

(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2011-526681

(P2011-526681A)

(43) 公表日 平成23年10月13日(2011.10.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	2 GO 4 5
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 K	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V	
	GO 1 N 21/64 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2011-515442 (P2011-515442)
 (86) (22) 出願日 平成21年6月30日 (2009. 6. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年2月16日 (2011. 2. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/058220
 (87) 国際公開番号 W02010/000756
 (87) 国際公開日 平成22年1月7日 (2010. 1. 7)
 (31) 優先権主張番号 08305361. 1
 (32) 優先日 平成20年6月30日 (2008. 6. 30)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 09305116. 7
 (32) 優先日 平成21年2月9日 (2009. 2. 9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 500025477
 アンステイテュ、ナショナル、ド、ラ、サ
 ント、エ、ド、ラ、ルシエルシュ、メディ
 カル (アンセルム)
 INSTITUT NATIONAL D
 E LA SANTE ET DE LA
 RECHERCHE MEDIC
 AL (INSERM)
 フランス国パリ、リュ ド トルビアク、
 101
 (74) 代理人 100089118
 弁理士 酒井 宏明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分断CD31の検出、アテローム性血栓症および自己免疫障害の診断、ならびにシグナル伝達経路を解析するための方法

(57) 【要約】

【課題】 CD31の生物学的機能をより良く理解することにより、血栓障害および自己免疫障害等のT細胞活性化に関連付けられる疾患の診断のためのより良好なツールの提供を可能にすること

【解決手段】 本発明は、血液白血球上に存在するCD31タンパク質の細胞外ドメインが分断され、かつ可溶性形態のCD31として循環中に放出されるという知見に起因する。分断CD31を検出するための方法が、さらに開示される。したがって、本発明は、CD31等の膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出するための方法、および診断ツールとしてのこのような方法の使用に関する。本発明はさらに、候補タンパク質が分子複合体の一部であるかどうかを決定するための方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的サンプルにおいて、膜貫通タンパク質の可溶性形態のなかから、該膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出するための方法であって、該可溶性形態が、該膜貫通タンパク質の可溶性スプライズバリエーションを含み、かつ該分断された外部ドメインを任意に含むものであり、該方法が、以下の工程：

a) 該分断された外部ドメインおよび該スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体（第 1 の識別抗体）に連結している第 1 の型のビーズを提供すること；

b) 該分断された外部ドメインに存在し、かつ該スプライズバリエーションに存在しないか、または該スプライズバリエーションに存在し、かつ該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体（第 2 の識別抗体）に連結している少なくとも 1 つの第 2 の型のビーズを提供すること；

c) 該分断された外部ドメインおよび該スプライズバリエーションの双方に存在する領域に特異的に結合する蛍光標識リガンド（シグナル伝達リガンド）を提供すること；

d) 該抗体を、該膜貫通タンパク質の該可溶性形態を含有すると思われる生物学的サンプルに接触させること；

e) 各々の型のビーズについて、該蛍光標識で得られるシグナルを、フローサイトメトリーにより測定すること；ならびに

f) 各々の型のビーズについて得られたシグナルを比較すること；

を含み、

工程（e）で測定されたシグナルにおける差異は、生物学的サンプルが該分断された外部ドメインを含むことを示す、方法。

【請求項 2】

生物学的サンプルにおいて、膜貫通タンパク質の可溶性形態のなかから、該膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出するための方法であって、該可溶性形態が、該膜貫通タンパク質の可溶性スプライズバリエーションを含み、かつ該分断された外部ドメインを任意に含むものであり、該方法が、以下の工程：

a) 該分断された外部ドメインおよび該スプライズバリエーションの双方に存在する領域に特異的に結合するリガンド（補足リガンド）に連結しているビーズを提供すること；

b) 該分断された外部ドメインおよび該スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する第 1 の型の蛍光標識抗体（第 1 の識別抗体）を提供すること；

c) 該分断された外部ドメインに存在し、かつ該スプライズバリエーションに存在しないか、または該スプライズバリエーションに存在し、かつ該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する少なくとも 1 つの第 2 の型の蛍光標識抗体（第 2 の識別抗体）を提供すること；

d) 該抗体を、該膜貫通タンパク質の該可溶性形態を含有すると思われる生物学的サンプルに接触させること；

e) 各々の蛍光標識について、該蛍光標識で得られるシグナルを、フローサイトメトリーにより測定すること；ならびに

f) 各々の蛍光標識について得られたシグナルを比較すること；

を含み、

工程（e）で測定されたシグナルにおける差異は、生物学的サンプルが該分断された外部ドメインを含むことを示す、方法。

【請求項 3】

以下である、請求項 1 または 2 記載の方法：

i) 該可溶性形態が、少なくとも 3 つの可溶性形態を含む；

i i) 識別抗体が、該可溶性形態間を識別するような様式で選択される；ならびに

i i i) 補足リガンドまたはシグナル伝達リガンドが、全ての該可溶性形態に存在する領

10

20

30

40

50

域に特異的に結合する。

【請求項 4】

該補足リガンドまたはシグナル伝達リガンドが抗体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

該分断された外部ドメインに対応する該可溶性形態の百分率および / または量を算出する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

可溶性形態に対する分断された外部ドメインの比率、または可溶性形態に対する可溶性スプライスパリアントの比率のいずれかを算出する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 7】

該膜貫通タンパク質が CD 3 1 である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

該膜貫通タンパク質が糖タンパク質 V I (G P V I) である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

第 1 の識別抗体が、CD 3 1 の第 1 の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合し、第 2 の識別抗体が、CD 3 1 の第 6 の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する、請求項 7 記載の方法。

20

【請求項 10】

識別抗体が、CD 3 1 の第 5 の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体をさらに含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

該生物学的サンプルが、血栓障害または自己免疫障害に罹患している、または罹患する危険性がある個体から得られる血漿である、請求項 7、9 および 10 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

個体が血栓障害または自己免疫障害に罹患しているかどうか、または罹患する危険性があるかどうかを診断するための方法であって、該方法は、該個体の生物学的サンプルにおいて、CD 3 1 の分断された外部ドメインを検出する工程を含み、CD 3 1 の該分断された外部ドメインの存在は、該個体が該血栓障害または自己免疫障害に罹患している、または罹患する危険性があることを示す、方法。

30

【請求項 13】

該個体における該障害の進行をモニターするために、および / または該個体における該障害の重篤性を評価するために、ならびに / あるいは薬物に対する該個体の応答性をモニターするために、CD 3 1 の分断された外部ドメインを検出する該工程が、少なくとも 2 つの異なる時点で繰り返される、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

薬物に対する患者の応答をモニターするための方法であって、該方法が以下の工程を含む、方法：

40

a) 該薬物による該患者の処置の開始前および後の該患者の生物学的サンプルにおいて CD 3 1 の分断された外部ドメインを検出すること；

b) 工程 (a) で検出された CD 3 1 の分断された外部ドメインのレベルを比較すること；ならびに、必要に応じて

c) CD 3 1 の分断された外部ドメインの該レベルにおける差異を、該患者を治療するため、薬物の有効性と相関付けること。

【請求項 15】

CD 3 1 の分断された外部ドメインを検出する該工程が、請求項 7 および 9 ~ 11 のいずれか一項に規定される方法にしたがって行なわれる、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項

50

記載の方法。

【請求項 16】

以下を含む、診断キット：

i) 膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインおよび該膜貫通タンパク質の可溶性スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結している第1の型のビーズ；

ii) 該分断された外部ドメインに存在し、かつ該可溶性スプライズバリエーションに存在しないか、または該可溶性スプライズバリエーションに存在し、かつ該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結している第2の型のビーズ；ならびに

iii) 該分断された外部ドメインおよび可溶性該スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する蛍光標識抗体。

10

【請求項 17】

以下を含む、診断キット：

i) 膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインおよび該膜貫通タンパク質の可溶性スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結しているビーズ；

ii) 該分断された外部ドメインに存在し、かつ該可溶性スプライズバリエーションに存在しないか、または該可溶性スプライズバリエーションに存在し、かつ該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する第1の型の蛍光標識抗体；ならびに

iii) 該分断された外部ドメインおよび可溶性該スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する第2の型の蛍光標識抗体。

20

【請求項 18】

候補分子が分子複合体のメンバーであるかどうかを決定するための方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 該分子複合体のメンバーに特異的に結合する抗体に連結しているビーズを提供すること；

b) 該ビーズを、該分子複合体を含有する生物学的サンプルに接触させること；

c) 生物学的サンプルに接触された該ビーズを、該候補分子に特異的に結合する少なくとも1つの型の蛍光標識抗体に接触させること；ならびに

d) 蛍光をフローサイトメトリーにより検出すること；

を含み、

工程(d)でのシグナルの検出は、該候補分子が該分子複合体のメンバーであることを示し；および

1つよりも多くの型の蛍光標識抗体が工程(c)で用いられる場合、該抗体は、異なる蛍光標識で標識されている、方法。

30

【請求項 19】

分子複合体を解析するためのキットであって、該方法は、以下：

i) 該分子複合体のメンバーに特異的に結合する抗体に連結しているビーズ；および

ii) 該分子複合体のメンバーであると思われる分子に特異的に結合する少なくとも1つの型の蛍光標識抗体；

を含み、

キットが1つよりも多くの蛍光標識抗体を含む場合、該抗体は、異なる蛍光標識で標識されている、方法。

40

【請求項 20】

分子複合体の該メンバーがCD31である、請求項18の方法または請求項19のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

(発明の分野)

本発明は、血液白血球上に存在するCD31タンパク質の細胞外ドメインが分断され、かつ可溶性形態のCD31として循環中に放出されるという知見に起因する。分断CD31を検出するための方法が、さらに開示される。したがって、本発明は、CD31等の膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出するための方法、および診断ツールとしてのこのような方法の使用に関する。本発明はさらに、候補タンパク質が分子複合体の一部であるかどうかを決定するための方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

CD31 (PECAM-1)

免疫応答は、血管接触面の細胞に排他的かつ構成的に発現している阻害性免疫レセプター、なかでもCD31 (PECAM-1)により制御され得る。

【0003】

CD31は、6個のIg様細胞外ドメイン、短い膜貫通セグメントおよび2個の免疫チロシンベースの阻害性モチーフ (Immunotyrosine-based Inhibitory Motif: ITIM) を含有する細胞質テイルを含む単鎖分子からなる。CD31の構造を、以下の表に示す。

【0004】

【表A】

ドメイン	配列番号1に対する位置
シグナルペプチド	1~27
細胞外ドメイン	28~601
第1のIg様細胞外ドメイン	34~121
第2のIg様細胞外ドメイン	145~233
第3のIg様細胞外ドメイン	236~315
第4のIg様細胞外ドメイン	328~401
第5のIg様細胞外ドメイン	424~493
第6のIg様細胞外ドメイン	499~591
膜近傍ドメイン	592~601
膜貫通ドメイン	602~620
細胞質ドメイン	621~738

【0005】

CD31の結果として生じる推定免疫調節特性は、CD31シグナル伝達が血液白血球の相互反発を誘起し、かつ自然および獲得免疫細胞の双方の阻害性シグナルと刺激性シグナルとの間の平衡を調節するという事実により支持される。CD31の遠位Ig様細胞外ドメインの機械的な係合 (engagement) は、そのITIMのリン酸化により誘発される外側から内側への阻害性シグナル伝達、ならびにSH2含有ホスファターゼの動員および活性化を誘導する。

【0006】

Zehnderら (非特許文献1) は、特異的かつ用量依存的な様式において混合リンパ球反応 (MLR) を阻害するCD31抗体を同定した。彼らはさらに、この抗体のエピトープ (即ち、CD31の23個の膜近位アミノ酸) に対応するCD31ペプチドがMLRを強力に阻害することを見出した。彼らは、CD31の23個の膜近位アミノ酸が機能的に重要な領域であり、そしてCD31ペプチドが結合性エピトープについて競合するこ

10

20

30

40

50

とによりリンパ球活性化に干渉すると仮定した。しかしながら、Zehnderらは、CD31媒介シグナル伝達がCD31ペプチドにより活性化されるかまたは阻害されるかを教示し得なかった。

【0007】

Chenら(非特許文献2)は、移植片対宿主病(GVHD)のマウスモデルにおいて、このペプチドがこの疾患の発症を遅延させ、かつ長期生存を向上させることを示した。彼らは、CD31ペプチドがT細胞活性化における通常の経路を阻害すると仮定した。また、Chenらは、T細胞活性化においてCD31ペプチドにより果たされる役割を解明し得なかった。特に、これらの従来の研究は、CD31シグナル伝達カスケードに対する、より正確には、CD31 ITIMのリン酸化状態に対するこのペプチドの推定効果を評価しなかった。

10

【0008】

依然として未知の機構によって、CD31は、所定の循環リンパ球上で「消失」している。その消失は、リンパ球の活性化の際に観察されており、そして、リンパ球のCD31シグナル伝達の非存在が、次いで、アテローム性血栓症の発症に關与する病的免疫応答を高めることが最近示されている。

【0009】

膜貫通セグメントを欠損するバリエーション転写物に起因する可溶性形態のCD31もまた、報告されており、したがって、循環CD31の個々の量は、遺伝的に決定されると現在では考えられている。結果として、多数の従来の研究は、可溶性CD31の血漿レベルとアテローム性血栓症または他の自己免疫疾患の危険性との間の相関性を見出すことを試みていた。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Zehnderら, 1995, Blood, 85(5): 1282 - 8

【非特許文献2】Chenら, 1997, Blood, 89(4): 1452 - 9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、解析された特定の遺伝的多型とは無関係に、データは、広範な範囲の血漿CD31値を示し、これらの異なる研究の結果は、相反していた。

30

【0012】

したがって、CD31の生物学的機能をより良く理解する必要性が存在する。これは、血栓障害および自己免疫障害等のT細胞活性化に關連付けられる疾患の診断のためのより良好なツールの提供を可能にする。

【0013】

シグナル伝達経路を解析するための方法

3つの異なるアッセイが、シグナル伝達経路を解析するために、現在のところ利用可能である：共免疫沈降、続いてウエスタンブロット(共IP/WB)、シグナル伝達ELISAアッセイの細胞活性化(CASE)およびCBA Flexセット(BD)アッセイ。

40

【0014】

共IP/WBアッセイでは、細胞を溶解し、先ずタンパク質抽出を行う。次いで、研究用タンパク質を、会合するタンパク質と共免疫沈降させ、2D電気泳動を行う。最後に、ウエスタンブロット後に得られた膜を、標識抗体とハイブリダイズさせ、シグナルを検出する。したがって、それは、時間を浪費するアッセイである。膜を脱ハイブリダイズさせ、かつ別の標識抗体で再ハイブリダイズさせてもよいが、4回を超えるべきでない。したがって、4つのパラメータのみを、単一のサンプル/膜で解析してもよい。また、共IP/WBアッセイは定性的であるが、定量的アッセイではない。最後に、当業者は、リン酸

50

化状態において研究用タンパク質と会合したタンパク質を、未リン酸化状態において研究用タンパク質に会合したものと比較することを望む場合には、2つの別々の共IP/WBアッセイを行わなければならない。

【0015】

CASE (スーパーアレイ) および PhosphorFlow (BD) アッセイは、共IP/WBアッセイよりも、単純かつ迅速である。なぜならば、標識抗体は、溶解細胞ではなく、透過処理細胞を含むサンプルに添加されるためである。また、如何なるプロットイングも必要とされない。抗体を、蛍光団 (PhosphorFlow) で標識するか、または酵素を介して検出し (CASE)、その活性を容易に測定することができる。しかしながら、これらのアッセイは、単一のサンプルで多くのパラメータを解析することを依然として可能にしない。なぜならば、限定された数の酵素のみが利用可能なためである。また、両アッセイは、共IP/WBアッセイよりもはるかに特異的ではない。なぜならば、研究用分子は補足されず、したがって、シグナル伝達経路の異なる分子間の相互作用を決定することができないためである。PhosphorFlow および CASE アッセイは、所定のシグナル伝達経路のうちどの分子が細胞に存在するか、または細胞中のリン酸化状態に存在するかを決定することを可能にするのみである。

10

【0016】

CBA Flex セット (BD) アッセイは、複数のシグナル伝達分子の同時決定を可能にするが、分子複合体の解析を可能にし得ず、したがって、特定のレセプター依存性シグナル伝達カスケードの決定は、不可能である。

20

【0017】

したがって、共IP/WB、PhosphorFlow/CASE および CBA Flex セットのそれぞれの利点を組み合わせる、シグナル伝達経路を解析するための改善された方法の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0018】

(発明の説明)

この状況において、驚くべきことに、活性化/記憶Tリンパ球上のCD31の推測された消失が、実際には不完全であり、そして第5の細胞外Ig様ドメインと第6の細胞外Ig様ドメインとの間でのCD31の分断から生じることが見出された。次いで、CD31の分断された細胞外ドメイン(「分断CD31 (shed CD31)」)とさらに称する)は、循環中に放出され、そこで、それはCD31の可溶性スプライスバリエーションと共に存在する。

30

【0019】

また、アテローム性血栓症の高い危険性が、循環中における分断CD31の増加およびスプライスバリエーションCD31の減少と関連付けられること、ならびに循環CD31の全体レベルと関連付けられないことが示された。

【0020】

この知見は、強力な診断ツールの提供につながる。実際、これまでに市販されていた試験は、CD31ドメイン1~5に対する抗体の使用を介して血漿CD31を検出していたので、それらは、CD31の可溶性スプライスバリエーション(6個全ての細胞外Ig様ドメインを含有する)と、CD31の分断形態(ドメイン1~5のみを含有する)との間を区別できなかった。一方、本明細書中に記載されるサブトラクティブ方法は、可溶性CD31の2つの形態間を区別することを可能にし、生物学的サンプル中におけるそれらの各々の割合を正確に定量する。

40

【0021】

さらに、このサブトラクティブ方法が、CD31以外の膜貫通タンパク質の可溶性形態を解析するために、ならびに分子複合体およびシグナル伝達経路を解析するために(例、シグナル伝達経路が活性化されるか、またはそうではないか、ならびに/あるいは候補タンパク質が分子複合体の一部であるかどうかを決定するために)適応できることが見出さ

50

れた。

【0022】

したがって、本発明は、本明細書中にさらに記載されるように、膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出および/または定量するための方法、個体が血栓障害または自己免疫障害に罹患しているかどうかを診断するための方法、診断キット、シグナル伝達経路が活性化されるかどうかを決定するための方法、ならびに候補分子が分子複合体の一部であるかどうかを決定するための方法を提供する。

【0023】

本発明の方法は、ELISAによる可溶性形態の検出等の先行技術の方法と比較して、多くの利点を有する。まず、それらは、無制限に繰り返すことができる。実際、各ビーズは、個体の試験単位を示し、得られたビーズの数は、繰返し数に対応する。ELISA試験は、通常、2連または3連で行われる。しかしながら、本発明の方法により、少なくとも300個の複製物（即ち、細胞測定ビーズ）を同時に得ることができる。第2に、本発明の方法は、時間を浪費しない。なぜならば、それらは、約30分で行うことができるためである。第3に、必要とされる出発材料（例、生物学的サンプル）の量が非常に少ない（約5 μ g）。第4に、幾つかの異なる可溶性形態を、同じ生物学的サンプルにおいて同時に検出することができる。最後に、本発明の方法は、比色測定方法に対する蛍光方法により可能にされる広域範囲に起因して、ELISAよりも感度が良い。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、健常ドナーからのヒト末梢血細胞の10色フローサイトメトリー解析の代表的な例を示す。抗体である抗CD31_{dom1}および抗CD31_{dom6}のアイソタイプコントロールを、挿入図中に示す。リンパ球、単球および顆粒球を、FSC/SSC散乱内でゲートした。B（CD20⁺A700⁺）およびT（CD3⁺PE-TR⁺）リンパ球を同定し、「リンパ球」内にゲートし、CD8⁺（PerCP）およびCD4⁺（APC）亜集団を、Tリンパ球内にゲートした。CD8⁺およびCD4⁺T細胞を、HLA-DRおよびCD45RAの発現についてさらに解析し、それにより活性化（1）、記憶（2）およびナイーブ（3）細胞に細分割した。全ての白血球は、CD31_{dom6}について陽性であった。dom1の欠損は、ナイーブ（3）から記憶（2）から活性化（1）T細胞へと増加した。

【図2a】図2aは、リンパ球上のCD31の見かけ上の消失がその細胞外分断に起因することを示す。可溶化された細胞膜結合CD31分子を、培養Jurkat CD4⁺T細胞から抽出し、蛍光ビーズにカップリングした。dom1ビーズ結合分子の百分率は、休止状態では6%未満であり、TCR係合5'後では99%を超えている。

【図2b】図2bは、リンパ球上のCD31の見かけ上の消失がその細胞外分断に起因することを示す。TCR活性化T細胞の培養上清（ ）中、およびヒト血漿（ ）中の殆どの可溶性CD31は、dom1~dom5を含み、かつdom6を欠損する単一の短縮型フラグメントからなる。dom5およびdom6の双方を欠損する、無視し得るレベルの短縮型CD31が、血漿中でのみ検出できた。

【図3a】図3aは、CD31^{shed}T上の残留細胞外フラグメントの同型のペプチドがCD31-ITIMリン酸化を誘導することを示す。漸増用量のCD31ペプチド551~574の存在下におけるヒト末梢血単核細胞のTCR係合に対する増殖応答。* p < 0.05 vs 用量「0」。

【図3b】図3bは、CD31^{shed}T上の残留細胞外フラグメントの同型のペプチドがCD31-ITIMリン酸化を誘導することを示す。培養Jurkat CD4⁺T細胞からの可溶化された膜結合CD31に対する686ITIMリン酸化のフローサイトメトリー評価。可溶化されたタンパク質を、E9-PECAM-1.2（dom6）機能的CBAビーズにより補足し、検出を、抗pY686ウサギ血清、続いてAlexaFluor（登録商標）488-抗ウサギ二次抗体により行った。柱状図は、2000 E9-PECAM-1.2獲得ビーズに対するAlexafluor（登録商標）488（pY

10

20

30

40

50

686)の中央蛍光強度(MFI)±変動係数(CV%)の%を示す。Per van = 陽性コントロール(ペルバナデート: per van adate); CD3/CD28 = 抗CD3および抗CD28抗体(各1 μ g/ml); ペプチド = CD31ペプチド551~574(100 μ M)。

【図4】図4は、本発明の方法の原理を説明する。

【図5】図5は、本発明の方法の原理を説明する。黒囲いが識別用抗体を表す。白囲いが補足またはシグナル伝達抗体を表す。

【図6a】図6aは、分断CD31が炎症疾患に対する診断および/または予後マーカーとして使用できることを示す。白囲いは、不良な予後の患者を示し、黒囲いは、良好な予後の患者を示す。「VS」は、赤血球の沈降速度を示す。「CRP」は、C反応性タンパク質を示す。「sCD31全体」は、本発明の方法で測定された、CD31の可溶性形態の全体レベルを示す。「sCD31^{cliv}e」は、本発明の方法で測定された、CD31の分断された外部ドメインを示す。

【図6b】図6bは、本発明の方法がGPVIの分断された外部ドメインを測定するために使用できることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

分断された外部ドメインの検出

タンパク質の異なる可溶性アイソフォーム間の鑑別を可能にする方法が、開発された。この方法は、細胞測定ビーズで標識された抗体および蛍光標識抗体の同時使用に基づく。次いで、標識抗体は、フローサイトメトリーにより検出される。簡潔には、可溶性アイソフォームを含むサンプルは、解析されるべき全ての可溶性アイソフォームに結合する第1の標識抗体(「補足抗体」または「シグナル伝達抗体」と称する)と接触される。サンプルはまた、幾つかの可溶性アイソフォームのみに結合する標識「識別抗体」と接触される。次いで、サンプルは、フローサイトメトリーにより解析され、当該サンプル中のアイソフォームの各々の割合が、算出される。

【0026】

したがって、本発明は、生物学的サンプルにおいて、膜貫通タンパク質の可溶性形態のなかから、当該膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出するための方法を提供する。ここで、当該可溶性形態は、当該膜貫通タンパク質の可溶性スプライズバリエーションを含み、かつ当該分断された外部ドメインを任意に含む。この方法は、以下の工程を含む：

a) 当該分断された外部ドメインおよび当該スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結している第1の型のビーズを提供すること；

b) 当該分断された外部ドメインに存在し、かつ当該スプライズバリエーションに存在しないか、または当該スプライズバリエーションに存在し、かつ当該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結している少なくとも第2の型のビーズを提供すること；

c) 当該分断された外部ドメインおよび当該スプライズバリエーションの双方に存在する領域に特異的に結合する蛍光標識リガンドを提供すること；

d) 当該抗体を、当該膜貫通タンパク質の当該可溶性形態を含有すると思われる生物学的サンプルに接触させること；

e) 各々の型のビーズについて、当該蛍光標識で得られるシグナルを、フローサイトメトリーにより測定すること；ならびに

f) 各々の型のビーズについて得られたシグナルを比較すること。

ここで、工程(e)で測定されたシグナルにおける差異は、生物学的サンプルが当該分断された外部ドメインを含むことを示す。好ましい実施形態では、まず、生物学的サンプルは、ビーズ連結抗体と接触され、次いで、ビーズは、回収され、蛍光標識リガンドと接触される。

10

20

30

40

50

【0027】

上記方法では、分断された外部ドメインは、シグナル伝達リガンドとして、1つの単一の蛍光標識リガンド、および識別抗体として、少なくとも2つの型のビーズ連結抗体を用いて検出される。

【0028】

あるいは、分断された外部ドメインは、補足リガンドとして、1つの型のビーズ連結リガンド、および識別抗体として、少なくとも2つの蛍光標識抗体を用いて検出されてもよい。

【0029】

生物学的サンプルにおいて、膜貫通タンパク質の可溶性形態のなかから、当該膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出するためのこのような方法（ここで、当該可溶性形態は、当該膜貫通タンパク質の可溶性スプライズバリエーションを含み、かつ当該分断された外部ドメインを任意に含む）は、以下の工程を含む：

a) 当該分断された外部ドメインおよび当該スプライズバリエーションの双方に存在する領域に特異的に結合するリガンドに連結しているビーズを提供すること；

b) 当該分断された外部ドメインおよび当該スプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する第1の型の蛍光標識抗体を提供すること；

c) 当該分断された外部ドメインに存在し、かつ当該スプライズバリエーションに存在しないか、または当該スプライズバリエーションに存在し、かつ当該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する少なくとも第2の型の蛍光標識抗体を提供すること；

d) 当該抗体を、当該膜貫通タンパク質の当該可溶性形態を含有すると思われる生物学的サンプルに接触させること；

e) 各々の蛍光標識抗体について、当該蛍光標識で得られるシグナルを、フローサイトメトリーにより測定すること；ならびに

f) 各々の蛍光標識抗体について得られたシグナルを比較すること。

ここで、工程（e）で測定されたシグナルにおける差異は、生物学的サンプルが当該分断された外部ドメインを含むことを示す。この方法では、各々の型の蛍光標識抗体は、異なる標識で標識される。したがって、第2の型の蛍光標識抗体の標識は、第1の型の蛍光標識抗体の標識とは異なる。この方法の枠組みでは、ビーズは、好ましくは、蛍光標識されていない。好ましい実施形態では、先ず、生物学的サンプルは、ビーズ連結リガンドと接触され、次いで、ビーズは、回収され、蛍光標識抗体と接触される。

【0030】

生物学的サンプルにおいて、膜貫通タンパク質の可溶性形態のなかから、当該膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインを検出するための上記方法はさらに、当該分断された外部ドメインに対応する当該可溶性形態の割合、百分率および/または量を算出する工程、ならびに/あるいは測定されたシグナルを、既知量の当該分断された外部ドメインおよび当該可溶性スプライズバリエーションを含む少なくとも1つの生物学的サンプルで得られたものと比較する工程、ならびに/あるいは可溶性形態（即ち、全ての可溶性アイソフォームまたは「総可溶性形態」）に対する分断された外部ドメイン（またはスプライズ形態）の比率を算出する工程を含んでいてもよい。

【0031】

本明細書中で用いられる場合、用語「ビーズ」とは、フローサイトメトリーにおける使用のための細胞測定ビーズをいう。本発明の方法では、異なる型のビーズとは、互いに区別可能なビーズをいう。このようなビーズは、例えば、BD Biosciences（San Jose, California）により市販されているBD（登録商標）細胞測定ビーズに対応していてもよい。ビーズは、当該分野において周知であり、以下にさらに記載される。

【0032】

10

20

30

40

50

フローサイトメーターは、光散乱および粒子の蛍光に基づく粒子の特徴付けを可能にする。フローサイトメーターでは、粒子は、各粒子を励起光、代表的には1つ以上のレーザーに曝すことによって個別に解析され、粒子の光散乱および蛍光特性が測定される。分子、被験物結合ビーズ、個別の細胞またはそれらの垂成分等の粒子が、代表的には、スペクトルの異なる1つ以上の蛍光色素で標識され、検出が、光検出器の多重性（検出されるべき各々の異なる色素に対するもの）を用いて行われる。フローサイトメーターは、例えば、BD Biosciences (San Jose, Calif.) から市販されている。フローサイトメーターの開発の初期には、種々の型のリガンド結合アッセイが、結合対の一方のメンバーでコーティングされたビーズ（微粒子とも称する）を用いて行うことができる」と認識されていた。コーティングされたビーズおよびレポーターは、ビーズ-被験物-レポーター複合体の形成を可能にするために、目的の被験物を含有する（または含有することが疑われる）サンプルと共にインキュベートされる。フローサイトメーターによる解析は、ビーズ-被験物-レポーター複合体の存在を検出すること、およびサンプル中に存在する被験物の定量的測定として、複合体に付随するレポーターの蛍光の量を同時に測定することの双方を可能にする。フローサイトメーターの開発の初期には、サンプル中の複数の被験物の同時解析は、区別可能なビーズのセット（各々の型のビーズが、独特の被験物特異的な結合剤でコーティングされている）を用いて行うことができる」とも認識されていた。ビーズのセットおよび蛍光標識レポーター試薬（検出されるべき被験物の各々の種に対するもの）は、存在する各被験物についてのビーズ-被験物-レポーター複合体の形成を可能にするために、目的の被験物を含有するサンプルと共にインキュベートされ、生じた複合体は、サンプル中に存在する被験物を同定するために、および必要に応じて、定量するために、フローサイトメーターにより解析される。複合体に結合した被験物の同一性は、ビーズの同一性により示されるため、複数の被験物が、全てのレポーター試薬について同じ蛍光団を用いて同時に検出することができる。

10

20

【0033】

区別可能な微粒子のセットを作製および使用する多数の方法が、刊行物に記載されている。これらとしては、サイズにより区別可能なビーズであって、各々のサイズの微粒子が異なる標的特異的抗体でコーティングされているもの（例、FulwylerおよびMcHugh, 1990, *Methods in Cell Biology* 33: 613-629を参照）、種々の濃度で2つ以上の蛍光色素を有するビーズであって、ビーズが蛍光色素のレベルによって識別されるもの（例、欧州特許出願第0126,450号を参照）、ならびに2つの異なる色素で区別可能に標識されたビーズであって、ビーズが各々の色素の蛍光強度を別々に測定することにより識別されるもの（例、米国特許第4,499,052号および同第4,717,655号を参照）が挙げられる。

30

【0034】

フローサイトメーターによる複数の被験物の同時解析のための一次元アレイおよび二次元アレイの双方が、市販されている。蛍光強度のレベルにより区別可能である単一の色素を付されたビーズの一次元アレイの例としては、BD（登録商標）細胞測定ビーズアレイ（CBA）（BD Biosciences, San Jose, Calif.）およびCyto-Plex（登録商標）フローサイトメーターマイクロスフェア（Duke Scientific, Palo Alto, Calif.）が挙げられる。蛍光強度（5つのレベル）およびサイズ（2つのサイズ）の組合せにより区別可能であるビーズの二次元アレイの例は、QuantumPlex（登録商標）マイクロスフェア（Bangs Laboratories, Fisher, Ind.）である。2つの色素の各々の蛍光のレベルにより区別可能である二重に色素を付されたビーズの二次元アレイの例は、Fultonら（1997, *Clinical Chemistry* 43(9): 1749-1756）に記載されている。

40

【0035】

本明細書中で用いられる場合、用語「特異的結合」は、当該分野内におけるその通常の意味を有する。分子が別の分子に特異的に結合するかどうかの事実は、一般に、競合的な

50

結合アッセイによって決定される。

【0036】

生物学的サンプルは、例えば、血漿、血液または尿に対応していてもよい。生物学的サンプルは、好ましくは、血漿に対応する。最も好ましくは、生物学的サンプルは、血栓障害または自己免疫障害に罹患している、または罹患する危険性がある個体から得られる。

【0037】

「リガンド」は、天然リガンド、抗体またはアプタマーを意味する。リガンドは、好ましくは、分断された外部ドメインおよびスプライズバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体である。

【0038】

本明細書中で用いられる場合、用語「抗体」とは、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の双方をいう。抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体である。しかしながら、それはまた、ポリクローナル抗体に対応していてもよい。

【0039】

蛍光標識リガンドおよび/または抗体は、例えば、FITC (FL1)、PE (FL2)、青色レーザーにおける使用のための蛍光団 (例、PerCP、PE-Cy7、PE-Cy5、FL3およびAPCまたはCy5、FL4)、赤色、紫色またはuvレーザーにおける使用のための蛍光団 (例、パシフィック・ブルー、パシフィック・オレンジ) 等の、当該分野において知られている任意の蛍光化合物で標識されてもよい。最適化された方法としては、ビーズおよび検出抗体についての異なる発光スペクトルが挙げられる。抗体は、好ましくは、直接的に標識される。しかしながら、それはまた、特に抗体がポリクローナル抗体である場合に、間接的に標識されてもよい。

【0040】

本明細書中で用いられる場合、用語「膜貫通タンパク質の分断された外部ドメイン」とは、タンパク質溶解プロセスにより切断された、膜貫通タンパク質の細胞外部分をいう。分断された外部ドメインが存在する膜貫通タンパク質の例としては、L-セレクトリン (Asimakopoulouら, *Perfusion*, 2000.15(6): p.495-9)、ICAM-1 (Beckerら, *J Immunol*, 1991.147(12): p.4398-401)、VCAM-1 (Gartonら, *SJ Biol Chem*, 2003.278(39): p.37459-64)、VCAM-1レセプター (Belgoreら, *Am J Cardiol*, 2001.87(6): p.805-7, A9)、P-セレクトリン (Doleら, *Thromb Haemost*, 2007.98(4): p.806-12)、CD40 (Continら, *J Biol Chem*, 2003.278(35): p.32801-9)、CD23 (Guら, *Blood*, 1998.92(3): p.946-51)、CD21 (Fremeaux-Bacchiら, *Int Immunol*, 1998.10(10): p.1459-66)、HLA-E (Derreら, *J Immunol*, 2006.177(5): p.3100-7)、NgR (Ahmedら, *Faseb J*, 2006.20(11): p.1939-41)、肝細胞増殖因子 (Wajihら, *Circ Res*, 2002.90(1): p.46-52)、IL-6R (Franchimontら, *Arthritis Rheum*, 2005.52(1): p.84-93)、TNFa (Fabrisら, *Clin Exp Immunol*, 1999.117(3): p.556-60)、IL-4R (Silvestriら, *Osteoarthritis Cartilage*, 2006.14(7): p.717-9)、IL-1R (Beckら, *Mol Immunol*, 1994.31(17): p.1335-44)、トランスフェリンレセプター (Chitambarら, *Blood*, 1991.78(9): p.2444-50)、ならびに免疫グロブリンの共通ガンマ鎖 (Meissnerら, *Blood*, 2001.97(1): p.183-91) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

本発明の好ましい実施形態では、膜貫通タンパク質は、CD31である。

10

20

30

40

50

【0042】

本明細書中で用いられる場合、用語「CD31」とは、CD31抗原またはPECAM-1とも称される血小板/内皮細胞接着分子をいう。このタンパク質は、任意の由来であってもよく、好ましくは、哺乳動物に由来し、最も好ましくは、ヒトに由来する。ヒトでは、CD31をコードする遺伝子は、ローカス17q23に局在する。ヒト野生型CD31の配列は、配列番号1として示される。しかしながら、本発明はまた、その対立遺伝子バリエーション、および他の種におけるそのホモログに関する。

【0043】

図5および配列番号1についての配列表(ヒトCD31)に示されるように、CD31タンパク質は、6つの細胞外免疫グロブリン様(Ig様)ドメインを含む。また、CD31は、膜貫通タンパク質としてのみではなく、6つの細胞外Ig様ドメインを含む可溶性スプライズバリエーションとしてもまた存在する(Goldbergerら 1994, J Biol Chem 269:17183-17191を参照)。

10

【0044】

予想外なことに、可溶性形態のCD31は、第1、第2、第3、第4および第5の細胞外Ig様ドメインを含む、分断された外部ドメインを含むことが見出された。したがって、第6の細胞外Ig様ドメインは、可溶性スプライズバリエーション中に存在するが、分断された外部ドメインには存在しない。

【0045】

したがって、本発明の好ましい実施形態は、生物学的サンプルにおいて、可溶性形態のCD31のなかから、CD31の分断された外部ドメインを検出するための方法に関する。ここで、少なくとも2つの識別抗体が用いられ、一方は、CD31の初めの5つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン中のいずれかに局在しているエピトープに特異的に結合し、他方は、CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する。補足またはシグナル伝達リガンドは、例えば、CD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメインに特異的に結合してもよい。シグナル伝達リガンドの補足は、好ましくは、補足またはシグナル伝達抗体であり、これは、例えば、CD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合してもよい。

20

【0046】

このような抗体は、当該分野において周知であり、例えば、HLDA抗体データベース(ワールドワイドウェブページ99.mh-hannover.de/aktuelles/projekte/hlda7/hlda/database/CD31.htmを参照)において列挙されている抗体のいずれか1つに対応していてもよい。

30

【0047】

本明細書中で用いられる場合、用語「CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープ」とは、配列番号1のアミノ酸499~601以内、即ち、CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン(配列番号1のアミノ酸499~591)以内および/または膜近傍領域(配列番号1の592~601)以内に局在しているエピトープをいう。好ましくは、当該エピトープは、配列番号1のアミノ酸499~591、524~601、または524~538以内に局在している。好ましい実施形態では、CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体は、PECAM1.2抗体(Invitrogen, San Diego, California)、PECAM1.1抗体、またはHC1/6抗体(Serotec, Kidlington, UK)に対応する。PECAM1.2抗体は、例えば、Yanら(Cell Adhes Commun 3:45-66)に記載されている。

40

【0048】

本明細書中で用いられる場合、用語「CD31の初めの5つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン中のいずれかに局在しているエピトープ」とは、配列番号1のアミノ酸28~4

50

93以内、最も好ましくは、配列番号1の34~493以内に局在しているエピトープをいう。本発明の好ましい実施形態では、当該エピトープは、CD31の第5の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に、あるいはCD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在している。

【0049】

本明細書中で用いられる場合、用語「CD31の第5の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープ」とは、配列番号1のアミノ酸424~493以内に局在しているエピトープをいう。好ましくは、当該エピトープは、配列番号1の448~470以内に局在している。好ましい実施形態では、CD31の第5の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体は、MEM-05抗体 (Zy med Laboratories, South San Francisco, California) に対応する。

10

【0050】

本明細書中で用いられる場合、用語「CD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープ」とは、配列番号1のアミノ酸34~233以内に局在しているエピトープをいう。CD31の第1の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープは、好ましくは、配列番号1の配列番号49~68以内に局在している。CD31の第1の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープは、好ましくは、配列番号1のアミノ酸166~187以内に局在している。好ましい実施形態では、CD31の初めの2つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体は、WM59抗体 (ドメイン2, BD, San Jose, California)、JC70A抗体 (ドメイン1, DAKO, Glostrup, Denmark)、または9G11抗体 (ドメイン1, R&D Systems, Minneapolis, USA) に対応する。WM59およびJC70A抗体は、例えば、Fawcettら (J Cell Biol 128:1229-1241) に記載されている。

20

【0051】

膜貫通タンパク質の当該可溶性形態としては、例えば、さらなる可溶性スプライズバリエーション、さらなる分断された外部ドメイン、またはタンパク質溶解プロセスにより生じたバリエーションに対応する、さらなる可溶性形態が挙げられてもよい。可溶性形態が少なくとも3つの可溶性形態を含む場合、2つよりも多くの識別抗体が用いられてもよい。この実施形態では、識別抗体は、可溶性形態間を識別するような様式において選択され、補足またはシグナル伝達抗体は、全ての当該可溶性形態に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する。

30

【0052】

5つの血漿サンプルからのデータは、殆どの循環している分断CD31がIg様ドメイン1~5を含むことを示した。しかしながら、Ig様ドメイン5は、16%までの血漿CD31において存在し得なかった。このことは、1つよりも多くの切断部位が細胞外CD31ドメインに存在し得ることを示す。したがって、CD31の全ての可溶性形態間を鑑別するためのより正確な試験はまた、CD31のIg様ドメイン5および6の検出に加えて、Ig様ドメイン1の検出を含む。したがって、生物学的サンプルにおいて、CD31の可溶性形態のなかから、CD31の分断された外部ドメインを検出するための方法は、CD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中、CD31の第5の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中、ならびにCD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープにそれぞれ特異的に結合する、3つの識別抗体の使用を含んでもよい。この実施形態では、補足またはシグナル伝達抗体は、CD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合しなければならない。

40

【0053】

CD31の分断された外部ドメインを検出するための方法はさらに、CD31の当該分

50

断された外部ドメインに対応する当該可溶性形態の割合、百分率および/または量を算出する工程、ならびに/あるいは測定されたシグナルを、既知量の当該分断された外部ドメインおよび当該可溶性スプライズバリエーションを含む少なくとも1つの生物学的サンプルで得られたものと比較する工程を含んでもよい。例えば、算出は、例えば、実施例1における「可溶性CD31のサブトラクティブ測定」との表題を付された段落に記載されるように行うことができる。CD31の分断された外部ドメインを検出するための方法は、好ましくは、総可溶性形態に対する分断された外部ドメインの比率、即ち、全ての可溶性アイソフォーム（ドメイン1～6を含む可溶性アイソフォーム、ドメイン1～5を含む可溶性アイソフォーム、およびドメイン1～2を含む可溶性アイソフォーム）に対する分断CD31の比率を算出する工程を含む。

10

【0054】

図4は、CD31の分断された外部ドメインの検出および定量についての本発明の方法を説明する。第1、第5または第6の細胞外Ig様ドメイン中に局在しているエピトープにそれぞれ特異的に結合する抗体に連結されている3つの型のピースが、用いられる。蛍光標識抗体は、第1および第2の細胞外Ig様ドメインに局在しているエピトープに特異的に結合する。各ピースについて得られたシグナルの強度の測定に基づく単純なサブトラクティブ算出は、CD31の可溶性形態の各々のそれぞれの割合を定量することを可能にする：

- ドメイン1～6を含む可溶性アイソフォーム = $a_{CD31_{d6}}$
- ドメイン1～5を含む可溶性アイソフォーム = $a_{CD31_{d5}} - a_{CD31_{d6}}$
- ドメイン1～2を含む可溶性アイソフォーム = $a_{CD31_{d1}} - (a_{CD31_{d5}} + a_{CD31_{d6}})$

20

【0055】

上記方法は、生物学的流体中に可溶である分断された外部ドメインを検出することを目的とする。しかしながら、これらの方法は、当該膜貫通タンパク質を発現している細胞上の膜貫通タンパク質（例、CD31^{shed}）の分断されたアイソフォームを検出するために適応されてもよい。その場合には、識別抗体は、分断されたアイソフォームおよび全長の膜貫通タンパク質の双方に存在する領域（例、Ig様ドメイン6）中、あるいは分断されたアイソフォームまたは全長の膜貫通タンパク質のいずれかに存在する領域（例、Ig様ドメイン1～2）中のいずれかに局在しているエピトープに特異的に結合する。本発明のこの局面は、実施例2、図1および図2aにより、CD31について説明される。

30

【0056】

本発明の別の好ましい実施形態では、膜貫通タンパク質は、GPVIである。

【0057】

本明細書中で用いられる場合、用語「GPVI」とは、血小板糖タンパク質VIをいう。このタンパク質は、任意の由来であってもよく、好ましくは哺乳動物に由来し、最も好ましくはヒトに由来する。ヒト野生型GPVIの配列は、SwissProtアクセッション番号Q9HCN6に示されている。用語「GPVI」は、野生型配列、スプライズおよび対立遺伝子バリエーション等のそのバリエーション、ならびに他の種におけるそれらのホモログを包含する。

40

【0058】

GPVIの可溶性形態は、細胞質テイルを含み、したがって、マルトース結合タンパク質(MBP)-GPVI細胞質テイルの融合タンパク質に対して惹起されたもの（例、Suzuki-Inoueら, J Biol Chem. 2002 277:21561-66）等の特異的抗体を用いて検出することができる。対照的に、GPVIの分断された形態は、全ての外部ドメインを含む。適切な抗外部ドメイン抗体の例としては、WO/2001/000810に開示されているクローン11A12、6B12、3j24.2および9012.2が挙げられる。GPVI天然リガンドであるコンブルキシンは、GPVIのスプライズ形態および分断された形態の双方に結合する。

【0059】

50

したがって、G P V I の分断された外部ドメインの検出は、以下のいずれかを用いて行うことができる：

- 識別抗体として、異なる型のビーズに連結されている抗テイルおよび抗外部ドメイン抗体、ならびにシグナル伝達リガンドとして、蛍光標識されたコンブルキシン、あるいは
- 補足リガンドとして、コンブルキシンにカップリングしたビーズ、ならびに識別抗体として、差示的に標識された蛍光抗テイルおよび抗外部ドメイン抗体。

【 0 0 6 0 】

また、上記方法は、当該可溶性形態が膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインでない場合でさえも、タンパク質の可溶性アイソフォームを検出するために用いられてもよいことが理解される。本発明の方法は、例えば、2つの可溶性スプライズバリエーションとして存在する、少なくとも2つの異なる可溶性形態として存在する任意のタンパク質の可溶性形態を検出するために用いることができる。換言すれば、それらは、タンパク質の異なる可溶性形態間の検出および区別を可能にする。

10

【 0 0 6 1 】

本発明の方法は、C D 3 1 の特定の例により説明される。しかしながら、当業者は、当業者が独自に選択した別のタンパク質に、この方法を容易に適応させることができる。可溶性ドメインの構造に依存して、当業者は、可溶性形態の一方のみに存在する、または存在しない領域を認識する抗体を選択する。また、当業者は、幾つかの抗体の同時結合を可能にするような様式において抗体を選択する。このような抗体は、抗体が重複エピトープを認識しないことを確認することにより容易に選択することができる。したがって、本発明の好ましい実施形態は、補足またはシグナル伝達抗体および異なる識別抗体が互いに交差 - 競合しない方法に関する。抗体が互いに交差 - 競合するかどうかを決定するための方法は、当該分野において周知であり、例えば、Blanchardら(1997, International Immunology, 9(12): 1775 - 1784)より記載される方法が挙げられる。

20

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態では、生物学的サンプル中に存在するタンパク質を断片化する工程(例、酵素消化による)を含む方法は、本発明の範囲から除かれる。

【 0 0 6 3 】

膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインおよび/または分断されたアイソフォームを検出するための上記方法は、分析応用および診断応用の双方における用途を見出す。幾つかの診断応用が、本明細書の以降の段落により詳細に記載されている。

30

【 0 0 6 4 】

診断方法および薬物モニタリング

アテローム性血栓症の高い危険性が、循環中の分断C D 3 1 の存在と関連付けられること、および総循環可溶性C D 3 1 の量と関連付けられないことが見出された。

【 0 0 6 5 】

したがって、本発明は、個体が血栓障害または自己免疫障害に罹患しているかどうか、または罹患する危険性があるかどうかを診断するための方法を提供する。この方法は、当該個体の生物学的サンプルにおいて、C D 3 1 の分断された外部ドメインを検出する工程を含む。ここで、C D 3 1 の当該分断された外部ドメインの存在は、当該個体が当該血栓障害または自己免疫障害に罹患している、または罹患する危険性があることを示す。C D 3 1 の分断された外部ドメインが検出可能である場合、この方法はさらに、総可溶性形態に対する分断された外部ドメインの比率を算出する工程を含んでいてもよい。実際、この比率は、非常に良好な予測値を有することが見出された(実施例7を参照)。

40

【 0 0 6 6 】

この診断に基づいて、適切な処置レジメが、当該個体に対して策定されてもよい。好ましくは、C D 3 1 の当該分断された外部ドメインは、第1、第2、第3、第4および第5の細胞外Ig様ドメインを含むが、第6の細胞外Ig様ドメインを欠損する。

【 0 0 6 7 】

50

本明細書を通じて用いられる場合、用語「血栓障害」としては、アテローム性血栓症、アテローム性動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、虚血性発作、末梢動脈疾患および腹部大動脈瘤が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、血栓障害は、アテローム性血栓症である。

【0068】

本明細書を通じて用いられる場合、用語「自己免疫障害」としては、関節リウマチ（RA）、脊椎関節症、多発性硬化症（MS）、炎症性腸疾患（IBD）、全身性エリテマトーデス（SLE）、グレーブス病および糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】

CD31の当該分断された外部ドメインの検出は、当該分野において知られている任意の方法にしたがって行なわれてもよい。それは、例えば、上記段落に記載される方法の1つによって検出されてもよい。あるいは、検出は、ELISAアッセイによって行なわれてもよい。しかしながら、本発明の方法にしたがって、分断CD31の外部ドメインを検出することが好ましい。なぜならば、このような方法は、設定がより容易であり、より迅速であり、かつより感度が良いためである。

10

【0070】

生物学的サンプルは、例えば、血漿、血液または尿に対応していてもよい。生物学的サンプルは、好ましくは、血漿に対応する。

【0071】

本発明の診断方法は、個体における血栓障害または自己免疫障害の進行をモニターするために、ならびに/あるいは当該個体における当該障害の重篤性を評価するために、ならびに/あるいは薬物に対する個体の応答性をモニターするために、少なくとも2つの異なる時点において繰り返されてもよい。

20

【0072】

本明細書中で用いられる場合、「異なる（またはより後の）時点」で生じる事象とは、少なくとも1時間の間隔で生じる事象をいう。好ましくは、この事象は、少なくとも6時間、12時間、1日、1週、2週または1ヶ月の間隔で生じる。

【0073】

本発明はまた、個体が血栓障害または自己免疫障害に罹患しているかどうか、あるいは罹患する危険性があるかどうかを診断するための、CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体の使用に関する。

30

【0074】

本発明はさらに、個体がアテローム性血栓症に罹患しているかどうか、または罹患する危険性があるかどうかを診断するための方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む：

- a) 当該個体の生物学的サンプルを提供すること；
- b) 当該生物学的サンプルにおいて、例えば、「分断された外部ドメインの検出」という表題が付された上記段落に記載される方法のいずれかにしたがって、CD31の分断された外部ドメインを検出すること；ならびに

40

c) 工程(a)の結果を、アテローム性血栓症に罹患する危険性と相関付けること。
ここで、当該生物学的サンプルにおけるCD31の当該分断された外部ドメインの存在は、当該個体がアテローム性血栓症に罹患しているか、または罹患する危険性があることを示す。好ましくは、CD31の当該分断された外部ドメインは、第1、第2、第3、第4および第5の細胞外Ig様ドメインを含むが、第6の細胞外Ig様ドメインを欠損する。

【0075】

CD31の可溶性形態における少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、90%または95%の分断された外部ドメインの存在は、当該個体が血栓障害または自己免疫障害（例、アテローム性血栓症など）に罹患しているか、または罹患する危険性があることを示す。

【0076】

50

好ましい実施形態では、診断されるべき当該個体の生物学的サンプルにおける分断CD31の量および/または百分率は、健常な個体の生物学的サンプルにおける分断CD31の量および/または百分率と比較される。

【0077】

低レベルの分断CD31に伴う高レベルのCD31可溶性スプライスバリエントは、診断されるべき個体が、最終的には頸動脈の粥腫(plaque)を伴う非特異的な胸痛に罹患していることを示す。正常または低減したレベルのCD31可溶性スプライスバリエントに伴う分断CD31レベルの僅かな増加は、診断されるべき個体がアテローム性動脈硬化症に罹患していることを示す。検出不能な量のCD31可溶性スプライスバリエントに伴う分断CD31レベルの顕著な増加は、診断されるべき個体がアテローム性血栓症に罹患していることを示す。

10

【0078】

本発明の診断方法は、例えば、個体が血栓障害または自己免疫障害に罹患しているかどうかを決定するために、個体における血栓障害または自己免疫障害の重篤性を評価するために、心筋梗塞の再発等の主要な心血管事象の危険性を予測するために、処置レジメを策定するために、患者における血栓障害または自己免疫障害の進行をモニターするために、薬物に対する患者の応答性を予測およびモニターするために、ならびに/あるいは患者の処置を調整するために、用いられてもよい。

【0079】

本発明の診断方法が、障害の進行をモニターするために、障害の重篤性を評価するために、薬物に対する応答性をモニターするために、および/または患者の処置を調整するために用いられる場合、それは、所定の患者から異なる時点で採取された生物学的サンプルに対して行われる。生物学的サンプルは、例えば、処置に対する患者の応答性を追跡するために、毎月、採取される。これらの解析に基づいて、処置は、次いで、調整されてもよい。その効力を増強させるために、および/または副作用を最小にするために、例えば、薬物の変更、または薬物の投薬量の調整が決定される。このような薬物モニタリングは、長期の処置(例えば、免疫抑制化合物が患者に投与される場合)において特に望ましい。分断CD31の検出は、患者における炎症応答をモニターするために、したがって、患者に投与することができる薬物の最小有効用量を決定するために、用いることができる。

20

【0080】

したがって、本発明は、血栓障害または自己免疫障害の進行をモニターするための、ならびに/あるいは個体における血栓障害または自己免疫障害の重篤性を評価するための、ならびに/あるいは薬物に対する患者の応答性をモニターするための方法を提供する。当該方法は、以下の工程を含む：

30

- a) 当該患者の第1の生物学的サンプルを提供すること；
- b) 当該第1の生物学的サンプルにおいて、CD31の分断された外部ドメインを検出すること；
- c) 当該患者の少なくとも1つの第2の生物学的サンプルを提供することであって、当該少なくとも1つの第2の生物学的サンプルが、第1の生物学的サンプルよりも後の時点で、当該患者から採取されたものであること；
- d) 当該少なくとも1つの第2の生物学的サンプルにおいて、CD31の分断された外部ドメインを検出すること；
- e) 工程(b)および(d)で得られた結果を比較すること。

40

【0081】

異なる時点で同じ患者から採取された幾つかの異なる生物学的サンプルは、工程(c)、(d)および(e)で用いられてもよい。例えば、患者の長期の処置の枠組みでは、生物学的サンプルは、規則的な間隔(例、毎月、2ヶ月毎または1年に2回)で患者から採取されてもよい。

【0082】

血栓障害または自己免疫障害の進行をモニターするための；ならびに/あるいは当該障

50

害の重篤性を評価するための；ならびに／あるいは薬物に対する患者の応答性をモニターするためのこのような方法はさらに、工程（e）の結果に基づいて、当該患者についての処置レジメを策定する工程（f）を含んでいてもよい。

【0083】

薬物モニタリングの枠組みでは、工程（a）の生物学的サンプルは、好ましくは、患者の処置の開始前から採取され、工程（c）の生物学的サンプルは、処置の開始後である。工程（b）で測定された分断CD31レベルと比較した場合における工程（d）で測定した分断CD31レベルの減少は、薬物が当該患者を治療するために効果的であることを示す。

【0084】

より具体的には、本発明は、薬物に対する、血栓障害または自己免疫障害に罹患している患者の応答性をモニタリングするための方法に関する。当該方法は、以下の工程を含む：

- a) 当該薬物による当該患者の処置の開始前および後の当該患者の生物学的サンプルにおいて、CD31の分断された外部ドメインを検出すること；
- b) 工程（a）で検出されたCD31の分断された外部ドメインのレベルを比較すること；ならびに、必要に応じて
- c) CD31の分断された外部ドメインの当該レベルにおける差異を、当該患者を治療するため、薬物の有効性と相関付けること。

【0085】

処置の開始前のCD31の分断された外部ドメインのレベルと比較した、処置の開始後のCD31の分断された外部ドメインのレベルにおける減少は、患者が当該薬物に対して応答すること、および当該薬物が当該患者を治療するために効果的であることを示す。好ましくは、減少は、少なくとも5、10、25、50、75または90%である。反対に、CD31の分断された外部ドメインのレベルにおいて如何なる有意な差異も工程（b）で見出されない場合、または処置の開始後のCD31の分断された外部ドメインのレベルにおける増加が工程（b）で見出された場合には、患者は当該薬物に対して応答せず、薬物は、当該患者を治療するために効果的ではない。

【0086】

本発明はさらに、患者における血栓障害または自己免疫障害の進行をモニターするために、ならびに／あるいは薬物に対する患者の応答性をモニターするために、CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体の使用に関する。

【0087】

診断キット

本発明はまた、以下を含む診断キットを意図する：

- a) 当該分断された外部ドメインおよび可溶性当該スプライズバリエントの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する蛍光標識抗体。
- b) 当該分断された外部ドメインに存在し、かつ当該可溶性スプライズバリエントに存在しないか、あるいは当該可溶性スプライズバリエントに存在し、かつ当該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結している第1の型のピース；ならびに
- c) 膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインおよび当該膜貫通タンパク質の可溶性スプライズバリエントの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結している第2の型のピース。

【0088】

このようなキットは、例えば、本発明の診断方法において、および／または薬物の選択において、ならびに／あるいは薬物モニタリングにおいて、用いることができる。

【0089】

好ましい実施形態では、膜貫通タンパク質は、CD31である。蛍光標識抗体および第

10

20

30

40

50

1の型のビーズに連結している抗体は、好ましくは、CD31の初めの5つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン中のいずれかに局在しているエピトープに特異的に結合する。第2の型のビーズに連結している抗体は、好ましくは、第6のIg様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する。

【0090】

このような診断キットは、例えば、以下を含む：

- CD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する蛍光標識抗体（例、標識WM59抗体、標識9G11抗体、または標識JC70A抗体、DAKO、）；
- CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体（例、PECAM1.2抗体）に連結されている第1の型のビーズ；
- 以下の一方または双方：

10

i) CD31の第5の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体（例、MEM-05、PECAM1.1またはHC1/6抗体）に連結している第2の型のビーズ；ならびに

ii) CD31の第1および/または第2の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体（例、JC70A、9G11またはWM59抗体）に連結している第3の型のビーズ。

【0091】

特定の実施形態では、キットは、PECAM1.2に連結している第1の型のビーズ、MEM-05抗体に連結している第2の型のビーズ、蛍光標識WM-59抗体（例、PE-WM-59）、および必要に応じて、JC70A抗体に連結している第3の型のビーズを含む。

20

【0092】

本発明の他の診断キットは、以下を含む：

- a) 膜貫通タンパク質の分断された外部ドメインおよび当該膜貫通タンパク質の可溶性スプライスバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体に連結しているビーズ；
- b) 当該分断された外部ドメインに存在し、かつ当該可溶性スプライスバリエーションに存在しないか、または当該可溶性スプライスバリエーションに存在し、かつ当該分断された外部ドメインに存在しないかのいずれかである領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する第1の型の蛍光標識抗体；ならびに
- c) 当該分断された外部ドメインおよび可溶性当該スプライスバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する第2の型の蛍光標識抗体であって、当該第2の蛍光標識抗体の標識が、当該第1の蛍光標識抗体の標識とは異なるもの；ならびに、必要に応じて
- d) 当該分断された外部ドメインおよび可溶性当該スプライスバリエーションの双方に存在する領域中に局在しているエピトープに特異的に結合する第3の型の蛍光標識抗体であって、当該第3の蛍光標識抗体の標識が、当該第1および第2の蛍光標識抗体の標識とは異なるもの。

30

40

【0093】

好ましい実施形態では、膜貫通タンパク質は、CD31である。第2の蛍光標識抗体およびビーズに連結されている抗体は、好ましくは、CD31の初めの5つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン中のいずれかに局在しているエピトープに特異的に結合する。第1の蛍光標識抗体は、好ましくは、第6のIg様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する。

【0094】

別の好ましい実施形態は、以下を含むキットに関する：

- 第1の細胞外Ig様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する抗体（例、Pecam1.3、9G11またはJC70A抗体）に連結しているビーズ；

50

- 第 6 の細胞外 I g 様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する第 1 の型の蛍光標識抗体 (例、F I T C - P E C A M 1 . 2 等の標識 P E C A M 1 . 2 抗体) ;

- 以下の一方または双方 :

- 第 1 または第 2 の細胞外 I g 様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する第 2 の型の蛍光標識抗体 (例、P E - W M 5 9 または P E - L 1 3 3 等の標識 W M 5 9 または L 1 3 3 抗体) ; ならびに

- 第 5 の細胞外 I g 様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合する第 3 の蛍光標識抗体 (例、M E M - 0 5 または P E C A M 1 . 1 あるいは H C 1 / 6 抗体) ;
【 0 0 9 5 】

蛍光標識抗体は、青色レーザーによって励起され、かつ F I T C、P E、P e r C P または P E - 直列チャネルにおいて発光するか、あるいは赤色レーザーによって励起され、かつ C y 5 / A P C または A P C - 直列チャネルにおいて発光するか、あるいは紫色レーザーによって励起され、かつパシフィック・ブルーまたはパシフィック・オレンジチャネルにおいて発光するか、あるいは UV レーザーによって励起され、かつ量子ドットチャネルにおいて発光する蛍光団を含んでいてもよい) ;

【 0 0 9 6 】

これらのキットはさらに、例えば、試薬および / または使用説明書等の他の成分を含んでいてもよい。

【 0 0 9 7 】

キットはまた、C D 3 1 の分断された外部ドメインおよび / または可溶性スプライスバリエーションを既知量で含むサンプル、健常な個体からのサンプル、ならびに / あるいはアテローム性動脈硬化症またはアテローム性血栓症に罹患している個体からのサンプルを含んでいてもよい。

【 0 0 9 8 】

シグナル伝達経路を解析するための方法

分断された外部ドメインを検出する上記方法は、タンパク質 / タンパク質相互作用およびシグナル伝達経路の解析等の他の目的のために適応されてもよい。この方法は、共 I P / W B よりも容易、迅速かつ強力であり、C A S E / P h o s p h o w および C B A F 1 e x セットよりも特異的であり、実際には、これらの技術の利点を組み合わせている。

【 0 0 9 9 】

したがって、本発明は、候補分子が分子複合体のメンバーであるかどうかを決定するための方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む :

a) 当該分子複合体のメンバーに特異的に結合する抗体に連結しているビーズを提供すること ;

b) 当該ビーズを、当該分子複合体を含有する生物学的サンプルに接触させること ;

c) 生物学的サンプルに接触された当該ビーズを、当該候補分子に特異的に結合する少なくとも 1 つの型の蛍光標識抗体に接触させること ; ならびに

d) 蛍光をフローサイトメトリーにより検出すること。

- 工程 (d) でのシグナルの検出は、当該候補分子が当該分子複合体のメンバーであることを示す ; および

- 1 つよりも多くの型の蛍光標識抗体が工程 (c) で用いられる場合には、当該抗体は、異なる蛍光標識で標識されている。

【 0 1 0 0 】

本発明の方法は、同じ生物学的サンプルを用いて、幾つかの決定を同時に行うことを可能にする。したがって、上記方法は、少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個または 10 個の候補分子について同時に行われてもよい。このような場合には、工程 (c) は、生物学的サンプルに接触された当該ビーズを、当該少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個または 10 個の候補分子の各々に特異的に結合する蛍光標識抗体に接触させることを含む。これらの蛍光標識抗体の各々は、他の蛍光標識とは異なる蛍光標識で標

10

20

30

40

50

識される。

【0101】

生物学的サンプルは、好ましくは、可溶性または可溶化分子（好ましくは、細胞に由来する）に対応する。生物学的サンプルは、例えば、細胞溶解物に対応する。このような細胞溶解物を調製するためのプロトコールは、例えば、実施例5に記載されている。細胞は、例えば、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤のカクテルを含有するRIPA緩衝液と共に、氷上で30分間溶解されてもよい。あるいは、可溶性または可溶化分子は、例えば、細胞を凍結、融解および破碎することにより調製されてもよい。

【0102】

上記方法は、所定の分子複合体および/または所定のシグナル伝達経路に関する複数の情報を集積することを可能にする。本明細書中で用いられる場合、「分子複合体」とは、会合した分子の複合体をいう。分子は、例えば、タンパク質、脂質、糖またはヌクレオチドに対応していてもよい。好ましい実施形態では、分子複合体は、タンパク質複合体であり、当該タンパク質複合体のメンバーは、タンパク質である。

10

【0103】

本発明の方法は、例えば、特定の条件下で所定のタンパク質と会合しているタンパク質を決定すること、あるいは所定のタンパク質がリン酸化されているか、またはされていないかを決定すること（タンパク質のリン酸化アイソフォームを特異的に認識する蛍光標識抗体を使用することによる）を可能にする。したがって、候補分子は、例えば、ある条件下でのみ分子複合体のビーズ補足メンバーに会合しているタンパク質、ある条件下でのみリン酸化されているタンパク質、または当該分子複合体のメンバーであるかどうか不明であるタンパク質に対応していてもよい。本発明の方法はまた、細胞外基質の糖タンパク質およびプロトグリカン（*protoglycan*）の複合体、または血栓の形成に関与する糖、脂質およびタンパク質の複合体を解析することを可能にする。

20

【0104】

工程(c)で用いられる抗体は、当該分子複合体のメンバーと思われるタンパク質の全てのアイソフォームに特異的に結合してもよく、あるいは当該タンパク質の分断、スプライスまたはリン酸化されたアイソフォームのみに特異的に結合してもよい。

【0105】

あるいは、工程(c)で用いられる抗体は、タンパク質の一次構造にかかわらず、ホスホチロシン、ホスホセリンまたはホスホスレオニン等のリン酸化アミノ酸に結合してもよい。

30

【0106】

工程(c)で用いられる抗体はまた、ヌクレオチド（DNAまたはRNA配列、AMPcまたはGMPc等の環状ヌクレオチド）、糖（例、シアル酸）、シグナル伝達経路に関与する脂質（例、ステロイドホルモン、イノシトール、ホスファチジルイノシトール、ロイコトリエン、プロスタグランジン、トロンボキサン、ガングリオシド、カベオリン、セラミドなど）、TLR媒介シグナル伝達に関与するリポ多糖、および糖脂質（例、オリゴデンドロサイトのシグナル伝達に関与するガラクトセレブロシド）に特異的に結合してもよい。

40

【0107】

分子複合体は、例えば、膜レセプター、細胞外リガンド、および伝達タンパク質等の細胞内タンパク質を含んでいてもよい。最も好ましくは、候補分子は、細胞内分子（例、細胞内タンパク質）である。

【0108】

このモデルを用いて解析することができる分子複合体の例としては、以下の表に提示されるものが挙げられる。ビーズ連結抗体で補足されるタンパク質は、分子複合体のメンバーのいずれか1つであってもよい。

【0109】

【表 B】

シグナル伝達経路	膜会合タンパク質	ホスホタンパク質	会合細胞内タンパク質(アクチベーター)	会合細胞内タンパク質(インヒビター)
CD3シグナル伝達 (T細胞)	CD31、CD3、CD45、CD28、CTLA4、SLAM、CD31	p56LcK、TCR のホスホITAM (CD3ζ)	Zap70、NFkB、ERK、IκBK、RhoA...	Csk、PTPアーゼ
IgMシグナル伝達 (B細胞)	IgM、CD19、CD22	Iga/b ITAM、SYK、GRB2、BTK、PI3K	RAS、IKK、PKCβ、RAC	SHP1、SHIP、PTEN、切断されたNotch
IL-6R (サイトカインシグナル伝達)	IL-6R、Gp130	IL-6レセプター (4個のチロシン)	Jak1、Stat3、Gab、ERK、MAPK	SHP2、SOCS3
b-インテグリンシグナル伝達 (癌研究)	β-インテグリン、タリン(Talin)、パキシリン(Paxillin)、Fyn、FAK	FAK	α-アクチニン、Gβ2、Ras、Raf1、MEK1/2、ERK1/2...	Sos、PTPアーゼ
C83シグナル伝達 (分断後) (アルツハイマー研究)	C83 (分断後)、β-セクレターゼ、α-セクレターゼ、C99 (β-セクレターゼにより残される) APP (分子全体)	GSK3	Cdk5/p25、Cdk5/p35	
FasLシグナル伝達 (アポトーシス)	FasL、FADD、TRADD、TNF-R1、RIP、リーパー (Reaper)、カスパーゼ、FLIP		p53、Bax、BCL-2、Apaf-1、MDM2、c-Myc	

10

20

30

【0110】

好ましい実施形態では、ビーズ連結抗体で補足される当該分子複合体のメンバーは、CD31である。

【0111】

蛍光標識抗体は、例えば、686位でリン酸化されたチロシンを含むCD31タンパク質に特異的に結合する抗体に対応してもよい。あるいは、蛍光標識抗体は、例えば、CD31シグナル伝達経路の一部である細胞内タンパク質のリン酸化されたアイソフォーム、またはCD31シグナル伝達経路の一部である伝達タンパク質に特異的に結合する抗体に対応してもよい。このようなタンパク質は、例えば、NewmanおよびNewman (2003 Arterioscler Thromb Vasc Biol 23:953-964)、ならびに/あるいはNewton-NashおよびNewman (1999 J Immunol 163:682-688)に記載されている。このような抗体は、例えば、第6の細胞外免疫グロブリン様ドメインを含むCD31タンパク質に結合してもよく(例、PECAM 1.2)、第2の細胞外免疫グロブリン様ドメインを含むCD31タンパク質に結合してもよく(例、WM59)、CD3、CD28、SHP2、CD45、CTLA4、SLAM、p56LcK、CD3、Zap70、NFkB、ERK、IκBK、RhoA、CskおよびPTPアーゼに結合してもよい。

40

【0112】

50

本発明はさらに、分子複合体を解析するためのキットを提供する。この方法は、以下を含む：

- i) 当該分子複合体のメンバーに特異的に結合する抗体に連結しているビーズ；および
- ii) 当該分子複合体の別のメンバーに特異的に結合する少なくとも1つの型の蛍光標識抗体。

ここで、キットが1つよりも多くの型の蛍光標識抗体を含む場合、当該抗体は、異なる蛍光標識で標識されている。

【0113】

より具体的には、本発明はさらに、以下を含むキットを提供する：

- CD31の第6の細胞外免疫グロブリン様ドメイン中に局在しているエピトープに特異的に結合するビーズ連結抗体（例、PECAM 1.2）；ならびに
- 以下からなる群より選ばれるタンパク質に特異的に結合する少なくとも1つの蛍光標識抗体：686位でリン酸化されたチロシンを含むCD31タンパク質（例、標識ウサギ抗CD31ホスホ-チロシン686ポリクローナル抗体。これは、例えば、Alexia Fluor（登録商標）488結合（Fab'）₂フラグメントで標識されていてもよい）；第6の細胞外免疫グロブリン様ドメインを含むCD31タンパク質（例、PECAM 1.2）；第2の細胞外免疫グロブリン様ドメインを含むCD31タンパク質（例、WM59）、CD3、CD28、SHP2、CD45、CTLA4、SLAM、p56LcK、CD3、Zap70、NFkB、ERK、IkBK、RhoA、CskおよびPTPアーゼ。

【0114】

本発明はまた、他の分子複合体を解析するためのキットを提供する。このようなキットは、例えば、ビーズ連結抗体および少なくとも1つの蛍光標識抗体を含んでもよい。ここで、各抗体は、以下からなる群より選ばれるタンパク質に特異的に結合する：

- IgM、CD19、CD22、Iga/b ITAM、SYK、GRB2、BTK、PI3K、RAS、IKK、PKCb、RAC、SHP1、SHIP、PTENおよび切断されたNotch；
- IL-6R、Gp130、Jak1、Stat3、Gab、ERK、MAPK、SHP2、SOCS3；
- ベータ-インテグリン、タリン、パキシリン、Fyn、FAK、a-アクチニン、GRb2、Ras、Raf1、MEK1/2、ERK1/2、SosおよびPTPアーゼ；
- C83（分断後）、b-セクレターゼ、a-セクレターゼ、C99（b-セクレターゼにより残される）APP（分子全体）、GSK3、Cdk5/p25、Cdk5/p35；あるいは
- FasL、FADD、TRADD、TNF-R1、RIP、リパー、カスパーゼ、FLIP、p53、Bax、BCL-2、Apaf-1、MDM2、c-Myc。

【0115】

本発明のキットはさらに、ホスホチロシンまたはホスホセリン/スレオニンに特異的に結合する蛍光標識抗体を含んでもよい。

【0116】

分子複合体を解析するための方法およびキットにおいて用いられる異なる抗体は、好ましくは、互いに交差-競合しない。

【0117】

雑誌の記事または要約、公開または未公開の特許出願、発行された特許あるいは任意の他の参考文献を含む、本明細書中で引用される全ての参考文献は、参照により全体が本明細書中に援用され、引用された参考文献中に提示されている全てのデータ、表、図および文章を含む。

【0118】

異なる意味を有するが、用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含有する（containing）」および「からなる（consisti

10

20

30

40

50

ng of)」は、本明細書を通じて変更可能に使用されており、互いに交換されてもよい。

【0119】

本発明はさらに、以下の実施例及び図を参照して評価される。

【実施例】

【0120】

実施例1：材料および方法

CD31⁺およびCD31^{shed}血液白血球の評価

10色のフローサイトメトリーを、基礎条件における、または可溶性1 μ g/mlの精製抗CD3抗体(R&Dシステムズ)による一晩の刺激後のいずれかの5人の健常な個体からの末梢血白血球に対して行った。10色のフローサイトメトリーを、処理前にPBS/ホルムアルデヒド1%/FCS1%中で37 $^{\circ}$ Cにて4分間固定された、5人の健常な個体からのヘパリン処理された末梢血白血球に対する赤血球の低張溶解(37 $^{\circ}$ Cで10分Tris10mM、NH₄Cl155mM、KHCO₃10mM中で1:10v:v、pH7.4)後に行った。ヒト血液に対する全ての実験は、国際倫理委員会により承認された(ワールドワイドウェブページclinicaltrials.gov; 識別番号:NCT00430820を参照)。ペレット細胞を、室温で30分間インキュベートし、BD BiosciencesからのCD3(PE-Texas Red)、CD4(PE-Cy7)、CD8(PerCP)、HLA-DR(APC-Cy7)、CD45RA(Pacific Blue)、および抗CD31(WM59、PE)、なら

20

びにInvitrogenからの抗CD20(AlexaFluor(登録商標)700)および抗CD31(PECAM1.2、FITC)に対する蛍光モノクローナル抗体(各1 μ l)のカクテルにより光から保護した。3つのレーザー(405、488および633nm)が取り付けられたBD LSRII(登録商標)を用いて、少なくとも50,000の事象を、リンパ球ゲート中に確認し、BD DIVA(登録商標)6.0ソフトウェアで解析した。

【0121】

可溶性CD31のサブトラクティブ測定

血漿および培養上清中のスプライスパリアントおよび短縮型CD31を検出するため、サイトカインビーズアレイ(CBA(登録商標)、BD)をカスタマイズした。3つの異なる機能性CBAビーズ(A9、D5およびE9)を、以下の精製モノクローナル抗CD31抗体JC70A(ドメイン1、DAKO)、MEM-05(ドメイン5、Zymed)およびPECAM1.2(ドメイン6、Invitrogen)のいずれか一つとカップリングした。次いで、カップリングしたビーズを、同じ5人の健常コントロールの血漿(図2)または培養上清と共にインキュベートし、循環CD31の陽性結合を、PE(BD)とカップリングした第4の抗CD31モノクローナル抗体WM-59(ドメイン1~2)により検出した。CD31のうち、少なくともドメイン1(JC70A)、またはドメイン1~5(MEM-05)、あるいは全ての細胞外ドメイン1~6(PECAM1.2)を含む血漿CD31の濃度を、サンプルおよび同じ標品(組換え、全長細胞外CD31、R&D Systems)の連続希釈物に関する100以上のゲートビーズに対する検出抗体の中央蛍光強度を解析することにより決定した。多様な抗体の結合親和性における差異に起因する任意の偏りを克服するため、標準曲線を、同じ既知濃度の組換えCD31を用いて、ビーズの各々について得た。PECAM1.2にカップリングしたビーズ(dom1~6)により決定されたCD31のng/mlにおける濃度を、MEM-05にカップリングしたビーズを用いて得られたものから差し引いて、dom6を欠損する循環CD31(dom1~5)の量を得た。後者を、JC70Aにカップリングしたビーズを用いて得られたCD31の濃度から差し引いて、dom5および6の双方を欠損するが、少なくともドメイン1および2を含有する可溶性CD31(dom1~2)の値を算出した。

30

40

【0122】

10

20

30

40

50

CD31 - ITIMリン酸化の評価

Log相のJurkat細胞(10⁷細胞/条件)を、20分の間、未刺激で放置するか(陰性コントロール)、またはペルバナデートと共にインキュベートするか(陽性コントロール)、あるいはペプチド551~574(100μM)の存在下または非存在下において、抗CD3および抗CD28抗体(R&D Systems、各1μg/ml)で刺激するか、あるいはペプチド単独と共にインキュベートした。次いで、細胞を、氷上で1mlのRIPA緩衝液により30分間溶解し、超遠心分離し、16μlの上清を、PECAM 1.2でコーティングされた機能性E9 CBA(登録商標)ビーズ(BD)と共に室温で2時間インキュベートした。引き続き、ビーズを、CBA洗浄緩衝液で洗浄し、2μlの未希釈のウサギ抗CD31ホスホ-チロシン686(pY686)血清と共にインキュベートし、続いて2回洗浄し、ヤギ抗ウサギIgG(Invitrogen)のAlexaFluor(登録商標)488結合(Fab')₂フラグメント(CBA洗浄緩衝液中で1:100)と共にインキュベートした。最後に、ビーズ(2000/条件)を、FITCチャンネル(530/30nm)においてフローサイトメトリーにより解析し、データを、DIVA 6.0(登録商標)ソフトウェア(BD)で算出した中央蛍光強度(MFI)±変動係数(CV%)の百分率として表した。二連の溶解物の分割物および組換えCD31の連続希釈物を、PECAM 1.2でコーティングしたビーズと共にインキュベートし、dom1+細胞に結合したCD31の量を、抗CD31 WM59-R-PE(dom1)およびPECAM 1.2-FITC(dom6)抗体を用いて明らかにした(データを図3aに示す)。

10

20

【0123】

蛍光ペプチド結合

CD31⁺およびCD31^{shed}CD4⁺T細胞に対するペプチド結合の可視化のため、上記のように調製された、新たに精製した末梢血白血球を、2mM EDTA(ペプチドのエンドサイトーシスを回避するため)を含有する緩衝化溶液で洗浄し、ポリ-D-リジンでコーティングしたibidi(登録商標)8-ウェル培養庫(Biovalley)において、50μM FITC標識CD31ペプチド551~574、および蛍光モノクローナル抗CD31(PE)および抗CD4(APC)抗体(BD Biosciences)の1:10希釈物と共に、暗加湿器中で室温で一晩インキュベートした。次いで、細胞を2回洗浄し、DAPIで核を対比染色し、0.3μm細胞内切片のデジタル画像を、ApoTome(登録商標)および冷却した単色光デジタルカメラ(Zeiss)が取り付けられたZeiss Axiovert M200顕微鏡(x63油浸用対物鏡)で得た。

30

【0124】

カルシウム流動アッセイ

C57Bl/6マウスからの脾臓細胞を、Caligiuriら(2005 Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:1659-1664)に記載されるように調製した。細胞を、製造業者の使用説明書に沿ってFluo-3AM(Invitrogen、番号F1242)と共にインキュベートした。カルシウム結合レーザーの蛍光を、ハムスター抗マウスCD3/CD28モノクローナル抗体(各40μg/ml)およびラット/ハムスターcompBead(登録商標)(1:50)を、単独で、あるいはラット抗マウスCD31抗体(クローン390、10μg/ml)の存在下、またはCD31ペプチド551~574(100μM)の存在下のいずれかにおいて、添加する前、および添加後に60秒間、LSRII(登録商標)サイトメーター(BD Biosciences)上のFITCチャンネルにおいて測定した。陰性コントロールは、ラットIgGアイソタイプコントロールおよび混雑(scramble)ペプチドを含んでいた。抗体およびcompBeads(登録商標)は、BD Biosciencesからであった。

40

【0125】

プラズモン表面共鳴

50

同種親和性結合の会合および解離定数を、表面プラズモン共鳴 (BIACore (登録商標) 2000、GE) により算出した。簡潔には、ペプチド551~574を、製造業者の使用説明書にしたがって、CM5チップ上に3400共鳴単位 (RU) でコーティングした。可溶性ペプチド551~574 (10mM HEPES (pH7.4)、150mM NaCl、0.005% Tween20の200 μ l中において12.5、25、50および100 μ M) を、ペプチドでコーティングしたチャンネル上に、およびコーティングしていないチャンネル上に、25にて20 μ l/分で注入した。解離を、300秒間モニターした。会合 (kon) および解離 (koff) 定数を、BIAevaluation (登録商標) 3.0ソフトウェア (GE) を用いて算出した。混雑ペプチドでコーティングしたチャンネル上へのペプチド551~574の注入は、無視し得るシグナルを生じた。

【0126】

インビトロ免疫調節の評価

同種異系マウス大動脈平滑筋細胞に対するCD8⁺T細胞媒介細胞溶解活性、およびマクロファージゼラチナーゼ (MMP-2/9) 活性の測定を、Invitrogenからのキットおよび試薬を用いて、Caligiuris (2006 Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:618-623) においてヒト細胞について以前に記載されているように行った。簡潔には、FVB/Nマウス大動脈平滑筋細胞の初代培養物を、脂溶性トレーサーDIO (緑) で標識し、C57Bl/6マウスからのCD8⁺T細胞強化脾臓細胞と共に3時間共培養した (混雑ペプチド n=3、およびペプチド551~574 n=3、50 μ M)。細胞溶解を、ヨウ化プロビジウム (PI) の細胞内蓄積により評価した。細胞を、フローサイトメトリーにより解析し、細胞溶解の%を、標的 (DIO⁺) 細胞に占める死 (PI⁺) 細胞の数を表すことにより算出した。細胞内MMP-2/9 (ゼラチナーゼ) 活性を、C57Bl/6マウスからの7日齢の骨髄由来マクロファージにおいて、Oregon Green (登録商標) ゼラチン (MFI) の取り込み3時間後に、フローサイトメトリーにより測定した (混雑ペプチド n=3、およびペプチド551~574 n=3、50 μ M)。T細胞増殖を、以前に記載 (Caligiuris Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:1659-1664) されているように、C57Bl/6 (CD31⁺/⁺) およびCD31⁻/⁻マウス (Charles River France) からの脾臓細胞のヒト末梢血単核細胞のいずれかを用いて行った。簡潔には、細胞を、1 μ g/ml抗マウスCD3/CD28または5 μ g/ml抗ヒトCD3抗体 (BD) を適切に含有する完全培地 (RPMI 1640、1%ピルビン酸、1%グルタミン、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-ファンギゾン、10%非働化仔ウシ血清、全てInvitrogenからである) において、U底96ウェルプレート中に0.2 \times 10⁶細胞/ウェルにて3連で蒔いた。25、50および100 μ Mの最終濃度のCD31 (551~574) および混雑ペプチドを、細胞を蒔く直前に、ウェル中に沈殿させた。蒔いた細胞を、5%CO₂において37で72時間培養した。(3H)チミジン (0.5 μ Ci/ウェル) を、最後の16時間添加し、増殖を、Tomtec回収器を用いて評価し、Wallacマイクロベータ計数器で解析した。データを、3連におけるcpmの平均 \pm SEMとして表す。

【0127】

インビボ免疫調節の評価

遅延型過敏症 (DTH) の抑制を、「Current Protocols in Immunology (2001) 4.0.1-4.0.2 Unit 4.2」に記載されるように評価した。簡潔には、TNCB (2-クロロ-1,3,5-トリニトロベンゼン、Fluka 番号79874) を、アセトン/オリーブ油 (1:1 v/v) 中に、10mg/mlの濃度で溶解した。BALB/cマウス (n=6/群) を、腹部aの剃毛領域に、合計0.2mlの調製物を塗布することによって準備した (n=6/群)。実験は、ペプチド551~574についての3つの群 (10、50、100 μ M) および10

10

20

30

40

50

0 μMの混雑ペプチドで処置した1つの群を含んでいた)。準備の5日後に、10 μlのTNCB溶媒混合物を、ペプチド551～574または混雑ペプチドの皮下(肩甲骨間)投与の30分後に、右耳介上に塗布した。耳の厚さの増大を、各マウスの右および左の耳介の厚みを差し引くことにより算出し(右-左/左×100)、ダイアル皮脂厚計(「Pocotest」、Kroepelin Langenmesstechnik)で24時間目に測定した。測定を、各耳に対して5回行い、さらなる解析のために平均した。ペプチドの免疫抑制効果を、抑制%=(1-TE/TS)×100〔式中、T=(誘発24時間後の耳の厚み)-(ベースラインの耳の厚み)、E=感作動物、S=処置動物〕として算出した。データを、平均±SEMとして表す。

【0128】

アテローム性動脈硬化症の病変サイズおよび大動脈瘤の形成の検出

本発明者らの飼育施設からの28週齢アポリポタンパク質E^{-/-}の雄マウス(n=8~10マウス/群)を、通常の固形食餌で維持し、標準的な条件下で保った。アテローム性動脈硬化症の促進および大動脈瘤の形成を、以前に記載(Daughertyら J Clin Invest 105:1605-1612)されるように、浸透ミニポンプ(Alzet、番号2004)を用いて、28日間の皮下アンジオテンシンII(Sigma、番号A9525)注入(1mg/kg/d)により誘導した。全ての実験は、本発明者らの機関の倫理委員会により承認された。アテローム性動脈硬化症の病変サイズを、以前に記載(Caligiuriら Arterioscler Thromb Bas c Biol 25:1659-1664)されるように、測定した。これらの実験を2

【0129】

ペプチド

ヒト材料に対する全ての実験を、ヒトペプチド配列を用いて行い、一方で、マウス等価物を、全てのマウス実験において用いた。ペプチドの配列を、以下の表に示す。

【0130】

【表C】

ヒト	NH2 - NHASSVPRSKILTVRVILAPWKK - COOH	配列番号2
マウス	NH2 - SSMRTSPRSSTLAVRVFLAPWKK - COOH	配列番号3
混雑	NH2 - SMPAVRSRFSATSLVTLKSRWPK - COOH	配列番号4

【0131】

実施例2:血液リンパ球の表面でのCD31の見かけ上の消失は、第5の細胞外Ig様ドメインと第6の細胞外Ig様ドメインとの間のその分断に起因する。

消失したCD31がその6つの細胞外Ig様ドメインの一部に制限されるか、または全体に拡張されるかを確立するために、この分子の膜遠位および膜近位Ig様ドメインを特異的に認識する2つの異なる抗体を用いて、5人の健常ドナーからの全血白血球の多色フローサイトメトリー解析を行った。異なる白血球集団間を識別し、かつ成熟および活性のそれらの状態を評価できるようにするため、一団の系譜マーカーならびにCD45RAおよびHLA-DRの発現を、同時に用いた。CD31の第1ドメインに特異的なモノクローナル抗体(クローンWM-59、dom1~2)により検出されるような、CD31の発現を、ナイーブ血液T細胞で認識したが、活性化/記憶血液T細胞では認識しなかった。全ての細胞は、成熟/活性化のそれらの状態にかかわらず、CD31の第6のIg様ドメインに特異的な別のモノクローナル抗体(クローンPECAM1.2、dom6)により検出される分子の膜近位細胞外フラグメントを発現していた(図1)。

【0132】

フロー細胞サイトメトリーは、T細胞レセプター(TCR)の係合が、80%を超える血液休止T細胞について、CD31 dom1⁺/dom6⁺からdom1⁻/dom6

10

20

30

40

50

+ (CD31^{shed}) 表現型への転換を誘導することを示した。培養T細胞溶解物からの膜タンパク質の分子解析は、99%を超えるT細胞結合CD31分子が、インビトロにおいてTCR刺激の5'分後に既に、dom1を含有する遠位部分を脱離させることを実証した(図2a)。上清の解析は、同時に、CD31の初めの5つのIg様ドメインに限定される単一の短縮型可溶性タンパク質が培養上清中に蓄積することを示した(図2b)。さらに、同じ健常ドナーの血漿の解析は、血漿中の大部分の可溶性CD31が、Ig様ドメイン1~5を含み、かつインビトロおよびインビボの双方で見かけ上CD31陰性(CD31^{dom1-})であるリンパ球に常に係留したままである膜近位の第6ドメインを特異的に欠損する短縮型分子から構成されていることを示した(図2b)。最小量の可溶性CD31のみが、培養上清中および血漿中の双方において、以前に報告(Goldbergerら J Biol Chem 269:17183-17191)されていたバリエーション形態で、予測されていた全ての6つの細胞外ドメインを含有していた(図2b)。この分子の有意な他の切断は、第5ドメインの上流で、何ら生じなかった。なぜならば、後者は、実質的に、短縮型可溶性CD31タンパク質における第1ドメインに付随して、常に存在していたからである(図2b)。

【0133】

ここで、活性化/記憶Tリンパ球上でのこの分子の推定される消失は、実際には不完全であり、第5の細胞外Ig様ドメインと第5の細胞外Ig様ドメインとの間でのCD31の分断から生じることが実証される。CD31分断は、Tリンパ球に対する細胞活性化の直後に生じ、上清中の短縮型分子の蓄積を、この細胞により生成される僅かなレベルのスプライズバリエーションと共に伴う。この知見は疑う余地がない。なぜならば、血漿CD31を検出する全ての市販の試験は、CD31ドメイン1~5に対する抗体を用いるものであり、したがって、スプライズバリエーション(6個の細胞外ドメインの全てを含有する)形態のCD31と短縮型(ドメイン1~5)形態のCD31との間を識別できないためである。本明細書中に記載されるサブトラクティブ免疫吸着アッセイは、可溶性CD31の2つの形態間を識別することができ、血漿中のそれらの各々の割合を正確に定量する。このアッセイは、大部分の血漿CD31がドメイン1~5を含むが、血液CD31^{dom1-}リンパ球に係留したままである膜近位の第6ドメインを欠損することを示した。したがって、これらのリンパ球を、CD31「陰性」細胞ではなく、CD31^{shed}細胞と称することを提案する。インビトロにおける以前の研究は、この分子の膜貫通セグメントからN末端にある未同定の位置におけるCD31の分断が、アポトーシスを起こした内皮細胞で生じ得ることを示した(Ilanら、2001、Faseb J 15:362-372)。初めて、分断が血液リンパ球上のCD31(不完全)消失を担うこと、および循環CD31が、分泌されたスプライズバリエーション形態からではなく、Ig様ドメイン5とIg様ドメイン6との間でのその切断に由来する短縮形態から主になることが本明細書中で示された。CD31についての遺伝的多型が記載されているが、可溶性CD31レベルの予測値は、アテローム性血栓症または他の異常免疫疾患のいずれかにおいて矛盾していた。実際、スプライズされた形態の量は、異なる遺伝的バリエーションにより予測することができ、タンパク質の分断から生じる形態の割合は、CD31遺伝子多型により決定されない。異なる研究間の不同性は、循環CD31が遺伝的バリエーションおよび短縮型形態の混合物であり、CD31の2つの形態間の識別が可能ではなかったという事実に起因していたと考えられる。本明細書中に記載されるサブトラクティブ方法は、CD31の分断に関連付けられるものとは無関係に、CD31の遺伝的バリエーションにより決定される予測値の鑑別を可能にする。

【0134】

実施例3: CD31^{shed} T細胞上の残留細胞外CD31フラグメント中に含有されるペプチドは、CD31-ITIMのリン酸化を増進する

このヒト分子の外部ドメインの膜近傍の23個のアミノ酸(551~574)に対応するCD31^{dom6}由来合成ペプチドは、CD31^{dom1+}およびCD31^{dom1-}(CD31^{shed}) CD4⁺Tリンパ球の双方にエキソピボで結合する。重要な

10

20

30

40

50

ことに、T細胞に対するこのペプチドの結合は、免疫細胞の制御に対して機能的な結果をもたらす。なぜならば、それは、インビトロでヒト末梢血T細胞増殖の用量依存性阻害を發揮するからである(図3a)。このペプチドの阻害効果が同種親和性結合およびCD31シグナル伝達の係合によって媒介され得るかどうかを評価するため、培養T細胞における686位のCD31ITIMチロシン(686ITIM)のリン酸化のレベルを評価した。抗CD3抗体および抗CD28抗体のみによるTCRの刺激、またはペプチド単独の存在は、CD31pY686の僅かな増加を誘導した(図3b)が、このペプチドの存在下における付随するTCR刺激は、CD31686ITIMのリン酸化を、23倍を超えてブーストした(図3b)。

【0135】

実施例4：アテローム性血栓症に罹患している患者からの血漿における、および罹患していない個体における分断CD31の検出

CD31の総量、分断CD31の量およびスプライスされたCD31の量を、アテローム性血栓症に罹患している11人の個体、および23人の罹患していない個体の双方において測定した。

【0136】

群「アテローム性血栓症」は、安静時でさえも胸痛に苦しみ、かつ異常な冠状動脈造影を呈する11人の個体を含んでいた。

【0137】

群「アテローム性血栓症なし」は、23人の個体を含んでいた。補足解析を、群「アテローム性血栓症なし」に対して行った。この群は、以下を含むことが判明した。

- 胸痛にかかわらず、正常な冠状動脈造影および正常な頸動脈エコードプラー(carotid echodoppler)を呈する8人の個体；
- 胸痛にかかわらず、正常な冠状動脈造影を呈するが、アテローム性動脈硬化症が頸動脈エコードプラーにより検出された4人の個体；ならびに
- 労作時のみ胸痛に苦しみ、かつ異常な冠状動脈造影を呈する(即ち、血栓症を伴わない、冠状動脈のアテローム性動脈硬化症に罹患している)11人の個体。

【0138】

CD31の総量、分断CD31の量およびスプライスされたCD31の量を、以下のとおり決定した。

1. 総量(1μl/試験)のビーズ(E9、クローンJC70Aとカップリング、DAKO)を、円錐チューブに移し、200gで5分間遠心分離した。上清を注意深く廃棄し、同量の血清強化緩衝液(BD 番号51-9002150)に交換し、室温で15分間インキュベートした。

2. 蛍光標識抗体の抗体混合物(PE-WM59; FITC-HC1/6; PB-PECAM1.2)を調製した(各々1μg/ml、各1μl/条件)。

3. 3μlの標品希釈物または血漿サンプルを各々含有する1個のチューブの前準備物(precondition)を調製した。再構成したビーズを、200gで5分間遠心分離し、上清を廃棄し、血清強化緩衝液を、蛍光標識抗体の混合物に交換した。3μlのこの溶液を、標品希釈物およびサンプルを含有するチューブの各々に分配し、溶液を、暗

中で4にて1時間インキュベートした。

4. 150μlの洗浄緩衝液(BD 番号51-9003797)を、各チューブに添加し、シグナルを得た。

【0139】

以下の表に示されるように、分断CD31の百分率は、全ての個体が胸痛に罹患しているという事実にもかかわらず、罹患していない個体よりも、アテローム性動脈硬化症に罹患している個体において、より高かった。

【0140】

10

20

30

40

【表 D】

CD31血漿レベル (ng/ml)	全体	スプライス	分断
アテローム性血栓症 (n=11)	11.55±0.7	-7.02±2.69	18.57±2.67
アテローム性血栓症なし (N=23)	11.58±0.49	5.26±1.850	6.31±1.85
T検定 Prob>F	0.9756	0.0007	0.0006

【0141】

全体のCD31量は、4つの群において同様であったが、分断CD31の量およびスプライスされたCD31の量は、各々の対をなす群の比較において有意に異なっていた。分断CD31は、異常な冠状動脈造影を伴う個体において増加しており、アテローム性動脈硬化症に罹患している個体が最も高い値を有していた。スプライスCD31は、アテローム性血栓症を伴わないアテローム性動脈硬化症に罹患している患者に依然として存在していたが、それは、アテローム性血栓症に罹患している患者では殆ど検出不能であった。

10

【0142】

これらの結果は、患者が頸動脈粥腫に最終的に付随する非特異的な胸痛に罹患していることを、低レベルの分断CD31に付随する高レベルのCD31可溶性スプライスバリエーションが示すことを実証する。正常レベルまたは減少レベルのCD31可溶性スプライスバリエーションに付随する分断CD31レベルの僅かな増加は、患者がアテローム性動脈硬化症に罹患していることを示す。検出不能な量のCD31可溶性スプライスバリエーションに付随する分断CD31レベルの顕著な増加は、患者がアテローム性血栓症に罹患していることを示す。

20

【0143】

実施例5：タンパク質会合およびリン酸化の定量的評価のためのCBA（登録商標）の使用

8.1. T細胞におけるCD31 ITIM依存性阻害経路を評価するために用いられるプロトコル

細胞の溶解。log相にあるJurkat T細胞（ $10 \times 10^6 / \text{ml}$ 、1ml）は、触れずに放置しておくか（陰性コントロール）、または $\text{Na}_3\text{VO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ （チロシンホスファターゼ阻害剤であるオルトバナジン酸ナトリウム、チロシンリン酸化についての陽性コントロール）と共にインキュベートするかのいずれかであった。並行して、細胞を、抗体媒介架橋によりCD3またはCD3+CD31（ドメイン2、WM-59抗体）のいずれかで刺激した。5%CO₂における37°Cでの20'インキュベーション後に、細胞を、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤のカクテルを含有するRIPA緩衝液により、氷上で30'間溶解した。溶解物を超遠心分離し、上清を直接にまたは分割してのいずれかで用い、さらなる解析のために-20°Cで保存した。

30

【0144】

固体支持体上での標的タンパク質の補足（室温で1時間）。この工程は、免疫沈降の原理にしたがうが、シグナル伝達複合体が変性も低減もせず、かつ如何なる電気泳動および/またはプロットングも行われない。固相支持体として、膜近位CD31 Ig様ドメイン6に対する抗体（PECAM1.2とも呼ばれるクローンMBC78.2）と予めカップリングしたCBA（登録商標）機能性ビーズを、製造業者の使用説明書にしたがって用いた。各条件からの20μlの溶解物上清の分割物を、5μl PECAM1.2-CBA（登録商標）と共に、室温で1時間インキュベートした。

40

【0145】

CD31に会合した分子およびCD31 ITIM 686のリン酸化状態の検出。ビーズをCBA洗浄緩衝液（100μl/チューブ）で一回洗浄した後、ビーズを、4つの別々のチューブ中に分割し、以下に対する蛍光抗体と共にインキュベートした：

- CD3 - FITC；

50

- CD28 - PE ;
- CD31ドメイン6 (PECAM1.2 FITC)
- CD31ドメイン2 (WM-59 PE)
- ホスホチロシン (クローン4G10 FITC) ;
- ホスホセリン / スレオニン (FITCで標識)
- CD31ホスホチロシン686 (alexaf luor 488抗ウサギ二次抗体と結合したウサギポリクローナル) ;あるいは
- SHP2 - PE。

【0146】

暗中における室温での1時間のインキュベーション後、ビーズを100 μ l CBA洗浄緩衝液で一回洗浄し、600個を超えるビーズを、LSR IIおよびDIVA (登録商標)ソフトウェアを用いて得た。 10

【0147】

4. 解析。各蛍光チャンネルにおける中央蛍光値を記録した。DIVA (登録商標)ソフトウェアもまた、%CV (変動係数)を算出した。これは、繰り返した測定についての誤差パー値の等価物として考慮することができ、サンプル間の統計的比較を可能にする。

【0148】

(8.2.結果)

結果を、以下の表に示す。

【0149】

【表E】

20

		(ng/ml) CD31 dom6	(ng/ml) CD31 dom2	%分断 CD31	MFI pY (4G10)	MFI pSer/pThreo
陰性 コントロール	未刺激	19	18	5	485	284
陽性 pYコントロール	Na3VO4/H2O2	103	77	25	1205	324
T細胞 活性化	CD3架橋	9080	83	99	2681	130
抗体 CD31 処置	CD3+CD31架橋	2389	46	98	2312	267
ペプチド CD31 処置	CD3架橋+CD31 ペプチド	10962 ¹	67 ²	99	3277 ³	329

30

【0150】

40

【表 F】

	MFI CD31 pY686	MFI SHP-2	MFI CD3	MFI CD28
陰性コントロール	1578	165	197	8165
陽性pYコントロール	10667	193	354	3932
T細胞活性化	4198	90	17876	25169
抗体CD31 処置	2268	149	2425	17147
ペプチドCD31処置	96632 ³	185 ⁴	20096 ⁵	24306 ⁵

10

【0151】

太字の値は、CD3架橋条件に対する増加を示し、イタリック体の値は、減少を示す。

【0152】

¹ 係合したCD31分子は、シス(cis)でオリゴマー化する。CD31分子は、T細胞活性化において調節性分子として生理学的に係合しており、このことは、T細胞刺激サンプルにおけるCD31ドメイン6量の増加を説明する。

【0153】

² CD31のドメイン2のみが検出された場合、補足分子の量は全てのサンプルにおいて同様であったと結論付ける。実際、殆どのCD31シスオリゴマー化分子は、「%分断」の欄に示されるように、T細胞活性化の際にドメイン6と2との間で分断する。

20

【0154】

³ 総ホスホチロシンは、CD31抗体処置により僅かに減少したが、それは、CD31ペプチド処置により僅かに増加した。実際、CD31 ITIMのみならず、T細胞活性化の際にCD31と会合している他の膜タンパク質(例、CD3およびCD28)上に存在するチロシンもまた、リン酸化されることができる。CD31ホスホITIMに特異的な差異は、配列特異的ホスホITIMに対する抗体を用いることにより検出することができた。ホスホチロシンのみならず、ホスホセリン/スレオニンもまた増加する。これらのアミノ酸は、CD31細胞質テイルまたは会合した分子のうちのいずれかにおいてリン酸化されることができる。

30

【0155】

⁴ CD31に会合したSHP-2の量は、抗体処置により50%、およびペプチド処置により100%増加する。

【0156】

⁵ 活性化レセプター(CD3)およびCD31に会合している共刺激分子(CD28)の量は、抗体処置により減少するが、それらは、CD31ペプチドにより増加する。これは、T細胞活性化に反対に作用するCD31 ITIMリン酸化の劇的増加の観点から、細胞の対抗調節機構として考えることができる。

【0157】

8.3. 結論

全てのこれらのデータを、非常に少量の同じサンプル(20 μl)から開始して得た。多色フローサイトメトリーの使用は、同時様式におけるそれらの解析を保障する。標品の利用可能性は、シグナル伝達複合体中の各分子の絶対量の正確な決定を可能にする。

40

【0158】

上記実験を、FITC(FL1)またはPE(FL2)結合抗体のいずれかを用いて行った。タンパク質補足のための非蛍光ビーズの使用は、青色レーザーにおける使用のための少なくとも2つの他の蛍光団の使用を可能にする(PerCPまたはPE-Cy7またはPE-Cy5、FL3およびAPCまたはCy5、FL4)。細胞測定に対するさらなるレーザー(赤色、紫色、uv)の利用可能性はさらに、この方法の能力を拡張する。1

50

7個までの異なる蛍光抗体を同時に用いることができ、したがって、17個までの異なるパラメータ（会合している膜タンパク質、シグナル伝達分子、リン酸化配列）を、確保できる多数のビーズに起因する強力な統計値を伴って、同じサンプルに対して同時に検出することができる。

【0159】

上記方法は、先行技術の方法に比較して、多くの利点を有する。以下の表は、この方法を共IP/WB、CBAFlexおよびCASE/Phosflowと比較する。

【0160】

【表G】

操作	IP/WB	CBAFlex	Phoflow/CASE	本発明の方法
タンパク質抽出	30分	30分	N/A	30分
免疫沈降	1-12時間	N/A	N/A	N/A
SDS-PAGE	2時間	N/A	N/A	N/A
プロット	2時間	N/A	N/A	N/A
固定	N/A	N/A	1時間	N/A
ブロッキング	1時間	N/A	1時間	N/A
一次抗体	1-18時間	1時間	1時間	1時間
洗浄	30分	5分	15分	0-5分
二次抗体	1時間	N/A	1時間	N/A
洗浄	30分	N/A	15分	N/A
検出發色	60分	N/A	15分	N/A
データの取得	1時間	10秒未満/ サンプル	15分	10秒未満/ サンプル
複数-標的	N/A	20個まで	2個以上	20個まで
時間	~12-36時間	~1.5時間	~7時間	~1.5時間
サンプルのサイズ	100 μ L以上	20-50 μ l	50 μ L以上	5 μ l以下
特異的な相互作用	有り(1つ)	N/A	N/A	有り(1つ以上)

10

20

30

【0161】

共IP/WBに比較して、この方法は、定量的、直接的かつはるかにより迅速である。また、それは、標的タンパク質、ホスホ分子ならびに会合している膜および細胞内分子の同時検出を可能にする。それはまた、はるかにより多くのパラメータの同時解析を可能にする。なぜならば、ウェスタンプロットは、限定された回数で再ハイブリダイズするに過ぎず、一方、細胞測定器の最新の世代によるこの方法の枠組みでは、20個までの抗体を同時に用いることができるためである。

【0162】

CASE/Phosflow、またはCBA Flexセットに比較して、この方法は、はるかにより特異的である。なぜならば、標的分子を補足し、分子複合体内の相互作用を解析できるためである。また、それは、標的タンパク質、ホスホ分子ならびに会合している膜および細胞内分子の同時検出を可能にする。

40

【0163】

実施例6：プロトコルの最適化

5 μ lのサンプルを、蛍光団にカップリングされた、機能性CBAビーズに固定したモノクローナルMEM-05抗体（CD31ドメイン5、Exbio、Caltag）、WM-59（CD31ドメイン2）およびPECAM 1.2（MBC 78.2とも呼ばれる、CD31ドメイン6）を含有する1 μ lの混合物と共に、暗転において4にて30~60'間インキュベートする。インキュベーション後、ビーズを、200 μ lのアッ

50

セイ希釈緩衝液で希釈し、得た。1000個を超えるゲートしたビーズに対するPEおよびFITCチャンネルの中央蛍光強度を、サンプルおよび標品（組換え、全長細胞外CD31、R&D Systems）の連続希釈物に対して解析した。多様な抗体の結合特性における差異に起因する任意の偏りを克服するために、2つの標準曲線を、組換えCD31と同時に用いられた検出抗体の各々で得た。ドメイン2、5および6に対する3つの識別抗体により、完全なCD31を、ドメイン6（6）を欠損するCD31から、ドメイン5および6（5~6）の双方を欠損するCD31から識別することが可能である。

【0164】

試験の特異性を向上させるため、CD31ドメイン1に対するモノクローナル抗体（クローンJC70A、Dako）を、補足ビーズにカップリングさせる。検出は、CD31ドメイン2（WOM-59、BD）、ドメイン5（HC1/6、Biosource）およびドメイン6に対する3つの蛍光抗体に基づく。精製したPECAM 1.2/MBC 78.2を、適切な蛍光団とカップリングする。現在の機能性ビーズでは、蛍光団の最適なセットは、FITC、PEおよびPerCPである。この組合せは、病院の生物実験室において利用可能である任意の基本的な青色レーザー細胞測定器（FACSscan、FACS caliberなど）での測定を可能にする。

10

【0165】

蛍光団としてのFITCおよびPEにより（実施例5を参照）、最低の検出限界は、3ng/mlである。これは、アテローム性血栓症に罹患する高い危険性を呈する患者におけるスプライスCD31の陰性値を生じる。これとは対照的に、異なる蛍光団は、感度の向上につながり得る。したがって、蛍光団および抗体の異なる組合せを試験する。

20

【0166】

実施例7：BIOcoreコホートの解析

患者のコホートを解析した。個体を、実施例4に示されるように、異なる群に分類した。

【0167】

細胞測定による細胞解析により、短縮型（分断）CD31を示すT（CD3+）リンパ球が急性冠状動脈事象の危険性のある患者において有意により高いことが確認された（表1を参照）。

30

【0168】

【表1】

表1

群によるCD31shed (CD3細胞の%) の一元配置 (oneway) 解析					
レベル	ーレベル	差異	より低いCL	より高いCL	p値
ACS	Norm	16.06119	10.7395	21.38292	<0.0001*
ACS	Carotide	15.99231	9.6004	22.38419	<0.0001*
ACS	SA	12.79007	7.9876	17.59257	<0.0001*
SA	Norm	3.27111	-2.2928	8.83498	0.2462
SA	Carotide	3.20223	-3.3926	9.797.9	0.3377
Carotide	Norm	0.06888	-6.9132	7.05092	0.9844

40

【0169】

上記表では、「ACS」は、急性冠状動脈症候群を表し、「Carotide」は、末梢アテローム性動脈硬化症を表し、「Norm」は、正常な冠状動脈の血管造影を表し、「SA」は安定な狭心症を表す。

【0170】

亜集団の解析は、この結論がCD4+T（CD3+）細胞およびCD8+T（CD3+）細胞の双方で有効であることを示した（それぞれ、表2および3を参照）。

50

【 0 1 7 1 】

【 表 2 】

表 2

群によるCD31shed (CD4細胞の%) の一元配置解析					
レベル	ーレベル	差異	より低いCL	より高いCL	p 値
ACS	Carotide	26.37179	18.2050	34.53856	<0.0001*
ACS	Norm	19.24452	12.4451	26.04397	<0.0001*
ACS	SA	16.43631	10.3003	22.57235	<0.0001*
SA	Carotide	9.93548	1.5094	18.36157	0.0213*
Norm	Carotide	7.12727	-1.7935	16.04806	0.1161
SA	Norm	2.80821	-4.3006	9.91704	0.4351

10

【 0 1 7 2 】

【 表 3 】

表 3

群によるCD31shed (CD8細胞の%) の一元配置解析					
レベル	ーレベル	差異	より低いCL	より高いCL	p 値
ACS	Carotide	8.364103	2.10954	14.61867	0.0093*
ACS	Norm	6.664452	1.45706	11.87185	0.0126*
ACS	SA	4.435567	-0.26376	9.13489	0.0640
SA	Carotide	3.928536	-2.52463	10.38171	0.2300
SA	Norm	2.228886	-3.21545	7.67322	0.4186
Carotide	Carotide	1.699650	-5.13239	8.53169	0.6227

20

【 0 1 7 3 】

また、血漿解析により、総可溶性CD31のレベルは、群間を識別できなかったことが確認された(表4を参照)。

【 0 1 7 4 】

30

【 表 4 】

表 4

群による総可溶性CD31 (ng/ml) の一元配置解析					
レベル	ーレベル	差異	より低いCL	より高いCL	p 値
Norm	ACS	1.017336	-0.71748	2.752148	0.2474
Norm	SA	0.965691	-0.84806	2.779439	0.2934
Norm	Carotide	0.825823	-1.45023	3.101875	0.4733
Carotide	ACS	0.191513	-1.89216	2.275182	0.8557
Carotide	SA	0.139868	-2.00997	2.289702	0.8976
SA	ACS	0.051645	-1.51391	1.617195	0.9480

40

【 0 1 7 5 】

血漿中のスプライスCD31および分断CD31の測定を可能にする、本発明の方法のみが、急性冠状動脈症候群を診断および/または予知するために適応できる(それぞれ、表5および6を参照)。

【 0 1 7 6 】

【表 5】

表 5

群によるスプライスCD31 (ng/ml) の一元配置解析					
レベル	ーレベル	差異	より低いC L	より高いC L	p 値
Norm	ACS	4.723988	1.97055	7.477428	0.0010*
SA	ACS	3.288827	0.80403	5.773619	0.0100*
Carotide	ACS	3.255752	-0.05138	6.562888	0.0536
Norm	Carotide	1.468236	-2.14424	5.080714	0.4220
Norm	SA	1.435162	-1.44356	4.313886	0.3250
SA	Carotide	0.033074	-3.37908	3.445224	0.9847

10

【 0 1 7 7 】

【表 6】

表 6

群による分断CD31 (ng/ml) の一元配置解析					
レベル	ーレベル	差異	より低いC L	より高いC L	p 値
ACS	Norm	3.707532	0.87674	6.538321	0.0108*
ACS	SA	3.238062	0.68347	5.792657	0.0135*
ACS	Carotide	3.065120	-0.33492	6.465159	0.0767*
Carotide	Norm	0.642412	-3.07155	4.356373	0.7322
SA	Norm	0.469470	-2.49012	3.429064	0.7537
Carotide	SA	0.172942	-3.33506	3.680946	0.9223

20

【 0 1 7 8 】

特に、分断可溶性CD31の割合(全体の%)は、急性冠状動脈症候群、安定な冠状動脈疾患および末梢アテローム性動脈硬化症の間を区別するために非常に有用である(表7を参照)。

30

【 0 1 7 9 】

【表 7】

表 7

群による分断CD31 (CD31の総可溶性形態の%) の一元配置解析					
レベル	ーレベル	差異	より低いC L	より高いC L	p 値
ACS	Norm	22.00424	8.4993	35.50915	0.0017*
ACS	Carotide	18.24801	2.0274	34.46865	0.0278*
ACS	SA	18.06073	5.8735	30.24799	0.0041*
SA	Norm	3.94351	-10.1759	18.06290	0.5808
Carotide	Norm	3.75623	-13.9620	21.47449	0.6750
SA	Carotide	0.18729	-16.5484	16.92299	0.9823

40

【 0 1 8 0 】

重要なことに、スプライスおよび分断CD31の患者の血漿における測定(総CD31のものではない)が、主要な有害な心血管事象(MACE、死亡、致命的または非致命的な心筋梗塞など)の再発を予測することを可能にすることもまた見出された。

【 0 1 8 1 】

【表 8】

表 8

以下の一元配置解析	1 元配置試験、カイ2乗近似		
	カイ2乗	DF	Prob > カイ2乗
MACEによる総CD31 (ng/ml)	0.1564	1	0.6925
MACEによるスプライスCD31 (ng/ml)	5.0064	1	0.0253*
MACEによる分断CD31 (ng/ml)	4.4985	1	0.0339*

10

【0182】

実施例 8：炎症疾患の診断および/または予後マーカーとしての分断CD31

本発明の方法を用いる可溶性スプライスおよび分断CD31の測定が、慢性炎症疾患を患う患者における処置不全の危険性を評価するために役立てることができるかどうかを調査した。

【0183】

関節リウマチまたは脊椎関節症のいずれかに冒された73人の患者からのデータを収集した。

【0184】

CD31の血漿レベルは、患者の予後および生物療法に対する陽性応答と関連することが見出された(図6Aを参照)。これは、現在のところ用いられているバイオマーカー(ESRおよびCRP)によっては予測できなかった。

20

【0185】

上記患者は、非常に重篤な炎症に罹患していた。このような場合には、分断CD31のレベルは、ベースライン値よりも数倍(1000ng/mlよりもさらに)に上昇し得、結果として、総可溶性CD31の有意な上昇につながる。したがって、分断CD31のみならず、総可溶性CD31もまた、炎症が非常に重篤である場合には、炎症に対するバイオマーカーとして用いることができる。

【0186】

しかしながら、炎症状態がより明白でない患者では、総可溶性CD31からの分断CD31の鑑別が必要とされる。

30

【0187】

実施例 9：可溶性GPVIの血漿レベルの測定

本発明の方法を、可溶性GPVIの血漿レベルを測定するために適応させた。可溶性形態のGPVIは、活性化の際に血小板から切り出され、これは、危険性のある患者における血栓形成の発生を評価し得る。

【0188】

(i)補足用の抗体(CBAビーズにカップリング)；および(ii)検出用のGPVI(コンブルキシン)の蛍光標識天然リガンドを用いる血漿中の分断GPVIを測定するための再現性のある方法を設定した。補足用の抗体は、クローン番号3j24.2またはクローン番号9012.2のいずれかであった。これらの2つのモノクローナル抗体は、WO/2001/000810として公開された特許出願番号PCT/US2000/018152に記載されている。これらの抗体は、GPVIの外部ドメインに局在しているエピトープを特異的に認識する。

40

【0189】

如何なる現在のELISAも、この新しい方法の感度および精度を達成できない(図6Bを参照)。標準曲線は、組換えGPVI二量体および組換えGPVI単量体の双方で得ることができる。この知見は価値がある。なぜならば、GPVIは、切断される直前の血小板活性化の際に二量体化するためである。分断後に、それは、二量体として、および単

50

量体としての双方で循環し、機能および/または診断的な価値は、二量体状態に依存して異なり得る。

【0190】

したがって、本発明の方法は、個体の血漿中における二量体および単量体の分断GPVIを測定することを可能にする。

【0191】

具体的には、GPVIの分断形態の検出は、以下のとおりに行うことができる。GPVIスプライス形態は、細胞質テイルを含み、したがって、マルトース結合タンパク質(MBP)-GPVI細胞質テイルの融合タンパク質(Suzuki-Inoueら J Biol Chem. 2002 277:21561-6)に対して惹起されたもの等の、細胞質テイルを認識する特異的な抗体を用いて検出することができる。一方、分断形態のGPVIは、完全な外部ドメインを含む。したがって、本発明の方法は、補足用の別々のビーズ上の特異的な抗体(抗テイルおよび抗外部ドメイン)および検出用の蛍光標識コンプレキシン、またはその逆(コンプレキシンにカップリングしたビーズによる補足、および差示的に標識された蛍光抗テイルおよび抗外部ドメイン抗体による検出)のいずれかを用いて行われる。

10

【配列表フリーテキスト】

【0192】

(配列の簡単な説明)

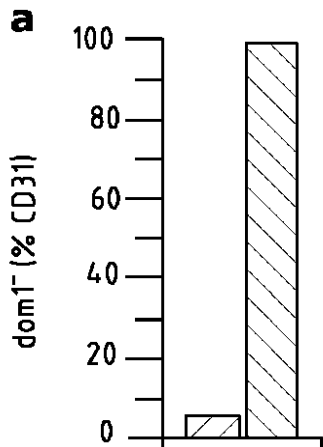
配列番号1は、ヒトCD31の配列に対応する。

配列番号2および3は、CD31ペプチドに対応する。

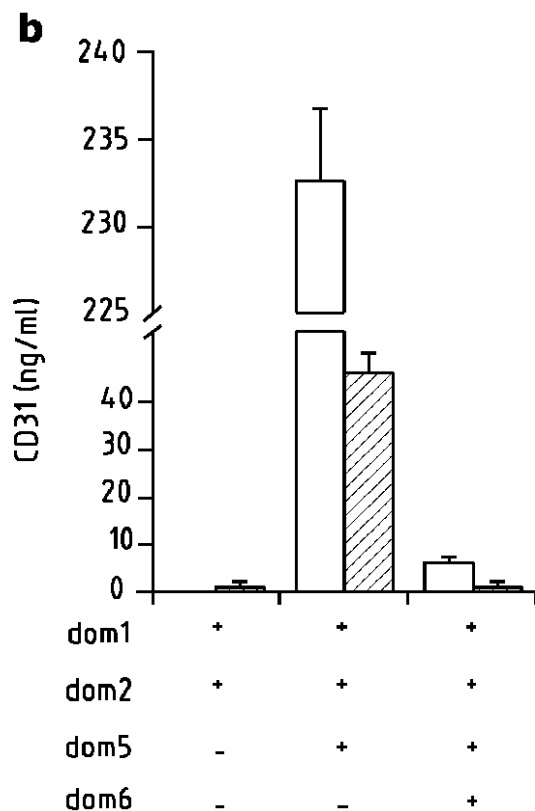
配列番号4は、ネガティブコントロールとして用いられる混雑ペプチドに対応する。

20

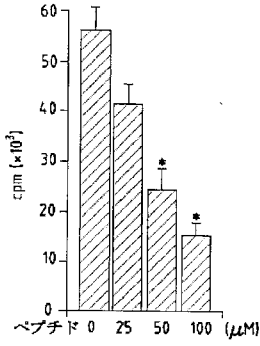
【図2a】



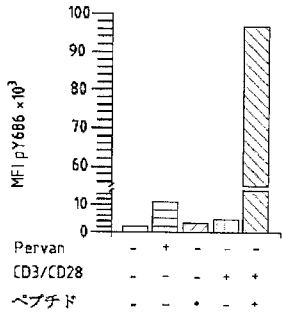
【図2b】



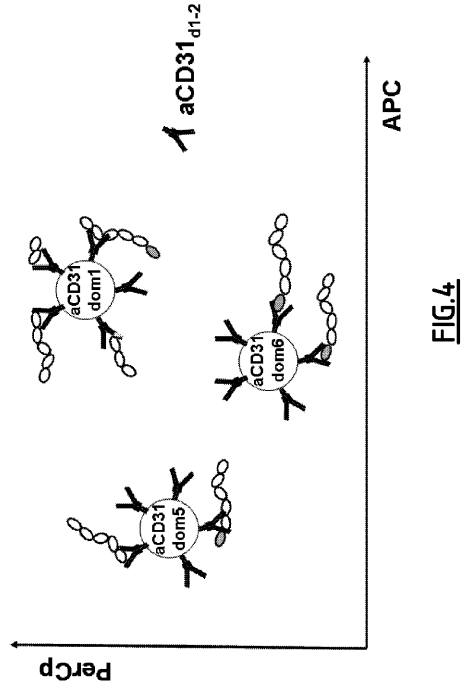
【 図 3 a 】



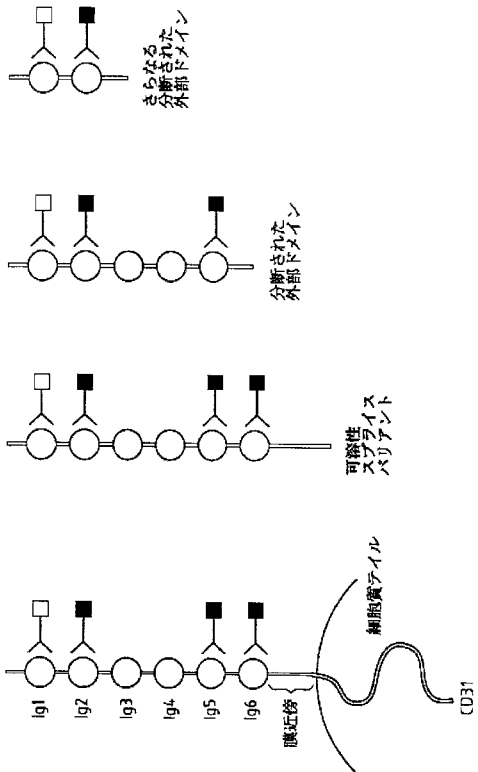
【 図 3 b 】



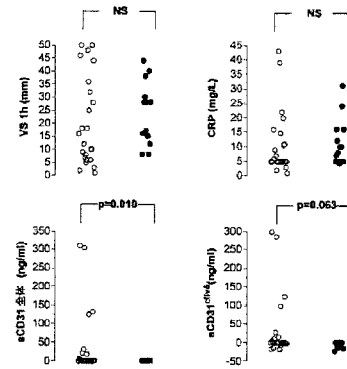
【 図 4 】



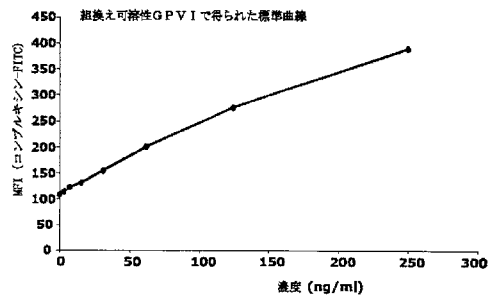
【 図 5 】



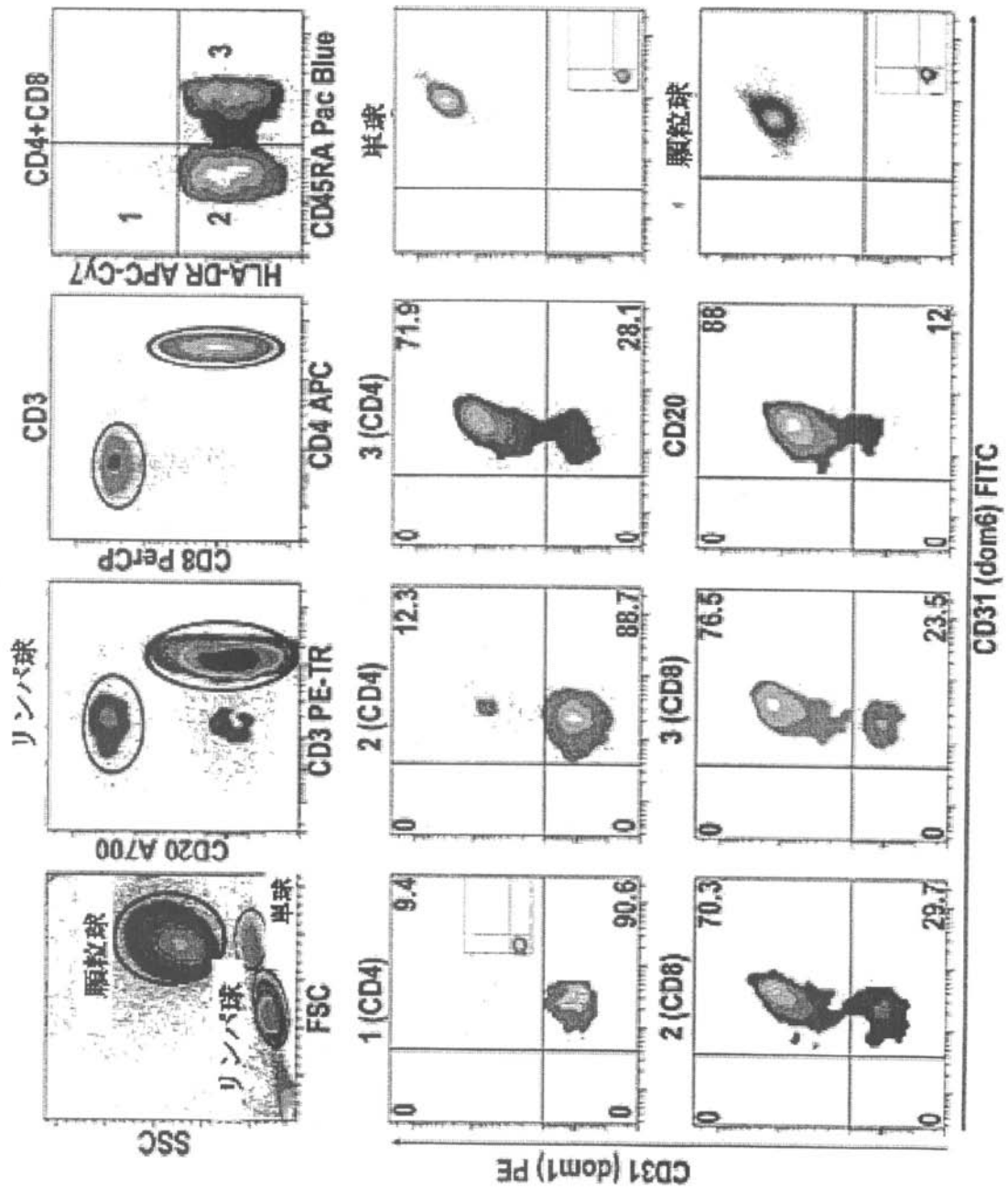
【 図 6 a 】



【 図 6 b 】



【 図 1 】



【 配列表 】

2011526681000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/058220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/543 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PREVOST JAY M ET AL: "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and inflammatory stimuli up-regulate secretion of the soluble GM-CSF receptor in human monocytes: Evidence for ectodomain shedding of the cell surface GM-CSF receptor alpha subunit." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 169, no. 10, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 5679-5688, XP002499371 ISSN: 0022-1767	1-8, 11, 14-17
A	abstract page 5682, column 1, paragraph 4 - page 5683, column 2, paragraph 2 ----- -/--	9-10, 12-13
<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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 October 2009	Date of mailing of the international search report 23/10/2009	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Thumb, Werner	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/058220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 2007/233391 A1 (MILSTEIN CESAR [GB] ET AL) 4 October 2007 (2007-10-04) abstract paragraphs [0044] - [0046], [0066], [0167] - [0171], [0611], [0612]	1-8, 11, 14-17 9-10, 12-13
Y A	US 2007/224628 A1 (GORDON NEAL F [US] ET AL) 27 September 2007 (2007-09-27) paragraphs [0030], [0034] - [0038], [0042], [0048] - [0050]	1-8, 11, 14-17 9-10, 12-13
X	MINAGAR A ET AL: "Plasma from MS patients in exacerbation induces shedding of PECAM-1 from cultured cerebral microvascular endothelial cells (CMVEC)" ABSTRACTS OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 26, no. 1-2, 5 November 2000 (2000-11-05), XP009106475 ISSN: 0190-5295 the whole document	12-15
Y	SUN QI-HONG ET AL: "Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 19, 1996, pages 11090-11098, XP002499372 ISSN: 0021-9258 abstract page 11090, column 2, paragraph 4	16-17
Y	WO 02/080968 A1 (MILLENNIUM PHARM INC [US]) 17 October 2002 (2002-10-17) abstract page 3, line 27 - page 4, line 7 page 33, line 7 - page 34, line 8. page 51, line 28 - page 52, line 3	8
Y	WO 2007/116779 A1 (MOCHIDA PHARM CO LTD [JP]; HOSAKA YOSHITAKA [JP]; NAITOH KATSUKI [JP];) 18 October 2007 (2007-10-18) the whole document in particular Examples 19-24 & EP 2 000 802 A1 (MOCHIDA PHARM CO LTD [JP]) 10 December 2008 (2008-12-10)	8

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/058220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERNDT M C; KARUNAKARAN D; GARDINER E E; ANDREWS R K: "Programmed autologous cleavage of platelet receptors" JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS - STATE OF THE ART 2007: XXI CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 200707 GB, vol. 5, no. SUPPL. 1, July 2007 (2007-07), pages 212-219, XP002546755 abstract page 214, column 2 - page 215, column 1, paragraph 1	8
A	----- WEI H ET AL: "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene polymorphism and its soluble level are associated with severe coronary artery stenosis in Chinese Singaporean" CLINICAL BIOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, XX, vol. 37, no. 12, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 1091-1097, XP004675933 ISSN: 0009-9120 abstract	1-17
A	----- SREBRUANY V L ET AL: "Effect of thrombolytic therapy on platelet expression and plasma concentration of PECAM-1 (CD31) in patients with acute myocardial infarction" ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, vol. 19, no. 1, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 153-158, XP002369623 ISSN: 1079-5642 abstract	1-17
A	----- WATKINS N A; O'CONNOR M N; RANKIN A; JENNINGS N; WILSON E; HARMER I J; DAVIES L; SMETHURST P A; DUDBRIDGE F; FARNDAL R W; OUWEHAN: "Definition of novel GP6 polymorphisms and major difference in haplotype frequencies between populations by a combination of in-depth exon resequencing and genotyping with tag single nucleotide polymorphisms." JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS : JUN 2006, vol. 4, no. 6, June 2006 (2006-06), pages 1197-1205, XP002546756 ISSN: 1538-7933 the whole document	8
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/058220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RABESANDRATANA HERISOA ET AL: "Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during in vitro maturation of reticulocytes" BLOOD, vol. 91, no. 7, 1 April 1998 (1998-04-01), pages 2573-2580, XP002515169 ISSN: 0006-4971	18-19
Y	abstract page 2573, column 2, paragraph 4 - page 2574, column 1, paragraph 5 page 2575, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1	20
X	WO 01/09608 A (BIOERGONOMICS INC [US]; COLLINS DANIEL P [US]) 8 February 2001 (2001-02-08) page 1, line 30 - page 2, line 32 figure 1	18
Y	DATABASE MEDLINE US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; March 2008 (2008-03), LIU XIN-GUANG ET AL: "[Determination of platelet-associate autoantibodies against platelet-specific receptors by cytometric bead array and its clinical application in idiopathic thrombocytopenic purpura]" XP002515171 abstract & ZHONGHUA XUE YE XUE ZA ZHI = ZHONGHUA XUEYEXUE ZAZHI MAR 2008, vol. 29, no. 3, March 2008 (2008-03), pages 175-178,	18-20
Y	NEWMAN PETER J ET AL: "Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology." ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY 1 JUN 2003, vol. 23, no. 6, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 953-964, XP002515170 ISSN: 1524-4636 the whole document	20
Y	WO 03/012047 A (AGENSYS INC [US]) 13 February 2003 (2003-02-13) the whole document	18-20
A	US 2003/235863 A1 (SKLAR LARRY A [US] ET AL SKLAR LARRY A [US] ET AL) 25 December 2003 (2003-12-25) the whole document	18-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/058220**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2009/058220

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17

Methods for detecting a shed ectodomain of a transmembrane protein in a biological sample and for distinguishing said shed ectodomain from protein isoforms obtained from alternative splicing.
Kits containing components for performing said methods.

2. claims: 18-20

A method for identifying components of a molecular complex.
A kit containing components for performing said method.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/058220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007233391 A1	04-10-2007	AU 2003219275 A1	16-09-2003
		CA 2478288 A1	12-09-2003
		EP 1481249 A1	01-12-2004
		WO 03075016 A1	12-09-2003
		US 2008318836 A1	25-12-2008
		US 2009181863 A1	16-07-2009
US 2007224628 A1	27-09-2007	AU 2007231009 A1	04-10-2007
		CA 2647042 A1	04-10-2007
		EP 2005192 A2	24-12-2008
		US 2007224704 A1	27-09-2007
		WO 2007112012 A2	04-10-2007
WO 02080968 A1	17-10-2002	NONE	
WO 2007116779 A1	18-10-2007	CA 2646807 A1	18-10-2007
		EP 2000802 A1	10-12-2008
EP 2000802 A1	10-12-2008	CA 2646807 A1	18-10-2007
		WO 2007116779 A1	18-10-2007
WO 0109608 A	08-02-2001	AT 343788 T	15-11-2006
		AU 768736 B2	08-01-2004
		AU 6392200 A	19-02-2001
		BR 0013298 A	02-04-2002
		CA 2380487 A1	08-02-2001
		CN 1382258 A	27-11-2002
		DE 60031548 T2	30-08-2007
		EP 1203236 A1	08-05-2002
		ES 2275528 T3	16-06-2007
		JP 4111712 B2	02-07-2008
		JP 2003506684 T	18-02-2003
		US 2002132231 A1	19-09-2002
		US 2009011443 A1	08-01-2009
		US 2002012907 A1	31-01-2002
		ZA 200200809 A	25-06-2003
WO 03012047 A	13-02-2003	AT 327256 T	15-06-2006
		AU 2002322776 B2	09-03-2006
		CA 2454133 A1	13-02-2003
		DE 60211714 T2	10-05-2007
		EP 1419277 A2	19-05-2004
		ES 2261708 T3	16-11-2006
		JP 2005500359 T	06-01-2005
		US 2003040026 A1	27-02-2003
		US 2003036099 A1	20-02-2003
		US 2003235863 A1	25-12-2003

 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, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, 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

(72)発明者 カリギウリー, ジュゼッピナ

フランス国, F - 7 5 0 1 8 パリ, リュ アンリ ウシャール 4 6, アンセルム セクトール クロード ベルナール - グルブ オスピタリエ ビシャ, アンセルム U 6 9 8 - バ

(72)発明者 ニコレッティ, アントニオ

フランス国, F - 7 5 0 1 8 パリ, リュ アンリ ウシャール 4 6, アンセルム セクトール クロード ベルナール - グルブ オスピタリエ ビシャ, アンセルム U 6 9 8 - バ

Fターム(参考) 2G043 AA01 AA03 BA16 DA05 EA01 FA01 KA03 KA09 LA03

2G045 AA25 DA36 DA44 FB03 GC15

专利名称(译)	检测脱落的CD31，诊断动脉粥样硬化血栓形成和自身免疫性疾病，以及分析信号通路的方法		
公开(公告)号	JP2011526681A	公开(公告)日	2011-10-13
申请号	JP2011515442	申请日	2009-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	研究所，国家，德，拉，城主，D，德，拉，RECHERCHE，医疗（安瑟伦）		
[标]发明人	カリギウリー,ジュゼッピナ ニコレッティアントニオ		
发明人	カリギウリー,ジュゼッピナ ニコレッティ,アントニオ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/49 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/6878 G01N15/0205 G01N33/54313 G01N2333/70503 G01N2800/226 G01N2800/24 G01N2800/52 Y10S435/968 Y10S435/973		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.575 G01N33/49.K G01N33/53.V G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/DA05 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/KA03 2G043 /KA09 2G043/LA03 2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/DA44 2G045/FB03 2G045/GC15		
代理人(译)	酒井宏明		
优先权	2008305361 2008-06-30 EP 2009305116 2009-02-09 EP		
其他公开文献	JP5866198B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题是通过更好地理解CD31的生物学功能来提供更好的工具来诊断与T细胞活化相关的疾病，如血栓形成疾病和自身免疫性疾病 本发明基于以下发现：存在于血液白细胞上的CD31蛋白的胞外结构域被切断并作为可溶形式的CD31释放到循环中由于。还公开了一种用于检测中断的CD31的方法。因此，本发明涉及用于检测诸如CD31的跨膜蛋白的破坏的胞外结构域的方法，以及这种方法作为诊断工具的用途。本发明进一步提供了用于确定候选蛋白质是否是分子复合物的一部分的方法。【选型图】无

ドメイン	配列番号1に対する位置
シグナルペプチド	1~27
細胞外ドメイン	28~601
第1のIg様細胞外ドメイン	34~121
第2のIg様細胞外ドメイン	145~233
第3のIg様細胞外ドメイン	236~315
第4のIg様細胞外ドメイン	328~401
第5のIg様細胞外ドメイン	424~493
第6のIg様細胞外ドメイン	499~591
膜近傍ドメイン	592~601
膜貫通ドメイン	602~620
細胞質ドメイン	621~738