I I に分類されたとき：比率 $T A / F F T$ を第 2 の閾値、特に 135 秒の対照時間に対する第 2 の閾値 1.65 に対して比較するステップであって、ここで

比率 $T A / F F T$ が第 2 の閾値より高いことは、グループ I I に分類された患者における血栓症を除外し、かつ血栓形成傾向または凝固活性化状態を診断することを可能にし、

比率 $T A / F F T$ が第 2 の閾値以下であることは、グループ I I に分類された患者における血栓症を示す、ステップであり、

ここで対照時間とは、ステップ a) ~ d) に従って測定された、血栓症の疑いのない健康な対象からのサンプルの平均フィブリン血餅形成時間である。

【0167】

テストされたサンプルに基づいて、本発明者らは、ステップ e') でグループ I に分類されたサンプルに対する第 1 の閾値 1.75 と、ステップ e') でグループ I I に分類されたサンプルに対する第 2 の閾値 1.55 とを定めた。これらの閾値は予め定められたも

のであり、テストされるサンプルの総数または使用される試薬のバッチの関数として変動し得ることを当業者は理解するだろう。

【0168】

フィブリン血餅形成時間（FFT）を考慮することによって、血栓症（それに対するTA/FFTは閾値以下である）と、凝固活性化状態および血栓形成傾向を有する血栓症（それに対するTA/FFTは閾値より高い）とを区別することが可能である。実際に、血栓形成傾向におけるFFTは常に短い（[対照時間 - 1標準偏差]、たとえば135秒の対照時間に対して<120秒）のに対し、凝固活性化状態におけるFFTは対照時間に等しい。

【0169】

好ましくは、この方法の最後に得られる静脈血栓症に対して特異的なDダイマーのレベルが高いことは、肺塞栓症（PE）または深部静脈血栓症（DVT）の程度を表す。よって、本発明による方法によって患者における血栓症が診断される場合に、ステップe'）で得られるDダイマーのレベルRを臨床的に用いられる尺度、すなわち0.5 μg/mlの閾値に対して関連付けたものは、PEまたはDVTの程度、したがって疾患の重篤度に比例する。実際に、重篤度の診断は通常はイメージングにおいて、発症した肺動脈の数およびタイプによって定められる。

【0170】

より具体的には、本発明による方法のステップh'、'3）において患者における血栓症が診断される場合、静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーのレベル（Ddi_{VTE}）は、ステップe'）で得られるDダイマーのレベルRである。

【0171】

ステップh'、'1）、h'、'2）およびh'、'3）において血栓症が除外されるが、ステップe'）で得られたレベルRは閾値より高く、好ましくは0.5 μg/mlの閾値よりも高い場合、この方法は、次の等式を用いて静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーのレベル（Ddi_{VTE}）を算出するステップで構成されるステップも含み、

【0172】

【数14】

$$Ddi_{VTE} = 0.5 \times \frac{R}{Ddi_S}$$

【0173】

ここでDdi_Sは、サンプル中のDダイマーのレベルである。この算出は、静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーのレベルを、閾値より下のレベルに関連付けることを可能にする。

【0174】

こうしてこの方法の最後に提供される静脈血栓症に対して特異的なDダイマーのレベルは、次いで肺塞栓症または深部静脈血栓症の程度を表す。

【0175】

C. 自動化

ステップc)の光学濃度の測定は、当該技術分野において公知の任意の好適な方法によって行われ得る。たとえば、ステップc)のOD測定は任意の好適な既存の機器、特に濁度計または分光光度計を用いて行われ得る。特にいくつかの実施形態においては、本発明による方法の少なくともステップc)およびd)が、ルーチン自動診断デバイス、好ましくは凝固アナライザにおいて行われる。優先的には、本発明による方法のすべてのステップが、こうした自動デバイスにおいて行われる。より優先的には、この測定はルーチン自動デバイスにおいてDダイマーの通常のアッセイと同時に行われる。たとえば、実施例9および10に記載されるとおり、本発明による方法はスターゴ（Stago）グループのSTA-R（登録商標）MaxまたはSTA-R（登録商標）Evolution Expert Series自動デバイスにおいて行われる。

10

20

30

40

50

【0176】

こうした自動デバイスは、同時にサンプルをロードし、混合動作およびインキュベーションを行い、ある波長における光学濃度を測定して、緊急の状況における単一のサンプル、または同時に複数のサンプルによって得られる血餅形成プロファイルを定めることを可能にする。全体のプロセスが10分未満で行われる。このことは、このプロセスを高速で信頼性が高く、かつ患者において再現性のある方法にする。

【0177】

本発明による方法は、遠隔生物学デバイスまたは患者のベッドサイドのポータブルデバイスにおいても使用され得る。いくつかの好ましい実施形態において、使用される遠隔生物学デバイスまたはポータブルデバイスは、物理的方法、好ましくは光学的方法、たとえばトロンボエラストグラフィもしくはレオメトリ法、または画像分析法などに基づくものである。優先的には、緊急の状況において単一のサンプルによって得られるフィブリン血餅形成プロファイルを定めるために、本発明による方法のこの変形のすべてのステップが、こうしたデバイスにおいて行われる。Dダイマーの通常のアッセイに対するものと同じ血液のチューブを用いて、全体のプロセスが5分未満で行われる。

【0178】

II - インビトロの診断の方法

本発明に従う静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法は、患者からの（たとえば血漿または全血などの）血液サンプルを用いて、これらの患者の年齢にかかわらず、かつこれらの患者の根底にある病理学的または生理的条件にかかわらず、これらの患者における静脈血栓塞栓症を診断することを可能にする。本発明者らによって得られた結果に示されるとおり、本発明による方法は、血栓塞栓症である患者の100%を偽陰性なしに診断することを可能にし、かつDダイマーをアッセイするための通常の方法よりも多くの患者を除外することを可能にする。

【0179】

よって本発明は、患者における静脈血栓塞栓症（VTE）のインビトロ診断のための方法に関し、この方法は次のステップで構成されるステップを含む。

- サンプル中のVTEに対して特異的なDダイマーのレベルを得るために、本明細書に記載される方法の第1または第2のバージョンに従って、患者からの血液サンプル中のVTEに対して特異的なDダイマーの定量的アッセイを行うステップと、
- その患者に関する診断を提供するステップとである。

【0180】

一般的に、テストされる患者が高齢の個体であるか、がんである患者であるか、感染症である患者であるか、または血栓形成傾向である患者である場合に、好ましくは本発明に従うVTEに対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法の第2のバージョンが選択されることになる。それ以外の場合には、本発明による方法の第1のバージョンが用いられてもよい。

【0181】

この方法の第1のバージョンが用いられるとき、その患者に関する診断とは（i）血栓症の除外、（ii）急性凝固活性化状態、または（iii）血栓症であってもよい。この方法の第2のバージョンが用いられるとき、その患者に関する診断とは（i）血栓症の除外、（ii）急性凝固活性化状態、（iii）血栓形成傾向を有する患者における血栓症、または（iv）低レベルの重篤度を有する血栓症もしくは肺梗塞の事象における血栓症を含む血栓症であってもよい。

【0182】

別様に定義されない限り、記載において用いられるすべての技術用語および科学用語は、この発明が属する技術分野の通常の特許出願によって一般的に理解される用語と同じ意味を有する。同様に、本明細書において言及されるすべての出版物、特許出願、すべての特許および他のすべての参考文献は、引用によって援用される。

【実施例】

【0183】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を説明するものである。しかし、これらの実施例は単なる例示のみのために提供されるものであって、いかなるやり方でも本発明の範囲を限定しないことが理解される。

【0184】

実験プロトコル

実施例において用いたプロトコルは、以下のとおりである。

プロトコル A

プロトコル A は、STAR（登録商標）Evolution Expert Series 自動凝固アナライザ（スターゴ）において行う方法である。

10

【0185】

STAR（登録商標）Evolution 自動デバイスの 8 つのキュベットに、機器によって以下を同時に加える（ステップ a）。

- D ダイマーの通常のアッセイに対して意図されたクエン酸チューブを 2500 g の速度にて 15 分間遠心分離した後に得た、200 μ l の純粋な血漿サンプル、

- 50 μ l の組織因子およびリン脂質の混合物 [TF + PL]、凍結乾燥して水で戻したもの；最終濃度 2 ~ 5 pM の組織因子（TF）および 4 μ M のリン脂質（PL）。

【0186】

自動デバイスはアームによって攪拌し、37 にて 300 秒間のインキュベーションを行う。自動デバイスは次いで、50 μ l の CaCl_2 を加えて最終濃度 16.7 mM にし、このトリガ試薬をニードルによって攪拌する（ステップ b）。自動デバイスは次いで、540 nm における光学濃度（OD）を時間の関数として 10 分間測定し（ステップ c）、フィブリン形成曲線をプロットする。

20

【0187】

図 5 a（ステップ d）に記載したとおり、測定の「後処理」に対するアルゴリズムは、曲線の接線からフィブリン形成時間（FFT）を算出し、かつプラトーの時間 TA における OD および時間 T0 ~ 10 秒における OD から、プラトーに達する時間（TA）における OD の変動（DOD）を算出することを可能にする。図 8 および実施例 3 に示すとおり、凝固亢進によって生成された D ダイマーの関数として調整された D ダイマーのレベルを、式 $[(X) \times (\text{FFT} / \text{対照時間})]$ によって算出し、ここで X は測定した D ダイマーのレベルである。

30

【0188】

炎症によって生成された D ダイマーの関数として調整された D ダイマーのレベルを、比率 [調整 D ダイマー / 炎症] によって算出する。図 9 および実施例 4 に示すとおり、炎症のレベルを等式 $y = a \ln(x) - b$ から定め、ここで y は DOD であり、x はフィブリノゲン濃度であり、a および b はフィブリンプラトーのレベルとフィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式に対する定数である。よって、D ダイマーをフィブリノゲン換算量（FEU）で表す（ステップ e）。

【0189】

血餅重合に達する時間を比率 TA / FFT によって算出し、ここで TA はステップ d) で定めたフィブリン重合プラトーに達する時間であり、FFT はステップ d) で定めたフィブリン血餅形成時間である。

40

【0190】

プロトコル B

プロトコル B は、Rotem（登録商標）デルタ自動凝固アナライザにおいて行う方法である。

【0191】

37 に予熱した、D ダイマーの通常のアッセイに対して意図されたクエン酸チューブから取った、300 μ l の無希釈全血（本発明による方法の変形のステップ a）および b）を、40 μ l の組織因子およびリン脂質の混合物 [TF + PL] を含有する前もって

50

予熱した機器のキュベットに加え、この混合物は凍結乾燥して水で戻したものであり；2～5 pMの組織因子（TF）および4 μMのリン脂質（PL）の最終濃度にし、かつ16.7 mMのCaCl₂の最終濃度にする。トロンボエラストマー測定を開始し（本発明による方法の変形のステップc）、次いで血液と試薬との混合物300 μlを機器によって分析し、この機器はフィブリン血餅の凝固活性化、形成、重合、および安定性を30分間継続的に記録して、通常のパラメータ（CT、CFT、角度α、A5、A10、MCF、MCF-t）を提供する。

【0192】

図5（B）に記載したとおり、接線からのフィブリン形成時間（FFT）およびフィブリン形成曲線のプラトーに達する時間（TA）における振幅を、時間の関数としての振幅の時間変化から算出する（本発明による方法の変形のステップd）。実施例3に示すとおり、凝固亢進によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマーのレベルを、式 $[(X) \times (FFT / \text{対照時間})]$ によって算出し、ここでXは測定したDダイマーのレベルである。

10

【0193】

炎症によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマーのレベルを、比率 $[\text{調整Dダイマー} / \text{炎症のレベル}]$ によって算出する。図9および実施例4に示すとおり、プラトーに達する時間における振幅（mm）とフィブリノゲン濃度とを結び付ける線形方程式からこのレベルを定める。よって、Dダイマーを初期フィブリノゲン換算量（FEU）で表す（本発明による方法の変形のステップe）。

20

【0194】

プロトコルC

プロトコルCは、STAR（登録商標）Evolution Expert Series自動凝固アナライザ（スターゴ）において行う方法である。

【0195】

STAR（登録商標）Evolution自動デバイスのキュベットに、機器によって以下を同時に加える（ステップa）。

- 200 μlの陰性対照または陽性対照血漿の各々のサンプル、凍結乾燥して水で再構成したもの、

- 50 μlの組織因子およびリン脂質の混合物 $[TF + PL]$ 、凍結乾燥して水で戻したもので、最終濃度2 pMの組織因子（TF）および4 μMのリン脂質（PL）。

30

【0196】

自動デバイスはアームによって攪拌し、37℃にて300秒間のインキュベーションを行い、次いで50 μlのCaCl₂を加えて最終濃度16.7 mMにし、このトリガ試薬をニードルによって攪拌する（ステップb）。自動デバイスは次いで、540 nmにおける光学濃度（OD）を時間の関数として10分間測定し（ステップc）、各対照血漿に対するフィブリン形成曲線をプロットする。

【0197】

図5A（ステップd））に記載したとおり、測定の「後処理」に対するアルゴリズムは、各対照血漿に対する曲線の接線からフィブリン形成時間（FFT）を算出し、かつプラトーの時間TにおけるODおよび時間T0～10秒におけるODから、プラトーに達する時間（TA）におけるODの変動（DOD）を算出することを可能にする。

40

【0198】

図8および実施例3に示すとおり、凝固亢進によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマーのレベルを、式 $[(X) \times (FFT / \text{対照時間})]$ によって算出し、ここでXは測定したDダイマーのレベルである。

【0199】

炎症によって生成されたDダイマーの関数として調整されたDダイマーのレベルを、比率 $[\text{調整Dダイマー} / \text{炎症のレベル}]$ によって算出する。図9（A）および（B）ならびに実施例4に示すとおり、このレベルを等式 $y = a \ln(x) - b$ から定め、ここでyは

50

DODであり、 x はフィブリノゲン濃度であり、 a および b は(a and b of) フィブリンプラターのレベルとフィブリノゲン濃度とを結び付ける対数方程式に対する定数である。よって、Dダイマーをフィブリノゲン換算量(FEU)で表す(ステップe)。

【0200】

実施例1：正常な患者および(血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない)血栓症の疑いのある患者からのさまざまな血漿のフィブリン形成時間

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコルAである。この実施例において用いる方法のステップd)は、この方法の第1または第2のバージョンのものであることを意味する区別を有さない。

10

【0201】

図5および以下の表1に示すとおり、テストしたPEおよび/またはDVTの疑いのある患者からのサンプルの中で、正常な患者(血栓症の疑いのない正常で健康な対象)、血栓症の除外を有する患者、およびイメージングにおいて静脈血栓症の陽性の診断を有する患者から、凝固活性化状態を有する患者のサンプルを、凝固亢進を表すフィブリン形成時間(FFT)、プラターに達する時間(TA)、および血餅重合に達する時間(比率TA/FFT)に関して区別する。

【0202】

凝固亢進状態を示す患者に対するフィブリン形成時間(FFT)は、より短い。しかし驚くべきことに、がん患者を含む血栓症の除外を有する患者とは反対に、PEおよび/またはDVTの診断を有する患者には凝固亢進状態が存在しない。本発明の方法の第1のバージョンにおいては、血栓症を有する患者と有さない患者とを識別するためにこのことを利用している。

20

【0203】

抗凝固剤処置を受けている患者を除き、含まれるすべての患者のプラターに達する時間は8分間を超えず、抗凝固剤処置を受けている患者に対する結果の提供はフィブリン形成時間に限っている。

【0204】

血餅重合に達する時間は、正常な患者、または凝固活性化状態を有する患者、またはがん患者を含む血栓症の除外を有する患者よりも、PEおよび/またはDVTの診断を有する患者において短くなる(比率TA/FFTがより低い)。本発明の方法の第2のバージョンにおいては、血栓症を有する患者と有さない患者とを識別するためにこのことを利用している。

30

【0205】

表1．フィブリン形成時間(FFT)、およびプラターに達する時間(TA)、および血餅重合に達する時間(TA/FFT)に関する、正常な患者および血栓症またはがんを有するか否かにかかわらず血栓症の疑いのある患者の血漿の中からの、凝固亢進状態を有する患者の血漿の識別。

【0206】

【表 1】

血漿の由来	診断 Dダイマー（閾値 0.5 μg/ml）および／ま たはイメージング		N	FFT (sec)		TA (sec)		TA/FFT
				平均	範囲	平均	範囲	平均
正常な患者	Ddi 陰性	陰性	150	133	88-206	1.82	172-324	1.82
がんを有さ ない血栓症 の疑いのある患者	Ddi 陰性	陰性	127	141	84-304	1.62	154-440	1.62
	Ddi 陽性血栓 症を有さない	陰性	88	154	88-258	1.55	154-384	1.55
	Ddi 陽性血栓 症を有する	陽性 PEおよ び／また はDVT	21	166	116-218	1.45	176-298	1.45
がんを有す る血栓症の 疑いのある 患者	イメージング 血栓症を有さ ない	陰性	16	155	116-210	1.56	190-304	1.56
	イメージング 血栓症を有す る	陽性 PEおよ び／また はDVT	6	176	126-212	1.46	204-298	1.46
抗凝固剤下			10	313	150-694	447	220-1122	/

10

20

【0207】

実施例 2：（血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない）血栓症の疑いのある患者からのさまざまな血漿における凝固亢進による Dダイマーの生成
この実施例において用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ e）は、この方法の第 1 のバージョンのものである。

【0208】

図 8（A、B）に示すとおり、テストした PE および／または DVT の疑いのある患者からのサンプルの中では、がんを有するかまたは有さない、イメージングにおいて血栓症の陽性の診断を有する患者または血栓症の除外を有する患者のいずれに対しても、フィブリン形成時間の関数として生じた Dダイマーはサンプルの初期 Dダイマーとよく相関する。

30

【0209】

次の式によってサンプルの Dダイマーのレベル X から調整 Dダイマー Y を算出することによって、凝固亢進によって生成された Dダイマーの関数としてサンプルの Dダイマーを調整するために、線形関数を利用する。

【0210】

【数 15】

40

フィブリン形成時間

$$Y = X \times \frac{\text{フィブリン形成時間}}{\text{対照時間}}$$

【0211】

このことによって、血栓症を有する患者におけるフィブリン形成時間 FFT の伸長に対して比例的に Dダイマーを増幅し、かつ凝固亢進を有する患者におけるフィブリン形成時間 FFT の短縮に対して比例的に Dダイマーを減算することが可能になる。

【0212】

この比率は、アッセイに用いる Dダイマー試薬のタイプおよびバッチの関数として変動し、かつフィブリン形成を測定するために用いる組織因子 - リン脂質試薬のバッチの関数

50

として変動する。次いで、試薬のバッチをこの式に従って有利に較正できる。

【0213】

実施例3：（血栓症を有しおよび有さず、かつがんを有するかまたは有さない）血栓症の疑いのある患者からのさまざまな血漿に対する、凝固亢進によって生成されたDダイマーの関数としてのDダイマーの調整

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコルAである。この実施例において用いる方法のステップe)は、この方法の第1のバージョンのものである。

【0214】

特に実施例2および以下の表2に記載したとおり、凝固亢進によって生成されたDダイマーの関数としてDダイマーを調整するために、本発明による方法の実施例2の線形相関 $y = ax + b$ を利用する。以下の表2に示すとおり、特に血栓症を有さない患者よりも血栓症を有する患者の方がDダイマーのレベルが3.6倍高く、血栓症を有さないがん患者よりも血栓症を有するがん患者の方が2.3倍高いことに基づいて、血栓症を有する患者と有さない患者とを識別する。

【0215】

凝固亢進によって生成されたDダイマーの関数としてDダイマーを調整することによって、凝固活性化状態における凝固亢進によって生成されたDダイマーを減算することが可能になる。

【0216】

表2．（血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない）血栓症の疑いのある患者からの血漿における、凝固亢進によって生成されたDダイマーの関数としてのDダイマーの調整

【0217】

【表2】

血漿の由来	診断 Dダイマーおよび／ またはイメージング	数	初期Dダイマーの レベル ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		調整Dダイマーの レベル／凝固亢進 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
			平均	範囲	平均	範囲
正常な患者	Ddi 陰性	150	0.28	0.27-0.47	0.28	0.27-0.54
がんを有するか または有さない 血栓症の疑いのある患者	Ddi 陰性	127	0.31	0.27-0.49	0.33	0.19-0.66
	Ddi 陽性 血栓症を有さない	88	1.60	0.51-11.6	2.00	0.43-19.0
	Ddi 陽性 血栓症を有する	21	5.72	1.33-30.0	7.19	1.41-41.0
変動＋／－血栓症			x 3.6		x 3.6	
がんを有する血 栓症の疑いのあるがんを有する患者	イメージング 血栓症を有さない	16	2.52	0.27-11.6	2.94	0.59-19.0
	イメージング 血栓症を有する	6	5.21	2.73-10.9	6.89	2.59-15.5
変動＋／－血栓症			x 2.1		x 2.3	

【0218】

実施例4：本発明の方法による、正常な患者および（血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない）血栓症の疑いのある患者からのさまざまな血漿のフィブリンプラターのレベル

血漿サンプル

この実施例の第1の部分において用いるプロトコルは、プロトコルAである。この実施例において用いる方法のステップd)は、この方法の第1または第2のバージョンのもの

であることを意味する区別を有さない。

【 0 2 1 9 】

図 6 および図 9 ならびに以下の表 3 に示すとおり、テストした P E および / または D V T の疑いのある患者からのサンプルの中で、イメージングにおいて血栓症の陽性の診断を有するか、または血栓症の除外を有する患者からのサンプルと、凝固活性化状態を有する患者および正常な患者（血栓症の疑いのない正常で健康な対象）とを、炎症を表すフィブリン形成プラトーのレベルに関して区別する。本発明の方法による D O D プラトーのレベルは、血栓症の存在または除外とは独立に、図 6（ A、 B ）において C 反応性タンパク質（ C R P ）およびフィブリノゲンによって表される炎症が大きいほど高くなる。

【 0 2 2 0 】

図 9（ A、 B ）に記載したとおり、最大血餅重合を表すフィブリン形成プラトーのレベルは、患者にかかわらずサンプルのフィブリノゲンのレベルと対数方程式 $y = a \ln x + b$ に従ってよく相関し、ここで y はプラトー開始時間における光学濃度の変動であり、 $\ln x$ はフィブリノゲンのレベルを表す x のネイピア対数である。変数 x は、 x のネイピア対数の指数関数によって、等式から算出する。以下の表 3 に示すとおり、フィブリノゲンのレベルと D O D とを結び付ける因子は、患者にかかわらず一定である。

【 0 2 2 1 】

以下の表 3 に示すとおり、がんを有する患者の場合を含む、血栓症を有する患者および有さない患者は、フィブリノゲンおよび / または D O D の量によって表される炎症に基づいて識別する。

【 0 2 2 2 】

表 3、フィブリン形成プラトーに達する時間における D O D によって定めた（血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない）血栓症の疑いのある患者からの血漿のフィブリンプラトーのレベル。

【 0 2 2 3 】

【表 3】

血漿の由来	診断 D-d i およ び / またはイ メージング	数	フィブリノゲンのレ ベル（ $\mu g / m l$ ）		DOD 540 nm		デルタ DOD/ Fib
			平均	範囲	平均	範囲	
正常な患者	Ddi 陰性	150	2.93	2.12-4.56	0.937	0.618-1.423	0.32
がんを有する かまたは有さ ない血栓症の 疑いのある患 者	Ddi 陰性	127	3.79	1.93-8.40	1.225	0.581-2.237	0.32
	Ddi 陽性 血栓症を有さ ない	88	4.50	1.67-8.27	1.437	0.458-2.119	0.32
	Ddi 陽性 血栓症を有す る	21	4.83	3.00-7.54	1.509	1.007-2.059	0.31
がんを有する 血栓症の疑い のある患者	イメージング 血栓症を有さ ない	16	4.15	2.63-7.23	1.424	0.716-2.051	0.34
	イメージング 血栓症を有す る	6	4.91	3.43-7.54	1.598	1.134-2.059	0.33

【 0 2 2 4 】

全血サンプル

この実施例の第 2 の部分において用いるプロトコルは、プロトコル B である。この方法は、抗血小板阻害剤、この場合はサイトカラシン D の存在下で行う。

【 0 2 2 5 】

炎症のレベルは、図 5（ B ）に示した全血における代替的方法に従うプラトーに達する

時間における振幅と、図 9 (C) に示したクラウドにおけるフィブリノゲンのレベルとを結び付ける線形方程式から定める。本発明による方法の変形によってテストする患者に対して、プラトーに達する時間における振幅に基づく方法と、DOD の決定に基づく本発明の方法との両方によって識別を行う。

【 0 2 2 6 】

実施例 5 : 本発明の方法による、正常な患者および (血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない) 血栓症の疑いのある患者からのさまざまな血漿に対する、炎症によって生成された D ダイマーの関数としての D ダイマーの調整

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ e) および f) は、この方法の第 1 または第 2 のバージョンのものであるという区別を有さない。

【 0 2 2 7 】

本発明による方法の実施例 4 の対数関数を利用して、比率 R によって、炎症によって生成された D ダイマーの関数として D ダイマーを調整し、

【 0 2 2 8 】

【 数 1 6 】

凝固亢進によって生成された D ダイマーの関数として調整された D ダイマー

$$R = \frac{\text{炎症のレベル}}{\text{炎症のレベル}}$$

【 0 2 2 9 】

かつそれらをフィブリノゲン換算量 F E U で表す。

【 0 2 3 0 】

プラスミンが生成する D ダイマーの量は、使用するラテックス試薬の抗体 8 D 2 および 2 . 1 . 1 6 による F E U 単位の約 5 0 % であるため、測定の陽性閾値は 0 . 5 μ g / m l である。

【 0 2 3 1 】

図 1 2 (A 、 B) および以下の表 4 に示すとおり、患者からのサンプルにおいて肺塞栓症 (P E) または深部静脈血栓症 (D V T) の確率を定めるために、閾値、好ましくは 0 . 5 μ g / m l の閾値に対して調整 D ダイマーのレベルを定める。

【 0 2 3 2 】

D ダイマーに関して除外された 1 2 7 人の患者はすべて、陰性の調整 D ダイマーレベルを有する。偽陽性の D ダイマーを有する、血栓症を有さない 8 8 人の患者のうち、8 0 % は陰性の調整 D ダイマーレベルを有してイメージングを回避する。よって、血栓症を有さない患者の 9 0 % より多くが、本発明の方法によってイメージングを回避する。

【 0 2 3 3 】

以下の表 4 に示すとおり、血栓症を有する患者の 1 0 0 % が、0 . 5 2 μ g / m l から 1 0 . 5 μ g / m l の範囲の陽性の調整 D ダイマーレベルを有する。

【 0 2 3 4 】

0 . 5 0 μ g / m l から 2 . 7 3 μ g / m l のレベルを有する調整 D ダイマーの点から偽陽性であることを見出した、血栓症を有さない患者からのサンプルのうち、1 / 3 はレベル < 0 . 6 0 μ g / m l を有し、1 / 3 はがんを有し、1 / 3 は凝固活性化状態を有する。

【 0 2 3 5 】

表 4 . 凝固亢進によって生成された D ダイマーの関数および炎症に対して調整された D ダイマーの関数としての D ダイマーの調整による、(血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない) 血栓症の疑いのある患者からの血漿の識別

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

【表 4】

血漿の由来	診断 Ddi および／ またはイメージ ジグ	N	調整Dダイマーの レベル／凝固亢進H		調整Dダイマーの レベル／炎症I		与えられた 結果
			平均	範囲	平均	範囲	
がんを有する かまたは 有さない血 栓症の疑い のある患者	Ddi 陰性	127	0.33	0.19-0.66	0.09	0.04-0.21	0 偽+
	Ddi 陽性 血栓症を 有さない	88	2.00	0.43-19.0	0.42	0.11-2.73	18 偽+
	Ddi 陽性 血栓症を 有する	21	7.19	1.41-41.0	1.65	0.52-10.5	0 偽-
がんを有する 血栓症の 疑いのある 患者	イメージジグ 血栓症を 有さない	16	4.24	0.59-19.0	0.72	0.12-2.73	7 偽+
	イメージジグ 血栓症を 有する	6	7.20	2.59-15.5	1.44	0.58-3.65	0 偽-

10

【0237】

実施例 6：血管内フィブリンによって生成された D ダイマーと、線溶亢進に関する高い凝固活性化状態において生成された D ダイマーとの区別

20

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ g) は、この方法の第 1 のバージョンのものである。

【0238】

これらの活性化状態において存在する D ダイマーと、血栓症の D ダイマーとの区別を、線溶亢進に関して行う。急性活性化状態におけるプラスミンによるフィブリノゲン分解産物 FgDP の生成は、それらの除外を可能にする。スターゴ試薬に対しては図 10 (A、B)、IL 試薬 (ステップ g)) に対しては図 11 (A、B) の線形方程式から線溶亢進を算出する。

【0239】

30

線溶亢進の存在下で ($FgDP > 7 \mu g / ml$)、血管内フィブリンによって生成された FgDP は、血栓症を有さない患者からのサンプルよりも、血栓症を有する患者に由来するサンプルの方が系統的に低い。これはどの D ダイマー試薬を用いてもそうである。このことによって、以下の表 5 に示すとおり、 $1 \mu g / ml$ の閾値において陽性である D ダイマー調整の前後の FgDP の差に基づいて、血栓症を有する患者と血栓症を有さない患者とを識別することが可能になる。反対に、血栓症を有さない患者において差が陰性または < 1.0 であることは、急性凝固活性化状態に注意を向けることを可能にする。

【0240】

表 5 . STAR (登録商標) (スターゴ) における光学的方法による、FgDP の演繹による線溶亢進の関数としての (血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない) 血栓症の疑いのある患者からの血漿の識別

40

【0241】

【表 5】

血漿の由来	診断 Ddi 陽性およびイメージング	N	調整 Ddi	FgDP/Ddi	FgDP 調整 Ddi	差 FgDP 閾値 $\geq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$	与えられた結果	
がんを有するかまたは有さない血栓症の疑いのある患者	Ddi 陰性	127	0.09	陰性	陰性	/	陰性	10
	血栓症を有さない	69	0.26	陰性	陰性	/	陰性	
		4	0.51	陰性	陰性	/	4 偽+	
		9	1.13	11.2	10.9	+0.3	陰性	
		6	0.91	15.3	9.2	+6.1 (+2.6 to +20.3)	6 偽+	
	血栓症を有する	2 19	0.55 1.77 (0.58-10.5)	陰性 18.8 (8.3-83.3)	陰性 14.5 (7.1-68.7)	/ +4.3 (+1.2 to +14.6)	陽性 陽性	
がんを有する血栓症の疑いのある患者	血栓症を有さない	10	0.26	陰性	陰性	/	陰性	20
		2	1.97	16.1	15.8	+0.3	陰性	
		1	0.51	陰性	陰性	/	1 偽+	
		3	0.97	18.8	9.5	+9.2	3 偽+	
	血栓症を有する	6	1.44 (0.58-3.65)	16.2 (9.5-31.7)	12.4 (7.1-26.2)	+3.8 (+1.3 から +6.7)	陽性 陽性	

【0242】

よって、凝固亢進（H）、炎症（I）、および線溶亢進（F）によって等しく生成された Dダイマーの関数として調整された陰性の Dダイマーのレベルに基づいて、95%の患者がイメージングを回避する。

【0243】

実施例 7 に示すとおり、偽陽性のうちの 3 つは閾値の限界にあり、4 つはがんであり、3 つは凝固活性化の原因を有して、フィブリン形成時間のかなりの短縮に基づいて偽陰性を生じることなくイメージングを回避できる。

【0244】

実施例 7：本発明の方法による Dダイマーの調整と比率 [クラウスの方法による Ddi / フィブリノゲン] との比較

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ h) は、この方法の第 1 のバージョンのものである。

【0245】

図 12 および以下の表 6 によって示すとおり、本発明の方法の第 1 のバージョン（ステップ h)）に従う凝固亢進（H）、炎症（I）、および線溶亢進（F）によって生成される Dダイマーの関数としての Dダイマーの調整は、比率 [Dダイマー / フィブリノゲン] よりも効果的である。以下の表 6 に示すとおり、因子 5.3 を掛けた調整 Dダイマーのレベルが高いことに基づいて、血栓症を有する患者を血栓症を有さない患者から識別する。よって、図 12 に示されるとおり、偽陽性レベルの Dダイマーを有する患者の 92%、すなわち血栓症を有さない患者の 97% は、ステップ h) に従う Dダイマーの調整によって陰性にされる。7 つの偽+のうち、4 つはがんであり、3 つは閾値の限界である。

【0246】

表 6. (血栓症を有するかまたは有さず、かつがんを有するかまたは有さない) 血栓症の疑いのある患者からの血漿における、比率 (ratio) [クラウスの方法による Dダイマー / フィブリノゲン] による調整と比較した、本発明の光学的方法による Dダイマーの調整 (H: 凝固亢進、I: 炎症、F: 線溶亢進、Ddi: Dダイマー、Fib: フィブリノゲン)

【0247】

10

20

30

40

50

【表 6】

血漿の由来	診断 Ddi および／ またはイメージ ジング	N	調整 Ddi [Ddi / (H+I+F)]		結果	比率 [Ddi/Fib] クラウ ス		結果
			平均	範囲		平均	範囲	
がんを有する かまたは 有さないP Eおよび／ またはDV Tの疑いの ある患者	Ddi 陰性	127	0.09	0.04-0.21	陰性	0.09	0.04-0.16	陰性
	Ddi 陽性 血栓症を 有さない	88	0.31	0.11-1.56	7 偽+	0.40	0.09-3.60	17 偽+
	Ddi 陽性 血栓症を 有する	21	1.65	0.52-10.5	0 偽-	1.35	0.38-7.71	2 偽-
変動+／-血栓症			x 5.3			x 3.4		
がんを有する 血栓症の 疑いのある 患者	血栓症を 有さない	16	0.45	0.12-1.56	4 偽+	0.75	0.09-3.60	7 偽+
	血栓症を 有する	6	1.44	0.58-3.65	0 偽-	1.18	0.38-3.0	1 偽-
変動+／-血栓症			x 3.2			x 1.6		

10

20

【0248】

比率 [Dダイマー / フィブリノゲン] による偽陰性を本発明の方法によって検出することによって、血栓症を見逃さないことが可能になる。

【0249】

本発明の方法による偽陽性は比率 [Dダイマー / フィブリノゲン] による偽陽性よりも少ないため、イメージングによって診断される患者の数を減らすことが可能になる。

【0250】

実施例 8 : P E および / または D V T の確率に関する、本発明の方法に従って調整された D ダイマーのレベルの影響

このステップにおいて用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ h) は、この方法の第 1 のバージョンのものである。

30

【0251】

本発明の方法に従って調整される D ダイマーの閾値は、有利には年齢の関数として調整したものではない。なぜなら D ダイマーのレベルと、凝固活性化と、炎症とは、50 歳より後に年齢の関数として徐々に増加するからである。その結果として、比率を年齢の関数として調整していない。

【0252】

本発明の方法に従って調整した D ダイマーのレベルが高いほど、フィブリン形成時間を有する式および D O D による比率の分母が大きくなり、P E または D V T の確率が高くなる。

40

【0253】

以下の表 7 に示すとおり、P E の程度が高いほど、かつ D V T が遠位または表在性ではなくて近位であるほど、調整 D ダイマーは高くなる。

【0254】

表 7 . 凝固亢進 (H)、炎症 (I)、および線溶亢進 (F) に対して調整された D ダイマーのレベルの関数としての P E および D V T の確率、(F F T : フィブリン形成時間、T : 平均対照時間 - 1 標準偏差 = 120 秒)、F g D P : フィブリノゲン分解産物、D d i : D ダイマー、A c t : 凝固活性化状態)。

【0255】

【表 7】

数	Ddi	調整 Ddi C+I+F]	デルタ FgDP	FFT ≤ T	PE および ／または D VT の確率	PE および／または D VT を有する患者から の血漿
1	1.56	0.58	/	190	中程度	亜区域性 PE
3	3.60	0.92	+2.6	157	高	区域性 PE
1	7.0	1.75	+6.7	212	高	両側性肺動脈 PE
1	10.9	3.65	+5.5	188	高	近位および遠位 PE
1	30.0	10.47	+14.6	182	非常に高	大規模 PE
1	0.72	0.25	/	88	活性化	腓骨静脈炎症
2	1.44	0.49	/	162	低	表在性 DVT
1	2.28	0.58	+1.2	162	中程度	遠位 DVT
1	3.60	0.91	+2.7	218	高	近位 DVT
1	7.70	1.62	+9.3	192	高	
1	12.1	4.19	+5.3	144	高	大頸静脈 DVT

10

【0256】

実施例 9：フィブリン形成測定 of 機器間の再現性

20

この実施例において用いるプロトコルは、この方法の第 1 または第 2 のバージョンのステップ a)、b)、c)、および d) に従って次のとおり用いた、STA-R (登録商標) におけるプロトコル C である。

【0257】

STA-R (登録商標) Evolution Expert Series 自動デバイス (スターゴ) の 8 つのキュベットに、機器によって以下を同時に加える。

- 200 μl の対照血漿サンプル：正常 (STA (登録商標) CCN)；凝固亢進性 (プロテイン S を枯渇させた血漿、STA DEF PS)、および低線溶対照血漿 (プラスミノゲンアクチベーター (plasminogen activator inhibitor) PAI-1、PAI-4C を含有する血漿)、
- 50 μl の組織因子とリン脂質との混合物 [TF 2 pM 最終 + PL 4 μM 最終]。

30

【0258】

攪拌および 37 °C にて 300 秒間のインキュベーションの後、自動デバイスは 50 μl の CaCl₂ を加えて最終濃度 16.7 mM にし、ニードルによって攪拌する。最後に、自動デバイスはフィブリン形成時間と、プラトーに達する時間 (TA) における光学濃度の変動 DOD とを、540 nm の波長にて時間の関数として 10 分間測定する。

【0259】

3 つの STAR (登録商標) 機器において、この方法の機器間の再現性を次のとおり定めた。3 つの機器の各々において、連続する 5 日間にわたって 2 つの測定を 12 シリーズ、つまり 24 回の測定を行い、正常な対照血漿 (CCN) と、病理学的な対照血漿 (DPS：プロテイン S を枯渇させた対照血漿、凝固亢進性、PAI：低線溶対照血漿) との各々 2 つのボトルを用い、すなわち各対照血漿に対して 48 回の測定を行った。ロスナー (Rosner) に従って、異常な値は除去した。

40

【0260】

フィブリン形成時間 FFT に対して得た変動係数 (CV: coefficients of variation) は、すべて 6 % 未満である。以下の表 8 に示すとおり、プラトーの時間における OD および最大 OD に対して得た変動係数は、どの対照血漿でもすべて 3 % 未満である。STAR (登録商標) 間の変動は、どのパラメータおよび対照血漿でも 2.5 % 未満である。

50

【 0 2 6 1 】

表 8 . フィブリン形成の測定の機器間の再現性 (C C N : 正常な対照血漿、 D P S : プロテイン S を枯渇させた対照血漿、凝固亢進性、 P A I : 低線溶対照血漿) 。

【 0 2 6 2 】

【表 8】

N=48 測定	フィブリン形成時間 FFT (秒)			プラトーの時間における OD			最大 OD		
対照血漿	CCN	DPS	PAI	CCN	DPS	PAI	CCN	DPS	PAI
STAR® 1									
平均	100.4	82.4	117.8	2.200	1.977	2.280	2.223	2.004	2.306
最小	86.0	78.0	102	2.157	1.751	2.217	2.174	1.768	2.239
最大	110.0	86.0	126	2.278	2.053	2.347	2.310	2.071	2.384
CV	5.8%	2.8%	4.5%	1.4%	2.8%	1.4%	1.5%	2.9%	1.5%
STAR® 2									
平均	99.7	83.1	118.2	2.222	2.015	2.309	2.337	2.043	2.337
最小	88.0	78.0	100.0	2.073	1.788	2.248	2.265	1.804	2.265
最大	116.0	90.0	138.0	2.280	2.114	2.381	2.422	2.154	2.422
CV	5.6%	3.3%	5.7%	1.9%	2.7%	1.3%	1.5%	2.8%	1.5%
STAR® 3									
平均	100.1	84.2	118.7	2.245	2.030	2.328	2.265	2.057	2.352
最小	90.0	76.0	106.0	2.192	1.879	2.261	2.213	1.904	2.279
最大	110.0	90.0	134.0	2.323	2.112	2.374	2.365	2.129	2.395
CV	4.4%	3.5%	4.6%	1.2%	2.6%	1.2%	1.3%	2.4%	1.1%
STAR®間の変動									
平均	99.9	83.2	118.2	2.222	2.007	2.306	2.275	2.035	2.332
標準偏差	0.35	0.90	0.42	0.02	0.03	0.02	0.06	0.03	0.02
CV	0.3%	1.1%	0.4%	1.0%	1.4%	1.1%	2.5%	1.3%	1.0%

【 0 2 6 3 】

実施例 10 : フィブリン形成測定の反復性

この実施例において用いるプロトコルは、この方法の第 1 または第 2 のバージョンのステップ a)、b)、c)、および d) に従って次のとおり用いた、S T A - R (登録商標)におけるプロトコル A である。

【 0 2 6 4 】

S T A - R (登録商標) Evolution Expert Series 自動デバイス (スターゴ) の 8 つのキュベットに、機器によって以下を同時に加える。

- 200 μ l の、正常な患者または静脈血栓症の疑いがある患者もしくはない患者からのクエン酸血漿のサンプル、
- 50 μ l の組織因子とリン脂質との混合物 [T F 2 p M 最終 + P L 4 μ M 最終] 。

【 0 2 6 5 】

攪拌および 37 にて 300 秒間のインキュベーションの後、自動デバイスは 50 μ l の C a C l₂ を最終濃度 16 . 7 m M にて加え、ニードルによって攪拌する。最後に、自動デバイスはフィブリン形成時間と、プラトーに達する時間 (T A) における光学濃度の変動 D O D とを、540 n m の波長にて時間の関数として 10 分間測定する。

【 0 2 6 6 】

この方法の各パラメータおよびサンプルの各々に対して、2 つ組の測定の反復性を 4 つの S T A R (登録商標) 機器において定めた。正常な患者からの 154 の血漿を S T A R (登録商標) 機器の 1 つにおいて試薬の第 1 のバッチによってテストし、血栓症の疑いのある患者からの 83 のサンプルの D ダイマー、フィブリン形成時間、プラトーにおける D O D、およびフィブリノゲンを残りの 3 つの S T A R (登録商標) 機器において試薬の第

2 のバッチによってテストした。

【 0 2 6 7 】

各々のパラメータに対して得た変動の平均および標準偏差を、以下の表 9 および表 1 0 において報告している。

【 0 2 6 8 】

表 9 および表 1 0 に示すとおり、フィブリン形成測定に対して得た変動の平均は、1 5 4 人の正常な患者に対して 2 % 未満であり、8 3 人の静脈血栓症を有する患者および有さない患者に対して 1 % 未満である。

【 0 2 6 9 】

フィブリン形成のパラメータの測定は、クラウスの方法におけるフィブリノゲンの測定と同様に反復性がある。

【 0 2 7 0 】

特異的 D ダイマーの測定は、D ダイマーおよび比率 [D ダイマー / フィブリノゲン] の測定と同様に反復性がある。変動の平均は 2 . 3 % 未満である。

【 0 2 7 1 】

2 つ組において特異的 D ダイマーによって陽性にされ、比率 [D d i / F i b] によって陰性にされた 5 つのサンプルのうち、2 つはイメージングで確認した肺塞栓症を有する患者からのものであり、2 つは凝固過剰活性化を有し、1 つは心疾患を有する患者からのものである。

すなわち、比率 [D d i / F i b] によって偽陰性であることを見出した、P E を有する 2 人の患者は本発明の方法によって診断できるが、P E を有さない 1 人の患者は本発明の方法によってイメージングを必要とする。

【 0 2 7 2 】

表 9 . 正常な患者からのサンプルにおけるフィブリン形成測定の 2 つ組の反復性。

【 0 2 7 3 】

【表 9】

正常な患者からのサンプル 2 つ組の数		フィブリン形成の測定		測定の変動	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差
フィブリン形成時間 FFT (秒)	150	134 82-206	24	-1.1%	7.1%
プラトーにおける D O D (540 nm)	150	0.937 0.618-1.423	0.20	-0.5%	1.8%

【 0 2 7 4 】

表 1 0 . イメージングにおける血栓症を有する患者および有さない患者からのサンプルにおける、フィブリン形成、D ダイマーおよび本発明の方法に従って調整された D ダイマー、ならびに比率 [D ダイマー / フィブリノゲン] の測定の 2 つ組の反復性。

【 0 2 7 5 】

【表 10】

イメージングにおける血栓症を有する患者および有さない患者からのサンプル 2つ組の数		フィブリン形成の測定		測定の変動	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差
フィブリノゲン (g/l)	83	3.97 1.92-8.40	1.10	0.4%	3.0%
フィブリン形成時間 FFT (秒)	83	151.6 88-382	41.4	0.9%	5.0%
プラトーにおける DOD (540 nm)	83	1.262 0.559-2.241	335	0.2%	2.0%
陽性 Dダイマー > 0.5 µg/ml	30	2.20 0.52-12.13	3.15	2.1%	7%
比率 [Dダイマー/フィブリ ノゲン]	30	0.67 0.12-4.92	1.14	2.1%	6.7%
陰性の比率	25	0.28 0.12-0.53	0.13	2.4%	7.3%
陽性の比率	5	2.61 0.60-4.92	1.85	0.2%	1.8%
血栓症に対して特異的な Dダ イマー (µg/ml)	30	0.71 0.14-4.28	1.00	2.3%	6.8%
陰性の特異的 Ddi	21	0.30 0.14-0.50	0.11	3.6%	7.7%
陽性の特異的 Ddi	9	1.66 0.51-4.28	1.44	-0.6%	1.8%

10

20

【0276】

実施例 11: Dダイマーをアッセイするための別の試薬による、本発明の方法に従う Dダイマーの調整

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ e) から h) は、この方法の第 1 のバージョンのものである。

30

【0277】

Dダイマーをアッセイするためのインスツルメンテーション・ラボラトリー (IL) の方法によって、実施例 2 の式による凝固亢進 (H) によって生成された Dダイマーの関数、実施例 4 の対数関数および実施例 5 の比率 R による炎症 (I) の関数、ならびに実施例 6 の線形方程式による線溶亢進 (F) の関数として Dダイマーを調整する。

【0278】

凝固亢進によって生成された Dダイマーの関数として Dダイマーを調整することによって、凝固活性化状態における凝固亢進によって生成された Dダイマーを減算することが可能になるが、表 11 に示すとおり、血栓症を有する患者と有さない患者とを識別することはできない。

40

【0279】

表 11. 血栓症の疑いのある患者からの血漿における、凝固亢進によって生成された Dダイマーの関数としての Dダイマーをアッセイするための IL の方法による Dダイマーの調整

【0280】

【表 1 1】

患者からの 血漿	診断 Dダイマーおよ び／またはイメ ージング	数	初期Dダイマーのレ ベル (μ g / m l)		調整Dダイマーのレベル／凝 固亢進 (μ g / m l)	
			平均	範囲	平均	範囲
血栓症の疑 いを有する	Ddi 陰性	120	0.43	0.11-3.32	0.46	0.09-3.35
	Ddi 陽性 血栓症を 有さない	79	1.75	0.20-7.34	2.12	0.21-16.7
	Ddi 陽性 血栓症を有する	15	8.42	1.39-25.4	10.9	1.82-34.7

10

【0 2 8 1】

図 1 3 および表 1 2 に示すとおり、炎症によって生成された D ダイマーの関数としての D ダイマーの調整によって、血栓症を有する患者と有さない患者とを識別することが可能になる。よって、約 9 0 % の患者が、陰性の調整 D ダイマーレベルに対する 2 つのスターゴおよび I L 試薬の 1 つまたは他のものによるイメージングを回避できる。

【0 2 8 2】

表 1 2 . 血栓症の疑いのある患者からの血漿における、凝固亢進および炎症によって生成された D ダイマーの関数としての D ダイマーをアッセイするための I L の方法による D ダイマーの調整。

20

【0 2 8 3】

【表 1 2】

患者からの 血漿	診断 Ddi および／ またはイメー ジング	N	調整Dダイマーのレ ベル (μ g / m l) ／凝固亢進 H		調整Dダイマーのレベ ル (μ g / m l) ／炎症 I		結果 偽＋ 偽－
			平均	範囲	平均	範囲	
血栓症の疑 いのある患 者からの血 漿	Ddi 陰性	120	0.46	0.09-3.35	0.12	0.02-1.04	2 F +
	Ddi 陽性 血栓症を 有さない	79	2.12	0.21-16.7	0.45	0.06-2.47	22 F +
	Ddi 陽性 血栓症を 有する	15	10.9	1.82-34.7	2.45	0.49-8.84	1 限界

30

【0 2 8 4】

図 1 3 ならびに以下の表 1 3 および表 1 4 に示すとおり、凝固亢進 (H) および炎症 (I) に加えて、線溶亢進 (F) によって生成された D ダイマーの関数としての D ダイマーの調整によって、より多くの患者を識別することが可能になる。よって、9 5 % より多くの患者が、本発明の方法に従って調整した陰性の D ダイマーのレベルに基づいて、イメージングを回避できる。9 つの偽＋のうち、3 つは転移を伴うがんであり、3 つは閾値の限界 (0 . 6 0) であり、3 つは高齢の患者 (> 8 0 歳) である。

40

【0 2 8 5】

表 1 3 . F g D P の演繹による線溶亢進によって生成された D ダイマーの関数としての D ダイマーをアッセイするための I L の方法による、本発明の方法による (血栓症を有するかまたは有さない) 血栓症の疑いのある患者からの血漿の識別。

【0 2 8 6】

【表 1 3】

患者からの 血漿	診断 Ddi 陽性 および イメージング	N	調整 Ddi	FgDP Ddi	FgDP 調整 Ddi	FgDP 閾値 ≥ 1.0	結果
血栓症の疑 いを有する	Ddi 陰性	120	0.12	/	/	/	陰性
	血栓症を 有さない	79	0.45	5.67	5.52	/	11 F +
	血栓症を 有する	15	2.45	23.4	17.7	+5.66	陽性 1 限界

10

【0 2 8 7】

図 1 3 および以下の表 1 4 に示すとおり、本発明の方法によるこの調整は、比率 [D ダイマー / フィブリノゲン] よりも効果的である。比率 [D ダイマー / フィブリノゲン] による偽陰性を本発明の方法によって検出することによって、血栓症を見逃さないことが可能になる。本発明の方法による偽陽性は比率 [D ダイマー / フィブリノゲン] による偽陽性よりも少ないため、イメージングを用いて診断される患者の数を減らすことが可能になる。

【0 2 8 8】

表 1 4 . 血栓症を有するかまたは有さない患者からの血漿における、D ダイマーをアッセイするための I L 試薬による本発明の光学的方法と、比率 [D ダイマー / フィブリノゲン] とによる D ダイマーの調整の比較 (H : 凝固亢進、I : 炎症、F : 線溶亢進、D d i : D ダイマー、F i b : フィブリノゲン) 。

20

【0 2 8 9】

【表 1 4】

患者からの 血漿	診断 Ddi および／ または イメージング	数	調整 Ddi [Ddi / (C+I+F)]		結果	比率[Ddi/Fib] (ク ラウス)		結果 偽+ 偽-
			平均	範囲		平均	範囲	
P E およ び／また は D V T の疑いを 有する	Ddi 陰性	120	0.12	0.02-0.41	0 F +	0.12	0.01-1.01	2 F +
	Ddi 陽性 血栓症を有さ ない	79	0.37	0.06-2.23	9 F +	0.41	0.05-2.26	17 F +
	Ddi 陽性 血栓症を有す る	15	2.45	0.49-8.84	1 限界	2.01	0.37-6.52	3 F -

30

【0 2 9 0】

実施例 1 2 : 年齢の関数としての (血栓症を有するかまたは有さず、がんを有するかまたは有さない) 血栓症の疑いのある患者に対する本発明による方法の診断性能レベル

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ e) から h) は、この方法の第 2 のバージョンのものである。

【0 2 9 1】

ステップ e ') に従って、炎症によって生成された D ダイマーのレベルの関数としてサンプルの D ダイマーのレベルを調整し、この調整レベルを低い D ダイマーのレベル ($< 4 \mu\text{g} / \text{m l}$) に対して補正することによって、血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル R を算出した。炎症の関数として分類したサンプルの各々に対して、ステップ g ') に従って、線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベルを算出した。次いで、患者における血栓症を除外もしくは診断するか、または患者における凝固活性化状態に注意を向けるために、比率 T A / F F T を閾値に対して比較した。

40

【0 2 9 2】

(血栓症を有するかまたは有さず、がんを有するかまたは有さない) 血栓症の疑いのある合計 2 1 8 人の患者をテストした。テストしたこれら 2 1 8 人の患者のうち、4 7 % は

50

50歳を超えており、17%は75歳を超えており、15%はがんを有した。199人の患者(91.3%)において、イメージングテストまたは臨床的確率によるDダイマーの陰性のアッセイに基づいて、PEおよび/またはDVTの診断を除外した。19人の患者、すなわち8.7%において、陽性のイメージングテストに基づいてPEおよび/またはDVTの診断を確認した。この218人の患者に対して、本発明の方法の第2のバージョンを用いて、血栓症または凝固活性化状態の除外および/または診断を行った。この方法の診断性能レベルを、Dダイマーの通常のアッセイおよび年齢調整Dダイマーの診断性能レベルと比較した。

【0293】

次いで、(血栓症を有するかまたは有さず、がんを有するかまたは有さない)血栓症の疑いのあるより多数の患者に対して、本発明の方法の診断性能レベルを定めた。テストした合計796人の患者において、49%は50歳を超えており、19%は75歳を超えており、7.3%はがんを有した。730人の患者(91.7%)において、PEおよび/またはDVTの診断を除外した。66人の患者、すなわち8.3%において、PEおよび/またはDVTの診断を確認した。

10

【0294】

高齢の患者においては、Dダイマーのレベル決定の臨床的有用性が限られる。これは、肺塞栓症を除外するためにDダイマーの閾値を年齢によって調整する必要があるためである(Righiniら, JAMA, 2014, 311: 1117-1124)。この調整した閾値は、50歳以上の患者に対して年齢に10を掛けたものに相当する。年齢に対して調整したDダイマー閾値と、臨床的確率のプレテスト評価との組み合わせを、肺塞栓症が除外された可能性のある多数の患者と組み合わせる(Righiniら, JAMA, 2014, 311: 1117-1124)。肺塞栓症(PE)および深部静脈血栓症(DVT)の臨床的確率のプレテスト評価のための方法は、当該技術分野において公知である(それぞれKolokら, Arch. Intern. Med., 2008, 168: 21-31, およびWellsら, NEJM, 2003, 349: 1227-1235を参照)。

20

【0295】

本発明の方法に従って調整されるDダイマーの閾値は、有利には年齢の関数として調整したものではない。なぜならDダイマーのレベルと、凝固活性化と、炎症とは、50歳より後に年齢の関数として徐々に増加するからである。その結果として、比率を年齢の関数として調整していない。本発明の方法に従って調整したDダイマーのレベルが高いほど、DODによる比率の分母が大きくなり、PEまたはDVTの確率が高くなる。

30

【0296】

以下の表15に示すとおり、血栓症の疑いのある218人の患者に対して、本発明の方法は、Dダイマーまたは年齢調整されたDダイマーの通常のアッセイよりも多くの患者(約20%多い)をさらに除外することを可能にする。よって、本発明の方法でテストした患者の75%よりも多くが、補助的なイメージングテストを必要としない。

【0297】

表15における性能レベルは、Dダイマーおよび年齢調整Dダイマーに対する通常の間値 $0.50 \mu\text{g/ml}$ と、本発明の方法によるこの実施例における閾値 $0.51 \mu\text{g/ml}$ とにおいて与えている。偽陰性の診断がなければ、3つの方法の感受性は100%である。他方で表15に示すとおり、本発明の方法の特異性は、他の2つの方法よりもかなり高い。陽性の尤度比は他の2つの方法よりも高く、この結果が陽性であるときには、患者が血栓症を有する確率が他の方法よりも3倍高いことを確実にする。

40

【0298】

本発明による方法をより多数の患者に適用するときにも、類似の診断性能レベルを見出している。表16に示すとおり、血栓症の疑いのある796人の患者のうち、この方法は79%の患者を除外することを可能にし(他の方法よりも20%より多い)、表17および図15(A)に示すとおり、これは年齢に関係しない。加えて本発明による方法は、が

50

んである患者（＜75歳）をより多く除外することを可能にする（図15（B）を参照）。最後に本発明による方法は、高齢の患者およびがんである患者だけでなく、がんである高齢の患者をより良好に除外することを可能にする（図15（B）を参照）。より多数の患者に対する結果は、本発明による方法の特異性が参照方法と比べて高いことを示す（表16を参照）。陽性の予測値は、参照方法の予測値よりも約2倍高い。

【0299】

表15．血栓症の疑いのある218人の患者（19人が血栓症を有し、199人が血栓症を有さない）に対する、本発明の方法の診断性能レベルと、Dダイマーおよび年齢調整Dダイマーのアッセイの診断性能レベルとの比較。

【0300】

【表15】

診断性能レベル N=218 患者	PEまたはDVTの診断に対して除外される患者の数	感受性 %	特異性 %	陽性の尤度比 (LR+)	陰性の尤度比 (LR-)
本発明の方法	166/218 (76.2%)	100%	83.2%	6.03	0.00
Dダイマー	115/218 (52.8%)	100%	57.8%	2.37	0.00
年齢調整Dダイマー	123/218 (56.4%)	100%	61.8%	2.62	0.00

【0301】

表16．血栓症の疑いのある796人の患者（66人が血栓症を有し、730人が血栓症を有さない）に対する、本発明の方法の診断性能レベルと、Dダイマーおよび年齢調整Dダイマーのアッセイの診断性能レベルとの比較。

【0302】

【表16】

診断性能レベル N=796 患者	% 除外	感受性	特異性	PPV（陽性の予測値）
本発明の方法	79% (+28%)	99.8%	86%	39% (X2)
Dダイマー	51%	100%	56%	17%
年齢調整Dダイマー	57% (+6%)	100%	62%	17%

【0303】

表17．血栓症の疑いのある796人の患者のうち、Dダイマーのレベル（D-di）が＜5.1μg/mlである50歳未満の386人の患者と50歳より上の379人の患者とに対する、本発明の方法による血管内フィブリン分解の結果もたらされるDダイマーのレベル（D-di）。

【0304】

【表 17】

年齢	診断 P E および／ま たは D V T	n	D-di μg/ml	本発明の方法 D-di μg/ml	平均年齢
< 50A N=386	陽性 PE または DVT	13	2.23	0.69 0.52-1.62	38 歳
	陰性	375	0.55	0.51 0.45-1.39	35 歳
≥ 50A N=379	陽性 PE または DVT	36	2.25	0.65 0.55-0.95	72 歳
	陰性	343	1.04	0.56 0.46-1.76	68 歳

10

【0305】

本発明の方法による血管内フィブリン分解の結果もたらされる D ダイマーのレベルは、患者の年齢にかかわらず（平均年齢 38 歳または 72 歳）、血栓症の診断を有する患者のものと類似している。他方で、血栓症を有さない患者における D ダイマーは、予想どおり年齢の関数として高くなる。

20

【0306】

実施例 13：患者グループによる本発明による方法の診断性能レベル

この実施例において用いるプロトコルは、プロトコル A である。この実施例において用いる方法のステップ e) および h) は、この方法の第 2 のバージョンのものである。

【0307】

ステップ e') に従って、炎症によって生成された D ダイマーのレベルの関数としてサンプルの D ダイマーのレベルを調整し、この調整レベルを低い D ダイマーのレベル (< 4 μg/ml) に対して補正することによって、血管内フィブリン分解の結果もたらされた D ダイマーのレベル R を算出した。炎症の関数として分類したサンプルの各々に対して、ステップ g') に従って、線溶亢進によって生成された D ダイマーのレベルを算出した。次いで、患者における血栓症を除外もしくは診断するか、または患者における凝固活性化状態に注意を向けるために、比率 T A / F F T を閾値に対して比較した。

30

【0308】

本発明の方法の第 2 のバージョンを用いて、血栓症の疑いのある合計 796 人の患者に対して、本発明の方法の診断性能レベルを定めた。血栓症を有する 8.3% の患者、がんを有する 7.3% の患者、血栓症の素因を有する患者、凝固亢進状態を有する患者、および凝固活性化状態を有する患者に対する、本発明の方法によって得られた結果を以下の表 18 ~ 21 に提供する。

【0309】

肺塞栓症 (PE) および深部静脈血栓症 (DVT) の診断

肺塞栓症 (PE) を有する 46 人の患者、深部静脈血栓症 (DVT) を有する 16 人の患者、PE および DVT の両方を有する 4 人の患者、静脈血栓症の病歴 (HIST: history) を有する 15 人の患者に対して得た、本発明の方法の診断性能レベルを表 18 に記載している。

【0310】

表 18. 血栓症の疑いのある 796 人の患者のうち、血栓症の診断を有する 66 人の患者に対して得た、本発明の方法の診断性能レベル。

【0311】

40

【表 18】

血栓症の診断	n	Ddi ($\mu\text{g/ml}$)	炎症 (DOD)	本発明の方法 Ddi ($\mu\text{g/ml}$)	真の陽性 (TP : True positive) 性能レベル
PE+ 陽性	46	5.2 0.68-30	4.8 2.6-9.9	1.43 0.52-7.64	97.8% TP 1の重篤でない SSPE*
DVT+ 陽性	16	4.1 0.77-13	4.4 2.6-6.6	1.28 0.55-5.05	100% TP
PE+ DVT+ 陽性	4	5.0 1.15-10	4.3 3.3-5.4	1.36 0.61-3.03	100% TP
HIST PE または DVT	15	5.8 0.68-20	4.5 2.6-8.4	1.83 0.54-7.24	100% TP
陰性の表在性 VT	3	1.1	4.0	0.60	2の偽陽性
陰性の静脈不全	2	0.52	4.2	0.50	2の真の陰性

10

*SSPE : 亜区域性肺塞栓症。

【0312】

表 19 に示すとおり、得た結果は、本発明による方法が、炎症のレベルが高い肺梗塞の事象および重篤でない分離した亜区域性肺塞栓症の事象を含む、静脈血栓塞栓症である患者の 100% 近くを診断することを可能にすることを示す。なお表 18 に示すとおり、定めた血管内フィブリン分解の結果もたらされる Dダイマーのレベルは、静脈血栓塞栓症（肺塞栓症または深部静脈血栓症）の病歴（HIST）の場合に高くなる。

20

【0313】

表 19 . 血栓症の疑いのある 796 人の患者のうち、血栓症の診断を有する 66 人の患者に対して得た、本発明の方法の診断性能レベル。

【0314】

【表 19】

血栓症の診断	N	Dダイマー	炎症 (DOD) N: 2 to 4.5 g/l	本発明の方法 Ddi ($\mu\text{g/ml}$) TP=真の陽性
広範囲、両側性、または 区域性 PE	24	7.1 1.2-30.0	4.8 2.8-8.4	1.91 0.57-7.52 (100% TP)
遠位 PE	7	1.7 0.89-2.77	5.4 3.7-9.9	0.60 0.55-0.65 (100% TP)
肺梗塞	7	2.5 1.1-5.1	5.8 3.1-8.4	0.73 0.52-1.62 (100% TP)
PEに関連する SSPE	6	3.3 1.15-5.1	5.0 3.1-7.5	0.80 0.52-1.62 (100% TP)
分離した SSPE	6	1.9 0.68-3.8	4.2 2.6-6.9	0.62 0.54-0.58 (1の偽陰性)

30

40

【0315】

血栓症素因状態

この研究でテストした血栓症の素因を示す 113 人の患者は、既知のがんである患者（58 人の患者、VTE に対して陰性と診断した 47 人および陽性と診断した 11 人を含む）、未知のがんである患者（21 人の患者、陰性と診断した 17 人および陽性と診断した

50

4人を含む)、妊娠中の女性(14人の患者、すべて陰性と診断)、出産した女性(4人の患者、すべて陰性と診断)、術後の段階の患者(2人の患者、すべて陰性と診断)、および長期旅行をしたばかりの患者(14人の患者、陽性と診断した1人を除いてすべて陰性と診断)であった。

【0316】

表20. 血栓症の疑いのある796人の患者のうち、血栓症の診断を有する16人を含む、血栓症素因状態を有する113人の患者に対して得た、本発明の方法の診断性能レベル。

【0317】

【表20】

血栓症素因状態を有する患者	血栓症の診断	n	Ddi	炎症 (DOD)	本発明の方法 Ddi ($\mu\text{g/ml}$)	性能レベル
既知のがん (n=58)	陽性	11	5.0	4.7	1.50	100% 真の陽性
	陰性	47	1.7	4.7	0.68	53% 除外
未知のがん (n=21)	陽性	4	6.4	4.2	2.0	100% 真の陽性
	陰性	17	2.0	4.8	0.67	48% 除外
妊娠	陰性	14	0.78	3.8	0.56	93% 除外
出産	陰性	4	0.67	3.5	0.54	100% 除外
術後	陰性	2	1.40	3.9	0.61	100% 除外
旅行 N=14	陽性	1	2.23	8.4	0.58	100% 真の陽性
	陰性	13	0.76	3.7	0.54	93% 除外

【0318】

血栓症素因状態を有する患者において得た結果は、本発明による方法が静脈血栓塞栓症である患者の100%を診断することを可能にすることを明らかに示す。加えて表20に示すとおり、本発明の方法は、がんでない患者の93%より多くを除外することを可能にする。がんである患者において、Dダイマーを定めるための通常の方法による22%と比べて、本発明の方法は患者の50%の除外を可能にする。

【0319】

凝固亢進状態

この研究でテストした凝固亢進状態を有する436人の患者は、血栓形成傾向のある患者(4人の患者、陽性と診断した1人を除いてすべてVTE陰性と診断)、腎不全である患者(26人の患者、陽性と診断した1人を除いてすべて陰性と診断)、外傷、転倒、または骨折をした患者(13人の患者、すべて陰性と診断)、および50歳以上の対象のグループ(393人の対象、陰性と診断した357人および陽性と診断した36人を含む)であった。

【0320】

表21. 血栓症の疑いのある796人の患者のうち、血栓症の診断を有する38人を含む、凝固亢進状態を有する436人の患者に対して得た、本発明の方法の診断性能レベル。

【0321】

【表 2 1】

凝固亢進状態を有する患者	血栓症の診断	n	Ddi	炎症 (DOD)	本発明の方法 Ddi ($\mu\text{g/ml}$)	性能レベル
血栓形成傾向	陽性	1	4.0	4.8	0.82	真の陽性
	陰性	3	0.37	3.8	0.48	100% 除外
腎不全 (RI : Renal insufficiency) 腎症	陽性	1	2.2	8.4	0.58	真の陽性
	陰性	25	3.0	5.1	0.78	50% 除外
外傷、転倒、骨折	陰性	13	1.86	3.9	0.70	77% 除外
年齢 ≥ 50 平均年齢 : 69	陽性	36	2.25	5.0	0.65	100% 真の陽性
	陰性	357	1.21	4.4	0.58	77% 除外、 < 50 歳に対する 94% と比較

10

20

【0322】

凝固性亢進状態を有する患者において得た結果は、本発明による方法が静脈血栓塞栓症である患者の 100% を診断することを可能にすることを明らかに示す。加えて表 2 1 に示すとおり、本発明の方法は、高齢の患者を含む患者の 75% より多くを除外することを可能にする。本発明の方法が除外しなかった高齢の患者のうち 1/3 はがんを有し、2/3 は腎不全または凝固活性化である。

【0323】

凝固活性化状態

この研究でテストした凝固活性化状態を有する 144 人の患者は、感染症または敗血症である患者 (5 人の患者、すべて VTE 陰性と診断)、肺疾患、気管支炎、または呼吸不全である患者 (71 人の患者、陽性と診断した 1 人を除いてすべて陰性と診断)、炎症性疾患である患者 (6 人の患者、すべて陰性と診断)、胃炎である患者 (7 人の患者、すべて陰性と診断)、心筋症である患者 (45 人の患者、陽性と診断した 1 人を除いてすべて陰性と診断)、および脳卒中の病歴のある患者 (10 人の患者、すべて陰性と診断) であった。

30

【0324】

表 2 2 . 血栓症の疑いのある 796 人の患者のうち、血栓症の診断を有する 2 人を含む、凝固活性化状態を有する 144 人の患者に対して得た、本発明による方法の診断性能レベル。

40

【0325】

【表 2 2】

凝固亢進状態を有する患者	血栓症の診断	n	Ddi	炎症 (DOD)	本発明の方法 Ddi ($\mu\text{g/ml}$)	性能レベル
感染症、敗血症	陰性	5	2.88	5.3	0.80	100% 除外
肺疾患、気管支炎、呼吸不全	陽性	1	2.76	9.9	0.56	真の陽性
	陰性	70	0.86	5.0	0.53	83% 除外
炎症性疾患	陰性	6	2.16	4.3	0.85	100% 除外
胃炎	陰性	7	0.72	4.3	0.51	86% 除外
心筋症 (SCA、心不全など)	陽性	1	2.77	4.1	0.65	真の陽性
	陰性	44	1.19	4.3	0.57	66% 除外
HIST 脳卒中	陰性	10	0.74	4.0	0.53	90% 除外

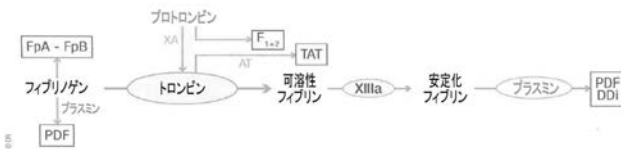
10

【0 3 2 6】

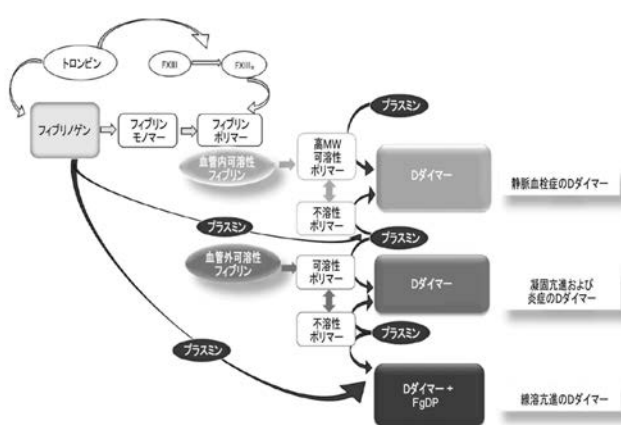
表 2 2 に示すとおり、凝固活性化状態を有する 1 4 4 人の患者において得た結果は、本発明による方法が静脈血栓塞栓症である患者の 1 0 0 % を診断し、加えて陰性の患者の 8 0 % を除外する (平均年齢 8 0 歳の心筋症を有する高齢の患者を除く) ことを可能にすることを明らかに示す。

20

【図 1】



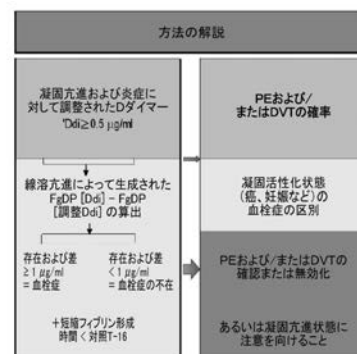
【図 2】



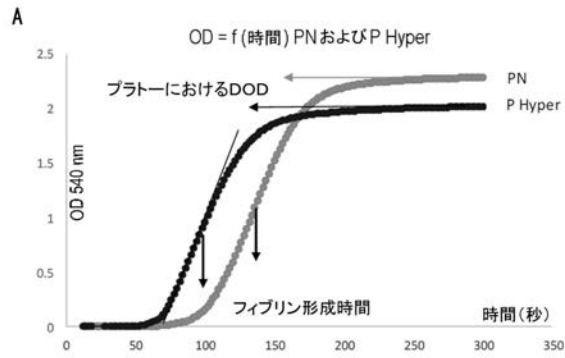
【図 3】

アッセイ			
サンプル	血液	全血	
試薬	Dダイマーラテックス		
測定	540 nmにおけるODの変動		
サンプル	血液	全血	
試薬	TF リン脂質		
	カルシウム		
測定	10分間の 540 nm における ODの変動	5分間の 流体力学的分析 または 画像分析による 物理的特性の変動	

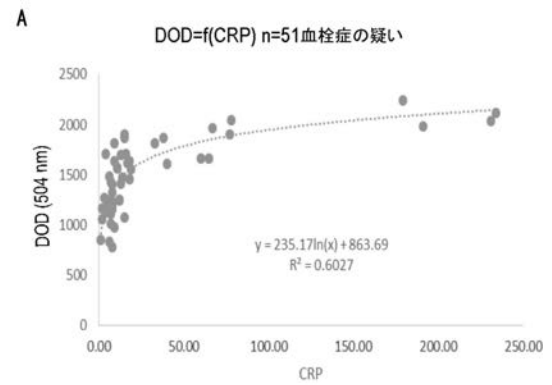
【図 4】



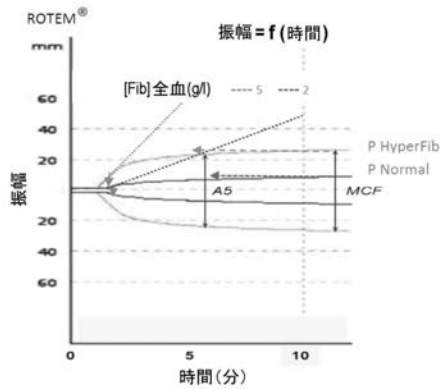
【図 5】



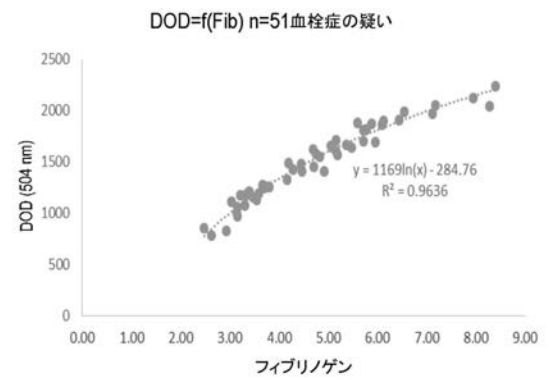
【図 6】



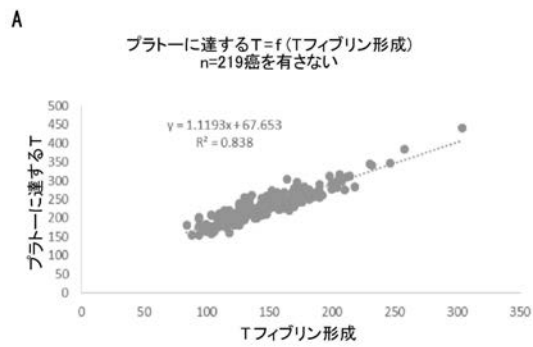
B



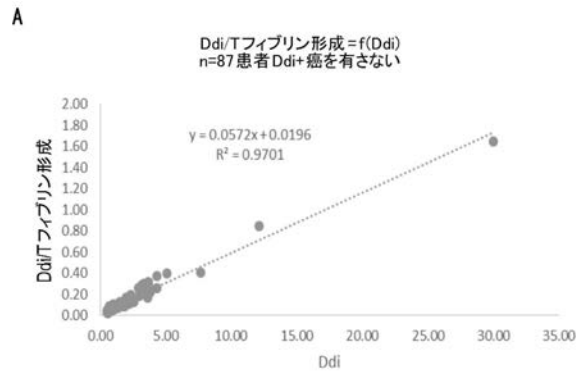
B



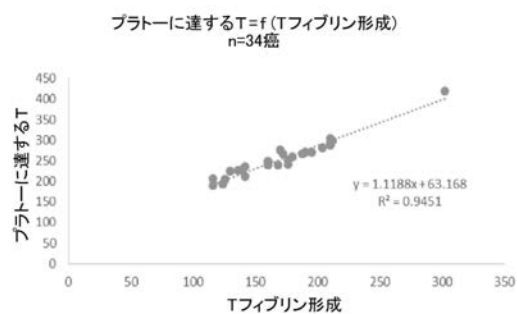
【図 7】



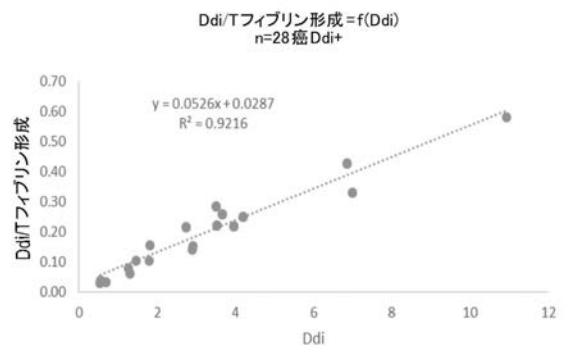
【図 8】



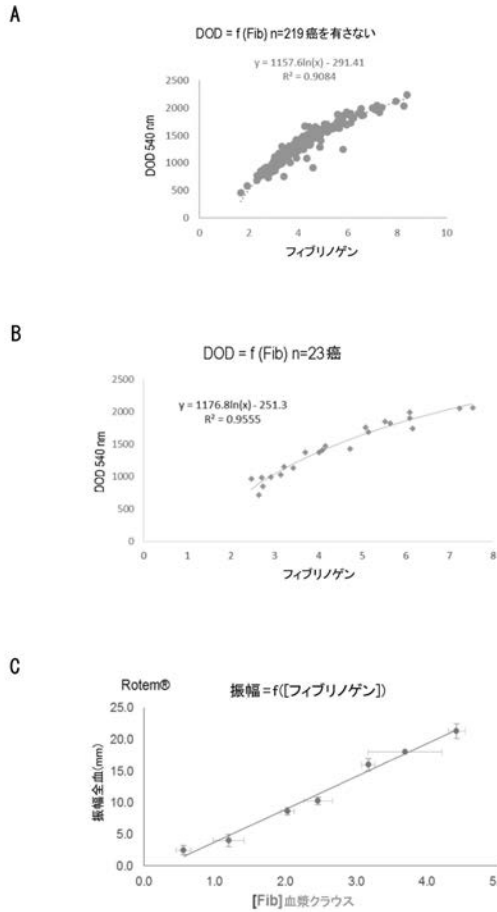
B



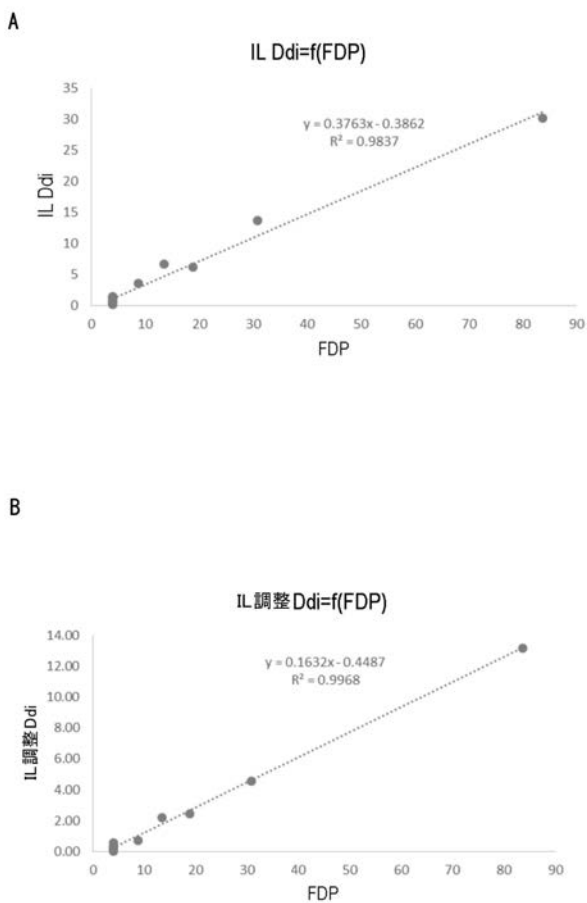
B



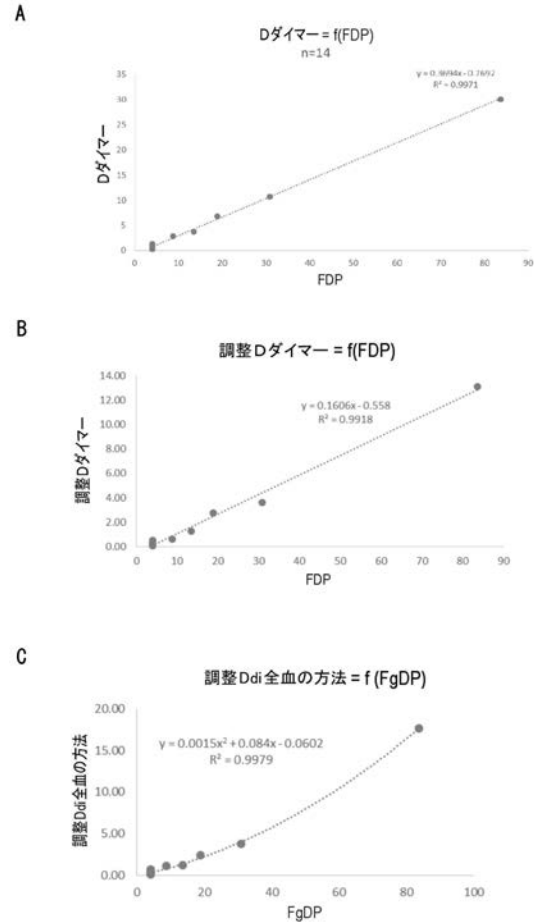
【図 9】



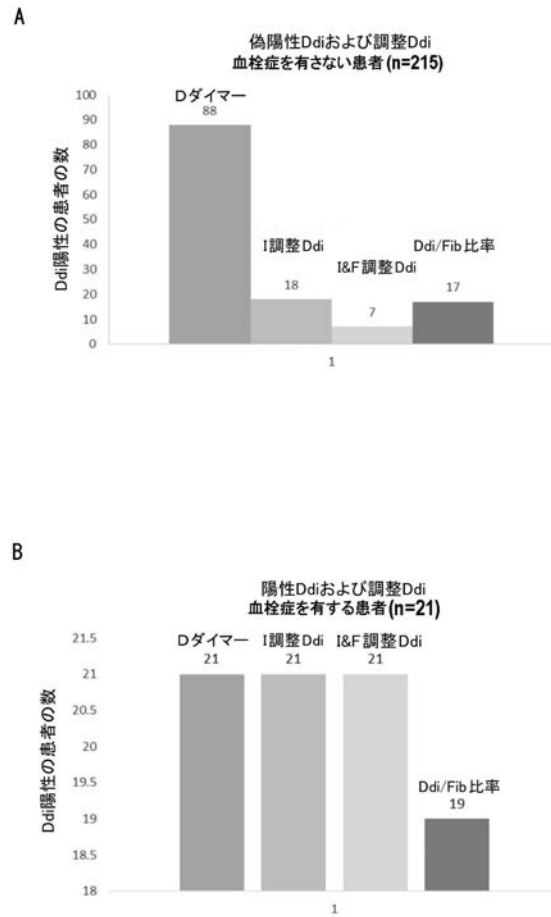
【図 1 1】



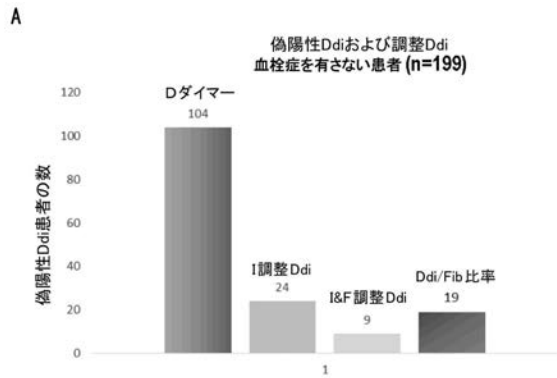
【図 1 0】



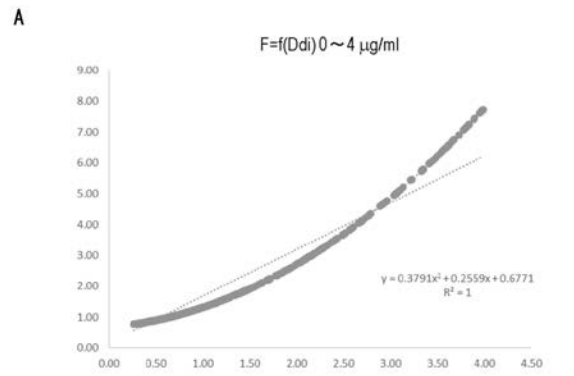
【図 1 2】



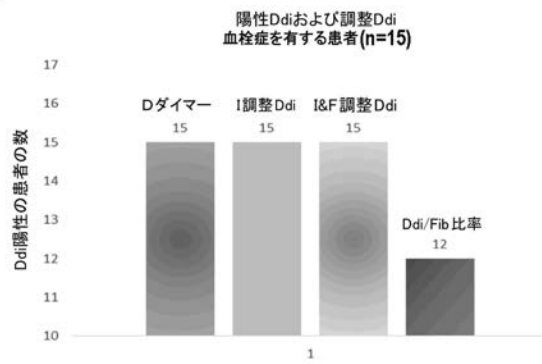
【図 1 3】



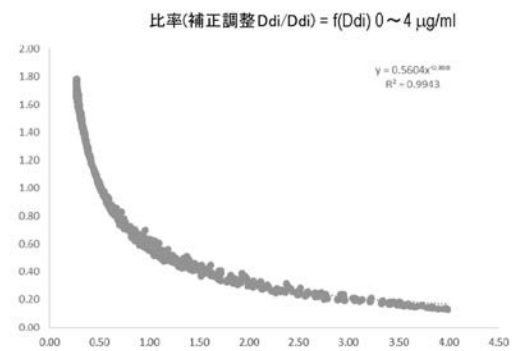
【図 1 4】



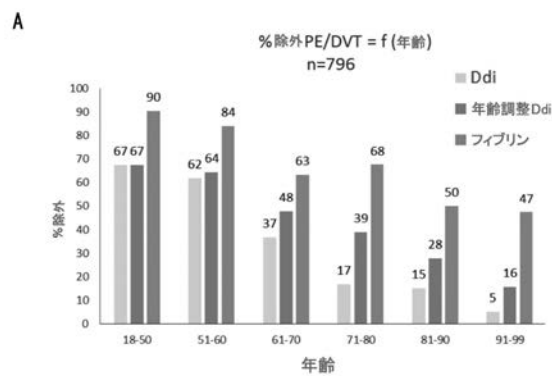
B



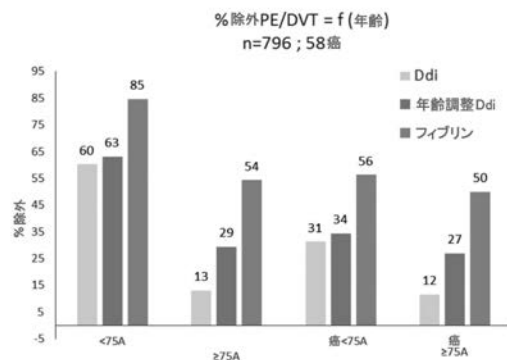
B



【図 1 5】



B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/050354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/56 G01N33/86
ADD.

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)

C12Q 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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/270243 A1 (ROBINSON VINCENT J B [US]) 25 October 2012 (2012-10-25) abstract paragraph [0113] -----	1-36
A	WO 2011/022054 A2 (MED COLLEGE GEORGIA RES INST [US]; ROBINSON VINCENT J B [US]) 24 February 2011 (2011-02-24) abstract page 22, line 11 - line 21 -----	1-36
A	US 2004/029286 A1 (KORTE WOLFGANG [CH]) 12 February 2004 (2004-02-12) abstract paragraph [0005] ----- -/-	1-36

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family 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 application or patent 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

10 April 2017

Date of mailing of the international search report

21/04/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jacques, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/050354

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Swaroopu Pulivarthi: "Effectiveness of D-Dimer as a Screening Test for Venous Thromboembolism: An Update", 31 October 2014 (2014-10-31), XP055282367, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4215485/ [retrieved on 2016-06-21] the whole document -----	1-36
A	M. RIGHINI ET AL: "D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 6, no. 7, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 1059-1071, XP055093339, ISSN: 1538-7933, DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.02981.x the whole document -----	1-36
A	RODGER MARC A ET AL: "Clinical Decision Rules and D-dimer in Venous Thromboembolism: Current controversies and future research priorities", THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, vol. 134, no. 4, 4 August 2014 (2014-08-04), pages 763-768, XP029060134, ISSN: 0049-3848, DOI: 10.1016/J.THROMRES.2014.07.031 the whole document -----	1-36
A	WO 2016/012729 A1 (STAGO DIAGNOSTICA [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV GRENOBLE I J) 28 January 2016 (2016-01-28) the whole document -----	1-36
A	HALABY RIM ET AL: "d-Dimer elevation and adverse outcomes", JOURNAL OF THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 39, no. 1, 9 July 2014 (2014-07-09), pages 55-59, XP035431589, ISSN: 0929-5305, DOI: 10.1007/S11239-014-1101-6 [retrieved on 2014-07-09] the whole document -----	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2017/050354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012270243 A1	25-10-2012	NONE	
WO 2011022054 A2	24-02-2011	EP 2467495 A2 WO 2011022054 A2	27-06-2012 24-02-2011
US 2004029286 A1	12-02-2004	AT 349703 T CA 2436716 A1 DE 60310655 T2 EP 1391733 A1 ES 2275980 T3 JP 4181459 B2 JP 2004163406 A US 2004029286 A1	15-01-2007 09-02-2004 15-11-2007 25-02-2004 16-06-2007 12-11-2008 10-06-2004 12-02-2004
WO 2016012729 A1	28-01-2016	FR 3024237 A1 WO 2016012729 A1	29-01-2016 28-01-2016

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050354

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12Q1/56 G01N33/86
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2012/270243 A1 (ROBINSON VINCENT J B [US]) 25 octobre 2012 (2012-10-25) abrégé alinéa [0113]	1-36
A	----- WO 2011/022054 A2 (MED COLLEGE GEORGIA RES INST [US]; ROBINSON VINCENT J B [US]) 24 février 2011 (2011-02-24) abrégé page 22, ligne 11 - ligne 21	1-36
A	----- US 2004/029286 A1 (KORTE WOLFGANG [CH]) 12 février 2004 (2004-02-12) abrégé alinéa [0005]	1-36
	----- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
 "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
 "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
 "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 avril 2017

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/04/2017

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Jacques, Patrice

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050354

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	Swaroop Pulivarthi: "Effectiveness of D-Dimer as a Screening Test for Venous Thromboembolism: An Update", 31 octobre 2014 (2014-10-31), XP055282367, Extrait de l'Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4215485/ [extrait le 2016-06-21] le document en entier -----	1-36
A	M. RIGHINI ET AL: "D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 6, no. 7, 1 juillet 2008 (2008-07-01) , pages 1059-1071, XP055093339, ISSN: 1538-7933, DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.02981.x le document en entier -----	1-36
A	RODGER MARC A ET AL: "Clinical Decision Rules and D-dimer in Venous Thromboembolism: Current controversies and future research priorities", THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, vol. 134, no. 4, 4 août 2014 (2014-08-04), pages 763-768, XP029060134, ISSN: 0049-3848, DOI: 10.1016/J.THROMRES.2014.07.031 le document en entier -----	1-36
A	WO 2016/012729 A1 (STAGO DIAGNOSTICA [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV GRENOBLE I J) 28 janvier 2016 (2016-01-28) le document en entier -----	1-36
A	HALABY RIM ET AL: "d-Dimer elevation and adverse outcomes", JOURNAL OF THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 39, no. 1, 9 juillet 2014 (2014-07-09), pages 55-59, XP035431589, ISSN: 0929-5305, DOI: 10.1007/S11239-014-1101-6 [extrait le 2014-07-09] le document en entier -----	1-36

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050354

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2012270243 A1	25-10-2012	AUCUN	
WO 2011022054 A2	24-02-2011	EP 2467495 A2 WO 2011022054 A2	27-06-2012 24-02-2011
US 2004029286 A1	12-02-2004	AT 349703 T CA 2436716 A1 DE 60310655 T2 EP 1391733 A1 ES 2275980 T3 JP 4181459 B2 JP 2004163406 A US 2004029286 A1	15-01-2007 09-02-2004 15-11-2007 25-02-2004 16-06-2007 12-11-2008 10-06-2004 12-02-2004
WO 2016012729 A1	28-01-2016	FR 3024237 A1 WO 2016012729 A1	29-01-2016 28-01-2016

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

F ターム(参考) 2G045 AA10 AA13 AA25 AA26 BA13 BB10 CA24 CA25 CA26 CA27
DA20 DA36 DA39 DA40 DA41 FA11 FA29 FB01 FB03 FB12
FB15 GC03 GC04 GC10 GC15 JA01 JA02 JA07 JA10
4H045 AA11 AA30 DA76 EA50

專利名称(译)	測定静脉血栓栓塞特异性D-二聚体的方法及其在诊断肺栓塞和深静脉血栓形成中的用途		
公开(公告)号	JP2019507345A	公开(公告)日	2019-03-14
申请号	JP2018543373	申请日	2017-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	斯塔戈诊断公司		
[标]发明人	コンタントジュヌヴィエーヴ		
发明人	コンタント ジュヌヴィエーヴ ボーペレ フランソワーズ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/86 G01N33/536 C07K14/745 C07K16/36		
CPC分类号	C12Q1/56 G01N33/86 G01N2800/226		
FI分类号	G01N33/53.L G01N33/86 G01N33/536.A C07K14/745 C07K16/36		
F-TERM分类号	2G045/AA10 2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB10 2G045/CA24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CA27 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA39 2G045/DA40 2G045/DA41 2G045/FA11 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC03 2G045/GC04 2G045/GC10 2G045/GC15 2G045/JA01 2G045/JA02 2G045/JA07 2G045/JA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	藤田和子		
优先权	2016051348 2016-02-18 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种测定血液样品中血管内纤维蛋白降解引起的静脉血栓栓塞特异性D-二聚体的方法，所述方法包括：包括常规检测和动态测量样品中纤维蛋白的形成。该方法可用于排除患者的肺栓塞或深静脉血栓形成和/或诊断患者的血栓形成或凝血活化或血栓形成。 【选择图表】 无

(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2019-507345 (P2019-507345A)
	(43) 公表日	平成31年3月14日 (2019.3.14)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	L 2G045
G01N 33/86 (2006.01)	G01N 33/86	A 4H045
G01N 33/536 (2006.01)	G01N 33/536	
C07K 14/745 (2006.01)	C07K 14/745	
C07K 16/36 (2006.01)	C07K 16/36	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁)	
(21) 出願番号	特願2018-543373 (P2018-543373)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成28年2月17日 (2017.2.17)	ダイアグノスティカ スターゴ
(85) 翻訳文提出日	平成30年10月16日 (2018.10.16)	フランス国 エフー 92600 アニエール
(86) 国際出願番号	PCT/FR2017/050354	シュル セーヌ アレー テレーザ 3
(87) 国際公開番号	W02017/140989	(74) 代理人
(87) 国際公開日	平成28年8月24日 (2017.8.24)	100116872
(31) 優先権主張番号	1651348	弁理士 藤田 和子
(32) 優先日	平成28年2月18日 (2016.2.18)	コンタント ジュヌヴィエーヴ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	フランス国 92400 クルブポア アヴェニユ デ ヴァネット 3
		ボーペレ フランソワーズ
		フランス国 95600 オーボンヌ リュ ガンベッタ 36
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	静脈血栓塞栓症に対して特異的なDダイマーをアッセイするための方法、ならびに肺塞栓症および深部静脈血栓症を診断するためのその使用	