

(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2012-510817

(P2012-510817A)

(43) 公表日 平成24年5月17日(2012.5.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 4 5 A
	G O 1 N 33/543	5 7 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2011-539696 (P2011-539696)
 (86) (22) 出願日 平成21年12月3日 (2009.12.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年7月7日 (2011.7.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/066588
 (87) 国際公開番号 W02010/065742
 (87) 国際公開日 平成22年6月10日 (2010.6.10)
 (31) 優先権主張番号 61/120,202
 (32) 優先日 平成20年12月5日 (2008.12.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591013229
 バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
 BAXTER INTERNATIONAL
 L INCORPORATED
 アメリカ合衆国 60015 イリノイ州、ディアフィールド、ワン・バクスター・パークウェイ (番地なし)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フォンビルブランド因子のADAMTS13媒介インビポ切断を測定する方法およびその使用

(57) 【要約】

本発明は一般的に、切断されたフォンビルブランド因子 (VWF) 断片を測定する方法に関連する。より具体的には、本発明は、トロンボスポンジン1型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー13 (ADAMTS13) の、インビポでVWFを切断する能力を測定する方法に関連する。本発明はまた、ヒトのものと同様のADAMTS13活性を示す、様々な動物モデルを用いる方法に関連する。本発明はさらに、哺乳動物において、特にヒトおよびヒト血漿において、rVWFの切断産物を測定する方法に関連する。



FIG. 1A

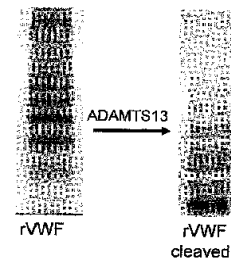


FIG. 1B

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

異常なインビトロノスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー 13 (ADAMTS 13) 活性を決定するための方法であって、該方法は、テスト被験体由来の血液サンプルにおいて、フォンビルブランド因子 (VWF) 切断断片を測定する工程を包含し、ここで正常な ADAMTS 13 活性を有することが公知であるコントロール被験体由来の血液サンプルにおける VWF 切断断片レベルと比較した、該テスト被験体の該血液サンプルにおける VWF 切断断片レベルの変化は、該テスト被験体における異常なインビトロ ADAMTS 13 活性を示す、方法。

【請求項 2】

被験体由来の血液サンプルにおいてトロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー 13 (ADAMTS 13) 活性を測定するための方法であって、該方法は：

- (a) 該血液サンプル中のフォンビルブランド因子 (VWF) 切断断片を測定する工程；
- (b) 該 VWF 切断断片を完全に分解した VWF の参照曲線と比較する工程；および
- (c) 該参照曲線に基づいて該 VWF 切断断片を定量化する工程を包含し、ここで VWF 切断断片の量は、ADAMTS 13 活性の量と相関する、方法。

【請求項 3】

被験体においてトロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー 13 (ADAMTS 13) 活性または濃度を増加させる処置の有効性を試験するための方法であって、該方法は、該処置の前および後に、該被験体由来の血液サンプルにおいてフォンビルブランド因子 (VWF) 切断断片を測定する工程を包含し、ここで該処置後の VWF 切断断片の増加は、該処置が、該被験体において ADAMTS 13 活性または濃度を増加させることにおいて有効であることを示す、方法。

【請求項 4】

被験体におけるフォンビルブランド病 (VWD) の処置に使用された VWF の有効性を試験するための方法であって、該方法は、処置の前および後に、該被験体由来の血液サンプルにおいて VWF 切断断片を測定する工程を包含し、ここで該処置後の VWF 切断断片の増加は、該被験体における内因性トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー 13 (ADAMTS 13) が該 VWF を切断することを示し、そしてここで該処置後の VWF 切断断片の減少または欠如は、該被験体における内因性 ADAMTS 13 が該 VWF を切断しないことを示す、方法。

【請求項 5】

被験体におけるトロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー 13 (ADAMTS 13) の欠損または機能不全に関連するフォンビルブランド病 (VWD) の処置の有効性を試験するための方法であって、該方法は、該処置の前および後に、該被験体由来の血液サンプルにおいてフォンビルブランド因子 (VWF) 切断断片を測定する工程を包含し、ここで該処置後の VWF 切断断片の増加は、該処置が該疾患の処置において有効であることを示す、方法。

【請求項 6】

前記処置が、前記被験体への ADAMTS 13 の投与である、請求項 3 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

被験体における血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の処置の有効性を試験するための方法であって、該方法は、該処置の前および後に、該被験体由来の血液サンプルにおいてフォンビルブランド因子 (VWF) 切断断片を測定する工程を包含し、ここで該処置後のトリプレット構造の減少を伴う VWF の超大型マルチマー形態の量の減少は、該処置が該被験体におけるトロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー 13 (ADAMTS 13) 活性または濃度の増加に有効であることを示す、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

前記 V W F 切断断片レベルを測定する工程が、V W F 抗体によってウェスタンブロット分析を行って V W F 切断断片を可視化することを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ウェスタンブロット分析が、非還元条件下で行われる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

V W F 断片を、マーカーに結合体化した V W F 抗体を使用することによって可視化する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記マーカーが、アルカリホスファターゼ (A L P) または西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記マーカーを、増強化学発光 (E C L) によって検出する、請求項 10 に記載の方法。

。

【請求項 13】

前記 V W F 抗体がモノクローナルまたはポリクローナルである、請求項 8 に記載の方法。

。

【請求項 14】

V W F マルチマーを、高分解能水平 S D S - アガロースゲル電気泳動、続くポリクローナルウサギ抗ヒト V W F 抗体による免疫染色を用いることによって可視化する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 15】

V W F 切断断片を、約 0 . 0 2 5 A g U / m L V W F から約 0 . 0 5 A g U / m L V W F の感度レベルで検出する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

被験体におけるトロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー 1 3 (A D A M T S 1 3) 活性を評価する方法であって、該方法は、該被験体の血液サンプルの全 V W F および V W F 切断断片レベルを、徐々に分解した V W F ~ 完全に分解した V W F の参照曲線と比較する工程を包含する、方法。

【請求項 17】

前記血液サンプルが血漿または血清である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記血液サンプルが血漿である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 19】

前記被験体が、哺乳動物である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記哺乳動物被験体が、ヒト、ウサギ、サル、イヌ、ラット、マウス、またはブタである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 21】

前記被験体が、ヒト、ウサギ、サル、またはイヌである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 22】

前記被験体が、ヒトである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記テスト被験体の前記血液サンプルにおける V W F 切断断片レベルが、コントロール被験体由来の血液サンプルにおける V W F 切断断片レベルと比較して増加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記テスト被験体の前記血液サンプルにおける V W F 切断断片レベルが、コントロール

10

20

30

40

50

被験体由来の血液サンプルにおけるVWF切断断片レベルと比較して減少する、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

VWF切断断片レベルの変化を、140kDaのVWF断片または176kDaのVWF断片のうちの一つまたはそれより多くのレベルを測定することによって検出する、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記VWF断片が、176kDaのVWF断片である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

被験体におけるトロンボスポンジン1型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテナーゼ、メンバー13(ADAMTS13)活性を測定するための方法であって、該方法は：

(a) 該被験体由来の血液サンプルにフォンビルブランド因子(VWF)を加える工程；
(b) ずれ応力の存在下および非存在下に該サンプルを曝露した後に、該血液サンプル中のVWF切断断片を測定する工程；

(c) 該VWF切断断片を、完全に分解したVWFの参照曲線または希釈したヒトもしくは動物血漿由来の参照曲線と比較する工程；ならびに

(d) 該参照曲線に基づいて該VWF切断断片を定量化する工程、

を包含し、ここでVWF切断断片の量は、ADAMTS13活性の量と相関する、方法。

【請求項28】

前記ずれ応力が、一定期間、約20 から約40 の温度で、約100s⁻¹から約10,000s⁻¹のずれ率を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記ずれ率が、約1,000s⁻¹から約8,000s⁻¹である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記ずれ率が約6,000s⁻¹である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記温度が、約30 から約40 である、請求項28に記載の方法。

【請求項32】

前記温度が約37 である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記一定期間が、約30秒から約1時間の範囲である、請求項28に記載の方法。

【請求項34】

前記時間が、約15分から約30分の範囲である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記時間が約30分である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記時間が約15分である、請求項34に記載の方法。

【請求項37】

前記血液サンプルが血漿または血清である、請求項27～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記血液サンプルが血漿である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記被験体が、哺乳動物である、請求項27～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

前記哺乳動物被験体が、ヒト、ウサギ、サル、イヌ、ラット、マウス、またはブタである、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

10

20

30

40

50

前記被験体が、ヒト、ウサギ、サル、またはイヌである、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記被験体が、ヒトである、請求項 41 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2008年12月5日に提出された米国仮特許出願番号61/120,202の利益を主張し、上記米国仮特許出願は、その全容が参照によって本明細書に援用される。

10

【0002】

(発明の分野)

本発明は一般的に、切断されたフォンビルブランド因子(VWF)断片を測定する方法に関連する。より具体的には、本発明は、トロンボスポンジン1型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー13(a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13))の、インビボでVWFを切断する能力を測定する方法に関連する。本発明はまた、ヒトのものと同様のADAMTS13活性を示す様々な動物モデルの使用に関連する。

【背景技術】

20

【0003】

(発明の背景)

健康なヒトにおける循環フォンビルブランド因子(VWF)は、貯蔵プールからの放出に際し、約450,000から約2000万ダルトン(Da)の範囲、またはさらにより高い分子量の、一連の高分子量マルチマーから構成されている。VWFは、損傷血管に対する血小板の接着を補助する一次止血を媒介する。血小板凝集に必要であることに加えて、VWFは、循環第VII因子(FVII)の安定化に必要である。フォンビルブランド病(VWD)において、VWFのこれらの機能の少なくとも1つが抑制され、様々な重症度の臨床症状を生じる。

【0004】

30

VWFのマルチマー化の程度が、一次止血機能において重要な役割を果たし、そして血小板凝集を促進する能力と関連する。VWFの高マルチマー形態の欠如は、II型VWDを有する被験体において見られるように、血小板凝集の減少を引き起こす。他方、超大型VWFマルチマーの蓄積は、微小血管系において血栓症を引き起こし得る。健康な個人において、VWFのマルチマーサイズは、ADAMTS13の存在によって調節される。Tyr¹⁶⁰⁵とMet¹⁶⁰⁶との間でのVWFモノマーのADAMTS13切断のために、VWFのマルチマーパターンは、特徴的な「トリプレット(triplet)」構造を示す。ADAMTS13を欠く個人は、トリプレット構造の減少と共に、増加した超大型VWFマルチマーの部分を持つ。これらの個人は多くの場合、血小板の消費を伴う微小血管系における血栓の形成によって特徴付けられる、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)と呼ばれる症候群を発症する。

40

【0005】

ADAMTS13は、そのコンフォメーションが球状から伸長した形態へ変化した場合にのみVWFを切断し得、その変化は通常ずれ応力下でのみ起こる。ADAMTS13活性は通常、コンフォメーション変化を誘導するために変性条件下で、またはペプチド基質を使用することによって、インビトロで測定される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

現在、内因性VWFの存在下でADAMTS13のインビボ活性を試験するために利用

50

可能な方法はない。従って、A D A M T S 1 3 による V W F の切断を測定する新規方法を開発する必要性が当該分野に存在する。前臨床および臨床試験中に、新規組換え V W F および A D A M T S 1 3 製品の有効性を決定する必要性も依然として当該分野に存在する。それに加えて、インビボにおいて A D A M T S 1 3 欠損の処置における新規治療の有効性を試験するための新規方法の必要性が当該分野に存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の概要)

本発明は、A D A M T S 1 3 のインビボ活性を測定するための方法、および、続くその必要のある被験体への投与のために、インビボで新しい型の組換えフォンビルブランド因子 (V W F) および組換え A D A M T S 1 3 を評価する方法に関連する、当該分野における 1 つまたはそれ以上の必要性に取り組む。

10

【0008】

1 つの局面において、本発明は、被験体の血液において V W F 断片を検出する方法を含む。そのような方法は、切断された V W F の循環断片の量の検出 (すなわち、可視化およびさらに定量化) によって、A D A M T S 1 3 のインビボ活性を示す。1 つの局面において、その方法は、V W F に対する特異的抗体を用いたイムノプロットティングと組み合わせた S D S - P A G E に基づく。いくつかの局面において、その V W F 抗体は、V W F の異なる断片に特異的である。そのような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルである。さらなる局面において、被験体の血液サンプルをゲルにアプライし、そのゲルをマーカーに結合体化した V W F 抗体によるイムノプロットティングに供し、そしてそのマーカーを増強化学発光によって検出する。

20

【0009】

別の局面において、本発明は、テスト被験体由来の血液サンプルにおいて、V W F 切断断片を測定する工程を含む、インビボで異常な A D A M T S 1 3 の活性を決定するための方法を含み、ここで正常な A D A M T S 1 3 活性を有することが公知であるコントロール被験体由来の血液サンプルにおける V W F 切断断片レベルと比較した、テスト被験体の血液サンプルにおける V W F 切断断片レベルの変化は、テスト被験体における異常なインビボ A D A M T S 1 3 活性を示す。

【0010】

本発明はまた、血液サンプル中の V W F 切断断片を測定する工程 ; その V W F 切断断片を完全に分解した V W F の参照曲線と比較する工程 ; およびその参照曲線に基づいて V W F 切断断片を定量化する工程を含む、被験体由来の血液サンプルにおいて A D A M T S 1 3 活性を測定する方法を含み、ここで V W F 切断断片の量は、A D A M T S 1 3 活性の量と相関する。

30

【0011】

別の局面において、本発明は、処置の前および後に、被験体由来の血液サンプルにおいて V W F 切断断片を測定することを含む、被験体において A D A M T S 1 3 活性または濃度を増加させる処置の有効性を試験する方法を含み、ここで処置後の V W F 切断断片の増加は、その処置が、被験体において A D A M T S 1 3 活性または濃度を増加させることにおいて有効であることを示す。

40

【0012】

さらなる局面において、本発明は、処置の前および後に、被験体由来の血液サンプルにおいて V W F 切断断片を測定することを含む、被験体における A D A M T S 1 3 の欠損または機能不全に関連するフォンビルブランド病 (V W D) の処置の有効性を試験する方法を含み、ここで処置後の V W F 切断断片の増加は、その処置がその疾患の処置において有効であることを示す。

【0013】

さらなる局面において、本発明は、処置の前および後に、被験体由来の血液サンプルにおいて V W F 切断断片を測定することを含む、被験体における V W D の処置に使用された

50

VWFの有効性を試験する方法を含み、ここで処置後のVWF切断断片の増加は、被験体における内因性ADAMTS13はVWFを切断することを示し、そしてここで処置後のVWF切断断片の減少または欠如は、被験体における内因性ADAMTS13はVWFを切断しないことを示す。

【0014】

様々な局面において、本発明の方法は、異なる種または動物モデル由来のVWFおよびADAMTS13の様々な供給源の種-種相互作用の比較を可能にする。

【0015】

様々な局面において、本発明の方法に含まれる処置の型は、ADAMTS13の被験体への投与を含む。

【0016】

本発明はさらに、処置の前および後に、被験体由来の血液サンプルにおいてVWF切断断片を測定することを含む、被験体における血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の処置の有効性を試験する方法を含み、ここで処置後のトリプレット構造の減少を伴うVWFの超大型マルチマーの量の減少は、その処置は被験体におけるADAMTS13活性または濃度の増加に有効であることを示す。

【0017】

本発明の様々な局面において、VWF切断断片またはVWFレベルを測定することは、VWF抗体によってウェスタンブロット分析を行ってVWF切断断片を可視化することを含む。1つの局面において、ウェスタンブロット分析を、感度を増加させるために非還元条件下で行う。他の局面において、還元条件も使用される。本発明の方法のさらなる局面において、VWF断片を、マーカーに結合体化したVWF抗体を使用することによって可視化する。様々な局面において、そのマーカーはアルカリホスファターゼ(ALP)または西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)である。またさらなる局面において、そのマーカーを、増強化学発光(ECL)によって検出する。

【0018】

本発明のいくつかの局面において、VWFマルチマーを、高分解能水平SDS-アガロースゲル電気泳動、続くポリクローナルウサギ抗ヒトVWF抗体による免疫染色を用いることによって可視化する。本発明の様々な他の局面において、そのVWF抗体はモノクローナルまたはポリクローナルである。当該分野で公知の他の型の抗体も、本発明の方法における使用のために企図される。またさらなる局面において、VWF切断断片レベルを、約0.025から約0.05AgU/mL VWFの感度レベルで検出する。

【0019】

他の局面において、本発明は、被験体の血液サンプルの全VWFおよびVWF切断断片レベルを、徐々に分解または消化したVWFの参照曲線と比較することを含む、被験体におけるADAMTS13活性を評価する方法を含み、ここで血液サンプル中のVWF切断断片レベルは、参照曲線から推定されたADAMTS13活性と相関する。

【0020】

様々な局面において、テスト被験体の血液サンプルにおけるVWF切断断片レベルは、コントロール被験体由来の血液サンプルにおけるVWF切断断片レベルと比較して増加する。他の局面において、テスト被験体の血液サンプルにおけるVWF切断断片レベルは、コントロール被験体由来の血液サンプルにおけるVWF切断断片レベルと比較して減少する。

【0021】

いくつかの局面において、VWF切断断片レベルの変化を、1つまたはそれ以上のVWF断片のレベルを測定することによって検出する。ある局面において、測定されるVWF断片は、140kDaのVWF断片または176kDaのVWF断片である。特定の局面において、測定されるVWF断片は、176kDaのVWF断片である。

【0022】

本発明は、被験体由来の血液サンプルにVWFを加える工程；ずれ応力の存在下および

10

20

30

40

50

非存在下にサンプルを曝露した後に、血液サンプル中のVWF切断断片を測定する工程；そのVWF切断断片を、完全に分解したVWFの参照曲線または希釈したヒトもしくは動物血漿由来の参照曲線と比較する工程；および参照曲線に基づいてVWF切断断片を定量化する工程を含む、被験体におけるADAMTS13活性を測定する方法を含み、ここでVWF切断断片の量は、サンプル中のADAMTS13活性の量と相関する。1つの局面において、そのVWFは、まだADAMTS13によって切断されていない、インタクトな組換えVWF(rVWF)である。いくつかの局面において、そのずれ応力は、一定期間、約20 から約40 の温度で、約100s⁻¹から約10,000s⁻¹のずれ率を含む。他の局面において、そのずれ率は、約1,000s⁻¹から約8,000s⁻¹である。1つの局面において、そのずれ率は約6,000s⁻¹である。様々な局面において、その温度は約30 から約40 である。1つの局面において、その温度は約37 である。いくつかの局面において、その一定期間は、約30秒から約1時間の範囲である。他の局面において、その時間は約15分から約30分の範囲である。1つの局面において、その時間は約30分である。別の局面において、その時間は約15分である。

10

【0023】

様々な局面において、本発明の方法における血液サンプルは、血漿または血清である。特定の局面において、その血液サンプルは血漿である。他の局面において、その血液サンプルは血清である。他の局面において、その血液サンプルは、血小板および白血球のような細胞成分も含む血漿である。

【0024】

さらなる局面において、本発明の方法における被験体は哺乳動物である。いくつかの局面において、その哺乳動物被験体は、ヒト、ウサギ、サル、イヌ、ラット、マウス、またはブタである。他の局面において、その哺乳動物被験体は、ヒト、ウサギ、サル、またはイヌである。特定の局面において、その被験体はヒトである。

20

【0025】

下記の図1-18で述べられる、付随する図面を参照することによって、本発明のさらなる説明が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、ヒトADAMTS13による切断後のrVWFのマルチマー構造の変化を示す。

30

【図2】図2は、VWF抗体によるイムノプロットティングによって検出された、ADAMTS13によるrVWFモノマーの特異的切断を示す。

【図3】図3は、残留VWF：CBAアッセイによって検出された、rVWFのADAMTS13依存性切断を示す。

【図4】図4は、FRETsおよびVWF：CBAアッセイによって測定された、正常ヒト血漿(NHP)のパーセンテージとして表されたADAMTS13活性を示す。

【図5】図5は、高分解能マルチマー分析を用いて、ADAMTS13によるVWFの切断を示し、そしてウサギ血漿はrVWFの分解およびヒト血漿と同様のサテライトバンドの形成を誘導したことを示す。

40

【図6】図6は、rVWFを様々な動物種由来の血漿とインキュベートした後の、非還元条件下のSDS-PAGE、続くHRPに結合したポリクローナル抗ヒトVWF抗体によるイムノプロットティングの結果を示す。その結果は、ヒト、ウサギ、サル、ブタ、またはイヌ由来の血漿とのインキュベーション後にヒトrVWFの切断を示すが、モルモット、ラット、またはマウスでは示さなかった。

【図7】図7は、還元条件下でのSDS-PAGE、続くモノクローナルVWF抗体によるイムノプロットティングの結果を示す。アスタリスクはヤギ抗マウスIgG抗体(2次)の内因性マウス血漿IgGとの反応を示す。

【図8】図8は、ウサギにおけるADAMTS13によるrVWF(1200IUのVWF：RCo/kg)の特異的インビボ切断を示す(140kDaおよび176kDaの断

50

片)。VWF断片を、還元SDS-PAGEによるイムノブロッティングによって、モノクローナル抗体で検出した(図8AおよびB)。コントロールとして、未切断のrVWFおよびインビトロにおいてrADAMTS13で切断されたrVWFを示す。rVWF投与のすぐ後にもマルチマーパターンの特徴的な変化が見られる(図8C)。

【図9A】図9は、VWF欠損およびADAMTS13欠損マウスにおける、ADAMTS13によるrVWF(2000IUのVWF:RCO/kg)の特異的インビボ切断を示す。176kDaのVWF切断断片は、C末端断片に特異的なモノクローナル抗体を用いて、いずれのマウス系統においても見えなかった(図9A)。アスタリスクは、ヤギ抗マウスIgG抗体のマウス血漿IgGとの反応を示す。rVWFマルチマーパターンの検出可能な変化は観察されなかった(図9B)。140kDaおよび176kDaのホモダイマーは、非還元条件下で、より感度の高い(しかし特異性の低い)ポリクローナル抗体を用いて、VWF欠損マウスにおいてのみ検出可能であり、ADAMTS13欠損マウスでは検出可能でなかった(図9C)。

10

【図9B】図9は、VWF欠損およびADAMTS13欠損マウスにおける、ADAMTS13によるrVWF(2000IUのVWF:RCO/kg)の特異的インビボ切断を示す。176kDaのVWF切断断片は、C末端断片に特異的なモノクローナル抗体を用いて、いずれのマウス系統においても見えなかった(図9A)。アスタリスクは、ヤギ抗マウスIgG抗体のマウス血漿IgGとの反応を示す。rVWFマルチマーパターンの検出可能な変化は観察されなかった(図9B)。140kDaおよび176kDaのホモダイマーは、非還元条件下で、より感度の高い(しかし特異性の低い)ポリクローナル抗体を用いて、VWF欠損マウスにおいてのみ検出可能であり、ADAMTS13欠損マウスでは検出可能でなかった(図9C)。

20

【図9C】図9は、VWF欠損およびADAMTS13欠損マウスにおける、ADAMTS13によるrVWF(2000IUのVWF:RCO/kg)の特異的インビボ切断を示す。176kDaのVWF切断断片は、C末端断片に特異的なモノクローナル抗体を用いて、いずれのマウス系統においても見えなかった(図9A)。アスタリスクは、ヤギ抗マウスIgG抗体のマウス血漿IgGとの反応を示す。rVWFマルチマーパターンの検出可能な変化は観察されなかった(図9B)。140kDaおよび176kDaのホモダイマーは、非還元条件下で、より感度の高い(しかし特異性の低い)ポリクローナル抗体を用いて、VWF欠損マウスにおいてのみ検出可能であり、ADAMTS13欠損マウスでは検出可能でなかった(図9C)。

30

【図10】図10は、等量のVWF:Agをロードした後、非還元SDS-PAGEを用いた、様々な動物モデルにおけるADAMTS13切断の有効性の直接比較を示す。ウサギ血漿サンプルにおいて、VWF欠損マウスサンプルと比較して、176kDaのVWF切断産物に対応するより強いバンドが検出可能であった。ADAMTS13欠損マウス血漿において、切断は検出可能でなかった。rVWFとヒトrADAMTS13との共注射(co-injection)は、rVWFの切断を誘導した。

【図11】図11は、rVWF(100IU/kg)の単一用量注射後の、カニクイザル血漿におけるVWF切断断片のウェスタンブロット検出の結果を示す。完全および部分的ADAMTS13分解rVWF断片(1AgU/mL)を、ウサギ抗ヒトVWF抗体によって、15秒間の露光後に、rVWFの単一用量注射後のカニクイザル血漿において測定した(図11A)。176kDaダイマーのバンドの強度は、rVWFの注射後に増加した。176kDaのVWFダイマーは、VWF抗原(VWF:Ag)の上昇が測定されない(図11B)VWF注射の24時間後でも、ベースライン(注射前)より高かった(図11A)。

40

【図12】図12は、ポリクローナルウサギ抗ヒトVWF抗体を用いて、15秒間の露光後に、非還元条件下で、ウェスタンブロッティングによって、緩衝液およびVWF欠損血漿において測定した、完全および部分的ADAMTS13分解rVWF(1AgU/mL)を示す。還元条件は、結果を視覚化するほど十分感度が高くなかった。緩衝液(図12A)およびVWF欠損血漿(図12B)の希釈の間に差異は検出されなかった。

50

【図13】図13は、露光時間を増加させることによってアッセイの感度を増加させることによって、VWF切断断片が、血漿において検出されたことを示す。完全および部分的ADAMTS13分解rVWF(1AgU/mL)を、ウサギ抗ヒトVWF抗体を用いて、15秒間(図13A)および60秒間(図13B)の露光後に、非還元条件下で、ウェスタンブロッティングによって、緩衝液およびVWF欠損血漿において測定した。

【図14】図14は、サンプル希釈を行うこと、およびプロット露光時間を増加させることによって、ウェスタンブロット分析の感度を最適化した結果を示す。正常ヒト血漿を、20倍に希釈し、そして176kDaの切断産物は、20-40nLの正常ヒト血漿における2分の露光時間後によく検出された(図14A)。VWF欠損血漿においては、ADAMTS13特異的バンド(VWF切断産物)は見られなかった(図14A)。完全に分解されたrVWF(1AgU/mL)を、40倍(0.5nLから20nL)に希釈し、そして約0.0006U/mL(0.5nL/0.8μL血漿)の感度レベルで検出し得た(図14B)。

【図15】図15は、血漿におけるADAMTS13によるVWF切断の定量化を示す。176kDaのVWF切断産物は、正常ヒト血漿においてよく検出された(約0.025AgU/mL VWF)(図15A)。異なる量の完全分解rVWF(1AgU/mL)のバンド強度から構築された参照曲線(図15B)から計算した場合、約1-2%のC末端ダイマー(176kDaのADAMTS13特異的切断産物)が、ヒト正常血漿において見出された。

【図16A】図16は、臨床第I相試験において被験体に7.5(図16A)および20(図16B)IUのVWF:RCO/kgを投与した後の、ヒト血漿におけるC末端VWF切断断片のウェスタンブロット検出の結果を示す。ADAMTS13依存性rVWF断片が、処置後15分で既に、ウサギ抗ヒトVWF抗体によって血漿中で検出可能であった。176kDaダイマーのバンドの強度は、約1時間(7.5IUのrVWF)および32時間(20IUのrVWF)の間、バックグラウンドより高いままであった。

【図16B】図16は、臨床第I相試験において被験体に7.5(図16A)および20(図16B)IUのVWF:RCO/kgを投与した後の、ヒト血漿におけるC末端VWF切断断片のウェスタンブロット検出の結果を示す。ADAMTS13依存性rVWF断片が、処置後15分で既に、ウサギ抗ヒトVWF抗体によって血漿中で検出可能であった。176kDaダイマーのバンドの強度は、約1時間(7.5IUのrVWF)および32時間(20IUのrVWF)の間、バックグラウンドより高いままであった。

【図17】図17は、ずれ応力存在下および非存在下における、0.2U/mLのヒト組換えADAMTS13、ヒト血漿由来ADAMTS13、および正常ヒト血漿による、1IU/mLのrVWFのインビトロ切断後のC末端VWF切断断片のウェスタンブロット検出の結果を示す。

【図18】図18は、ずれ応力存在下および非存在下における、ヒトADAMTS13によるインビトロ切断後の、低(図18A)および高(図18B)分解能におけるrVWFのマルチマー構造の変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ADAMTS13によるVWFまたはrVWFのインビトロ切断を測定することによって、ADAMTS13活性を測定する方法を提供する。本発明はまた、VWFが正常にプロセシングされたかどうかを決定する方法を提供する。本発明は、フォンビルブランド病(VWD)の処置、および血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)および他の異常なレベルのADAMTS13に関連する障害の処置における、新規治療の有効性を試験するための改善された方法に関する、当該分野におけるニーズに取り組む。

【0028】

他に定義されなければ、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。以下の参考文

10

20

30

40

50

献は、本発明において使用される多数の用語の一般的な定義を当業者に提供する：S i n g l e t o n ら、D I C T I O N A R Y O F M I C R O B I O L O G Y A N D M O L E C U L A R B I O L O G Y (第2版、1994)；T H E C A M B R I D G E D I C T I O N A R Y O F S C I E N C E A N D T E C H N O L O G Y (W a l k e r 編、1988)；T H E G L O S S A R Y O F G E N E T I C S、第5版、R . R i e g e r ら (編)、S p r i n g e r V e r l a g (1991)；およびH a l e およびM a r h a m、T H E H A R P E R C O L L I N S D I C T I O N A R Y O F B I O L O G Y (1991)。

【0029】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに他を示さなければ、複数の言及を含むことをここで注意する。

10

【0030】

本明細書中で使用される場合、以下の用語は、他に特定されなければ、それらに帰する意味を有する。

【0031】

本明細書中で引用されるあらゆる数値は、より低い値からより高い値まで全ての値を含むことも特異的に理解される。すなわち列挙された最も低い値と最も高い値との間の全ての可能な数値の組み合わせが、本出願において明白に述べられたと考えられる。例えば、濃度範囲が約1%から約50%と述べられたら、2%から40%、10%から30%、または1%から3%等のような値が、本明細書中で明白に列挙されることが意図される。上記で列挙した値は、特異的に意図されるものの単なる例である。

20

【0032】

範囲は、本明細書中で「約」または「およそ」1つの特定の値から、および/または「約」または「およそ」別の特定の値までとして表され得る。そのような範囲が表される場合、別の実施態様は、1つの特定の値から、および/または他の特定の値までを含む。同様に、先行する「約」の使用によって、値が近似値として表される場合、特定の値が別の実施態様を形成することが理解される。

【0033】

「異常な」という用語は、テスト被験体における、正常なまたはコントロール被験体におけるポリペプチド、タンパク質、または酵素のレベルまたは活性と比較して、異常な、異型の、または不自然なレベルまたは活性のポリペプチド、タンパク質、または酵素を指す。そのような異常なレベルまたは活性は、より低いレベル、より低い活性、または完全な欠損を反映し得る。

30

【0034】

「VWF切断断片」または「VWF断片」または「VWF切断産物」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、そしてプロテアーゼ切断から生じるVWFの断片を指す。1つの局面において、そのVWFを切断するプロテアーゼは、ADAMTS13である。VWF切断プロテアーゼ(VWFCP)とも呼ばれるADAMTS13は、VWFを切断する、亜鉛を含むメタロプロテアーゼ酵素である。ADAMTS13は、血液中に分泌され、そして大きなVWFマルチマーを分解し、その活性を減少させる。ADAMTS13は、複数の構造的および機能的ドメインから成り、そしてこれらのドメインは、ADAMTS13のVWFに対する認識および結合に関与し得る。「マルチマー」または「マルチマー形態」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。ULVWFマルチマーは、それらが内皮細胞から分泌されるときに、ADAMTS13によって切断される。従って、「ADAMTS13」および「VWFCP」という用語は、交換可能に使用される。

40

【0035】

「可視化された」または「検出された」という用語は、イムノプロットまたはウェスタンプロットにおけるVWF切断断片レベルの調査を議論する場合に、本明細書中で交換可

50

能に使用される。同様に、「レベル (level)」または「レベル (levels)」という用語は、プロットまたはアッセイにおいて、可視化されたか、検出されたか、または測定されたVWFの量または濃度を指す。

【0036】

「被験体」または「テスト被験体」または「その必要のある被験体」という用語は、本明細書中で交換可能に使用し得、そしてあらゆる哺乳動物を指す。様々な局面において、その被験体はヒト、ウサギ、サル、またはイヌである。ヒトと同様、イヌもVWDに罹患することが公知である。

【0037】

「血液」または「血液サンプル」という用語は、本明細書中で交換可能に使用し得る。様々な局面において、その血液は血漿または血清である。従って、「血液」、「血液サンプル」、「血漿」、「血漿サンプル」、「血清」、および「血清サンプル」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。

10

【0038】

「内因性」という用語は、宿主生物において天然に発現するか、または細胞、組織、もしくは臓器に起源のあるポリペプチドまたはポリヌクレオチドまたは他の化合物を指す。「外来性」は、宿主生物の外側の細胞、組織、または臓器の外側に由来する、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または他の化合物を指す。

【0039】

「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合で連結したアミノ酸残基から成るポリマーを指す。合成ポリペプチドを、例えば、自動化ポリペプチド合成機を用いて、全てまたは部分的に合成する。「タンパク質」という用語は、典型的には大きなポリペプチドを指す。「ペプチド」という用語は、典型的には短いポリペプチドを指す。

20

【0040】

「ADAMTS13」または「組換えADAMTS13」または「rADAMTS13」という用語は、本明細書中で交換可能に使用し得、そしてトロンボスポンジン1型モチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、メンバー13ポリペプチドを指す。

【0041】

「VWF」または「組換えVWF」または「rVWF」という用語は、本明細書中で交換可能に使用し得、そしてフォンビルブランド因子ポリペプチドを指す。

30

【0042】

「薬剤」または「化合物」という用語は、本発明の哺乳動物被験体において生物学的パラメーターに影響を及ぼす能力を有するあらゆる分子を記載する。

【0043】

本発明の方法は、ADAMTS13活性を測定するための様々なアッセイの使用を含んでいた。いくつかの局面において、ADAMTS13によるrVWFの切断を、少し修飾して、Gerritsenら(Thromb. Haemost. 82:1386-1389, 1999)によって記載されたように行う。組換えVWFを、変性条件下で、Ba²⁺活性化ADAMTS13で消化する。血漿サンプルを、5mMのTris、1.5Mの尿素、pH8.0中で1:20に希釈し(50mU/mLのADAMTS13活性)、ADAMTS13を活性化するための9.3mMのBaCl₂および1IU/mLのヒトrVWF(最終濃度)と混合し、そして37°Cで24時間インキュベートする。Na₂SO₄(8.25mM)を加えることによって、反応を停止する。その溶液を遠心分離し、そしてできた上清をさらなる分析のために使用する。ポジティブコントロールとして、1IU/mLのrVWFを、他はテスト品目のために使用したのと同じ条件下で、ヒトrADAMTS13(50mU/mL)とインキュベートする。

40

【0044】

本発明の他の局面において、VWF抗原を血漿サンプルにおいて決定する。VWF:Agを、Tanら(Thromb. Res. 121:519-526, 2008)によって

50

記載されたように、市販で入手可能なポリクローナルウサギ抗VWF抗体(Dako、Glostrup、Denmark)を用いてELISAで決定した。

【0045】

本発明の別の局面において、ADAMTS13活性を、製造会社の指示に従って、73アミノ酸から成る、蛍光標識合成VWFペプチド(FRETS-VWF73、Peptides Institute、Osaka、Japan)を用いて測定する。血漿サンプルを、希釈した正常ヒト血漿の参照曲線に対して測定する。

【0046】

本発明のまたさらなる局面において、コラーゲン結合活性(VWF:CBA)の決定を行う。いくつかの局面において、rVWFのコラーゲンに対する結合を、公開されたELISAに基づく方法(Turecekら、Semin.Thromb.Hemost.28:149-160、2002)によって決定する。いくつかの局面において、そのコラーゲン供給源は、Southern Biotechnology Associates(Birmingham、AL)のヒトコラーゲンIII型である。結合したrVWFを、HRPと結合体化したポリクローナル抗VWF抗体(Dako)で検出する。

10

【0047】

本発明のさらに別の局面において、VWFマルチマー分析を行う。いくつかの局面において、rVWFのマルチマー構造を、Turecekら(Blood 90:3555-3567、1997)によって記載されたように、高密度水平SDSアガロースゲル電気泳動によって分析する。サンプルを1.0IU/mLのVWF:Agまで希釈し、そしてTris-EDTA-SDS緩衝液とインキュベートする。溶液中に含まれるマルチマーを、2.5%の高分解能アガロースゲルにおいて、非還元条件下で分離する。VWFマルチマーを、ポリクローナルウサギ抗ヒトVWF抗体(Dako)、続いてBio-Rad(Richmond、CA、USA)のALP色展開(development)キットを用いたアルカリホスファターゼ(ALP)結合体化抗ウサギIgGによる免疫染色によって、ゲル中で視覚化する。

20

【0048】

本発明はまた、特異的ADAMTS13切断産物の分析を含む。いくつかの局面において、ADAMTS13媒介切断を、ポリクローナル抗ヒトVWF抗体(Dako)またはいくつかの局面において以下のマウスモノクローナル抗体のうち1つを用いて、SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析によって検出する:VWFのV8プロテアーゼ断片Iに対する、VW33-5(Takara Bio Europe、Saint-Germain-en-Laye、France);非還元条件下で、VWFのV8プロテアーゼ断片IIIに対する、VW92-3(Takara Bio Europe);還元条件下でVWFのA1ドメインを認識するEsVWF10(American Diagnostica、Stamford、CA)、およびN末端断片においてADAMTS13切断に際し産生されるエピトープを検出するN10(Katoら、Transfusion 46:1444-1452、2006)。いくつかの局面において、抗体をALP結合体化ヤギ抗マウス2次抗体およびALP検出キット(Bio-Rad)と共に使用する。他の局面において、マウスおよびウサギ血漿における内因性免疫グロブリンと反応する2次抗体を回避するために、ウサギ由来の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)-結合体化ポリクローナル抗VWF抗体(Dako)を、ECL検出システム(GE Healthcare、Munich、Germany)と共に使用する。

30

40

【0049】

本発明はまた、異なる動物種において、rVWFのインビボ切断を行う方法を含む。いくつかの局面において、ウサギおよびカニクイザルに、rVWFを1200、600、300、および100VWF:RCoIU/kg体重(BW)の用量で、およびVWF-またはADAMTS13欠損マウスにrVWFを2000VWF:RCoIU/kgBWの用量で注射することによって、ヒトrVWFのADAMTS13切断に対するインビボ感度を決定する。血液サンプルを、様々な時点で取る。いくつかの実験において、分析の前

50

に、マウスのサンプルを、プロテインGセファロース (Invitrogen、Carl
sbad、CA) によって免疫枯渇にする。

【0050】

本発明の方法は、異常なADAMTS13活性に関連する疾患または障害の処置の有効性を診断および試験することを含む。そのような疾患または障害は、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTPまたはMoscowitz病) を含む。TTPは、血液凝固系のまれな障害であり、体中の小血管に広範囲な顕微鏡的血餅の形成を引き起こす。TTPのほとんどの症例は、VWFの大きなマルチマーの切断を司る酵素ADAMTS13の欠損または阻害に起因する。顕微鏡的血餅を通過する赤血球は、ずれ応力に供され、それは溶血を引き起こす。血流の減少および細胞損傷は、末端臓器の損傷を引き起こす。現在の治療は、ADAMTS13に対する循環抗体を減少させ、そして酵素の血液レベルを補充するための補助および血漿交換に基づく。

10

【0051】

先天性TTPまたは後天性TTPを有する被験体は、ADAMTS13が重度に欠損していることが見出された。ADAMTS13は、血液凝固の過程において、血小板、血餅、および血管壁をつなぐタンパク質であるVWFの分解を司るメタロプロテナーゼである。非常に大きなVWF分子は、より凝固を引き起こす傾向がある。従って、ADAMTS13によるVWFの適切な切断がなければ、特に、高いずれ応力のためにVWFが最も活性である血管系の部分：微小血管系において、凝固が高い確率で起こる。先天性ADAMTS13欠損症は、ADAMTS13遺伝子の変異によって引き起こされる。家族性形態を有する被験体は、重度のプロテアーゼ欠損を有する。家族性TTPにおけるADAMTS13遺伝子変異は、ADAMTS13の不活性または活性の減少を引き起こす。後天性欠損は、ADAMTS13活性を阻害する自己抗体の産生によって起こる。後天性TTPは、特発性、および自己免疫疾患、悪性腫瘍、幹細胞移植、妊娠 (特に3番目のトリメスター)、ある薬物 (チクロピジン、マイトマイシン、クロピドグレル、およびシクロスポリンを含む)、または感染のような合併症に二次性のものである。本発明は、血液中のADAMTS13活性を測定する方法、および血液中の異常なADAMTS13レベルまたは活性に関連する疾患の処置の有効性を試験する方法を提供する。

20

【0052】

ADAMTS13の欠損はもともと、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の再発性家族性形態である、Uphaw-Shulman症候群において発見された。その時まで既に、血漿交換に対する反応およびIgGインヒビターの特徴付けのために、TTPが自己免疫形態でも起こることが疑われていた。ADAMTS13の発見から、その表面の特異的エピトープが、阻害抗体の標的であることが示された。

30

【0053】

ADAMTS13遺伝子の70超の変異が、TTPの家族性形態を有する人々において報告された。これらの変異のほとんどは、ADAMTS13酵素の単一のアミノ酸を変化させる。他の変異は、適切に機能できないADAMTS13の異常に小さいバージョンの産生を引き起こす。ADAMTS13遺伝子の変異は、ADAMTS13酵素の活性を重度に抑制する。結果として、VWFは血流において正常にプロセッシングされない。VWFがADAMTS13によって正常にプロセッシングされなければ、損傷の非存在下でも、血小板がお互いに密着し、そして血管壁に接着するのを誘導することによって、体中で異常な血餅の形成を促進する。妊娠、下痢、手術、および感染のようなさらなる因子が、おそらく異常な凝固の誘発に役割を果たす。血餅は、小血管の血流を阻害し、脳、腎臓、心臓、および他の臓器に損傷を引き起こし得る。異常な凝固はまた、TTPに関連する他の合併症を引き起こす。

40

【0054】

TTP症候群は、微小血管症溶血および血小板凝集/硝子質血栓 (その形成は凝集系の活性には無関係である) によって特徴付けられる。血小板微小血栓が顕著である; それらは体中の微小循環 (すなわち細動脈、毛細血管) において形成し、血管の部分的閉塞を引

50

き起こす。臓器虚血、血小板減少症、および赤血球の断片化（すなわち分裂赤血球）が起こる。その血栓は部分的に、上を覆う増殖内皮細胞で血管内腔を閉塞する。腎臓、脳、心臓、膵臓、脾臓、および副腎の内皮は、特にTTPに対して脆弱である。肝臓、肺、胃腸管、胆嚢、骨格筋、網膜、下垂体、卵巣、子宮、および精巣も、より少ない程度影響される。炎症性の変化は起こらない。

【0055】

1982年に、Moakeおよび彼の同僚が、再発性TTPを有する4人の被験体の血漿において、超大型VWF（ULVWF）マルチマーを観察した（Moake J L、Seminn. Hematol. 34: 83 - 89、1997；Moake J L、Seminn. Hematol. 41: 4 - 14、2004）。これらのマルチマーは、内皮細胞で注目されたものと同じサイズであった。正常な個人の血漿は、より小さいVWFを有する。Moakeは、TTPを有する被験体の血漿において、大きなVWFをその正常なサイズへと低減する酵素の欠損があることを示唆した。この大きなVWFが、血栓形成を媒介する血小板と接着するより高い能力を有することも注目された。

10

【0056】

本項目は、ADAMTS13の生物学的機能とULVWFマルチマーの存在とTTPまたはTTP様臨床症状の発生との間の関係の記載を、そのような記載が本発明の方法のより良い理解を促進する程度まで提供する。ADAMTS13の生物学的機能とULVWFマルチマーの存在とTTPまたはTTP様臨床症状の発生との間に関連が存在する。TTPの病因は、微小血管系における血小板集塊による。ULVWFマルチマーの増加した接着が存在し、これらのマルチマーを切断するための機能するタンパク質分解酵素（ADAMTS13）の欠如のために、血小板血栓の形成を引き起こす。

20

【0057】

TTPはまた、がん、化学療法、HIV感染、ホルモン補充療法、およびエストロゲン、および多くの通常使用される薬物（チクロピジン、クロピドグレル、およびシクロスポリンAを含む）に関連し得る。いくつかの場合に、低い検出可能なレベルのADAMTS13と関連する、TTP以外の他の状態は、全身性の結合組織疾患である。組換えADAMTS13（rADAMTS13）が、TTPの処置において試験された多くの治療のうちの一つである。本発明は、rADAMTS13、およびADAMTS13関連疾患に関連する全ての治療の有効性を試験する方法を含む。

30

【0058】

低レベルのADAMTS13は、血液中の凝固物質（血小板）の集塊化を引き起こす。血小板が集塊化すると、血流中に利用可能な血小板が少なくなる。この集塊、または凝集は、皮下の出血および紫斑と呼ばれる紫色の斑点を引き起こし得る。それはまた、顕微鏡的血小板集塊を通過するときはずれ応力に供されたときに、赤血球の分解（溶血を起こす）を引き起こし得る。従って赤血球は時期尚早に破壊される。血流の減少および細胞の損傷は、末端臓器の損傷を引き起こす。

【0059】

ヒトADAMTS13抗原のレベルを、ELISAによって決定し得る（Riegerら、Thromb. Haemost. 95: 212 - 220、2006）。ADAMTS13活性を、分解されたVWFのコラーゲン結合親和性の減少に基づいて測定し得（Gerritsenら、Thromb. Haemost. 82: 1386 - 1389、1999）、これはVWFの高分子量形態の、コラーゲンに対する優先的な結合に基づく機能的アッセイである。このアッセイにおいて、試験する希釈血漿サンプルを、プロテアーゼ活性を消滅させた正常血漿に加える。プロテアーゼ枯渇血漿中に存在するVWFが、テスト血漿中のVWF切断プロテアーゼによって消化される。タンパク質分解は、VWFの低分子量形態を生じ、それはヒトコラーゲンIII型でコーティングしたマイクロタイタープレートへの結合障害を示す。コラーゲン結合VWFを、ヒトVWFに対するペルオキシダーゼ結合体化ウサギ抗体を用いて定量化する。試験した血漿サンプル中のVWF切断プロテアーゼ活性の値を、VWF基質を正常ヒト血漿プール（NHP）の希釈物とインキュベ

40

50

ートすることによって達成した検量線から読む。

【0060】

現在の紫斑病またはTTP治療は、ADAMTS13に対する循環抗体を抑制する、およびADAMTS13の血液レベルを補充するための補助および血漿交換に基づく。血漿交換は、1991年からTTPの最も重要な治療である。先天性の欠損は、血漿の注入によって、ADAMTS13遺伝子の欠損および変異を置換し得る。後天性の欠損は、血漿交換によってADAMTS13のインヒビターを除去し得る。しかし、血漿交換は、血漿注入よりも有効な処置である。この重篤な状態は、早く認識され、そして早く医学的介入が開始されるなら、ポジティブな結果を有し得る。

【0061】

それに加えて、VWFの循環レベルの増加およびヒトにおけるADAMTS13活性の減少は、虚血性脳卒中の危険因子であると考えられる(Zhaoら、American Society of Hematology、Abstract 259、12月6~9日、2008、San Francisco、CA)。従って、本明細書中におけるインビボでADAMTS13活性を測定する方法はまた、脳卒中の診断および治療における適用を有する。

【0062】

本発明はまた、VWFの異常なプロセッシングまたはADAMTS13濃度または活性における欠損を診断する方法、およびTTPおよび他のADAMTS13関連病理または障害の処置における新規治療の開発において使用される、ADAMTS13濃度または活性を増加させる治療を試験する方法を含む。様々な局面において、他のADAMTS13関連病理または障害は、異常なレベルのVWFまたはVWFの異常なプロセッシングによって特徴付けられる疾患を含む。

【0063】

本項目は、そのような説明が本発明の方法のより良い理解を促進する程度まで、VWF症候群の記載を提供する。VWF症候群は、VWFの生産不足または過剰生産のいずれかが存在する場合に、臨床的に現れる。VWFの過剰生産は、血栓症(血管内における血栓または血栓の形成、血流を妨害する)の増加を引き起こし、一方VWFの高分子量形態のレベルの減少、またはその欠如は、血小板凝集および創傷閉鎖の障害のために、出血の増加および出血時間の増加を引き起こす。本発明の方法を、様々な型のVWF症候群の診断および処置において使用し得る。

【0064】

VWFは機能的FVIIの必須の成分であるので、VWFの欠損はまた、表現型の血友病Aを引き起こし得る。これらの場合において、第VII因子の半減期は、血液凝固カスケードにおけるその機能が損傷される程度まで抑制される。VWDまたはVWF症候群に罹患した被験体は多くの場合、FVII欠損を示す。これらの被験体において、抑制されたFVII活性は、X染色体遺伝子の欠損の結果ではなく、血漿中のVWFの量的および質的变化の間接的結果である。血友病AとVWDとの間は、通常VWF抗原を測定することによって、またはリストセチン補助因子活性を決定することによって、区別し得る。リストセチン補助因子活性を、リストセチンおよび血小板基質を被験体の血漿へ加えることによって測定する。リストセチンは、VWFの血小板糖タンパク質Ib受容体への結合を増強し、凝集を引き起こす。光透過の変化によって測定されるように、被験体のVWFは、リストセチンによって誘導された血小板凝集を補助する。従って、このアッセイは、被験体のVWFの機能的活性のインビトロにおける測定である。VWF抗原含有量およびリストセチン補助因子活性の両方が、ほとんどのVWD被験体において低下しており、一方それらは血友病A被験体において正常である。

【0065】

VWDは、VWFの欠損または機能不全によって引き起こされる遺伝性出血障害である。従って、VWFの欠損は、血小板接着を害することによって、またはFVIIの濃度を抑制することによって、出血を引き起こし得る。VWDを、(主に皮膚粘膜の)出血の

10

20

30

40

50

個人的および家族性の証拠と共に、臨床的および身体的検査の後に診断し、そして試験所の検査によって確認する。試験所の検査は典型的には、第V I I I凝固因子（F V I I I : C）、フォンビルブランド因子（V W F）タンパク質（抗原；V W F : A g）、およびリストセチン補助因子（V W F : R C o）アッセイまたはコラーゲン結合アッセイ（V W F : C B A）を用いて評価されるV W F機能または活性の最初の血漿試験を伴う。V W F : C B Aは、酵素結合イムノソルベント検定法の手順と同様、コラーゲンに結合したV W Fの量の測定に基づく。さらなる試験所の検査は、V W F : マルチマーの評価を含む、一連の確証的およびV W Dサブタイプ補助アッセイを含み得る。

【0066】

より具体的には、V W F : A gアッセイは、定量的アッセイであり、そして患者の血漿に存在するV W Fの全体レベルの測定を提供する；それは機能的アッセイではなく、そして存在するV W Fの質に関する情報を生じない。V W F : C B Aアッセイは、存在するV W Fの質に関する情報を提供する機能的アッセイである。V W F : A gおよびV W F : C B Aは、相補的なアッセイであり、そして様々な局面において、組み合わせて使用する。V W F : R C oアッセイは、V W F : A gおよびV W F : C B Aアッセイによって個々に提供されるものの間にある、V W Fの存在に関する情報を提供する、定量的および定性的アッセイの両方である。V W F : マルチマーアッセイは、定性的手順であり、そして半定量的である。V W F : マルチマーアッセイは、存在するV W Fのスナップショットを提供する。上記で記載したアッセイは、インビトロでV W Fを試験するために当該分野で周知である。

【0067】

提供された方法はまた、様々な局面において、V W Fの使用を含む。本発明の方法における使用のために、全ての形態のV W Fおよび組換えV W Fが企図される。いくつかの局面において、本発明の方法において使用されるV W Fは、H U M A T E - P（登録商標）；およびI M M U N A T E（登録商標）、I N N O B R A N D（登録商標）、および8 Y（登録商標）を含むがこれに限らない。

【0068】

本発明の方法の様々な局面において、組換えV W Fを被験体に投与する。組換えV W Fを、少なくとも約10 R C o U / k g B W、少なくとも約20 R C o U / k g B W、少なくとも約30 R C o U / k g B W、少なくとも約40 R C o U / k g B W、少なくとも約50 R C o U / k g B W、少なくとも約60 R C o U / k g B W、少なくとも約70 R C o U / k g B W、少なくとも約80 R C o U / k g B W、少なくとも約90 R C o U / k g B W、少なくとも約100 R C o U / k g B W、少なくとも約150 R C o U / k g B W、少なくとも約200 R C o U / k g B W、少なくとも約250 R C o U / k g B W、少なくとも約300 R C o U / k g B W、少なくとも約350 R C o U / k g B W、少なくとも約400 R C o U / k g B W、少なくとも約450 R C o U / k g B W、少なくとも約500 R C o U / k g B W、少なくとも約550 R C o U / k g B W、少なくとも約600 R C o U / k g B W、少なくとも約650 R C o U / k g B W、少なくとも約700 R C o U / k g B W、少なくとも約750 R C o U / k g B W、少なくとも約800 R C o U / k g B W、少なくとも約850 R C o U / k g B W、少なくとも約900 R C o U / k g B W、少なくとも約950 R C o U / k g B W、少なくとも約1000 R C o U / k g B W、少なくとも約1200 R C o U / k g B W、少なくとも約1400 R C o U / k g B W、少なくとも約1600 R C o U / k g B W、少なくとも約1800 R C o U / k g B W、少なくとも約2000 R C o U / k g B W、少なくとも約2500 R C o U / k g B W、少なくとも約3000 R C o U / k g B W、少なくとも約3500 R C o U / k g B W、少なくとも約4000 R C o U / k g B W、少なくとも約4500 R C o U / k g B W、少なくとも約5000 R C o U / k g B W、少なくとも約6000 R C o U / k g B W、少なくとも約7000 R C o U / k g B W、少なくとも約8000 R C o U / k g B W、少なくとも約9000 R C o U / k g B W、少なくとも約10000 R C o U / k g B W、少なくとも約20000 R C o U / k g B W、少なくとも約50000 R

10

20

30

40

50

C o U / k g B W、および少なくとも約 1 0 0 0 0 0 R C o U / k g B W、および 1 0 0 0 0 0 R C o U / k g B W より多くまでの用量で投与する。

【 0 0 6 9 】

本発明の方法の様々な他の局面において、組換え A D A M T S 1 3 を被験体に投与する。組換えヒト A D A M T S 1 3 が記載された (P l a i m a u e r ら、B l o o d 1 0 0 : 3 6 2 6 - 3 6 3 2、2 0 0 2)。組換えヒト A D A M T S 1 3 は、まだヒト投与のためには市販で入手可能でないが、本発明は、臨床試験における、およびそれが市販で入手可能な場合に、そのような r A D A M T S 1 3 の使用を含む。遺伝性 A D A M T S 1 3 欠損を有する被験体において、正常ヒト血漿が A D A M T S 1 3 の供給源として使用され、そして I U / m L の A D A M T S 1 3 を含む。精製血漿由来または組換え A D A M T S 1 3 は、現在 1 0 0 - 5 0 0 U / k g B W の用量範囲で、動物における使用のために利用可能である。本発明の方法は、I U / m L または U / k g B W の適当な用量で投与されたこれらの任意の供給源の使用を企図する。1つの局面において、本発明は、少なくとも約 1 0 U / k g B W、少なくとも約 2 0 U / k g B W、少なくとも約 3 0 U / k g B W、少なくとも約 4 0 U / k g B W、少なくとも約 5 0 U / k g B W、少なくとも約 6 0 U / k g B W、少なくとも約 7 0 U / k g B W、少なくとも約 8 0 U / k g B W、少なくとも約 9 0 U / k g B W、少なくとも約 1 0 0 U / k g B W、少なくとも約 1 5 0 U / k g B W、少なくとも約 2 0 0 U / k g B W、少なくとも約 2 5 0 U / k g B W、少なくとも約 3 0 0 U / k g B W、少なくとも約 3 5 0 U / k g B W、少なくとも約 4 0 0 U / k g B W、少なくとも約 4 5 0 U / k g B W、少なくとも約 5 0 0 U / k g B W、少なくとも約 5 5 0 U / k g B W、少なくとも約 6 0 0 U / k g B W、少なくとも約 6 5 0 U / k g B W、少なくとも約 7 0 0 U / k g B W、少なくとも約 7 5 0 U / k g B W、少なくとも約 8 0 0 U / k g B W、少なくとも約 8 5 0 U / k g B W、少なくとも約 9 0 0 U / k g B W、少なくとも約 9 5 0 U / k g B W、少なくとも約 1 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 1 2 0 0 U / k g B W、少なくとも約 1 4 0 0 U / k g B W、少なくとも約 1 6 0 0 U / k g B W、少なくとも約 1 8 0 0 U / k g B W、少なくとも約 2 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 2 5 0 0 U / k g B W、少なくとも約 3 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 3 5 0 0 U / k g B W、少なくとも約 4 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 4 5 0 0 U / k g B W、少なくとも約 5 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 6 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 7 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 8 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 9 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 1 0 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 2 0 0 0 0 U / k g B W、少なくとも約 5 0 0 0 0 U / k g B W、および少なくとも約 1 0 0 0 0 0 U / k g B W、および 1 0 0 0 0 0 U / k g B W より多くまでの用量での r A D A M T S 1 3 の投与を含む。

10

20

30

【 0 0 7 0 】

本発明の方法の様々な局面において、その方法を、様々な温度で行う。ある局面において、本発明は、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、約 3 0、約 3 1、約 3 2、約 3 3、約 3 4、約 3 5、約 3 6、約 3 7、約 3 8、約 3 9、約 4 0、約 4 1、約 4 2、約 4 3、約 4 4、約 4 5、約 4 6、約 4 7、約 4 8、約 4 9、約 5 0、約 5 1、約 5 2、約 5 3、約 5 4、約 5 5、約 5 6、約 5 7、約 5 8、約 5 9、約 6 0、約 6 1、約 6 2、約 6 3、約 6 4、約 6 5、約 6 6、約 6 7、約 6 8、約 6 9、約 7 0、約 7 1、約 7 2、約 7 3、約 7 4、約 7 5、約 7 6、約 7 7、約 7 8、約 7 9、約 8 0、約 9 0、および約 1 0 0 の温度を含む方法を含む。1つの局面において、本発明は、約 2 0 から約 4 0 の温度を含む方法を含む。特定の局面において、本発明は、約 3 0 から約 3 5 の温度を含む方法を含む。1つの局面において、本発明は約 3 2 の温度を含む方法を含む。

40

【 0 0 7 1 】

本発明のいくつかの局面において、提供された方法をある時間にわたって行う。様々な

50

局面において、本発明は、約 5 秒、約 10 秒、約 15 秒、約 20 秒、約 25 秒、約 30 秒、約 35 秒、約 40 秒、約 45 秒、約 50 秒、約 55 秒、約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分、約 6 分、約 7 分、約 8 分、約 9 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 24 時間、約 36 時間、約 48 時間、約 72 時間、および約 96 時間、の時間を含む方法を含む。ある局面において、その時間は約 10 秒から約 3 時間の範囲である。特定の局面において、その時間は約 30 秒から約 1 時間の範囲である。より特定の局面において、その時間は約 15 分から約 30 分の範囲である。1 つの局面において、その時間は約 30 分である。別の局面において、その時間は約 15 分である。

10

【0072】

いくつかの局面において、提供された方法を、ずれ応力下で行う。様々な局面において、そのずれ応力は、約 100 s⁻¹、約 200 s⁻¹、約 300 s⁻¹、約 400 s⁻¹、約 500 s⁻¹、約 600 s⁻¹、約 700 s⁻¹、約 800 s⁻¹、約 900 s⁻¹、約 1000 s⁻¹、約 2000 s⁻¹、約 3000 s⁻¹、約 4000 s⁻¹、約 5000 s⁻¹、約 6000 s⁻¹、約 7000 s⁻¹、約 8000 s⁻¹、約 9000 s⁻¹、約 10,000 s⁻¹、約 11,000 s⁻¹、約 12,000 s⁻¹、約 13,000 s⁻¹、約 14,000 s⁻¹、約 15,000 s⁻¹、約 16,000 s⁻¹、約 17,000 s⁻¹、約 18,000 s⁻¹、約 19,000 s⁻¹、および約 20,000 s⁻¹ のずれ率を含む。ある局面において、そのずれ応力は、約 100 から約 10,000 s⁻¹ のずれ率を含む。他の局面において、そのずれ応力は、約 1,000 s⁻¹ から約 8,000 s⁻¹ のずれ率を含む。1 つの局面において、そのずれ率は約 6,000 s⁻¹ である。

20

【0073】

提供された方法において、rVWF または rADAMTS13 を、様々な用量を含む、任意の用量で哺乳動物に投与する。投与量は、体重、VWF の活性、ADAMTS13 プロテアーゼの活性、投与経路、哺乳動物レシピエントの健康または状態、および当業者に公知の様々な因子に基づき得る。

30

【実施例】

【0074】

(実施例)

本発明のさらなる局面および詳細が、制限ではなく説明であることが意図される、以下の実施例から明らかである。実施例 1 は、ヒト rVWF の ADAMTS13 切断に対する感度は、種間で異なることを示す。実施例 2 は、血漿中の ADAMTS13 由来の切断産物の定量化および検出を示す。実施例 3 は、ヒト組換え VWF で処置した被験体由来の血漿における、VWF 切断断片の検出を記載する。実施例 4 は、ずれ応力下での ADAMTS13 媒介 VWF タンパク質分解後の VWF 切断断片の検出を記載する。実施例 5 は、血漿中における内因性 VWF に対する組換え ADAMTS13 の影響の検出を記載する。

40

【0075】

(実施例 1：ヒト組換えフォンビルブランド因子の ADAMTS13 切断に対する感度は、種間で異なる)

上記の本明細書中で述べたように、VWF マルチマーサイズおよび従って VWF 活性は、血液中の ADAMTS13 活性によって調節される。その研究の目的は、異なる動物種の血漿中に存在する ADAMTS13 による切断に対するヒト rVWF の感度を決定することであった。異なる種の ADAMTS13 の、ヒト rVWF を切断する能力を、インビトロおよびインビボで試験した。

【0076】

ADAMTS13 活性の決定：様々な動物由来の希釈血漿サンプルを、塩化バリウムで処理して ADAMTS13 を活性化した。ヒト rVWF (1 U/mL) (発酵および精製

50

によってCHO細胞から得た) (Turecekら、Blood 108: Abstract 1017、2006; American Society of Hematology Annual Meeting Abstract)を加え、そして混合物を変性条件下(1.5Mの尿素)で24時間インキュベートした。次いでADAMTS 13活性を、下記の本明細書中で記載されるような多くのアッセイによって決定した。

【0077】

コラーゲン結合活性(VWF: CBA)アッセイ: サンプルを、コラーゲンをコーティングしたウェル中でインキュベートした。結合したrVWFを、ポリクローナル抗ヒトVWF抗体(DAKO、Denmark)を用いて検出した。血漿サンプルのADAMTS 13活性を、非切断rVWFと比較して、残存VWF: CB活性のパーセントとして表し、そしてデータを用量-反応曲線で示した(1:20から1:3000希釈)か、または、正常ヒト血漿(NHP)(1:20希釈、50mU/mLのヒトADAMTS 13活性と同等)と比較して、コラーゲン結合活性(CBA)の減少のパーセントとして表した。上記の本明細書中で記載したように、VWF: CBAは、存在するVWFの質について、定量的および定性的情報を提供する、機能的アッセイである。

10

【0078】

蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)活性アッセイ: ADAMTS 13のタンパク質分解活性を、73アミノ酸から成る蛍光標識合成VWFペプチド(FRETS-VWF73、Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan)を用いて、製造会社の指示に従って測定した。血漿サンプル(ADAMTS 13活性)を、希釈正常ヒト血漿(NHP)から調製した参照曲線に対して測定し、そしてNHPのパーセントとして表した。

20

【0079】

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびイムノブロットイング: SDS-PAGEを、還元および非還元条件下で、勾配(3%-8%)Tris-酢酸ゲルを用いて行い、続いてタンパク質をPVDF膜へエレクトロブロットイングし、そしてモノクローナル(MoAb.VW33-5: TaKaRa Bio Inc., Japan; MoAb N10: Abcam, USA, Katoら(2006) Transfusion 46, 1444)およびポリクローナルウサギ抗ヒトVWF(DAKO、Denmark)抗体と共にインキュベートした。コントロールとして、rVWFを組換えADAMTS 13(Plaimauerら、Blood 100: 3626、2002)で処理した。2次抗体を、アルカリホスファターゼ(ALP)または西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のいずれかで標識した。そのタンパク質を、ALPまたは増強化学発光(ECL)検出キットを用いて視覚化した。高分解能水平SDS-アガロースゲル電気泳動、続いてポリクローナルウサギ抗ヒトVWF抗体による免疫染色を用いて、マルチマー分析を行った。

30

【0080】

動物: この研究において使用された動物血漿サンプルは、サル(アカゲザルおよびカニクイザル)、ウサギ(New Zealand White)、ブタ(Yorkshire)、イヌ(ビーグル)、モルモット(Dunkin Hartley)、ラット(Sprague Dawley)、およびマウス(VWF欠損(def)およびADAMTS 13欠損(どちらもC57BLバックグラウンドを有する))から取った。

40

【0081】

インビボ研究: New Zealand Whiteウサギを、静脈内注射によって、1200IU VWF: リストセチン補助因子活性(VWF: RCo)/kg体重(BW)で処置した。上記の本明細書中で記載したように、VWF: RCoアッセイは、VWF濃度/活性を測定する1つの方法である。従って、VWFの濃度は、多くの場合VWF: RCoユニットで報告される。rVWFの注射前および注射後様々な時点における血液サンプルを、ウサギの中心耳動脈から取った。クエン酸添加血漿を調製し、そして凍結保存した。マウスを、静脈内注射によって、2000IU VWF: RCo/kg BW単独

50

で、または19.4 μg/kg BWのrADAMTS13と共に処置した。マウス由来の血液サンプルを、心臓穿刺によって取り、そしてクエン酸添加血漿を調製し、そして凍結保存した。MoAbsの内因性IgGとの反応性を回避するために、ゲルにロードする前に、インビボ研究由来のマウス血漿サンプルを、プロテインGセファロースビーズで免疫枯渇した。

【0082】

(ヒトADAMTS13によるrVWFの切断)

ヒトADAMTS13による切断後の、rVWFのマルチマー構造の変化を、図1に示す。正常ヒト血漿(NHP)におけるVWFマルチマーは、ADAMTS13切断の結果としてサテライトバンドを示す(図1Aを参照のこと)。組換えVWFは、いかなるサテライト構造も有さずに高MWのマルチマーを含む(図1Bを参照のこと)。変性条件下でのrVWFのADAMTS13とのインキュベーションは、より小さいマルチマーおよびサテライトバンドの出現と共に、マルチマー数の減少を引き起こす。

10

【0083】

ADAMTS13によるrVWFモノマーの特異的切断を、図2に示す。rVWFモノマーのADAMTS13特異的切断は、140kDaのN末端および176kDaのC末端断片を生じ、それをイムノプロットティングによって検出し得る。VWFのモノクローナル抗体による還元SDS-PAGEを用いたイムノプロットティングの結果を、図2Aに示す。モノクローナル抗体N10は、ADAMTS13によってTy^r160⁵とMe^t160⁶との間で切断された場合にのみ、VWFのN末端140kDa断片を検出する(インタクトなVWFとは反応しない)。モノクローナル抗体VW33-5は、176kDaのC末端断片およびインタクトなVWFを検出する。VWFのポリクローナル抗体による非還元SDS-PAGEを用いたイムノプロットティングの結果を、図2Bに示す。そのポリクローナルウサギ抗VWFAbは、切断断片およびインタクトなVWFマルチマーをどちらも検出する。

20

【0084】

(異なる動物種のADAMTS13による、rVWFのインビトロ切断)

rVWFのADAMTS13依存性の切断を、残存VWFコラーゲン結合(VWF:CBA)活性によって検出した(図3を参照のこと)。FRETsおよびVWF:CBAによって測定されるADAMTS13活性も、図4に示す。ADAMTS13活性を、NHPのパーセンテージとして表す。ウサギ血漿におけるADAMTS13の酵素活性は、ヒト血漿と同じくらい高かった(CBAおよびFRETsによって測定)。カニクイザルおよびアカゲザル、ブタ、およびイヌのサンプルにおいては、より低いADAMTS13活性が観察された。しかし、FRETsは、CBAより高いADAMTS13活性を示した。VWF欠損マウス、ADAMTS13欠損マウス、ラット、およびモルモット由来の血漿サンプルにおいては、ADAMTS13活性はほとんど、または全く検出されなかった。

30

【0085】

高分解能マルチマー分析を用いたADAMTS13によるVWF切断の可視化(図5を参照のこと)は、ウサギ血漿が、正常ヒト血漿(NHP)と同様の、rVWFの分解およびサテライトバンドの形成を誘導したことを示した。カニクイザル、アカゲザル、ブタ、およびイヌも、rVWFの特異的切断を示したが、より低い程度であった。緩衝液とインキュベートしたrVWFと比較して、モルモット、ラット、およびマウス血漿では、重要性をもつ変化は観察されなかった。

40

【0086】

rVWFのADAMTS13切断を可視化するための、イムノプロットティングの使用は(図6および7を参照のこと)、バンド(切断されたVWF)の強度は一般的に、VWF:CBAアッセイの結果とよく相関することを示した。図6は、非還元条件下でのSDS-PAGE、続くHRPと結合したポリクローナル抗ヒトVWF抗体によるイムノプロットティングの結果を示す。このポリクローナル抗ヒトVWF抗体は、VWF切断断片(14

50

0 および 176 kDa) およびインタクトなマルチマーをどちらも検出し、そしてモノクローナル抗体よりも感度が高いが特異性は低い。ポリクローナル抗体によるイムノブロッティングの結果(図6を参照のこと)は、ヒト、ウサギ、サル、ブタ、またはイヌ由来の血漿とのインキュベーション後のヒト rVWF の切断を示したが、モルモット、ラット、またはマウス由来では示さなかった。

【0087】

モノクローナル抗体 VW33-5 によって、匹敵する結果が得られた(図7を参照のこと)。図7は、還元条件下での SDS-PAGE、続くモノクローナル VWF 抗体によるイムノブロッティングの結果を示す。上記の本明細書中で議論されたように、モノクローナル抗体 VW33-5 は、C末端 176 kDa 断片およびインタクトな VWF を検出し、一方モノクローナル抗体 N10 は、ADAMTS13 によって Tyr¹⁶⁰⁵ と Met¹⁶⁰⁶ との間で切断された場合にのみ、VWF の N末端 140 kDa 断片を検出する。VWF の ADAMTS13 切断をまた、N10 抗体によって検出した(図7の 140 kDa のバンドを参照のこと)。図7のアスタリスクは、ヤギ抗マウス IgG 抗体(2次)の内因性マウス血漿 IgG との反応を示す。これらの反応は、マウスサンプルにおける N10 抗体による 140 kDa モノマーの可視化を妨げた。バンドの強度は一般的に、CBA アッセイの結果とよく相関していた。

10

【0088】

ヒト、ウサギ、カニクイザルおよびアカゲザルの血漿において、rVWF モノマーの ADAMTS13 特異的切断が、イムノブロッティングによって示された。ブタおよびイヌにおいて、低レベルの 176 kDa 断片が検出可能であった。C57BL マウス系統、ラット、およびモルモットの血漿とインキュベートした場合、rVWF 断片は見えなかった。

20

【0089】

(異なる動物種の ADAMTS13 による rVWF のインビボ切断)

ウサギにおける ADAMTS13 による rVWF (1200 IU VWF : RCo / kg) の特異的インビボ切断(140 kDa および 176 kDa 断片)を、還元 SDS-PAGE の後、イムノブロッティングによってモノクローナル抗体で検出した(図8A および B を参照のこと)。コントロールとして、未切断 rVWF およびインビトロで rADAMTS13 によって切断された rVWF を示す。rVWF 投与の直後にマルチマーパターンの特徴的な変化も見られる(図8Cを参照のこと)。

30

【0090】

図9は、VWF 欠損および ADAMTS13 欠損マウスにおける、ADAMTS13 による rVWF (2000 IU VWF : RCo / kg) の特異的インビボ切断を示す。非還元 SDS-PAGE 後、C末端断片に特異的なモノクローナル抗体(VW33-5)を用いて、どちらのマウス系統においても、176 kDa の VWF 切断断片は見えなかった(図9A)。アスタリスクは、ヤギ抗マウス IgG 抗体の、マウス血漿 IgG との反応を示す。これらの反応は、N10 抗体による 140 kDa モノマーの可視化を妨げた。rVWF マルチマーパターンの検出可能な変化は観察されなかった(図9B)。140 kDa および 176 kDa ホモダイマーは、非還元条件下で、より感度の高い(しかし特異性は低い)ポリクローナル抗体を用いて、VWF 欠損マウスでのみ検出可能であり、ADAMTS13 欠損マウスでは検出可能でなかった(図9C)。

40

【0091】

動物モデルにおける ADAMTS13 切断の有効性の直接比較を、等量の VWF : Ag をロードして、非還元 SDS-PAGE で行った(図10を参照のこと)。ウサギ血漿サンプルにおいて、VWF 欠損マウスサンプルと比較して、176 kDa の VWF 切断産物に対応するより強いバンドが検出可能であった。ADAMTS13 欠損マウス血漿において、切断は検出されなかった。rVWF とヒト rADAMTS13 の共注射は、rVWF の切断を誘導した。図10のコントロールレーン 1-3 は、未切断の rVWF (1)、rADAMTS13 と前もって混合した rVWF (2)、および rADAMTS13 によ

50

てインビトロで切断された r V W F (3) を示す。

【 0 0 9 2 】

r V W F (1 0 0 I U / k g) の単一用量注射後に、カニクイザル血漿において V W F 切断断片が検出可能であった (図 1 1 を参照のこと) 。完全および部分的 A D A M T S 1 3 分解 r V W F 断片 (1 A g U / m L) を、ウサギ抗ヒト V W F 抗体を用いて、15 秒間の露光後、非還元条件下のウェスタンブロッティングによって、r V W F の単一用量注射後にカニクイザル血漿において測定した (図 1 1 A) 。r V W F の注射前、カニクイザル血漿においてベースラインの分解バンド (1 7 6 k D a ダイマー) が見られた。r V W F の注射後に、1 7 6 k D a の V W F ダイマーの量の増加が見られた。1 7 6 k D a の V W F ダイマーは、V W F 抗原 (V W F : A g) の増加が測定されない (図 1 1 B) 、V W F 注射の 2 4 時間後においても、ベースライン (注射前) より高かった (図 1 3 A) 。

10

【 0 0 9 3 】

これらの結果は、A D A M T S 1 3 によるヒト r V W F のインビトロ切断感度における実質的な差異が、異なる動物種の血漿の間で見出されたことを示す。ウサギ血漿は、相同的なヒト血漿と同じくらい、ヒト r V W F のタンパク質分解において有効であった。カニクイザル、アカゲザル、ブタおよびイヌ由来の血漿サンプルは、ヒト r V W F に対して中程度の A D A M T S 1 3 タンパク質分解活性を示した。V W F 欠損マウス、ラット、およびモルモット由来の血漿サンプルは、ヒト r V W F に対して実質的に A D A M T S 1 3 活性を示さなかった。

【 0 0 9 4 】

ウサギおよびマウスにおける、高用量の r V W F の注射によるインビボ研究は、インビトロにおける結果を確認した。V W F 欠損マウスにおいて観察された残留切断は、A D A M T S 1 3 欠損マウスにおける切断の欠如によって確認された。ウサギ血漿において、V W F の A D A M T S 1 3 特異的切断断片およびマルチマーのサテライトバンドの形成によって示されたように、r V W F は有効に切断された。V W F 欠損および A D A M T S 1 3 欠損マウス血漿において、r V W F の切断はほとんど示されなかった。ヒト r A D A M T S 1 3 は、マウス A D A M T S 1 3 酵素を置換し得、そしてマウスにおいて r V W F と共注射された場合に V W F を切断し得た。

20

【 0 0 9 5 】

これらのデータは、ヒト r V W F とマウス、ラット、およびモルモットの血漿に存在する内因性 A D A M T S 1 3 との間の低い種適合性を示す。カニクイザル、アカゲザル、ブタ、およびイヌの血漿に存在する A D A M T S 1 3 は、ヒト r V W F に対してより良いタンパク質分解活性を示した ; しかし A D A M T S 1 3 タンパク質分解活性は、依然としてヒト r V W F に対するヒト A D A M T S 1 3 活性より低かった。ウサギ A D A M T S 1 3 活性は、ヒト r V W F のタンパク質分解において、相同的なヒト血漿と同じくらい有効であるようであった。異なる動物においてヒト r V W F の有効性、(病態) 生理学、および代謝を評価する場合に、A D A M T S 1 3 のタンパク質分解活性 / 特異性におけるこれらの種の差異を考慮しなければならない。この研究はまた、ウサギ、およびウサギ血漿は一般的に、ヒト r V W F を評価および試験するためのモデルとして有用であり得ることを示唆する。

30

40

【 0 0 9 6 】

その方法はまた、様々な動物モデルにおいて、注射された r V W F に対する内因性 A D A M T S 1 3 の効果を検出するために適当である。本発明の方法は、異なる種における r V W F に対する A D A M T S 1 3 の効果の決定において、様々な動物モデルの適合性の調査を可能にする。

【 0 0 9 7 】

(実施例 2 : 血漿における A D A M T S 1 3 由来切断産物の定量化および検出)

その研究の目的は、臨床試験中に、r V W F による処置後、I I I 型 V W D 被験体の血漿サンプルにおいて、V W F の A D A M T S 1 3 媒介切断 (すなわち V W F 断片) を検出し得るかどうかを決定するためのアッセイを開発することであった。

50

【0098】

rVWF注射(100IU VWF:RCO/kg)の前および後(1、3、9、15、および24時間)に得た、正常ヒト血漿、重度のVWF欠損ヒト血漿、ADAMTS13欠損ヒト血漿、およびカニクイザル血漿サンプルを使用した。変性条件下でrADAMTS13によって処理した完全および部分的分解rVWFを、コントロールとして使用した。

【0099】

血漿サンプルを、非還元条件下でSDS-PAGEにアプライし、続いてウェスタンブロッティングを行った。そのプロットを、HRP標識ウサギ抗ヒトVWFポリクローナル抗体(Dako)で染色し、そして増強化学発光(ECL)plus技術によって展開した。

10

【0100】

完全および部分的ADAMTS13分解rVWF(1AgU/mL)を、緩衝液およびVWF欠損血漿中で、ポリクローナルウサギ抗ヒトVWF抗体を用いて、15秒間の露光後、非還元条件下でウェスタンブロッティングによって測定した(図12を参照のこと)。還元条件は、結果を可視化するのに十分感度が高くなかった。ウェスタンブロット分析で、緩衝液(図12A)およびVWF欠損血漿(図12B)の希釈の間で、差異は検出されなかった。VWF由来C末端断片(176kDaダイマー)を、ECLを使用して検出した。完全に分解されたrVWF(1AgU/mL)を、>62.5倍希釈(16nL/1μL血漿)において検出し得た。他のヒト血漿タンパク質との交差反応は見られなかった。

20

【0101】

露光時間を増加させることによってアッセイの感度を増加させることによって、血漿においてVWF切断断片を検出した(図13を参照のこと)。完全および部分的ADAMTS13分解rVWF(1AgU/mL)を、ウサギ抗ヒトVWF抗体を用いて、15秒(図13A)および60秒(図13B)の露光後、非還元条件下のウェスタンブロッティングによって、緩衝液およびVWF欠損血漿において測定した。176kDaの切断断片が、正常ヒト血漿において見られたが、VWF欠損血漿においては見られなかった(図13AおよびBを参照のこと)。ADAMTS13欠損血漿において、微量の176kDa切断断片が検出されたが(図13AおよびBを参照のこと)、存在する全VWFと比較して非常に少ない量であった。完全に分解されたrVWF(1AgU/mL)は、60秒の露光時間で、320倍の希釈(2.5nL/0.8μL血漿/レーン)までよく検出された(図13Bを参照のこと)。

30

【0102】

ウェスタンブロットアッセイの検出限界または感度レベルをさらに、血漿サンプルを希釈すること、および露光時間を2分へ増加させることによって決定した(図14)。正常ヒト血漿を、20倍(5nLから100nLへ)に希釈し、そして20-40nLの正常ヒト血漿をアプライした場合(0.8μLのVWF欠損血漿中)176kDaの切断産物を、2分後によく検出した(0.025-0.05AgU/mL VWF)(図14Aを参照のこと)。VWF欠損血漿中に、ADAMTS13特異的バンド(VWF切断産物)は見られなかった(図14A)。完全に分解されたrVWF(1AgU/mL)を40倍(0.5nLから20nLへ)に希釈し、そして176kDaのVWFダイマーによって測定されるとき、約0.0006U/mLの濃度(0.5nL/0.8μL血漿)で検出し得た(図14Bを参照のこと)。

40

【0103】

ADAMTS13によるVWFの切断をさらに、VWF分解バンドを定量化することによって血漿中で測定した(図15)。176kDaのVWF切断産物を、0.8μLのVWF欠損血漿(0.025AgU/mL VWF)中にアプライした20nLの正常ヒト血漿中でよく検出した(図15A参照)。異なる量の完全に分解されたrVWF(1AgU/mL)のバンド強度から構築された参照曲線から計算した場合、約1-2%のC末端

50

ダイマー（176 kDaのADAMTS 13特異的切断産物）が、ヒト正常血漿において見出された（図15Bを参照のこと）。

【0104】

従って、血漿中のADAMTS 13媒介VWF切断バンドの特異的検出のための、高度に感度の高い方法が開発された。完全に分解されたrVWFによる定量的比較に基づいて、正常ヒト血漿において全VWF：Agの約1 - 2%が、176 kDaの分解バンドとして現れた。正常血漿中のC末端ダイマー（176 kDaのダイマー）を、0.025 - 0.05 U/mLのVWF：Ag濃度の下限で検出し得る。

【0105】

この研究は、VWF切断産物は、ADAMTS 13活性と相関することを示し、この方法がインビボで注射されたrVWFに対する内因性ADAMTS 13の効果を検出するために適当であることを示した。その方法をまた、インビボADAMTS 13活性のマーカーとして使用し得る。従って、この実施例は、血漿サンプルにおいてVWF切断産物を調査することによって、インビボでADAMTS 13活性を測定するための、感度の高い方法の開発を説明する。

10

【0106】

（実施例3：rVWFによる処置前および後の被験体由来の血漿におけるVWF切断断片の検出）

臨床第I相試験の過程において、III型VWD被験体を、7.5 IU VWF：RCO/kg体重のrVWFで処置した。処置の前および96時間までの処置後の様々な時点において血液サンプルを採取し、そしてADAMTS 13依存性VWF切断断片の存在に関してアッセイした。

20

【0107】

それぞれの血漿サンプルを、3 - 8% Tris - 酢酸ゲルに非還元条件下でSDS - PAGEにアプライし（レーンあたり500 nL）、続いてECLplus技術と組み合わせ、HRP標識ウサギ抗ヒトVWFポリクローナル抗体（Dako）を用いてウェスタンブロッティングを行った。VWD血漿（VWD - P、George King）、正常ヒト血漿（VWD血漿中で希釈した0.1 U/mL、NHP）、rVWF（VWD血漿中で希釈した0.1 U/mL）、およびインビトロ消化rVWF（VWD血漿中で希釈した1 nL、分解コントロール）をコントロールとした。176 kDaのダイマーは、処置前サンプルにおいては検出可能ではなかったが、15分、30分、および1時間の時点の処置後サンプルにおいては明らかに識別可能であった（図16Aを参照のこと）。この断片はrVWFには欠如しているので、被験体の内因性ADAMTS 13が、投与されたrVWFを切断したに違いない。

30

【0108】

臨床第I相試験の過程において、III型VWD被験体を、20 IU VWF：RCO/kg体重のrVWF（上記で述べたよりも高い用量）で処置した。血液サンプルを、処置前および96時間までの処置後の様々な時点で採取し、そしてADAMTS 13依存性VWF切断断片の存在に関してアッセイした。

【0109】

それぞれの血漿サンプルを、上記で記載したように、非還元条件下でSDS - PAGEにアプライした。176 kDaのダイマーは、処置前のサンプルでは検出可能でなかったが、32時間の時点までの処置後サンプルにおいては明らかに識別可能であった（図16Bを参照のこと）。より高いrVWFの用量が投与されたために（20対7.5 IU/kg）、ADAMTS 13特異的切断断片は、ウェスタンブロッティングによって、より長い間血漿中で識別可能であった。

40

【0110】

（実施例4：ずれ応力下でのADAMTS 13媒介VWFタンパク質分解後のVWF切断断片の検出）

VWFのずれ応力誘導タンパク質分解切断を、60 mmのコーン（0.5°の角度）を

50

用いて、500 μ Lの全容積で、コーンプレート型粘度計 (H A A K E R h e o S t r e s s 1、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) において行った。その実験デザインは、Shimra (Blood 111: 651-657、2008) による刊行物に基づいていた。rVWF (1 IU/mLの最終濃度) を、50 mMのHEPES、150 mMのNaCl、0.1 μ MのZnCl₂、および5 mMのCaCl₂、pH = 7.4を含む反応緩衝液において、rADAMTS13、血漿由来ADAMTS13 (pADAMTS13)、または正常ヒト血漿 (0.2 U/mLの最終濃度) と混合した。サンプルを6000 s⁻¹のすれ率に37 °Cで15分間供することによって反応を開始し、そしてEDTA (5 mMの最終濃度) の添加によって停止した。ネガティブコントロールとして、同一のサンプルを、ずれ応力の非存在下で、同様にインキュベートした。ポジティブコントロールとして、rVWFを、変性条件下 (1.5 Mの尿素) で24時間、rADAMTS13とインキュベートした。

10

【0111】

サンプルを、3-8%のTris-酢酸ゲル上に、非還元条件下でSDS-PAGEにアプライし (レーンあたり500 nL)、続いてECLplus技術と組み合わせて、HRP標識ウサギ抗ヒトVWFポリクローナル抗体 (Dako) を用いてウェスタンブロッティングを行った。この実験の結果を図17に示す。分解コントロールは、VWFのADAMTS13切断に際し特異的に産生される、176 kDaのダイマーの位置をマークする。ずれ応力に供したサンプルに関して、同じ移動度のバンドが識別可能であった。対照的に、rVWF開始材料および静的条件下に維持したこと以外は同一のサンプルは、特異的な切断断片を示さなかった。

20

【0112】

観察されたADAMTS13によるVWF切断の特異性をまた、マルチマー分析によって分析した。rVWF (3 IU/mLの最終濃度) を、50 mMのHEPES、150 mMのNaCl、0.1 μ MのZnCl₂、および5 mMのCaCl₂、pH = 7.4を含む反応緩衝液中で、rADAMTS13 (5 U/mLの最終濃度) と混合した。そのサンプルを6000 s⁻¹のすれ率に37 °Cで30分間供することによって反応を開始し、そしてEDTA (5 mMの最終濃度) の添加によって停止した。ネガティブコントロールとして、同一のサンプルを、ずれ応力の非存在下で同様にインキュベートした。

30

【0113】

低および高分解能マルチマー分析 (図18Aおよび18Bを参照のこと) は、rADAMTS13がrVWFの分解およびサテライトバンドの形成を誘導し、正常ヒト血漿 (NHP、George King) のものと同様のパターンを生じることが示した。静的であること以外は同一である条件下に維持したサンプルに関しては、マルチマーパターンの重要性をもつ変化は観察されなかった。

【0114】

組み合わせたデータは、血液循環中の生理学的な条件により近いインビトロの条件に供することで、ADAMTS13依存性VWF切断が達成され、そしてそれを、新規に開発されたアッセイによって測定し得ることを示す。

【0115】

従って、このアッセイはまた、基質としてrVWFを加えることによって、ヒト血漿サンプルにおいてADAMTS13活性を測定するために適当である。広い範囲のADAMTS13活性レベルを有する血漿サンプルに適用可能である。

40

【0116】

(実施例5: 血漿中の内因性VWFに対する組換えADAMTS13の効果の検出)

この研究の目的は、ヒトおよび異なる動物サンプルにおいて、内因性VWFに対する注射された組換えADAMTS13 (rADAMTS13) の効果を検出するために、血漿中のADAMTS13切断産物を検出する方法をさらに開発することである。これは、rADAMTS13の前臨床試験のために最も適したモデルを選択する方法を生じる。上記の本明細書中で述べたような方法を使用して、rVWFおよびヒト血漿を含む様々な動物

50

種の血漿中の内因性VWFの切断に対するrADAMTS13の効果を試験する。

【0117】

本発明は、本発明の実施のための特定の様式を含むことが見出されたか、または提案された特定の実施態様に関して記載された。述べられた発明の様々な修飾およびバリエーションが、本発明の範囲および意図から離れることなく、当業者に明らかである。本発明は特定の実施態様に関連して記載されたが、主張されたような本発明は、そのような特定の実施態様に過度に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際、関連する分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための記載された様式の様々な修飾が、以下の請求の範囲内であることが意図される。

【 図 1 】

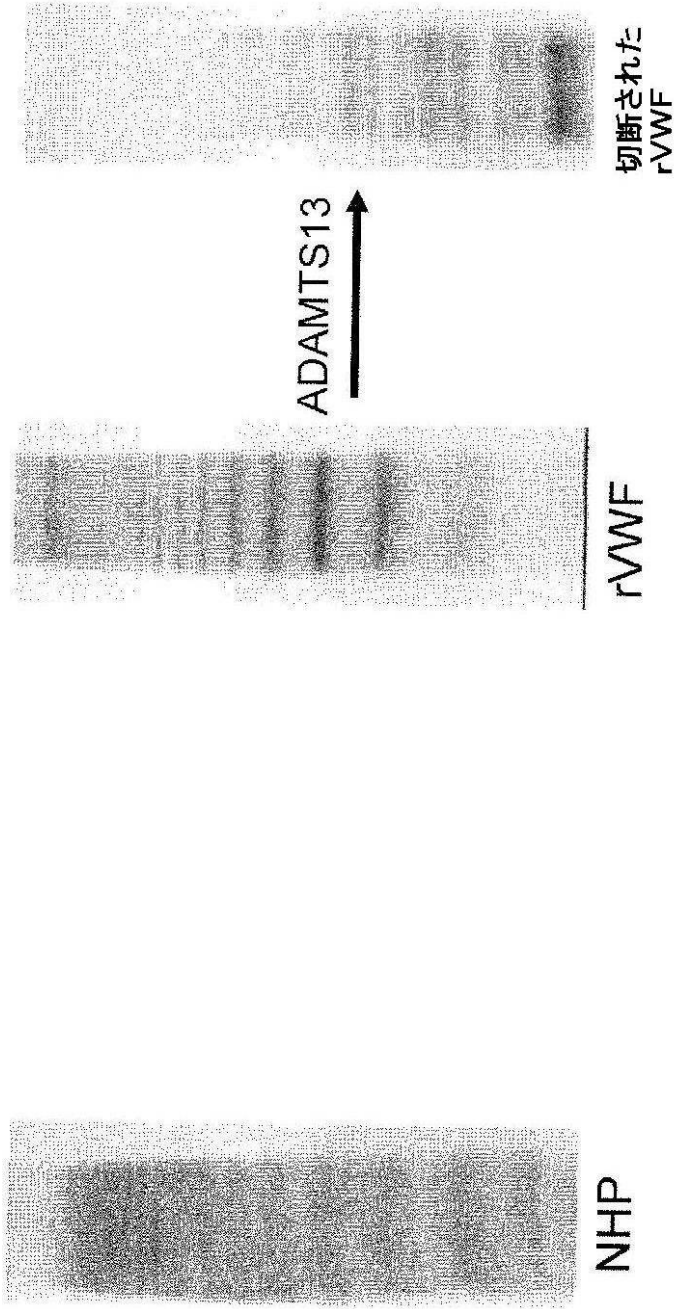


FIG. 1A

FIG. 1B

【 図 2 】

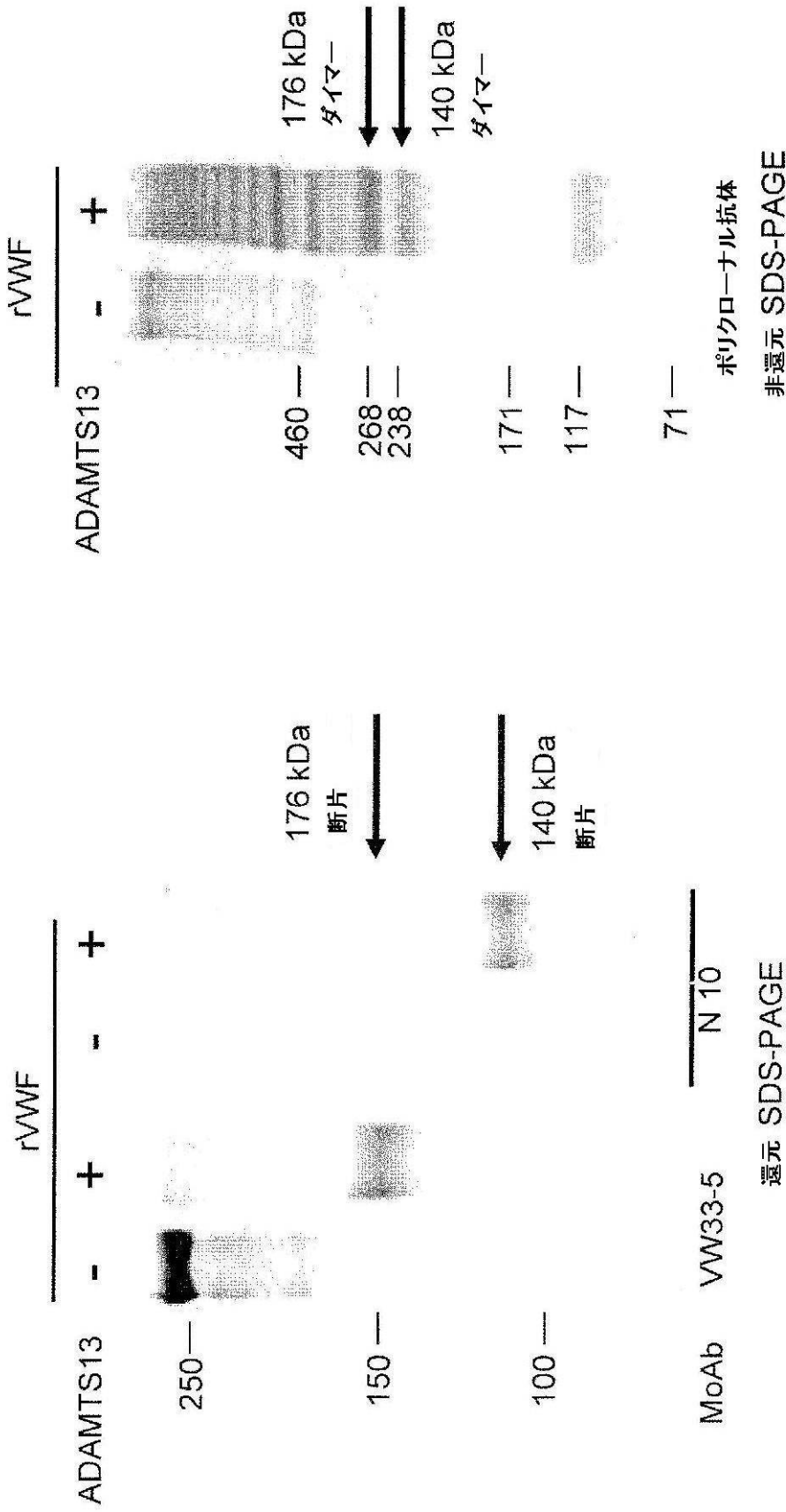


FIG. 2A

FIG. 2B

【 図 3 】

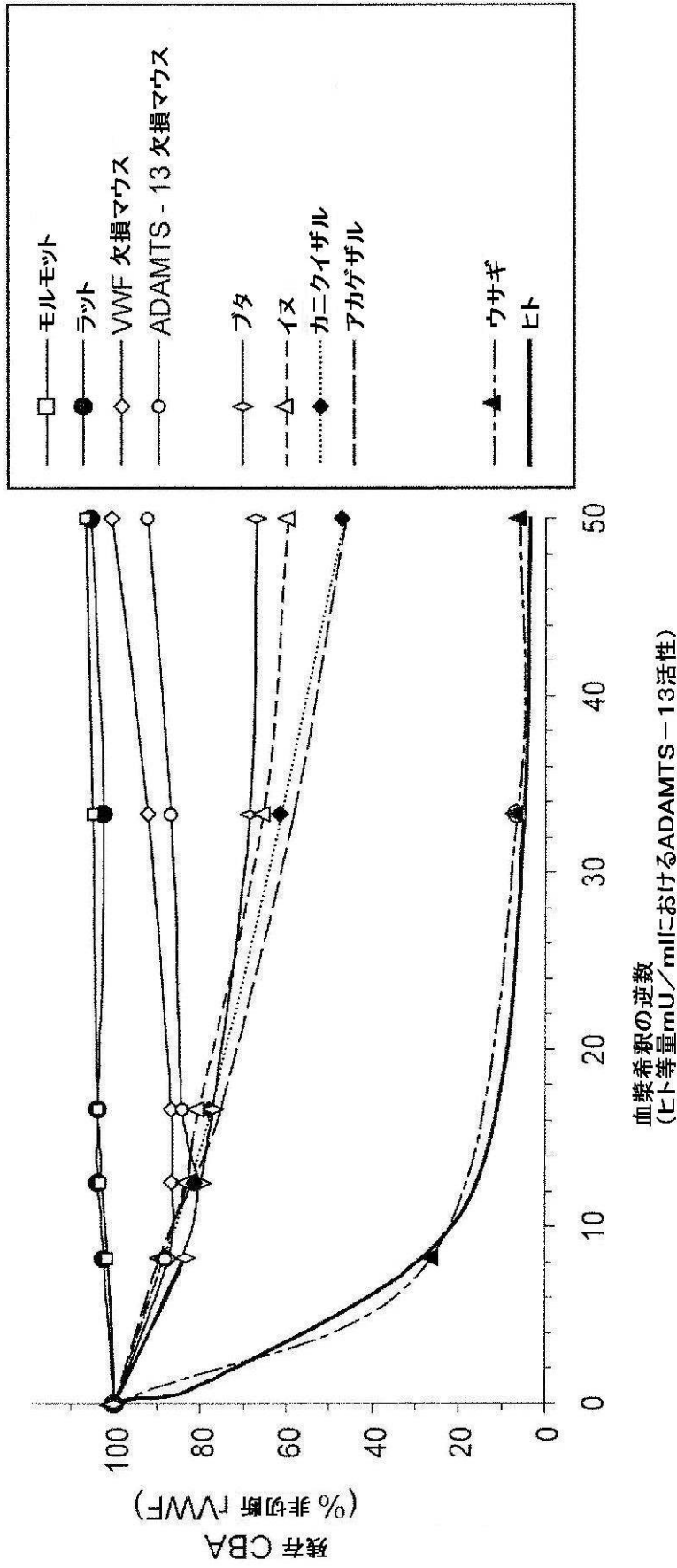


FIG. 3

【 図 4 】

	カニケイザル	97	116	93	52	190	検出限界未満	検出限界未満
	フカゲザル	116	93	52	190			
	ウサギ	93	52	190	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
	New Zealand White	52	190					
	ヲタ	52	190	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
	Yorkshire	190						
	イヌ	190	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
	ビーグル							
	モルモット	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
	Dunkin Hartley							
	ゾット	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
	Sprague Dawley							
	ラウス	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
	VWF 欠損 (C57BL)							
	ADAMTS13	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
	欠損 (C57BL)							
FRETS -VWF73 (%)		97	116	93	52	190		
CBA (%)		51	55	98	36	40		

FIG. 4

【 図 5 】

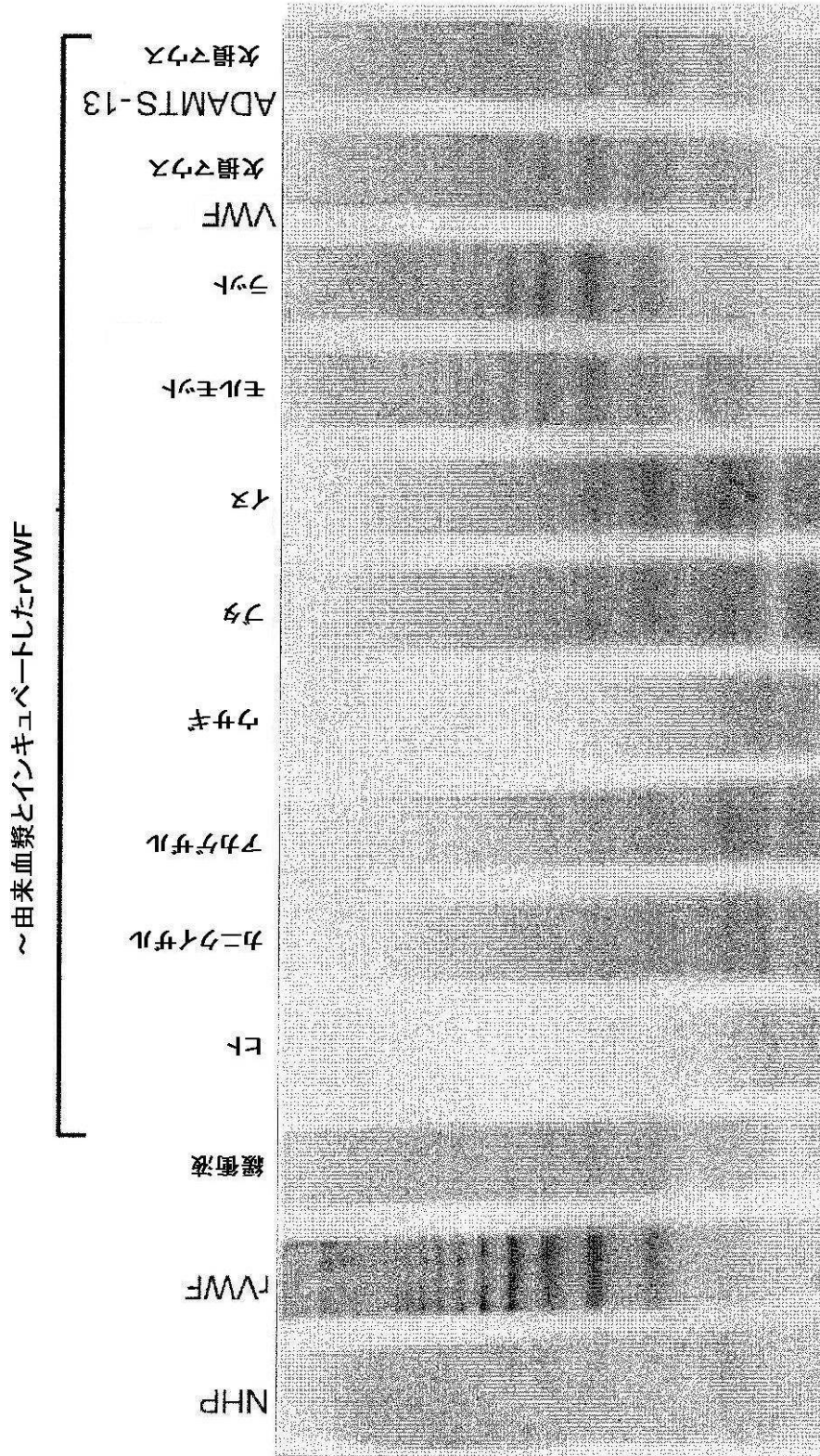


FIG. 5

【 図 6 】

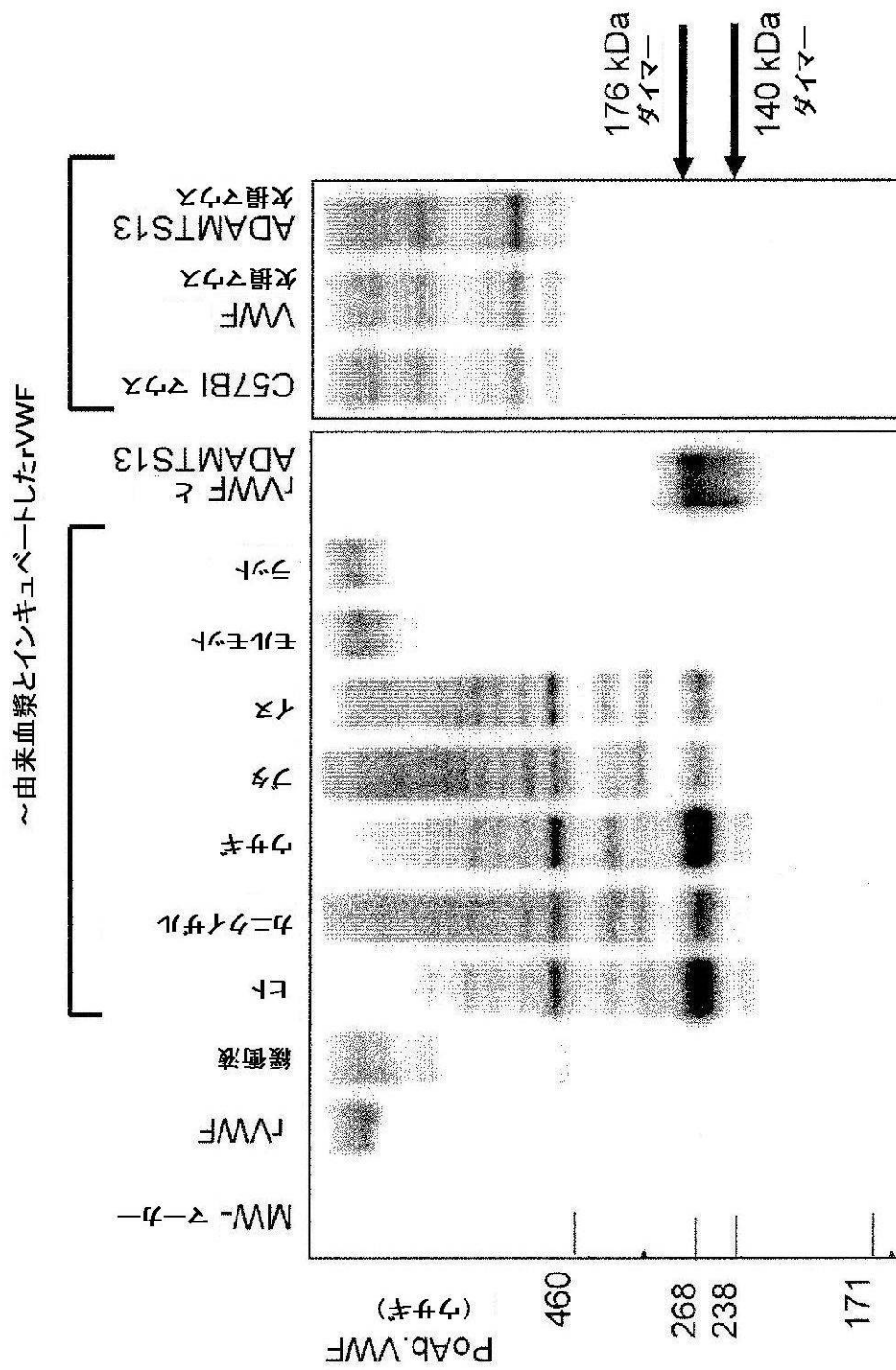


FIG. 6

【 図 7 】

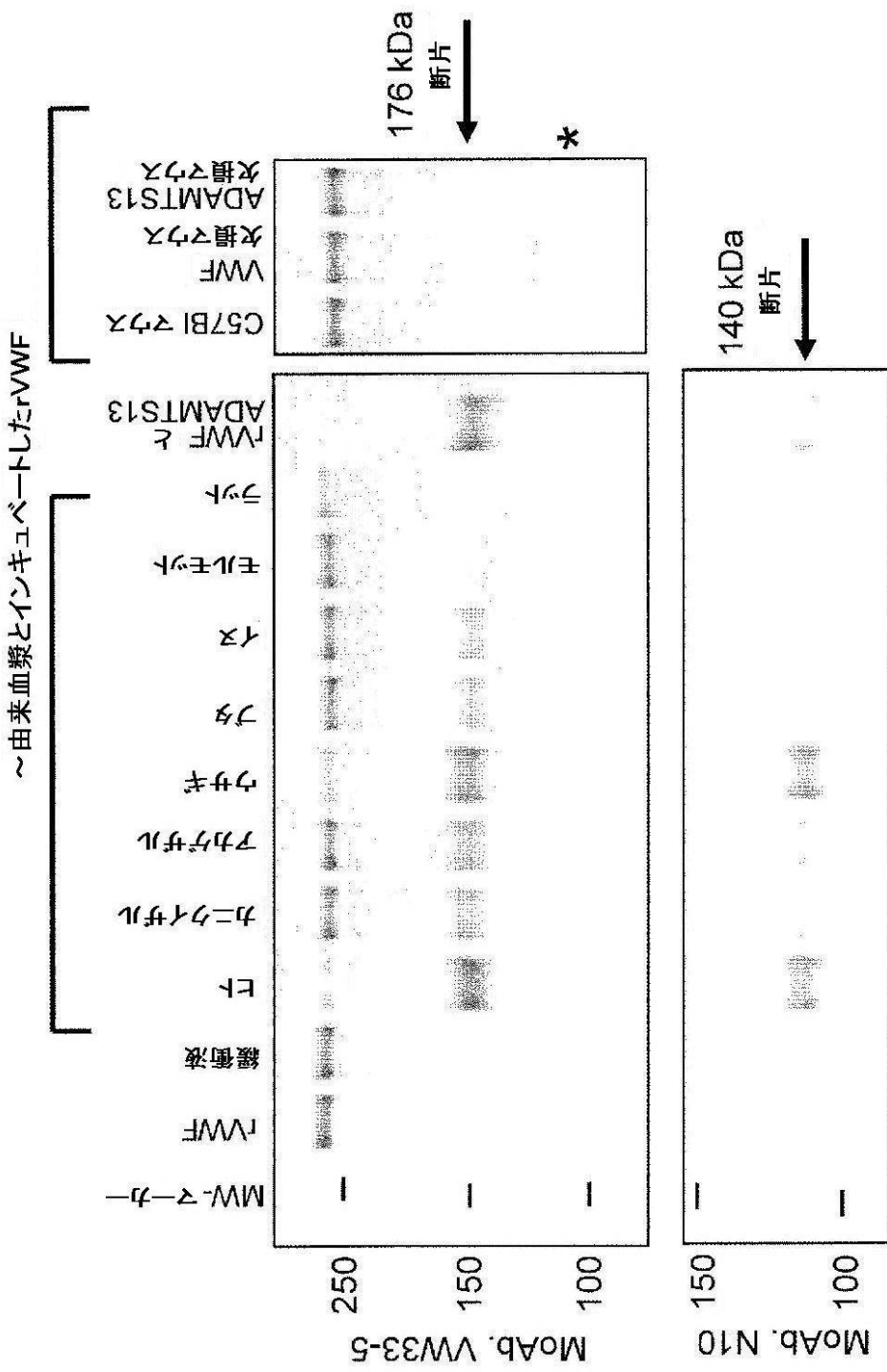


FIG. 7

【 図 8 】

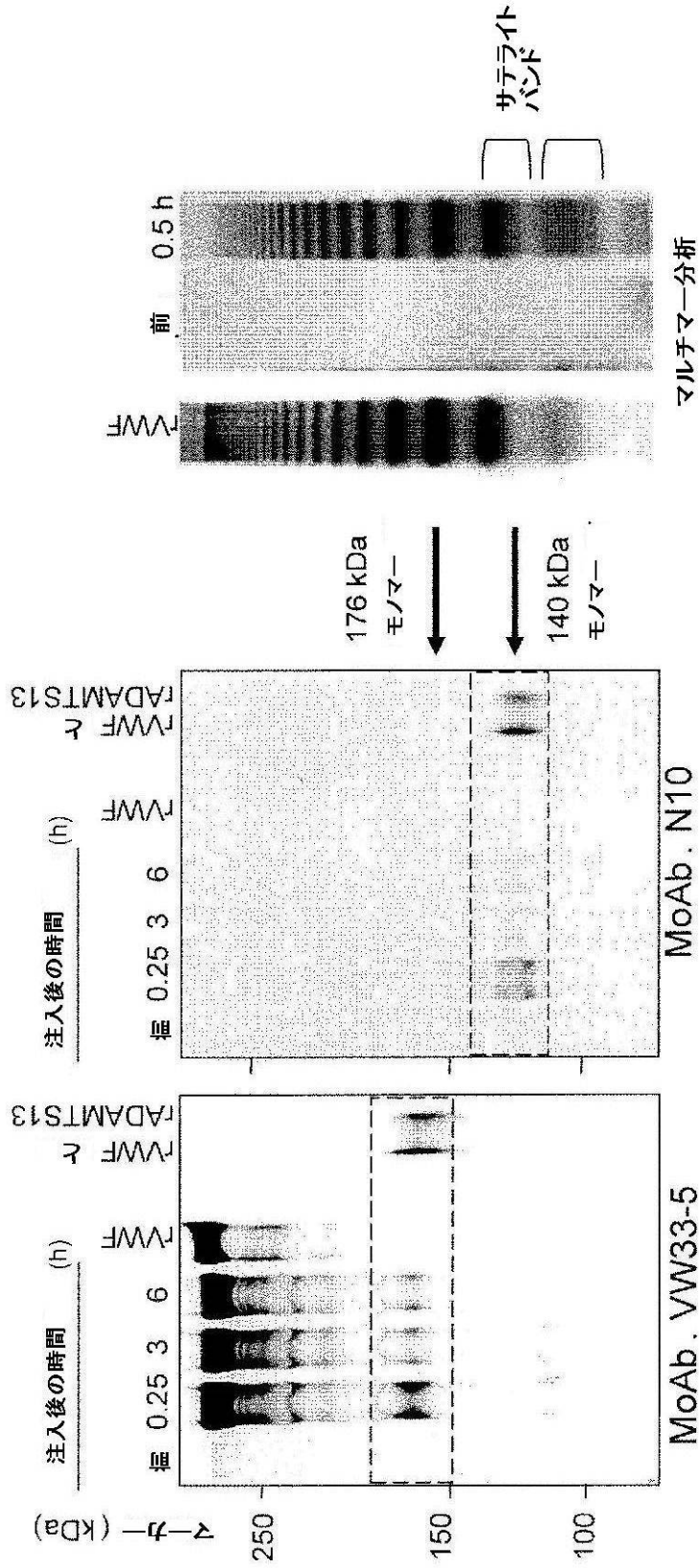


FIG. 8C

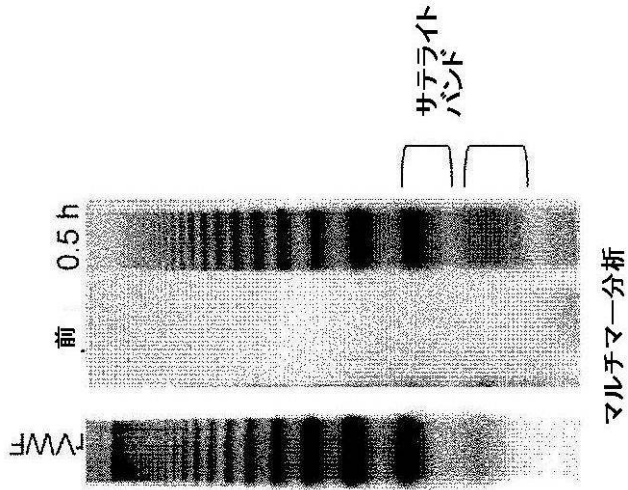


FIG. 8B

FIG. 8A

【 図 9 B 】

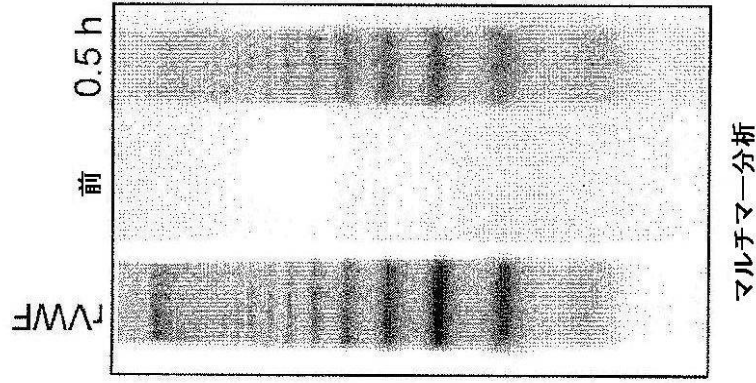


FIG. 9B

【 図 9 C 】

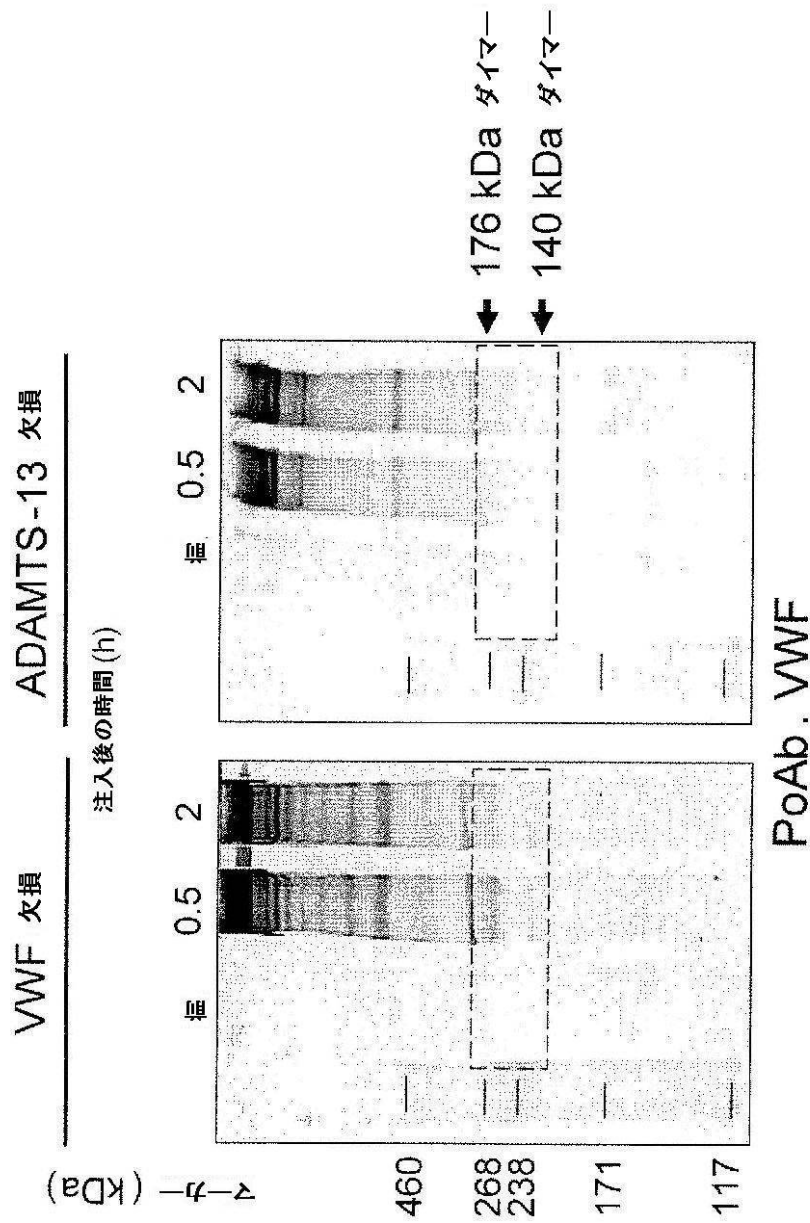


FIG. 9C

【 図 10 】

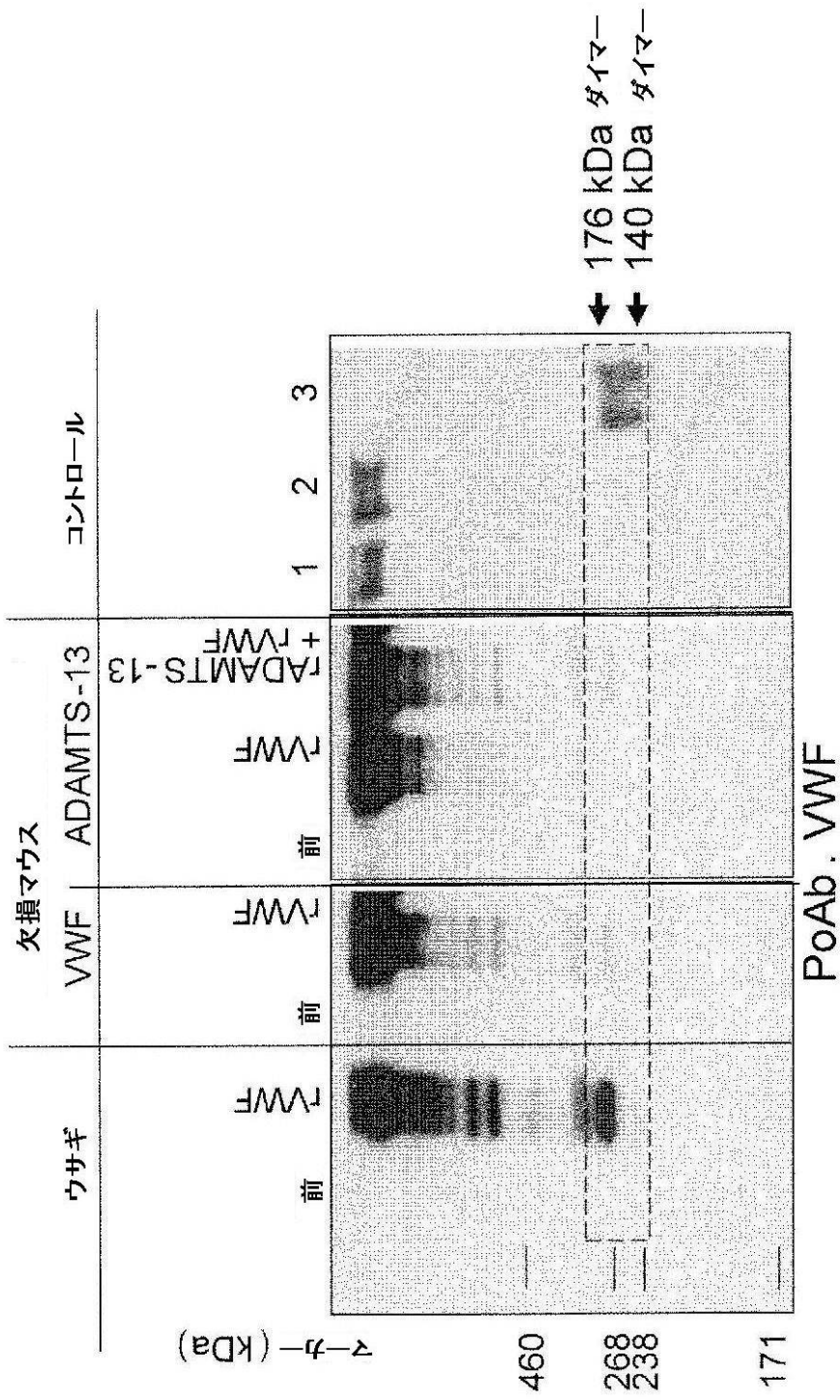
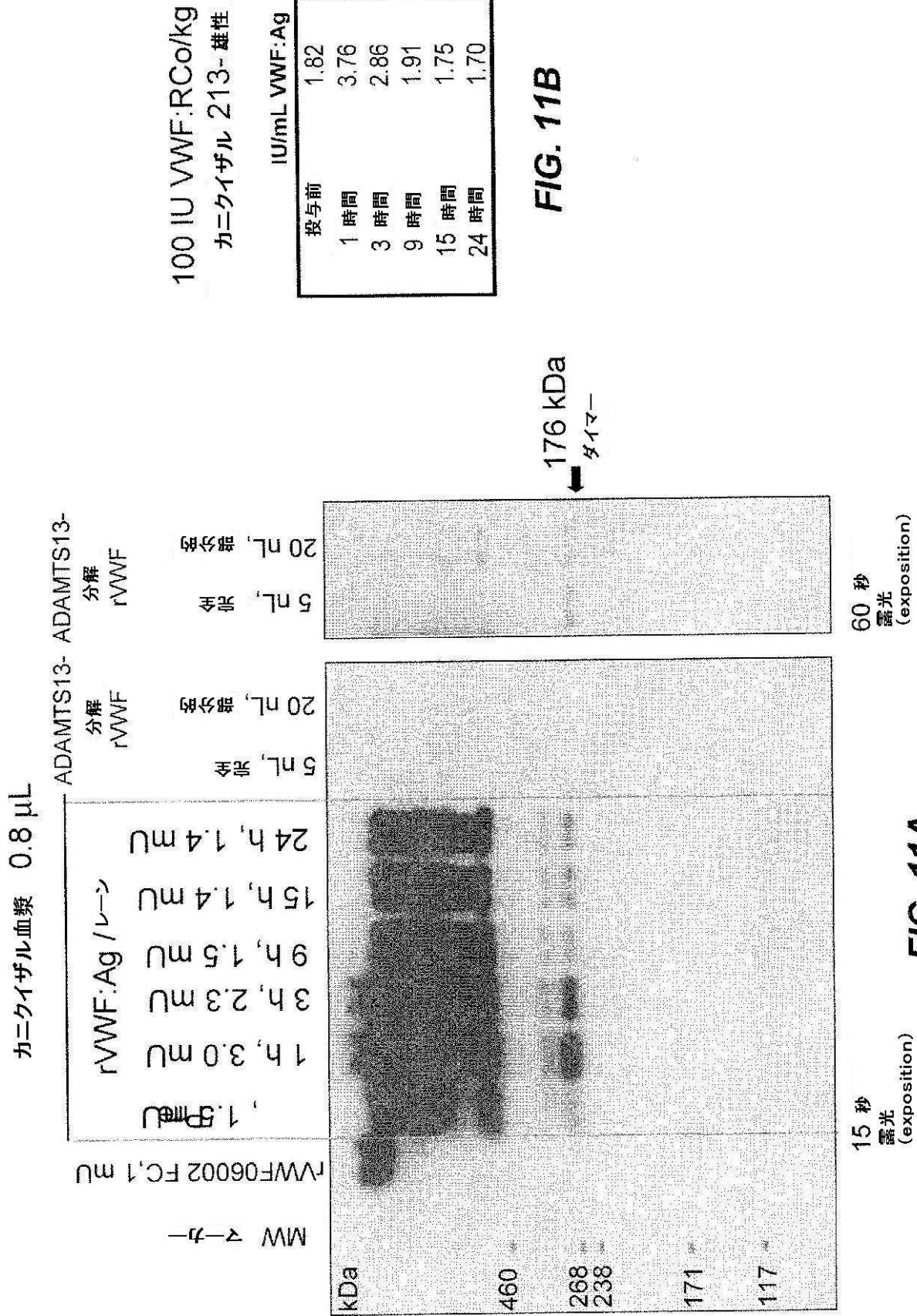


FIG. 10

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

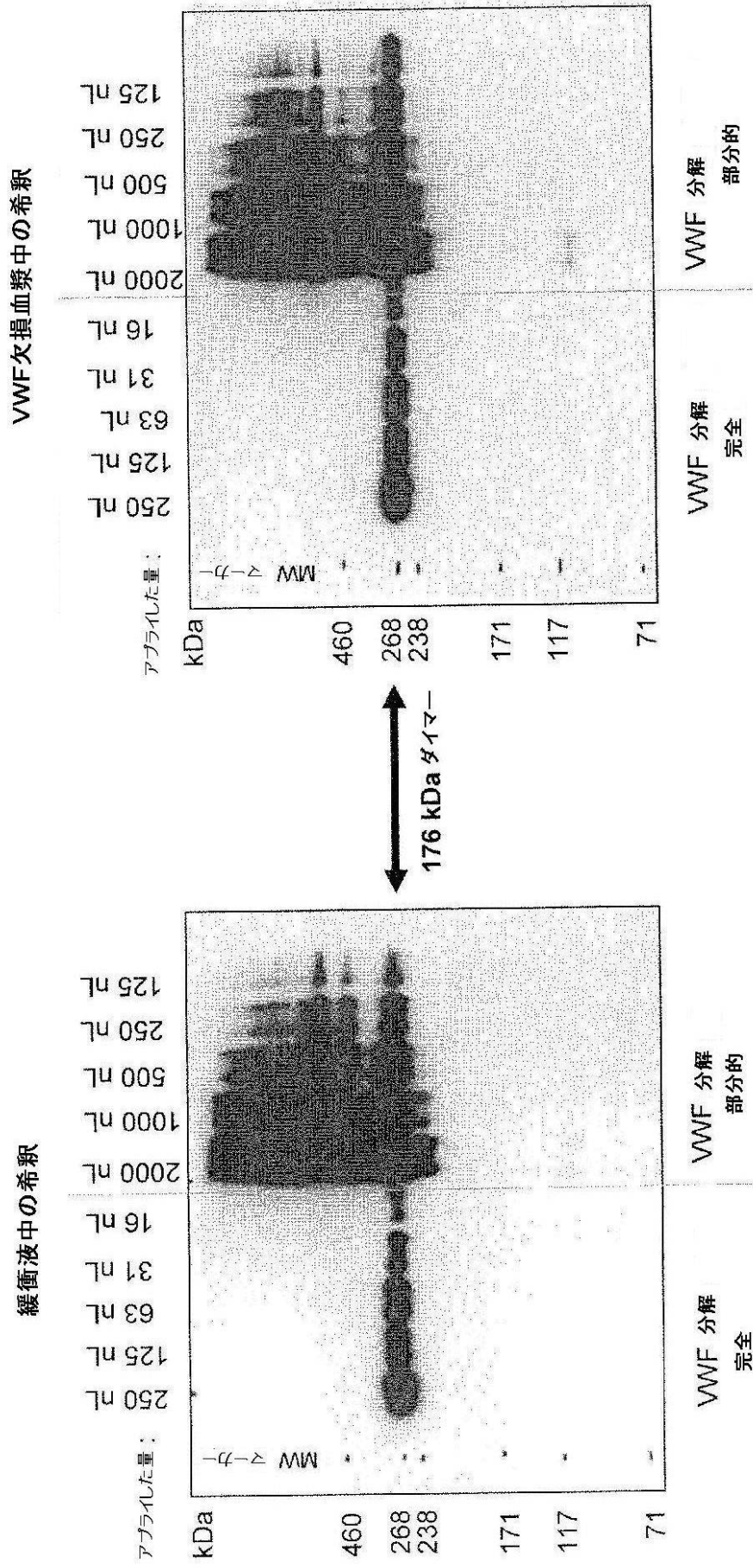


FIG. 12B

FIG. 12A

【 図 1 3 】

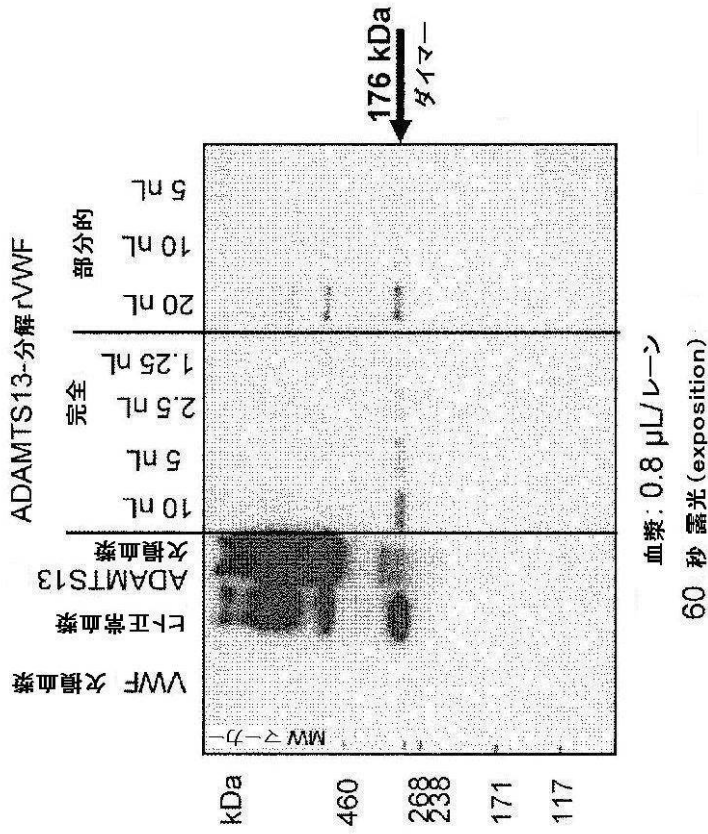


FIG. 13B

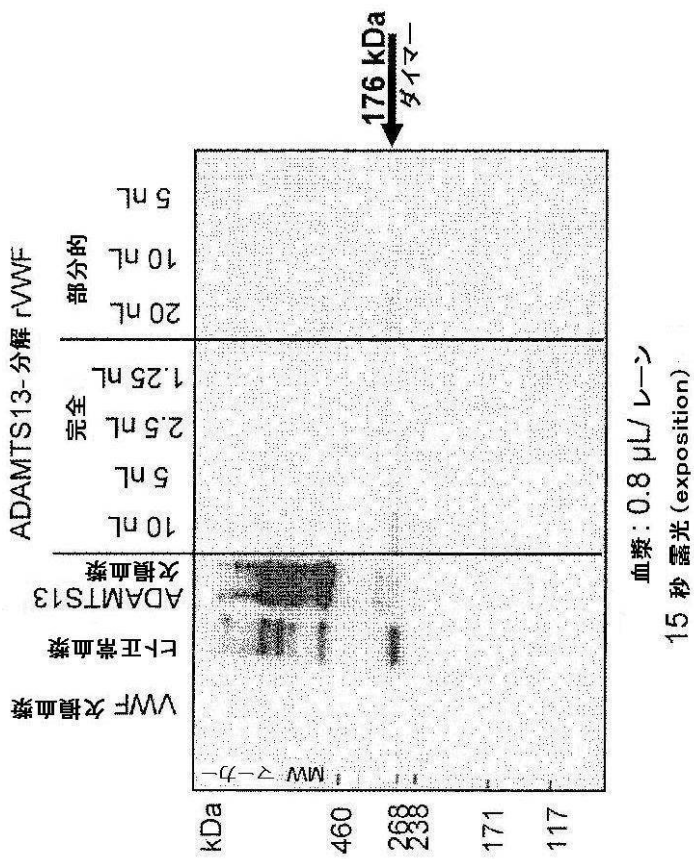


FIG. 13A

【 図 1 4 】

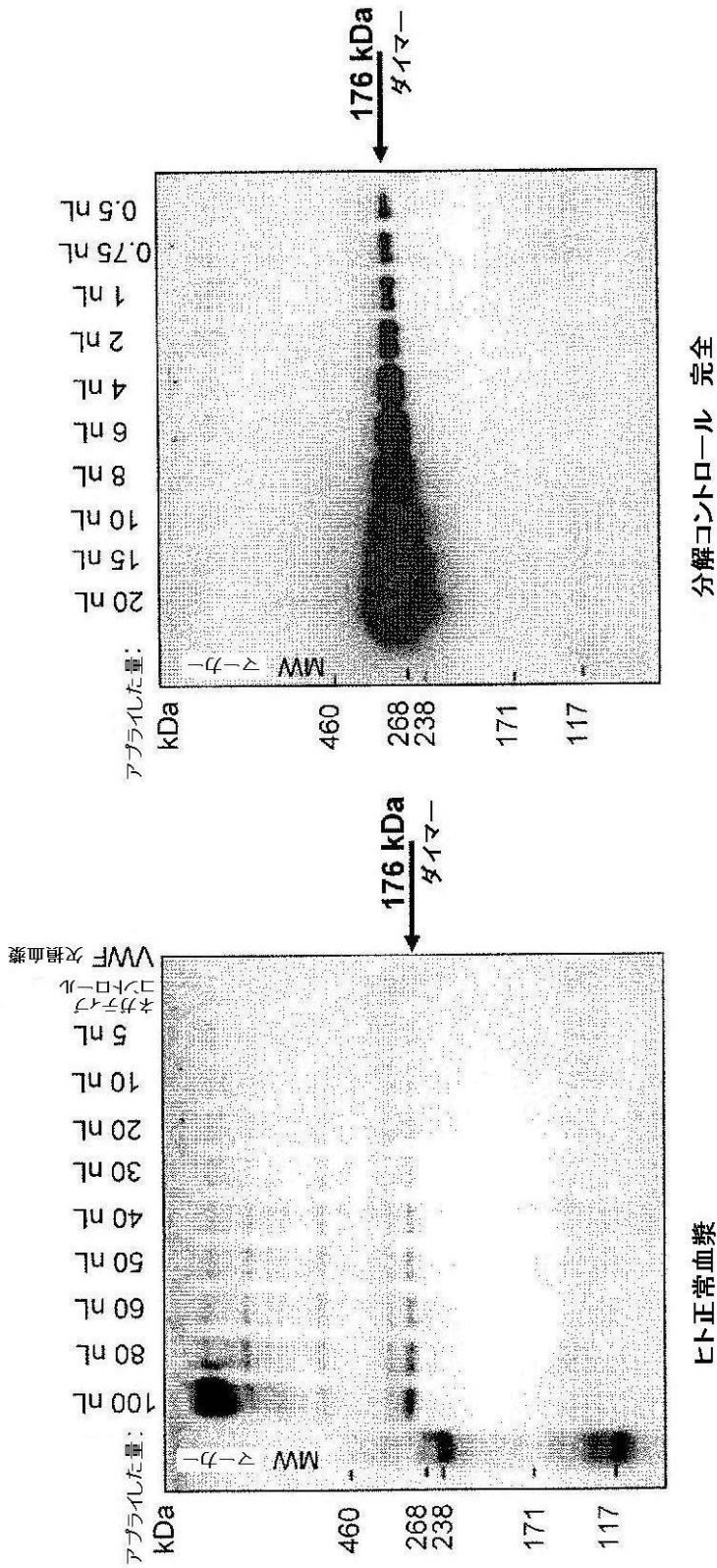


FIG. 14B

FIG. 14A

【 図 1 5 】

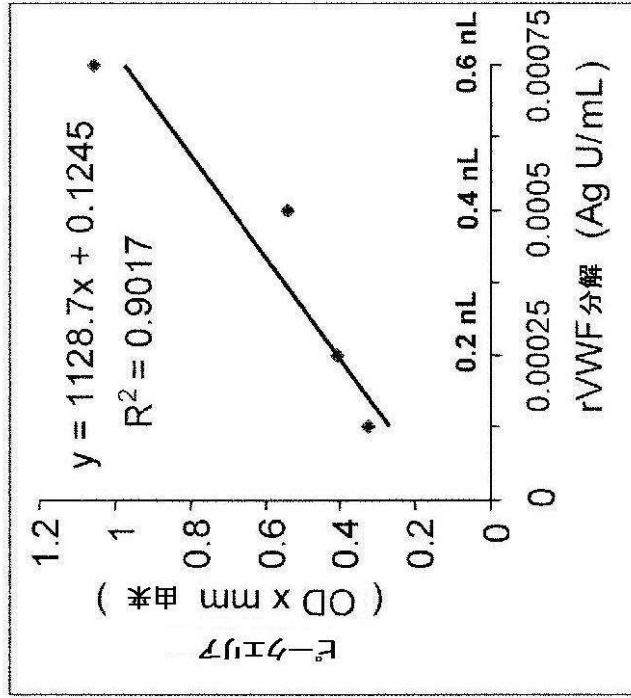
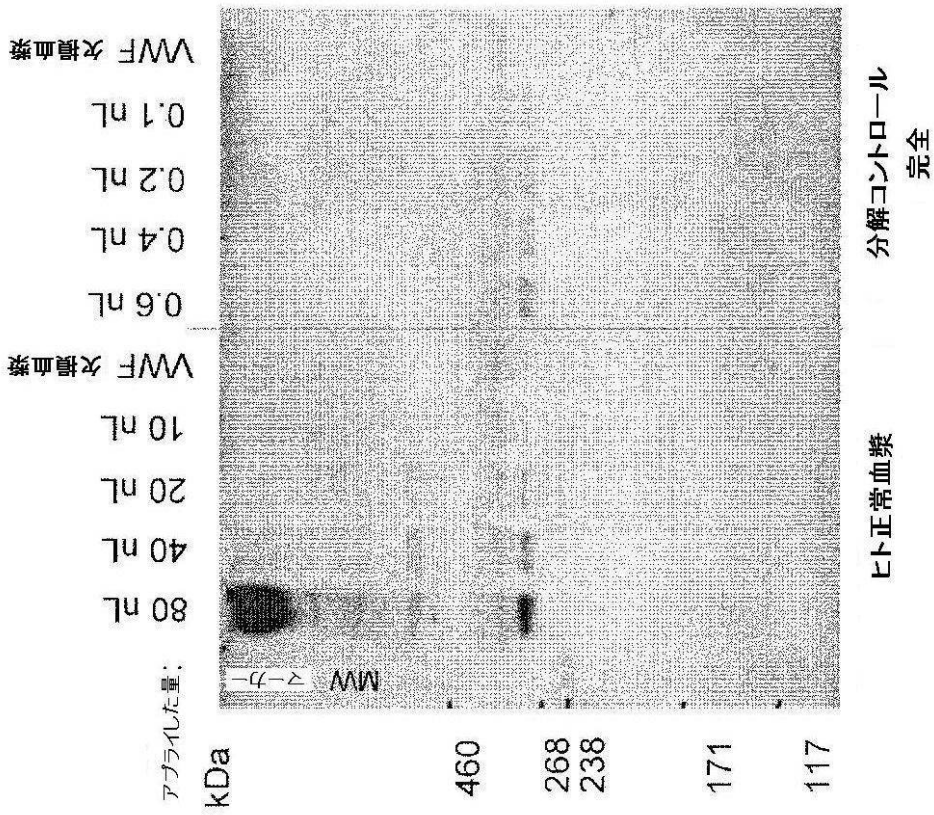


FIG. 15B

FIG. 15A

【図 16 A】

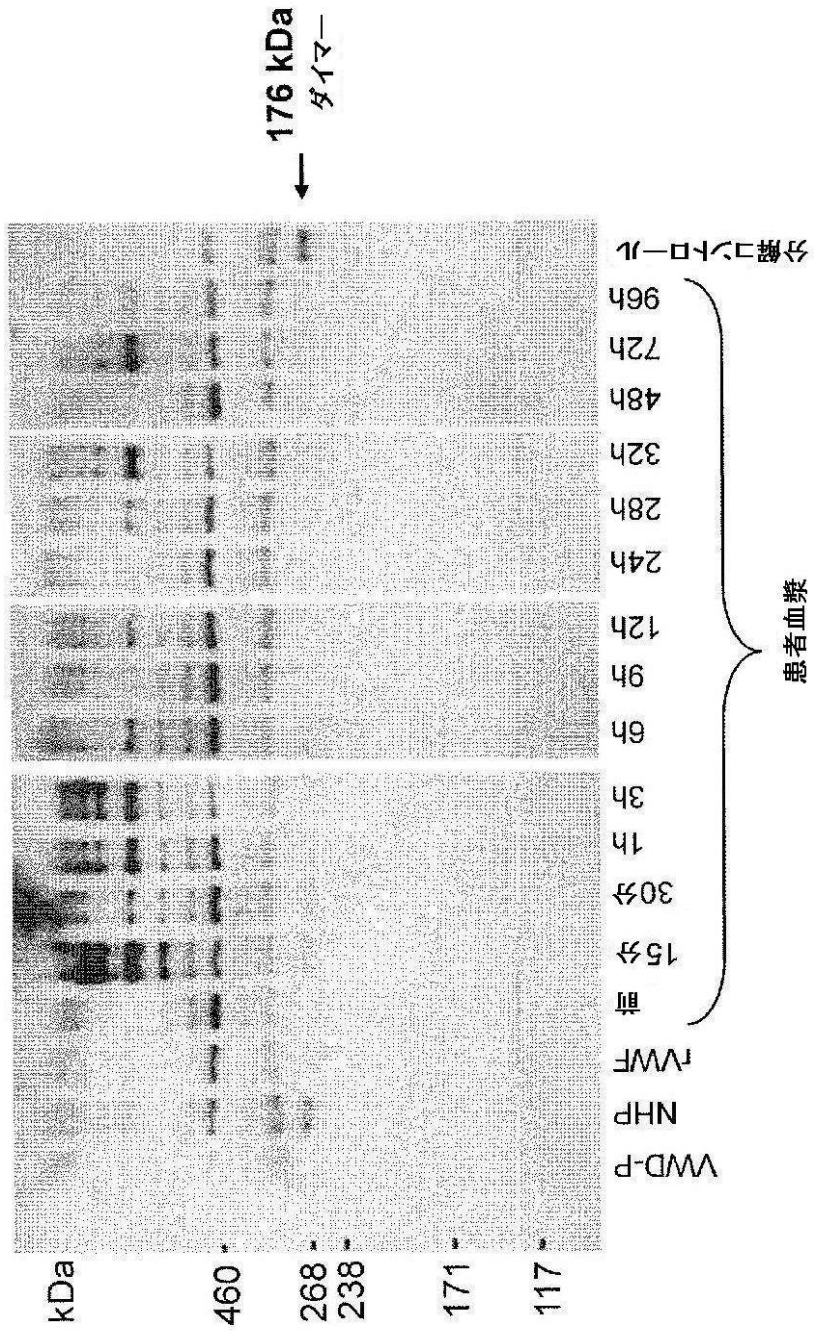


FIG. 16A

【図 16 B】

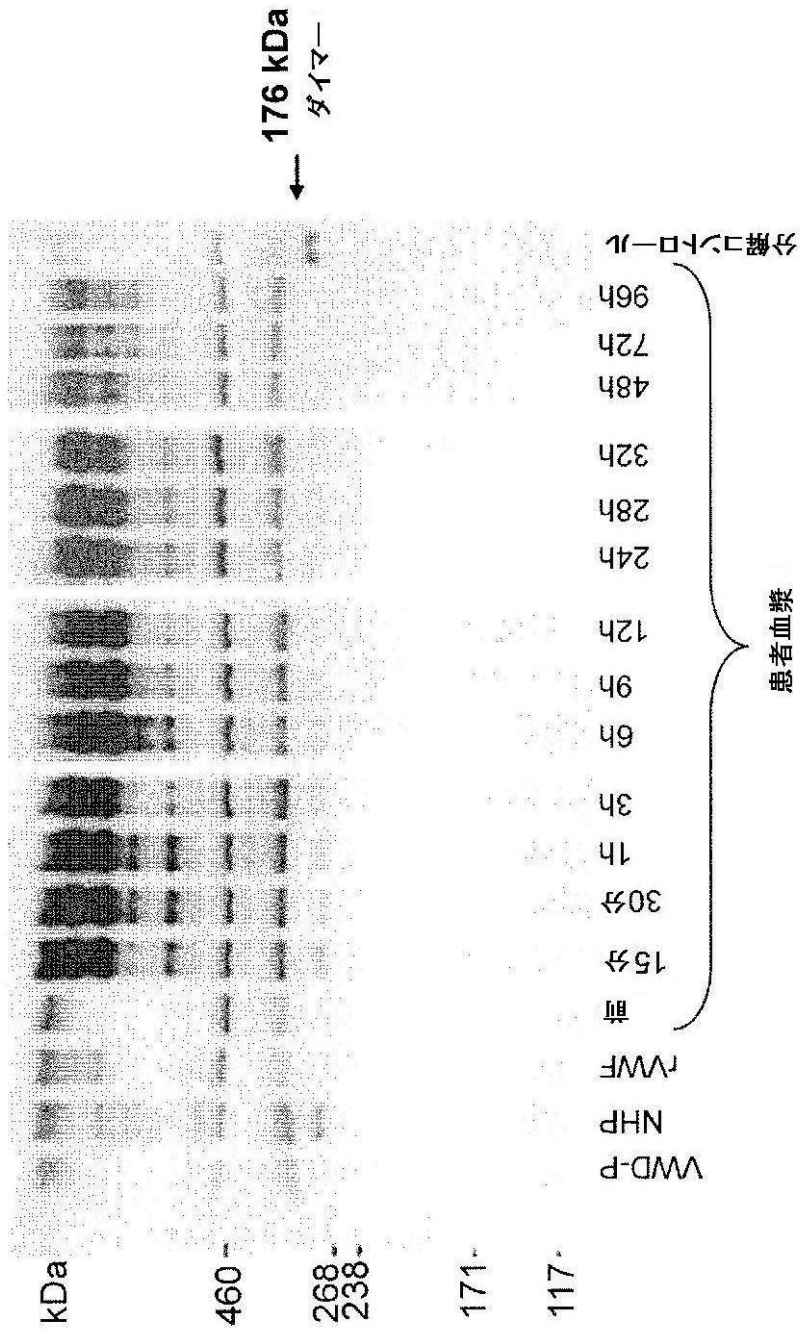


FIG. 16B

【 図 17 】

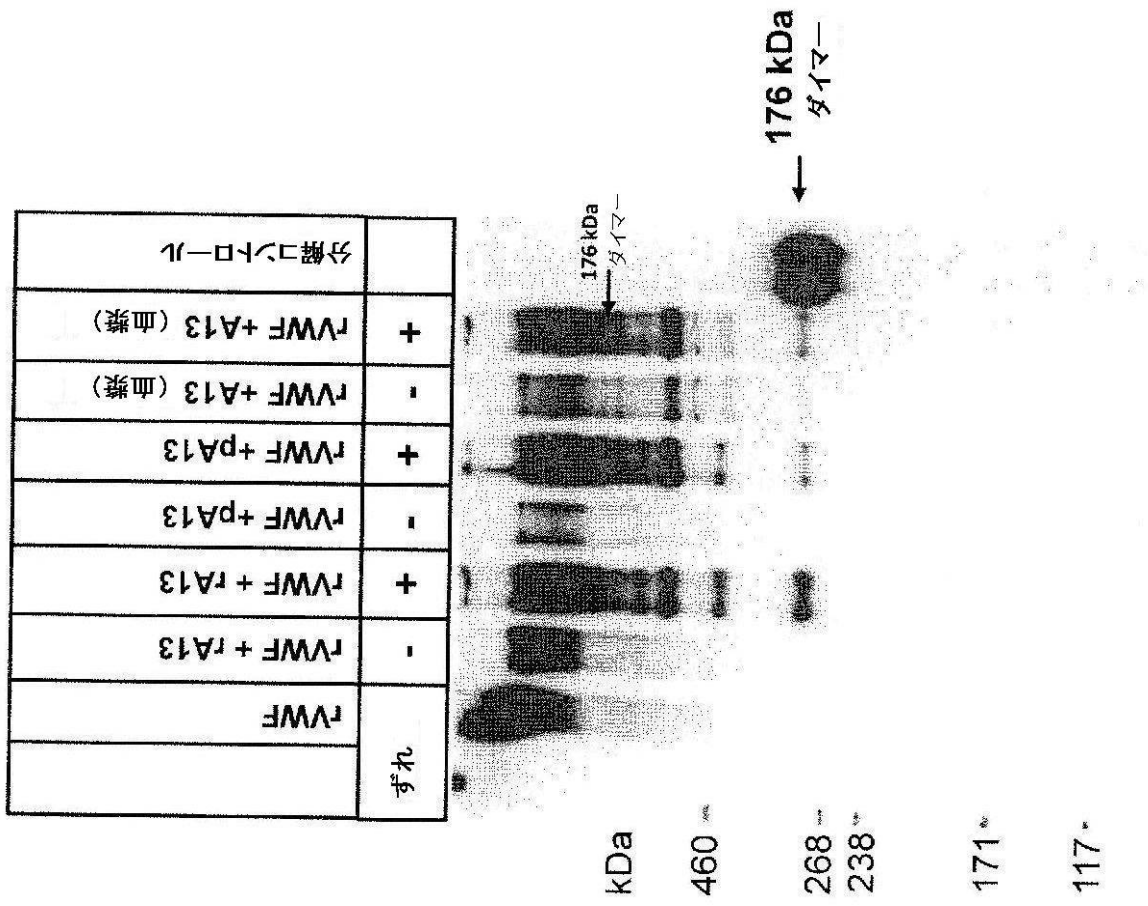


FIG. 17

【 図 1 8 】

マルチマ分析
高分解能

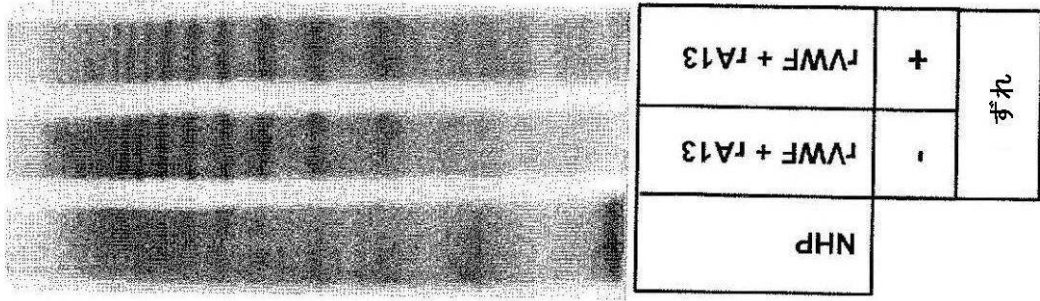


FIG. 18B

マルチマ分析
低分解能

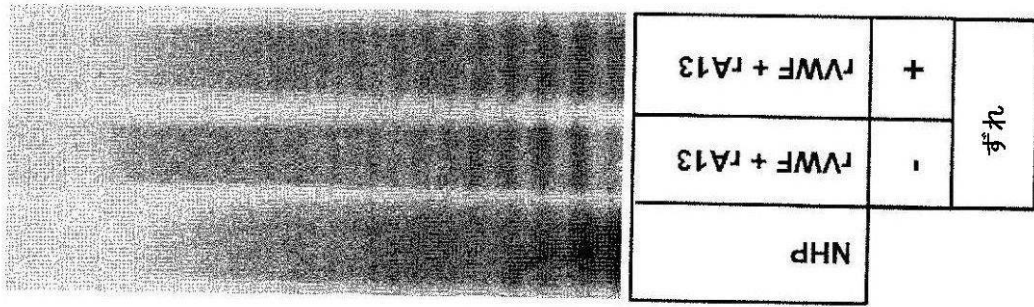


FIG. 18A

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/066588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/37		
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) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REITER RA ET AL: "Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin" BLOOD, vol. 101, no. 3, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 946-948, XP002570481	1-3,5-26
A	the whole document, particularly abstract, page 946 and figures 1,2 ----- -/-	4,27-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 25 February 2010		Date of mailing of the international search report 30/03/2010
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) 340-3015		Authorized officer Schmidt, Harald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/066588

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUCHIGAMI S ET AL: "Changes in plasma Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) levels in patients with unstable angina" THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, vol. 122, no. 5, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 618-623, XP023980624 ISSN: 0049-3848 [retrieved on 2008-03-04] abstract; figures 1-3	1-42
A	EP 1 988 174 A1 (MITSUBISHI KAGAKU IATRON INC [JP]; CHEMO SERO THERAPEUT RES INST [JP]) 5 November 2008 (2008-11-05) paragraph [0015]; figures 1-5	1-42
A	WO 03/016492 A2 (UNIV MICHIGAN [US]; GINSBURG DAVID [US]; LEVY GALLIA [US]; TSAI HAN-MO) 27 February 2003 (2003-02-27) claims 1-32	1-42
A	ARONSON DL ET AL: "ADAMTS13 proteolysis of von Willebrand factor: What is bite-sized" BLOOD, vol. 102, no. 11, 1999, 16 November 2003 (2003-11-16), pages 544A-545A, XP008119500 abstract	1-42
A	HABERICHTER SL ET AL: "Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival" BLOOD, vol. 108, no. 10, 15 November 2006 (2006-11-15), pages 3344-3351, XP002570482 page 3350; figure 2 abstract	1-42
A	JP 2007 248395 A (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST) 27 September 2007 (2007-09-27) abstract	1-42
A	US 2007/015703 A1 (WAGNER DENISA [US] ET AL) 18 January 2007 (2007-01-18) example 8	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2009/066588

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1988174	A1	05-11-2008	AU 2007210643 A1	09-08-2007
			CA 2641189 A1	09-08-2007
			CN 101374956 A	25-02-2009
			WO 2007088849 A1	09-08-2007
			KR 20080091185 A	09-10-2008
			US 2009004673 A1	01-01-2009
WO 03016492	A2	27-02-2003	AU 2002336367 A1	03-03-2003
			US 2003073116 A1	17-04-2003
			US 2006233784 A1	19-10-2006
			US 2006246589 A1	02-11-2006
			US 2009274683 A1	05-11-2009
			US 2009304672 A1	10-12-2009
JP 2007248395	A	27-09-2007	NONE	
US 2007015703	A1	18-01-2007	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 501453189

バクスター・ヘルス케어・ソシエテ・アノニム

BAXTER HEALTHCARE S.A.

スイス国 8152 グラットパーク (オブフィコン), サーガウアーシュトラッセ 130

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ファラディ, カタリン

オーストリア国 アー - 1230 ウィーン, オセロガッセ 1/6/2

(72)発明者 ロッテンシュタイナー, ハンスペーター

オーストリア国 アー - 1020 ウィーン, ハイトガッセ 10/17

(72)発明者 タレセク, ペーター

オーストリア国 アー - 3400 クロスターノイブルク, ヴァイトリンク, ハウプトシュ
トラッセ 59ゲ

(72)発明者 シュワルツ, ハンス - ペーター

オーストリア国 アー - 1180 ウィーン, ヴァイマーラー シュトラッセ 76

(72)発明者 シュライナー, ユッタ

オーストリア国 アー - 1170 ウィーン, フェルヘルガッセ 5-7/2/1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QR16 QR48 QS16 QS36 QX02

专利名称(译)	测量ADAMTS13介导的体内von Willebrand因子切割的方法及其用途		
公开(公告)号	JP2012510817A	公开(公告)日	2012-05-17
申请号	JP2011539696	申请日	2009-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	巴克斯特国际公司 巴克斯特医疗保健股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	巴克斯特国际公司 巴克斯特Herusukeya, 兴业ANONYME		
[标]发明人	ファラディカタリン ロッテンシュタイナーハンスペーター タレセクペーター シュワルツハンスペーター シュライナーユッタ		
发明人	ファラディ, カタリン ロッテンシュタイナー, ハンスペーター タレセク, ペーター シュワルツ, ハンス-ペーター シュライナー, ユッタ		
IPC分类号	C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C12Q1/37 C12Q1/56 G01N2333/755 G01N2800/224 C12Q1/00 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/573 G01N33/86 G01N2333/96486 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/37 G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/543.575		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QS16 4B063/ /QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/120202 2008-12-05 US		
其他公开文献	JP6111016B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及测量裂解的von Willebrand因子 (VWF) 片段的方法。更具体地, 本发明涉及测量解联蛋白和金属蛋白酶与血小板反应蛋白1型基序, 成员13 (ADAMTS13) 在体内切割VWF的能力的方法。本发明还涉及使用各种动物模型的方法, 所述动物模型证明ADAMTS13活性与人类相似。本发明还涉及测量哺乳动物, 特别是人和人血浆中rVWF的裂解产物的方法。

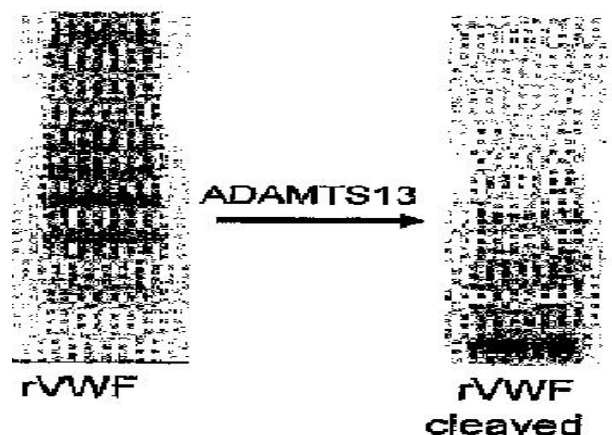


FIG. 1B