

(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2016-537648

(P2016-537648A)

(43) 公表日 平成28年12月1日(2016.12.1)

(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 N	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2016-552204 (P2016-552204)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月28日 (2014.10.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年6月24日 (2016.6.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/062591
 (87) 国際公開番号 W02015/065986
 (87) 国際公開日 平成27年5月7日 (2015.5.7)
 (31) 優先権主張番号 61/896, 951
 (32) 優先日 平成25年10月29日 (2013.10.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

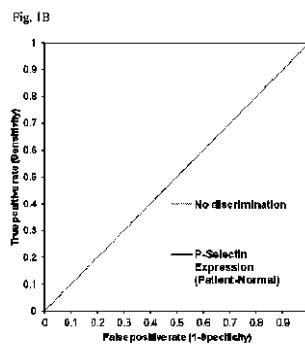
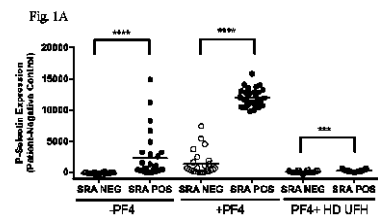
(71) 出願人 516129714
 ブラッドセンター リサーチ ファウン
 ーション
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3
 2 3 3、ミルウォーキー、エヌ 1 8 ス
 ストリート 6 3 8
 (74) 代理人 100134832
 弁理士 龍野 文雄
 (74) 代理人 100060690
 弁理士 龍野 秀雄
 (74) 代理人 100070002
 弁理士 川崎 隆夫
 (74) 代理人 100165308
 弁理士 津田 俊明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘパリン誘発性血小板減少症/血栓症を引き起こす血小板活性化抗体を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、患者における血小板活性化を検出する方法であって、a)ヘパリン誘発性血小板減少症(HIT)を有すると疑われる患者から、血液サンプルを得る工程；b)有効量の血小板第4因子(PF4)を血小板サンプルと共にインキュベートして、PF4処理血小板サンプルを得る工程；c)前記患者血液サンプルを前記PF4処理血小板と接触させる工程；およびd)血小板活性化の程度を測定する工程を含み、正常血液サンプルを使用して得られた結果と比較した、血小板活性化の増加が、前記患者がHITを有することを示す方法を提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血小板活性化を検出する方法であって、

a) ヘパリン誘発性血小板減少症 (HIT) を有すると疑われる患者から、血液サンプルを得る工程；

b) 有効量の血小板第 4 因子 (PF4) を血小板サンプルと共にインキュベートして、PF4 処理血小板サンプルを得る工程；

c) 前記患者血液サンプルを前記 PF4 処理血小板と接触させる工程；および

d) 前記合わせた患者血液サンプルおよび PF4 処理血小板の活性化を測定する工程を含み、

正常血液サンプルと比べた、前記患者血液サンプルにおける血小板活性化の増加が、前記患者が HIT を有することを示す、方法。

【請求項 2】

前記血小板上の p - セレクチンの発現の増加；前記血小板に対する免疫グロブリンの結合の増加；前記血小板に対するアネキシン V の結合の増加；前記血小板から放出されたセロトニン、ベータトロンボグロブリン、ピロリン酸塩、フィブロネクチンもしくはフォン・ヴィレブランド因子の増加；血小板膜タンパク質 Fc ガンマ RII (CD32) のタンパク質分解切断の増加；血小板形態の変化；血小板細胞質中のイオン化カルシウムレベルの増加；活性化血小板に見られる 1 つ以上の CD マーカーの発現レベルの変化；血小板凝集；細胞内カルシウムレベル；インテグリンのコンフォメーション；セロトニン、ATP、ADP もしくは VWF などの血小板顆粒内容物の放出；血小板膜電位；または血小板インピーダンスを測定することによって、血小板活性化を決定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

CD62P の発現を測定することによって、血小板活性化を決定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記患者血液サンプルが、全血、血漿、血清、多血小板血漿、または血液から精製された抗体のサンプルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

さらなるヘパリンまたはヘパリン様化合物の存在下で、前記患者サンプルを前記 PF4 処理血小板と接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記さらなるヘパリンまたはヘパリン様化合物が、約 0.05 ~ 100 単位 / ミリリットルの最終濃度である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

患者における血小板結合抗体を検出する方法であって、

a) ヘパリン誘発性血小板減少症 (HIT) と疑われる患者から、患者血液サンプルを得る工程；

b) 有効量の血小板第 4 因子 (PF4) を血小板サンプルと共にインキュベートして、PF4 処理血小板サンプルを得る工程；

c) 前記患者血液サンプルを前記 PF4 処理血小板と接触させる工程；および

d) 前記患者血液サンプルにおける血小板結合抗体の量を測定する工程を含み、

正常ドナー血液サンプルにおける血小板結合抗体の量と比べた、前記患者血液サンプルにおける血小板結合抗体の量の増加が、前記患者が HIT を有することを示す、方法。

【請求項 8】

前記患者サンプルが、全血、血漿、血清、多血小板血漿、または血液から精製された抗体のサンプルを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

さらなるヘパリンまたはヘパリン様化合物の存在下で、前記患者サンプルを前記 P F 4 処理血小板と接触させることをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記さらなるヘパリンまたはヘパリン様化合物が、約 0.05 ~ 100 単位 / ミリリットルの最終濃度である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

H I T を有すると疑われる患者由来のサンプルにおける血小板活性化の存在を決定するためのキットであって、以下の構成要素：

- a) 有効量の精製 P F 4 ；
- b) 血小板活性化を検出することができる抗体またはプローブ；および
- c) 使用説明書

からなる、キット。

【請求項 12】

陽性反応の特異性を確認するのに有効な量の高用量ヘパリンをさらに含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

血小板活性化阻害剤をさらに含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 14】

前記血小板活性化阻害剤がプロスタグランジン E 1 である、請求項 11 に記載のキット

。

【請求項 15】

患者における血小板活性化を検出する方法であって、

- a) 患者から、血液サンプルを得る工程；
- b) 有効量の血小板第 4 因子 (P F 4) を血小板サンプルと共にインキュベートして、P F 4 処理血小板サンプルを得る工程；
- c) 前記患者血液サンプルを前記 P F 4 処理血小板と接触させる工程；および
- d) 前記患者血液サンプルにおける血小板凝集または血小板凝固を測定する工程

を含み、

正常サンプルにおけるレベルと比べた、患者血液サンプルを使用して得られた血小板凝集または血小板凝固の増加が、前記患者が H I T を有することを示す、方法。

【請求項 16】

P F 4 と共にインキュベートした血小板の前記サンプルが、単離血小板または洗浄正常ドナー血小板である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記患者が、ヘパリン誘発性血小板減少症 (H I T) を有すると疑われる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

患者における血小板活性化を検出する方法であって、

- a) ヘパリン誘発性血小板減少症 (H I T) を有すると疑われる患者から、血液サンプルを得る工程；
- b) 有効量の血小板第 4 因子 (P F 4) を正常血小板サンプルおよび前記患者血液サンプルと共にインキュベートする工程；
- c) 前記 P F 4 処理血小板の血小板活性化を測定する工程

を含み、

正常血液サンプルと比べた、前記患者血液サンプルにおける血小板活性化レベルの増加が、前記患者が H I T を有することを示す、方法。

【請求項 19】

C D 6 2 P の発現を測定することによって、血小板活性化を決定する、請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年10月29日に出願された米国仮出願第61/896,951号（これは、すべての目的のために参照により組み込まれる）の優先権を主張する。

【0002】

連邦政府支援研究に関する声明

本発明は、National Institutes of Healthによって認められた認可HL-13629の下で政府の支援によってなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

ヘパリンは、二糖単位の繰り返しからなる高硫酸化グリコサミノグリカン（GAG）である。未分画ヘパリンは、12～15キログルトン（kD）の平均分子量を有する。ヒト患者への注入のために商業的に調製されたほとんどのヘパリンは、ブタの腸粘膜から単離されたものであり、「未分画ヘパリン」（UFH）と称される形態である。様々な方法によってUFHを分画すると、多糖鎖の60%が8kD未満の分子量を有する低分子量ヘパリン（LMWH）が得られる。UFHの抗凝固効果は、トロンビンのセリンプロテアーゼ阻害剤である抗トロンピン3（ATIII）との相互作用によって媒介される。

【0004】

抗トロンピンに対するUFHの結合は、ATIIIによる凝固プロテアーゼ、トロンピンおよびXa因子の阻害を著しく増加させる。米国だけで、1年間に、手術および他の治療処置を受けている入院患者の約3分の1または12万人の患者が、血栓症の治療または予防のために、UFHまたはLMWHを投与されていると推定される。これらの患者の約1～5%は、障害「ヘパリン誘発性血小板減少症」（HIT）を発症する。

【0005】

HITはヘパリンに対する有害反応であり、罹患患者は血小板活性化抗体を産生して、血小板減少症を発症する。これらの個体の一部は、重症例では致死的であり得る動脈血栓症または静脈血栓症を経験する。専門家は、1年間に最大600,000人の人々がHITを発症すると考えており、これは、毎年診断される乳癌の症例数の2倍であり、米国で毎年診断される新たな狭心症の症例数にほぼ等しい。早期の診断および治療が罹患率を減少させ得るので、HITの適時かつ正確な診断を行うことが重要である。HITの正確な診断は、臨床所見および臨床検査結果の両方に注意を払う必要がある。

【0006】

HITを有すると疑われる患者の従来治療は、すべてのヘパリンを即時停止した後、直接トロンピン阻害剤などの非ヘパリン代替抗凝固剤を急速投与することを含む。このような治療は、さらなる入院、多額の費用、1日当たり1%の大量出血のリスクを伴う。したがって、HITの正確な診断および血栓症リスクの特性評価は、有効な患者管理に重要である。

【0007】

血小板第4因子（PF4）は、4つの同一の70アミノ酸サブユニットからなる32kDの四量体タンパク質であり、活性化血小板の顆粒から放出され、高い親和性でヘパリンに結合して、HIT抗体が認識するPF4エピトープの生成をもたらす。PF4の1つの生理学的役割は、血管の内皮表面上のヘパリン様分子を中和し、それにより、凝固を促進することであり得る。他の役割は、炎症促進性活性、血管新生の阻害、ならびに巨核球増殖および血小板産生の阻害を含むと思われる。

【0008】

HITは、ヘパリンとの複合体におけるPF4を認識する抗体によって引き起こされる。HIT抗体を検出するための利用可能な試験の中では、セロトニン放出アッセイ（SRA）がHITの典型的な臨床像と最も良く相関すると多くの者によって考えられており、

10

20

30

40

50

HIT診断の代わりとして使用されることが多い。しかしながら、放射能の使用、多大な労力、新鮮血小板への依存、およびアッセイの技術的要求を含む課題により、通常、SRAは、少数の専門研究室においてのみ実施される。広く使用されている別の診断試験であるPF4系ELISAは、技術的に簡単であり、抗体検出感度が高いが、臨床HITを診断するために必要な特異性を欠く。

【0009】

最近開発された他のHITアッセイは有望であるが、まだ調査中であり、臨床使用についてまだ検証されていない。一部のヘパリンPF4指向抗体はHITを引き起こすが、他の多くは引き起こさない理由は依然として不明である。しかしながら、SRAで試験陽性の抗体は病原性であり、血小板減少症だけではなく、HITの最も深刻な合併症である血栓症を引き起こす可能性が最も高いと一般に認められている。

10

【0010】

したがって、血小板を活性化する抗体と、血小板を活性化しない抗体とを区別するアッセイであって、典型的な病院研究室が比較的短時間で実施し得るアッセイが必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、患者における血小板活性化抗体を検出する方法であって、a)ヘパリン誘発性血小板減少症(HIT)を有すると疑われる患者から、血液サンプルを得る工程；b)有効量の血小板第4因子(PF4)を血小板サンプルと共にインキュベートして、PF4処理血小板サンプルを得る工程；c)前記患者血液サンプルを前記PF4処理血小板と接触させる工程；およびd)前記患者血液サンプルにおける血小板活性化を測定する工程を含み、正常サンプルと比べた血小板活性化の増加が、前記患者がHITを有することを示す方法を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

一般に、前記方法で使用するのに最も適切および実用的な血小板は、洗浄正常ドナー血小板であろう。しかしながら、異常血小板、未洗浄血小板、単離血小板、精製血小板または血小板誘導体を使用し得る。一般に、患者サンプルを用いて得られたシグナルの比が、正常サンプルを使用して得られたシグナルを、少なくとも2倍、最も好ましくは少なくとも3倍超える場合、測定値は陽性であるとみなし得る。第1の例において、図1に示されているアッセイでは、正常血清と比べたp-セレクチンの中央値蛍光強度(MFI)の8000超の増加は陽性であるとみなし得る。最良の結果のために、適切な数の真に陽性の対照サンプルおよび真に陰性の対照サンプルを使用した検証を実施して、陽性サンプルおよび陰性サンプルの適切なカットオフを定義すべきである。

30

【0013】

一実施形態では、本発明の方法は、ヘパリンの非存在下で行われるが、代替的な実施形態では、患者サンプルとPF4処理血小板との接触は、0.05~100単位/mlの範囲の量のさらなるヘパリンまたはヘパリン様化合物の存在下で行われ得る。

【0014】

本発明はまた、患者における血小板結合抗体を評価することによって、血小板活性化(病原性)HIT抗体を検出する方法であって、a)ヘパリン誘発性血小板減少症(HIT)を有すると疑われる患者から、血液サンプルを得る工程；b)有効量の血小板第4因子(PF4)を血小板サンプルと共にインキュベートして、PF4処理血小板サンプルを得る工程；c)前記患者血液サンプルを前記PF4処理血小板と接触させる工程；およびd)前記患者血液サンプルにおける血小板結合抗体の量を測定する工程を含み、正常サンプルと比較した、患者サンプルにおける血小板に結合する抗体の評価によって検出された抗体の存在が、前記患者がHITを有することを示す方法を提供する。一般に、患者サンプルを用いて得られたシグナル(この場合にはIg-血小板結合)の比が、正常サンプルを使用して得られたシグナルを、少なくとも2倍、最も好ましくは少なくとも3

40

50

倍超える場合、測定値は陽性であるとみなし得る。図2に示されているアッセイでは、サンプルが、正常血清と比べた中央値蛍光強度(MFI)の2500超の増加、およびMFIの80%の増加を示す場合、サンプルは陽性であるとみなす。

【0015】

本発明はまた、患者サンプルにおける血小板活性化抗体の存在を決定するためのキットを提供する。一実施形態ではキットは、前記キットは、a)有効量の精製ヒトPF4；b)有効量の少なくとも2つの標識抗ヒト抗体であって、一方が血小板特異的マーカー(例えば、CD41)と反応性であり、他方が、血小板活性化の尺度として選択されたマーカー(例えば、p-セレクチン)と反応性である少なくとも2つの標識抗ヒト抗体；c)陽性反応の特異性を確認するのに十分な有効量の高用量ヘパリン；d)有効量の陽性対照HIT抗体；e)有効量の陰性対照抗体サンプル；f)アッセイで使用するための血小板を得るための説明書；ならびにg)アッセイを実施するための説明書；h)血小板活性化のマーカーを検出するための1つ以上のさらなる試薬(例えば、蛍光標識アネキシンVまたは抗p-セレクチン抗体)g)ベースライン血小板活性化を最小化するためのプロスタグランジンE1を含む。別の実施形態では、前記キットは、a)有効量の精製ヒトPF4；b)血小板活性化を測定するための有効量の少なくとも1つの標識抗ヒト抗体(例えば、抗ヒトp-セレクチン)；ならびにc)アッセイを実施するための説明書を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】図1。p-セレクチン発現アッセイにおける血小板活性化(SRA+)患者サンプルの正確な検出。図1A左。外因性PF4を血小板と共にプレインキュベートしなかった場合、SRA+サンプル(n=29)は、p-セレクチン発現のごくわずかな増加をもたらした；SRA-サンプル(n=24)は、ほとんど効果がなかった。縦軸に示されている値は、患者血清を使用して得られた中央値蛍光強度(MFI)(p-セレクチン発現の尺度)と、プールした正常血清を用いて得られたMFIとの差を示す。Alexa Fluor 647標識GpIIB特異的抗体を使用して、CD41(GpIIB)陽性に基づいて、血小板特異的な事象をゲーティングする。図1A中央。外因性PF4を血小板と共にプレインキュベートした場合、すべてのSRA+(SRA陽性)サンプルは、高レベルのp-セレクチン発現をもたらし、SRA-(SRA陰性)サンプルと明確に区別可能であった。図1A右。高用量ヘパリン(HDUFH)を追加した場合、SRA+サンプルが、SRA-サンプルと比べて、p-セレクチン発現のごくわずかな増加を示したように、p-セレクチン発現は有意に減少した。

20

30

【図1B】疾患分類変数としてSRAを使用して、受信者動作特性(ROC)曲線を作成した(すなわち、SRA+サンプルにおける陽性p-セレクチン発現アッセイは、「真の陽性」を意味するであろう)。PF4強化p-セレクチンアッセイの曲線下面積(AUC)は1.0であったが、これは、このアッセイが、試験サンプルについて完全な診断精度を有していたことを実証している。各サンプルにおいてSRAを少なくとも2回実施したところ、本研究で使用したサンプル(24個のSRA-および29個のSRA+)のラン間で、すべての結果が一致していた。水平バーは、各群の平均を示す。アスタリスクは、平均間の有意差を示す[p<0.0001(****)、p<0.001(***)]。

40

【図2A】図2。IgG-血小板結合アッセイにおける血小板活性化(SRA+)患者サンプルの正確な検出。図2A左。外因性PF4を血小板と共にプレインキュベートしなかった場合、SRA+サンプル(n=29)は、正常血清と比べて、血小板に対するIgGの結合のごくわずかな増加をもたらした；SRA-サンプル(n=24)は、ほとんど効果がなかった。縦軸は、患者血清を用いて得られたMFI(IgG結合の尺度)と、プールした正常血清を用いて得られたMFIとの差を示す。Alexa Fluor 647標識CD41特異的抗体を使用して、CD41(GpIIB)陽性に基づいて、血小板特異的な事象をゲーティングする。図2A中央。外因性PF4を血小板と共にプレインキュベートした場合、SRA+サンプルは、SRA-サンプルよりも有意に高レベルのIgG結合をもたらした。図2A右。高用量ヘパリン(HDUFH)を追加した場合、SRA+

50

サンプルが S R A - サンプルと区別不可能であるように、I g G - 血小板結合は著しく減少した。

【図 2 B】疾患分類変数として S R A を使用して、受信者動作特性 (R O C) 曲線を作成した (すなわち、S R A + サンプルにおける陽性 I g G - 血小板結合アッセイは、「真の陽性」を意味するであろう)。本明細書で概説した実験条件を使用したところ、(H L A 抗体による血小板に対する抗体結合を除外するために) P F 4 の追加によって、サンプルが、正常血清と比した中央値蛍光強度 (M F I) の 2 5 0 0 超の増加、および M F I の 8 0 % の増加を示す場合、サンプルは陽性であるとみなすコンビナトリアル戦略は、S R A + H I T 抗体と S R A - H I T 抗体との区別において、ほぼ完全な精度をもたらす (A U C = 0 . 9 4)。これは、このアッセイが、試験サンプルについて高レベルの診断精度を有していたことを実証している。各サンプルにおいて S R A を少なくとも 2 回実施したところ、本研究で使用したサンプル (2 4 個の S R A - および 2 9 個の S R A +) のラン間で、すべての結果が一致していた。水平バーは、各群の平均を示す。アスタリスクは、平均間の有意差を示す [$p < 0 . 0 0 0 1$ (* * * *)、 $p < 0 . 0 5$ (*)]。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 7 】

I . 一般

本明細書および特許請求の範囲において、用語「含む (i n c l u d i n g) 」および「含む (c o m p r i s i n g) 」は非限定的な用語であり、「限定されないが、. . . . を含む」を意味するものと解釈すべきである。これらの用語は、より限定的な用語「から本質的になる」および「からなる」を包含する。

【 0 0 1 8 】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される単数形「a」「an」および「the」には、文脈上特に明確な指示がない限り、複数形の指示対象を含む。同様に、用語「a」(または「an」)、「1つ以上の」および「少なくとも1つの」は、本明細書では互換的に使用され得る。用語「含む (c o m p r i s i n g) 」、「含む (i n c l u d i n g) 」、「特徴とする」および「有する」も互換的に使用され得ることに留意すべきである。

【 0 0 1 9 】

別段の指定がない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の通常熟練者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で具体的に述べられるすべての刊行物および特許は、本発明に関連して使用される可能性のある刊行物中で報告される化学薬品、器具、統計分析、および方法論に関する記述および開示を含めて、すべての目的に対してそれらの全体が参照により援用される。本明細書で引用されるすべての参考文献は、当技術分野の技術水準を暗示するものと受け取るべきである。本明細書中の何物も、本発明が従来発明に基づくかかる開示に先立つ資格がないという告白と解釈されるべきではない。

【 0 0 2 0 】

I I . 本発明

一実施形態では、本発明は、H I T の診断を助けるために、H I T を有すると疑われる患者における血小板活性化 (病原性) H I T 抗体を検出する方法を提供する。本発明の方法は、P F 4 と共にプレインキュベートした血小板を活性化することができる患者抗体を検出する。血小板、患者サンプルおよび P F 4 を同時に一緒に追加し、次いで、血小板活性化のレベルを検出することもできるが、しかしながら、血小板を P F 4 と共にプレインキュベートすると、いくつかの患者サンプルについて、最大限の血小板活性化がもたらされるので、好ましい実施形態である。外因性 P F 4 の使用およびヘパリンの不要は、特許請求の範囲に記載されている方法のユニークな特徴である。本発明の方法は、ヘパリンで治療された患者における血栓症 / 血小板減少症のリスクを増加させる抗体の、簡便、迅速かつ高感度の検出を可能にする。

【 0 0 2 1 】

10

20

30

40

50

一実施形態では、前記方法は、a) HITを有すると疑われる患者から、血清または血漿サンプルを得ること；b) 有効量の血小板第4因子(PF4)を洗浄正常ドナー血小板と共に室温で20分間インキュベートして、PF4処理血小板サンプルを得ること；c) 前記患者血液サンプルを前記PF4処理血小板サンプルと室温で60分間接触させること；ならびにd) 前記患者血液サンプルにおける血小板活性化抗体の量を測定することを含み、正常血清による活性化と比較した、患者サンプルによる血小板活性化の評価によって検出された病原性HIT抗体の存在は、前記患者がHITを有することを示す。図1に示されているアッセイでは、正常血清と比べたp-セレクチンの中央値蛍光強度(MFI)の8000超の増加は陽性であるとみなし得る。一般に、患者サンプルを用いて得られたシグナル(この場合にはp-セレクチン発現)の比が、正常サンプルを使用して得られたシグナルを、少なくとも2倍、最も好ましくは少なくとも3倍超える場合、測定値は陽性であるとみなし得る。

10

【0022】

一実施形態では、限定されないが、血小板表面p-セレクチンの増加；血小板表面に対するアネキシンVの結合の増加；血小板からのセロトニン、ベータトロンボグロブリン、ピロリン酸塩、フィブロンネクチンもしくはフォン・ヴィレブランド因子の放出の増加；血小板膜タンパク質FcガンマRII(CD32)のタンパク質分解切断の増加；血小板形態の変化；または血小板細胞質中のイオン化カルシウムレベルの増加を含む血小板活性化の1つ以上のマーカーを測定することによって、患者サンプルにおける血小板活性化抗体の量を決定する。活性化血小板上に見られる1つ以上のCDマーカーの発現レベルの変化；血小板凝集；細胞内カルシウムレベル；インテグリンのコンフォメーション；セロトニン、ATP、ADPもしくはVWFなどの血小板顆粒内容物の放出；血小板膜電位；または血小板インピーダンスを測定することによっても、患者サンプルにおける血小板活性化の量を決定し得る。

20

【0023】

図1Aおよび図2Aは、エンドポイントとしてp-セレクチン発現およびIgG結合を使用した、血小板活性化抗体の検出の具体例を提供する。測定は、当業者に公知の従来の方法を使用して、特殊な条件下で血小板活性化を検出するのに有用であり得る様々なものを包含する。本発明者らの発見は、PF4で処理した血小板を活性化するそれらの能力によって、血小板活性化抗体を検出する有用なものである。本発明者らは、この血小板活性化を検出し得るアッセイの2つのこのような例を示したが、他のものも使用し得る。

30

【0024】

一実施形態では、患者サンプルにおける血小板活性化(病原性)HIT抗体の測定を、血小板に対するヒト免疫グロブリンの結合を測定することによって実施する。

【0025】

一実施形態では、ヘパリンが少なくとも50U/mlのレベルで存在する高用量ヘパリン対照は、反応がベースラインレベルに低下することを示して、血小板活性化がHIT抗体によって特異的に媒介されたことを証明する。

【0026】

別の実施形態では、本発明の方法は、低用量ヘパリン、ヘパリン様分子またはポリアニオン化合物の存在下で実施され得るが、これらの物質は、血小板活性化抗体の量を測定するのに不要である。アッセイにおける低用量ヘパリンの追加は、特許請求の範囲に記載されているアッセイの感度または特異性の改善に対して測定可能な影響を及ぼさないと思われる。

40

【0027】

別の実施形態では、当業者に公知の多くの方法の1つにより血小板凝集または血小板凝固の増加を観察することによって、血小板活性化抗体の量を測定し得る。

【0028】

一実施形態では、本発明の方法は、2つ以上の蛍光標識抗体を追加する蛍光活性化細胞選別(FACS)をさらに含み得る。一実施形態では、一方の抗体は、血小板特異的マ-

50

カー、例えばCD41に特異的であり、別の抗体は、血小板活性化の表面マーカーに特異的であり、例えば、抗p-セレクチン抗体、またはアネキシンV結合と、その結合を検出するための抗アネキシンV抗体との組み合わせである。

【0029】

一実施形態では、本発明の方法は、血小板活性化の表面マーカーに特異的な蛍光標識プローブ、例えば抗p-セレクチン抗体、アネキシンV結合と、その結合を検出するための標識抗アネキシンV抗体との組み合わせを追加する蛍光活性化細胞選別(FACS)、または直接標識アネキシンVの使用をさらに含み得る。

【0030】

別の実施形態では、本発明の方法は、患者における血小板結合抗体を測定することによって、血小板活性化(病理性)HIT抗体を検出する方法を含む。前記方法は、a)ヘパリン誘発性血小板減少症(HIT)を有すると疑われる患者から、患者血液サンプルを得ること；b)有効量の血小板第4因子(PF4)を血小板サンプルと共にインキュベートして、PF4処理血小板サンプルを得ること；c)前記患者血液サンプルを前記PF4処理血小板と接触させること；およびd)前記患者血液サンプルにおける血小板結合抗体の量を測定することを含み、正常血清における血小板結合抗体と比較した、患者血液サンプルにおける血小板結合抗体の評価によって検出された病理性HIT抗体の存在は、前記患者がHITを有することを示す。

10

【0031】

一実施形態では、フローサイトメトリー分析で血小板をマーキングするのに使用される抗原は、CD9、CD23、CD31、CD36、CD41、CD42、CD49、CD61、CD62P、CD63、CD107、CD151、CD165、それらのアイソフォーム、または血小板の外部に存在する任意のマーカーである。血小板はまた、それらの前方散乱特性および側方散乱特性によって、フローサイトメトリーで同定され得る。

20

【0032】

具体的には、一実施形態では、本発明者らは、HITを有すると疑われる患者の血液サンプルにおける血小板活性化の量を測定する。工程1は、血小板をPF4と共にプレインキュベートすることである；工程2は、患者サンプルをPF4処理血小板と共にインキュベートして、それらの活性化を可能にすることである；工程3は、正常サンプルと比較したCD62P発現の上昇を調査することによって、血小板活性化を測定することである。血小板活性化の増加は、患者がHITを有することを示す。血小板の内部で高レベルのCD62Pを発現するアルファ顆粒は表面に遊走および融合して、その内容物を血流に漏出するので、これが起こる。これは、活性化血小板の表面上のCD62Pの上昇を引き起こす。

30

【0033】

一実施形態では、患者血液サンプルにおける血小板結合抗体の量の測定は、PF4処理血小板に結合する患者抗体の量を測定すること、およびその値と、正常血液サンプルを使用した場合に結合する抗体の量とを比較することを含む。図2に示されているアッセイでは、サンプルが、正常血清と比べた中央値蛍光強度(MFI)の2500超の増加を示す場合、サンプルは陽性であるとみなす。一般に、患者サンプルを用いて得られたシグナル(この場合にはIg-血小板結合)の比が、正常サンプルを使用して得られたシグナルを、少なくとも2倍、最も好ましくは少なくとも3倍超える場合、測定値は陽性であるとみなし得る。この実施形態では、PF4で前処理された血小板に結合する患者抗体の検出は、HITを示す。この実施形態では、PF4で血小板を前処理し、次いで、患者血液サンプルと共にインキュベートする。血小板を1回洗浄し、例えば、ヒト免疫グロブリンG、AまたはMに特異的な蛍光標識二次抗体を追加することによって、血小板結合抗体の量を測定する。

40

【0034】

キット。本発明はまた、患者血清における血小板活性化抗体の存在を決定するためのキットを提供する。一実施形態では、前記キットは、a)有効量の精製ヒトPF4；b)血

50

血小板活性化のマーカに対する有効量の少なくとも1つの標識抗ヒト抗体であって、2つを使用する場合には、一方が血小板特異的抗体（例えば、抗CD41）と反応性であり得、他方が、血小板活性化のマーカ（例えば、p-セレクチン）と反応性である少なくとも1つの標識抗ヒト抗体；c）陽性反応の特異性を確認するのに十分な有効量の高用量ヘパリン；d）有効量の陽性対照HIT抗体；e）有効量の陰性対照抗体血清；f）アッセイで使用するための正常ドナー血小板を得るための説明書；ならびにg）アッセイを実施するための説明書；h）血小板活性化のマーカを検出するための1つ以上のさらなる試薬（例えば、蛍光標識アネキシンVまたは抗p-セレクチン抗体）g）ベースライン血小板活性化を最小化するためのプロスタグランジンE1を含む。反応構成要素がより少ないキットは、a）有効量の精製ヒトPF4；b）血小板活性化のマーカに対する有効量の少なくとも1つの標識抗ヒト抗体（例えば、抗ヒトp-セレクチン抗体）、ならびにc）使用説明書を含み得る。

10

【0035】

定義。「診断」によって、本発明者らは、病状（例えば、癌または前悪性病変）もしくは症候を分類すること、病状の重症度（悪性度または病期）を決定すること、病状の進行をモニタリングすること、ならびに/または病状の転帰および/もしくは回復の可能性を予測することを意味する。

【0036】

「有効量」によって、本発明者らは、望ましい転帰をもたらすのに十分な化合物の量を意味する。「有効量」は、化合物、使用、担当医師または獣医師の判断、および他の要因に応じて変化するであろう。

20

【0037】

「HIT」によって、本発明者らは、ヘパリン誘発性血小板減少症を意味し、これは、血小板第4因子（PF4）とヘパリンとの複合体に結合して、血栓促進症状および血小板減少症状（これは、重症例では致死的であり得る）をもたらす血小板活性化抗体を罹患患者が産生する、ヘパリンに対する有害反応である。

【0038】

「ヘパリン誘発性」によって、本発明者らは、ヘパリンに対する曝露から生じる抗体、または自然発生HITのように、HITの指標である、ヘパリンと複合体形成したPF4を認識するものを意味する。

30

【0039】

「ヘパリン様化合物」によって、本発明者らは、高い負電荷を有する化合物、例えばポリアニオン、ヘパリン誘導体、化学修飾ヘパリン、ヘパリン様グリコサミノグリカン分子、複数のヘパリンまたはヘパリン様グリコサミノグリカンを含むプロテオグリカン、低分子量ヘパリン、またはヘパリン様グリコサミノグリカンの意味し、これらはいずれも直接的に、またはスペーサー/リンカー分子を介してコア分子に接続され得る。

【0040】

「患者」によって、本発明者らは、HITを有すると疑われる任意のヒトを意味する。「HITを有すると疑われる」によって、本発明者らは、患者が、HITを示す臨床所見（例えば、正常未満の血小板数、以前に診断された血塊の拡大もしくは拡張、または体内の他の場所における新たな血塊の発達を含む）を示すことを意味する。HITを示すさらなる症候としては、発熱、発疹、悪寒、高血圧、息切れおよび胸痛が挙げられる。

40

【0041】

栓球としても公知の「血小板」、によって、本発明者らは、血液凝固、止血および血栓形成に関与する巨核球の無核断片を意味する。通常、ヒト血小板は、限定されないが、血小板アフレーシス、血小板フェレーシスおよび分画遠心法を含む様々な方法によって単離される。洗浄正常ドナー血小板が適切であるが、しかしながら、未洗浄血小板、単離血小板または精製血小板を含む他の供給源由来の血小板も使用し得る。

【0042】

「血小板活性化」によって、本発明者らは、活性化を誘発する分子、例えばコラーゲン

50

、トロンボキサンA2、ADP、トロンピンなどに血小板が遭遇した場合の、血小板の応答を意味する。血小板活性化は、例えば、血小板活性化に関連するマーカーの変化、密顆粒および顆粒のエキソサイトーシス、膜酵素ホスホリパーゼA2の活性化、形態の変化などを含む血小板の様々な変化をもたらす。

【0043】

当技術分野で公知の任意の方法を使用して、血小板活性化レベルを測定し得る（例えば、患者血液サンプルにおける活性化血小板に見られるか、または前記活性化血小板から放出されるマーカーのレベルを、正常対照サンプルにおける活性化血小板のレベルと比較して測定するなど）。活性化血小板に見られるか、または活性化血小板から放出されることが公知の任意のマーカー（例えば、活性化血小板に見られる1つ以上のCDマーカー、例えばp-セレクチンとしても公知のマーカーCD62Pを含む）を使用して、血小板活性化を測定し得る。加えて、免疫グロブリンの結合の増加、血小板凝集、細胞内イオン化カルシウムレベル、インテグリンのコンフォメーションの変化、血小板顆粒内容物の放出、血小板膜電位もしくは血小板インピーダンスの変化、Fcガンマ受容体2切断断片のレベル、または血小板の形態変化を測定することによって、血小板活性化を測定し得る。

10

【0044】

「血小板活性化の増加」によって、本発明者らは、正常血液サンプルにおけるベースライン血小板活性化のものの少なくとも1.5倍の血小板活性化の増加を意味する。一実施形態では、血小板活性化の増加は、正常血液サンプルにおけるベースライン血小板活性化の量の少なくとも2倍または3倍である。正常血液サンプルと比較した患者血液サンプルの「増加」の決定は、試験サンプル、陽性対照サンプルおよび既知の正常サンプルならびに統計的方法の使用、例えば、正常サンプル、または試験もしくは患者サンプルの比較に使用するための試験サンプルの計算された代表値、平均値、中央値または範囲の使用を必要とし得る。

20

【0045】

「PF4」によって、本発明者らは、血小板から精製されたネイティブな血小板因子4（PF4）または組換え型PF4のいずれかを意味する。ネイティブなPF4は、四量体状態で存在する。最適には、PF4は四量体であるが、他の形態のPF4も機能し得る。

30

【0046】

「サンプル」によって、本発明者らは、HITを有すると疑われるヒトまたは動物患者から得られた検体または培養物を意味する。生物学的サンプルは、患者から得ることができ、流体、固体、組織および気体を包含する。一実施形態では、患者抗体の供給源は、血清であろう。しかしながら、血漿、全血または他の血液産物、例えば多血小板血漿などは十分であろう。好ましくは、約0.2mlのサンプルが試験反応に必要である。しかしながら、このような例は、本発明に適用可能なサンプルの種類を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0047】

「固体表面」によって、本発明者らは、PF4-ヘパリン複合体（または他の抗原）の固定化に適切な任意の表面を意味する。この技術のための好ましい固体支持体は、ポリスチレンビーズである。他の種類のビーズとしては、磁気ビーズ、微粒子およびナノ粒子が挙げられる。いくつかのナノ粒子は、金属製の内部を有する。他の固体支持体としては、ポリスチレンまたは他のプラスチックから作られたELISAプレートが挙げられ得る。

40

【0048】

「標識抗体」によって、本発明者らは、蛍光色素で標識された任意の抗体、例えばFc特異的なアロフィコシアニン（APC）結合AffiniPure F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、鎖特異的なフルオレセイン（FITC）結合F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgAなどを意味する。加えて、このような抗体の生産のために、限定されないが、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ロバ、ウマ、ウシ、ブタおよびサルを含む様々な種を使用し得る。これらの抗体は、天然ではポリクローナルまたはモノクローナルのいずれ

50

れかであり得る。

【0049】

「使用説明書」によって、本発明者らは、刊行物、記録、図表、または本明細書に記載される目的の1つのために本発明の有用性を伝達するのに使用される任意の他の表現媒体を意味する。前記キットの説明資料は、例えば、本発明を含有する容器に添付され得るか、または本発明を含有する容器と一緒に輸送され得る。

【0050】

希釈。一実施形態では、患者サンプルの希釈は、1:5 (血小板活性化アッセイ) および1:20 (血小板結合アッセイ) である。しかしながら、当業者によって決定されるように、使用者の要求に応じて、未希釈~1:500の範囲内の他の希釈も十分であり得る。本明細書で使用される患者サンプルの最も適切な希釈は、血清の1:5~1:20希釈であるが、しかしながら、患者における抗体応答の強さに応じて、1:2~1:10, 000の範囲内の他の希釈も十分であり得る。最も好ましい種類のサンプルは、血清であろう。しかしながら、本発明者らは、全血または血漿も十分であると予測する。強力な抗体を含有するサンプルの場合、1:500超の希釈が適切であり得る。

10

【0051】

緩衝液。好ましい実施形態では、PBS-1%BSAまたはTyrodes HEPES-1%BSA緩衝液を体抗原反応に使用する。しかしながら、当技術分野で公知のほとんどの等張溶液および生理溶液も十分であろう。

【0052】

インキュベーション時間。一実施形態では、血小板活性化および抗体抗原反応が5~120分間、最も最適には60分間起こるようにする(血小板結合アッセイおよび血小板活性化アッセイ)。しかしながら、当業者によって認識されるように、より長いまたはより短いインキュベーションを使用し得る。驚くべきことに、本発明者らは、37℃ではなく室温でのインキュベーションが、血小板結合抗体および血小板活性化抗体の両方を測定するために最適であることを見出した。

20

【0053】

PF4と血小板とのプレインキュベーション。血小板結合抗体および血小板活性化のレベルを測定するために、PF4を血小板と共にプレインキュベートすることにより、SRA陽性サンプルおよびSRA陰性サンプルがより明確に区別可能になるようにアッセイ性能が増強された。血小板活性化アッセイおよび血小板結合アッセイは両方とも、統計的有意性でSRA(-)とSRA(+)抗体とを区別する。これは、本発明者らの発見および本発明の好ましい実施形態の重要な実用的特性である。

30

【0054】

蛍光色素。一実施形態では、本発明の方法で使用される各抗体は、蛍光標識される。例えば、蛍光色素を使用することを含む、当技術分野で公知の任意の蛍光標識方法を使用し得る。例えば、一実施形態では、当業者であれば、可能な限り重複しないように発光スペクトルを有する抗体を使用するであろう(例えば、FITC、APCおよびPEなど)。フローサイトメトリー装置中に存在する検出レーザーを使用することによって、色素の蛍光発光を区別することができるように、蛍光標識二次抗体の置換を使用し得る。色素の発光スペクトルが近ければならない程度に制限はない。しかしながら、異なる検出レーザーを使用する蛍光標識抗体を求めることが一般に認められている。

40

【0055】

フローサイトメトリー。フローサイトメトリーは、細胞を流れる流体に懸濁し、電子検出装置によってそれらを通させることによって、細胞計数、選別、バイオマーカー検出およびタンパク質工学に用いられるレーザー生物物理学的技術である。それは、1秒間当たり最大数千個の粒子の物理的特性および/または化学的特性の同時分析を可能にする。フローサイトメトリーは、健康障害、特に血液癌の診断に日常的に使用されているが、基礎研究、臨床診療および臨床試験における他の多くの用途を有する。一般的な変化は、目的の集団を精製するために、その特性に基づいて粒子を物理的に選別することである。本

50

発明の一実施形態では、細胞に結合した蛍光標識抗体を検出および定量することができるフローサイトメトリーは、このような抗体によって引き起こされる血小板活性化（例えば、p-セレクチン発現）を測定することによって、またはPF4処理血小板に対するこのような抗体の結合を測定することによって、血小板活性化HIT抗体を検出して、HITの診断を補助するために使用される。しかしながら、当技術分野で公知の蛍光標識抗体を検出する他の方法も使用し得る。例えば、Luminex型プラットフォームは蛍光色素標識ビーズ検出し、または蛍光を読み取ることができるELISAプレートリーダーも使用し得る。

【0056】

当業者であれば、同様に作用する様々な物質または条件を、本明細書に記載されるものの代用とすることができることを認識するであろう。血小板、血小板特異抗原、血小板活性化のマーカー、抗体および抗原の混合物をインキュベートする方法、抗体に使用される希釈範囲、反応に使用される緩衝液、患者抗体の供給源、インキュベーション時間、二次抗体の種、二次抗体と共に使用される標識、ならびに標識抗体の検出フォーマットについて、これらの代用が可能である。

10

【0057】

複数の実施形態が開示されるが、当業者であれば、以下の詳細な説明から、本発明のさらに他の実施形態が明らかであろう。明らかであるように、本発明は、本発明の精神および範囲から逸脱せずに、様々な明白な態様を改変することができる。したがって、詳細な説明は、本質的に例示的なものであり、限定的なものではないとみなされるべきである。

20

【0058】

III. 実施例

当然のことながら、以下の実施例は、単に例示目的で示されるものであり、決して本発明の範囲を限定するものではない。実際、本明細書に示され記載されるものに加えて、上記説明および以下の実施例から、本発明の様々な改変が当業者に明らかであり、添付の特許請求の範囲内にある。

【実施例1】

【0059】

患者および臨床試験。

【0060】

HITを有すると疑われる患者由来の血清サンプル（ $n = 53$ ）を、血小板およびNeutrophil Immunology Laboratory of the Blood Center of Wisconsin (BCW)から入手した。選択したサンプルは、PF4-ELISA陽性であり、光学密度(OD)が0.4超であり、高用量(HD; 100 U/ml)未分画ヘパリン(UFH)で49%以上減少した。各サンプルについて、SRAを少なくとも2回実施したところ、セロトニン放出アッセイ(SRA)では、29個のサンプルが一貫して陽性であり、24個が陰性であった。研究プロトコルは、Institutional Review Board of Blood Center of Wisconsinによって承認された。

30

【実施例2】

【0061】

p-セレクチンアッセイ。

【0062】

プロスタグランジンE1の存在下で、(ドナー間の血小板変動を最小限にするために)グループOの血液ドナー2~3人のクエン酸多血小板血漿から血小板を単離した。反応混合物は、 1×10^6 個の血小板を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)-1%ウシ血清アルブミン(BSA)から構成されており、これに、(1) $50 \mu\text{g/ml}$ PF4、(2) $50 \mu\text{g/ml}$ PF4および高用量(HD)UFHまたは(3)緩衝液を室温で20分間追加した。このアッセイでは、追加するPF4の量を最適化して、血小板活性化を最大化した。次いで、10マイクロリットルの血清を追加して、 $50 \mu\text{l}$ の最終反応容量を

40

50

得た。前述のように、ヒトPF4を精製した。

【0063】

室温で60分間インキュベートした後、フィコエリトリン (PE) 標識 p - セレクチン抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA) および Alexa Fluor 647 標識抗 GPIIb 抗体 290.5 を追加した。15分後、200 μ l の PBS - 1% BSA で混合物を希釈し、Accuri C6 フローサイトメーターにおいて、血小板イベントを得た。GPIIb 陽性によってイベントをゲーティングし、p - セレクチン PE の中央値蛍光強度 (MFI) を記録した。

【実施例3】

【0064】

免疫グロブリン - 血小板結合アッセイ。

【0065】

プロスタグランジン E1 の存在下で、(ドナー間の血小板変動を最小限にするために) グループ O の血液ドナー 2 ~ 3 人のクエン酸多血小板血漿から血小板を単離した。反応混合物は、 1×10^6 個の血小板を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) - 1% ウシ血清アルブミン (BSA) から構成されており、これに、(1) 50 μ g / ml PF4、(2) 50 μ g / ml PF4 および高用量 (HD) UFH ならびに (3) 緩衝液を室温で20分間追加した。このアッセイでは、追加する PF4 の量を最適化して、血小板に対する IgG 結合を最大化した。次いで、2.5 マイクロリットルの血清を追加して、50 μ l の最終反応容量を得た。室温で60分間インキュベートした後、FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) および Alexa Fluor 647 標識抗 GPIIb 抗体 290.5 を追加した。30分後、200 μ l の PBS - 1% BSA で混合物を希釈し、Accuri C6 フローサイトメーターにおいて、血小板イベントを得た。GPIIb 陽性によってイベントをゲーティングし、抗ヒト IgG FITC の中央値蛍光強度 (MFI) を記録した。

【0066】

統計：マンホイットニー検定を使用して、SRA + サンプルおよび SRA - サンプルの2つの群を比較した (Prism, Graphpad, La Jolla, CA)。Analyse-it ソフトウェア (Leeds, UK) を使用して、受信者動作特性曲線を作成した。0.05 未満の p 値を有意とみなした。

【0067】

結果

SRA 陰性ではなく SRA 陽性の患者サンプルは、PF4 で前処理した血小板における血小板 p - セレクチン発現を誘導した。PF4 で前処理した血小板における p - セレクチン発現を誘導する 53 メンバー HIT 抗体パネルの能力を特性評価した。図 1 A (左) に示されているように、未処理の血小板を使用した場合、SRA 陰性サンプルは、p - セレクチン発現を誘導することができず、SRA 陽性サンプルは、ごくわずかであるが有意な p - セレクチンの増加をもたらした (それぞれ SRA + サンプル対 SRA - サンプルについて、中央値蛍光強度 (MFI) の平均増加は、正常血清と比べて 2295 対 - 112 であった。p < 0.0001)。

【0068】

PF4 で前処理した血小板をアッセイで使用した場合、SRA 陰性サンプルではなく SRA 陽性サンプルによって誘導される p - セレクチン発現は、大きく増加した (図 1 A、中央; それぞれ SRA + サンプル対 SRA - サンプルについて、中央値蛍光強度 (MFI) の平均増加は、正常血清と比べて 12,037 対 1415 であった。p < 0.0001)。p - セレクチン発現は、高用量ヘパリンによって有意に阻害された (図 1 A、右)。

【0069】

ROC 分析では、曲線下面積 (AUC) は、診断精度の尺度を提供する。p - セレクチン発現アッセイは、1.0 の完全な AUC 測定値を達成した (図 1 B)。これは、非常に高い信頼性で、p - セレクチン発現アッセイを SRA の代わりとして使用し得ることを示

10

20

30

40

50

唆している。本明細書で使用される用語「PF4強化p-セレクチン放出アッセイ」、「p-セレクチン発現アッセイ」および「血小板活性化アッセイ」はすべて、本発明の方法を指す。

【0070】

SRA(-)ではなくSRA(+)の患者血清中の抗体は、PF4で前処理した血小板を認識した。図2A(左)に示されているように、SRA陰性サンプル由来のIgGは、未処理の血小板に結合することができず、SRA陽性サンプルは、ごくわずかであるが有意なIgG結合の増加をもたらした(それぞれSRA+サンプル対SRA-サンプルについて、中央値蛍光強度(MFI)の平均増加は、正常血清と比べて5,046対2,665であった。 $p < 0.05$)。

10

【0071】

対照的に、SRA(-)サンプルではなくほとんどのSRA(+)患者サンプル中の抗体は、PF4で前処理した血小板を認識する(図2A、中央;それぞれSRA+サンプル対SRA-サンプルについて、中央値蛍光強度(MFI)の平均増加は、正常血清と比べて29,585対3,393であった。 $p < 0.0001$)。血小板に対するIgG結合は、高用量ヘパリンによって有意に阻害された(図2A、右)。

【0072】

血小板結合アッセイは、0.94のAUC測定値を達成した(図2B)。これは、高い信頼性で、本発明の血小板結合アッセイをSRAの代わりとして使用し得ることを示唆している。本明細書で使用される用語「PF4強化血小板結合アッセイ」、「IgG-血小板結合アッセイ」および「免疫グロブリン-血小板結合アッセイ」はすべて、本発明の方法を指す。

20

【0073】

上記説明、添付の図面および下記特許請求の範囲は例示的なものであり、本発明を限定するものではない。本明細書に記載される本発明を考慮して、当業者であれば、本発明の多くの主題および変形に想到するであろう。このような主題および変形はすべて、本明細書の企図する範囲内である。例えば、上記様々な例示的な実施形態および下記特許請求の範囲に関して本発明を説明したが、公知のものであるか、または希少なものであるか、または現時点で予期されていないものであり得るかにかかわらず、当業者であれば、様々な代替、改変、変形、改良および/または実質的な均等物が明らかであり得る。本発明の精神および範囲から逸脱せずに、様々な変更を行い得る。したがって、本発明は、これらの例示的な実施形態のすべての公知のまたは今後開発される代替、改変、変形、改良および/または実質的な均等物を包含することを意図する。

30

【0074】

参考文献

1. Jang IK, Hursting MJ. Circulation. 2005; 111: 2671 - 2683.
2. Arepally GM, Ortel TL. Annu Rev Med. 2010; 61: 77 - 90.
3. Shantsila E, Lip GY, Chong BH. Chest. 2009; 135: 1651 - 1664.
4. Lo GK, Sigouin CS, Warkentin T. Am J Hematol. 2007; 82: 1037 - 1043.
5. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, et al. N Engl J Med. 1995; 332: 1330 - 1335.
6. Warkentin TE. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011; 2011: 143 - 149.
7. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, et al. Thromb Haemost. 1992; 68: 95 - 96.
8. Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH.

40

50

- J Clin Invest . 1994 ; 93 : 81 - 88 .
- 9 . Kelton JG et al . Blood . 1994 ; 83 : 3232 - 3239 .
- 10 . Greinacher A et al . Thromb Haemost . 1994 ; 71 : 247 - 251 .
- 11 . Greinacher A , Juhl D , Strobelt U , et al . J Thromb Haemost . 2007 ; 5 : 1666 - 1673 .
- 12 . Bakchoul T et al . Thromb Res . 2011 ; 127 : 345 - 348 .
- 13 . Morel - Kopp MC et al . Int J Lab Hematol . 2010 ; 33 : 245 - 250 . 10
- 14 . Juhl D et al . Eur J Haematol . 2006 ; 76 : 420 - 426 .
- 15 . Cuker A , Rux AH , Hinds JL , et al . Blood . 2013 ; 121 : 3727 - 3732 .
- 16 . Nazi I , Arnold DM , Smith JW , et al . J Thromb Haemost . 2013 ; 11 : 1146 - 1153 .
- 17 . Levine RL . Chest . 2005 ; 127 : 1488 - 1490 .
- 18 . Davoren A , Aster RH . Am J Hematol . 2006 ; 81 : 36 - 44 . 20
- 19 . U . S . Cancer Statistics Working Group . <http://www.cdc.gov/uscs> .
- 20 . Go AS , Mozaffarian D , Roger VL , et al . Circulation . 2013 ; 127 : e6 - e245 .
- 21 . Cuker A , Cines DB . Blood . 2012 ; 119 : 2209 - 2218 .
- 22 . McFarland J et al . Am J Hematol . 2012 ; 87 : 776 - 781 .
- 23 . Sheridan D , Carter C , Kelton JG . Blood . 1986 ; 67 : 27 - 30 . 30
- 24 . Bougie DW et al . Blood . 2010 ; 116 : 3033 - 3038 .
- 25 . Bougie DW , Rasmussen M , Zhu J , Aster RH . Blood . 2012 ; 119 : 6317 - 6325 .
- 26 . Zou KH , O'Malley AJ , Mauri L . Circulation . 2007 ; 115 : 654 - 657 .
- 27 . Rauova L et al . Blood . 2006 ; 107 : 2346 - 2353 .
- 28 . Newman PM , Chong BH . Blood . 2000 ; 96 : 182 - 187 . 40
- 29 . Horne MK , 3rd , Alkins BR . J Lab Clin Med . 1996 ; 127 : 435 - 442 .
- 30 . Horne MK , 3rd , Hutchison KJ . Am J Hematol . 1998 ; 58 : 24 - 30 .
- 31 . Suh JS , Aster RH , Visentin GP . Blood . 1998 ; 91 : 916 - 22 .
- 32 . US Patent 5,763,201 to Aaron Tomer .
- 33 . Sachais BS et al . Blood . 2012 Aug 2 ; 120 (5) : 1137 - 42 .
- 34 . Kowalska MA et al . Blood . 2011 Sep 8 ; 11 50

8 (1 0) : 2 8 8 2 - 8 .

3 5 . R a u o v a L e t a l . B l o o d . 2 0 1 0 D e c 2 ; 1 1 6 (2 3) : 5 0 2 1 - 3 1 .

3 6 . K o w a l s k a M A e t a l . T h r o m b R e s . 2 0 1 0 A p r ; 1 2 5 (4) : 2 9 2 - 6 .

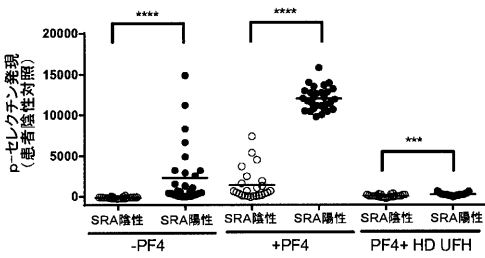
3 7 . R a u o v a L e t a l . J T h r o m b H a e m o s t . 2 0 0 9 J u l ; 7 S u p p l 1 : 2 4 9 - 5 2 .

3 8 . P o n c z M e t a l . P a t h o p h y s i o l H a e m o s t T h r o m b . 2 0 0 6 ; 3 5 (1 - 2) : 4 6 - 9 .

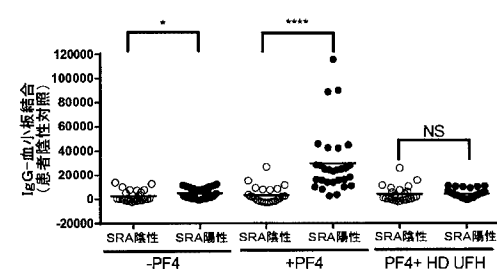
3 9 . S u v a r n a S e t a l . B l o o d . 2 0 0 5 A u g 1 ; 1 0 6 (3) : 9 2 9 - 3 1 .

10

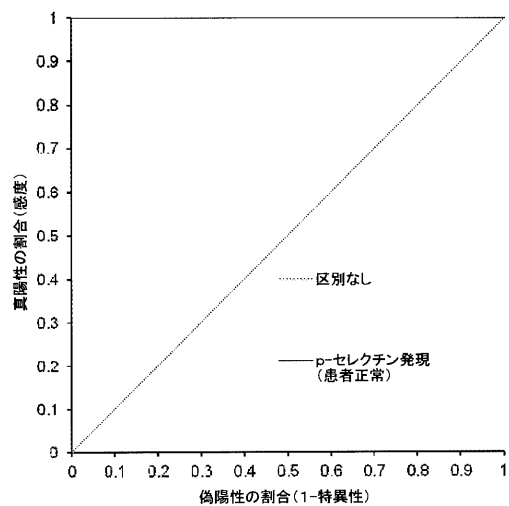
【 図 1 A 】



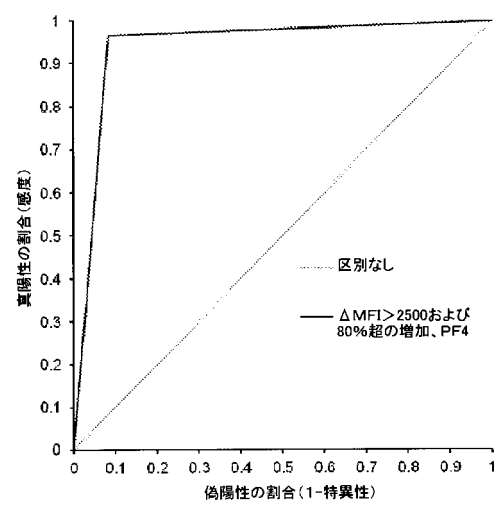
【 図 2 A 】



【 図 1 B 】



【 図 2 B 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/82591
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/86, C12Q 1/56 (2014.01) CPC - G01N 33/86, G01N 2800/222 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) IPC - G01N 33/86, C12Q 1/56 (2014.01); CPC - G01N 33/86, G01N 2800/222; USPC - 435/7.21 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/7.21 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Google Patent (US, EP, WIPO); Dialog Proquest (NPL); Patbase (CN, DE, EP, FR, GB, JP, KR, US, WIPO); Search Terms: detect*, measur*, assess*, diagnos*, platelet, antibod*, immuno*, blood, disease, disorder, serum, plasma, pf4, platelet, platelet factor 4, hit, heparin-induced thrombocytopenia, cd62p, p-selectin, Granule Membrane, GMP-140		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 2013/042111 A2 (TOMER) 28 March 2013 (28.03.2013); entire document, especially p 9, ln 19-27, 30-33; p 10, ln 1-4, 15-24; p 11, ln 1-5, 9-11; p 12, ln 1-12, 14-20; p 13, ln 4-26; p 14, ln 17-20; p 15, ln 1-3, 10-25; p 19, ln 30-33; p 26, ln 7-10; p 38, ln 3-11; p 57, ln 1-30	1-13, 15-19 — 14
Y	US 7,790,362 B2 (COLLER et al.) 07 September 2010 (07.09.2010); entire document, especially col 1, ln 14-22.	14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 18 December 2014 (18.12.2014)		Date of mailing of the international search report 13 JAN 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

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

(74)代理人 100110733

弁理士 鳥野 正司

(74)代理人 100115048

弁理士 福田 康弘

(72)発明者 アスター、リチャード、エイチ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53202、ミルウォーキー、ナンバー18イー、エヌ プロスペクト 1800

(72)発明者 ブージー、ダニエル、ダブリュ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53022、ジャーマンタウン、マグノリア ドライブ ダブリュ142 エヌ10576

(72)発明者 ジョーンズ、カーティス、ジェラルド

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53211、ミルウォーキー、アパートメント 5、エヌ ストーウェル アベニュー 2545

(72)発明者 パドマナバーン、アナン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53066、オコノモウオック、リバー レイクス ロード エス、1862

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ02 QQ03 QQ79 QQ91 QR48 QR51 QR67 QS33

专利名称(译)	检测引起肝素诱导的血小板减少症/血栓形成的血小板活化抗体的方法		
公开(公告)号	JP2016537648A	公开(公告)日	2016-12-01
申请号	JP2016552204	申请日	2014-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	ブラッドセンターリサーチファウンデーション		
申请(专利权)人(译)	布拉德中心研究基金会		
[标]发明人	アスターリチャードエイチ ブージーダニエルダブリュ ジョーンズカーティスジェラルド パドマナバーンアナン		
发明人	アスター、リチャード、エイチ ブージー、ダニエル、ダブリュ ジョーンズ、カーティス、ジェラルド パドマナバーン、アナン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/04		
CPC分类号	G01N33/86 C12Q1/56 G01N33/56966 G01N33/6854 G01N2333/70564 G01N2800/222 G01N2800/224 G01N2800/226		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.D C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR67 4B063/QS33		
代理人(译)	滝野秀雄 川崎孝雄 津田俊明 福田 康弘		
优先权	61/896951 2013-10-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种检测患者血小板活化的方法，其包括以下步骤：a) 从怀疑患有肝素诱导的血小板减少症 (HIT) 的患者获得血样； b) 有效量的血小板与血小板样品的温育因子 (PF4) 以获得经PF4处理的血小板样品； c) 使所述患者血液样品与所述经PF4处理的血小板接触；和d) 测量血小板活化程度。与使用正常血液样本获得的结果相比，血小板活化的增加提供了一种指示患者患有HIT的方法。

