

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/116779

発行日 平成21年8月20日 (2009. 8. 20)

(43) 国際公開日 平成19年10月18日 (2007. 10. 18)

(51) Int. Cl.

GO1N 33/53 (2006.01)

F I

GO1N 33/53

テーマコード (参考)

V

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁)

出願番号 特願2008-509792 (P2008-509792)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2007/056530  
 (22) 国際出願日 平成19年3月20日 (2007. 3. 20)  
 (31) 優先権主張番号 特願2006-100241 (P2006-100241)  
 (32) 優先日 平成18年3月31日 (2006. 3. 31)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

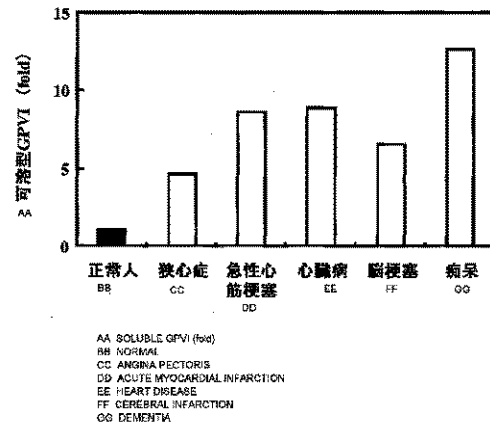
(71) 出願人 000181147  
 持田製薬株式会社  
 東京都新宿区四谷1丁目7番地  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100095360  
 弁理士 片山 英二  
 (74) 代理人 100149010  
 弁理士 星川 亮  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁  
 (72) 発明者 保坂 義隆  
 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬  
 株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規血小板活性化マーカー及びその測定方法

(57) 【要約】

本発明はG P V I に対する抗体を産生するマウスハイブリドーマを多数樹立し、それらの産生する抗体を組み合わせることで、血漿中に存在する s G P V I を簡便かつ高感度で測定する方法を提供する。これにより、新規な血小板活性化マーカー、その測定試薬及び方法、ならびに血小板活性化/血管内皮傷害関連疾患の診断等における当該マーカーの新規用途が提供される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

1 以上の G P V I 特異的結合物質を用いる、ヒト体液中の可溶型 G P V I ( s G P V I ) の測定方法。

**【請求項 2】**

測定感度が 3 0 p g / m l 以下である、請求項 1 の測定方法。

**【請求項 3】**

G P V I 特異的結合物質が G P V I のループ 2 またはループ 9 に特異的に結合する抗体である、請求項 1 又は 2 の測定方法。

**【請求項 4】**

G P V I 特異的結合物質として、結合部位の異なる 2 以上の抗 G P V I 抗体を用いる、請求項 1 ないし 3 の何れかの測定方法。

**【請求項 5】**

G P V I 特異的結合物質として、少なくとも G P V I のドメイン 1 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体及びドメイン 2 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体を用いる、請求項 4 の測定方法。

**【請求項 6】**

G P V I 特異的結合物質として、G P V I のループ 2 に特異的に結合する抗体及びループ 9 に特異的に結合する抗体を用いる、請求項 4 または 5 の測定方法。

**【請求項 7】**

サンドイッチ免疫測定方法である、請求項 3 ないし 6 の何れかの測定方法。

**【請求項 8】**

1 以上の G P V I 特異的結合物質を含有する、ヒト体液中の s G P V I の測定用の試薬又はキット。

**【請求項 9】**

測定感度が 3 0 p g / m l 以下である、請求項 8 の試薬又はキット。

**【請求項 10】**

G P V I 特異的結合物質が G P V I のループ 2 またはループ 9 に特異的に結合する抗体である、請求項 8 又は 9 の試薬又はキット。

**【請求項 11】**

G P V I 特異的結合物質として、結合部位の異なる 2 以上の抗 G P V I 抗体を含有する、請求項 8 ないし 10 の何れかの試薬又はキット。

**【請求項 12】**

G P V I 特異的結合物質として、少なくとも G P V I のドメイン 1 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体及びドメイン 2 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体を含有する、請求項 8 ないし 11 の何れかの試薬又はキット。

**【請求項 13】**

G P V I 特異的結合物質として、G P V I のループ 2 に特異的に結合する抗体及びループ 9 に特異的に結合する抗体を含有する、請求項 8 ないし 12 の何れかの試薬又はキット。

**【請求項 14】**

サンドイッチ免疫測定法に用いる、請求項 8 ないし 13 何れかの試薬又はキット。

**【請求項 15】**

請求項 1 ないし 14 の何れかの s G P V I の測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、ヒト体液中の s G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定又は定量するための方法。

**【請求項 16】**

請求項 1 ないし 14 の何れかの s G P V I の測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、ヒト体液中の s G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断方法。

**【請求項 17】**

10

20

30

40

50

前記疾患が血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患である、請求項 16 の診断方法。

【請求項 18】

前記疾患が狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆からなる群から選ばれるいずれかである、請求項 16 又は 17 の診断方法。

【請求項 19】

請求項 1 ないし 14 の何れかの s G P V I の測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、ヒト体液中の s G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、コラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬が奏効する患者の選別方法。

【請求項 20】

前記抗血小板薬が抗 G P V I 抗体又は G P V I - F c である、請求項 19 の選別方法。

【請求項 21】

前記患者の疑われる疾患が血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患である、請求項 19 又は 20 の選別方法。

【請求項 22】

前記患者の疑われる疾患が血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患である、請求項 19 ないし 21 の何れかの選別方法。

【請求項 23】

前記患者の疑われる疾患が狭心症、急性心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆からなる群から選ばれるいずれかである、請求項 19 ないし 22 の何れかの選別方法。

【請求項 24】

請求項 1 ないし 14 の何れかの s G P V I の測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、ヒト体液中の s G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、コラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬の投与時期を決定する方法。

【請求項 25】

請求項 1 ないし 14 の何れかの s G P V I の測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、ヒト体液中の s G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、コラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬の治療効果もしくは副作用発現の予測方法、モニタリング方法又は予後の判定方法。

【請求項 26】

1 以上の G P V I 特異的結合物質を含有する、請求項 15 ないし 25 の何れかの方法のための試薬又はキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な血小板活性化マーカー、その測定試薬及び方法、ならびに血小板活性化 / 血管内皮傷害関連疾患の診断等における当該マーカーの新規用途に関する。

【背景技術】

【0002】

日本人の死亡原因第一位は悪性新生物、第二位は心疾患、第三位は脳血管疾患である。そして、心疾患と脳血管疾患の大部分は心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症が占めており、この両者を合わせると、癌での死亡に匹敵する。それ故、血栓症の予防・治療は、大きな問題点として残されている。そして、血栓症の予防・治療においては、血小板活性をコントロールすることが重要であり、抗血小板薬が積極的に処方されている。しかしながら、その臨床効果は決して満足できるレベルには達していない。

【0003】

血小板の機能は、損傷を受けた血管部位の内皮下組織に結合する粘着反応と、血小板同士がくっつき合う凝集反応の 2 つにわけられる。特に、後者は血小板に含まれている顆粒の内容物の放出を伴っている。また、血小板の活性化の過程において、様々な分子がその機能発現に関与しており、これらは血小板活性化マーカーとして利用されている。そして

10

20

30

40

50

、このマーカーを有効に活用することにより、病的血栓に対する診断がより明確となるうえ、治療法に関しても、より適切な選択が可能となる。

【0004】

従来、血小板の活性化の指標として、血小板の顆粒に蓄積されているトロンボグロブリンや血小板第4因子の測定が行われてきた。しかしながら、これらは腎機能低下時に高値となる点や、採血手技の影響などを考慮する必要があり、必ずしも適切なマーカーとは言いがたい。また、トロンボグロブリンや血小板第4因子がともに高値の場合は、*in vitro*での血小板活性化による変化である可能性が高いので注意が必要である。したがって、より高感度で特異性の高い血小板活性化マーカーの登場が望まれていた。

【0005】

近年、血小板活性化マーカーとして、Pセレクトインの検出が利用されつつある (Shattil S. J.ら、Blood、1987年、70巻、p.307-315) (Murakami T.ら、Eur. J. Clin. Invest.、1996年、26巻、p.996-1003)。Pセレクトインは、血小板の顆粒膜あるいは血管内皮細胞のWeibel-Palade小体に存在する膜タンパク質であり、これらの細胞が刺激を受けた際に、細胞表面に移動してくる。現在、Pセレクトインは膜結合型と可溶型の2種類のタイプに分類されている。そして、膜結合型のPセレクトインは、蛍光標識した抗Pセレクトイン抗体とフローサイトメトリーを用いて、直接的に検出される。しかしながら、血小板におけるPセレクトインの発現は、試料の取り扱いにより擬陽性となることがあり、安定した結果を得ることは難しい。一方、可溶型Pセレクトインは、サンドイッチELISA法にて検出が可能である。しかしながら、Pセレクトインは血小板と血管内皮細胞に由来することから、血漿中の可溶性Pセレクトインを測定する場合、その由来が問題となる。

【0006】

血小板が種々の状況下で活性化されたり、物理的な刺激を受けると、微小な膜小胞体が生成され、この膜小胞体はマイクロパーティクルと呼ばれている。血小板マイクロパーティクルはフローサイトメトリーを用いて測定するのが一般的であり、様々な血栓性疾患の病態把握において重要であるが、(1)機器間の感度の違い、(2)マイクロパーティクル領域のゲートの囲み方、(3)測定限界がマイクロパーティクルのサイズと近いこと、(4)使用する抗体の種類による施設間差などの問題点が指摘されており、測定方法の標準化は達成されていない。

【0007】

血小板膜上に存在する糖蛋白質VI (GPVI)は、血小板のコラーゲン受容体であり、コラーゲン刺激による血小板の活性化に中心的役割を担っていることが明らかにされている (高山博史、日本血栓止血学会誌、2003年、第14巻、第2号、p.75-81参照)。また、抗マウスGPVI抗体は、コラーゲン刺激特異的に血小板凝集を抑制し、出血時間の著明な延長をきたすことなく、抗血栓作用を発揮することが報告されている (Nieswandt B.ら、J. Exp. Med.、2001年、第194巻、第4号、p.459-469参照)。さらに、抗ヒトGPVI抗体も出血時間の著明な延長をきたすことなく、抗血小板作用を発揮することが報告されている (Takayama H.ら、Blood、2005年、第106巻、第11号、p612a) (WO2005/111083A2)。したがって、コラーゲン惹起血小板凝集を特異的に抑制する薬物、例えば抗GPVI抗体は、安全で有効性の高い抗血小板薬となり得ることが期待されている。

【0008】

血小板に存在しているGPVIを、ウエスタンブロッティングで検出できることが報告されている (Tsujii M.ら、J. Biol. Chem. 1997年第272巻38号p.23528-23531)。また、抗GPVI抗体を血小板に添加すると、GPVIがsheddingし、培養上清中に可溶型GPVI (sGPVI)が出現することがウエスタンブロッティングにより証明されている (Bergmeier W.ら、Thromb. Haemost. 2004年、第91巻、p.951-958)。このsGPVI

10

20

30

40

50

Iのsheddingはメタロプロテアーゼの作用によるものと示唆されている。しかしながら、これらの現象は生体外において生理的にはほとんど起こりえない条件下で人為的に惹起されたものであり、実際に生体内において、生理的又は病態下において、血小板GPVIのsheddingが生じているかは全く不明であった。また、ウエスタンブロッティングによる血小板GPVIならびにsGPVIの検出自体は、検査に供する試料の調製および検出感度等、臨床の場において一般化するのには問題が多い。さらに、血小板表面のGPVIの存在量は血小板1個あたり約3000個と極めて微量と推定されている。したがって、血栓・塞栓症等の診断を目的とした場合、より簡便で特異性及び検出感度の高い検査方法の開発が望まれている。

【発明の開示】

【0009】

このように、血小板活性化/血管内皮傷害関連疾患、例えば血栓症等の診断および抗血小板薬のレスポンスを選別する際において、信頼性の高い血小板活性化のバイオマーカー、及び、簡便で、感度が高く、安定した結果が得られる当該バイオマーカーの測定方法又は診断方法、並びにそれらのための試薬又はキットが切望されている。

【0010】

本発明の目的は、新規な血小板活性化マーカー、その測定試薬及び方法、ならびに血小板活性化/血管内皮傷害関連疾患の診断等における当該マーカーの新規用途を提供するものである。

【0011】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、GPVIに対する抗体を産生するマウスハイブリドーマを多数樹立し、それらの産生する抗体を組み合わせることで、血漿中に存在するsGPVIを簡便かつ高感度で測定することを着想した。この着想に基づき、鋭意研究を重ねた結果、血小板膜上に存在するGPVI(以下、mGPVIと記載することがある)ならびに体液中に存在する可溶性GPVI(以下、sGPVIと記載することがある)を特異的かつ高感度で測定する方法を確立することに成功するとともに、これが血小板活性化マーカーとなり得ることを見出し、本発明を完成した。

【0012】

以下に本発明を説明する。

本発明の第1の態様は、

(1) 1以上のGPVI特異的結合物質を用いる、試料中のGPVI、特に生体試料中のsGPVI又はmGPVIの測定方法、好ましくは、

(1a) 1以上のGPVI特異的結合物質を用いる、体液、特にヒト体液中の可溶性GPVI(sGPVI)の測定方法、

(1b) 測定感度が100pg/ml以下、好ましくは30pg/ml以下、より好ましくは10pg/ml以下、さらに好ましくは3.0pg/ml以下、特に好ましくは1.0pg/ml以下である、上記何れかの測定方法、

(1-1) GPVI特異的結合物質が抗GPVI抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-1a) GPVI特異的結合物質がGPVIのドメイン1、好ましくは、ループ2又はループ5、より好ましくはループ2に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-1b) GPVI特異的結合物質がGPVIのドメイン2、好ましくは、ループ9又はループ11、より好ましくはループ9に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-1c) GPVI特異的結合物質がGPVIのループ2またはループ9に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-2) GPVI特異的結合物質として、結合部位の異なる2以上の抗GPVI抗体を用いる、上記何れかの測定方法、

(1-3) GPVI特異的結合物質として、少なくともGPVIのドメイン1に特異的に結合する抗GPVI抗体及び/又はドメイン2に特異的に結合する抗GPVI抗体を用い

10

20

30

40

50

る、上記何れかの測定方法、

(1-3a) 前記GPV Iのドメイン1に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ2又はループ5、好ましくはループ2に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-3b) 前記GPV Iのドメイン2に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ9又はループ11、好ましくはループ9に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-3c) 前記GPV Iのドメイン1に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ2又はループ5、好ましくはループ2に特異的に結合する抗体であり、かつ、前記GPV Iのドメイン2に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ9又はループ11、好ましくはループ9に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-4) GPV I特異的結合物質として、少なくともGPV Iのループ2に特異的に結合する抗体及び/又はループ9に特異的に結合する抗体を用いる、上記何れかの測定方法、

(1-4a) 少なくともGPV Iのループ2に特異的に結合する抗体を非固相化抗体としてを用いる、上記何れかの測定方法、

(1-4b) 少なくともGPV Iのループ9に特異的に結合する抗GPV I抗体を固相化抗体として用いる、上記何れかの測定方法、

(1-4c) 少なくともGPV Iのループ2に特異的に結合する抗体を非固相化抗体として、及び、ループ9に特異的に結合する抗GPV I抗体を固相化抗体として用いる、上記何れかの測定方法、

(1-4d) サンドイッチ免疫測定法である、上記何れかの測定方法、

(1-4e) 非固相化抗体がF(ab')<sub>2</sub>である、上記何れかの測定方法、

(1-4f) ビオチン化非固相化抗体及びpoly-HRP標識ストレプトアビジンで検出する系を用いる、上記何れかの測定方法、

(1-4g) 前記GPV Iのループ2に特異的に結合する抗体がF1232-10-2抗体である、または、前記GPV Iのループ9に特異的に結合する抗体がF1232-7-1抗体である、上記何れかの測定方法、

(1-5) 少なくともGPV Iのドメイン1に特異的に結合する抗GPV I抗体及び/又はドメイン2に特異的に結合する抗GPV I抗体を用いる、体液中、特にヒト体液中のsGPV Iの測定方法、

(1-5a) 前記GPV Iのドメイン1に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ2又はループ5に特異的に結合する抗体である、上記何れかのsGPV Iの測定方法、

(1-5b) 前記GPV Iのドメイン2に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ9又はループ11に特異的に結合する抗体である、上記何れかのsGPV Iの測定方法、

(1-5c) 前記GPV Iのドメイン1に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ2又はループ5に特異的に結合する抗体であり、かつ、前記GPV Iのドメイン2に特異的に結合する抗GPV I抗体がGPV Iのループ9又はループ11に特異的に結合する抗体である、上記何れかのsGPV Iの測定方法、

(1-6) 少なくともGPV Iのループ2に特異的に結合する抗GPV I抗体及び/又はループ9に特異的に結合する抗GPV I抗体を用いる、上記何れかのsGPV Iの測定方法、

(1-6a) 少なくともGPV Iのループ2に特異的に結合する抗体を非固相化抗体としてを用いる、上記何れかのsGPV Iの測定方法、

(1-6b) 少なくともGPV Iのループ9に特異的に結合する抗GPV I抗体を固相化抗体として用いる、上記何れかのsGPV Iの測定方法、

(1-6c) 少なくともGPV Iのループ2に特異的に結合する抗体を非固相化抗体として、及び、ループ9に特異的に結合する抗GPV I抗体を固相化抗体として用いる、上記

10

20

30

40

50

何れかの s G P V I の測定方法、

- ( 1 - 6 d ) サンドイッチ免疫測定法である、上記何れかの測定方法、
- ( 1 - 6 e ) 非固相化抗体が F ( a b ' ) 2 である、上記何れかの測定方法、
- ( 1 - 6 f ) ピオチン化非固相化抗体及び p o l y - H R P 標識ストレプトアビジンで検出する系を用いる、上記何れかの測定方法、
- ( 1 - 6 g ) 前記 G P V I のループ 2 に特異的に結合する抗体が F 1 2 3 2 - 1 0 - 2 抗体である、または、前記 G P V I のループ 9 に特異的に結合する抗体が F 1 2 3 2 - 7 - 1 抗体である、上記何れかの測定方法、である。

本発明の第 2 の態様は、

( 2 ) 1 以上の G P V I 特異的結合物質を含有する、試料中の G P V I 、特に生体試料中の s G P V I 又は m G P V I の測定試薬又はキット、好ましくは、

( 2 a ) 1 以上の G P V I 特異的結合物質を含有する、体液、特にヒト体液中の s G P V I の測定試薬又はキット、

( 2 b ) 測定感度が 1 0 0 p g / m l 以下、好ましくは 3 0 p g / m l 以下、より好ましくは 1 0 p g / m l 以下、さらに好ましくは 3 . 0 p g / m l 以下、特に好ましくは 1 . 0 p g / m l 以下である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 1 ) G P V I 特異的結合物質が抗 G P V I 抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 1 a ) G P V I 特異的結合物質が G P V I のドメイン 1 、好ましくは、ループ 2 又はループ 5 、より好ましくはループ 2 に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 1 b ) G P V I 特異的結合物質が G P V I のドメイン 2 、好ましくは、ループ 9 又はループ 1 1 、より好ましくはループ 9 に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 1 c ) G P V I 特異的結合物質が G P V I のループ 2 またはループ 9 に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 2 ) G P V I 特異的結合物質として、結合部位の異なる 2 以上の抗 G P V I 抗体を含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 3 ) G P V I 特異的結合物質として、G P V I のドメイン 1 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体及びドメイン 2 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体を含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 3 a ) 前記 G P V I のドメイン 1 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体が G P V I のループ 2 又はループ 5 、好ましくはループ 2 に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 3 b ) 前記 G P V I のドメイン 2 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体が G P V I のループ 9 又はループ 1 1 、好ましくはループ 9 に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 3 c ) 前記 G P V I のドメイン 1 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体が G P V I のループ 2 又はループ 5 、好ましくはループ 2 に特異的に結合する抗体であり、かつ、前記 G P V I のドメイン 2 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体が G P V I のループ 9 又はループ 1 1 、好ましくはループ 9 に特異的に結合する抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 4 ) G P V I 特異的結合物質として、G P V I のループ 2 に特異的に結合する抗体及びループ 9 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体を含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 4 a ) 少なくとも G P V I のループ 2 に特異的に結合する抗体を非固相化抗体として含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 4 b ) 少なくとも G P V I のループ 9 に特異的に結合する抗 G P V I 抗体を固相化抗体として含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

( 2 - 4 c ) 少なくとも G P V I のループ 2 に特異的に結合する抗体を非固相化抗体とし

10

20

30

40

50

て、及び、ループ9に特異的に結合する抗GPVI抗体を固相化抗体として含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-4d) サンドイッチ免疫測定法に用いる、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-4e) 非固相化抗体がF(ab')<sub>2</sub>である、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-4f) ビオチン化非固相化抗体及びpoly-HRP標識ストレプトアビジンを含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-4g) 前記GPVIのループ2に特異的に結合する抗体がF1232-10-2抗体である、または、前記GPVIのループ9に特異的に結合する抗体がF1232-7-1抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-5) 少なくともGPVIのドメイン1に特異的に結合する抗体及び/又はドメイン2に特異的に結合する抗GPVI抗体を含有する、体液中、特にヒト体液中のsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-5a) 前記GPVIのドメイン1に特異的に結合する抗GPVI抗体がGPVIのループ2又はループ5に特異的に結合する抗体である、上記何れかのsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-5b) 前記GPVIのドメイン2に特異的に結合する抗GPVI抗体がGPVIのループ9又はループ11に特異的に結合する抗体である、上記何れかのsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-5c) 前記GPVIのドメイン1に特異的に結合する抗GPVI抗体がGPVIのループ2又はループ5に特異的に結合する抗体であり、かつ、前記GPVIのドメイン2に特異的に結合する抗GPVI抗体がGPVIのループ9又はループ11に特異的に結合する抗体である、上記何れかのsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-6) 少なくともGPVIのループ2に特異的に結合する抗体及び/又はループ9に特異的に結合する抗GPVI抗体を含有する、上記何れかのsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-6a) 少なくともGPVIのループ2に特異的に結合する抗体を非固相化抗体として含有する、上記何れかのsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-6b) 少なくともGPVIのループ9に特異的に結合する抗GPVI抗体を固相化抗体として含有する、上記何れかのsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-6c) 少なくともGPVIのループ2に特異的に結合する抗体を非固相化抗体として、及び、ループ9に特異的に結合する抗GPVI抗体を固相化抗体として含有する、上記何れかのsGPVIの測定試薬又はキット、

(2-6d) サンドイッチ免疫測定法に用いる、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-6e) 非固相化抗体がF(ab')<sub>2</sub>である、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-6f) ビオチン化非固相化抗体及びpoly-HRP標識ストレプトアビジンを含有する、上記何れかの測定試薬又はキット、

(2-6g) 前記GPVIのループ2に特異的に結合する抗体がF1232-10-2抗体である、または、前記GPVIのループ9に特異的に結合する抗体がF1232-7-1抗体である、上記何れかの測定試薬又はキット、である。

本発明の第3の態様は、

(3) sGPVI又はmGPVIからなる血小板活性化マーカー、である。

本発明の第4の態様は、

(4) 血小板活性化マーカーとしてのsGPVI又はmGPVIの使用、である。

本発明の第5の態様は、

(5) 試料中のsGPVI又はmGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定又は定量するための方法、又はそれらの判定方法もしくは評価方法、

(5-1) 上記何れかのGPVI、特にsGPVIの測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、GPVI、特にsGPVI、より好ましくはヒト体液中のsGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定又は定量

10

20

30

40

50

するための方法、又はそれらの判定方法もしくは評価方法、である。

本発明の第6の態様は、

(6) 試料中のsGPVI又はmGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断方法、罹病性の判定方法又は発症リスクの評価方法、

(6-1) 上記何れかのGPVI、特にsGPVIの測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、GPVI、特にsGPVI、より好ましくはヒト体液中のsGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、上記血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断方法、罹病性の判定方法又は発症リスクの評価方法、

(6-2) 前記疾患が、好ましくは血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、より好ましくは狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆からなる群から選ばれるいずれかである、上記何れかの診断方法、罹病性の判定方法又は発症リスクの評価方法、である。

10

本発明の第7の態様は、

(7) 試料中のsGPVI又はmGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、抗血小板薬、好ましくはコラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬、より好ましくは抗GPVI抗体が奏効(著効)する患者の選別方法、

(7-1) 上記何れかのGPVI、特にsGPVIの測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、試料中のGPVI、特にsGPVI、より好ましくはヒト体液中のsGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、上記抗血小板薬、好ましくはコラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬、より好ましくは抗GPVI抗体又はGPVI-Fcが奏効する患者の選別方法、

20

(7-2) 前記患者の疑われる疾患が、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患、好ましくは血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、より好ましくは狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆からなる群から選ばれるいずれかである、上記何れかの選別方法、である。

本発明の第8の態様は、

(8) 試料中のsGPVI又はmGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、抗血小板薬、好ましくはコラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬の投与(開始)時期を決定する方法、

(8-1) 上記何れかのGPVI、特にsGPVI、より好ましくはヒト体液中のsGPVIの測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、GPVI、特にsGPVI、より好ましくはヒト体液中のsGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、上記決定方法、

(8-2) 前記薬剤を投与する患者の疑われる疾患が、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患、好ましくは血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、より好ましくは狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆からなる群から選ばれるいずれかである、上記何れかの決定方法、である。

30

本発明の第9の態様は、

(9) 試料中のsGPVI又はmGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、抗血小板薬、好ましくはコラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬の治療効果もしくは副作用発現の予測方法、モニタリング方法又は予後の判定方法、

(9-1) 上記ヒト体液中のsGPVIの測定方法、測定試薬又は測定キットを用いて、ヒト体液中のsGPVIを検出、測定又は定量する工程を含む、上記予測方法、モニタリング方法又は予後の判定方法、

(9-2) 前記患者の疑われる疾患が、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患、好ましくは血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、より好ましくは狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆からなる群から選ばれるいずれかである、上記何れかの予測方法、モニタリング方法又は予後の判定方法、である。

40

本発明の第10の態様は、

(10) 1以上のGPVI特異的結合物質を含有する、前記本発明第5ないし9の態様の

50

何れかの方法のための試薬又はキット、である。

本発明の第 1 1 の態様は、

( 1 1 ) 上記診断方法又は選別方法によって、診断又は選別された患者に抗血小板薬、好ましくはコラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬を投与することを特徴とする疾患の予防又は治療方法、

( 1 1 - 1 ) 上記診断方法又は選別方法によって、診断又は選別された患者に抗 G P V I 抗体又は G P V I - F c、好ましくは抗 G P V I 抗体を投与することを特徴とする疾患の予防又は治療方法、

( 1 1 - 2 ) 前記疾患が血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患、好ましくは血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、より好ましくは狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆から選ばれるいずれかである、上記何れかの予防又は治療方法、である。

10

本発明の第 1 2 の態様は、

( 1 2 ) 上記診断方法又は選別方法によって、診断又は選別された患者の疾患を予防又は治療するための、抗血小板薬、好ましくはコラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬を含有することを特徴とする薬剤、

( 1 2 - 1 ) 上記診断方法又は選別方法によって、診断又は選別された患者の疾患を予防又は治療するための、抗 G P V I 抗体又は G P V I - F c、好ましくは抗 G P V I 抗体を含有することを特徴とする薬剤、

( 1 2 - 2 ) 前記疾患が血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患、好ましくは血栓性疾患もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、より好ましくは狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞及び痴呆からなる群から選ばれるいずれかである、上記何れかの薬剤、である。

20

### 【 0 0 1 3 】

本発明の測定方法、測定試薬またはキットにより、試料中の G P V I、特に生体試料中の s G P V I 又は m G P V I が高感度に測定しうる。

また、本発明の測定方法、測定試薬またはキットを用いて、s G P V I 又は m G P V I を検出、測定又は定量することにより、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定、定量、判定もしくは評価、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断、罹病性の判定もしくは発症リスクの評価、抗血小板薬、特に抗 G P V I 抗体の奏効する患者の選別、それらの投与（開始）時期の決定、及び、それらの治療効果もしくは副作用発現の予測、モニタリングもしくは予後の判定等が可能となる。

30

### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 1 4 】

図 1 は、ラット G P V I 遺伝子の塩基配列を示す。

図 2 は、ヒト及びラット G P V I のアミノ酸配列のアラインメントならびに各ドメイン及び各グループ（L 1 ~ L 1 4）の位置を示す。

図 3 は、ヒト及びマウス G P V I のアミノ酸配列のアラインメントならびに各ドメイン及び各グループ（L 1 ~ L 1 4）の位置を示す。

図 4 は、リコンビナント r G P V I - F c の S D S - P A G E の結果を示す。

40

図 5 は、F 1 2 3 9 - 6 - 1 の S D S - P A G E の結果を示す。

図 6 は、抗ラット G P V I 抗体の認識領域の解析の結果を示す。

図 7 は、ラット可溶型 G P V I E L I S A 標準曲線を示す。

図 8 は、ヒト可溶型 G P V I E L I S A 標準曲線を示す。

図 9 は、ラット血小板膜上の G P V I フローサイトメトリー解析の結果を示す。

図 1 0 は、ラット血小板インビトロ s h e d d i n g サンプルにおける上清中の可溶型 G P V I 濃度を示す。

図 1 1 は、サル血小板膜上の G P V I フローサイトメトリー解析の結果を示す。

図 1 2 は、サル血小板の G P V I ウェスタン解析の結果を示す。

図 1 3 は、サル血小板インビトロ s h e d d i n g サンプルにおける上清中の可溶型 G

50

P V I 濃度を示す。

図 1 4 は、ヒト血小板の G P V I フローサイトメトリー解析の結果を示す。

図 1 5 は、ヒト血小板の G P V I ウェスタン解析の結果を示す。

図 1 6 は、ヒト血小板インビトロ s h e d d i n g サンプルにおける上清中の可溶型 G P V I 濃度を示す。

図 1 7 は、ラットエンドトキシン惹起血栓モデル動物を用いた実験結果を示す。

図 1 8 ( A ) は、コラーゲン惹起血栓モデル動物を用いた 3 0 分後の実験結果を示す。

図 1 8 ( B ) は、コラーゲン惹起血栓モデル動物を用いた 1 5 分後の実験結果を示す。

図 1 9 ( A ) は、バルーンカテーテル血管内膜傷害モデルを用いた、血漿中可溶型 G P V I 量等の測定の実験結果を示す。

10

図 1 9 ( B ) は、バルーンカテーテル血管内膜傷害モデルを用いた、抗 G P V I 抗体の効果を示す。

図 2 0 は、ラットエンドトキシン惹起血栓モデル動物における尿中の可溶型 G P V I の変化を示す。

図 2 1 は、各種ヒト病態血漿の可溶型 G P V I の量を示す。

図 2 2 は、ヒト血小板の G P V I ウェスタン解析の結果を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 5 】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明において、測定対象である G P V I の由来動物種は特に限定されず、哺乳類、例えば、マウス、ラット及びサルであるが、好ましくはヒト G P V I である。これらの G P V I のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は公知であり、マウス、ラット及びヒト G P V I のアミノ酸配列は図 1 ~ 3 に示されている。m G P V I は膜貫通蛋白質として血小板表面に存在し、通常、全長の G P V I 分子であり、上述のアミノ酸配列からなる。s G P V I は、血小板から何らかの原因により遊離したものであるが、酵素、特に血小板由来の酵素、好ましくは、プロテアーゼ、より好ましくはメタロプロテアーゼにより切断されて可溶型となったものと考えられる。その分子量は、例えば、実施例で示されるように、還元条件下で S D S - P A G E 上約 5 5 k d であり、抗 G P V I 抗体を用いてウェスタンブロッティング等で検出可能である。

20

本発明において試料（以下、検体と記載することがある）、特に生体試料は、必ずしも限定されず、体液、細胞又は組織が含まれ、体液としては、例えば、血液、血漿、多血小板血漿（P R P）乏血小板血漿（P P P）、及び尿等、細胞としては例えば血小板である。m G P V I の場合、好ましくは血小板を含有する生体試料であり、特に、血液、多血小板血漿（P R P）又は血小板である。s G P V I の場合、好ましくは体液、特に、血液、血漿、乏血小板血漿（P P P）及び尿等である。また、生体試料の由来動物種は、必ずしも限定されず、哺乳類、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ及びサル等が含まれ、好ましくはヒトである。

30

【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 の態様の試料中の G P V I の測定方法は、1 以上の G P V I 特異的結合物質を用いて、試料中の G P V I、特に生体試料中の s G P V I 又は m G P V I を測定することを特徴とする。また、本発明の第 2 の態様の試料中の G P V I の測定試薬又はキットは、少なくとも 1 以上の G P V I 特異的結合物質を含有することを特徴とする。本発明において、G P V I 特異的結合物質は、コラーゲン、C R P 及び c o n v u l x i n 等を含むが、好ましくは、抗 G P V I 抗体である。以下、代表例として抗体を記載するが、本発明においては、適用可能な範囲で、抗体以外の G P V I 特異的結合物質についても抗体の記載に準ずることができる。

40

抗 G P V I 抗体は、特異的に G P V I、特に、s G P V I 又は m G P V I を認識又は結合する抗体であれば、必ずしも限定されない。G P V I との結合親和性（K d）が、 $10^{-7}$  M 以下、好ましくは  $3 \times 10^{-8}$  M 以下、より好ましくは  $1 \times 10^{-8}$  M 以下、さらに好ましくは  $3 \times 10^{-9}$  M 以下、特に好ましくは  $1 \times 10^{-9}$  M 以下である。

50

抗体の由来動物種は必ずしも限定されず、例えば、哺乳類、特にマウス、ラット、ハムスターもしくはウサギ等が挙げられ、また、遺伝子組換え技術により作製される抗体であってもよい。モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれも適用可能であるが、特異性等の性状及び物質的な均一性の点ではモノクローナル抗体は好ましい。

本発明において抗体の形態は、必ずしも限定されず、種々のものが適用可能である。例えば、本発明の抗体としては、その活性、例えば、GPVIとの結合能を有する限りにおいて、抗体の断片もしくは一部又は誘導体でもよい。例えば、断片としては、Fab (Fragment of antigen binding)、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>等、誘導体としては、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化抗体(dsFv)、diabody、sc(Fv)<sub>2</sub>(例えば、Orita T, Blood. 2005; 105: 562-566参照)、nanobody(例えば、Cortez-Retamozo V., Cancer Research 64, 2853-2857, 2004参照)及びCDRを含有するペプチド等が挙げられる。これらは公知の方法で作製しうる。

公知の抗GPVI抗体、例えば、マウス抗ヒトGPVIモノクローナル抗体(WO01/810、WO02/80968、WO2005/111083等参照)、ラット抗マウスGPVIモノクローナル抗体(Nieswandt et al.)、ラット抗ヒトGPVIモノクローナル抗体hGP5C4(WO2005/54294等参照)、ヒト一本鎖抗体(scFv)(WO01/810、WO03/54020等参照)及びヒト抗ヒトGPVIモノクローナル抗体(WO05/7800)であってもよい。

#### 【0017】

結合領域、結合部位もしくはエピトープが同定されている抗体等が好ましく、特定のドメイン、例えば、ドメイン1もしくはドメイン2と結合する抗体、又は、特定のループ、例えば、ループ2もしくはループ9の少なくとも一部を認識する抗体が挙げられる。具体例としては、実施例に示された抗体ならびにWO2006/117910及びWO2006/118350の実施例に記載された抗体等が挙げられる。そのような抗体の製造方法及び同定方法は種々の方法が適用でき、公知の方法を応用することもできるが、好ましくは、GPVIの特定部位、例えば特定のドメイン、好ましくは特定のループ領域を他のアミノ酸配列、具体的には、他の動物種のGPVIの対応するアミノ酸配列で置換した変異体を免疫用抗原又は抗体の同定用抗原として用いる方法が挙げられ、具体的には本願またはWO2006/117910もしくはWO2006/118350の実施例に記載された方法を適用することができる。また、それらの抗体の認識領域等は、当該置換変異体と抗体との結合性及びGPVIと抗体との結合性を公知の方法に準じて測定することにより推定しうる。具体的な方法は実施例に示されている。

これらの結合領域等の同定された抗体を1又は2以上、好ましくは結合領域等の異なる2種類、好ましくはGPVIとの結合において互いに競合しない抗体の組合せ、例えば、ドメイン1と結合する抗体及びドメイン2と結合する抗体、又は、ループ2の少なくとも一部と結合する抗体及びループ9の少なくとも一部と結合する抗体の組合せを用いることにより、特異性、選択性及び/又は感度の高いGPVIの検出又は測定が可能であり、特に、複数のGPVI分子種が混在する場合において、その内の特定のGPVI分子種、例えば、sGPVIを特異的、選択的及び/又は高感度に測定することが可能となる。好適な例は実施例に示されている。

#### 【0018】

本発明において、測定感度は必ずしも限定されないが、試料中の濃度で示した場合、1 ng/mL以下、好ましくは300 pg/mL以下、より好ましくは100 pg/mL以下、さらに好ましくは30 pg/mL以下、特に好ましくは10 pg/mL以下、極めて好ましくは3.0 pg/mL以下、最も好ましくは1.0 pg/mL以下である。また、検出限界濃度が、1 ng/mL以下、好ましくは300 pg/mL以下、より好ましくは100 pg/mL以下、さらに好ましくは30 pg/mL以下、特に好ましくは10 pg/mL以下、極めて好ましくは3.0 pg/mL以下、最も好ましくは1.0 pg/mL以下である。すなわち、検出限界濃度は、1 ng/mL以下、好ましくは300 pg/mL

1以下、より好ましくは100 pg/ml以下、さらに好ましくは30 pg/ml以下、特に好ましくは10 pg/ml以下、極めて好ましくは3.0 pg/ml以下、最も好ましくは1.0 pg/ml以下である。試料中の濃度は、標準曲線を作成する標準物質、例えば、GPVI-Fcの量として換算しても良い。また、測定前に試料の希釈操作を要する場合は、希釈後の値である。

試料、特に血漿中の可溶性GPVIを測定する場合は、血漿成分の影響を受けずに特異的に血小板より遊離したGPVIを測定することが必要とされる。したがって、一般的には特異性の高い抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法が使用される。そこで本発明の測定法において重要となるのは精度よくGPVIを測定するために、できるだけ血漿成分の影響を減らすことであり、その手段としては第一に検体の希釈が選択される。また、影響を減らす目的で反応液中に界面活性剤等の成分を添加することも可能であるが、それらが測定系に影響を及ぼす可能性がある。従って、精度よくGPVIを測定するためには、検体を希釈して測定することが好ましく、必然的に高感度が要求される。実施例8に示した方法を用いた場合、正常ヒト血漿中のsGPVI濃度は、hGPVI-hFc量に換算して約0.1~10 ng/ml(中央値0.4 ng/ml)の範囲である。検体を精度よく測定するには、通常検体を5倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは50倍以上、さらに好ましくは100倍以上希釈して測定することが必要であり、そのためには測定系の感度は30 pg/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下、より好ましくは数pg/ml以下であることが望ましい。本発明の方法、具体的には実施例、特に、実施例8で示した方法を用いれば、3 pg/mlの標準物質で約40 mAbsの吸光度差が得られ、本発明により十分な感度を得ることが可能である。

本発明の測定方法、測定試薬又はキットにおいて、抗GPVI抗体は標識抗体又は非標識抗体のいずれでもよいが、少なくとも1つの標識抗体を用いることが好ましい。この標識において、標識物質及び標識方法は公知の物質及び方法を用いることができ、放射性物質、酵素、蛍光物質及び化学発光物質等が用いられ、いずれも適用可能である。これらの内、酵素標識抗体を用いる方法が特殊な設備や高価な検出装置を必要とせず取り扱いも簡便である等の点で好ましい。また、標識には、直接法と間接法があり、いずれも適用可能である。

本発明の測定方法において、その測定原理等は必ずしも限定されず、一般的には免疫測定法であり、公知の方法、例えば、酵素抗体法、ELISA法、サンドイッチ免疫測定法、凝集法、固相直接法、固相結合法、溶液反応法、競合法、非競合法、イムノクロマト法、フロースルー法等が挙げられ、これらを単独又は組み合わせて、適用しうる(例えば、「超高感度酵素免疫測定法」石川栄治著、学会出版センター(1993年)、「免疫測定法の新しい活用事例と診断試薬・治療薬開発への応用」免疫測定法開発研究会、経営教育出版、酵素免疫測定法(第3版)石川栄治等編、医学書院(1987年)等参照)。また、標識の信号を電気化学的に測定するMEDIA法(特開平5-264552)による測定、マイクロチップを使用したイムノアッセイ法(「バイオサイエンスとインダストリー」第61巻449-454頁2003年)、時間分解蛍光免疫測定法「アナリティカルバイオケミストリー(Analytical biochemistry)」(米国)、1984年、第137巻、p.335-343)及びホモジニアス免疫測定法も適用できる。これらの内、サンドイッチ免疫測定法、特に、マイクロウェルプレート等の不溶性担体を用いたサンドイッチELISA法が簡便であり、感度の面でも好ましい。

#### 【0019】

サンドイッチ免疫測定法は公知の技術を利用することができる。測定法の原理、応用及び改良法については、例えば、「超高感度酵素免疫測定法」石川栄治著、学会出版センター(1993年)、「免疫測定法の新しい活用事例と診断試薬・治療薬開発への応用」免疫測定法開発研究会、経営教育出版、酵素免疫測定法(第3版)石川栄治等編、医学書院(1987年)に記載されている。

サンドイッチ免疫測定法は、通常測定する蛋白質を認識する部位の異なる2種類以上の抗体を用いて抗体-抗原-抗体複合体を形成させることにより測定する方法である。サン

ドイツ免疫測定法においては、通常、不溶性担体を用いるが、その場合、不溶性担体に結合させる第一の抗体を固相化（用）抗体又はキャプチャー抗体と、第二の抗体を非固相化抗体、液相抗体もしくは検出用抗体又は直接的若しくは間接的に標識される場合標識抗体と呼ぶことがある。まず、第一の抗体が結合した不溶性担体を用意し、固相若しくは反応場所とする。検体を固相の該不溶性担体に添加し、反応させる。一定時間反応させた後、洗浄して固相に特異的に結合しなかった物質を除去する。続いて標識した第二の抗体を添加する。一定時間反応させた後、洗浄して複合体を形成しなかった標識抗体を除去し、標識物に基づいて固相に特異的に結合した複合体の量を特異的に定性または定量する。サンドイッチ法は上記のように２段階で行う方法（２ステップ法）と抗原及び標識抗体を同時に加える１段階法（１ステップ法）のいずれを使用することもできる。

10

本発明において、固相化抗体としては、種々の抗体を用いることができるが、好ましくはドメイン２、より好ましくはループ９又はループ１１、特にループ９に特異的に結合する抗体が挙げられる。また、非固相化抗体としては、種々の抗体を用いることができるが、好ましくはドメイン１、より好ましくはループ２又はループ５、特にループ２に特異的に結合する抗体が挙げられる。また、これらの内、固相化抗体としてループ９に特異的に結合する抗体及び非固相化抗体としてループ２に特異的に結合する抗体の組合せが好ましい。

サンドイッチ免疫測定法において、不溶性担体を用いずに、溶液中で行うこともできる。例えば、抗原と標識抗体及び第二の標識した第二の結合物質を液相中で反応させ、該標識と該第二の標識との相互作用を測定する方法である。また、サンドイッチ免疫測定法等において、別法として競合法により測定することもできる。抗原-抗体複合体を形成させる中で、検体中の抗原と標識した抗原若しくは標識した抗原類似物質を競合させることにより測定する方法である。

20

また、サンドイッチ免疫測定法において、さらに別法として第二の特異結合を利用して測定することもできる。抗体-抗原-抗体-第二の特異結合物質の複合体若しくは抗体-抗原-抗体-第二の特異結合物質-第二の特異結合物質の特異結合パートナー（以下、第二の特異結合パートナーと記載することがある）の複合体を形成させて測定する方法である。第二の特異結合物質-第二の特異結合パートナーの組み合わせとしては、抗原とその抗体、リガンドとそのレセプター、糖鎖含有物質とレクチン、ピオチンとアビジン若しくはストレプトアビジン等が挙げられる。さらに、抗体に対する抗体、すなわち、抗イムノグロブリン抗体を利用して、抗体-抗原-抗体-抗イムノグロブリン抗体の複合体を形成させて測定する方法、また、抗イムノグロブリン抗体及び第二の特異結合を利用して、抗イムノグロブリン抗体-抗体-抗原-抗体-第二の特異結合物質-第二の特異結合パートナー等を形成させて測定する方法が例示される。

30

#### 【 0 0 2 0 】

２種類の結合部位の異なる抗体を用いる本発明の好適な例としては、第二の特異結合物質-第二の特異結合パートナーとしてピオチンとアビジン若しくはストレプトアビジンを用いて、一方、特に、非固相化抗体をピオチン化し、これを標識、特に *poly*-HRP 標識したストレプトアビジンで検出する系が挙げられる。具体的な方法は実施例に示されている。

40

本発明のサンドイッチ免疫測定系で用いる不溶性担体は、ビーズ、ラテックス粒子、磁性粒子、プレート、チューブまたはメンブレン等を用いればよい。ビーズ、プレートまたはチューブは、その材料としてポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、ステンレス、プラスチック等が挙げられる。メンブレンは、セルロース、セルロース誘導体、ニトロセルロース、多孔性合成ポリマー、グラスファイバー、布、不織布、濾紙等が挙げられる。形状としては、ビーズ、ラテックス粒子または磁性粒子等は球形として用いることができる。保存時のスペースの確保の点で有利である。プレートまたはチューブはウエル形として用いることができる。市販の自動化測定器、プレートリーダー等に対応可能な点で有利である。また、メンブレンはイムノクロマト法、フロースルー法に用いることができる。抗体、第二の結合物質、第二の特異結合物質若しくはそのパートナー、または抗

50

イムノグロブリン抗体の不溶性担体への結合は熱吸着法、化学結合法等により行うことができる。

また、非特異的吸着等の反応を低減し、測定系の特異性もしくは感度を高める目的で、不溶性担体に上記物質が結合していない非吸着面に対して、測定系に影響しない物質でブロッキング処理することが好ましい。測定系に影響しない物質としては、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン等の蛋白質及びTween 20、NP-40等の界面活性剤等が例示される。

本発明のサンドイッチ免疫測定系キットに用いる標識としては、ペルオキシダーゼ、特に、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、オキシダーゼ及びウリカーゼ等の酵素、アクリジニウム若しくはその誘導体、またはエクオリン若しくはその改変体等の化学発光物質、FITCまたはユウロピウム(Eu)若しくはサマリウム(Sm)等のランタノイド等の蛍光物質、色素、金コロイド、着色ラテックス、あるいはアイソトープが挙げられる。

例えば酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合は、発色基質として3,3',5,5'-テトラベンジジンまたは1,2-フェニレンジアミン等が、アルカリフォスファターゼを用いる場合は、発色基質として4-ニトロフェニルフォスフェート等が、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は、発色基質として2-ニトロフェニル $\beta$ -D-ガラクトシド等が例示される。

抗体、第二の結合物質、第二の特異結合物質若しくはそのパートナー、または抗イムノグロブリン抗体への酵素標識は、二段階グルタルアルデヒド法、過ヨード酸法、マレイミド法、ピリジル $\cdot$ ジスルフィド法等により行うことができる。酵素以外の標識についても熱吸着法、化学結合法等の公知の技術を利用して行うことができる。

酵素標識は、上記に例示される様な発色基質を用いれば、通常の吸光度測定系を用いて測定でき、また感度も比較的高く好ましい。化学発光物質、蛍光物質、着色標識若しくはアイソトープを標識として用いる場合は、その標識に応じた測定機器により測定できる。また、Eu、例えばクリプテート(Eu<sup>3+</sup>クリプテート)等の蛍光物質を用いる場合は、第二の標識としてXL665等のアロフィコシアニン誘導体を用いて、蛍光共鳴エネルギー転移を測定することもできる。また、簡易な測定キット、例えイムノクロマト法、フロースルー法を利用したキットに用いる標識は、色素、金コロイド若しくは着色ラテックスが視覚的にも観察可能であるので好ましい。凝集法で不溶性担体として用いられる粒子としては、ラテックス、赤血球(例えば羊赤血球)、ゼラチン、マイクロビーズまたはカーボン粒子等、一般に用いられている粒子を使用することができる。

#### 【0021】

本発明の測定試薬又はキットは、1以上のGPVI特異的結合物質以外に任意の構成成分又は構成要素を含有してもよい。例えば、測定試薬又はキットの任意の構成成分として、安定化剤、賦形剤又は保存剤等の添加剤、また、キットの任意の構成要素として、標準物質、検体若しくは標識抗体等の緩衝液若しくは希釈剤、標識抗体に酵素が使われる場合の酵素に適した発色基質、ブロッキング剤、反応停止剤または洗浄剤等が例示される。希釈剤は、特に限定はないが、検体に含まれる物質を含む希釈剤が好ましい。検体が血清であり、その血清を入手するための採血をEDTAやクエン酸存在下で行われた場合、希釈剤としても同量のEDTAやクエン酸が存在することが好ましい。例えば、希釈剤中にEDTAを0.2~1mg/ml含むことが好ましい。標準物質としては、生体試料から調製したGPVI、特に、sGPVIもしくはmGPVI、又は、遺伝子工学的に調製した組換えGPVI、特に、sGPVI、mGPVI、GPVI細胞外ドメインもしくはGPVI細胞外ドメインとイムノグロブリンのFc断片との融合蛋白質(GPVI-Fc)等である。これらは公知の方法で調整しうる。

本発明の測定試薬又はキットは、以下の診断方法等において特に有用である。

#### 【0022】

後述の実施例で示されるように、sGPVI又はmGPVIは生体内及び生体外における種々の血小板刺激による影響、特に血小板の活性化に伴って変動、特に量的な変動を示

すことから、生体内における血小板の活性化、特にG P V Iを介した活性化の状態を推定するバイオマーカー、すなわち、血小板活性化マーカーとして利用しうる。

具体的には、例えば、生体試料中のs G P V Iが高値である場合、生体内で何らかの原因、特に、G P V Iを介した機序により血小板の活性化が惹起されていることが推定される。また、例えば、血小板のm G P V Iが高値である場合、生体内における血小板刺激、特に、G P V Iを介した刺激に対して血小板が活性化されやすい状態にあることが推定される。これらの原因、機序又は刺激としては、血管内皮傷害による血管内皮下のコラーゲンの露出等が挙げられる。

すなわち、本発明は、可溶型G P V I ( s G P V I ) 又は血小板膜上に存在するG P V I ( m G P V I ) からなる血小板活性化マーカー、血小板活性化マーカーとしてのs G P V I 又はm G P V I の使用を提供する。

10

#### 【 0 0 2 3 】

また、s G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量することにより、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断等を行なうことができる。すなわち、本発明は、

試料中のs G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定又は定量するための方法、又はそれらの判定方法もしくは評価方法（本発明の第5の態様）、

試料中のs G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断方法、罹病性の判定方法又は発症リスクの評価方法（本発明の第6の態様）、

20

試料中のs G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、抗血小板薬、好ましくはコラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を抑制する抗血小板薬、より好ましくは抗G P V I 抗体が奏効する患者の選別方法（本発明の第7の態様）、

試料中のs G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、上記の薬剤の投与（開始）時期を決定する方法（本発明の第8の態様）、

試料中のs G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量する工程を含む、上記の薬剤の治療効果もしくは副作用発現の予測方法、モニタリング方法又は予後の判定方法（本発明の第9の態様）、

1以上のG P V I 特異的結合物質を含有する、前記本発明の第5ないし9の態様の方法のいずれかのための試薬又はキット（本発明の第10の態様）、

30

#### 【 0 0 2 4 】

上記本発明の第5～9の態様の方法は、少なくとも試料、特に生体試料中のs G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量する工程を含むが、これは、少なくとも、試料と1以上のG P V I 特異的結合物質を接触させる工程を含む。試料中のs G P V I 又はm G P V I の検出、測定又は定量は、本発明の測定方法、測定試薬又はキットを用いて、上記本発明の第1及び2の態様の記載に準じて行なうことができる。

#### 【 0 0 2 5 】

試料が任意の疾患の患者又は疾患の恐れのある個体由来である場合、健常人の測定値との比較、発症前後の測定値との比較、もしくは、治療、特に抗血小板薬等の薬剤による治療の前後の測定値の比較を行なう工程を伴うことができる。例えば、予め複数の正常人の測定結果を求めておき、その測定結果の平均値若しくは範囲をとる等により標準化した正常人の値または正常人の値の範囲を、正常人の標準値として、測定した値と比較する工程である。例えば、正常人の平均値+2SDまたは3SDをカットオフ値として正常人の標準値を求めればよい。また、予め疾患、例えば、血栓症患者の基準値を求めておいて、測定した値と比較する工程を行ってもよい。この工程を正常人の標準値と比較する工程の代わりに行ってもよい。これらの測定及び又は測定値の比較を行なうことで、上記した本発明第5～9の態様の方法を効率的に実施することができる。

40

#### 【 0 0 2 6 】

本発明において、前記血小板の活性化は、必ずしも限定されないが、好ましくは血小板

50

アゴニスト、より好ましくは、G P V I 特異的アゴニストによるものである。当該血小板アゴニストとしては、コラーゲン、特に、血管内皮障害に伴う血管内皮下に存在するコラーゲンが挙げられ、その他に、血小板活性化作用を有する抗G P V I 抗体、C R P 及びc o n v u l x i n 等が挙げられる。

【0027】

本発明において、血小板活性化もしくは血管内皮傷害と関連する疾患は、血小板の活性化もしくは凝集、特にコラーゲンによる血小板の活性化もしくは凝集、血管内皮傷害、又は、動脈硬化性の反応に起因する、又はそれらを伴う疾病及び血液凝固系の異常、例えば、血液凝固系の亢進に起因するもしくはそれを伴う疾患を含む。特に、血栓もしくは塞栓又は動脈硬化に起因する又はそれらを伴う疾患、すなわち、血栓性もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、例えば、血栓症及び塞栓症ならびに動脈硬化症等である。これらの疾患には、動脈性血栓症のみならず、静脈性血栓症も含まれ、また、心房細動に起因する脳梗塞も含まれる。

具体的には、狭心症、心筋梗塞、血栓溶解療法時、経皮的冠動脈内腔拡張術施行時、ステント施行時、バイパス手術施行時もしくは人工血管施行時の、またはこれらの後の血管内皮肥厚、血管再狭窄、狭心症もしくは心筋梗塞、等が挙げられる。さらに、心房細動もしくは心房粗動及びこれらに起因する血栓症、塞栓症、特に脳梗塞、等が挙げられる。その他、閉塞性血栓性血管炎、急性動脈閉塞症、閉塞性動脈硬化症または深部静脈血栓症等があり、脳梗塞（アテローム性血栓性梗塞、ラクナ梗塞、心原性梗塞）、一過性脳虚血発作、くも膜下出血後の脳血管攣縮、肺血栓、肺塞栓症、血管性紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、播種性血管内凝固症候群、血液体外循環時（血液透析）の血液凝固防止、全身性エリテマトーデス、多発性動脈炎、抗リン脂質抗体症候群、紫斑病性腎炎、糖尿病に伴う内皮細胞傷害、糖尿病性腎炎、糖尿病性網膜症、腎塞栓、移植治療に伴う合併症（肝静脈閉塞症、移植片対宿主病）等が挙げられる。好ましくは、血栓性もしくは塞栓性疾患又は動脈硬化性疾患、例えば、血栓症もしくは塞栓症又は動脈硬化症、より好ましくは、狭心症、心筋梗塞、心臓病、脳梗塞又は痴呆である。

本発明の測定方法、測定試薬又はキットを用いて、試料中のG P V I、特に生体試料中のs G P V I 又はm G P V I を測定することにより、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定又は定量、判定もしくは評価、又は、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断、罹病性の判定もしくは発症リスクの評価が可能である。それらの実施においては、健常人の測定値との比較、発症前後の測定値との比較、又は、治療、特に抗血小板薬等の薬剤による治療の前後の測定値の比較を行なう工程を伴うことが好ましい。

本発明において、抗血小板薬は必ずしも限定されず、公知の薬剤が挙げられ、例えば、アスピリン、チクロピジン、G P I I b / I I I a アンタゴニスト等が挙げられる。また、コラーゲン惹起血小板活性化又は凝集を特異的に抑制する抗血小板薬としては、種々のものが適用可能である。例えば、コラーゲンに対する抗体、コラーゲンペプチド、その断片及び誘導体（例えば、W O 9 9 / 5 0 2 8 1 等参照）、G P V I、その断片もしくはそれらの誘導体、例えば、G P V I - F c（例えば、W O 0 1 / 8 1 0、W O 0 3 / 1 0 4 2 8 2 等参照）などが挙げられる。好ましくは、抗G P V I 抗体またはG P V I - F c、より好ましくは抗G P V I 抗体である。抗G P V I 抗体としては、公知の抗G P V I 抗体、例えば、マウス抗ヒトG P V I モノクローナル抗体（W O 0 1 / 8 1 0、W O 0 2 / 8 0 9 6 8、W O 2 0 0 5 / 1 1 1 0 8 3 等参照）、ラット抗マウスG P V I モノクローナル抗体（N i e s w a n d t e t a l .）、ラット抗ヒトG P V I モノクローナル抗体h G P 5 C 4（W O 2 0 0 5 / 5 4 2 9 4 等参照）、ヒト一本鎖抗体（s c F v）（W O 0 1 / 8 1 0、W O 0 3 / 5 4 0 2 0 等参照）及びヒト抗ヒトG P V I モノクローナル抗体（W O 0 5 / 7 8 0 0）を使用しうる。好ましくは、コラーゲン惹起血小板凝集を抑制する抗体、G P V I 消失作用を有する抗体、G P V I のループ9を認識する抗体が挙げられる。具体例としては、本願実施例に示された抗体ならびにW O 2 0 0 6 / 1 1 7 9 1 0 及びW O 2 0 0 6 / 1 1 8 3 5 0 の実施例に記載された抗体等が挙げられる。

本発明の測定方法等により試料中のs G P V I 又はm G P V I を検出、測定又は定量す

ることで、これらの薬剤の奏効する患者の選別、それらの投与（開始）時期の決定、及び、それらの治療効果もしくは副作用発現の予測、モニタリングもしくは予後の判定等が可能となる。それらの実施においては、健常人の測定値との比較、または、治療、特に抗血小板薬等の薬剤による治療の前後の測定値の比較を行なう工程を伴うことが好ましい。

【0028】

心筋梗塞や脳梗塞の2次予防や、糖尿病に伴う末梢動脈閉塞症において血漿中および/あるいは尿中の可溶性GPVIを測定し、高値を示した患者を選別し、このような患者に抗GPVI抗体あるいは可溶性GPVI-Fcを投与すると、患者を選別しなかった場合に比べ、高い有効率を示すと予想される。すなわち、血中および/あるいは尿中の可溶性GPVI量を測定することにより、心筋梗塞、脳梗塞および末梢動脈閉塞症、等の血栓症の高リスク患者を選別すること、さらには抗GPVI抗体や可溶性GPVI-Fcが有効である患者を選別することができる。

10

【0029】

PCI施行後に血漿中および/あるいは尿中の可溶性GPVI量を測定する。可溶性GPVI量が高値を示している期間、抗血小板療法を継続した場合と継続しなかった場合を比較すると、継続した方がしなかった場合に比べ心血管イベントの発症率は低いと予想される。すなわち、血漿中および/あるいは尿中の可溶性GPVI量を測定することにより、血栓症発症リスクを評価し、抗血小板薬の投薬期間を決めることができる。

【実施例】

【0030】

以下の実施例により本発明を更に詳述するが、本発明はこれら実施例に限定して理解されるべきものではない。

20

[実施例1]

【0031】

ラットGPVI遺伝子のクローニング

まず、公知であるマウスGPVI遺伝子の情報を基に、マウスGPVI遺伝子の各エクソンをそれぞれ増幅可能なプライマー（6対）を設計した。これらを用いて、ラットゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、特異的に増幅された遺伝子断片をシークエンスし、つなぎあわせることで、ラットGPVI遺伝子配列を推定した。次に、この配列情報に基づいてラットGPVI用プライマー（ratGPVI-a, mGPVI-d）を再設計し、ラット骨髓由来cDNA（ラット骨髓由来RNAを、オリゴdTプライマーを用いて逆転写して合成）を鋳型としたPCRで、ラットGPVI全長遺伝子を増幅した。増幅産物をゲルから抽出し、pT7-Blue（T）ベクター（タカラバイオ）にTAクローニングした後、塩基配列を決定した。推定した配列と同じことを確認し、このプラスミドをpTK-2478とした。図1にラットGPVI遺伝子の塩基配列を示す。

30

【0032】

## 【表 1】

表 1

第 1 エクソン	rat GPVI-a	CCCTCAGGGCATCCTGTTCTAT (配列番号 1)
	rat GPVI-c	TTTCCCAGGTCACCTTCAGGACT (配列番号 2)
第 2、3 エクソン	rat GPVI-f	TTAAGGGAGTCTCTAGCCTCTG (配列番号 3)
	mGPVI-g	GTTTAGCATACACACCTGTAGCAATTAGCT (配列番号 4)
第 4 エクソン	rat GPVI-j	CCTGTTTCCGTCTTTAATAGAG (配列番号 5)
	rat GPVI-l	CCTTGCCACACCTCTGACTCC (配列番号 6)
第 5 エクソン	rat GPVI-m	GTGAGAAAATCAAGTCACAGAAATG (配列番号 7)
	rat GPVI-o	TTCAGACACATTTGTAGTAGAAC (配列番号 8)
第 6 エクソン	rat GPVI-r	GGAGCACTGGGATGAACTGTCA (配列番号 9)
	rat GPVI-s	GAGAAACCCATCCTCTTGCCAC (配列番号 10)
第 7 エクソン	rat GPVI-v	GCTTCACAAGCATATGAGCACGTG (配列番号 11)
	rat GPVI-w	ATTATAGCTCTATAGATTCCATG (配列番号 12)
全長	rat GPVI-#a	GGGAATTCCATGTCTCCAGCCTCACTC (配列番号 13)
	mGPVI-d	CCAAGTATTCTAGGCCAGTGG (配列番号 14)

## 【実施例 2】

## 【0033】

20

ラット GPVI (D1D2) マウス GPVI (D3) - マウス Fc 融合蛋白質 (rGPVI - mFc) 発現プラスミドの構築

pTK-2478 を鋳型とし、プライマー対 (rat GPVI-a および rat GPVI-t) で PCR を行うことで、ラット GPVI の D1 および D2 (GPVI の細胞外領域のドメイン 1 およびドメイン 2) をコードする遺伝子断片 A を増幅した。同様に、pTK-2440 (WO2006/117910 及び WO2006/118350 に記載) を鋳型とし、プライマー対 (rat GPVI-s および IgG1-i) で PCR を行うことで、マウス GPVI の D3 (GPVI の細胞外ドメインで、D1 および D2 以外の領域) をコードする遺伝子断片 B を増幅した。次に A および B を混合して鋳型とし、プライマー対 (rat GPVI-a および IgG1-i) で再度 PCR を行うことで、ラット GPVI (D1 および D2) とマウス GPVI (D3) が連結された遺伝子断片 C を得た。この断片 C の 5' 側を EcoRI、3' 側を BamHI で切断後、マウス Fc 領域 (mFc) を EF プロモーターの下流に有するプラスミド (pTK-2299 : WO2006/117910 及び WO2006/118350 に記載) の EcoRI および BamHI 部位に挿入することで、ラット GPVI - mFc 融合蛋白質を発現可能な pTK-2483 を構築した。

30

## 【0034】

## 【表 2】

表 2

IgG1-i	CCAGGAGTTCAGGTGCTGGGCACGGTGGGC (配列番号 15)
rat GPVI-#s	GTGGTTACTGGACCCTCTGCCACTCCCAGC (配列番号 16)
rat GPVI-#t	GCTGGGAGTGGCAGAGGGTCCAGTAACCAC (配列番号 17)

## 【0035】

なお、mFc をヒト Fc 領域 (hFc) に置き換えたラット GPVI - hFc (rGPVI - hFc)、マウス GPVI - hFc (mGPVI - hFc)、ヒト GPVI - hF

50

c ( h G P V I - h F c )、r G P V I - h L 2 , 5 - h F c ( ラット G P V I - h F c のループ 2、5 をヒト G P V I の対応する配列で置換した G P V I 変異体蛋白質)、r G P V I - h L 9 , 1 1 - h F c ( ラット G P V I - h F c のループ 9、1 1 をヒト G P V I の対応する配列で置換した G P V I 変異体蛋白質)、h G P V I - m L 2 - h F c ( ヒト G P V I - h F c のループ 2 をマウス G P V I の対応する配列に置換した G P V I 変異体蛋白質) 及び h G P V I - m L 9 - h F c ( ヒト G P V I - h F c のループ 9 をマウス G P V I の対応する配列に置換した G P V I 変異体蛋白質) の各発現プラスミドを、公知のヒト G P V I 及びマウス G P V I の配列、図 1 のラット G P V I の配列ならびにヒト及びラット G P V I のアミノ酸配列のアラインメント ( 図 2 ) 又はヒト及びマウス G P V I のアミノ酸配列のアラインメント ( 図 3 ) に示された各ループのアミノ酸配列に基づいて、公知の方法 ( W O 0 1 / 8 1 0、W O 0 3 / 5 4 0 2 0、W O 2 0 0 5 / 7 8 0 0 等参照) を参考に、実施例 2 と同様の手法で作製した。

10

[ 実施例 3 ]

【 0 0 3 6 】

#### r G P V I - m F c 融合蛋白質の発現および精製

C O S - 1 細胞は 1 0 % 牛胎児血清入りのダルベッコ M E M 培地で継代した。無血清のダルベッコ M E M 培地にトランスフェクション試薬 ( F u G E N E 6、ロシュダイアグノスティックス) を混和後、p T K - 2 4 8 3 を適量混和し、H y b r i d o m a - S F M 培地 ( G I B C O ) に培地交換した C O S - 1 細胞に添加した。3 7 ° C、5 % C O 2 存在下で、3 日間培養後上清を回収し、新たな培地でさらに 3 日間培養し、それらの上清をプロテイン A カラム ( P r o s e p - v A、M I L L I P O R E ) にて精製したものを抗ラット G P V I 抗体作製用の抗原とした。得られた r G P V I - m F c 融合蛋白質を定法にて S D S - P A G E で解析した。すなわち、5 - 2 0 % のグラジエントゲルにサンプルと分子量マーカー ( B i o - R a d、P r e c i s i o n P l u s P r o t e i n U n s t a i n e d S t a n d a r d ) をアプライし、電気泳動した後、銀染色した ( 図 4 )。

20

なお、r G P V I - h F c 融合蛋白質、m G P V I - h F c 融合蛋白質、h G P V I - h F c 融合蛋白質、r G P V I - h L 2 , 5 - h F c 変異体蛋白質、r G P V I - h L 9 , 1 1 - h F c 変異体蛋白質および h G P V I - m L 9 - h F c 変異体蛋白質も同様に発現及び精製した。

30

[ 実施例 4 ]

【 0 0 3 7 】

#### 抗ラット G P V I モノクローナル抗体の作製

A l u m ( P I E R C E ) 1 2 . 5 μ L と C p G アジュバント 1 m g と精製ラット G P V I - m F c 融合蛋白質 2 0 μ g を混合し、1 0 0 μ L とした投与抗原を d d Y マウス ( メス、8 週令、S L C ) の両足のフットパッド内にマイクロシリンジを用いて、それぞれ 5 0 μ L 投与した。1 1 日後、投与抗原 2 0 μ g を 5 0 μ L の生理食塩水で希釈し、フットパッド内に各 2 5 μ L ずつ投与した。3 日後、腸骨リンパ節よりリンパ球を分離し、得られたリンパ球を P 3 × 6 3 - A g . 8 . U 1 ( A T T C ) と混合した後、ポリエチレングリコールを用いて安東民衛・千葉丈ノ著「単クローン抗体実験操作入門」( 講談社) にしたがって細胞融合を行った。H A T 培地によりハイブリドーマを選択し、1 週間後、目的の抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングした。すなわち、0 . 0 7 6 M リン酸緩衝液 ( p H 7 . 4 ) ( 以下 P B S と記載) で精製ラット G P V I - h F c 融合蛋白質を 3 μ g / m L に希釈し、イムノプレート ( M a x i s o r p、N U N C ) に 5 0 μ L / ウエル添加した。4 ° C で O v e r N i g h t 反応後、イオン交換水で 3 回洗浄し、2 % S t a b i l g u r d を含む P B S を各ウエルに 1 0 0 μ L 添加しブロッキングを行った。次に培養上清を各ウエルに添加し、3 7 ° C で 1 時間反応させた後、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む生理食塩水で 3 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体 ( D A K O ) を、1 0 % ウサギ血清を含む P B S で 1 0 0 0 倍に希釈し、各ウエルに 5 0 μ L 添加した。3 7 ° C で 1 時間反応後、同様に 5 回洗浄し T M B 溶液 ( B

40

50

i o F i x ) を各ウエルに添加した。室温で 10 分間反応後、0.5 M 硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 ( N J - 2 1 0 0 、日本インターメッド ) で 4 5 0 n m の吸光度を測定した。精製ラット G P V I - h F c 融合蛋白質と反応した細胞を選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。11 日後、同様にスクリーニングを行い、精製ラット G P V I - h F c 融合蛋白質と反応する抗体を産生するハイブリドーマを 17 クローン取得した ( 表 3 ) 。

【 0 0 3 8 】

【 表 3 】

表 3

Sample		固相抗原	
		Rat GPVI	Human GPVI
Sample	F1239-1-3	2.288	0.019
	F1239-2-3	2.953	0.015
	F1239-4-2	0.843	0.026
	F1239-5-3	2.259	0.021
	F1239-6-1	2.272	0.032
	F1239-7-1	2.872	0.013
	F1239-8-1	1.344	0.013
	F1239-9-1	2.284	0.028
	F1239-10-2	2.061	0.021
	F1239-11-1	1.372	0.014
	F1239-15-3	1.552	0.023
	F1239-16-3	1.224	0.017
	F1239-17-2	1.502	0.014
	F1239-18-1	1.098	0.015
	F1239-19-1	2.93	0.017
	F1239-22-3	1.956	0.024
F1239-23-1	2.668	0.021	
Control	Anti IgG	2.944	2.84
	Normal Mouse IgG	0.123	0.026
	F1232-37-2	0.137	2.757

【 実施例 5 】

【 0 0 3 9 】

#### ハイブリドーマが産生する抗体の調製

以後の操作は特に記載が無い限り 4 にて実施した。マウスハイブリドーマ培養液を、プレフィルターとして 1 μ m の孔径を有するカプセルカートリッジフィルター ( 東洋濾紙株式会社 ) 、本フィルターとして 0.22 μ m の孔径を有するフルオロダイニフィルター ( P A L L ) およびミリパック 2 0 0 ( M I L L I P O R E ) をそれぞれ用い、室温にて清澄化し培養上清を得た。この培養上清を予め P B S - ( S i g m a ) にて平衡化したプロテイン A ( r m p P r o t e i n A S e p h a r o s e F a s t F l o w 、 G E H e a l t h c a r e バイオサイエンス ) に吸着させ、非吸着蛋白質を P B S - にて洗浄後、非特異的に吸着している蛋白質を 10 × P B S - ( S i g m a ) にて溶出した

。その後、プロテインAに結合している抗体を、100 mMグリシン - 塩酸バッファー (pH 3.0) にて溶出した。溶出液の容量を測定し、直ちに1/10容量の2M Tris - HCl (pH 8.5) を添加し、pHを中性に戻し精製抗体溶液とした。この精製抗体溶液を、攪拌式セルを用いて、分子量カット30,000のバイオマックスPB限外濾過膜 (MILLIPORE) により濃縮した後、生理食塩液 (大塚生食注、大塚製薬工場) に対して透析し、最終的な精製抗体溶液とした。得られた抗体を定法にてSDS-PAGEで解析した。すなわち、5-20%のグラジエントゲルにサンプルと分子量マーカー (Bio-Rad、Precision Plus Protein Unstained Standard) をアプライし、電気泳動した後、銀染色した (図5)。なお、以下の実施例では、全て、同様の方法で精製した抗体を使用した。

10

[ 実施例 6 ]

【 0040 】

#### 抗ラットGPV I抗体の認識領域

実施例4で得られた抗ラットGPV Iモノクローナル抗体の認識ドメインの解析を行った。すなわちPBSで精製rGPV I-hFc融合蛋白質を2µg/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) に50µL/ウエル添加した。37で1時間反応後、イオン交換水で5回洗浄し、2% Stabligurdを含むPBSを各ウエルに100µL添加しブロッキングした。次に実施例5で精製したモノクローナル抗体を各種濃度に調製しポリプロピレンプレート (NUNC) に50µL/ウエルで添加し、さらに実施例3で得られたrGPV I-hFc融合蛋白質、hGPV I-hFc融合蛋白質、rGPV I-hL2, 5-hFc改変体蛋白質、rGPV I-hL9, 11-hFc改変体蛋白質をそれぞれ50µL/ウエルで添加し混合した。本混合サンプルをrGPV I-hFc融合蛋白質で固相した上記のイムノプレートに50µL/ウエルで添加し、37で1時間反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で5回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗マウスカッパ鎖抗体 (Rockland) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し、各ウエルに50µL添加した。37で1時間反応後、同様に5回洗浄しTMB溶液 (BioFix) を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で450nmの吸光度を測定した。その結果、rGPV I-hL2, 5-hFc改変体蛋白質を添加した時に吸光度が低下しない抗体、つまりはループ2及び/又はループ5を認識している抗体が1種類 (F1239-11-1)、またrGPV I-hL9, 11-hFc改変体蛋白質を添加した時に吸光度が低下しない抗体、つまりはループ9及び/又はループ11を認識している抗体が3種類 (F1239-4-2、F1239-6-1、F1239-22-2) 存在する事が示された (図6)。なお、上記の3種類の抗体 (F1239-4-2、F1239-6-1、F1239-22-2) は、同様の方法においてマウスGPV I-hFc融合蛋白質とは結合しなかった。さらに、ラットGPV IとマウスGPV Iのループ11のアミノ酸配列は同一であることを併せて考察すると、ループ11が重要な認識領域とは考えにくく、上記の抗体は少なくともラットGPV Iのループ9の一部を含有する構造を認識していると推定される。

20

30

[ 実施例 7 ]

【 0041 】

#### ラット可溶性GPV IのELISA法による測定

実施例4にて作製したマウス抗ラットGPV I抗体を用いてサンドイッチELISA系を構築した。すなわちPBSで精製F1239-6-1抗体を10µg/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) に75µL/ウエルで添加した。4でOver Nightで反応した後、イオン交換水で5回洗浄し、5% Stabligurd、0.1% Tween 20を含むPBSを各ウエルに200µL添加しブロッキングした。次にサンプル及びスタンダードとして用いる組換えrGPV I-hFc融合蛋白質を0.1% BSA、0.3M塩化ナトリウム、0.05% Tween 20/PBSを用いて希釈した。また、測定サンプルとして血漿を用いる場合は5倍以上で希釈

40

50

し、それぞれ50 $\mu$ L/ウエルで添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間攪拌しながら反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で5回洗浄した。Biotin標識したF1239-7-1 F(ab')<sub>2</sub>抗体を20% Poly-HRP DILUENT (Fitzgerald)、0.3M塩化ナトリウム、0.05% Tween 20を含んだPBSにて希釈し、各ウエルに50 $\mu$ L添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌しながら反応させた後、同様に5回洗浄した。次いでPOLY-HRP80-Streptavidin (Fitzgerald)を20% Poly-HRP DILUENT、0.05% Tween 20を含むPBSにて希釈し、各ウエルに50 $\mu$ L添加した。37 $^{\circ}$ Cで30分攪拌させながら反応させた後、同様の方法で6回洗浄し、TMB溶液 (BioFix)を各ウエルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。図7にrGPVI-hFc融合蛋白質を標準品として用いて作成した標準曲線を示す。

10

[実施例8]

【0042】

#### ヒト可溶性GPVIのELISA法による測定

マウス抗ヒトGPVI抗体を用いてサンドイッチELISA系を構築した。すなわちPBSで精製F1232-7-1抗体を10 $\mu$ g/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb、NUNC)に75 $\mu$ L/ウエル添加した。4 $^{\circ}$ CでOver Nightで反応後、イオン交換水で5回洗浄し、5% Stabligurd、0.1% Tween 20を含むPBSを各ウエルに200 $\mu$ L添加しブロッキングした。次にサンプル及びスタンダードとして用いる組換えhGPVI-hFc融合蛋白質を0.1% BSA、0.3M塩化ナトリウム、0.05% Tween 20/PBSを用いて希釈した。また測定サンプルとして血漿を用いる場合は5倍以上で希釈し、それぞれ50 $\mu$ L/ウエルで添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間攪拌させながら反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で5回洗浄した。Biotin標識したF1232-10-2 F(ab')<sub>2</sub>抗体を20% Poly-HRP DILUENT (Fitzgerald)、0.3M塩化ナトリウム、0.05% Tween 20を含んだPBSにて希釈し、各ウエルに50 $\mu$ L添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間、攪拌しながら反応させた後、同様に5回洗浄した。次いでPOLY-HRP80-Streptavidin (Fitzgerald)を20% Poly-HRP DILUENT、0.05% Tween 20を含んだPBSにて希釈し、各ウエルに50 $\mu$ L添加した。37 $^{\circ}$ Cで30分間、攪拌しながら反応させた後、同様の方法で6回洗浄し、TMB溶液 (BioFix)を各ウエルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。図8にhGPVI-hFc融合蛋白質を標準品として用いて作成した標準曲線を示す。本系では3pg/mLの標準品において約40mAbsの吸光度の差が得られ、測定感度は少なくとも3pg/mL以下であった。

20

30

[実施例9]

【0043】

#### ラットPRPの調製およびconvulxin、CRPあるいはADPによる血小板刺激

正常ラットから採血したクエン酸加血を110 $\times$ g、25、15分間遠心分離することにより多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP)を得た。引き続き、PRPにACD-A (acid-citrate-dextrose)を添加し、pH6.5に調整した後、830 $\times$ g、25 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離することにより血小板を回収した。回収した血小板にACD-AでpH6.5に調整したHEPES Buffer (137mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、5.5mM Glucose、3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM HEPES、1mg/mL BSA)を添加して2回洗浄した。洗浄後、HEPES Buffer (pH7.3)を添加して血小板を懸濁し、洗浄血小板とした。CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>を1mMとなるように添加した洗浄血小

40

50

板にconvulxin (ALEXIS)、CRP (ペプチド合成品)あるいはADPを添加し、室温において1時間反応させ血小板を刺激した。25mM EDTAを含むProtease Inhibitor Cocktail溶液を添加して反応を終了した後、18,000×g、25で1分間遠心分離し、上清画分および血小板画分を回収した。

[実施例10]

【0044】

ラット血小板GPVI発現のフローサイトメトリーによる測定

実施例9に示した方法で、洗浄血小板をconvulxin、CRPあるいはADPで刺激した。対照として洗浄血小板にバッファーのみを添加し、室温において1時間静置した。25mM EDTAを含むProtease Inhibitor Cocktail溶液を添加して反応を終了した後、0.5% 非働化FBSならびに2.5mM EDTAを含むPBS (以下、FACSバッファー)で洗浄後、蛍光色素R-Phycoerythrin (以下、PE)で標識したマウス抗ラットGPVI抗体F1239-11-1を $3 \times 10^5$ 個の血小板に対して0.5μg相当添加して室温、遮光下で30分静置した。PE標識F1239-11-1のアイソタイプ対照として、PE標識マウスIgG2a抗体を同量添加した試料も併せて調製した。30分後、FACSバッファーで血小板を洗浄後、フローサイトメーターCYTOMICS FC500 (BECKMAN COULTER)で血小板の蛍光強度を測定することにより血小板膜表面上のGPVI発現量について解析した。なお、GPVI発現量は、PE標識F1239-11-1検出結果値からPE標識マウスIgG2a抗体検出結果値を差し引いて算出した。図9に結果を示す。Convulxin (CVX)およびCRP刺激血小板ではバッファーのみを添加した血小板と比較して、顕著なGPVI発現量の減少が認められた、ADP刺激血小板ではGPVI発現量の低下は認められなかった。

10

20

[実施例11]

【0045】

ラットPRPの可溶型GPVI量のELISAによる測定

実施例9に示した方法で、洗浄血小板をconvulxin、CRPあるいはADPで刺激した後、上清画分を回収した。さらに、実施例7の方法により、上清中の可溶型GPVI量を測定した。図10に結果を示す。ConvulxinおよびCRPで刺激した血小板の上清中において、顕著な可溶型GPVI量の上昇が認められた。一方、ADPで刺激した血小板の上清中における可溶型GPVI量の上昇は微弱であった。

30

[実施例12]

【0046】

サルPRPの調製およびConvulxin、CRPあるいはADPによる血小板刺激

正常サルから採血したクエン酸加血を115×g、25、15分間遠心分離することにより多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP)を得た。引き続き、PRPにACD-A (acid-citrate-dextrose)を添加し、pH6.5に調整した後、830×g、25で10分間遠心分離することにより血小板を回収した。回収した血小板にACD-AでpH6.5に調整したHEPES Buffer (137mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、5.5mM Glucose、3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM HEPES、1mg/mL BSA)を添加して2回洗浄した。洗浄後、HEPES Buffer (pH7.3)を添加して血小板を懸濁し、洗浄血小板とした。CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>を1mMとなるように添加した洗浄血小板にconvulxin (ALEXIS)、CRP (ペプチド合成品)あるいはADPを添加し、室温において1時間反応させ血小板を刺激した。25mM EDTAを含むProtease Inhibitor Cocktail溶液を添加して反応を終了した後、18,000×g、25で1分間遠心分離し、上清および血小板画分を回収した。

40

[実施例13]

【0047】

50

サル血小板GPVI発現のフローサイトメーターによる測定

実施例12に示した方法で、洗浄血小板をconvulxin、CRPあるいはADPで刺激した。対照として洗浄血小板にバッファーのみを添加し、室温において1時間静置した。25mM EDTAを含むProtease Inhibitor Cocktail溶液を添加して反応を終了した後、FACSバッファーで洗浄後、蛍光色素PEで標識したキメラ抗ヒトGPVI抗体F1232-37-2あるいはキメラ抗ヒトGPVI抗体F1232-10-1を $4 \times 10^5$ 個の血小板に対して $1 \mu\text{g}$ 相当添加して室温、遮光下で30分静置した。PE標識キメラF1232-37-2およびPE標識キメラF1232-10-1のアイソタイプ対照としてPE標識ヒトIgG4抗体を同量添加した試料も併せて調製した。30分後、FACSバッファーで血小板を希釈後、フローサイトメーターCYTOMICS FC500 (BECKMAN COULTER)で血小板の蛍光強度を測定することにより血小板膜表面上のGPVI発現量について解析した。なお、GPVI発現量は、PE標識キメラF1232-37-2あるいはPE標識キメラF1232-10-1検出結果値からPE標識ヒトIgG4抗体検出結果値を差し引いて算出した。結果を図11に示す。ConvulxinおよびCRP刺激血小板ではバッファーのみを添加した血小板と比較して、GPVI発現量の減少が認められたが、ADP刺激血小板ではGPVI発現量の低下は認められなかった。

10

[実施例14]

【0048】

サル血小板GPVI量のウエスタンブロッティングによる測定

実施例12に示した方法で、洗浄血小板をconvulxin、CRPあるいはADPで刺激した後、上清画分および血小板画分を回収し、上清画分に含まれる可溶性GPVIおよび血小板画分に含まれるGPVI(以下、血小板GPVI)をWestern Blotting法により検出した。すなわち上清画分 $12 \mu\text{L}$ に $\times 4$  Sample Buffer (+ mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Roche)、Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIERCE))を $4 \mu\text{L}$ 添加した。血小板画分は $1.9 \times 10^6$ 個血小板相当/ $\mu\text{L}$ となるように $\times 1$  Sample Buffer (+ mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Roche)、Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIERCE))を添加し、99で5分間熱処理した。熱処理したサンプルを5-20%の濃度勾配ポリアクリルアミドゲル(ATTO)に、1レーンあたり上清画分は全量、血小板画分は $16 \mu\text{L}$ アプライした後に、ゲル一枚につき定電流30mAで通電し電気泳動した。ブロッティングは常法に従い、セミドライ法により低蛍光のメンブレン(Immobilon-FL PVDF、MILLIPORE)に転写した。ブロッティング後、Block Ace (大日本製薬株式会社)を用いて4で一晩ブロッティングした。さらに、10% Block Ace / 0.1% Tween 20を含むPBS (TPBS)で希釈した一次抗体(ヒトGPVI合成ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体)を添加し、室温で1時間、反応させた。TPBSで洗浄した後、10% Block Ace / TPBSで希釈した二次抗体(Anti-Rabbit Igs HRP)を添加し、室温で30分間反応させた。TPBSで洗浄した後、ECL Plus (Amersham Biosciences)およびTyphoon9410 (Amersham Biosciences)を用いて可溶性GPVIおよび血小板GPVIの検出を行なった。結果を図12に示す。ConvulxinおよびCRPで刺激した血小板では、顕著な血小板GPVIの減少が認められた。また、ConvulxinおよびCRPで刺激した血小板では著明な可溶性GPVIの上昇が認められた。一方ADPで刺激した血小板では血小板GPVI発現量に大きな変動は認められず、可溶性GPVIも検出されなかった。

20

30

40

[実施例15]

【0049】

サルPRPの可溶性GPVI量のELISAによる測定

50

実施例 12 に示した方法で、洗浄血小板を Convulxin、CRP あるいは ADP で刺激した後、上清を回収した。さらに、実施例 8 の方法により、上清中の可溶性 GPVI 量を測定した。結果を図 13 に示す。Convulxin および CRP で刺激した血小板の上清中において、顕著な可溶性 GPVI 量の上昇が認められた。一方、ADP で刺激した血小板の上清中における可溶性 GPVI の上昇は極めて微弱であった。

[ 実施例 16 ]

【 0050 】

ヒト PRP の調製および Collagen、Convulxin、CRP あるいは ADP による血小板刺激

正常ヒトから採血したクエン酸加血を  $170 \times g$ 、25、15 分間遠心分離することにより多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) を得た。引き続き、PRP に ACD-A (acid-citrate-dextrose) を添加し、pH 6.5 に調整した後、 $830 \times g$ 、25 で 10 分間遠心分離することにより血小板を回収した。回収した血小板に ACD-A で pH 6.5 に調整した HEPES Buffer ( $137 \text{ mM NaCl}$ 、 $1 \text{ mM MgCl}_2$ 、 $5.5 \text{ mM Glucose}$ 、 $3 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $10 \text{ mM HEPES}$ 、 $1 \text{ mg/mL BSA}$ ) を添加して 2 回洗浄した。洗浄後、HEPES Buffer (pH 7.3) を添加して血小板を懸濁し、洗浄血小板とした。 $\text{CaCl}_2$  および  $\text{MgCl}_2$  を  $1 \text{ mM}$  となるように添加した洗浄血小板に collagen (collagen reagent 'Horm' Nycomed)、convulxin (ALEXIS)、CRP (ペプチド合成品) あるいは ADP を添加し、室温において 1 時間反応させ血小板を刺激した。 $25 \text{ mM EDTA}$  を含む Protease Inhibitor Cocktail 溶液を添加して反応を終了した後、 $18,000 \times g$ 、25 で 1 分間遠心分離し、上清および血小板画分を回収した。

10

20

[ 実施例 17 ]

【 0051 】

ヒト血小板 GPVI 発現のフローサイトメーターによる測定

実施例 16 に示した方法で、洗浄血小板を collagen、convulxin、CRP あるいは ADP で刺激した。対照として洗浄血小板にバッファのみを添加し、室温において 1 時間静置した。 $25 \text{ mM EDTA}$  を含む Protease Inhibitor Cocktail 溶液を添加して反応を終了した後、FACS バッファで洗浄後、蛍光色素 PE で標識したキメラ抗ヒト GPVI 抗体 F1232-37-2 を  $4 \times 10^5$  個の血小板に対して  $1 \mu\text{g}$  相当添加して室温、遮光下で 30 分静置した。PE 標識キメラ F1232-37-2 のアイソタイプ対照として PE 標識ヒト IgG4 抗体を同量添加した試料も併せて調製した。30 分後、FACS バッファで血小板を希釈し、フローサイトメーター CYTOMICS FC500 (BECKMAN COULTER) で血小板の蛍光強度を測定することにより血小板膜表面上の GPVI 発現量について解析した。なお、GPVI 発現量は、PE 標識キメラ F1232-37-2 検出結果値から PE 標識ヒト IgG4 抗体検出結果値を差し引いて算出した。結果を図 14 に示す。Collagen 刺激血小板で、GPVI 発現量の減少が認められた。Convulxin および CRP で刺激した血小板では、GPVI 発現がほとんど消失していた。一方、ADP 刺激した血小板では GPVI 発現量の低下は認められなかった。

30

40

[ 実施例 18 ]

【 0052 】

ヒト血小板 GPVI 量のウエスタンブロッティングによる測定

実施例 16 に示した方法で、洗浄血小板を collagen、convulxin、CRP あるいは ADP で刺激した後、上清画分および血小板画分を回収し、上清画分に含まれる可溶性 GPVI および血小板画分に含まれる GPVI (以下、血小板 GPVI) を Western Blotting 法により検出した。すなわち上清画分  $12 \mu\text{L}$  に  $\times 4$  Sample Buffer (+ mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Roche)、Phosphatase

50

Inhibitor Cocktail (PIERCE) を4  $\mu$ L 添加した。血小板画分は  $1.9 \times 10^6$  個血小板相当/ $\mu$ L となるように x1 Sample Buffer (+ mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Roche)、Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIERCE)) を添加し、99 で5分間熱処理した。熱処理したサンプルを5 - 20%の濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (ATTO) に、1レーンあたり上清画分は全量、血小板画分は16  $\mu$ L アプライした後に、ゲル一枚につき定電流30mAで通電し電気泳動した。プロットイングは常法に従い、セミドライ法により低蛍光のメンブレン (Immobilon-FL PVDF、MILLIPORE) に転写した。プロットイング後、Block Ace (大日本製薬株式会社) を用いて4 で一晩ブロックした。さらに、10% Block Ace / 0.1% Tween 20 を含む PBS (TPBS) で希釈した一次抗体 (ヒトGPVI 合成ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体) を添加し、室温で1時間、反応させた。TPBS で洗浄した後、10% Block Ace / TPBS で希釈した二次抗体 (Anti-Rabbit Igs HRP) を添加し、室温で30分反応させた。TPBS で洗浄した後、ECL Plus (Amersham Biosciences) および Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) を用いて可溶型GPVI および血小板GPVI の検出を行った。結果を図15に示す。Convulxin およびCRPで刺激した血小板では顕著な血小板GPVI の減少が認められた。また、Collagen、Convulxin およびCRPで刺激した血小板では可溶型GPVI の上昇が認められた。一方ADPで刺激した血小板では血小板GPVI の大きな変動は認められず、可溶型GPVI も検出されなかった。

10

20

[ 実施例 19 ]

【 0053 】

#### ヒトPRPの可溶型GPVI量のELISAによる測定

実施例16に示した方法で、洗浄血小板をCollagen、Convulxin、CRPあるいはADPで刺激した後、上清を回収した。さらに、実施例8の方法により、上清中の可溶型GPVI量を測定した。結果を図16に示す。Collagen、Convulxin およびCRPで刺激した血小板の上清中において、著明な可溶型GPVI量の上昇が認められた。一方、ADPで刺激した血小板の上清中における可溶型GPVIの上昇は認められなかった。

30

[ 実施例 20 ]

【 0054 】

#### ラットエンドトキシン惹起血栓モデル動物における血漿中可溶型GPVI量の測定

雌性Wistarラットをペントバルビタールナトリウム (50 mg / kg) で麻酔し、右大腿静脈よりエンドトキシンを20 mg / kgの用量で2時間、あるいは40 mg / kgの用量で4時間、持続静脈内投与した。エンドトキシン投与終了時に、腹部大動脈より採血し、血小板数を自動血球数測定装置 (Sysmex、東亜医用電子) にて測定した。また、血液を遠心することにより血漿を分離し、可溶型GPVIを実施例7に記載した方法で、可溶型ICAM-1はELISAキット (R&D System、Rat s ICAM-1 (CD54) Immunoassay) を用いて測定した。結果を図17に示す。エンドトキシンを投与することにより、血小板数の低下が認められた。このことは、エンドトキシンの投与により血小板の活性化が生じていることを示している。また、エンドトキシンを投与することにより、血漿中の可溶型GPVI量および可溶型ICAM-1量が上昇した。

40

[ 実施例 21 ]

【 0055 】

#### (1) ラットコラーゲン惹起血栓モデル動物における血漿中可溶型GPVI量の測定

雄性SDラットをペントバルビタールナトリウム (50 mg / kg) で麻酔し、右大腿静脈よりコラーゲンを0.5 mg / kgの用量で15分間持続静脈内投与した。コラーゲ

50

ン投与開始より30分後に、頸静脈より採血し、血小板数を自動血球数測定装置（S y s m e x、東亜医用電子）にて測定した。また、血液を遠心することにより血漿を分離し、可溶性G P V Iを実施例7に記載した方法で、可溶性I C A M - 1はE L I S Aキット（R & D S y s t e m、R a t s I C A M - 1（C D 5 4）I m m u n o a s s a y）を用いて測定した。結果を図18（A）に示す。コラーゲンを投与することにより、血小板数の低下が認められた。このことは、コラーゲンの投与により血小板の活性化が生じていることを示している。また、コラーゲンを投与することにより、血漿中の可溶性G P V I量ならびに可溶性I C A M - 1が上昇した。さらに、血小板数の低下の程度と血漿中の可溶性G P V I量の上昇の程度は一致した。

同様に、雄性SDラットをペントバルビタールナトリウム（50 mg / k g）で麻酔し、右大腿静脈よりコラーゲンを0.1 mg / k gの用量で急速静脈内投与した。コラーゲン投与15分後、30分後、および60分後に頸静脈より採血し、血小板数を自動血球数測定装置（S y s m e x、東亜医用電子）にて測定した。また、血液を遠心することにより血漿を分離し、可溶性G P V Iを実施例7に記載した方法で測定した。結果を図18（B）に示す。血小板数の低下は軽微であったが、血漿中の可溶性G P V I量はコラーゲン投与より15分で速やかに上昇した。

【0056】

#### （2）ラットコラーゲン惹起血栓モデル動物におけるG P V I抗体の効果

雄性SDラットに抗ラットG P V I抗体（F1239-6-1）を投与した。6日後にコラーゲンを0.8 mg / k gの用量で急速静脈内投与した。コラーゲンを投与してから15分まで、生死を観察した。結果を表4に示す。抗ラットG P V I抗体（F1239-6-1）は、血漿中の可溶性G P V I量が上昇する血栓モデル動物において、0.3 mg / k g以上の用量で動物の死亡を完全に抑制した。

従って、本発明の測定方法等により血漿中のs G P V Iを測定することで、疾患の発症前に、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定又は定量をおこなうこと、血栓症等の血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患を診断すること、及び治療対象患者を選別することが可能であると考えられる。また、これらの患者に抗G P V I抗体等の抗血小板薬を投薬することで高い有効率が得られると考えられる。

【表4】

表4

群	生存数／例数
生理食塩水	0／15
F1239-6-1 0.1 mg/kg	1／7
F1239-6-1 0.3 mg/kg	7／7
F1239-6-1 1.0 mg/kg	8／8

[実施例22]

【0057】

#### （1）ラットバルーン傷害モデル動物における血漿中可溶性G P V I量の測定

雄性SDラットを45 mg / k gのペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与により麻酔し、頸部および大腿部を切開した。大腿動脈にバルーンカテーテルを挿入し、先端を左頸動脈の内外頸動脈分岐部まで導いた。バルーンカテーテルが頸動脈内にあることを確認した後、バルーン内に空気を注入してバルーンを膨らませた。バルーンを膨らませた状態で、大動脈弓までバルーンカテーテルを引き抜いた。この作業を3回繰り返すことにより、血管内膜に傷害を与えた。翌日、ペントバルビタールナトリウム45 mg / k g腹腔内投与麻酔下で腹部大動脈より、クエン酸加血液を採取し、血漿を取得した。血漿中の可溶性G P V I量は実施例7に記載した方法で、可溶性I C A M - 1はE L I S Aキット（

10

20

40

50

R & D System、Rat s ICAM - 1 ( CD 5 4 ) Immunoassay ) を用いて測定した。結果を図 1 9 ( A ) に示す。バルーンカテーテルで血管内膜に傷害を与えることにより、血漿中の可溶性 ICAM - 1 量が上昇した。このことは、バルーンカテーテルにより血管内膜が傷害を受けたことを示している。また、可溶性 GPVI 量の上昇も認められた。

【 0 0 5 8 】

#### ( 2 ) ラットバルーン傷害モデル動物における抗 GPVI 抗体の効果

実施例 2 2 に記載したモデル動物において、抗ラット GPVI 抗体の効果を検討した。すなわち、抗ラットに F 1 2 3 9 - 6 - 1 を 3 m g / k g で皮下投与し、6 日後に実施例 2 2 の方法で血管内膜傷害を加えた。バルーン傷害より 1 5 日後にペントバルビタール麻酔下において左右の頸動脈を採取して 1 0 % 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンブロックを作製した。次にパラフィンブロックを薄切してスライド標本を作製し、Hematoxylin - Eosin 染色をおこなった後、顕微鏡を用いて観察した。すなわち、観察した像を CCD カメラを用いてデジタル画像として記録し、これを画像解析ソフト WinROOF を用いて解析し、内膜および内中膜の断面積を算出した。結果を図 1 9 ( B ) に示す。抗ラット GPVI 抗体 ( F 1 2 3 9 - 6 - 1 ) は血漿中の可溶性 GPVI の上昇が認められた動脈硬化モデル動物において、内膜の肥厚を抑制した。

従って、本発明の測定方法等により血漿中の s GPVI を測定することで、疾患の発症前に、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定又は定量をおこなうこと、動脈硬化性疾患等の血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患を診断すること、及び治療対象患者を選別することが可能であると考えられる。また、これらの患者に抗 GPVI 抗体等の抗血小板薬を投薬することで高い有効率が得られると考えられる。

[ 実施例 2 3 ]

【 0 0 5 9 】

#### ラットエンドトキシン惹起血栓モデル動物における尿中可溶性 GPVI 量の測定

雌性 Wistar ラットをペントバルビタールナトリウム ( 5 0 m g / k g ) で麻酔し、右大腿静脈よりエンドトキシンを 4 0 m g / k g の用量で 4 時間、持続静脈内投与した。エンドトキシン投与終了時に、尿を取得し、実施例 7 の方法を用いて尿中可溶性 GPVI を測定した。結果を図 2 0 に示す。エンドトキシンを投与することにより尿中においても可溶性 GPVI 量の上昇が認められた。

[ 実施例 2 4 ]

【 0 0 6 0 】

#### 各種ヒト病態血漿の可溶性 GPVI 量の測定

各種ヒト病態血漿中の可溶性 GPVI 量を、実施例 8 に示した方法で測定した。結果を図 2 1 に示す。狭心症、急性心筋梗塞、心臓病、脳梗塞および痴呆の疾患患者血漿は、正常ヒト血漿に比較して可溶性 GPVI が高値であった。

[ 実施例 2 5 ]

【 0 0 6 1 】

#### 抗ヒト GPVI モノクローナル抗体の作製

精製 h GPVI - m F c 2 0 μ g をフロインド完全アジュバント ( D I F C O ) 又は Alum ( P I E R C E ) 及びオリゴ CpG と混合し、投与抗原とした。ddY マウス ( メス、8 週令、S L C ) に 2 回投与し、3 日後、リンパ節又は脾臓よりリンパ球を分離した。得られたリンパ球を P 3 × 6 3 - A g . 8 . U 1 ( A T T C ) と混合した後、ポリエチレングリコール ( P E G 1 5 0 0 、 S i g m a ) を用いて安東民衛・千葉丈 / 著「単クローン抗体実験操作入門」( 講談社、p 8 3 ) にしたがって細胞融合を行った。HAT 培地によりハイブリドーマを選択し、1 週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマを h GPVI - h F c 及び h GPVI - m L 9 - h F c に対する結合活性を指標としてスクリーニングした。すなわち、精製 h GPVI - h F c または h GPVI - m L 9 - h F c を D - P B S ( p H 7 . 4 ) で 1 μ g / m L に希釈し、イムノプレート ( M a x i s o r b 、 N U N C ) に 5 0 μ L / ウェル添加し、実施例 6 の記載の方法と同様にして固相化した

。次に培養上清を各ウェルに添加し室温で1時間反応させた後、実施例6に記載の方法と同様にしてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(DAKO、P260)を用いて反応を行い、吸光度を測定した。その結果、精製hGPVI-hFcと結合し(吸光度1以上)、hGPVI-mL9-hFcとは結合しない(吸光度0.5以下)抗体を産生している細胞を選択し、常法に従いクローニングした。8~10日後、同様にスクリーニングを行い、L9特異的マウス抗ヒトGPVI抗体を産生するハイブリドーマを得た。実施例4と同様に、得られたハイブリドーマを培養し、モノクローナル抗体を精製した。各抗体のGPVI結合活性を、上記ELISA法における吸光度が0.5以下を-、0.5~1.0までを+、1.0~2.0を++、2.0以上を+++として、表示した(表5)。

10

同様の手法を用いて、L2特異的マウス抗ヒトGPVI抗体を産生するハイブリドーマ(F1232-10-1及び同一クローン由来と考えられるF1232-10-2)を得た。

【0062】

【表5】

表5

Clone	hGPVI-hFc との結合	hGPVI-mL9-hFc との結合
F1249-18-2	+++	-
F1245-7-1	++	-
F1246-1-1	++	-
F1249-5-1	++	-
F1249-20-1	+++	-
F1249-24-1	+++	-
F1249-30-1	+++	-
F1245-5-1	++	-
F1245-6-2	++	-
F1249-3-2	+	-
F1245-4-1	+++	-
F1249-22-1	+	-
F1232-37-2	++	-

[実施例26]

【0063】

#### 抗GPVI抗体の可変領域アミノ酸配列の決定

常法に従い、ハイブリドーマF1232-37-2及びF1232-10-1より一本鎖cDNAを合成した。得られた一本鎖cDNAを鋳型としたMouse Ig-Primer Set(Novagen)によるPCRで抗GPVI抗体の可変領域をコードするDNAを増幅し、その塩基配列を決定した。各ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体F1232-37-2及びF1232-10-1の重鎖及び軽鎖可変領域の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列を配列表に示した(配列番号18-25)。

40

[実施例27]

【0064】

#### 抗GPVI抗体のヒト可溶性GPVI認識能の確認

実施例16に示した方法で正常ヒトから調製した洗浄血小板にconvulxinもしくは対照としてバッファーのみを添加し、37℃において1時間静置した後、上清画分を

50

回収した。実施例 18 に示した方法で、マウス抗ヒト GPVI 抗体である F1232-7-1 もしくは F1232-10-2、およびヒト GPVI 合成ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体を一次抗体として Western Blotting 法によりヒト可溶化型 GPVI の検出を行った。結果を図 22 に示す。F1232-7-1 および F1232-10-2 はヒト GPVI 合成ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体と同様に convulxin で刺激した洗浄血小板の上清画分試料において、ヒト可溶型 GPVI の存在を確認する事が可能であった。また、バッファーのみを添加した洗浄血小板の上清画分試料では、F1232-7-1、F1232-10-2 ならびにヒト GPVI 合成ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体によってヒト可溶型 GPVI は検出されなかった。このことから、ヒト可溶型 GPVI の ELISA 法で使用している F1232-7-1 および F1232-10-2 はヒト可溶化型 GPVI を認識していると考えられた。

10

【産業上の利用可能性】

【0065】

本発明の測定方法、測定試薬またはキットにより、試料中の GPVI、特に生体試料中の sGPVI 又は mGPVI が高感度に測定しうる。また、本発明の測定方法、測定試薬またはキットを用いて、sGPVI 又は mGPVI を検出、測定又は定量することにより、血小板活性化もしくは血管内皮傷害の検出、測定、定量、判定もしくは評価、血小板活性化もしくは血管内皮傷害関連疾患の診断、罹病性の判定もしくは発症リスクの評価、抗血小板薬、特に抗 GPVI 抗体の奏効する患者の選別、それらの投与（開始）時期の決定、及び、それらの治療効果もしくは副作用発現の予測、モニタリングもしくは予後の判定等が可能となる。

20

【配列表フリーテキスト】

【0066】

配列番号 1 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 2 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 3 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 4 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 5 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 6 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 7 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 8 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 9 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 10 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 11 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 12 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 13 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 14 は実施例 1 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 15 は実施例 2 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 16 は実施例 2 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。  
 配列番号 17 は実施例 2 の PCR 反応に用いたプライマーの配列である。

30

40

[ 配列表 ]

## SEQUENCE LISTING

<110> MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Novel platelet activation marker and assay method thereof

<130> PCT07-0018

<150> JP 2006-100241

<151> 2006-03-31

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 1

ccctcagcgc atcctgttcc tat

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 2

tttcccaggt caccttcagg act

23

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 3

ttaagggagt ctctagcctc tg

22

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 4

gtttagcata cacacctgta gcaattagct

30

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 5

cctgtttcct gtctttaata gag

23

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 6

ccttgccac acctctgact cc

22

<210> 7

<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 7  
gtgagaaaat caagtcacag aaatg

25

<210> 8  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 8  
ttcagacaca tttgtagtag aac

23

<210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 9  
ggagcacttg ggatgaactg tca

23

<210> 10  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 10

gagaaaccca toctcttgcc ac

22

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 11

gcttcacaag catatgagca cgtg

24

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 12

attatagctc tatagattcc atg

23

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 13

gggaattcca tgtctccagc ctcacto

27

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 14

ccaagttatt tctaggccag tgg

23

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 15

ccaggagttc aggtgctggg cacggtgggc

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 16

gtggttactg gaccctctgc cactcccagc

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 17

gctgggagtg gcagagggtc cagtaaccac

30

<210> 18

<211> 360  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 18  
 gtccagctgc agcagctctgg gcctgagctg gtgaggcctg gggaatcagt gaagatttcc 60  
 tgcaagggtt cggctacac attcactgat tatgctatac actgggtgaa gctgagtcac 120  
 gcaaagagtc tagagtggat tggagttatt agtatttact atgatgatac aaactacaac 180  
 cagaagtta agggcaaggc cacaatgact gtagacaaat cctccagcac agcctatctg 240  
 gaacttgcca gattgacatc tgaggattct gccatctatt actgtgcaag acgaaggac 300  
 agctcgggtc cctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 19  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 19  
 gacattgtgc tgaccaatc tccagottct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatggca atagttttat gcaactggtac 120  
 cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatcaa cctagaatct 180  
 gggatccctg ccaggttcag tggcagtggt tctaggacag acttcaccct caccattaat 240  
 cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300  
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgca 348

<210> 20  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 20

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Glu Ser  
 1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala  
 20 25 30

Ile His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45

Val Ile Ser Ile Tyr Tyr Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu  
 65 70 75 80

Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Arg Arg Asp Ser Ser Gly Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 21

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20

25

30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

Ala Asp Ala Ala  
 115

<210> 22

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

gttactctga aagagtctgg cctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 60

tgttctttct ctgggttttc actgagcact tatggtatag gagtaggctg gattcgtcag 120

ccttcaggga agggctctgga gtggctggca cacatttggg ggaatgatga taagtactat 180

aacacagccc tgaagagccg gtcacaatc tccaaggata cctccaacaa ccaggtatcc 240

ctcaagatcg ccagtgtgga cactgcagac actgccacat actactgtgc togagtttat 300

tactacggta gtagttttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357

<210> 23  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 23  
 gacatccaga tgactcagtc tocagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60  
 atcacatgtc gagcaagtga gaatattttc agtattttag catggtatca gcagaaacag 120  
 ggaaaatctc ctcaactcct ggtctatgct gcaacaaatt tagcagatgg tgtgccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 240  
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttatggta ctccgtggac gttcgggtgga 300  
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat gctgca 336

<210> 24  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 24

Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr  
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly  
 20 25 30

Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val Phe  
65 70 75 80

Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 25  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Ile  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

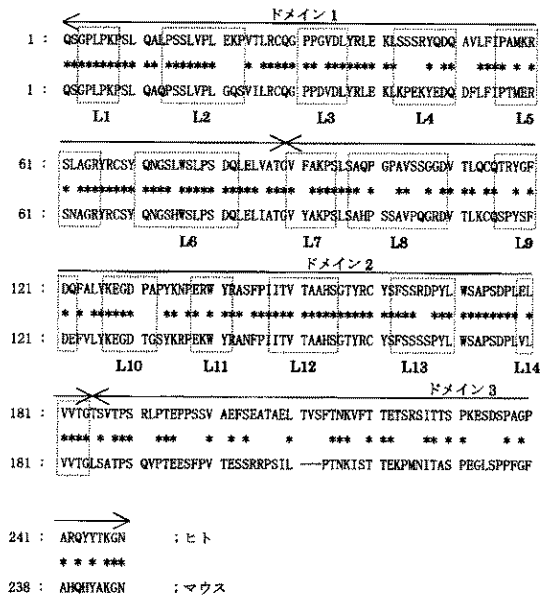
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Thr Pro Trp



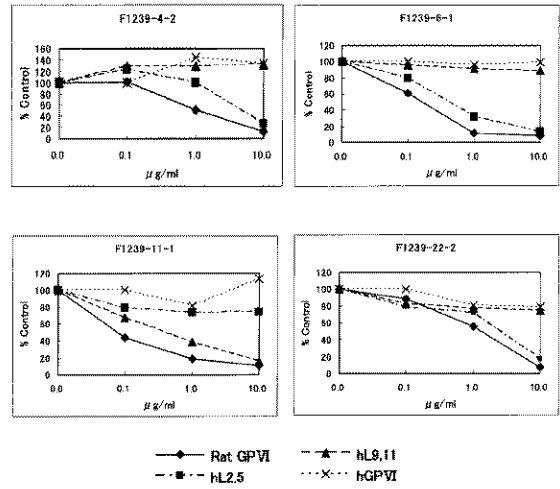
【 図 3 】

図3



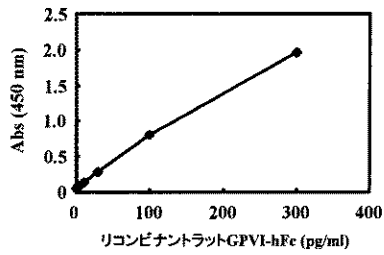
【 図 6 】

図6



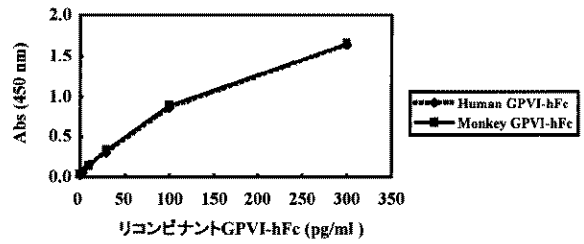
【 図 7 】

図7



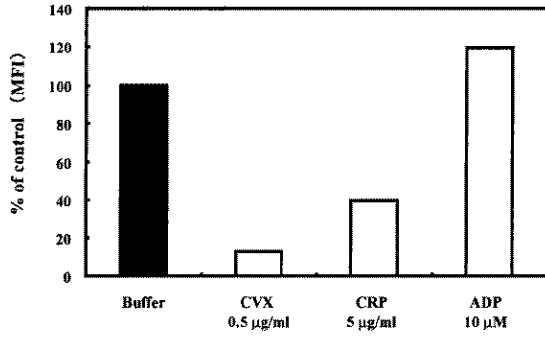
【 図 8 】

図8



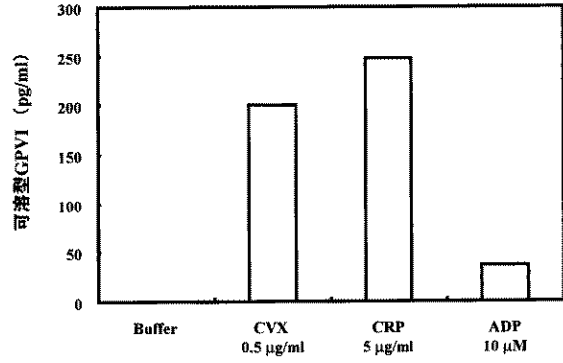
【 図 9 】

図9



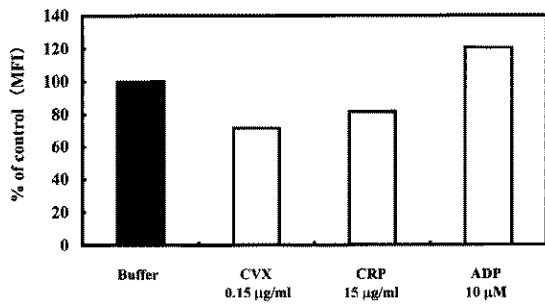
【 図 10 】

図10



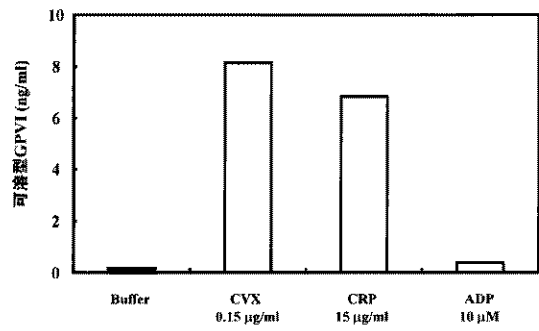
【 図 11 】

図11



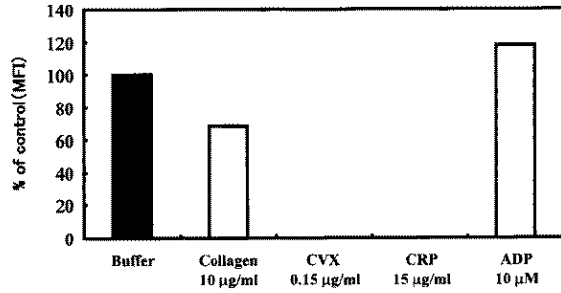
【 図 13 】

図13



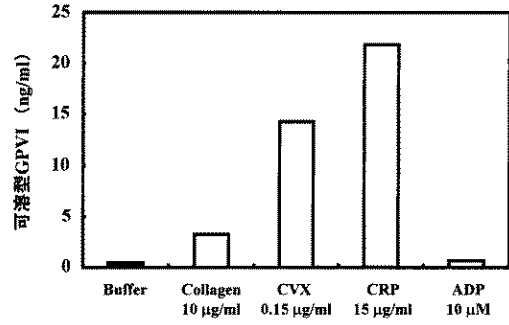
【 図 1 4 】

図14



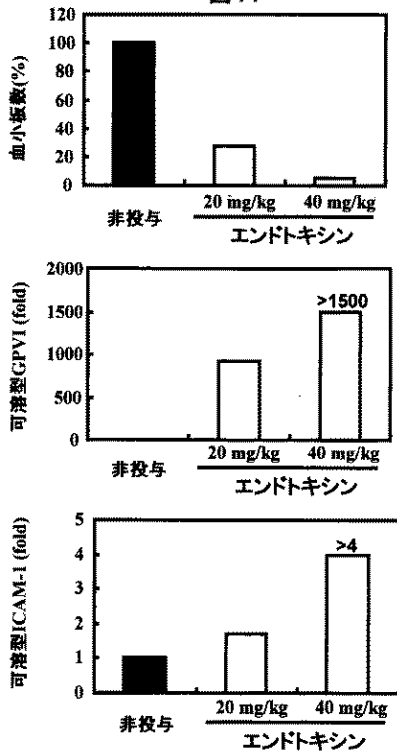
【 図 1 6 】

図16



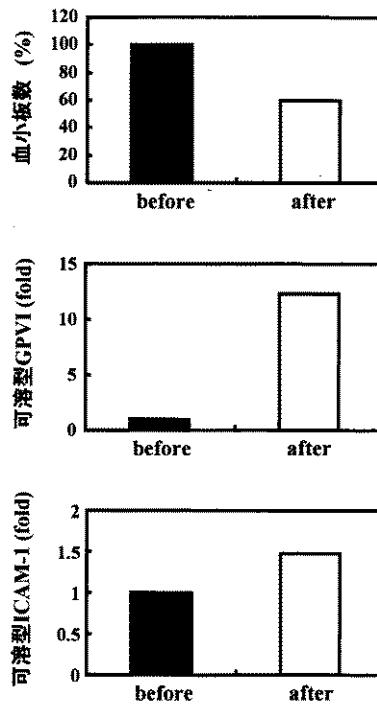
【 図 1 7 】

図17



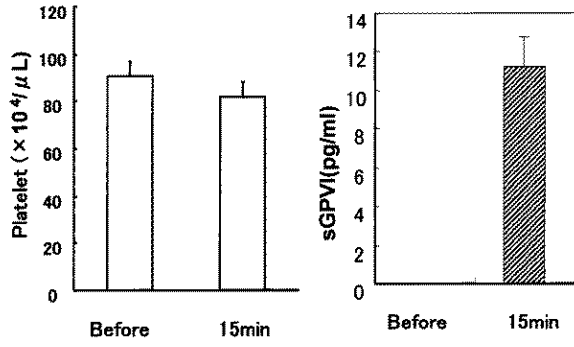
【 図 1 8 ( A ) 】

図18(A)



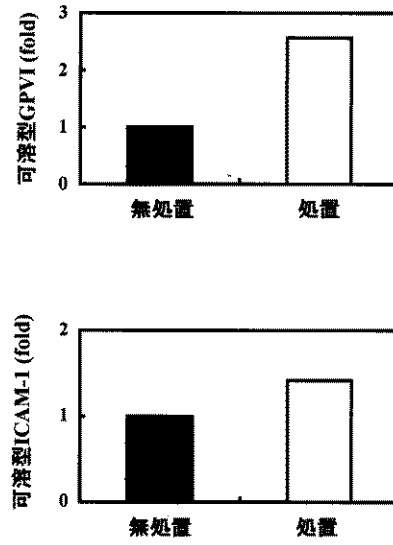
【 図 18 ( B ) 】

図18(B)



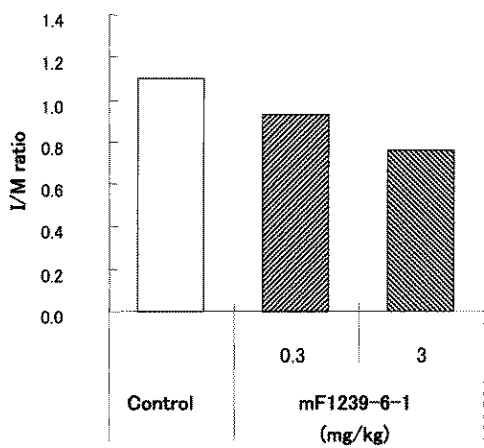
【 図 19 ( A ) 】

図19(A)



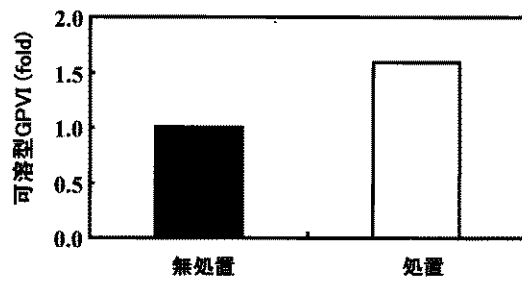
【 図 19 ( B ) 】

図19(B)



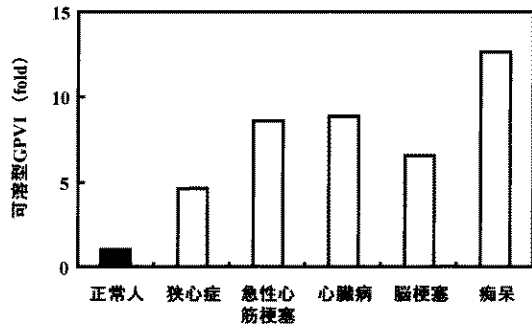
【 図 20 】

図20



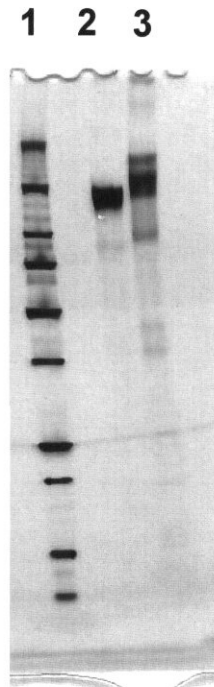
【 図 2 1 】

図21



【 図 4 】

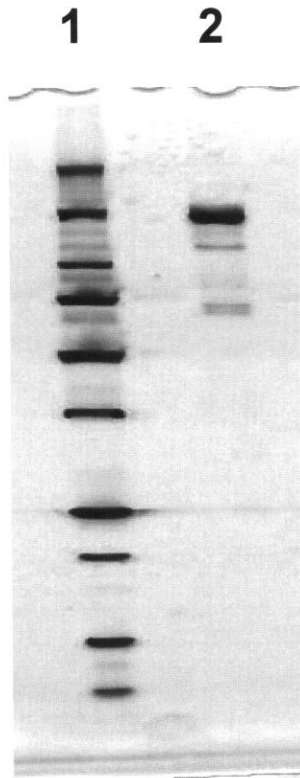
図4



レーン1:分子量マーカー  
レーン2:リコンビナントラットGPVI-hFc  
レーン3:リコンビナントラットGPVI-mFc

【 図 5 】

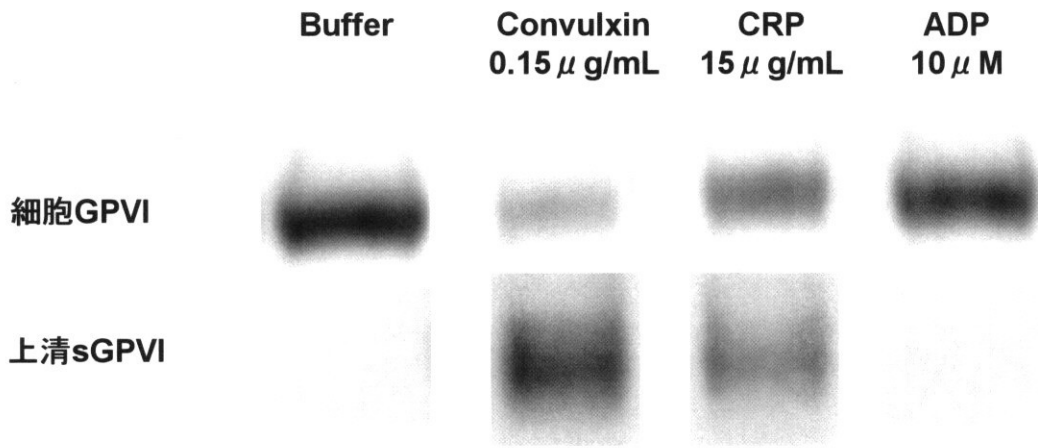
図5



レーン1:分子量マーカー  
レーン2:F1239-6-1

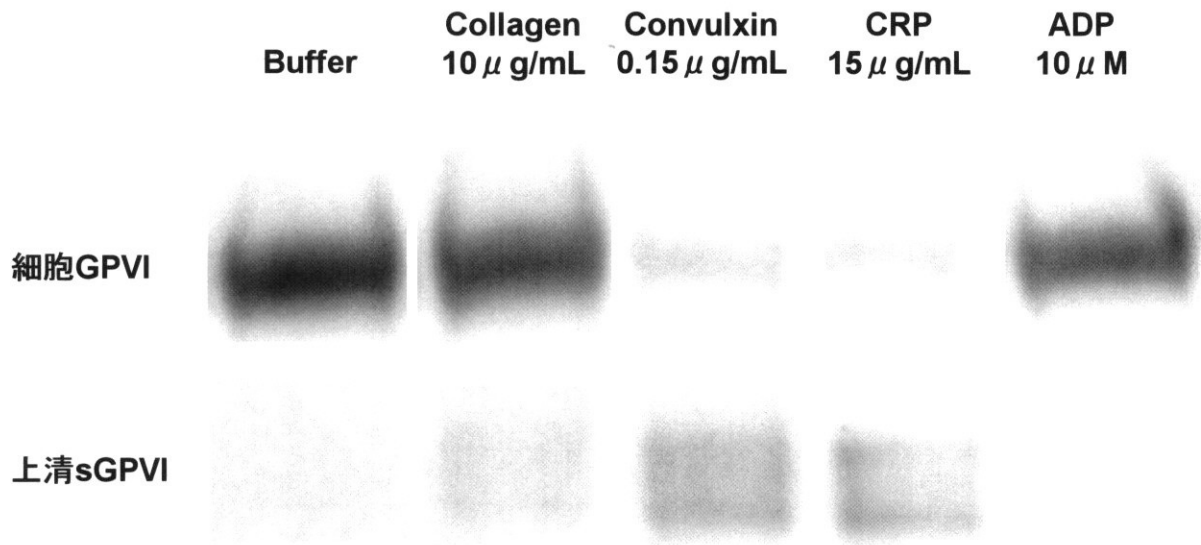
【 図 1 2 】

図12



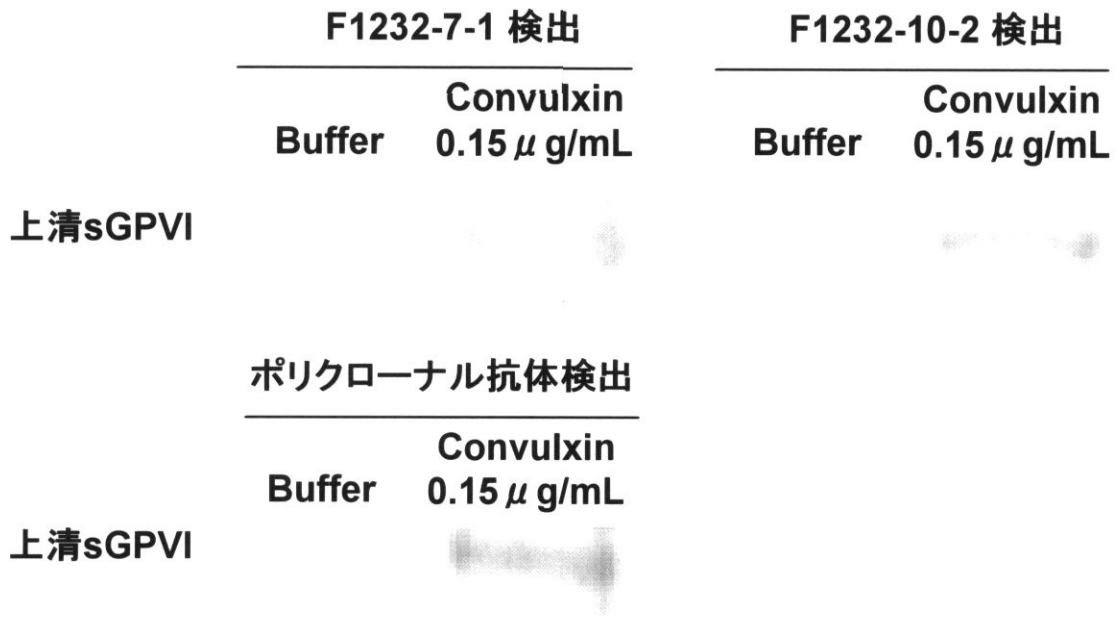
【 図 1 5 】

図15



【図 2 2】

図22



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/056530
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i		
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) G01N33/53, C07K16/28		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/0001826 A1 (GILL D.S.), 01 January, 2004 (01.01.04), Full text; all drawings; particularly, Par. Nos. [0577] to [0589] & WO 2002/080968 A1 & AU 6063500 A	1-15, 26
Y	BRIAN BOYLAN, et al., Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRγ-chain complex from the human platelet surface., Blood, Vol.104, No.5, 2004.09.01, P.1350-1355	1-15, 26
Y	GARDINER E.E., et al., Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase., Blood, Vol.104, No.12, 2004.12.01, P.3611-3617	1-15, 26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 June, 2007 (14.06.07)		Date of mailing of the international search report 26 June, 2007 (26.06.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/056530

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.: 16-25  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions of claims 16-25 pertain to a method for diagnosis of the human body.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/056530	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, C07K16/28			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	US 2004/0001826 A1 (GILL D. S.) 2004.01.01, 全文, 全図, 特に【0577】 - 【0589】 & WO 2002/080968 A1 & AU 6063500 A	1-15, 26	
Y	BRIAN BOYLAN, et al., Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcR $\gamma$ -chain complex from the human platelet surface., Blood, Vol.104, No.5, 2004.09.01, P.1350-1355	1-15, 26	
Y	GARDINER E. E., et al., Regulation of platelet membrane levels	1-15, 26	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 14.06.2007		国際調査報告の発送日 26.06.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 佳代子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/056530

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase., Blood, Vol.104, No.12, 2004.12.01, P.3611-3617	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/056530

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 16-25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 16-25に係る発明は、ヒトの身体の診断方法である。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

---

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,MT,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,BH,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,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 内藤 克紀  
東京都新宿区四谷一丁目 7 番地 持田製薬株式会社内

(72)発明者 本田 元康  
東京都新宿区四谷一丁目 7 番地 持田製薬株式会社内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	新型血小板活化标记物及其测量方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2007116779A1</a>	公开(公告)日	2009-08-20
申请号	JP2008509792	申请日	2007-03-20
申请(专利权)人(译)	持田制薬株式会社		
[标]发明人	保坂義隆 内藤克紀 本田元康		
发明人	保坂 義隆 内藤 克紀 本田 元康		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/28 C07K2317/34 G01N33/86 G01N2333/70503 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/53.V		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 铃木康仁		
优先权	2006100241 2006-03-31 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种测定血浆中存在的sGPVI的方便且高灵敏度的方法;这通过建立多个小鼠杂交瘤来实现,所述小鼠杂交瘤产生针对GPVI的抗体并组合由其产生的抗体。由此提供了新的血小板活化标记物,用于确定该新型血小板活化标记物的试剂和方法,以及该标记物在例如诊断与血小板活化/血管内皮损伤相关的疾病中的新应用。