

(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2009-516201

(P2009-516201A)

(43) 公表日 平成21年4月16日(2009.4.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 X	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2008-541395 (P2008-541395)	(71) 出願人	592221528
(86) (22) 出願日	平成18年11月17日 (2006.11.17)		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
(85) 翻訳文提出日	平成20年7月15日 (2008.7.15)		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
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/044840	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02007/059332		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成19年5月24日 (2007.5.24)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/737,488		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成17年11月17日 (2005.11.17)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/804,843		
(32) 優先日	平成18年6月15日 (2006.6.15)		
(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】

本発明は、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。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。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 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。

## 【請求項 2】

前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-セレクトリン、およびコンパルクシンから選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記血小板活性化因子はADPである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記血小板は、多血小板血漿から得られたものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記抗CD40L抗体はhu5c8である、請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記架橋因子は、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、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

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

## 【請求項 9】

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

30

## 【請求項 10】

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

## 【請求項 11】

CD40L結合部分対架橋因子の比は、3:2である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 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、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。

40

## 【請求項 13】

ヒトがCD40L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って、

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CD40L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って、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い、工程；および

50

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。

【請求項14】

前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、好中球エラストラーゼ、p-セレクチン、およびコンバルキシンから選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記血小板活性化因子はADPである、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記血小板は、多血小板血漿から得られる、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

前記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体である、請求項13に記載の方法。

【請求項18】

前記抗CD40L抗体はhu5c8である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記架橋因子は、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、請求項13に記載の方法。

【請求項20】

前記架橋因子は、sCD40L、抗ヒトIgG抗体、および抗hFc抗体から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項21】

CD40L結合部分対架橋因子の比は、1:1000~1000:1である、請求項13に記載の方法。

【請求項22】

CD40L結合部分対架橋因子の比は、1:500~500:1である、請求項13に記載の方法。

【請求項23】

CD40L結合部分対架橋因子の比は、3:2である、請求項13に記載の方法。

【請求項24】

ヒトが抗CD40L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って、

該ヒトから血小板を採取する工程；

該血小板をADPで活性化する工程；

活性化した該血小板と、該抗CD40L抗体とを接触させる工程；

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であって、該抗CD40L抗体とsCD40L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。

【請求項25】

血小板活性化因子および架橋因子を含む、キット。

【請求項26】

前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、好中球エラストラーゼ、p-セレクチン、およびコンバルキシンから選択される、請求項25に記載のキット。

【請求項27】

前記血小板活性化因子はADPである、請求項25に記載のキット。

【請求項28】

10

20

30

40

50

CD40L結合部分をさらに含む、請求項25に記載のキット。

【請求項29】

前記CD40L結合部分は、抗CD40L抗体である、請求項28に記載のキット。

【請求項30】

前記抗CD40L抗体はhu5c8である、請求項29に記載のキット。

【請求項31】

前記架橋因子は、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、請求項25に記載のキット。

【請求項32】

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

【請求項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、請求項25に記載のキット。

【請求項34】

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

【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

10

20

30

40

50

体の産生をもたらし得る。

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

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

【非特許文献3】van Kooten̄、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】Katō、J. Clin. Invest., 1999, 104, 947 - 955

【非特許文献6】Vakkalan̄、Arthritis Rheum., 1999, 42, 871 - 881

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

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(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、好中球エラストラーゼ、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。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。

【0006】

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。

【0007】

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、好中球エラストラーゼ、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

10

20

30

40

50

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。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。

【0008】

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。

10

【0009】

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、トロンピン、トロンボキサン、好中球エラストラーゼ、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。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。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

（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。

【0011】

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。

30

【0012】

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。

40

【0013】

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

50

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、トロンピン、トロンボキサン(例えば、TXA2)、ヒト好中球エラストラーゼ(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。

#### 【0014】

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10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20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、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。

#### 【0015】

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(例えば、FcRI、FcRII、FcRIII、およびFcRn)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。

#### 【0016】

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確立の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な、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。

#### 【0017】

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

10

20

30

40

50

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。

【0018】

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。

10

【0019】

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、好中球エラストラーゼ、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。

20

30

【0020】

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】

【0021】

(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)。

40

【0022】

(実施例2: 多血小板血漿(PRP)の調製および血小板の回収)

50

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常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。

#### 【0023】

(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でブロッティングした(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。

#### 【0024】

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、10μM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。

#### 【0025】

(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 $2 \sim 5 \times 10^8$ /mLの血小板を含むPRPの350μLアリコートを、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100μLに加えた。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。

#### 【0026】

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50μLの添加によって開始した。上記凝集プロファイラーは、同時に稼働し得る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

10

20

30

40

50

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 A D P 濃度で実施した。

【 0 0 2 7 】

( 実施例 5 : 活性化血小板の表面上での C D 4 0 L の発現 )

C D 4 0 L 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 ) 。 C D 4 0 L 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 C D 4 0 L 抗体と一緒にインキュベートし、表面 C D 4 0 L の存在を、結合したビオチン化抗 C D 4 0 L 抗体を定量することによって決定した。 C D 4 0 L の表面発現を、 1 0 μ M の A D P と一緒に、または A D P なしでのインキュベートの 1 分後、 1 0 分後、 2 0 分後、 4 0 分後、および 6 0 分後に評価した。 C D 4 0 L の表面発現は、活性化のわずか 1 分後に A D P 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 ) 。 s C D 4 0 L とのビオチン結合体化抗 C D 4 0 L 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 C D 4 0 L 抗体の結合は C D 4 0 L 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 C D 4 0 L 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。

10

【 0 0 2 8 】

それにもかかわらず、A D P 処理された血小板上で発現する表面 C D 4 0 L 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、C D 4 0 L が通常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 C D 4 0 L 抗体の結合により、抗 C D 4 0 L が血小板表面上に存在する C D 4 0 L 分子を認識することが確認される。

20

【 0 0 2 9 】

( 実施例 6 : 血小板部分における C D 4 0 L の量の評価 )

活性化血小板の表面上に発現される C D 4 0 L は C D 4 0 L 抗体によって認識され得るので、抗 C D 4 0 L 抗体に対するこの潜在的な「くぼみ ( s i n k ) 」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 C D 4 0 L の量を、組換え s C D 4 0 L 標準の既知の量と比較した。1 0 0 万個の血小板における C D 4 0 L の量は、約 8 0 p g であると見積もられる。新たに採血した血液の各 1 m L は約 3 0 0 万個の血小板を含み、平均的な人は約 5 L の総容量を有する。計算上は、約 1 2 0 μ g の C D 4 0 L が、平均的な個体の血小板部分に存在する。

30

【 0 0 3 0 】

( 実施例 7 : 血小板凝集における研究用グレードの抗 C D 4 0 L 抗体の効果 )

抗 C D 4 0 L 抗体と、活性化血小板上で発現された C D 4 0 L 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 C D 4 0 L 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 C D 4 0 L 抗体は、広範な A D P 濃度にわたって、A D P 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 C D 4 0 L 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 I g G 抗体 ( 表 2 および表 3 ) は、血小板凝集に影響しなかった。C D 4 0 - F c を評価し、血小板の表面上に発現される C D 4 0 L 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。C D 4 0 - F c は、血小板凝集に影響しなかった ( 表 4 ) 。

40

【 0 0 3 1 】

( 実施例 8 : 血小板凝集における架橋抗 C D 4 0 L 抗体の効果 )

( 抗体によって架橋された抗 C D 4 0 L 抗体 )

抗 C D 4 0 L 抗体が I g G の F c 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 h F c と一緒に、または抗 h F c なしで、抗 C D 4 0 L 抗体で処理した。一方の実験では、架橋された抗 C D 4 0 L 抗体の効果、種々の量の A D P および抗 h F c で交差滴定した ( 表 5 ) 。抗 C D 4 0 L 抗体の、2 0 μ g / m L または 6 . 6 6 μ g / m

50

L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2.22 $\mu$ g/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。

【0032】

(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、233 $\mu$ g/mLの抗CD40L抗体と、30 $\mu$ g/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、30 $\mu$ g/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つかの健常ドナーから単離された血小板で起こった。

【0033】

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)。アグリコシルバージョンの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Fc I Ia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)。

【0034】

【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 ( $\mu$ M)	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、5 $\mu$ g/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。

【0035】

【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 ( $\mu$ M)	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

10

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、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

20

【0036】

【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 ( $\mu$ M)	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

30

40

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、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

50

【 0 0 3 7 】

【 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。

【 0 0 3 8 】

30

【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。

【0039】

【表 6】

表6: 静止型血小板に対する、正常ヒト血清の効果

30

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

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

## 【0040】

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。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0041】

【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。

10

【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。

【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。

20

【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、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。

30

【 図 1 】

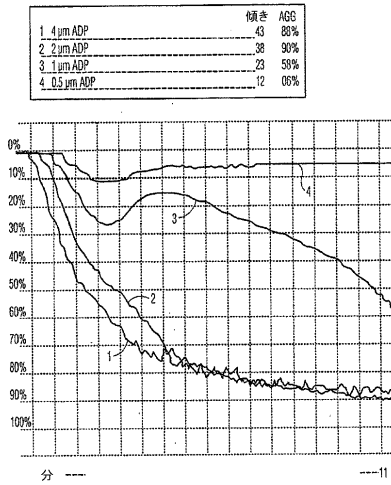


FIG. 1

【 図 2 】

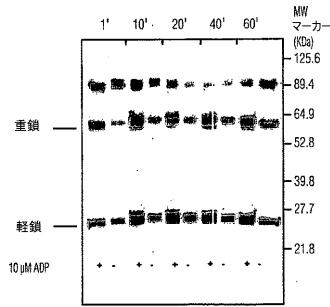


FIG. 2

【 図 3 】

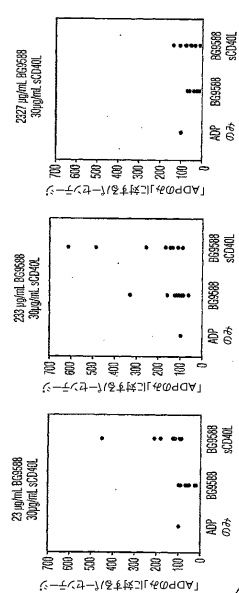


FIG. 3

【 図 4 】

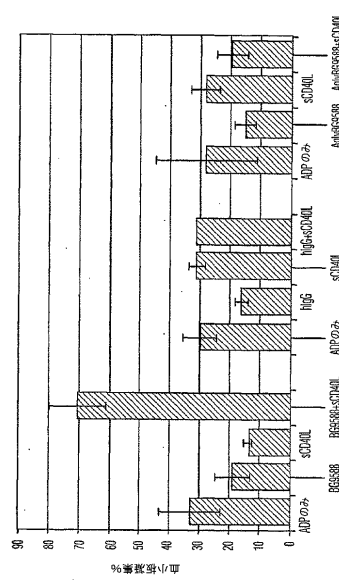
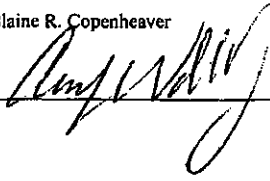


FIG. 4

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2006/044840</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <i>G01N 33/86</i> (2006.01) US. Cl. 436/69, 436/70 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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 practicable, search terms used) WPIDS, MEDLINE, CHEM ABS, BIOSIS, EMBASE; KEYWORDS: PLATELET, CLOTTING, CD40L, sCD40L, CD154, THROMBIN, THROMBOXANE, ELASTASE, SELECTIN, CONVULXIN and similar terms		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Langer F. et al, The role of CD40 in CD40L-and antibody-mediated platelet activation, Thromb Haemost (2005 June) Vol 93 No 6 1137-46 Whole document	1-34
Y	US 3694161 A (KLESZYNSKI R et al) 26 September 1972 Claims	1-34
Y	Xu H. et al, Human Platelets activate porcine endothelial cells through a CD154 dependant pathway, Transplantation (2001 Dec 15) Vol 72 No 11, p1858-1861 Abstract, p1859, figs 1-2	1-34
<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      "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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date      "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 "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)      "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 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means      "&" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 June 2007		Date of mailing of the international search report <b>28 NOV 2007</b>
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:  Blaine R. Copenheaver Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/044840

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Medline On-line abstract Accession Number 2004077257 of, Koyoma I. et al, Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in non-human primates, Transplantation (2004 Feb 15) Vol 77 No 3 pp460-62. Abstract	1-24
Y	WO 2003055516 A (UNIVERSITY OF READING et al) 10 July 2003 Abstract, claim 13	25-34
A	WO 2003040691 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL INC) 15 May 2003 Whole document	13, 24
A	EP1530047 A (HOFFMANN LA ROCHE et al) 11 May 2005 Abstract, Claims	1-24
A	Henn V. et al, The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40, Blood (2001 Aug 15) Vol 98 No 4 pp1047-1054 Abstract, p1048	1-34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2006/044840**

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. These particulars are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	3694161	NONE					
EP	1530047	CA	2540544	EP	1685409	US	2006286681
		WO	2005045440				
WO	03040691	CA	2464531	CN	1613012	EP	1451577
		US	7189518	US	2003152566		
WO	03055516	AU	2002367136	CA	2470696	US	2005169920
END OF ANNEX							

## 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 スウ, イェン - ミン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02420, レキシントン, ダグラス ロード 3

(72)発明者 スー, リヘ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01867, レディング, メイン ストリート 976

Fターム(参考) 2G045 BB10 CA24 CA25 FB03

专利名称(译)	血小板聚集测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009516201A</a>	公开(公告)日	2009-04-16
申请号	JP2008541395	申请日	2006-11-17
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司, Emuei公司		
[标]发明人	スウイエンミン スーリハ		
发明人	スウ, イエン-ミン スー, リハ		
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/BB10 2G045/CA24 2G045/CA25 2G045/FB03		
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	JP5396083B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了确定血小板聚集的方法，在施用CD40L结合部分时确定对凝结的易感性的方法，以及与其相关的试剂盒。本发明提供了一种测定血小板聚集的方法，该方法包括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，使活化的血小板与血小板交联。包括接触药剂的步骤，其中通过血小板的沉淀来定量聚集。CD40L结合部分和交联剂不是预先形成的免疫复合物。

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