

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5042237号  
(P5042237)

(45) 発行日 平成24年10月3日(2012.10.3)

(24) 登録日 平成24年7月20日(2012.7.20)

| (51) Int.Cl. |              | F I              |                     |
|--------------|--------------|------------------|---------------------|
| <b>C07K</b>  | <b>19/00</b> | <b>(2006.01)</b> | C O 7 K 19/00 Z N A |
| <b>C07K</b>  | <b>7/08</b>  | <b>(2006.01)</b> | C O 7 K 7/08        |
| <b>C12N</b>  | <b>15/09</b> | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 N 15/00 A     |
| <b>G01N</b>  | <b>33/53</b> | <b>(2006.01)</b> | G O 1 N 33/53 K     |
| <b>A61K</b>  | <b>38/00</b> | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K 37/02       |

請求項の数 15 (全 18 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |  |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2008-552758 (P2008-552758)  | (73) 特許権者 | 594110594                                  |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年2月7日(2007.2.7)           |           | ステイフチュンク フェル ディアグノス<br>ティシュ フォルシュンク        |
| (65) 公表番号     | 特表2009-525725 (P2009-525725A) |           | スイス国 シーエイチー1785 クレツ<br>シア スル モラ, ブラツーロンド ( |
| (43) 公表日      | 平成21年7月16日(2009.7.16)         |           | 番地なし)                                      |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2007/001042             | (74) 代理人  | 110000796                                  |
| (87) 国際公開番号   | W02007/090630                 |           | 特許業務法人三枝国際特許事務所                            |
| (87) 国際公開日    | 平成19年8月16日(2007.8.16)         | (72) 発明者  | リガル ドミニク                                   |
| 審査請求日         | 平成21年10月7日(2009.10.7)         |           | フランス国 エフ-69370 リヨン                         |
| (31) 優先権主張番号  | 06002496.5                    | (72) 発明者  | ティボー ジュリアン                                 |
| (32) 優先日      | 平成18年2月7日(2006.2.7)           |           | フランス国 エフ-69007 リヨン                         |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    |           | ル ガラン 7                                    |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板抗原特異抗体の結合を中和するペプチドアプタマー並びにそれを含む診断及び治療への応用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(A) N末端からC末端の方向に、  
 (i) バリン、イソロイシン、ロイシン、アラニン及びグリシンから成る群から選択される4つの脂肪族アミノ酸、  
 (ii) アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択される2つの酸性アミノ酸、  
 (iii) 1つのプロリン、  
 (iv) アルギニン及びリシンから成る群から選択される1つの塩基性アミノ酸、  
 (v) アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択される2つの酸性アミノ酸、  
 (vi) トレオニン及びセリンから成る群から選択される1つのアルコールアミノ酸、及び、  
 (vii) トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンから成る群から選択される1つの芳香族アミノ酸、  
 の配列を有する、少なくとも1つのドデカペプチド、及び  
 (B) 少なくとも1つのポリペプチド、  
 を含む、ペプチドアプタマー。

## 【請求項2】

さらに(C) 1つ又は複数の検出可能なマーカを含む、請求項1に記載のペプチドアプタマー。

## 【請求項 3】

前記ドデカペプチドの配列が配列番号 1 の配列を有する、請求項 1 又は 2 に記載のペプチドアダプター。

## 【請求項 4】

前記ポリペプチドがチオレドキシン (Trx)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、コイルドコイルポリペプチド、ジスルフィド架橋を形成可能なシステイン含有ポリペプチド、又は 1 つ又は複数のそれらの断片から成る群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドアダプター。

## 【請求項 5】

前記検出可能なマーカーが蛍光マーカー、放射性マーカー、His タグ、グルタチオントランスフェラーゼ (GST)、Flag タグ、ビオチン、Ha タグ、Myc タグ及び Xpress タグから成る群から選択される、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のペプチドアダプター。

10

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチドアダプターをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

## 【請求項 7】

ヒト血小板抗原特異抗体を検出又は同定する方法であって、  
 ( i ) ヒト血小板抗原特異抗体の検査を受けるヒト血清を請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチドアダプターと接触させる工程、及び、  
 ( i i ) 前記ペプチドアダプターのヒト血小板抗原特異抗体との直接又は間接相互作用を検出する工程、  
 を含む、ヒト血小板抗原特異抗体を検出又は同定する方法。

20

## 【請求項 8】

前記検出する工程 ( i i ) がイムノプロット、免疫沈降、イムノキャプチャー、血小板抗原のモノクローナル抗体固定化、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、フローサイトメトリー、プロテインアレイ技術、分光法、質量分析、クロマトグラフィー、表面プラズモン共鳴、蛍光消光 (fluorescence extinction) 及び蛍光エネルギー移動から成る群から選択される 1 つ又は複数の検出方法を含む、請求項 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

検出又は同定される前記ヒト血小板抗原特異抗体が抗 HPA - 1 a である、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

免疫性血小板減少症の症状を患う患者の血清中のヒト血小板抗原特異抗体を検出及び / 又は同定する、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記免疫性血小板減少症が特発性 (ideopathic) 血小板減少性紫斑病 (ITP)、新生児 / 胎児同種免疫性血小板減少症 (NAIT)、輸血後紫斑病 (PTP) 又は血小板不応状態から成る群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチドアダプターを含む、ヒト血小板抗原特異抗体のスクリーニング及び / 又は同定のための診断キット。

40

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチドアダプターを使用することを、採取されたヒト血清中のヒト血小板抗原特異抗体を検出するイムノアッセイ。

## 【請求項 14】

治療に有効な量の請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチドアダプターを含む、薬学的組成物。

## 【請求項 15】

更に薬学的に許容される塩、補助剤、希釈剤及び溶剤、又はそれらの任意の組み合わせか

50

ら成る群から選択される1つ又は複数の追加成分を含む、請求項14に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血小板GPIIb/IIIa分子に存在するヒト血小板抗原HPA-1aエピトープを特に模倣し、且つHPA-1a特異抗体(抗HPA-1a)の結合を中和可能なペプチドアプタマーに関する。このペプチドアプタマーは、ヒト血清中のHPA-1a特異抗体を検出及び同定する方法、抗体のスクリーニング及び同定のための診断キット、イムノアッセイ及び薬学的組成物に有利に使用される。

10

【背景技術】

【0002】

血小板はヒト血液の主成分の1つであり、血液凝固系の細胞成分である。血液は基本的に、血漿、赤血球(red blood cell/erythrocyte)、白血球(white blood cell/leukocyte)、及び血小板(platelet/thrombocyte)から構成されている。血小板は骨髄において巨核球により産生される。血小板は実際は真の細胞ではなく、顆粒を含む膜及び細胞質の断片であることが一般に認識されている。より詳細には、血小板は巨核球由来の外膜及び細胞質から成り、これらは顆粒、濃密体、暗調小管系、及びミトコンドリアを含む。

【0003】

血小板糖タンパク質GPIIb/IIIa、GPIa/IX、GPIa/IIa又はGPIVの他に、血小板はグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーにより連結される少なくとも5つの糖タンパク質を含む。これらの一つに、CD109に分類される170kDaの糖タンパク質がある。CD109は中でも、Gov同種抗原を保有することを特徴とする。

20

【0004】

免疫性血小板減少症は、血小板が抗体により破壊される臨床状態である。特発性血小板減少性紫斑病(ITP)は、GPIIb/IIIa、GPIa/IX、GPIa/IIa又はGPIV血小板糖タンパク質を標的とする、IgG抗血小板自己抗体により引き起こされる自己免疫性血小板破壊を特徴とする、ありふれた疾患である。新生児/胎児同種免疫性血小板減少症(NAIT)は、胎児血小板を破壊し、重症血小板減少症を誘発する、母系ヒト血小板同種抗原(HPA)同種抗体(抗HPA)により引き起こされる。NAITは妊娠例の1/1000の推定発症率を有し、in uteroで脳出血又は脳室拡大をもたらす。同種抗体のスクリーニング及び同定は、この疾病の予防及び治療に必須の工程である。輸血後紫斑病(PTP)は、抗HPA同種抗体に起因する、血小板の別の免疫介在性破壊である。血小板不応状態は、レシピエントが産生した同種抗体により輸血血小板が破壊される臨床状態である。これらの抗体の特性決定は、効果的な血小板輸血の提供に必要とされる工程である。

30

【0005】

イムノプロット法、免疫沈降、イムノキャプチャー、血小板免疫蛍光試験、又はモノクローナル抗体固定化血小板検定(MAIPA)等の血小板抗原のモノクローナル抗体固定化、又は酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)において、これまでの血小板を対象とする自己抗体又は同種抗体の検出方法は全て、新鮮血小板を使用する。これらの測定法は全て、事前にHPA系で分類された血小板の採取を要する。さらに、当該技術分野で既知のこれらの測定法は、上述したように、新鮮血小板を使用する。しかしながら、4又は20での保存の間、血小板の糖タンパク質は脱離する過程をたどるため、血小板製剤は幾つかの血小板抗体の検出に不適切となる。一週間を超えるような長い期間にわたって正常なレベルの血小板糖タンパク質発現を保つ試みは全て成功(succesful)しなかった。これらの要因のために、毎週新たなバッチの血小板をドナーから採取する必要がある。したがって、血小板免疫学の分野において、正常なレベルの血小板糖タンパク質発現を、(例えば一ヶ月を超えるような)長期間保つ方法が常に必要とされている。

40

50

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

したがって、本発明の根底にある技術上の問題は、ヒト血清中のヒト血小板抗原特異抗体の検出及び/又は同定を可能にする新規のシステムを提供することにある。本発明は特に、(i)血小板糖タンパク質に存在する血小板同種抗原のエピトープ発現、すなわち正常なレベル、また好ましくは正常なパターンでの発現を、保存下で安定に維持するアプタマー、(ii)かかる安定なアプタマーを産生するプロセス、及び(iii)かかる安定なアプタマーの分析的な、殊に免疫学的な用途を提供するであろう。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

上記の技術上の問題に対する解決策は、特許請求の範囲に特徴付けられる実施形態を提供することにより達成される。

## 【0008】

特に、(A)N末端からC末端の方向に、  
 (i)バリン、イソロイシン、ロイシン、アラニン及びグリシンから成る群から選択される4つの脂肪族アミノ酸、  
 (ii)アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択される2つの酸性アミノ酸、  
 (iii)1つのプロリン、  
 (iv)アルギニン、リシン及びヒスチジンから成る群から選択される1つの塩基性アミノ酸、  
 (v)アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択される2つの酸性アミノ酸、  
 (vi)トレオニン及びセリンから成る群から選択される1つのアルコールアミノ酸、及び、  
 (vii)トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンから成る群から選択される1つの芳香族アミノ酸、  
 の配列を有する、少なくとも1つのドデカペプチド、  
 (B)少なくとも1つのポリペプチド、及び必要に応じて、  
 (C)1つ又は複数の検出可能なマーカー、  
 を含む、ペプチドアプタマーが提供される。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0009】

「ペプチドアプタマー」という用語は本明細書中で用いられる場合、ドデカペプチドがハプテンとして機能する、上記の任意の化合物も包含する。さらに、本発明によるペプチドアプタマーは、血小板糖タンパク質GPIIb/IIIaに存在するHPA-1aエピトープを模倣することができる。

## 【0010】

本発明によると、「ドデカペプチド」という用語は、上記の又は図1a及び図1bに記載のアミノ酸配列を有する任意のドデカペプチドを包含する。特に、ドデカペプチドは任意の結合様式、例えば共有結合、水素架橋、ファンデルワールス結合又は静電結合を介して、1つ又は複数のポリペプチドに結合し得る。本発明の好適な実施形態では、ドデカペプチドはポリペプチドに共有結合する。

## 【0011】

本発明の一実施形態では、上記のペプチドアプタマーはVVAGDDPREDTW(配列番号1)の配列を有するドデカペプチドを含む。

## 【0012】

さらに、本明細書中で、「ポリペプチド」という用語は配列の長さ又は種類に関して限定されず、骨格タンパク質又は融合タンパク質の配列等の、任意の適切なアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含む。本発明によると、当該ポリペプチド（複数可）は、本発明においてそれらの断片の形で使用され得るし、検出に又は任意の精製工程で使用される標識等の、それらの調製に由来する任意の残基を含有し得る。本発明によるポリペプチド（複数可）は、グリコシル化（glycosylation）、核酸の付着又は任意の他の化学修飾等の、生物環境に接触することに由来する変化を有するポリペプチド（複数可）も包含する。

【0013】

本発明の別の実施形態では、上記のペプチドアプタマーはチオレドキシン（Trx）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、コイルドコイルポリペプチド及びジスルフィド架橋を形成可能なシステイン含有ポリペプチドから成る群から選択されるポリペプチドを含む。

10

【0014】

本発明によるポリペプチド（複数可）は、不活性担体、ドデカペプチドによる抗体への提示に有用な骨格タンパク質、ペプチドアプタマーの精製に有用な精製助剤又はペプチドアプタマーの検出において有用な検出手段として機能し得る。

【0015】

本発明によると、上記のドデカペプチド（複数可）は、ポリペプチド（複数可）の任意の位置に結合し得る。例えば、ドデカペプチド（複数可）はポリペプチド（複数可）のN末端又はC末端に結合し得、又はポリペプチド内に組み込まれて、当該ドデカペプチドのN末端及びC末端に隣接する2つの断片を生じ得る。本発明によるペプチドアプタマーが2つ以上のドデカペプチドを含有することがさらに考えられるが、これらは当該ポリペプチド（複数可）の同じ位置若しくは異なる位置又はその断片に結合し得る。本発明のさらなる実施形態では、ペプチドアプタマーは、直接又はペプチドスペーサーを介して互いに結合する、2つ以上のドデカペプチドを含有する。

20

【0016】

「検出可能なマーカー」という用語は、本明細書で用いられる場合、生化学的検出マーカー等の特別な種類の検出マーカーに限られず、検出に好適な当該技術分野で既知の任意の残基を包含する。

【0017】

本発明の一実施形態では、上記のペプチドアプタマーは、蛍光マーカー、放射性マーカー、Hisタグ、グルタチオントランスフェラーゼ（GST）、Flagタグ、ビオチン、Haタグ、Mycタグ及びXPressタグから成る群から選択される検出可能なマーカーを含む。

30

【0018】

本明細書で用いられる場合、「チオレドキシン - ヒト - 血小板 - 抗原 1a」（Trx - HPA - 1a）は、本発明の好適な実施形態に関し、ここで上記のペプチドアプタマーは、検出マーカーとしてHisタグを有するポリペプチドチオレドキシン（Trx）の活性部位中に融合する、配列番号1に記載のドデカペプチドを含む（図3a及び図3b）。当該Trx - HPA - 1aは、配列番号2に記載のタンパク質配列を有し（図3b）、配列番号3の核酸配列によりコードされる（図3a）。

【0019】

本発明のペプチドアプタマーは、組み換えDNA技術のような当該技術分野で既知の任意の方法により調製できる。

40

【0020】

本発明のさらなる実施形態は、ヒト血小板抗原特異抗体を検出又は同定する方法であって、

- (i) ヒト血小板抗原特異抗体の検査を受けるヒト血清を準備する工程、
  - (ii) ヒト血清を上記のペプチドアプタマーと接触させる工程、及び、
  - (iii) ペプチドアプタマーのヒト血小板抗原特異抗体との直接又は間接相互作用を検出する工程、
- を含む、ヒト血小板抗原特異抗体を検出又は同定する方法に関する。

50

## 【 0 0 2 1 】

本明細書中で、「ヒト血小板抗原」という用語は、血小板 G P I I b / I I I a 糖タンパク質に存在する H P A - 1 a エピトープだけでなく、血清又は任意の体液中で可溶性の G P I I b / I I I a に存在する可溶性 H P A - 1 a エピトープも包含する。

## 【 0 0 2 2 】

本明細書中で、「ヒト血小板抗原特異抗体」という用語は、任意の H P A - 1 a 特異抗体（抗 H P A - 1 a ）を包含し、他のタンパク質又は糖タンパク質と交差反応性のある抗体も包含する。

## 【 0 0 2 3 】

本明細書中で用いられる場合、「ヒト血清」という用語は、直接患者から又は保存血液から採取した任意のヒト血液の血清、血漿又は羊水を包含する。

10

## 【 0 0 2 4 】

本発明によると、「直接又は間接相互作用」という表現は、ペプチドアプタマーとヒト血小板抗原特異抗体との間の任意の相互作用を包含し、他の分子が関与する任意の相互作用をさらに包含する。このような他の分子は、例えばタンパク質、タンパク質複合体、核酸、糖及び/又は脂質であり得る。

## 【 0 0 2 5 】

上記の方法の検出する工程（ i i i ）はイムノプロット、免疫沈降、イムノキャプチャー、血小板抗原のモノクローナル抗体固定化、酵素結合免疫吸着検定法（ E L I S A ）、フローサイトメトリー、プロテインアレイ技術、分光法、質量分析、クロマトグラフィー、表面プラズモン共鳴、蛍光消光及び/又は蛍光エネルギー移動から成る群から選択される1つ又は複数の検出方法を含む。

20

## 【 0 0 2 6 】

本発明の好適な実施形態では、上記の方法で検出又は同定される抗体は、抗 H P A - 1 a である。

## 【 0 0 2 7 】

本発明の別の実施形態では、免疫性血小板減少症を患う患者の血清中のヒト血小板抗原特異抗体を検出及び/又は同定するために、上記の方法は用いられ得る。

## 【 0 0 2 8 】

本発明の好適な実施形態では、上記の方法は患者の血清中のヒト血小板抗原特異抗体を検出及び/又は同定するために使用され、ここで患者は、特発性（ ideopathic ）血小板減少性紫斑病（ I T P ）、新生児/胎児同種免疫性血小板減少症（ N A I T ）、輸血後紫斑病（ P T P ）又は血小板不応状態から成る群から選択される免疫性血小板減少症を患っている。

30

## 【 0 0 2 9 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明によるペプチドアプタマーを含む、ヒト血小板抗原特異抗体のスクリーニング及び同定のための診断キットに関する。この診断キットは、スクリーニング又は同定手順を実施するために当該技術分野で既知の任意のさらなる成分/化合物を含み得る。

## 【 0 0 3 0 】

本発明の別の実施形態は、本発明によるペプチドアプタマーを含む、ヒト血清中のヒト血小板抗原特異抗体を検出するイムノアッセイに関する。このようなイムノアッセイの例としては、イムノプロット法、免疫沈降、イムノキャプチャー、血小板抗原のモノクローナル抗体固定化、酵素結合免疫吸着検定法（ E L I S A ）及び/又は放射免疫測定法が挙げられる。さらなるアッセイは、表面プラズモン共鳴、蛍光消光（ fluorescence evanescence ）及びフローサイトメトリーに関する。

40

## 【 0 0 3 1 】

本発明によるさらなる実施形態は、治療に有効な量の本発明によるペプチドアプタマー及び必要に応じて、薬学的に許容される担体、薬学的に許容される塩、補助剤、希釈剤及び溶剤、又はそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される1つ又は複数の追加成

50

分を含む、薬学的組成物に関する。

【0032】

さらに、薬学的組成物は、それを必要とする患者に対して5～50mgの適切な用量で、非経口的、経口的、皮膚に若しくは舌下にといった任意の適切な手段を介して投与するか、又はリンパ器官に注射することができる。

【0033】

本発明の薬学的組成物は、特発性(ideopathic)血小板減少性紫斑病(ITP)、新生児/胎児同種免疫性血小板減少症(NAIT)、輸血後紫斑病(PTP)又は血小板不応状態等の免疫性血小板減少症疾患の治療及び/又は予防に使用することができる。このアダマーを、母体の血漿中の抗HPA-1a抗体を中和するために用いること、胎児又は羊水中に注射することが可能である。さらに、アフエーシス手順(選択的血漿吸着法)において、血漿をインキュベートした場合に抗体を除去するためのビーズ又はポリマーのような支持体に、このアダマーをグラフトすることが可能である。

【実施例】

【0034】

実施例1

FliTrx(商標)ペプチドライブラリ及びモノクローナル抗体

Lu et al. (Lu Z, Murray KS, Van Cleave V, LaVallie ER, Stahl ML, McCoy JM. 「フラジェリンとの機能融合としての大腸菌細胞表面上のチオレドキシランダムペプチドライブラリの発現: タンパク質-タンパク質相互作用の探査のために設計されたシステム (Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions)」Biotechnology (N Y). 1995 Apr; 13(4): 366-72) により記載されたシステムに基づく、FliTrx(商標)ランダムペプチドライブラリは、Invitrogen (San Diego, CA) より入手した。表現型HPA-1aに特異的なGP11b/IIIaタンパク質に対するmAb Camtranは、Cambridge (Griffin H. M., Ouweland W. H., 「V遺伝子ファージディスプレイライブラリ由来の血小板糖タンパク質IIIaのロイシン33に特異的なヒトモノクローナル抗体(HPA-1a) (A human monoclonal antibody specific for the Leucine 33 (HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from V gene phage display library)」Blood 1995, 86, 12: 4430-4436) より入手した。

【0035】

増殖及びペプチドライブラリの誘導

細胞培養及び一般的なパンニング法を製造業者のプロトコルに記載の通り実施する。発現を駆動するPLバクテリオファージプロモータを含有するpFliTrx(商標)を、c1リプレッサの発現がtrpプロモータの支配下にある大腸菌(GI826)中で伝播する。プラスミドを含む大腸菌細胞を、100µg/mlのアンピシリンを含有するIMC培地(1xM9塩(40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8.5mM NaCl、20mM NH<sub>4</sub>Cl)、0.2%カザミノ酸、0.5%グルコース、1mM MgCl<sub>2</sub>)中で25℃で一晩、飽和状態になるまで増殖する。100µg/mlのトリプトファンにより、ペプチド挿入を含むチオレドキシ-フラジェリン融合タンパク質の発現を25℃で6時間誘導する。次に、10mlの誘導大腸菌培養物に0.1gの脱脂粉乳、300µlの5M NaCl及び500µlの20% -メチルマンノシドの混合物を添加する。得られた溶液は、以下のスクリーニングのためのペプチドライブラリとして使用される。

【0036】

ランダムペプチドディスプレイライブラリのパンニング

60mm組織培養プレート(Nunc)をペプチドライブラリスクリーニングに使用する。1mlの滅菌水で希釈した抗体20µgを用いて、20～25℃で1時間、プレートをプレコートする。液体を除去した後、10mlの滅菌水でプレートを洗浄し、次に10ml

10

20

30

40

50

のブロッキング溶液 (IMC培地中、1%脱脂粉乳、150 mM NaCl、1% -メチルマンノシド及び100 µg/mlのアンプシリン)を補充し、1時間穏やかに攪拌する。6時間のペプチドライブラリ誘導の終了の直前に、ブロッキング溶液をデカントし、得られた溶液の10 mlアリコートプレートを添加する。プレートを水平振盪機で75 rpmで1分間穏やかに攪拌し、20~25 で1時間インキュベートする。細菌培養物をデカントし、100 µg/mlのアンプシリン及び1% -メチルマンノシドを含有するIMC培地10 mlで、5分間穏やかに攪拌することでプレートを洗浄する。さらに4回洗浄した後、1 mlのIMCで30秒間ポルテックスすることで、結合細菌を分離する。残存する分離細菌をプレートから回収し、次のバイオパンニングのために増殖する。続く4回のバイオパンニングで同様の手順を実施する。5回のバイオパンニング後、細菌のコロニーをRMG (1×M9塩、2%カザミノ酸、0.5%グルコース、1 mM MgCl<sub>2</sub>、100 µg/mlのアンプシリン及び1.5%アガー)プレートから無作為に取り出し、30 で一晩増殖する。

10

## 【0037】

## ウエスタンブロット

基本的には製造業者のプロトコルに従って、ウエスタンブロットにより陽性クローンの同定を行う。簡潔に述べると、RMGプレートの40のクローンを2 mlのRM培地 (1×M9塩、2%カザミノ酸、1%グリセロール、1 mM MgCl<sub>2</sub>) 100 µg/mlのアンプシリンを含む)に移し、30 で飽和状態になるまで振盪しながら増殖する。一晩培養物からの40 µlの試料を、細胞密度がOD600、0.75になるまで、100 µg/mlのアンプシリン及び100 µg/mlのトリプトファンを含有するIMC 2 ml中に37 で接種した。誘導細胞培養物の1.5 mlアリコートを採取し、10000 gで1分間遠心分離した。ペレットをSDSポリアクリルアミドゲルローディングバッファーに再懸濁し、5分間煮沸し、8% SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。分離したタンパク質を、液体電気泳動転写セル (Bio-Rad) のニトロセルロースメンブレン (PROTRAN (登録商標) BA79、Schleicher & Schuell) にブロットする。次にメンブレンをTBS (10 mM Tris (pH 7.2) 及び0.15 M NaCl) 5%粉乳を用いて、4 で一晩ブロッキングした後、TBS 1%粉乳、0.05% Tween 20で1:100に希釈したcamtran抗体を用いて、20~25 で2時間インキュベートする。TBS 0.05% Tween 20で3回洗浄した後、1:92000に希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ヒトIgG (Fc特異的) (Sigma、A0170)を用いて、20~25 で40分間、メンブレンをインキュベートする。TBS 0.05% Tween 20でさらに3回洗浄した後、Lumi-Light PLUSウエスタンブロット基質 (Roche) により結合複合体を検出する。次に、HPA-1b表現型に特異的なGPIIb/IIIaタンパク質に反応するヒト血清を用いて、ウエスタンブロットを行うことにより陽性クローンを再分析する。

20

30

## 【0038】

## DNAシーケンシング

同定したクローンのプラスミドDNAを、Wizard (登録商標) Plus SVミニプレップDNA精製システム (Promega) を使用して単離する。Flitrix (商標) フォワードシーケンシングプライマー (5' - ATTCACCTGACTGACGAC - 3') を使用して、ヌクレオチド配列をMWGにより決定する。

40

## 【0039】

タンパク質Trx-HPA-1aのクローニング、発現及び精製

## 【0040】

## 発現プラスミドのクローニング及び生成

事前に選択したpFlitrixプラスミドを用いて、チオレドキシソペプチドをコードするcDNAをPCR反応により増幅する。PCR条件は次の通りである: 95 で1分、続いて95 で45秒、36 で30秒、72 で45秒の12サイクル、次に95 で45秒、45 で30秒、72 で45秒の20サイクル、そして反応を完全にす

50

めに72 で3分間。3'末端に、プライマー配列5'-TGTCGACCCAGGTTAGCGTC-3'はSalI部位を誘導し、5'末端に、プライマー配列5'-TCATATGATGAGCGATAAAATTA-3'はNdeI部位を誘導する。PCRで生成したDNA断片をpGEM(登録商標)-TイージーベクターシステムI(Promega)にサブクローニングする。次に、プラスミド構築物を、制限酵素NdeI及びSalIにより増幅及び消化する。消化されたDNA断片を、SalI部位の下流の停止コドンの前の6つのHisコドンにコードする、アンピシリン耐性ベクターpT7-7(T7ポリメラーゼ発現系に基づくベクター)のNdeI部位及びSalI部位にクローニングする。プラスミドを大腸菌株DH5に形質転換し、アンピシリン耐性コロニーを単離する。耐性コロニーを増殖することでプラスミドの大規模な産生と精製が可能になる。プラスミドの適切な構築をDNAシーケンシングにより確認する。

10

Trx-HPA-1a(JT-PLP01)の過剰発現及び精製

プラスミドを大腸菌株C41(DE3)に形質転換する(Miroux B, Walker JE.「大腸菌におけるタンパク質の過剰産生:幾つかの膜タンパク質及び球状タンパク質の高レベルの合成を可能にする突然変異宿主(Overproduction of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels)」J Mol Biol. 1996 Jul 19; 260(3): 289-98)。新たに形質転換したコロニーを20µg/mlのアンピシリンを含有する400mlの2YT培地(16%バクトトリプトン、10%バクト酵母抽出物、85.5mM NaCl)に接種し、0.7mM イソプロピル-b-D-チオガラクトピラノシドでの誘導前に、OD600が0.6~0.8になるまで37 で増殖する。37 での一晩培養後、細胞を遠心分離により採取する。ペレットを再懸濁し、10mLの溶菌バッファー(20mM Tris-HCl(pH8.0)、20%グリセロール、500mM NaCl、0.1% Triton X-100、1mM PMSF、1mg/mlのリゾチーム、1/2錠のComplete Mini EDTA-free(Roche)及び250単位/mlのBenzonase(Merck))中で、4 で30分間インキュベートする。画分(5ml)を30秒間の超音波処理により破碎する。上清の4回の遠心分離(9000gで30分間)後、リゾチーム及びBenzonaseを含まない溶菌バッファー中で予め平衡化した7ml Ni-NTAアガロースカラム(Qiagen)にその可溶性画分をアプライする。混合物を4 で1時間、浴中でインキュベートする。リゾチーム及びBenzonaseを含まない溶菌バッファー、次いで20mM Tris-HCl(pH8.0)、20%グリセロール、100mM KCl、0.5mM PMSF、及び20mMイミダゾールを含む溶菌バッファーでカラムを洗浄し、100mMイミダゾールを含有する同じバッファーでTrx-HPA-1aを溶出する。SDS-PAGEによりTrx-HPA-1aを含有すると判断された画分をプールする。試料のバッファーを交換し、5kDaカットオフのVivaspin Concentratorメンブレン(Vivascience)及び20mM Tris(pH8.0)、10mM NaClを用いて、遠心分離により試料を濃縮する。1mL Q-セファロースカラム(Mono Q HR 5/5, Amersham Pharmacia Biotech)に試料をアプライする。20mM Tris(pH8.0)、10mM NaClでカラムを洗浄し、10mM~1M NaClの直線勾配でTrx-HPA-1aを溶出する。Trx-HPA-1aに富む画分をプールし、1~15mg/mlに濃縮し、PBS又は滅菌水中、Vivaspin Concentratorで平衡化し、使用するまで-20 で保管する。タンパク質濃度をブラッドフォード法(Kruger NJ.「タンパク質定量化のためのブラッドフォード法(The Bradford method for protein quantitation)」Methods Mol. Biol. 1994; 32: 9-15)により求める。

20

30

40

【0041】

精製Trx-HPA-1aの分析

エレクトロスプレー装置API 165(Applied Biosystems)を使用して質量スペクトルを得る。ペプチドマスフィンガープリンティング及びMaldi-ToF分析(Voyager-DE TM PRO, Applied Biosystems)により同定する。

50

## 【0042】

## ヒト血清からの全IgGの精製

100mM Tris-HCl (pH8) 中で予め平衡化した250 $\mu$ l/ml プロテインAセファロースビーズカラム (P3391, Sigma-Aldrich) に、10%の1M Tris-HCl (pH8) で平衡化したヒト血清をアプライする。カラムを10容量の100mM Tris-HCl (pH8) 及び10容量の10mM Tris-HCl (pH8) で洗浄する。全IgGを100mMグリシン (pH3) で溶出する。溶出画分を10%の1M Tris-HCl (pH8) で中和する。IgGを含有する画分を濃縮し、5kDaカットオフのVivaspin Concentratorメンブレン及びPBSでバッファーを交換する。SDS-PAGEで試料を分析し、IgG濃度をブラッドフォード法 (Kruger NJ. 「タンパク質定量化のためのブラッドフォード法 (The Bradford method for protein quantitation)」Methods Mol. Biol. 1994; 32: 9-15) により求める。

10

## 【0043】

## 実施例2

## 免疫共沈降

1 $\mu$ gのTrx-HPA-1aタンパク質を、バッファーA (PBS、0.5Mトリス) 又は0.01% Tween20、0.1% NP40、若しくは0.05% Tritonを含むバッファーA中、ヒト血清からのIgG抽出物30 $\mu$ gで20~25で2時間インキュベートする。10%の1M Tris-HClを混合物に添加し、100mM Tris-HCl (pH8) で予め平衡化した25 $\mu$ lのプロテインAセファロースビーズを用いて4で45分インキュベートする。次に、ビーズを100mM Tris-HCl (pH8)、0.2% Tween20で4で10分3回洗浄し、10mM Tris-HCl (pH8)、0.2% Tween20で3回洗浄する。プロテインA-セファロース-IgG-Trx-HPA-1a複合体の沈殿 (fall) を作成するために、混合物を1000gで2分間遠心分離する。SDSサンプルバッファー中で煮沸することによりタンパク質を溶出し、溶出物を15% SDSポリアクリルアミドゲル上で溶解し、液体電気泳動転写セルのニトロセルロースメンブレン (PROTRAN (登録商標) BA79, Schleicher & Schuell) 上にプロットする。次に、TBS5%粉乳でメンブレンを4で一晩ブロッキングした後、TBS1%粉乳、0.05% Tween20で1:200に希釈した抗His抗体 (Hisプローブ, Santa Cruz Biotechnology) を用いて、20~25で1時間10分インキュベートする。TBS0.05% Tween20で3回洗浄した後、1:3000に希釈したHRP結合ヤギ抗ウサギIgG (Dakocytomation) を用いて、メンブレンを20~25で50分間インキュベートする。TBS0.05% Tween20でさらに3回洗浄した後、Lumi-Light PLUSウエスタンプロット基質により結合複合体を検出する。

20

30

## 【0044】

## 実施例3

## イムノキャプチャー

Rachel et al.により発表された技法 (Med Lab Sci: 1985, 42; 194-199) によると、イムノキャプチャーは、血小板に対するIgG抗体を検出する古典的な技法である。

40

## 【0045】

本明細書中で、Trx-HPA-1aと血小板HPA-1aに対する抗体を含有するヒト血清との相互作用は、イムノキャプチャーにより試験される。血小板アッセイに対するIgG抗体を検出するための固相システム (Capture P (登録商標)、Immucor) が使用される。血小板のプールをTrx-HPA-1aタンパク質と置き換える。炭酸バッファー (脱イオン水中、15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、35mM NaHCO<sub>3</sub>) 中、1ウエル当たり50ng又は100ngのTrx-HPA-1aで、円錐形のウエルを有するマイクロタイテーションプレートを4で一晩コートする。PBSで洗浄した後、匿名のドナーの血清50 $\mu$ lをウエルに添加し、37で45分間インキュベートする。6回

50

の洗浄後、50  $\mu$ l の Capture - P 指示赤血球（抗ヒト Ig G 抗体を保有する赤血球）。

【0046】

#### 実施例 4

##### イムノアッセイ

ヒト血清中の HPA - 1 a 特異抗体を、炭酸バッファー中 1 ウエル当たり 100 ng の Trx - HPA - 1 a で、4 で一晩コートしたマイクロタイトレーションプレート (Nunc) を使用して、ELISA 試験により決定する。プレートを 250  $\mu$ l の PBS で 2 回すすぐ。1% ウシ血清アルブミン (BSA) (A7030, Sigma) を含有する PBS 250  $\mu$ l を用いて、非特異部位を 20 ~ 25 で 1 時間 30 分インキュベートすることによりブロッキングする。プレートを 250  $\mu$ l の PBS で 1 回すすぎ、次に 100  $\mu$ l の PBS 1% BSA で希釈したヒト血清 10  $\mu$ l を用いて、20 ~ 25 で 45 分間、振盪培養器でインキュベートする。0.05% Tween 20 を含有する PBS で 3 回、及び PBS で 1 回の洗浄後、HRP 結合ヤギ抗ヒト Ig G (Fc 断片特異的) (Jackson ImmunoResearch) を用いて、プレートを 20 ~ 25 で 40 分間、振盪培養器でインキュベートする。PBS 0.05% Tween 20 で 3 回、及び PBS で 2 回の洗浄後、製造業者の使用説明書に従って、ペルオキシダーゼ基質 OPD (1, 2 - フェニレンジアミン二塩酸塩) (DakoCytomation) を添加することにより、抗 HPA - 1 a 抗体の結合を検出する。25 ~ 30 分にわたって、492 nm での吸収を ELISA プレートリーダーを使用して測定する。反応を停止するには、0.5 M  $H_2SO_4$  100  $\mu$ l をウエルに添加する。次に、OPD のインキュベート時間に従う、吸光度の進展 (evolution) の曲線を分析する。

10

20

【0047】

#### 実施例 5

この実験では、Trx - HPA - 1 a のヒト Ig G HPA - 1 a 特異的ポリクローナル同種抗体の結合を中和する能力を、MAIPA 技術により判定する。MAIPA 技術は、Kiefel et al. (Blood: 1987, 70; 1722-1727) により記載されているように使用される。MAIPA 技術は、血小板の同種抗体及び自己抗体を検出及び同定する、より特別な技法である。

【0048】

特に、ポリクローナル抗 HPA - 1 a を含む若しくは含まないヒト血清 50  $\mu$ l、又はポリクローナル抗 HPA - 1 a を含まないヒト血清 50  $\mu$ l 中の 15 ng の Camtran を、20  $\mu$ l の PBS で希釈した 0、1 ng、10 ng、100 ng 又は 1000 ng の Trx - HPA - 1 a を用いて、20 ~ 25 で 25 分間、振盪培養器でインキュベートする。混合物を 3  $\mu$ l の Ni - NTA アガーローズビーズで、5 分間プレインキュベートし、複合体同種抗体 / Trx - HPA - 1 a を 13000 rpm、2 分間の遠心分離により破壊する。50  $\mu$ l の上清を使用して MAIPA を実施する。次に、従来のように MAIPA 技法を使用して血清の中和を判定する。

30

【0049】

30  $\mu$ l の PBS で希釈した、増加する濃度の Trx - HPA - 1 a (0、1 ng、10 ng、100 ng 及び 1000 ng) を、ポリクローナル抗 HPA - 1 a を含む若しくは含まないヒト血清 50  $\mu$ l、又はポリクローナル抗 HPA - 1 a を含まないヒト血清 50  $\mu$ l で希釈した 15 ng の Camtran に添加する。20 ~ 25 で 25 分間のインキュベート後、3  $\mu$ l の Ni - NTA アガーローズビーズで混合物をプレインキュベートし、複合体同種抗体又は Camtran / Trx - HPA - 1 a を 13000 rpm、2 分間の遠心分離により破壊する。次に、50  $\mu$ l の上清血清の中和を、従来のように MAIPA 技法を使用して判定する。結果は図 8 a、図 8 b 及び図 8 c に示す。

40

#### 実施例 6

MAIPA 及び ELISA を使用した抗 HPA - 1 a 抗体の検出

血液試料 (表 1、左) は匿名のドナー又は NAIT 患者からのものである。粗血清 (表

50

1、「MAIPA」)又はプロテインA精製免疫グロブリン(表1、「MAIPA pure」)についてMAIPAを実施する。ドナーの大部分は、MAIPA及びELISAの双方を使用して、陰性であることが判明した。MAIPAが0.1を上回る光学密度( $OD > 0.1$ )を示すことで、またELISA(終点測定)により、7つの試料は陰性であることが判明した。しかしながら、全てのドナー試料について、経時的分析は、光学密度は時間と共に直線的に増加し、一次導関数は一定であり( $dOD/dt = \text{一定}$ )、二次導関数はゼロに等しい( $d^2OD/dt^2 = 0$ )ことを示す。したがって、ELISAを使用して $d^2OD/dt^2 = 0$ であった場合、所与の試料は陰性であることが割り出される。ELISA経時的分析の結果は、指定の欄に表示される(表1、「曲線」):全てのドナー試料は陰性であると試験される( $d^2OD/dt^2 = 0$ )、一方、NAIT患者(Pan, St Camb, Bru)からの3つの試験された試料は陽性であることが判明する( $d^2OD/dt^2 > 0$ )。その結果、所与の試料は、本明細書中に記載のELISAを用いて、以下の基準の1つを満たす場合、陰性である:0.1を下回る光学密度(終点)又は $d^2OD/dt^2 = 0$ (経時変化)。全ての試料は、終点プロトコルを用いて陰性であると判明したが、経時的プロトコルを用いても同様に陰性であると判明することが指摘されるべきである。また、NAIT患者(Pan, Sch, Ac mB2)からの3つの試料の免疫除去は、精製ペプチドアダプター(表1、「neutr.」)を用いて首尾よく行われる。HPA遺伝子座のジェノタイピングが示される(表1、「geno.」)。

10

【0050】

表1は、MAIPA及びELISAを使用した抗HPA-1a抗体検出実験の結果をまとめたものである。記号は次の通りである:(-)陰性;(+)陽性;(-/+ )最初は陰性であったが後に陽性と試験された;(ND)判定せず。

20

【0051】

【表 1】

| 表 1         |       |               |         |       |        |                |
|-------------|-------|---------------|---------|-------|--------|----------------|
| 試料番号        | MAIPA | MAIPA<br>pure | ELISA   | 曲線の傾き | neutr. | geno.          |
| ドナー:(n=115) |       |               |         |       |        |                |
| 1~103       | -     | ND            | -       | ND    |        |                |
| 104~108     | -     | ND            | -       | -     |        |                |
| 109         | -     | -             | OD>0, 1 | -     |        | a/a            |
| 110         | -     | -             | OD>0, 1 | -     |        | a/a            |
| 111         | -     | -             | OD>0, 1 | -     |        | a/a            |
| 112         | -     | ND            | OD>0, 1 | -     |        | ND             |
| 113         | -     | -             | OD>0, 1 | -     |        | a/a            |
| 114         | -     | -             | OD>0, 1 | -     |        | a/a            |
| 115         | -     | -             | OD>0, 1 | -     |        | a/a            |
| 患者:(n=27)   |       |               |         |       |        |                |
| Pen         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Tro         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Hal         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Bra1        | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Per         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Ama         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Del         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Pas         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Par         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Bra2        | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Pie         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Jas         | -     | -             | -       |       |        | ND             |
| Gar         | -     | -             | +       |       |        | ND             |
| LeM         | -     | +             | +       |       |        | ND             |
| DeA         | -/+   | +             | +       |       |        | $\alpha$ 2b3a  |
| And         | -     | +             | +       |       |        |                |
| Mar         | -     | +             | +       |       |        |                |
| Bou         | -     | +             | +       |       |        |                |
| Cha         | -     | +             | +       |       |        |                |
| Pro         | +     | +             | +       |       |        | $\alpha$ glyco |
| Dum         | +     | +             | +       |       |        | $\alpha$ 3a    |
| Pan         | +     | +             | +       | +     | +      | b/b            |
| Kurc        | +     | +             | +       |       |        |                |
| St Camb     | +     | ND            | +       | +     |        |                |
| Sén         | +     | +             | -       |       |        | b/b            |
| Sch         | +     |               |         |       | +      | ND             |
| Bru         | +     |               | +       | +     |        | b/b            |
| Ac mB2      |       | +             | +       |       | +      |                |

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図 1】(a) 本発明によるペプチドアプタマーに含まれるドデカペプチドのアミノ酸の組み合わせ。全ての配列は順に、4つの脂肪族アミノ酸(V、I、L、A、G)、2つの酸性アミノ酸(D、E)、1つのプロリン、1つの塩基性アミノ酸(R、K、H)、2つの酸性アミノ酸(D、E)、1つのアルコールアミノ酸(T、S)及び1つの芳香族アミノ酸(W、Y、F)を含む。矢印はペプチドのN末端からC末端へ方向を指す。(b) 本発明によるドデカペプチドの無作為な例。矢印はN末端からC末端へ配列の方向を指す。例として得られたドデカペプチドは、Gly-Ile-Val-Val-Glu-Asp-Pro-Lys-Asp-Glu-Thr-Tyrのペプチド配列を有する。

10

20

30

40

50

【図2】Camtranモノクローナル抗体を使用して試験されたウエスタンブロット。選択された細菌クローンからの全タンパク質抽出物(1~9)。HPA-1a血小板からの試料は陽性対照として用いられた(左のレーン、「platea」)。陽性クローンは63kDのバンドを特徴とする(レーン2、3、5、8、9)。

【図3】(a)Trx-HPA-1aタンパク質をコードする配列。このORFは、pT7-7発現ベクターのNdeI制限部位とSalI制限部位との間にクローニングされる。Trx-HPA-1aタンパク質は、C末端に6-His尾部を持つ。(b)Trx-HPA-1aタンパク質の配列。タンパク質はチオレドキシンの活性部位に12アミノ酸長の配列、C末端にポリヒスチジン尾部を含有する。

【図4】(a)SDS Page(クマシーブルー)による組換えタンパク質の検出。陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製したタンパク質20μgを20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した(レーン1)。分子量マーカーを右に示す。(b)Trx-HPA-1aタンパク質のエレクトロスプレー質量スペクトル。期待した大きさ(14640da)のメジャーピークが検出される。マイナーピーク(D)は、N末端に2つのメチオニン残基を欠くTrx-HPA-1aに対応する。(c)Trx-HPA-1aのトリプシン消化後に得られた生成物のMALDI-TOF質量分析スペクトル。黒い星印(H)は期待した大きさでのピークに対応する。これらのピークでTrx-HPA-1a配列の80%に相当する。

【図5】再懸濁し、抗His抗体を使用するウエスタンブロットにより分析した免疫沈降物を示す。免疫沈降に使用したバッファーは、PBS(レーン1、2、9、10)、PBS-Tween(0.01%) (レーン3、4)、PBS-NP40(0.1%) (レーン5、6)、PBS-Triton(0.5%) (レーン7、8)である。抗HPA-1a抗体を含有する血清試料(1、3、5、7)又は含有しない血清試料(2、4、6、8)を免疫沈降に使用した。Trx-HPA-1aを含まない陰性対照(9)又は免疫グロブリンを含まない陰性対照(10)を示す。

【図6】典型的なイムノキャプチャー実験の結果を示す。以下の血清を使用した：抗HPA-1a抗体を含有する2つの試料(1-2)、抗HPA-1b抗体を含有する1つの試料(3)、1つの陰性対照(4)。50ng又は100ngのTrx-HPA-1aタンパク質でウェルをコートした。Trx-HPA-1aとの相互作用は、抗HPA-1a抗体を含有する血清(1、2)でのみ検出された。

【図7】ELISA実験を示す。ODが492nmの経時的分析。抗HPA-1a抗体を含有する血清(P+及びSt Camb)又は含有しない血清(429876、383545、489956、361177)を使用した。d<sup>2</sup>OD/dt<sup>2</sup>の値を示す(6c)。d<sup>2</sup>OD/dt<sup>2</sup>の算出により陽性試料と陰性試料を区別できる。dは、炭酸バッファー中1ウェルあたり150ngのTrx-HPA-1aを用いて、4で一晚コートしたマイクロタイトレーションプレート(Nunc)を使用するELISAアッセイにより測定した、ヒト血清中のHPA-1a特異抗体の検出を示す。プレートを200μlのPBSで2回すすいだ。1%ウシ血清アルブミン(BSA)(A7030、Sigma)を含有する200μlのPBSを入れ、100分間室温(RT)におくことで非特異的結合をブロックした。次に、プレートを200μlのPBSで1回すすぎ、100μlのPBS+1%BSAで(1:100~4:5に)希釈したヒト血清を用いて、RTで45分間振盪培養器で再度インキュベートした。0.05%Tween20を含有するPBSでの3回の洗浄及びPBSでの1回の洗浄の後、HRP結合ヤギ抗ヒトIgG(Fc断片特異的)(Jackson ImmunoResearch)を用いて、RTで40分間、プレートを振盪培養器でインキュベートした。PBS+0.05%Tween20での3回の洗浄及びPBSでの2回の洗浄の後、製造業者の使用説明書(DakoCytomation)に従って、ペルオキシダーゼ基質(OPD:1,2-フェニレンジアミン二塩酸塩)を添加することにより、抗HPA-1a抗体の結合を検出した。20分後、100μlの0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止した。ELISAプレートリーダーを用いて492nmで吸収を記録した。492nmでのODの進展は血清中の抗HPA-1aの力価に依存する。この進展は抗体-抗原相

10

20

30

40

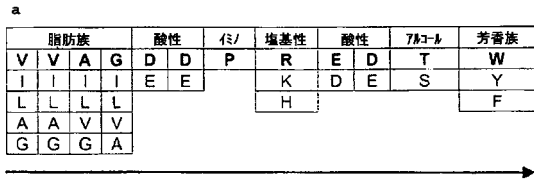
50

相互作用に特徴的であり、Trx-HPA-1aアプタマーが抗HPA-1aを含む血清と含まない血清を区別できることを実証する。Sch及びPanという試料は抗HPA-1a抗体を含有し、試料Negは健康なドナーからの陰性対照である。高希釈(1/50)で、NegサンプルのODは<0.05であり、一方、Sch及びPanのODは>0.23である。低希釈(1/2)で状況は同じであり、NegのODは<0.11、Sch及びPanは>0.66であった。

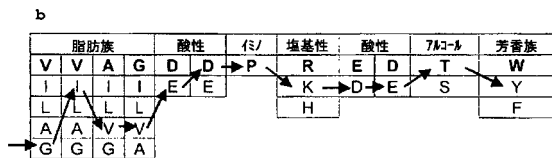
【図8】(a)MAIPAアッセイにおける、ヒト血清の同種抗体抗HPA-1aの中和を示す。2つの異なる生成のデータを使用して時間内の安定性を比較した。(b)MAIPAアッセイにおける、Camtran抗体のTrx-HPA-1aでの中和。100ngのTrx-HPA-1aは、MAIPAアッセイにおけるCamtranの阻害に十分であった。(c)特異的HPA-1a抗体(抗HPA-1a)を含有する2種のヒト血清の中和。

10

【図1】

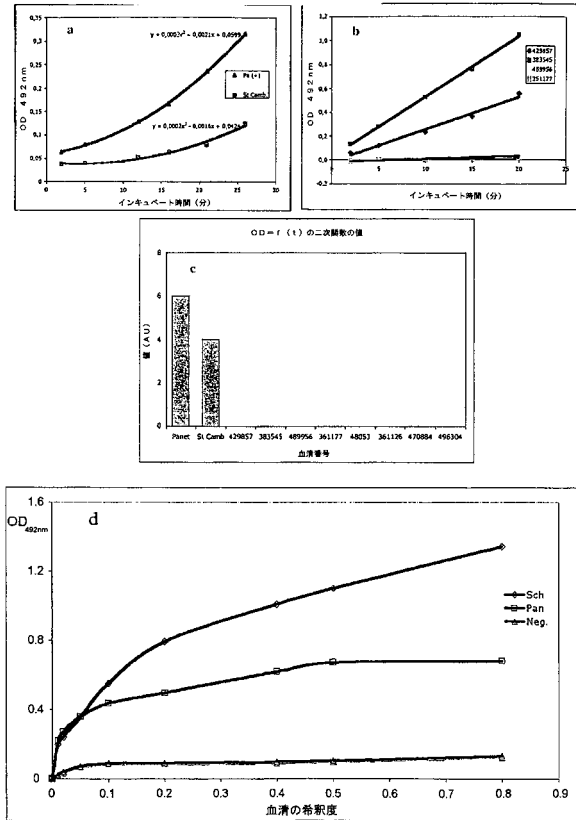


【図2】

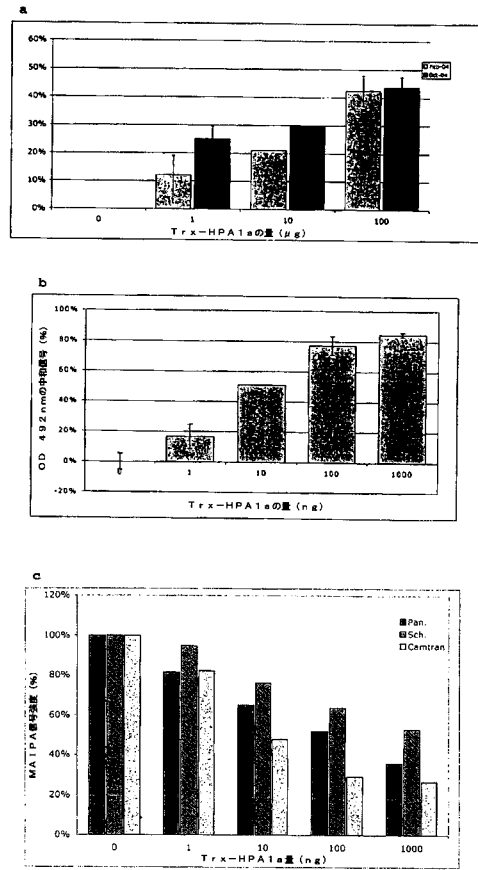




【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

0005042237000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 7/00 (2006.01) A 6 1 P 7/00

(72)発明者 ジレ ジェマン  
フランス国 エフ - 6 9 0 0 4 リヨン ル ガラ 1 3

(72)発明者 メリユー イヴ  
フランス国 エフ - 6 9 0 0 3 リヨン ル アンドレ フィリップ 3 0

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特表平08 - 5 0 3 7 7 0 ( J P , A )  
Nucl. Acids Res. , 2 0 0 5 年 , Vol.33, No.22 , P.7066-7073 , & Database Uniprot, 2006-01-  
24, accession no. Q2SHY4, [Online], <URL:http://www.uniprot.org/uniprot/q2shy4> , 検索  
日 : 2 0 1 2 年 1 月 2 7 日  
VOX SANGUINIS , 2 0 0 5 年 7 月 , Vol.89, No.SUPPL.1 , P.23

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 7/08

C07K 19/00

C12N 15/09

G01N 33/53

CA/REGISTRY(STN)

PubMed

WPI

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 中和血小板抗原特异性抗体结合的肽适体及其在含有它的诊断和治疗中的应用                                    |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP5042237B2</a>   | 公开(公告)日 | 2012-10-03 |
| 申请号            | JP2008552758  | 申请日     | 2007-02-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 僵硬脊点击科帕Rudia ING亚诺斯组织文件夹顺点击   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Sutifuchunku Fuyuru鹿INGÉ½组织Forushunku                                 |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | Sutifuchunku Fuyuru鹿INGÉ½组织Forushunku                                 |         |            |
| [标]发明人         | リガルドミニク<br>ティボージュリアン<br>ジレジェマン<br>メリューイヴ                              |         |            |
| 发明人            | リガルドミニク<br>ティボー ジュリアン<br>ジレ ジェマン<br>メリュー イヴ                           |         |            |
| IPC分类号         | C07K19/00 C07K7/08 C12N15/09 G01N33/53 A61K38/00 A61P7/00             |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/564 C07K7/08 C07K2319/00 G01N2333/745 G01N2500/02 G01N2800/222 |         |            |
| FI分类号          | C07K19/00.ZNA C07K7/08 C12N15/00.A G01N33/53.K A61K37/02 A61P7/00     |         |            |
| 审查员(译)         | 鈴木隆行  |         |            |
| 优先权            | 2006002496 2006-02-07 EP  |         |            |
| 其他公开文献         | JP2009525725A   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本发明涉及肽适体，其特异性地模拟血小板GPIIb / IIIa分子中存在的人血小板抗原HPA-1a的表位，并且能够中和HPA-1a特异性抗体（抗HPA-1a）的结合。该肽适体有利地用于检测和鉴定人血清中HPA-1a特异性抗体的方法，用于筛选和鉴定抗体的诊断试剂盒，免疫测定和药物组合物。【选择图表】无

表 1

| 試料番号         | MAIPA | MAIPA pure | ELISA    | 曲線の傾き | neutr. | geno.   |
|--------------|-------|------------|----------|-------|--------|---------|
| ドナー: (n=115) |       |            |          |       |        |         |
| 1~103        | -     | ND         | -        | ND    |        |         |
| 104~108      | -     | ND         | -        |       |        |         |
| 109          | -     | -          | OD > 0.1 | -     |        | a/a     |
| 110          | -     | -          | OD > 0.1 | -     |        | a/a     |
| 111          | -     | -          | OD > 0.1 | -     |        | a/a     |
| 112          | -     | ND         | OD > 0.1 | -     |        | ND      |
| 113          | -     | -          | OD > 0.1 | -     |        | a/a     |
| 114          | -     | -          | OD > 0.1 | -     |        | a/a     |
| 115          | -     | -          | OD > 0.1 | -     |        | a/a     |
| 患者: (n=27)   |       |            |          |       |        |         |
| Pen          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Tro          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Hal          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Bra1         | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Per          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Ama          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Del          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Pas          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Par          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Bra2         | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Ple          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Jas          | -     | -          | -        |       |        | ND      |
| Gar          | -     | -          | +        |       |        | ND      |
| LeM          | -     | +          | +        |       |        | ND      |
| DeA          | - / + | +          | +        |       |        | α 2b3a  |
| And          | -     | +          | +        |       |        |         |
| Mar          | -     | +          | +        |       |        |         |
| Bou          | -     | +          | +        |       |        |         |
| Cha          | -     | +          | +        |       |        |         |
| Pro          | +     | +          | +        |       |        | α glyco |
| Dum          | +     | +          | +        |       |        | α 3a    |
| Pan          | +     | +          | +        | +     | +      | b/b     |
| Kurc         | +     | +          | +        |       |        |         |
| St_Camb      | +     | ND         | +        | +     |        |         |
| Sen          | +     | +          | -        |       |        | b/b     |
| Sch          | +     |            |          |       |        | ND      |
| Bru          | +     |            | +        | +     | +      | b/b     |
| Ac_mB2       |       | +          | +        |       | +      |         |