

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 503425

(P2003 - 503425A)

(43)公表日 平成15年1月28日(2003.1.28)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード ( 参考 )
C 0 7 K 14/745	ZNA	C 0 7 K 14/745	4 B 0 6 5
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/795		C 0 7 K 14/795	
16/36		16/36	
19/00		19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 89数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 507103(P2001 - 507103)

(86)(22)出願日 平成12年6月30日(2000.6.30)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月28日(2001.12.28)

(86)国際出願番号 PCT/US00/17977

(87)国際公開番号 W001/001150

(87)国際公開日 平成13年1月4日(2001.1.4)

(31)優先権主張番号 60/141,734

(32)優先日 平成11年6月30日(1999.6.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ  
オブ カリフォルニア  
アメリカ合衆国,カリフォルニア 94607 -  
5200,オークランド,フランクリンストリー  
ト 1111,トゥエルフス フロア

(72)発明者 モーリス, テイモシー エー.  
アメリカ合衆国,カリフォルニア 92103,サ  
ン ディエゴ,ゴールドフィンチ ストリー  
ト 3150

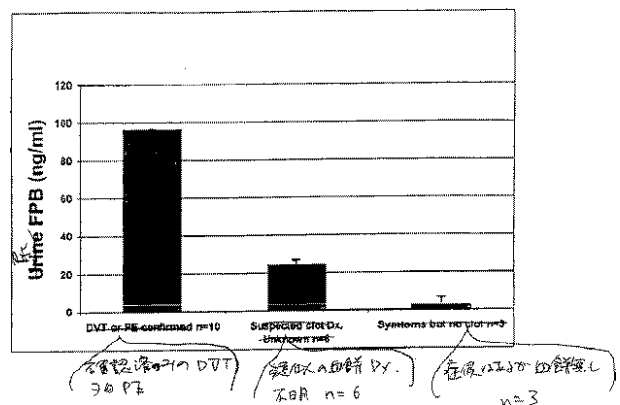
(74)代理人 弁理士 石田 敬 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血栓性又は血栓塞栓性疾患のための診断的試験

(57)【要約】

血栓性又は血栓塞栓性疾患を、白理学的な試料中の B の存在又は非存在によって検出又は監視する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号1を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるフィブリノペプチドBのペプチド類似体。

【請求項2】 配列番号2を含んで成るアミノ酸配列によって定義される脱アルギニンフィブリノペプチドBのペプチド類似体。

【請求項3】 輸送分子に共有結合した、請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項4】 前記輸送分子がキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)である、請求項3に記載のペプチド。

【請求項5】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメント。

【請求項6】 前記のそのフラグメントがFab、F(ab)<sub>2</sub>、又はFvフラグメントである、請求項5に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項7】 前記の抗体又はそのフラグメントが基質と結合する、請求項5に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項8】 前記基質がゲル、ヒドロゲル、樹脂、ビーズ、ニトロセルロース、ナイロンフィルター、マイクロタイタープレート、培養フラスコ、又はポリマー材料である、請求項7に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項9】 検出可能部分を更に含んで成る、請求項5に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項10】 前記の検出可能部分が、放射性核種、酵素、特異的に結合する対の成分、コロイド性色素物質、蛍光色素、化学発光物質、電気化学発光物質、電気活性剤、還元物質、ラテックス、ジゴキシゲニン、粒子、金属、ダンシルリジン、抗体、プロテインA、プロテインG、電子密度材料、又は発色団である、請求項9に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項11】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドである、標的ペプチドを特異的に認識する抗体を産生する連続細胞系。

【請求項12】 モノクローナル抗体細胞系である、請求項11に記載の連続細胞系。

【請求項13】 前記標的ペプチドが輸送分子と共有結合する、請求項11に記載の連続細胞系。

【請求項14】 前記輸送分子がキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）である、請求項13に記載の連続細胞系。

【請求項15】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドである、標的ペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体を産生する動物。

【請求項16】 前記標的ペプチドが輸送分子と共有結合する、請求項15に記載の動物。

【請求項17】 前記輸送分子がキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）である、請求項15に記載の動物。

【請求項18】 患者の血栓性又は血栓性又は血栓塞栓性疾患を検出するための診断方法であって：

（a）精製FPB試料を形成するために、フィブリノペプチドB（FPB）及び脱アルギニンFPBを含むと疑われる生理学的試料を、FPB：検出剤複合体を形成するための量の、FPBに特異的な検出剤と接触させ；ここで、当該検出剤は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである；そして

（b）患者が血栓性又は血栓塞栓性疾患を有するか否かを決定するために、試料中に存在するFPB：検出剤複合体の存在又は量を検出すること、を含んで成る方法。

【請求項19】 前記生理学的試料からフィブリノーゲンを除去することを更に含んで成る、請求項18に記載の診断方法。

【請求項20】 血栓性又は血栓塞栓性疾患が深部静脈血栓症（DVT）又は肺塞栓症（PE）である、請求項18に記載の診断方法。

- 【請求項21】 前記生理学的試料が体液である、請求項18に記載の方法。
- 【請求項22】 前記体液が血漿である、請求項21に記載の方法。
- 【請求項23】 前記試料中に存在するF P B：検出剤複合体の量が5 ng / ml超である、請求項22に記載の方法。
- 【請求項24】 前記試料中に存在するF P B：検出剤複合体の量が10 ng / ml超である、請求項22に記載の方法。
- 【請求項25】 前記体液が尿である、請求項21に記載の方法。
- 【請求項26】 前記試料中に存在するF P B：検出剤複合体の量が50 ng / ml超である、請求項25に記載の方法。
- 【請求項27】 前記試料中に存在するF P B：検出剤複合体の量が100 ng / ml超である、請求項25に記載の方法。
- 【請求項28】 前記ペプチドが輸送分子に共有結合する、請求項18に記載の方法。
- 【請求項29】 前記輸送分子がキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）である、請求項28に記載の方法。
- 【請求項30】 前記の抗体又はそのフラグメントがF a b、F（a b）<sub>2</sub>、又はF vフラグメントである、請求項18に記載の方法。
- 【請求項31】 前記の抗体又はそのフラグメントが基質と結合する、請求項18に記載の方法。
- 【請求項32】 前記基質がゲル、ヒドロゲル、樹脂、ビーズ、ニトロセルロース、ナイロンフィルター、マイクロタイタープレート、培養フラスコ、又はポリマー材料である、請求項31に記載の方法。
- 【請求項33】 前記の抗体又はそのフラグメントが検出可能部分を更に含んで成る、請求項18に記載の方法。
- 【請求項34】 前記の検出可能部分が、放射性核種、酵素、特異的に結合する対の成分、コロイド性色素物質、蛍光色素、還元物質、化学発光物質、電気化学発光物質、電気活性剤、ラテックス、ジゴキシゲニン、金属、粒子、ダンシルリジン、抗体、プロテインA、プロテインG、電子密度材料、又は発色団であ

る、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 前記の検出段階(c)が酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫比濁分析、凝集、沈澱、免疫拡散法、免疫電気泳動、免疫蛍光、電気化学発光、表面プラズモン共鳴、化学発光、電気化学免疫アッセイ、放射性免疫アッセイ、又は免疫組織化学によるものである、請求項18に記載の方法。

【請求項36】 患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の処置を監視するための方法であって：

(a) 精製FPB試料を形成するために、フィブリノペプチドB(FPB)及び脱アルギニンFPBを含むと疑われる生理学的試料を、FPB：検出剤複合体を形成するための量の、FPBに特異的な検出剤と接触させ；ここで、当該検出剤は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである；

(b) 前記試料中に存在するFPB：検出剤複合体の量を検出し；

(c) それ以後の適当な時点で段階(a)及び(b)を繰り返す；そして

(d) 血栓症又は塞栓症が、大きさにおいて縮小しているか否かを決定するために、段階(b)及び(c)で決定される量を比較し、そしてその量の変化を関連づけること、  
を含んで成る方法。

【請求項37】 前記生理学的試料からフィブリノーゲンを除去することを更に含んで成る、請求項36に記載の診断方法。

【請求項38】 患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患を検出するための診断方法であって：

(a) フィブリノペプチドB(FPB)及び脱アルギニンFPBを含むと疑われる尿試料を、FPB：検出剤複合体を形成するための量の、FPBに特異的な検出剤と接触させ；ここで、当該検出剤は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである；  
そして

(b) 患者が血栓性又は血栓塞栓性疾患を有するか否かを決定するために、前記試料中に存在するF P B：検出剤複合体の存在又は量を検出すること、を含んで成る方法。

【請求項39】 患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の処置を監視するための診断方法であって：

(a) フィブリノペプチドB (F P B) 及び脱アルギニンF P Bを含むと疑われる尿試料を、F P B：検出剤複合体を形成するための量の、F P Bに特異的な検出剤と接触させ；ここで、当該検出剤は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるF P Bペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである；そして

(b) 患者が血栓性又は血栓塞栓性疾患を有するか否かを決定するために、前記試料中に存在するF P B：検出剤複合体の存在又は量を検出すること、を含んで成る方法。

【請求項40】 患者の血栓性又は血栓性又は血栓塞栓性疾患の検出のためのキットであって：

(a) F P Bに特異的な検出剤を含んで成る組成物；ここで当該検出剤は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるF P Bペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである；及び

(b) 前記組成物を同封する梱包材料、を含んで成るキット。

【請求項41】 患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の検出方法であって、患者の尿中のF P Bペプチドの存在又は量を検出する段階を含んで成る方法。

【請求項42】 F P Bペプチドの存在又は量を検出する前記の段階がH P L C解析を含んで成る、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 F P Bペプチドの存在又は量を検出する前記の段階がキャピラリー電気泳動解析を含んで成る、請求項41に記載の方法。

【請求項44】 F P Bペプチドの存在又は量を検出する前記の段階が免疫

アッセイを含んで成る、請求項41に記載の方法。

【請求項45】 尿の量又は糸球体濾過の速度の指標を測定する段階を更に含んで成る、請求項41に記載の方法。

【請求項46】 尿中のF P Bペプチドの濃度が50 ng/ml超であるか否かを決定するための段階を更に含んで成る、請求項41に記載の方法。

【請求項47】 尿中のF P Bペプチドの濃度が正常な集団のものより有意に大きいか否かを決定するための段階を更に含んで成る、請求項41に記載の方法。

【請求項48】 患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の処置を監視する方法であって、当該患者の尿中のF P Bレベルを測定し、そして前記レベルが許容範囲にあるか否かを決定する段階を含んで成る方法。

【請求項49】 患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の処置を監視するための方法であって：

(a) 最初に、患者の尿に存在するF P Bの量を検出し；  
(b) その後の次の機会に、患者の尿に存在するF P Bの量を検出し；そして  
(c) 血栓症又は塞栓症が、大きさにおいて縮小しているか否かを決定するために、段階(a)及び(b)で決定した量を比較すること、  
を含んで成る方法。

【請求項50】 タンパク質、検出可能な標識、ポリマー、ビーズ、電気化学発光標識、抗原、ビオチン、ストレプトアビジン金属キレート、コロイド、又は電気化学標識と共有結合した、請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項51】 患者の血栓性又は血栓性又は血栓塞栓性疾患の検出のためのキットであって：

(a) F P Bに特異的な検出剤を含んで成る組成物；ここで当該検出剤は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含んで成るアミノ酸配列によって定義されるF P Bペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである；及び

(b) 尿の量又は糸球体濾過の速度の指標を測定するための試薬、  
を含んで成るキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****本発明の背景**

本発明は、血栓性又は血栓塞栓性疾患、例えば深部静脈血栓症（DVT）及び肺塞栓症（PE）を有する患者の医学的な処置を、臨床的な診断を容易にすることにより、そして処置の有効性が測定され得る手段を提供することにより改善すべく設計される。

**【0002】**

DVT及びPEを有する患者を治療することの最も挑戦的な観点は、最初の診断を行うことに関係している。事実、ほとんどのPEによる死亡は、疾患が検出される前に起こる。臨床的な徴候及び症状は知覚し得るものでも、特異的なものでもなく；そしてDVT及び/又はPEを診断するためのそれに続く評価方法は時間がかかり、高価で、そして潜在的に侵襲性である。これらの疾患のための非侵襲性の診断技術は、血管の解剖における欠点、活動的な血栓症に特異的でないという発見を示すことに焦点が当てられている。例えば、圧縮超音波検査法（CUS）は、大腿静脈における病態を検出するために使用され得る。しかし、新規な血栓と、それ以前の血栓に由来する病巣の壁の肥厚との識別は、確実に行われ得ない。更に、CUSは無症候性のDVTを確実に検出することができない。その結果、活動性の血栓症を示唆する血清マーカーの同定に注目が集まってきた。

**【0003】**

この10年間、血栓塞栓性疾患を同定するための血漿D-ダイマーレベルの有用性が広範に調べられてきた。D-ダイマーは、架橋型フィブリンの分解の結果として形成され、そして血漿レベルがDVT及びPEにおいて共に増大することが示されてきた。しかしながら、血漿D-ダイマーレベルは、必ずしもフィブリン形成の割合ではないが、フィブリン分解活性の割合を反映している。その結果、血漿D-ダイマーレベルは先のフィブリン形成に関与している様々な病理学的症状、例えば敗血症、DIC、肺炎、及び悪性腫瘍において増大する。事実、医学的な入院患者（恐らく血栓塞栓性疾患でない）のうちの22%だけが、増大したD-ダイマーレベルを有していない。

## 【0004】

抗凝血剤は、血栓塞栓性疾患、特に静脈血栓塞栓症（VTE）を処置するために何十年も使用されてきたが、この疾患を処置する理想的な方法は解決されていない。一般的に、初期の抗凝血が短期間の死亡を劇的に減少させることは認められており（Douketis et al., 1998）、そして長期間の続発症、例えば再発性DVT及びPEの発生が、診断後の最初の数日における処置の強度にも依存していることが明らかになってきている（Hull et al., 1997）。VTEにとって最適な初期の抗凝血法は、しかしながら議論の余地がある問題である。新規な抗血栓の戦略は常に開発されており、これは非分画性ヘパリン（Raschke et al., 1993, Lopaciuk et al. 1992, Hirsch et al. 1996）、低分子量ヘパリン（Levine et al. 1996, Koopman et al. 1996, Meyer et al. 1995）及び抗凝血酵素トロンビンの特異的阻害剤（Verstraete 1997）及び第Xa因子（Walenga et al. 1997）の投与計画の改良を含む。各計画は、*in situ*での血栓の増大を抑制するためのその能力として定義される、特異的な抗血栓能を有する。これらの新規な抗凝血剤の戦略の利点は、初期の抗血栓作用と長期間の臨床的な結果との関係に依存するだろう。

## 【0005】

抗凝血剤は異なる作用機構を持つことがあるが、フィブリンへのフィブリノーゲンのトロンビン媒介型の変換を防ぎ、そしてその結果血栓の増大を停止させるという（抗血栓症）、最終的な生化学的目標は同一である。不幸なことに、活性、例えば活性化された部分的なトロンボプラスチンの時間（aPTT）及び血漿抗Xa活性の*in vitro*での試験によって測定される、これらの処方の抗凝血能は、動物モデルにおいてそれらの抗血栓性作用を全く予想しない（Carrier et al. 1993, Carrier et al. 1992, Morris et al. 1998）。

## 【0006】

不適当なVTEの最初の処置が、致死的な肺塞栓症（Dalen 1986）及び長期の再発（Hull 1997）の素因を作るという認識が増大している。しかしながら、VTEの初期の処置における低い抗血栓性の活性自身が、乏しい臨床的な結果へと導くことを示唆するデータに対する制限が存在している。例えば、非分画性ヘパ

リンを受ける患者の抗凝血活性は、実際の血漿ヘパリンレベルとわずかに適度な相関を有する、血漿 a P T T を用いて通常測定される (Gawoski et al. 1987, Brandt et al. 1981, van den Besselaar et al. 1990)。更に、血栓症の動物モデルにおいて観察される、抗凝血活性と抗血栓性作用との間の適度な相関でさえ、ヒトにおいて確証されていない。最後に、抗血栓症の強度が臨床的な有効性と相関しているという仮説は道理に適っているが、ヒトにおいては試験されていない。例えば、V T E の再発と、抗凝血の抗血栓性作用とを相関させる臨床的な研究は存在していなかった。

#### 【0007】

V T E を有するヒトにおける、抗凝血剤の抗血栓作用の測定は困難である。D V T (圧縮超音波検査法、インピーダンス・プレチスモグラフィ及び磁気共鳴画像法) 及び P E (肺換気・血流スキャン及びヘリカル C T スキャン) の診断に最も一般的に使用される非侵襲性試験は、血栓塞栓が急性的に増大したか否かを確実に決定するための十分な解剖学的情報を提供しない。侵襲性の研究、例えば対比 ( c o n t r a s t ) 静脈造影法及び血管造影法は、血栓のサイズの総変化を示すのにより優れているが (Lopaciuk et al. 1992, National Heart 1970)、苦痛なことがあり、そしてしばしば次の処置のために実用的でない。更に、それらは進行中の血栓症により、血餅の大きさのかすかな増大を検出することができないであろう。最後に、上述の解剖試験の全てが、固有のフィブリン分解系の作用 (血餅サイズの縮小) から、抗凝血作用 (血餅の増大の抑制) を区別することができないという限界を有する。

#### 【0008】

V T E のために最も一般的に使用されている血清学的試験、D - ダイマー試験も、急性血栓症のマーカーとして不適當である。V E T の高感度の指標として徐々に認識されているが、当該試験は既存の血餅に由来する血栓溶解フラグメントを測定し、そして血栓の増大と相関していないだろう。同様に、トロンビン活性化の血清マーカー、例えばプロトロンビン F 1 + 2 フラグメント及びトロンビン - アンチトロンビン III 複合体は、フィブリン (フィブリノーゲン) 変換及び重合化の直接的な指標ではない。この様に、第 X a 因子及びトロンビンに対して異

なる活性のスペクトルを有する抗凝血剤（例えばヘパリン五糖及びヒルジン）は、たとえそれらの *in vivo* での作用と抗血栓性作用とが同一であっても、これらの試験に対して別々に影響を及ぼすことが予想されるだろう。

#### 【0009】

従って、現行の必要性は、DVT及びPEについての確かな試験について、並びに異なる治療計画の有効性を決定するための試験についても存在している。また、PE及び/又はDVTの検出において十分な特異性及び感度を有するマーカーの発見は診断の精度に役立ち、そして資源における費用の有効利用を容易にするだろう。この様に、ポジティブな試験による患者のみが抗凝血、そして更には適当な試験による評価を求めるだろう。

#### 【0010】

##### 本発明の要約

本発明は、生理学的な試料におけるフィブリノペプチドB (FPB) のレベルを測定することによって、血栓性又は血栓塞栓性疾患、例えばPE及び/又はDVTを検出する方法を提供する。当該試料は血液、血漿又は、好ましくは尿であり得る。本発明はまた、血液、血漿又は、好ましくは尿中のFPBレベルの変化を監視することによって、患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の処置を監視するための方法を提供する。本発明はまた、これらの測定を実施するためのアッセイ方法を提供する。本発明はまた、FPB由来の配列を含むペプチドを提供し；これらのペプチドはFPBについてのアッセイにおけるキャリブレーター又はコントロールとして使用されることがあり、それらは輸送タンパク質と連結し、そしてFPBに対する抗体を産生するために使用されることがあり、そして/あるいはそれらは標識又は固相と連結し、そしてFPBについての競合アッセイにおける競合物として使用されることがある。本発明はまた、FPBについての免疫アッセイを実施するための試薬、競合物、及びキットを提供する。

#### 【0011】

本発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列によって定義されるペプチド、フィブリノペプチドB (fibronopeptide B)、及び配列番号2に示されるアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドを提供する。これら

のペプチドは、輸送分子、例えばキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と共有結合され得る。また、これらのペプチド及びその誘導体は、基質、例えばゲル、ヒドロゲル、樹脂、ビーズ、磁気ビーズ、電極、ニトロセルロース、ナイロンフィルター、マイクロタイタープレート、培養フラスコ、又はポリマー材料と付着され得る。前記ペプチドは、それと作用可能に連結する検出可能部分を有することがあり、そして当該検出可能部分は、放射性核種、酵素、特異的に結合する対の成分、コロイド性色素物質、蛍光色素、還元物質、ラテックス、ジゴキシゲニン、金属、粒子、ダンシルリジン、抗体、プロテインA、プロテインG、電子密度材料、化学発光物質、電気化学発光物質、電気活性化合物又は発色団であってもよい。

#### 【0012】

本発明はまた、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、又は配列番号6に示したアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントを提供する。その様なフラグメントは、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、又はFvフラグメントであってもよい。当該抗体又はそのフラグメントは、基質、例えばゲル、ヒドロゲル、樹脂、ビーズ、磁気ビーズ、電極、ニトロセルロース、ナイロンフィルター、マイクロタイタープレート、培養フラスコ、又はポリマー材料に付着し得る。当該抗体又はそのフラグメントは、それと作用可能に連結した検出可能部分を有することがあり、そして当該検出可能部分は放射性核種、酵素、特異的に結合する対の成分、コロイド性色素物質、蛍光色素、還元物質、ラテックス、ジゴキシゲニン、金属、粒子、ダンシルリジン、抗体、プロテインA、プロテインG、電子密度材料、電気化学発光物質、化学発光物質又は発色団であってもよい。

#### 【0013】

本発明は更に、標的ペプチドを特異的に認識する抗体を産生する、連続的な細胞系を提供し、ここで、当該標的ペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6に示したアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドである。当該細胞系はモノクローナル抗体の細胞系であってもよい。

## 【0014】

本発明は更に、標的ペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体を産生する動物を提供し、ここで、当該標的ペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6に示したアミノ酸配列によって定義されるFPBペプチドである。当該標的ペプチドは、輸送分子と共有結合し得る。それはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)であってもよい。

## 【0015】

本発明は、患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患を検出するための方法であって、当該患者が血栓性又は血栓塞栓性疾患を有するか否かを決定するために、試料、例えば患者から採取した生理学的な体液中のFPBの存在又は量を検出する段階を有する方法を提供する。検出され得る血栓性又は血栓塞栓性疾患は、深部静脈血栓症(DVT)又は肺塞栓症(PE)であり得る。検出され得る生理学的な体液は、体液、例えば血液又は尿であり得る。検出段階に使用され得る技術の例は、質量分析法、ペプチドの配列決定、クロマトグラフィー(例えばHPLC又はTLC)、電気泳動(例えばキャピラリー電気泳動)、酵素結合免疫吸着アッセイ法、免疫比濁分析、凝集、沈澱、免疫拡散法、免疫電気泳動、電気化学発光免疫アッセイ、電気化学免疫アッセイ、化学発光免疫アッセイ、ウェスタンブロット、免疫蛍光、放射線免疫アッセイ、及び免疫組織化学を含む。試料中に存在するFPBの量は、それが有意に正常な範囲より上である場合に、又はそれが血栓性若しくは血栓塞栓性疾患の指標となる範囲内にある場合に、血栓性又は血栓塞栓性疾患について「ポジティブ」であるとみなされる。使用される正確なカットオフ値は、所望のアッセイの感度及び選択性に依存して変化するだろう。1つの態様において、血液又は血漿試料中に存在するFPBの量は、それが5ng/ml以上である場合に、そして特にそれが10ng/ml以上である場合に、血栓性又は血栓塞栓性疾患について「ポジティブ」であるとみなされる。別の態様において、尿の試料中に存在するFPBの量は、それが50ng/ml以上である場合に、そして特にそれが100ng/ml以上である場合に、血栓性又は血栓塞栓性疾患について「ポジティブ」であるとみなされる。

## 【0016】

本発明は、患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患を検出するための診断方法であつて、フィブリノペプチドB ( F P B ) 及び脱アルギニンF P Bを含むと疑われる生理学的試料を、F P B : 検出剤複合体を形成する量の、F P Bに特異的な検出剤と接触させ(ここで、当該検出剤は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6に示したアミノ酸配列によって定義されるF P Bペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである)、そして患者が血栓性又は血栓塞栓性疾患を有するか否かを決定するために、試料中に存在するF P B : 検出剤複合体の存在又は量を検出する段階を有する方法を提供する。当該方法は生理学的試料からフィブリノーゲンを除去する段階を含む。検出され得る血栓性又は血栓塞栓性疾患は、深部静脈血栓症( D V T ) 又は肺塞栓症( P E ) であり得る。検出され得る生理学的な体液は、体液、例えば血液、血漿又は尿であり得る。検出段階は、酵素結合免疫吸着アッセイ法、免疫比濁分析、凝集、沈澱、免疫拡散法、免疫電気泳動、電気化学発光免疫アッセイ、化学発光免疫アッセイ、電気化学免疫アッセイ、ウェスタンブロット、免疫蛍光、放射線免疫アッセイ、及び免疫組織化学によって行われ得る。血漿試料中に存在するF P B : 検出剤複合体の量は、それが5 ng / ml以上である場合に、そして特にそれが10 ng / ml以上である場合に、血栓性又は血栓塞栓性疾患について「ポジティブ」であるとみなされる。尿試料中に存在するF P B : 検出剤複合体の量は、それが50 ng / ml以上である場合に、そして特にそれが100 ng / ml以上である場合に、血栓性又は血栓塞栓性疾患について「ポジティブ」であるとみなされる。

#### 【0017】

本発明は、生理学的試料、例えば血液、血漿、又は好ましくは尿中のF P Bのレベルの変化を監視することによって、患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の処置を監視するための方法を提供する。監視は、フィブリノペプチドB ( F P B ) 及び脱アルギニンを含むと疑われる生理学的試料を、F P B : 検出剤複合体を形成する量の、F P Bに特異的な検出剤と接触させ(ここで、検出剤は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6に示したアミノ酸配列によって定義されるF P Bペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフ

ラグメントである)、試料中に存在するF P B: 検出剤複合体の量を検出し; それ以後の適当な時点で前記段階を繰り返す; そして血栓性又は塞栓性が大きさにおいて縮小しているか否かを決定するために、2つの時点で決定された量を比較し、そしてその量の変化を関連づける段階を含んで成る。当該方法は、試料からフィブリノーゲンを除去する段階を含み得る。

【0018】

本発明はまた、患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患を検出するための診断方法であって、フィブリノペプチドB (F P B) 及び脱アルギニンF P Bを含むと疑われる尿試料を、F P B: 検出剤複合体を形成するための量の、F P Bに特異的な検出剤と接触させ(ここで、検出剤は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6によって定義されるF P Bペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである); 患者が血栓性又は血栓塞栓性疾患を有するか否かを決定するために、試料中に存在するF P B: 検出剤複合体の存在又は量を検出することを含む方法を提供する。

【0019】

更に、本発明は患者の尿中のF P Bレベルの変化を監視することによって、患者の血栓性又は血栓塞栓性疾患の処置を監視するための診断方法を提供する。その様な監視は、フィブリノペプチドB (F P B) 及び脱アルギニンF P Bを含むと疑われる尿試料を、F P B: 検出剤複合体を形成するための量の、F P Bに特異的な検出剤と接触させ(ここで、検出剤は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5又は配列番号6に示したアミノ酸配列によって定義されるF P Bペプチドを特異的に認識する抗体又はそのフラグメントである); そして血栓性又は塞栓症が、大きさにおいて縮小しているか否かを決定するために、長時間F P Bの尿濃度の変化を監視することを含んで成ることもある。

【0020】

本発明はまた、1又は複数の容器において、本発明のアッセイの実施に使用される1又は複数の試薬又は組成物を含むキットを提供する。これらのキットはまた、検定試料又は標準を含むこともある。

【0021】

### 本発明の詳細な説明

フィブリノペプチドは、フィブリン血餅の形成の間に素速く放出され、そして血液/尿のフィブリノペプチドレベルは、それ故に血栓塞栓性疾患における血栓の増大の正確な基準である。フィブリノペプチドA及びB（FPA及びFPB）は、可溶性フィブリノーゲンの鎖（それぞれ）のアミノ末端に存在する短いアミノ酸配列である。凝血経路における最終段階の1つにおいて、トロンピンは、自然に重合化する、フィブリンIを形成するために最初にFPAを開裂することによって、可溶性フィブリノーゲンをフィブリンに変換する。続いて、トロンピンは半固体のネットワークを形成するために側方で会合し、そして架橋する、フィブリンIIポリマーを形成するためのフィブリンIサブユニットの鎖からフィブリノペプチドB（FPB）を放出し、一方、フィブリノペプチドは血漿中で可溶性のままである。

#### 【0022】

血漿FPAレベルは血栓症の間上昇し、そしてこの基準は血栓症及び抗凝血のための妥当なマーカーを代表し得る。FPAは、事実、免疫アッセイ及び高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）によって、血漿中で検出可能である。しかしながら、FPAは非常に容易にフィブリノーゲンから開裂するので、人為現象的に上昇した血漿レベルは一般的な困惑させる問題である。回収用の管にタンパク質分解阻害剤が添加される場合でさえ、試料の採取過程自体がFPAの放出をもたらす得る。誤って上昇したレベルは静脈穿刺及び留置カテーテルを介する静脈切開の様な因子と一体とされてきた。

#### 【0023】

本発明者は、FPBがFPAよりも血栓性活性のマーカーとして適していることを発見した。理論に囚われること無く、FPBのマーカーとしての利点のいくつかは、後述するFPBの特性のいくつかと関連している。トロンピンが媒介する、フィブリノーゲンからのFPBの開裂は、FPAの場合よりもかなり遅い（Ng et al. 1993）。事実、トロンピンが媒介するFPBの放出は、フィブリノーゲンからのFPAの除去が完了した後にのみ起こる。更に、FPBの*ex vivo*での放出は、フィブリンIの重合化を阻害する物質によって阻害され得る。

F P Bの血漿測定は、それ故に人為現象的な誤りをほとんど被ることはない。F P Bは、*in vivo*でのフィブリノーゲン重合化の間に、連続的にフィブリノーゲン分子から開裂する。一旦重合化が全身性の抗凝血療法の投与によって中断すると、F P Bの開裂は中止する。以前の研究によって、血漿F P Bレベルが子宮内血栓症の後急激に上昇し、それによって*in vivo*での進行中のフィブリノの形成を反映することが示された。更に、F P Bレベルは、他の様々な診断において有意に上昇しない。この様に、活性血栓症と関連しているフィブリノの形成は、他の医学的症状において見られるものよりも有意に高い血漿レベルをもたらす。この様に、F P Bは、試料の回収の間の、人為現象的な上昇に対してF P Aほど影響を受けない。血漿F P Bのレベルの測定は、それ故に急性血栓症について更に高感度であり、そして特異的な血清学的なマーカーである。

#### 【0024】

活動的な*in vivo*での血栓症を測定するための現在の努力は、*in situ*での血栓の表面上のフィブリノーゲンからのF P Bの除去が局所的な血栓性の活性と相関し、そして抗凝血の間に消失したことを証明することに焦点が集まった。最初に、*in vitro*での実験が行われ、F P Bの開裂の後、フィブリノの鎖に暴露した新規エピトープ、<sub>15-22</sub>が、モノクローナル抗体（抗<sub>15-22</sub>）（Morris et al. 1997a）による結合に対して、わずかに一時的に接触できることを示した。この現象は、<sub>15-22</sub>部位が平行なフィブリン単一繊維の間の側方の会合によって素速く覆われるという事実によって説明された。この様に、フィブリンサブユニットは、F P Bが開裂したが、側方化がまだ起きていない場合にのみ抗<sub>15-22</sub>と結合することができる。本質的に、当該エピトープは活動的な血栓症の間にのみ接触できる。

#### 【0025】

次に、フィブリノーゲンからのF P Bの開裂も、*in vivo*での血栓性の活性と相関していたことが証明された。DVT及びPEの*in vivo*での実験モデルにおいて、活動的に増大している*in situ*の血栓は、ガンマカメラで映像化するのに十分な量の、放射性標識した抗<sub>15-22</sub>と結合した（Morris et al. 1993）。<sub>15-22</sub>部位がわずかに一時的に暴露されるので（フィブリン

ネットワークの側方化前)、血栓の映像化は、凝血が継続している場合にのみ起こる。放射性標識した抗<sub>15-22</sub>の投与前に、既に形成した血栓を有する患者の全身性の抗凝血は、抗体の結合を抑制した。事実、抗凝血の程度(血液ヘパリンレベルによって測定されるもの)は、血栓での放射性標識した抗<sub>15-22</sub>の局在化と強力な反対の相関を有していた(Morris et al. 1997b)。

#### 【0026】

血栓症の類似モデルは、静脈内の非分画性ヘパリン、皮下の非分画性ヘパリン及び共に皮下から与えられた、2つの低分子量ヘパリンの、4つの異なる抗凝血療法の抗血栓効率を比較するために使用された(Morris et al. 1998)。そこには療法間の抗血栓効果における有意な差異が存在しており、これは当該実験の間に測定された*ex vivo*での抗凝血試験(例えば抗Xa活性)と相関していなかった。

#### 【0027】

血栓症の指標としての<sub>15-22</sub>部位の暴露の測定は、当該暴露の一時的な性質により、そして当該測定が検出剤の注入を全身的に要するという事実によって問題とされる。対照的に、我々は今回、放出されたFPBペプチドの測定が血栓性活性の優れた指標であり、そして<sub>15-22</sub>について記述された欠点を持たないことを発見した。血栓症の*in vitro*及び*in vivo*の両方のモデルにおけるFPBの測定は、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて行われた。合成ヒトFPBは、合成FPA及び血漿タンパク質から容易に区別された。次に、実験的な血栓が誘導された、3匹のイヌに由来する血漿試料が集められ、そしてHPLCによって解析された。フィブリノペプチド濃度は、ピーク時の領域( $A_{205}$ の時間)を、既知の量の精製されたイヌのフィブリノーゲンをトロンビンで処理することによって得られたものと比較することによって推定された。FPA及びFPBの両方に相当するピークは血栓の誘導前は低かったが、血栓が誘導され、そして*in situ*での増大が認められるにつれて着実に増大した。これらの実験は、*in vivo*での血栓症の基準として、FPBレベルを用いる妥当性を支持する。

#### 【0028】

本発明は、F P B及び/又は脱アルギニンF P Bの測定に基づいた、活動的な血栓症を検出するための非侵襲性の血液、血漿、及び/又は尿の試験の作製と部分的に関与する（F P Bの様に素速く形成される分解産物は、正常な血漿中のカルボキシペプチダーゼに暴露される）。この測定を実施するために使用され得る方法は、ペプチドの配列決定、質量分析法、クロマトグラフィー（例えばH P L C又はT L C）、電気泳動による分離（例えばキャピラリー電気泳動）及び特異的な結合の相互作用を介する測定（例えば免疫アッセイ）を含む。F P B及び脱アルギニンF P Bが共に測定され得る。本発明はまた、これらのマトリックスにおいてF P B及び脱アルギニンF P Bを測定するための免疫アッセイを含む。

#### 【0029】

同一のアッセイを用いて両ペプチドを試験するための原理は、ヒトにおいて、正常な血漿に*in vivo*で存在するカルボキシペプチダーゼが、循環しているF P Bを脱アルギニンF P Bに分解するということである。血漿中に存在するF P Bと脱アルギニンF P Bとの相対比は、部分的に、それぞれの個体のカルボキシペプチダーゼ活性に依存している。血漿中で上昇した両ペプチドのレベルは、進行中の血栓症の比率を反映している。従って、本発明の1つの態様において、F P Bの測定は、F P B及び脱アルギニンF P Bの両方と交差反応する様に設計される免疫アッセイを用いて行われる。あるいは、2つのペプチドは、前記ペプチドのうちの1つにそれぞれ特異的な2つの独立したアッセイの使用を介して測定されることがあり；続いて、F P B由来ペプチドの合計量が、F P B及び脱アルギニンF P Bの計算した濃度を合計することによって決定される。

#### 【0030】

この様に、本発明はD V T、P E及び他の血栓性疾患の診断における使用のために、進行中の血栓症のマーカーとして血液及び尿中のF P Bを測定するための方法を提供する。更に、当該アッセイは異なる抗凝血療法の抗血栓効率を決定するために使用され得る。当該F P B試験はD - ダイマー試験よりも活動的なD V T又はP Eの存在について更に高感度であり、そして特異的である。静脈穿刺が必要でない場合、それは尿を用いて行われ得る。

#### 【0031】

本発明の重要な観点は、尿中のF P Bの測定の有用性の現時点での発見である。F P Bが血液中で生成するという事実にもかかわらず、尿中のF P Bレベルが血液又は血漿中のものより、約1～2倍の大きさであり、そしてその結果、より単純で、より素速く、そして/あるいはあまり感度がないアッセイによる測定に影響を受けやすい。更に、いくつかの場合において、尿中のF P Bの測定は、驚くべきことに血栓性活性又は疾患とより良く相関することが明らかとなった(血液又は血漿中での測定と比較して)。尿の測定の追加の利益は、血栓性の活性と関連づけられるF P B濃度の変化についての時定数が、血液中よりも尿中でより長くなる傾向があり;尿の測定が、その結果現在の血栓性活性の指標となるだけでなく、少し前の血栓性活性も示唆し得るという事実である。

#### 【0032】

F P B及び脱アルギニンF P Bの合計濃度のための免疫アッセイ試験が開発されてきており、そして試薬が容易に大量に製造されており、又は製造され得る。当該アッセイは血栓症の*in vitro*モデルにおいて;実験的に誘導された深部静脈血栓症(DVT)及び肺塞栓症(PE)を用いる動物モデルにおいて、そして入院患者のDVT及びPEの存在が確実に検出される、ヒトの臨床研究において試験されてきた。本発明は、DVT及びPEの管理において検出し、そして補助するための保護目的の診断ツールとして使用され得る。当該免疫アッセイは、患者のそばで容易にかつ安価に行われ得る。更に、当該アッセイは進行中の血栓の増大を検出するので、それは治療を誘導するのにも有用である。

#### 【0033】

本明細書に更に明確かつ正確に記載されている目的のために、若干の用語上の約束事が以下の考察において採用された。これらの約束事は本発明の説明を増強するための実用的な手段を提供することを意図しているが、限定することを意図しておらず、そして当業者は、矛盾することはないが、他のかつ追加の解釈を暗示し得ることを理解するだろう。

#### 【0034】

F P Bの「類似体」又は「変異体」は、天然F P Bを完全に同一でないポリペプチドである。その様なF P Bの類似体は、1又は複数のアミノ酸の挿入、欠失

又は置換によってアミノ酸配列を変化させることによって得られ得る。当該タンパク質のアミノ酸配列は、天然のポリペプチドと比較した場合、実質的に同一の又は向上した質を有するポリペプチドを作製するために、例えば置換によって修飾される。当該置換は保存的置換であってもよい。「保存的置換」は、類似の側鎖を有する別のアミノ酸によるアミノ酸の置換である。保存的置換は、全体的なペプチドがその空間的な高次構造を維持するが、変化した生物学的活性を有する様に、アミノ酸の電荷又はアミノ酸の側鎖のサイズにおける（あるいは、側鎖内の化学基のサイズ、電荷又は種類における）最小の変化を可能にするアミノ酸による置換であるだろう。例えば、一般的な保存的な変化は、AspからGlu, Asn又はGln; HisからLys, Arg又はPhe; AsnからGln, Asp又はGlu、そしてSerからCys、Thr又はGlyであり得る。アラニンは他のアミノ酸を置換するために一般的に使用される。20の必須アミノ酸は以下の様にグループ化され得る：非極性の側鎖を有するアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニン；無電荷の極性側鎖を有するグリシン、セリン、スレオニン、シスチン、チロシン、アスパラギン及びグルタミン；酸性側鎖を有するアスパラギン酸及びグルタミン酸；並びに塩基性側鎖を有するリジン、アルギニン、及びヒスチジン。L. Stryer, *Biochemistry* (2d ed.) p. 14-15; Lehninger, *Biochemistry*, p. 73-75。

#### 【0035】

ポリペプチドの類似体が、生物学的活性、例えば抗原性又は免疫原性活性を修飾し、又は向上するために、ポリペプチド構造においてあるアミノ酸で他のアミノ酸を置換することに基づいて得られ得ることが知られている。例えば、別のアミノ酸の置換を介して、小さな高次構造の変化は、活性の増大をもたらすポリペプチドに対して付与され得る。あるいは、あるポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、十分なFPBの生物学的特性を保持するペプチド-分子複合体を提供するために、結果として他の分子と連結され得る残基を提供するために使用され得る。標識又は固相と連結しているが、抗FPB抗体と結合する能力を保持しているある類似体は、FPBのための競合的免疫アッセイにおける競合物として使用さ

れ得る。

【0036】

天然配列と変異体配列との間の相同性の程度（同一性のパーセンテージ）は、例えばこの目的のために一般に適用されるコンピュータプログラムを用いて2つの配列を比較することによって決定され得る。1つの適当なプログラムは、Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12 : 387, 1984) に記載のGAPコンピュータプログラムであり、これはウィスコンシン大学の遺伝学のコンピュータグループから入手可能である。

【0037】

F P Bの類似体のアミノ酸配列は、本質的に天然F P Bのアミノ酸配列に対応する。本明細書で使用する場合、「本質的に対応する」は、天然F P Bによって生じる応答と実質的に同一の生物学的応答を誘発するであろうポリペプチド配列を言及する。その様な応答は天然F P Bによって生じるレベルの少なくとも60%であってもよく、そして天然F P Bによって生じるレベルの少なくとも80%であってもよい。本発明の変異体は、対応する天然F P Bに存在していないアミノ酸残基又は対応する天然F P Bに関連している欠失を含み得る。

【0038】

アミノ酸は、それが別のアミノ酸配列との機能的な関係に置かれている場合に「作用可能に連結」している。一般的に、「作用可能に連結」は、連結しているアミノ酸配列が近接していることを意味する。

【0039】

本明細書に従う「抗体」は、エピトープと特異的に結合するタンパク質として広く定義される。モノクローナル抗体は、当業界で既知の方法によって製造され得る。これらの方法は、Kohler及びMilstein (1975) 並びにCampbell (1985) によって記述された免疫学的方法；並びにHuse等 (1989) によって記述された組換えDNA法を含む。

【0040】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」（又は「mAb」）は、単一のエピトープ又は抗原決定基と反応する、好ましくは特異的に反応する、

任意の同種の抗体又はその抗原結合領域を言及する。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用する場合、しかしながら天然、修飾型、又は合成であり、そしてハイブリッド又はキメラ抗体を含み得る同種の抗体を言及する。この用語は、その用語を一般に理解する場合、「ポリクローナル抗体」を含まない。「ポリクローナル抗体」は、全てが単一のエピトープ又は抗原決定基を認識する、異種の抗体群である。

【0041】

用語「抗原決定領域」は、エピトープと反応する本発明の抗体の、天然、修飾型、又は合成のフラグメントを言及する。その様な抗原結合領域は、限定しないが、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、及びFvフラグメントを含む。

【0042】

本発明の抗体の機能的等価物は、更に全抗体のものと、同一の結合特性を有するか、又はそれに相当する結合特性を有する抗体のフラグメントを含む。その様なフラグメントは、Fabフラグメント又はF(ab)<sub>2</sub>フラグメントのうちの1つ又はその両方を含み得る。好ましくは、当該抗体フラグメントは、合計6個の全抗体の補体決定領域(「CDR」)を含むが、その様な領域の合計よりも少ない、例えば3個、4個又は5個のCDRを含むフラグメントも機能的であり得る。フラグメントはLamoyi等(1983)及びParham(1983)によって記述された方法によって調製され得る。本発明の抗体の他の機能的な等価物は、FPBと特異的に結合する他の分子、例えばFPBと結合する受容体、及びFPBと結合する能力について選択されたペプチド又は核酸(例えばファージディスプレイ又はSELEX法による)を含む。

【0043】

本発明の抗体はエピトープFPBと特異的に反応することが明らかとなっており、これは完全なフィブリノーゲン及びそのフラグメントを含み、フィブリノペプチドB、脱アルギニンフィブリノペプチドB、臭化シアンによる開裂から生じるフィブリノーゲンのN-DSKフラグメント、並びに配列番号1及び2によって定義されるペプチドを含む、関連タンパク質部分の多くに見出される。用語「抗FPB」は、フィブリノーゲン、フィブリノペプチドB、脱アルギニンフィブ

リノペプチドB、N - D S K、及び関連ペプチドの特徴である、このエピトープと特異的に反応することのできる本発明の抗体の能力を言及する。

【0044】

従って、本発明の抗体は、配列番号1及び2のアミノ酸配列の特徴、並びに他の機能的に等しい配列、すなわち類似の結合能を示すそれらのアミノ酸配列によって定義されるエピトープと特異的に反応する。当該抗体は、限定するエピトープを欠く部分と有意に交差反応しない。

【0045】

本発明の抗体の他の特性の中でも、当該抗体が、天然F P BとそれらのN末端で異なる配列番号1及び2、並びに生理学的試料中に見出されるF P Bの天然型である、配列番号3～6によって定義されるペプチドと反応する。従って、本発明の抗体はアミノ酸配列CQGVNDNEEGFFSAR（配列番号1）及びCQGVNDNEEGFFSA（配列番号2）によって定義されるエピトープと特異的に反応すると理解される。それらの一次構造において、配列番号1又は配列番号2、あるいは類似配列、（例えば：QGVNDNEEGFFSAR（配列番号3）；QGVNDNEEGFFSA（配列番号4）；環化ピログルタミン酸 - GVNDNEEGFFSAR（配列番号5）；及び環化ピログルタミン酸 - GVNDNEEGFFSA（配列番号6））を含み、そして二次以上の次数の構造由来の有意な立体障害を欠くタンパク質は、それ故に本発明の1又は複数の検出抗体又はポリクローナル抗血清と結合するだろう。その様なタンパク質は天然のもの、例えばフィブリンI、又は合成のもの、例えば常用の合成又は組換え方法によって製造されるもの、例えば当業界で知られているものであってもよい。配列番号1及び2によって特徴づけられるアミノ酸配列のホモログ、並びにエピトープ限定配列を含むタンパク質も、本発明の1又は複数の検出抗体又はポリクローナル抗血清と反応することが予想される。しかしながら、当該抗体及び抗血清は、このエピトープを欠く部分と実質的な交差反応を示さない。このエピトープを含むペプチド又はタンパク質は本発明の免疫アッセイを用いて検出することができ、標準物質又はスタンダードとして使用することができ、あるいはF P Bのための免疫アッセイにおける競合物として標識され、又は固定化され、そして使用されることがある。

## 【0046】

用語「フィブリノーゲン」は、フィブリノーゲンの任意の型を含むことが意図される。従って、フィブリノーゲンは単量体フィブリノーゲン分子、及び単量体構造(A<sub>E</sub>B)を有する二量体フィブリノーゲン分子、並びに単量体構造(A<sub>E</sub>B)を有する分子、及び他のハイブリッド分子を言及し、これらは天然、修飾型、又は合成のいずれかである。用語「フィブリノーゲン」は通常ヒト由来のフィブリノーゲンを言及するが、任意の種、特に哺乳類の種のフィブリノーゲンを含み得る。更に、当該用語は特定の文脈において、特定の種に具体的に限定されることがあり、例えば「ヒトフィブリノーゲン」である。

## 【0047】

一般的に、免疫原として有用であるために、ペプチドフラグメントは、検出される分子のエピトープを定義するために十分なアミノ酸残基を含まなければならない。当該フラグメントが短かすぎて免疫原となり得ない場合、それは輸送分子と複合されることがある。いくつかの適当な輸送分子は、キーホールリンペットヘモシアニン及びウシ血清アルブミンを含む。複合は当業界で知られている方法によって行われ得る。1つのそのような方法は、当該フラグメントのシステイン残基と、輸送分子上のチオール反応部分、例えばシステイン残基又はマレイミド基とを結合させることである。本発明において、システイン残基は、必要なシステインを提供できる様に、分子のアミノ末端と特異的に共有結合された。更に、システインをアミノ末端に結合させることによって、当該輸送分子は優先的にこの特定の末端と結合し、抗原性のカルボキシ末端を暴露させるだろう。

## 【0048】

本発明は、フィブリノペプチドB及びフィブリノーゲンのエピトープ並びに当該エピトープを含むそのフラグメントと反応するポリクローナル抗体を産生する動物を提供する。本発明はまた、フィブリノペプチドB及びフィブリノーゲンのエピトープ並びに当該エピトープを含むそれらのフラグメントと反応するモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞系を提供する。これらの動物及びハイブリドーマによって産生する抗体も、本発明の重要な観点である。

## 【0049】

Kohler及びMilstein (1975) によって最初に説明されたハイブリドーマ技術は、分泌産物であるモノクローナル抗体が、フィブリノペプチドBのエピトープ又は抗原決定基と反応する、ハイブリドーマ細胞系を調製するために使用され得る。本発明のハイブリドーマ細胞系を調製するための一般的な方法は後述する。当業者は、本明細書に詳細に記載されているモノクローナル抗体及びハイブリドーマ細胞系を含む本発明が、ハイブリドーマ、及びその結果としての本発明の抗体を作製するための様々な方法を提供することを認識するだろう。本発明のハイブリドーマ細胞系は、免疫学的に関連する脾臓細胞の活性化のために、配列番号1によって定義されるフィブリノペプチドB又は配列番号2によって定義される脱アルギニンFPBペプチドを用いて調製され得る。一般的に、宿主哺乳類は上述の様なペプチド又はペプチドフラグメントを用いて接種され、そして次に追加免疫される。脾臓は、最後の追加免疫から数日後に、接種した哺乳類から回収される。抗体産生脾臓細胞は続いて収集され、そしてマウスのミエローマ細胞との融合によって不死化される。ハイブリドーマと称される、ハイブリッド細胞は、融合から生じる継続性の細胞系であり、続いて前記ペプチドとの反応性について選択され、そしてスクリーニングされる。当業者は、ハイブリドーマ技術に対する更なる詳細については、Kohler及びMilstein (1975) ; Kennett 等 (1980) ; 並びにGoding (1986) を参照する。Campbell (1985) も参照のこと。

#### 【0050】

本明細書に記載の特異的な抗FPB抗体は本発明の例示にすぎず、そして配列番号1によって定義されるフィブリノペプチドB又は配列番号2によって定義される脱アルギニンFPBペプチドと特異的に反応する全ての抗体は、起源となる種、又はIgG, IgA, IgM, IgE、及びIgDを含む、免疫グロブリンのクラス若しくはサブクラスに関係なく、本発明の範囲に含まれる。本発明はまた、抗FPB抗体の抗原結合フラグメントを提供する。非FPB含有物質と対抗する様な、フィブリノペプチドBと結合する能力は、本発明に従う特異的抗体の一般的な特徴である。

#### 【0051】

上文で論じた様に、本発明の抗体は、動物の免疫化、ハイブリドーマの調製、

並びに上述した抗F P B抗体のものと類似している、フィブリノペプチドB及びフィブリノーゲンとの反応性を有する抗体の同定によって構築され、そして単離され得る。しかしながら、本発明はまた、多くのB 関連フラグメントとの抗体の反応性の決定を必要としない、本発明の単一特異的な抗体を同定するための手段を提供する。本発明の抗体は、本明細書に記載の細胞系によって産生される抗体を用いての、免疫沈降及び競合的結合の研究によっても同定され得る。

#### 【0052】

抗F P B単一特異的抗体を用いる免疫沈降は、抗原性の同一性を決定するために使用され得る。同一性の確認は、過剰な量のある抗F P B抗体を用いて、試験可能な試料、例えば血漿試料由来の抗原を枯渇させ、そして処理した試料由来のB 鎖フラグメントを免疫沈降させることのできない別の抗体の能力を観察することによって得ることができる。また、前記抗体が同一のエピトープ又は極めて関連しているエピトープと結合する場合において、各抗体は、フィブリノペプチドBと結合することについて、他のものと競合するだろう。競合的な結合の研究は一般的に当業界で知られており、そしてある常用の型を下文の例において提示する。

#### 【0053】

タンパク質分解酵素、例えばパパイン及びペプシンによる抗体調製物の処理は、抗原結合活性を保持する、F a b及びF ( a b )<sub>2</sub>の種類を含む抗体フラグメントを生成する。本発明の抗体の、その様な酵素による処理は、その結果本発明のフィブリノペプチドB抗原結合フラグメントを生成するために使用され得る。本発明の抗体の抗原結合フラグメントの調製、並びにそれらの診断上及び治療上の有用性、並びに他の適用は、それら自身を当業者に提案する。抗F P B抗体の抗原結合フラグメントは、本発明の治療上の態様において特に有用である。

#### 【0054】

当業者は、本発明の抗体及び抗体フラグメントの抗原結合領域が、本発明の重要な特徴であることを認識するだろう。本発明の抗F P Bハイブリドーマ細胞は、本発明のその様な抗原結合領域をコードするDNAの好ましい供給源としての務めを果たす。このDNAは、組換えDNA技術を介して、ハイブリッド又はキ

メラタンパク質をコードする、新規な「ハイブリッド」又は「キメラ」DNA配列を生成するために、任意の所望なアミノ酸残基の配列をコードするDNAと結合され得る。その様な方法において、前記抗体のある部分が最終的にある種に由来し、そして前記抗体の別の部分が別の種に由来する、本発明のキメラ抗体を得ることができる。しかしながら、本発明はまた、FPB抗原結合領域を含む任意のキメラ分子を含んで成る。

#### 【0055】

本発明の抗体はまた、フィブリノーゲン、又はフィブリノペプチドB若しくはその一部を含む開裂産物の発現を同定するために、任意な検出可能な基、例えば蛍光標識、酵素標識、及び放射性核種との複合によって標識され得る。適当な検出可能な標識は、限定しないが、放射性核種、酵素、特異的に結合する対の成分、コロイド性色素物質、蛍光色素、還元物質、ラテックス、ジゴキシゲニン、金属、粒子、ダンシルリジン、抗体、プロテインA、プロテインG、電子密度材料、発色団、電気化学発光物質、化学発光物質、電気活性物質等を含む、当業界で知られているもののなかから選択され得る。直接的に又は間接的に検出可能な、任意な適当な標識が有効に利用され得る。当業者は、上文に記載したこれらの標識が、この発明において利用され得る異なる標識のうちの単なる例示であることをはっきりと認識するだろう。

#### 【0056】

抗体を標識するための方法は、例えばHunter等(1962)及びDavid等(1974)によって説明されてきた。抗体を標識するための追加の方法は、米国特許第3,940,475号及び第3,645,090号に記載されてきた。

#### 【0057】

当該標識は放射性であってもよく、すなわち放射性核種を含んでいてもよい。有用な放射性核種のいくつかの例は、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、及び $^3\text{H}$ を含む。放射性核種の使用は、英国特許書類第2,034,323号、米国特許第4,358,535号及び第4,302,204号に記載されてきた。

#### 【0058】

非放射性標識のいくつかの例は、酵素、発色団、電子顕微鏡によって検出可能

な原子及び分子、並びに自身の磁気的特性によって検出可能な金属イオンを含む。

#### 【0059】

いくつかの有用な酵素標識は、基質において検出可能な変化をもたらす酵素を含む。いくつかの有用な酵素及びそれらの基質は、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ピロガロール及びo-フェニレンジアミン）、-ガラクトシダーゼ（フルオレセイン-D-ガラクトピラノシド）、及びアルカリホスファターゼ（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム）を含む。酵素標識の使用は、U.K. 2,019,404、EP 63,879、及びRotman (1961) に記載されてきた。

#### 【0060】

有用な発色団は、例えば蛍光、化学発光、及び生物発光分子、並びに色素を含む。本発明において有用な、いくつかの特異的な発色団は、例えば、蛍光、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリン、ウンベリフェロン、ルミノール及びルテニウム又はオスミウム等の発光ビピリジル又はフェナントロリン含有錯体を含む。

#### 【0061】

当該標識は、当業界で公知の方法によって、抗体プローブと複合され得る。当該標識は前記プローブ上の官能基を介して直接結合され得る。当該プローブは、例えば官能基を含むか、又は含まされ得る。適当な官能基の例は、例えば、アミノ、カルボキシル、スルフヒドリル、マレイミド、イソシアネート、イソチオシアネートを含む。あるいは、標識、例えば酵素及び発色団分子は、カップリング剤、例えばジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド等によって抗体と複合され得る。

#### 【0062】

当該標識はまた、上述した方法によってプローブと結合したリガンドによって抗体プローブと、そして当該標識と結合したそのリガンドのための受容体と複合され得る。既知のリガンド-受容体の組み合わせのいずれかが適している。いくつかの適当なりガンド-受容体の対は、例えばビオチン-アビジン又は-ストレ

プトアビジン、及び抗体 - 抗原を含む。ビオチン - アビジンの組み合わせが好ましい。この様に、本発明の抗F P B抗体は、多くの免疫化学的及び免疫組織学的利用において、蛍光標識、酵素標識、放射性核種、電子密度標識、基質等との複合によって検出可能性を付与されたアビジンの一種の添加時に、ビオチンとの複合によって誘導体化され、そして使用され得る。

#### 【0063】

本発明の抗体はまた、当業者にとって既知の方法に従い、基質材料に付着され、又は結合され得る。その様な材料は、一般的に実質上固体であり、そして比較的不溶性であり、これは当該抗体の物理的かつ化学的な破壊に対する安定性を付与し、そして当該抗体を特異的な空間分布に配置させる。基質材料の中で、当業者の所望の目的に従う材料を選択することができ、これは限定しないが、ゲル、ヒドロゲル、樹脂、ビーズ、磁気粒子又はビーズ、ニトロセルロース、ナイロンフィルター、マイクロタイタープレート、培養フラスコ、ポリマー性材料等の様な材料を含み得る。

#### 【0064】

本発明の抗体は、標識されるか、又は標識されず、ヒト又は動物の対象由来の組織試料中のフィブリノーゲン又はF P B関連ペプチドの存在を決定するために、免疫学的なアッセイにおいて使用され得る。対象者の体液試料、例えば血漿又は尿、並びに血液バンク由来の試料は、本発明の抗F P B抗体を用いて、フィブリノーゲン及びF P Bの存在について評価され得る。更に、本発明に従う適当な医薬調製物は、*in vivo*での使用のために、例えば生きている対象者におけるフィブリノーゲン又はF P B含有物質及び構造の可視化のために利用され得る。

#### 【0065】

この様に、本発明は、フィブリノペプチドB、フィブリノーゲン又は配列番号1及び2によって定義されるアミノ酸配列を含んでなるそれらのフラグメントを、抗F P B単一特異的抗体によって結合させるための方法を提供する。従って、フィブリノーゲン及びフィブリノペプチドB、それらの天然、修飾型、及び合成変異体、並びにそれらのフラグメントは、本発明の抗体によって検出され、そし

て測定され得る。

【0066】

本発明のF P B結合方法において、当該方法は、F P Bの存在又は非存在が決定され得る、試験可能な系を、抗F P B抗体又はその抗原結合領域と接触させることを含む。当該方法は、続いて試験可能な系の分析物と抗体との間の特異的な会合又は結合の程度の測定に關与する。この方法において、当該系における抗体の特異的結合は、当該系における分析物、すなわちフィブリノーゲン又はそのF P B含有フラグメントの存在を示唆する。

【0067】

本発明は更に、試料中のフィブリノペプチドBの存在を検出するための方法を提供する。当該方法は、生物学的試料、例えば血液又は尿試料中のタンパク質/ペプチドの存否を認識する標識プローブの使用を含む。当該プローブは、試料中のF P B含有分析物の存在を認識する、本発明に従う抗体であってもよい。当業界で知られている他の試験方法は、本発明の抗体を使用するために適用され得る。

【0068】

典型的な方法は、分解産物の差次的な分離、例えば超遠心による当該産物の分離を含む。当該産物は、続いてフィブリノーゲンの1又は複数のドメインと特異的に反応し、又は特異的に会合する抗体と当該産物とを接触させることによって測定される。好ましくは、その様な抗体は単一の分解産物と特異的に反応し、それによって他の産物に対する当該産物の特徴づけを可能にする。

【0069】

1つの態様において、検出方法は、マーカー部分で検出可能に標識された抗F P B抗体を利用する。他の態様において、当該方法は、基質材料と結合した本発明の抗体を利用し得る。当該方法において、前記組成物はまた、他の試薬、例えば差次的に他のフィブリノーゲンサブユニット又はサブタイプを検出する他の抗体を含むことがある。この方法は更に、同一の試料中の遊離F P B又はF P B含有フラグメント及び他のフラグメントの差次的な解析又は特徴づけを可能にする、別のフラグメントについての特異性を有する少なくとも1つの他の抗体を用い

る使用に適応され得る。例えば、別の蛍光標識と複合する2又はそれ以上の抗体は、タンパク質の分離又は他の免疫測定技術におけるプローブとして利用され得る。

#### 【0070】

本発明のFPB結合方法は、抗体を特異的に標的物質と結合させる、当業界で知られている方法を含む。好ましい方法は、免疫化学的方法、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法、ウェスタンブロット、免疫化濁分析法、凝集法、沈澱法、免疫拡散法、免疫電気泳動法、免疫蛍光法、放射性免疫アッセイ法、表面プラズモン(plasmon)共鳴、及び化学発光、蛍光、リン光、電気化学発光、生物発光又は電気活性化化合物の検出に基づく免疫アッセイ方法を含む。

#### 【0071】

抗体を用いてタンパク質の存在を検出するためのアッセイは既に説明されており、そして既知の形式、例えば標準的なブロット及びELISAの形式に従う。これらの形式は、通常前記タンパク質を含むと疑われる試料と一緒に抗体をインキュベートし、そして抗体とタンパク質との複合体の存在を検出することに基づく。当該抗体は、インキュベーション段階の前、間、又は後のいずれかに標識される。タンパク質は、好ましくは検出前に固定化される。固定化は固体表面、例えばマイクロタイターウェル又はビーズにタンパク質を直接結合させることによって、又は固定化された抗体にタンパク質を結合させることによって達成され得る。

#### 【0072】

免疫アッセイを行う方法は公知である。使用され得る技術は、直接的な結合形式及び競合的な結合形式を含む。直接的な結合形式のある一般的な例は、サンドイッチ結合アッセイである。FPBのための競合的なアッセイの典型例において、試料中のFPBは、標識された抗FPB抗体との結合のために、標識されたFPB(又はその類似体)と競合する。いくつかの一般的な「固相」の結合アッセイの形式において、2つの標識された種のうちの1つの標識は、固相支持体又は試薬を固相支持体にもたらしするために使用される補獲部分にある。適当な免疫アッセイ技術の例は、引用によって本明細書に組み入れられる、Immunassay Handboo

k, Wild D., Editor, Stockton Press : New York, 1994 において明らかとなるだろう。

#### 【0073】

本発明は更に、対象者の血栓性又は血栓塞栓性疾患、例えば深部静脈血栓症又は肺塞栓症の存在を決定し又は診断するための方法を含む。この方法において、FPB又はそのフラグメントは、本発明の抗FPB抗体を含む組成物によって測定される。FPB分析物の測定量は、血栓性又は血栓塞栓性疾患と関連していることが認識され、又は知られているFPBの量と比較される。当該方法は、対象者において測定され、かつ標準のFPBの値からの、血栓性又は血栓塞栓性疾患の存在又は見込みの決定を含む。当該方法は、例えば体内でのフィブリノペプチドBの位置及び/又は分布の映像化又は可視化による、*in vivo*でのFPBペプチドの測定又は検出を含み得る。あるいは、当該方法は、対象者からの医学的試料の獲得及び*ex vivo*又は*in vivo*等でのFPBの測定を含む。

#### 【0074】

ポリクローナル抗血清：

ペプチド合成 - 前記ペプチドのアミノ末端にシステイン残基を含むヒトフィブリノペプチドB (FPB) の類似体は、Peninsula Laboratories (San Carlos, CA) によって調製された。当該ペプチドは、ウサギの免疫化のために、マレイミド活性化輸送タンパク質に対する方向性の結合を可能にするために設計された。ペプチドの純度は、質量分析及び2つの異なる溶媒系を用いるHPLCによって判断した場合に90%超であった。当該ペプチドのアミノ酸配列は次の様である；CQGVNDNEEGFFSAR (配列番号1)。脱アルギニンFPBの類似体 (アミノ酸配列：CQGVNDNEEGFFSA (配列番号2)) を同じ方法で調製した。

#### 【0075】

FPB抗血清の調製 - ヒトFPBの免疫複合体は、Pierceにより提供されたプロトコール (プロトコール#0135) に従い、10mgのマレイミド活性化キーホールリンペットヘモシアニン (Pierce Chemical, Rockford, IL) に対し

て5mgのN - システイニル - F P Bをカップリングさせることによって調製した。F P Bに対するポリクローナル抗血清はニュージーランドシロウサギにおいて産生された。3匹のウサギは、それぞれフロイント完全アジュバントにおける免疫複合体(1mg)の一次皮下注射を受け、続いて4週間の間隔でフロイント不完全アジュバント中での2回の皮下追加免疫注射(それぞれ1mg)が与えられた。ウサギは、一次注射から2週間後に開始して、2週間置きに出血させられた。血液を4℃で一晩凝固させた後、抗血清を遠心(2000×g、10分)によって回収し、そして解析するまで-20℃で保存した。各抗血清のF P B抗体の力価は、直接的な結合のE L I S Aにおいて決定された。要約すると、マイクロプレートのウェルは、合成ヒトF P B (Sigma Chemical, St. Louis, MO)でコーティングされ、そしてB S Aでブロッキングされた。ウェルは、続いて連続希釈したF P B抗血清、次にペルオキシダーゼ複合ヤギ抗ウサギI g G検出抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA)と一緒にインキュベートされた。ウェルはo - フェニレンジアミン (O P D) の基質溶液を用いて展開され、そして各ウェルの吸光度(490nm)をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で測定した。抗体の力価は、1.0超の吸光度を生じる最少の抗血清の希釈として任意に定義された。この過程は、脱アルギニンF P Bとキーホールリンペットヘモシアニンの免疫複合体を用いて、別のウサギで繰り返された。

#### 【0076】

抗血清の特異性 - 競合的E L I S Aは、F P B抗血清の特異性を評価するために展開された。特に断らない限り、全ての段階は室温で行われ、そしてマイクロプレートは、各段階の合間に、0.1% Tween - 20を含む0.02M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.15M  $\text{NaCl}$ 、1mM EDTA、pH7.4 (PNE)を用いて3回洗浄された。マイクロプレートのウェルは、最初に合成ヒトF P B (0.2M  $\text{NaHCO}_3$  中2mg/mL、100mL/ウェル)を用いて4℃で一晩コーティングされ、そして次にPNE中の1%のB S A (PNE A)を用いて1時間「ブロッキング」された。その間に、各競合物の連続希釈液を調製した。断わったものを除き、全てがヒト起源である、以下の競合物を試験した：天然F P B

(ヒト及びイヌ)、合成F P B、合成脱アルギニンF P B、合成フィブリノペプチドA、及び精製フィブリノーゲン。20mLの各競合物の希釈液は、ポリプロピレンマイクロチューブにおいて200mLのF P B抗血清(1:2500)を用いて、90分間別々にブレインキュベートされた。前記競合物及び抗血清の希釈液は、希釈緩衝液(0.1% Tween-20含有PNEA)中で調製された。ブレインキュベーション期間の終わりに、100mLの各混合物を2つ1組のF P Bでコーティングしたウェルに適用し、そして90分間インキュベートした。洗浄後、100mLのペルオキシダーゼ複合型ヤギ抗ウサギIgG検出抗体(希釈緩衝液中で1:5000)を各ウェルに加え、そして1時間インキュベートした。最後の洗浄後、各ウェルを、100mlのOPD基質溶液で正確に5分間展開した。反応は等量の3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加によって停止させ、そして各ウェルの吸光度(490nm)をマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 【0077】

高い力価が複数の抗血清について示され、そして本発明はこの方法で産生された抗血清のいずれかを含むが、今日までに本発明者によって得られた最良の反応性は、R4097、出血(bleed)I3の場合に明らかになった。この抗血清を用いる競合実験は、溶液中の天然ヒトF P Bが、表面に結合した合成ヒトF P Bに対する抗体結合の有効な競合阻害剤であることを示唆した。対照的に、溶液中の天然イヌF P Bは、表面に結合した合成ヒトF P Bに対する抗体結合について競合せず、これはイヌF P Bが前記抗血清と交差反応しないことを示唆している。F P BのIC<sub>50</sub>(6.7nM)を脱アルギニンF P BのIC<sub>50</sub>(8.9nM)で割り、100倍して定義される脱アルギニンF P Bの交差反応性は75%であった。この様に、当該F P BアッセイはF P B及びその一次代謝物である、脱アルギニンF P B、その両方に対して高感度である。F P Aは本質的に全く交差反応性を示さなかった(<0.1%)。

#### 【0078】

前記抗血清は、親の(ヒト)フィブリノーゲンに対して有意な交差反応性を示した。フィブリノーゲンのIC<sub>50</sub>(2.3nM)が予想通りF P BのIC<sub>50</sub>の約半分であったのは、各フィブリノーゲン分子が2つの潜在的に交差反応性のF

P B配列を有しているためである。それ故に、遠心による限外濾過によって、血漿及び尿から、交差反応性のフィブリノーゲン分子(340,000kD)を除去することが好ましい。フィブリノーゲンは、50,000~100,000kDの範囲の分子量のカットオフ値を有する様々な濾過膜を用いて、溶液中のフィブリノペプチドから分離され得る。しかしながら、最良の結果はBiomax-100膜(100,000kDのカットオフ値)を用いる遠心による限外濾過を用いて得られた。追加の動物において、この方法を用いて産生した他のポリクローナル抗血清が、フィブリノーゲンと交差反応しなかったことに注目することは重要である。本発明はまた、免疫アッセイにおけるこの抗血清の使用を含み、この場合、フィブリノーゲンは患者の試料から除かれる必要はないだろう。

#### 【0079】

モノクローナル抗体：

ペプチドの複合：N-システニルFPB(又は脱アルギニンFPB)は、上述の様にマレイミド活性化キーホールリンペットヘモシアニンと複合される。5匹のBalb/cマウスは、50 $\mu$ gの初回刺激量で、次にそれぞれ50 $\mu$ gの複数回の追加免疫量で免疫化された。試験出血は、前述した直接結合ELISAを用いて、抗体の産生及び力価についてスクリーニングされる。

#### 【0080】

脾細胞の融合は、直接結合及び競合ELISAによって決定される場合の最良の応答者で行われる。脾細胞は、最適化されたポリエチレングリコールを介する融合プロトコルを用いて、Sp2/O-Ag14ハイブリドーマ細胞系と融合される。増殖及びスクリーニング：融合細胞は96穴プレートに蒔かれ、そして毎週細胞の増殖について監視された。細胞の増殖を示す穴は、4週目に、そして更に再び6週目にELISAによってスクリーニングされる。

#### 【0081】

ポジティブな穴に由来する細胞は、限界希釈によって回収され、そしてサブクローニングされる。サブクローンはELISAによってスクリーニングされる。ポジティブなクローンは増殖され、そして再びスクリーニングされる。直接結合及び競合ELISAによって決定される場合の、最も有望なクローンは冷凍保存

され、そして腹水の産生に使用される。

【0082】

腹水液は、Balb/cマウスにおいて、サブクローニングに由来する選択されたハイブリドーマ細胞系の腹膜内注射の後に産生する。当該液体は(ELISAによって)スクリーニングされ、そして抗体のアイソタイピングにかけられる。

【0083】

F P B / 脱アルギニン F P B アッセイ :

以下の方法は、限外濾過した血漿及び尿試料中のフィブリノペプチドB ( F P B ) 濃度の決定のために、最も適したものであることが明らかとなった。通常、尿中で F P B が高レベルなので、尿の限外濾過液を「標準アッセイ」(下文を参照のこと)に、そして血漿の限外濾過液を「高感度アッセイ」にかけするのが慣例である。血漿の限外濾過液を 1 : 2 希釈で開始することに注意すること。

【0084】

使用した材料 : 抗 F P B 抗血清 (ウサギ 4097、出血 I 3) ; 合成 F P B コントロール溶液 ; F P B 保存溶液 ; I g G - H R P 保存溶液 ; コーティング緩衝液 ( 0 . 2 M 炭酸水素ナトリウム ) ; 洗浄緩衝液 ( 0 . 1 % Tween - 20 を含む 0 . 0 2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0 . 1 5 M  $\text{NaCl}$ 、1mM EDTA、pH 7 . 4 ) ; 希釈緩衝液 ( 1 % BSA 及び 0 . 1 % Tween - 20 を含む、0 . 0 2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0 . 1 5 M  $\text{NaCl}$ 、1mM EDTA、pH 7 . 4 ) ; 30%過酸化水素 (  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、Sigma # 1009 ) ; 10mgの o - フェニレンジアミン錠 ( OPD、Sigma # P 8 2 8 7 ) ; OPD 溶液 A ( 0 . 5 M クエン酸 ) ; OPD 溶液 B ( 0 . 1 1 M リン酸ナトリウム ( 二塩基性 ) ) ; OPD 停止溶液 ( 3 N 硫酸 ) ; PNE 10 倍保存溶液 ( 0 . 2 M リン酸ナトリウム ( 一塩基性 )、1 . 5 M 塩化ナトリウム、10mM EDTA ( 二ナトリウム塩 )、pH 7 . 4 ) ; PNE A ( 1 % ( w / v ) ウシ血清アルブミン含有 PNE ( 1 倍 ) ) ; Tween - 20 ( Sigma # P 6 5 8 5 ) ; 10% Tween - 20 ( Sigma # P 8 9 4 2 ) 。

【0085】

方法：マイクロウェルプレートは以下の様に調製する：F P B 保存溶液をコーティング緩衝液で2 mg/mLに希釈する。100  $\mu$  l のF P B 溶液(2 mg/mL)を各マイクロプレートのウェルに加える。プレートシーラーでウェルに封をし、そして冷蔵庫に一晩据える。

#### 【0086】

「標準アッセイ」は、1.56 ~ 100 ng/mLのF P B / 脱アルギニンF P B 濃度を検出するために使用される。当該試料は以下の様に調製する：F P B 保存溶液をC Bで2 mg/mLに希釈する。100  $\mu$  l のF P B 溶液(2 mg/mL)を各マイクロプレートのウェルに加える。プレートシーラーでウェルに封をし、そして冷蔵庫に一晩据える。室温の湯浴で限外濾過した試料を融解する。抗F P B 抗血清をD Bで1 : 2500に希釈する。F P B 保存溶液をD Bで100 ng/mLに希釈し、そして次にP 200を用いて2倍の連続希釈溶液を作製する(50 l + 50 l D B)。標準曲線に以下のF P B 濃度：100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56、及び0 ng/mLを使用する。希釈緩衝液でF P B コントロールを1 : 2000に希釈する。別々の1.7 mLのマイクロチューブ中で、20  $\mu$  l のスタンダード/コントロール/試料を200  $\mu$  l の抗F P B (1 : 2500)と合わせ、混合するためにボルテックスする(これらはブレインキュベーション混合物と称される)。1時間45分インキュベートする。

#### 【0087】

「高感度アッセイ」は、0.313 ~ 20 ng/mLのF P B / 脱アルギニンF P B 濃度を検出するために使用される。当該試料は以下の様に調製される：F P B 保存溶液をC Bで2 mg/mLに希釈する。100  $\mu$  l のF P B 溶液(2 mg/mL)を各マイクロプレートのウェルに加える。プレートシーラーでウェルに封をし、そして冷蔵庫に一晩据える。室温の湯浴で限外濾過した試料を融解する。抗F P B 抗血清をD Bで1 : 250に希釈する。F P B 保存溶液を希釈緩衝液で20 ng/mLに希釈し、そして次に2倍の連続希釈溶液を作製する(250  $\mu$  l + 250  $\mu$  l の希釈緩衝液)。標準曲線に以下のF P B 濃度：20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313、及び0 ng/mLを使用する。希釈緩衝液でF P B コントロールを1 : 10,000に希釈する。別々の1.7 mLのマイクロチュ

ープ中で、 $20\mu\text{l}$ の抗FPB(1:250)を $200\mu\text{l}$ のスタンダード/コントロール/試料と合わせ、混合するためにボルテックスする(これらはプレインキュベーション混合物と称される)。1時間45分インキュベートする。

#### 【0088】

前記抗体のプレインキュベーション時間の中に、冷蔵庫からFPBでコーティングしたプレートを出し、そして各ウェルを $250\mu\text{l}$ の洗浄緩衝液で2回すすぐ。ウェル上の残りのタンパク質結合部位を「ブロッキング」するために、 $100\mu\text{l}$ のPNEAを各ウェルに加える。プレートを覆い、そして1時間「ブロッキング」させておく。抗体のプレインキュベーション時間の終わりに、各ウェルを2回、 $250\mu\text{l}$ の洗浄緩衝液ですすぐ。

#### 【0089】

前記アッセイは以下の様に行う： $100\mu\text{l}$ の各プレインキュベーション混合物を2つ1組のウェルに加える。前記プレートを覆い、そして1時間15分インキュベートし、そして次に各ウェルを3回、 $250\mu\text{l}$ の洗浄緩衝液ですすぐ。 $100\mu\text{l}$ のIgG-HRP(希釈緩衝液中で1:4000)を各ウェルに加える。プレートを覆い、そして1時間15分インキュベートする。IgG-HRPのインキュベーションの終わりに、各ウェルを3回、 $250\mu\text{l}$ の洗浄緩衝液ですすぐ。

#### 【0090】

最初に $10\text{mg}$ のOPD錠をOPD A/OPD B混合液中に溶解し、そして次に $10\mu\text{l}$ の $\text{H}_2\text{O}_2$ を加えることによって基質溶液を完成させる。混合するために複数回反転させる。 $100\mu\text{l}$ の基質溶液を各ウェルに加える。正確に5分間インキュベートし、そして次に $100\mu\text{l}$ のOPD停止溶液を各ウェルに加える。

#### 【0091】

以下の装置の設定：二重波長終点モード(L1 =  $490\text{nm}$ 、L2 =  $650\text{nm}$ )、オートミックスオンを用いて、Vmaxのマイクロプレートリーダーにおいて各ウェルの吸光度を読み込む。OPDの基質反応を開始してから14分後にプレートを読み込む。FPBスタンダードの4つのパラメーターの合致から標準曲線を

作製する。試料のF P B濃度及び標準曲線由来のF P Bコントロールを挿入するためにS o f t m a xを使用する。

【0092】

本発明は更に、以下の詳細な例を参照することによって説明されるだろう。

【0093】

例1：血漿試料中のF P B及び脱アルギニンF P Bの測定

本実験の目的は、前記免疫アッセイが正常なヒト血漿の存在下で合成F P B及び合成脱アルギニンF P Bを検出し得るか否かを決定することにあつた。前記アッセイはまた、小さな血栓が循環している血液量にF P Bを放出する場合に予想される濃度をシミュレートするために、抗凝固された血漿中で連続希釈された、血清（凝固した血漿）中のF P Bレベルを測定するために使用された。

【0094】

方法：緩衝液若しくは抗凝固し、限外濾過した血漿中で希釈した既知の濃度の合成F P B又は脱アルギニンF P B（0～100ng/ml）は、高力価の抗F P B抗血清の固定化希釈液を用いて、ポリプロピレンチューブ中で、室温で90分間プレインキュベートされた。これらのプレインキュベーション混合物は、続いてF P Bでコーティングしたマイクロプレートのウェルに加えられ、そして室温で追加時間インキュベートされた。当該プレートは、引き続いて上述の様に抗ウサギIgG-HRP及びOPDを用いて展開された。490nmでの吸光度を測定した後、標準曲線を作製する。類似性は、緩衝液中で希釈したスタンダードを、血漿中で希釈したスタンダードと対比させることによって評価した。

【0095】

結果：前記アッセイは、正常なヒトの抗凝固した血漿中のF P Bを検出しなかった。血漿を精製F P B（最終濃度10ng/ml）と混合（S p i k e）した場合、前記アッセイは $7.72 \pm 0.89$  ng/mlを計測した。類似の結果は、精製脱アルギニンF P Bを用いて得られた（結果は示さない）。更に、血清（血漿をトロンビンで凝固させることによって得られる）は、過剰のヘパリンで前処理した血漿を用いて希釈された（1：800）。F P B濃度は $8.03 \pm 0.51$  ng/mlであり、これは1%の血漿フィブリノーゲンがフィブリンに変換された場合に

予想され得る範囲内である。抗F P Bはイヌフィブリノペプチド、又は完全なイヌフィブリノーゲンと交差反応しなかった（結果は示さない）。

【0096】

考察：これらの実験は、F P B及び脱アルギニンF P Bを測定するための免疫アッセイの正確性を証明する。更に、測定されたF P Bレベルは、70 kgのヒトにおいて、4 mlの血栓を構成すると思われる、*in vivo*の全血液量のうちの0.1%の血栓症を検出することができるだろう。

【0097】

結論：血漿F P B免疫アッセイは*in vivo*で活動的な血栓症を検出することができる。当該アッセイは、DVT及びPEの診断、並びに*in vivo*での凝固の増大を抑制する抗凝固剤の能力の比較に有用である。

【0098】

例2：血栓症の動物モデルにおけるF P Bレベル

対象：これまでの実験において使用されている、非常に確立されたモデルにおいて、実験的な血栓症のイヌに由来する血漿及び尿試料を解析し、F P Bレベルを測定した。血栓症の誘導の前に、当該動物はイヌフィブリノーゲンを枯渇させられ、そして精製ヒトフィブリノーゲンを注入された。血漿及び尿中のヒトF P Bレベルの上昇は、血栓性活性を反映している。

【0099】

方法：成体の雑種のイヌを麻酔し、そしてそれらのフィブリノーゲンを枯渇させた。アンクロドが循環から排出された後、天然フィブリノーゲン活性が最小である間、実験的な血栓は概説の様に誘導される（Morris et al. 1997b）。イヌをハロタンで麻酔し、挿管し、そして動脈の血液ガスを正常な上限で維持するために機械的に通気する。当該動物は、完全にフィブリン溶解を阻害するためにその時点で、そしてそれから6時間毎にボラスのトラネキサム酸を与えられた（Marsh et al. 1994）。この後、それらは少なくとも300 mg/dl（3 mg/ml）のフィブリノーゲンレベルを達成するために、標準的な生理食塩水中で6 gの精製ヒトフィブリノーゲンを注入された。これらの条件下、フィブリノーゲンレベルは、この研究の期間を通じて200 mg/dl（2 mg/ml）超に維持された。

## 【0100】

二重のバルーンカテーテルは、両方の後肢の伏在静脈から大腿静脈まで進められた。続いてバルーンを膨張させ、静脈内に5mlの封がされた区画を作製した。二重のバルーンの間を介して、200ユニットのトロンビンが、血栓症を誘導するために各静脈内腔に注入された。1時間後、全てのバルーンをしぼませ、そして誘導された血栓症は更に3時間、*in situ*で熟成される。

## 【0101】

各動物につき1つのバルーンカテーテルが、血栓の塞栓形成を防ぐために大腿静脈に放置された。反対側の大腿静脈中のバルーンカテーテルを除去し、そして血栓は受動的な脚の動きによって塞栓形成された。

## 【0102】

塞栓形成の後、抗凝固は、血漿ヘパリンレベルを1.0ユニット/mlに維持するように調節された、ヘパリンボラス(300ユニット/kg)、続く連続注入(90ユニット/kg/時間)によって達成された。この投与量の抗凝固は、血栓の増大の完全な抑制を伴った(Morris et al. 1997b)。別の実験において、より少量のヘパリンが使用され(80ユニット/kgの初回量及び18ユニット/kg/時間の注入の割合)、そして投与量は「治療的なヘパリンレベル」(0.2~0.4ユニット/ml)を維持するために調節された。

## 【0103】

血液及び尿試料は、脱フィブリノーゲン化(*defibrinogenation*)の後に、血栓の誘導後一定間隔で、そして抗凝固の後に、基準線で滴定されたチューブ(プロテアーゼ阻害剤を含む)に回収された。血漿が遠心(2500×g、10分間)によって得られ、そしてフィブリノーゲン及び他の血漿タンパク質を除去するために限外濾過(*Millipore*)にかけられた。全ての試料は、解析するまで70℃で保存された。尿及び限外濾過した血漿中のFPB<sub>合計</sub>レベルは、上述の様に免疫アッセイによって決定される。

## 【0104】

免疫アッセイによって決定し、各時点のものを結び付けて、血漿FPB<sub>合計</sub>レベルの平均値及び標準偏差を計算した。基準線の値は、血栓の誘導、増大及び抗

凝固の間の値と比較される。少なくとも2つの標準偏差の平均値間の差異は、統計学的に有意であるとみなされる。

#### 【0105】

結果：予備実験が3匹のイヌで行われ、これらの全てが、実験的に誘導された血栓の塞栓形成後に、過剰量のヘパリンによる抗凝固を受けた（以下の図を参照のこと）。当該実験の最初の数時間の測定は、大量のヒトフィブリノーゲンの注入が、血栓の誘導前に血漿又は尿のF P B<sub>合計</sub>レベルを有意に増大させないことを示している。

#### 【0106】

しかしながら、血栓が深静脈で形成した後、血漿F P B<sub>合計</sub>レベルは直ちに上昇する。血漿F P B<sub>合計</sub>は、凝固の増大の間、基準線よりも上昇したままであった。血漿F P B<sub>合計</sub>レベルの別のピークは、塞栓形成の直後に起こる。一度過剰なヘパリンが始められると、血栓症は中断する。F P Bはもはや産生されず、そして血漿中に残るF P B<sub>合計</sub>は素速く除かれる（約45分の $t_{1/2}$ ）。

#### 【0107】

尿中のF P B<sub>合計</sub>の合計量（30分間隔で測定したもの）もまた、ヒトフィブリノーゲンの注入後に低いが、血栓が形成された後に安定して上昇した。予想通り、尿中で回収されたF P B<sub>合計</sub>の量は、たとえ数時間後でも、血漿レベルの上昇と平行した。尿中の事実上のF P B<sub>合計</sub>濃度は、通常、血漿中で測定されたレベルの2倍以上であり、これは恐らく腎臓による当該ペプチドの優先的な除去を反映している。

#### 【0108】

興味深いことに、血漿及び尿中のF P Bレベルは共に、更にトロンビンが注入されていないという事実にもかかわらず、血栓が塞栓形成された後に増大した。既に述べた様に、血漿レベルはすぐに上昇し、一方、尿中で除去された量は、当該事象から数時間後に上昇した。

#### 【0109】

考察：これらの実験は、F P Bの血漿及び尿レベルがVTEにおいて進行中の血栓症の潜在的なマーカーであることを示唆している。予備的なデータは、これ

らのレベルの一方又は両方が、活動的な血栓症の間に有意に増大するが、徐々に強くなる抗凝固療法の間には正常に向かって回復することを示唆している。これらの発見は、FPBの、血栓症のマーカーとしての有効性を示している。

#### 【0110】

#### 例3：急性肺塞栓症のモデルにおけるフィブリノペプチドB

本実験の目的は、肺塞栓症の血栓性活性がフィブリノペプチドBの血漿レベルのための新規アッセイを用いて測定され得るか否かを決定すること、並びに塞栓形成自体が先在している血栓を更に血栓性にし、恐らく凝固の増大及び下流の微細な塞栓形成をもたらすという仮説を試験することであった。

#### 【0111】

主な肺塞栓症の心肺作用は、完全には理解されていない。特に、肺循環に対する有害作用における、活動的な血栓症の役割は知られていない。事実、肺動脈の高流量の循環における塞栓が、塞栓形成の前に起こる活性と比較して、それらの血栓性活性を増大するか否かは未だに決定されていない。活動的な血栓症のために近年開発された血漿マーカー、フィブリノペプチドB (FPB) を用いて、静脈血栓の血栓活性が塞栓形成後に増大するか否かを決定するために、以下の実験が行われた。

#### 【0112】

肺塞栓を有する多くの患者は、「標準的な投与量」の抗凝固剤で処置される場合に、自身の病気を切り抜けて生きる。しかしながら、広範囲のPEを有する患者の亜集団は、標準的な抗凝固剤及び血栓溶解剤で処置した場合でさえ、高い死亡率を有する。彼等の死の病態生理学が明らかでないのは、大部分の患者が開始の事象から数日後に死亡し、そして塞栓形成のサイズが直接死亡率を予測しないためである。塞栓形成自体が、更に血栓性活性を促進し、これが既存の凝固を増大させ、又は小さな肺動脈に微細な塞栓形成をもたらし、直ちに心不全を悪化させ得ることが仮定される。

#### 【0113】

PEを有する患者を処置する臨床医は、抗凝固が凝固過程を拘束する程度を決定するための実践方法を現在持っていない。PEを処置するために必要な抗凝固

剤の投与量は、大部分、臨床的に安定な患者における測定の結果によって決定される。活動的な血栓症の間にのみ循環に放出されるフィブリノペプチドB (FPB) 及びその代謝物についてのアッセイは後述する。このアッセイは、肺塞栓形成自体が先在している深部静脈血栓の血栓性活性を加速するか否かを決定するための動物モデルにおいて使用された。

#### 【0114】

ヒトFPBのための免疫アッセイがイヌFPBを認識しないので、イヌの血栓症モデルは、先在している血栓及び循環しているフィブリノーゲンが主にヒト起源のものとなる様に修飾される。従って、イヌは相当な程度まで不活性化された、自身の天然フィブリノーゲンを有する。

#### 【0115】

材料：Maxisorp ELISAプレートはNunc (Naperville, IL) から購入した。合成ヒトフィブリノペプチドB及びフィブリノペプチドA (共に99%純粋)、イヌフィブリノーゲン (>60%凝固可能)、ウシ血清アルブミン (>98%純粋)、アネクロド、並びにトラネキサム酸はSigma (St. Louis, MO) から購入した。N-システイニルフィブリノペプチドB (>90%純粋) 及び脱アルギニンフィブリノペプチドB (>98%純粋) は、Peninsula Laboratories (San Carlos, CA) 及びImmuno-Dynamics (La Jolla, CA) によってそれぞれ特注合成された。ヒトフィブリノーゲン (>95%凝固可能) 及びアプロチニンは、Calbiochem (La Jolla, CA) から購入した。親和性精製したヤギ抗ウサギIgG (Fcフラグメント特定のであり、ペルオキシダーゼと複合したものは、Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA) から購入した。マレイミド活性化キーホールリンペットヘモシアニン及びフロイントアジュバント (完全及び不完全) はPierce (Rockford, IL) から購入した。局所のトロンビン (ウシ) 及び非分画性ヘパリン (ブタ) は、それぞれJones Pharma (St. Louis, MO) 及びElkins-Sinn (Cherry Hill, NJ) から購入した。プロポフォル及びハロタンは、それぞれZeneca Pharmaceuticals (Wilmington, DE) 及びHalocar

bon Laboratories (River Edge, NJ) から入手した。他の全ての化学物質は試薬用又はそれ以上のものであった。

#### 【0116】

方法：FPB抗血清：ヒトFPBの免疫複合体は、Pierce Chemical Companyによって提供されたプロトコールに従い、5mgのN-システニル-FPBを10mgのマレイミド活性化キーホールリンペットヘモシアニンとカップリングさせることによって調製した。FPBに対するポリクローナル抗血清は、ニュージーランドシロウサギにおいて産生された。3匹のウサギは、フロイント完全アジュバント中の免疫複合体(1mg)の一次皮下注射を受け、続けて4週間の間隔でフロイント不完全アジュバント中の二次皮下追加注射(各1mg)が与えられた。ウサギは、一次注射から2週間後に開始して、2週間隔で出血させられた。血液を4℃で一晩放置して凝固させた後、抗血清が遠心(2000×g、10分)によって回収され、そして解析するまで-20℃で保存させた。各抗血清のFPB抗体力価は、直接結合の、ELISAで決定された。要約すると、マイクロプレートのウェルは合成FPBでコーティングされ、そしてBSAでブロッキングされた。続いて、ウェルは連続希釈したFPB抗血清で、次にペルオキシダーゼ複合ヤギ抗ウサギIgG検出抗体でインキュベートされた。ウェルをo-フェニレンジアミン(OPD)基質溶液で展開し、そして各ウェルの吸光度(490nm)をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で測定した。抗体の力価は、1.0の吸光度を生じる抗血清の希釈として、任意に定義された。最大の力価を生じる抗血清(1:2500)は、後述するFPBアッセイにおいて使用した。

#### 【0117】

FPBアッセイ：競合ELISAは、血漿及び尿の限外濾過液におけるFPB濃度の決定のために展開された。特に断らない限り、全ての段階が室温で行われ、そしてマイクロプレートを各段階で3回、0.1% Tween-20を含む0.02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.15M NaCl、1mM EDTA、pH7.4(PNE)で洗浄した。マイクロプレートのウェルは、最初に合成FPB(0.2M NaHCO<sub>3</sub> 中で2µg/ml、100µl/ウェル)を用いて4℃で一晩

コーティングされ、そして次に1% BSA/PNE (PNEA)を用いて1時間「ブロッキング」された。一方、20  $\mu$ lの限外濾過した試料及び合成FPBのスタンダード(1.56 ~ 100 ng/ml)を、ポリプロピレンのマイクロチューブにおいて、200  $\mu$ lのFPB抗血清(1:2500)と一緒に1時間プレインキュベートした。FPBスタンダード及び抗血清の希釈液は、希釈緩衝液(0.1% Tween-20含有PNEA)中で調製した。プレインキュベーション時間の終わりに、100  $\mu$ lの各混合物を2つ1組のFPBでコーティングしたウェルに適用し、そして1時間インキュベートした。洗浄後、100  $\mu$ lのペルオキシダーゼ複合ヤギ抗ウサギIgG検出抗体(希釈緩衝液中で1:5000)を各ウェルに加え、そして1時間インキュベートした。最後の洗浄後、各ウェルを100  $\mu$ lのOPD基質溶液で正確に5分間展開した。反応を等量の3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加によって停止させ、各ウェルの吸光度(490nm)をマイクロプレートリーダーにおいて測定した。試料中のFPB濃度は、各スタンダードのFPB濃度と、対応する吸光度を対比させてプロットすることによって得られた標準曲線から補間された。試料の値が標準曲線の上限を超える場合、それらの試料は、希釈緩衝液で適当に希釈した後に再試験された。FPBアッセイのためのアッセイ内及びアッセイ間変異係数は、それぞれ14.1%及び5.0%であった。競合ELISAも、FPB抗血清と、ヒトフィブリノーゲン、フィブリノペプチドA(FPA)、脱アルギニンFPB、及びイヌFPBとの交差反応性を評価するために使用された。

#### 【0118】

フィブリノーゲンアッセイ：血漿中のフィブリノーゲンレベルは、市販のキット(Sigma, St. Louis, MO)を用いて決定された。要約すると、緩衝液中で希釈された25  $\mu$ lの試料(又はスタンダード)を、キットと一緒に提供された50  $\mu$ lのトロンビン溶液と混合し、そして凝固時間が記録された。凝固時間は、試料(又はスタンダード)及びトロンビン混合物中に、木製の塗布棒を繰り返して浸漬することによる、フィブリンの「弦(string)」の最初の出現として考えた。全てのアッセイを3回1組で行った。各試料のフィブリノーゲン濃度は、対数(フィブリノーゲン濃度)と対数(凝固時間)を対比させてプロットする

ことによって得た標準曲線からの補間によって決定した。ヘパリンを含む試料、又は少ないフィブリノーゲンを有する試料(20 mg/dl (0.2 mg/ml)未満)のフィブリノーゲン濃度は、当該アッセイにおいてフィブリン血餅を形成することができない能力によって決定され得る。

#### 【0119】

フィブリノーゲン置換及び血栓症モデル：8匹の健康な雄の雑種のイヌ(20~24 kg)を当該研究に使用した。各動物を静脈内プロポフォル(6~10 mg/kg)で麻酔し、挿管し、そして機械的に通気した。麻酔は、引き続きハロタン(大気中1~2%)を用いて研究期間中維持された。天然のイヌフィブリノーゲンは、4時間に及ぶアंकロド(2~3 µ/kg)の静脈内注入によって枯渇した。各動物を放置して麻酔から回復させ、そして住居に戻した。2日後、各動物を前述の様に麻酔し、挿管し、そして通気させ、そしてフォーリーカテーテルが尿の回収のために据えられた。カテーテルを、連続的な血圧の監視のために足背動脈に据えた。標準的な生理食塩水(0.9% NaCl)が、約50 mL/時間の尿の排出を維持するために静脈内から投与される。各動物は、続いて6 gの精製ヒトフィブリノーゲン(250 mLの標準的な生理食塩水中で溶解したもの)を90分に及んで注入された。フィブリノーゲンの置換の後、トラネキサム酸がフィブリン分解を阻害するために静脈内から投与された(6時間毎に110 mg/kg)。蛍光透視のもとで、右及び左の大腿静脈に引き続いて進行する、特別な二重バルーンカテーテルの置換のために、伏左静脈上で相互に縮小(Cut-down)が行われた。封がされた血管内の空間を作製したバルーンの膨張の後、膨張したバルーン間のカテーテルの小さな穴を介してウシトロンビン(200ユニット)を注射することによって、血栓症が誘導された。4時間の凝固の熟成期間に、バルーンは、血流の回復及び凝固の増大をさせるために、部分的にしぼめられた。凝固の熟成期間の後、肺塞栓が大腿の血栓を含む脚の一方の受動的な動きによって作製された(下文を参照のこと)。

#### 【0120】

対象の配置：8匹の動物のうち3匹を任意に選択して、大腿の血栓の塞栓形成の1時間前に静脈内からのヘパリン(300ユニット/kgボラス、続く90ユ

ニット/kg/時間の注入)を受けさせた。当該研究の終わりに(塞栓形成から5時間後)、各動物は、死後の血液凝固を防ぐための、ヘパリン(3000ユニット)のポラス静脈内注入、続いて心停止を誘導するための静脈からのネンプタール(120mg/kg)注入を受けた。部検は、全ての凝固の正確な位置を決定するために慎重に行われた。最終的に、全ての大腿静脈血栓及び肺塞栓が別々に回収され、そして計量された。当該プロトコールは、カリフォルニア大学のSan Diego Animal Subjects Committeeによって承認された。スタンダードに対して適合された実験動物の看護及び取扱いは、政府の推奨に従い、カリフォルニア大学のSan Diego Department of Veterinary Servicesによって確立された。

#### 【0121】

試料の回収及び処理：血液試料(4.5mL)は、研究の間の様々な時間に抜き出され、そしてプロテアーゼ阻害剤(アプロチニン及びヘパリン、各500ユニット)を有する0.5mlの0.129M緩衝化クエン酸ナトリウムを含むバキュティナーチューブに加えられた。プロテアーゼ阻害剤は、フィブリノーゲンアッセイに使用した血液試料から除かれた。血漿は2500×gでの10分間の遠心(4)によって得られた。フィブリノペプチドB(FPB)アッセイのための血漿は、等量の0.9%(w/v)NaClで希釈し、Ultrafree(Biomax-100)の遠心濾過装置(Millipore, Bedford, MA)を用いて、取扱い説明書に従い限外濾過にかけられ、そして限外濾液を解析のために保存した。ヒトフィブリノーゲンの注入から開始して、研究の間、60分間隔で尿を回収した。60分間隔毎に回収した尿の量を記録し、そしてFPBアッセイのための試料(4.5mL)を、上述の様に遠心(2500×g、10分間、4)によって清澄にし、そして次に限外濾過にかけた。プロテアーゼ阻害剤を有する、クエン酸ナトリウムを含むバキュティナーチューブに加えた。全ての試料が、解析するまで-70で保存された。

#### 【0122】

統計：データは、特に断らない限り平均値±標準誤差として表す。群の比較は、独立t試験(両側)を用いて、生データの対数変換に対して行われた。平均値

間の差異は、 $p < 0.05$ が有意であるとみなした。

### 【0123】

#### 結果

F P B 抗血清の特異性：F P B 抗血清の特異性は、上述の競合 E L I S A において評価された。図 1 A に示す様に、溶液中の天然ヒト F P B は、表面に結合した合成ヒト F P B に対して結合する抗体の有効な競合阻害剤であった。対照的に、溶液中の天然イヌ F P B は、表面に結合した合成ヒト F P B に対して結合する抗体では競合しなかった。競合 E L I S A はまた、F P B 抗血清と、ヒトフィブリノーゲン及び複数の合成ヒトフィブリノペプチドとの交差反応性を評価するために使用された。図 1 B に示す様に、F P B 及び脱アルギニン F P B についての競合曲線はほぼ同一であった。脱アルギニン F P B の交差反応性は、F P B の  $I C_{50}$  (6.7 nM) を脱アルギニン F P B の  $I C_{50}$  (8.9 nM) で割り、100 を掛けたものとして定義され、そして 75 % であった。この様に、F P B アッセイは F P B 及びその一次代謝物、脱アルギニン F P B、その両方に対して感度がある。F P A は本質的に全く交差反応性を示さなかったが ( $< 0.1\%$ )、親のフィブリノーゲンは有意な交差反応性を示した。フィブリノーゲンの  $I C_{50}$  (2.3 nM) が、予想通り F P B の  $I C_{50}$  の約半分であったのは、各フィブリノーゲン分子が 2 つの潜在的に交差反応する F P B 配列を有するためである。交差反応性のフィブリノーゲン分子 (340,000 kD) は、試料の処理の間、B i o m a x - 100 膜 (100,000 kD のカットオフ値) を用いる、遠心による限外濾過によって研究試料から効果的に除去された (データは示さない)。

### 【0124】

フィブリノーゲンの置換：F P B 抗血清が、F P B アッセイにおいてイヌ F P B と交差反応しなかったので、血栓症モデルにおいて、ヒトフィブリノーゲンでイヌのものを置換する必要があった。これは、循環から効果的に自己のフィブリノーゲンを枯渇させるアंकロドを用いて、各動物を前処置することによって達成した。血漿フィブリノーゲンレベルは、アंकロドによる処置前及び後に、そして再び精製ヒトフィブリノーゲンを用いた注入前及びその後の様々な時点で決定された。アंकロド処置と異種フィブリノーゲンの注入との間の 2 日間の休止

期間に、アंकロドは循環から除かれ（データは示さない）そしてフィブリノーゲンレベルは検出限界以下のままであった。アंकロド処置後及びヒトフィブリノーゲンによる置換前のフィブリノーゲンレベルは、全ての動物において検出限界（ $20\text{ mg/dL}$ （ $0.2\text{ mg/ml}$ ））以下であった。精製ヒトフィブリノーゲンをを用いた注入の後、血漿フィブリノーゲンレベルは約 $400\text{ mg/dL}$ （ $4.0\text{ mg/ml}$ ）に回復し、そして残りの研究期間を通じて標準的な限界の範囲内（ $200\sim 400\text{ mg/dL}$ （ $2.0\sim 4.0\text{ mg/ml}$ ））で維持された。

#### 【0125】

凝固特性：大腿血栓及び肺塞栓は、部検の際に各動物から回収された。塞栓は、時々多数の葉及び/又は部分的な肺動脈に留まっていた。凝固は、血栓の場合 $0.37\sim 2.50\text{ g}$ 、そして塞栓の場合 $0.29\sim 0.78\text{ g}$ の重さ（全断片の重さを合わせたもの）に及んだ。血栓（ $0.82\pm 0.26\text{ g}$ ）及び塞栓（ $0.54\pm 0.068$ ）の凝固重量の平均値 $\pm$ SEMは有意な差がなかった（ $p=0.31$ ）。

#### 【0126】

血栓塞栓症の間の血漿FPBレベル：血漿中のFPBレベルは、大腿静脈の血栓症の誘導前、及びその後の様々な時点で測定された。図3に示す様に、血漿レベルの平均値 $\pm$ SEMは、血栓症の誘導から10分後に、基準線（ $3.7\pm 1.1\text{ ng/mL}$ ）から $25.4\pm 8.9\text{ ng/mL}$ （ $p<0.005$ ）のピークレベルに急激に上昇した。FPBレベルは、その後低下したが、基準線付近に戻る前に、血栓症の1時間後に有意に上昇したまた維持された（ $p<0.05$ ）。血栓症の誘導から4時間、各動物の2つの大腿凝固のうちの1つが塞栓形成された。塞栓形成の1時間前、3匹の動物が方法の項目に記載した様に静脈からのヘパリンによる処置がされた。塞栓形成後、FPBは再び急激に $20.2\pm 7.7\text{ ng/mL}$ のピークレベルに上昇し、そしてその後1～2時間以内に基準線に戻った。しかしながら、塞栓形成後のFPBの上昇は、塞栓形成前にヘパリンで処置した動物において完全に抑制された（図2）。

#### 【0127】

血栓塞栓症の間の尿のFPBレベル：尿は大腿静脈の血栓症の誘導前及び後に

、各動物から1時間毎に回収された。それぞれの時間の間隔で尿に排出されたF P Bの合計を図3に提示する。全ての動物についての合計の尿F P Bの平均値±SEMは、血栓症の1時間以内に基準線(0.5±0.1 μg)から有意に上昇し(3.3±0.7 μg)(p<0.001)、そして研究期間を通じて有意に上昇したままであった。尿F P Bの最初のピーク(20.3±7.3 μg)は、血栓症の誘導から10分後に起こった血漿F P Bの最初のピークと反対に、血栓症の誘導から4時間後に起こった。尿F P Bの最初のピークは、塞栓形成前にヘパリンで処置した動物において抑制された。尿F P Bの合計は、当該研究の最後の間隔(塞栓形成の5時間後)の間に、全ての動物において再び上昇した。F P Bの合計に加えて、血栓症の誘導後の、各時間毎の尿の回収物におけるF P B濃度も、各群の動物についての基準線と比較して有意に上昇した(データは示さない)

#### 【0128】

#### 結論

血漿F P Bは活動的な血栓症の間に急速に上昇するが、循環からも急速に除かれる。当該ペプチドは血栓症の開始から1~数時間遅れて尿に出現し、そしてたとえ血栓の増大が全身性の抗凝固剤によって中断しても上昇したまま維持される。この様に、尿F P Bのレベルは、血栓の増大が、患者が試験され又は医療助手を捜す時に起こらない場合であっても、直近の血栓性活性の優れた指標を提供し得る。肺塞栓形成自体が、ヘパリンで完全に阻害され得る血栓症の加速を引き起こすことにも注意すること。従って、塞栓形成の高い危険性を有するDVTの患者は、直ちに抗凝固されるべきである。

#### 【0129】

#### 例4：DVT及びPEを有する患者から採取した臨床試料中のF P Bの上昇

この実験の目的は、F P Bの血漿及び尿レベル(新規に創作したELISAアッセイを用いる)が、急性肺塞栓症又は深部静脈血栓症を有する患者において、正常なボランティア及び他の医学的症状を有するものよりも高いか否かを決定することにあつた。

#### 【0130】

VTEは一般的に他の医学的疾患の場面で起こり(Goldhaber et al. 1983, Hirsch et al. 1995)、そしてこれらの複雑な患者を現行の計画に含めるために参考になるだろう。不幸なことに、多くの医学的症候は、炎症部位での拡散性のフィブリン重合化を含んでおり、これは血栓症のマーカーの血漿レベルを変化させ得る。従って、当該計画の次の段階は、FPB<sub>合計</sub>レベルが他の疾患を有する患者から、VTEを有する患者を識別することができるか否かを決定することである。

#### 【0131】

臨床研究は、UCSDにてDVT及び/又はPEを有することが疑われている患者の尿FPBレベルを試験して行われた。この結果は、FPBレベルが、DVT及びPEの間、血栓症を有する患者と他の医学的症候を有するものとを区別するために十分に増大したことを示した(Eckhardt et al. 1981)。

#### 【0132】

方法：処置している医師によってAcute Venous Thrombo-embolism Serviceに委ねられ、そしてDVT又はPEのいずれかを有することが疑われているUCSD医療センターの連続入院患者は、当該研究に参加することが求められた。インフォームドコンセントが1人の研究者によって得られた。

#### 【0133】

当該研究に参加する時、血液及び尿の試料が患者から採取された(可能ならば、全身性抗凝固の開始前)。これらの試料は、新規に創作されたFPB ELISAアッセイを用いて、ex-vivo解析のために処理された。

#### 【0134】

対象者は、静脈血栓塞栓性疾患(臨床的に示唆されているもの)の診断的な精密検査を終えた。研究室での試験結果を知ることなく、PIはDVT(下肢圧縮超音波試験、静脈造影図)及びPE(肺換気/血流スキャン、コントラスト促進型のヘリカルCTスキャン、肺血管造影)の診断を確認し、又は論破するために使用した客観試験を再検討した。認められた基準に従い、患者は以下の様に分類された：1) VTE ポジティブ - 血栓塞栓性疾患が客観試験によって確認された

; 2) VTE ネガティブ - 血栓塞栓性疾患が論破された; 又は 3) VTE 不明 - 信頼性のある試験が完了されなかった。

#### 【0135】

VTE のための治療を受けた患者において、第 2 の血液及び尿試料は、一度適切な抗凝固レベルが達成されたときに得られた。(臨床的な要因によって評価)。再び、これらの試料は、FPB ELISA アッセイを用いて、*ex vivo* 解析のために処理される。

#### 【0136】

結果:

尿 FPB レベルは、DVT を有する患者において、DVT を有さない患者及びコントロールよりも著しく高かった(図 4)。前記診断が客観試験によって合致された 10 人の患者は、 $96 (+/- 41)$  ng/ml の、尿中の FPB の平均 ( $+/- SEM$ ) レベルを有していた。前記診断が論破された 3 人の患者は、 $2.7 (+/- 1.9)$  ng/ml の尿 FPB レベルを有していた。9 人の健康なコントロール患者の、平均 ( $+/- SEM$ ) の尿 FPB レベルは  $2.15 (+/- 1.9)$  ng/ml であった。

#### 【0137】

これらの実験において、尿 FPB レベルで観察された強力な依存関係にもかかわらず、正常なボランティアと DVT を有する患者との血漿 FPB<sub>合計</sub> レベルに差異はなかった。肺塞栓を有する若干の患者が、FPB<sub>合計</sub> のより高い血漿レベルを有する傾向があったが、差異はそれほど小さくなく、そしてこれらの予備実験において試験された集団は小さかった。従って、本発明は血漿及び尿の両方のための FPB 試験を含むが、次の例にとっての焦点は、尿中の FPB レベルの決定にある。

#### 【0138】

我々が、相関が尿の体積又は糸球体の濾過速度について作製されなかったにもかかわらず、尿中の FPB レベルと DVT の存在又は非存在との優れた相関を観察したことに注意すべきである。いくつかの適用において、尿の体積又は糸球体の濾過速度の指標となる尿中のマーカー(例えば、クレアチニン、タンパク質、

アルブミン)を測定することも有益である。このマーカーの濃度は、これらの効果を説明するために、測定されたF P B濃度を標準化するために使用され得る。

#### 【0139】

##### 結論

この様に、尿F P Bレベルは、静脈血栓塞栓性疾患を有する患者において、他の患者よりもかなり高い。

#### 【0140】

##### 例5：D V T / P E の危険がある入院患者の血漿及び尿中のF P Bの測定

目的：急性血栓症についてのF P Bの特異性を更に描写するために、F P B血漿/尿レベルは、静脈血栓塞栓性疾患の診断が疑わしくない(そしてスクリーニング試験によって示唆されていない)、様々な他の医学的かつ外科的な症状を有する入院患者において測定される。

#### 【0141】

##### 方法：

登録：コンプレッションストッキングがV T Eの予防のために必要とされ、そして在籍している医師が参加を許可した、U C S D医療センターの連続入院患者(n = 765)は、当該研究のための候補者とみなされた。インフォームド Consentは、研究者の1人によって得られる。当該研究者は、D V Tについての最初のスクリーニングを行う(下分を参照のこと)。除外基準は、同意の拒否、最初のC U S時のD V T、動脈機能不全、加圧帯材料に対する接触アレルギー、加圧帯の使用を不可能にする下肢の損傷、現時点での承認の間の12時間以上のI P C装置の使用及び以前のV T Eの症状の発見を含む。

#### 【0142】

血漿及び尿のF P Bレベルは、以下の様にそれぞれの患者において測定される：後述するそれぞれの時点で、血液試料(新たな静脈穿刺によって20ml)及び尿試料(20~40ml)が、抗凝固剤を含むチューブに集められる。血漿及び尿は、フィブリノーゲンを除くために限外濾過され、そしてフィブリノペプチドBについて試験される。レベルは、D V T及びP Eについての以下の解剖学的スクリーニング試験の結果の結果と比較される。

## 【0143】

結果の測定についての時点：患者は以下の時点、当該研究への参加時、静脈圧縮装置の適用から2週間後、当該装置の停止時及び当該装置の停止から1週間後にVTEについてスクリーニングされる。患者が当該装置の停止から1週間以上前に退院した場合、彼等は最後の試験のために戻ることに、ささやかな金銭的な報奨を提案される。スクリーニングの詳細は後述する。

## 【0144】

結果 - DVT：圧縮超音波検査法（CUS）が、症候性の患者におけるDVTの存在を確認し、そして無症候性の患者におけるDVTについてスクリーニングするために使用される。このアプローチの長所は、無症候性DVTについてのCUSの特異性が97%であり、症候性の患者の特異性とほぼ等しいことである。従って、ポジティブな試験が期待され得る。

## 【0145】

各時点で、患者は面接され、試験され、そしてCUSが行われる。DVTの徴候又は症候が明らかにされず、そしてCUSがネガティブである場合、更なる精密検査が行われる。CUSが非圧縮性の近位のLE静脈（膝窩及びその上）を明らかにする場合、患者は、症候に関係無くDVTを有するとみなされる。DVTの徴候又は症候が存在し、そして最初のCUSがネガティブである場合、それは2日目及び7日目に繰り返される。一連のCUS試験のいずれかが非圧縮性のLE静脈を明らかにする場合、患者はDVTを有するとみなされる。いずれもポジティブでない場合、患者はDVTを免れているとみなされた。

## 【0146】

最初の一連のCUS研究がDVTを明らかにしている、当該研究への参加時にDVTの徴候又は症候を有する患者は、IPCの適用前にDVTを有していたと仮定される。これらの患者は当該研究から脱落し、そして更なる解析から除外される。

## 【0147】

結果 - PE：各時点で、患者は面接され、そして試験される。PEの徴候又は症候が明らかにされない場合、更なる精密検査は行われぬ。PEが臨床的に疑

わしい場合、患者の担当の医師が通知される。ATSのガイドラインに従い、精密検査を行うことは、USCD医療センターの治療の標準である。要約すると、肺換気/血流(V/Q)スキャンが、可能ならば行われる。正常なV/Qスキャンは、PEを除外しているとして認められる。肺換気の欠点と釣り合わない、2若しくはそれ以上の部分的な又はそれより大きな血流の欠点を明らかにするスキャン(「高確率」スキャン)は、PEの診断として認められる。それ以外のスキャンは非診断的とみなされる。非診断的なV/Qスキャンによる患者は、肺血管造影を受けた。研究者は、PEのための精密検査がこれらのガイドラインに従うことを勧めたが、診断試験は、患者の担当の医師によって示唆される様に注文される。

#### 【0148】

DVT又はPEと診断された任意の患者の担当の医師は、診断試験の結果が通知される。処置は担当の医師の裁量であるが、Acute Venous Thrombo-Embolism Serviceの診察が通常提案される。

#### 【0149】

結果：

様々な理由で入院が認められた、DVTを有する209人の患者の尿におけるFPBの平均(+/-SD)レベルは11.6(+/-25.4)ng/mlであった(図5)。退院時(少なくとも4時間の入院後)、DVTを有さないものの尿FPBレベルは16.5(+/-34.3)であった。

#### 【0150】

結論

これらの結果は、尿FPBレベルの上昇が入院患者において一般的でなく、これが血漿D-ダイマー試験の場合と異なることを示唆している。従って、FPBの特異性は、血栓症のための他の臨床的に利用可能なマーカー、例えばD-ダイマーよりも高い。

#### 【0151】

例6：処置の間のFPBレベル

この実験の目的は、ヘパリンの「治療的な投与量」による抗凝固の間に測定さ

れる、尿又は血漿のF P Bレベルが、V T E患者の前処置のレベルと比較して低下するか否かを決定することにある。

#### 【0152】

後の抗凝固効果についてのF P B<sub>合計</sub>の有効性は、V T Eを大量のヘパリンで処置した場合に、尿レベル（又は上述した血漿レベル）が確実に低下するか否かを決定することによって試験される。

#### 【0153】

D V T及び/又はP Eの診断が（上述の基準に基づいて）確認されている、V T Eサービスに送られた一連の患者が登録される。治療の前に、血液及び尿試料がF P B<sub>合計</sub>の測定（及び上述した、他のF P B測定）のために回収される。続いて、患者は、プロトコールに当たりコントロール値の1.5～2.5倍にa P T Tが保たれる様に調整された量のヘパリン（80ユニット/kgボラス、18ユニット/kg/時間注入）を静脈内から処置される。ヘパリンの「治療的な量」が定常状態で維持されたらすぐに、血液及び尿を再び回収し、そして同一の因子が測定される。更に、血漿a P T T、抗X a及び抗トロンビンの測定が上述の様に行われる（Morris et al. 1998）。

#### 【0154】

それぞれの患者について、抗凝固の前後に測定される尿及び血漿F P B<sub>合計</sub>レベルの間の差異が記録される。抗凝固の後のF P B<sub>合計</sub>レベルの低下の平均が計算される。必要な試料のサイズは、後述する予備的なデータに基づいて見積もられる：抗凝固の間の尿F P B<sub>合計</sub>中の減少の平均値（+ / - S D）は60 ng / ml（+ / - 85.7 ng / ml）であった。研究されるべきV T E患者についての標準偏差が類似していると仮定して、37組の試料が、抗凝固の後のレベルの50%の減少を検出するために、0.01のアルファ及び95%の検出力（power）が必要とされる。

#### 【0155】

予備的な結果：F P Bの尿レベルは、1人の患者を除いて、抗凝固の間有意に低下した（図）。尿F P Bが増大した唯一の患者は自己の脚に衝突による外傷を受けており、そして彼の繰り返しの試料が得られた日に大きな手術を必要として

いた。更に重要なことに、彼のa P T T測定によって見積もられた彼のヘパリン投与量は、彼の最初と2回目の試験の間の間隔において治療的な範囲に達していなかった。事実、この患者はまた、初日よりも2日目の採集時に、血漿F P Bのより大きな上昇が明らかにされた（結果は示さない）。

【0156】

考察：当該研究のこの部分は、F P Bの尿レベルが、V T Eを有する患者が抗凝固される場合に減少するという独特の特性を有していることを示唆している。当該試験の更なる展開（及び恐らくは上述したF P B血漿試験の変化の展開）の後、それらは抗凝固の短期間の有効性の有効な評価として使用され得る。これらのマーカーは、臨床的な設定において適用可能な、事実上の抗血栓効果の最初の試験を代表し得る。

【0157】

全ての刊行物及び特許は、個々の刊行物又は特許出願が具体的かつ個別に引用によって組み込まれることが示唆されているのと同程度に、引用によって本明細書に組み入れられる。当業者にとって、多くの変更及び修飾が、特許請求の範囲から逸脱することなく本発明において行われ得ることは明らかだろう。

【表1】

バイオグラフィー

米国特許第6,066,448号、第6,078,782号、第5,731,147号、第5,876,947号.

Becker DM, Philbrick JT, Bachhuber TL, Humphries JE: D-dimer testing and acute venous thromboembolism. A shortcut to accurate diagnosis? *Arch Intern Med* 156:939-946 (1996).

Bell, W.R.J., Defibrinogenating enzymes. *Drugs*, 54 Suppl 3:18-30 (1997).

Bilezikian, SB, Nossel HL, Butler VP and Canfield RE, "Radioimmunoassay of human fibrinopeptide B and kinetics of fibrinopeptide cleavage by different enzymes," *J. Clinical Investigation* 56:438-445 (1975).

Bini A, Callender S, Procyk R, Blomback B and Kudryk BJ, "Flow and antibody binding properties of hydrated fibrins prepared from plasma, platelet rich plasma and whole blood," *Thrombosis Res* 76(2):145-156 (1994).

Bini A, Fenoglio JJ Jr, Mesa-Tejada R, Kudryk B and Kaplan KL, "Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis," *Arteriosclerosis* 9(1):111-121 (1989).

Bini A, Fenoglio JJ Jr, Sobel J, Owen J, Fejgl M and Kaplan KL, "Immunochemical characterization of fibrinogen, fibrin I and fibrin II in human thrombi and atherosclerotic lesions," *Blood* 69(4):1038-1045 (1987).

Bini A, Itoh Y, Kudryk BJ and Nagase H, "Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): Hydrolysis of  $\gamma$ Gly404-Ala405 peptide bond," *Biochemistry* 35(40):13056-13063 (1996).

Bini A and Kudryk BJ, "Fibrin and its derivatives in the normal and diseased vessel wall," *Ann NY Acad Sci* 667:112-126.

【表 2】

- Bini A, Mesa-Tejada R, Fenoglio JJ Jr, Kudryk B and Kaplan KL, "Immunohistochemical characterization of fibrin(ogen)-related antigens in human tissues using monoclonal antibodies," *Laboratory Investigation* 60(6):814-821 (1989).
- Bovil, E.G., McDonagh, J., Triplett, D.A., Arkin, C.F., Brand, J.T., Hayes, C.E., Kaczmarek, E., Long, T., Rock, W.A., Performance Characteristics of Fibrinogen Assays; Results of the College of American Pathologists Proficiency Testing Program 1988-1991. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 117:58-66 (1993).
- Brandt, J. T., Triplett, D. A., Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments on the Activated Partial Thromboplastin Time. *Am. J. Clin. Pathol.*, 76:530-537 (1981).
- Bounameaux H, Khabiri E, Huber O, Schneider P, Didier D, de Moerloose P, Reber G: Value of Liquid Crystal Contact Thermography and Plasma Level of D-Dimer for Screening of Deep Venous Thrombosis Following General Abdominal Surgery. *Thromb Haemost* 67:603-606 (1992).
- Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, Schneider P, Slosman D, Reber G, Unger PF: Measurement of D-Dimer in Plasma as Diagnostic Aid in Suspected Pulmonary Embolism. *Lancet* 337:196-200 (1991).
- Carrier, D., Caranobe, C., Boneu, B., A Comparison of the Antithrombotic Effects of Heparin and of Low Molecular Weight Heparins with Increasing Antifactor Xa/Antifactor IIa Ratio in the Rabbit. *British Journal of Hematology*, 83:622-626 (1993).
- Carrier, D. Caranobe, C., Gabaig, A. M., Larroche, M., Boneu, B., Effects of Heparin, Dermatan Sulfate and of their Association on the Inhibition of Venous Thrombosis Growth in the Rabbit. *Thrombosis and Haemostasis*, 68: 637-641 (1992).

【表3】

Campbell, Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology, Elsevier, Amsterdam. pp. 3-6, 20-23, 42-45 (1991).

Chung et al. Characterization of complementary deoxyribonucleic acid and genomic deoxyribonucleic acid for the  $\beta$  chain of human fibrinogen. *Biochemistry* 22:3244-3250 (1983).

Collen D and Lijnen HR, "Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis," *Blood* 78(12):3114-3124 (1991).

Dalen, J. E., Hirsh, J., American College of Chest Physicians and the National Heart, Lung and Blood Institute National Conference on Antithrombotic Therapy. *Arch. Intern. Med.*, 146:462-472 (1986).

Douketis, J. D., Kearon, C., Bates, S., Duku, E. K., Ginsberg, J. S., Risk of fatal pulmonary embolism in patients with treated venous thromboembolism. *JAMA*, 279:458-462 (1998).

Dyr JE, Blomback B, Hessel B, Kornalik F: Conversion of fibrinogen to fibrin induced by preferential release of fibrinopeptide B. *Biochim.Biophys.Acta* 990:18-24 (1989).

Ebert RF, Bell WR: Assay of human fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 148:70-78 (1985).

Eckhardt T, Nossel HL, Hurllet-Jensen A, La Gamma KS, Owen J, Auerbach M: Measurement of desarginine fibrinopeptide B in human blood. *J Clin Invest* 67:809-816 (1981).

Fu Y and Grieninger G, "Fib.sub.420 : A normal human variant of fibrinogen with two extended  $\alpha$  chains," *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2625-2628 (1994).

【表 4】

Fu Y, Weissbach L, Plant PW, Oddoux C, Cao Y, Liang TJ, Roy SN, Redman CM and Grieninger G, "Carboxy-Termina-Extended variant of the human fibrinogen  $\alpha$  subunit: a novel exon conferring marked homology to  $\beta$  and  $\gamma$  subunits," *Biochemistry* 31(48):11968-11972.

Gando, S., Tedo, I., Diagnostic and prognostic value of fibrinopeptides in patients with clinically suspected pulmonary embolism. *Thromb. Res.*, 75:195-202 (1994).

Gawoski, J. M., Arkin, C. F., Bovill, T., Brandt, J., Rock, W. A., Triplett, D. A., The Effects of Heparin on the Activated Partial Thromboplastin Time of the College of American Pathologists Survey of Specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 111:785-790 (1987).

Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Panju A, van Beek EJ, Patel A: Application of a novel and rapid whole blood assay for D-dimer in patients with clinically suspected pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 73:35-38 (1995).

Ginsberg J, Brill-Edwards PA, Donovan D: D-Dimer in Patients With Clinically Suspected Pulmonary Embolism. *Chest* 104:1679-1684 (1993).

Goldhaber SZ, Simons GR, Elliott CG, Haire WD, Toltzis R, Blacklow SC, Doolittle MH, Weinberg DS: Quantitative Plasma D-Dimer Levels Among Patients Undergoing Pulmonary Angiography for Suspected Pulmonary Embolism. *JAMA* 270:2819-2822 (1993).

Goldhaber, S.Z., Savage, D.D., Garrison, R.J., Castelli, W.P., Kannel, W.B., McNamara, P.M., Gherardi, G., Feinleib, M., Risk factors for pulmonary embolism. The Framingham Study. *Am. J. Med.*, 74:1023-1028 (1983).

Harlow, E., Lane, D., Immunizations, in Anonymous Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory (1998).

【表5】

Harlow et al., *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. pp. 72-77, 600-612 (1998).

Higgins DL, Lewis SD, Shafer JA: Steady State Kinetic Parameters for the Thrombin-catalyzed Conversion of Human Fibrinogen to Fibrin. *J Biological Chemistry* 258:9276-9282 (1983).

Hirsch, D. R., Lee, T. H., Morrison, R. B., Carlson, W., Goldhaber, S.Z., Shortened hospitalization by means of adjusted-dose subcutaneous heparin for deep venous thrombosis. *Am. Heart J.*, 131:276-280 (1996).

Hirsch, D.R., Ingenito, E.P., Goldhaber, S.Z., Prevalence of deep venous thrombosis among patients in medical intensive care. *JAMA*, 274:335-337 (1995).

Hoellerich VL, Wigton RS: Diagnosing pulmonary embolism using clinical findings. *Arch Intern Med* 146:1699-1704 (1986).

Hull, R. D., Raskob, G. E., Brant, R. F., Pineo, G. F., Valentine, K. A., The importance of initial heparin treatment on long-term clinical outcomes of antithrombotic therapy. The emerging theme of delayed recurrence. *Arch. Intern. Med.*, 157:2317-2321 (1997).

Hull, R. D., Raskob, G. E., Hirsch, J. Jay, R. M., Leclerc, J. R., Geerts, W. H., Rosenbloom, D., Sackett, D. L., Anderson, C. Harrison, L., Gent, M., Continuous Intravenous Heparin Compared With Intermittent Subcutaneous Heparin In The Initial Treatment of Proximal-Vein Thrombosis. *NEJM*, 315:1109-1114 (1986).

Kinjoh et al., Production of a monoclonal antibody against rabbit fibrinopeptide B (FPB) for immunological assay of rabbit FPB. *Japanese Journal of Physiology* 44 (Supp. 1): S117, Abstract#272 (1994).

【表6】

Koopman, M., Prandoni, P., Piovella, F., Treatment of Venous Thrombosis with Intravenous Unfractionated Heparin Administered in the Hospital as Compared with Subcutaneous Low-Molecular-Weight Heparin Administered at Home. *NEJM*, 334:682-687 (1996).

Koopman J, Haverkate F, Grimbergen J, Egbring R and Lord ST, "Fibrinogen Marburg: A homozygous case of dysfibrinogenemia, lacking amino acids A $\alpha$  461-610 (Lys 461 AAA Stop TAA)," *Blood* 80(8):1972-1979 (1992).

Kudryk B, Bini A, Procyk R, Matsueda GR and Shainoff JR, "Cross-linking of fibrinogen by tissue transglutaminase: Involvement of the C-termini of the A $\alpha$ - and  $\gamma$ -chains in formation of A $\alpha$  $\gamma$ -dyads," *Thromb Haemostas* 69(6):1260 (1993).

Kudryk, B, Gidlund M, Rohoza A, Ahadi M, Coiffe D and Weitz JI, "Use of a synthetic homologue of human fibrinopeptide A for production of a monoclonal antibody specific for the free peptide," *Blood* 74(3):1036-1044 (1989).

Kudryk BJ, Grossman ZD, McAfee JG and Rosebrough SF, "Monoclonal antibodies as probes for fibrin(ogen) proteolysis," *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy* J-F. Chatal, ed. CRC Press, Boca Raton 365-398 (1989a).

Kudryk B, Robinson D, Netre C, Hessel B, Blomback M, and Blomback B, "Measurement in human blood of fibrinogen/fibrin fragments containing the B $\beta$ 15-42 sequence," *Thromb Res* 25:277-291 (1982).

Kudryk B, Rohoza A, Ahadi M, Chin J and Wiebe ME, "A monoclonal antibody with ability to distinguish between NH<sub>2</sub>-terminal fragments derived from fibrinogen and fibrin," *Mol Immunol* 20:1191-1200 (1983).

Kudryk B, Rohoza A, Ahadi M, Chin J, and Wiebe ME, "Specificity of a monoclonal antibody for the NH<sub>2</sub>-terminal region of fibrin," *Mol Immunol* 21:89-94 (1984).

【表 7】

Kudryk B, Rohoza A, Ahadi M, Gidlund M, Procyk R and Matsueda GR,  
*Thromb Haemostas* 65:898 (Abstract 714) (1991).

Levine, M., Gent, M., Hirsh, J. Leclerc, J., Anderson, D., Weitz, J., Ginsberg, J.,  
Turpie, A. G., Demers, C., Kovacs, M., Geerts, W., Kassis, J., Desgjardins, L.,  
Cusson, J., Cruickshank, M., Powers, P., Brien, W., Haley, S. Willan, A., A  
Comparison of Low-Molecular-Weight Heparin Administered Primarily at  
Home with Unfractionated Heparin Administered in the Hospital for Proximal  
Deep Vein Thrombosis. *NEJM*, 334:677-681 (1996).

Liu CY, Sobel JH, Weitz JI, Kaplan KL, and Nossel HL, "Immunologic  
identification of the cleavage products from the A alpha- and B beta-chains in  
the early stages of plasmin digestion of fibrinogen," *Thromb Haemostas*  
56(1):100-106 (1986).

Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD and  
Silverstein SC, "CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N  
terminus of the A-alpha chain of fibrinogen," *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1044-  
1048 (1991).

Lopaciuk, S., Meissner, A. J., Filipecki, S., Zawilska, K., Sower, J., Ciesielski,  
L., Bielawiec, M., Glowinski, S., Czestochowska, E., Subcutaneous low  
molecular weight heparin versus subcutaneous unfractionated heparin in the  
treatment of deep vein thrombosis: a Polish multicenter trial. *Thromb. Haemost.*,  
68:14-18 (1992).

Marsh, J.J., Konopka, R., Lang, I.M., Wang, H., Pedersen, C., Chiles, P., Reilly,  
C.F., Moser, K.M., Suppression of Thrombolysis in a Canine Model of  
Pulmonary Embolism. *Circulation*, 90:3091-3097 (1994).

Meyer, G., Brenot, F., Pacouret, G., Simonneau, G., Gillet, Juvin K.,  
Charbonnier, B., Sors, H., Subcutaneous low-molecular-weight heparin fragmin  
versus intravenous unfractionated heparin in the treatment of acute non massive

【表 8】

pulmonary embolism: an open randomized pilot study. *Thromb. Haemost.*, 74:1432-1435 (1995).

Miller GJ, Bauer KA, Barzegar S, Foley AJ, Mitchell JP, Cooper JA, Rosenberg RD: The effects of quality and timing of venepuncture on markers of blood coagulation in healthy middle-aged men. *Thromb.Haemost.* 73:82-86 (1995).

Morris, T. A., Marsh, J. J., Konopka, R., Pedersen, C. A., Chiles, P. G., Moser, K. M., Comparison of Enoxaparin, Dalteparin and Unfractionated Heparin Using an In Vivo Marker for Propagating Canine Venous Thrombi. *Circulation* 1998; submitted.

Morris TA, Marsh JJ, Fagnani R, Hagan M, Moser KM: Degree of Polymer Organization Decreases the Binding of a Monoclonal Antibody Raised Against the B-Chain Amino Terminus of Fibrin. *Thromb.Haemost.* 77:704-709 (1997a).

Morris TA, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA, Chiles PG, Fagnani R, Hagan M, Moser KM: Antibodies Against the Fibrin B-Chain Amino Terminus Detect Active Canine Venous Thrombi. *Circulation* 96:3173-3179 (1997b).

Morris, T. A., Marsh, J. J., Konopka, R., Pedersen, C., Chiles, P., Moser, K. M., Anti-fibrin Antibodies Detect Deep Vein Thrombosis in a Canine Model. *Chest*, 104:24s (1993).

Moser, K. M., Spragg, R. G., Bender, F., Konopka, R., Hartman, M. T., Fedullo, P., Study of Factors That May Condition Scintigraphic Detection of Venous Thrombi and Pulmonary Emboli with Indium-111-Labeled Platelets. *J. Nuc. Med.*, 21:1051-1058 (1980).

National Heart, Lung and Blood Institute Urokinase Pulmonary Embolism Trial: Phase I Results. *JAMA*, 214:2163-2172 (1970).

【表9】

Ng. A. S., Lewis, S. D., Shafer, J. A., Quantifying thrombin-catalyzed release of fibrinopeptides from fibrinogen using high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, 222:341-358 (1993).

Owens et al., The genetic engineering of monoclonal antibodies. *J. Immunological Methods* 168: 149-165 (1994).

Plow EF and Edgington TS, "Surface markers of fibrinogen and its physiologic derivatives revealed by antibody probes," *Semin Thromb Haemostas* 8(1):36-56 (1982).

Procyk R, Kudryk B, Callender S, Blomback B, "Accessibility of epitopes on fibrin clots and fibrinogen gels," *Blood* 77: 1469-1475 (1991).

Raschke, R. A., Reilly, B. M., Guidry, J. R., Fontana, J. R., Srinivas, S., The Weight-based Heparin Dosing Nomogram Compared With a "Standard Care" Nomogram: A Randomized Controlled Trial. *Ann. Intern. Med.*, 119:874-881 (1993).

Reber G, Vissac AM, de Moerloose P, Bounameaux H, Amiral J: A new, semi-quantitative and individual ELISA for rapid measurement of plasma D-dimer in patients suspected of pulmonary embolism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6:460-463 (1995).

Russel, D., Hull, M.B., Subcutaneous Low-Molecular-Weight Heparin Compared With Continuous Intravenous Heparin In The Treatment of Proximal-Vein thrombosis. *NEJM*, 326:975-982 (1992).

Singer II, Kawka DW, Bayne EK, Donatelli SA, Weidner JR, Williams HR, Ayala JM, Mumford RA, Lark MW, Glant TT, Nabozny GH and David CS, "VDIPEN, A metalloproteinase-generated neopeptide, is induced and immunolocalized in articular cartilage during inflammatory arthritis," *J Clinical Investigation* 95:2178-2186 (1995).

【表 1 0】

Southan C, Thompson E, Lane DA: Direct analysis of plasma fibrinogen-derived fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography: investigation of nine congenital fibrinogen abnormalities. *Br.J Haematol.* 65:469-473 (1987).

Southan C, Thompson E, Lane DA: Direct analysis of plasma fibrinogen-derived fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. *Thromb.Res.* 43:195-204 (1986).

Tapson VF, Carroll BA, Davidson BL, Elliott CG, Fedullo PF, Hales CA, Hull RD, Hyers TM, Leeper KV, Morris TA, Moser KM, Raskob GE, Sostman HD, Thompson BT: American Thoracic Society Position Paper: The Diagnostic Approach to Acute Venous Thromboembolism. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1999, in press)

Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Burtis, C. Ashword, E. R., Eds., WB Saunders, Philadelphia (1994).

Valenzuela R, Shainoff JR, DiBello PM, Urbanic DA, Anderson JM, Matsueda GR and Kudryk BJ, "Immunoelectrophoretic and immunohistochemical characterizations of fibrinogen derivatives in atherosclerotic aortic intimas and vascular prosthesis pseudo-intimas," *Amer J Pathol* 141(4):861-880 (1992).

van Beek EJ, Schenk BE, Michel BC, van den Ende B, Brandjes DP, van der Heide YT, Bossuyt PM, Beuller HR: The role of plasma D-dimers concentration in the exclusion of pulmonary embolism [published erratum appears in *Br J Haematol* *Br J Haematol* 92:725-732 (1996)

van den Besselaar, A. M., Meeuwisse-Braun, J., Bertina, R. M., Monitoring heparin therapy: relationships between the activated partial thromboplastin time and heparin assays based on ex-vivo heparin samples. *Thromb. Haemost.*, 63:16-23 (1990).

【表 1 1】

van Hulsteijn H, Brieet E, Koch C, Hermans J, Bertina R: Diagnostic value of fibrinopeptide A and beta-thromboglobulin in acute deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Acta Med Scand* 211:323-330 (1982).

Verstraete, M., Direct thrombin inhibitors: appraisal of the antithrombotic/hemorrhagic balance. *Thromb. Haemost*, 78:357-363 (1997).

Walenga, J. M., Jeske, W. P. Bara, L., Samama, M. M., Fareed, J., Biochemical and pharmacologic rationale for the development of a synthetic heparin pentasaccharide. *Thromb. Res.*, 86:1-36 (1997).

Weissbach L and Grieninger G, "Bipartite mRNA for chicken  $\alpha$ -fibrinogen potentially encodes an amino acid sequence homologous to  $\beta$ - and  $\gamma$ -fibrinogens," *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5198-5202 (1990).

Wilner et al., Immunochemical analysis of rabbit antihuman fibrinopeptide B antibodies. *Biochemistry* 18:5078-5082 (1979).

Yung, G. L., Marsh, J. J., Berstein, R. J., Hirsh, A. M., Channick, R. N., Moser, K. M., Fibrinopeptide A Levels in Primary Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157:A592 (Abstract) (1998).

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> The Regents of the University of California  
 5 Morris, Timothy A.

<120> Diagnostic test for thrombotic or thromboembolic disease

<130> 1133.005WO1  
 10

<150> US 60/141,734  
 <151> 1999-06-30

<160> 6  
 15

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
 <211> 15  
 20<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Cys-FPB  
 25

<400> 1  
 Cys Gln Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg  
 1 5 10 15

30<210> 2  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

35<220>  
 <223> Cys-desArg-FPB

<400> 2  
 Cys Gln Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala  
 40 1 5 10

```

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 3
Gln Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg
1           5           10

10<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15<400> 4
Gln Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala
1           5           10

<210> 5
20<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
25<221> SITE
<222> 1
<223> Xaa = pyroglutamic acid

<400> 5
30Xaa Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg
1           5           10

<210> 6
<211> 13
35<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
40<222> 1

<223> Xaa = pyroglutamic acid

<400> 6
Xaa Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala
5 1           5           10

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】

競合ELISAによるFPB抗血清の特異性。様々な濃度の天然ヒトFPB（ひし形）又はイヌFPB（四角）は、FPB抗血清で別々にプレインキュベートされ、そしてFPBでコーティングしたウェルにかけられた。インキュベーション後、ウェルに結合した抗体は方法に記載した様に評価された。プレインキュベーション混合物に使用したFPBは、室温で1時間トロンビン（2ユニット/mL）で凝固した精製ヒト又はイヌフィブリノーゲン（2.5 mg/ml）から誘導された。凝固液は、続いて遠心による限外濾過にかけられ、そして限外濾液中のFPBの存在は、HPLCによって確認された。FPB濃度は任意の単位（AU）で示す。データは2回1組で決定した平均値±範囲として表す。

#### 【図1B】

競合ELISAによるFPB抗血清の特異性。様々な濃度の精製ヒトフィブリノーゲン（黒丸）、合成FPB（ひし形）、脱アルギニンFPB（三角）、又はFPA（白丸）が、FPB抗血清で別々にプレインキュベートされ、そして次にFPBでコーティングしたウェルにかけられた。インキュベーション後、ウェルに対して結合した抗体は、方法において記載した様に評価された。データは2回1組の決定による平均値として示し、そして競合物質がプレインキュベーション混合物中に存在していない場合に得られた最大吸光度のパーセンテージとして表す。

#### 【図2】

血栓塞栓症の間の血漿FPBレベル。血漿FPBレベルは全部で8匹の実験動物（ひし形）において、左右の大腿静脈血栓症の誘導の前及びその後の指定時間に測定された。血栓症の4時間後、各動物の大腿の凝固の1つが肺まで塞栓形成された。塞栓形成の1時間前に、ヘパリン治療は前記動物のうちの3匹（三角）において開始された。他の5匹の動物（四角）は、塞栓形成前にヘパリンを受けなかった。データは各群の動物について平均値±SEMのFPBレベルとして表される。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.05$ は、基準線（時間 = 0）のレベルと比較された。

#### 【図3】

血栓塞栓症の間の合計の尿FPB。FPBレベルは、左右の大腿静脈血栓症の

誘導前及び後に、1時間毎の尿の回収物中で測定された。基準線の試料(BL)は、血栓症の誘導に使用した二重のバルーンカテーテルの挿入直前に、1時間毎の回収物から採集された。それぞれの時間の間隔についてのFPBの合計の尿の排出は、尿のFPB濃度を、1時間毎の間隔で回収された合計量と掛けることによって決定された。血栓症の4時間後、各動物の大腿の凝固の1つは、肺まで塞栓形成されていた。塞栓形成の1時間前に、ヘパリン治療が3匹の動物において開始された。データは、各群の動物について、平均値 $\pm$ SEMの尿FPBとして示す。白棒：全動物(n=8)。灰色棒：塞栓形成前にヘパリンで処置しなかった動物(n=5)。黒棒：塞栓形成前にヘパリンで処置した動物(n=3)。合計の尿FPBは、全ての群の動物において、血栓症の誘導後の全ての時間で、基準線( $p < 0.05$ )と比較して有意に上昇した。

【図4】

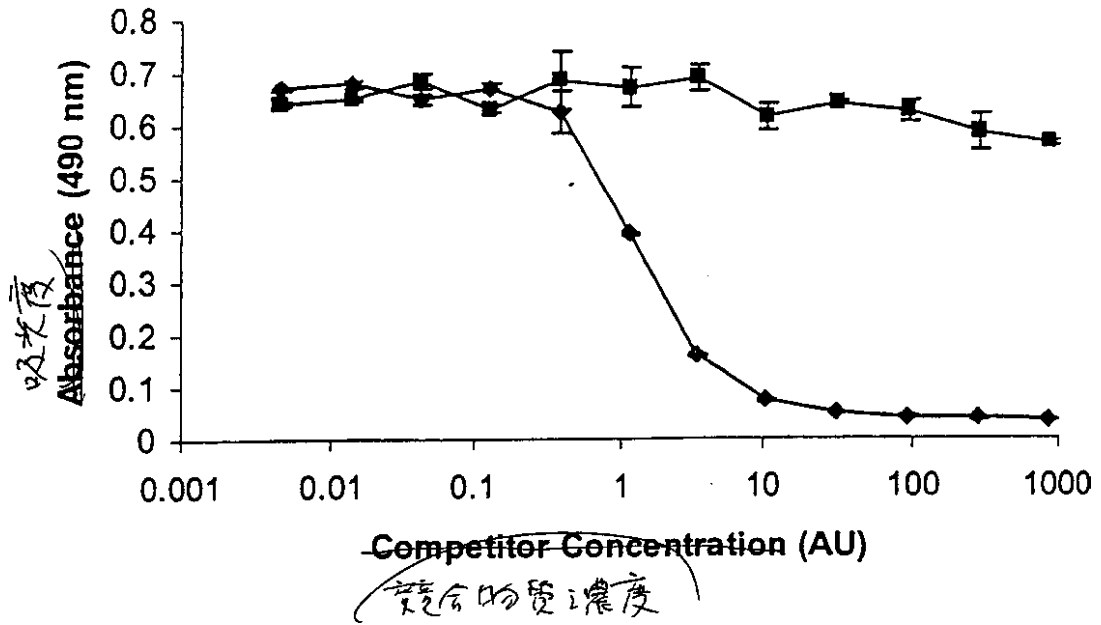
例4．尿FPBレベルはDVTを有さない患者( $2.7 \pm 1.9$  ng/ml)及び健康なコントロールの対象者( $2.15 \pm 1.9$  ng/ml)よりも著しく高かった(全ての値を平均値 $\pm$ SEMとして表した)。

【図5】

例5．様々な理由で入院が許可された、DVTを有さない209人の患者の尿中のFPBレベルの平均値( $\pm$ SD)は、 $11.6 (\pm 25.4)$  ng/mlであった(図5)。退院時(少なくとも48時間の入院後)、DVTを有さないものの尿FPBレベルは $16.5 (\pm 34.3)$ であった。これらのレベルは、DVT又はPEを有する患者において観察されたものより著しく低い(図4を参照のこと)。

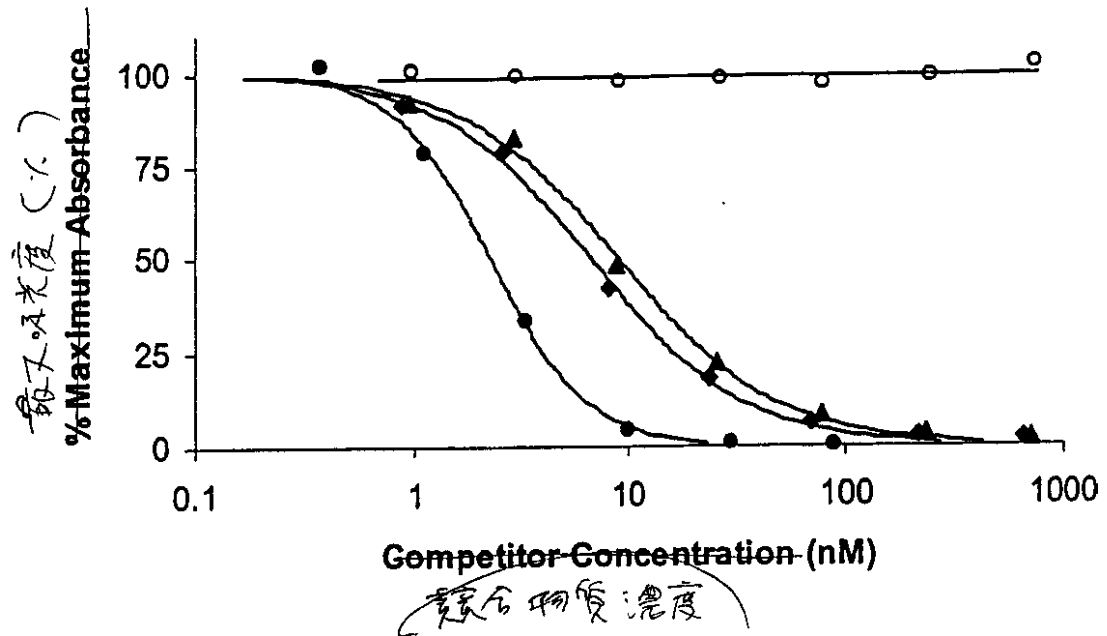
【圖 1 A】

1 A



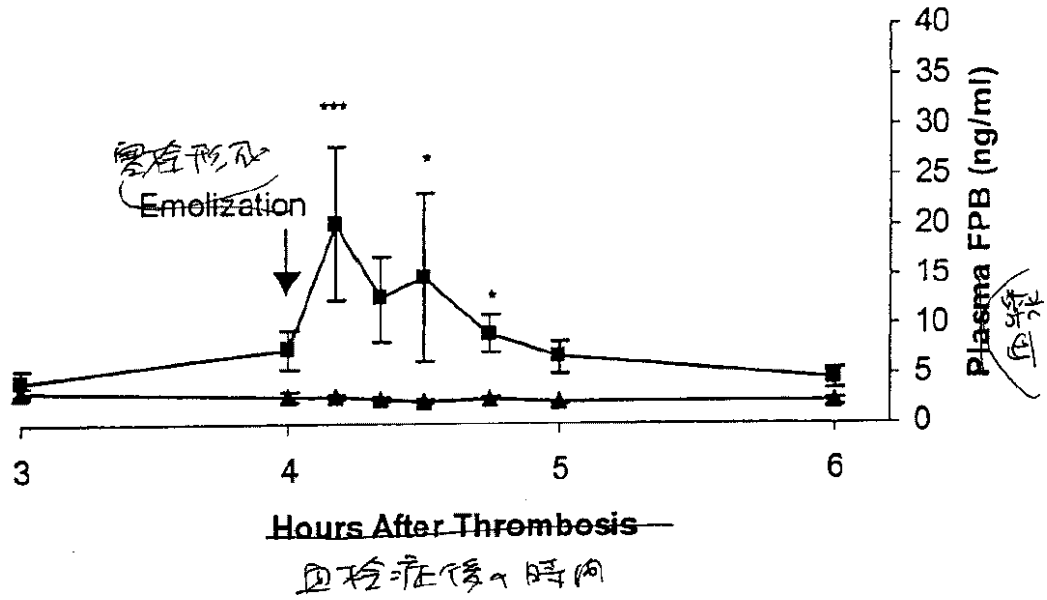
【圖 1 B】

1 B



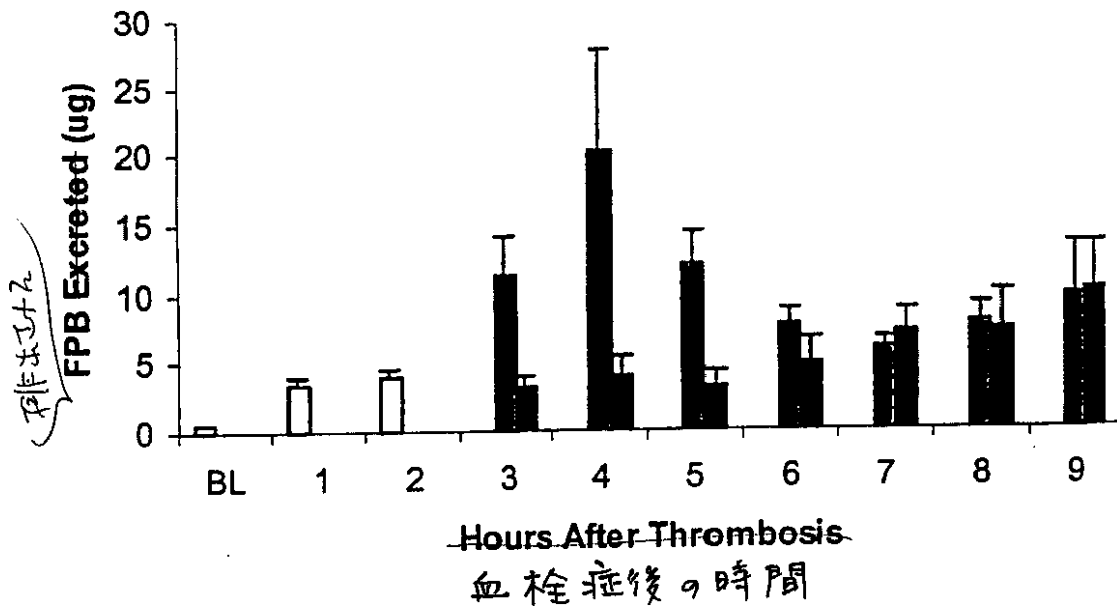
【図2】

2.



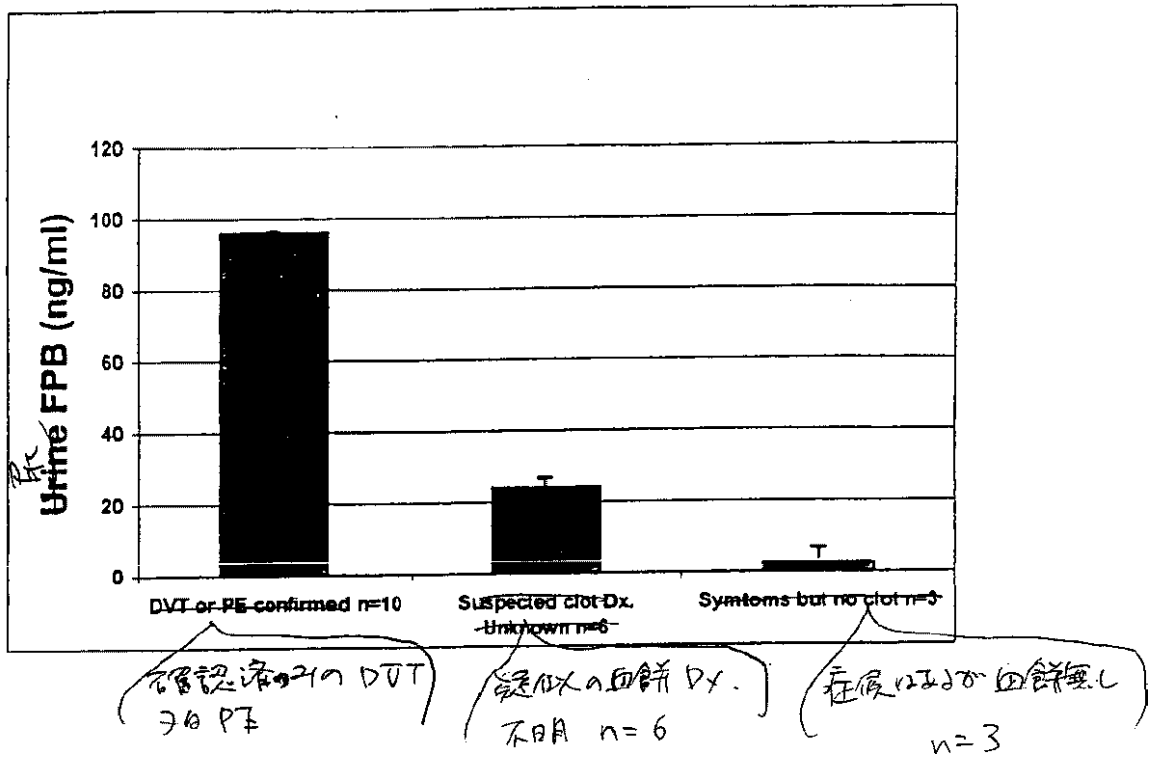
【図3】

3.



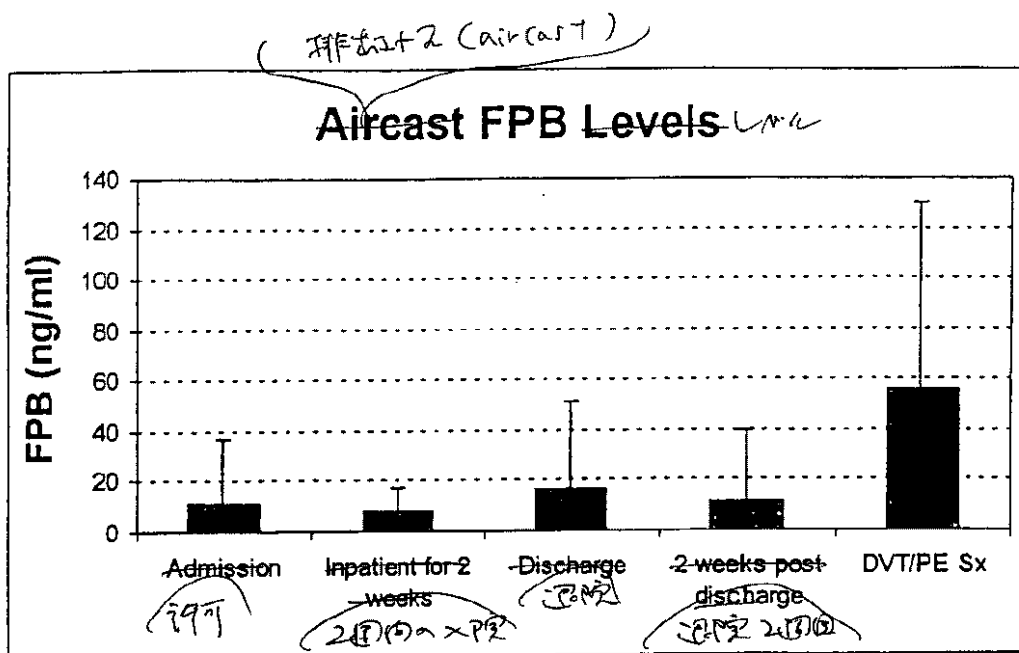
【図4】

4.



【図5】

5.



TP-1	TP-2	TP-3	TP-4	TP-5	
11.611	8.409	16.564	10.918	55.589	MEAN 平均値
25.43599	9.198792	34.35118	29.18733	74.97536	Standard Dev. 標準偏差
1.759444	3.066264	3.122835	4.35099	43.28705	Standard Error of Mean 標準誤差
209	9	121	45	3	n
Admission	Inpatient for 2 weeks	Discharge	2 weeks post discharge	DVT/PE Sx	
許可	2週間入院	退院	退院2週間		

【手続補正書】

【提出日】平成14年1月25日(2002.1.25)

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

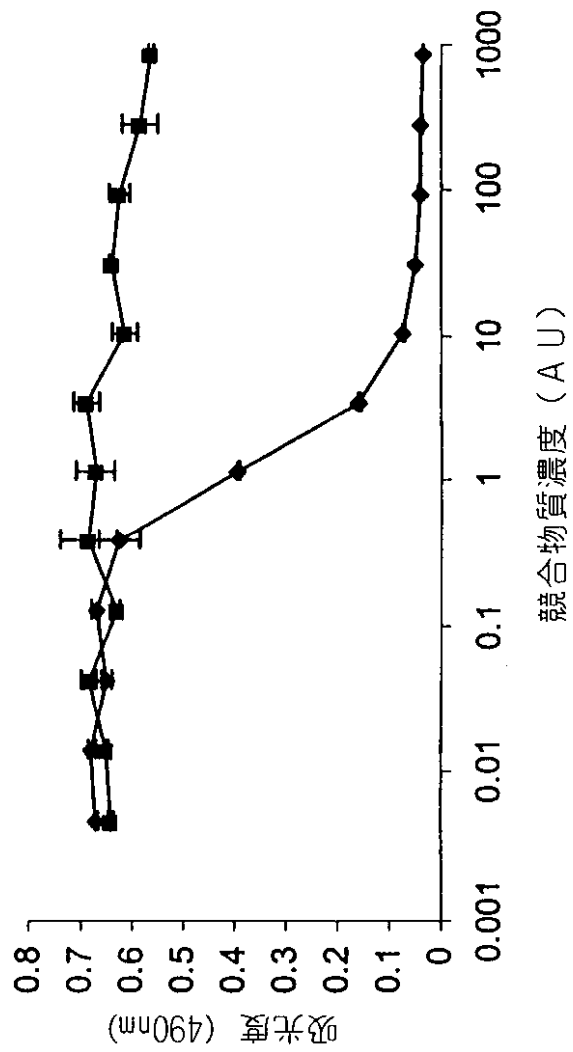
【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

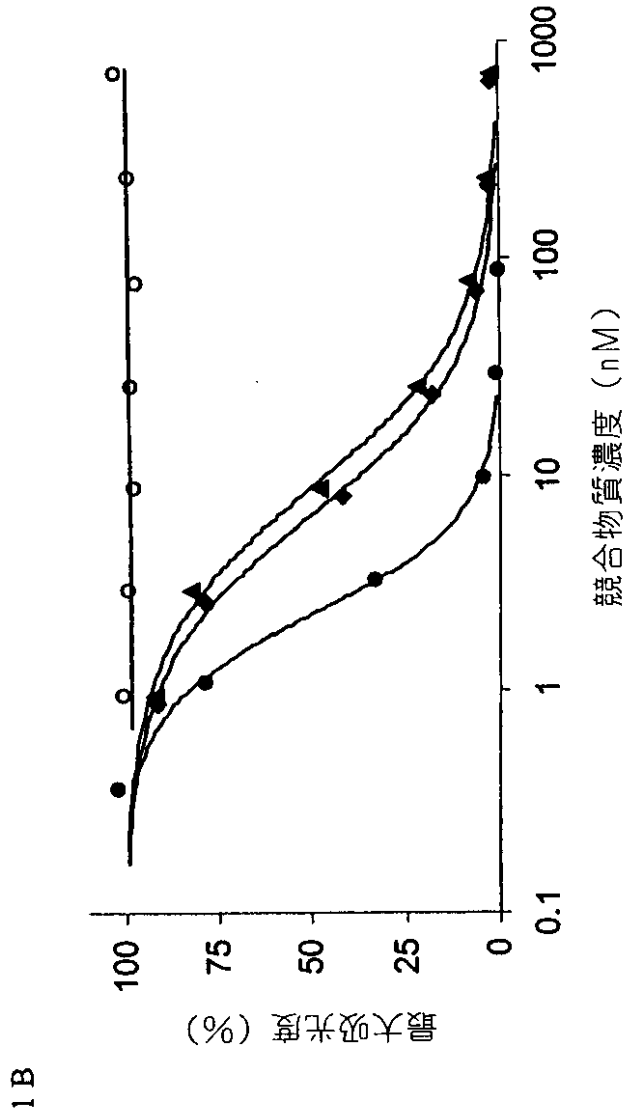
【補正の内容】

【図1A】

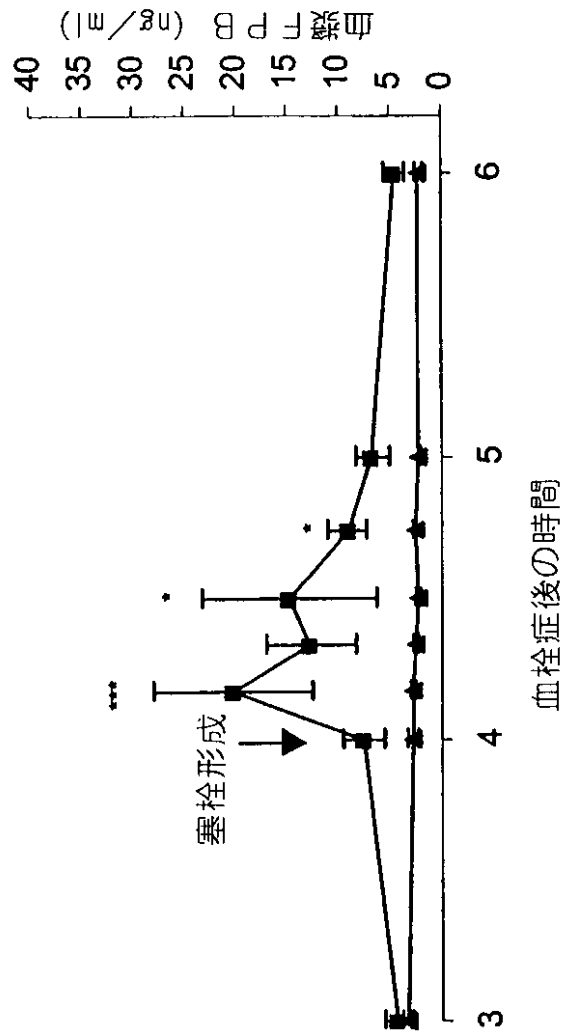
Figures  
1A



【圖 1 B】



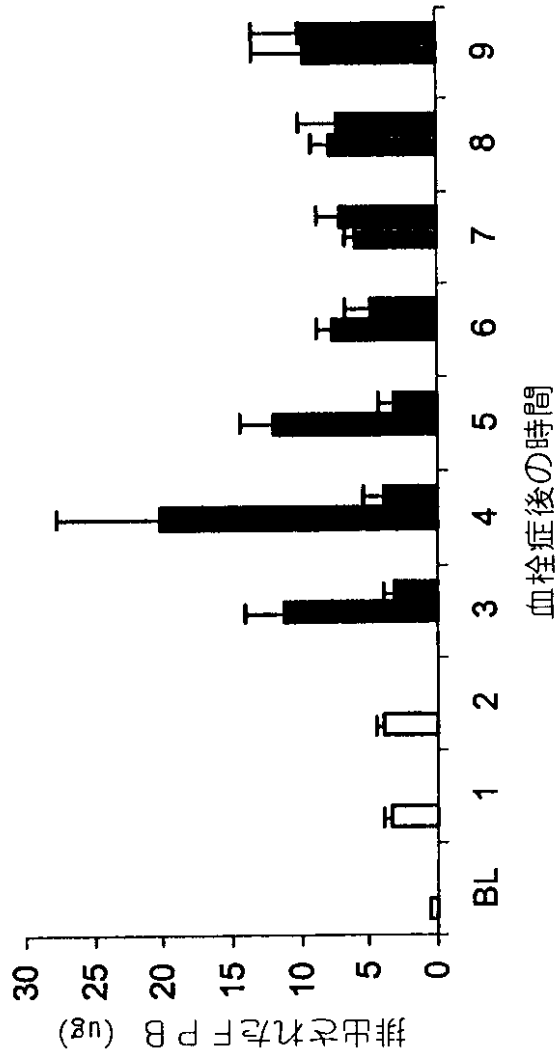
【図2】



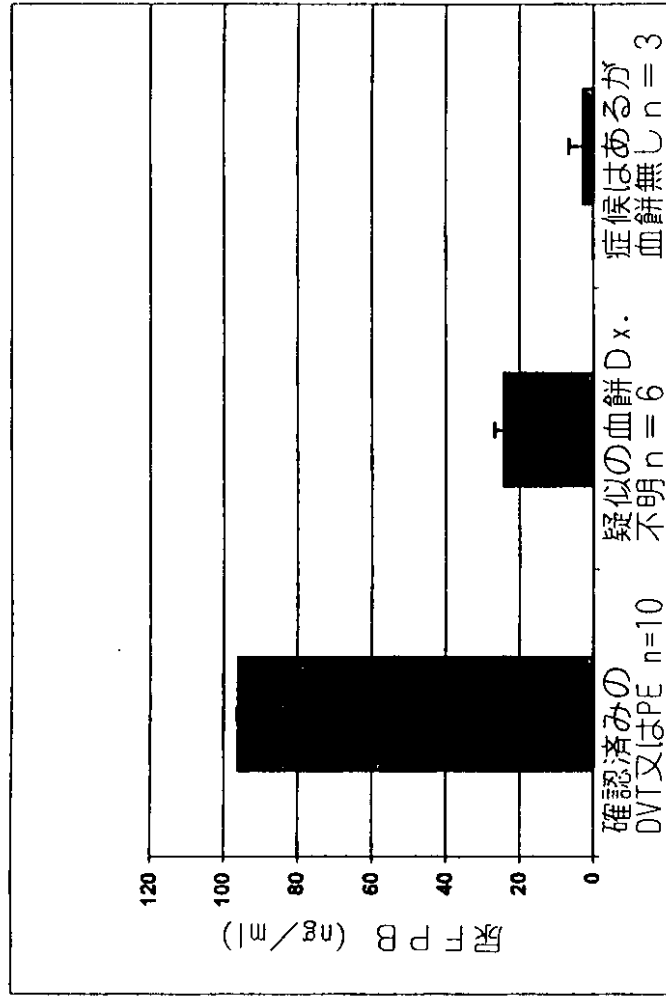
2.

【図3】

3.



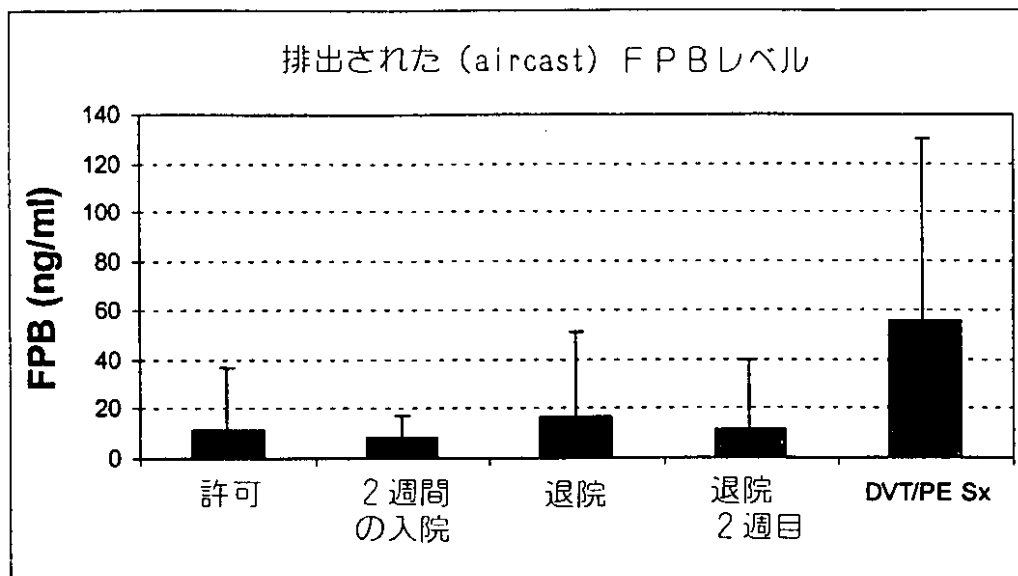
【図4】



4.

【図5】

5.



TP-1	TP-2	TP-3	TP-4	TP-5	
11.611	8.409	16.564	10.918	55.589	平均値
25.43599	9.198792	34.35118	29.18733	74.97536	標準偏差
1.759444	3.066264	3.122835	4.35099	43.28705	標準誤差
209	9	121	45	3	n
許可	2週間の入院	退院	退院2週目	DVT/PE Sx	

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/17977
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/75 C07K16/36 C12N5/06 G01N33/86 G01N33/532		
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 C07K 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, MEDLINE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, STRAND, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 99 05176 A (NEW YORK BLOOD CENTER INC) 4 February 1999 (1999-02-04) the whole document	15-24, 28-40 1-14, 25-27, 41-51
Y	----- DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; KAIZU K ET AL.: "ROLE OF INTRARENAL COAGULATION AND ANTICOAGULANT THERAPY IN THE PROGRESSION OF DIABETIC NEPHROPATHY" retrieved from STN XP002154952 abstract & NIPPON JINZO GAKKAI SHI JAPANESE JOURNAL OF NEPHROLOGY (1993 JAN) 35 (1) 35-42, ----- -/--	25-27, 41-49,51
<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		'*I' 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. '*B' document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  8 December 2000		Date of mailing of the international search report  21/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Cervigni, S

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/17977

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE MEDLINE 'Online!  US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM),  BETHESDA, MD, US;  SHIBATA K ET AL.: "INTRAGLOMERULAR  COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN HUMAN  PRIMARY GLOMERULAR DISEASES"  retrieved from STN  XP002154953  abstract  &amp; NIPPON JINZO GAKKAI SHI JAPANESE JOURNAL  OF NEPHROLOGY (1991 AUG) 33 (8) 719-29,</p>	25-27, 41-49,51
Y	<p>K Y HUI ET AL: "Monoclonal Antibodies to  a Synthetic Fibrin-Like Peptide Bind to  Human Fibrin but Not Fibrinogen"  SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE  ADVANCEMENT OF SCIENCE,,  vol. 222, 1 September 1983 (1983-09-01),  pages 1129-1132, XP002080953  ISSN: 0036-8075  page 1130, column 1, paragraph 1</p>	1-14,50
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1991  NAIM J O ET AL: "THE GENERATION OF  ANTIBODY IN MICE TO TUFTSIN A NATURALLY  OCCURRING PHAGOCYTOSIS STIMULATING  TETRAPEPTIDE"  Database accession no. PREVI99192088050  XP002154954  abstract  &amp; IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS,  vol. 20, no. 4, 1991, pages 351-364,  ISSN: 0882-0139</p>	1-14,50
A	<p>WILNER G D ET AL: "IMMUNOCHEMICAL  ANALYSIS OF RABBIT ANTIHUMAN  FIBRINOPEPTIDE B ANTIBODIES"  BIOCHEMISTRY,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY,  EASTON, PA,  vol. 18, no. 23, 1979, pages 5078-5082,  XP002914823  ISSN: 0006-2960  the whole document</p>	3-24, 28-40,50

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/17977
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BILEZIKIAN S B ET AL: "RADIOIMMUNOASSAY OF HUMAN FIBRINOPEPTIDE BETA AND KINETICS OF FIBRINOPEPTIDE CLEAVAGE BY DIFFERENT ENZYMES"            JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION,US,NEW YORK, NY,            vol. 56, no. 2, August 1975 (1975-08),            pages 438-445, XP002914824            ISSN: 0021-9738            the whole document</p>	3-24, 28-40,50
A	<p>US 5 807 538 A (BUTTRAM SCOTT ET AL)            15 September 1998 (1998-09-15)            example 1</p>	3-24, 28-40,50
A	<p>OWENS R J ET AL: "THE GENETIC ENGINEERING OF MONOCLONAL ANTIBODIES"            JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM,            vol. 168, 1994, pages 149-165, XP002914829            ISSN: 0022-1759</p>	

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

information on patent family members

International Application No.  
PCT/US 00/17977

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9905176 A	04-02-1999	US 5876947 A	02-03-1999
		AU 8503898 A	16-02-1999
		EP 1007570 A	14-06-2000
US 5807538 A	15-09-1998	US 6017510 A	25-01-2000
		US 5711931 A	27-01-1998
		AU 683015 B	30-10-1997
		AU 4043893 A	05-10-1993
		CA 2131816 A	14-09-1993
		EP 0630265 A	28-12-1994
		JP 7504902 T	01-06-1995
		WO 9317719 A	16-09-1993
		US 5989519 A	23-11-1999
		US 5965107 A	12-10-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
C 1 2 N	5/06	G 0 1 N	33/53	L
	5/10		33/563	
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N	5/00	E
	33/563			B
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C U , C Z , D E , D K , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			

专利名称(译)	血栓形成或血栓栓塞性疾病的诊断测试		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003503425A</a>	公开(公告)日	2003-01-28
申请号	JP2001507103	申请日	2000-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学校董会		
[标]发明人	モーリスティモシーエー		
发明人	モーリス, ティモシー エー.		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/745 C07K14/75 C07K14/795 C07K16/36 C07K19/00 C12N5/06 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/563 G01N33/86		
CPC分类号	G01N33/86 C07K14/75 C07K16/36 G01N2333/75		
FI分类号	C07K14/745.ZNA A01K67/027 C07K14/795 C07K16/36 C07K19/00 G01N33/53.L G01N33/563 C12N5/00.E C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA00 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA65 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/141734 1999-06-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

通过在蛋白质样品中是否存在B来检测或监测血栓形成或血栓栓塞性疾病。

