

(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2005-520170

(P2005-520170A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
**G01N 33/53**  
**// C12Q 1/68**

F I  
 G O 1 N 33/53 L  
 C 1 2 Q 1/68 Z N A A

テーマコード (参考)  
 4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2003-580871 (P2003-580871)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成14年6月28日 (2002.6.28)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成16年2月13日 (2004.2.13)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2002/020618</p> <p>(87) 国際公開番号 W02003/083490</p> <p>(87) 国際公開日 平成15年10月9日 (2003.10.9)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/302,261</p> <p>(32) 優先日 平成13年6月29日 (2001.6.29)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/318,755</p> <p>(32) 優先日 平成13年9月11日 (2001.9.11)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 502073946                  バイオメリュー・インコーポレイテッド                  bioMerieux, Inc.                  アメリカ合衆国27712ノースカロライ                  ナ州ダーラム、ロドルフ・ストリート10                  0番</p> <p>(74) 代理人 100083806                  弁理士 三好 秀和</p> <p>(72) 発明者 オーテル、 トーマス エル.                  アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チ                  ャペル ヒル</p> <p>(72) 発明者 スー、 ツォウウェイ                  アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2                  7712 ダーラム</p>
--	---

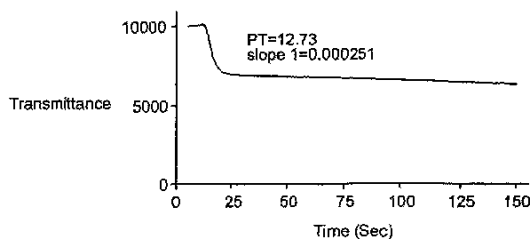
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者における抗リン脂質抗体症候群の可能性の上昇を予測するための方法

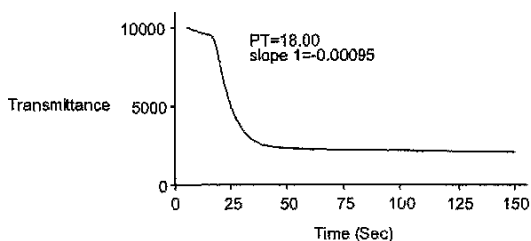
(57) 【要約】

個体が抗リン脂質抗体症候群を有しているか、または抗リン脂質抗体症候群を有する可能性が高まっていることを予測するための方法であって： a) 個体からの被験サンプルを提供すること； b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること； c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして経時的に光散乱または透過率をモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること； d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで個体が抗リン脂質抗体症候群を有しているかまたは抗リン脂質抗体症候群のリスクが上昇していることを決定すること；を含む方法。リン脂質を凝固試薬の一部として、または凝固が活性化されていない試薬の一部として提供することができる。タンパク質に結合するリン脂質に対する特定の抗体のための確認アッセイを実施することができる。

A



B



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体が抗リン脂質抗体症候群を有している可能性の上昇を予測するための方法であって

- ：
- a) 個体からの被験サンプルを提供すること；
  - b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；
  - c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；
  - d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで個体で抗リン脂質抗体症候群の可能性が上昇していることを決定すること；
- を含んでなる方法。

## 【請求項 2】

時間依存的測定がサンプルを通る吸光度及び/または透過率の変化の経時的な光学的測定である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

サンプルが個体の全血または血漿サンプルである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

トロンボプラスチンを含んでなる凝固試薬の一部としてリン脂質を加える請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

凝固試薬がプロトロンビン時間試薬である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

リン脂質が非二重層配列を含む種々の構造のリン脂質の異種性混合物である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

リン脂質が天然供給源に由来する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

凝固試薬が組織因子、ハライド塩及びリン脂質の混合物を含んでなる請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 9】

2 価金属カチオンまたは 2 価金属カチオンの塩をリン脂質と一緒に添加することをさらに含んでなる請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

抗リン脂質抗体の存在を決定するために少なくとも 1 つの確認アッセイを実施することをさらに含んでなる請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

少なくとも 1 つの確認アッセイがラテックス・イムノアッセイまたは E L I S A である請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

少なくとも 1 つのイムノアッセイが少なくとも 1 つの抗<sub>2</sub>糖タンパク質、抗プロトロンビン及び抗カルジオリピン抗体に関するアッセイを含んでなる請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 13】

個体が経口抗凝固剤を摂取しているヒトである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

抗リン脂質抗体が確認アッセイで認められる場合、経口抗凝固剤治療を開始することをさらに含んでなる請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 15】

10

20

30

40

50

時間依存的測定プロファイルが光学透過率プロファイルである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

光学透過率プロファイルが写真 - 光学凝固分析器で作成される請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

個体が自然流産または血栓塞栓性事象を経験した者である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

A P T T が凝固時間の延長を呈するかどうかを決定するために個体からのサンプルでさらに A P T T アッセイを実施することを含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

少なくとも 1 つの確認アッセイが基準： a ) リン脂質依存的スクリーニングアッセイの延長； b ) プールされた正常血漿との 1 : 1 混合物を用いる延長されたアッセイの修正の欠如；及び c ) 過剰のリン脂質の添加による延長されたアッセイの修正；に従って A P L A を同定するための確認アッセイである請求項 10 に記載の方法。

10

【請求項 20】

リン脂質が凝固試薬の一部として添加されない請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

A P T T 試薬で時間依存的測定プロファイルを誘導すること、及び時間依存的測定で負の勾配 1 があるかどうかを決定することを含んでなる確認アッセイを実行する請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 22】

血小板中和試験である確認アッセイを実行する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

予め決定された値または閾値を超えた A P T T 時間依存的測定で勾配 1 がない場合、次いでイムノアッセイであるさらなる確認アッセイを実施する請求項 21 の方法。

【請求項 24】

イムノアッセイが抗<sub>2</sub>糖タンパク質、抗プロトロンビン及び抗カルジオリピン抗体に関する E L I S A である請求項 23 の方法。

【請求項 25】

小胞またはリポソームがラッセルクサリヘビ毒を含んでなる D R V V T D R V V T 試薬の一部である請求項 1 の方法。

30

【請求項 26】

値または勾配が予め決定された閾値を超える場合、次いで被験サンプルが C 反応性タンパク質または L C - C R P を含んでなるかどうかを決定する請求項 1 の方法。

【請求項 27】

被験サンプルが C 反応性タンパク質を含んでなるかどうかを決定することが、ホスホリルコリンの存在下及び不在下で A P T T アッセイを実施することを含んでなる請求項 26 の方法。

【請求項 28】

負の A P T T 勾配があり、そしてこれがホスホリルコリンによりにより阻害されない場合、A P L A に関する確認試験を実施する請求項 27 の方法。

40

【請求項 29】

リン脂質がホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン及び/またはホスファチジリンイノシトールである請求項 1 の方法。

【請求項 30】

勾配または値を決定する前に金属塩の形態の金属カチオンを添加することをさら含んでなる請求項 29 の方法。

【請求項 31】

複数のホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン及びホスファチジリンイノシトールを被験サンプルに添加する請求項 29 の方法。

50

- 【請求項 3 2】  
被験サンプルが個体から精製された I g G である請求項 1 の方法。
- 【請求項 3 3】  
値または勾配を決定する前にリン脂質結合タンパク質を被験サンプルに添加することをさらに含んでなる請求項 3 2 の方法。
- 【請求項 3 4】  
リン脂質結合タンパク質が<sub>2</sub>糖タンパク質 1、カルジオリピンまたはプロトロンビンである請求項 3 3 の方法。
- 【請求項 3 5】  
値または勾配を決定する前に凝固試薬を被験サンプルに添加することをさらに含んでなる請求項 3 3 の方法。 10
- 【請求項 3 6】  
個体が播種性血管内凝固の患者ではない請求項 1 の方法。
- 【請求項 3 7】  
リン脂質が哺乳動物組織に由来する試薬の一部である請求項 1 の方法。
- 【請求項 3 8】  
組織が脳または胎盤である請求項 3 7 の方法。
- 【請求項 3 9】  
金属カチオンの供給源の不在下でリン脂質を添加する請求項 1 の方法。
- 【請求項 4 0】  
リン脂質がプロトロンビン時間試薬の一部である請求項 1 の方法。 20
- 【請求項 4 1】  
APLA に対してさらに感受性があるリン脂質で再度請求項 1 の方法を実施することをさらに含んでなる請求項 1 の方法。
- 【請求項 4 2】  
少なくとも 1 つのイムノアッセイが抗<sub>2</sub>糖タンパク質に関するアッセイを含んでなる請求項の方法。
- 【請求項 4 3】  
少なくとも 1 つのイムノアッセイが抗プロトロンビンに関するアッセイを含んでなる請求項 1 2 の方法。 30
- 【請求項 4 4】  
少なくとも 1 つのイムノアッセイが抗<sub>2</sub>糖タンパク質及び抗プロトロンビンに関するアッセイを含んでなる請求項 1 2 の方法。
- 【請求項 4 5】  
少なくとも 1 つのイムノアッセイが抗カルジオリピン抗体に関するアッセイを含んでなる請求項 1 2 の方法。
- 【請求項 4 6】  
被験サンプルが経口抗凝固剤の投与を受けている個体に由来し、そしてプロトロンビンをリン脂質と一緒に被験サンプルに添加する請求項 1 の方法。
- 【請求項 4 7】  
リン脂質結合タンパク質の存在を決定するために確認アッセイを実施することをさらに含んでなる請求項 1 に記載の方法。 40
- 【請求項 4 8】  
確認アッセイが<sub>2</sub>糖タンパク質、プロトロンビンまたは抗カルジオリピンに関するアッセイである請求項 4 7 の方法。
- 【請求項 4 9】  
被験サンプルをリン脂質と組み合わせ、そして凝固試薬を被験サンプルに添加しないで時間依存的測定プロファイルが得られる請求項 1 の方法。
- 【請求項 5 0】  
抗リン脂質抗体の存在の可能性の上昇を決定した後に、a) リン脂質依存的スクリーニ 50

ングアッセイの延長；b) プールされた正常血漿との1：1混合物を用いる延長されたアッセイの修正の欠如；及びc) 過剰のリン脂質の添加による延長されたアッセイの修正；を含んでなる確認アッセイを実施する請求項1の方法。

【請求項51】

予め決定された閾値を越えた勾配1が検出される場合、リン脂質抗体の存在の可能性の上昇を決定した後に、個体からの被験サンプルにリン脂質を少なくとも1つのリン脂質結合タンパク質と一緒に添加すること、サンプルに関して時間依存的測定プロファイルを実施すること、及び検出された最初の勾配1と比較して勾配1の増加があるかまたはないかを決定することを含んでなる確認アッセイを実施する請求項1の方法。

【請求項52】

添加したリン脂質がPTまたはAPTT試薬の一部ではない請求項1の方法。

【請求項53】

勾配1が予め決定された閾値を越えて検出される場合、再度1つのリン脂質結合タンパク質を添加して請求項1の方法を実施し、そして別のリン脂質結合タンパク質を添加してさらに再度請求項1の方法を実施し、そして各々の添加試験に関して勾配1における増加があるかどうかを決定することをさらに含んでなる請求項1の方法。

【請求項54】

勾配1が予め決定された閾値を越えて検出される場合、確認試験としてDRVVT試験を実施することをさらに含んでなる請求項1の方法。

【請求項55】

リン脂質がPC及びPSを含んでなる請求項1の方法。

【請求項56】

リン脂質がさらにPEを含んでなる請求項55の方法。

【請求項57】

PSが全リン脂質の10%またはそれ以上である請求項56の方法。

【請求項58】

PSが全リン脂質の15%またはそれ以上である請求項54の方法。

【請求項59】

PSが全リン脂質の25%またはそれ以上である請求項58の方法。

【請求項60】

PCが全リン脂質の少なくとも40%である請求項56の方法。

【請求項61】

PCが全リン脂質の少なくとも60%である請求項60の方法。

【請求項62】

PCが全リン脂質の40%から70%である請求項61の方法。

【請求項63】

PEが全リン脂質の少なくとも5%である請求項56の方法。

【請求項64】

PEが全リン脂質の少なくとも15%である請求項63の方法。

【請求項65】

PEが全リン脂質の5から50%である請求項63の方法。

【請求項66】

PEが全リン脂質の5から30%である請求項65の方法。

【請求項67】

全リン脂質のPSが10%から30%、PCが40%から70%及びPEが5%から50%である請求項56の方法。

【請求項68】

凝固試薬がトロンビン時間試薬である請求項4に記載の方法。

【請求項69】

凝固試薬が希釈されたラッセルクサリヘビ毒試薬である請求項4に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 70】

凝固試薬が活性化部分トロンボプラスチン時間試薬である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 71】

凝固試薬がヘビ毒及びリン脂質を含んでなる試薬である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 72】

リン脂質が、抗リン脂質抗体症候群を有する患者の大部分で予め決定された閾値を越えて勾配 1 を引き起こすのに十分なリン脂質である請求項 1 の方法。

## 【請求項 73】

時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えることが決定される場合、次いで試験サンプルが、抗リン脂質抗体症候群を有している可能性が上昇している個体からのサンプルであるとして合図される請求項 1 の方法。

10

## 【請求項 74】

方法を実施する分析器と接続したプリンターで警告を印刷することにより合図を実施する請求項 73 の方法。

## 【請求項 75】

方法を実施する分析器と接続したモニターで警告を表示することにより合図を実施する請求項 73 の方法。

## 【請求項 76】

個体が抗リン脂質抗体症候群を有している可能性が上昇していることを予測するための方法であって：

20

a) 個体からの被験サンプルを提供すること；

b) 被験サンプルを、リン脂質を含んでなる凝固試薬と組み合わせること；

c) フィブリン重合の形成を経時的にモニター観察して、時間依存的測定プロファイルを提供すること；

d) 時間依存的測定プロファイルのデータを十分に定義する 1 つまたはそれ以上の予測変数のセットを定義すること；

e) 抗リン脂質抗体症候群と 1 つまたはそれ以上の予測変数との関係を示すモデルを誘導すること；及び

f) 工程 e) のモデルを利用して個体における抗リン脂質抗体症候群の可能性の上昇を予測すること；

30

を含んでなる方法。

## 【請求項 77】

凝固試薬が P T 試薬である請求項 76 に記載の方法。

## 【請求項 78】

工程 a) から e) を A P T T 試薬を用いて繰り返すことをさらに含んでなる請求項 77 に記載の方法。

## 【請求項 79】

P T 試薬を使用する場合、1 つまたはそれ以上の予測変数が凝血開始前の勾配、凝固後の勾配及び血塊形成の開始時間を含む請求項 78 に記載の方法。

40

## 【請求項 80】

A P T T 試薬を使用する場合、1 つまたはそれ以上の予測変数が 1 つまたはそれ以上の凝固発現に相当する時間、凝固の midpoint に相当する時間、凝固の終点に相当する時間、及び凝血開始前の値または勾配を含む請求項 79 に記載の方法。

## 【請求項 81】

予測変数が凝固時間または I N R、及び血塊形成の開始前の勾配を含む請求項 76 に記載の方法。

## 【請求項 82】

リン脂質を含んでなる凝固試薬がプロトロンビン時間試薬である請求項 76 の方法。

## 【請求項 83】

50

1つまたはそれ以上のパラメーターが勾配1、 $t_{min2}$ 、 $t_{min1}$ 、 $t_{max2}$ 、勾配3及び変化量である請求項82の方法。

【請求項84】

個体が経口抗凝固治療を受けていない個体である請求項83の方法。

【請求項85】

1つまたはそれ以上のパラメーターが勾配1、 $t_{min2}$ 、 $t_{min1}$ 及び $t_{max2}$ である請求項82の方法。

【請求項86】

1つまたはそれ以上のパラメーターが勾配1、 $t_{min2}$ 、 $m_{in2}$ 、 $t_{min1}$ 、 $t_{max2}$ 、 $m_{ax2}$ 、勾配3及び変化量である請求項82の方法。

10

【請求項87】

個体が経口抗凝固治療を受けている個体である請求項86の方法。

【請求項88】

時間依存的測定プロファイルが少なくとも1つの光学プロファイルである請求項76の方法。

【請求項89】

光学プロファイルが血栓症及び止血試験のための自動分析器により提供される請求項88の方法。

【請求項90】

工程fの後、予測された抗リン脂質抗体症候群を確認するための1つまたはそれ以上のアッセイを実施する請求項76の方法。

20

【請求項91】

1つまたはそれ以上の確認アッセイが抗リン脂質抗体に関する1つまたはそれ以上のイムノアッセイである請求項90の方法。

【請求項92】

モデルが神経ネットワークである請求項76の方法。

【請求項93】

リン脂質がホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン及び/またはホスファチジリノシトールである請求項76の方法。

【請求項94】

勾配または値を決定する前に金属塩の形態の金属カチオンを添加することをさら含んでなる請求項93の方法。

30

【請求項95】

複数のホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン及びホスファチジリノシトールを被験サンプルに添加する請求項93の方法。

【請求項96】

被験サンプルが個体から精製されたIgGである請求項76の方法。

【請求項97】

値または勾配を決定する前にリン脂質結合タンパク質を被験サンプルに添加することをさらに含んでなる請求項96の方法。

40

【請求項98】

リン脂質結合タンパク質が<sub>2</sub>糖タンパク質1、カルジオリピンまたはプロトンピンである請求項97の方法。

【請求項99】

値または勾配を決定する前にさらに凝固試薬の一部としてリン脂質を被験サンプルに添加する請求項97の方法。

【請求項100】

個体が播種性血管内凝固の患者ではない請求項76の方法。

【請求項101】

リン脂質が哺乳動物組織に由来する試薬の一部である請求項76の方法。

50

## 【請求項 102】

組織が脳または胎盤である請求項 101 の方法。

## 【請求項 103】

金属カチオンの供給源の不在下でリン脂質を添加する請求項 76 の方法。

## 【請求項 104】

リン脂質がプロトロンビン時間試薬の一部である請求項 76 の方法。

## 【請求項 105】

1 つまたはそれ以上のイムノアッセイが抗<sub>2</sub>糖タンパク質、抗プロトロンビン及び/または抗カルジオリピン抗体に関するイムノアッセイである請求項 91 の方法。

## 【請求項 106】

個体が抗リン脂質抗体症候群を有している可能性が上昇していることを示すこれらの被験サンプルにおいて第 2 のアッセイを実施することをさらに含んでなり、第 2 のアッセイの結果は個体が抗リン脂質抗体症候群を有している可能性を上昇させることができる請求項 1 の方法。

## 【請求項 107】

少なくとも 1 つの時間依存的測定プロファイルから個体の抗リン脂質抗体症候群を予測するための方法であって、

a) 個体からの被験サンプルをリン脂質と組み合わせ、そして被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；

b) 時間依存的測定プロファイルのデータを十分に定義する 1 つまたはそれ以上の予測変数のセットを定義すること；

c) 抗リン脂質抗体症候群と 1 つまたはそれ以上の予測変数との関係を示すモデルを誘導すること；及び

d) 工程 c) のモデルを利用して個体における抗リン脂質抗体症候群の存在を予測すること；

を含んでなる方法。

## 【請求項 108】

1 つまたはそれ以上の予測変数が凝血開始前のプロファイルの値または勾配の低下を含む請求項 107 に記載の方法。

## 【請求項 109】

1 つまたはそれ以上の予測変数がさらに 1 つまたはそれ以上の：プロファイルの第 1 誘導の最低値、第 1 誘導の最低値の時間指数、プロファイルの第 2 誘導の最低値、第 2 誘導の最低値の時間指数、プロファイルの第 2 誘導の最大値、第 2 誘導の最大値の時間指数、未知サンプルの時間依存的測定中の凝固パラメーターにおける全体的な変化、凝固時間、及び血塊形成後のプロファイルの勾配を含む複数の変数である請求項 108 に記載の方法。

## 【請求項 110】

少なくとも 1 つの該時間依存的測定プロファイルが少なくとも 1 つの光学プロファイルである請求項 109 に記載の方法。

## 【請求項 111】

少なくとも 1 つの該光学プロファイルが血栓症及び止血試験のための自動分析器により提供される請求項 110 に記載の方法。

## 【請求項 112】

未知のサンプルにおいて 1 つまたはそれ以上の波長で複数の光学測定を経時的に行って、少なくとも 1 つの該光学プロファイルを誘導し、該光学測定は光散乱及び/または光吸光度の変化に対応する請求項 111 に記載の方法。

## 【請求項 113】

複数の光学測定を経時的に行って、少なくとも 1 つの該光学プロファイルを誘導し、そして複数の該光学測定は各々第 1 の光学測定値に正規化される請求項 112 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

## 【請求項 1 1 4】

工程 a) で少なくとも 1 つの該光学プロファイルが該分析器により自動的に提供され、それによりサンプル容器から試験ウェルに自動プローブにより該サンプルが自動的に除去され、1 つまたはそれ以上の試薬が該試験ウェルに自動的に添加されて該適当な変化が該サンプル内で開始され、そして該特性の進行が自動的に光学的に経時的にモニター観察されて該光学データプロファイルが誘導される請求項 1 1 0 に記載の方法。

## 【請求項 1 1 5】

工程 d) の後、予測された抗リン脂質抗体症候群が自動的に該自動分析器のメモリーに蓄積され、及び/または該自動分析器で表示される請求項 1 1 4 に記載の方法。

10

## 【請求項 1 1 6】

工程 d) の後、予測された抗リン脂質抗体症候群を確認するための 1 つまたはそれ以上のアッセイを実施する請求項 1 1 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 1 7】

1 つまたはそれ以上の確認アッセイが抗リン脂質抗体に関する 1 つまたはそれ以上のイムノアッセイを含んでなる請求項 1 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 1 1 8】

工程 c) の該モデルが神経ネットワークである請求項 1 0 7 に記載の方法。

## 【請求項 1 1 9】

工程 c) の該関係が少なくとも 1 つの自動化アルゴリズムにより決定される請求項 1 0 7 に記載の方法。

20

## 【請求項 1 2 0】

該モデルが多層パーセプトロンであり、そして少なくとも 1 つの該アルゴリズムが逆伝搬学習アルゴリズム (back propagation learning algorithm) である請求項 1 1 9 に記載の方法。

## 【請求項 1 2 1】

工程 a) で複数の時間依存的測定プロファイルが工程 b) での使用のために誘導される請求項 1 0 7 に記載の方法。

## 【請求項 1 2 2】

複数の該時間依存的測定プロファイルが P T 試薬、A P T T 試薬、フィブリノーゲン試薬及び T T 試薬で開始されるアッセイからの少なくとも 2 つのプロファイルを含む請求項 1 2 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 1 2 3】

サンプルが医学的患者に由来し、そして工程 d) で双方の該モデル及びさらなる患者の医学的データを利用し個体における抗リン脂質抗体症候群を予測する請求項 1 0 7 に記載の方法。

## 【請求項 1 2 4】

1 つまたはそれ以上の確認アッセイが基準： a) リン脂質依存的スクリーニングアッセイの延長； b) プールされた正常血漿との 1 : 1 混合物を用いる延長されたアッセイの修正の欠如；及び c) 過剰のリン脂質の添加による延長されたアッセイの修正；に従って A P L A を同定するための確認アッセイである請求項 1 1 6 に記載の方法。

40

## 【請求項 1 2 5】

被験対象における血栓症のリスクが上昇していることを予測するための方法であって、  
 a) 個体からの被験サンプルを提供すること；  
 b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；  
 c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そしてサンプルを通る光の透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；  
 d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで被験対象の血栓症の

50

リスクが上昇していることを決定すること；  
を含んでなる方法。

【請求項 1 2 6】

光ビームが自動凝固計の単色光光源に由来する請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

サンプルが個体の全血または血漿サンプルである請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

リン脂質がトロンボプラスチンを含んでなる凝固試薬の一部である請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

凝固試薬が P T 試薬である請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

リン脂質が小胞またはリポソームである請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

リン脂質を凝固試薬の一部として被験サンプルに加えない請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

リン脂質がトロンボプラスチン及びハライド塩を含んでなる凝固試薬の一部である請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

金属カチオンまたは金属カチオンの塩を添加することをさらに含んでなる請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

抗リン脂質抗体の存在を決定するために少なくとも 1 つの確認アッセイを実施することをさらに含んでなる請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

少なくとも 1 つのアッセイがラテックス・イムノアッセイまたは E L I S A である請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

少なくとも 1 つの確認アッセイが抗<sub>2</sub>糖タンパク質、抗プロトロンビン及び抗カルジオリピン抗体に関するアッセイである請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

個体が経口抗凝固剤を投与されている請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

抗リン脂質抗体が決定される場合、個体を経口抗凝固剤で処置することをさらに含んでなる請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

時間依存的測定プロファイルが光学透過率プロファイルである請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

光学透過率プロファイルが写真 - 光学凝固分析器で作成される請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

個体が自然流産または血栓塞栓性事象を経験した者である請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

A P T T が凝固時間の延長を呈するかどうかを決定するために個体からのサンプルで A P T T アッセイを実施することをさらに含んでなる請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

抗リン脂質抗体症候群を有する個体の治療をモニター観察するための方法であって、

a) A P S を有する個体からの被験サンプルを提供すること；

b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；

10

20

30

40

50

c) 被験サンプルに光を誘導し、そしてサンプルからの光の反射率またはそれを通る透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；  
 d) 時間依存的測定プロファイルの値または勾配を決定すること；  
 e) 個体に治療を施すこと；  
 f) 工程 a) から d) を繰り返すこと；及び  
 g) 値または勾配を互いに比較して、該治療の効率を決定すること；  
 を含んでなる方法。

【請求項 1 4 4】

治療が経口抗凝固剤の投与である請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

値が経時的に低下するか、または勾配が経時的に上昇する場合、次いで個体の状態が悪化していることを決定し、そして値が経時的に上昇するか、または勾配が経時的に低下する場合、次いで個体の状態が改善されていることを決定する請求項 1 4 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 4 6】

小胞またはリポソームが凝固試薬と一部として添加される請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

凝固試薬が D R V V T または P T 試薬である請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

サンプルの I N R が決定される請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

値または勾配及び I N R を用いて個体の治療を管理する請求項 1 4 8 に記載の方法。

20

【請求項 1 5 0】

治療が A P L P 抗体の低下を志向する請求項 1 4 3 の方法。

【請求項 1 5 1】

抗リン脂質抗体症候群を有する個体の治療をモニター観察するための方法であって、

a) A P S を有する個体からの被験サンプルを提供すること；  
 b) 被験サンプルを凝固試薬と組み合わせ、そしてリン脂質を添加すること；  
 c) フィブリン重合の形成を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；  
 d) 血塊形成の開始前に時間依存的測定プロファイルの値または勾配を決定すること；  
 e) 決定した値または勾配に基づいて個体に治療を施すこと；

30

を含んでなる方法。

【請求項 1 5 2】

値または勾配が閾値をより大きく超えるほど、治療が個体により多くを提供する請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

治療が経口抗凝固剤の投与であり、そしてここで決定された値または勾配に依存して経口抗凝固剤の投与量を増加または低下させる請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

A P S の個体の集団内の重大なリスクの個体として個体を分類するための方法であって

40

a) 個体からの被験サンプルを提供すること；  
 b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；  
 c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；  
 d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；及び

時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで A P S 個体が重大なリスクの個体であることを決定すること；  
 を含んでなる方法。

50

## 【請求項 155】

重大なリスクが血栓性事象の重大なリスクである請求項 154 に記載の方法。

## 【請求項 156】

重大なリスクが流産、SLE または自己免疫障害の重大なリスクである請求項 154 に記載の方法。

## 【請求項 157】

重大なリスクが SLE の重大なリスクである請求項 156 に記載の方法。

## 【請求項 158】

重大なリスクが血小板減少症の重大なリスクである請求項 154 に記載の方法。

## 【請求項 159】

抗リン脂質抗体症候群を有する被験対象からの被験サンプルにおける抗リン脂質抗体のレベルを間接的に測定する方法であって：

- a) 個体からの被験サンプルを提供すること；
  - b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；
  - c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；
  - d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点での値または勾配を決定すること；及び値または勾配を被験サンプル中の抗リン脂質抗体のレベルに相関させること；
- を含んでなる方法。

10

## 【請求項 160】

抗リン脂質抗体が抗<sub>2</sub>糖タンパク質、抗プロトロンビン及び/または抗カルジオリピン抗体である請求項 159 の方法。

20

## 【請求項 161】

抗<sub>2</sub>糖タンパク質または抗カルジオリピンのレベルが決定される請求項 160 の方法。

## 【請求項 162】

個体が抗リン脂質抗体症候群を有する可能性が上昇していることを予測するための方法であって：

- a) 個体からの被験サンプルを提供すること；
  - b) 被験サンプルを APTT 試薬と組み合わせること；
  - c) フィブリン重合の形成を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；
  - d) 時間依存的測定プロファイルのデータを十分に定義する 1 つまたはそれ以上の予測変数のセットを定義すること；
  - e) 抗リン脂質抗体症候群と 1 つまたはそれ以上の予測変数との関係を示すモデルを誘導すること；及び
  - f) 工程 e) のモデルを利用して個体における抗リン脂質抗体症候群の可能性の上昇を予測すること；
- を含んでなる方法。

30

## 【請求項 163】

時間依存的測定プロファイルが少なくとも 1 つの光学プロファイルである請求項 162 の方法。

40

## 【請求項 164】

光学プロファイルが血栓症及び止血試験のための自動分析器により提供される請求項 163 の方法。

## 【請求項 165】

工程 f) の後、予測された抗リン脂質抗体症候群を確認するための 1 つまたはそれ以上のアッセイを実施する請求項 162 の方法。

## 【請求項 166】

1 つまたはそれ以上の確認アッセイが抗リン脂質抗体に関する 1 つまたはそれ以上のイ

50

ムノアッセイである請求項 165 の方法。

【請求項 167】

モデルが神経ネットワークである請求項 162 の方法。

【請求項 168】

1 つまたはそれ以上のパラメーターが勾配 1、凝固時間、 $t_{min 2}$ 、 $min 2$ 、 $t_{min 1}$ 、 $min 1$ 、 $t_{max 2}$ 、 $max 2$ 、勾配 3 及び変化量である請求項 162 の方法。

【請求項 169】

複数のパラメーターが用いられ、そして勾配 1、凝固時間、 $t_{min 2}$ 、 $t_{min 1}$ 、 $t_{max 2}$ 、 $max 2$ 、勾配 3 及び変化量から選択される請求項 168 の方法。

10

【請求項 170】

個体が経口抗凝固剤治療を受けていない請求項 169 の方法。

【請求項 171】

複数のパラメーターが用いられ、そしてその少なくとも 2 つが勾配 1 及び勾配 3 である請求項 168 の方法。

【請求項 172】

1 つまたはそれ以上の確認アッセイを実施することをさらに含んでなる請求項 162 の方法。

【請求項 173】

1 つまたはそれ以上の確認アッセイが C 反応性タンパク質または LC - CRP に関して検定することを含む請求項 172 の方法。

20

【請求項 174】

1 つまたはそれ以上の確認アッセイが少なくとも 1 つの抗リン脂質抗体に関するイムノアッセイを含んでなる請求項 173 の方法。

【請求項 175】

抗リン脂質抗体が抗<sub>2</sub>糖タンパク質、抗プロトロンビン及び/または抗カルジオリピン抗体である請求項 174 の方法。

【請求項 176】

個体が経口抗凝固剤治療を受けている請求項 162 の方法。

【請求項 177】

個体からの被験サンプルに関して PT アッセイを実施すること、及び予め決定された閾値を越える勾配 1 があるかどうかを決定することをさらに含んでなる請求項 162 の方法。

30

【請求項 178】

A P T T 試薬及びホスホリルコリンで第 2 のアッセイを実行して勾配 1 が阻止されているかどうかを決定することをさらに含んでなる請求項 168 の方法。

【請求項 179】

単一のパラメーターを使用し、そしてモデルが閾値である請求項 162 の方法。

【請求項 180】

リン脂質抗体症候群のリスクの上昇を決定するための方法であって：

40

a) A P T T 試薬を個体の被験サンプルに添加すること；

b) 被験サンプルにおける時間依存的測定プロファイルを実施すること；

c) 血塊形成の開始前にプロファイルが予め決定された閾値を越えた勾配または値を示すかどうかを決定すること、及びその場合；

d) カルシウムを含まない A P T T 試薬を用いる以外は ( a ) から ( c ) を繰り返し、抗リン脂質抗体症候群 ( または抗リン脂質抗体症候群の可能性の上昇 ) の決定は、再度予め決定された閾値を越えた値または勾配を示すプロファイルであることを確認すること；を含んでなる方法。

【請求項 181】

個体をモニター観察するための方法であって：

50

- a) 個体からの被験サンプルを提供すること；
  - b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；
  - c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；
  - d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；
- そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで個体が抗リン脂質抗体症候群を有しているかまたは抗リン脂質抗体症候群のリスクが上昇していることを決定すること；
- を含んでなる方法。

10

## 【請求項 182】

被験サンプル中の抗リン脂質抗体を検出するための方法であって：

- a) 個体からの被験サンプルを提供すること；
  - b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；
  - c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；
  - d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；及び
- 時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで個体が抗リン脂質抗体を有していることを決定すること；
- を含んでなる方法。

20

## 【請求項 183】

根底にある A P S が原因で個体が臨床事象を経験する可能性の上昇を決定するための方法であって：

- a) 個体からの被験サンプルを提供すること；
  - b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；
  - c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；
  - d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；及び
- 時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで個体が根底にある A P S が原因で個体が臨床事象を経験する可能性が上昇していることを決定すること；
- を含んでなる方法。

30

## 【請求項 184】

臨床事象が S L E、流産、血栓症または自己免疫障害である請求項 183 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は 2001 年 6 月 29 日出願の O r t e l に対する米国仮特許出願第 60 / 30 2 2 6 1 号から、及び 2001 年 9 月 11 日出願の O r t e l に対する米国仮特許出願第 60 / 3 1 8 7 5 5 号への優先権を主張し、各々出展明示により本明細書の一部とする。

40

## 【0002】

(背景技術)

本発明は波形分析及び波形に基づく患者の異常の予測の分野である。被験サンプルを通る光透過率を経時的にモニター観察して「波形」の時間依存的測定プロファイルを提供する凝固計（またはその他の分析器）から波形を提供することができる。本発明はまた患者の抗リン脂質抗体を検出し、とりわけ患者サンプルから時間依存的測定プロファイルを入手し、そして時間依存的測定プロファイルに基づいて、患者が抗リン脂質抗体症候群（A P S）または抗リン脂質抗体（A P L A）を有している可能性の上昇を予測する分野でも

50

ある。本発明はまた時間依存的測定プロファイル及び/またはA P Sの結果としての血栓症のリスクを評価すること、ならびにこれらの患者の治療をモニター観察することをも志向する。

#### 【0003】

(関連技術の説明)

伝統的に、臨床試験の凝固試験に関して報告された結果は凝固時間として提供される。光透過率の変化を時間の関数としてモニター観察することにより凝固時間を決定する凝固計を利用することができる。かかる凝固計は1997年7月8日に発行されたFischerらに対する米国特許第5646046号に開示されており、その対象は出展明示により本明細書の一部とする。これらの分析器から得られた光学データを用いて凝固反応の開始前、反応中及び開始後に生じる特定の事象を定義することができる。この研究法を用いて、PT(プロトロンビン時間)またはAPTT(活性化部分トロンボプラスチン時間)アッセイに関する光学データを3つのセグメント、すなわち「相」に分けることができる：凝固前セグメント、凝固セグメント、及び凝固後セグメント(図2)。これらのセグメントは(1)反応中の個々の事象の時期；(2)これらの事象が生じる速度；及び(3)変化の大きさ；を定義する一連のパラメーターにより特徴づけられる。

10

#### 【0004】

透過率波形(TW)は種々の臨床状況に関する有用な情報を提供することが示されており、例えば2000年8月8日発行のGivensらに対する米国特許第6101449号及び2001年11月20日発行のBraunらに対する米国特許第6321164号に開示されており、その各々の対象は出展明示により本明細書の一部とする。そこで開示されるように波形パラメーターを用いて、神経ネットワークモデルを用いてヘパリンまたは特定の因子の欠損の存在を予測することができる。また波形シグナルの振幅を用いて血漿サンプル中のフィブリノーゲン濃度を推定した。本発明では患者をスクリーニングするか、または患者が抗リン脂質抗体症候群を有している可能性の上昇を予測するのにこれらの波形分析を用いることができる。

20

#### 【0005】

別の実例では(2001年12月20日公開のFischerらに対する国際公開公報第01/96864号に開示されており、出展明示により本明細書の一部とする)、APTT試験の凝固前相に関与する「二相性」変化が播種性血管内凝固(DIC)に随伴されている。この「二相性」変化はAPTTの凝固前相での負の勾配1の出現を特徴とし、そしてC反応性タンパク質(CRP)と低密度リポタンパク質(VLDL)との間の沈殿の形成の結果である。この複合体はリポタンパク質複合C反応性タンパク質からLC-CRPと称されている。APTTのこの負の勾配1は、DICに関する標準的な臨床検査における異常(例えばD二量体レベルの上昇)の進展に先行することが示され、そして波形変化は臨床結果と密接に相関した。以下に示すように、PTに関する(及びAPTTに関する)二相性波形は、患者がAPLAを有することを予測し、そしてさらなる試験を促すのに有用である。

30

#### 【0006】

抗リン脂質抗体(APLA)はリン脂質及びリン脂質結合タンパク質、主に<sub>2</sub>GPI及びプロトロンビンからなる複合体に特異性を有する抗体の異種性群である。これらの抗体は再発性の動脈及び静脈血栓塞栓症、ならびに再発性の自然流産に随伴される。APLAに関する診断用臨床試験は最も一般的な免疫学的(抗カルジオリピン)または機能的アッセイ(ループス抗凝固因子)である。病理学的抗カルジオリピン抗体は、抗カルジオリピンELISAの遮断バッファーに用いられるウシ胎仔血漿に存在するタンパク質補助因子、<sub>2</sub>GPIの存在を必要とすると報告している研究者もいる。一方、ループス抗凝固因子はプロトロンビン-リン脂質複合体を認識し、そしてリン脂質依存性凝固アッセイを阻止する。抗<sub>2</sub>GPI抗体を含むその他の抗体もまたループス抗凝固活性に寄与する。

40

<sub>2</sub>GPIに対する抗体及びプロトロンビンがAPLAを有する患者における血栓症のリスク上昇に随伴されることを実証している研究もある。

50

## 【0007】

インビトロ反応性プロファイルに基づいて、APAを2つのサブクラスに分ける：1) 抗カルジオリピン抗体(ACA)及び2) ループス抗凝固因子(LAC)。これらの反応性プロファイルは1950年代初期から知られている。ヒト血漿中のリン脂質反応性抗体の存在は最初、感染の証拠はないが梅毒の血漿学的試験で陽性である患者で報告された。偽陽性梅毒試験に寄与する抗体は最終的に試験試薬中のカルジオリピンを認識していることが解った。1952年に、全身性エリテマトーデス(SLE)の患者におけるリン脂質依存性凝固インヒビターについての最初の報告が公開された。リン脂質依存性凝固インヒビターと血栓症との矛盾した関連性は1963年に最初に報告され、ループス抗凝固因子なる用語は9年後にSLEの患者の流行に基づいて提示された。

10

## 【0008】

ACAは抗体のアニオン性または中性リン脂質への結合に基づいて、免疫学的方法により検出される。近年、実際の抗原標的がリン脂質表面ではなく、むしろこれらのリン脂質に結合するタンパク質、最も注目すべきは $\alpha_2$ -糖タンパク質1及びプロトロンビンであることが解明されてきている。抗 $\alpha_2$ -糖タンパク質1及び抗プロトロンビン抗体の直接測定のための免疫アッセイもまた利用されている。

## 【0009】

LACはリン脂質依存性凝固アッセイ、例えばAPTT及びDRVVTにおける干渉により決定される。LAC及びACAは独立して生じるか、または同時に存在し得る。LAC及びACA活性は同一抗体の特性であり得るか、または活性を物理学的に分離することができる。

20

## 【0010】

抗リン脂質抗体症候群(APS)なる用語を用いて、APAの存在と動脈及び静脈血栓症、胎児喪失ならびに血小板減少症のような臨床上的特徴との間の関連性について報告されている。疾患関連性の範囲は広い。APSはいずれかの基礎障害(原発性APS)の不在下で存在し得るか、または症状はSLEもしくはその他の自己免疫疾患、またはその他の病学的症状に関連する慢性炎症性疾患のバックグラウンドに対して存在し得る。しかしながら、本明細書で用いるように、「抗リン脂質抗体症候群」または「APS」は、いずれかの臨床上的特徴が存在してもしなくても、単に抗リン脂質抗体を有している個体の症状を意味する。本明細書で用いる「重大なリスク」とは、APSに起因する臨床事象、例えば流産、血栓性事象、自己免疫障害、血小板減少症、SLE等を有するリスクが上昇している、APSを有する個体を意味する。

30

## 【0011】

(発明の要約)

抗リン脂質抗体症候群の検査室診断は臨床医には矛盾を示す。血栓症との関連性にも関わらず、伝統的なスクリーニングアッセイ(APTT及びPT)では通常凝固時間の延長が示される。光学プロファイルから算出される波形パラメータは臨床的に有用なさらなる情報を提供することが示されている。本発明で提示する実施例はPT及びAPTTから得られる光学波形プロファイルがAPSの患者を同定するのに有用であることを示している。

40

## 【0012】

本発明は、個体が抗リン脂質抗体症候群を有しているかまたはその可能性が上昇していることを予測するための方法であって、a) 個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで患者が抗リン脂質抗体症候群を有しているかまたは抗リン脂質抗体症候群のリスクが上昇していることを決定すること；を含んでなる方法を志向する。

50

## 【0013】

本発明はまた個体が抗リン脂質抗体症候群を有している可能性が上昇していることを予測するための方法であって、a) 個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルを、リン脂質を含んでなる凝固試薬と組み合わせること；c) フィブリン重合の形成を経時的にモニター観察して、時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルのデータを十分に定義する1つまたはそれ以上の予測変数のセットを定義すること；e) 抗リン脂質抗体症候群と1つまたはそれ以上の予測変数との関係を示すモデルを誘導すること；及びf) 工程e) のモデルを利用して個体における抗リン脂質抗体症候群の可能性の上昇を予測すること；を含んでなる方法を志向する。

## 【0014】

本発明はさらに少なくとも1つの時間依存的測定プロファイルからの個体の抗リン脂質抗体症候群を予測するための方法であって、a) 個体からの被験サンプルをリン脂質と組み合わせ、そして被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；b) 時間依存的測定プロファイルのデータを十分に定義する1つまたはそれ以上の予測変数のセットを定義すること；c) 抗リン脂質抗体症候群と1つまたはそれ以上の予測変数との関係を示すモデルを誘導すること；及びd) 工程c) のモデルを利用して個体における抗リン脂質抗体症候群の存在を予測すること；を含んでなる方法を志向する。

## 【0015】

本発明はまた、被験対象における血栓症のリスクが上昇していることを予測するための方法であって、a) 個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そしてサンプルを通る光の透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで被験対象の血栓症のリスクが上昇していることを決定すること；を含んでなる方法を志向する。

## 【0016】

本発明はさらに、抗リン脂質抗体症候群を有する個体の治療をモニター観察するための方法であって、a) 抗リン脂質抗体症候群を有する個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そしてサンプルからの光の反射率またはそれを通る透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルの値または勾配を決定すること；e) 患者に治療を施すこと；f) 工程a) からd) を繰り返すこと；及びg) 値または勾配を互いに比較して、該治療の効率を決定すること；を含んでなる方法を志向する。

## 【0017】

本発明はなおさらに、抗リン脂質抗体症候群を有する個体の治療をモニター観察するための方法であって、a) 抗リン脂質抗体症候群を有する個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルを、リン脂質を含んでなる凝固試薬と組み合わせること；c) フィブリン重合の形成を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 血塊形成の開始前に時間依存的測定プロファイルの値または勾配を決定すること；e) 決定した値または勾配に基づいて患者に治療を施すこと；を含んでなる方法を志向する。

## 【0018】

本発明はまた、APSの患者の集団内の重大なリスクの患者として個体を分類するための方法であって、a) 個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点での値または勾配が、対応する予め決定された値ま

10

20

30

40

50

たは勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで A P S 患者が重大なリスクの患者であることを決定すること；を含んでなる方法を志向する。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、抗リン脂質抗体症候群を有する被験対象からの被験サンプルにおける抗リン脂質抗体のレベルを間接的に測定する方法であって、a) 個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点での値または勾配を決定すること；及び値または勾配を被験サンプル中の抗リン脂質抗体のレベルに

10

【 0 0 2 0 】

本発明はなおさらに、個体が抗リン脂質抗体症候群を有する可能性が上昇していることを予測するための方法であって、a) 個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルを A P T T 試薬と組み合わせること；c) フィブリン重合の形成を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルのデータを十分に定義する1つまたはそれ以上の予測変数のセットを定義すること；e) 抗リン脂質抗体症候群と1つまたはそれ以上の予測変数との関係を示すモデルを誘導すること；及びf) 工程e)のモデルを利用して個体における抗リン脂質抗体症候群の可能性の上昇を予測すること；を含んでなる方法を志向する。

20

【 0 0 2 1 】

本発明の別の実施形態では、リン脂質抗体症候群のリスクの上昇を決定する方法は、a) A P T T 試薬を患者の被験サンプルに添加すること；b) 被験サンプルにおける時間依存的測定プロファイルを実施すること；c) 血塊形成の開始前にプロファイルが予め決定された閾値を越えた値または勾配を示すかどうかを決定すること、及びその場合；d) カルシウムを含まない A P T T 試薬を用いる以外は a) から c) を繰り返し、A P S (または A P S の可能性の上昇) の決定は、再度予め決定された閾値を越えた値または勾配を示すプロファイルであることを確認すること；を含んでなる。

【 0 0 2 2 】

本発明のさらに別の実施形態では、個体をモニター観察する方法は a) 個体からの被験サンプルを提供すること；b) 被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；c) 被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；d) 時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；そして時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで患者が抗リン脂質抗体症候群を有しているかまたは抗リン脂質抗体症候群のリスクが上昇していることを決定すること；を含んでなる。

30

【 0 0 2 3 】

( 好ましい実施例の説明 )

本発明では、被験サンプルにおける凝固開始の前に、複合体の形成に起因する標本における光透過率の変化が ( 予め決定された閾値を越える ) 負の勾配として検出される。この変化は被験サンプル中の抗リン脂質抗体の可能性の上昇を示している。さらに本明細書で論じるように、本明細書で勾配 1 と称する、この最初の勾配を用いて病理学的及び非病理学的抗リン脂質抗体を区別することができる。

40

【 0 0 2 4 】

本明細書で用いる「モニター観察」または「モニター観察すること」なる用語は A P S に関して患者をスクリーニングすること、A P L A を検出すること、個体が A P S を有しているとして診断すること、患者の A P S の状態の重篤度を決定すること、個体の A P S の状態の病理学を決定すること、または個体の状態の進行もしくは後退を追跡することを意味する。本明細書で用いる「抗リン脂質抗体症候群」及び「A P S」とは、個体が抗リ

50

ン脂質抗体を有している状態を意味する。そして本明細書で用いる「抗リン脂質抗体」または「A P L A」なる用語は、1つまたはそれ以上の異なる型の抗リン脂質抗体を含む全ての抗リン脂質抗体の少なくとも1つのサブセットを意味する。また、「サンプル」または「被験サンプル」なる用語は血液、血漿または血漿サンプルを意味する。また、本明細書で（「時間依存的測定プロファイルにおける特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越える場合」のように）「超える」なる用語を用いる場合、測定される勾配またはその他の値の絶対値がその他の値の勾配の閾値の絶対値よりも大きいことを意味する。加えて、本明細書において用いる「時間依存的測定」は、パラメーター変化の「グラフ」またはプロファイルに至るように、一定時間の複数の時点でパラメーター変化が測定される、被験サンプルのパラメーター変化の経時的な測定を意味する。本発明の好ましい時間依存的測定は、サンプルを通る光透過率における変化の経時的な測定である。「個体」及び「患者」なる用語は本明細書において互換的に用いられ、そして医師の介護下にある人に限定することを意味するものではない。本明細書で用いる「リン脂質」は技術分野の技術者に公知の用語である。例えば、小胞またはリポソームの形態であるリン脂質を本明細書に開示する種々の方法に用いることができる。本明細書で用いる「確認アッセイ」とは最初のアッセイ、例えば抗リン脂質抗体の少なくとも一部の結合及びかかる結合の検出に關与するアッセイの予測値を高めるアッセイを意味する。

10

## 【0025】

## 材料及び方法

## 血漿サンプル

20

正常ドナー：20人の正常ドナーからの血漿サンプルを入手して、種々A P L A抗体レベルのカットオフ値を確立した。さらに、6人の個体を採用して、そしてI g Gスパイクアッセイのため、及びI g G媒介光透過性アッセイにおける正常範囲を確立するための最初のI g G精製のための血漿サンプルを入手した。これらのドナーのうちの2人は大規模I g G精製のための血漿サンプルを提供した。これらの個体のなかで公知のA P L Aを有している者はいなかった。

## 【0026】

A P L Aを有する患者：A P L A及び負のP T勾配1の結果（Simplastin Lを用いる）を有する9人の患者を採用した。国際血栓止血学会のループス抗凝固因子/抗リン脂質抗体小委員会により推奨される診断基準に従ってA P Sの診断を行った。抗カルジオリピン抗体I g GレベルをE L I S Aにより決定した。即座に使用しないサンプルは使用時まで-70 で保存した。

30

## 【0027】

## 試薬

プロテインAセファロースC L - 4 B、リン酸塩緩衝生理食塩水、p H 7 . 4（P B S）、パッケージ、アングロッド、カルジオリピン、アネキシンV、ヒト血漿アルブミン及びその他の化学物質はSigma Chemical Corporation（St . L o u i s、ミズーリ州）から購入した。ヒトプロトロンピン、第I X因子及び第X因子はHaematologic Technologies（Essex Junction、バーモント州）から入手した。I g G調製物を濃縮するためのCentricon Y M - 30遠心フィルター装置はMillipore Corporation（Bedford、マサチューセッツ州）から購入した。Simplastin（登録商標）L（P T試薬、I S I 2 . 0 0）及び凝固試験で用いたその他の試薬はbioMerieux, Inc.（Durham、ノースカロライナ州）から入手した。Dade Innovin（登録商標）（P T試薬、I S I 1 . 0 0）はDade - Behring, Inc.（Newark、デラウェア州）から入手した。

40

## 【0028】

<sub>2</sub> G P I、プロトロンピン及び第V因子における遺伝的多型性の決定  
S a n g h e r aらに従って以下のプライマー：

50

## 【化1】

エクソン7 順行性プライマー5' - GTGTAGGTGTACTCATCTACTGT-3',

エクソン7 逆行性プライマー5' - CAAGTGGGAGTCCTAGCTAA-3',

エクソン8 順行性プライマー5' - TTGTTTCTCTTAGAATGTTTAT-3',

エクソン8 逆行性プライマー5' - TGGATGAACAAGAAACAAGTG-3'.

## 【0029】

を用いてポリメラーゼ連鎖反応によりエクソン7 (コドン306) 及びエクソン8 (コドン316) の<sub>2</sub>GPI遺伝的多型性を決定した。プロトロンビンG20210A多型性及び第V因子Leiden多型性を以前に報告されているように実施した。 10

## 【0030】

ヒト血漿<sub>2</sub>GPIの精製

以前に報告されている方法にわずかに修飾を加えた方法に従ってヒト血漿<sub>2</sub>GPIの精製を実施した (Izumiら、検討中の原稿)。簡単には、過塩素酸を血漿に加えて最終濃度1.8%にして、室温で30分間攪拌した。アニオン交換クロマトグラフィー及びヘパリンカラムクロマトグラフィーにより上澄から<sub>2</sub>GPIを精製した。<sub>2</sub>GPI調製物をドデシル硫酸10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により試験し、そしてELISAにより定量した。 20

## 【0031】

4で保存を延長した後、リン脂質に結合しなかった<sub>2</sub>GPIの切断形態を部分精製された<sub>2</sub>GPI分画から単離した。切断部位はAla<sup>314</sup>及びPhe<sup>315</sup>残基の間のペプチド結合であり、タンパク質シーケンシングにより確認した。プラスミン切断<sub>2</sub>GPI (Lys<sup>317</sup>-Thr<sup>318</sup>の間で切断する)と同様に、切断された<sub>2</sub>GPIはリン脂質に結合しなかった。

## 【0032】

免疫学的アッセイ

抗カルジオリピン抗体ELISA:カルジオリピンに対するIgG抗体は以前に報告されているようにELISAにより検出され、そしてLouisville APL Diagnostics, Inc. (Doraville、ジョージア州)の抗カルジオリピンIgGキャリブレーターを用いて標準曲線を確認した。10GPL単位の抗カルジオリピンIgGレベルをカットオフ値として確立した (1GPL単位は標準血漿からアフィニティ精製された1µg/ml IgG抗カルジオリピン調製物のカルジオリピン結合活性として定義される)。 30

## 【0033】

抗プロトロンビン及び抗<sub>2</sub>GPI抗体ELISA:ヒトプロトロンビンに対するIgG抗体を以前に報告されているように検出した。ヒト<sub>2</sub>GPIに対するIgG抗体を検出した。抗プロトロンビン及び抗<sub>2</sub>GPIに関するカットオフ値を、正常なドナーから得られた平均値プラス3標準偏差として確立した。 40

## 【0034】

プロトロンビン時間及び光学データパラメーター

全てのPTアッセイをMDA-180 (登録商標)写真-光学凝固計 (bioMerieux, Inc.)で2検体ずつ実施した。PTアッセイでは、クエン酸処理した患者の血漿50µlを37℃まで加温した後、トロンボプラスチン100µlと混合した。580nmで150秒間の光透過率に関して反応を連続的にモニター観察した。その他の波長 (または複数の波長)を使用でき、そしてその他の凝固計以外の分析器を使用することができる。具体的に記載したもの以外は、全実験で使用したトロンボプラスチンはSimplelastin Lであった。

## 【0035】

反応中に、コンピューターアルゴリズムが凝固時間及び透過率波形を作り上げるその他の光学パラメーターを記載したように決定した。勾配1パラメーターを、反応の開始で始まり、そして凝固の発現で終わる線の勾配として定義した。凝固時間が25秒を超える場合、または凝固が検出されなかった場合、勾配1パラメーターを580nm、25秒間での光学密度を用いて算出した。透過率波形を、WETを用いてダウンロードし、そしてWIT A.00ソフトウェア(bioMerieux、Inc.)を用いてオフラインで見た。

#### 【0036】

フィブリノーゲンの負の勾配1への寄与を決定するために、脱フィブリン患者及び正常の血漿を報告されたように調製した。簡単には、50U/mlアンクロッド5 $\mu$ lをクエン酸処理した血漿1mlに加え、そして37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした。処理した血漿を8000gで遠心して、フィブリン塊をベレット化し、そしてPT分析用にきれいなチューブに移した。トロンビンが負の勾配1に寄与したかどうかを決定するために、ヒルジン(Sigma Chemical Corp.、St. Louis、ミズーリ州)をAPLA患者血漿に最終濃度0.1、0.25、0.5、1.0、10及び20U/mlに加え、そして次にヒルジン・スパイク血漿サンプルをPTアッセイにて使用した。

10

#### 【0037】

##### 全IgGの精製

プロテインAセファロースCL-48カラムを製造者の指示書に従って調製した。カラムをPBS10カラム容量で平衡にした。血漿を解凍し、そしてSorvall SS34ローター中10000rpmで10分間遠心し、そして上澄をプロテインAセファロースカラムに適用した。以下に記載するようにIgG涵濁血漿を収集し、そして保存した。次いでカラムをPBSで十分洗浄した(～50カラム容量またはOD<sub>280</sub>がゼロになるまで)。0.1Mグリシン-HCl(pH2.5)3カラム容量でIgGを溶出し、2M Tris-HCl(pH8.0)で中和し、そして次にカラムをPBS3容量で洗浄した。OD<sub>280</sub>でモニター観察してIgGが含まれる分画を合わせ、そしてPBSに対して一晚透析した。透析されたIgGをCentricon YM-30遠心用フィルター装置で濃縮し、そしてIgGに関するOD<sub>280</sub>吸光係数( $E_{1\%}^{1cm} = 14.3$ )を用いて最終IgG濃度を決定した。IgGの使用濃度をPBSで40mg/mlに調整した。

20

30

#### 【0038】

##### IgG涵濁血漿及びIgGスパイクの調製

プロテインAセファロースカラムIgGを吸収させることにより患者及び対照からのIgG涵濁血漿サンプルを得た。バッファーでの血漿の希釈を最低限にするために、血漿8mlをプロテインAセファロースカラム5mlに適用した。最初に流した血漿5から6mlを捨てた。続く血漿2から3mlをIgG涵濁血漿として収集した。IgG涵濁血漿中の抗カルジオリピンIgG抗体レベルを決定することによりプロテインAカラムの効率を評価した。IgG吸収の後、吸収前には抗カルジオリピンIgG抗体レベルが最高であった2人の患者からのIgG涵濁血漿中の抗カルジオリピンIgG抗体レベルは検出不能になった(A003及びA004)。

40

#### 【0039】

IgG涵濁対照血漿を患者A003及びA004からのIgGで最終濃度8mg/ml IgGまでスパイクした。反対に、患者A003及びA004からのIgG涵濁血漿サンプルを正常ドナーからのIgGで同一最終濃度でスパイクした。IgGスパイク血漿サンプルを完全(分画化していない)血漿ならびに患者及び対照からのIgG涵濁血漿サンプルと一緒にPTアッセイで試験した。

#### 【0040】

##### IgG波形アッセイ

IgG波形アッセイをMDA-180(登録商標)凝固計でのPT基盤アッセイにおける、クエン酸処理した血漿に関するPBS中8mg/ml 精製IgG(またはIgG及

50

び血漿タンパク質混合物)で代用した。8 mg/ml IgG (またはIgG及び血漿タンパク質混合物) 50 µlを37℃まで加温し、トロンボプラスチン100 µlと混合し、そして次に580 nmでモニター観察した。血塊形成はなかったため、最初の25秒間の波形プロファイルから勾配1の結果が得られた。異常波形を6人の正常ドナーから精製された全IgGサンプルで得られた平均以下の2以上の標準偏差として定義した。

#### 【0041】

IgG波形アッセイにおいて試験するために以下の血漿タンパク質を選択した：プロトロンビン、<sub>2</sub>GPI、第IX因子、第X因子及びアネキシンV。ヒト血漿アルブミンは陰性対照として含まれた。個々の血漿タンパク質をその生理学的濃度で、及び生理学的濃度の4倍の濃度でIgGと混合した(プロトロンビン、100及び400 µg/ml; <sub>2</sub>GPI、200及び800 µg/ml; 第IX因子、5及び20 µg/ml; 第X因子、10及び40 µg/ml; アネキシンV、4及び16 ng/ml; 及びヒト血漿アルブミン、40及び160 mg/ml)。異常波形の作成に寄与する血漿タンパク質に関しては、濃度依存性を調べるためにさらなる濃度を含めた。タンパク質のリン脂質結合への依存性を試験するために、切断された<sub>2</sub>GPIを元来の<sub>2</sub>GPIと同一濃度で使用した。

10

#### 【0042】

Simplastin L及びDade Innovinで得られた結果を比較することにより、IgG波形アッセイのトロンボプラスチン特異性を決定した。精製された正常及び患者IgGサンプルを個々のトロンボプラスチンと共に、<sub>2</sub>GPIまたはプロトロンビンの存在下または不在下でインキュベートした。

20

#### 【0043】

##### 統計分析

分析のために1次データをエクセル スプレッドシート・ファイルにダウンロードした(Microsoft Corporation、Redmond、ワシントン州)。Prism, v. 3.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego、カリフォルニア州)を用いて統計分析を実施した。データを平均±標準偏差(SD)として表す。対応のあるt検定(両側検定)を用いて、APLA患者からの全IgGのIgG涸渇正常血漿及び経口抗凝固因子を投与された非APLA患者からのIgG涸渇血漿への添加の前後で、ならびに生理学的濃度の血漿タンパク質の患者の全IgGへの添加の前後での凝固時間及び勾配1の値における変化を比較した。統計学的な有意性をp < 0.05として定義した。

30

#### 【0044】

図1及び図4Bに示すように、この勾配1の変化はAPLAを有する患者41人中26人(63%)で同定され、そしてこれは正常及びワルファリン投与されている非APLA患者の双方からAPLA患者をそのまま区別する唯一のパラメーターであった。

#### 【0045】

本発明の1つの実施形態では、リン脂質を含有するプロトロンビン時間試薬を個々の被験サンプルに混合する。これは多くの方法、例えば、サンプル容器からサンプルのアリコートを吸引するプローブを伴った自動プローブが突き刺されている被験サンプル容器(例えばバキューイナ型容器)から被験サンプルアリコートを提供することにより達成することができる。自動プローブをキュベット上の位置まで移動させ、そしてそこに降ろす。別の自動プローブは試薬容器から試薬を吸引し、そしてキュベット上の位置まで移動してそこに試薬を入れる。光ビームはキュベットを通して透過し、そして透過光は経時的に検出され、従って時間依存的な測定プロファイル、この場合は光透過率プロファイルが提供される。凝固試薬(例えばPT試薬、APTT試薬、TT試薬、DRVVT試薬、組織因子、ヘビ毒+リン脂質等)を被験サンプルに添加する場合、次いで図2で示されるような凝固波形が得られる。

40

#### 【0046】

プロトロンビン時間試薬またはトロンボプラスチンを用いる本発明の実施形態では、試

50

薬はSimplastin(登録商標)Lでよく、これはAPLAに対して最高の感受性、及び評価されるプロトロンビン時間試薬の最良の識別能力を示す。HTF(Simplastin R HTF)及びDade C プラスなどのその他の試薬もまたAPLAに対して(図22で示されるように)感受性を示す。図9で説明するように、Triton X-100の添加によりAPLA個体のサンプルに公知である勾配1応答がなくなるので、脂質構造はこの複合体の形成に重要である。本発明の別の実施形態では、プロトロンビン時間を用いなくて、むしろ金属カチオンを伴うかまたは伴わないリン脂質を被験サンプルと組み合わせ、そして前記したように勾配1の変化を決定する。

#### 【0047】

図2は光学透過率対正常標本のプロトロンビン時間アッセイの時間を示し、透過率の第1及び第2誘導を含む。凝固中の事象を識別記号A(シグナルの始点)、B(凝固の発現)、C(凝固の中点)、D(凝固の終点)及びE(シグナルの終点)により示す。図2の反応の3つのセグメントは凝固前セグメント(A-B)、凝固セグメント(B-D)、及び凝固後セグメント(D-E)を含む。パラメータ $t_B$ 、 $t_C$ 及び $t_D$ は各々 $t_{min2}$ 、 $t_{min1}$ 及び $t_{max2}$ を意味し、これは凝固発現、中点、及び終点に対応する。MDA(登録商標)に関して報告された凝固時間を $t_{min2}$ から誘導する。勾配1はA点及びB点(凝固前相)を結ぶ線の勾配であり、勾配3はD点及びE点(凝固後相)を結ぶ線の勾配である。

10

#### 【0048】

凝固はキュベットを通る透過率の低下を引き起こす唯一の事象ではない。凝固開始前の最初の勾配である勾配1(点Aから点Bへの線の勾配として定義される)は、凝固の発現前の光透過率の異常な低下の結果である。この最初の負の勾配は、以下の実施例で示すように、抗リン脂質抗体症候群の可能性の上昇を示している。

20

#### 【0049】

負のPT勾配1がAPLAを有する患者で観察される

正常なドナー血漿、経口抗凝固剤を投与されている患者、APLA患者及び経口抗凝固剤を投与されているAPLA患者のMDA(登録商標)からのPT及びAPT光学データから波形パラメータを算出した。これらの患者群からのPTパラメータに関する結果の平均(表1)は波形パラメータの診断上の有用性を示し、とりわけ経口抗凝固剤による影響を受けていないAPLA集団の識別における勾配1及び勾配3が有用であり、これはまた経口抗凝固剤の影響を受けなかった。異常な勾配1の結果(正常ドナーの平均以下でSDを超える)はAPLA患者の63%(41人中26人)で観察され、一方異常な勾配3の結果はAPLA患者の24%(41人中10人)で観察された(図4、そしてデータは示していない)。

30

#### 【0050】

凝固試薬を本発明で用いる場合、PT試薬はAPT試薬を超えるのが好ましいが、好ましくは1つ以上の凝血プロファイルパラメータ(例えば凝固時間、勾配1及び/または勾配3)を用いる場合、APT凝血プロファイルを用いることができる。これらの患者群からのAPTパラメータの結果の平均(表2)は、勾配1及び勾配3がAPLA集団に関する診断有用性を示すことを示した。これらのパラメータはまた経口抗凝固剤の影響を受けなかった。経口抗凝固剤投与を受けているAPLA患者の15.4%(26人中4人)及び経口抗凝固剤投与を受けていないAPLA患者の30.8%(13人中4人)のみでAPT勾配1値が正常ドナーの平均以下で2SDを超えて異常に低下した(図3)。しばしばAPLAに関する試験の一部として用いられるAPT凝固時間はAPLA患者の75.6%(41人中31人)で延長したが、経口抗凝固剤投与を受けている非APLA患者の82.4%(17人中14人)でも延長した。これらの結果により、APLA患者の高いパーセンテージでPT勾配1及びAPT勾配1が異常であり、そしてこれらのパラメータが抗凝固剤投与を受けているAPLA患者にも有用であることが示された。

40

#### 【0051】

50

図3に関連してより具体的には、この図は経口抗凝固剤治療を伴う及び伴わない患者及び対照からのAPTT凝固時間及び勾配1の結果の分布を説明している。MDA（登録商標）写真-光学凝固計のPlatelin（登録商標）Lで全てのサンプルを測定し、そして透過率波形プロファイルを分析のためにダウンロードした。APTT凝固時間をパネルAで示し、そして破線は正常ドナーの平均を超えて標準偏差2である値を特定する。APTT勾配1の結果をパネルBに示し、破線は平均以下で標準偏差2である値を特定する。水平の実線は個体の各サブセットに関する平均値を特定する。略語には：ND、正常ドナー；OAC、経口抗凝固剤投与されている患者；APLA、経口抗凝固剤治療を受けていない抗リン脂質抗体患者；APLA+OAC、経口抗凝固剤治療を受けている抗リン脂質抗体患者などがある。

10

#### 【0052】

図4で示されるように、経口抗凝固剤治療を伴う及び伴わない患者及び対照からのSimplastin（登録商標）LでのPT凝固時間及び勾配1の結果の分布が示されている。全てのサンプルをMDA（登録商標）写真-光学凝固計で測定し、そして透過率波形プロファイルを分析のためにダウンロードした。パネルAで示されるPT凝固時間及び破線は正常ドナーの平均を超えて標準偏差2である値を特定する。PT勾配1の結果をパネルBに示し、破線は平均以下で標準偏差2である値を特定する。水平の実線は個体の各サブセットに関する平均値を特定する。略語は図3と同一である。

#### 【0053】

次に図5で示されるように、正常及びAPLA患者血漿サンプルからのPTアッセイの透過率波形プロファイルを示す。(A)正常ドナー及び(B)ワルファリン治療を受けていないAPLA患者からの血漿サンプルでプロトンピン時間をMDA（登録商標）写真-光学凝固計でSimplastin（登録商標）Lを用いて測定した。

20

#### 【0054】

図6はPT及びPT勾配1値に及ぼすヘパリンの効果を説明している。プールされた正常血漿を0.1、0.4、0.6、0.8、1.0及び10U/mlの濃度のブタ由来ヘパリンでスパイクした。同一のMDA（登録商標）写真-光学凝固計でSimplastin（登録商標）Lを用いてスパイクした血漿でPTを測定し、そして透過率波形プロファイルを分析のためにダウンロードした（ヘパリンは10U/mlで凝血に至らなかった）。パネルAでは、破線が平均を超えて標準偏差2である値を特定し；パネルBでは破線が平均以下で標準偏差2である値を特定する。図7はトロンビンインヒビターであるヒルジンの添加の、APLA患者血漿のPT勾配1に及ぼす効果を示しており、これは変化がトロンビン生成とは独立していることを実証している。

30

#### 【0055】

図8aで示されるように、正常及びAPLA患者に関する勾配1はPT試薬(Simplastin L)を患者の血漿に添加した場合に示され、そして図8bはリン脂質混合物を血漿に添加した場合の正常及びAPLA患者に関する勾配1を示す。図9はデタージェント(Triton X-100)の添加の、APLA患者血漿のPT勾配1に及ぼす効果を説明している。これらのデータはリン脂質表面に関する要件を示している。Triton X-100は用量依存的な様式で勾配1の変化を減じた。

40

【表 1】

表 1. Simplastin (登録商標) L を用いる PT 凝固時間及び光学パラメーター

パラメーター	正常ドナー <i>n</i> =17	APLA 患者 <i>n</i> =15	ワルファリン 投与を受けて いる非 APLA 患者 <i>n</i> =17	ワルファリン 投与を受けて いる APLA 患者 <i>n</i> =26
PT 凝固時間	12.15 ± 0.29	16.39±4.26 <sup>†‡</sup>	24.31 ± 4.13 <sup>†</sup>	23.11 ± 10.55 <sup>†</sup>
勾配 1 (X 10 <sup>-3</sup> )	0.315 ± 0.09	-0.174±0.37 <sup>†‡</sup>	0.238± 0.18	0.022± 0.39 <sup>†‡</sup>
<i>tmin2</i>	12.14±0.33	16.41±4.21 <sup>†‡</sup>	24.52±4.17 <sup>†</sup>	23.29±10.68 <sup>†</sup>
<i>min2</i> (X 10 <sup>-2</sup> )	-0.126±0.02	-0.130±0.07	-0.085±0.03 <sup>†</sup>	-0.096±0.04 <sup>†</sup>
<i>tmin1</i>	13.52±0.32	18.23±4.96 <sup>†‡</sup>	26.38±4.41 <sup>†</sup>	25.21±11.11 <sup>†</sup>
<i>min1</i> (X 10 <sup>-1</sup> )	-0.130±0.03	-0.148±0.07	-0.103±0.02 <sup>†</sup>	-0.120±0.04
<i>tmax2</i>	14.89±0.38	20.19±6.37 <sup>†‡</sup>	28.04±4.49 <sup>†</sup>	26.83±11.24 <sup>†</sup>
<i>max2</i> (X 10 <sup>-3</sup> )	0.548±0.09	0.512±0.31	0.287±0.09 <sup>†</sup>	0.363±0.18 <sup>†</sup>
勾配 3 (X 10 <sup>-3</sup> )	-0.109±0.02	-0.081±0.05 <sup>†</sup>	-0.102±0.04	-0.103±0.08 <sup>†</sup>
変化量	0.312±0.07	0.510±0.17 <sup>†</sup>	0.470±0.10 <sup>†</sup>	0.510±0.16 <sup>†</sup>

† 正常ドナー集団に関して得られた結果と有意に異なる患者群に関する結果

‡ ワルファリン投与を受けている非 APLA 患者に関して得られた結果と有意に異なる APLA 患者 (ワルファリン投与を受けていない) に関する患者

10

20

30

## 【表 2】

表 2. APTT 凝固時間及び光学パラメーター

パラメーター	正常ドナー <i>n</i> =17	APLA 患者 <i>n</i> =13*	ワルファリン 投与を受けて いる非APL A患者 <i>n</i> =17	ワルファリン 投与を受けて いるAPLA 患者 <i>n</i> =26	
APTT 凝固 時間	28.82±4.04	47.73±16.32 <sup>†</sup>	39.87±4.64 <sup>†</sup>	53.32±25.38 <sup>†</sup>	10
勾配 1 (X 10 <sup>-3</sup> )	-0.039±0.04	-0.062±0.14 <sup>‡</sup>	0.043±0.04 <sup>†</sup>	-0.013±0.20 <sup>‡</sup>	
<i>t</i> <sub>min2</sub>	28.34±4.11	47.32±16.45 <sup>†</sup>	39.93±4.71 <sup>†</sup>	53.31±25.55 <sup>†</sup>	
<i>min</i> 2 (X 10 <sup>-3</sup> )	-0.201±0.03	-0.183±0.10	-0.162±0.04 <sup>†</sup>	-0.165±0.06 <sup>†</sup>	
<i>t</i> <sub>min1</sub>	31.93±5.01	51.83±17.66 <sup>†</sup>	42.36±4.69 <sup>†</sup>	57.42±26.86 <sup>†</sup>	
<i>min</i> 1 (X 10 <sup>-1</sup> )	-0.102±0.02	-0.096±0.06	-0.087±0.02 <sup>†</sup>	-0.087±0.04	20
<i>t</i> <sub>max2</sub>	37.74±4.74	60.62±20.05 <sup>†</sup>	49.51±4.99 <sup>†</sup>	65.46±28.30 <sup>†</sup>	
<i>max</i> 2 (X 10 <sup>-3</sup> )	0.166±0.03	0.130±0.01 <sup>†</sup>	0.093±0.03 <sup>†</sup>	0.102±0.06 <sup>†</sup>	
勾配 3 (X 10 <sup>-3</sup> )	-0.016±0.01	-0.052±0.10 <sup>‡</sup>	-0.059±0.03 <sup>†</sup>	-0.038±0.04 <sup>‡</sup>	
変化量	0.479±0.09	0.693±0.17 <sup>†</sup>	0.642±0.111 <sup>†</sup>	0.692±0.15 <sup>†</sup>	

\*ワルファリン投与を受けなかったAPLA患者の2人は、>150秒のAPTT結果を得て、そしてこれら分析では含めない。

†正常ドナー集団に関して得られた結果と有意に異なる患者群に関する結果。

‡ワルファリン投与を受けている非APLA患者に関して得られた結果と有意に異なるAPLA患者（ワルファリン投与を受けていない）に関する結果。

30

## 【0056】

APLA患者からの血漿における負のPT勾配1はIgGに起因する

患者IgGがPT勾配1で観察された異常に寄与するかどうかを決定するために、正常血漿サンプルからのPT光学プロファイル（図10A）を、全IgGの除去前（図10B）及び除去後（図10C）のAPLA患者血漿からのPTプロファイルと比較した。プロテインAセファロースCL-4Bカラムクロマトグラフィーを用いてAPLAが上昇した2人の患者に関して血漿からIgG抗体を除去した。APLA患者からの全IgGの除去により、IgG涸渇前の同一血漿と比較して、PT勾配1のほとんど完全な正規化（絶対値で12倍低下）及び凝固時間の大幅な短縮に至った（図10B及びC）。この患者は試験時に経口抗凝固剤治療を受けておらず、そして後天性低プロトロンビン血症ではなかった。

40

## 【0057】

IgG涸渇正常血漿へのAPLA患者からのIgGの添加

2人のAPLA患者から精製した全IgGを6人の正常ドナーからのIgG涸渇血漿サンプルに添加し、最終濃度8mg/mlを得た。6人の正常血漿に関する平均PT勾配1

50

の結果はベースラインで  $0.306 \times 10^{-3} \pm 0.109 \times 10^{-3}$  であり、そして平均PT凝固時間は  $12.88 \pm 0.23$  秒であった。APLA IgGの添加後、平均PT勾配1は  $-0.521 \times 10^{-3} \pm 0.063 \times 10^{-3}$  ( $p < 0.0001$ ) であり、そして平均PT凝固時間は  $13.71 \pm 0.24$  秒 ( $p < 0.0001$ ) であった。1つの正常血漿での個体の実験に関する光学プロファイルはPTに関しては図11A及び11Bに、そしてAPTアッセイに関しては11C及び11Dに示す。これらの同一のIgG調製物もまたAPT凝固時間の延長を引き起こしたが、6つのIgG過剰正常血漿に関するAPT勾配1の結果には影響しなかった(パネルC及びD)。対照的に、正常血漿からの全IgGの、IgG過剰APLA患者血漿への添加は凝固時間または勾配1の結果を変化させなかった(データは示していない)。

10

## 【0058】

ワルファリン投与を受けている患者からのIgG過剰血漿へのAPLA患者からのIgGの添加

APLA患者からの全IgGをワルファリンの投与を受けている非APLA患者6人からのIgG過剰血漿サンプルに添加し、最終濃度  $8 \text{ mg/ml}$  を得た。ワルファリン治療を受けている非APLA患者からの血漿サンプルの平均PT勾配1は  $0.231 \times 10^{-3} \pm 0.07 \times 10^{-3}$  であり、そして平均PT凝固時間は  $20.63 \pm 2.68$  秒であった。APLA IgGの添加前のIgG過剰血漿サンプルの平均PT勾配1は  $0.251 \times 10^{-3} \pm 0.105 \times 10^{-3}$  であり、そして平均PT凝固時間は  $20.59 \pm 2.829$  秒であった ( $p =$  有意でない)。しかしながらAPLA IgGの添加後、平均PT勾配1は  $-0.232 \times 10^{-3} \pm 0.0724 \times 10^{-3}$  ( $p < 0.0001$ 、IgG過剰血漿と比較) であり、そして平均PT凝固時間は  $22.041 \pm 2.829$  秒 ( $p < 0.0001$ ) であった。経口抗凝固剤治療を受けている1人の患者での個体の実験に関する光学プロファイルはPTに関しては図12A及び12Bに、そしてAPTアッセイに関しては12C及び12Dに示す。正常ドナーから精製した全IgGの、IgG過剰APLA患者血漿への添加は凝固時間または勾配1の結果を変化させなかった(データは示していない)。

20

## 【0059】

APLAを有する患者からの全IgGの、ワルファリンを投与されている非APLA患者からのからのIgG過剰血漿サンプルへの添加は、統計的に有意なINRの増加に至った(図13)。INR結果で観察されたシフトは2つのIgG調製物に関してわずかに異なり、これはこれらの抗体の異種性特性と合致した(図13)。2つのIgG過剰血漿サンプルに関して、APLA患者からの全IgGの添加により、治療用INRから治療を超えた結果へのシフトに至った(図13)。この結果は、数人の患者における経口抗凝固剤治療中の抗リン脂質抗体がPT結果を延長させる公知の能力と合致する。これはしばしば抗凝固の実際のレベルを反映しないINR結果に至る。

30

## 【0060】

C反応性タンパク質のレベルは負のPT勾配1の存在に随伴されない

DICを有する患者からの負のAPT勾配1がVLDLとCRPとの間の複合体形成に起因したという知見は、Fischerらに記載されるように、APLAを有する患者におけるCRPのレベルに注目することを我々に促した。異常なPT勾配1値を有する38人の患者からの血漿サンプルを試験した。CRPレベルと異常PT勾配1の結果の振幅との間に相関性はなかった ( $r = 0.1712$ ;  $p = 0.2908$ )。さらに、これらの患者のうち22人(58%)は正常なCRPレベルを有していた。従って、APLA血漿における負のPT勾配1値の存在はCRPレベル上昇とは関連しなかった。

40

## 【0061】

負のPT勾配1はフィブリノーゲンまたはトロンピン活性を必要としない。

## 【0062】

負のPT勾配1は血塊形成の発現の前に生じる凝固前事象である。フィブリノーゲンが負のPT勾配1の作成に必要なかどうかを試験するために、APLAを有する患者及び正常

50

ドナーからの脱フィブリン血漿を入手した。正常ドナーからの脱フィブリン血漿サンプルは凝血せず、そして負のPT勾配1を有さなかった(図3A)。対照的に、脱フィブリン患者血漿サンプルもまた凝血しなかったが、これらのサンプルは依然負のPT勾配1を有していた(図3B)。負のPT勾配1のトロンビン活性への依存性を考慮から外して、APLA患者血漿サンプル(A003及びA004)をヒルジンの漸増濃度でスパイクした。PT凝固時間は徐々に延長されたが、負のPT勾配1は未変化のままであった(データは示していない)。

#### 【0063】

精製された患者IgGはたいていの患者で異常IgG波形アッセイを引き起こさなかった

10

負のPT勾配1の作成にはトロンビンもフィブリノーゲンも必要としなかったので、IgG単独で異常な凝固前相を誘起し得るかどうかを試験した。図15に示すように、全IgGをPT基盤のアッセイにおいて血漿の代わりに使用した場合、2つのIgGサンプル(A025及びA445)のみが正常なドナーサンプルと比較して異常な凝固前相を表示し、これはさらなる血漿成分が異常な波形プロファイルに寄与していたこと示唆している。

#### 【0064】

異常IgG波形アッセイの生成におけるリン脂質結合血漿タンパク質の役割

患者A003及びA004からの精製されたIgGを用いるIgG波形アッセイにおいて異常な凝固前相反応に寄与するための5つのリン脂質結合タンパク質を試験した。試験した血漿タンパク質の中でプロトロンビン及び $\alpha_2$ GPIのみがIgG波形アッセイにおける異常プロファイルの作成に寄与した(図16)。双方のタンパク質がその生理学的濃度で異常IgG波形結果を、そしてその生理学的濃度の4倍の濃度でわずかにさらに異常な結果引き起こした(図5)。第IX因子、第X因子及びアニキシンVは異常なIgG波形アッセイを引き起こさず、ヒト血漿アルブミンも引き起こさなかった。

20

#### 【0065】

IgG調製物はその反応性においてプロトロンビン及び $\alpha_2$ GPIと異なる

負のPT勾配1のプロトロンビン及び $\alpha_2$ GPIへの依存性をさらに定義するために、漸増濃度のプロトロンビン及び $\alpha_2$ GPIの存在下で9人の患者及び2人の正常ドナーに関するIgG波形アッセイの結果を特徴づけした。リン脂質結合タンパク質の不在下で異常IgG波形を伴う2つのIgG調製物(A025及びA445)に関して、 $\alpha_2$ GPIの漸増濃度で患者A445に関する異常IgG波形の結果が増強された(図17A)。しかしながら、どの患者でもプロトロンビンの添加では影響はなかった(図17B)。3つのIgGサンプル(患者A003、A004及びA028)は $\alpha_2$ GPI(図6A)またはプロトロンビン(図6B)の存在下で用量依存的な様式で異常IgG波形を進展させた。3人全ての患者で $\alpha_2$ GPI及びプロトロンビンに対するIgG抗体レベルが上昇した(図1)。別の3人の患者のIgGサンプル(患者A005、A006及びA532)はプロトロンビンへの依存性を示したが、 $\alpha_2$ GPIには示さなかった(図6)。3人全ての患者でIgG抗プロトロンビンレベルが上昇したが、A006のみで抗 $\alpha_2$ GPI IgGレベルが上昇した(図1)。最後に、1人の患者のIgG(患者A125)はプロトロンビンでも $\alpha_2$ GPIでも異常IgG波形を誘起しなかった。この患者はAPSを有していたが、プロトロンビンまたは $\alpha_2$ GPIに対する抗体レベルは上昇していなかった(図1)。2人の正常ドナーからのIgGサンプルはリン脂質結合タンパク質の存在下でも不在下でも異常なIgG波形を誘起しなかった(1人の正常ドナーを図6に示す)。プロトロンビン及び $\alpha_2$ GPI単独では異常なIgG波形アッセイを誘起しなかった(データは示していない)。

30

40

#### 【0066】

異常IgG波形は $\alpha_2$ GPIのリン脂質への結合を必要とした

次にタンパク質補助因子がIgG波形アッセイにおいて切断された $\alpha_2$ GPIを元来の $\alpha_2$ GPIと置換することによりリン脂質膜表面に結合できなければならないかを試験し

50

た。非リン脂質結合<sub>2</sub> GPIはその野生型の対応物と同一の濃度でA003 IgGの存在下で試験した場合、この患者からの抗体はELISAにおいて切断された<sub>2</sub> GPIに結合したにもかかわらず、異常なIgG波形を誘起しなかった(図18)。

#### 【0067】

異常IgG波形は試薬特異的であった

200 μg/ml<sub>2</sub> GPIの存在下、9人の患者のIgGサンプル中5人のサンプルでSimplastin Lを用いて異常IgG波形アッセイが観察された(図19A)。対照的に、9人の患者IgGサンプル中2人のサンプルのみがプロトロンビンInnovinを用いて異常IgG波形アッセイを有した(図19B)。注目すべきは、これらの2人の患者はA025及びA445であり、双方共にSimplastin Lで補助因子非依存性IgG波形アッセイを実証した(図4)。これらの2人の患者のIgGサンプルはまた<sub>2</sub> GPI不在下でInnovinを用いて異常なIgG波形アッセイを有した(データは示していない)。

10

#### 【0068】

臨床結果との相関性

4人の患者は再発性静脈性及び/または動脈性血栓性事象を有した(A003、A004、A006及びA028)。これらの4人の患者のうち3人は<sub>2</sub> GPI及びプロトロンビンの双方で異常なIgG波形アッセイを有した。4番目の患者(A006)はプロトロンビンのみで異常なIgG波形アッセイを有したが、ELISAにより検出される抗<sub>2</sub> GPI抗体を有した(図1)。これらの患者のうち3人はまた第V因子Leidenに関してヘテロ接合性であった(図1)。4人の患者は単一の血栓塞栓性事象を有し、そして:[1]さらなるタンパク質補助因子の不在下で異常IgG波形アッセイ(A025、A445); [2]プロトロンビンのみで異常アッセイ(A532); または[3]正常IgG波形アッセイ(A125)を有した。注目すべきは、これらの患者のうち1人はまた第2のプロトロンビン多型性を有した(プロトロンビンG20210A多型; 患者A532)。我々の研究で1人の患者のみが無症候性であった(A005)。この患者はプロトロンビンの存在下で異常IgG波形プロファイルを有したが、<sub>2</sub> GPIでは有さなかった。患者の中でCys<sup>306</sup>またはTrp<sup>316</sup>での非リン脂質結合性<sub>2</sub> GPI多型性に関してホモ接合性であるものはなかった(図1)が、患者A005はTrp<sup>316</sup> Serに関してヘテロ接合性であり、そして患者A445はCys<sup>306</sup> Glyに関してヘテロ接合性であった。

20

30

#### 【0069】

前記のデータは前記したような通常の凝固臨床試験、プロトロンビン時間、またはその他の凝固試薬(APTT、TT、DRVVT等)もしくはフィブリン重合を活性化させない類似の試薬に基づいた単純な方法を用いてAPLA IgG抗体の存在を検出する能力を説明している。これらの実例はワルファリン経口抗凝固剤治療中に用いることができ、そしてヘパリンの影響を受けない方法を実証している。経口抗凝固剤治療はしばしばPTアッセイを用いてモニター観察される。種々のプロトロンビンは第II、第V II及び第X因子の血漿レベルに対して感受性が異なるので、国際標準比率(INR)を導入して異なる試薬で得られたPT時間の比較を可能にした。PT凝固時間はしばしば抗リン脂質抗体症候群(APS)を有する患者において延長され、これはこれらの患者における抗凝固剤治療の管理を複雑にし得る。さらに、ワルファリン投与を受けているAPSの患者がしばしば、これらの患者の抗凝固の真のレベルを正確に反映しない非常に異なったINRを有していることを示している。従って、血漿中に存在し得る高レベルの抗リン脂質抗体が血塊形成に干渉し得るので、標準化PTに対するINRの使用はAPSの患者にとって妥当ではない。臨床抗凝固治療では、患者がAPSを有しているかいないかを、一連の経費のかかる試験を行わずに決定することはしばしば困難である。従って、抗凝固治療をモニター観察するのに用いられる通常のPT試験からのPT勾配1値は、そうでなければ気付かれないか、またはそうでなければ不適切な治療を受けているかもしれない、APLAを有している可能性が上昇している患者を同定するのに非常に有用である。経口抗凝固

40

50

剤は凝固の発現を遅延させることができるが、勾配1に影響しない。APLA患者からの精製された全IgG調製物は負の勾配1を作成するのみならず、凝固時間を有意に延長し、そしてIgG涸渇経口抗凝固剤投与されていた非APLA血漿においてINRを増加させ、これはINR値の増加とAPLAの存在との関係を示唆している。もちろん、凝固試薬以外の試薬、及び凝固分析器以外の分析器を本発明で用いることができる。

#### 【0070】

さらに詳細には、前記のデータは生物学的に重要な抗体サブセットを同定する能力を示している。精製された患者のIgG、精製されたタンパク質補助因子及び前記したような負のPT勾配1を作成する特異的トロンボプラスチンを使用するアッセイを用いて、異常なPT波形パラメーターに寄与する成分をよりよく定義すること、及び再発性血栓性事象のリスクを有した患者を同定するためのアッセイを適用する可能性を認識することが可能になっている。

10

#### 【0071】

これらの患者で検出される異常な凝固前相はIgG抗体媒介であり、そしてプロトロンビン及び/または<sub>2</sub>GPIの存在により増幅される。APLAは<sub>2</sub>GPI及びプロトロンビンに結合することが示されており、そしてAPLA-プロトロンビン複合体は脂質膜に結合することが示されている。いく人かの患者でその他のリン脂質結合タンパク質がこの効果を媒介することが可能であり(例えばプロテインS、高分子量キニノゲン)、この研究の患者A125の場合である。これらの結果はまた、追加のプロトロンビンを反応混合物に加えた場合、抗プロトロンビン抗体を有している、ワルファリン治療を受けている特定の患者がこのアッセイによりさらに良好に検出され得ることを示唆している。

20

#### 【0072】

本明細書では記載していない別の実験で、異常なIgG波形結果が組織因子の存在に依存しないことが示された。Dade Innovin(登録商標)は、精製されたホスファチジルセリン及びホスファチジルコリンの混合物で再脂質化された精製された組換えヒト組織因子からなり、これはウサギ脳組織から抽出され、そしてホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン及びその他の脂質などのリン脂質の複合混合物を含有するSimplastin Lと同様には作用しなかった。勾配1決定に基づくAPS個体の検出を可能にするその他の試薬はDade Cプラス及びSimplastin R HTFであった。図14A及び14Bは種々試薬と異なるリン脂質結合タンパク質との相関を示す。

30

#### 【0073】

データはまたIgG波形アッセイが病理学的APLAと非病理学的APLAとを区別できることを示している。例えば異常IgG波形プロファイルを作成するために<sub>2</sub>GPIを必要としたIgGを有するこれらの個体は再発性の血栓症問題を有した(A003、A004及びA028)。対照的に、3人の患者の中の1人はプロトロンビンで異常波形を実証したが、<sub>2</sub>GPIでは実証しなかったIgGサンプルを有し、無症候性であり(A005)、そしてもう1人は単一の静脈性血栓性事象を維持していた(A532)。さらなるプロトロンビンのリスク因子の存在(例えば第V因子Leiden)もまたこれらの患者における血栓症のリスクを変化させることが示されており、再発性の事象を有する4人の患者の中の3人はまた第V因子Leidenに関してヘテロ接合性であった。

40

#### 【0074】

前記の実例では、PT試薬を各患者サンプルに添加した。しかしながら、PT試薬の代わりにリン脂質小胞を個体の被験サンプルに添加することも可能である。小胞またはリポソームを例えば天然供給源、合成リン脂質、または被験サンプルに加えた血小板から精製することができる。リン脂質が天然供給源に由来する場合、供給源は哺乳動物組織(例えば哺乳動物、一般的にはウサギの脳組織または胎盤)でよい。リン脂質を金属カチオン(一般的にはカルシウムまたはカルシウム塩)を伴ってまたは伴わずに被験サンプルに添加することができる。標準的なPT試薬を使用しない場合、小胞またはリポソームを血小板、細胞残屑、リン脂質または血小板マイクロ粒子の形態で添加することができる。本発明

50

の1つの実施形態では、1つまたはそれ以上のPC、PS、PEまたはPIを個体の被験サンプルに（金属カチオンを伴ってまたは伴わずに）添加し、続いて被験サンプル中の濁度を光学的にモニター観察する。

#### 【0075】

前記したように、実際のフィブリン重合は最初の勾配を検出するのに必要ではないので、凝固の活性化は必要ではない。図8で説明するように、フィブリン重合がトロンビンインヒビターの添加により開始された場合でさえも勾配1の変化は明白である。この型の波形は、凝固を活性化しない試薬（例えばフィブリン重合を引き起こさないで凝血に至る）を被験サンプルと単純に混合することによっても達成できる。血塊形成の発現なしで、勾配1は、血塊形成を含み、そして凝固を生じることができる期間を含み得る特定の期間にわたって波形の勾配として決定される。このもしかするとより長い期間より多くのデータの点を可能にすることができ、いくつかの状況で試験の精度を増す可能性がある。

10

#### 【0076】

リン脂質に加えて金属カチオンをサンプルに加えることができるが、勾配1を得るかまたはAPS状態を予測する必要はない。金属カチオンは2価金属カチオンであるのが好ましく、そして塩の形態で添加することができる。好ましい実施形態では、塩は塩化カルシウムであるが、その他の塩（例えばマグネシウムまたはマンガン）を用いることもできる。所望によりバッファ及び安定剤を添加することもできる。前記の成分のいずれかを別個に、または非凝固試薬の一部として一緒に添加することができる。また別に、前記した凝固試薬を用いる場合、トロンビンのインヒビターを添加することができる。凝固が試験で活性化されない場合、光透過率の全体的な低下（変化量）を複数のパラメータ評価において用いることができる（少なくとも勾配1及び変化量）。

20

#### 【0077】

凝固試薬を用いる場合、次いで本明細書で前記した勾配1のモニター観察に加えて、凝血波形からさらなるパラメータを利用することができる。プロファイルのパラメータは血塊形成の開始時間の1つまたはそれ以上の時間、プロファイルの全体的な変化（例えば光透過率の全体変化）、血塊形成の開始後のプロファイルの勾配、凝血開始の時間での促進、血塊形成の終点後の勾配等でよい。好ましいさらなるパラメータは血塊形成の開始及び血塊形成終点後の勾配である。APLA患者を正常の患者と区別する最大の能力を有しているパラメータを表1に示す（PT波形）。

30

#### 【0078】

本発明のアッセイを実施するための試薬またはキットは凝固活性剤、とりわけPT試薬に見出されるような組織因子を含むことができる。しかしながら好ましいキットは、前記したようなリン脂質小胞またはリポソームの形態のリン脂質を金属塩または金属イオンを伴ってまたは伴わずに含んでなる。キットはまたアッセイを実施するための、及びアッセイの結果がサンプル中の抗リン脂質抗体の上昇の可能性を示すかどうかを決定するための指示書をも提供する。指示書はまた確認を求める（例えばイムノアッセイによる）ための提言、または抗リン脂質症候群を確認するための1つまたはそれ以上の確認アッセイを実施するための実際の指示書をも含むことができる。リン脂質を含んでなる凝固試薬を用いる場合、血塊形成の開始の前に勾配1を決定する指示を示すべきである。より長時間にわたる勾配1の決定を可能にするために、凝血インヒビターを含むこともできる。また、アッセイの感度を増強するためにさらなるリン脂質結合タンパク質、例えばAPLAが特異的であるタンパク質（例えば<sub>2</sub>糖タンパク質、カルジオリピン、プロトロンビン）、及び1つまたはそれ以上のタンパク質の添加のための指示書を加えることもできる。リン脂質結合タンパク質をPT試薬に、またはリン脂質小胞を含んでなる試薬に加え、続いて凝血プロファイルをモニター観察することができる。勾配1が最初に検出された後、リン脂質結合タンパク質を1つまたはそれ以上の確認アッセイに用いることもできる。確認試験では、特定のリン脂質結合タンパク質を最初の試験から同一の（複数の）試薬と一緒に被験サンプルに加える。勾配1がさらに険しくなる場合、次いで特定のAPLA抗体の存在が解る。例えば、被験サンプルが試験され、そして勾配1の結果に至る場合、例えば

40

50

糖タンパク質及び/またはプロトロンビンの添加を伴って第2の試験を行うことができる。第2試験が第1試験よりも大きな勾配になる場合、次いでリン脂質結合タンパク質に対する抗体(例えば抗<sub>2</sub>糖タンパク質)の存在を決定することができる。APSを伴う多くの患者に関して勾配1を引き起こすことができるリン脂質のみならず、さらに確認試験でリン脂質に加えることができる1つまたはそれ以上のリン脂質結合タンパク質(プロトロンビン、<sub>2</sub>糖タンパク質、抗カルジオリピン)をも有しているキットを提供することができる。キットの指示書により使用者がキットリン脂質を患者の被験サンプル(例えば血漿)に添加することにより時間依存的測定プロファイルを実行するのを指示する。勾配1の(例えば特定の値を超えた)結果がでると、次いでリン脂質を1つまたはそれ以上のリン脂質結合タンパク質と一緒に添加する第2のアッセイで勾配1が増加し得るかどう  
10  
かを調べるために、第2のアッセイを実施するようにキットの使用者に指示する。患者の被験サンプルでの勾配1の検出後、勾配1の値が増加し得るかどうかを決定するために、リン脂質の量を次のアッセイで増加させるべきであることを指示書が指示するキットを有することも可能である。そしてもちろん複数のさらなるアッセイ(リン脂質結合タンパク質を添加する1つまたはそれ以上のアッセイ、及び1つまたはそれ以上のリン脂質を次のアッセイで増加させる1つまたはそれ以上のアッセイ)。

【0079】

別の確認アッセイ(及び同一物を含むキット)は、希釈されたラッセルクサリヘビ毒を患者被験サンプルに加えて、凝固時間が延長されるかどうか、及び/または勾配1の結果がでるかどうかを調べるDRVVT試験である。リン脂質の量を第2の試験のために増加  
20  
させる2つのDRVVT試験(1つはスクリーニング用、そして1つは確認用)を実行することも可能である。望む場合、APTTをスクリーニングアッセイとして実行する場合、及び勾配1が特定の閾値を越える結果になる場合、次いでDRVVT確認アッセイを実施する。実際に、凝固試薬(TT、PT、APTT、DRVVT等)またはリン脂質を第1のスクリーニングアッセイに使用し、つづいてリン脂質がより高濃度である同一または異なる試薬を使用することができる。または、血小板中和アッセイを確認アッセイとして実施することができる。

【0080】

APTTスクリーニングアッセイを実施することも可能であり、勾配1が存在する場合、第2の修飾APTTアッセイ(カルシウムを用いない以外は標準的なAPTTアッセイ  
30  
と同一)を実施して、LCCRPにより引き起こされる勾配1の可能性を除外する。さらに、第1にAPTTアッセイを実施することも可能であり、(カルシウムを用いる)APTTアッセイが続く。本発明では第2のアッセイを行わないで、修飾されたAPTTアッセイをそのままスクリーニングアッセイとして実行することもできる。

【0081】

スクリーニングアッセイとして用いることができるリン脂質は好ましくは少なくともホスファチジルコリン(PC)及びホスファチジルセリン(PS)であり、場合によってはホスファチジルエタノールアミン(PE)もまた感度を上げるためのリン脂質混合物の一部にしてもよい。リン脂質混合物は10%またはそれ以上、好ましくは15%またはそれ  
40  
以上のPSを含んでなることができる。20%もしくはそれ以上、または25%もしくはそれ以上の量もまた可能である(10%から30%が好ましい)。リン脂質混合物中のPCの量は好ましくは少なくとも40%(好ましくは40%から70%の範囲)であり、一方PS、PC及びPEの混合物中残りはPE、少なくとも5%、または少なくとも15%である(例えば5から50%、好ましくは5から30%の量)。好ましくは、リン脂質は天然の供給源に由来するが、合成的に誘導されたリン脂質を使用することもできる。図20で示されるように、PC:PS=75:25の混合物によりいく人かのAPLA患者の検出が可能になる。しかしながら、図21で示されるように、PE/PC/PSの混合物は正常とAPLA被験サンプルとをより良好に識別する。

【0082】

1つ以上のアッセイを患者の被験サンプルで実行する場合、第1のリン脂質混合物を、

10

20

30

40

50

第2の試験のリン脂質混合物よりも低濃度/量になるように選択することができる。患者サンプルに関する第1の試験のためのリン脂質混合物を、第1の試験を高感度にするためにでき、一方第2の試験のためのリン脂質混合物を、第2の試験をさらに特異的にするためにできる。好ましくは、第1の(スクリーニング)試験には感受性のあるリン脂質混合物または天然供給源に由来するプロトロンビン試薬を用いる。

#### 【0083】

前記の実例では、患者がAPLAを有している可能性の上昇を予測するために閾値(勾配1の値)を用いる。2000年8月8日発行のGivensらに対する米国特許第6101449号、及び2001年11月20日発行のBraunらに対する米国特許第6321164号に開示される複数のパラメーター及びモデリング、ならびに1999年6月30日に出版されたGivensらに対する米国特許出願第09/345080号に示される自己組織化特徴マップを用いて本発明を容易に実行することもできる(各々は出展明示により本明細書の一部とする)。1つの実施形態では、モデルのパラメーターの1つはPT(またはAPTまたはその他の凝固試薬)プロファイルにおける凝血開始前の勾配(勾配1)である。またPT凝血プロファイルからのその他の部分またはパラメーターを用いてAPSの可能性の上昇を予測することもできる。再度表1を参照して、経口抗凝固剤(ワルファリン)を投与されていないAPLA患者は正常ドナー(ワルファリンを投与されているAPLA患者も同様)とは有意に異なる勾配1を有するのみならず、ワルファリンを投与されている非APLA患者と比較して、凝固時間、 $t_{min2}$ 、 $t_{min1}$ 、 $t_{max2}$ 、勾配3及び変化量もまた有意に異なった。これらのAPLA患者はまたワルファリンを投与されている非APLA患者と比較して、有意に異なる勾配1、 $t_{min2}$ 、 $t_{min1}$ 及び $t_{max2}$ を有した。ワルファリンを投与されているAPLA患者は正常ドナーと比較して有意に異なる勾配1を有したが、正常と比較して、凝固時間、 $t_{min2}$ 、 $t_{min1}$ 、 $t_{max2}$ 、 $t_{max1}$ 、勾配3及び変化量もまた有意に異なった。勾配1に加えて、そのようなその他のパラメーター、または米国特許第6101449号に示される複数のパラメーター及びモデリングを用いて患者が有しているAPSの可能性の上昇の存在を予測することができる。

#### 【0084】

単一のパラメーターの閾値を用いても、または複数のパラメーターモデルを用いても、患者サンプル中のAPLAの可能性の指標がある場合、APLAに関する確認アッセイ(例えばイムノアッセイ)及び/またはLC-CRPの可能性から区別するためのアッセイを実行するのが望ましい(しかしながら複数のパラメーターモデルではこれは不必要になる)。実施することができるかかる区別アッセイの1つはホスホリルコリンの添加を伴うAPTアッセイである-勾配1は、元来LC-CRPに起因する勾配1を有したAPTアッセイでは形成されない。または望む場合、定量的LC-CRPアッセイを実行して、このメカニズムにより引き起こされる勾配1の可能性を除外することができる(例えばAPTアッセイにおいて)。これはリン脂質を伴わないで金属カチオン(例えばカルシウム)を添加するか、または凝固試薬を用いる場合、その型を変えることにより達成することができる(前記したように、リン脂質及び金属カチオンを含んでなる試薬を、リン脂質及び金属カチオンを有する凝固試薬の代わりに用いることができる)。いずれかの事象では、予め決定した閾値(または勾配1を含み得る1つまたはそれ以上のパラメーターを利用するモデル予測)を越える勾配1の存在はAPLAの可能性の指標であり、そして好ましくは、さらなる試験で追跡して、患者がAPSを有しているかどうかを確認すべきである。

#### 【0085】

APLAに関する確認アッセイは、いずれかの(異種性)抗リン脂質抗体に関する1つまたはそれ以上のイムノアッセイでよい。好ましくは、確認アッセイは抗<sub>2</sub>糖タンパク質、抗プロトロンビンまたは抗カルジオリピン抗体に関するイムノアッセイである。いずれかの公知のアッセイ方法、例えば金属ゾル・イムノアッセイ、ELISA、ラテックス・イムノアッセイ等によりかかるイムノアッセイを実施することができる。確認アッセイ

は基準：[ 1 ] リン脂質依存的スクリーニングアッセイの延長；[ 2 ] プールされた正常血漿との 1 : 1 混合物を用いる延長されたアッセイの修正の欠如；及び[ 3 ] 過剰のリン脂質の添加により延長されたアッセイの修正；に従って A P L A を同定するためのアッセイでもよい。

【 0 0 8 6 】

本発明のアッセイは定量的または反応定量的アッセイでもよい。図 1 4 a 及び 1 4 b に示されるように、勾配 1 の程度をリン脂質抗体（この場合抗<sub>2</sub>糖タンパク質抗体及び抗カルジオリピン抗体）の量、A P S の程度及び/または血栓性事象の可能性に相関させることができる。しばしば抗リン脂質抗体を伴う患者で上昇する抗体レベルとの相関性研究により、66 人の A P L A 患者のこの集団において、負の勾配 1 の値と抗カルジオリピン I g G ( r = 0 . 7 ) のレベル及び<sub>2</sub>糖タンパク質に対する抗体のレベル ( r = 0 . 6 ) との相関性を示した。このように、A P L A を定量でき、及び/または患者の進行もしくは退行を勾配 1 に関して繰り返し行った試験に基づいて（または前記したような複数のパラメーターの繰り返し行った分析に基づいて）モニター観察することができる。

10

【 0 0 8 7 】

前記した P T 試薬またはリン脂質の代わりに、試薬は A P T T 試薬でよい。図 3 に示されるように、A P T T 凝血プロファイルにおける勾配 1 はまた抗リン脂質抗体症候群を有する患者の可能性の上昇を示し得る。そして、表 2 に示されるように、A P T T 凝血プロファイルから、経口抗凝固剤（ワルファリン）投与を受けていない A P L A 患者は（正常と比較して）有意に異なる A P T T 勾配 1、ならびに凝固時間、t m i n 2、t m i n 1、t m a x 2、m a x 2、勾配 3 及び変化量を有した。経口抗凝固剤投与を受けていないこれらの A P L A 患者はまた経口抗凝固剤投与を受けている非 A P L A 患者と比較して有意に異なる勾配 1 及び勾配 3 を有した。経口抗凝固剤投与を受けている A P L A 患者は経口抗凝固剤投与を受けている非 A P L A 患者と比較して有意に異なる勾配 1 及び勾配 3 を有し、そして正常と比較して A P T T 凝固時間、t m i n 2、m i n 2、t m i n 1、t m a x 2、m a x 2 及び変化量が有意に異なった。これらのパラメーターは単独でまたは複数パラメーターモデル（例えば、前記した神経ネットワークモデル）で一緒に、A P S の可能性の上昇を予測するために用いることができた。

20

【 0 0 8 8 】

本発明はまた患者が重大なリスクのある患者、例えば血栓性事象のリスクが上昇している患者であることを決定することをも志向する。血栓症は最も一般的に抗リン脂質抗体の存在に随伴される臨床事象である。血栓性事象は抗リン脂質抗体を有する患者の 30 % までに報告されており、全体的な発生率は年間患者 100 人あたり 2 . 5 人である。静脈性血栓塞栓症（V T E）は血栓性事象の約 3 分の 2 に相当する。脳梗塞は最もよくある動脈閉塞性事象であり、しばしば若年層でも発生する。血栓症の再発率もまたとりわけ高く、A P A の存在はさらに器官損傷及び心臓血管性疾患のリスクの上昇などの機能予後の悪さに関連している。抗リン脂質抗体を有する個体における血栓症の発生率が高いために、本発明はリン脂質を被験サンプルに添加し、時間依存的測定を行い、そして勾配 1 を決定し、そして勾配 1 が特定の値を超える場合、次いで個体で血栓性事象を呈するリスクが上昇していることを決定する試験でもよい。

30

40

【 0 0 8 9 】

前記の変法では、個体で血栓性事象のリスクが上昇していることを決定し、ここでリン脂質を患者の被験サンプルに加え、そして特定の閾値を越える勾配 1 を検出する第 1 の試験を実施する。次いでリン脂質及びベータ 2 糖タンパク質 1 またはプロトロンビンのいずれかを患者の被験サンプルに加える第 2 の試験を実施する。さらなるベータ 2 糖タンパク質 1 を添加したときに勾配 1 の上昇が観察される場合（またはプロトロンピンを添加したときに勾配 1 の上昇が観察されない場合）、次いで患者の A P S がベータ 2 糖タンパク質 1 のレベル上昇の存在に起因する可能性が上昇しており、これは抗トロンピン抗体に随伴される A P S に比較して、血栓症の合併症のリスクの上昇に随伴されることが示されている。この方法を用いて A P S の患者が、凝血プロファイルにおける勾配 1 の存在（及び/

50

またはその程度)に基づいてAPS(例えば流産、血栓性事象、SLE、自己免疫障害等)の臨床発現を経験するリスクが高いことを決定することもできる。

【0090】

また個体が流産を経験するリスクが上昇している個体の決定、及び/または既に経験した流産の原因がAPSによるものであることを決定に本発明を適用することもできる。かかる方法では、個体からの被験サンプルを提供し;被験サンプルをリン脂質と組み合わせ;光ビームを被験サンプルに導いてそして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供し;時間依存的測定プロファイルの特定の時間で、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越える値または勾配を検出し;そして、時間依存的測定プロファイルの値または勾配が予め決定された閾値を越える場合、次いで個体で流産を経験するリスクが上昇していること(または既に経験した流産がAPSに起因した可能性があること)を決定する。

10

【0091】

また数週もしくは数ヶ月毎にまたはその他の間隔で試験を複数回実施する本発明を用いて、APSのリスクが上昇していると決定されている(またはAPS患者として確認されている)個体の状態をモニター観察することもできる。抗ベータ2糖タンパク質1を標的とする薬物、例えばLJP 1082(La Jolla Pharmaceuticals Co.より入手)またはこれもしくはリン脂質結合タンパク質に対するその他の抗体を標的とする別の薬物でAPS患者を処置する場合、次いで例えば本明細書で前記したアッセイからの勾配1の存在(及び程度)を決定することにより、かかる治療を経時的にモニター観察することができる。

20

【0092】

本発明はまた全身性エリテマトーデス(SLE)の可能性の上昇を決定することをも志向する。SLEは抗リン脂質抗体を有する患者の35%で報告されている最も頻発する症状の1つである。SLEは米国で毎年100000人以上の入院の原因となり、SLEは出産適齢期の女性の腎臓疾患及び脳梗塞の主要な原因である。

【0093】

本発明の方法を凝固分析器で実施する必要はないが、経時的にサンプルの濁度(または粘度)の変化を決定することができる、好ましくはサンプルを通る光透過率をモニター観察することができる臨床化学分析器またはその他の機器で実施することもできる。特定の値を超える勾配1が前記に従って決定される場合、サンプルをAPSの可能性のあるサンプルとして合図することができる。かかる合図は分析器/装置と接続したプリンターで、またはモニター/スクリーンでの警告、音声警告等によることができる。

30

【0094】

本発明を好ましい実施形態を参照して示し、そして記載してきたが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細において種々の修飾及び変更を施すことができることは技術分野の技術者には理解されよう。例えば、前記では本発明の理解をより完全なものにするために具体的な詳細を示しているが、本発明がこれらの具体的な詳細を用いることなく本発明を実施することができることは技術分野の技術者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

40

【0095】

【図1】この図は勾配1の変化がAPLAを有する患者41人中26人(63%)で同定されたことを示している。

【図2】この図は透過率の第1及び第2誘導を含む、正常な標本のPTまたはAPTアッセイに関する光学透過率対時間を示す。

【図3】図3A及び図3Bは、経口抗凝固剤治療を伴う及び伴わない患者及び対照のAPT凝固時間及び勾配1の結果を説明している。

【図4】図4A及び図4Bは、経口抗凝固剤治療を伴う及び伴わない患者及び対照に由来するSimplastin(登録商標)LでのPT凝固時間及び勾配1の結果の分布を説明している。

50

【図5】この図は正常及びAPLA患者の血漿サンプルのPTアッセイの透過率波形プロファイルを説明する。

【図6】この図はPT及びPT勾配1の値に及ぼすヘパリンの影響を示す。プールされた正常血漿に0.1、0.4、0.6、0.8、1.0及び10U/mlの濃度のブタ由来ヘパリンをスパイクした。

【図7】この図はAPLA患者の血漿のPT勾配1に及ぼすトロンビンインヒビター・ヒルジンの添加の影響を示し、これは変化がトロンビン生成とは独立していることを実証している。

【図8】図8aは、PT試薬(Simplastin L)を患者の血漿に加えた場合の正常及びAPLA患者に関する勾配1を説明し、そして図8bはリン脂質混合物を患者の血漿サンプルに加えた場合の正常及びAPLA患者に関する勾配1値を示している。

【図9】この図はAPLA患者血漿のPT勾配1に及ぼすデタージェント(Triton X-100)の添加の影響を説明している。

【図10】a)正常なTW; b)APLA患者血漿からの負の勾配1を伴うTW;及びc)全IgGを除去した後の同一のAPLA患者からのTWからのPTアッセイ(Simplastin(登録商標)L)に関する透過率波形プロファイルを示す。

【図11】この図は、a)IgGを添加する前の正常なPT TW; b)負の勾配1を示す、8mg/mlで添加したAPLA患者IgGを伴う同一のドナー血漿からの異常PT TW; c)IgGを添加する前の正常なAPTT TW;及びd)正常な勾配1を示す添加したAPLA患者IgG(8mg/ml)を伴う同一のドナー血漿からの延長されたAPTT TW;を伴うAPLA患者からの全IgGでスパイクしたIgG涵濁正常血漿からのPT及びAPTTアッセイの透過率波形プロファイルを示す。

【図12】図は、a)IgGを添加する前のPT凝固時間の延長を示すPT TW; b)負の勾配1を示す、添加したAPLA患者IgGを伴う同一ドナー血漿からの異常PT TW; c)IgGを添加する前のAPTT TW;及びd)添加したAPLA患者IgGを伴う同一ドナー血漿からの正常勾配1を伴うAPTT凝固時間の延長;を伴うAPLA患者からの全IgGでスパイクしたIgG-涵濁した経口抗凝固剤投与した血漿からのPT及びAPTTアッセイの透過率波形プロファイルを示す。

【図13】ワルファリンの投与を受けていた6人の対照からのIgG涵濁血漿における国際標準比率(INR)に及ぼすAPLA IgGの影響を示す。

【図14】図14aは抗<sub>2</sub>糖タンパク質抗体とプロトロンビン時間勾配1との間の相関性を説明し、そして図14bは抗カルジオリピン抗体のレベルとプロトロンビン時間勾配1との間の相関性を説明する。

【図15】図15は、全IgGをPT基盤のアッセイにおける血漿の代わりに用いた場合、正常ドナーサンプルと比較して2つのIgGサンプルのみが異常な凝固前相を表示したことを示すチャートである。

【図16】図16は列挙した血漿タンパク質のうち、プロトロンビン及び<sub>2</sub>GPIのみがIgG波形アッセイにおいて異常プロファイルの作成に寄与したことを説明している。

【図17】図17A及び17Bは、プロトロンビン及び<sub>2</sub>GPIの濃度上昇の存在下での9人のAPS患者及び2人の正常ドナーに関するIgG波形アッセイの結果を示している。

【図18】図18は1つの被験サンプルに関して、非リン脂質結合<sub>2</sub>GPIは、特定の被験サンプルからのIgGの存在下で、その野生型の対応物と同一の濃度で試験する場合、この個体からの抗体がELISAにおいて切断された<sub>2</sub>GPIに結合したが、異常IgG波形を誘導しなかったことを示している。

【図19】図19A及び19Bは、<sub>2</sub>GPIの存在下、APLA被験サンプルと正常との間の識別の程度を、用いたPT試薬に依存して変化させることができることを示している。

【図20】図20は単純なPC:PS(75:25)リン脂質混合物の識別能力を説明している。

10

20

30

40

50

【図21】図21はSimplastin L及び種々PE:PC:PSリン脂質混合物の識別能力の改善を説明している；ならびに

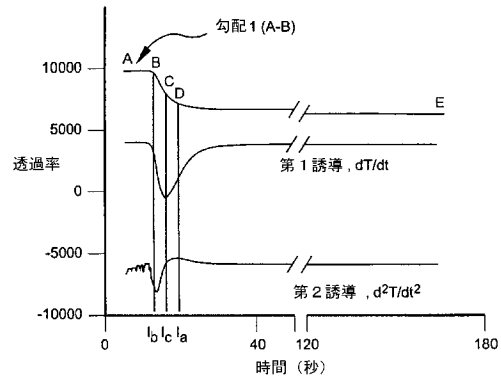
【図22】図22は種々トロンボラスチンの勾配1に対する感受性を説明している。

【図1】

患者	播血症様群	肺原性 血栓症	動脈性 血栓症	ACL IgG	LAC	$\alpha$ - $\beta$ GPII	$\alpha$ -FII	$\beta$ GPI 306*	$\beta$ GPI 316*	FV 506*	FII 20210†
A003	PAPS	DVTs/PES	CVA	158	+	80	23	CC	WW	RQ	GG
A004	SLE	DVT	MI	140	+	17	13	CC	WW	RQ	GG
A005	Asx	-	-	75	+	6	11	CC	WS	RR	GG
A006	PAPS	DVTs/PE	PAO, CVA	144	+	47	13	CC	WW	RQ	GG
A025	PAPS	DVT	-	75	+	11	17	CC	WW	RR	GG
A028	PAPS	DVTs/PE	-	131	+	19	12	CC	WW	RR	GG
A125	PAPS	PE	-	6	+	2	9	CC	WW	RR	GG
A445	PAPS	-	CVA	111	+	47	15	CG	WW	RR	GG
A532	PAPS	DVT	-	10	+	2	16	CC	WW	RR	AG

FIG. 1

【図2】  
FIG. 2



【 図 3 】  
FIG. 3A

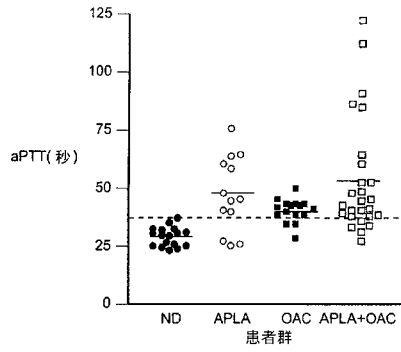
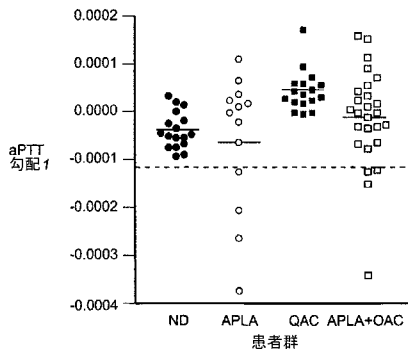


FIG. 3B



【 図 4 】  
FIG. 4A

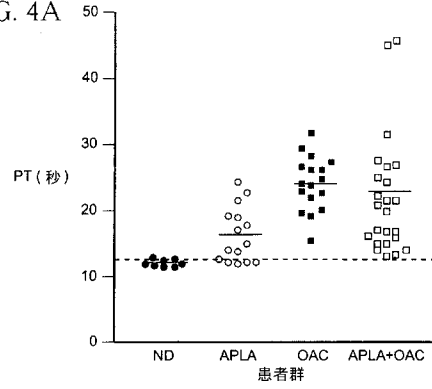
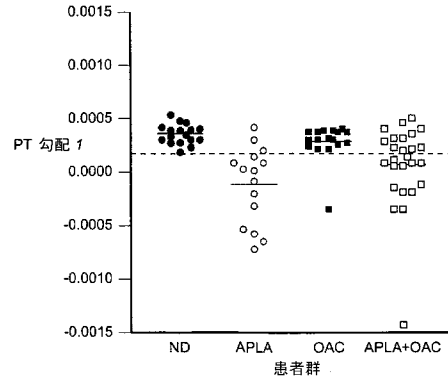


FIG. 4B



【 図 5 】  
FIG. 5A

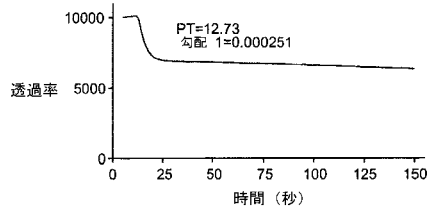
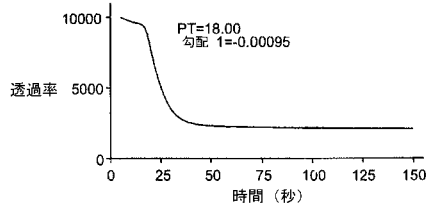


FIG. 5B



【 図 6 】  
FIG. 6A

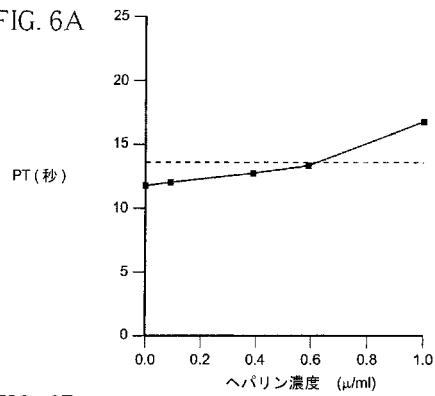
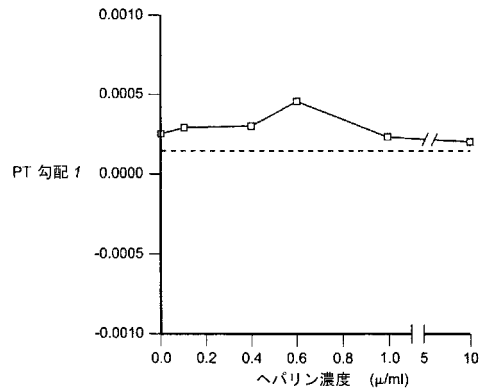
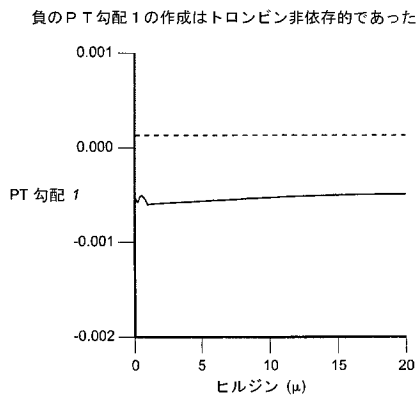


FIG. 6B



【 図 7 】  
FIG. 7



【 図 8 】  
FIG. 8A

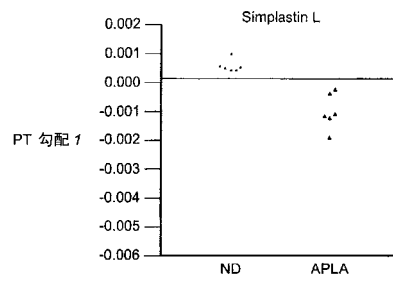
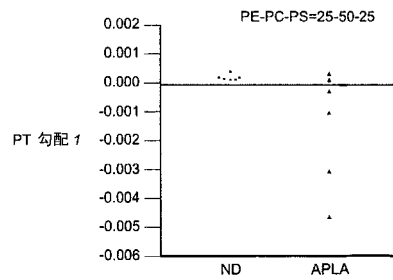
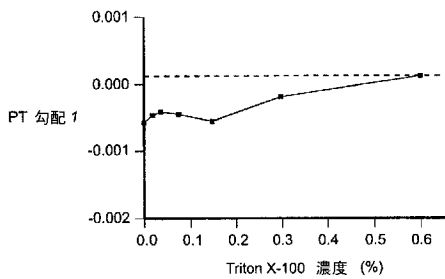


FIG. 8B



【 図 9 】  
FIG. 9



【 図 10 】  
FIG. 10A

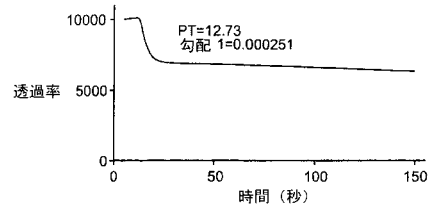


FIG. 10B

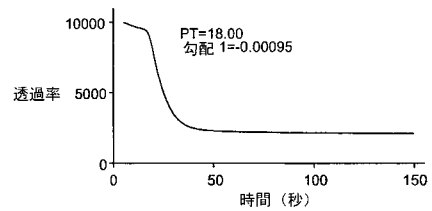
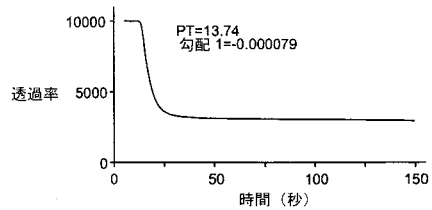


FIG. 10C



【 図 1 1 】  
FIG. 11A

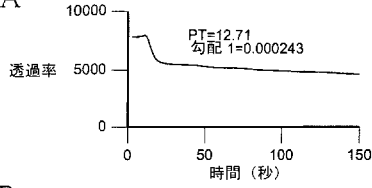


FIG. 11B

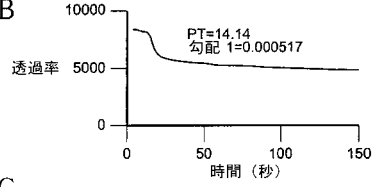


FIG. 11C

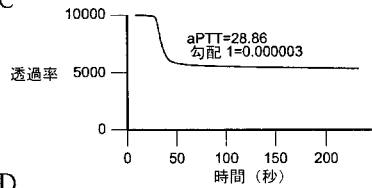
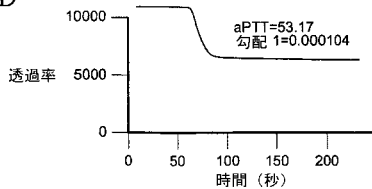


FIG. 11D



【 図 1 2 】  
FIG. 12A

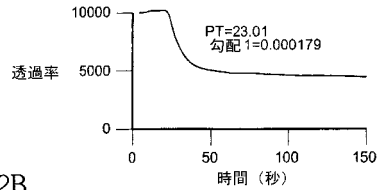


FIG. 12B

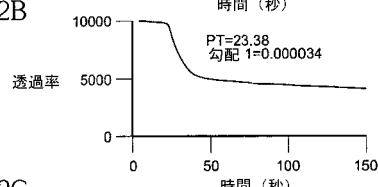


FIG. 12C

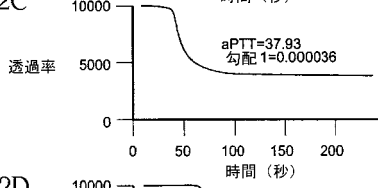
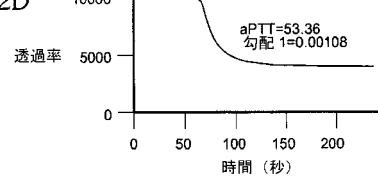
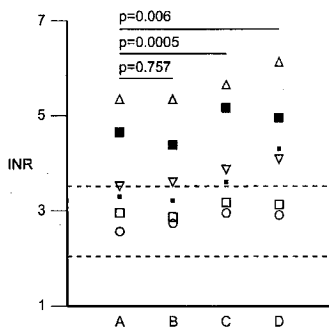


FIG. 12D



【 図 1 3 】  
FIG. 13



【 図 1 4 - 1 】  
FIG. 14A

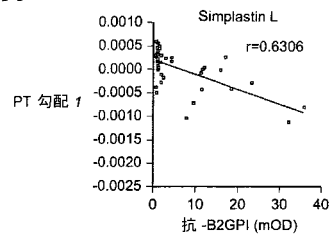


FIG. 14B

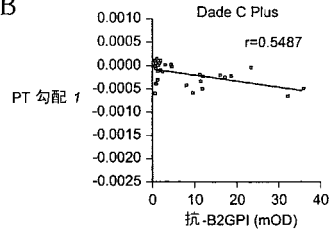
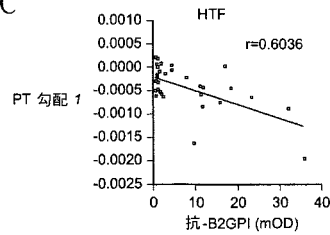


FIG. 14C



【 図 1 4 - 2 】

FIG. 14D

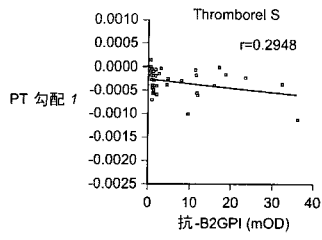


FIG. 14E

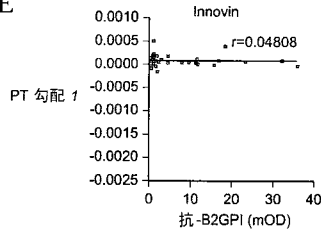
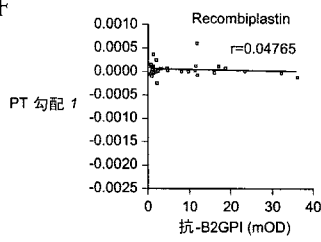


FIG. 14F



【 図 1 4 - 3 】

FIG. 14G

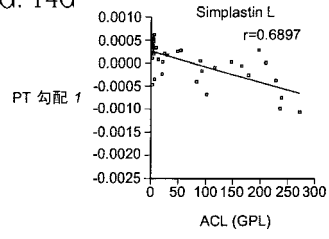


FIG. 14H

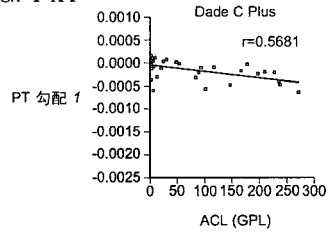
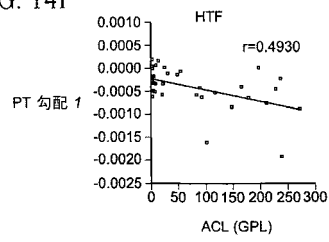
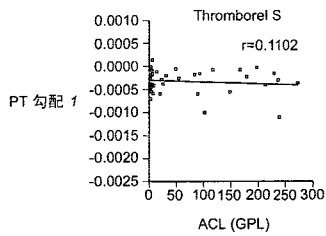


FIG. 14I



【 図 1 4 - 4 】

FIG. 14J



50 150 250

FIG. 14K

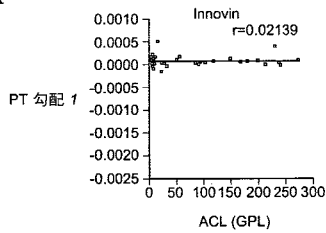
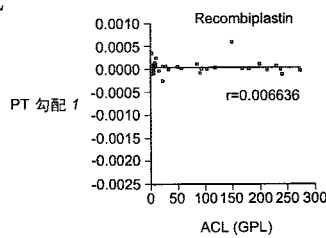
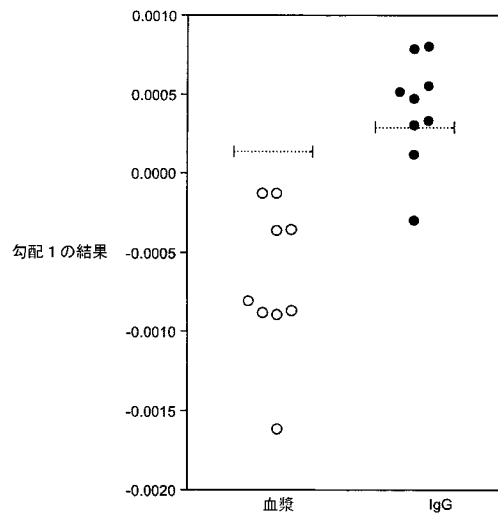


FIG. 14L

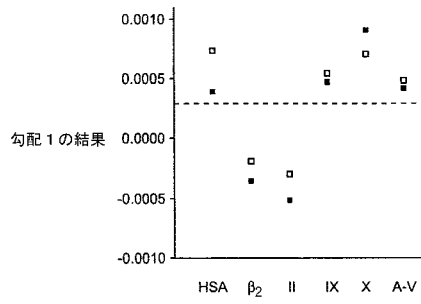


【 図 1 5 】

FIG. 15



【 図 1 6 】  
FIG. 16



【 図 1 7 】  
FIG. 17A

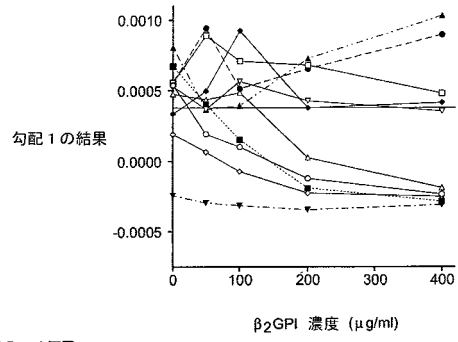
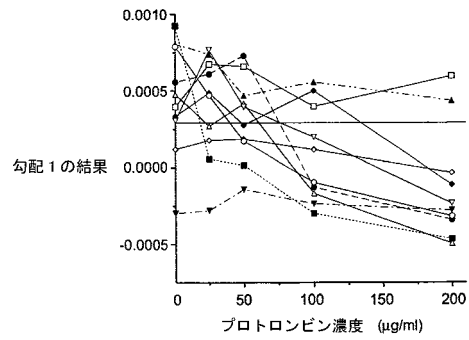
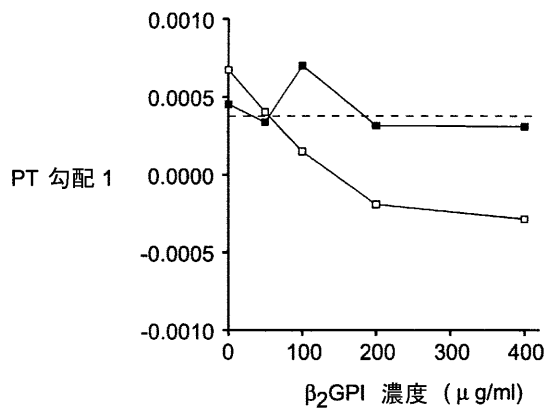


FIG. 17B



【 図 1 8 】  
FIG. 18



【 図 1 9 】  
FIG. 19A

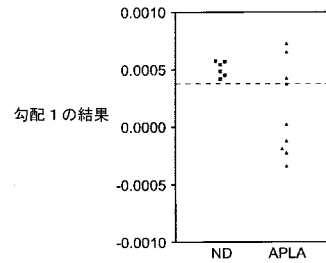
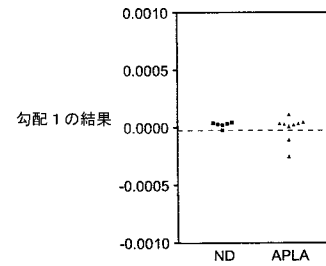
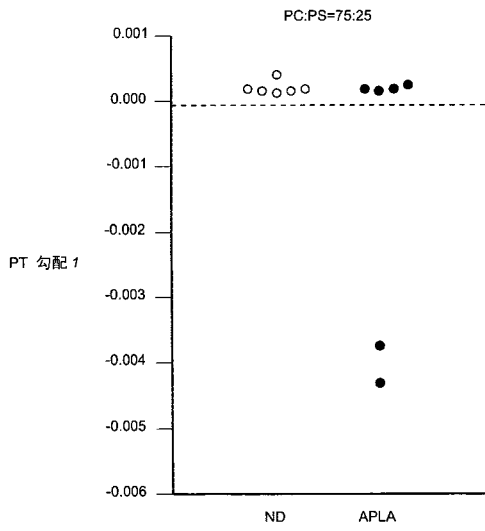


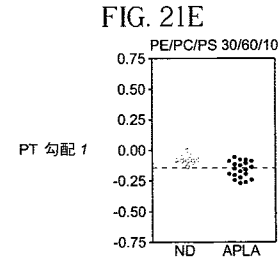
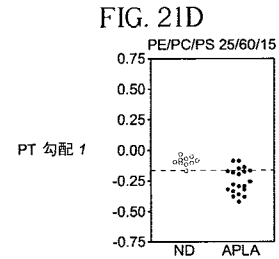
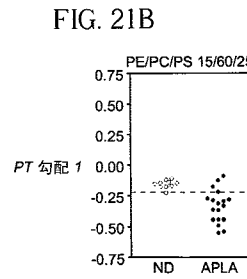
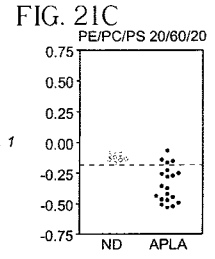
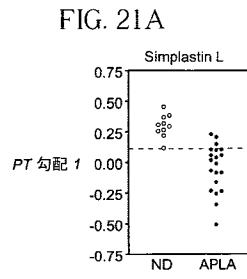
FIG. 19B



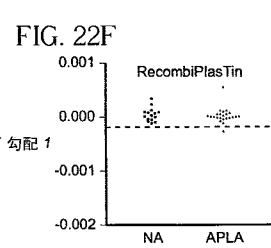
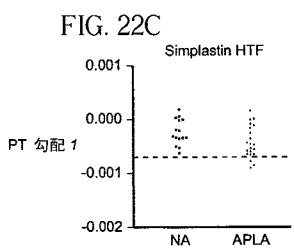
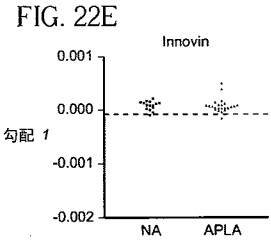
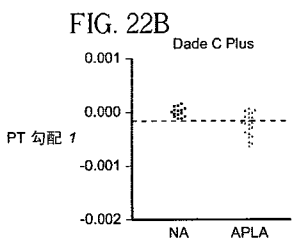
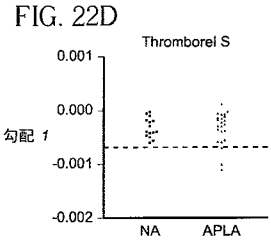
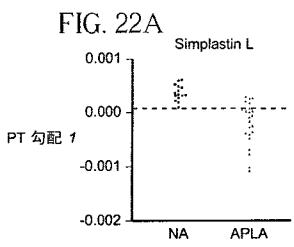
【 図 2 0 】  
FIG. 20



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成16年8月19日(2004.8.19)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験サンプルをリン脂質及びトロンボプラスチンを含んでなる凝固試薬と組み合わせること；被験サンプルに光ビームを誘導し、そして光散乱または透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；時間依存的測定プロファイルの特定の時点または時間での値または勾配が、対応する予め決定された値または勾配の閾値を越えるかどうかを決定すること；を含んでなる被験サンプルの分析方法。

【請求項2】

少なくとも1つの確認アッセイを利用することを含んでなり、ここで該確認アッセイが基準：a)リン脂質依存的スクリーニングアッセイの延長；b)プールされた正常血漿との1:1混合物を用いる延長されたアッセイの修正の欠如；及びc)過剰のリン脂質の添加による延長されたアッセイの修正；に従ってAPLAを同定するためのアッセイである請求項1の方法。

【請求項3】

a)被験サンプルをリン脂質と組み合わせること；b)被験サンプルに光ビームを誘導し、そして被験サンプルからの光の反射率またはそれを通る透過率を経時的にモニター観察して時間依存的測定プロファイルを提供すること；c)時間依存的測定プロファイルの値または勾配を決定すること；d)工程a)からc)を繰り返すこと；及びe)値または勾配を互いに比較すること；を含んでなる被験サンプルの分析方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

図8Aで示されるように、正常及びAPLA患者に関する勾配1はPT試薬(Simplastin L)を患者の血漿に添加した場合に示され、そして図8Bはリン脂質混合物を血漿に添加した場合の正常及びAPLA患者に関する勾配1を示す。図9はデタージェント(Triton X-100)の添加の、APLA患者血漿のPT勾配1に及ぼす効果を説明している。これらのデータはリン脂質表面に関する要件を示している。Triton X-100は用量依存的な様式で勾配1の変化を減じた。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

本発明のアッセイは定量的または反応定量的アッセイでもよい。図14A及び14Bに示されるように、勾配1の程度をリン脂質抗体(この場合抗<sub>2</sub>糖タンパク質抗体及び抗カルジオリピン抗体)の量、APSの程度及び/または血栓性事象の可能性に相関させることができる。しばしば抗リン脂質抗体を伴う患者で上昇する抗体レベルとの相関性研究により、66人のAPLA患者のこの集団において、負の勾配1の値と抗カルジオリピンIgG( $r = 0.7$ )のレベル及び<sub>2</sub>糖タンパク質に対する抗体のレベル( $r = 0.$

6)との相関性を示した。このように、APLAを定量でき、及び/または患者の進行もしくは退行を勾配1に関して繰り返し行った試験に基づいて(または前記したような複数のパラメータの繰り返し行った分析に基づいて)モニター観察することができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0095】

【図1】この図は勾配1の変化がAPLAを有する患者41人中26人(63%)で同定されたことを示している。

【図2】この図は透過率の第1及び第2誘導を含む、正常な標本のPTまたはAPTTアッセイに関する光学透過率対時間を示す。

【図3】図3A及び図3Bは、経口抗凝固剤治療を伴う及び伴わない患者及び対照のAPTT凝固時間(図3A)及び勾配1の結果(図3B)の分布を示している。

【図4】図4A及び図4Bは、経口抗凝固剤治療を伴う及び伴わない患者及び対照に由来するSimplastin(登録商標)LでのPT凝固時間(図4A)及び勾配1の結果(図4B)の分布を示している。

【図5】図5A及び図5Bは、正常(図5A)及びAPLA患者(図5B)の血漿サンプルのPTアッセイの透過率波形プロファイルを示している。

【図6】図6A及び図6Bは、異なるヘパリン量がPT及びPT勾配1の値に及ぼす影響を示している。

【図7】この図はAPLA患者の血漿のPT勾配1に及ぼすトロンビンインヒビター・ヒルジンの添加の影響を示し、これは変化がトロンビン生成とは独立していることを実証している。

【図8】図8Aは、PT試薬(Simplastin L)を患者の血漿に加えた場合の正常及びAPLA患者に関する勾配1を示し、そして図8Bはリン脂質混合物を患者の血漿サンプルに加えた場合の正常及びAPLA患者に関する勾配1値を示している。

【図9】この図はAPLA患者血漿のPT勾配1に及ぼすデタージェント(Triton X-100)の添加の影響を説明している。

【図10】図10A~10Cは、PTアッセイ(Simplastin(登録商標)L)に関する透過率波形プロファイルを示し、正常血漿サンプル(図10A);全IgG除去前のAPLA患者血漿サンプル(図10B);全IgG除去後のAPLA患者血漿サンプル(図10C)である。

【図11】図11A~11Dは、全IgGでスパイクされたIgG涵濁正常血漿に関するPTとAPTTアッセイの透過率波形プロファイルを示し、IgGを添加する前の正常なPT透過率波形を示すAPLA患者(図11A);負の勾配1を示すAPLA患者のIgGを8mg/mlを添加した同一のドナー血漿に関する異常PT TW(図11B);IgGを添加する前の正常APTT TW(図11C);及び正常な勾配1を示すAPLA患者のIgG(8mg/ml)を添加した同一のドナー血漿に関する延長されたAPTT TW。

【図12】図12A~12Dは、全IgGでスパイクされたIgG-涵濁の経口抗凝血薬を投与した血漿に関するPT及びAPTTアッセイのTWプロファイルを示し、延長されたPT凝固時間を示すIgGを添加する前のPT TWを示すAPLA患者(図12A);負の勾配1を示す、APLA患者のIgGを添加した同一のドナー血漿に関する異常PT TW(図12B);IgGを添加する前のAPTT TW(図12C);及びAPLA患者のIgGを添加した同一のドナー血漿に関する正常な勾配1を伴う延長されたAPTT凝固時間。

【図13】ワルファリンの投与を受けていた6人の対照からのIgG涵濁血漿における国際標準比率(INR)に及ぼすAPLA IgGの影響を示す。

【図14】図14A～14Lは、種々の試薬（Simplastin L；Dade C Plus；HTF；Thromborel S；Innovin；及びRecombiplastin）と2つの異なるリン脂質結合タンパク質（抗- $\alpha_2$ 糖タンパク質”抗 $\alpha_2$  GPI”及び抗カルジオリピン抗体”ACL”）を用いた場合のPT勾配1を示す。

【図15】図15は、全IgGをPT基盤のアッセイにおける血漿の代わりに用いた場合、正常ドナーサンプルと比較して2つのIgGサンプルのみが異常な凝固前相を表示したことを示すチャートである。

【図16】図16は列挙した血漿タンパク質のうち、プロトロンビン及び $\alpha_2$  GPIのみがIgG波形アッセイにおいて異常プロファイルの作成に寄与したことを説明している。

【図17】図17A及び17Bは、負のPT勾配1の $\alpha_2$  GPIへの依存性（図17A）、及びプロトロンビン濃度を利用した9人のAPS患者と2人の正常なドナーのIgG波形結果（図17B）の定義を示している。

【図18】図18は1つの被験サンプルに関して、非リン脂質結合 $\alpha_2$  GPIは、特定の被験サンプルからのIgGの存在下で、その野生型の対応物と同一の濃度で試験する場合、この個体からの抗体がELISAにおいて切断された $\alpha_2$  GPIに結合したが、異常IgG波形を誘導しなかったことを示している。

【図19】図19A及び19Bは、 $\alpha_2$  GPIの存在下、APLA被験サンプルと正常との間の識別の程度を、用いたPT試薬に依存して変化させることができることを示しており、図19AはSimplastin Lでの異常IgG波形アッセイを示し、図19Bはトロンボプラスチン Innovinでの異常IgG波形アッセイを示している。

【図20】図20は単純なPC：PS（75：25）リン脂質混合物の識別能力を説明している。

【図21】試薬Simplastin L（図21A）、及び種々PE：PC：PSリン脂質混合物（図21B～21E）の識別能力の改善を示している。

【図22】図22A～22Fは、NAで表される正常ドナー及びAPLAで表される抗リン脂質抗体ドナーにおける種々トロンボプラスチン（Simplastin L；Dade C Plus；Simplastin HTF；Thromborel S；Innovin；Recombiplastin）の勾配1の感受性を示している。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/20618
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/92 G01N33/557 G01N33/68 G01N33/86 G01N21/47 G06F19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SU ZUOWEI ET AL: "Evaluation of transmittance waveform profiles from coagulation screening assays in patients with antiphospholipid antibodies" JOURNAL OF AUTOIMMUNITY, vol. 15, no. 2, September 2000 (2000-09), page A51, XP009020582 9th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies; Tours, France; September 12-16, 2000 ISSN: 0896-8411 abstract	162-172, 174-180
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search <b>7 November 2003</b>		Date of mailing of the international search report <b>24.02.04</b>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-9016		Authorized officer <b>Mandl, B</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 02/20618

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/62077 A (KRILIS STEVEN ;SOUTH EASTERN SYDNEY AREA HEAL (AU)) 19 October 2000 (2000-10-19) page 1, line 34 - page 2, line 2 page 2, line 13 - line 28 page 3, line 1 - line 18 page 4, line 9 - line 19	
A	WO 01/013125 A (TOH CHENG HOK ;DOWNEY COLIN (GB); AKZO NOBEL NV (NL); FISCHER TIMO) 22 February 2001 (2001-02-22) page 30, line 5 - page 31, line 6 page 2, line 3 - page 5, line 20	
A	WO 01/012839 A (HARRISON HAROLD H ;BERG DAVID E (US); BERG LOIS HILL (US)) 22 February 2001 (2001-02-22) page 2, line 15 - page 3, line 4	
A	DOWNEY C ET AL: "EARLY IDENTIFICATION AND PROGNOSTIC IMPLICATIONS IN DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION THROUGH TRANSMITTANCE WAVEFORM ANALYSIS" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 1, no. 80, July 1998 (1998-07), pages 65-69, XP001098607 ISSN: 0340-6245 abstract	
A	TOH C H: "APTT revisited: detecting dysfunction in the hemostatic system through waveform analysis." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 82, no. 2, August 1999 (1999-08), pages 684-687, XP009020442 ISSN: 0340-6245 the whole document	
T	SU Z ET AL: "Abnormal optical waveform profiles in coagulation assays from patients with antiphospholipid antibodies" BLOOD COAGULATION AND FIBRINOLYSIS, vol. 13, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 7-17, XP009020444 ISSN: 0957-5235 the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 02/20618**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-124, 143-150, 151-158, 162-181, 183, 184

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 02/20618

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-124,143-150,151-158,162-181,183,184

Methods for predicting an increased likelihood of having APS, for categorizing an individual as an acute risk individual or for determining an increased likelihood of experiencing a clinical event due to an underlying APS comprising the steps of combining the test sample with phospholipids and directing a light beam at the test sample and monitoring light scattering or transmittance over time so as to provide a time-dependent measurement profile.

Methods for predicting an increased likelihood of having APS comprising the steps of combining the test sample with a coagulation reagent comprising phospholipids and monitoring the formation of fibrin polymerization over time so as to provide a time-dependent measurement profile.

Methods for predicting an increased likelihood of having APS comprising the steps of combining the test sample with an APTT reagent and monitoring the formation of fibrin polymerization over time so as to provide a time-dependent measurement profile.

Methods for predicting an increased likelihood of having APS comprising the steps of adding an APTT reagent to an individual's test sample and performing a time dependent measurement profile on the test sample as long as this measurement profile is not based on the monitoring the formation of fibrin polymerization over time.

---

2. claims: 125-142

Methods for predicting an increased risk of thrombosis comprising the steps of combining the test sample with phospholipids and directing a light beam at the test sample and monitoring light scattering or transmittance over time so as to provide a time-dependent measurement profile.

---

3. claims: 159-161,182

Methods for indirectly measuring a level of antiphospholipid antibodies in a test sample comprising the steps of combining the test sample with phospholipids and directing a light beam at the test sample and monitoring light scattering or transmittance over time so as to provide a time-dependent measurement profile.

---

4. claim:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No. PCT/JP 02 20618

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 02/20618

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0062077 A	19-10-2000	WO 0062077 A1	19-10-2000
		AU 768038 B2	27-11-2003
		AU 3648600 A	14-11-2000
		EP 1173771 A1	23-01-2002
		JP 2002541484 T	03-12-2002
WO 0113125 A	22-02-2001	US 6429017 B1	06-08-2002
		AU 6617900 A	13-03-2001
		CA 2380622 A1	22-02-2001
		EP 1200837 A1	02-05-2002
		JP 2003507713 T	25-02-2003
		WO 0113125 A1	22-02-2001
		US 2003049851 A1	13-03-2003
WO 0112839 A	22-02-2001	AU 6769000 A	13-03-2001
		CA 2385502 A1	22-02-2001
		GB 2368642 A	08-05-2002
		WO 0112839 A1	22-02-2001
		US 2002037528 A1	28-03-2002

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ブラウン、 ポール ジェイ .

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27712 ダーラム

(72)発明者 テジドー、 リリアナ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 ラレイ

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA12 QA19 QQ03 QQ43 QQ44 QR08 QR42 QR56 QS25  
QS34 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005520170A5</a>	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2003580871	申请日	2002-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	主要生物有限公司刘 生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物主刘，公司		
[标]发明人	オーテルトーマスエル スーツオウエイ ブラウンポールジェイ テジドーリリアナ		
发明人	オーテル、トーマス エル. スー、ツオウエイ ブラウン、ポール ジェイ. テジドー、リリアナ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 G01N21/47 G01N21/77 G01N33/557 G01N33/68 G01N33/86 G01N33/92 G06F19/00		
CPC分类号	G01N33/92 G01N21/47 G01N21/77 G01N33/557 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N33/86 G01N2021 /7773 G01N2021/7783 G16H10/40 G16H15/00 G16H40/63 G16H50/20		
FI分类号	G01N33/53.L C12Q1/68.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QQ44 4B063/QR08 4B063 /QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	三好秀		
优先权	60/302261 2001-06-29 US 60/318755 2001-09-11 US		
其他公开文献	JP2005520170A		

#### 摘要(译)

一种用于预测个体具有更高的概率为具有任一具有抗磷脂抗体综合征，或抗磷脂抗体综合征的方法：a) 提供来自个体的测试样品；b) 将测试样品与磷脂组合；c) 在测试样品上诱导光束并随时间监测光散射或渗透率以提供时间相关的测量曲线；d) 在特定的时间或测量时间的配置文件特定的值或梯度包括确定是否超过相应的预定值或阈值斜率；值或梯度和时间相关的测量配置文件是预定的超过阈值然后确定个体具有抗磷脂抗体综合征或具有增加的抗磷脂抗体综合征的风险；该方法包括。磷脂可以作为凝固试剂的一部分提供，或作为未激活凝血的试剂的一部分提供。可以进行磷脂与蛋白质结合的特异性抗体的确认测定。