

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-73273

(P2012-73273A)

(43) 公開日 平成24年4月12日(2012.4.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/49 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/49	X
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2011-290232 (P2011-290232)	(71) 出願人	592221528
(22) 出願日	平成23年12月29日 (2011.12.29)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2008-541395 (P2008-541395) の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ センター 14
原出願日	平成18年11月17日 (2006.11.17)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/737, 488		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成17年11月17日 (2005.11.17)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/804, 843	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成18年6月15日 (2006.6.15)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板凝集アッセイ

(57) 【要約】

【課題】血小板凝集を決定する方法、CD40L結合部分の投与の際の凝固に対する感受性を決定する方法、およびそれらに関するキットを提供すること。

【解決手段】血小板の凝集をアッセイする方法であって、血小板と血小板活性化因子とを接触させる工程；活性化した該血小板と、CD40L結合部分とを接触させる工程；および該活性化血小板と架橋因子とを接触させる工程、を包含し、該CD40L結合部分と該架橋因子とは予め形成された免疫複合体ではなく、そして沈殿した血小板が、該血小板の凝集の指標となる、方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

明細書中に記載の発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、部分的に、血小板の凝集を測定する方法、抗CD40L抗体の投与の際の凝固に対する感受性を決定する方法、およびそれらに関連するキットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

(発明の背景)

血栓塞栓合併症(TEC)が、抗CD40L(CD40Lとは、CD40リガンドの略語であり、CD154としても公知)抗体、特に抗CD40Lに対するヒト化モノクローナル抗体のいくつかの臨床試験において観察されている。活性化T細胞によって発現されることが知られているが、CD40Lはまた、活性化ヒト血小板の表面上に存在することもまた示されており、インビトロで内皮細胞における役割を果たし得る(非特許文献1)。しかしながら、血小板/内皮細胞相互作用のレベルにおけるインビトロでの凝固の制御における、CD40/CD40L経路の役割は、まだ明らかにされていない。

## 【0003】

CD40Lは、活性化T細胞において発現されることが最初に記載された、II型膜タンパク質である。CD40Lと、そのレセプターであるCD40との相互作用は、B細胞分化、増殖、およびヘルパーT細胞によって誘導される免疫グロブリン(Ig)アイソタイプスイッチのために重要である(非特許文献2;および非特許文献3)。血小板と内皮細胞との相互作用におけるCD40/CD40L経路の関与が、最近報告された(非特許文献1)。正常の状態下では、CD40Lは血小板に保管される。活性化の際に、CD40Lは、CD63、P-セレクチン、およびいくつかの他のタンパク質の表面出現、および血小板内顆粒からの可溶性メディエーターの放出を伴って、血小板の表面に移行する(非特許文献4)。そのようにして、CD40Lは凝固前の活性における役割を果たし得る。

## 【0004】

可溶性DC40L(sCD40L)のレベルの上昇は、狼瘡患者の血液において見出されている(非特許文献5;および非特許文献6)。IgのFc部分に対する自己抗体であるリウマチ因子(RF)は、しばしば、自己免疫疾患の患者の血清において検出される(非特許文献7)。したがって、抗CD40L抗体の投与は、抗CD40L抗体に対する抗体の産生をもたらし得る。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

【非特許文献1】Hennő、Nature, 1998, 391, 591-594

【非特許文献2】Foyő、Annu. Rev. Immunol., 1996, 14, 591-617

【非特許文献3】van Kootenő、J. Leukoc. Biol., 2000, 67, 2-17

【非特許文献4】Murano G., Basic Concepts of Hemostasis and Thrombosis, 1980, Boca Raton, FL, CRC Press, Inc.

【非特許文献5】Katoő、J. Clin. Invest., 1999, 104, 947-955

【非特許文献6】Vakkalanakaő、Arthritis Rheum., 199

10

20

30

40

50

9, 42, 871 - 881

【非特許文献7】M agee d 5、Ann . N . Y . Acad . Sci . , 1997 , 815 , 296 - 311

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、血小板の凝集をアッセイする方法を提供し、この方法は、血小板と血小板活性化因子とを接触させる工程、活性化血小板とCD40L結合部分とを接触させる工程、この活性化血小板と架橋因子とを接触させる工程を包含し、凝集が、血小板の沈殿によって定量化される。このCD40L結合部分とこの架橋因子とは、予め形成された免疫複合体ではない。上記血小板活性化因子は、アデノシン二リン酸(ADP)、コラーゲン、トロンビン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ、p-セレクチン、およびコンバルキシン(convulxin)から選択される。血小板は、多血小板血漿(PRP)から得ることができる。いくつかの実施形態において、上記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体(例えば、hu5c8)である。上記架橋因子は、可溶性CD40L(sCD40L)、抗ヒトIgG抗体、抗hFc抗体、RF、Fcレセプター陽性アクセサリ細胞、可溶性プロテインA、および可溶性ヒトFcレセプターから選択される。抗CD40L抗体対sCD40Lの比は、1:1000~1000:1、1:500~500:1、または3:2であり得る。

10

20

【0007】

本発明はまた、血小板の凝集をアッセイする方法を提供し、この方法は、ADPによって血小板を活性化する工程、活性化血小板と、抗CD40L抗体とを接触させる工程、およびこの活性化血小板とsCD40Lまたは抗hFc抗体とを接触させる工程を包含し、沈殿した血小板が、この血小板の凝集の指標となる。上記抗CD40L抗体とsCD40Lとは、予め形成された免疫複合体ではない。

【0008】

本発明はまた、CD40L結合部分の投与の際の凝固に対して個体が感受性であるか否かを決定する方法を提供し、この方法は、ヒトから血小板を採取する工程、この血小板と血小板活性化因子とを接触させる工程、活性化血小板とCD40L結合部分とを接触させる工程、この活性化血小板と架橋因子とを接触させる工程、および血小板凝集の存在または非存在を決定する工程を包含し、ここで、70%またはそれより多い血小板の凝集が、凝固に対する感受性の指標となる。上記CD40L結合部分と架橋因子とは、予め形成された免疫複合体ではない。上記血小板活性化因子は、ADP、コラーゲン、トロンビン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ、p-セレクチン、およびコンバルキシンから選択される。血小板は、多血小板血漿(PRP)から得ることができる。いくつかの実施形態において、上記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体(例えば、hu5c8)である。上記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、抗hFc抗体、RF、Fcレセプター陽性アクセサリ細胞、可溶性プロテインA、および可溶性ヒトFcレセプターから選択される。抗CD40L抗体対sCD40Lの比は、1:1000~1000:1、1:500~500:1、または3:2であり得る。

30

40

【0009】

本発明はまた、抗CD40L抗体の投与の際の凝固に対してヒトが感受性であるか否かを決定する方法を提供し、この方法は、そのヒトから血小板を採取する工程、その血小板をADPで活性化する工程、活性化血小板と抗CD40L抗体とを接触させる工程、活性化血小板とsCD40Lまたは抗hFc抗体とを接触させる工程、および血小板凝集の存在または非存在を決定する工程を包含し、70%またはそれより多い血小板凝集が、凝固に対する感受性の指標となる。上記抗CD40L抗体と上記架橋因子とは、予め形成された免疫複合体ではない。

【0010】

50

本発明はまた、血小板活性化因子、架橋因子、および必要に応じてCD40L結合部分を含むキットを提供する。この血小板活性化因子は、ADP、コラーゲン、トロンビン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ、p-セレクチン、およびコンボルキシンから選択される。上記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体（例えば、hu5c8）であり得る。上記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、抗hFc抗体、RF、Fcレセプター陽性アクセサリ細胞、可溶性プロテインA、および可溶性ヒトFcレセプターから選択される。上記キットはさらに、少なくとも1本の針、血液を受容するための容器、アッセイ構成要素を受容するための容器、および指示書を含み得る。いくつかの実施形態において、アッセイ構成要素を受容するための容器は、キュベットである。

本発明はまた、以下の項目を提供する。

10

(項目1)

血小板の凝集をアッセイする方法であって、

血小板と血小板活性化因子とを接触させる工程；

活性化した該血小板と、CD40L結合部分とを接触させる工程；および

該活性化血小板と架橋因子とを接触させる工程、

を包含し、該CD40L結合部分と該架橋因子とは予め形成された免疫複合体ではなく、そして沈殿した血小板が、該血小板の凝集の指標となる、方法。

(項目2)

上記血小板活性化因子は、ADP、コラーゲン、トロンビン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ、p-セレクチン、およびコンボルキシンから選択される、項目1に記載の方法。

20

(項目3)

上記血小板活性化因子はADPである、項目1に記載の方法。

(項目4)

上記血小板は、多血小板血漿から得られたものである、項目1に記載の方法。

(項目5)

上記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体である、項目1に記載の方法。

(項目6)

上記抗CD40L抗体はhu5c8である、項目5に記載の方法。

(項目7)

上記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、抗hFc抗体、RF、Fcレセプター陽性アクセサリ細胞、可溶性プロテインA、および可溶性ヒトFcレセプターから選択される、項目1に記載の方法。

30

(項目8)

上記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、および抗hFc抗体から選択される、項目1に記載の方法。

(項目9)

CD40L結合部分対架橋因子の比は、1:1000~1000:1である、項目1に記載の方法。

(項目10)

CD40L結合部分対架橋因子の比は、1:500~500:1である、項目1に記載の方法。

40

(項目11)

CD40L結合部分対架橋因子の比は、3:2である、項目1に記載の方法。

(項目12)

血小板凝集をアッセイする方法であって、

ADPで血小板を活性化する工程；

活性化した該血小板と、抗CD40L抗体とを接触させる工程；および

該活性化血小板と、sCD40Lまたは抗hFc抗体とを接触させる工程

を包含し、該抗CD40L抗体とsCD40Lとは、予め形成された免疫複合体ではなく

50

、そして沈殿した血小板は、該血小板の凝集の指標となる、方法。

(項目 1 3 )

ヒトが C D 4 0 L 結合部分の投与の際の凝固に感受性であるか否かを決定する方法であつて、

該ヒトから血小板を採取する工程；

該血小板と、血小板活性化因子とを接触させる工程；

活性化血小板と、該 C D 4 0 L 結合部分とを接触させる工程；

該活性化血小板と架橋因子とを接触させる工程であつて、該 C D 4 0 L 結合部分と該架橋因子とは予め形成された免疫複合体ではない、工程；および

血小板凝集の存在または非存在を決定する工程

を包含し、70%またはそれより多くの血小板の凝集が、凝固に対する感受性の指標となる、方法。

(項目 1 4 )

上記血小板活性化因子は、A D P、コラーゲン、トロンピン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ、p - セレクチン、およびコンバルキシンから選択される、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5 )

上記血小板活性化因子は A D P である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 6 )

上記血小板は、多血小板血漿から得られる、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 7 )

上記 C D 4 0 L 結合部分は、抗 C D 4 0 L 抗体である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 8 )

上記抗 C D 4 0 L 抗体は h u 5 c 8 である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9 )

上記架橋因子は、s C D 4 0 L、抗ヒト I g G 抗体、抗 h F c 抗体、R F、F c レセプター陽性アクセサリ細胞、可溶性プロテイン A、および可溶性ヒト F c レセプターから選択される、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 2 0 )

上記架橋因子は、s C D 4 0 L、抗ヒト I g G 抗体、および抗 h F c 抗体から選択される、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 2 1 )

C D 4 0 L 結合部分対架橋因子の比は、1 : 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 : 1 である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 2 2 )

C D 4 0 L 結合部分対架橋因子の比は、1 : 5 0 0 ~ 5 0 0 : 1 である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 2 3 )

C D 4 0 L 結合部分対架橋因子の比は、3 : 2 である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 2 4 )

ヒトが抗 C D 4 0 L 抗体の投与の際の凝固に感受性であるか否かを決定する方法であつて、

該ヒトから血小板を採取する工程；

該血小板を A D P で活性化する工程；

活性化した該血小板と、該抗 C D 4 0 L 抗体とを接触させる工程；

該活性化血小板と、s C D 4 0 L または抗 h F c 抗体とを接触させる工程であつて、該抗 C D 4 0 L 抗体と s C D 4 0 L とは予め形成された免疫複合体ではない、工程；および

血小板凝集の存在または非存在を決定する工程

を包含し、70%またはそれより多くの血小板の凝集が、凝固に対する感受性の指標となる、方法。

10

20

30

40

50

(項目25)

血小板活性化因子および架橋因子を含む、キット。

(項目26)

上記血小板活性化因子は、ADP、コラーゲン、トロンビン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ、p-セレクチン、およびコンバルキシンから選択される、項目25に記載のキット。

(項目27)

上記血小板活性化因子はADPである、項目25に記載のキット。

(項目28)

CD40L結合部分をさらに含む、項目25に記載のキット。

10

(項目29)

上記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体である、項目28に記載のキット。

(項目30)

上記抗CD40L抗体はhu5c8である、項目29に記載のキット。

(項目31)

上記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、抗hFc抗体、RF、Fcレセプター陽性アクセサリー細胞、可溶性プロテインA、および可溶性ヒトFcレセプターから選択される、項目25に記載のキット。

(項目32)

上記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、および抗hFc抗体から選択される、項目25に記載のキット。

20

(項目33)

少なくとも1本の針、血液を受容するための容器、アッセイ構成要素を受容するための容器、および指示書をさらに含む、項目25に記載のキット。

(項目34)

アッセイ構成要素を受容するための上記容器がキュベットである、項目33に記載のキット。

**【図面の簡単な説明】****【0011】**

**【図1】**図1は、PRPコントロールと比較した、サンプルを透過する光のパーセントを示す、Biodata 4-チャンネル血小板凝集プロファイラーによって作成したトレースを示す。このトレースは、最適以下のADP添加の4分後に終了し、そして最終値は、凝集した血小板のパーセントであるとみなされる。ADP滴定を実施し、各PRPサンプルについてのADPの最適以下の濃度を決定する。

30

**【図2】**図2は、活性化血小板が表面CD40Lを発現していることを示す。ヒト血小板を、1分間、10分間、20分間、40分間、または60分間、10 $\mu$ MのADPと一緒に、またはADPなしで、インキュベートした。血小板表面上のCD40Lはビオチン化抗CD40L抗体と相互作用することができるので、血小板表面上のCD40Lの活性化により誘導される増加が、活性化血小板に結合したビオチン化抗CD40L抗体に対するウェスタンブロッティングによって定量化される。

40

**【図3】**図3は、血小板凝集が抗CD40L抗体とsCD40Lとの複合体によって影響されることを示す。PRPは、10人の健常なドナーから入手した。抗CD40L抗体およびsCD40Lを、PRP添加の少なくとも20分前に混合した。滴定を各ドナーについて実施し、最適以下の凝集を生じるADP濃度を決定した。凝集を、最適以下濃度のADPを使用して誘導した。各ドットは、1人の個人に由来する結果を示す。

**【図4】**図4は、血小板の凝集が、抗CD40L抗体と組換えsCD40Lとの複合体によって特異的に増強されることを示す。PRPは、1人の健常な個体から入手した。凝集は0.75 $\mu$ MのADPで誘導し、これをこのドナーについての最適以下であると決定した。抗CD40L抗体、hIgGおよびアグリコシル抗CD40L抗体を、200 $\mu$ g/mLで、sCD40Lを30 $\mu$ g/mLで評価した。抗CD40L抗体またはhIgGは

50

、PRP含有キュベットへの添加の20分以上前に、組換えsCD40Lと混合した。バーは、2つのデータ点の平均および標準偏差を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

(実施形態の説明)

本発明は、血小板凝集をアッセイする方法、ヒトがCD40L結合部分の投与の際の凝固に対して感受性であるか否かを決定する方法、およびこれらの方法において使用され得るキットを提供する。

【0013】

一局面において、本発明は、血小板凝集をアッセイする方法を提供し、この方法は、血小板と血小板活性化因子とを接触させる工程、活性化血小板とCD40L結合部分とを接触させる工程、およびその活性化血小板と架橋因子とを接触させる工程を包含する。沈殿した血小板が、血小板凝集の指標となる。上記CD40L結合部分と上記架橋因子とは、血小板に加えられるときに、予め形成された免疫複合体ではない。沈殿した血小板は、血小板凝集の指標となる。

10

【0014】

いくつかの実施形態において、上記血小板は、ヒトのような哺乳動物から得られる。血小板は、ヒトから得られたPRPに存在し得る。さらに、血小板は、所望される場合にはPRPから単離され得る。いくつかの実施形態において、血小板またはPRPは、例えばヒトがCD40L結合部分の投与の際の凝固または血小板凝集の危険があるか否かを決定するためのCD40L結合部分(例えば、抗CD40L抗体)の投与の前に、ヒトから得られる。血液は、広範に公知の技術によってヒトから入手され得る。PRPは、一般的に使用される分離技術によって細胞成分から分離され得る。この分離技術としては、例えば、遠心分離などが挙げられる。代表的な血小板調製は、以下の実施例2に記載されている。セファロースゲル濾過カラムによる精製は、Fineら、Am. J. Pathol., 1976, 84, 11-24および以下の実施例3に記載されている。

20

【0015】

上記血小板またはPRPは、血小板活性化因子と接触させられる。本明細書中で使用される場合、句「血小板活性化因子」とは、最適以下に血小板を活性化するために使用され得る任意の化合物をいう。CD40L結合部分によって引き起こされる凝集を区別することができるように、血小板の最適以下の活性化が所望される。例えば、血小板は、ある量の血小板活性化因子と接触され、閾値量または最適以下量の血小板凝集を誘導する。血小板凝集のこの量は、CD40L結合部分によって誘導される凝集の量よりも少ないものでなければならず、0%の凝集~70%の凝集、またはその中の任意の部分範囲の範囲であり得る。血小板活性化因子は、当業者に周知であり、ADP、コラーゲン、トロンビン、トロンボキサン(例えば、TXA2)、ヒト好中球エラスターゼ(HNE)、p-セレクチン、コンバルキシンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0016】

上記血小板はまた、CD40L結合部分と接触される。本明細書中で使用される場合、句「CD40L結合部分」とは、機能的Fc抗体ドメインを含み、かつCD40Lに結合することもできる任意の物質である。いくつかの実施形態において、このCD40L結合部分は、抗CD40L抗体である。本明細書中で使用される場合、句「抗CD40L抗体」は、CD40Lおよび/またはsCD40Lに結合することができ、かつFcレセプターと機能的に相互作用することもできる任意の抗体、そのフラグメントまたは変異体を意味する。したがって、いくつかの実施形態において、CD40L抗体は、完全にインタクトなFc領域を含む。他の実施形態において、抗CD40L抗体は、完全にインタクトであるが改変されたFc領域を含み、ここでこの改変は、Fcレセプターの結合および/またはシグナル伝達を妨害しない。他の実施形態において、抗CD40L抗体は、変異型および/または短縮型Fc領域を含み、この変異および/または短縮は、Fcレセプターの結合および/またはシグナル伝達を妨害しない。抗CD40L抗体は当業者に周知であり

40

50

、例えば hu5c8 が挙げられる。さらなる抗 CD40L 抗体としては、M90、M91、M92、IDEC131、および AnCell 抗 CD154L (24-31 としても公知)、ならびに Grayら、Seminars in Immunol, 1994, 6, 303-310、および Noelle, Immunity, 1996, 4, 415-419 に開示されるものが挙げられる。さらに、CD40-Fc は、CD40L を架橋することができる試薬である。

#### 【0017】

上記血小板はまた、架橋因子とも接触させられる。本明細書中で使用される場合、句「架橋因子」とは、CD40L 結合部分を架橋するために使用され得る任意の因子を意味する。適した架橋因子は当業者に周知であり、sCD40L、抗ヒト IgG 抗体、抗 hFc 抗体、RF、Fc レセプター陽性アクセサリ細胞、可溶性プロテイン A、および可溶性ヒト Fc レセプター (例えば、Fc RI、Fc RII、Fc RIII、および Fc Rn) が挙げられるが、これらに限定されない。CD40L 結合部分対 sCD40L の比率は、1:1000~1000:1、1:500~500:1、1:100~100:1、1:10~10:1、または 3:2 である。

10

#### 【0018】

血小板と、血小板活性化因子、CD40L 結合部分および架橋因子との接触の際に、血小板の沈殿が血小板凝集の指標となる。血小板沈殿の欠如は、血小板凝集の欠如の指標である。いくつかの実施形態において、ネガティブコントロールまたはブランクが、血小板凝集のベースラインまたは閾値量を確認するために使用され得る。血小板、血小板活性化因子、CD40L 結合部分、および架橋因子を含む試験サンプルは、血小板凝集を測定するためにアッセイされ得、そしてベースラインの血小板凝集と比較され得る。試験サンプルとネガティブコントロールとの間の血小板凝集における任意の差異が、その試験サンプルにおける血小板凝集の指標であり得る。このアッセイは、例えば試験チューブ、遠心チューブまたはキュベットのよう、アッセイ成分を受容するための任意の適した容器において実施され得る。

20

#### 【0019】

別の局面において、本発明はまた、CD40L 結合部分の投与の際の凝固に対してヒトが感受性であるか否かを決定する方法を提供する。上述のように、凝固を含む血栓塞栓合併症が、抗 CD40L 抗体のヒトへの投与の際に観察されている。従って、いくつかの例において、抗 CD40L 抗体または他の任意の CD40L 結合部分を受容することを企図しているヒトが、処置の際にそのような合併症を起こすことに対して感受性であるか否かを決定することが望ましい。代表的な方法は、ヒトから血小板を採取し、その血小板を上述のような血小板活性化因子で活性化させ、その活性化した血小板を上述のような CD40L 結合部分と接触させ、その活性化した血小板を上述のような架橋因子と接触させ、そして血小板凝集の存在または非存在を決定することを包含する。この CD40L 結合部分と架橋因子とは、予め形成された免疫複合体ではない。

30

#### 【0020】

血小板凝集、およびその存在または非存在は、当業者に公知の多数の手段によって決定され得る。例えば、血小板沈殿の指標である血小板の凝集は、以下の実施例に記載されるようにモニタリングされ得る。血小板凝集の量は、例えば CD40L 結合部分およびその血小板に依存して、サンプルごとに変動し得る。血小板凝集の量が 70% 以上である場合、または 75% 以上である場合、または 80% 以上である場合、または 85% 以上である場合、または 90% 以上である場合、または 95% 以上である場合、凝固および / または血栓塞栓合併症に対する感受性の指標である。例えば抗 CD40L 抗体での処置を受けることを企図しており、かつ本明細書中に記載されるアッセイ方法において試験が陽性である (すなわち、70% 以上の血小板凝集を有する) ヒト (すなわち、そのヒトは凝固に対して感受性である) は、代替的な治療レジメンが企図され得る。実際に、ヘルスケアの専門家は、本明細書中に記載されるアッセイにおける特定の結果を受け取った際には、代替的な治療を申し出るだろう。

40

50

## 【0021】

別の局面において、本発明は、血小板活性化因子、架橋因子、および必要に応じてCD40L結合部分を含むキットを提供する。いくつかの実施形態において、上記血小板活性化因子は、ADP、コラーゲン、トロンピン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ、p-セレクチンおよびコンバルキシンから選択される。いくつかの実施形態において、上記CD40L結合部分は、例えばhu5c8のような抗CD40L抗体である。いくつかの実施形態において、上記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、抗hFc抗体、RF、Fcレセプター陽性アクセサリー細胞、可溶性プロテインA、および可溶性ヒトFcレセプターから選択される。このキットはまた、例えば針、血液を受容するための容器、アッセイ成分を受容するための容器、および本明細書中に記載される方法を実施するための指示書のような、さらなる品目も含み得る。いくつかの実施形態において、アッセイ成分を受容するための容器はキュベットである。

10

## 【0022】

本明細書中に開示される発明がより効率的に理解され得るために、実施例が以下に提供される。これらの実施例は単に例示目的のためのものであり、決して本発明を限定すると解釈されるべきではないことが理解されるべきである。

## 【実施例】

## 【0023】

(実施例1：試薬)

研究用グレードの抗CD40L抗体、組換えsCD40L、および組換え可溶性CD40-IgG1Fc融合タンパク質(CD40-Fc)を、Biogenにて調製した(Ferrantら、Mol. Immunol., 2002, 39, 77-84)。コントロールのヒトIgGは、Protos Immunoresearch (San Francisco, CA)から購入したヒトIgG1であった。ヒトIgGのFc領域に対する抗体(抗hFc)は、親和性精製されたマウス抗ヒトIgG Fc (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)であった。Rb779は、CD40LのC末端に由来するペプチドに対して惹起されたウサギ抗血清である(Garberら、J. Biol. Chem., 1999, 274, 33545-33550)。

20

## 【0024】

(実施例2：多血小板血漿(PRP)の調製および血小板の回収)

インビトロ血小板凝集実験において使用した全ての血小板は、10日以内にアスピリンまたはアスピリン含有化合物を摂取していないと言った健全なヒトボランティアから単離した。凝集アッセイは、PRPに対して実施した。約50mLの全血を、0.5mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5mLのVacutainerチューブにアリコートで収集した。PRPは、抗凝固性の血液を200gで10分間遠心分離し、上清を収集することによって調製した。

30

## 【0025】

(実施例3：ウェスタンブロッティング)

CD40Lに対するウェスタンブロッティングを、以下のように調製した精製血小板において実施した。総量50mLの全血を0.5mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5mLのVacutainerチューブにアリコートで収集した。PRPを、その血液を20分間180gで遠心分離することによって調製した。収集されたPRP上清を、カラム用量の2倍のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で事前に平衡化したSephacel CL2B (Pharmacia, Peapack, New Jersey)ゲル濾過カラムに流した。血小板を溶出させ、PBSで洗浄した。ウェスタンブロッティングを、血小板中に存在するCD40Lの量を定量するために実施した。簡潔に述べると、血小板をLaemmliサンプル緩衝液で処理し、タンパク質を、勾配ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル(Laemmli, Nature, 1970, 227, 680-685)で電気泳動することによって解離させた。そのタンパク質をニトロセルロ

40

50

ース (Towbinら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1979, 76, 4350-4354) に移し、その膜を、ヒトCD40Lタンパク質のC末端に由来するペプチドに対して惹起させたウサギ抗血清であるRb779でブロッキングした (Garberら、J. Biol. Chem., 1999, 274, 33545-33550)。結合した抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に結合体化させたヤギ抗ウサギ抗血清によって検出した。組換えsCD40Lの段階希釈を、血小板由来タンパク質サンプルと平行で評価した。その血小板サンプル中のCD40Lの量は、組換えsCD40L標準との比較によって見積もった。

#### 【0026】

血小板を、ビオチン結合体化抗CD40L抗体とインキュベートし、CD40Lが血小板の表面上に存在するか否かを決定した。PRPを、10 $\mu$ MのADPと一緒に、またはADPなしで、1分間、10分間、20分間、40分間、または60分間インキュベートし、次いで、ビオチン結合体化抗CD40L抗体とインキュベートした。結合していない抗体を、PBSで洗浄することによって血小板から除去した。血小板に結合した抗CD40L抗体の量を、HRP結合体化ストレプトアビジンを使用するウェスタンブロッティングによって決定した。ビオチン結合体化抗CD40L抗体の血小板への特異的結合を、その抗体を組換えsCD40Lとプレインキュベートすることによって評価した。

10

#### 【0027】

(実施例4：血小板凝集アッセイ)

Biodata 4チャンネル血小板凝集プロファイラー (PAP-4; Biodata Corp., Hatboro, PA) を、乏血小板血漿 (PPP) のみを含むキュベットを使用してブランクとした。約2~5 $\times$ 10<sup>8</sup>/mLの血小板を含むPRPの350 $\mu$ Lアリコート、攪拌棒を備えるキュベットに加えた。抗CD40L抗体、ヒトIgG、正常ヒト血清、CD40-Fc、または抗hFcを、総容量100 $\mu$ Lで加えた。充填されたキュベットを機械上に配置し、ADPの添加前に反応成分を混合した。

20

#### 【0028】

凝集を、最適以下濃度 (最終濃度は各個体サンプルに応じて変動する) のADPの50 $\mu$ Lの添加によって開始した。上記凝集プロファイラーは、同時に稼動し得る4つのポートを有する。凝集のトレースを、ADPの添加後4分間、各サンプルについて作成した。トレースの最後に、機器が、サンプルを通る光の透過とPPPブランクを通る光の透過とを比較することによって、凝集のパーセンテージを算出する。代表的なADP滴定を示すトレースを、図1に示す。各実験の開始時に滴定を実施し、その後の試行を最適以下のADP濃度で実施した。

30

#### 【0029】

(実施例5：活性化血小板の表面上でのCD40Lの発現)

CD40Lの発現は、ヒト血小板から調製した溶解物において容易に検出した (データは示さず)。CD40Lが静止型血小板および/または活性化血小板で発現されるか否かを決定するために、血小板をビオチン結合体化抗CD40L抗体と一緒にインキュベートし、表面CD40Lの存在を、結合したビオチン化抗CD40L抗体を定量することによって決定した。CD40Lの表面発現を、10 $\mu$ MのADPと一緒に、またはADPなしでのインキュベートの1分後、10分後、20分後、40分後、および60分後に評価した。CD40Lの表面発現は、活性化のわずか1分後にADP活性化血小板上で検出可能であり、経時的に増加した (図2)。sCD40Lとのビオチン結合体化抗CD40L抗体のプレインキュベートは活性化血小板への結合を阻害する (データは示さず) ので、ビオチン結合体化抗CD40L抗体の結合はCD40Lに特異的である。不活性化 (「静止型」) 血小板上で検出された表面CD40Lの量もまた、経時的に増加した。この現象は、本発明者らの実験条件下での血小板活性化の基本レベルに起因するようである。

40

#### 【0030】

それにもかかわらず、ADP処理された血小板上で発現する表面CD40Lの量は、一致する未処理コントロールよりも一貫して高かった。これらの結果は、CD40Lが通常

50

は血小板の内部に隠れており、活性化の際に表面に転位するという概念と一致する。さらに、ビオチン結合体化抗CD40L抗体の結合により、抗CD40Lが血小板表面上に存在するCD40L分子を認識することが確認される。

#### 【0031】

(実施例6：血小板部分におけるCD40Lの量の評価)

活性化血小板の表面上に発現されるCD40LはCD40L抗体によって認識され得るので、抗CD40L抗体に対するこの潜在的な「くぼみ(sink)」のサイズを評価することが重要である。ウェスタンブロッティング法を使用して、血小板中のCD40Lの量を、組換えsCD40L標準の既知の量と比較した。100万個の血小板におけるCD40Lの量は、約80pgであると見積もられる。新たに採血した血液の各1mLは約300万個の血小板を含み、平均的な人は約5Lの総容量を有する。計算上は、約120μgのCD40Lが、平均的な個体の血小板部分に存在する。

10

#### 【0032】

(実施例7：血小板凝集における研究用グレードの抗CD40L抗体の効果)

抗CD40L抗体と、活性化血小板上で発現されたCD40Lとの相互作用が止血カスケードに影響するか否かを決定するために、研究用グレードの抗CD40L抗体の存在下での健常なヒトの血小板の凝集を試験した。研究用グレードの抗CD40L抗体は、広範なADP濃度にわたって、ADP活性化血小板の凝集に影響しなかった(表1~3)。静止型血小板もまた、抗CD40L抗体によって影響されなかった(表1および表3~5)。予想されたように、コントロールのヒトIgG抗体(表2および表3)は、血小板凝集に影響しなかった。CD40-Fcを評価し、血小板の表面上に発現されるCD40Lに対する二量体レセプタータンパク質の結合が凝集に影響するか否かを決定した。CD40-Fcは、血小板凝集に影響しなかった(表4)。

20

#### 【0033】

(実施例8：血小板凝集における架橋抗CD40L抗体の効果)

(抗体によって架橋された抗CD40L抗体)

抗CD40L抗体がIgGのFc領域に特異的な抗体によって架橋されるときに凝集における影響があるか否かを決定するために、活性化血小板および静止型血小板を、架橋因子としての抗hFcと一緒に、または抗hFcなしで、抗CD40L抗体で処理した。一方の実験では、架橋された抗CD40L抗体の効果を、種々の量のADPおよび抗hFcで交差滴定した(表5)。抗CD40L抗体の、20μg/mLまたは6.66μg/mLの抗hFcとの架橋は、血小板凝集に影響しなかった(表5)。しかしながら、抗CD40L抗体が2.22μg/mLの抗hFcと架橋されたときに、凝集の増加が観察された(表5、109の行と110の行との比較)。そのような増強効果は、低濃度のADPが活性化に使用されたときには観察されなかった(表5)。血小板は、抗CD40L抗体を架橋するとは考えられない通常のヒト血清の存在下では、抗CD40L抗体によって影響されなかった(表6)。これらの結果は、抗体によって架橋された抗CD40L抗体による血小板凝集の増強が、可能性があることを示唆している。

30

#### 【0034】

(可溶性CD40Lリガンドによって架橋された抗CD40L抗体)

複数の濃度の抗CD40L抗体とsCD40Lとを、血小板凝集アッセイにおいて評価し、sCD40Lによって架橋された抗CD40L抗体が血小板凝集を増強するか否かを決定した。sCD40Lおよび抗CD40L抗体において利用可能な結合部位の数に基づいて、抗CD40L抗体は、2分子の三量体sCD40Lが3分子の二価抗CD40L抗体に結合したときに、最大に架橋される。計算によると、最大の架橋のための重量/重量比は、理論上、抗CD40L抗体 3.75対sCD40L 1である。この範囲におけるいくつかの比率を試験し、233μg/mLの抗CD40L抗体と、30μg/mLのsCD40Lが、抗CD40L抗体の最大架橋のための条件であることが、実験的に見出された。10倍低い濃度および10倍高い濃度の抗CD40L抗体もまた、30μg/mLのsCD40Lで評価した。この試験は、10人の健常なドナーから調製されたPRP

40

50

を使用して実施された。興味深いことに、増強された凝集が、全てではないがいく人かの健常ドナーから単離された血小板で起こった。

【0035】

血小板凝集は、sCD40Lによって最大に架橋された抗CD40Lによって誘導された(図3)。アグリコシル化のsCD40Lによって架橋された抗CD40L抗体は、血小板凝集を増強しなかった。このことは、この効果がFcγRIIa依存性であることを示している(図4)。コントロールのヒトIgG(hIgG)およびsCD40Lはともに、血小板凝集に対して効果を有さなかった(図4)。

【0036】

【表1】

表1:ADP活性化血小板に対する、抗CD40Lの効果

サンプル番号	BG9588	ADP濃度 (μM)	凝集%
1		20.00	73
2	+	20.00	72
3		6.70	60
4	+	6.70	71
5		2.00	25
6	+	2.00	21
7		0.70	11
8	+	0.70	24
9		0.37	12
10	+	0.37	15
11		0.00	3
12	+	0.00	11

抗CD40L抗体は、静止型血小板の凝集を誘導もしないし、ADP活性化血小板の凝集に影響もしない。PRPをキュベットに入れ、5μg/mLの研究用グレードの抗CD40L抗体と一緒に、またはそれなしで、攪拌した。ADPを、列挙されている最終濃度まで添加した。4分間の凝集のトレースを各サンプルに対して作成し、凝集のパーセントを算出した。

【0037】

【表2】

表2:ADP活性化血小板に対する、抗CD40LおよびIgGの効果

サンプル番号	BG9588	ヒト IgG	ADP (μM)	凝集%
13			20.00	77
14		+	20.00	89
15	+		20.00	80
16			6.70	74
17		+	6.70	75
18	+		6.70	78
19			2.00	10
20		+	2.00	12
21	+		2.00	12
22			0.70	8
23		+	0.70	11
24	+		0.70	10
25			0.37	9
26		+	0.37	10
27	+		0.37	10
28			0.00	3

抗CD40L抗体およびコントロールのヒトIgGは、ADP活性化血小板に影響しない。PRPをキュベットに入れ、5μg/mLの研究用グレードの抗CD40L抗体もしくはヒトIgGと一緒に、またはそれらなしで、攪拌した。ADPを、列挙されている最

終濃度まで添加した。4分間の凝集のトレースを各サンプルに対して作成し、凝集のパーセントを算出した。

【0038】

【表3】

表3:ADP活性化血小板に対する、抗CD40LおよびIgGの効果

サンプル番号	BG9588	ヒト IgG	ADP (μM)	凝集の%
29			0.00	1
30		+	0.00	3
31	+		0.00	3
32			20.00	70
33		+	20.00	68
34	+		20.00	68
35			10.00	64
36		+	10.00	69
37	+		10.00	69
38			5.00	72
39		+	5.00	70
40	+		5.00	67
41			2.50	65
42		+	2.50	57
43	+		2.50	62
44			1.25	13
45		+	1.25	15
46	+		1.25	12
47			0.60	10
48		+	0.60	9
49	+		0.60	10
50			0.30	10
51		+	0.30	10
52	+		0.30	10

10

20

抗CD40L抗体および非特異的ヒトIgGは、静止型血小板の凝集を誘導もしないし、ADP活性化血小板の凝集に影響もしない。PRPをキュベットに入れ、5μg/mLの研究用グレードの抗CD40L抗体もしくはヒトIgGと一緒に、またはそれらなしで、攪拌した。ADPを、列挙されている最終濃度まで添加した。4分間の凝集のトレースを各サンプルに対して作成し、凝集のパーセントを算出した。

【0039】

30

【表 4】

表4: ADP活性化血小板に対する、抗CD40L抗体およびCD40-Fcの効果

サンプル番号	BG9588 (μg/mL)	CD40lg (μg/mL)	ADP (μM)	凝集%
53			0.00	2
54	20.00		0.00	3
55	10.00		0.00	3
56	5.00		0.00	3
57	2.50		0.00	5
58	1.25		0.00	3
59		20.00	0.00	3
60		10.00	0.00	3
61		5.00	0.00	3
62		2.50	0.00	3
63		1.25	0.00	3
64		0.63	0.00	3
65			20.00	84
66			5.00	79
67		10.00	5.00	79
68			2.50	77
69		10.00	2.50	81
70			1.25	61
71		10.00	1.25	64
72			0.60	15
73		10.00	0.60	16

10

20

活性化血小板の表面上のCD40Lに対する抗CD40L抗体またはCD40-Fcの結合は、血小板凝集に影響しない。PRPをキュベットに入れ、列挙された濃度の研究用グレードの抗CD40L抗体もしくはCD40-Fcと一緒に、またはそれらなしで、攪拌した。ADPを、列挙されている最終濃度まで添加した。4分間の凝集のトレースを各サンプルに対して作成し、凝集のパーセントを算出した。

【0040】

【表 5】

表5: ADP活性化血小板に対する、架橋された抗CD40L抗体の効果

サンプル番号	BG9588	抗 hFc (μg/mL)	ADP (μM)	凝集%
98			0.0	2
99			20.0	76
100		20.00	0.0	3
101	+		0.0	3
102	+	20.00	0.0	3
103		20.00	1.0	73
104	+	20.00	1.0	83
105	+	6.66	0.0	3
106		6.66	1.0	80
107	+	6.66	1.0	84
108	+	2.22	0.0	3
109		2.22	1.0	23
110	+	2.22	1.0	76
111	+	20.00	0.0	4
112		20.00	0.5	6
113	+	20.00	0.5	8
114	+	6.66	0.0	3
115		6.66	0.5	8
116	+	6.66	0.5	8
117	+	2.22	0.0	3
118		2.22	0.5	7
119	+	2.22	0.5	8

10

20

活性化血小板の表面上のCD40Lへの抗CD40L抗体の架橋は、限定された条件下で、凝集を増強し得る。PRPをキュベットに入れ、2 μg/mLの研究用グレードの抗CD40L抗体および/もしくは列挙された濃度の抗hFcと一緒に、またはそれらなしで、攪拌した。ADPを、列挙されている最終濃度まで添加した。4分間の凝集のトレースを各サンプルに対して作成し、凝集のパーセントを算出した。

【0041】

【表 6】

表6: 静止型血小板に対する、正常ヒト血清の効果

サンプル番号	BG9588	血清 (μg/mL)	凝集%
74			2
75		1.0x	8
76		0.2x	7
77		0.04x	5
78		0.008x	5
79		0.0016x	6
80		0.00032x	6
81	+	1.0x	9
82	+	0.2x	6
83	+	0.04x	6
84	+	0.008x	7
85	+	0.0016x	6
86	+	0.00032x	6

30

40

正常ヒト血清は、静止型血小板の凝集に影響しなかった。PRPをキュベットに入れ、2 μg/mLの研究用グレードの抗CD40L抗体および/もしくは列挙された濃度の正常ヒト血清と一緒に、またはそれらなしで、攪拌した。ADPを、列挙されている最終濃度まで添加した。4分間の凝集のトレースを各サンプルに対して作成し、凝集のパーセントを算出した。

50

【 0 0 4 2 】

当業者には、本明細書中に記載されているものに加えて種々の改変が上述の説明から明白である。そのような改変もまた、添付の特許請求の範囲内に入ることが意図される。本願において参照された各参考文献（ジャーナルの記事、米国特許、米国以外の特許、特許出願公報、国際出願公報、GenBankアクセッション番号などが挙げられるが、これらに限定されない）は、その全体が、本明細書中に参考として援用される。

【 図 1 】

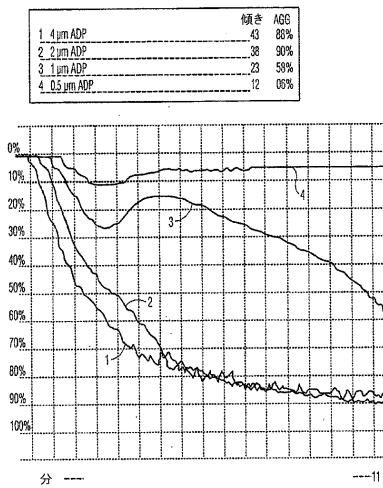


FIG. 1

【 図 2 】

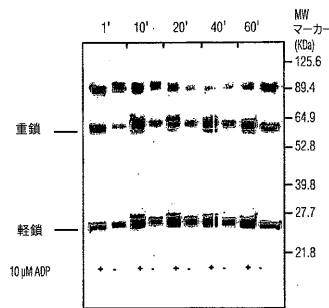


FIG. 2

【 図 3 】

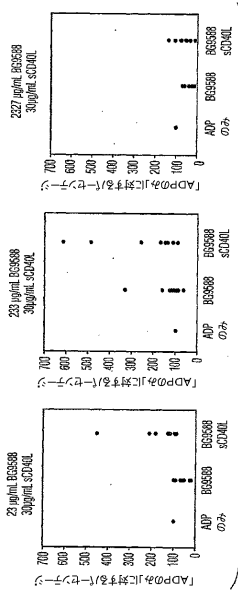


FIG. 3

【 図 4 】

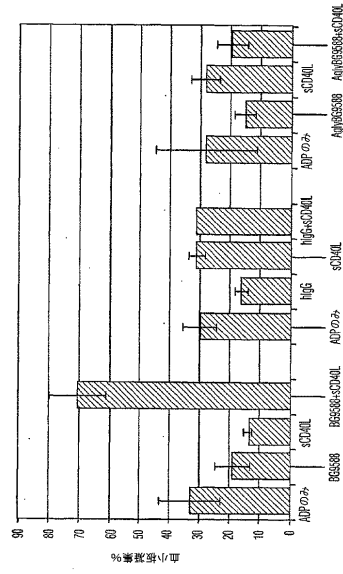


FIG. 4

---

フロントページの続き

(72)発明者 イェン - ミン スウ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 0 , レキシントン , ダグラス ロード 3

(72)発明者 リヘ スー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 6 7 , レディング , メイン ストリート 9 7 6

Fターム(参考) 2G045 CA24 CA26 FA11 GC10

【外国語明細書】

2012073273000001.pdf

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012073273A5</a>	公开(公告)日	2013-02-14
申请号	JP2011290232	申请日	2011-12-29
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司, Emuei公司		
[标]发明人	イエンミンスウ リハスー		
发明人	イエン-ミン スウ リハ スー		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N33/86		
FI分类号	G01N33/49.X G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/CA24 2G045/CA26 2G045/FA11 2G045/GC10		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/737488 2005-11-17 US 60/804843 2006-06-15 US		
其他公开文献	JP2012073273A JP5639993B2		

摘要(译)

解决的问题：提供确定血小板聚集的方法，确定在给予CD40L结合部分后对凝血的敏感性的方法以及与之相关的试剂盒。一种测定血小板凝集的方法，该方法包括以下步骤：使血小板与血小板活化因子接触；使活化的血小板与CD40L结合部分接触；以及使活化的血小板交联。与其中不是CD40L结合部分和交联因子不是预先形成的免疫复合物的因子接触，并且沉淀的血小板指示血小板的聚集。[选择图]无