

(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2008-527358

(P2008-527358A)

(43) 公表日 平成20年7月24日(2008.7.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 L	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2007-550764 (P2007-550764)	(71) 出願人	507123844
(86) (22) 出願日	平成18年1月13日 (2006.1.13)		アブリックス ナームローゼ フェンノー
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月12日 (2007.9.12)		トシャップ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/000273		ベルギー ベー9052 ズウィナルデ
(87) 国際公開番号	W02006/074947		テクノロジーパルク 4
(87) 国際公開日	平成18年7月20日 (2006.7.20)	(71) 出願人	507239617
(31) 優先権主張番号	60/644,414		イユーエムセー ユトレヒト ホールディ
(32) 優先日	平成17年1月14日 (2005.1.14)		ング ベースローテン フェンノートシャ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ップ
			オランダ エヌエル-3584 セーエム
			ユトレヒト ヤーレラーン 40
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患及び障害の異なる形態を区別する方法及びアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別し、及び/又は該疾患又は障害の進行を予測するための方法であって、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる少なくとも1種の疾患又は障害をわずらっている患者、又は前記疾患又は障害をわずらっていると疑われる患者から得た少なくとも1つの生物学的試料を供給する工程と、前記生物学的試料中の活性化vWFの量を決定する工程とを含み、前記試料中の活性化vWFの量が前記疾患又は障害の異なる状態又は形態を示している方法に関する。本発明は、さらに、試料中の活性化vWFの量を決定するためのキットの部品、並びに非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる抗体の使用、抗体の部分又はフラグメントの使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血小板減少及び/又はフォンビルブラント因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別し、及び/又は該疾患又は障害の進行を予測するための方法であって、

a) 血小板減少及び/又はフォンビルブラント因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる少なくとも1種の疾患又は障害をわずらっている患者、又は前記疾患又は障害をわずらっていると疑われる患者から得た少なくとも1つの生物学的試料を供給する工程；

b) 前記生物学的試料中の活性化vWFの量を決定する工程；

を含み、前記試料中の活性化vWFの量が、前記疾患又は障害の異なる状態又は形態の指標となる、前記方法。

【請求項 2】

生物学的試料がvWFを含む試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

生物学的試料がvWFと血小板とを含む試料である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

生物学的試料が全血、血漿、血清又は他の適切な血液画分から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

試料中の活性化vWFの量と前記試料中の血小板数を両方とも決定し、場合により両者を相互に比較する、請求項3又は4に記載の方法。

【請求項 6】

血小板減少及び/又はフォンビルブラント因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる前記疾患及び障害が、以下の疾患及び障害：

血小板減少性紫斑病(TTP)、子癇前症、HELLP症候群、2型フォンビルブラント病；DIC(びまん性細胞内血液凝固)又は敗血症；悪性高血圧症；抗リン脂質症候群；発癌物質全般への暴露；血小板濃縮物による血小板輸血後(灌流のため)；

から成る群より選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

血小板減少及び/又はフォンビルブラント因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる前記疾患が血小板減少性紫斑病(TTP)であり、後天性TTPの患者と先天性TTPの患者を区別するために使用される、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

血小板減少及び/又はフォンビルブラント因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる前記疾患が子癇前症又はHELLP症候群であり、子癇前症の患者とHELLP症候群の患者を区別するために使用される、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

血小板減少及び/又はフォンビルブラント因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる前記疾患が子癇前症であり、前記子癇前症の進行を予測し、特にHELLPを発症するであろう子癇前症の患者を予測し、及び/又は患者がHELLPを発症する危険が高いかを決定する、請求項6に記載の方法。

【請求項 10】

生物学的試料を、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる結合作用因子と接触させ、場合により前記結合作用因子に結合した活性化vWFの量を決定することによって、活性化vWFの量を決定する、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

結合作用因子が、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できるタンパク質又はポリペプチドである、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

結合作用因子が、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる抗体；非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる、抗体の部分又はフラグメント；又は抗体の1以上の部分又はフラグメントを含むタンパク質又はポリペプチドであって前記部分またはフラグメントの少なくとも1つは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる前記タンパク質又はポリペプチド、である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

結合作用因子が、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる重鎖抗体；重鎖抗体の部分又はフラグメントであって非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる前記部分又はフラグメント；又は重鎖抗体の1以上の部分又はフラグメントを含むタンパク質又はポリペプチドであって前記部分又はフラグメントの少なくとも1つは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる前記タンパク質又はポリペプチド、である、請求項12に記載の方法。

10

【請求項14】

結合作用因子が、抗体の非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる可変ドメイン；又は1以上の可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチドであって前記可変ドメインの少なくとも1つは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる前記タンパク質又はポリペプチド、である、請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】

可変ドメインの少なくとも1つが重鎖可変ドメインである、請求項12、13又は14に記載の方法。

20

【請求項16】

可変ドメインの少なくとも1つが重鎖抗体の可変ドメインである、請求項12、13、14又は15に記載の方法。

【請求項17】

結合作用因子が、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できるナノ抗体；又は1以上のナノ抗体を含むタンパク質又はポリペプチドであって、前記ナノ抗体の少なくとも1つは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる前記タンパク質又はポリペプチドである、請求項10～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

結合作用因子が重鎖抗体AU/VWFA-11；前記重鎖抗体AU/VWFA-11の部分又はフラグメント、特に前記重鎖抗体AU/VWFA-11の可変ドメイン；又は前記重鎖抗体AU/VWFA-11の1以上の部分又はフラグメントを含むタンパク質又はポリペプチド、特に前記重鎖抗体AU/VWFA-11の少なくとも1つの可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチドである、請求項10～16のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項19】

結合作用因子の使用を含む免疫吸着アッセイによって活性化vWFの量が決定される、請求項10～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

結合作用因子が適切な支持体上に固定化されている、請求項10～19のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項21】

試料中の活性化vWFの量を決定するためのキットであって、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる少なくとも1種の作用因子を含み；場合により、前記試料中の(活性化及び非活性化)vWFの総量を決定するための手段；及び/又は前記試料中の血小板数を決定するための手段；及び/又は使用説明書；及び/又はそれ自体既知の結合アッセイ用キットの1以上の構成部品、要素又は成分を含んでよく；

場合により適切なパッケージ又は容器に包装されていてもよい、前記キット。

【請求項22】

非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる抗体、抗体の部分若しくはフラグメントであって非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる前記部分若しく

50

はフラグメント、又は、抗体の部分若しくはフラグメントを含むタンパク質若しくはポリペプチドであって前記部分若しくはフラグメントが非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる前記タンパク質若しくはポリペプチドの、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的な相互作用で特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別し、及び/又は該疾患又は障害の進行を予測するための使用及び/又は前記区別及び/又は前記予測を行う方法における使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別し、及び/又は該疾患又は障害の進行を予測するための方法に関する。 10

特に、本発明は、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別するため；該疾患又は障害の進行を追うため；該疾患又は障害の進行についての予測を行うため；該疾患又は障害に適した治療又は治療計画を決定するため；該治療の治療効力を決定するため；及び/又は必要が示された場合に該治療を修正するために使用可能なパラメータを提供する方法に関する。

本発明のさらなる局面、実施態様、使用、適用及び利点は以下のさらなる説明で明らかになるだろう。 20

本発明は、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる少なくとも1種の疾患又は障害をわずらっている患者、又は前記疾患又は障害をわずらっている疑いのある患者から得た生物学的試料中の活性化vWFのレベルを用いて、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別し；該疾患又は障害の進行を追う；該疾患又は障害の進行について予測を行い；該疾患又は障害に適した治療を決定し；該治療の治療効力を決定し；及び/又は必要が示された場合に該治療を修正することができるという驚くべき知見に基づいている。

【0002】

従って、第1局面では、本発明は、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別し、及び/又は該疾患又は障害の進行を予測する方法に関し、前記方法は、以下の工程： 30

a) 血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる少なくとも1種の疾患又は障害をわずらっている患者、又は前記疾患又は障害をわずらっている疑いのある患者から得た少なくとも1つの生物学的試料を供給する工程；

b) 前記生物学的試料中の活性化vWFの量を決定する工程；
を含み、

前記試料中の活性化vWFの量が前記疾患又は障害の異なる状態又は形態を表す。 40

本発明の方法で使用する生物学的試料は、好ましくはvWFを含み、さらに好ましくはvWFと血小板を含む試料である。特に、全血、血漿、血清又は他の適切な血液画分から生物学的試料を選択することができる。

本発明の方法では、試料中の活性化vWFの量(例えば、絶対量、レベル及び/又は濃度)を、活性化vWFの量についての参照値、例えば、該疾患又は障害をわずらっていない患者又は患者群から得た参照値；該疾患又は障害をわずらっている患者又は患者群から得た参照値；異なる形態の該疾患又は障害をわずらっている患者又は患者群から得た参照値と比較することができる。試料中の活性化vWFの量を同じ患者から得た(例えば、より早い時点及び/又はより遅い時点で得た)1以上のさらなる試料中のvWFの量と比較してもよい。後述する実験セクションを参照されたい。 50

【0003】

試料中の活性化vWFの量を、該試料の別の適切なパラメーターと比較してもよい。

例えば、試料中の活性化vWFの量を同試料中の非活性化vWFの量及び/又は(活性化及び非活性化)vWFの総量と比較してもよい。また、試料中の活性化vWFと非活性化vWFの量の適切な比(例えば、該試料中のvWFの総量に対する該試料中の活性化vWFのパーセンテージ)を参照値、例えば、該疾患又は障害をわずらっていない患者又は患者群から得た参照値及び/又は該疾患又は障害をわずらっている患者又は患者群から得た参照値と比較してもよい。この目的のため、それ自体既知の方法で非活性化vWFの量及び/又はvWFの総量を決定することができる。この場合もやはり後述する実験セクションを参照されたい。

使用する試料がvWFと血小板を両方とも含む場合、試料中の活性化vWFの量を同試料中の血小板数と比較してもよい。また、試料中の活性化vWFの量と試料中の血小板数の適切な比を参照値、例えば、該疾患又は障害をわずらっていない患者又は患者群から得た参照値及び/又は該疾患又は障害をわずらっている患者又は患者群から得た参照値と比較してもよい。この目的のため、それ自体既知の方法で試料の血小板数を決定することができる。この場合もやはり後述する実験セクションを参照されたい。

【0004】

特に、本発明を用いて(臨床医が使用可能な1以上のパラメーターを与えて)下記疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別し、該疾患及び障害の進行を追い、該疾患及び障害の進行について予測を行い；該疾患及び障害に適した治療又は治療計画を決定し；該疾患及び障害の治療の治療効力を決定し；及び/又は必要が示された場合に該疾患及び障害の治療を修正することができる：血小板減少性紫斑病(TTP)、子癇前症、HELLP症候群、2型フォンビルブランド病；DIC(びまん性細胞内血液凝固(diffuse intracellular coagulation))又は敗血症；悪性高血圧症；抗リン脂質症候群；発癌物質全般への暴露；血小板濃縮物による血小板輸血後(灌流のため)；マラリア；静脈及び/又は動脈の血栓症並びに骨髄移植。

1つの好ましいが、限定的でない実施態様によれば、本発明の方法を用いて血小板減少性紫斑病(TTP)の異なる状態又は形態を区別し、該疾患の進行を追い、該疾患の進行について予測を行い；該疾患に適した治療又は治療計画を決定し；該疾患の治療の治療効力を決定し；及び/又は必要が示された場合に該疾患の治療を修正する。特に、この実施態様によれば、本発明の方法を用いて後天性TTPの患者と先天性TTPの患者を区別できる。実験パートで後述するように、先天形態のTTPの患者から得た試料は、後天形態のTTPの患者から得た試料より有意に多い活性化vWFを含むだろう。したがって、先天形態のTTPの患者を後天形態のTTPの患者から区別することができる(例えば、臨床医によって)。

別の好ましいが、限定でない実施態様によれば、本発明の方法を用いて、子癇前症及び/又はHELLP症候群の異なる状態又は形態を区別し、該疾患の進行を追い、該疾患の進行について予測を行い；該疾患に適した治療又は治療計画を決定し；該疾患の治療の治療効力を決定し；及び/又は必要が示された場合に該疾患の治療を修正する。例えば、この実施態様によれば、本発明の方法を用いて子癇前症の患者とHELLP症候群(子癇前症の重症形態)の患者を区別できる。この実施態様を用いて子癇前症の進行を追い、及び/又は子癇前症の進行を予測することができ、特に、子癇前症の患者がHELLPを発症するか、及び/又は子癇前症の患者がHELLPを発症する危険が高いかを予測することができる。実験パートで後述するように、HELLPの患者から得た試料は、健康な妊娠している対象から得た試料及び子癇前症の患者から得た試料より有意に多い活性化vWFを含むだろう。したがって、HELLP症候群の患者を健康な対象及び子癇前症の患者から(例えば、臨床医によって)区別することができ、子癇前症の進行を追い、及び/又は予測し、特に子癇前症の患者がHELLPを発症するかを予測でき、及び/又は子癇前症の患者がHELLPを発症する危険が高いかを決定することもできる。

【0005】

一般的に、本発明では、試料中び活性化vWFの量、レベル又は濃度が下記値：
[平均値] + [2 × S D]

10

20

30

40

50

(ここで、

[平均値] = 健康なボランティア群から得た試料中の活性化vWFの平均量；

[$2 \times S D$] = 前記試料の標準偏差)

より高い場合、前記試料は、“増加した”又は“上昇した”レベルの活性化vWFを含むと考えることができ；

実際には、非健康患者から得た試料は、この値より有意に高い活性化vWFのレベルを含みうるということが理解される(後述する実験パートの値を比較)。

本発明の方法では、それ自体既知のいずれの方法でも、例えば適切な分光光度法、クロマトグラフ法、質量スペクトル法又は他のそれ自体既知の適切な方法で活性化vWFの量を決定することができる。

しかし、活性化vWFの量は、好ましくは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる結合作用因子と生物学的試料を接触させ、場合により次に前記結合作用因子に結合している活性化vWFの量を決定することによって決定される。

これは、当業者には明らかなように、結合作用因子を含むどのような適切な結合アッセイを用いても達成することができ、例えばELISA又はRIA等の免疫吸着アッセイ；マイクロアレイの使用を含むアッセイ；カラム、(共有結合によって又は他の様式で)結合作用因子が付着したビーズ又は他の支持体を含むアフィニティー法；ビーズ又は適切な標識若しくはマーカー(例えば、蛍光マーカー)に付着した結合作用因子の使用を含むセルソーティング法(例えばFACS)の使用；及び適宜標識した結合因子の使用を含む他の方法が挙げられる。

結合作用因子が(共有結合によって、又は他の様式で)付着する適切な担体(例えば、紙のストリップ、チューブ、ウェル、又は他の適切な表面若しくは媒体)の使用を通じて本発明の方法を実施することも考えられる。次に、この担体を適切な方法で適切な時間、試料に曝露した後、該担体に結合した活性化vWFの量を決定することができる。これは、例えば、結合したvWFを担体から溶出してから、溶出した活性化vWFの量を決定する、試料に曝露する前後の担体上に残存している遊離の結合部位の量を比較する、及び/又は前記担体に結合した活性化vWFの量を直接測定することによって遂行しうる。例えば、担体が該担体に結合したvWFの量を指示する(例えば、色の変化を通じて)指示手段を備えてもよいと考えられ；又は担体を適宜該担体に結合した活性化vWFの量の尺度となる信号(例えば、色の変化)を与えるようにさせうると考えられる。

【0006】

当業者には、このような結合アッセイを遂行するための方法、技術及び設備が明かだろう。例えば、後述する実験パートを参照されたい。結合アッセイのため、この場合もやはり当業者には明らかなように、結合作用因子を適切な支持体上に固定化してもよい。

非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できるいずれの適切な結合作用因子(すなわち、vWFの活性化/結合コンホメーションと、vWFの非活性化/非結合コンホメーションを区別できる結合作用因子)も使用できる。

例えば、この結合作用因子は非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できるタンパク質又はポリペプチドでよく、例えば、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる抗体；抗体の部分又はフラグメント(前記部分又はフラグメントは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる)；又は抗体の1以上の部分又はフラグメントを含む、及び/又は抗体の1以上の部分又はフラグメントを構成するタンパク質又はポリペプチド(前記部分又はフラグメントの少なくとも1つは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる)でよい。

特に、前記部分又はフラグメントは可変ドメイン、例えば重鎖可変ドメイン及び/又は軽鎖可変ドメイン、或いは重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインを両方含むScFvでよい。このような抗体とフラグメント、及びそれらを得る方法は当業者には明らかであり、例えば以下の文献を参照されたい：Roitt et al, “Immunology” (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001);及びJaneway et al, “Immunobiology” (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

1つの好ましいが限定でない実施態様によれば前記結合作用因子は、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる、いわゆる“重鎖抗体”；重鎖抗体の部分又はフラグメント(前記部分又はフラグメントは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる)；又は重鎖抗体の1以上の部分又はフラグメントを含む、及び/又は重鎖抗体の1以上の部分又はフラグメントを構成するタンパク質又はポリペプチド(前記部分又はフラグメントの少なくとも1つは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる)(例えば、2以上の該フラグメントを含む多価タンパク質。このような多価タンパク質は、vWFの活性化形態に対して、すなわち対応する一価形態に比し、高いアフィニティー及び/又は特異性を有しうるので、改良された感受性、少ないバックグラウンド及び/又はより良い信号対雑音比をもたらしうる)であり得る。

重鎖抗体とそれを得る方法は技術的に開示されており、例えば、一般的な背景技術として引用される以下の参考文献を参照されたい：Vrije Univwesiteit BrusselによるWO 94/04678(=EP 656 946)、WO 96/34103(=EP 0 822 985)及びWO 97/49805；Vlaams Interunive rsitair Institute voor BiotechnologieによるWO 97/49805；Unilever N.V.によるWO 94/25591(=EP 0 698 097)及びWO 00/43507；National Research Council of CanadaによるWO 01/90190；the Institute of AntibodiesによるWO 03/025020(=EP 1 433 793)；出願人によるWO 04/062551、WO 04/041863、WO 04/041865、WO 04/041862；並びに例えばHamers-Casterman et al, Nature, Vol. 363, p. 446 (1993)及びRiechmann and Muyldermans, Journal of Immunological Methods, 231 (1999), p. 25-38。

【 0 0 0 8 】

例えば、所望抗原に対する重鎖抗体は、上記一般的な先行技術で開示されているように、前記抗原で免疫したラグダ科動物種から得ることができる。

上記参考文献でも言及されているように、天然に存在する重鎖抗体は、天然に存在する通常の4-鎖抗体(本来、重鎖と軽鎖を両方含む)中に存在する軽鎖を含まない。このため、このような天然に存在する重鎖抗体は、当該技術では“単鎖抗体”(例えばWO 02/085945参照； V_L ドメインに共有結合した V_H ドメインを含む合成ポリペプチドである、いわゆる“単鎖Fv”又は“scFv”と混同すべきでない)及び“軽鎖のない免疫グロブリン”(例えば、EP 0 656 946及びさらに上記一般的な背景技術のいくつかを参照)とも呼ばれており、この用語は、本明細書の目的では、本明細書で使用する用語“重鎖抗体”に等しいと考えるものとする。

これら参考文献でも言及されているように、天然に存在する重鎖抗体の重鎖は、CH3ドメイン、CH2ドメイン及び可変ドメインを含むが、軽鎖ドメインに加え、天然に存在する通常の4-鎖抗体の重鎖中に存在するCH1ドメインを欠いている。本明細書では、天然に存在する重鎖抗体由来の可変ドメインを“ V_{HH} ドメイン”とも呼ぶ。一般に“ V_H ドメイン”と呼ばれる通常の4-鎖抗体由来の可変ドメインと前記可変ドメインを区別するためである。

一般的に、 V_{HH} ドメインは通常の V_H ドメインの免疫グロブリンフォールドを保持する構造を有する。しかし、 V_H ドメインに比べて V_{HH} ドメインは、そのアミノ酸配列中(特にそのフレームワーク領域中)に、 V_{HH} ドメイン内の、 V_H ドメイン中であれば V_H/V_L ドメイン中間相を形成するであろう領域/残基をさらに疎水性にする1以上の置換を含む(上で引用した一般的な背景技術を参照されたい)。

また、上で引用した一般的な背景技術で言及されているように、重鎖抗体と V_{HH} ドメインは、それぞれ如何なる軽鎖又は軽鎖可変ドメインが存在しなくても抗原と結合できるという主要な利点を有する。このため、重鎖抗体と V_{HH} ドメインは、通常の4-鎖抗体又はその軽鎖若しくは重鎖可変ドメインより容易に得ることができ、発展させ、(特に)大規模に製造し、使用し、及び/又は支持体に結合させることができる。例えば、Hindustan Lever Limitedによる国際出願WO 01/40310には固体支持体上の V_{HH} ドメインの固定化が開示されている。

【 0 0 0 9 】

10

20

30

40

50

特に好ましい実施態様によれば、結合作用因子はNanobodyTM (ナノ抗体) である。この用語については出願人の公開されていない国際出願PCT/EP2005/011819(2005年11月4日提出、表題“重鎖抗体の可変ドメイン配列の製造方法”)及びAblynx N.V.のさらなる公開された特許出願と未公開特許出願を参照されたい。[注: NanocloneTM、NanobodyTM及びNanobodiesTMはAblynx N.V.による商標の保護又は適用を受ける]。一般的に、Nanobodies (ナノ抗体) は、天然に存在するV_{HH}ドメインに特徴的な機能的性質と構造上のいくつかの特徴を有するタンパク質として記載することができる。例えば、Nanobodyは、天然に存在するV_{HH}ドメインの特性である機能的性質と構造上の特徴(少なくともそのいくつか)を有する限り、天然に存在するV_{HH}ドメイン、“ヒト化”V_{HH}ドメイン又は“ラクダ化”V_{HH}ドメインでよく、同様に部分的又は全体的な合成タンパク質でもよい。出願人の公開されていない米国仮出願60/683,474も参照されたい(以下参照)。この出願はvWFに対する種々のNanobodies(活性化vWFに対するNanobodiesを含む)を開示している。出願によるこれら出願及び上述した他の先行技術でも言及されているように、Nanobodiesを多価形式及び/又は多重特異性形態にして使用することもできる。

出願人による国際出願WO 04/062551(引用によって本明細書に援用する)は、vWFの種々のドメインに対する重鎖抗体及びvWFの活性化と非活性化の両形態に対する重鎖抗体、該重鎖抗体のV_{HH}ドメイン、それらに基づいたNanobodiesTM、並びにそれらを得る方法について開示している。これら重鎖抗体とV_{HH}ドメインは、本明細書で述べる方法で使うために特に適している。例えば、vWFの活性化形態に向けられた(例えば、vWFのA1ドメインの活性化形態に向けられた)WO 04/062551の重鎖抗体(又はそのV_{HH}ドメイン)を用いて本発明の試料中の活性化vWFの量を決定することができる。一方、vWFの非活性化形態に向けられた(例えば、A1ドメインの非活性化形態に向けられた)又はvWFの活性化と非活性化の両形態に向けられた(例えば、vWFのA3ドメインに向けられた)WO 04/062551の重鎖抗体(又はそのV_{HH}ドメイン又はそれに基づいたNanobodyTM)を本発明の方法で用いて、それぞれ試料中の非活性化vWFの量又は試料中のvWFの総量を決定することができる。

【0010】

vWFの活性化形態に向けられたいくつかの特に好ましいが、限定でないNanobodiesTMは、国際出願WO 04/062551に記載されている、vWFのA1ドメインの活性化形態に向けられたNanobodiesであり、限定するものではないが、AU/VWFA-11(“a-11”); AU/VWFA-12(“a-12”)及び/又はAU/VWFA-16(“a-16”)が挙げられる。上述したように、これらNanobodiesTMの多価(例えば、二価又は三価)形態(すなわち、これらNanobodies(同一又は異なってよい)の2、3又は4以上が相互に結合しており、場合により適切なリンカー配列を介してもよい。この場合もやはり国際出願WO 04/062551に記載されている)の使用は、vWFの活性化形態に対して、より高い親和性及び/又は特異性をもたらす(すなわち、対応する一価Nanobodyに比し)、ひいては改良された感受性; 少ないバックグラウンド及び/又はより良い信号対雑音比のアッセイをもたらす。このような多価タンパク質の設計及び製造のため、この場合もやはりWO 04/062551、及び上記Nanobodiesに関する一般的な背景技術を参照されたい。

本発明の方法で使用可能な他のNanobodiesは、出願人の公開されていない米国仮出願60/683,474(2005年5月20日提出、名称“凝集-媒介障害の治療用NanobodiesTM”)に記載されている。

既に上述したように、また、以下の実験パートでさらに説明するように、本発明で決定される値をパラメーターとして用いて(例えば臨床医によって)、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患又は障害の異なる状態又は形態を区別し; 該疾患又は障害の進行を追い; 該疾患又は障害の進行について予測を行い; 該疾患又は障害に適した治療を決定し; 該治療の治療効力を決定し; 及び/又は必要が示された場合に該治療を修正することができる。このことは、本明細書の開示に基づいて臨床医のスキルの範囲内である。

本発明の方法とアッセイを例えば上記疾患及び/又は障害についての研究、及び/又は該疾患又は障害におけるvWFの役割に関する研究で使用することもできる。

10

20

30

40

50

【0011】

さらなる局面では、本発明は、試料中の活性化vWFの量を決定するため、特に本明細書で述べる方法で使うための構成要素のキットに関する。前記構成要素のキットは、少なくとも、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFに結合できる結合作用因子(場合により、上述したように適切な担体又は表面に付着してよい)を含み；かつ場合により、試料中の(活性化及び非活性化)vWFの総量を決定するための手段(当業者には明らかであろう)；及び/又は試料中の血小板数を決定するための手段(当業者には明らかであろう)；及び/又は使用説明書；及び/又はそれ自体既知の結合アッセイ用の1以上の部品、要素又は成分(当業者には明らかであろう)を含んでよく；ここで、前記構成要素のキットは、場合により適切なパッケージング又は容器に包装されていてもよい。前記構成要素のキット中、前記結合作用因子は、好ましくはさらに上述したとおりである。

10

本発明は、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFに結合できる結合作用因子の、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患及び障害の異なる状態又は形態を区別するための使用、及び/又は該疾患又は障害の進行を予測するための使用；及び/又は前述した方法における使用、及び/又は上述したキットの構成要素としての使用にも関する。

前記結合作用因子は、好ましくはさらに上述した通りであり、例えば抗体又は抗体の部分若しくはフラグメント(前記抗体、部分又はフラグメントは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFに結合できる)；該抗体の少なくとも1つの部分又はフラグメントを含み、及び/又は構成するタンパク質又はポリペプチド；重鎖抗体又はその部分若しくはフラグメント(前記重鎖抗体、部分又はフラグメントは非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFに結合できる)；該重鎖抗体の少なくとも1つの部分又はフラグメントを含み、及び/又は構成するタンパク質又はポリペプチド；NanobodyTM(前記Nanobody(ナノ抗体)は非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFに結合できる)；又は1以上のNanobodiesTMを含むタンパク質又はポリペプチドでよい。

20

【0012】

また、本発明は、血小板減少及び/又はフォンビルブランド因子(vWF)と血小板との間の自発的相互作用によって特徴づけられる疾患及び障害を予防又は治療するため、或いは前記疾患及び障害の(さらなる)進行を遅らせ、又は予防するための、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる結合作用因子(上述したような)の使用にも関する。

30

また、この目的のため、それ自体既知の方法で、1以上の医薬的に許容しうる担体、希釈剤又は賦形剤を用いて適切な医薬形態又は医薬製剤に前記結合作用因子を組み入れ、かつ適切な治療計画に従い、適切な投与経路によって、該予防又は治療が必要な患者に治療的に有効な量で投与することができる。この場合もやはり、例えばWO 04/062551及び米国仮出願60/683,474(参照によって本明細書に援用する)を参照されたい。

本発明は、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる結合作用因子(上述したような)の、試料又は流体、特に活性化vWFと非活性化vWFを両方とも含む試料又は流体から活性化vWFを選択的に除去するための使用にも関する。試料は、特に、上述したような生物学的試料、例えば、患者から得た生物学的試料でよい。流体は、例えば、血液又は血漿のような生体液でよく、例えば患者から得てもよい。

40

【0013】

後者の実施態様の方法の非限定例として、患者から血液を採取後(バッチ式又は本質的に連続的)、本発明の結合作用因子/方法を用いて前記血液から選択的に活性化vWFを除去後、(活性化vWFの量が減少した)前記血液を前記患者に戻す。この目的では、患者に戻す予定の血液から、活性化vWFを有する結合作用因子の分離を容易にするため、結合作用因子を担体に結合させてよい。適切な担体と分離法(例えば、特別に適合させた透析設備の使用)は当業者に明らかであり、例えばWO 04/062551及び米国仮出願60/683,474に記載されている。或いは、結合作用因子をタグで標識して、タグ付加結合作用因子(タグに活性化vWFが結合している)の除去を容易にすることができる。次に、このようなタグ付加結合作用因子を患者に、患者由来の血液循環から所望量の活性化vWFを除去するのに適した量

50

で(それ自体既知のいずれのやり方によってもよく、例えば、静脈内注射又は注入を用いて血液循環に直接導入して)投与することができる。この実施態様で使うために適したタグ(例えば、ガラクトース)、結合作用因子にタグを付加する方法、及びこの実施態様を遂行する方法(例えば、投与すべき量)は当業者に明らかだろう。例えば、限定するものではないが、この実施態様の方法をTTP、HELLP、2B型VWF又は他の血栓性障害(限定するものではないが、本明細書で述べるものが挙げられる)の治療のため、又は前記治療の一部として、活性化vWFの(選択的)除去で使用する。

【0014】

現在、虚血性合併症を予防するため血小板血栓形成を阻止する種々の作用因子がその抗血栓用途について研究されている。臨床に到達した薬剤もあるが、“理想的な抗血栓薬”の探究はまだ進行中である。循環する活性VWFの存在によって引き起こされる血栓性合併症を予防するための治療の選択肢としてNanobodies(ナノ抗体)、例えば以下の実施例で述べるAU/VWFA-11等を使用できる。AU/VWFA-11は潜在性VWFは認識せず活性なVWFを認識するので、このNanobody(ナノ抗体)は危険なvWF分子だけを除去する。対照的に、通常のVWFのレベルは影響を受けないままなので、低すぎるVWFの結果としての出血性合併症の危険は回避される。ナノ抗体の修飾によってvWF-ナノボディ複合体のクリアランスを促進することができる。このような修飾として、限定するものではないが、例えば、ガラクトース-認識スカベンジャー-受容体(アシアロ糖タンパク質-受容体)による認識を増強するためのガラクトースが挙げられる。また、他のタグをAU/VWFA-11に共有結合によって付加することもできる。

上で参照した出願人の出願で既に述べたように、造影目的で有利にNanobodiesを使用することができる。本発明によれば、非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できる、特に非活性化vWFの存在下で特異的に活性化vWFと結合できるNanobodiesを、特にin vivoイメージングのために使用して血小板に富む血栓の位置を特定できることが分かった。この目的のため、いずれの方法(例えば、米国仮出願60/683,474でNanobodiesについて述べたように)で標識した結合作用因子も使用することができる。次に、標識した結合作用因子を対象に、該対象の血液循環中に存在しうるいずれの血小板りに富む血栓を可視化するのにも適した量で投与(それ自体既知のいずれかの適切な方法、例えば、静脈内注射又は注入で循環血液中に直接導入して)後、それ自体既知のいずれかの方法、例えば、NMR、MRI、PET又はいずれかの他の非侵襲的方法(使用する標識によって決まる)を用いて前記血栓を可視化することができる。

例えば、後述するナノ抗体 AU/VWFA-11をトレーサー剤として用いて患者の脈管構造内の血栓の位置を特定することができる。血漿内を循環するVWFとは対照的に、血栓中に存在するVWFは活性な血小板結合コンホメーションで存在する。ナノ抗体AU/VWFA-11は選択的に活性VWFを認識するので、このナノ抗体は血栓中に存在するVWFを選択的に標的にするだろう。従って、ナノ抗体を適切に標識すると、ナノ抗体は血栓の位置を特異的に特定することができる。適切な標識化として、限定するものではないが、放射線医療で用いられる放射性核種(例えば、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、磁気共鳴画像処理で用いられる標識(例えば、Gd)又は光学技術による検出用のマーカー(例えば、コロイド金)が挙げられる。

【0015】

本発明の方法を用いて、対象の循環内のいずれの点又は位置でせん断速度が高いか又は上昇した状態かを決定することができる。本発明により、循環におけるこのような高いか又は上昇したせん断速度の状態の存在が、血液中の活性化vWFのレベルの増加につながるということが分かった。従って、非活性化vWFの存在下でさえ選択的に測定できる、本発明の方法と結合作用因子を用いて、活性化vWFのレベルが上昇しているか - すなわちベースラインに比べて、及び/又は活性化vWFのレベルとvWFの総レベル(又は非活性化vWFのレベル)の比を測定することによって - を決定することができ、患者の循環のどこかに高いか又は上昇したせん断速度の状態が存在するという事実を臨床医に警告することができる。限定するものではないが、このことは、例えば、患者の体のどこかに全体的又は部分的な血流の制限(例えば、対象の1以上の血管(静脈及び/又は動脈)中の血栓又はアテローム斑の存在

10

20

30

40

50

のため)が存在することの指標でありうる。患者の血液循環における血流の制限及び/又は高いせん断速度の状態を付随する、及び/又はこのような制限及び/又は状態につながるこれら及び他の疾患、状態及び障害の例は当業者には明白であり、このようなすべての疾患、状態及び障害の(早期)検出及び/又は診断のために本発明で述べる方法と結合作用因子を使用できる。

【0016】

ここで、以下の非限定的な実験パートと添付の非限定的な図面を用いて、本発明をさらに説明する。

図1は、基準Nanobody(ナノ抗体)とAU/VWFa-11のwt-VWF及びリストセチン-活性化VWFに対する示差的結合性を示すグラフである。図1A/図1B: Pd-VWFをマイクロタイターウェルに固定化し(1 µg/ml, 4 で一晩)、種々の濃度のビオチン化した基準Nanobody(図1A, 0~625nM)とAU/VWFa-11(図1B, 0~10nM)と共にインキュベートした。結合した抗体をHRP-結合ストレプトアビジンで検出した。図1C/図1D: Pd-VWF被覆マイクロタイターウェルを種々の濃度のwt-VWFの存在下又は非存在下()、或いは1mg/mlのリストセチンと予めインキュベートした(5分, 室温)異なる濃度のVWFの存在下又は非存在下()で基準Nanobody(62.5nM, 図1C)とAU/VWFa-11(1.9nM, 図1D)と共にインキュベートした(基準Nanobodyでは0~90nM、AU/VWFa-11では0~20nM)。結合した抗体はHRP-結合ストレプトアビジンで検出した。VWFの非存在下における結合を100%に設定した。VWFの存在下における残存結合を比VWF(nM): 抗体(nM)に対してプロットした。データは、3回の実験の平均±SDを示す。

10

20

【0017】

図2は、AU/VWFa-11とA1ドメインとの相互作用の特性を示すグラフである。図2A: 種々の濃度のA1ドメイン(0~500nM)を、0.08pmol/mm²のAU/VWFa-11で被覆したCM5-センサーチップ上で20 µl/分の流速にて灌流した。チップ上で灌流したVWF/A1の濃度に対する平衡時応答(モルA1: モルAU/VWFa-11)をプロットした。図2B: VWF/A1(1238-1481)、VWF/A1(1261-1468)及びVWF/A1(1261-1468)/R1306Q(500nM)を、0.12pmol/mm²のAU/VWFa-11で被覆したCM5センサーチップ上で5 µl/分の流速にて灌流した。240秒間結合させてから、前記チップ上で緩衝液を灌流して解離させた。

【0018】

図3は、GpIb とAU/VWFa-11の異なる結合部位を示すグラフである。図3A: マイクロタイターウェルを4 で一晩wt-VWF(50mMのNaHCO₃緩衝液中37nM)で被覆した。室温で1時間ウェルをPBS中0.5%のPVPでブロッキング後、ウェルをAU/VWFa-11又は基準Nanobodyと共にインキュベートした(PBS中1.25 µM, 1時間, 室温)。PBSで洗浄後、GpIb-IX-V複合体を発現するCHO-細胞(0.1%のBSAを含むDMEM中1x10⁵個の細胞)を基準Nanobody又はAU/VWFa-11(1.25 µM)の存在下又は非存在下で結合させた。これら細胞の内因性のアルカリ性ホスファターゼ活性を測定することによって、これら細胞の結合をモニターし、抗体の非存在下における結合を100%に設定した。データは、3回の実験の平均±SDを示す。図3B~3D: III型コラーゲンで被覆した(30 µg/cm², 0.05mol/lの酢酸中)カバーガラス上、基準Nanobody又はAU/VWFa-11の非存在下(図3B)、或いは基準Nanobodyの存在下(31.3又は125nM, 図3C)又はAU/VWFa-11の存在下(62.5又は625nM, 図3D)で1600秒⁻¹のせん断速度にて全血を灌流した。図3E/図3F: pd-VWF(15 µg/ml)で被覆したカバーガラス上、625nMのAU/VWFa-11の非存在下(図3E)又は存在下(図3F)で、1600秒⁻¹のせん断速度にて再構成血液を灌流した。灌流後、付着した血小板をPBS中0.5%のグルタルアルデヒド中で固定し、メタノール中で脱水し、メイグリュンワルド(May-Grunwald)及びギムザ(Giemsa)染色した。図3G: コンピューター利用解析を用いて血小板の付着を評価し、血小板で覆われた表面の百分率として表した(n=3)。

30

40

【0019】

図4は、AU/VWFa-11への結合に及ぼすリストセチンとR1306Q変異の影響を示すグラフである。マイクロタイターウェルを一晩37 でAU/VWFa-11(50mMのNaHCO₃中5 µg/ml, pH 9.6)にて被覆し、PBS中3%のBSA、0.1%のTween-20で37 にて30分ブロッキングした。洗浄後、

50

種々の濃度のwt-VWF(四角)又はVWF/R1306Q(丸)(0~3.7nM)を含む培地でマイクロタイターウェルをインキュベートした。1mg/mlのリストセチンの存在下(白記号)又は非存在下(黒記号)で1時間37℃にて結合させた。PBS中0.1%のTween-20を用いてマイクロタイターウェルを洗浄し、HRP-結合ポリクロナール抗-VWF抗体とインキュベートした。ペルオキシダーゼ活性を測定することによって、結合したVWFを検出した。データは3回の実験の平均±SDを示す。

【0020】

図5は、2B型VWD血漿中に存在する活性化VWFを示すグラフである。図5A：AU/VWFa-11(5µg/ml)で被覆したマイクロタイターウェルをPBS中、3%のBSA、0.1%のTween-20で30分ブロッキングした。NPP(○)、正常な個体由来の血漿(n=9、白抜き記号)及びVED 2B型血漿(n=12、三角)をPBSに希釈して濃度範囲(0.23~0.93nM)を得た。洗浄後、前記希釈した血漿で1時間37℃にてウェルをインキュベートした。結合したVWFをHRP-結合ポリクロナール抗-VWF抗体で検出した。希釈した試料中のVWFの濃度を、測定したOD490nmに対してプロットした。NPPで見られる傾きを1に設定した。矢印は異なる2人のVWD 2B型患者について見られた勾配を示す。データは2回の実験の平均±SDを表す。図5B：活性化因子を式1を用いて計算し、点図としてプロットした。矢印は、図5Aの患者1と2について計算した活性化係数を表す。2B型VWD患者で見られる活性化係数は、正常な個体で見られる活性化係数より有意に高かった(p<0.001)。データは、2回の実験の平均±SDを示す。図5C：9人の2B型VWD患者について計算した活性化係数をこれら試料中の血小板数に対してプロットすると、相関関係が有意であることが分かった(p<0.003, R²=0.7401)。

10

20

【0021】

図6は、TTP血漿中の活性化VWFの検出を示すグラフである。図6A/図6C：AU/VWFa-11被覆マイクロタイターウェルをNPP(○)、正常な個体由来の血漿(n=9、○)及び後天性TTPをわずらう患者由来の血漿(図6A、n=12、○)又は先天性TTPをわずらう患者由来の血漿(図6C、n=5、○)と共にインキュベートした。インキュベーション前にVWFの濃度範囲(62~250ng/ml)を得るため、血漿を希釈した。結合したVWFをHRP-結合抗-VWF抗体でモニターした。希釈した試料中のVWFの量をHRP活性(OD490nm)に対してプロットした。傾きを計算し、NPPについて見られる傾きを1に設定した。矢印は後天性TTPをわずらう患者について見られる傾き(1)又は先天性TTPをわずらう患者について見られる傾き(2)を指し示す。図6B/図6D：活性化係数を計算し、点図にプロットした。矢印は図6Aと図6Cでプロットした患者で見られる値を指し示す。後天性及び先天性TTPで見られる活性化係数は正常な個体で見られる値より有意に高かった(後天性TTP対正常：p<0.0001及び先天性TTP対正常：p<0.03)。また、後天性TTPと比較すると、先天性TTPで見られる活性化係数は有意に上昇していた(p<0.05)。データは、2回の実験の平均±SDを示す。

30

【0022】

図7は、HELLP症候群における上昇した活性VWFレベルを示すグラフである。NPP、正常な個体の試料(n=9、○)と正常な妊娠している対照(n=9、○；“正常な妊婦”)、子癇前症をわずらう患者の試料(n=6、○；“子癇前症”)及びHELLP症候群の患者の試料(n=44、○)をPBSに希釈してVWFの濃度範囲を250~31.5ng/mlとした。希釈した試料をAU/VWFa-11被覆ウェル中(5µg/ml、4℃で50mMのNaHCO₃、pH 9.6で一晩被覆、一晩4℃にて)37℃で1時間インキュベートした。結合したVWFをHRP-結合ポリクロナール抗-VWF抗体で検出した。希釈試料中のVWFの量をHRP活性(OD490nm)に対してプロットした。傾きを計算し、NPPで見られる傾きを1に設定した。データは2回の実験の平均±SDを示す。

40

【0023】

〔実験パート〕

血小板とフォンビルブランド因子は一緒に血液循環中に存在するが、相互作用は損傷部位でのみ起こる。これら部位において、VWFは、血小板上の露出した内皮下マトリックスとGpIb-IX-V複合体との間の分子ブリッジとして作用する。この相互作用にはVWFのA1-ドメインのGpIb-結合コンホメーションへのシフトが必要である。本明細書では、ラマ抗体の可変ドメイン(“NanobodyTM”(ナノ抗体))AU/VWFa-11はVWFの非結合コンホメーション

50

ンと結合コンホメーションとを区別できることを論じる。この抗体の可変ドメインは、VWFの活性化時だけ露出されるA1ドメイン中の部位を認識する。単離されたA1ドメインに対するAU/VWFA-11の親和性は77nMであることが分かったが、フォンビルブラント病の2B型変異R1306Qの導入、又はリストセチンとのインキュベーションは結合効率を高めた。AU/VWFA-11を用いて、2B型VWDの血漿中のVWFのコンホメーション及び血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura(TTP))患者を研究した。これらの病気は異なる表現型の外観を有するが、両方とも自発的な血小板-VWF相互作用によって引き起こされる血小板減少によって特徴づけられる。2B型VWD患者及びTTP患者の血漿は、有意に増加したレベルの活性化VWFを含んでいた(それぞれ、 $p < 0.001$ 及び $p < 0.0001$)。さらに、2B型VWD患者では活性化VWFと血小板数との間に逆の相関関係が見られた。先天性形態のTTPの患者由来のVWFは、後天性TTP患者由来のVWFより有意に活性化されていた($p < 0.05$)。結論として、AU/VWFA-11免疫吸着アッセイを用いてTTPを検出することができ、かつ後天性TTPと先天性TTPを区別することができる。AU/VWFA-11免疫吸着アッセイは、他の疾患におけるVWFの役割を調査するための手段を提供することもできるだろう。

10

【0024】

損傷した血管壁への血小板の付着は、フォンビルブラント因子(VWF)を含む幾つかの要素が関与する多工程過程である。VWFは、多量体サブユニットの配列として血漿中で循環する接着性糖タンパク質である¹。この多量体構造により、VWFは内皮下マトリックスと血小板-表面糖タンパク質(Gp)Ib/IX/V複合体との間の分子ブリッジとして機能することができる。VWFとGpIb/IX/V受容体との複合体形成は、速く流れる血液に露出された血管表面上に血小板をつなぎ留めるために特に重要なものである²。

20

VWFとGpIb/IX/V複合体との間の相互作用は、両成分の特異的領域によって媒介される：VWF残基1238~1481(いわゆるA1ドメイン)はGpIbとの残基1~290の相互作用部位を含む³。この複合体の構造は原子レベルで解析されているが⁴、この相互作用に関して不明なままの問題もある。例えば、VWFとGpIbが血液循環中に一緒に存在するという概念にもかかわらず、正常な状態下ではその相互作用が生じない。対照的に、単離された組換えA1ドメインはGpIbへの自発的な結合を示す。明らかに、その多量体環境における非結合態様から結合態様のVWF A1ドメインへのシフトは複合体形成を誘導するために必要である⁴。しかし、この活性化工程の分子的根拠はあまり知られていない。

30

【0025】

A1ドメインの活性化はいくつかの手段によって誘導できる。A1ドメインの非生理的活性化は、ガラス又はプラスチック等の人工表面上への精製VWFの直接の固定化を通じて起こる。VWFのin vitro活性化は、ヘビ毒成分ボトロセチン(botrocetin)又は抗生物質リストセチン等のモジュレーターの添加によっても達成される^{5,6}。さらに、VWFの生理的活性化は、VWFの内皮下マトリックス成分コラーゲンへの結合時、又は非常に高いせん断応力の条件下で誘導される。また、種々の病理学的条件もVWFと血小板GpIbとの間の時期尚早の複合体形成をもたらす。VWFのA1ドメインにおけるいくつかの機能獲得型変異はGpIbに対する親和性を高めうる。このような変異は2B型フォンビルブラント病と関連し、その患者は血漿由来の高分子量の多量体の損失、高いリストセチン誘発血小板凝集、持続する出血時間及び血小板減少によって特徴づけられる^{7,8}。自発的な血小板の付着を許容することが報告されている別の条件は多量体VWFの大きさに関する。多量体VWFは内皮細胞内のパイベル・パラデ小体(Weibel-Palade body)中に貯蔵され、刺激によって放出される^{9,11}。新しく放出されたVWFは超大型(UL)-VWF多量体に富んでおり、いかなるモジュレーターが存在しなくても血小板と結合する潜在力を有する¹²。循環内でのUL-VWF分子の直接放出は、内皮表面におけるこれら多量体のタンパク質分解によって妨げられる¹³。この過程は最近同定されたプロテアーゼADAMTS-13によって媒介され、このプロテアーゼは成熟VWFをMet1605及びTyr1606間で切断する^{14,15}。ADAMTS-13によって切断されると、残りの多量体は自発的に血小板に結合する能力を失った。ADAMTS-13活性の重要性は生命を脅かす病気である血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)によって実証され、この病気では、ADAMTS-13活性が低い又は存在しない。ADAMTS-13欠損は、阻害性抗体によって(後天性TTP)¹⁶

40

50

、又はADAMTS-13をコードする遺伝子の変異によって(先天性TTP)^{17,18}引き起こされる。ADAMTS-13活性の非存在下では、過剰なUL-VWF多量体が循環中に放出され、微小血管内における自発的な血小板の結合と引き続く血栓形成をもたらす¹⁹。これが溶血性貧血、腎不全、神経脱落症候、発熱及び時には昏睡状態を引き起こす²⁰。

2B型VWD及びTTPは異なる表現型の外観と関連するが、これらは、循環するVWF多量体の少なくとも一部が活性コンホメーションで存在するであろうということが共通している。リストセチン依存性の血小板凝集を測定することで活性化VWFの存在を決定できる。しかし、この方法は感受性が低く、VWF抗原が低いときは使えない。本明細書では、固定化されたVWFを認識するが天然のVWFを認識しないラマ-由来のモノクローナル抗体の可変ドメインが記載され、この抗体の可変ドメインが、VWFの活性化によって露出されるようになるVWFのA1ドメイン内のエピトープを認識することを示唆している。引き続きこの抗体の可変ドメインを用いて2B型VWD患者とTTP患者の血漿試料中の活性化VWFの存在をモニターした。この分析は、両患者群の循環中では活性化VWFのレベルが正常な個体に比べて2~10倍上昇していることを明らかにした。

【0026】

〔材料及び方法〕

タンパク質と抗体：

記載されたように組換えGpIb (残基1~290)を発現させ、精製した⁴。GpIb 抗体(2D4)は、H. Deckmyn博士(Kortrijk, Belgium)から親切にも提供されたものである。ポトロセチンはKordia研究室供給(Leiden, The Netherlands)から購入した。血漿由来の(pd)-VWFを凍結沈降物(Haemate P 250 IE, Behringwerke AG, Marburg, Germany)から記載通りに精製した²¹。ウシ血清アルブミン及びヒト胎盤コラーゲンIII型はSigmaから得、ヒトアルブミン(Fraction V)はMP Biochemicals(Irvine, CA USA)から得た。VWFに対するポリクローナル抗体とVWFに対するHRP-結合抗体はDakocytomation(Glostrup, Denmark)から得た。

【0027】

組換えタンパク質の構築と発現：

wt-VWFとVWF/R1306Qをコードする発現ベクター-pNUTの構築は以前に記載された²²⁻²⁴。VWF/A1(1261~1468)とVWF/A1(1261~1468)-R1306Qを発現ベクター-pPIC9にクローン化し、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)で過剰発現させた⁴。フォワードプライマー-5'-GGA TCCCAGGAGCCGGGAGGCCTGGTGG-3'及びリバースプライマー-5'-GCGGCCGCCCGGGCCACAGTGACT TG-3'でPCR産物を生成することによってpNUT-VWF/A1(1238~1481)を構築した。この際、pNUT-VWFを鋳型として使用した。配列解析後、C-末端の6-ヒスチジンタグを含むBamHI-NotI消化pNUTベクターにBamHI-NotIフラグメントを連結した。ベイビーハムスターの腎臓細胞(プロペプチドの正確な除去のためのフューリンも過剰発現している)内でwt-VWF、VWF/R1306Q及びVWF/A1(1238~1481)を安定的に発現させた²²。記載された通りに無血清条件培地から全長タンパク質を精製した²⁵。Ni²⁺/NTAクロマトグラフィーを用いて発現培地からVWF/A1(1238~1481)を精製した⁴。VWF/A1(1261~1468)とVWF/A1(1261~1468)-R1306Qをピキア・パストリスで発現させてヘパリンセファロース上で精製後、ゲルろ過した⁴。SDS-PAGEによる分析は、すべての組換えタンパク質が均質に精製されたことを示した。以前に記載されている通りに0.1% SDS、1% アガロースゲル電気泳動を用いてwt-VWFとVWF/R1306Qの多量体構造を解析した。

【0028】

抗体の可変ドメイン(NanobodiesTM)の生産と選択：

高分子量の多量体を含むwt-VWF調製物で免疫してラマ抗体を産生させた。免疫及びライブラリー構築は記載されたように行った²⁷。抗体の可変ドメインの選択のため、Maxisorpマイクロタイタープレート(NUNC, Denmark)のウェルを50mMのNaHCO₃緩衝液中5µg/mlのVWF/A1(1238~1481)で被覆した(pH 9.6, 4 で一晩)。洗浄後、1%のカゼインを含むPBS(PBS-C)で室温にて3時間ウェルをブロッキングし、ファージと共にインキュベートした(室温で2時間)。ウェルをPBSで10回洗浄し、結合したファージを0.2Mのグリシン緩衝液(pH 2.4

、室温で20分)で溶出した。溶出されたファージを指数関数的に増殖している大腸菌TG1細胞に加え²⁸、細胞をLB-アンピシリン上に蒔いた。第2ラウンドでは、ファージを10 µg/mlの組換えwt-VWFに再懸濁させた後、VWF/A1(1238~1481)被覆マイクロタイターウェル中でインキュベーションした。ウェルを30分10 µg/mlのwt-VWFで7回洗浄し、結合したファージを溶出してTG-1細胞を感染させた。TG-1細胞培養に1mMのイソプロピル-β-D-ガラクトピラノシドを添加して発現を誘導し(OD600nm=0.5)、記載されたようにペリプラズムタンパク質を抽出し²⁹、被覆VWF/A1(1238~1481)(2 µg/ml)への結合について分析した。ポリクロナールウサギ-抗-ラマ抗体(Dakocytomation)とHRP-結合ヤギ-抗-ウサギ抗体(Ablynx, Zwijnaard, Belgium)で結合を検出した。すべてのポジティブクローンのDNAをHinfIで消化し、異なるHinfIパターンのクローンを用いて大腸菌の非サブレッサー株、WK-6細胞を形質転換させた²⁷。ペリプラズム試料を記載されたように調製し、Ni²⁺/NTA樹脂を用いて抗体の可変ドメインを均質に精製した。

10

【0029】

競合アッセイ：

AU/VWFa-11と活性化VWFとの相互作用の特異性を免疫吸着アッセイで評価した。このアッセイでは、精製したpd-VWF(3.7nM)をマイクロタイターウェル(Costar, Cambridge MA, USA)に固定化した。3%のBSAと0.1%のTween-20を含むPBSで37 °Cにて1時間ウェルをブロックし、種々の濃度の基準Nanobody(WO 04/062551に従う)とPBS中のビオチン化AU/VWFa-11(0~625nM)と共に37 °Cで1時間インキュベートした。HRP-結合ストレプトアビジンで抗体の可変ドメインの結合をモニターし、半最大結合時の抗体濃度を決定した。これら濃度を競合アッセイで用い、pd-VWF被覆ウェルを指示濃度のwt-VWF又は1mg/mlのリストセチンとプレインキュベートした(室温で5分)wt-VWFの非存在下又は存在下の抗体とインキュベートした(基準Nanobodyについては0~115nMの可溶性VWF及びAU/VWFa-11については0~38nM)。洗浄後、ウェルをHRP-結合ストレプトアビジン(Dakocytomation, Denmark)とインキュベートし、基質としてo-フェニレンジアミン(OPD)を用いてHRP-活性を測定することで結合を検出した。

20

【0030】

表面プラズモン共鳴分析：

Biacore 2000システム(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を用いて、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance(SPR))結合研究を行った。供給業者(Biacore AB, Uppsala, Sweden)が指示している通りにアミン-カップリングキットを用いてCM5センサーチップ上にAU/VWFa-11を固定化した。VWFのA3ドメインを認識するナノ抗体、V128Hを対照として用いた。V128H被覆チャンネルへの結合に対してVWF/A1(1238~1281)、VWF/A1(1261~1468)及びVWF/A1(1261~1468)-R1306Q(2B型突然変異)のAU/VWFa-11被覆チャンネルへの結合を補正した。VWF構成物の固定化Nanobodiesへの結合は150mMのNaCl、25nMのHepes、0.005%のTween-20(pH 7.4)中25 °Cで5 µl/分の流速にて行った。引き続き50mMのトリエチルアミンとギ酸緩衝液(10mMのNaHCO₂と150mMのNaCl pH 2.0)を施して表面の再生を行った。

30

【0031】

GpIb-IX-V複合体を発現するCHO-細胞の固定化VWFへの静的付着：

50mMのNaHCO₃(pH 9.6)中、マイクロタイターウェル(NuncIon, NUNC, Denmark)で4 °Cにて一晚wt-VWF(37nM)を固定化した。PBS中0.5%のPVPで室温にて1時間ウェルをブロックし、1.25 µMのAU/VWFa-11又は基準Nanobodyとインキュベートした(室温で1時間)。PBSで3回洗浄後、GpIb-IX-V複合体を発現するCHO-細胞(Lopez博士からの提供、0.1%のBSAを含むDMEM中1x10⁵個の細胞)を基準Nanobody又はAU/VWFa-11(1.25 µM)の存在下又は非存在下で固定化VWFに結合させた(37 °Cで90分)。ウェルを洗浄し、溶解緩衝液(1%のTriton-X-100中3mg/mlのPNP、50mMの酢酸、pH 5.0)に希釈したp-ニトロフェニルホスファート(PNP, Sigma)を基質として用いてCHO-細胞の内因性のアルカリ性ホスファターゼ活性を測定することによって細胞の結合を検出した。

40

【0032】

III型コラーゲン及びVWFへの血小板の付着：

50

先行する10日の間アスピリン又は他の非ステロイド性抗炎症薬の摂取をしなかった健康なボランティアから採取した全血でIII型コラーゲン上の灌流を行い、50 µg/mlのPPACK(H-D-Phe-Pro-Arg-クロロメチルケトン, Bachem, Torrence, CA USA)及び20U/mlの五糖の0.1容中に灌流した。Thermanoxカバーガラス(NUNC, Denmark)をコラーゲンIII型で被覆し³⁰、全血をカバーガラス上で5分1600秒⁻¹にて灌流した。VWF被覆カバーガラス上の灌流は記載通りに³⁰、再構成した血液で1600秒⁻¹のせん断速度で行った。灌流後、該スライドを洗浄し、固定化および染色し³⁰、OPTIMAS 6.0ソフトウェアによるコンピューター利用解析で血小板の付着を評価した(Dutch Vision Systems BV, Breda, The Netherlands)。すべての灌流を3回行った。

【0033】

患者材料：

Vacutainerシステムを用いて3.1%のクエン酸塩中に健康ドナー(n=9)、2B型VWDの患者(n=10)及び後天性TTPの患者(n=12)又は先天性TTPの患者(n=5)の血漿試料を収集した。血小板減少を伴う常染色体遺伝性出血障害、高リストセチン誘導血小板凝集及びゲル電気泳動で高い多量体のVWF多量体の非存在という典型的パターンのファミリーで2B型VWDが診断された。後天性血栓性血小板減少性紫斑病の患者は血小板減少、クームス(Coombs)陰性溶血性貧血及び末梢血中の断片化赤血球の存在によって特徴づけられる。溶血性貧血及び血小板減少の他の原因を排除し、すべての患者を血漿交換によって治療した。血漿交換に対する応答をすべての患者で観察した。治療前に血漿試料を採取し、これら試料中にADAMTS-13活性が存在しないことが分かった。先天性型TTPの5人の患者の血漿試料は親切にJ.P. Girma(Hospital de Bicetre, Paris, France)によって提供された血小板不足血漿(PPP)を等分して-80℃で凍結させた。正常なプール血漿(NPP)として、40人の健康なドナーのPPPをプールして小分けして-80℃にて貯蔵した。すべての患者に、科学目的のために血液をサンプリングすることについてインフォームドコンセントを与えた。

【0034】

活性化VWFについての免疫吸着アッセイ：

前に記載した通りにVWF抗原レベルを定量化した²⁶。マイクロタイターウェル(Maxisorb, NUNC, Denmark)を50mMのNaHCO₃(pH 9.6)中5 µg/mlのAU/VWFa-11で4℃にて一晚被覆し、3%のBSAと0.1%のTween-20を含むPBSで37℃にて30分ブロックした。0.1%のTween-20を含むPBSで3回洗浄し、wt-VWF又はVWF-R1306Qを含む培養基、又は血漿試料と共にインキュベートした(37℃で1時間)。すべての試料をPBSで希釈して0.23~1.85nMのVWF濃度にした。PBS-Tweenで3回洗浄後、プレートをHRP-結合ポリクロナル抗-VWF(1.3 µg/ml)とPBS中37℃で1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tweenで3回洗浄し、基質としてo-フェニレンジアミン(Merck, Germany)を用いてHRP-活性を測定することで結合を検出した。各ELISAで正常なプール血漿(NPP)を標準物質として用いた。下記の式1を用いて種々の血漿試料の傾きを、NPP結合について見られる傾きと比較した。式1で計算される係数を活性化係数とした。

$$(\text{傾き}_{\text{試料}} / \text{傾き}_{\text{NPP}}) = \text{活性化係数 (式1)}$$

【0035】

AU/VWFa-11免疫吸着アッセイの変動：

AU/VWFa-11免疫吸着アッセイの実験内変動を決定するため、1つのマイクロタイタープレートのAU/VWFa-11被覆ウェルを1つの試料(正常な個体番号7)と共に10回インキュベートした。さらに、試料番号7を10回の異なる実験で測定して実験間変動を決定した。標準物質としてNPPを用いて活性化係数を計算した。実験内変動は7.1%であり、異なる実験間の変動は13.7%だった。

データ解析と統計：

Graph Pad Prism(ウィンドウズ(登録商標)用のGraphPad Prismバージョン4, GraphPad Software, San Diego, CA)を用いてSPRデータ及びAU/VWFa-11免疫吸着アッセイデータの解析を行った。データを標準偏差と共に平均として表現した。異なる患者群間でウェルチ(Welch)補正をした独立t-検定(un-paired t-test)を行って活性化VWFの平均レベルを比

10

20

30

40

50

較した。p<0.05を有意と考えた。

【 0 0 3 6 】

〔 結果 〕

ナノ抗体AU/VWFA-11はVWFの活性コンホメーションを特異的に認識する：

活性化VWFを優先的に認識するが、未変性VWFを認識しない抗体を得るため、UL-VWF(20サブユニットを超える多量体サイズ)を含む精製VW調製物でラマを免疫した。続いて、この動物の抗体レパートリーをクローン化し、ファージ-ディスプレイ法によりモノクローナル抗体の可変ドメインをその固定化VWFに結合する能力について選択した。この手順で単離された抗-VWF抗体の可変ドメインを固定化組換えA1フラグメントへの結合についてスクリーニングした。得られた可変ドメインのうち、さらなる解析のため、AU/VWFA-11及び基準Nanobodyの2つを選択した。天然VWFとリストセチン-活性化VWFとを区別するその能力について両ドメインをモニターした。この目的のため、精製組換えwt-VWFをマイクロタイターウェルに固定化した。この手順は該分子内のコンホメーションの変化をもたらし、活性化VWFに特異的な抗体の結合を可能にする。予想されるように、どちらのピオチン化抗体も用量依存様式及び飽和様式で固定化されたVWFに結合した。50%最大結合は、基準Nanobodyでは62.5nMで得られ、AU/VWFA-11では1.9nMで得られた(図1 A/B)。これら濃度を競合アッセイで用い、種々濃度の可溶性wt-VWF又はリストセチンとブレインキュベートしたwt-VWFの存在下で該抗体の結合を調べた(図1 B)。等モル濃度の両競合相手の存在は、ピオチン化した基準Nanobodyの結合を±90%減じた。対照的に、ピオチン化したAU/VWFA-11の結合は20倍モル過剰のwt-VWFの存在下でも影響を受けなかったが、リストセチン-活性化VWFは用量依存様式で結合を阻害した。明らかにAU/VWFA-11は少なくとも部分的に活性化コンホメーションであるVWFを選択的に認識する可能性を有する。

10

20

【 0 0 3 7 】

AU/VWFA-11はA1ドメイン中のエピトープを認識する：

次に、ナノ抗体 AU/VWFA-11とVWFのA1ドメインとの相互作用を詳細に調査した。まず、AU/VWFA-11とVWF/A1(1238~1481)との相互作用をSPR分析を用いて定量様式でモニターした。種々濃度のVWF/A1(1238~1481)(0~500nM)を固定化AU/VWFA-11(0.08pmol/mm²)上で流速20µl/分にて灌流した。VWF/A1(1238~1481)は用量依存様式、飽和様式及び可逆様式で固定化Nanobodyと会合した(図2 A)。単離されたA1ドメインの固定化AU/VWFA-11への結合の平衡に基づく解析により、77nMという親和定数が明らかになった。別のアプローチでは、A1ドメインの3つの変種：VWF/A1(1238~1481)(A1ドメインのフランキング領域を含む)、VWF/A1(1261~1468)(該フランキング領域を欠いている)及びVWF/A1(1261~1468)-R1306Q(2B型変異 Arg1306 Glnを含有)へのNanobody AU/VWFA-11の結合を比較した。3つすべてのVWF/A1ドメインをAU/VWFA-11被覆(0.12pmol/mm²)CM5センサーチップ上で流速5µl/分にて灌流し、Nanobodyを結合させた(図2 B)。AU/VWFA-11被覆チップ上でのVWF/A1(1261~1468)の灌流は、VWF/A1(1238~1481)の灌流より高いシグナルという結果になった。さらに、VWF/A1(1261~1468)-R1306QはVWF/A1(1261~1468)より効率的に結合した。これらの結果は、確かにNanobody AU/VWFA-11のエピトープの露出がA1ドメインの活性化に依ることを示唆しうる。

30

40

【 0 0 3 8 】

GpIbとAU/VWFA-11は、A1ドメイン内の異なる領域に結合する：

リストセチン、VWFの固定化、又は2B型VWD変異によって誘導されるコンホメーションがGpIbへの結合を促進し、かつこのコンホメーションはAU/VWFA-11によっても特異的に認識される。従って、AU/VWFA-11とGpIbはA1ドメインの同様の領域に結合するという可能性を考えた。このことをまず静的付着アッセイで試験した。このアッセイでは、GpIb-IX-V複合体を発現するCHO-細胞を上記基準Nanobody又はNanobody AU/VWFA-11の存在下又は非存在下で固定化wt-VWFに結合させた。予測されるように、CHO-細胞は効率的に固定化VWFに結合し(図3 A)、VWFの固定化がGpIb-結合コンホメーションへのシフトを誘導することを確認する。この相互作用は1.25µMの基準Nanobodyによって部分的に阻害された(59%まで)。対照的に、1.25µMのAU/VWFA-11の存在下でさえ、CHO-細胞の固定化VWFへの結合は

50

影響を受けないままであり、AU/VWFa-11の結合部位はGpIb の結合部位とは異なることを示唆している。

GpIb へのVWFの結合に及ぼす両ナノ抗体の影響は流れ条件下で異なりうるので、その灌流アッセイでの影響を研究した。ヒト全血を高いせん断(1600秒^{-1})でコラーゲンIII型表面上で灌流した。この条件下、血小板の付着はVWFとGpIb との相互作用に完全に依存する³¹。ナノ抗体の非存在下では、この条件の結果、血小板被覆 $67.8 \pm 8.3\%$ ($n=3$)となった(図3 B)。基準Nanobodyの存在は、血小板被覆の減少と関連した(31.3nM 及び 125nM 抗体の存在下、それぞれ $49.8 \pm 4.5\%$ 及び $24.9 \pm 3.1\%$)(図3 C)。対照的に、 625nM の抗体AU/VWFa-11の存在下でさえ、血小板被覆は、抗体AU/VWFa-11が存在しない場合と同様だった($73.3 \pm 4.4\%$ 、図3 D)。さらに、AU/VWFa-11の存在下、VWF-表面への血小板の付着は影響を受けないままだった(図3 E / 3 F)。これらのデータはGpIb と抗体AU/VWFa-11はA1ドメインの異なる領域に結合するという観点と適合しうる。

【0039】

溶液中の活性化VWFの検出のための免疫吸着アッセイ：

GpIb とナノ抗体 AU/VWFa-11はVWFの異なる部位に結合するが、両方とも、例えば固定化、リストセチン又は2B型VWD変異によって誘導される活性化形態のVWFだけを認識することが共通している。このユニークな特徴が、この抗体を溶液中の活性化VWFの検出のために使用できるようにする。第1例として、組換えwt-VWF及び組換えVWF/R1306Qの固定化ナノ抗体AU/VWFa-11への結合を比較した。そこで、この特定のナノ抗体をマイクロタイターウェルに固定化し、リストセチンの非存在下及び存在下で、種々の濃度($0 \sim 3.7\text{nM}$)のwt-VWF及びVWF/R1306Qとインキュベートした。引き続きVWFに対するHRP-結合ポリクロナール抗体を用いて、結合したVWFの量をモニターした。wt-VWFに関し、いくらかの結合を観察できたが、吸光度値は0.3未満のままだった(図4)。リストセチンを添加すると、結合が大いに増加し、吸光度の6倍の増加で表される(1.85 まで)。この差を曲線の開始直線部のそれぞれの傾きを計算することによって数量化した。これは、VWF/リストセチンの傾きがwt-VWFのみの傾きに比べて2.7倍に増えることを明らかにした。wt-VWFと比較した傾きの同様の増加がリストセチンの非存在下でのVWF/R1306Qで観察された(図4)。さらに、この増加は、リストセチンの存在下でさらに増強されることはなかった。このアッセイは明らかに活性コンホメーションのA1ドメインを含む循環しているVWFを検出するための有用な手段を提供する。

【0040】

患者の血漿中の活性化VWFの検出：

ナノ抗体 AU/VWFa-11は溶液中の活性なVWFの検出で特に有効であったので、このナノ抗体が患者の血漿中の活性なVWFの検出のために使用できるかどうか試験した。まず、以前に2B型として定義された患者の血漿を解析し、正常な個体群も同様に解析した。基準として正常なプール血漿(NPP)を使用した(「材料及び方法」参照)。NPPについて得られた吸光度値は低いままであり(図5 A)、その傾きを1とした。正常な各個体についても、低い吸光度しか検出されず、正常な個体の血漿中の低量の活性VWFを示唆している(図5 A)。NPPと比較した平均の傾きは 0.70 ± 0.13 だった($n=9$ ；図5 B)。対照的に、2B型VWD患者の血漿では、非常に増加した吸光度値によって示されるように(図5 A)、高量の活性VWFを定量できた。その平均の傾きを計算すると 8.4 ± 4.5 だった($n=10$ ；正常な個体に比し $p=0.0006$ ；図5 B)。従って、このアッセイは、実際、患者の血漿中の活性なVWFの存在を解析するために有用であると考えられる。

【0041】

VWF活性化と血小板数の相関：

興味深いことに、2B型VWD患者の血漿中のVWFについて決定される活性化係数はかなり変動した($1.95 \sim 14.0$)。正常な個体の血漿中ではこの変動は見られなかった($0.51 \sim 0.89$)。2B型突然変異を含むVWFは自発的に血小板に結合し、血小板とVWFの両方のクリアランスを高めることとなる。従って、循環中のVWFの相対的な活性化は血小板-VWF複合体の形成に影響を与える可能性を考えた。この問題を取り扱うため、種々の血漿試料中の血小板数を

測定し、この数を活性化係数に対してプロットした。これらのパラメーター間には強い逆相関が見られた(図5C、 $p < 0.003$ 、 $R^2 = 0.7401$)。

【0042】

TTP患者の血漿中の活性化VWFの検出：

血漿中の活性VWFの存在について解析した第2群の患者はADAMTS-13活性を欠く患者であり、臨床的にTTPと明示された患者である。2つの群を区別することができた：1群はADAMTS-13を先天的に欠損している患者として定義され($n=5$)、第2群はADAMTS-13の後天性欠損を有した($n=12$)。正常な個体群に比し(上記参照)、後天性ADAMTS-13欠損を有する患者はその血漿中の活性VWFのレベルが上昇しているようだった。平均の傾きを計算すると 1.52 ± 0.40 で($p < 0.0001$)、正常な個体群に比べて有意に高い。先天性ADAMTS-13欠損の患者もその血漿中に活性VWFを含んでいた。興味深いことに、活性VWFの量(傾き = 5.85 ± 3.3)が正常な個体に比べて増加するのみならず($p < 0.03$)、後天性ADAMTS-13欠損患者に比べても増加していた($p < 0.05$)。さらに、正常な個体及び2つの患者群のそれぞれの間では傾きの値は重ならなかった。このことは、後天性ADAMTS-13欠損と先天性ADAMTS-13欠損を迅速に区別できるという点で、このアッセイがADAMTS-13欠損の診断に有用でありうることを示唆している。

10

【0043】

HELLP症候群におけるGpIb-結合コンホメーションのVWF：

血小板減少によって特徴づけられる第3の病的状態はHELLP症候群(溶血、高い肝臓酵素と低い血小板(Haemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets))である。VWF抗原レベルは正常な妊娠中に増加し、また子癇前症及び子癇前症の重症形態であると考えられるHELLP(溶血、高い肝臓酵素と低い血小板)をわずらう患者ではさらに増加する。HELLPは消耗的な血小板減少によって特徴づけられ、母親と新生児の罹患率及び死亡率について危険である。正常な妊娠対照($n=9$)、子癇前症の患者($n=6$)及びHELLP症候群の患者($n=44$)についての免疫吸着アッセイでAU/VWFa-11へのVWFの結合を分析した。子癇前症の患者について計算した活性化係数は、健康な妊娠対照に比べて有意には増加していなかった。しかしながら、HELLP症候群を患う患者においては活性化VWFのレベルは正常な妊娠対照に比べて有意に増加し($p < 0.0001$)、子癇前症の患者に比べて有意に増加していた($P < 0.0001$)。VWF-活性化係数は、同一試料で測定したVWF抗原レベルとVWFリストセチン補因子活性の両方と有意に相関した(スピアマンの順位相関係数 0.908 、 $p < 0.0001$)。

20

30

【0044】

〔考察〕

損傷した血管壁への血小板の付着の際、VWFは露出した内皮下マトリックスとGpIb-IX-V複合体との間の分子ブリッジとして機能する。GpIbとVWFのA1ドメインとの間の相互作用には、非結合態様から結合態様へのシフトによる活性化が必要である。2B型VWDやTTP等の種々の病的状態下では、VWFと血小板との間の自発的な相互作用が生じるが、従来、血漿中でこのような活性化VWF分子の存在を直接検出するためのアッセイは開発されていなかった。本明細書では、静止状態のVWFと活性化状態のVWFを区別できる抗体とその可変ドメインを開示する。この抗体を用いて、2B型VWD及びTTPの患者の血漿中で活性化VWFが循環することが示された。

40

VWFのGpIb-結合コンホメーションとGpIb-非結合コンホメーションを区別できるであろう抗体を開発するため、組換えwt-VWFでラマを免疫した。ラマは、かなりの比率の機能性免疫グロブリンを、軽鎖を欠く重鎖のホモダイマーとして産生する³²。この抗体は小さく(16kD)、その対する抗原と特異的に、かつ対する抗原に対して高い親和性で反応すると報告されている²⁷。さらに、ライブラリーを作製してファージディスプレイ法を用いて多くの抗体をスクリーニングすることが比較的容易である。この手順によりナノ抗体、AU/VWFa-11が得られ、このナノ抗体はVWFをリストセチンとプレインキュベートした場合、A1ドメインを特異的に認識することが分かった(図1)。2B型VWD変異、R1306Qを導入した場合も、VWFのA1ドメイン中のAU/VWFa-11の結合部位が露出された(図2B及び図4)。Dumasらは³³、R1306Q変異がコンホメーションの変化を誘発し、結果としてGpIbとの強く、自発的

50

な相互作用をもたらすモデルを示した。このことは、VWFがGpIb結合コンホメーションのときだけ露出される領域にAU/VWFa-11が結合することを示唆しうる。

【0045】

我々は、AU/VWFa-11がGpIb-結合部位内の領域を認識する可能性を考えた。しかし、組換えGpIbへのVWFのボトロセチン誘導結合は過剰のAU/VWFa-11によって影響を受けなかった。さらに、GpIb-IX-V複合体を発現するCHO-細胞の固定化VWFへの結合及びコラーゲンIII型、又は流れ条件下のVWFへの血小板の結合は、過剰のNanobodyの存在下で変化しないままだった。これらの観察は、GpIb及びAU/VWFa-11はA1ドメインの異なる部位に結合すること、或いはGpIbのその結合部位に対する親和性はAU/VWFa-11の親和性より高いことを示唆している。ラマ抗体は対する抗原に高い親和性で結合することが分かっているの

10

で、後者はありそうもない。
AU/VWFa-11の結合部位をさらに同定するための試みでは、該抗体ドメインへの2種の異なるA1ドメインの結合を研究した。抗体の選択で用いたA1ドメイン、VWF/A1(1238~1481)は該A1ドメインのN-末端及びC-末端フランキングペプチドも含有している。SPR分析は、これらフランキングペプチドの除去がAU/VWFa-11に対する結合部位の露出を改善することを明らかにした(図2B)。AU/VWFa-11はVWFのGpIb-結合コンホメーションに特異的なので、この結果は、A1ドメインのフランキング領域が非結合コンホメーションから結合コンホメーションへのシフトの役割を果たすことを示唆している。これらの結果は、フランキングペプチドがGpIbとVWFとの間の相互作用に影響を与えることを示唆しているNakayamaらの報告³⁴と一致する。

20

【0046】

このように、リストセチンに誘導される血小板の活性化を用いて、VWFのGpIb-結合能を測定することが多い。このアッセイは血漿VWFの反応性を測定できるが、生理的でないリストセチン誘導型凝集に基づいている。AU/VWFa-11は、天然VWFとGpIb-結合コンホメーションにあるVWFを区別するように特異的に設計された。その活性を測定するため非常に低量のVWFしか必要でなく、このためAU/VWFa-11ベース免疫吸着アッセイは、TTPなどの低いVWF抗原レベルの疾患においてVWFの該コンホメーション状態を測定するために好適である。さらに、AU/VWFa-11は、VWFの固定化、リストセチンとのインキュベート、又は2B型VWD変異などの種々の方法で誘導しうる活性化によって露出される部位を認識する。このため、AU/VWFa-11免疫吸着アッセイは異なる病的状態下でVWFのコンホメーション状態を研究

30

するため非常に有用である。
GpIb-結合コンホメーションVWFと非結合コンホメーションのVWFを区別するAU/VWFa-11のユニークな特徴のため、AU/VWFa-11は、健康な抗体とAU/VWFa-11は2B型VWD及びTTPをわづらう患者の血漿中のVWFを研究することができる。健康な個体とNPPの血漿は、固定化AU/VWFa-11へのVWFのほんの僅かな結合しか示さず、循環しているVWFの大部分が非結合コンホメーションであることを示唆している。いくらかの残存結合が見られ、生理的状态下でさえ小割合のVWF分子が活性化コンホメーションで循環することを示している。

【0047】

続いて、2B型VWD及びTTPにおけるVWFの活性化係数を測定した。

これらの2つの表現型的に異なる疾患は、両方とも自発的な血小板-VWF相互作用によって生じる血小板減少によって特徴づけられる。両疾患では、正常個体に比べて活性化VWFの有意な増加が見られた(図5及び6)。さらに、2B型VWD患者の血漿中のVWFについて測定した活性化と血小板数の間には逆相関関係が見られた(図5C)。これは血小板減少の発症における活性化VWFの直接的な役割を示している。

40

興味深いことに、AU/VWFa-11を先天性TTPの患者由来の血漿とインキュベートすると、活性化係数が正常な個体に比べて有意に上昇するのみならず、後天性TTPの患者に比べても上昇することが明らかになった。病院に入院時、血漿交換により治療する前に後天性TTPの患者の血漿試料を収集した。この時点では、微小血管中で見られる血小板に富む血栓中にかなりの部分の活性化VWFが存在しうるだろう。このことが、後天性TTPと先天性TTPとの間の活性化VWFのレベルの差異を説明できるだろう。他方、後天性TTPと先天性TTPの

50

異なる分子的背景もVWFの活性化の差異を説明できるだろう。さらに研究を行わなければならないが、AU/VWFa-11免疫吸着アッセイは後天性TTPと先天性TTPを区別するための有用な手段のようである。

要約すると、本明細書で述べる新しいNanobody（ナノ抗体）はVWFの静止状態と活性化状態を区別することができる。AU/VWFa-11免疫吸着アッセイは血漿中の活性化VWFの検出を可能にし、このため該アッセイは異なる疾患におけるVWFの役割を調査するための非常に有用な手段である。

【 0 0 4 8 】

〔参考文献リスト〕

- (1) Ruggeri ZM. Von Willebrand factor. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:142-149.
- (2) Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289-297.
- (3) Vicente V, Houghten RA, Ruggeri ZM. Identification of a site in the alpha chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem*. 1990;265:274-280. 10
- (4) Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA et al. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. 2002;297:1176-1179.
- (5) Berndt MC, Du XP, Booth WJ. Ristocetin-dependent reconstitution of binding of von Willebrand factor to purified human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry*. 1988;27:633-640.
- (6) Scott JP, Montgomery RR, Retzinger GS. Dimeric ristocetin flocculates proteins, binds to platelets, and mediates von Willebrand factor-dependent agglutination of platelets. *J Biol Chem*. 1991;266:8149-8155. 20
- (7) Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, Ciavarella N, Zimmerman TS. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med*. 1980;302:1047-1051.
- (8) Ruggeri ZM, Zimmerman TS. von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood*. 1987;70:895-904. 30
- (9) Ruggeri ZM, Ware J. The structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost*. 1992;67:594-599.
- (10) Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:395-424.
- (11) Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. Identification of a large precursor polypeptide chain. *J Biol Chem*. 1983;258:2065-2067. 40

- (12) Arya M, Anvari B, Romo GM et al. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood*. 2002;99:3971-3977.
- (13) Dong JF, Moake JL, Nolasco L et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*. 2002;100:4033-4039. 10
- (14) Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*. 2001;98:1662-1666.
- (15) Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*. 2001;98:1654-1661.
- (16) Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*. 2002;347:589-600. 20
- (17) Levy GG, Nichols WC, Lian EC et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001;413:488-494.
- (18) Remuzzi G, Galbusera M, Noris M et al. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2002;100:778-785. 30
- (19) Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest*. 1986;78:1456-1461.
- (20) George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2000;96:1223-1229.
- (21) Sodetz JM, Pizzo SV, McKee PA. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. *J Biol Chem*. 1977;252:5538-5546. 40

- (22) Lankhof H, van Hoeij M, Schiphorst ME et al. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost.* 1996;75:950-958.
- (23) Lankhof H, Damas C, Schiphorst ME et al. Functional studies on platelet adhesion with recombinant von Willebrand factor type 2B mutants R543Q and R543W under conditions of flow. *Blood.* 1997;89:2766-2772. 10
- (24) Sixma JJ, Schiphorst ME, Verweij CL, Pannekoek H. Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur J Biochem.* 1991;196:369-375.
- (25) Lenting PJ, Westein E, Terraube V et al. An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. Basic aspects and application to the R1205H mutation. *J Biol Chem.* 2004;279:12102-12109. 20
- (26) Romijn RA, Westein E, Bouma B et al. Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J Biol Chem.* 2003;278:15035-15039.
- (27) Arbabi GM, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 1997;414:521-526.
- (28) Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS et al. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:4133-4137. 30
- (29) Skerra A, Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science.* 1988;240:1038-1041.
- (30) Lisman T, Moschatsis S, Adelmeijer J, Nieuwenhuis HK, de Groot PG. Recombinant factor VIIa enhances deposition of platelets with congenital or acquired alpha IIb beta 3 deficiency to endothelial cell matrix and collagen under conditions of flow via tissue factor-independent thrombin generation. *Blood.* 2003;101:1864-1870. 40

- (31) Wu YP, Vink T, Schiphorst M et al. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction and inhibited by von Willebrand factor-glycoprotein IIb/IIIa interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1661-1667.
- (32) Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363:446-448. 10
- (33) Dumas JJ, Kumar R, McDonagh T et al. Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein Ibalpha complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem.* 2004;279:23327-23334.
- (34) Nakayama T, Matsushita T, Dong Z et al. Identification of the regulatory elements of the human von Willebrand factor for binding to platelet GPIb. Importance of structural integrity of the regions flanked by the CYS1272-CYS1458 disulfide bond. *J Biol Chem.* 2002;277:22063-22072. 20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 9 】

【図 1】 基準NanobodyとAU/VWFa-11のwt-VWF及びリストセチン-活性化VWFに対する差次的結合性を示すグラフである。

【図 2】 AU/VWFa-11とA1ドメインとの相互作用の特性を示すグラフである。

【図 3 - 1】 GpIb とAU/VWFa-11の異なる結合部位を示すグラフである。

【図 3 - 2】 図 3 - 1 続き

【図 4】 AU/VWFa-11への結合に及ぼすリストセチンとR1306Q変異の影響を示すグラフである。 30

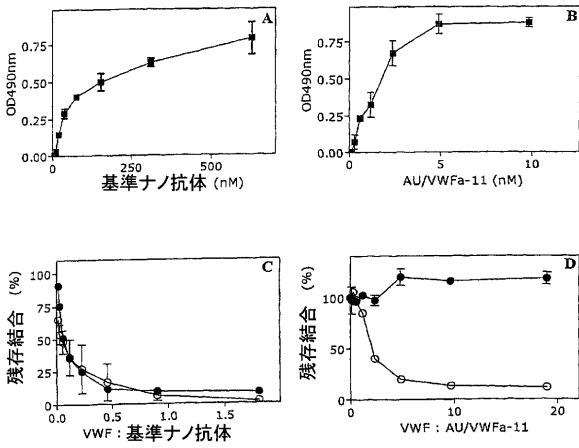
【図 5】 2B型VWD血漿中に存在する活性化VWFを示すグラフである。

【図 6】 TTP血漿中の活性化VWFの検出を示すグラフである。

【図 7】 HELLP症候群における活性VWFの上昇したレベルを示すグラフである。

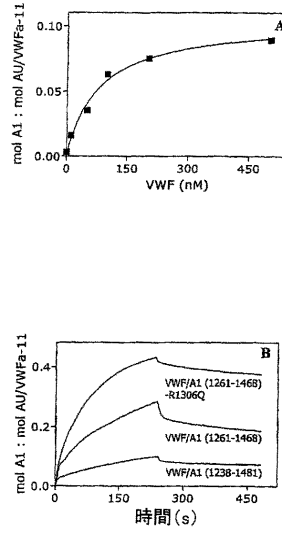
【 図 1 】

Figure 1



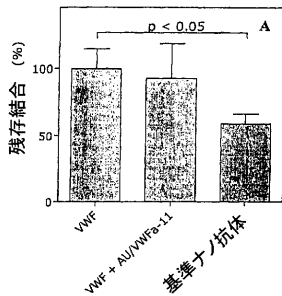
【 図 2 】

Figure 2



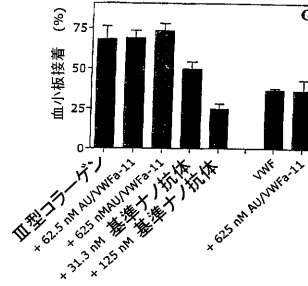
【 図 3 - 1 】

Figure 3



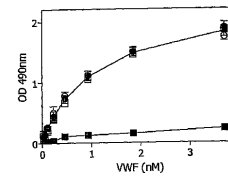
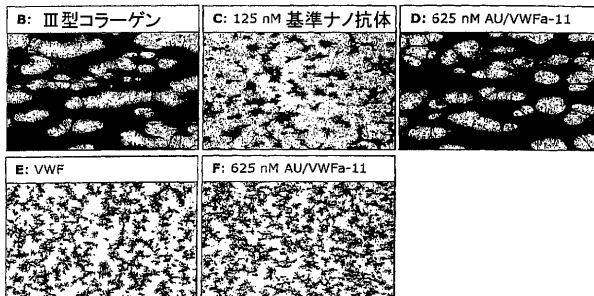
【 図 3 - 2 】

Figure 3 (続き)



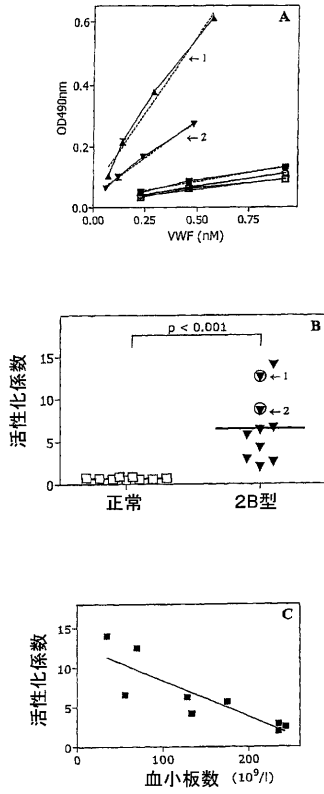
【 図 4 】

Figure 4



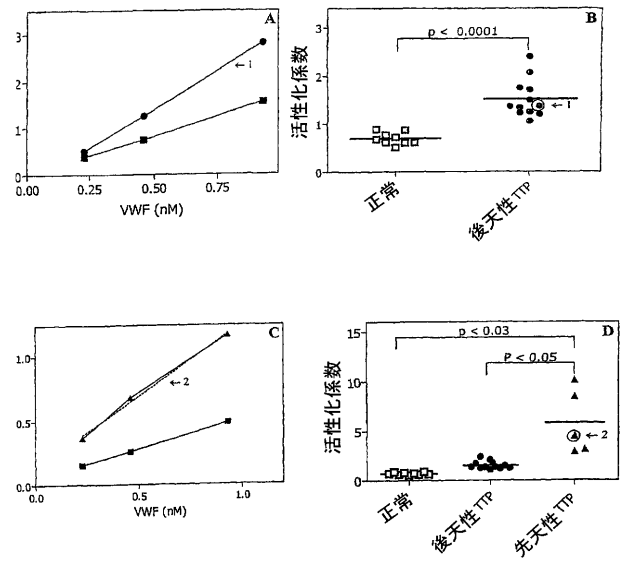
【 図 5 】

Figure 5



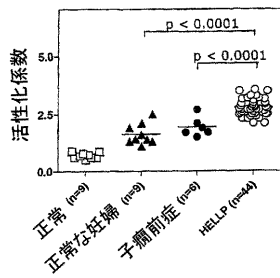
【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

Figure 7



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/000273

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/86		
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, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MURDOCK PAUL J ET AL: "Von Willebrand factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: An alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 78, no. 4, 1997, pages 1272-1277, XP008066081 ISSN: 0340-6245 the whole document ----- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 July 2006	Date of mailing of the international search report 25/07/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lunter, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/000273

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FAVALORO EMMANUEL J ET AL: "Discrimination of von Willebrand's Disease (VWD) subtypes: Direct comparison of von Willebrand factor: Collagen binding assay (VWF:CBA) with monoclonal antibody (MAB) based VWF-capture systems" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 84, no. 4, October 2000 (2000-10), pages 541-547, XP008066082 ISSN: 0340-6245 the whole document	1-22
X	FAVALORO EMMANUEL J: "Detection of von Willebrand disorder and identification of qualitative von Willebrand factor defects: Direct comparison of commercial ELISA-based von Willebrand factor activity options" AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, vol. 114, no. 4, October 2000 (2000-10), pages 608-618, XP008066091 ISSN: 0002-9173 the whole document	1-22
X	WO 01/02853 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; CAUWENBERGHS, NANCY; VANHOORELBEKE, KAREN; DEC) 11 January 2001 (2001-01-11) page 2 - page 12	1-21
X	VEYRADIER A ET AL: "Laboratory diagnosis of von Willebrand disease." INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY RESEARCH. 1998, vol. 28, no. 4, 1998, pages 201-210, XP009058399 ISSN: 0940-5437 the whole document	1-20
X	VANHOORELBEKE KAREN ET AL: "A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, STUTTGART, DE, vol. 83, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 107-113, XP000974940 ISSN: 0340-6245 the whole document	1-21

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/000273

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FAVALORO E J ET AL: "DEVELOPMENT OF A SIMPLE COLLAGEN BASED ELISA ASSAY AIDS IN THE DIAGNOSIS OF, AND PERMITS SENSITIVE DISCRIMINATION BETWEEN TYPE 1 AND TYPE II, VON WILLEBRAND'S DISEASE" BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS, RAPID COMMUNICATIONS, OXFORD, OXFORD, GB, vol. 2, no. 2, 1991, pages 285-291, XP000916134 ISSN: 0957-5235 the whole document	1-21
X	TSAI H-M ET AL: "ANTIBODIES TO VON WILLEBRAND FACTOR-CLEAVING PROTEASE IN ACUTE THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US, vol. 339, no. 22, 26 November 1998 (1998-11-26), pages 1585-1594, XP001079259 ISSN: 0028-4793 the whole document	1-20
X	LATTUADA ANTONELLA ET AL: "Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome." HAEMATOLOGICA, vol. 88, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 1029-1034, XP002388092 ISSN: 0390-6078 the whole document	1-20
X	WO 2004/062551 A (ABLYNX N.V; SILENCE, KAREN) 29 July 2004 (2004-07-29) page 3 page 7 - page 8	1-22
X	WO 00/24781 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 4 May 2000 (2000-05-04) page 2 - page 3	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/000273

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0102853	A	11-01-2001	NONE	
WO 2004062551	A	29-07-2004	CN 1735630 A	15-02-2006
WO 0024781	A	04-05-2000	AU 755549 B2	12-12-2002
			AU 1212700 A	15-05-2000
			CA 2344606 A1	04-05-2000
			EP 1124856 A1	22-08-2001
			JP 2002529373 T	10-09-2002

フロントページの続き

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

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 デ グロート フィリップ ヘー

オランダ エヌエル - 1 4 1 1 イェーイックス ナールデン イェー ファン ウンセルコーイ
ラン 3

(72)発明者 フェインヘーヤ ロブ

オランダ エヌエル - 3 7 2 3 デーエル ビルトホーフェン ラウリラルトラン 2 5

(72)発明者 レンティング ペーテル イェー

オランダ エヌエル - 1 0 2 5 セーウェー アムステルダム デイクワートル 2 1 3

(72)発明者 シレンス カレン

ベルギー ベー 3 0 9 0 オーフェライセ ジャン トンブルストラート 2 1

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA05 CA09 CA11 CA20 HA11

专利名称(译)	用于区分血管细胞减少症和/或血管性血友病因子 (vWF) 与血小板之间自发相互作用的不同形式的疾病和病症的方法和测定		
公开(公告)号	JP2008527358A	公开(公告)日	2008-07-24
申请号	JP2007550764	申请日	2006-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	阿布链接纳摩玫瑰汾笔记本闭嘴 基于Iyu过他们骂乌得勒支控股低10分笔记本闭嘴		
申请(专利权)人(译)	阿布链接Namuroze奋笔记本闭嘴 lyuemuse乌得勒支控股基低10分笔记本闭嘴		
[标]发明人	デグロートフィリップヘー フェインヘーヤロブ レンティングペーテルイエー シレンスカレン		
发明人	デグロート フィリップ ヘー フェインヘーヤ ロブ レンティング ペーテル イエー シレンス カレン		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/86 G01N2333/755 G01N2800/222		
FI分类号	G01N33/53.L C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/644414 2005-01-14 US		
其他公开文献	JP4829897B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明区分自发不同状态或疾病和病症的特征在于血小板减少症和/或冯·维勒布兰德因子 (vWF) 和血小板之间的相互作用的形式, 和/或所述疾病或病症用于预测的, 血小板减少症和/或冯·维勒布兰德因子 (vWF) 的进展的方法和血液患有至少一种疾病或病症的患者, 其特征在于与血小板的自发相互作用或从怀疑患有所述疾病或病症的患者获得的至少一种生物学提供样品, 并确定所述生物样品中活化的vWF的量, 其中在所述样品中其中活化的vWF的量表示所述疾病或病症的不同状况或形态。本发明进一步包括用于测定样品中活化的vWF的量的试剂盒的部分和使用能够在灭活的vWF存在下特异性结合活化的vWF的抗体, 对使用。

