

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6805272号  
(P6805272)

(45) 発行日 令和2年12月23日 (2020. 12. 23)

(24) 登録日 令和2年12月7日 (2020. 12. 7)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 21/51 (2006. 01)	GO 1 N 21/51
GO 1 N 33/483 (2006. 01)	GO 1 N 33/483 C

請求項の数 10 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2018-565846 (P2018-565846)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成29年6月14日 (2017. 6. 14)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2019-526039 (P2019-526039A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	令和1年9月12日 (2019. 9. 12)		E AKTIENGESSELLSCHAF
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/064500		T
(87) 国際公開番号	W02017/216208		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(87) 国際公開日	平成29年12月21日 (2017. 12. 21)		グレンツァーヘルストラツセ１２４
審査請求日	令和2年1月22日 (2020. 1. 22)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	16174523. 7		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成28年6月15日 (2016. 6. 15)	(74) 代理人	100118902
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善されたDダイマーアッセイ較正

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光学的Dダイマーアッセイのための較正曲線を提供するための方法であって、

a) あらかじめ決定されたDダイマー濃度を有する較正物質ストック溶液を提供し、

b) 少なくとも2つの較正物質試料を提供し、ここで、該少なくとも2つの較正物質試料は、該較正物質ストック溶液から得られ、すべてのまたは1つを除くすべての較正物質試料は希釈によって該較正物質ストック溶液から得られ、

c) Dダイマーアッセイにおいて、b) の該較正物質試料の光学的特性値を決定し、

d) 割り当て濃度値を、b) の少なくとも1つの較正物質試料に割り当て、ここで、少なくとも1つの較正物質試料に割り当てられる該割り当て濃度値は、該較正物質試料の計算濃度値から逸脱し、ここで、該計算濃度値は、較正物質ストック溶液から較正物質試料を得る間に適用される希釈係数を考慮することによって、較正物質試料に帰せられる濃度値であり；そして該割り当て濃度値が、工程c) で用いる方法で得た較正曲線を、該較正物質ストック溶液に関して、異なる方法で得たか、異なるデバイス上で得たか、または異なるデバイスモデル上で得た参照較正曲線に比較することによって得られ、そして

e) c) の該光学的特性値、d) の単数または複数の割り当て濃度値、そして割り当て濃度値が割り当てられなかった較正物質試料に関する計算濃度値に基づいて、較正曲線を確立する

工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

10

20

少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの校正物質試料を提供する、請求項1の方法。

【請求項3】

すべてまたは1つを除くすべての校正物質試料が希釈によって前記校正物質ストック溶液から得られる、請求項1または2の方法。

【請求項4】

割り当て濃度値が、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つの校正物質試料に割り当てられる、請求項1～3のいずれか1項の方法。

【請求項5】

前記光学的特性が濁度および/または光学密度である、請求項1～4のいずれか1項の方法。

【請求項6】

前記Dダイマーアッセイが、Dダイマーを特異的に認識する検出剤と前記校正物質試料を接触させる工程を含む、請求項1～5のいずれか1項の方法。

【請求項7】

前記校正曲線が非線形校正曲線である、請求項1～6のいずれか1項の方法。

【請求項8】

試料中のDダイマー濃度を決定するための方法であって、

a) Dダイマーに特異的に結合する検出剤と前記試料を接触させ、

b) a)の試料/検出剤混合物の光学的特性値を決定し、

c) 請求項1～7のいずれか1項記載の校正曲線を提供し、

d) b)において決定した試料/検出剤混合物の該光学的特性値およびc)の該校正曲線に基づいて、該試料におけるDダイマー濃度を決定する工程を含む、前記方法。

【請求項9】

前記校正物質ストック溶液および/または前記の少なくとも1つの割り当て濃度値を、1またはそれより多い試薬ロットに割り当てる、請求項8の方法。

【請求項10】

前記校正物質ストック溶液および/または前記の少なくとも1つの割り当て濃度値を、前記検出剤のロットに割り当てる、請求項9の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光学的Dダイマーアッセイのための校正曲線を提供するための方法であって、a) あらかじめ決定されたDダイマー濃度を有する校正物質ストック溶液を提供し、b) 少なくとも2つの校正物質試料を提供し、ここで、前記の少なくとも2つの校正物質試料は、前記校正物質ストック溶液から得られ、c) 前記Dダイマーアッセイにおいて、b)の前記校正物質試料の光学的特性値を決定し、d) 割り当て濃度値を、b)の少なくとも1つの校正物質試料に割り当て、ここで、少なくとも1つの校正物質試料に割り当てられる前記の割り当て濃度値は、前記校正物質試料の計算濃度値から逸脱し、そしてe) c)の前記光学的特性値、d)の単数または複数の割り当て濃度値、そして割り当て濃度値が割り当てられなかった校正物質試料に関する計算濃度値に基づいて、校正曲線を確立する工程を含む、前記方法に関する。本発明は、前記校正曲線に基づいて、試料中のDダイマー濃度を決定するための方法、ならびにこれに関連するキット、デバイス、データベース、データキャリア、および使用にさらに関する。

【発明の概要】

【0002】

被験体試料におけるDダイマー濃度の増加は、分解されている血餅の存在を示し、そしてしたがって血栓、塞栓、凝血異常等を含む重度の状態を示しうるため、Dダイマーアッセイは、臨床的に非常に重要である。臨床診療において、Dダイマーアッセイは、肺塞栓

10

20

30

40

50

症および深部静脈血栓症の除外診断を提供するために用いられ、すなわちあらかじめ決定されたカットオフ値未満のDダイマー濃度は、被験体が肺塞栓症を患っておらず、そして深部静脈血栓症を患っていないことを示す(Ramzi & Leeper (2004), Am. Fam. Phys. 69(12): 2829; Schutgensら(2003), Circulation 2003; 107: 593-597)。もっとも頻繁に用いられるDダイマーアッセイは、抗Dダイマー抗体でコーティングされたラテックスビーズを用いる、免疫比濁法アッセイである(例えばUS 8,900,872 B2を参照されたい)。試料中のDダイマーの濃度に応じて、Dダイマー/抗体複合体の形成は、ラテックスビーズの凝集を誘導し、そしてDダイマー濃度に比例する反応混合物の濁度増加を誘導する。

10

#### 【0003】

凝血パラメータに関する臨床アッセイ、特に免疫学的アッセイは、一般的に、校正、すなわち測定パラメータ、例えば測光的に決定されるシグナル、および決定しようとするパラメータ、例えば分析物の濃度の間の関係の確立を実行することを必要とする。校正は、通常、既知のあらかじめ決定された濃度の分析物を有する試料セットに関して、測定パラメータを決定し、そして校正曲線を確立することによって行われる。アッセイの種類に応じて、用いるデバイス、試薬の特定のバッチ、および校正を行う日にさえも、多かれ少なかれ校正結果が顕著に依存することが観察される可能性もあり、したがって、各測定に関して完全な校正曲線を確立するのが一般的な実施である。しかし、こうした手順は、労働および費用集約的である。したがって、校正を単純化することが試みられた。

20

#### 【0004】

US 2007/0020765 A1において、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)アッセイの校正が2つの校正物質試料のみで行われた；が、この手順は、校正曲線が線形であることを必要とする。異なるアプローチにおいて、単一の校正アジャスターを用いて、いくつかの凝血アッセイにおいて、各試料に関する測定パラメータの修正値が計算された(US 8,900,872 B2)。しかし、このアプローチは、偏差が、偏差の根底にあると仮定される数学的公式にしたがうことを必要とする。

#### 【0005】

したがって、当該技術分野には、先行技術の欠点を回避して、凝血アッセイを校正するための改善された手段および方法に関する必要性がある。この問題は、本明細書に開示する手段および方法によって解決される。

30

#### 【0006】

したがって、本発明は、光学的Dダイマーアッセイのための校正曲線を提供するための方法であって、

- a) あらかじめ決定されたDダイマー濃度を有する校正物質ストック溶液を提供し、
- b) 少なくとも2つの校正物質試料を提供し、ここで、前記の少なくとも2つの校正物質試料は、前記校正物質ストック溶液から得られ、
- c) 前記Dダイマーアッセイにおいて、b)の前記校正物質試料の光学的特性値を決定し、

d) 割り当て濃度値を、b)の少なくとも1つの校正物質試料に割り当て、ここで、少なくとも1つの校正物質試料に割り当てられる前記の割り当て濃度値は、前記校正物質試料の計算濃度値から逸脱し、そして

40

e) c)の前記光学的特性値、d)の単数または複数の割り当て濃度値、そして割り当て濃度値が割り当てられなかった校正物質試料に関する計算濃度値に基づいて、校正曲線を確立する

工程を含む、前記方法に関する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0007】

【図1】本発明の方法にしたがって得られる校正曲線。x軸： $\mu\text{g/ml}$ でのDダイマー濃度；y軸：吸光度変化(A)。該図は、t411装置上の典型的な校正曲線を示す。

50

この較正曲線を構築するために用いたストック溶液の較正物質値および希釈を、上述または後述の方法にしたがって決定する。最高dダイマー濃度でのデータポイントを、較正物質ストック溶液から採用する一方、最低濃度のデータポイントは、装置上の較正物質ストックの自動化希釈後の割り当て値から得られる。

【発明を実施するための形態】

【0008】

以下で用いるような用語「有する(have)」、「含む(comprise)」または「含まれる(include)」またはその任意の恣意的な文法的変形は、非排他的な方式で用いられる。したがって、これらの用語は、これらの用語によって導入される特徴に加えて、この文脈で記載される実体に、さらなる特徴は存在しない状況、および1またはそれより多いさらなる特徴が存在する状況の両方を指すことも可能である。例えば、表現「AはBを有する」、「AはBを含む」および「AにはBが含まれる」は、Bに加えて、Aに他の要素が存在しない状況(すなわちAはもっぱらそして排他的にBからなる状況)、ならびにBに加えて実体Aに1またはそれより多い他の要素、例えば要素C、要素CおよびDまたはさらにさらなる要素が存在する状況の両方を指してもよい。

【0009】

さらに、以下で用いるような用語「好ましくは」、「より好ましくは」、「最も好ましくは」、「具体的に」、「より具体的に」、「特に」、「より明確に」または類似の用語は、さらなる可能性を制限することなく、任意の特徴と組み合わせて用いられる。したがって、これらの用語によって導入される特徴は、任意の特徴であり、そしていかなる意味でも、請求項の範囲を制限するとは意図されない。本発明は、当業者が認識するであろうように、別の特徴を用いることによって実行可能である。同様に、「本発明の態様において」または類似の表現によって導入される特徴は、本発明のさらなる態様に関するいかなる制限も伴わず、本発明の範囲に関するいかなる制限も伴わず、そしてこうした方式で導入される特徴と、本発明の他の任意のまたは任意でない特徴とを組み合わせる可能性に関するいかなる制限も伴わずに、任意の特徴であると意図される。さらに、別に示されていない限り、用語「約」は、関連分野において、一般的に認められる技術的精度を持つ、示す値に関し、好ましくは示す値 $\pm 20\%$ 、より好ましくは $\pm 10\%$ 、最も好ましくは $\pm 5\%$ に関する。

【0010】

本発明の方法はin vitro法である。さらに、これらは、明確に言及したものに加えて、工程を含んでもよい。例えば、較正曲線を提供するための方法は、工程c)のDダイマーアッセイにおいて、Dダイマーに特異的に結合する検出剤と較正物質試料を接触させ、そして/または工程e)において確立される較正曲線を、例えば本発明のデバイスの評価装置に提供する、さらなる工程を含んでもよい。さらに、本発明の方法の1またはそれより多い工程は、自動化設備によって補助されるかまたは実行されてもよい。

【0011】

用語「Dダイマー」は、本明細書において、フィブリンのプラスミン触媒加水分解によって生成される2つの架橋フィブリンドメインを含むポリペプチドに関する。1つの態様において、該用語はヒトDダイマーに関する。Dダイマー分子は当業者に知られ、原則として、その測定法もまた知られる(Dempfle CE(2005), Semin Vasc Med 5:315-320; EP1695984A1、実施例1)。したがって、用語「Dダイマーアッセイ」は、試料中のDダイマーの量または濃度を決定するアッセイに関する。1つの態様において、Dダイマーアッセイにおいて、試料中のDダイマー濃度を決定する。1つの態様において、Dダイマーアッセイは光学アッセイであり、さらなる態様において試料の光学的特性を決定する工程を含むアッセイである。当業者に理解されるであろうように、1つの態様において、前記光学的特性は、前記試料を検出剤と接触させた後に、少なくとも一度、決定され；さらなる態様において、前記光学的特性は、前記試料を検出剤と接触させる前およびさせた後に決定され、そして1つの態様において、前記試料中のDダイマーの量または濃度の決定は、前記試料を検出剤と接触させ

た後に決定された前記光学的特性値、および前記試料を検出剤と接触させる前に決定された前記光学的特性値の間の相違に基づく。1つの態様において、用語Dダイマーには、Dダイマーを含有する、フィブリンのスプライス変異体の加水分解産物および/またはフィブリンの分解産物であるDダイマーが含まれる。

#### 【0012】

1つの態様において、Dダイマーアッセイは、Dダイマーを特異的に認識する検出剤と比較物質試料を接触させる工程を含む。当業者が認識するであろうように、用語「特異的に認識する」および「特異的に結合する」、またはその文法的変形は、試料中に存在する他の化合物、典型的には生体分子が、リガンド、特に本発明のDダイマーを特異的に認識する検出剤に特異的に結合しないことを示すために用いられ；1つの態様において、これは、化学的化合物、例えば干渉化合物の、Dダイマーとの相互作用に關与しない剤の領域への結合を排除しない。1つの態様において、Dダイマー以外の化合物に特異的に結合する検出剤の結合のレベルは、Dダイマーへのアフィニティの最大10%、最大1%、最大0.1%、または最大0.01%の結合アフィニティを生じる。1つの態様において、Dダイマーを特異的に認識する検出剤は、生物学的巨大分子、例えばアプタマーである。Dダイマーを特異的に認識する検出剤は、Dダイマーに特異的に結合する生物学的活性を有する。1つの態様において、Dダイマーを特異的に認識する検出剤は、Dダイマーに特異的に結合する少なくとも2つのドメインを有する；したがって、Dダイマーを特異的に認識する検出剤は、1つの態様において、Dダイマー架橋剤である。1つの態様において、Dダイマーを特異的に認識する剤は、Dダイマーに含まれる少なくとも1つのエピトープに特異的に結合し、ここで、前記エピトープは、Dダイマーに特異的なエピトープである。特に、前記エピトープは、フィブリンのプラスミン触媒加水分解後にのみアクセス可能になるエピトープであってもよく；したがって、エピトープはまた、Dダイマーの派生物中に含まれてもよく、ここで、Dダイマーの前記派生物は、Dダイマーと量が相関する化合物であり、例えばDダイマーの分解産物である。1つの態様において、Dダイマーを特異的に認識する検出剤は抗体、1つの態様においてモノクローナル抗体、さらなる態様においてモノクローナル抗体のF(ab)<sub>2</sub>断片である。

#### 【0013】

用語「抗体」には、本明細書において、モノクローナル抗体、少なくとも2つの損なわれていない抗体から形成される多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および本明細書の別の箇所に明記するような所望の結合活性を示す限り、抗体断片が含まれる。したがって、本発明記載の多重特異性抗体はまた、例えばDダイマーの2またはそれより多いエピトープに結合することによって、Dダイマーに特異的に結合する。1つの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。1つの態様において、抗体は全長抗体または抗体断片である。

#### 【0014】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体（免疫グロブリン）は、異なるクラスに割り当て可能である。免疫グロブリンの5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、そしてこれらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2にさらに分割可能である。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元立体配置は周知であり、そして一般的に、例えば、Abbasら、Cellular and Mol. Immunology, 第4版, W.B. Saunders, Co. (2000)に記載される。抗体は、抗体と1またはそれより多い他のタンパク質またはペプチド、色素、ポリマー等の共有または非共有会合によって形成される、より大きな融合分子の一部であってもよい。

#### 【0015】

用語「全長抗体」、「損なわれていない抗体」、および「全抗体」は、本明細書において、交換可能に用いられ、以下に定義するように、実質的に損なわれていない型の、抗体断片ではない抗体を指す。該用語は、特に、Fc領域を含有する重鎖を含む抗体を指す。

「抗体断片」は、損なわれていない抗体の部分を含み、1つの態様においてその抗原結合領域を含む。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F ( a b )<sub>2</sub>、およびF v断片；ディアボディ；直鎖抗体；一本鎖抗体分子、ナノボディ、および抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。抗体のパパイン消化は、各々、単一の抗原結合部位を含む「F a b」断片と称される2つの同一の抗原結合断片、およびその名称が容易に結晶化する能力を反映する、残りの「F c」断片を生じる。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、そしてなお抗原を架橋することが可能であるF ( a b )<sub>2</sub>断片を生じる。「F v」は、完全抗原結合部位を含有する、最小抗体断片である。1つの態様において、2鎖F v種は、緊密に非共有会合した、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖F v ( s c F v ) 種において、軽鎖および重鎖が2鎖F v種におけるものと同様に「二量体」構造で会合可能であるように、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインが、柔軟なペプチドリンカーによって共有連結されていてもよい。この立体配置において、各可変ドメインの3つの超可変領域 ( H V R ) は、抗原結合部位を定義するように相互作用する。集合して、6つのH V Rが、抗体に、抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン ( または抗原に特異的な3つのH V Rのみを含むF vの半分 ) であってさえ、抗原を認識し、そして結合する能力を有するが、完全結合部位よりも低いアフィニティである。用語「ディアボディ」は、2つの抗原結合部位を含む抗体断片を指し、該断片は、同じポリペプチド鎖において、軽鎖可変ドメイン ( V L ) に連結された重鎖可変ドメイン ( V H ) を含む ( V H - V L )。同じ鎖上の2つのドメインの間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることによって、ドメインは、別の鎖の相補ドメインと対形成し、そして2つの抗原結合部位を生成するように強いられる。ディアボディは、二価または二重特異性であることも可能である。ディアボディは、例えばE P 0 4 0 4 0 9 7 ; W O 1 9 9 3 / 0 1 1 6 1 ; H u d s o n ら , N a t . M e d . 9 ( 2 0 0 3 ) 1 2 9 - 1 3 4 ; およびH o l l i n g e r ら , P N A S U S A 9 0 ( 1 9 9 3 ) 6 4 4 4 - 6 4 4 8 に、より詳細に記載される。トリアボディおよびテトラボディは、H u d s o n ら , N a t . M e d . 9 ( 2 0 0 3 ) 1 2 9 - 1 3 4 にまた記載される。

#### 【 0 0 1 6 】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち集団中に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる、ありうる突然変異、例えば天然存在突然変異を除いて同一である。したがって、修飾語「モノクローナル」は、別個の抗体の混合物ではない抗体の特性を示す。特定の態様において、こうしたモノクローナル抗体には、典型的には、分析物に結合するポリペプチド配列を含む抗体が含まれ、ここで分析物結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの、単一の分析物結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスによって得られた。例えば、選択プロセスは、複数のクローン、例えばハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組換えDNAクローンのプールからの、ユニークなクローンの選択であってもよい。選択されたターゲット結合配列は、例えば、ターゲットに対するアフィニティを改善するため、ターゲット結合配列をヒト化するため、細胞培養におけるその産生を改善するため、i n v i v oでの免疫原性を減少させるため、多重特異性抗体を生成するため等で、さらに改変されていてもよく、そして改変されたターゲット結合配列を含む抗体もまた、本発明のモノクローナル抗体であることを理解しなければならない。異なる決定因子 ( エピトープ ) に対して向けられる異なる抗体が含まれるポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子に対して向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、これらが典型的には他の免疫グロブリンが混入していない点で好適である。

#### 【 0 0 1 7 】

抗体またはその断片は、例えば、H a r l o w および L a n e " A n t i b o d i e s , A L a b o r a t o r y M a n u a l " , C S H P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , 1 9 8 8 に記載される方法を用いることによって得ら

10

20

30

40

50

れうる。モノクローナル抗体は、マウス骨髄腫細胞の、免疫哺乳動物由来の脾臓細胞への融合を含む、K e h l e r および M i l s t e i n , N a t u r e 2 5 6 ( 1 9 7 5 ) , 4 9 5、ならびに G a l f r e , M e t h . E n z y m o l . 7 3 ( 1 9 8 1 ) , 3 に元来記載された技術によって、調製可能である。

#### 【0018】

1つの態様において、Dダイマーを特異的に認識する検出剤は、ラテックス粒子、すなわちコロイド性分散ポリマー粒子に共有カップリングする。別の態様において、Dダイマーを特異的に認識する検出剤は、ビオチン/アビジン（またはストレプトアビジン）などのバイオアフィン（b i o a f f i n e）対を通じて非共有方式でラテックス粒子に付着する。適切なラテックス粒子およびその適切なサイズは当業者に知られる。ラテックス粒子は、サイズが不均一であり、例えば  $0.1\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}$ 、1つの態様において  $0.15\mu\text{m} \sim 0.50\mu\text{m}$  のサイズ範囲である。1つの態様において、ラテックス粒子はサイズが均一である。

10

#### 【0019】

用語「校正物質ストック溶液」は、本明細書において、既知の、1つの態様においてあらかじめ決定された濃度のDダイマーを有する、Dダイマーの溶液、1つの態様において水溶液に関する。当業者に理解されるであろうように、1つの態様において、原則的に、既知の量のDダイマー、例えば組換えヒトDダイマーを提供して、そして既知の体積の液体中に前記の既知の量を溶解し、こうして既知の濃度のDダイマーを有する校正物質ストック溶液を提供することも可能である。1つの態様において、適切な濃度でDダイマーを含むことが知られる試料を混合することによって、そして適切なアッセイによって前記混合物中のDダイマー濃度を計算するかまたは1つの態様において決定することによって、校正物質ストック溶液を提供する。1つの態様において、校正物質ストック溶液は、校正中に決定される最高のDダイマー濃度に対応するかまたはこれを超える濃度のDダイマーを含む。

20

#### 【0020】

本発明にしたがって、提供される校正物質ストック溶液の数は、本発明の校正曲線を確立するために用いられる校正物質試料の数より少ない。1つの態様において、本発明の校正曲線を確立するため、1つの単一の、すなわち正確に1つの校正物質ストック溶液を提供する。さらなる態様において、本発明の校正曲線を確立するために、1つの単一の校正物質ストック溶液を提供し、そしてすべてのまたはすべてのさらなる校正試料は、希釈によって、前記の単一の校正物質ストック溶液から得られる。

30

#### 【0021】

本明細書において、用語「あらかじめ決定されたDダイマー濃度」は、本発明の校正曲線が確立された時点で知られるDダイマー濃度、例えば本発明の方法を実行する前に決定されていたDダイマー濃度に関する。1つの態様において、あらかじめ決定されたDダイマー濃度は、校正物質ストック溶液中の実際のDダイマー濃度であって、ここで、実際のDダイマー濃度は、A d e m a & G e b e r t ( 1 9 9 5 ) , T h r o m b R e s 8 0 : 8 5 にしたがって決定可能であるようなDダイマー濃度である。しかし、あらかじめ決定されたDダイマー濃度が、異なるデバイス、1つの態様において、デバイスの異なるモデル上で決定されたDダイマー濃度であることもまた想定される。1つの態様において、あらかじめ決定されたDダイマー濃度は、デバイス特異的な値、すなわち正しいDダイマー濃度が決定されるように、前記校正物質ストック溶液に割り当てられた値である。したがって、1つの態様において、あらかじめ決定されたDダイマー濃度は、本明細書に明記するような割り当て値であってもよい。さらなる態様において、あらかじめ決定されたDダイマー濃度は、A d e m a & G e b e r t にしたがって決定可能であるようなDダイマー濃度  $\pm 50\%$ 、1つの態様において  $\pm 30\%$  に対応する。

40

#### 【0022】

用語「校正物質試料」は、本明細書において、校正物質ストック溶液由来の試料に関する。したがって、1つの態様において、ゼロのDダイマー濃度を有する校正物質溶液は、

50

本発明にしたがった較正物質試料ではない。較正物質試料は、既知のDダイマー濃度の較正物質ストック溶液に基づいて、計算Dダイマー濃度値が、数学的手段によって、1つの態様において基本的算術演算によって、前記較正物質試料に帰せられうるように、較正物質ストック溶液から「得られる」。したがって、1つの態様において、較正物質試料は、固体表面上に前記較正物質ストック溶液の既知の体積を乾燥させ、そして残渣を既知の体積の液体に溶解することによって、較正物質ストック溶液から得られうる。1つの態様において、較正物質試料は、希釈によって、特に既知の体積の較正物質ストック溶液を、Dダイマーを含まない、既知の体積の液体と混合することによって、較正物質ストック溶液から得られる。理解されるであろうように、較正物質試料をさらに希釈して、より低い濃度を有するさらなる較正物質試料を提供してもよく；したがって、希釈および連続希釈を用いて、任意の恣意的な組み合わせで、本発明の較正物質試料を提供してもよい。本発明にしたがって、少なくとも2つの較正物質試料を提供する。理解されるであろうように、特に、非線形較正曲線を提供しなければならない場合、さらなる較正物質試料を用いてもよい。したがって、1つの態様において、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの較正物質試料を提供する。さらなる態様において2～10の較正物質試料を提供し、さらなる態様において3～8の較正物質試料を提供し、さらなる態様において4～7の較正物質試料を提供し、さらなる態様において5または6の較正物質試料を提供する。1つの態様において、較正物質試料の1つは、較正物質ストック溶液と同じDダイマー濃度を有し、すなわち1つの態様において、較正物質試料は、未希釈較正物質ストック溶液であってもよい。したがって、1つの態様において、すべてまたは1つを除くすべての較正物質試料は、希釈によって前記較正物質ストック溶液から得られる。

#### 【0023】

本発明にしたがって、較正物質試料は、計算濃度値を有してもよく、用語「計算濃度値」は、較正物質ストック溶液中のDダイマーのあらかじめ決定された濃度に基づいて、前記計算によって得られうる、Dダイマー濃度値を指す。したがって、1つの態様において、計算濃度値は、較正物質ストック溶液から較正物質試料を得る間に適用される希釈係数を考慮することによって、試料に帰せられる濃度値である。1つの態様において、計算濃度値は、各較正物質試料に帰せられ；さらなる態様において、計算濃度値は、割り当て濃度値が割り当てられていない較正物質試料にのみ帰せられる。したがって、割り当て濃度値がすべての較正物質試料に割り当てられる1つの態様において、計算濃度値は、前記較正物質試料のいずれにも帰せられない。

#### 【0024】

本発明にしたがって、割り当て濃度値は、少なくとも1つの較正物質試料に割り当てられる。用語「割り当て濃度値」は、本明細書において、較正物質試料に帰せられる濃度値に関し、ここで、前記の割り当て濃度値は、前記較正物質試料に帰せられうる計算濃度値から、本明細書において以下に明記するように逸脱し；したがって、表現「少なくとも1つの較正物質試料に割り当てられた、前記の割り当て濃度値は、前記較正物質試料の計算濃度値から逸脱する」は、明確化のみのために用いられる。本明細書において、「割り当て濃度値は、計算濃度値から逸脱する」は、割り当て濃度値が、計算濃度値とは異なる、すなわち計算濃度値の技術的精度の適用可能範囲外であることを意味する。当業者に理解されるであろうように、例えば、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の計算濃度値は、 $1.45 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1.54 \mu\text{g}/\text{ml}$ の値を示し、そしてしたがって、この例において、割り当て濃度値は、 $1.45 \mu\text{g}/\text{ml}$ より低いまたは $1.54 \mu\text{g}/\text{ml}$ より高いであろう。さらなる態様において、割り当て濃度値は、計算濃度値+5%より高いか、または計算濃度値-5%より低い。さらなる態様において、割り当て濃度値は、計算濃度値+10%より高いか、または計算濃度値-10%より低い。さらなる態様において、割り当て濃度値は、計算濃度値+15%より高いか、または計算濃度値-15%より低い。さらなる態様において、割り当て濃度値は、計算濃度値+20%より高いか、または計算濃度値-20%より低い。さらなる態様において、割り当て濃度値は、計算濃度値+50%より高いか、または計算濃度値-50%より低い。さらなる態様において、割り当て濃度値は、計算濃度値



の2倍より高いか、または計算濃度値の半分より低い。1つの態様において、割り当て濃度値は、1より多くの較正物質試料に割り当てられる。したがって、1つの態様において、割り当て濃度値は、少なくとも2つ、1つの態様において少なくとも3つ、さらなる態様において少なくとも4つ、さらなる態様においてすべての較正物質試料に割り当てられる。本発明にしたがって、較正物質試料の割り当て濃度値各々は、上に明記するようなそれぞれの試料の計算濃度値から逸脱する。認識されるであろうように、逸脱の方向および/または度合いは、割り当て濃度値が割り当てられる較正物質試料間で多様であってもよく；例えば1つの態様において、第一の較正物質試料の割り当て濃度値は、前記の第一の較正物質試料 - 10%の計算濃度値より低くてもよく、そして第二の較正物質試料の割り当て濃度値は、前記の第二の較正物質試料 + 20%の計算濃度値よりも高くてもよい。1つの態様において、逸脱の度合いは、割り当て濃度値が割り当てられる較正物質試料間で多様である。さらなる態様において、割り当て濃度値が割り当てられる較正物質試料間で、逸脱の度合いのみが多様であり、すなわち逸脱の方向（すなわち割り当て濃度値が計算濃度値よりもより高いかまたは低い）は、多様ではない。したがって、1つの態様において、すべての割り当て濃度値は、それぞれの計算濃度値よりも高いか、またはすべての割り当て濃度値は、それぞれの計算濃度値よりも低い。1つの態様において、計算濃度値から逸脱する割り当て濃度値が割り当てられる、少なくとも1つの較正物質試料は、(i) 較正物質ストック溶液であり、そして/または(ii) 希釈によって較正物質ストック溶液から得られる。割り当て濃度値は、例えば手動で確立された較正曲線に関して較正ポイントを調整することによって、または較正曲線を確立するデバイス内に手動で前記の割り当て濃度値を入力することによって、手動で割り当ててもよく；あるいは割り当て濃度値は、例えばバーコードおよび関連する割り当て濃度値を含むデータベースを含む、適切に装備されたデバイス内に、バーコードを読み入れることによって、自動化方式で割り当ててもよい。

#### 【0025】

したがって、本発明にしたがって、較正物質試料は、(i) 計算濃度値、(ii) 割り当て濃度値、または(iii) 計算濃度値および割り当て濃度値を帰せられていることも可能である。1つの態様において、割り当て濃度値を試料に帰する場合、前記の割り当て濃度値を、較正曲線を確立する際に用いる。

#### 【0026】

1つの態様において、割り当て濃度値は、特定の方法、例えば免疫比濁法で得られた較正曲線を、異なる方法、例えば本明細書において上に明記するようなAdema & Gebertの方法で得られた参照較正曲線に比較し、そして参照較正曲線に対応する、1つの態様において本質的にこれと同一である較正曲線を得るために、1またはそれより多い較正物質試料に、どの濃度値を割り当てべきかを決定することによって、得られる。1つの態様において、割り当て濃度値は、特定のデバイスまたはデバイスモデル上で、特定の方法で得られる較正曲線を、異なるデバイスまたはデバイスモデル上で、前記の特定の方法で得られる参照較正曲線に比較し、そして参照較正曲線に対応する、1つの態様において本質的にこれと同一である較正曲線を得るために、1またはそれより多い較正物質試料に、どの濃度値を割り当てべきかを決定することによって、得られる。本明細書において、用語「参照較正曲線」は、例えば特定の量のDダイマーを含有することが知られる、選択された血漿プールにおいて、Dダイマーのあらかじめ決定されたそして同一でない濃度を有する試料における光学的特性値を決定することによって得られる較正曲線に関する。1つの態様において、参照較正曲線は、非希釈参照試料を用いた参照測定において得られる。1つの態様において、割り当て濃度値は、前記Dダイマーアッセイにおいて、Dダイマーのあらかじめ決定されたそして同一でない濃度を有する少なくとも3つの試料に関する光学的特性値を決定することによって得られる。1つの態様において、少なくとも4つ、さらなる態様において少なくとも5つの前記試料を用いる。

#### 【0027】

1つの態様において、参照較正曲線および較正曲線は、同じ検出剤バッチ（ロット）お

よび／または較正物質ストック溶液の同じバッチ（ロット）を用いて得られる。本明細書において、用語「バッチ」および「ロット」は、1つの態様において、同じ産生プロセスで産生される特定の種類の試薬調製実体に関する。したがって、1つの態様において、較正物質ストック溶液および／または得られる少なくとも1つの割り当て濃度値は、1またはそれより多い試薬ロットに割り当てられる。1つの態様において、較正物質ストック溶液の試薬ロットへの割り当ては、前記試薬ロットで使用するための前記較正物質ストック溶液の保持に関する。1つの態様において、前記較正物質ストック溶液は、少なくとも1つの試薬ロットでの使用のために保持され；さらなる態様において、前記較正物質ストック溶液は1より多い試薬ロットでの使用のために保持され；さらなる態様において、前記較正物質ストック溶液は、多数の試薬ロット、特に少なくとも2つ、1つの態様において少なくとも5つ、さらなる態様において少なくとも10の試薬ロットで使用するために保持される。1つの態様において、割り当て濃度値の試薬ロットへの割り当ては、前記の割り当て濃度値が、前記試薬ロットがDダイマーアッセイで用いられる際のみ適用可能であることを示すことに関する。1つの態様において、較正物質ストック溶液および／または得られる少なくとも1つの割り当て濃度値を、前記の割り当て濃度値（単数または複数）を得る際に用いられる、特定のタイプのデバイス、特にデバイスモデルに割り当てる。したがって、1つの態様において、割り当て較正值は、ロット特異的およびデバイス特異的方式で決定される。したがって、1つの態様において、例えば較正物質ストック溶液の筐体上にプリントすることによって、またはパッケージング自体に含めることによって、較正物質ストック溶液とともに提供されてもよい識別子、例えば参照番号またはバーコードと、較正物質ストック溶液を関連付け、前記識別子は、該識別子で用いるべき試薬ロットの情報を提供する。1つの態様において、較正物質ストック溶液は、前記較正物質ストック溶液に付随するリーフレットまたはパッケージ挿入物上に提供されてもよい識別子と関連付けられる。

10

20

#### 【0028】

用語「光学的特性」は、本明細書において、光学装置、すなわち光子を検出する装置によって検出可能な特性に関する。特に、光学的特性は：反射特性、透過特性、放出特性、散乱特性、蛍光特性、リン光特性、回折特性、および偏光特性からなる群より選択される少なくとも1つの特性であってもよいし、またはこうした特性を含んでもよい。本明細書において、少なくとも1つの光学的特性の変化は、以前検出不能であった特性の存在の検出、以前検出されていた特性の非存在の検出、および特性の定量的変化の検出、すなわち少なくとも1つの光学的特性の変化の度合いに相関するシグナル強度の変化の検出を含むと理解されるであろう。1つの態様において、本明細書に言及されるような光学的特性は、試料の濁度および／または光学密度、あるいはそれに関連する特性を指す。1つの態様において、光学的特性は、試料によって透過される放射束に対する、前記試料によって受け取られる放射束の比に比例するパラメータ、例えば吸光度であり；さらなる態様において、決定される光学的特性は、試料を通じた光路の吸光度および長さの比、すなわち光学密度である。上に定義するような光学的特性を測定値として読み取り可能な物理的シグナルに変換する方法は、当該技術分野に周知である。

30

#### 【0029】

用語「較正曲線」は、特に生物学および／または臨床的アッセイの背景において、当業者に知られる。1つの態様において、較正曲線は、Dダイマーアッセイで決定される値、例えば光学的特性値、および分析物の量、例えばDダイマーの計算濃度または割り当て濃度の間の較正において得られる関係のグラフ的および／または数学的提示である。1つの態様において、較正曲線は直線または本質的に直線である。さらなる態様において、較正曲線は非線形であり、すなわち厳密な意味で曲線である。さらなる態様において、較正曲線は、少なくとも1つの屈曲点を有し、さらなる態様において正確に1つの屈曲点を有する。したがって、1つの態様において、較正曲線は、シグモイド較正曲線であり、ここで、1つの態様において、較正曲線の傾斜の数学記号は較正間隔に渡って不変であり、そしてさらなる態様において、較正曲線の傾斜は、全較正間隔に渡ってゼロではない。本発

40

50

明にしたがって、校正曲線を確立するために、割り当て濃度値が割り当てられない試料に計算濃度値を用い、そして割り当て濃度値が割り当てられる試料に割り当て濃度値を用いる。したがって、本発明にしたがった校正曲線は、計算濃度値のみから得られる校正曲線から、少なくとも1つの光学的特性/濃度値対で逸脱する。当業者に理解されるであろうように、校正曲線は、手動で確立されても、自動化設備によって補助されても、または自動化設備、特にデータプロセッシングデバイスによって確立されてもよい。

【0030】

好適なことに、本発明の根底にある研究において、Dダイマーアッセイで得られる測定においては、校正物質試料の濃度値を再調整して、計算濃度値から逸脱することによって、バッチ間および/またはデバイスモデル間変動が補償されることが見いだされた。こうすることによって、1つの校正溶液しか提供されず、そこからさらなる校正物質試料が希釈によって得られる場合であっても、高い精度の測定を可能にする校正曲線を得ることが可能である。さらに、Dダイマーアッセイの全測定範囲に渡って、高いデバイスモデル間再現性を確実にすることが可能である。

10

【0031】

上で行った定義は、変更すべき点を変更して以下に適用される。さらに以下で行われるさらなる定義および説明もまた、変更すべき点を変更して、本明細書に記載されるすべての態様に適用される。

【0032】

本発明は、試料におけるDダイマー濃度を決定するための方法であって、  
a) 前記試料を、Dダイマーに特異的に結合する検出剤と接触させ、  
b) a) の試料/検出剤混合物の光学的特性値を決定し、  
c) 本発明記載の校正曲線を提供し、  
d) b) で決定した試料/検出剤混合物の前記光学的特性値およびc) の前記校正曲線に基づいて、前記試料中のDダイマー濃度を決定する  
工程を含む前記方法にさらに関する。

20

【0033】

本発明のDダイマー濃度を決定するための方法は*in vitro*法であり、そして特に言及したものに加えてさらなる工程を含んでもよい。さらなる工程は、複数の態様において、工程a) のための試料を提供し、試料を例えば遠心分離によってプレプロセッシングし、そして/または工程a) の後に、前記試料をさらなる剤、例えばDダイマーに特異的に結合する検出剤を特異的に認識する剤と接触させることに関する。

30

【0034】

用語「試料」は、本明細書において、本発明のDダイマーを含むと推測されるかまたは含むことが知られる試料に関する。1つの態様において、試料は、血栓症、特に深部静脈血栓症、および/または塞栓症、特に肺塞栓症を患うと推測される被験体の試料、ならびに/あるいは妊娠被験体由来、産後(出産した後)の被験体由来、および/または集中治療室にやってきたかもしくは集中治療室で治療されている被験体由来の試料である。1つの態様において、試料は、定期的な健康診断の一部として、ルーチンの測定を経た被験体由来である。1つの態様において、試料は、体液試料、組織または臓器由来の試料、あるいは洗浄/リンス液の試料、あるいは外部または内部体表面から得られるスワブまたはスメアであるか、あるいはこれらを含む。1つの態様において、糞便、尿、唾液、脳脊髄液、血液、血清、血漿、または涙液試料が、本発明の方法による試料として含まれる。試料は、ブラシ、(コットン)スワブ、スパーテル、リンス/洗浄液、パンチ生検デバイス、針またはランセットでの腔の穿刺、あるいは外科的器具の使用によって得られてもよい。しかし、1つの態様において、搔把、スワブまたは生検を含む周知の技術によって得られた試料が、本発明の試料としてまた含まれる。細胞不含液は、ホモジナイズなどの溶解技術によって、そして/または濾過または遠心分離などの分離技術によって、体液または組織または臓器から得られうる。1つの態様において、試料は、本発明のDダイマーを含むことが知られる体液、すなわち1つの態様において血液、血漿、血清、唾液等から得られ

40

50

る。本発明の方法を実行するために、試料をさらにプロセッシングしてもよいことが理解されるものとする。特に、当該技術分野に知られる方法および手段によって、試料から細胞を除去してもよい。1つの態様において、試料は、血液、血清または血漿試料、さらなる態様において血漿試料、特にクエン酸血漿試料である。

【0035】

用語「被験体」は、本明細書において、動物、1つの態様において哺乳動物、さらなる態様において霊長類、さらなる態様においてヒトに関する。1つの態様において、本発明記載の被験体は、特に体液、特に血液において、上昇したレベルのDダイマーを有すると推測される被験体である。したがって、1つの態様において、被験体は、血栓症、塞栓症、凝血異常、または血液Dダイマー濃度の増加を引き起こすさらなる状態を患うと推測されるかまたは患うことが知られている。1つの態様において、被験体は、肺塞栓症および/または深部静脈血栓症を患うと推測されるかまたは知られ、そして/または妊娠被験体、産後（出産した後）の被験体、および/または集中治療室にやってきたかもしくは集中治療室で治療されている被験体である。さらなる態様において、被験体は、肺塞栓症および/または深部静脈血栓症の症状を示し、肺塞栓症および/または深部静脈血栓症の診断を排除しなければならない被験体である。

10

【0036】

本発明の方法の文脈において用いるような用語「接触させること」は、当業者に理解される。1つの態様において、該用語は、本発明の化合物、特にDダイマーに特異的に結合する検出剤を、試料と物理的に接触させ、それによって、検出剤および試料の相互作用を可能にすることに関する。1つの態様において、接触には、試料を、例えば適切な緩衝剤でさらに希釈することが含まれる。

20

【0037】

Dダイマー濃度を決定するための方法において、本明細書の別の箇所に明記するような、試料/検出剤混合物の光学的特性を決定する。1つの態様において、方法は、免疫測光法であり；さらなる態様において、方法は免疫比濁法であり、すなわち検出剤を添加した後、試料の濁度の増加を測定する方法である。したがって、1つの態様において、方法は、本明細書において上に明記するように、試料/検出剤混合物の吸光度および/または光学密度を決定する方法である。

【0038】

試料/検出剤混合物の光学的特性値および本発明の校正曲線に基づいて、試料におけるDダイマー濃度を決定する工程は、当業者によって適切と思われる任意の手段によって達成可能である。例えば、1つの態様において、Dダイマー濃度は、校正曲線のグラフ提示を確立することによって、そして光学的特性の測定値に対応するDダイマー濃度をグラフ的に決定することによって、決定可能である。さらなる態様において、校正曲線は数学的等式として提示され、そしてDダイマー濃度は、前記数学的等式に、光学的特性の測定値を適用することによって計算される。

30

【0039】

本発明はまた、試料においてDダイマー濃度を決定するためのキットであって、あらかじめ決定した濃度のDダイマーを有する校正物質ストック溶液、および校正物質試料に関する少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータキャリアを含む、前記キットにも関する。

40

【0040】

用語「キット」は、本明細書において、一緒にパッケージングされていてもまたはされていなくてもよい、本発明の前述の化合物、手段または試薬のコレクションを指す。キットの構成要素は、別個の筐体によって（すなわち別個の部分のキットとして）含まれてもよく、または特に結合剤は、2またはそれより多い構成要素が単一の筐体中で提供されてもよい。さらに、本発明のキットが、1つの態様において、本明細書において上に言及する方法を実施するために用いられるべきであることが理解されるものとする。1つの態様において、構成要素、1つの態様においてすべての構成要素が、上に言及する方法を実施

50

するためのすぐに使用できる方式で提供されることが想定される。1つの態様において、前記構成要素のすべてまたはいくつかは、乾燥、例えば凍結乾燥型で提供され、ここで構成要素は、水性緩衝溶液などの液体を用いて再構成される。1つの態様において、前記構成要素のすべてまたはいくつかは、濃縮液体型で提供され、ここで、濃縮構成要素は、水性緩衝溶液などの液体を用いて希釈される。さらに、キットは、1つの態様において、前記方法を実行するための、そして適用可能な場合、乾燥試薬の前記再構成のための、使用説明書を含有する。使用説明書は、紙または電子型の使用者マニュアルによって提供されてもよい。さらに、マニュアルは、本発明のキットを用いて前述の方法を実施した際に得られる結果を解釈するための使用説明書、およびまたは本明細書において以下に明記するような濃度値を含んでもよい。1つの態様において、キットは、Dダイマーを特異的に認識する少なくとも1つの検出剤をさらに含む。さらなる態様において、キット中のDダイマーを特異的に認識する少なくとも1つの検出剤は、ラテックスビーズ、1つの態様において均一サイズのラテックス粒子、1つの態様において異なるサイズのラテックス粒子に共有カップリングしているか；あるいは、キットは、ラテックスビーズ、および前記ラテックスビーズへの検出剤のカップリングのための手段を含む。また、1つの態様において、キットは、Dダイマーアッセイを実行するためのさらなる手段、例えば緩衝剤をさらに含む。

10

#### 【0041】

本明細書において、用語「少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータキャリア」は、広い意味で用いられ、そしてこれには、割り当て濃度を物理的に含むデータキャリア、ならびに割り当て濃度値を決定可能にする情報を含むデータキャリアが含まれる。また、少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータキャリアは、人によって読み取り可能および/または機械によって読み取り可能であってもよい。したがって、少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータキャリアは、適用可能な割り当て濃度を示す印刷された情報、および例えばマニュアル中に前記情報を含めることによって、前記の割り当て濃度値が人による読み取りに適用可能である校正試料の表示であってもよい。しかし、少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータキャリアは、1つの態様においてまた、人にそして/または機械に読み取り可能な識別子、例えばバーコードまたはRFIDデバイスであってもよく；前記識別子は、1つの態様において、校正物質ストック溶液のバッチを同定して、適切なデータベースにおいて、適用可能な割り当て濃度値および前記の割り当て濃度値が適用可能である校正試料の同定が可能になる。1つの態様において、キット中に含まれる同じまたはさらなる識別子は、前記校正物質ストック溶液および/または少なくとも1つの割り当て濃度値を含む前記データキャリアを、1またはそれより多い試薬ロット、特にDダイマーを特異的に認識する検出剤のロットに割り当てる。したがって、1つの態様において、校正物質ストック溶液は識別子を含む筐体中に含まれ、前記識別子は、前記校正物質ストック溶液および/または前記データキャリアを、1またはそれより多い試薬ロット、特にDダイマーを特異的に認識する検出剤のロットに割り当てる。さらなる態様において、キットに含まれる同じまたはさらなる識別子は、前記校正物質ストック溶液および/または少なくとも1つの割り当て濃度値を含む前記データキャリアを、1またはそれより多いデバイスモデル（単数または複数）に割り当てる。

20

30

40

#### 【0042】

本発明は、試料の光学的特性を検出するための手段、およびDダイマーアッセイのためのあらかじめ定義された校正試料に関する少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータベースを含む機械読み取り可能データキャリアを含む、試料においてDダイマー濃度を決定するためのデバイスにさらに関する。本明細書の別の箇所に明記するように、少なくとも1つの校正物質試料に割り当てられる割り当て濃度値は、前記の校正物質試料の計算濃度値から逸脱する。

#### 【0043】

用語「デバイス」は、本明細書において、決定結果が得られることを可能にするように、互いに機能可能であるように連結された、少なくとも前述の手段を含む、手段のシステ

50

ムに関する。試料を検出剤と接触させるための好ましい手段は、本発明の方法と関連して、上に開示される。操作可能な方式で、手段を連結する方法は、デバイスに含まれる手段のタイプに応じるであろう。1つの態様において、手段は、単一デバイスに含まれる。

【0044】

1つの態様において、試料処理装置は、試料のための容器を含む。容器は、試料と直接接触してもよいし、または試料を受け取るためのさらなる手段の容器であってもよく、さらなる手段は、例えばマルチウェルプレートであってもよく、ここに試料または複数の試料を適用してもよい。さらに、試料処理装置は、1つの態様において、較正物質ストック溶液を、例えば投薬手段に連結された容器、例えばポンプに連結されたチュービング中に含む。さらなる態様において、デバイスは、あらかじめ決定されたDダイマー濃度を有する1つの較正物質ストック溶液を含み；したがって、1つの態様において、デバイスは1つのみ、すなわち正確に1つの較正物質ストック溶液を含む。1つの態様において、試料処理装置は、少なくとも1つの検出剤化合物を、例えば乾燥型で、または投薬手段に連結された容器、例えばポンプに連結されたチュービング中に含む。さらなる態様において、試料処理装置は、混合のための手段および反応混合物の温度を調整するための手段を含む。

10

【0045】

1つの態様において、適切な検出装置上で検出測定を実行することによって、決定結果を得る。したがって、1つの態様において、本発明のデバイスの分析装置は、試料のおよび試料/検出剤混合物の光学的特性を検出するための検出装置をさらに含む。本発明にしたがった検出装置として適切な手段は、当業者に知られ、そしてこれには、例えば測光デバイスが含まれる。

20

【0046】

本発明のデバイスは、Dダイマーアッセイのためのあらかじめ定義された較正試料に関する少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータベースを含む、機械読み取り可能データキャリアをさらに含む。1つの態様において、前記機械読み取り可能データキャリアは、評価装置または評価デバイスに機能可能であるように連結される。

【0047】

1つの態様において、本発明のデバイスは、評価装置をさらに含むか、または分析システムの一部であり、前記分析システムは、評価デバイスをさらに含む。当業者に理解されるであろうように、評価手段は、本発明のデバイスと同じ筐体に、評価装置として含まれてもよいし、または別個のデバイス、すなわち評価デバイスであってもよい。1つの態様において、評価装置またはデバイスは、本発明の分析装置の出力装置から出力データを受け取り、そして論理演算を行って、前記出力データの評価を提供するようプログラミングされたマイクロプロセッサを含む。出力データの評価は、例えば1またはそれより多い対照検出反応において測定された値に関するデータの修正、統計計算、例えば2またはそれより多い平行検出反応の平均の計算、例えば較正物質ストック溶液濃度への希釈係数の適用による計算濃度値の提供、参照値に対する出力データの比較、リストにおけるデータのコンパイル等を含んでもよい。1つの態様において、評価デバイスは、データ保存装置をさらに含む。さらなる態様において、前記データ保存装置は、参照値を、例えば参照値データベース中に含む。さらに、1つの態様において、データ保存装置は、上に明記するように、本発明のデバイスから受け取った出力データを保存するよう適応される。1つの態様において、評価装置またはデバイスは、分析装置によって、決定される光学的特性値に、デバイスの装置読み取り可能データキャリア上に提供される単数または複数の割り当て濃度値に、そして評価装置またはデバイスによって提供される割り当て濃度値が割り当てられなかった較正物質試料に関する計算濃度値に基づいて、Dダイマーアッセイに関する較正曲線を確立するための手段を含む。さらなる態様において、評価装置またはデバイスは、分析装置によって決定される試料/検出剤混合物の光学的特性値、および上に明記するような評価装置またはデバイスによって提供される較正曲線に基づいて、試料中のDダイマー濃度を決定するための手段を含む。

30

40

50

## 【 0 0 4 8 】

1つの態様において、本発明のデバイスは、検出装置に、そして/または評価装置またはデバイスに連結された、データ出力装置をさらに含む。データ出力装置は、1つの態様において、検出装置によって得られるか、あるいは評価装置またはデバイスによって生成される出力データに適応される。適切なデータ出力装置は、当業者に知られ、そしてこれには、単純な出力装置、例えばDダイマー濃度増加が検出されたことを示す、指標ランプまたはディスプレイが含まれる。しかし、出力装置はまた、出力デバイスへのインターフェースであってもよく、前記インターフェースは、任意の種類のデータ伝達手段、例えば、USBのようなケーブル接続、ワイヤレスLAN、ブルートゥース（登録商標）等のようなワイヤレス接続を含むもの、またはインスタントメッセージ、eメール等によるデータ伝達などの間接的接続であってもよい。

10

## 【 0 0 4 9 】

1つの態様において、Dダイマー濃度を自動的に検出するための手段を適用する場合、前記自動操作手段によって得たデータを、診断を確立するかまたは確立を補助する（例えば血栓症を患っていない、そして塞栓症を患っていない被験体を同定する）ため、例えばコンピュータプログラムによってプロセッシングしてもよい。典型的な検出手段は、上記の本発明の方法に関連する態様と関連して開示される。こうした場合、手段は、システムの利用者が、量の決定の結果およびその診断値を、マニュアルに提供される指示および解釈によってまとめられるように、機能可能であるように連結される。当業者は、さらなる発明的技術を伴わずに、手段を連結する方法を知っている。典型的なデバイスは、専門臨床家の特別な知識を伴わずに適用可能なものであり、例えば単に試料を装填することが必要とされる電子デバイスである。結果は、1つの態様において、絶対量または相対量としての、パラメータ診断生データの出力として提供されてもよい。これらのデータは、臨床家による解釈が必要であろうことが理解されるものとする。しかし、やはり想定されるのは、出力が、その解釈に専門臨床家を必要としないプロセッシングされた診断生データを含む、エキスパートシステムデバイスである。

20

## 【 0 0 5 0 】

本発明は、試料中のDダイマー濃度を決定するための割り当て濃度値を有する、少なくとも1つの校正試料の使用にさらに関する。上記から理解されるであろうように、前記使用には、試料中のDダイマー濃度を決定するための、1つの態様においてまた、割り当て濃度値を有する少なくとも2つの校正試料の使用、さらなる態様において割り当て濃度値を有する少なくとも3つの校正試料の使用、さらなる態様において割り当て濃度値を有する少なくとも4つの校正試料の使用、さらなる態様において割り当て濃度値を有する少なくとも5つの校正試料の使用も含まれる。

30

## 【 0 0 5 1 】

本発明はまた、あらかじめ定義された校正試料に関する少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータベースにも関する。1つの態様において、前記データベースは、Dダイマーを特異的に認識する検出剤を含む組成物の少なくとも1つのロットに関する識別子をさらに含む。さらに、本発明は、本発明のデータベースを含むデータキャリアーに関する。

## 【 0 0 5 2 】

本発明はさらに、本明細書に開示する態様の1またはそれより多くにおいて、プログラムが分析デバイス、コンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行された際に、本発明記載の方法を実行するための、コンピュータ実行可能命令を含む、コンピュータプログラムを開示し、そして提唱する。特に、コンピュータプログラムは、コンピュータ読み取り可能データキャリア上に保存されてもよい。したがって、特に、上に示すような方法工程の1つ、1より多く、またはさらにすべてが、コンピュータまたはコンピュータネットワークを用いることによって、好ましくはコンピュータプログラムを用いることによって、実行可能である。

40

## 【 0 0 5 3 】

本発明はさらに、本明細書に含まれる態様の1またはそれより多くにおいて、プログラ

50

ムが分析デバイス、コンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行された際に、本発明記載の方法を実行するための、プログラムコード手段を有するコンピュータプログラム製品を開示し、そして提唱する。特に、プログラムコード手段は、コンピュータ読み取り可能データキャリア上に保存可能である。

【0054】

さらに、本発明は、コンピュータまたはコンピュータネットワーク内、例えばコンピュータまたはコンピュータネットワークの作業メモリまたはメインメモリ内に装填された後、本明細書に開示する態様の1またはそれより多くにしたがって、方法を実行可能である、データ構造が保存されたデータキャリアを開示し、そして提唱する。

【0055】

本発明はさらに、プログラムがコンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行された際に、本明細書に開示する態様の1またはそれより多くにしたがって方法を実行するための、機械読み取り可能キャリア上に保存されたプログラムコード手段を含むコンピュータプログラム製品を提唱し、そして開示する。本明細書において、コンピュータプログラム製品は、取引可能製品としてのプログラムを指す。製品は、一般的に、恣意的形式、例えば紙の形式で、またはコンピュータ読み取り可能データキャリア上に存在していてもよい。特に、コンピュータプログラム製品は、データネットワーク上で分配可能であってもよい。

【0056】

最後に、本発明は、本明細書に開示する態様の1またはそれより多くにしたがって方法を実行するための、コンピュータシステムまたはコンピュータネットワークによって読み取り可能な命令を含有する、調節されたデータシグナルを提唱し、そして開示する。

【0057】

1つの態様において、本発明のコンピュータ実行側面に関して、本明細書に開示する態様の1またはそれより多くにしたがった方法の、1またはそれより多くの方法工程、あるいはさらに、すべての方法工程は、コンピュータまたはコンピュータネットワークを用いることによって実行可能である。したがって、一般的に、データの提供および/または操作を含む任意の方法工程は、コンピュータまたはコンピュータネットワークを用いることによって実行可能である。一般的に、これらの方法工程には、典型的には手動作業を必要とする方法工程、例えば試料の提供および/または実際の測定の実行の特定の側面を除く、任意の方法工程が含まれてもよい。

【0058】

特に本発明はさらに：

- 少なくとも1つのプロセッサを含むコンピュータまたはコンピュータネットワークであって、該プロセッサが、本明細書記載の態様の1つにしたがって方法を実行するように適応されている、前記コンピュータまたはコンピュータネットワーク、

- コンピュータ装填可能データ構造であって、該データ構造がコンピュータ上で実行されている間、本明細書記載の態様の1つにしたがって方法を実行するように適応されている、前記コンピュータ装填可能データ構造、

- コンピュータプログラムであって、該プログラムがコンピュータ上で実行されている間、本明細書記載の態様の1つにしたがって方法を実行するように適応されている、前記コンピュータプログラム、

- コンピュータプログラムであって、該コンピュータプログラムがコンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行されている間、本明細書記載の態様の1つにしたがって方法を実行するためのプログラム手段を含む、前記コンピュータプログラム、

- 先行する態様に記載のプログラム手段を含むコンピュータプログラムであって、該プログラム手段がコンピュータ読み取り可能保存媒体上に保存されている、前記コンピュータプログラム、

- 保存媒体であって、データ構造が該保存媒体上に保存され、そして該データ構造がコンピュータまたはコンピュータネットワークのメインおよび/または作業ストレージに装

10

20

30

40

50



填された後、本明細書記載の態様の1つにしたがって方法を実行するように適応されている、前記保存媒体、および

- プログラムコード手段を有するコンピュータプログラム製品であって、該プログラムコード手段がコンピュータまたはコンピュータネットワーク上で実行された際に、本明細書記載の態様の1つにしたがって方法を実行するため、該プログラムコード手段が、保存媒体上に保存可能であるかまたは保存されている、前記コンピュータプログラム製品を開示する。

【0059】

上記を考慮して、以下の態様が特に想定される：

1. 光学的Dダイマーアッセイのための較正曲線を提供するための方法であって、  
a) あらかじめ決定されたDダイマー濃度を有する較正物質ストック溶液を提供し、  
b) 少なくとも2つの較正物質試料を提供し、ここで、前記の少なくとも2つの較正物質試料は、前記較正物質ストック溶液から得られ、

c) 前記Dダイマーアッセイにおいて、b)の前記較正物質試料の光学的特性値を決定し、

d) 割り当て濃度値を、b)の少なくとも1つの較正物質試料に割り当て、ここで、少なくとも1つの較正物質試料に割り当てられる前記の割り当て濃度値は、前記較正物質試料の計算濃度値から逸脱し、そして

e) c)の前記光学的特性値、d)の単数または複数の割り当て濃度値、そして割り当て濃度値が割り当てられなかった較正物質試料に関する計算濃度値に基づいて、較正曲線を確立する

工程を含む、前記方法。

【0060】

2. 少なくとも3つ、1つの態様において少なくとも4つ、さらなる態様において少なくとも5つの較正物質試料を提供する、請求項1の方法。

3. すべてまたは1つを除くすべての較正物質試料が、希釈によって、前記較正物質ストック溶液から得られる、請求項1または2の方法。

【0061】

4. 割り当て濃度値が、少なくとも2つ、1つの態様において少なくとも3つ、さらなる態様において少なくとも4つの較正物質試料に割り当てられる、請求項1～3のいずれか1項の方法。

【0062】

5. 計算濃度値から逸脱する割り当て濃度値が割り当てられる、前記の少なくとも1つの較正物質試料が、(i)較正物質ストック溶液であり、そして/または(ii)希釈によって較正物質ストック溶液から得られる、請求項1～4のいずれか1項の方法。

【0063】

6. 前記光学的特性が濁度および/または光学密度である、請求項1～5のいずれか1項の方法。

7. 前記Dダイマーアッセイが、Dダイマーを特異的に認識する検出剤と前記較正物質試料を接触させる工程を含む、請求項1～6のいずれか1項の方法。

【0064】

8. Dダイマーを特異的に認識する前記検出剤が抗体、1つの態様においてモノクローナル抗体、さらなる態様においてモノクローナル抗体のF(ab)<sub>2</sub>断片である、請求項7の方法。

【0065】

9. Dダイマーを特異的に認識する前記検出剤が、ラテックス粒子に共有カップリングしている、請求項7または8の方法。

10. 前記較正曲線が非線形較正曲線である、請求項1～9のいずれか1項の方法。

【0066】

11. 前記の割り当て濃度値が、前記Dダイマーアッセイにおいて、Dダイマーのあ

10

20

30

40

50

あらかじめ決定され、そして非同一の濃度を有する、少なくとも3つの試料に関する光学的特性値を決定することによって得られる、請求項1～10のいずれか1項の方法。

【0067】

12. 前記校正物質ストック溶液および/または前記の少なくとも1つの割り当て濃度値が、1またはそれより多い試薬ロットに割り当てられる、請求項1～11のいずれか1項の方法。

【0068】

13. 試料中のDダイマー濃度を決定するための方法であって、  
a) Dダイマーに特異的に結合する検出剤と前記試料を接触させ、  
b) a)の試料/検出剤混合物の光学的特性値を決定し、  
c) 請求項1～11のいずれか1項記載の校正曲線を提供し、  
d) b)において決定した試料/検出剤混合物の前記光学的特性値およびc)の前記校正曲線に基づいて、前記試料におけるDダイマー濃度を決定する  
工程を含む、前記方法。

10

【0069】

14. 前記方法が免疫測光法である、請求項13の方法。  
15. 前記方法が免疫比濁法である、請求項13または14の方法。  
16. 前記校正物質ストック溶液および/または前記の少なくとも1つの割り当て濃度値を、1またはそれより多い試薬ロット、特に前記検出剤のロットに割り当てる、請求項13～15のいずれか1項の方法。

20

【0070】

17. 試料中のDダイマー濃度を決定するためのキットであって、あらかじめ決定された濃度のDダイマーを有する校正物質ストック溶液、および校正物質試料に関する、少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータキャリアを含む、前記キット。

【0071】

18. Dダイマーを特異的に認識する検出剤をさらに含む、請求項17のキット。  
19. Dダイマーを特異的に認識する前記検出剤が抗体である、請求項18のキット。

【0072】

20. Dダイマーを特異的に認識する前記剤が、ラテックス粒子、1つの態様において異なるサイズのラテックス粒子に共有カップリングされている、請求項18または19のキット。

30

【0073】

21. 前記校正物質ストック溶液が、識別子を含む筐体中に含まれ、前記識別子が、前記校正物質ストック溶液および/または前記データキャリアを1またはそれより多い試薬ロット、特にDダイマーを特異的に認識する検出剤ロットに割り当てる、請求項17～20のいずれか1項のキット。

【0074】

22. 試料中のDダイマー濃度を決定するためのデバイスであって、試料の光学的特性を検出するための手段、およびDダイマーアッセイに関するあらかじめ定義された校正試料のための少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータベースを含む機械読み取り可能データキャリアを含む、前記デバイス。

40

【0075】

23. 前記デバイスが、あらかじめ決定されたDダイマー濃度を有する1つの校正物質ストック溶液をさらに含む、請求項22のデバイス。

24. 試料中のDダイマー濃度を決定するための割り当て濃度値を有する少なくとも1つの校正物質試料の使用。

【0076】

25. あらかじめ定義された校正物質試料に関する少なくとも1つの割り当て濃度値を含むデータベース。

50

26. 前記データベースが、Dダイマーを特異的に認識する検出剤を含む組成物の少なくとも1つのロットに関する識別子をさらに含む、請求項25のデータベース。

【0077】

27. 請求項25または26のデータベースを含むデータキャリア。

28. 計算濃度値が、校正物質ストック溶液から校正物質試料を得る間に適用される希釈係数を考慮することによって、試料に帰せられる濃度値である、態様3～12のいずれか1つの方法。

【0078】

29. 前記の割り当て濃度値が、工程c)で用いる方法で得た校正曲線を、異なる方法で得たか、異なるデバイス上で得たか、または異なるデバイスモデル上で得た参照校正曲線に比較することによって得られた、態様1～12および28のいずれか1つの方法。

10

【0079】

30. 前記校正試料が、校正物質ストック溶液から、好ましくは希釈によって得られた、態様17～21のいずれか1つのキット、態様22または23のデバイス、態様24の使用、あるいは態様25または26のデータベース。

【0080】

本明細書で引用するすべての参考文献は、その全開示内容、および本明細書で特に言及する開示内容に関して、本明細書に援用される。

以下の実施例は、本発明を単に例示するものとする。該実施例は、いかなるものであっても、本発明の範囲を限定するとは解されないものとする。

20

【実施例】

【0081】

実施例1：校正

cobas t 411装置上のDダイマーアッセイを校正するため、校正物質ストック溶液を、1:1、1:2、1:4、1:8および1:16の比で装置によって自動的に希釈して、4つのさらなる校正物質試料を生じた。以下の工程を含む標準化法の間、試薬ロット特異的ターゲット値(割り当て濃度値)を、各校正物質試料に割り当てた:

1) 第一の工程は、二次校正物質として、ヒト血漿プールを確立することであった。標準化を実行しなければならないターゲット装置、この例ではRocheのcobas t 411上で、Dダイマーアッセイの一次測定範囲を含むことを目的として、プールを生成した。この目的のため、新鮮ヒト血漿を用いて、8つの血漿プールを生成した。確立された臨床化学系、この場合、Rocheのcobas c501を用いて、これらの血漿プールの一次ターゲット値(濃度値)を得た。

30

【0082】

2) 第二の工程において、血漿プールを用いて、Dダイマー試薬ロット特異的ターゲット値(割り当て濃度)を、Dダイマー校正物質ストック溶液の多様なロットに割り当てた。この目的のため、実施例2に明記するように、cobas t 411上で、血漿プールを測定し、そして測定値およびプールの割り当て値の間で、方法比較(Passing-Bablok)を計算した。cobas t 411装置上の個々の校正セットポイントのターゲット値は、方法比較の再計算が、もっとも狭い特定を満たすことを可能にするまで、方法比較曲線を、可能な限り緊密に、最適回帰直線に適合させることによって、個々に調整された。

40

【0083】

この方法は、カスタマーによって用いられるDダイマー試薬ロットおよびDダイマー校正物質ストック溶液の各々の組み合わせに関して実行され、そしてcobas t 411から臨床化学分析装置c501への優れた比較可能性を可能にする。

【0084】

実施例2：測定

Dダイマー試験を実行するため、商業的に入手可能なDダイマー試薬、Dダイマー校正物質溶液または校正物質ストック溶液および2つのDダイマー対照(すべてRoche

50

D i a g n o s t i c s ) を用いた。

【 0 0 8 5 】

R o c h e の D ダイマーアッセイの 1 つを実行するため、一般的に、ヒト血漿または血清のアリコットをキュベットにピペッティングして、D ダイマー試薬を、 $250\text{ mmol/L}$  T R I S / H C l 緩衝剤を含有する緩衝剤 R 1 と接触させる。続いて、モノクローナル抗ヒトDダイマーでコーティングされたラテックス粒子を含有する試薬 R 2 を、この混合物に添加して、免疫比濁反応を開始する。代替法として、免疫比濁反応はまた、試料を試薬 R 1 および R 2 に添加することによっても開始可能である。ヒト試料中に含有されるDダイマーは、ラテックスビーズ上にコーティングされた抗体によって架橋され、ビーズの凝集を生じる。これは、装置の測光装置によって検出される試料の吸光度の変化を導き、そしてしたがって、単位  $[\mu\text{g FEU/ml}]$  で、試験試料におけるDダイマー濃度の決定が可能になる。

10

【 0 0 8 6 】

標準化を実行すべきターゲット装置、本実施例では R o c h e の c o b a s t 4 1 1 上で、 $20\mu\text{l}$  のヒト血漿および  $80\mu\text{l}$  の R 1 試薬を、 $30\mu\text{l}$  のイミダゾール緩衝剤で希釈した後、 $70\mu\text{l}$  の R 2 試薬を添加して、そして免疫比濁反応を行った。

【 図 1 】

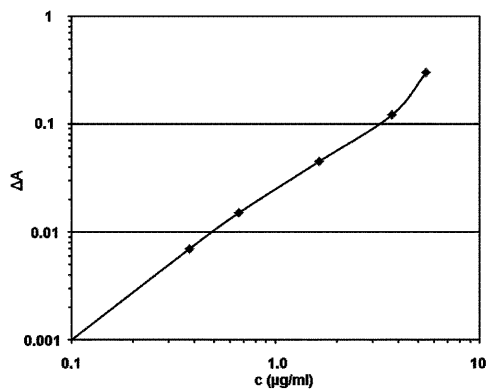


Fig. 1

---

フロントページの続き

(74)代理人 100157923

弁理士 鶴喰 寿孝

(72)発明者 ゴットシャルク, ノルベルト

ドイツ国 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム, ハンス - グッゲンオースシュトラーク 1

(72)発明者 ヤークトファー, フランツィスカ

ドイツ国 8 2 1 1 0 ゲルメリング, ヴィンターシュトラーク 9

(72)発明者 タウン, マイケル - ハロルド

ドイツ国 8 2 3 8 6 オーバーハウゼン, ヴァルトシュトラーク 4 5

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特開 2 0 0 6 - 1 0 5 8 3 8 ( J P , A )

特開 2 0 0 6 - 2 3 4 6 7 5 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 4 / 1 9 8 7 1 6 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

G 0 1 N 2 1 / 5 1