

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-529642

(P2012-529642A)

(43) 公表日 平成24年11月22日(2012.11.22)

(51) Int.Cl.

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

D

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2012-514520 (P2012-514520)
 (86) (22) 出願日 平成22年6月10日 (2010. 6. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年12月9日 (2011. 12. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2010/051164
 (87) 国際公開番号 W02010/142921
 (87) 国際公開日 平成22年12月16日 (2010. 12. 16)
 (31) 優先権主張番号 0902885
 (32) 優先日 平成21年6月12日 (2009. 6. 12)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

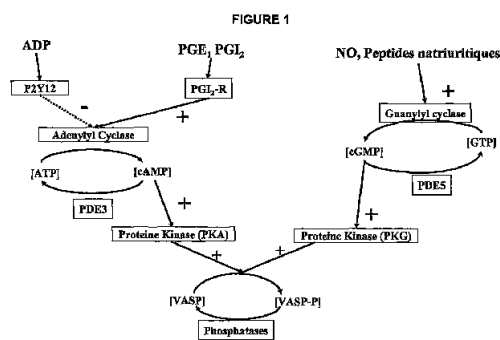
(71) 出願人 510071769
 バイオサイテックス
 フランス国マルセイユ13010. シュマ
 ン・ド・ラルメ・ダフリック140
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞シグナル伝達経路の細胞内バイオマーカーの全血アッセイー所定細胞集団の活性化測定における使用

(57) 【要約】

本発明は、細胞シグナル伝達経路に関与する細胞内タンパク質(バイオマーカー)のリン酸化状態を測定するステップを含む、サンプルの所定細胞集団の細胞活性化状態の、全血サンプルについてのELISAアッセイ方法に関する。本発明による細胞内タンパク質のリン酸化状態のアッセイ方法の特定の適用は、全血サンプル中に存在する細胞集団の細胞活性化に対するアゴニスト作用剤又はアンタゴニスト作用剤のフォローアップに関する。このような適用は、患者の治療フォローアップの一助となることができ、又は薬物のスクリーニングに使用され得る。これに関連して、この適用は特に、全血サンプル中に含まれる血小板の活性化の観察による止血、特に血液凝固の精査に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞シグナル伝達経路に関与する細胞内タンパク質(バイオマーカー)のリン酸化状態を測定するステップを含む、サンプルの所定細胞集団の細胞活性化状態の、全血サンプルについて実施されるELISAによるアッセイ方法。

【請求項 2】

アッセイする細胞活性化状態が血小板の活性化状態である、請求項1に記載のELISAによるアッセイ方法。

【請求項 3】

リン酸化状態を試験する細胞内タンパク質が、キナーゼファミリーのタンパク質又はキナーゼ基質タンパク質である、請求項1又は2に記載のELISAによるアッセイ方法。

10

【請求項 4】

細胞内タンパク質が、キナーゼPKA、PKG、AKT、ERK、JAK2、BCR-ABLから選択されるキナーゼの基質タンパク質又はキナーゼ自体である、請求項2に記載のELISAによるアッセイ方法。

【請求項 5】

細胞内タンパク質が、タンパク質VASP若しくはSTAT5などの血小板キナーゼ基質、又はタンパク質AKT、P38若しくはERKなどのキナーゼである、請求項2から4のいずれか一項に記載のELISAによるアッセイ方法。

【請求項 6】

20

全血のサンプルについて実施される以下のステップ:

a)全血サンプルの1つのアリコート部分を、所定細胞内タンパク質のリン酸化の活性化によって前記サンプルの所定細胞集団の細胞活性に対して作用する第1化合物、有利には生理的化合物によって活性化し、且つもう1つのアリコート部分を前記第1化合物、及び細胞受容体との相互作用の経路を経て又は細胞シグナル伝達酵素との相互作用の経路を経て前記リン酸化を阻害又は変更する第2化合物によって活性化するステップと、

b)活性化サンプルの細胞を、非リン酸化細胞内タンパク質とリン酸化状態の前記タンパク質との平衡を保持できる条件下で溶解させ、前記平衡が前記サンプルの前記所定細胞集団の細胞活性の証拠を示すステップと、

c)溶解生成物を除去するために洗浄するステップと、

30

d)処理サンプルを、そのリン酸化状態に関係なく細胞内タンパク質を特異的に認識する抗体を含む捕捉プローブと共にインキュベートするステップと、

e)リン酸化細胞内タンパク質とリン酸化状態の前記細胞内タンパク質を特異的に認識する可視化抗体との免疫複合体の形成を可視化するステップと

を含み、前記抗体を必要に応じて標識する、請求項1から5のいずれか一項に記載のELISAによるアッセイ方法。

【請求項 7】

所定細胞内タンパク質(第2化合物と称する)のリン酸化に変更を加えることによって血小板活性化と相互作用する化合物が投与された患者から採血した全血サンプルについて実施される以下のステップ:

40

a)全血サンプルのアリコート部分を、所定細胞内タンパク質のリン酸化の活性化によって前記サンプルの所定細胞集団の細胞活性に対して作用する第1化合物によって活性化するステップと、

b)活性化サンプルの細胞を、非リン酸化細胞内タンパク質とリン酸化状態の前記タンパク質との平衡を保持できる条件下で溶解させ、前記平衡が前記サンプルの前記所定細胞集団の細胞活性の証拠を示すステップと、

c)溶解生成物を除去するために洗浄するステップと、

d)処理サンプルを、そのリン酸化状態に関係なく細胞内タンパク質を特異的に認識する抗体を含む捕捉プローブと共にインキュベートするステップと、

e)リン酸化細胞内タンパク質とリン酸化状態の前記細胞内タンパク質を特異的に認識す

50

る可視化抗体との免疫複合体の形成を可視化するステップと

を含み、前記抗体を必要に応じて標識する、請求項1から5のいずれか一項に記載のELISAによるアッセイ方法。

【請求項 8】

前記第2化合物による活性化が、前記第1化合物による活性化に先行する、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

ステップa)において、リン酸化を阻害又は変更する前記第2化合物による活性化が、細胞活性に対する効果を試験する物質、例えば、生物活性又は治療活性を有する物質であることを特徴とする、請求項6に記載のアッセイ方法。

10

【請求項 10】

洗浄ステップの後に、サンプルを保存するための凍結ステップを行う、請求項6から9のいずれか一項に記載のELISAによるアッセイ方法。

【請求項 11】

前記免疫複合体の形成の可視化を、抗体のマーカーの基質を用いて行い、且つ前記可視化が、処理サンプルの2つのアリコート部分の光学濃度を測定するステップ、及び必要に応じてそれに続く、PRIを算出するステップを含む、請求項6から10のいずれか一項に記載のELISAによるアッセイ方法。

【請求項 12】

リン酸化状態を測定する細胞内タンパク質がVASPタンパク質であり、活性化を測定する細胞集団が血小板集団であり、前記サンプルの1つのアリコート部分を、VASPリン酸化のアゴニストである第1化合物によって活性化し、サンプルのもう1つのアリコート部分を、同一第1化合物によって、及び更に、生物活性又は治療活性を試験する物質に対する標的血小板受容体と相互作用する第2化合物によって活性化する、請求項1から11のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

20

【請求項 13】

VASPリン酸化の生理的アゴニストが、アデニリルシクラーゼを活性化する酵素、例えば、プロスタグランジンPGE1、PGI2、及びグアニリルシクラーゼを活性化する物質、例えば、NO供与物質又はナトリウム利尿ペプチドから選択される、請求項12に記載のアッセイ方法。

30

【請求項 14】

リン酸化を阻害又は変更する化合物が、ADPによって刺激される受容体P2Y12などの血小板受容体と及び/又は細胞シグナル伝達酵素、例えば、アデニリルシクラーゼ、グアニリルシクラーゼ、ホスホジエステラーゼ(例えば、PDE2、PDE3若しくはPDE5)又はキナーゼタンパク質(例えば、PKA若しくはPKG)と相互作用する物質である、請求項13に記載のアッセイ方法。

【請求項 15】

リン酸化状態を測定する細胞内タンパク質がVASPタンパク質であり、活性化を測定する細胞集団が血小板集団であり、サンプルの1つのアリコート部分を、VASPリン酸化の第1生理的アゴニスト、例えば、PGE1、PDG2又はPGI2によって活性化し、サンプルのもう1つのアリコート部分を、同一第1アゴニストによって、及び更に、細胞受容体と相互作用する、例えば、ヌクレオチドADPによって刺激される受容体P2と相互作用する第2化合物によって活性化し、前記第2化合物がVASPリン酸化を阻害するか又は前記第2化合物を試験することによってその阻害特性を検査する、請求項1から13のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

40

【請求項 16】

リン酸化状態の細胞内タンパク質を特異的に認識する抗体が、モノクローナル抗体、例えば、セリン239がリン酸化されているVASPタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体、又はセリン473がリン酸化されているAKTタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体である、請求項1から15のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

50

【請求項 17】

溶解用緩衝液が、以下の混合物：

最終濃度0.0002～10%、好ましくは0.02～2%、好ましくは0.2%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)；

最終濃度0.002～10%、好ましくは0.2～5%、好ましくは2%のTriton X-100(オクチルフェノキシポリエトキシフェノール)；

最終濃度0.000002～10%、好ましくは0.004～1%、好ましくは0.04%の、活性成分として5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン及び2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを含む殺菌剤型の広域スペクトル殺菌剤

を含むか又は前記混合物によって構成される、請求項1から14のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

10

【請求項 18】

全てのインキュベーションステップを周囲温度又は約37℃の温度において実施し、且つ溶解ステップを、周囲温度又は約37℃の温度において10～30分間、好ましくは10分間実施する、請求項1から17のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 19】

血液サンプルを、活性を試験する細胞集団の完全性を保つ条件下で、特に、採取中の前記細胞集団の活性化を防ぐ条件下で採取し、次いで、採取サンプルを抗凝血剤、例えば、クエン酸ナトリウム、好ましくは0.109M又は0.129Mクエン酸三ナトリウムによって、抗凝血剤1容量に対して血液9容量の割合で処理する、請求項1から18のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

20

【請求項 20】

サンプル中に含まれる所定細胞集団の活性に対するアゴニスト作用剤又はアンタゴニスト作用剤によって治療されている患者から既に採取された全血サンプルに適用される、請求項1から18のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 21】

アゴニスト作用剤又はアンタゴニスト作用剤が血小板凝集に作用する、請求項19に記載のアッセイ方法。

【請求項 22】

血小板活性化のアンタゴニストが、ADPに対するP2Y₁₂受容体のアンタゴニスト、例えば、クロピドグレル若しくはチクロピジンなどのチエノピリジンであるか、又は細胞シグナル伝達酵素、例えば、アデニリルシクラーゼ、グアニリルシクラーゼ、ホスホジエステラーゼ(例えば、PDE2、PDE3若しくはPDE5)又はキナーゼタンパク質(例えば、PKA若しくはPKG)と相互作用する物質である、請求項20に記載のアッセイ方法。

30

【請求項 23】

例えば、患者が前記アンタゴニスト作用剤によく応答するか又はあまり応答しないかを判定するために、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法に従ってアッセイし、血小板反応性指数(PRI)を算出し、PRIを解釈することの特徴とする、血小板活性化のアンタゴニスト作用剤で治療されている患者の凝血障害を監視するためのインビトロ法。

【請求項 24】

請求項17において定義された溶解用緩衝液；

洗浄溶液；

必要ならば標識された、リン酸化状態の細胞内タンパク質を特異的に認識する抗体を含むことを特徴とする、請求項1から23のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全血サンプルについて実施する、細胞シグナル伝達経路に關与する細胞内バイオマーカーのインビトロアッセイ方法に關する。本発明はまた、血液サンプル中に含ま

50

れる所定細胞集団の細胞の活性化測定における前記方法の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

本出願は、血液中に存在する細胞の活性化時に起こり得る生理的プロセスの精査に関する。このような細胞は、特定の生理的状态、特に病的状態の結果として血液循環に見られる血液又は細胞中に自然に存在する細胞であることができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】ヨーロッパ特許EP1042368

10

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Hollopeter Gら、Nature 2001:409:202~7

【非特許文献2】Czernik A Jら(1991)、Methods Enzymol 201:264

【非特許文献3】<http://www.immunoglobe.com>

【非特許文献4】<http://www.carbomer.com>

【非特許文献5】<http://www.sigmaaldrich.com>

【非特許文献6】<http://www.roche-applied-science.com>

【非特許文献7】<http://www.biozyme.com>

【非特許文献8】<http://www.nanotools.de>

20

【非特許文献9】<http://www.kem-en-tec.com>

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

細胞活性化が、ある種の細胞内タンパク質の状態の変更(modification)、特に細胞シグナル伝達経路に属するタンパク質のリン酸化状態の変更に伴随して起こることが観察された。本発明は、細胞集団活性化のバイオマーカーとして役立つ、このようなタンパク質及びそれらのリン酸化状態の解析に関する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

30

したがって、本出願は、細胞シグナル伝達経路、特にシグナルトランスダクションに関与する細胞内タンパク質が、リン酸化によって発現調節されるタンパク質であるアッセイ方法を対象とする。よって、リン酸化状態が観察されるタンパク質が、細胞活性の結果としての、細胞活性化のバイオマーカーである。

【0007】

本発明による、細胞内タンパク質のリン酸化状態のアッセイ方法の特定の適用は、全血サンプル中に存在する細胞集団の細胞活性化に対するアゴニスト作用剤(agonistic agent)又はアンタゴニスト作用剤(antagonistic agent)の監視に関する。このような適用は、特に患者の治療監視に役立つか、又は薬物スクリーニングに有用であると考えられる。

【0008】

40

詳細には、本出願は、全血サンプル中に含まれる細胞集団の活性化の観察による止血、特に血液凝固の精査に関連する。細胞活性化は、実際には、血液凝固の原因となる反応がトリガーされる場合に起こるプロセスである。詳細には、インビボでの血小板の内皮下構造への接着、又はインビトロでの外部刺激(ADP、トロンビン、コラーゲンなど)の作用の後に観察される血小板の活性化は、血小板の凝集を引き起こすことができ、これらの条件下で、凝固カスケードの反応を正常に発生させて、フィブリル網状構造による血小板凝集塊の安定化により血栓を形成できる。

【0009】

したがって、本発明はより詳細には、血小板の活性化状態を測定するために、より一般的には血小板活性の精査に役立つように、全血サンプル中に含まれる血小板(トロンボサ

50

イト)において発現される細胞内タンパク質のリン酸化状態の解析に適用できる。

【0010】

本発明は、血管系の疾患に関連する医療分野において、特に活性物質の検査又は血管系の疾患の予防又は治療に効果的な物質の監視に特に有用である。よって、本発明の方法の特定の適用は、血小板凝集抑制剤として知られているか又はその可能性のある作用剤に対する血小板の応答を監視することからなる。したがって、本発明の方法は、例えば、血小板凝集抑制剤に対する生物学的耐性又は他の耐性をスクリーニングするために、投与される血小板凝集抑制剤の投与量を患者に適合させるために、又は治療を中断すべきか若しくは継続すべきかの判断への寄与に、使用できる。

【0011】

血小板において発現される細胞内タンパク質のリン酸化状態のアッセイとの関連において、治療又は制御のための化合物の同定を含む病態の診断又は監視に関して本発明の方法が有効であり得る病態の特定例は、冠動脈アテローム性動脈硬化の結果としての急性冠動脈症候群(例えば、心筋梗塞、冠動脈血栓、冠動脈閉塞)、虚血性脳血管障害、2型糖尿病、鎌状赤血球症(drepanocytosis)などである。

【0012】

血小板の活性化は、例えば、血管病変又は動脈プラークの破裂後の血栓形成プロセスがトリガーされた結果である。活性化された血小板は血管壁に接着した後、可逆的に、次いで不可逆的に凝集し、血管内皮の病変を生理的に修復するか、又は病的状態では、血管を閉塞させる。

【0013】

血小板活性化プロセスにおいて同定される、本発明の実施形態(implementation)において重要な分子パートナー(molecular partner)のうち、損傷細胞において分泌された後に又はトロンビンなどの凝固因子に応答して、血小板の密顆粒によって放出されるヌクレオチドADP(アデノシン二リン酸)の役割が観察された。ADPによる血小板の刺激は、不安定な血小板凝集塊を形成させる。血小板ADP受容体の1つは、P2Y₁₂に命名されているプリンP₂受容体(Hollt et al. 1997, Nature 386:213-217)であり、細胞内シグナルトランスダクションのいくつかの経路(カスケード)の選択的活性化に関与している。P2Y₁₂受容体は、形成された血小板凝集体の安定に関与している。

【0014】

血小板の活性化は、プロスタグランジンPGE(特にPGE₁若しくはPGE₂)などの生理的アゴニストによって、プロスタグランジンPGI(例えば、PGI₂)又はプロスタグランジンPGD(例えば、PGD₂)によって刺激され得る。PGE₁による血小板の活性化により、タンパク質VASP(血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質)のリン酸化が活性化される。VASPのリン酸化は、セリン239(NCBIによって2009年5月10日付バージョンにおいて受託番号NP003361.1が発行された配列中のセリン)において、例えば、活性化がPGE₁によって開始される場合にはcAMP(環状アデノシン二リン酸)の細胞内濃度に比例した量で及び/又は例えば、活性化がNO(一酸化窒素)-供与化合物によって開始される場合にはcGMP(環状グアノシン二リン酸)の細胞内濃度に比例した量で起こる。

【0015】

cAMP又はcGMPの細胞内濃度はそれぞれ、アデニリルシクラーゼ又はグアニリルシクラーゼとホスホジエステラーゼとの協奏作用(concerted action)によって調節される。キナーゼは、細胞活性化調節の重要な酵素である。このようなキナーゼは多種存在し、タンパク質基質のセリン、スレオニン又はチロシン残基へのATPのリン酸基の転移によって、膜又は細胞内タンパク質のリン酸化に関与している。この翻訳後修飾により、細胞周期の多くの活性が調節され、異常なリン酸化は多くの病的状態に関与する可能性がある。ある種のキナーゼは、生物活性分子、特に薬物の組成の一部を形成する活性物質、又は治療活性成分若しくは診断上重要な分子を決定する可能性のある候補の直接的又は間接的な標的となる。このようなキナーゼとしては、キナーゼAKT(場合によってはPKBと称する)、ERK、JAK2、BCR-ABL(主にある種の白血病腫瘍細胞中に存在する)、PKA、PKGが挙げられる。結果と

10

20

30

40

50

して、本発明において、キナーゼ又はこのようなキナーゼの基質を形成する細胞内タンパク質が、キナーゼの活性変化の追跡において重要なバイオマーカーとなることが明白であると考えられる。

【0016】

血小板のVASPタンパク質は、いくつかのこのようなキナーゼ、特にPKA(cAMP依存性プロテインキナーゼ)及びPKG(cGMP依存性プロテインキナーゼ)の基質である。VASPは、血小板細胞骨格の動態調節において中心的な役割を果たし、まさにこの場合には、PKA及び/又はPKGの活性のバイオマーカーと考えられるが、上流で起こっている細胞シグナル伝達カスケード全体のバイオマーカーとも考えられる。

【0017】

更に、VASPタンパク質のリン酸化が、循環血中の別の分子、ヌクレオチドADPによっても制御される。ADPが血小板受容体P2Y12と相互作用すると、P2Y12が占有され、結果として、生理的アゴニストによって誘発されるVASPタンパク質(血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質)のリン酸化が阻害又は制限される。

【0018】

VASPリン酸化の阻害又は制限/変更は、リン酸化のアゴニストによって既に誘発されたVASPタンパク質の完全若しくは部分的脱リン酸化、又は前記リン酸化の完全若しくは部分的阻止を含む。

【0019】

タンパク質AKTは、アミノ酸Ser473(NCBIデータベースにおいて2009年5月22日付バージョンの受託番号NP001014431.1で同定される配列中の473位のセリン)の活性部位のリン酸化状態に酵素発現が直接依存するキナーゼである。AKTはまた、細胞伝達物質(cellular mediator)又は細胞シグナル伝達タンパク質であると考えられる。血小板において、トロンビンによる受容体PAR-1の活性化が、AKTのリン酸化を誘発する。同様に、ADPによる受容体P2Y12の活性化が、アミノ酸Ser473のリン酸化を誘発すると思われる。結果として、セリン473のリン酸化状態は、トロンビン受容体(par1)又はADP受容体P2Y12の状態のバイオマーカーと考えられる。

【0020】

したがって、血管病態リスクを示す患者又はこのような病態を患っている患者及びまた、このような病態の治療を受けている患者の血液中の血液細胞集団、特に血小板の活性化状態を測定すること、詳細には、血小板活性化プロセスに対する投与活性物質の干渉を評価することが重要である。また、血小板活性化のアゴニスト又はアンタゴニストの設計を目的として候補物質を試験するために、全血からのサンプル中の血小板の活性化状態を、特に血小板受容体との特異的相互作用によって、測定することも重要である。

【0021】

この目的で、本発明は、血小板において発現される細胞内タンパク質のリン酸化の観察に基づく手段を提供する。

【0022】

血小板において発現される細胞内タンパク質のリン酸化状態の変更の測定によって血小板の活性化を解析する手段は、先行技術において既に記載されている。Biocytex(マルセイユ、フランス)製のPLT VASP/P2Y12と命名されているキットは、例えば、細胞内タンパク質VASP(血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質)のリン酸化状態の測定によって血小板の活性化状態を測定することからなる、全血サンプルについて実施されるインビトロ試験を行う。この試験においては、2つの試験条件(サンプルの一部については、プロスタグランジンPGE1を用いてVASPを活性化し、別の部分についてはPGE1及びADPを用いてVASPを活性化する)を比較するために、二色フローサイトメトリーを用いてタンパク質VASPのリン酸化を測定する。解析は、蛍光の検出及び血小板反応性指数の算出によって行う。血液の他の細胞群又は細胞片が測定を妨げないように、血小板を含む細胞クラウド(cellular cloud)をサイトグラムにおいて単離することが、フローサイトメトリー解析には必要である。しかし、サイトメトリー解析の実施条件の決定及びその解析の実施は、問題を引き起こ

10

20

30

40

50

すおそれがある。

【0023】

本発明は、細胞内タンパク質、特に血小板VASPタンパク質のリン酸化状態の全血サイトメリー解析の実施代替手段を提供する。この代替手段に従って、ELISA型免疫酵素試験を用いて解析を実施する。

【0024】

この目的で、本発明者らは、所定の血小板受容体によって媒介される血小板活性化の特異的測定を実施できる、全血中の血小板の活性化条件及び阻害条件を決定した。

【0025】

したがって、本発明において、本発明者らは、ELISA解析のシグナルが常に、サンプルの他の成分及び細胞から分離された均一細胞集団又は解析の唯一の標的と検証された均一細胞集団(例えば、培養腫瘍細胞株又は精製リンパ球若しくは血液から単離されたリンパ球)からの受容体の活性化後に測定される生化学的及び細胞原理とは区別される試験を明示した。

【0026】

したがって、本発明者らは、この必要性を省くことによって、PRP(多血小板血漿)の作製における血小板活性の監視試験の使用を制限する理由を克服できることを明らかにした。

【0027】

本発明は、細胞シグナル伝達カスケードに關与する細胞内タンパク質(バイオマーカー)のリン酸化状態を測定するステップを含む、全血サンプルに関するELISAの実施による、サンプルの所定の細胞集団の細胞活性化状態のアッセイ方法に關する。

【0028】

したがって、本発明は、ELISA解析において、全血サンプル、特に血小板中の所定細胞集団において発現される細胞内タンパク質のリン酸化状態を測定するための手段を提供する。血小板の活性化状態のマーカーとしてこのように使用される細胞内タンパク質の1つは、タンパク質VASPである。もう1つのこのようなタンパク質は、タンパク質AKTである。

【0029】

本出願において、用語「全血サンプル」は、人又は動物対象から採取される血液サンプルに使用し、本発明の方法の実施前にはこのサンプルを分画しない。本発明のアッセイを実施するための血液サンプルの容量は有利なことにわずかであり、例えば、80 μ L程度であり、2つのアリコート部分に分割される。

【0030】

血液サンプルを対象から採取する場合には、活性化状態を測定しようとする細胞集団の完全性を、例えばサンプルの攪拌及び熱衝撃を回避することによって、保持できる条件を選択することが重要である。特に、血小板の完全性は保たなければならない。

【0031】

本発明のELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)試験は、下記段落に記載し且つ実施例中で更に詳述する操作条件を使用する。この試験は、周知のELISA原理に従い、手動で又は自動的に実施できる。この試験は、タンパク質のリン酸化状態の測定のためには定性試験であり、血小板反応性指数を測定する場合には半定量試験であり、又は校正標準の測定を含む場合には定量試験であることができる。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明の特定の実施形態において、活性を測定する細胞集団は、血小板集団である。

【0033】

本発明の特定の実施形態において、リン酸化状態を試験する細胞内タンパク質は、キナーゼファミリーのタンパク質又はキナーゼ基質タンパク質である。

【0034】

したがって、本発明の方法を用いてリン酸化状態を測定する細胞内タンパク質は、例え

10

20

30

40

50

ば、キナーゼPKA、PKG、AKT、ERK、JAK2、BCR-ABLから選択されるキナーゼの基質タンパク質又はキナーゼ自体から選択される。

【0035】

本発明の好ましい実施形態において、リン酸化状態を試験する細胞内タンパク質は、タンパク質VASP又はSTAT5である。

【0036】

本発明の別の実施形態において、リン酸化状態を試験できる細胞内タンパク質は、AKT、p38及びERKから選択される。

【0037】

本発明のELISAアッセイには、リン酸化状態の測定の標的となるバイオマーカータンパク質とこのタンパク質のこのリン酸化状態を特異的に認識する抗体との免疫複合体 (immunological complex) を形成することが必要である。対象抗体が対象リン酸化状態の当該タンパク質を認識するが、非リン酸化状態の同一タンパク質をそれほど認識しない場合に、認識を特異的と称する。この抗体はまた、当該リン酸化状態の当該タンパク質を本質的に認識するが、処理されたサンプル中に含まれる他のタンパクをそれほど認識しない。

【0038】

本発明のELISA試験は、1又は2ステップで実施できる。本発明のELISA試験を2ステップで(既知の標準方式で)実施する場合は、最初に、処理された血液サンプルを、リン酸化状態に関係なく、被験細胞内タンパク質を特異的に認識する抗体(捕捉抗体)と接触させる。次に、捕捉された抗原を、リン酸化された形態になった後の被験細胞内タンパク質を特異的に認識する抗体(可視化抗体(revealing antibody))と接触させることによって、可視化する。

【0039】

本発明のELISA試験を1ステップで実施する場合は、被験細胞内タンパク質を、ウェル中で捕捉抗体と同時に可視化抗体と接触させる。

【0040】

リン酸化状態に依存する抗体又はこのリン酸化状態に特異的な抗体は、種々のタンパク質から、例えば、Czernik A Jら(1991)、Methods Enzymol 201:264によって記載された技術を用いて得た。この目的で、動物、例えば、ウサギを、リン酸化タンパク質、又は標的タンパク質中の対象リン酸化部位を構成するアミノ酸配列を示す合成ホスホペプチドで免疫化することができる。これらのペプチドは、エピトープを構成するのに十分でなければならない。これらのペプチドは、例えば、6~20個、6~15個、好ましくは6~10個のアミノ酸残基を含むことができる。好ましくは、作製抗体は、リン酸化タンパク質によって構成される抗原に対して高い親和性及び良好な特異性を有するものから選択される。

【0041】

リン酸化VASPタンパク質を検出するための抗体、特にモノクローナル抗体の作製については、ヨーロッパ特許EP1042368に記載されており、この特許を参照によって本明細書中に組み入れる。詳細には、この特許において、効果的なモノクローナル抗体は、DSM Collectionに受託番号ACC2330で寄託されているハイブリドーマ16C2(クローン16C2)によって産生される抗体である。この特許EP1042368の実施例1は、リン酸化抗VASP抗体(P-VASP)の回収を記載している。本発明においては、ペプチド配列KLRKVS²³⁹KQ又はペプチド配列RKVS²³⁹KQEを用いて、他の抗P-VASP抗体を作製できる。抗P-VASP抗体はまた、市販されている。前記抗体の他に、US Biologicalによって供給されるマウスモノクローナル抗体(クローン4i67)又はヤギポリクローナル抗P-VASP(Ser239)抗体(Santa Cruz、sc-23507)などを挙げるができる。

【0042】

必要ならば、ELISAは、特異性を向上させるために、第1抗体を認識する第2抗体を用いて実施する。

【0043】

用語「抗体」は、適切な場合には重鎖及び軽鎖の全てを含む抗体、又は標的抗原の認識

10

20

30

40

50

部位を含むか若しくは標的抗原の認識部位によって構成される抗体のフラグメント、例えば、重鎖によって若しくは重鎖の会合によって構成されるフラグメント、例えば、(Fab')₂フラグメント又はFabフラグメントを意味する。

【0044】

本発明の特定の実施形態によれば、免疫複合体の形成は、抗体マーカーの基質、例えば、着色基質又は蛍光マーカーによって可視化され、光学濃度を測定するためのステップを含む。ペルオキシダーゼなどのマーカーを使用できる。

【0045】

特に抗体のマーカーがペルオキシダーゼである場合には、光学濃度は、例えば、450nmにおいて測定する。

10

【0046】

詳細には、本発明は、セリン239位がリン酸化されているVASPタンパク質などのキナーゼ血小板基質、或いはセリン473位がリン酸化されているAKTタンパク質、チロシン694位がリン酸化されているSTAT5、スレオニン180位若しくはチロシン182位がリン酸化されているp38、又はスレオニン202位若しくはチロシン204位がリン酸化されているERKなどのキナーゼである細胞内タンパク質のリン酸化状態の測定に使用できる。

【0047】

これらのタンパク質のリン酸化型に対する特異抗体は市販されているか、又は本出願中で言及された方法によって作製できる。

【0048】

20

例えば、以下の抗体が入手可能である：

参照番号：9351L PAb(Cell Signaling)、クローンC71E5 MAb(Cell Signaling)、クローンC11C5 MAb(Cell Signaling)で、若しくは参照番号：クローン47 BD、クローン5G4-MCF-7 (Nanotools)、クローン14H2(Cell Signaling)、クローンST5P4A9(Zymed)で販売されているウサギ抗p-STAT5(Tyr 694)抗体、又はウサギ抗P-AKT抗体、クローン193H12(Cell Signalingによって販売)。

【0049】

前記タンパク質の非リン酸化型を認識する抗体(捕捉抗体を構成する)も市販されている：STAT5として挙げられるのは、ウサギ抗体(クローンC-17、Pab Santa Cruz)若しくはマウス抗体(クローン89BD、クローンST5-8F7(Invitrogen)、クローンA-9(Santa Cruz))であり、AKTとしては、ウサギ抗体がCell Signalingによって供給され(クローン193H12)、リン酸化ERKとしては、特異抗体が、例えば、Cell Signaling(参照クローン197G2)、Calbiochem(参照クローン12D4)又はLifespan Biosciences(参照番号LS-C16383)によって販売されている。p38としては、Cell Signalingがまた、参照番号9228、9212、9215などの抗体を提供しており、Santa Cruzが参照番号sc-7972の抗体(p38クローンA-12マウスMab)を提供している。

30

【0050】

本発明のELISAを実施するために、患者から採取した血液サンプルを処理して、凝固しないようにする。詳細には、標準的な抗凝血剤、例えば、ヘパリン又はクエン酸三ナトリウム(例えば0.109M又は0.129Mクエン酸三ナトリウム)などのクエン酸ナトリウムを血液サンプルに、抗凝血剤1容量に対して血液9容量の割合で添加して、血液について実施されるインビトロアッセイを実施する。

40

【0051】

詳細には、本発明のELISAアッセイ方法は、

a)全血サンプルの1つのアリコート部分を、所定細胞内タンパク質のリン酸化の活性化によって前記サンプルの所定細胞集団の細胞活性に対して作用する第1化合物、有利には生理的化合物によって活性化し、且つもう1つのアリコート部分を前記第1化合物、及び細胞受容体との相互作用の経路を経て又は細胞シグナル伝達酵素との相互作用の経路を経て前記リン酸化を阻害又は変更する第2化合物によって活性化するステップと、

b)活性化サンプルの細胞を、非リン酸化細胞内タンパク質とリン酸化状態の前記タンバ

50

ク質との平衡を保持できる条件下で溶解させ、前記平衡が前記サンプルの前記所定細胞集団の細胞活性の証拠を示すステップと、

c) 溶解生成物を除去するために洗浄するステップと、

d) 処理サンプルを、そのリン酸化状態に関係なく細胞内タンパク質を特異的に認識する抗体であって、IgG型の免疫グロブリン又はF(ab')₂若しくはFabフラグメントである抗体を含む捕捉プローブと共にインキュベートするステップと、

e) リン酸化細胞内タンパク質とリン酸化状態の前記細胞内タンパク質を特異的に認識する可視化抗体との免疫複合体の形成を可視化するステップと
の実施を含む。

【0052】

10

試薬及びサンプルは有利には、マイクロプレートのウェル中に入れる。試薬及びサンプルは、単一のウェル中に入れ、移動の必要がない。

【0053】

本発明の特定の実施形態において、前記ステップは、第2化合物がリン酸化状態の阻害若しくは変更に関して検査される物質であって、サンプル採取前に患者に投与されるだけであるか又は前記第1生理的化合物による活性化前に採取された全血サンプルと接触させられる点で、変更されている。

【0054】

本発明の特定の実施形態において、免疫複合体の形成を可視化するステップの後に、血小板反応性指数(PRI)を算出するステップを行う。PRIは、詳細には、抗体のマーカーの可視化と関連する光学濃度を読み取ることによって免疫複合体が検出される場合に、得ることができる：

20

【0055】

【数1】

$$PRI = \frac{OD[C1] - OD[C1+C2]}{OD[C1] - OD[ブランク]}$$

【0056】

[式中、

30

C1=第1化合物、例えば、リン酸化活性化剤；

C2=第2化合物、例えば、リン酸化阻害剤]。

【0057】

アッセイ方法の特定の実施形態において、リン酸化状態が測定する細胞内タンパク質はVASPタンパク質であり、活性化を測定する細胞集団は血小板集団であり、サンプルの1つのアリコート部分は、第1VASPリン酸化アゴニストによって活性化し、サンプルのもう1つのアリコート部分は、同一第1化合物によって、及び更に、被験物質の標的血小板受容体と相互作用して生物活性又は治療活性を生じる第2化合物によって活性化する。

【0058】

アッセイ方法の別の特定の実施形態において、VASPのリン酸化の生理的アゴニストは、アデニリルシクラーゼを活性化するプロスタグランジン、例えば、PGE1、PGI2、PDG2及びグアニリルシクラーゼを活性化する物質、例えば、NO供与物質(例えば、SNP:ニトロプルシドナトリウム)、又はナトリウム利尿ペプチド(例えば、ANP:動脈ナトリウム利尿ペプチド;BNP:B型ナトリウム利尿ペプチド)から選択される。

40

【0059】

特定の実施形態において、リン酸化を阻害又は変更する化合物は、ADPによって刺激される受容体P2Y12などの血小板受容体と相互作用する物質、例えば、クロピドグレル若しくはチクロピジンなどのチエノピリジン、及び/又は細胞シグナル伝達酵素、例えば、アデニリルシクラーゼ、グアニリルシクラーゼ、ホスホジエステラーゼ(例えば、PDE2、PDE3又はPDE5)若しくはキナーゼタンパク質(例えば、PKA又はPKG)と相互作用する物質である

50

。

【0060】

以下の実施例は、細胞内タンパク質のリン酸化に関して活性を有する物質によって得られた結果を示している。これらの物質は、単独で又は別の生理的化合物(例えば、観察されるシグナル伝達経路がP2Y12を含む場合には、ADP)と併用される場合に、前記第2化合物の代表例である。

【0061】

本発明の特定の実施形態において、前記ステップの他に、アッセイ方法は、洗浄ステップ後に実施される、サンプルを保存するために、例えば-20 又は-80 におい凍結させるステップを含むことができる。本発明者らは、このようにして保存された後のサンプルは、安定性を変化させることなく試験できることを観察した。これは、採取(collection)後2ヶ月を超える期間の凍結による保存後に信頼性の高い結果が得られることを意味する。

10

【0062】

本発明者らはまた、サンプリング後48時間までは、血小板の安定性が依然として保たれるので、サンプルは凍結をしなくても試験できることを観察した。

【0063】

この試験によれば、血小板活性化との相互作用を観察する化合物(被験化合物)は、「第2化合物」に関して前記ステップで示されるように、血液サンプルの採取後に添加する必要はなく、サンプルの採取前に患者に投与されていてもよい。この場合には、前記第2化合物の投与は、被験化合物がリン酸化を含む経路によって直接相互作用する場合には、採取された全血のサンプルについて実施されていなくてもよいし、又は患者に投与される化合物の活性の立証が必要な場合には特に、リン酸化を調節する細胞シグナル伝達経路の生理的化合物の投与からならなくてもよい。

20

【0064】

被験化合物が患者に投与された化合物である場合には、本発明の解析は、前記化合物の有効性又は患者の治療抵抗性の程度を測定する目的で行うことができる。

【0065】

本発明の好ましい実施形態において、アッセイは、

- ・ 最終濃度0.02~2%、好ましくは0.2%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS);
- ・ 最終濃度0.2~5%、好ましくは2%のTriton X-100(オクチルフェノキシポリエトキシフェノール);
- ・ 最終濃度0.004~1%、好ましくは0.04%の、活性成分として5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン及び2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを含む殺菌剤型の広域スペクトル殺菌剤

30

の混合物又は機能的に同等の混合物を含むか又はそれによって構成される溶解用緩衝液を使用する。

【0066】

機能的に同等な混合物は、SDSをコレート又はデオキシコレートなどの別の陰イオン洗剤に置き換えることによって、及び/又はTriton X-100をNonidet P-40若しくはTween 80などの別の非イオン洗剤に置き換えることによって調製できる。イオン洗剤及び非イオン洗剤は、5~0.005%の濃度で使用する。

40

【0067】

本発明の溶解用緩衝液の調製に適した殺菌剤は、ProClin(登録商標)(Rohm and Haas)、ProClin 150又はProClin 300である。これは、微生物の増殖を阻害し且つ細胞死を引き起こすことができる別の広域スペクトル殺菌剤に置き換えることができる。

【0068】

有利には、ELISAを実施する場合には、インキュベーションステップの全てを周囲温度又は37 の温度において実施し、溶解ステップを周囲温度又は37 の温度において1~30分間、好ましくは10分間実施する。

【0069】

50

本発明の他の特徴及び利点は、図及び実施例から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】 VASPリン酸化調節経路(カスケード)の簡易図である。

【図2】 細胞内タンパク質リン酸化経路との相互作用による血小板活性化に対する種々の活性物質の効果を示すグラフである。

【図3】 細胞内タンパク質リン酸化経路との相互作用による血小板活性化に対する種々の活性物質の効果を示すグラフである。

【図4】 細胞内タンパク質リン酸化経路との相互作用による血小板活性化に対する種々の活性物質の効果を示すグラフである。

【図5】 細胞内タンパク質リン酸化経路との相互作用による血小板活性化に対する種々の活性物質の効果を示すグラフである。

【図6】 細胞内タンパク質リン酸化経路との相互作用による血小板活性化に対する種々の活性物質の効果を示すグラフである。

【図7】 細胞内タンパク質リン酸化経路との相互作用による血小板活性化に対する種々の活性物質の効果を示すグラフである。

【図8】 細胞内タンパク質リン酸化経路との相互作用による血小板活性化に対する種々の活性物質の効果を示すグラフである。

【図9A】 処理、溶解及び凍結の前後の血小板安定性試験を示すグラフである。

【図9B】 処理、溶解及び凍結の前後の血小板安定性試験を示すグラフである。

【図10】 処理、溶解及び凍結の前後の血小板安定性試験を示すグラフである。

【図11】 1ステップ又は2ステップで実施したELISAの結果を示すグラフである。

【実施例】

【0071】

I. VASPリン酸化状態の対するP2Y12受容体の活性化の影響を立証するための、全血ELISA試験におけるVASPタンパク質リン酸化による血小板活性化の解析

血小板中において、VASPのリン酸化(P-VASP)が、機能的ADP受容体(P2Y12)の活性化状態を反映し得ることが十分に確認されているにもかかわらず、P2Y12によって媒介される血小板活性化に対する、全血に含まれる全血液細胞(赤血球+白血球)の溶解の影響は、これまで文献に記載されていない。

【0072】

詳細には、受容体(例えば、P2Y12)と、バイオマーカーを構成する、リン酸化され得る物質(例えば、VASP)との間のシグナル伝達の全レベルに關与する酵素の、媒体への放出は、バイオマーカー $\leftrightarrow$ リン酸化バイオマーカーの平衡(例えば、VASP $\leftrightarrow$ P-VASP又は任意のシグナル伝達バイオマーカー、例えば、AKT、STAT5、p38、ERKなどの平衡)を場合によっては乱す可能性がある。細胞溶解の作用によって媒体中に遊離されるユビキタス酵素のうち、タンパク質キナーゼ(PKA、PKG)及びホスファターゼが、VASPのリン酸化又はその脱リン酸化に關与する。したがって、これらの酵素の作用が、細胞溶解ステップにおいて平衡(VASP $\leftrightarrow$ P-VASP)を直接変更でき、それによって測定結果の関連性を変え得ることがすぐに予想できる。

【0073】

したがって、本発明者らはELISA解析を、

1)細胞溶解に同調して媒体中に放出される細胞酵素の活性を固定し；

2)細胞溶解の作用によって遊離されるヌクレオチド(ADP、ATP、AMP、cAMP、GMP、cGMPなど)を無効にする

ように設計した。例えば、赤血球がADPリザーバーであり、細胞活性化、特に血小板に即座に影響を与えることはよく知られている。

【0074】

本発明者らは、本出願において設計されたELISA解析によって、詳細には以下の例中で示されるように、解析へのこれらの干渉のリスクを克服することができることを観察した

10

20

30

40

50

。

【 0 0 7 5 】

マイクロウェルプレート操作手順

ADPによって活性化される活性化剤PGE1及び受容体P2Y12の制御下におけるVASPのリン酸化状態のELISA解析のために、以下のステップ及び条件を使用した：

1) クエン酸ナトリウム(0.109M又は0.129M)などの抗凝固剤を含むサンプル管中に血液を採取し；

2a) 必要ならば、血小板活性との相互作用が測定される化合物を、全血サンプルを含むウェルの一部に入れ；

2b) マイクロプレートの相当するウェル中に、PGE1又はPGE1+ADP活性化剤(40 µL)を入れ； 10

3) 血液(40 µL)を加え、次いで出し入れを繰り返すことによって撹拌し；

4) 混合物を周囲温度で10分間インキュベートし；

5) 活性化血液を含むウェル中に溶解用緩衝液(100 µL)を加え、出し入れを繰り返すことによって全体を撹拌し；「ブランク」ウェル中にも溶解用緩衝液(180 µL)を入れ；

6) 反応媒体を周囲温度で30分間インキュベートし；

7) 次いで、プレートを希釈洗浄溶液で3回洗浄し(3 × 300 µL、20倍濃縮として供給)；

8) 20倍濃縮抗P-VASP抗体を含むペルオキシダーゼプローブを希釈用緩衝液中で希釈し；

9) 希釈ペルオキシダーゼプローブを、全てのウェルに入れ(200 µL)；

10) それを周囲温度で30分間インキュベートし； 20

11) プレートを希釈洗浄溶液で3回洗浄し(3 × 300 µL、20倍濃縮として供給)；

12) 次いで、TMB可視化用基質を全てのウェルに入れ(200 µL)；

13) それを周囲温度で5分間インキュベートし；

14) 次いで、全てのウェルに停止液を加え(100 µL)；

15) プレートを数分間放置し；

16) プレートリーダーを用いてOD_{450nm}を測定し；

17) 血小板反応性指数を、下記式：

【 0 0 7 6 】

【 数 2 】

$$PRI = \frac{OD_{450nm} [PGE1] - OD_{450nm} [PGE1 + ADP]}{OD_{450nm} [PGE1] - OD_{450nm} [ブランク]}$$

30

【 0 0 7 7 】

を用いて算出した。

【 0 0 7 8 】

前記手順で用いた試薬の組成は、以下の通りであった：

【 0 0 7 9 】

1. ELISAプレート：

immunoGlobe(ドイツ)(<http://www.immunoglobine.com>)製の総抗VASP F(ab')₂(クローンI E273)がコーティングされたNUNC「Maxisorp」プレート。 40

【 0 0 8 0 】

2. 凍結乾燥PGE1活性化剤：

Carbomer(<http://www.carbomer.com>)製のプロスタグランジンE1(5 µM)
+添加剤。

【 0 0 8 1 】

3. 凍結乾燥PGE1+ADP活性化剤：

Carbomer(<http://www.carbomer.com>)製のプロスタグランジンE1(5 µM)(モル濃度は、5pM ~ 5mMの範囲内で変更可能)

+Sigma(<http://www.sigmaaldrich.com>)製のADP(20 µM)(モル濃度は、5pM ~ 5mMの範囲内 50

で変更可能)

+添加剤。

【 0 0 8 2 】

4. 溶解用緩衝液

・ Triton X-100(Sigma、<http://www.sigmaaldrich.com>)2%(濃度は0.002～10%の範囲内で変化可能)

・ SDS(Sigma、<http://www.sigmaaldrich.com>)0.2%(濃度は0.0002～10%の範囲内で変更可能)

・ ProClin 300(Sigma、<http://www.sigmaaldrich.com>)0.4%(濃度は0.000002～10%の範囲内で変更可能)

を含むPBS緩衝液。

【 0 0 8 3 】

5. 20倍洗浄溶液

【 0 0 8 4 】

【表 1】

化合物	濃度、g/l
リン酸二水素ナトリウム・2H ₂ O	31.13
塩化ナトリウム	174.90
Tween 20	19.95
Nipagine A	0.998
硫酸ゲンタマイシン	0.075
Light green SF yellowish	0.695
塩酸	定量不能(pH 調整のため)
水酸化ナトリウム	

【 0 0 8 5 】

最終pH=6.65±0.05

最終濃度:1.14

【 0 0 8 6 】

6. 希釈用緩衝液

調製済み希釈用緩衝液(1リットル当たりの量)

NaCl 8.8g

NaH₂PO₄ 3.9g

Tween 20 1g

ウシアルブミン 1g

Acid blue 25 12.5mg

proClin 0.5g

pH: 目標値7.50(7.30～7.70)

【 0 0 8 7 】

7. ペルオキシダーゼ20×プローブ

これは、HRPペルオキシダーゼ酵素:Roche(スイス)(<http://www.roche-applied-science.com>)又はBBI Enzyme(旧Biozyme)(<http://www.biozyme.com>)から入手可能なペルオキシダーゼ(POD)が結合された、NanoTools(ドイツ)(<http://www.nanotools.de>)から入手可能な、ヨーロッパ特許EP1042368に記載のマウスモノクローナルリン酸化抗VASP抗体(クローン16C2)であった。

【 0 0 8 8 】

8. TMB

Kem-En-Tec(デンマーク)(<http://www.kem-en-tec.com>)製の「TMB ONE、調製済み基材」

。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

9. 停止液

$H_2SO_4=0.2M$

モル濃度は0.0002～10Mの範囲内で変化させることができた。

【 0 0 9 0 】

採取したサンプルの解析は、同時に標準サンプルの解析を含むことができた。

【 0 0 9 1 】

II.VASPリン酸化経路の受容体及び/又は酵素に対して作用する物質の影響を評価するための、全血ELISA試験におけるVASPタンパク質リン酸化による血小板活性化の解析

II.1 PDE3阻害試験

糖尿病などの病態に関連した血小板活性化の監視に使用される、ホスホジエステラーゼPDE3に対して活性な活性成分、シロスタゾール(Angilillo、USA)を、ヒト全血について試験した。

【 0 0 9 2 】

全血100 μL 及び100 μL のシロスタゾール希釈溶液を用いた。インキュベーションは37において2時間30分実施した。

【 0 0 9 3 】

図4に示される結果は、異なる量のシロスタゾールの存在下におけるVASPのリン酸化状態の変化を示している。

【 0 0 9 4 】

他の分子も同様に試験できる。

【 0 0 9 5 】

II.2 PGE2活性化剤試験のEP3受容体

プロスタグランジンPGE2のEP3受容体に対して作用する活性成分スルプロストンを、ELISA試験を用いて全血について試験した。

【 0 0 9 6 】

全血10 μL (FACS)及び40 μL (ELISA)並びにスルプロストン希釈溶液10 μL (FACS)及び40 μL (ELISA)を用いた。インキュベーションは周囲温度において10分間実施した。

【 0 0 9 7 】

VASPリン酸化に対するその効果を図5に示す。

【 0 0 9 8 】

II.3 PGD2受容体活性化剤試験

PGD2のDP1受容体に対して作用する、BW245cと命名されている化合物を、FACS及びELISAを用いて全血について解析した。

【 0 0 9 9 】

全血10 μL (FACS)及び40 μL (ELISA)並びにBW245c希釈溶液10 μL (FACS)及び40 μL (ELISA)を用いた。インキュベーションは周囲温度において10分間実施した。

【 0 1 0 0 】

結果を図7に報告する。

【 0 1 0 1 】

III.VASPリン酸化経路の受容体及び/又は酵素に対して作用する物質の影響を評価するための、全血ELISA試験におけるVASPタンパク質リン酸化による血小板活性化の解析

1)クエン酸ナトリウム(0.109M又は0.129M)などの抗凝血剤を含むサンプル管中に血液を採取し;

2a)必要ならば、血小板活性との相互作用が測定される化合物を、全血サンプルを含むウェルの一部に入れ;

2b)マイクロプレートの相当するウェル中に、PGE1又はPGE1+TRAP14活性化剤(40 μL)を入れ;

3)血液を加え(40 μL)、次いで出し入れを繰り返すことによって攪拌し;

4)混合物を周囲温度で10分間インキュベートし;

10

20

30

40

50

5) 活性化血液を含むウェル中に溶解用緩衝液(100 μ L)を加え、出し入れを繰り返すことによって全体を撈拌し;「ブランク」ウェル中にも溶解用緩衝液(180 μ L)を入れ;

6) 反応媒体を周囲温度で30分間インキュベートし;

7) 次いで、プレートを希釈洗浄溶液で3回洗浄した(3 $\times$ 300 μ L、20倍濃縮として供給)。

【0102】

試薬の組成は、項目IIに示されている。

【0103】

トロンビン受容体(PAR-1)のTRAP14アゴニストを、一方ではELISAを用いて、他方ではFACSを用いて全血について試験することにより、VASPタンパク質のリン酸化状態に対する間接的な効果を評価した。結果を図6に示す。

10

【0104】

化合物C1(第1化合物)はPGE1であり、化合物C2(第2化合物)はTRAP14であった。

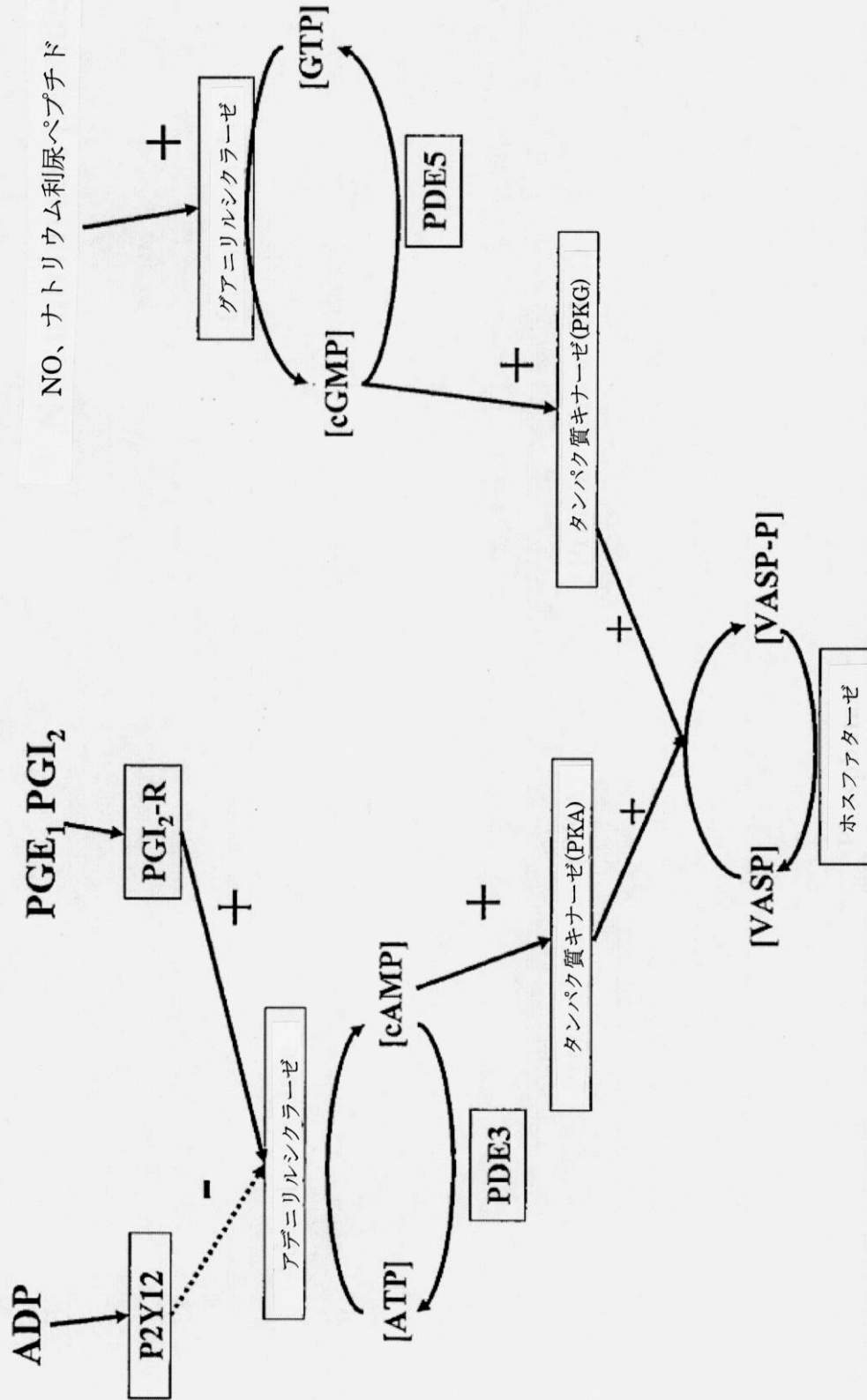
【0105】

IV. 活性化後(PGE1+ADP+ MRS2395による)の全血サンプルの保存

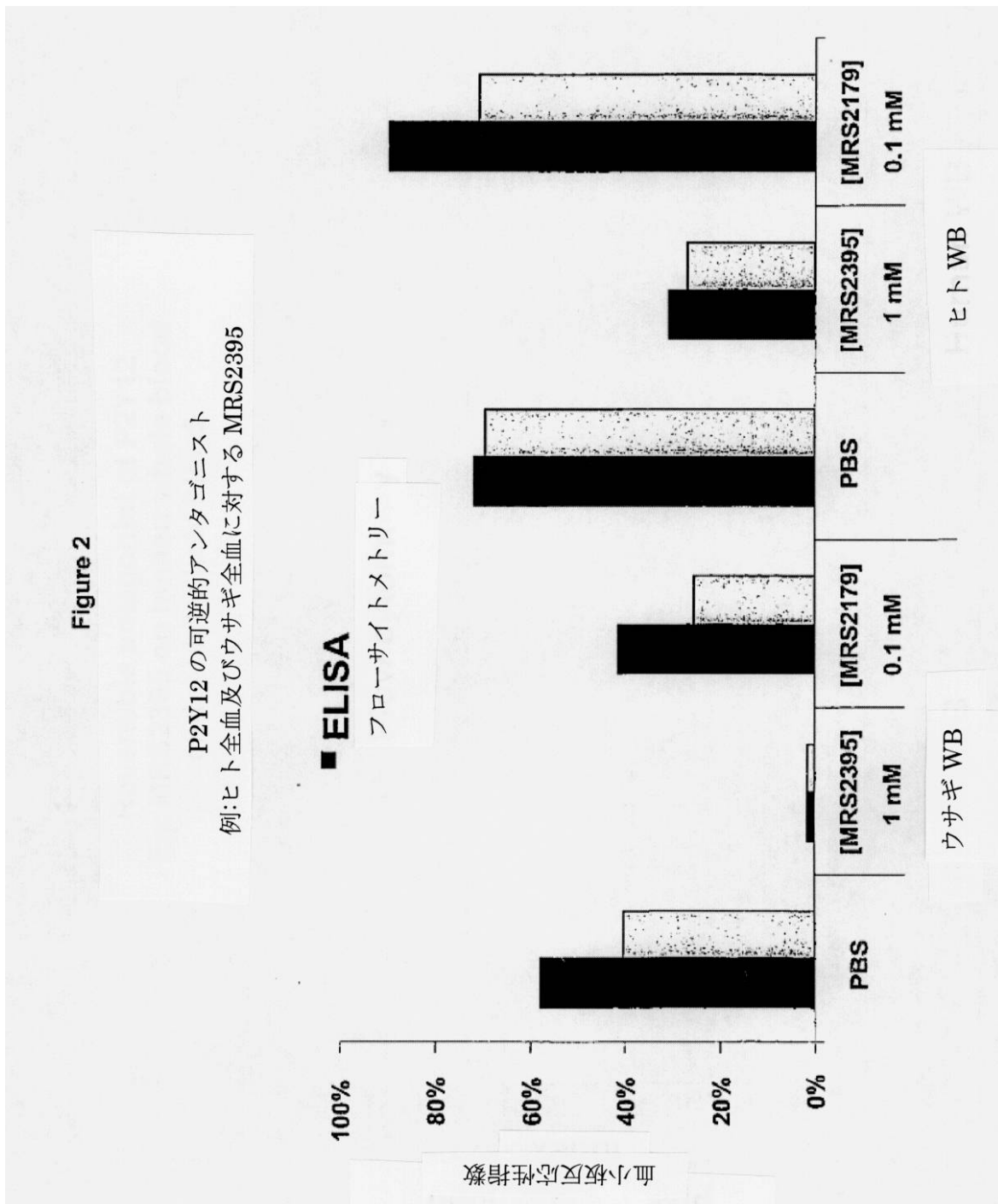
図9及び10は、PGE1+ADP+MRS2395で処理された全血サンプル(WB)の血小板安定性を、処理後48時間まで、又は溶解とそれに続く凍結後22日間までについて示している。ELISA及びフローサイトメトリーを用いて得られたPRIの結果を示している。

【図 1】

FIGURE 1



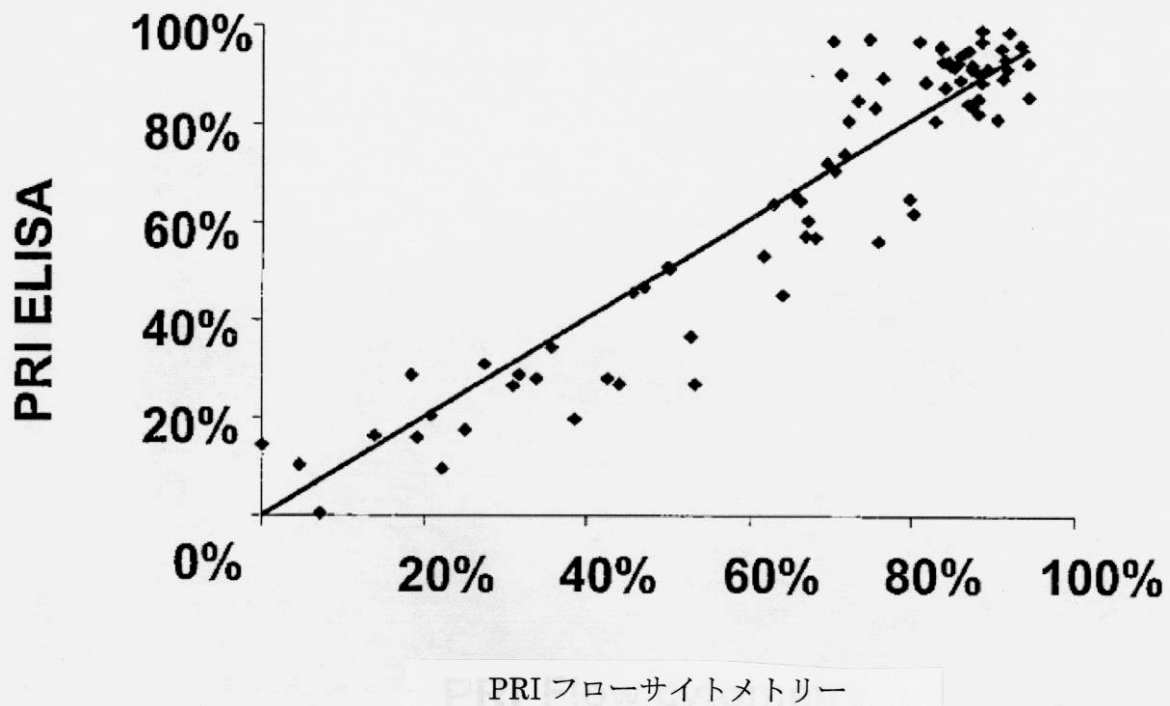
【 図 2 】



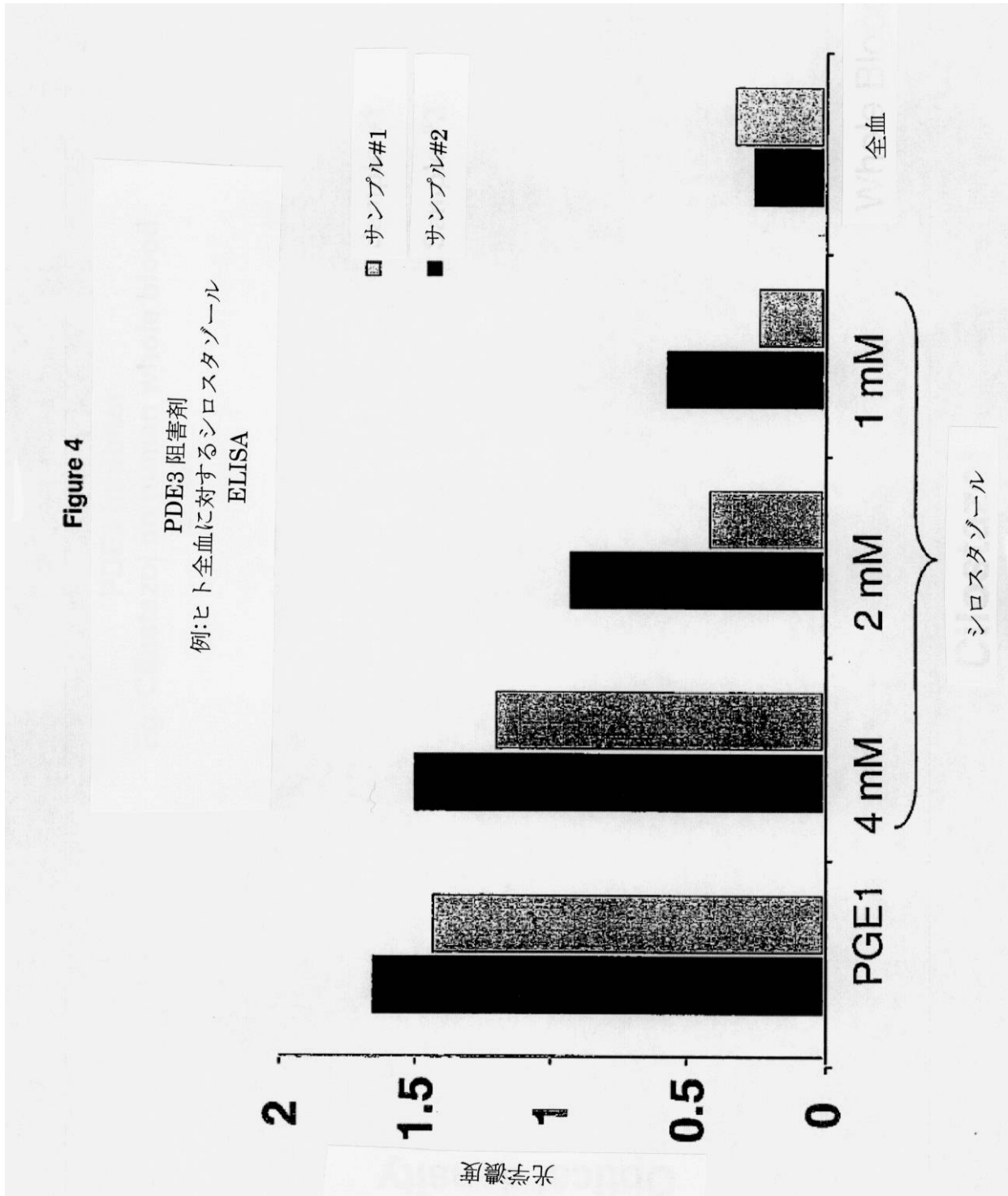
【 図 3 】

Figure 3

P2Y₁₂ の不可逆的アンタゴニスト
例: ヒト全血に対するクロピドグレル(Sanofi)
ELISA 対フローサイトメトリーの相関
(n=95)



【 図 4 】



【 図 5 】

Figure 5

PGE2 受容体(EP3)
例:スルプロストン(FACS 及び ELISA による解析)

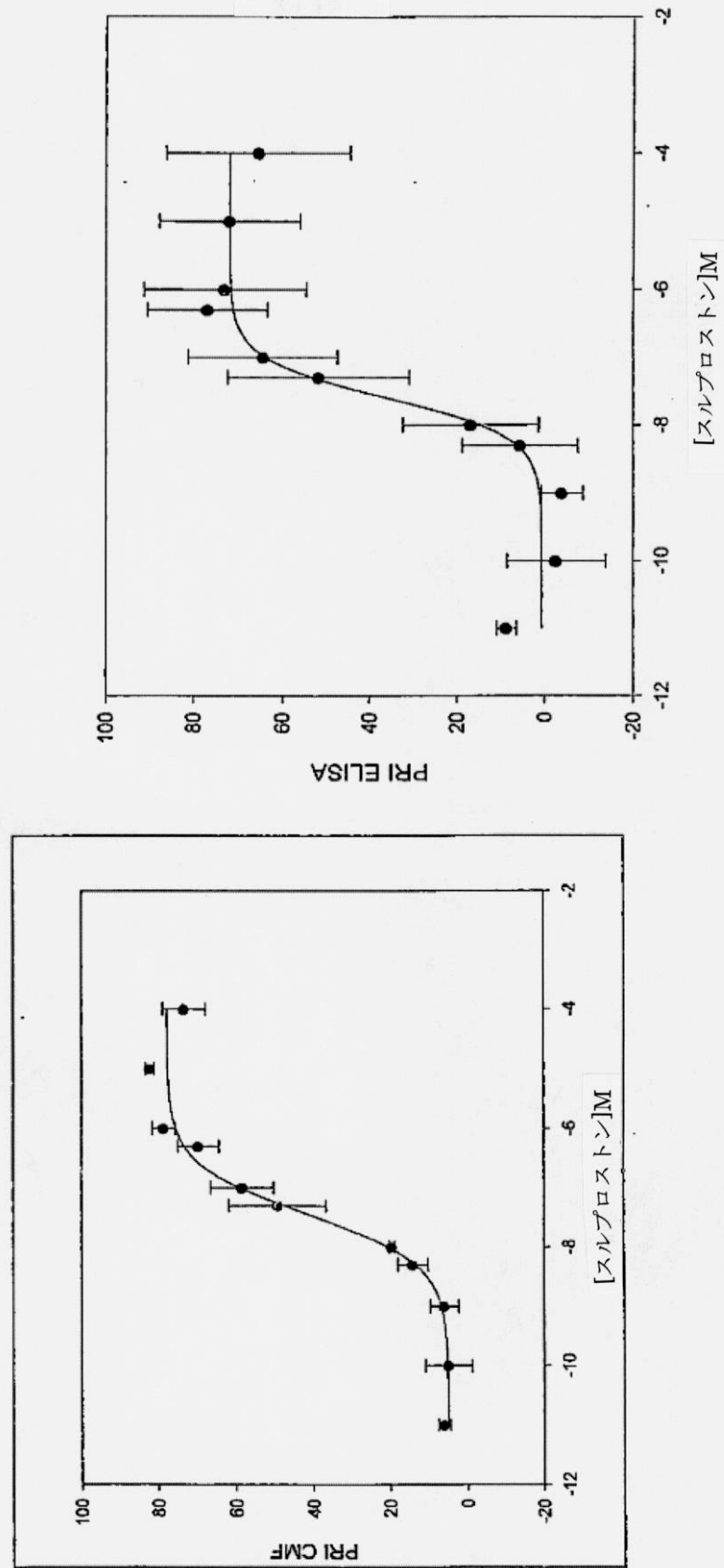
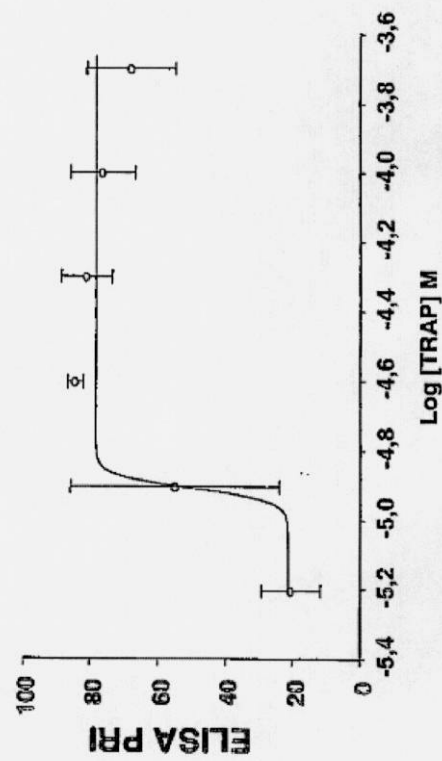


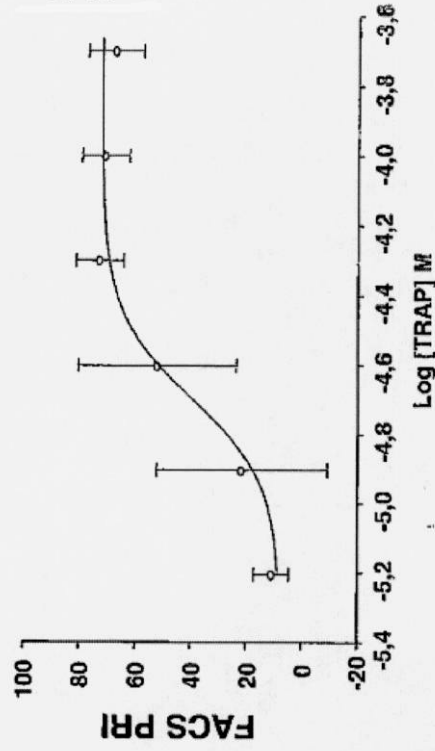
Figure 6

ヒト全血におけるトロンビン受容体(PAR-1)の
アゴニスト(TRAP14)の効果(ELISA&FACS)

ELISA



FACS



PAR-1 受容体リガンド、TRAP14 ペプチドの配列
TRAP 14 マー(SFLLRNPNDKYEPE)(Neosystem)

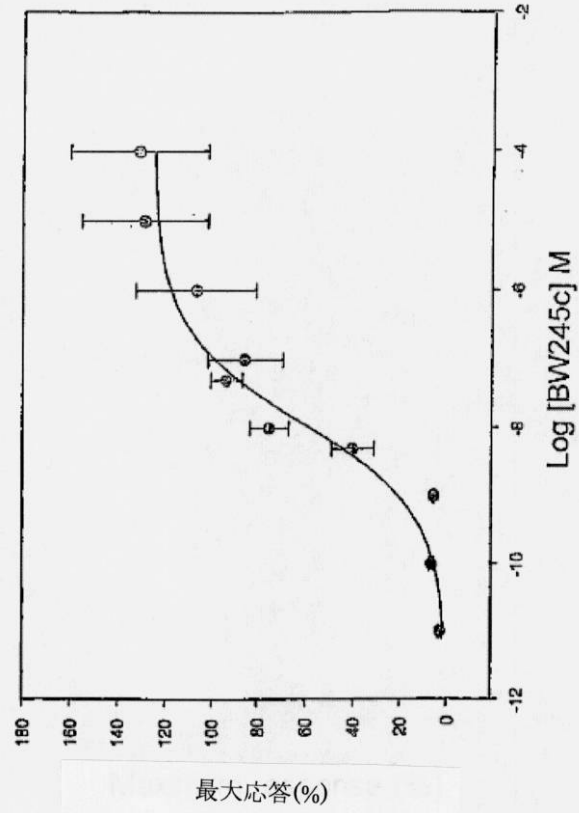
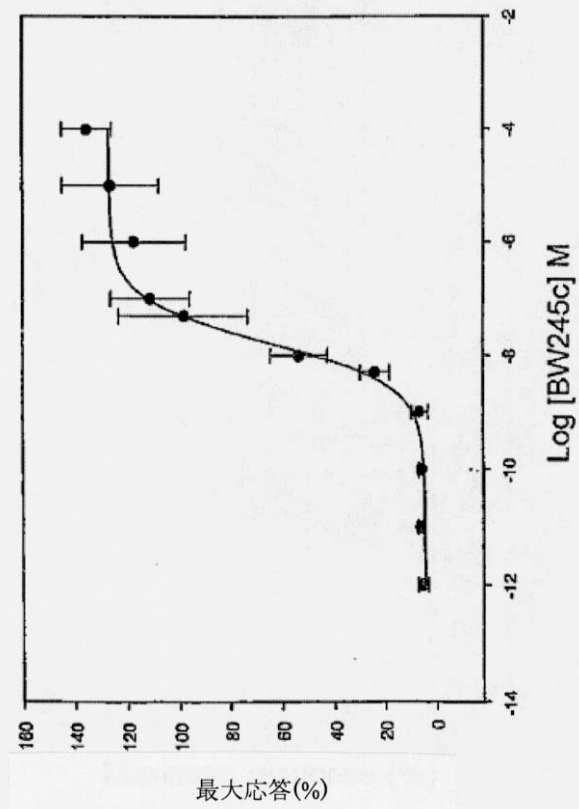
【 図 7 】

Figure 7

DP1(PGD2 受容体)
例:BW245c(FACS 又は ELISA による解析)

BW245c によって誘発された VASP のリン酸化
FACS

BW245c によって誘発された VASP のリン酸化
ELISA



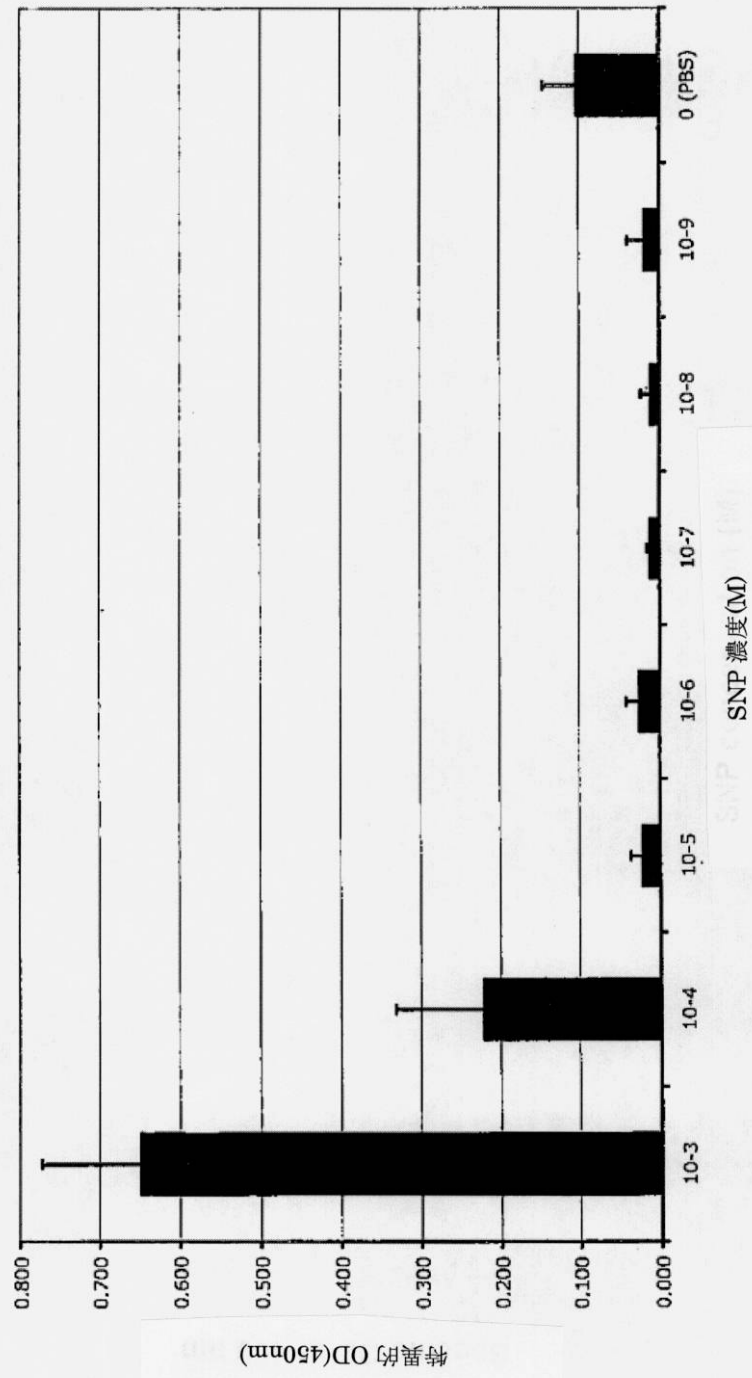
【 図 8 】

Figure 8

NO 供与体

例: ヒト全血に対する SNP/試験

ELISA-VASP-P: 全血に対する SNP 用量の効果

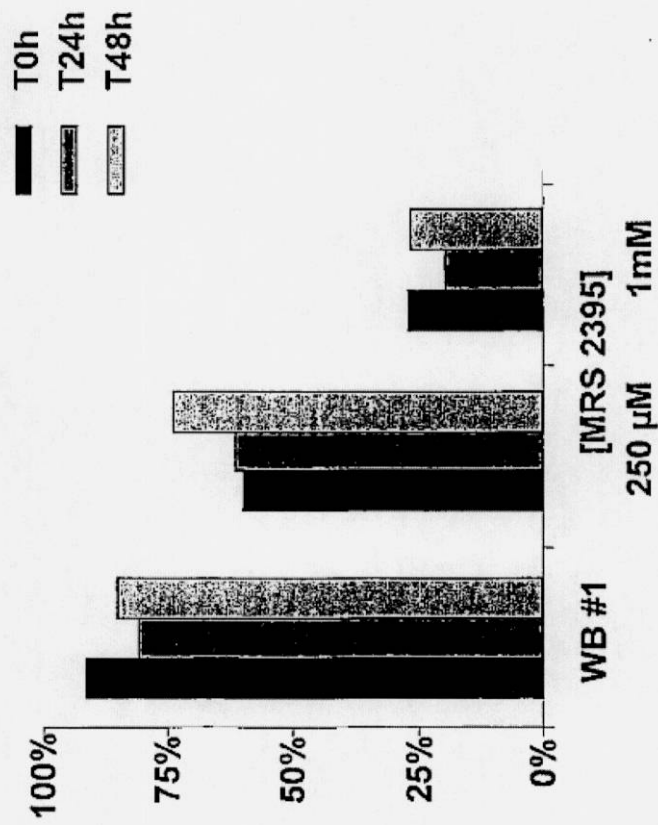


【図 9 A】

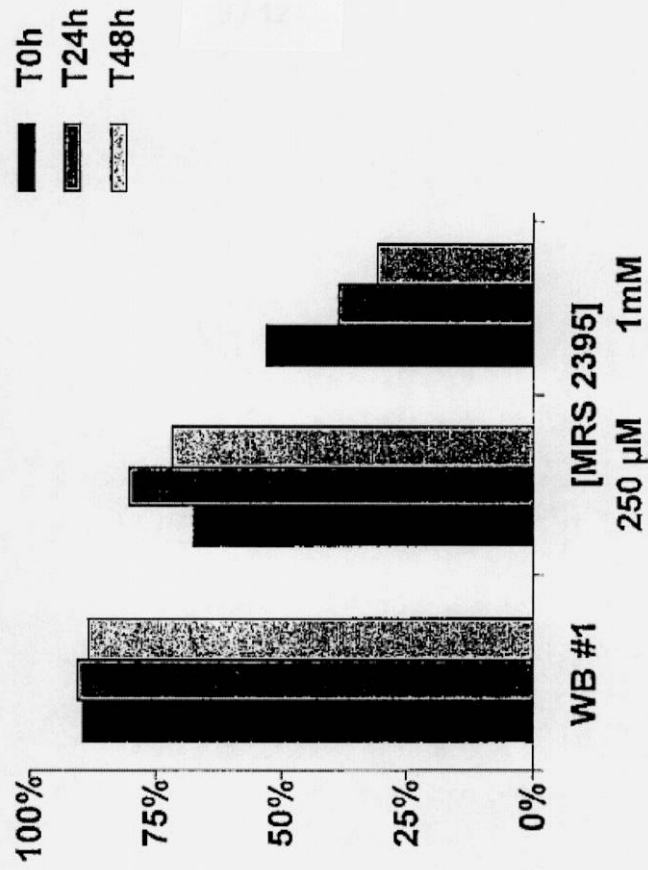
Figure 9A

全血中における血小板の安定性
フローサイトメトリー及びELISAによる解析

ELISA



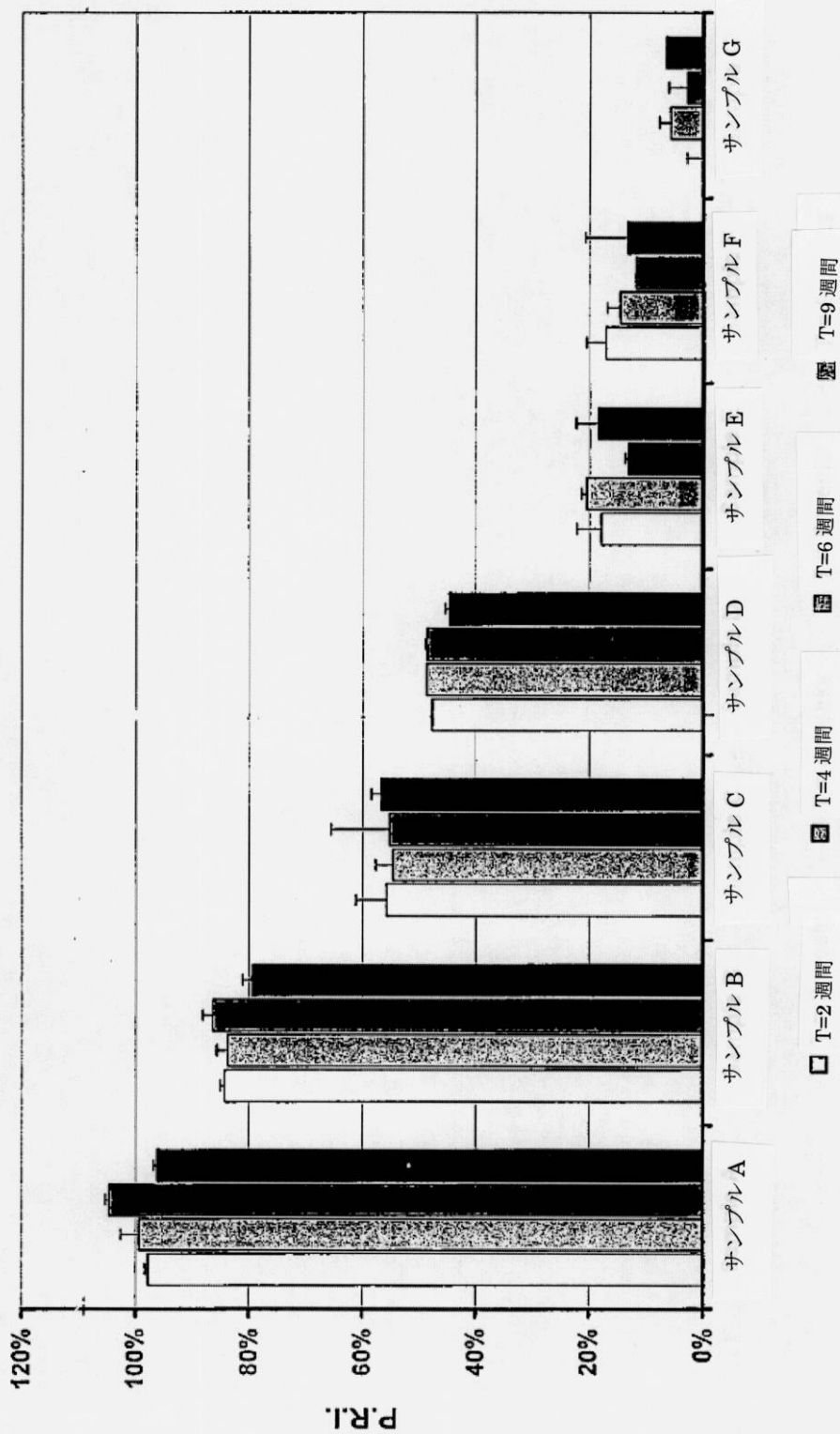
フローサイトメトリー



【図 9 B】

Figure 9B

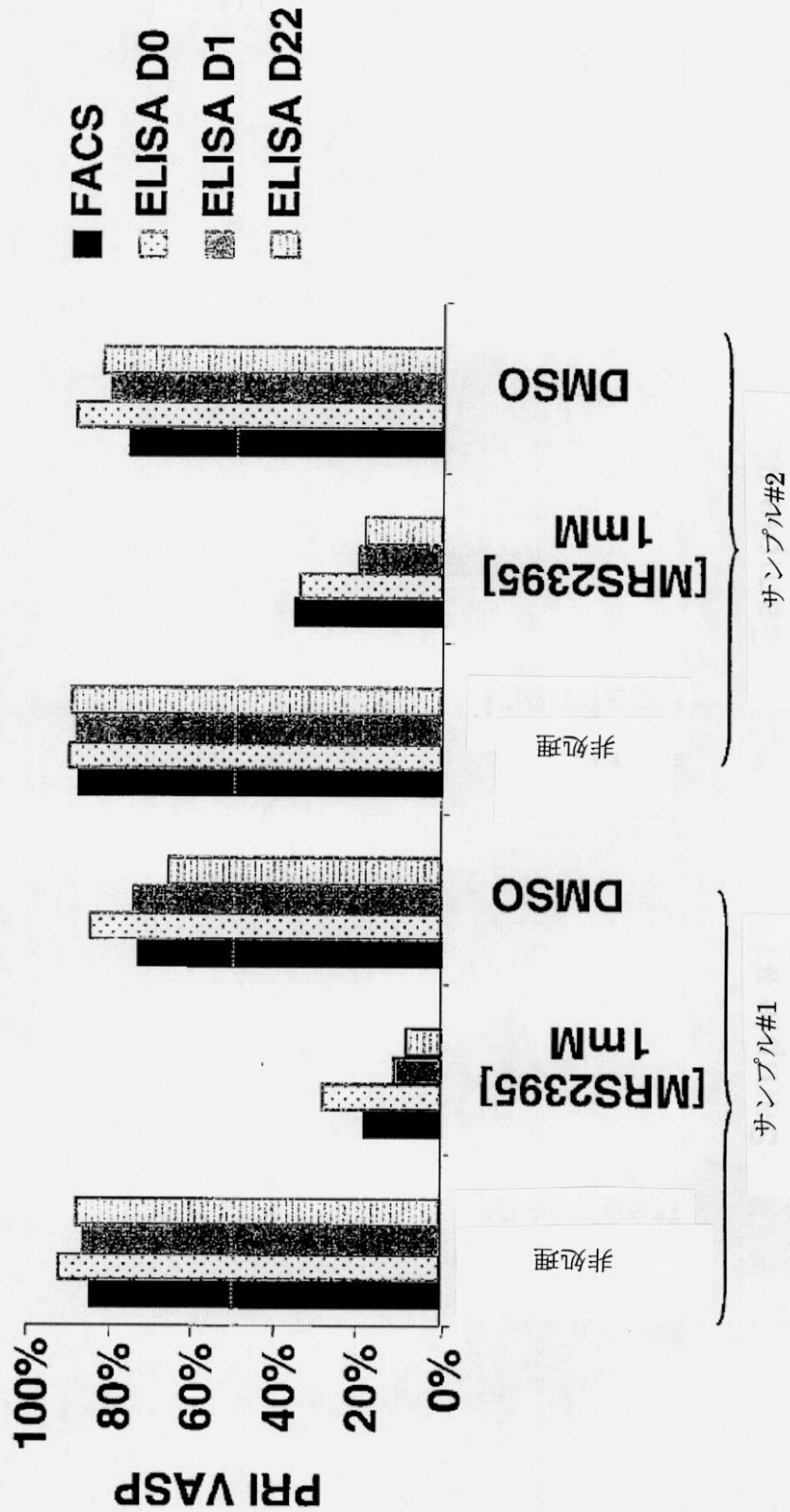
全血中における血小板の安定性
ELISA による解析



【図 10】

Figure 10

ヒト全血から調製した血小板溶解産物の安定性。
0日、1日及び22日における、ELISAを用いた凍結サンプルの解析。
同時に、0日におけるフローサイトメトリーによる解析。

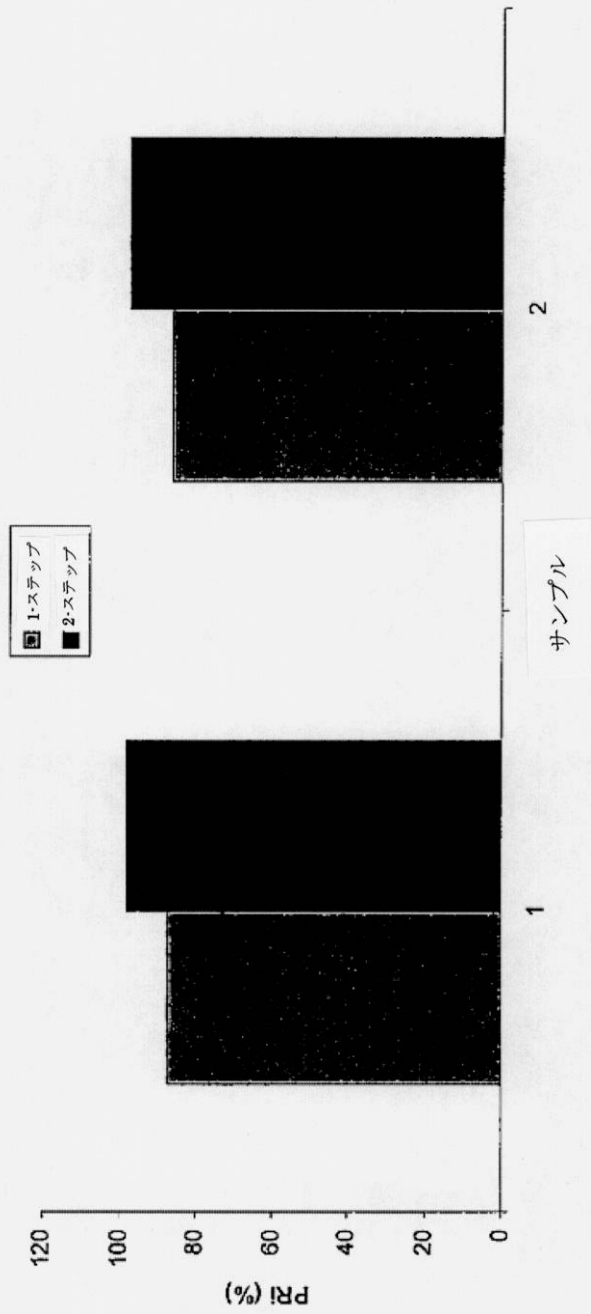


【図 11】

Figure 11

1 ステップ又は 2 ステップ ELISA

1 ステップ又は 2 ステップ ELISA



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2010/051164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/48 G01N33/86 G01N33/68 G01N33/50
ADD.

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 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHWARZ U R ET AL: "Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS SEP 1999, vol. 82, no. 3, September 1999 (1999-09), pages 1145-1152, XP009129280 ISSN: 0340-6245 the whole document ----- -/-	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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.

B document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 August 2010

Date of mailing of the international search report

05/11/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stricker, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2010/051164

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALEIL B ET AL: "Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases." JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS : JTH JAN 2005, vol. 3, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 85-92, XP002568520 ISSN: 1538-7933	1-5, 12-23
Y	* abstract page 86, column 1, paragraph 4	24
X	GURBEL PAUL A ET AL: "Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY 15 NOV 2005, vol. 46, no. 10, 15 November 2005 (2005-11-15), pages 1827-1832, XP002568521 ISSN: 1558-3597	1-5, 12-23
Y	* abstract page 1828, column 2, paragraph 2	24
X	PAMPUCH AGNIESZKA ET AL: "Comparison of VASP-phosphorylation assay to light-transmission aggregometry in assessing inhibition of the platelet ADP P2Y(12) receptor" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 96, no. 6, December 2006 (2006-12), pages 767-773, XP009129279 ISSN: 0340-6245	1-5, 12-23
Y	* abstract page 768	24
X	BONELLO L ET AL: "Vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of postprocedural major adverse cardiovascular events." JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS : JTH AUG 2007, vol. 5, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 1630-1636, XP002568522 ISSN: 1538-7933	1-5, 12-23
Y	page 1631, paragraph 2	24
-/-		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2010/051164

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRERE CORINNE ET AL: "ADP-induced platelet aggregation and platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS OCT 2007, vol. 98, no. 4, October 2007 (2007-10), pages 838-843, XP009129553 ISSN: 0340-6245	1-5, 12-23
Y	the whole document page 839, column 1, paragraph 4 - page 839, column 2, paragraph 1	24
X	BONELLO LAURENT ET AL: "Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY 8 APR 2008, vol. 51, no. 14, 8 April 2008 (2008-04-08), pages 1404-1411, XP002568523 ISSN: 1558-3597	1-5, 12-23
Y	* abstract page 1405, column 1	24
A	CATTANEO M: "The platelet P2 receptors" 1 January 2007 (2007-01-01), PLATELETS,, PAGE(S) 201 - 220 , XP009129117 the whole document figures 10-3	4,5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/051164

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/48 G01N33/86 G01N33/68 G01N33/50 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SCHWARZ U R ET AL: "Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS SEP 1999, vol. 82, no. 3, septembre 1999 (1999-09), pages 1145-1152, XP009129280 ISSN: 0340-6245 le document en entier ----- -/--	1-24
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 août 2010		05/11/2010
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé
		Stricker, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/051164

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ALEIL B ET AL: "Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases." JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS : JTH JAN 2005, vol. 3, no. 1, janvier 2005 (2005-01), pages 85-92, XP002568520 ISSN: 1538-7933	1-5, 12-23
Y	* abrégé page 86, colonne 1, alinéa 4	24
X	GURBEL PAUL A ET AL: "Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY 15 NOV 2005, vol. 46, no. 10, 15 novembre 2005 (2005-11-15), pages 1827-1832, XP002568521 ISSN: 1558-3597	1-5, 12-23
Y	* abrégé page 1828, colonne 2, alinéa 2	24
X	PAMPUCH AGNIESZKA ET AL: "Comparison of VASP-phosphorylation assay to light-transmission aggregometry in assessing inhibition of the platelet ADP P2Y(12) receptor" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 96, no. 6, décembre 2006 (2006-12), pages 767-773, XP009129279 ISSN: 0340-6245	1-5, 12-23
Y	* abrégé page 768	24
X	BONELLO L ET AL: "Vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of postprocedural major adverse cardiovascular events." JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS : JTH AUG 2007, vol. 5, no. 8, août 2007 (2007-08), pages 1630-1636, XP002568522 ISSN: 1538-7933	1-5, 12-23
Y	page 1631, alinéa 2	24

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/051164

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FRERE CORINNE ET AL: "ADP-induced platelet aggregation and platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS OCT 2007, vol. 98, no. 4, octobre 2007 (2007-10), pages 838-843, XP009129553 ISSN: 0340-6245	1-5, 12-23
Y	le document en entier page 839, colonne 1, alinéa 4 - page 839, colonne 2, alinéa 1	24
X	BONELLO LAURENT ET AL: "Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study." JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY 8 APR 2008, vol. 51, no. 14, 8 avril 2008 (2008-04-08), pages 1404-1411, XP002568523 ISSN: 1558-3597	1-5, 12-23
Y	* abrégé page 1405, colonne 1	24
A	CATTANEO M: "The platelet P2 receptors" 1 janvier 2007 (2007-01-01), PLATELETS,, PAGE(S) 201 - 220 , XP009129117 le document en entier figures 10-3	4,5

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 マクシム・ムラール

フランス・F - 1 3 4 0 0・オーバーニュ・カンパーニュ・ラ・ジョアンヴィル・(番地なし)

(72)発明者 ダニエレ・ブレ・モワンヌ

フランス・F - 1 3 7 3 0・サン・ヴィクトレ・アレ・ドゥ・ラ・カスカデル・9 6 8

专利名称(译)	细胞信号通路的细胞内生物标志物的全血测定 - 用于测量给定细胞群的激活		
公开(公告)号	JP2012529642A	公开(公告)日	2012-11-22
申请号	JP2012514520	申请日	2010-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	BIOCYTEX		
申请(专利权)人(译)	生物赛天使		
[标]发明人	マクシムムラル ダニエレブレモワンヌ		
发明人	マクシム・ムラル ダニエレ・ブレ・モワンヌ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/86 C12Q1/485 G01N33/502 G01N33/5041 G01N33/6893 G01N2800/222 G01N2800/224 G01N2800/32 G01N2800/324 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	2009002885 2009-06-12 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在全血样品上通过ELISA测定样品的预定细胞群的细胞活化状态的方法包括测定细胞信号传导途径（生物标记物）中涉及的细胞内蛋白的磷酸化状态。用于测定细胞内蛋白质的磷酸化状态的方法的特定应用包括监测全血样品中存在的细胞群的细胞活化的激动剂或拮抗剂。这种应用可以特别有助于患者的治疗监测，或者它可以用于药物筛选。特别地，本申请涉及通过观察全血样品中包含的血小板的活化来探索止血，特别是血液凝固的背景。

