

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-538352

(P2013-538352A)

(43) 公表日 平成25年10月10日 (2013. 10. 10)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	K	4 B O 6 3
GO 1 N 33/543	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	D	
C 1 2 Q 1/04	(2006. 01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 A	
		C 1 2 Q 1/04		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

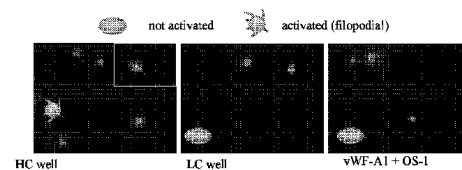
(21) 出願番号	特願2013-528698 (P2013-528698)	(71) 出願人	504456798
(86) (22) 出願日	平成23年9月19日 (2011. 9. 19)		サノファイ
(85) 翻訳文提出日	平成25年5月2日 (2013. 5. 2)		フランス国、エフ - 7 5 0 0 8 ・ パリ、リ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/066200		ユ・ラ・ボエティ・5 4
(87) 国際公開番号	W02012/038370	(74) 代理人	100127926
(87) 国際公開日	平成24年3月29日 (2012. 3. 29)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	10306008.3	(74) 代理人	100140132
(32) 優先日	平成22年9月21日 (2010. 9. 21)		弁理士 竹林 則幸
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	メルシー・デ ホープ
			ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフル
			ト・アム・マイン、サノフィー・アベンティ
			ス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・
			ハー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 相互作用パートナーとの血小板の相互作用を検出及び／又は定量化するための方法

(57) 【要約】

本発明は、相互作用パートナーとの血小板又は血小板表面分子の相互作用を検出及び／又は定量化するための方法、相互作用パートナーとの血小板又は血小板表面分子の相互作用を調節する試験物質の能力を検出及び／又は定量化するための方法、並びに製品に言及する。

Fig. 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血小板又は血小板表面分子と相互作用パートナーとの相互作用を検出及び／又は定量化するための方法であって、

(a) レーザー走査又は蛍光サイトメトリー又は顕微鏡検査による光学的分析に適したマルチウェルプレートを準備する工程[ここでプレートの1つ又はそれ以上のウェルは、血小板表面分子の相互作用パートナーでコーティングされる]；

(b) 標識された血小板を、

i) 1つ又はそれ以上の相互作用パートナーでコーティングされたウェル及び i i、i i i 又は i v のうちの1つ又はそれ以上；

i i) 血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用せず又は強く相互作用しないことが知られている1つ又はそれ以上の分子でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの1つ又はそれ以上のウェル；

i i i) 血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用することが知られている1つ又はそれ以上の分子でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの1つ又はそれ以上のウェル；

i v) 血小板に結合するが活性化しないことが知られている1つ若しくはそれ以上の分子でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの1つ又はそれ以上のウェル[I I I 及び I v は同じであってもよい]と接触させる工程；

(c) ウェルを洗浄して未結合の血小板を除去する工程；

(d) ウェル又はプレートの予め選択された領域においてレーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより；

i) 血小板の総数、及び／又は

i i) 活性化された血小板の数

を検出する工程；

を含み、

ここで強い血小板相互作用を有する相互作用パートナーは、低コントロールと比較して検出された血小板の増加、及び／又は低コントロールと比較して活性化された血小板の増加に基づいて同定され得、一方弱い又は低い血小板相互作用を有するパートナーは、高コントロールと比較して検出された血小板の減少及び／又は高コントロールと比較して活性化された血小板の減少に基づいて同定され得る、上記方法。

【請求項 2】

以下のパラメーター；

a) 弱くなった蛍光シグナルを有する血小板の数

b) 異常な形態(断片)を有する血小板の数

c) 異常なレッドシフトした蛍光を有する物体(大型赤色物質)の数

のうちの1つが決定され、かつ

ここで請求項 1 の b i i i) 又は i v) と比較して、請求項 1 の b i) について検出された a、b 又は c のうちのいずれかの増加が、相互作用パートナーの毒性又は異常な作用についての識別子としての役割を果たす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

血小板又は血小板表面分子の相互作用パートナーとの結合を調節する試験物質の能力を検出及び／又は定量化するための方法であって、以下；

(a) レーザー走査又は蛍光サイトメトリー又は顕微鏡検査による光学的分析に適したマルチウェルプレートを準備する工程[ここでプレートの1つ又はそれ以上のウェルは、血小板表面分子の相互作用パートナーでコーティングされる]；

(b) 標識された血小板を；

i) 1つ又はそれ以上の相互作用パートナーでコーティングされたウェル、及び場合

により i i、i i i 又は i v のうちの 1 つ又はそれ以上：

i i) 血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用せず又は強く相互作用しないことが知られている 1 つ又はそれ以上の分子でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの 1 つ又はそれ以上のウェル；

i i i) 血小板と特異的に相互作用せず若しくは強く相互作用せず、かつ / 又は血小板を活性化しないことが知られている血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用することが知られている 1 つ又はそれ以上の分子でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの 1 つ又はそれ以上のウェル；

i v) 血小板に結合するが活性化しないことが知られている 1 つ又はそれ以上の分子でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの 1 つ又はそれ以上のウェル [I I I 及び I v は同じであってもよい]

と接触させる工程；

(c) 試験物質を血小板と接触させる工程；

(d) ウェルを洗浄して未結合の血小板を除去する工程；

(e) ウェル又はプレートの予め選択された領域において、レーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより血小板の総数を検出する工程；及び場合により

(f) ウェルの予め選択された領域において、レーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより、以下のパラメーター I、i i、i i i 又は i v のうちの 1 つ又はそれ以上を検出する工程；

i) 弱くなった蛍光シグナルを有する血小板の数；

i i) 異常な形態を有する血小板の数；

i i i) 異常なレッドシフトした蛍光を有する物体の数；

i v) 活性化された血小板の数；並びに

(g) (e) 及び場合による (f) に従う値と、試験物質を加えずに生成された 1 つ又はそれ以上の参照値とを比較する工程；

を含み、

ここで試験物質を用いて検出された値と試験物質を用いずに検出された値との間の差が、該試験物質が血小板表面分子又は血小板の結合を調節可能であることを示す、上記方法。

【請求項 4】

f) i、i i 又は i i i のうちの 1 つ又はそれ以上が検出され、ここで試験物質を含まない参照サンプルと比較して、f) i、i i、i i i 又は i v) の値の 1 つ又はそれ以上との間の増加は試験物質の毒性作用を示す、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

f) i v に従う活性化された血小板の数が検出され、試験物質を含まない参照サンプルと比較した間の増加が試験物質の血小板活性化効果を示す、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

血小板が、試験物質及び血小板をコーティングされたプレートと接触させる前に試験物質と混合される、請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

血小板が、以下：カルセイン - A M、C M F D A (5 - クロロメチルフルオレセインジアセテート)、P K H 6 7、レサズリン、ラバセル、(固定可能) F M 1 - 4 3、ナノ - オレンジ又は蛍光標識されたファロイジン [顕微鏡検査 / サイトメトリーにおいて検出可能なシグナルを与えるように規定される標識 / 色素] のうちの 1 つのような蛍光色素で標識される、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

血小板表面分子が、G P 1 b、コラーゲン受容体、P A R 1、P A R 4、P 2 Y プリン受容体 1、P 2 Y プリン受容体 1 2、接合部接着分子 A (J A M A)、J A M C のような血小板表面タンパク質である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

血小板表面受容体の相互作用パートナーが、天然に存在する相互作用パートナー、その機能的誘導体若しくはフラグメント、又は合成相互作用パートナーである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

相互作用パートナーが、以下：フォン・ビルブランド因子 1 (vWF - 1)、vWF - 1 の A 1 ドメイン、コラーゲン、フィブリノーゲン、プロテイン c、Mac - 1 ($\alpha M \beta 2$)、P - セレクチン、(CD 6 2 P)、高分子量キニノーゲン、トロンボスポンジン - 1、可溶性 GPVI)、PSGL 1、又はこれらのうちのいずれかの機能的フラグメント若しくは誘導体のうちの 1 つである、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

マルチウェルプレートが、96 ウェル、386 ウェル又は 1536 ウェルのプレートであり、好ましくは 386 ウェルプレートである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法についての指示を含む説明書を含んでなる製品。

【請求項 13】

物質が哺乳動物に対して毒性である可能性があるかどうかを決定する方法であって、
a) 該哺乳動物と同じ種の一員である対象からの血小板サンプルを準備する工程；
b) フォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントを準備する工程；
c) 血小板をフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントと混合する工程；
d) 血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性を決定する工程；
e) 物質を、フォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントと共に血小板と混合する工程；及び
f) 血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性を決定する工程；
を含み、

20

30

ここで血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の親和性が、物質が存在しない場合よりも物質の存在下でより低い場合、該物質は該哺乳動物に対して毒性である可能性がある、上記方法。

【請求項 14】

フォン・ビルブランド因子のフラグメントが配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

フォン・ビルブランド因子のフラグメントが、配列番号 1 の核酸配列を含むポリヌクレオチドから翻訳される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

工程 c) の混合がマルチウェルプレートのウェル中で行なわれる、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 17】

フォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントがマルチウェルプレートのウェル上にコーティングされる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

血小板が工程 c) の後でかつ工程 d) の前に洗浄される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性が、血小板の洗浄後に残っている血小板の数を検出することにより測定される、請求項

50

18に記載の方法。

【請求項20】

血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性が、血小板の洗浄後に活性化状態にある血小板の数を検出することにより測定される、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

工程e)の混合がマルチウェルプレートのウェル中で行なわれる、請求項13に記載の方法。

【請求項22】

フォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントがマルチウェルプレートのウェルにコーティングされる、請求項21に記載の方法。

10

【請求項23】

血小板が工程c)の後でかつ工程d)の前に洗浄される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性が、血小板の洗浄後に残っている血小板の数を検出することにより測定される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性が、血小板の洗浄後に活性化状態にある血小板の数を検出することにより測定される、請求項22に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

本発明は、相互作用パートナーとの血小板又は血小板表面分子の相互作用を検出及び/又は定量化するための方法、相互作用パートナーとの血小板又は血小板表面分子の相互作用を調節する試験物質の能力の検出及び/又は定量的ための方法、並びに製品に関する。

【背景技術】

【0002】

30

第一世界の国々において最もよくある死因は冠動脈血栓症により引き起こされる急性心筋梗塞である。血小板付着及び血栓形成は創傷治癒に不可欠な複雑なプロセスである。血餅の形成は通常は組織損傷の結果であり、これが血小板付着/凝集及び凝固カスケードを開始し、そして創傷治癒中の血流を遅くするか防止する効果を有する。しかし、特定の疾患状態において、循環系内の血餅の形成は望ましくない程度に達し、そしてそれ自体が病理的な結果をもたらす可能性のある病的状態の原因である。循環血小板は粘着性になり、そしてプラーク破綻後のアテローム硬化性病変への曝露により、又は病理的ずり応力に応じて閉塞性血栓を形成する。

【0003】

多くの粘着性タンパク質及び様々な受容体がこの複雑な進展に関与する。

40

【0004】

1つの重要な粘着性血漿タンパク質は、2050アミノ酸の成熟サブユニットを有する多量体糖タンパク質であるフォン・ビルブランド(van Willebrand)因子(vWF)である。vWFの配列は当該分野で公知である。遺伝子Xの配列は当該分野で公知である。vWFのコードポリヌクレオチド配列は、NCBIヌクレオチドデータベースで受入番号NM_000552.3で公的に入手可能である。vWFのタンパク質配列は、NCBIタンパク質データベースで受入番号NP_00543.2で公的に入手可能である。NCBIは国立のバイオテクノロジー情報センターである(郵便宛て先: National Centre for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA; ウェブアドレス: www.ncbi.org)、(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3524673)も参照のこと。vWFのクローニング及びそ

50

のアミノ酸配列は非特許文献 1 においてさらに公開されている。

【0005】

vWFについては2つの血小板膜糖タンパク質受容体が同定されている。非活性化血小板は血小板GPIb複合体を介してvWFに結合する。この相互作用は、高いずり(shear)により、又はvWFのいずれかの表面への結合により生理的に誘導される。続いてvWFはコンホメーションを変化させ、そして相互作用が可能となるようにA1結合ドメインを示す。活性化の後、血小板はvWFに対する第二の結合部位、GPIIb - IIIa複合体を表し、これはフィブリノゲンの結合部位でもある。血小板活性化は、最終的に強固な血小板付着をもたらす増幅機構を誘導する。

【0006】

血小板付着におけるGPIbの本質的な役割は、抗体の使用、及び血小板からのGPIbが存在しない遺伝的欠損であるベルナル・スーリエ症候群における観察により確立された。ベルナル・スーリエ病患者由来の血小板は付着が不十分であり、そしてvWFに応じて穏やかに凝集する。また、GPIb及びvWFの(ob)相互作用を調節する多数のヘビ毒タンパク質が報告されている。

【0007】

モノクローナル抗体又はヘビ毒タンパク質を使用する、GPIbのvWFに対する相互作用の特異的阻害は、動脈損傷又は血栓性合併症により引き起こされる血栓形成を制御する効果的な手段である。小さいペプチドがGPIb - vWF相互作用の有効な阻害剤であることを示唆する実験的証拠もある(非特許文献2)。GPIb - vWF相互作用の阻害が、既に発売されているGPIIb - IIIaの抗体アプシキシマブよりも広い安全域で血栓形成を阻害するということを示唆する実験的証拠もある(非特許文献3)。しかし、GPIb - vWF相互作用を阻害し、そしてそれ故血栓形成を阻害するための、患者に利用可能な薬物は未だ存在しない。

【0008】

血栓形成を制限又は予防するための安全かつ有効な治療用抗血栓剤は継続して必要とされており、血栓事象の減少を出血事象の増加と(どのようにしても可能な限り)分離させることができる薬剤のような新規な薬剤についてスクリーニングすることは非常に望ましい。1つのアプローチは、GPIb - vWF相互作用の阻害のような血栓形成における初期の段階を標的とする薬剤の探索である。さらに、他の分子との血小板の相互作用及び/又は血小板の活性化に関与する多くの他の血小板表面分子があり(例えばプロテイナーゼ活性化受容体1(PAR1)、血小板糖タンパク質VI(GPVI)、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 、5 - ヒドロキシトリプタミン受容体2A (5HT_{2A})、及びプロスタグランジンE2受容体EP3サブタイプ(EP₃)など)、それらは新しく安全な抗血栓治療のための望ましい標的だろう。

【0009】

従って、特異的調節因子、特に血小板又は血小板表面分子の結合パートナー(大部分は受容体又はリガンド)との相互作用の阻害剤に対する多大な必要性が存在する。

【0010】

血小板阻害剤のための最先端のスクリーニング方法は主に、ずり応力下又は静止状態で特定の相互作用パートナー(例えばフィブリノゲン)に付着する血小板の能力を検定する(例えば非特許文献4を参照のこと、これらの開示は本明細書中に加入されるべきである)。しかしこれらの方法は、試験された試験物質により誘導される毒性作用の同定が大部分できていない。従って、最先端のハイスループットアッセイを用いて同定された活性試験物質の多くは毒性及び他の望ましくない効果を有し、従って上記の望ましくない特性を示す調節因子を識別するために大規模で費用のかかる二次プロファイリング又は対比スクリーニングキャンペーン(counter - screening campaigns)を必要とする。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Biochemistry. 1986 Jun 3; 25(11): 3171 - 84. : Amino acid sequence of human von Willebrand factor, Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade R

10

20

30

40

50

D, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K.

【非特許文献2】Benard, S.A., Smith, T.M., Cunningham, K., Jacob, J., DeSilva, T., Lin, L., Shaw, G.D., Kriz, R., Kelleher, K.S., Biochemistry 47 (16) 4674, 2008

【非特許文献3】Kageyama, S.; Yamamoto, H.; Nakazawa, H., Yoshimoto, R. Thromb. Res. 101 (2001) 395 - 404

【非特許文献4】Blue et. al. 「Application of high - throughput screening to identify a novel α IIb - specific small - molecule inhibitor of α IIb3 - mediated platelet interaction with fibrinogen」, Blood, p, 1. February 2008, Volume 111, Number 3, p.1248 - 1256 (2008)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

従って本発明の目的は、迅速で、かつ血小板毒性のような望ましくない副作用の同定を可能にする、血小板を調節する試験物質のスクリーニング方法を提供することである。この目的は、本発明に従う方法により解決される。

【課題を解決するための手段】

【0013】

要旨

本開示は、血小板又は血小板表面分子と相互作用パートナーとの相互作用を検出及び/又は定量化するための方法を提供し、本方法は以下の工程：(a) レーザー走査又は蛍光サイトメトリー又は顕微鏡検査による光学的分析に適したマルチウェルプレートを準備する工程[ここでプレートの1つ又はそれ以上のウェルは、血小板表面分子の相互作用パートナーでコーティングされている]；(b) 標識された血小板を、i) 1つ又はそれ以上の相互作用パートナーでコーティングされたウェル及びii、iii又はivのうちの1つ又はそれ以上；ii) 血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用せず又は強く相互作用しないことが知られている1つ又はそれ以上の分子(低コントロール)でコーティングされた、上記のマルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの1つ若しくはそれ以上のウェル；iii) 血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用することが知られている1つ又はそれ以上の分子(高コントロール)でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの1つ又はそれ以上のウェル；iv) 血小板に結合するが活性化しないことが知られている1つ又はそれ以上の分子(活性化コントロール)でコーティングされた、上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの1つ又はそれ以上のウェル[III及びIVは同じであってもよい]と接触させる工程；(c) ウェルを洗浄して未結合の血小板を除去する工程；(d) ウェル又はプレートの予め選択された領域においてレーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより：i) 血小板の総数、及び/又はii) 活性化された血小板の数を検出する工程を含み、ここで強い血小板相互作用を有する相互作用パートナーは、低コントロールと比較して多数の検出された血小板、及び/又は低コントロールと比較して多数の活性化された血小板に基づいて同定され得るのに対して、弱い又は低い血小板相互作用を有するパートナーは、高コントロールと比較して少数の検出された血小板及び/又は高コントロールと比較して少数の活性化された血小板に基づいて同定され得る。

20

30

40

【0014】

本方法の特定の実施態様において、以下のパラメーター：1) 弱くなった蛍光シグナルを有する血小板の数、2) 異常な形態(断片)を有する血小板の数、又は3) 異常なレッドシフトした蛍光を有する物体の数(大型赤色物質)；のうちの1つが決定され、ここで上記のb ii iii) 又はiv) (高コントロール又は活性化コントロール)と比較して、上記のb i) について1、2又は3のうちのいずれかにおいて多数が検出されることは、相互作用パートナーの毒性又は異常な効果についての識別子としての役割を果たす。

【0015】

50

本開示はまた、血小板又は血小板表面分子の相互作用パートナーとの結合を調節する試験物質の能力を検出及び／又は定量化するための方法を提供し、本方法は、以下の工程：

(a) レーザー走査又は蛍光サイトメトリー又は顕微鏡検査による光学的分析に適したマルチウェルプレートを準備する工程〔ここでプレートの1つ又はそれ以上のウェルは、血小板表面分子の相互作用パートナーでコーティングされている〕；(b) 標識された血小板を：i) 1つ若しくはそれ以上の相互作用パートナーでコーティングされたウェル、及び場合により ii) i) 若しくは ii) i) 若しくは iii) v) のうちの1つ若しくはそれ以上；ii) i) 血小板若しくは血小板表面分子と特異的に相互作用せずかつ／若しくは強く相互作用しないことが知られている1つ若しくはそれ以上の分子（低コントロール）でコーティングされた、(c) 上記マルチウェルプレート若しくはさらなるマルチウェルプレートの1つ若しくはそれ以上のウェル；ii) i) 血小板と特異的に若しくは強く相互作用せず、かつ／若しくは活性化しないことが知られている血小板若しくは血小板表面分子と特異的に相互作用することが知られている1つ若しくはそれ以上の分子（高コントロール）でコーティングされた、上記マルチウェルプレート若しくはさらなるマルチウェルプレートの1つ若しくはそれ以上のウェル；又は iii) v) 血小板に結合するが活性化しないことが知られている1つ若しくはそれ以上の分子（活性化コントロール）でコーティングされた、上記マルチウェルプレート若しくはさらなるマルチウェルプレートの1つ若しくはそれ以上のウェル〔III及びIVは同じであってもよい〕と接触させる工程；(c) 試験物質を血小板と接触させる工程；(d) ウェルを洗浄して未結合の血小板を除去する工程；(e) ウェル又はプレートの予め選択された領域において、レーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより血小板の総数を検出する工程；及び場合により (f) ウェルの予め選択された領域において、レーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより、以下のパラメーターI、ii) i) i) 又は iii) v) のうちの1つ又はそれ以上を検出する工程：i) 弱くなった蛍光シグナルを有する血小板の数；ii) i) 異常な形態（断片）を有する血小板の数；ii) i) 異常なレッドシフトした蛍光を有する物体（大型赤色物質）の数；iii) v) 活性化された血小板の数；並びに (g) (e) 及び場合により (f) に従う値と、試験物質を加えずに生成された1つ又はそれ以上の参照値とを比較する工程を含み、ここで試験物質を用いて検出された値と試験物質を用いずに検出された値との間の差は、その試験物質が血小板表面分子又は血小板の結合を調節することができることを示す。

10

20

30

【0016】

この方法の一実施態様において、f) i) i) 又は ii) i) i) (or iii) or) のうちの1つ又はそれ以上が検出され、ここで試験物質を含まない参照サンプルと比較して、f) i) i) i) i) 又は iii) v) の値の1つ又はそれ以上との間の増加は試験物質の毒性作用を示す。別の実施態様において、f) iii) v) に従う活性化された血小板の数が検出され、ここで試験物質を含まない参照サンプルと比較した間の増加が試験物質の血小板活性化効果を示す。

【0017】

本開示はまた、血小板が、試験物質及び血小板をコーティングされたプレートと接触させる前に試験物質と混合され得る、上記の方法のいずれかに従う方法を提供する。さらに、上記の方法のいずれかについて、血小板は以下のうちの1つのような蛍光色素で標識され得る：カルセイン-AM、CMFDA（5-クロロメチルフルオレセインジアセテート）、PKH67、レサズリン、ラバセル（Lavacell）、（固定可能）FM1-43、ナノ-オレンジ（Nano-Orange）又は蛍光標識されたファロイジン。さらに、上記の方法のいずれかについて、血小板表面分子は、GP1b、コラーゲン受容体、PAR1、PAR4、P2Yプリン受容体1、P2Yプリン受容体12、接合部付着分子A（JAMA）、又はJAMCのような血小板表面タンパク質であり得る。さらに、上記の方法のいずれかについて、血小板表面受容体の相互作用パートナーは、天然に存在する相互作用パートナー、その機能的誘導体若しくはフラグメント、又は合成相互作用パートナーであり得る。さらに、上記の方法のいずれかについて、相互作用パートナーは、以下：フォン・ビルブランド（van Willebrand）因子1（vWF-1）、vWF-1のA1

40

50

ドメイン、コラーゲン、フィブリノゲン、プロテイン c、Mac - 1 ($\alpha M \beta 2$)、P - セレクチン、(CD 6 2 P)、高分子量キニノーゲン、トロンボスポンジン - 1、可溶性 GPVI)、PSGL 1、又はこれらのうちのいずれかの機能的フラグメント若しくは誘導体のうちの 1 つであり得る。さらに、上記の方法のいずれかについて、マルチウェルプレートは、96 ウェル、384 ウェル又は 1536 ウェルのプレートであり得、好ましくは 384 ウェルプレートである。

【0018】

本開示はまた、上記の方法のいずれかについての指示を含む説明書 (leaflet) を含んでなる製品を提供する。

【0019】

本開示はまた、物質が哺乳動物に対して毒性である可能性があるかどうかを決定する方法を提供し、本方法は、その哺乳動物と同じ種の一員である対象からの血小板サンプルを準備すること；フォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントを準備すること；血小板をフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントと混合すること；血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性を決定すること；物質を、フォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントと共に血小板と混合すること；及び血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性を決定すること；を含み、ここで血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の親和性が、物質が存在しない場合よりも物質の存在下でより低い場合、その物質は哺乳動物に対して毒性である可能性がある。

【0020】

特定の実施態様において、フォン・ビルブランド因子のフラグメントは配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。他の実施態様において、フォン・ビルブランド因子のフラグメントは配列番号 1 の核酸配列を含むポリヌクレオチドから翻訳される。

【0021】

さらに、これらの工程の混合はいずれもマルチウェルプレートのウェルにおいて起こり得る。フォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントはマルチウェルプレートのウェルにコーティングされ得る。血小板は、血小板及びフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントを混合した後で、しかし決定する工程の前に洗浄され得る。血小板とフォン・ビルブランド因子タンパク質又はそのフラグメントとの間の結合親和性は、血小板の洗浄後に残っている血小板の数を検出することにより、又は血小板の洗浄後に活性化状態にある血小板の数を検出することにより測定され得る。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図 1】カルセイン AM 標識後にマイクロタイタープレートにおいて観察された血小板の形態。

【図 2】血小板付着のための (in for) vWF - A1 の最適量の決定。ウェルを単離された vWF - A1 でコーティング (白色バー) するか、コーティングしないか (青色バー)、又は BSA でコーティングした (黒色バー)。Z' 値を、低コントロールとしての BSA でコーティングされたウェルにおける血小板の数に対する、高コントロールとしての A1 でコーティングされたウェルにおける検出された血小板の数を使用して計算した。

【図 3】vWF - A1 (高コントロール (HC) 左)、BSA (低コントロール； LC、中央) のいずれかでコーティングされたウェル又は GPIb 特異的阻害剤 OS - 1 と共に高コントロール (HC) でコーティングされたウェル (右) 中に分配 (dispersion) した後の血小板の形態。画像は Olympus IX81 顕微鏡で 60x 又は 100x 対物レンズ (objectives) を適切なフィルターと共に使用して撮影した。

【図 4】付着していない血小板の洗浄後の低コントロールウェル (BSA のみでコーティングされた) の、Acumen により生成された 384 ウェルプレートのウェル画像。ウェルのいくつかの隅には矢印で示されたより多くの物質が付着したままになっている。

10

20

30

40

50

【図5】付着していない血小板を除去するために使用される様々な洗浄プログラムは、S/B及びアッセイの統計に重大な影響を有する。ウェルを、単離されたA1(「高コントロール」；白色バー)でコーティングするか、コーティングしない(青色バー)か、又はBSAでコーティングした(「低コントロール」；黒色バー)。Z'値を、低コントロールとしてのBSAでコーティングされたウェルにおける血小板の数に対する、高コントロールとしてのA1でコーティングされたウェルにおいて検出された血小板の数を使用して計算した。

【図6】付着していない血小板を除去するために最適化された洗浄機プログラムを使用して、70倍に匹敵するS/B(BSAに対してvWF-A1に付着した血小板の数)を、Z'値>0.6で得ることができた。これらの条件下で、OS-1(GPIbに結合してそのVWF-A1との相互作用を遮断するペプチド)を用いて、及びAK2(GP-Ibに対するマウスモノクローナル抗体)を用いて、ほぼ完全な阻害が得られる。

【図7】付着した血小板の数(白色バー)及びOS-1の計算されたIC50値(緑色三角形)に対する、コーティングに使用したvWF-A1の量の効果

【図8】プレートの安定性。長期の物質インキュベーション(緑色対青色柱状グラフ色調)及び最終洗浄工程とプレート読み取りとの間のプレートの安定性(緑色又は青色の強度)の効果。

【図9】30のプレートの完全自動化実行の間の、血小板-VWF-a1相互作用のS/B値、Z'値及びOS-1による阻害の値。最初、6番目、12番目、18番目、24番目及び最後のプレートのデータのみを示した。

【図10】血小板-A1相互作用に対して既知の毒性を有する試験物質に対する効果。

【図11】BSAをコントロールとして使用した、コラーゲン1に対する血小板相互作用のS/B値及びZ'値。最適化された条件を使用して、特異的小試験物質阻害剤及びコラーゲン受容体に対する抗体(ASC-2)は、コントロール(BSA)値に匹敵するレベルまで血小板の付着を遮断することができた。

【図12】血小板-コラーゲン1相互作用アッセイの6つの試験プレートのZ'値及びS/B値。

【図13】いくつかのサブグループから構成される69の試験物質の試験物質訓練セット(training set)のうちポジティブなものの配分。

【図14】毒性試験物質の存在しない場合(左)又は存在下(右)でのvWF-A1でコーティングされたウェルに付着している血小板の形態。血小板が細胞毒性特性を有する試験物質とインキュベートされた大部分のウェルにおいて、多くの小さな緑色蛍光物体が観察された。画像はOlympus IX81顕微鏡で60x対物レンズ並びに励起用に472/30nmフィルター及び発光を検出するために520/35nmフィルターを使用して撮影された。

【図15】毒性試験物質の同定。毒性試験物質で処理したウェル(C及びD)では、vWF-A1でコーティングされたウェルにおいて観察された典型的な緑色蛍光血小板の代わりに、小さい蛍光性物質が検出され得る(B)。さらに、正常形態を有する血小板の頻度は、BSAでコーティングされたコントロールウェルと比較して低かった(A)。これらの小物体をより明瞭にするために同様に(in like)印を付けた。血小板が毒性試験物質と共にインキュベートされたいくつかのウェルでは血小板はより不鮮明であった(Cを参照のこと)。

【図16】X軸に示される異なる処理を区別するその能力についての、特徴「血小板として同定された物体の緑色発光の平均強度の中央値」(血小板の定義については「Acumen読み取り(reading)」の項を参照のこと)の箱ヒゲ図を示す。「高」及び「低」という分類は、それぞれ中性(高)-及び刺激薬(低)コントロールグループを表す。

【図17】全ての(43)可能な特徴の相関プロットを示す。色コードは相関の程度を示す(緑色は-1であり、黒色は約0であり、そして赤色は1である)。

【図18】構築された分類子について最も関連した特徴の重要度解析の結果を示す。

【図19】特異値分解の最初の3つの成分を示す。第2成分は主に中性コントロールと刺激薬コントロールを分離する。ポジティブOS1参照コントロールは明らかに刺激薬コントロールの領域(werea)に分散している。推定毒性試験物質の大部分は中性コントロールの領域(werea)の辺りに分散していた。試験(test test)物質は $0.025 > \text{第2成分} < 0.0$

10

20

30

40

50

75の辺りに広がっており、潜在的阻害剤として検出されるかもしれないが、それらは潜在的毒性試験物質と同様であった。

【図20】刺激薬コントロール及び中性コントロール状態についての推定毒性試験物質の階層的クラスター分析の結果を示す。クラスター分析に基づいて推定毒性試験物質グループ3(青色)、5(橙色)及び6(褐色)が分類子の構築のために選択された。

【図21】選択されたグループ(中性コントロール、刺激薬コントロール、OS1参照、樹木の(tree)異なるツール試験物質及び3つの推定毒性試験物質)を示す。それぞれの単一のグループについて、12の次元データベクトル(dimensional data vector)を星形プロット(star plot)として表す。各セグメントの高さ是对応する測定値の、率に応じて調整し正規化した値を表す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

詳細な説明

本発明は、血小板又は血小板表面分子(例えばGP1b)のそれらの相互作用パートナー(例えばvWF)との相互作用を調節する新規な試験物質の同定のための改善されたアッセイ方法を提供することにより上記の必要性を満たし、ここで望ましくない副作用、例えば試験物質の血小板毒性が並行してモニタリングされ得る。

【0024】

一実施態様によれば、本発明は、血小板又は血小板表面分子と相互作用パートナーとの相互作用を検出及び/又は定量化するための方法に関し、本方法は、

(a) レーザー走査サイトメトリー若しくは顕微鏡検査による、又は蛍光サイトメトリー若しくは顕微鏡検査による光学的分析に適したマルチウェルプレートを準備する工程[ここでプレートの1つ又はそれ以上のウェルは、血小板表面分子の相互作用パートナーでコーティングされる]；

(b) 標識された血小板を、

i) 1つ又はそれ以上の相互作用パートナーでコーティングされたウェル及びi i、i i i又はi vのうちの1つ又はそれ以上；

i i) 血小板若しくは血小板表面分子と特異的に相互作用せず若しくは強く相互作用しないことが知られている1つ若しくはそれ以上の分子(低コントロール)でコーティングされた、(上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの)1つ若しくはそれ以上のウェル；

i i i) 血小板と特異的に相互作用せず若しくは強く相互作用せず、かつ/又は活性化しないことが知られている血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用することが知られている1つ又はそれ以上の分子(高コントロール)でコーティングされた、(上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの)1つ又はそれ以上のウェル；

i v) 血小板に結合するが活性化しないことが知られている1つ又はそれ以上の分子(活性化コントロール)でコーティングされた、(上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの)1つ又はそれ以上のウェル[I I I及びI vは同じであってもよい]

と接触させる工程；

(c) ウェルを洗浄して未結合の血小板(すなわち、相互作用パートナーと特異的に相互作用しなかった血小板)を除去する工程；

(d) ウェル及び/又はプレートの予め選択された領域(ここで、プレート及び/又は各ウェルの一部又は全体の領域が分析され得る)においてレーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより；

i) 血小板の総数(ここでb i)における血小板の数をb i i)における血小板の数で割り、100を掛けて、相互作用パートナーに特異的に結合した血小板のパーセンテージXを得る)、及び/又は

v) 活性化された血小板の数[ここでb i)、i i)、i i i)又はi v)のいずれかにおける血小板の数を、b i)、i i)、i i i)又はi v)のうちの同じものにおける活性化された血小板の数で

10

20

30

40

50

割り、100を掛けて、b i)、ii)、iii)又はiv)の各々における活性化された血小板のパーセンテージを得る]

を検出する工程；

を含み、

ここで強い血小板相互作用を有する相互作用パートナーは、低コントロールと比較して検出された血小板の増加、及び／又は低コントロールと比較して活性化された血小板の増加に基づいて同定され得るのに対して、弱いか又は低い血小板相互作用を有するパートナーは、高コントロールと比較して検出された血小板の減少及び／又は高コントロールと比較して活性化された血小板の減少に基づいて同定され得る。

【0025】

10

強い血小板結合相互作用を有する相互作用パートナーは、例えば

- ・多数の血小板、及び／又は
- ・多数の活性化された血小板

に基づいて同定され得る。

【0026】

弱いか低い血小板結合相互作用を有する相互作用パートナーは、

- ・少数の血小板、及び／又は
- ・少数の活性化された血小板

に基づいて同定され得る。

【0027】

20

本発明に従うこの方法は、新しい血小板相互作用パートナーの同定、さらには既知の血小板相互作用パートナーの分析も可能にし、ここで、分析に含まれるべきパラメーターに依存して、血小板相互作用加えて効果(例えば血小板毒性作用、血小板活性化など)も容易かつ迅速に検出され得る。分析しようとする血小板相互作用パートナーは、いずれの種類の分子又は分子複合体でも、1つより多くの分子でもよく、そしてまた以下に定義されるようないずれの種類の試験物質でも1つ又はそれ以上の試験物質を含む混合物であってもよい。

【0028】

このようなさらなる効果を分析及び検出する目的に向かって、以下のパラメーター：

a) 弱くなった蛍光シグナルを有する血小板の数

30

b) 異常な形態(断片)を有する血小板の数

c) 異常なレッドシフトした蛍光を有する物体(大型赤色物質(large red material))の数の1つ又は両方が決定され得、かつ

ここでb i i i)又はi v)(高コントロール又は活性化コントロール)と比較して、b i)についてa、b又はcのうちのいずれかにおける多数は、相互作用パートナーの毒性又は異常な効果についての識別子としての役割を果たす。

【0029】

本発明の別の局面は、血小板又は血小板表面分子の相互作用パートナーとの結合を調節する試験物質の能力を検出及び／又は定量化するための方法に言及し、本方法は、以下の工程：

40

(a) レーザー走査又は蛍光サイトメトリー又は顕微鏡検査による光学的分析に適したマルチウェルプレートを準備する工程[ここでプレートの1つ又はそれ以上のウェルは、血小板表面分子の相互作用パートナーでコーティングされている]；

(b) 標識された血小板を：

i) 1つ又はそれ以上の相互作用パートナーでコーティングされたウェル、及び場合によりi i、i i i又はi v)のうちの1つ又はそれ以上；

i i) 血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用せず又は強く相互作用しないことが知られている1つ又はそれ以上の分子(低コントロール)でコーティングされた、(上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの)1つ又はそれ以上のウェル；

50

i i i) 血小板と特異的に相互作用せず若しくは強く相互作用せず、かつ/又は血小板を活性化しないことが知られている血小板又は血小板表面分子と特異的に相互作用することが知られている1つ又はそれ以上の分子(高コントロール)でコーティングされた、(上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの)1つ又はそれ以上のウェル;

i v) 血小板に結合するが活性化しないことが知られている1つ又はそれ以上の分子(活性化コントロール)でコーティングされた、(上記マルチウェルプレート又はさらなるマルチウェルプレートの)1つ又はそれ以上のウェル [I I I 及び I v は同じであってもよい]

と接触させる工程;

(c) 試験物質を血小板と接触させる工程(ここで、これは工程b)の前、後、又は同じ時点に(一緒に)起こり得る);

(d) ウェルを洗浄して未結合の血小板を除去する工程;

(e) ウェル又はプレートの予め選択された領域において、レーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより血小板の総数を検出する工程; 及び場合により

(f) ウェルの予め選択された領域において、レーザー走査又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーにより、以下のパラメーターI、i i、i i i又はi vのうちの1つ又はそれ以上を検出する工程;

i) 弱くなった蛍光シグナルを有する血小板の数;

i i) 異常な形態(断片)を有する血小板の数;

i i i) 異常なレッドシフトした蛍光を有する物体(大型赤色物質)の数;

i v) 活性化された血小板の数; 並びに

(g) (e) 及び場合による(f)に従う値と、試験物質を加えずに生成された1つ又はそれ以上の参照値とを比較する工程;

を含み、

ここで試験物質を用いて検出された値と試験物質を用いずに検出された値との間の差が、その試験物質が血小板表面分子又は血小板の結合を調節可能であることを示す。

【0030】

本発明の異なる局面のために使用される物質/試験物質/活性物質は、精製されたか、部分的に精製されたか、合成されたか、又は生化学的若しくは分子生物学的方法により製造された、いずれかの生物学的物質若しくは化学的物質又は天然産物抽出物であり得る。これは、限定されないが: 化学的試験物質又は小分子化合物(例えば有機分子)、核酸(例えばDNA、RNA、長いか又は短い、例えばオリゴヌクレオチド、siRNAなど)、タンパク質(例えば、ペプチド、あらゆる種類の既知の形式の抗体、単一特異的、二重特異的若しくは多重特異的、若しくはそれらのフラグメント、又は他のタンパク質結合実体、例えばタンパク質様足場(例えばDarpin、Ankyrin))などのような、いずれかの化学的分子若しくは生物学的分子又は分子複合体であり得る。

【0031】

血小板表面分子の相互作用パートナーとの結合を調節する試験物質の能力を検出又は定量化するための方法において、f) i、ii又はiii(or iii or)の1つ又はそれ以上が検出される場合、試験物質を含まない参照サンプルと比較して、f) i、ii、iii又はiv)の値の1つ又はそれ以上との間の増加は、その試験物質の毒性作用を示す。

【0032】

さらに、このような方法において、f) ivに従う活性化された血小板の数が検出される場合、試験物質を含まない参照サンプルと比較して活性化された血小板の数の増加は、その試験物質の血小板活性化効果を示す。

【0033】

血小板の総数は、以下のパラメーターの1つ、2つ又は3つにより同定され得る:

・ 目的の相互作用パートナーに付着している個々の単離された血小板において測定された最小値と最大値の間にある蛍光強度、

10

20

30

40

50

・ 目的の相互作用パートナーに付着している血小板において測定される、予め選択された最小値と最大値との間の、個々の単離された血小板の寸法、

・ 目的の相互作用パートナーに付着している血小板において測定される、(例えば高コントロールの平均パラメーターと比較して)最小値と最大値との間にある検出された蛍光の発光波長スペクトル(「色」)。

【0034】

正確なスペクトル、さらには蛍光強度及び寸法は、血小板を染色するために使用されるフルオロフォアのスペクトル特性及び実験設定(使用される検出器の種類; 励起及び発光に使用される波長)に依存し、それらの選択は当業者に知られている。

【0035】

弱くなった蛍光シグナルを有する血小板(「薄暗い(dim)血小板」)の数は、被検体(分析されるべき試験物質)の血小板毒性作用を示す。これは、例えば以下のパラメーターの1つ、2つ又は3つにより同定され得る:

・ 目的の相互作用パートナーに付着している、通常の蛍光強度を有する単一の血小板について測定された平均値(例えば、試験物質を添加していない高コントロール又はいずれかの他のコントロールサンプルのもの)よりも低い、単一の血小板あたりの平均及び/又はピーク蛍光強度。好ましくは、血小板あたりの平均及び/又はピーク蛍光強度は、通常の蛍光強度を有する血小板についての平均値より90%若しくはそれ以下、80%若しくはそれ以下、70%若しくはそれ以下、60%若しくはそれ以下、又は50%若しくはそれ以下であり、70%又はそれ以下が好ましい。

・ 目的の相互作用パートナーに付着している単一の血小板において測定して、最小値と最大値との間にある個々の単離された血小板の寸法(上記も参照のこと)、

・ 目的の相互作用パートナーに付着している血小板と等しい、検出された蛍光の発光波長スペクトル(「色」)。正確なスペクトルは、血小板の染色に使用されるフルオロフォアのスペクトル特性(以下を参照のこと)及び実験設定(使用される検出器の種類; 励起のため、及び放射された蛍光を検出するために使用される波長)に依存する。

【0036】

被検体(分析されるべき試験物質)の毒性作用の指標としての、異常な形態の断片(破片)を有する血小板の数は、例えば以下のパラメーターの1つ、2つ又は3つを用いて同定され得る:

・ 目的の相互作用パートナーに付着している通常の形態を有する単一の血小板において測定された平均値よりも小さい(例えば、高コントロール又は試験物質を添加していないいずれかの他のコントロールサンプルの個々の血小板の寸法の平均値と比較して)、個々の物体の寸法。好ましくは、個々の血小板あたりの寸法は(is is)、目的の相互作用パートナーに付着している通常の形態を有する単一の血小板において測定された平均値の寸法よりも、90%若しくはそれ以下、80%若しくはそれ以下、70%若しくはそれ以下、60%若しくはそれ以下、又は50%若しくはそれ以下であり、70%又はそれ以下が好ましい。

・ 目的の相互作用パートナーに付着している通常の形態を有する血小板において測定された値の1%~100%、2%~100%、3%~100%、4%~100%、5%~100%、6%~100%、7%~100%、8%~100%、9%~100%又は10%~100%である、単一物体あたりの平均及び/又はピーク蛍光強度、5%~100%の値が好ましい。

・ 目的の相互作用パートナーに付着している(通常の形態を有する)血小板において測定されたものに等しい、検出された蛍光の発光波長スペクトル(「色」)。正確なスペクトルは、血小板を染色するために使用されるフルオロフォアのスペクトル特性(以下を参照のこと)、及び実験設定(使用される検出器の種類; 励起のため及び放射された蛍光を検出するために使用される波長)に依存する。

【0037】

被検体(分析されるべき試験物質)の血小板毒性作用の指標としての、異常なレッドシフトした蛍光を有する物体(大型赤色物質)の数は、例えば以下のパラメーターの1つ、2つ又は3つを用いて同定され得る:

・ 目的の相互作用パートナーに付着している血小板において測定された最大波長と比較してより長波長にシフトした物体の検出された蛍光の発光波長スペクトル(「色」)。絶対値は実験設定(使用された検出器の種類；励起及び発光に使用された波長)に依存する。

・ 約5～500 μm^2 、約7～400 μm^2 、約8～350又は約10～300 μm^2 である個々の物体の寸法、約10～300 μm^2 が好ましい。これらの値は、使用された検出器の種類；励起及び発光に使用された波長に依存する。

【0038】

活性化された血小板の数は、例えば以下のパラメーターの1つ又は2つ又は3つを用いて同定され得る：

・ (血小板を活性化する活性を加えられていないコントロールにおいて、例えば高コントロール又は活性化コントロールにおいて)目的の相互作用パートナーに付着している単一の血小板について測定された平均最大値より大きい、血小板の群からなる物体の寸法、

・ 目的の相互作用パートナーに付着している血小板において測定して(例えば高コントロール)、最小値と最大値との間にある平均蛍光強度及び平均蛍光ピーク強度、

・ (例えば高コントロールにおいて)目的の相互作用パートナーに付着している血小板において測定して、平均最大値と最小値との間にある、検出された蛍光の発光波長スペクトル(「色」)。正確なスペクトルは、血小板を標識するために使用されるフルオロフォアのスペクトル特性(以下を参照のこと)、及び実験設定(使用される検出器の種類；励起のため及び放射された蛍光を検出するために使用される波長)に依存する。

【0039】

測定されたデータに基づいて、以下の計算を行うことができる：

・ 別の集団(Y)に対する1つの集団(X)の% =

【数1】

$$\% = \left(\frac{\text{集団Xにおける物体の数}}{\text{集団Yにおける物体の数}} \times 100 \right)$$

【0040】

測定された特徴/パラメーターの阻害のパーセンテージは、例えば

【数2】

$$\% \text{ 阻害} = 100 - \left(\frac{\text{化合物で処理したウェル (高結合相互作用パートナーでコーティングされたウェル) において検出された特徴の値} - \text{低コントロール (非結合または低結合相互作用パートナーでコーティングされたウェル) において検出される特徴の値}}{\text{高コントロール (高結合相互作用パートナーでコーティングされたウェル) において検出される特徴の平均値} - \text{低コントロール (非結合又は低結合相互作用パートナーでコーティングされたウェル) において検出される特徴の平均値}} \times 100 \right)$$

により計算され得る。

【0041】

特定の特徴/パラメーターの活性化パーセンテージは、例えば：

【数3】

$$\% \text{ 活性化} = \left(\frac{\text{化合物で処理したウェル (高結合相互作用パートナーでコーティングされたウェル) において検出された特徴の値}}{\text{高コントロール (高結合相互作用パートナーでコーティングされたウェル) において検出された特徴の平均値}} \times 100 \right)$$

により計算され得る。

【 0 0 4 2 】

予め選択された(同時に)領域における分析は、検出された値が異なるサンプル間で比較できるということを保証する。この予め選択された領域は、1つ若しくはそれ以上のウェル全体を含むプレートの決められた領域であり得、又はそれは1つのウェル内の予め選択された領域、又は両方の組み合わせ(例えばプレートの予め選択された領域、ここで各ウェルにおいて、そのウェルの予め選択された領域が分析される)であり得、予め選択された領域はまた、プレート全体(例えばプレートの全てのウェル)及び/又は各ウェルの全体であってもよい。一実施態様において、分析されるべき領域は3~5mm×3~5mmであり、別の実施態様では、それは3×3mm、4×4mm又は5×5mmであり、4×4mmが好ましく、さらに、予め選択された領域は、プレートあたりの規定された数のウェルであり得る(例えば、10~20、14~17、14、15、16、又は17)。プレートのウェルのいくつかのみが同時に分析される場合、この工程はプレートの他のウェルで繰り返され得、又はプレートの別の部分が、全ての方法の工程が行われるまで、本発明に従う方法の1つの異なる工程において分析される。

10

【 0 0 4 3 】

上記の集団は、例えば以下のウェルにおいて測定される：

- ・高結合コントロール：血小板及び/又は血小板表面分子と特異的に相互作用することが知られている相互作用パートナー(例えば、vWF-A1又はコラーゲン1のような比較的強い相互作用を有する高結合相互作用パートナー)でコーティングされた1つ又はそれ以上のウェル(好ましくは規定された数)

20

- ・非結合又は低結合コントロールは、BSAのような、非相互作用パートナー又は低相互作用パートナー(例えば、血小板又は血小板表面分子に特異的又は強く結合せず、かつ特異的又は強く相互作用しないことが知られている分子又は分子複合体、試験物質など)でコーティングされた、1つ又はそれ以上のウェル(好ましくは規定された数、例えば高結合コントロールと同じ数)である。

- ・実験用ウェル：目的の相互作用パートナーでコーティングされた1つ又はそれ以上のウェル(好ましくは規定された数、例えば高結合コントロール及び/又は低結合コントロールと同じ数)、ここで試験試験(test test)物質がこれらのウェルに加えられ得、血小板の添加と同時に、血小板の添加前に又は後に加えられ得、血小板添加の前の添加が好ましい。

30

【 0 0 4 4 】

実施例の項において後で詳述されるように、一実施例によれば、反応あたり16のウェルを、上記3種のウェル(高コントロール、低コントロール及び実験用ウェル)のそれぞれについて分析した。

【 0 0 4 5 】

結合パートナーとの血小板相互作用を減少させ、かつ/又は血小板活性化を減少させる試験物質は、例えば以下のパラメーターにより同定され得る：

- ・全ての高結合コントロールコントロール(control control)ウェルの平均値より高い、特徴「血小板の数」の阻害パーセンテージについての値。

40

【 0 0 4 6 】

結合パートナーとの血小板相互作用を増加させ、かつ/又は血小板活性化を増加させる試験物質は、例えば以下のパラメーターにより同定され得る：

- ・特徴「血小板の数」の阻害パーセンテージについての値が、全ての実験用ウェルについて得られた平均値より高いか、又は全ての非結合若しくは低結合コントロールウェルの平均値より高い。

【 0 0 4 7 】

血小板に対して毒性作用を有する試験物質は、例えば以下のパラメーターの1つ又は2つ又は3つに基づいて同定され得る：

- ・血小板の総数の減少：所定の試験物質についての実験用ウェルにおける特徴「血小板

50

の数」の阻害パーセンテージの値が、全ての実験用ウェルの平均値より高いか、又は全ての高結合コントロールウェルの平均値より高い。

・
・

・血小板破片の増加：以下の計算 - 特徴「異常な形態の断片(破片)を有する血小板の数」を特徴「全ての血小板の数」で割ったパーセンテージ - の結果が、全ての高結合コントロールウェルについて得られた平均値より高いか、又は全ての高結合コントロールウェルの平均値より高い。

・

・薄暗い血小板の増加：以下の計算 - 特徴「弱くなった蛍光シグナルを有する血小板(「薄暗い血小板」)の数」のパーセンテージを特徴「血小板の数」のパーセンテージで割った値 - の結果が、全ての高結合コントロールウェルについての平均値より高いか、全ての高結合コントロールウェルの平均値より高い。

10

【0048】

分析されたこれら3つのパラメーターのそれぞれは単独で、又は他のパラメーターとのいずれかの組み合わせで、試験物質の毒性に関する信頼できる指標を与える。

【0049】

特徴「血小板の総数の減少」と「血小板破片の増加」との組み合わせは、毒性作用の決定のための非常に信頼できるパラメーターの組み合わせである。「薄暗い血小板の増加」がさらに分析される場合、これはさらにより信頼できる結果をもたらす。

20

【0050】

血小板活性化を増加させる試験物質は、例えば以下のパラメーターの1つ又は両方に基づいて同定され得る：

・増加した数の活性化された血小板：特徴「活性化された血小板の数」のパーセンテージを特徴「血小板の数」のパーセンテージで割った値；この値は全ての実験用ウェルについての平均値より高い、

・特徴「異常なレッドシフトした蛍光を有する物体(大型赤色物質)の数」のパーセンテージを特徴「血小板の数」のパーセンテージで割った値；この値は、全ての実験用ウェルについて得られた平均値より高い。

【0051】

30

血小板活性化を減少させる試験物質は、例えば以下のパラメーターの1つ又は両方に基づいて同定され得る：

・活性化された血小板の減少した数：以下の計算 - 特徴「活性化された血小板の数」のパーセンテージを特徴「血小板の数」のパーセンテージで割る - の結果；この値は、全ての実験用ウェルについての平均より低い。

・大型赤色物質の減少した量：以下の計算 - 特徴「異常なレッドシフトした蛍光を有する物体(大型赤色物質)の数」のパーセンテージを特徴「血小板の数」のパーセンテージで割った値 - の結果が、全ての実験用ウェルについて得られた平均値より低い。

【0052】

上述のように、血小板は、血小板をプレートと接触させる前、後又は接触させるのと同時に、試験物質と接触され得る；一実施例によれば、コーティングされたプレートと試験物質及び血小板を接触させる前に、血小板を試験物質と混合する。

40

【0053】

血小板は、レーザー走査及び/又は蛍光顕微鏡検査又はサイトメトリーによる検出を可能にするいずれかのマーカーで標識され得る。マーカーの例としては：カルセイン - AM(例えばInvitrogenから)、CMFDA (5 - クロロメチルフルオレセインジアセテート(例えばInvitrogenから)、PKH67(例えばSigma - Aldrichから)、レサズリン(例えばInvitrogenから)、Lavacell(例えばActive Motif^(R))、(固定可能)FM1 - 43(例えばInvitrogenから)、Nano - Orange(例えばInvitrogenから)、又は蛍光標識ファロイジン(例えばInvitrogenから)のような蛍光色素が挙げられる。

50

【 0 0 5 4 】

血小板表面分子は、タンパク質又は糖タンパク質のような、受容体又は他の血小板表面タンパク質のような、血小板（例えばヒト又は非ヒト血小板）のいずれかの表面分子、例えばGP1b、コラーゲン受容体、PAR1、PAR4、P2Yプリン受容体1、P2Yプリン受容体12、接合部付着分子A(JAMA)、JAMC又はいずれかの他の公知の血小板表面分子であり得る。

【 0 0 5 5 】

血小板又は血小板表面分子の相互作用パートナーは、血小板又は血小板表面分子と相互作用する生物学的又は人工の（例えば化学的な）分子又は超分子複合体、例えば血小板表面分子若しくは受容体又はその機能的フラグメント若しくは誘導体の人工又は天然に存在するリガンドであり得る（ここでフラグメント又は誘導体は、天然に存在するリガンドが相互作用する表面分子又は受容体となお相互作用できる場合に機能的とみなされる）。

10

【 0 0 5 6 】

相互作用パートナーの例としては、フォン・ビルブランド（van Willebrand）因子1(vWF - 1)、vWF - 1のA1ドメイン、コラーゲン、フィブリノゲン、プロテインc、Mac - 1(α M β 2)、P - セレクチン、(CD62P)、高分子量キニノーゲン、トロンボスポンジン - 1、可溶性GPVI)、PSGL1、又はこれらのいずれかの機能的フラグメント若しくは誘導体が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

一実施例によれば、相互作用パートナーはvWF - 1である。別の実施例によれば、これは、配列番号2と95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有するか、又は配列番号1と95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する配列を含む核酸によりコードされる、vWF - 1である。別の実施例によれば、相互作用パートナーはvWF - 1のA1ドメインである。

20

【 0 0 5 8 】

本発明の状況において使用されるマルチウェルプレートは、レーザー走査顕微鏡若しくは蛍光顕微鏡、レーザー走査血球計算器若しくは蛍光血球計算器を用いる光学的分析に適したいずれかのマルチウェルプレートであり得る。このようなプレートは当該分野で公知である。適切な形式としては、例えば96ウェル、386ウェル又は1536ウェルのプレートが挙げられ、好ましくは386ウェルプレートである。

【 0 0 5 9 】

本発明セットはまた、上記の方法の1つ又はそれ以上の指示を含む説明書（leaflet）を含んでなる製品に関する。

30

【 0 0 6 0 】

以下において、本発明は実施例の形態でより詳細に記載され、これら実施例は限定と理解されるべきではない。

【実施例】

【 0 0 6 1 】

導入：

生血小板におけるvWF - GP1b相互作用の多重パラメーター解析：

本発明は、以下において、固定化タンパク質との生きたヒト血小板の相互作用の特異的かつ定量的測定のための血小板ベースのアッセイ（HTSに適している）の形態で説明される。これは、血小板に対して粘着性である2つのタンパク質：コラーゲン1及びフォン・ビルブランド因子からのA1ドメインについて示される。血小板を約50 000のマルチプレートウェルに分配し、そして未結合の血小板を洗浄により除去した。このアッセイは1日あたり約50 000のウェルをスクリーニングするのに適していた。このアッセイは、毒性及び血小板活性化効果を示唆する複数の細胞パラメーターの取得及び分析を含む、阻害剤及び/又は活性化剤の同定を可能にする。

40

【 0 0 6 2 】

生理的条件下では、血小板は血管損傷の部位で凝集して漏出を塞ぐ。血漿フォン・ビルブランド因子(vWF)は、このプロセスにおいて細胞外アダプターとして作用し、損傷した

50

血管壁においてコラーゲンに結合し、次いで血小板表面上でそのA1ドメインを介して膜糖タンパク質Ib複合体に結合する。vWF - A1ドメインは、比較的高い流体ずり速度でvWFがコラーゲンに結合する場合にのみ露出されるので、vWF及び血小板は血液中で容易に相互作用しない。この事象を、フォン・ビルブランド (von Willibrand) 因子(vWF) 及びGPIb受容体複合体の相互作用を阻害する試験物質を同定することを目標とした生物学的に関連するスクリーニングキャンペーン (campaign) に転換するために、新しい結合アッセイが開発された。この結合アッセイでは、生血小板を、単離されたvWF - A1ドメインでコーティングされた384マルチウェルプレートのウェルに加える。

【0063】

アッセイプロトコルを、ツール試験物質としてのvWFA1タンパク質 - タンパク質相互作用の既知の阻害剤及び選択された数の既知の細胞傷害性試験物質 (全部で61) を用いて確認した。細胞傷害性のような特異的效果と非特異的效果とを区別するための最も重要な読み出し (read - out) パラメーターを見つけるためにこのデータをさらに使用した。

10

【0064】

懸濁液中の血小板の限られた安定性にもかかわらず、1週あたり約48000の単一の点の検出というスループットが、良好な統計的品質 ($0.65 < Z' < 0.85$) で得られた。このアッセイを、619,569の試験物質のセットに10 μ Mで使用した。得られた6,847のポジティブな試験物質 (付着した血小板の数に基づいて) を再確認し、そして血小板とコラーゲン1との間の相互作用の阻害について、同様のプロトコルを使用して対比スクリーニングした (counter screened)。残りの試験物質から、vWF - A1相互作用とさらにはコラーゲン1相互作用の両方の阻害について両方ともIC₅₀値を決定した。85の試験物質を、vWF - A1に対する血小板相互作用の高い阻害とコラーゲンに対する低い阻害を有する特異的活性物質 (actives) として選択した。これらの活性物質のいくつかは、いくつかの濃度についてコラーゲンと比較してA1への血小板の増加した結合を示した。

20

【0065】

循環血小板は、止血が必要とされるまで非反応性状態に維持されなければならない。インタクトな血管の内皮細胞は、主に血小板と内皮下結合組織との間にバリアを形成することにより血液凝固を防止する。内皮下組織には、コラーゲン、フィブロネクチン及びラミニンのような血小板に対して粘着性の物質であるタンパク質が存在する。血液凝固の他の調節因子は血流中に位置し、典型的な例はフォン・ビルブランド因子(vWF) である。vWFは血小板の損傷した表面への付着を媒介する多量体タンパク質である。これはタンパク質の中心部分にA1及びA3ドメインのようないくつかのドメインを含有し、これが凝固のための血小板の捕捉及び活性化に重要な役割を果たす。血小板vWF受容体についての結合部位はA1ドメイン内にあるのに対し、その相同なA3ドメインはコラーゲンに結合する。通常の循環においてA1ドメインは隠れている。従って、傷害が存在しない場合、vWFは循環血小板と相互作用しないように見える。そのA3ドメインを介したコラーゲンへのvWFの結合による固定化はまた、確認 (confirmation) の変化を誘導し、血小板膜上のvWF受容体に対する増加した結合親和性、血小板付着、血小板形状変化及び露出した内皮下層に沿った拡散、他の血小板の動員及び血小板の活性化を介した凝集に通じる血小板顆粒のエキソサイトーシスの放出を引き起こす。

30

40

【0066】

さらに、血小板のvWFに対する親和性は、高流体ずり応力の条件下で、vWFの折り畳みをほどこいて血小板上のvWF受容体との相互作用のためのvWF - A1配列を露出させることができる条件下で劇的に増加する。この折り畳みをほどこくプロセスは可逆的であり、流体力学的ずり応力がなければ、タンパク質はすぐに弛緩してそのまとめられた (compact) 状態へと戻る。高ずり応力の条件は、特にハイスループットスクリーニングの間に実験室で再現することは煩雑であるので、vWF全体の代わりにA1ドメインを本アッセイでは使用した。

【0067】

vWF - A1ドメインとその受容体との間の相互作用に対する阻害剤を検出するために、vWF

50

- A1ドメイン（あるいは以下では「A1」とも呼ぶ）と直接相互作用するタンパク質である単離されたGpIbタンパク質の代わりに全血小板を使用することが有利である。GP1bタンパク質はGP1b - IX - Vからなる複合体の一部である。この複合体の一部は脂質ラフトと結合しているようであり、GP1b - IX - V媒介血小板機能におけるこの関連についての生理学的役割に関する証拠がある。糖タンパク質Ib - IX - V複合体の脂質ラフトへの局在化は血小板付着及び活性化に必要であるため、全GP1b - IX - V複合体が適切な活性化及びシグナル伝達のために必要とされるということはもっともらしく思われる(Shrimpton, The Journal of Experimental Medicine, Volume 196, Number 8, 1057 - 1066)。

【0068】

VWF血小板相互作用の重要性は、vWF受容体又はvWFタンパク質自体の定量的又は定性的な欠損が、両方とも0.1~1%の罹患率で出血性障害を生じることから明らかである。欠損の箇所に依存して、いくつかの疾患が知られている；フォン・ビルブランド因子病(vWD) (vWFに異常がある場合)及びベルナルル - スーリエ症候群又は巨大血小板症候群(vWF受容体に欠損がある場合)。

10

【0069】

血小板が患部血管と相互作用する場合、この上記と同じプロセスが、世界中で主要な死因である心血管疾患の原因である病的な血管閉塞を生じ得る。急性冠症候群(ACS)の病態生理学的基礎は、その後の血小板付着、凝集、血栓の形成を伴う急性プラーク破綻である。1つのアプローチは、血小板活性化又は凝集の代わりに血栓症の最初の段階、すなわち血小板付着を阻害することである。

20

【0070】

ほとんど全てのACSは既存の冠動脈硬化症における血栓形成の結果として生じる。プラーク破綻の結果として、血小板は内皮下基質に露出され、これが局所的血栓形成をもたらす。これがその後、冠動脈閉塞及び急性心筋梗塞(AMI)を引き起こす。AMI後の患者において、高ずり誘導血小板付着及び凝集が増加し、そして抗vWF抗体の投与により阻害される。従って、VWF - 血小板相互作用を特異的に阻害する治療は、見込みのある新しい抗血小板薬として特に興味を持たれる(Drugs of the Future 2003, 28(1) : 61 - 67, the role of VWF - collagen interaction in acute platelet thrombus formation, K. Vanhoorelbeke and H. Deckmyn)。

【0071】

固定化タンパク質への洗浄された血小板の結合を、洗浄により未結合の血小板を除去した後に384マルチウェルプレートのウェルを画像化することにより決定した。このアッセイの目的は、固定化タンパク質と血小板との間の相互作用を阻害するそれらの能力について小分子を同定することであった。しかし、このアッセイは生体分子又は超分子複合体の分析にも適している。

30

【0072】

例えば特異的血小板 - A1相互作用阻害剤として作用する試験物質は、A1でコーティングされたウェルへの血小板への付着を、細胞傷害性であることなく減少させるべきである。

【0073】

輸血を目的とした血小板濃縮物から得られた血小板をカルセイン - AM(生細胞及び血小板に進入することができるカルセインのアセトメトキシ誘導体)により蛍光標識し、そして単離されたvWF - A1ドメイン又はコントロールとしての血清アルブミンでコーティングされたマルチプレートのウェルに加えた。インキュベーションした後、未結合の血小板を洗浄により除去した。固定化vWF - A1に結合している血小板の量を、レーザー走査血球計算器を使用した画像化により決定した。特定の物体の数、それらの寸法、丸さ、放射される色、及び蛍光強度のようないくつかの特徴を測定した。これらのパラメーターは、既知の阻害剤、毒性試験物質及び不活性「中性」試験物質から構成される訓練セット(training set)の試験物質を区別するそれらの能力により選択された。付着した物体をこれらのパラメーターの組み合わせにより同定し、このようにして、血小板を他の血液産物と区別して定量化することができる。開発されたアッセイはスクリーニングを意図しており、

40

50

週あたり4x30プレート(a 384ウェル)のスループットを良好な統計($Z' > 0.8$)で得ることができ、そして試験された22の参照試験物質の>90%を十分な感度で同定することができた。

【0074】

このアッセイの目的は、血小板とvWF-A1ドメインとの間の相互作用を阻害するそれらの能力について小分子を同定することであった。これらの試験物質を、標識された血小板の直前に、コーティングされたウェルに加えた。アッセイの開発の間に、他の細胞アッセイにおいてそれらの細胞毒性特性について知られている大部分の試験物質がA1ドメインとの血小板の相互作用の有効な阻害剤であるということが明らかになった。注意深く多重パラメーター解析を行うことにより、細胞傷害性試験物質は非毒性阻害剤と区別され得る。さらなる多次元解析はまた、血小板の付着の阻害を生じる毒性作用を有する試験物質に対してフィルターをかけた。試験物質の構造の比較は、さらなる薬物開発のための有力候補である構造的共通要素を同定した。

【0075】

ツール試験物質としてのvWFA1タンパク質-タンパク質相互作用の既知の阻害剤及び選択された数の既知の細胞傷害性試験物質(合計61)を用いてアッセイプロトコルを検証した。特異的効果と非特異的効果(例えば細胞傷害性)とを区別するために最も重要な読み出しパラメーターを見つけるためにこのデータをさらに使用した。

【0076】

このアッセイは、600Kの試験物質を384形式でスクリーニングするために適している。懸濁液での血小板の限定された安定性にもかかわらず、週あたり約48000の単一点検出のスループットが、良好な統計的品質($Z' > 0.7$)で得られた。確認用検証用コレクション(Validation Collection)を三重に試験し、0.7-0.9%のヒット率を示した(毒性の可能性のある試験物質を差し引いていない)。

【0077】

ハイコンテンツスクリーニング(HCS)

ハイコンテンツスクリーニング(HCS)は、全細胞形態変化及び多数の生物学的プロセスに関与するシグナル伝達事象、例えばタンパク質の局在化、トランスロケーション、リン酸化、タンパク質-タンパク質相互作用及びセカンドメッセンジャーカスケードの検出を可能にする。このような画像ベースのスクリーニングアプローチは、それらの豊富な情報含有量のためにHCSと呼ばれている。マイクロタイタープレートにおける細胞の画像は自動的に生成され、そして画像解析アルゴリズムを使用して解析される。このようにして、蛍光強度、粒度、細胞形状、細胞内小器官の構成、目的の物体の空間的關係のような試験物質の効果に関連する細胞の複数の生化学的及び形態学的パラメーターが同時に測定され得る。創薬のためのHCSの主要な利点は、それが：例えば細胞の分集団又は細胞内構造を規定するためのパラメーターの組み合わせ(多重化)及び場合により望ましくない効果(毒性)の初期の検出を可能にすることである。

【0078】

周知の参照基準の薬理プロファイルのパラメーターとの比較による薬物プロファイリング：既知の薬物及び薬理的参照に対して表現型ヒットの細胞活性プロファイルを比較する化学構造解析によるヒットの構造-活性相関：多重パラメーター解析により検出して、類似した生物学的効果を生じる試験物質を見出す機会。細胞に対する類似した活性を有する試験物質のコレクションの化学構造の綿密な解析は、共通の構造要素の同定を可能にする。これは、優先順位付けを増強し単純化し、そして見込みのある化学的候補の化学的最適化により、先導する開発を促進させる。

【0079】

多重パラメーター解析

単一細胞分析からの世代多重パラメーターはデータの著しい増加をもたらす。多次元空間におけるデータの解析は、単一読み出しアッセイにおける有効性又は効力による通常の等級序列と対照的に、困難な作業になり得る。HCSから得られるこの多量のパラメーター

10

20

30

40

50

を十分に活用するために、これらのパラメーターを生物学的、化学的及び薬理学的状況で評価、解析及び解釈する必要がある。従って、十分に特徴付けられたコントロール及び参照状況を、多次元データの解析の過程で検討した。

【 0 0 8 0 】

多次元データセットの正規化は重要な最初の工程である。この作業を、複数の市販及び学術的なソフトウェアソリューションにより達成した。ツール試験物質又は天然リガンドの作用様式のような十分に確定された参照状況は、通常は主要なスループットスクリーニングから独立して測定されるという事実に起因して、適切な正規化方法を注意深く選択することが重要である。多次元データが正確に正規化されるとすぐに、標準的な多変量データ解析技術、例えばクラスター分析、因子分析、分類技術及びフィルタリング技術を適用した。

10

【 0 0 8 1 】

Acumen技術

Acumenは、励起のために488nmのレーザーを使用する細胞ベースのスクリーニング及び4色同時の検出を可能にする読み取り機である。Acumen技術は、画像解析よりもむしろ血球計算の原理を適用する。レーザーは視野全体を走査して一定間隔で強度読み取りを収集する。これにより、常用の顕微鏡検査により行われるようなウェルの一部の画像を作成する代わりに、ウェル全体の画像化が可能となる。ウェル全体の分析は、ウェル全体の典型ではない画像の分析により誤った解釈をする危険性を排除する。閾値 (Thresholding) アルゴリズムは、溶液バックグラウンドより高い全ての蛍光強度を識別する。Acumen技術は迅速かつ強固な結果である - いずれのプレートについてもプレートあたり平均で約10分。

20

【 0 0 8 2 】

1. 材料

1.1 貯蔵

全ての材料を、供給業者により推奨されるように、それらのウェブサイト (以下に列挙される) に記載されるように、又はそれらの製品情報に記載されるように貯蔵した。

【 0 0 8 3 】

1.2 細胞

血小板を、DRK - Blutspendedienst Baden - Wuerttemberg - Hessen GmbH; 生産者: Institut Frankfurt, PF 730367 D - 60505 Frankfurtを介して入手した。輸送はBluttransportにより血液製剤のための法的ガイドラインに従って行われた。血小板濃縮物を室温にてEdmund BuehlerによるTiMixで穏やかな攪拌下にて貯蔵した (設定6)。これらの濃縮物は、4ドナーからプールされ、約30%血漿を含有していた。

30

【 0 0 8 4 】

1.3 プレート

アッセイプレート: Greiner hb(高結合)、黒色、透明底部、384ウェル、Greiner#78109

7

【 0 0 8 5 】

1.4 化学薬品

試薬	供給業者	注文番号	形態	分子量	貯蔵
Trizma塩基	SIGMA	T - 1503	固形	MW 121,14	室温
Trizma HCl	SIGMA	T - 3253	固形	MW 157,6	室温
NaCl	SIGMA	S - 3014	固形	MW 58,44	室温
KCl	SIGMA	P - 9541	固形	MW 74,55	室温
CaCl ₂	SIGMA	C - 3306	固形	MW 147,0	室温
MgCl ₂ x 6H ₂ O	SIGMA	M - 2670	固形	MW 203,31	室温
10%Pluronic - F - 68	SIGMA	P - 5556	液状	MW 8350	室温
(水中10%Pluronic F - 68からなる市販の溶液)					

40

50

PGE1 SIGMA P - 5515 固形 - 20
 無水エタノール中0,5mg PGE1 / mlから作製されたストック 液状 - 20
 カルセイン - AM Invitrogen C - 3099 液状 - 20
 (乾燥DMSO中カルセイン - AM *1mg / mL (= 1,005mM) を含有する市販の溶液)

ReoPro Centocor B.V PZN 7123941 液状 2mg / ml 2 - 8

【 0 0 8 6 】

1.5 タンパク質及び抗体

BSA(アッセイ緩衝液用)

SIGMA A - 7906 固形 + 4

10

BSA脂肪酸非含有(ブロッキング溶液用)

SIGMA A - 7030 固形 + 4

vWF - A1 (= フォン・ビルブランド因子 (Faktor) A1ドメイン (Aa 475 - 706)、
 液状 ; 5,3mg / ml - 80

【 0 0 8 7 】

1.6 緩衝液及び溶液

TBS - 10X濃縮 = 全ての以後の緩衝液の基礎 : 500mM TRIS - HCl、pH7,4、200mM NaCl、27
 mM KCl、0,5mM CaCl₂ ; 貯蔵 室温又は + 4

1 M MgCl₂ - ストック溶液

vWF - A1 - コーティング溶液及びブロッキング溶液のためのTBS - vWF - A1 - コーティン
 グ / ブロッキング - 緩衝液 (Puffer) 1X : 1xTBS - 緩衝液中2mM MgCl₂

20

試験物質希釈及びコントロールのための、血小板調製に使用されるTBS - 付着 (Adhaesi
 on) 緩衝液1X(= アッセイ緩衝液、新たに調製したもの) : 1xTBS中2mM MgCl₂及び0.1% BSA
 (SIGMA - A - 7906)

コーティング後の洗浄、ブロッキング及びアッセイ - インキュベーション後のためのTB
 S - 洗浄緩衝液1X

TBS - 付着緩衝液 (Adhesionbuffer) 1X中のPluronic - F - 68 0.001%

TBS - vWF - A1 - コーティング / ブロッキング - 緩衝液(1x)中のvWF - A1 - コーティン
 グ溶液 : 1xTBS - 緩衝液中2mM MgCl₂中の30 µg / ml vWF - A1

実際のパッチ : 5,3mg / ml

30

TBS - vWF - A1 - コーティング / ブロッキング - 緩衝液 (Puffer) 1X中5% ブロッキング
 緩衝液 : 5% BSA粉末、脂肪酸非含有(SIGMA - A - 7030)

PGE1 - アッセイ濃度 : 0,25 µg / ml、貯蔵 - 20

PGE1 - ストック溶液(0,5 mg / ml)2 µlを、DRK / 独国赤十字からの4ml血小板濃縮物を加
 える前に加えなければならない

カルセイン - AM - アッセイ濃度 : 2,5 µM / ml、

カルセイン - AM - ストック溶液(1mg / ml)からの5 µlを、2⁸血小板 / mlの濃度を有する
 血小板懸濁液2 mlに加えた :

ReoPro - アッセイ濃度 : 2,5 µg / ml、+ 4 で貯蔵 - すぐに使える (ready to use) ;

血小板溶液 2E 08 / mlから (von) 5E 07 / mlへ (auf) > 1 : 4

40

TBS - 付着 (Adhaesions) 緩衝液 (Puffer) 最初に3mlをピペットで取る

ReoPro - ストック溶液(2mg / ml) 添加して短く攪拌する 5 µl

血小板 (Thrombocyten) 2E 08 / ml 1ml

384アッセイのための血小板希釈(20 µlで10000細胞 / ウェル)

5E 07 / mlから5E 05 / mlへ血小板希釈 > 1 : 100

TBS - 付着 (Adhaesions) 緩衝液 最初にこの緩衝液をピペットで取る、

PPピーカーに「Fluegelruehrfisch」(羽根型攪拌子) 99ml

血小板 5E 07 / ml 01ml

【 0 0 8 8 】

1.7 参照試験物質

50

a) 2つの特異的GPIb阻害剤を使用した：

OS - 1(社内合成)、Benard et al. Biochemistry, 2008, 47 (16), pp 4674 - 4682)を参照のこと：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363340>

OS - 1ペプチドはGPIbに結合し、そしてそれがVWF - A1との鍵となる相互作用を形成することができなくなるようなやり方でGPIbを安定化する。

b) Chemicon Internationalからのマウス抗ヒトCD42Bモノクローナル抗体。この抗体はCD42b抗原に対して特異的である；血小板糖タンパク質Gp1bアルファ、これはフォン・ビルブランド因子(vWF)の受容体として機能する；クローン名：AK2；カタログ番号CBL166

、
【 0 0 8 9 】

10

2. 方法

2.1 vWF - A1でのアッセイプレートのコーティング及びBSAによるブロッキング

TBS - vWF - A1 - コーティング / ブロッキング - 緩衝液 (Puffer) 1X(15 µg / ml vWF - A1を含有)25 µlを、LabsystemsからのMultidropを使用してウェルに滅菌で加えた。プレートをインキュベートし、そして最少で一晩から1週間まで貯蔵した。貯蔵は4℃で滅菌下で、蒸発に対して保護して行った。

【 0 0 9 0 】

本明細書で使用されるvWF - A1ドメインの配列は：(ヒトvWFのA1ドメインをクローン化してBamHI / HindIIIを標準的発現ベクター中に入れて発現させ、そして公知の方法で生成した)：

20

【 0 0 9 1 】

cDNA配列(配列番号1)

【 化 1 】

```
atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatcccaggagccgggaggcctggtggtgcctcccacag
atgccccggtgagccccaccactctgtatgtggaggacatctcggaaccgccgttgacgatttctactg
cagcaggctactggacctggtcttctctgctggatggctcctccaggctgtccgaggctgagtttgaagtg
ctgaaggcctttgtggtggacatgatggagcggctgcgcatctcccagaagtgggtccgcgtggccgtgg
tggagtaccacgacggctcccacgcctacatcgggctcaaggaccggaagcgaccgtcagagctgcggcg
cattgccagccagggtgaagtatgcgggcagccagggtggcctccaccagcgaggtcttgaaatacacactg
ttccaaatcttcagcaagatcgaccgccctgaagcctcccgcatcgccctgctcctgatggccagccagg
agccccaacggatgtcccggaaactttgtccgctacgtccagggcctgaagaagaagaagggtcattgtgat
cccggtgggcattgggccccatgccaacctcaagcagatccgcctcatcgagaagcaggccccctgagaac
aaggccttcgtgctgagcagtggtgatgagctggagcagcaaagggacgagatcgttagctacctctgtg
accttgcccctgaagcccctcctcctactctgccc
```

30

【 0 0 9 2 】

アミノ酸配列(配列番号2)

【化 2】

10	20	30	40	50	60
MRGSHHHHHH	GSQEPGGLVV	PPTDAPVSPT	TLYVEDISEP	PLHDFYCSRL	LDLVFLDGS
70	80	90	100	110	120
SRLSEAEFEV	LKAFVVDMM	RLRISQKWVR	VAVVEYHDGS	HAYIGLKDRK	RPSELRRIAS
130	140	150	160	170	180
QVKYAGSQVA	STSEVLKYTL	FQIFSKIDRP	EASRIALLLM	ASQEPQRMSR	NFVRYVQGLK
190	200	210	220	230	240
KKKVIVIPVG	IGPHANLKQI	RLIEKQAPEN	KAFVLSSVDE	LEQQRDEIVS	YLCDLAPEAP
PPTLP					

10

アミノ酸の数：245

分子量：27683.9

理論的 pI：7.83

【0093】

試験物質を加える1時間前に、プレートのウェルをBSAでブロッキングした。先に、Bio tekからのELx405マイクロプレート洗浄機(96ウェル)を使用してウェルを1xTBS - 洗浄緩衝液、60μl / ウェルで洗浄した。

20

【0094】

直後に(ウェルを乾燥させるべきではない)、これらのウェルをLabsystemsからのMultid ropを使用して5%BSA - 脂肪酸非含有40μl / ウェルでブロッキングした。ウェルを試験物質を加えるまで1~2時間インキュベートした。

【0095】

2.2 試験物質希釈

試験物質管理から供給された密封されたプレートを使用するまで - 20℃で貯蔵した。試験物質を100% DMSOに3mMで溶解させた。試験物質をTBS - 付着 (Adhaesion) 緩衝液1Xで10μMの最終濃度まで希釈した。希釈された試験物質を室温で貯蔵し、そして数時間以内に使用した。HTSは一点測定で起こった。

30

【0096】

2.3 ウェルの洗浄及び試験物質添加

ウェルを1x TBS - 洗浄緩衝液60μl / ウェルでBiotekからのELx405マイクロプレート洗浄機(96ウェル)を使用して洗浄することにより、余分のBSAを洗い流し、続いて試験物質溶液又は高コントロール及び低コントロール10μlをCybioロボット工学を使用して加えた。プレートを乾燥させなかった。

【0097】

2.4 HTSの間のコントロール

低コントロール：vWF - A1 - コーティング無し、ブロッキングのためのBSA処理プレートのみ

40

高コントロール：vWF - A1 +

標準(非毒性GP1b阻害剤) vWF - A1 + 及びOS - 1 10μM

【0098】

2.5 血小板標識及び分配

独国赤十字から得られたままの血小板濃縮物からの血小板の取り出しと、マルチウェルプレート中への血小板の分配との間に必要な合計時間は45~60分の間であるべきである。

独国赤十字から得られたままの血小板濃縮物を含有するバッグを攪拌台から取り出し(1.2; 細胞を参照のこと)、そして滅菌フローキャビネット中で流出物を吸収するように吸収タオル上に置いた。チューブ類、チューブクランプ及びハサミを水中70%エタノールで

50

滅菌した。

血小板濃縮物を含むバッグからのチューブ類をクランプしてチューブを切断した。

クランプを解放し、そしてバッグから出てきた最初の約10mlの濃縮物を廃棄した。濃縮物30mlをポリプロピレン製50ml BD - Falconチューブに入れた。

次に、2.5 μ l PGE - ストック (0.5mg / ml) を空の12mlポリプロピレン製丸底チューブ (Greiner) に加えた。これに5ml血小板濃縮物を加え (PGE1の最終濃度は0,25 μ g / mlである)、そしてこのチューブを穏やかに混合し、そして5分間室温でインキュベートした。

次に、チューブをMinifuge T (Heraeus Holding GmbH, Hanau) で300xgにて15分間室温で遠心分離した (加速設定3及びブレーキ設定1)。

【0099】

10

遠心分離の後、上清をデカンテーションし、そしてペレットをTBS - 1x中で「ティッキング (ticking)」することにより注意深く再懸濁し、最初の2.5mlはペレットを再懸濁するために使用し、次に約1~2mlを使用した (体積合計が5mlを超えないように注意すること)。

【0100】

血小板の数を決定するために、この血小板懸濁液2mlを新しいチューブに入れ、そして3mlアッセイ緩衝液 (Assaypuffer) で希釈した。これから約0,2~0,5mlのアリコートをし、Beckman Coulter Ac.T5diff型で細胞を計数するためにピペットでエッペンドルフ (Eppendorf) チューブに入れた。

【0101】

20

血小板をカルセイン - AMで染色するために、50mlチューブを選択した (型 ポリプロピレン光保護チューブ、Greiner Bio - one)。このチューブに、血小板を 2^8 血小板 / mlまで希釈するために必要な体積のアッセイ緩衝液を最初に加えた。この体積のアッセイ緩衝液を最初に加え、次に等体積のカルセインAMを加えて最終濃度2,5 μ M カルセイン - AMとした (10ml最終体積あたり10 μ lカルセイン - AMストック)。チューブ内容物をボルテックスにより簡単に混合した。この混合物に、 2^8 血小板 / mlの最終密度になるような体積の血小板を注意深く加えた。この混合物を静止して10~15分間、暗所にてインキュベートして血小板を蛍光染色した。

【0102】

30

新しい50mlチューブを取り (型 ポリプロピレン光保護チューブ、Greiner Bio - one)、血小板をアッセイ緩衝液中で 5^7 細胞 / mlに希釈した。必要な体積のアッセイ緩衝液を加えた後、2.5 μ g / mlの最終濃度にするために必要な等体積のReoProストック溶液を加えた。次に、(5^7 血小板 / mlを得るために) 必要な体積の血小板を加えた。チューブを静止して10~15分間、暗所にて10分間インキュベートした。その間に、Multidrop (LabsystemsからのMultidrop) のカセットをアッセイ緩衝液で十分に (thoroughly) すすいだ。

10分間ReoProと共にインキュベートした後、血小板をさらにTBS - 付着緩衝液 (Adhaesionsbuffer) で 5^5 血小板 / mlまで希釈した (すなわち、20 μ lあたり10,000個の血小板; 1つのウェルに加えられた体積)。この最終希釈工程のためにポリプロピレンピーカー (体積500~1000ml) を使用した。このピーカーに必要な体積のTBS - 付着緩衝液 (Adhaesionsbuffer) を最初に加え、次に滅菌浮遊攪拌子を加えた。ピーカーを設定3で磁気攪拌装置上に置いて; そして等体積の血小板を、2分間攪拌しながら穏やかに加えて完全な希釈を確実にした。次にMultidrop (LabsystemsからのMultidrop) のカセットの体積に等しい体積を血小板懸濁液で十分にすすいだ。直後に、マルチウェル中への血栓の分散が始まった。チューブ及びカセットの死容積 (dead volume) と等しい量を廃棄し、その後Multidropを用いて: 20 μ l血小板懸濁液を各ウェルに加えた。チューブ類ができるだけ短くなるようなやり方でシステムを配置した。

40

分配はできるだけ速く行うべきであり、通常は血小板を30のマルチウェルプレートに分配するために30分未満が必要である。

【0103】

2.6 インキュベーション及び洗浄

50

血小板及び試験物質を含むプレートを、蓋をせず暗所で室温にて1.5～3時間の間インキュベートした。次にウェルを2x60 μ l TBS - 洗浄緩衝液1Xで洗浄し、2回のプレートの洗浄の間に5分の間を置いた。

重要なことは、ウェルの全ての隅を洗浄することである。これはElx405 96ウェル洗浄機(BioTek InstrumentsからのELx405マイクロプレート洗浄機)を使用して達成される。吸引を左下の隅及び右上の隅の両方で行い、分配は常に同じ位置であった；-23/0。次に、プレートを180度回転させ、そして吸引及び分配を繰り返した。

【0104】

2.7 Acumen読み取り

プレートをAcumen血球計算器(Acumen Explorer、TTP Labtech)でソフトウェアバージョン数3.1.12及びMDAQドライバーバージョン1.0.10(2008-01)を使用して読み取った。プレートをAcumenにTwister2(Caliper)を使用してロードした。スクリーニング室を約18～20まで弱く冷やした。蓋をしていないアッセイプレートの間に、上のプレートへのスクリーニングプレートの凝縮(condensation)を避けるために使用される空の白いプレートを置いた。白いプレートは廃棄した。

【0105】

Acumenにおけるプレートの読み取りのために使用した設定をここで記載した。

アルゴンイオンレーザー出力を6mWに設定：

放射される蛍光を以下のチャンネルで以下の設定を使用して記録した：

波長：500～530nmを有する放射光をチャンネル1で記録した：

データ収集：使用可能、トリガー：使用可能、PMT電圧：530V

波長：540～560nmを有する放射光をチャンネル2で記録した：

データ収集：使用可能、トリガー：使用可能、PMT電圧：500V

波長：575～640nmを有する放射光をチャンネル3で記録した：

データ収集：使用可能、トリガー：使用可能、PMT電圧：500V

【0106】

関心領域は：ウェルの中心の周りに4x4mmの幅及び高さを有する矩形形状を有していた。

全ての記録チャンネルにおいてバックグラウンド値より高い2標準偏差の感度閾値(thresholding sensitivity)を使用した放射光の収集。

ベースライン追跡範囲(Baseline Tracking Window) 301 μ m

及びノイズ平滑化範囲(Noise Smoothing Window) 3 μ m

【0107】

物体識別設定はX重複：0.5 μ m、Y分離：0.5 μ mであった。

【0108】

以下の集団を以下のフィルターを使用して識別した。

血小板の集団 - フィルター：

1° ピーク強度 - ベースライン：900～20000

1° 面積：90～1200

1° ピーク強度 - ベースライン / 3° ピーク強度 - ベースラインの比：1～100

大型赤色物質の集団 - フィルター：

1° ピーク強度 - ベースライン：50～200

3° ピーク強度 - ベースライン：80～250

3° 周囲：45～100

3° 面積：80～300

活性化血小板の集団 - フィルター：

1° 周囲：90～1000

1° 面積：350～4000

1° ピーク強度 - ベースライン：333～9000

1° 半値幅強度(Half Width Intensity)：6900～1.3e + 06

1° ピーク強度 - ベースライン / 3° ピーク強度 - ベースラインの比 : 1 ~ 50

1° 全強度 : 65000 ~ 120000

薄暗い血小板 (plat) の集団 (300 1pibl 1200 - フィルター :

1° ピーク強度 - ベースライン : 300 ~ 1200

1° 面積 (Warea) : 90 ~ 1000

1° ピーク強度 - ベースライン / 3° ピーク強度 - ベースラインの比 : 1 ~ 100

破片血小板 (「血小板からの破片」) の集団 - フィルター :

1° ピーク強度 - ベースライン : 0 ~ 20000

1° 面積 : 0 ~ 90

1° ピーク強度 - ベースライン / 3° ピーク強度 - ベースラインの比 : 0.6 ~ 100

10

高ch3物体 - フィルター :

1° 面積 : 0 ~ 10000

1° ピーク強度 - ベースライン / 3° ピーク強度 - ベースラインの比 : 0 ~ 1

【 0 1 0 9 】

集団から以下の特徴を抽出した :

1. データ : 物体の数

2. 血小板 (1pibl > 900) : 物体の数

3. 大型赤色物質 : 物体の数

4. 活性化血小板 : 物体の数

5. 薄暗い血小板 (plat (elets)) : 物体の数

20

6. 破片血小板 : 物体の数

7. 高ch3物体 : 物体の数

8. パーセンテージ : 血小板 (1pibl > 900) 物体の数 / データ : 物体の数

9. パーセンテージ : 活性化血小板 : 物体の数 / 血小板 (1pibl > 900) 物体の数

10. パーセンテージ : 薄暗い血小板 (plat (elets)) : 物体の数 / 血小板 (1pibl > 900)

物体の数

11. パーセンテージ : 血小板 (1pibl > 900) 物体の数 / 破片血小板 : 物体の数

12. 血小板 (1pibl > 900) : 中央値1° 平均強度

13. 血小板 (1pibl > 900) : 幾何平均1° 平均強度

14. 血小板 (1pibl > 900) : 幾何平均1° ピーク強度 - ベースライン

30

15. 血小板 (1pibl > 900) : 幾何平均1° 全強度

16. 血小板 (1pibl > 900) : 平均1° 周囲

17. 血小板 (1pibl > 900) : 中央値1° 面積 (Warea)

【 0 1 1 0 】

3 データ解析

3.1 アッセイの質の直接的決定

アッセイプレート品質の直接的分析のために、我々はZ'ファクターをZhanget al. : 「A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays.」 J Biomol Screen. 1999 ; 4(2) : 67 - 73) に記載されるように計算した。Z'ファクターを、パラメーター : 血小板の数 (血小板 : 物体の数) を使用して計算した。Z'の計算のために、BSAのみ (血小板に対して非常に低い結合特性を有するタンパク質) でコーティングされたウェルからのデータを低コントロールとして使用し、そしてvWF - A1でコーティングし、その後BSAでブロッキングしたウェルからのデータを高コントロールとして使用した。

40

【 0 1 1 1 】

3.2 多重パラメーター解析

通常、多数の特徴が各単一の処理について決定され得る。大抵は、これらの特徴の小さいサブセットは、十分に確立されたコントロール、参照状態及び可能な毒性表現型の区別に関して関連しており、最も重要な特徴は : データ処理、次元の減少並びに最も関連する生物学的、化学的及び薬理学的プロセスに集中した観点という理由から定義された。

50

特徴選択は、適切な分類子(例えばK近傍法(knn)及びナイーブベイズ)の綿密な設計及び構築により得られた。それらを交差検証($p = 3 / 4$)及び50の再サンプリング反復により検証した。結果として、これらの分類子は、十分に特徴付けられたコントロール - 参照 - 及び可能な毒性表現型を非常に正確に識別することができた。分類子の最も重要な特徴を識別するために、重要度解析を行った。これらの結果を相関解析の結果と比較した。このアプローチは最も重要でかつ最小の相関の特徴セットの選択を可能にした。得られた特徴セットをHTSの間に使用し、上に列挙した。

【 0 1 1 2 】

3.3 使用した装置

Acumen Explorer TTP Labtech

10

ソフトウェア (Softwwere) バージョン3.1.12、MDAQドライバーバージョン1.0.10 (2008 - 01)。

Biomek FX	Beckman Coulter
Multidrop	Thermo Labsystems
Vi - Cell™ XR	Beckman Coulter
Minifuge T	Heraeus
ELx 405 Select	Biotek
Twister2	Caliper

【 0 1 1 3 】

4. 結果

20

4.1 カルセイン - AMを用いた血小板の標識

vWF - a1でコーティングされたウェルへの付着後の血小板を検出するために、洗浄した血小板をカルセイン - AMで蛍光標識した。カルセイン - AMを検出するために適したフィルターを使用した顕微分析は、事前活性化 (preactivation) の確実な形態学的徴候のない明るい球状物体を示した。しかし、鮮やかで漠然とした (vage) 蛍光バックグラウンド染色に加え、より大きな明るい構造も頻繁に観察可能であり、度々焦点が合わず、おそらく標識された血球を表していた、図1を参照のこと。

【 0 1 1 4 】

4.2 vWF - A1でコーティングされたウェルへの標識されたプレートの付着

蛍光標識された洗浄した血小板を固定化vWF - A1に付着させた。付着した血小板を、上記の設定を使用したAcumenでの画像化により定量した。さまざまな量のvWF - A1をプレートに加え、そして付着した血小板の量を洗浄後に96ウェル形式で決定した。図2におけるデータは、検出された血小板の量がvWF - A1の量の増加とともに増加したことを示す。しかし、未処理のウェルでも多量の血小板を観察することができた。これは血小板のプラスチックウェルへの付着により生じ、そしてこの血小板の (コーティングされていない) ウェルへの付着は、ウェルをBSAでコーティングすることにより大幅に減少させることができた。このアッセイに必要なvWF - A1の最適な量を決定するために、Z'値を計算した。データから、 $1 \mu\text{g}$ / ウェルより多いA1の量のさらなる増加はアッセイを改善せず、そしてZ'値 > 0.5 の最小必要条件はまだ達成されなかった、図2を参照のこと。

30

【 0 1 1 5 】

4.2 分散後の血小板の活性化

血小板の分散は部分的活性化を誘導し得る。活性化された血小板は、休止 (resting) 血小板と比較して異なる付着特性特性を有する。活性化の間、いくつかのタンパク質は血小板の内部から形質膜へと活発に移動した。また、表面からの受容体のクリアランスはHordill et al.; von Willebrand factor bound to glycoprotein Ib is cleared from the platelet surface after platelet activation by thrombin.: Blood : 79, pp. 2011 - 2021, 04/15/1992により記載されている。

40

【 0 1 1 6 】

血小板の分散が形態の変化という点で活性化を引き起こしたかどうかを調べるために、血小板を分散の直後に高分解能蛍光顕微鏡検査法顕微鏡により観察した。A1と相互作用し

50

ている血小板はいくらかの伸長を有しており、活性が起こったことを示していた。しかし血小板の活性化の形態学的徴候は、プレートが活性化していないはずのウェル (wells were) (BSA又は十分な阻害剤を用いたウェル)において観察されず、血小板を標識及び分配する手順が形態変化により観察されるいずれの活性化も誘導しなかったことを示していた、図3を参照のこと。

【0117】

4.4 洗浄プログラムの最適化

ウェルを観察したときに、洗浄設定は最適化され得るということが明らかになった。多くの低コントロールウェルにおいて、かなりの量の血小板がウェルに付着したままになっていた、図4を参照のこと。付着した血小板は、ウェルの特定の領域の非効率的な洗浄により生じた不規則なパターンを示した。

10

【0118】

アッセイを改善するために、洗浄機設定 (洗浄プログラム) の多くの変化を試験した。洗浄機プログラムの念入りの試験がアッセイの統計を改善し得るということが明らかになった。図5はアッセイのZ'値に対するいくつかの洗浄機プログラムの効果を示す。

【0119】

全細胞サイトメトリーから生成されたウェルからの画像を分析することにより、そしてプレートの統計を比較することにより、洗浄機設定を78からのS/B及びZ' > 0.6に最適化することができた。これらの設定を使用して、抗体が血小板糖タンパク質gpIbアルファ (AK2 ; 1.7の項を参照のこと) に対して特異的であり、かつOS - 1を阻害剤としてそれぞれ2 µg / ml及び10 µMで使用した場合に、血小板付着のほぼ90%の阻害が達成された、図6を参照のこと。

20

【0120】

4.5 特異的阻害剤OS - 1についてのIC50値によるアッセイの感度の決定

特異的阻害剤OS - 1は2008年にBernardらにより発見された (Biochemistry 2008, 47, 4674 - 4682。ELISA技術を使用して、510nMのIC50値が、vWF - A1及びGPIb相互作用の間の相互作用を阻害するOS - 1の能力について決定された。開発されたアッセイが少なくとも同様の感度でOS - 1の阻害能力を検出することができるかどうかを決定するために、OS - 1のIC50値を決定した。

【0121】

IC50値が384プレートのウェルをコーティングするために使用されたA1の量に依存するということが観察された。従って、限定された量の単離A1タンパク質を最適に使用したが、なお有効なアッセイのために十分な統計学的値を得るために、A1の量を最小限にした。最適化された洗浄プログラムを使用して、より少量のA1を使用することができた。これらのより少量のvWF - A1を用いて、OS - 1についてのIC50を、コーティングに使用したA1の量に依存して約65及び150 nMに変化させて得た。これらのIC50はBenardらにより公開された510nMの値に近かった。このことは、記載されたアッセイが少なくともBerardら (2008) により記載されたアッセイと同程度の感度であることを示す、図7を参照のこと。

30

【0122】

4.6 スクリーニング及びアッセイのスループットの決定の間のプレートの安定性

有意義なアッセイに到達するための方法を確定した後、プレートの安定性を決定した。プレートの洗浄 (約5分 / プレート) 及びプレートの読み取り (10分 / プレート) は分配工程 (1分 / プレート) より遅いので、プレートの蓄積がアッセイの間に起こるため、これは必要である。これは、最後に分配されたプレートを、読み取りの前に9時間まで蓄える必要があるということを意味する。従って (Therefore) 、プレートが洗浄の前に (室温で) 貯蔵され得るかどうか (長期の試験物質インキュベーション時間を意味する) 、及びプレートがプレートの洗浄後に ; 読み取り前に貯蔵され得るかどうかを決定した。

40

【0123】

図8は、アッセイにおけるプレート貯蔵の効果を示す。プレート貯蔵時間の増加は、検出された血小板の数を増加させた。一見、より多くの血小板が沈降し付着することができ

50

たようである。洗浄前の長期の貯蔵は検出された血小板の数のわずかな損失を生じたが、これはアッセイの統計学的有意性に対して影響を有していなかった。全ての場合において Z' は >0.5 であった。

【0124】

さらに、既知の毒性の問題を有する試験物質（以下の項を参照のこと）の毒性作用は、貯蔵時間の増加とともに増加するということが観察された（データは示していない）。対照的に、参照阻害剤 OS-1 はほとんど一定の値を示した、図 8 を参照のこと。

【0125】

プレートを読み取り前に貯蔵することができる時間が分かって、30のプレートのセットを自動化条件下で試験した。この試験のデータを以下の図に示し、ここでは1番目、6番目、12番目、18番目、24番目及び最後のプレートの結果を示した。この実行の全てのプレートにおいて、少なくとも20xのS/Bが >0.5 の Z' 値及びOS-1による高い阻害とともに得られた。従って、このアッセイは1日あたり少なくとも30のプレートを用いるハイスループットスクリーニングに適していると結論づけられた、図9を参照のこと。

10

【0126】

アッセイは、付着した血小板の数が、使用される分析のための単一のパラメーターである場合に毒性試験物質を阻害剤として同定する。阻害剤を同定することを目的とする多くの細胞アッセイにおいて、毒性特徴を有する試験物質が阻害剤として同定された。従って、多くの細胞ベースのアッセイにおいて毒性作用が知られている2つの試験物質を試験した。両方の毒性試験物質が、30 μ M濃度でのvWF-A1への血小板付着の完全な阻害とともに、10 μ Mでの実質的な阻害を示した、図10を参照のこと。

20

【0127】

従って我々は、付着した血小板の数のみが読み出しとして使用される場合に、アッセイは毒性試験物質を阻害剤として同定すると結論づけた。スクリーニングの間の偽陽性の蓄積を避けるために、毒性試験物質の同定による疑陽性の数を減少させようと試みた。

【0128】

4.8 「毒性試験物質」と阻害剤との区別

試験物質の毒性に起因する偽陽性の数を減少させるために、2つの方策を使用した：対比(counter) - スクリーニング(コラーゲン上への付着が測定されるアッセイにおいて全ての阻害剤を試験する)又は多重パラメーター解析のいずれか。

30

【0129】

4.8.1 コラーゲン1との相互作用に関する(対比)スクリーニングによる毒性試験物質の同定：アッセイの実用的な説明

このアッセイのために、本質的にはA1コーティングプレート上への血小板の付着の試験について上で記載された設定と同じ設定を使用した。

【0130】

ラット尾部コラーゲン1でウェルをコーティングするために、0.01M酢酸中の200 μ g/mlコラーゲンI(ラット尾部、SIGMA(C8897))からなるストック溶液を準備した。この溶液を0.01M酢酸で10 μ g/mlまで希釈し、そして25 μ lを384ウェルに加えた。コラーゲン1のウェルへの結合のためにプレートを終夜4でインキュベートした。試験物質を加える1時間前に、プレートのウェルを上記のようにBSAでブロッキングした。

40

また、血小板の準備、標識及び分配は、vWF-A1について記載されるとおりであった。コラーゲンIへの血小板付着のために、 $MgCl_2$ の濃度を4mMまで増加させ、そしてウェルあたり加えた血小板の数を50,000血小板まで増加させた。これらの条件を使用して、このアッセイにより特異的阻害剤の相互作用を良好な統計学的パラメータで検出することができた、図11を参照のこと。

【0131】

6つのプレートのセットを自動化条件下で試験した。全てのプレートについて0.5より大きい Z' 値が20又はそれ以上のS/Bと共に得られた。

【0132】

50

合計で69の試験物質から構成される訓練セットを、このアッセイの確認をするために使用した。これらの試験物質から、31の試験物質が推定毒性試験物質であることが分かり、vWF - A1 - 血小板相互作用の2つの推定阻害剤、32のコラーゲン - 血小板相互作用阻害剤、及び多くの細胞アッセイにおいて毒性であることが知られている4つの試験物質を血小板 - コラーゲン相互作用アッセイにおいて10 μ Mで試験した。

【0133】

データの要約を図13に示す：

【0134】

vWF - A1アッセイにおいて阻害剤として作用した試験物質の75%より多くが、毒性の可能性があると分類された試験物質のグループからのものであった。大部分の細胞アッセイにおいて毒性であることが知られている4つの試験物質のうち3つが毒性であった。同じ試験物質が血小板 - コラーゲン相互作用アッセイにおいて毒性であった。また、全部で32の既知のコラーゲン阻害剤を、同じ順位 (IC50に基づく、データは示していない) で同定することができた。他方では、参照試験物質OS - 1のような、血小板 - A1相互作用からの真正な阻害剤及びGP1bに対する抗体(AK2)はコラーゲンとの相互作用を阻害しなかった。従って、血小板とコラーゲン1との間の相互作用についてのアッセイはコラーゲン阻害剤を検出することができ、そして対比スクリーニングとして使用される場合は、細胞傷害性作用を有する大部分の試験物質を検出できると結論づけた。

10

【0135】

4.8.2 検出された血小板は毒性試験物質とのインキュベーション後に異って見える顕微鏡検査によりウェルを見ると、小さい点状の蛍光物質が血小板の代わりに見られた、図14を参照のこと。我々は、この物質を、洗浄後に除去された血小板からのレムナントとして解釈し、それ故それを「破片 (debris)」と呼んだ。しかし、この小さな物質が小胞のような他の物質を表すということも排除できない。

20

【0136】

他の推定毒性試験物質を使用して、大型の血小板又は減少した蛍光強度を有する血小板は、減少した蛍光強度で観察された。

【0137】

Acumenにおいて、血小板を毒性試験物質と共にインキュベートしたウェルでも、多数の小さい点状蛍光物質が観察された。これらのウェルでは血小板の量は減少し、そしてしばしば残った血小板はより低い蛍光であった。図15を参照のこと。

30

【0138】

従って我々は、多重パラメーター解析を使用することにより毒性試験物質と非毒性阻害剤とを区別しようと試みた。

【0139】

4.9 多重パラメーター解析：設定

特徴選択

このアッセイの目的はvWF - A1血小板相互作用を阻害する試験物質を同定することである。しかし、vWF - A1血小板相互作用の完全な阻害剤は血小板に対する毒性試験物質ともみなされ得る。従って、以下のコントロール及び参照状態(刺激薬(低)コントロール、中性(高)コントロール、AK2、OS1、毒性グループ1~5)を考慮し、そして重要なグループとして選択した。

40

【0140】

選択されたグループの区別のために最も意味のある特徴を同定するために、最初の工程で個々の血小板、血小板の小さい群又は血小板若しくは他の血球由来であり得る物体の蛍光強度又は形態を表す全ての可能なパラメーターを使用する必要がある。最初の工程において、それぞれ単一の特徴を、9つの重要なグループのうちの少なくとも1つを区別することができる統計学的有意性について試験した(図16)。次に、相関解析を行った(図17)。43の特徴のセット内で高度に相関したもののセットが存在することを同定することは非常に容易であった。第三の選択基準として、構築された分類子(K近傍法(knn)及びナイー

50

ブベイズ(交差検証($p = 3 / 4$)、50の再サンプリング反復)の重要性について全ての特徴の評価を考慮した(図18)。

【0141】

以下の特徴のセットが同定された。これらは43の可能な特徴からの代表であり、互いの間の相関は最も少なく、かつ構築された分類子にとって重要である：

血小板($1\text{pibl} > 900$)：中央値1°平均強度(FLU)

活性化(activated)血小板：物体の N° (N°)

血小板($1\text{pibl} > 900$)：幾何平均1°ピーク強度 - ベースライン(FLU)

血小板($1\text{pibl} > 900$)：幾何平均1°全強度(FLU)

血小板($1\text{pibl} > 900$)：中央値1°面積(μm^2)

血小板($1\text{pibl} > 900$)：平均1°周囲(μm)

破片血小板：物体の N° (N°)

薄暗い血小板のパーセンテージ($300 \leq 1\text{pibl} \leq 1200$)：物体の N° / 血小板($1\text{pibl} > 900$)：物体の N°)(%)

血小板($1\text{pibl} > 900$)：幾何平均1°平均強度(FLU)

パーセンテージ：血小板($1\text{pibl} > 900$) 物体の数 / データ：物体の数

パーセンテージ：活性化血小板：物体の数 / 血小板($1\text{pibl} > 900$) 物体の数

パーセンテージ：薄暗い血小板：物体の数 / 血小板($1\text{pibl} > 900$) 物体の数

パーセンテージ：血小板($1\text{pibl} > 900$) 物体の数 / 破片血小板：物体の数

(Acumen読み取りの項において記載されるとおり)

【0142】

4.9.2 分類子評価

主要スクリーニングの可能性のあるヒットが検出される前に、構築された分類子を評価しなければならない。従って、試験データをHTSモードで自動化条件下で得た。この試験データは、既知の阻害剤、既知の毒性試験物質並びに中性コントロール及び刺激薬コントロールのような選択された試験物質の少数のセットを含んでいた。特異値分解を最初にこのデータセットに適用した。第1及び第3の成分に隠れた支配的因子はあまり明確でないが、第2の成分は、主に刺激薬コントロール(緑色)及び中性コントロール(赤色)の区別を説明する。ポジティブ参照のOS1は刺激薬コントロールの領域内にうまく分散している。この結果は、分類子の構築をかなり有望にする。特異値分解の結果にしたがって、以下のグループ - クラスを同定した：刺激薬コントロール、中性コントロール、OS1(参照)及び毒性の可能性のある試験物質。毒性の可能性のある試験物質のグループは非常に多様性がある。従ってこのグループを徹底的に調べた。刺激薬コントロール及び中性コントロールを用いた推定毒性試験物質の階層的クラスター分析に基づいて、3つの興味深い毒性の可能性のあるグループを分類子の構築のために同定した(精度 - 0.91、95%信頼区間 - (0.836、0.958)及びカッパ - 0.8866)(図20)。

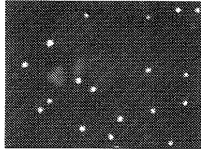
【0143】

選択された試験物質の小さいサブセットのセットを示す。それぞれの測定された試験物質についての全データベクトルの12次元性に起因して、いわゆる星形プロット表現を選択した。この種の表現は、グループ割り当ての迅速な視覚的評価を可能にする。選択されたツール試験物質は、毒性の可能性のあるグループ及び中性コントロール状態よりも、OS1参照及び刺激薬コントロールにより似ていた。

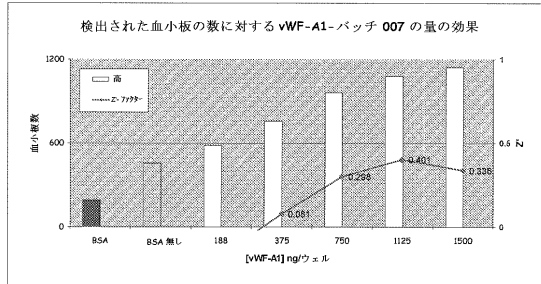
【0144】

これらの少数の実施例はさらに、多重パラメーター解析が、毒性試験物質とより特異的な非毒性阻害剤とを区別することにより偽陽性試験物質の数を減らすことができるということが期待されるということを説明する。

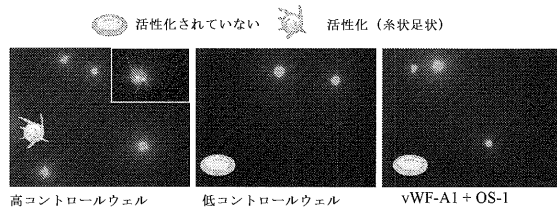
【図 1】



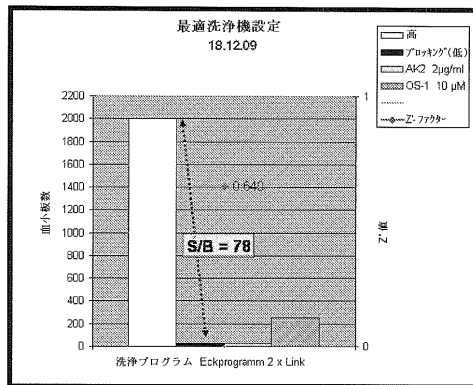
【図 2】



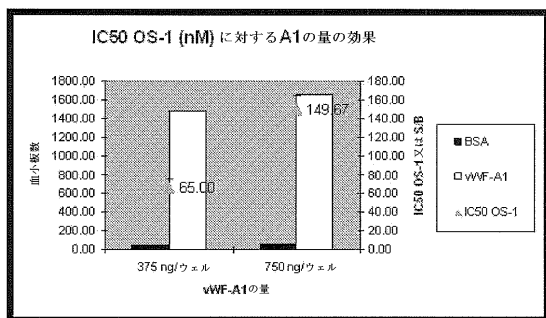
【図 3】



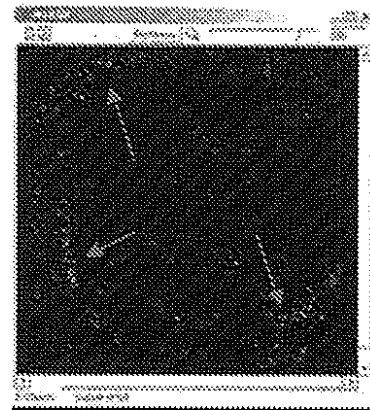
【図 6】



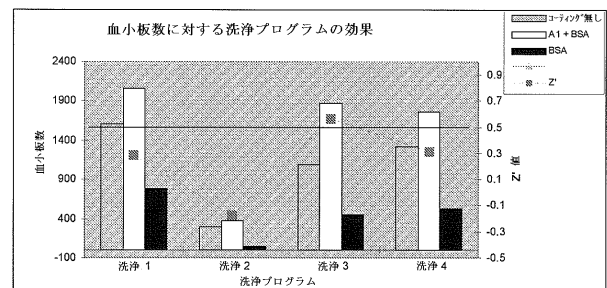
【図 7】



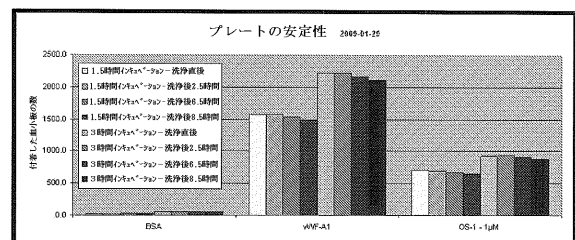
【図 4】



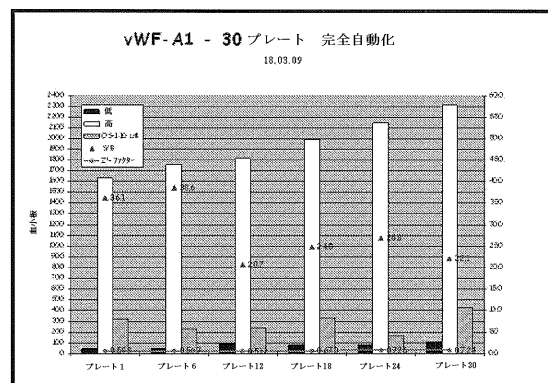
【図 5】



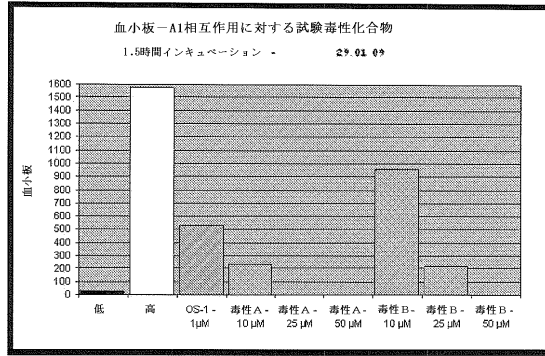
【図 8】



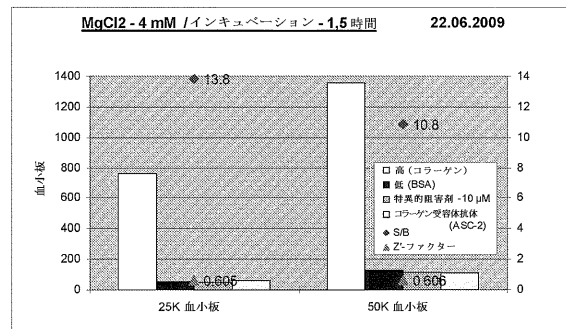
【図 9】



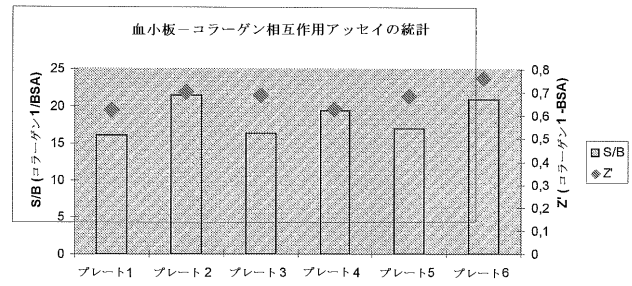
【図 10】



【図 11】



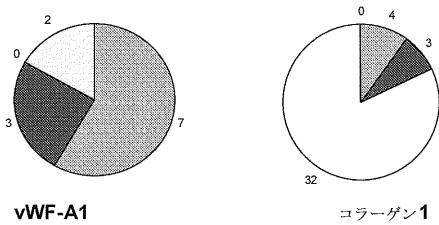
【図 12】



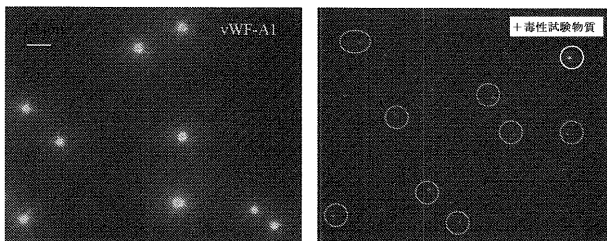
【図 13】

- vWF-A1 - 血小板相互作用の2つの阻害剤
- 32 のコラーゲン-血小板相互作用阻害剤
- 4 つの毒性化合物 (細胞ベースのアッセイにおいて)
- 31 の推定毒性化合物 (齧歯動物において毒性-長期研究)

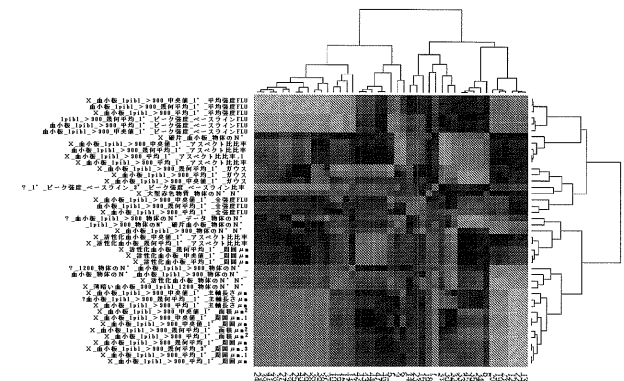
以下に対する血小板の相互作用を測定するアッセイにおける訓練セットのうちポジティブものの分布:



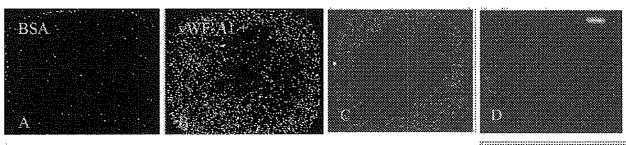
【図 14】



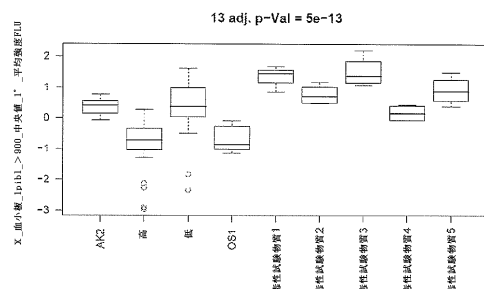
【図 17】



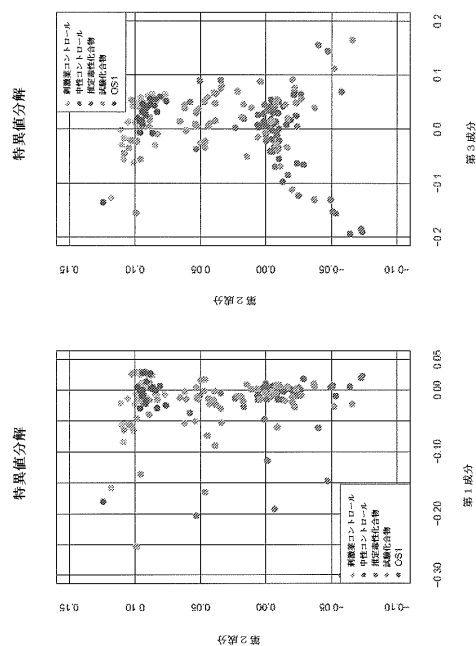
【図 15】



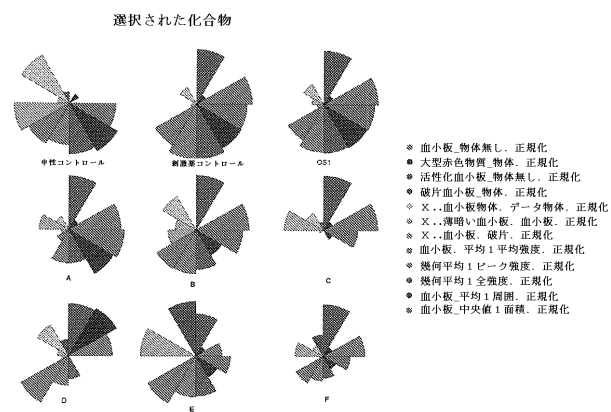
【図 16】



【 ㊦ 1 9 】



【 ㊦ 2 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/066200

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/49 G01N33/86
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N C12N C07K

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, COMPENDEX, INSPEC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RATHORE V ET AL: "Phospholipase Cgamma2 contributes to stable thrombus formation on VWF", 27 August 2004 (2004-08-27), FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, PAGE(S) 26 - 30, XP004536196, ISSN: 0014-5793 figure 1	1-4, 6-10,12
X	ARTONI ANDREA ET AL: "ADAMTS-13 Binds Platelets through Gpib", 1 November 2009 (2009-11-01), BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, PAGE(S) 1186/3044, XP009147500, ISSN: 0006-4971 abstract	1-6,8-12

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 2012

Date of mailing of the international search report

15/02/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Mason, William

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/066200

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YA A NAIMUSHIN ET AL: "Ability of Different Glycoprotein IIb-IIIa Ligands to Support Platelet Aggregation Induced by Activating Antibody CRC54", BIOCHEMISTRY (MOSCOW), KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 70, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 782-789, XP019294640, ISSN: 1608-3040 page 784, column 1 -----	1,9,10, 12
A	WO 2010/040861 A1 (UNIV DUBLIN CITY [IE]; ROYAL COLLEGE OF SURGEONS IN I [IE]; BASABE-DES) 15 April 2010 (2010-04-15) figures 7,9; examples 3,5 -----	1-12
A	CHEN DONG ET AL: "A new plate based plasma von Willebrand factor (VWF): Ristocetin cofactor activity assay", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 11, part 1, 1 November 2007 (2007-11-01), page 638A, XP009147521, ISSN: 0006-4971 abstract -----	1-12
X	SOBEL M ET AL: "HEPARIN INHIBITION OF VON WILLEBRAND FACTOR-DEPENDENT PLATELET FUNCTION IN-VITRO AND IN-VIVO", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 87, no. 5, 1991, pages 1787-1793, XP002668650, ISSN: 0021-9738 -----	13, 16-19, 21-24
Y	page 1788, column 2, lines 1-25; figures 2a-2c page 1789, column 1, line 45 - page 1790, column 1, line 6 -----	20,25
X	US 2008/293628 A1 (DAI KESHENG [US] ET AL) 27 November 2008 (2008-11-27) -----	13
Y	paragraph [0099] - paragraph [0104] -----	20,25
X	US 2006/264369 A1 (DIENER JOHN L [US] ET AL) 23 November 2006 (2006-11-23) examples 3,3A -----	13-15
A	EP 1 074 564 A1 (AJINOMOTO KK [JP]) 7 February 2001 (2001-02-07) paragraph [0108] -----	13-25
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/066200

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WILLIAMS S ET AL: "Inhibition of von willebrand factor binding to platelets by two recognition site peptides: the pentadecapeptide of the carboxy terminus of the fibrinogen gamma chain and the tetrapeptide arg-gly-asp-ser", THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, vol. 46, no. 3, 1 May 1987 (1987-05-01), pages 457-471, XP022879799, ISSN: 0049-3848, DOI: 10.1016/0049-3848(87)90133-2 [retrieved on 1987-05-01] page 458 - page 460; figure 1 -----	13-25
A	TANIUCHI Y ET AL: "Flavocetin-A and -B, two high molecular mass glycoprotein Ib binding proteins with high affinity purified from Trimeresurus flavoviridis venom, inhibit platelet aggregation at high shear stress", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1244, no. 2-3, 9 June 1995 (1995-06-09), pages 331-338, XP027450141, ISSN: 0304-4165, DOI: 10.1016/0304-4165(95)00052-D [retrieved on 1995-06-09] page 334, column 2, paragraph 2 - page 335, column 1, paragraph 1 -----	13-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/066200

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010040861 A1	15-04-2010	US 2011263452 A1 WO 2010040861 A1	27-10-2011 15-04-2010
US 2008293628 A1	27-11-2008	US 2008293628 A1 WO 2005110494 A2	27-11-2008 24-11-2005
US 2006264369 A1	23-11-2006	AU 2005282380 A1 CA 2578046 A1 EP 1791557 A2 JP 2008512097 A KR 20070101226 A US 2006264369 A1 US 2007066551 A1 WO 2006029258 A2	16-03-2006 16-03-2006 06-06-2007 24-04-2008 16-10-2007 23-11-2006 22-03-2007 16-03-2006
EP 1074564 A1	07-02-2001	AT 417068 T EP 1074564 A1 JP 4380067 B2 JP 2008224684 A US 6878811 B1 WO 9954360 A1	15-12-2008 07-02-2001 09-12-2009 25-09-2008 12-04-2005 28-10-1999

フロントページの続き

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

(72)発明者 クラウス・リンダウアー
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72)発明者 ウルリーケ・ルカシーク
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72)発明者 ホルスト・ブルーム
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72)発明者 トーマス・ランガー
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72)発明者 マーリオン・ゼルリン
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

F ターム(参考) 4B063 QA18 QQ03 QQ79 QR48 QR72 QS32 QX02

专利名称(译)	用于检测和/或量化与相互作用配偶体的血小板相互作用的方法		
公开(公告)号	JP2013538352A	公开(公告)日	2013-10-10
申请号	JP2013528698	申请日	2011-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	赛诺菲		
申请(专利权)人(译)	Sanofui		
[标]发明人	メルシーデホープ クラウスリンダウアー ウルリーケルカシーク ホルストブルーム トーマスランガー マーリオンゼルリン		
发明人	メルシー・デ ホープ クラウス・リンダウアー ウルリーケル・カシーク ホルスト・ブルーム トーマス・ランガー マーリオン・ゼルリン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/04		
CPC分类号	G01N33/86 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.D G01N33/543.501.A C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QS32 4B063/QX02		
优先权	2010306008 2010-09-21 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了检测和/或定量血小板或血小板表面分子与相互作用配偶体的相互作用的方法，检测测试物质调节血小板或血小板表面分子与相互作用配偶体的相互作用的能力。和/或量化，以及产品。

