

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4722480号
(P4722480)

(45) 発行日 平成23年7月13日(2011.7.13)

(24) 登録日 平成23年4月15日(2011.4.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 19/00	(2006.01) C 07 K 19/00
C 07 K 16/06	(2006.01) C 07 K 16/06
C 07 K 14/47	(2006.01) C 07 K 14/47
A 61 K 38/00	(2006.01) A 61 K 37/02

請求項の数 29 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-511349 (P2004-511349)
(86) (22) 出願日	平成15年6月5日(2003.6.5)
(65) 公表番号	特表2006-512894 (P2006-512894A)
(43) 公表日	平成18年4月20日(2006.4.20)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2003/005929
(87) 國際公開番号	W02003/104282
(87) 國際公開日	平成15年12月18日(2003.12.18)
審査請求日	平成18年5月12日(2006.5.12)
(31) 優先権主張番号	02 012 742.9
(32) 優先日	平成14年6月7日(2002.6.7)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁(EP)

(73) 特許権者	510201702 コリムン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシ ュレンクテル・ハフツング C o r i m m u n G m b H ドイツ82152マルティンスリート、ロ ッホハマー・シュトラーセ29番
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(74) 代理人	100123301 弁理士 富田 憲史
(74) 代理人	100127638 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖タンパク質V1ドメインを含むイムノアドヘシン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のa)およびb):

a) 以下の(i)または(ii)から選択されるGPVI タンパク質:

(i) そのアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸 1~267によって表されるGPVIの細胞外ドメイン;

(ii) (i)のアミノ酸配列における1または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により (i)のGPVI の細胞外ドメインと異なっており、かつ、コラーゲンに結合することができる(i)のGPVI の細胞外ドメインの変異体、

b) 以下の(iii)または(iv)から選択されるFc 部分:

(iii) そのアミノ酸配列が、配列番号1のアミノ酸 273~504によって表される免疫グロブリンのFc ドメイン;

(iv) (iii) のアミノ酸配列における1または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により(iii)の免疫グロブリンのFc ドメインと異なっており、かつ、融合タンパク質をコラーゲンとの結合が可能な形態で生産することを可能とすることができる(iii)の免疫グロブリンのFc ドメインの機能保存変異体、

を含み、該GPVIタンパク質とFcタンパク質とがアミノ酸配列 Gly-Gly-Argを特徴とするリンクーを介して融合している融合タンパク質。

【請求項2】

配列番号1のアミノ酸配列からなる請求項1の融合タンパク質。

10

20

【化1】

1 MSPSPTALFC LGLCLGRVPA QSGPLPKPSL QALPSSLVPL EKPVTLRCQG
 51 PPGVDLYRLE KLSSSRYQDQ AVLFIPIAMKR SLAGRYRCSY QNGSLWSLPS
 101 DQLELVATGV FAKPSLSAQP GPAVSSGGDV TLQCQTRYGF DQFALYKEGD
 151 PAPYKNPERW YRASFPIITV TAAHSGTYRC YSFSSRDPYL WSAPSDPLEL
 201 VVTGTSVTPS RLPTEPPSSV AEFSEATAEL TVSFTNKVFT TETRSITTS
 251 PKESDSPAGP ARQYYTKGNG GRESKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF 10
 301 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 351 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 401 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 451 TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 501 SPGK*

(配列番号1)

20

【請求項3】

1 または数個のアミノ酸においてグリコシル化されている請求項1または2のいずれかの融合タンパク質。

【請求項4】

ホモ二量体融合タンパク質である請求項1～3のいずれかの融合タンパク質。

【請求項5】

2つの单量体が共有結合している請求項4の融合タンパク質。

【請求項6】

蛍光標識されている請求項4または5の融合タンパク質。

【請求項7】

30

その配列が以下の群から選択される核酸：

- a)配列番号2の核酸
- b)配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸
- c)配列番号1のアミノ酸配列における1または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により配列番号1のタンパク質と異なっており、かつ、コラーゲンと結合することができるタンパク質をコードする核酸、ただし、該核酸は配列番号1のアミノ酸残基270-272に対応する位置においてアミノ酸残基Gly-Gly-Argを有するタンパク質をコードする

。

【化2】

1 ATGTCTCCAT CCCCAGCCGC CCTCTTCTGT CTTGGGCTGT GTCTGGGGCG
 51 TGTGCCAGCG CAGAGTGGAC CGCTCCCCAA GCCCTCCCTC CAGGCTCTGC
 101 CCAGCTCCCT GGTGCCCTG GAGAAGCCAG TGACCCCTCCG GTGCCAGGGA
 151 CCTCCGGGCG TGGACCTGTA CGCCTGGAG AAGCTGAGTT CCAGCAGGTA
 201 CCAGGATCAG GCAGTCTCT TCACTCCGGC CATGAAGAGA AGTCTGGCTG
 251 GACGCTACCG CTGCTCCTAC CASAACGGAA GCCTCTGGTC CCTGCCAGC
 301 GACCAGCTGG AGCTCGTTGC CACGGGAGTT TTTGCCAAAC CCTCGCTCTC
 351 AGCCCAGCCC GGCCCAGCGG TGTCGTCAAGG AGGGGACGTA ACCCTACAGT
 401 GTCAGACTCG GTATGGCTTT GACCAATTG CTCTGTACAA GGAAGGGGAC
 451 CCTGCGCCCT ACAAGAATCC CGAGAGATGG TACCGGGCTA GTTCCCCAT
 501 CATCACGGTG ACCGCCGGCC ACAGCGGAAC CTACCGATGC TACAGCTTCT
 551 CCAGCAGGGA CCCATACCTG TGGTCGGCCC CCAGCGACCC CCTGGAGCTT
 601 GTGGTCACAG GAACTCTGT GACCCCCAGC CGGTTACCAA CAGAACCAAC
 651 TTCCCTCGGTA GCAGAATTCT CAGAAGCCAC CGCTGAACCTG ACCGTCTCAT
 701 TCACAAACAA AGTCTTCACA ACTGAGACTT CTAGGAGTAT CACCAACAGT
 751 CCAAAGGAGT CAGACTCTCC AGCTGGTCCT GCCCGCCAGT ACTACACCAA
 801 GGGCAACGGC GGCGCGGAGT CCAAATCTTG TGACAAAAGT CACACATGCC
 851 CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCCTGGGG GACCGTCAGT CTTCCCTTTC
 901 CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC
 951 ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT
 1001 GGTACGTGGA CGCGCTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
 1051 GAGCACTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA
 1101 CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG
 1151 CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC
 1201 CGAGAGCCAC AGGTGTACAC CCTGCCCTCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA
 1251 GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAGA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA
 1301 TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGAC
 1351 ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT
 1401 CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG
 1451 TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG
 1501 TCTCCGGGTA AATGA

(配列番号2)

【請求項8】

配列番号2の配列からなる請求項7の核酸。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 のいずれかの核酸にコードされるタンパク質。

【請求項 10】

請求項 7 または 8 のいずれかの核酸によってコードされる 2 本のポリペプチド鎖を含み、各鎖が鎖間ジスルフィド結合によって他方の鎖のヒンジ領域に連結しているヒンジ領域を有する、アテローム性動脈硬化症の治療または予防のための抗アテローム硬化性医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 7 または 8 のいずれかの核酸を含むベクター。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれかの融合タンパク質または請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質を発現する細胞。

10

【請求項 13】

請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 1 の融合タンパク質のホモ二量体であるイムノアドヘシンを含む医薬組成物。

【請求項 15】

イムノアドヘシンが配列番号 1 のポリペプチドのホモ二量体である請求項 14 の医薬組成物。

【請求項 16】

20

静脈内用調製物である請求項 14 または 15 の医薬組成物。

【請求項 17】

請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質またはホモ二量体形態の場合の請求項 9 のタンパク質を含む、患者におけるアテローム性動脈硬化症の治療または予防のための医薬組成物。

【請求項 18】

アテローム進行の予防のための請求項 17 の医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質またはホモ二量体形態の場合の請求項 9 のタンパク質を含む、患者における動脈内血栓症の予防のための医薬組成物。

30

【請求項 20】

患者が急性冠症候群または頸動脈症候群に罹患しており、かつ、活動性動脈内病変を有する、請求項 19 の医薬組成物。

【請求項 21】

糖尿病のアテローム硬化性合併症の治療のための、請求項 17 ~ 20 のいずれかの医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質、またはホモ二量体形態の場合の請求項 9 のタンパク質を含む、心筋梗塞および/または脳卒中の治療または予防のための医薬組成物。

40

【請求項 23】

経口、皮下、腹腔内または静脈内投与用の請求項 17 ~ 22 のいずれかの医薬組成物。

【請求項 24】

融合タンパク質 0.5 ~ 6.0 mg/kg を送達するための剤形である請求項 17 ~ 23 のいずれかの医薬組成物。

【請求項 25】

GPVI とコラーゲンとの結合の阻害剤をインビトロでスクリーニングするための請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質またはホモ二量体形態の場合の請求項 9 のタンパク質の使用。

【請求項 26】

50

ホモ二量体融合タンパク質が蛍光標識されている請求項 2 5 の使用。

【請求項 2 7】

以下の工程を含む糖タンパク質 VI のコラーゲンへの結合の阻害剤をインピトロでスクリーニングする方法:

- (i)コラーゲンを露出する表面を提供する工程;
- (ii)該表面の一部分と、請求項 4 または 5 の融合タンパク質またはホモ二量体形態の場合の請求項 9 のタンパク質とを、該融合タンパク質の該表面への結合を可能とするあらかじめ決められた条件下で接触させる工程;
- (iii)該表面の別の部分と、該融合タンパク質とを、工程(ii)の条件下で被験化合物の存在下で接触させる工程;
- (iv)該被験化合物の非存在下および存在下での該表面に結合した該融合タンパク質の量を測定する工程;
- (v)被験化合物の非存在下と比較して該被験化合物の存在下において該表面への該融合タンパク質の結合が少なければ該被験化合物を阻害剤として同定する工程; および、
- (vi)血小板凝集および/または血小板活性化に対する該阻害剤の機能的効果を測定する工程。

10

【請求項 2 8】

請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質またはホモ二量体形態の場合の請求項 9 のタンパク質の、GPVI に媒介される血小板の活動性血管内病変への付着の阻害剤をインピトロでスクリーニングするための使用。

20

【請求項 2 9】

請求項 4 または 5 のホモ二量体融合タンパク質またはホモ二量体形態の場合の請求項 9 のタンパク質を免疫原として使用することを含む非ヒト哺乳類からのモノクローナル抗体の產生方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特異的な糖タンパク質 VI ドメインを含むイムノアドヘシンに関する。本発明のイムノアドヘシンは、二量体の形でイムノアドヘシンを生成する特定のプロセスによって得られる。本発明はまた、特定グループの患者における動脈内血栓の予防用の医薬品を調製するための糖タンパク質 VI イムノアドヘシンの使用に関する。さらに、本発明は、アテローム進行の予防および治療用の医薬品を調製するための糖タンパク質 VI イムノアドヘシンの使用に関する。本発明はまた、糖尿病患者におけるアテローム性動脈硬化症の慢性進行の予防および治療用の医薬品を調製するための糖タンパク質 VI イムノアドヘシンの使用に関する。本発明はまた、GPVI を介した血小板の活性血管内病変への接着を阻害する剤を *in vitro* および *in vivo* でスクリーニングする方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

急性冠状動脈または頸動脈症候群は、西欧社会における主な死亡原因である。このような心血管系の事象をなんとか生き延びた場合でも、多くの患者は、心筋梗塞や脳卒中へつながる血管内血栓症などの致命的な合併症に苦しむことになる。

40

【0003】

血管内血栓症は、血管内で血小板が凝集した結果であり、それによって、血管内の血流がひどく低下し、あるいは完全に阻害されることがある。特に、アテローム斑の破裂によって下流組織の動脈血栓症から虚血に至る事象のカスケードが引き起こされ、心筋梗塞や虚血性脳卒中などが起こる。血管損傷に対する最初の応答は、循環している血小板が露出した内皮下基質タンパク質へ接着することであり、これによってその後の血小板凝集が誘発される。内皮下層の巨大分子成分のうち、線維性コラーゲンは、血小板の強力な活性化因子として働き、*in vitro* でも *in vivo* でも血小板接着を起こすので、最

50

も血栓形成性の高い成分であると考えられている(1~3)。

【0004】

コラーゲン受容体らしいと報告されている血小板膜タンパク質には、GPIb およびインテグリン_{IIb-3}などの、コラーゲンに結合したフォンビルブランド因子(vWF)を介してコラーゲンと間接的に相互作用するもの、ならびにGPVI、インテグリン₂₋₁、およびCD36などのコラーゲンと直接的に相互作用するものに分けることができる((2)にその総説がある)。最近、血小板糖タンパク質VI(GPVI)が主要な血小板コラーゲン受容体として同定された(4)。GPVIは、60~65kDaのI型膜貫通糖タンパク質であり、免疫グロブリンスープラファミリーに属する(5;6)。ヒトおよびマウス血小板では、GPVIは、細胞表面でFcR鎖と複合体を形成する(7;8)。GPVIと結合するリガンドは、Fc受容体g鎖のITAMモチーフのチロシンリン酸化を誘発して(9~13) Sykキナーゼ、LAT、SLP-76、およびホスホリパーゼCと続く下流へのシグナル伝達を開始する。GPVIが欠損した血小板では、コラーゲン誘導性接着およびin vitro凝集が起こらない(4;14)。同様に、機能をブロックする抗GPVIモノクローナル抗体は、コラーゲンおよびコラーゲン三重らせん体を模倣するコラーゲン関連ペプチドCRPに対するex vivoの血小板凝集を軽減する(15;16)。

【0005】

血小板の凝集による合併症の問題は、血小板凝集の阻害剤を投与することによって対処できることが知られている。急性冠状動脈症候群を治療する場合、ReoProなどのGPIIb/IIIa阻害剤は、患者の予後を著しく改善する。しかし、最近の臨床試験メタアナリシスの結果から、最適な血栓症予防処置にもかかわらず、死亡または心筋梗塞のリスクがかなり残ることが明らかになった(Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Theroux P, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomized clinical trials. Lancet 2002; 359: 189~98頁)。この治療法特有の深刻な副作用は、出血性合併症である。これらは患者の2.4%に発生し、治療した患者のほぼ0.1%に最も重い脳内出血が発生する。GPIIb/IIIa受容体遮断薬の機構的な欠点がいくつか明らかになっている。これが次善の有効性および副作用の原因である(Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engelmann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. Thromb Res. 2001; 101: 53~64頁. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. Circulation. 1999; 99: E1~E11頁)。

【0006】

血小板凝集を阻害すると、血小板の凝集能力が損なわれる。その結果、好ましくない血栓形成だけでなく、出血を止めるという血小板の一般的な能力も影響を受ける。したがって、血小板凝集阻害剤の投与は本来的に、さらに致命的な合併症を起こす可能性のある出血などの深刻な副作用をひき起こす。これらの副作用は当然、糖尿病患者においてはさらに問題となる。

【0007】

10

20

30

40

50

糖尿病は、アテローム性動脈硬化症に関する主なリスク因子の1つである。さらに、糖尿病は、致命的な合併症のリスクが増え、急性血管症候群特に冠状動脈症候群を示す患者では死亡率が高くなる。不安定狭心症にかかっている糖尿病患者は、非糖尿病患者と比べてpla-que潰瘍および冠内血栓の発生率が高い(Biondo-Zoccaia GGL; Abbate A; Liuzzo G, Biasucci L: Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. J Am Coll Cardiol 41; 1071~1077頁; 2003)。

【0008】

血小板がアテローム性動脈硬化症の悪化における主な引き金であることがだんだんと分かってきている。アテローム悪化と、血小板応答性の増大および糖尿病との関連は、いまのところわかっていない。糖尿病患者はアテローム性動脈硬化症の程度に関係なく急性血管合併症にかかるが、これは糖尿病性急性血管合併症およびアテローム硬化性急性血管合併症の発生において異なる現在未知の血小板活性化のメカニズムがあることを示す。

【非特許文献1】Boersma E, Harrington RA, Moliterni DJ, White H, Theroux P, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. Lancet 2002; 359: 189~98頁

【非特許文献2】Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engelmann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. Thromb Res. 2001; 101: 53~64頁

【非特許文献3】Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. Circulation. 1999; 99: E1~E11頁

【非特許文献4】Biondo-Zoccaia GGL; Abbate A; Liuzzo G, Biasucci L: Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. J Am Coll Cardiol 41; 1071~1077頁; 2003

【非特許文献5】Ruggeri Z.M.: Mechanisms initiating platelet thrombus formation. Thromb. Haemost. 1997; 78, 611~616頁

【非特許文献6】van Zanten G.H.ら. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. J Clin. Invest 1994; 93, 615~632頁

【非特許文献7】Clemetson K.J. & Clemetson J.M. Platelet collagen receptors. Thromb. Haemost. 2001, 86, 189~197頁

【非特許文献8】Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. J Cli

10

20

30

40

50

n Invest 1989; 84: 1440~1445頁

【特許文献1】国際公開WO 01/16321

【特許文献2】国際公開WO 01/00810

【特許文献3】米国特許第6,383,779号

【非特許文献9】Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tzomiyama Y, Ordinas AおよびDiaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. Blood 1997; 88: 2081~2092頁

10

【非特許文献10】Moroi MおよびJung SM. Platelet receptors for collagen. Thromb. Haemost. 1997; 78: 439~444頁

【非特許文献11】FayedおよびFuster. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. Circulation 2001; 89: 305~316頁

【非特許文献12】Helftら. Progression and Regression of Atherosclerotic Lesions. Circulation 2002; 105: 993~998頁

20

【非特許文献13】Savage B.、Saldivar E. & Ruggeri Z. M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. Cell 1996; 84: 289~297頁

【非特許文献14】Santoro S. A. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. Cell 1986; 46: 913~920頁

30

【非特許文献15】Moog S. L. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. Blood 2001; 98: 1038~1046頁

【非特許文献16】Moroi M.、Jung S. M.、Okuma M. & Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. J Clin. Invest 84: 1440~1445頁

【非特許文献17】Gibbins J. M.、Okuma M.、Farndale R.、Barnes M. & Watson S. P. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies threonine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. FEBS Lett. 1997; 413: 255~259頁

40

【非特許文献18】Nieswandt B. L. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001; 193: 459~469頁

【非特許文献19】Nieswandt B. L. Glycoprotein VI b

50

ut not 2 1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20, 2120~2130頁

【非特許文献20】Schulte, V.ら. Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 364~368頁

【非特許文献21】Goto, S.、Ikeda, Y.、Saldivar, E. & Ruggeri, Z. M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J. Clin. Invest.* 1998; 101, 479~486頁

【非特許文献22】Sixma, J. J.、van Zanten, G. H.、Bang a, J. D.、Nieuwenhuis, H. K. & de Groot, P. G. Platelet adhesion. *Semin. Hematol.* 1995; 32, 89~98頁

【非特許文献23】Rekhter, M. D. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc. Res.* 1999; 41, 376~384頁

【非特許文献24】Rekhter, M. D. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am. J. Pathol.* 1993; 143, 1634~1648頁

【非特許文献25】Opsahl, W. P.、DeLuca, D. J. & Ehrhart, L. A. Accelerated rates of collagen synthesis in atherosclerotic arteries quantified in vivo. *Arteriosclerosis* 1987; 7, 470~476頁

【非特許文献26】Kasirer Friede, A.ら. Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin IIb 3. *J. Biol. Chem.* 2002; Vol 277: 11949~11956頁

【非特許文献27】Bergmeier, W.、Rackebrandt, K.、Schroder, W.、Zirngibl, H. & Nieswandt, B. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GP1b-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood* 2000; 95, 886~893頁

【非特許文献28】Nieswandt, B.、Bergmeier, W.、Rackebrandt, K.、Gessner, J. E. & Zirngibl, H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood* 2000; 96, 2520~2527頁

【非特許文献29】Massberg, S. et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92, 507~515頁

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】**【0009】**

したがって、血液の止血能力を維持しながら急性冠状動脈または頸動脈症候群に引き続
いて起こる致命的な合併症を回避するのに有用な医薬品を提供することが本発明の課題で
ある。

【0010】

アテロームの進行を治療または予防するための医薬品を提供することが本発明の他の課
題である。

【0011】

糖尿病、特に糖尿病に関連する合併症を治療するための医薬品を提供することが本発明
のさらなる課題である。 10

【0012】

血小板の血管内病変接着の阻害剤についての *in vitro* および *in vivo* の
スクリーニング法を提供することが本発明の他の課題である。

【課題を解決するための手段】**【0013】**

上記の課題は、特許請求の範囲に述べるように解決される。本発明は、血管損傷後の生
理学的剪断応力下における血小板動員のプロセスには G P V I が実際に必須であることを
示す直接の *in vivo* における証拠をはじめて提供するものである。異なる血管内皮
除去マウスモデルで G P V I を阻害または欠如させると、血小板血管壁相互作用および血
小板凝集が実質的に失われるので、 G P V I が動脈血栓形成の主な決定因子として特定さ
れる。これは、 G P V I - リガンド相互作用を阻害することによって、アテローム性動脈
硬化症の開始における動脈血栓症が抑制されることを示す。本発明は、特定の可溶形態の
G P V I の抗血栓性潜在能力を利用する。特に、 G P V I の細胞外ドメインおよびヒト N
末端側 F c tag を含む融合タンパク質を提供する。可溶形態のヒト G P V I は高い親
和性でコラーゲンに特異的に結合し、 *in vitro* では固定化コラーゲン、 *in vivo* では
血管損傷部位への血小板の接着を弱める。したがって、本発明は、急性臨床的
合併症である動脈内血栓の必須条件は、始めに血管壁の活性病変に血小板が接着すること
であるという認識に基づいている。本発明者らは、血管壁の病変において糖タンパク質 V
I (G P V I) 受容体を介して血小板が内皮下基質コラーゲンに接着することが、血栓の
形成に関する重要な事象であることに気付いた。したがって、本発明の融合タンパク質が
内皮下基質コラーゲンへの血小板接着を阻害すると、活性病変への血小板の接着を抑制す
るだけでなく、活性病変での血小板の凝集を予防することも可能になる。それによって、
一般的な血小板の凝集能力を損なわずに血管内血栓の形成を効率的に回避することができる。
20

【0014】

内皮下層の様々な成分、ラミニン、フィブロネクチン、フォンビルブランド因子 (v W
f) およびコラーゲンなどが血小板のリガンドであり活性化因子であることを考えると、
ただ 1 つの血小板受容体の阻害によって血栓形成の複雑なプロセスを阻害できることは驚
きである。さらに、 *in vitro* 試験では血小板上の多種多様な受容体が提案されて
いるものの、病変部への *in vivo* での血小板接着に影響する関連受容体または受容
体の組合せは、これまで知られていなかった。 40

【0015】

本発明はまた、 G P V I がアテローム性動脈硬化症の進行における血小板活性の主要な
メディエーターであるという認識に基づいている。コラーゲンを介した G P V I の活性化
を阻害することにより、アテローム性動脈硬化症になりやすい A p o e - / - マウス
におけるアテローム進行が軽減されることを実証している (図 16 参照のこと) 。さらに、
、進行型アテローム性動脈硬化症や血栓合併症になりやすい糖尿病患者由来の血小板では
、 G P V I 共受容体である F c 受容体の発現が増大することを実証している。したがって
、糖尿病患者由来の血小板はブラーク破裂によってコラーゲンが内皮下血管層に覆われて
50

いない、即ち内皮剥離がおきている場所でのコラーゲン刺激に対する応答性が増大していて、これが臨床的に観察される不安定狭心症における血栓合併症を増大させるのかもしれない。

【0016】

したがって、本発明は、患者、特に糖尿病患者におけるアテローム進行の治療を提供する。さらに、本発明は、特に糖尿病患者における血管内血栓症などの急性血管合併症を治療するための医薬品を提供する。イムノアドヘシン F c - G P V I - n t は、G P V I 受容体によってアテローム進行および血小板のコラーゲンにたいする応答性の増大を減衰させるための強力な治療ツールである。したがって、F c - G P V I - n t は、アテローム性動脈硬化症を治療するための、特に糖尿病におけるアテローム硬化性合併症を治療するための医薬品である。

10

【0017】

本発明は、以下のセグメント：

- (a) コラーゲンと結合する機能を有する、糖タンパク質 V I (G P V I) の細胞外ドメインまたはその変異体、および
- (b) 免疫グロブリンの F c ドメインまたはその機能保存的部分を含む融合タンパク質 (F c - G P V I - n t) を提供する。

【0018】

融合タンパク質は、図 7 に示すアミノ酸配列を特徴とする。本発明による融合タンパク質は、以下の工程によって得る、または得ることができる。

20

- (a) 図 7 に示すアミノ酸配列をコードしている F c - G P V I - n t 用アデノウィルスを H e l a 細胞に感染させ、感染から 2 日後に培養上清を集め；
- (b) 工程 (a) の上清を遠心分離 (3 8 0 0 g 、 3 0 分、 4) し；
- (c) 工程 (b) の上清をろ過 (0 . 4 5 μ m) し；
- (d) 同体積量の硫酸アンモニウム (7 6 1 g / l) を加えて 4 で一晩攪拌することによってイムノアドヘシンを沈殿させ；
- (e) 遠心分離 (3 0 0 0 g 、 3 0 分、 4) によってタンパク質をペレットにし；
- (f) 工程 (e) のペレットにしたタンパク質を 0 . 1 倍体積量の P B S 中に溶解し、 4 で終夜 P B S 中で透析し；
- (g) 遠心分離 (3 0 0 0 g 、 3 0 分、 4) によってタンパク質溶液を清澄化し；
- (h) 工程 (g) の溶液をプロテイン A カラム (H i T r a p (商標) プロテイン A H P 、 A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h A B 、スウェーデン、 U p p s a l a) に導入し；
- (i) O D _{2 8 0} < 0 . 0 1 になるまでカラムを結合バッファー (2 0 m M リン酸ナトリウムバッファー pH 7 . 0 、 0 . 0 2 % N a N ₃) で洗浄し；
- (k) 溶出バッファー (1 0 0 m M グリシン pH 2 . 7) を用いて画分に分けて溶出させ；
- (l) 溶出した画分を中和バッファー (1 M トリス / H C l pH 9 . 0 、 0 . 0 2 % N a N ₃) を用いて中和し；
- (m) 画分をプールし；
- (n) プールした画分を 4 で終夜 P B S 中で透析し、
- (o) 透析生成物を小分けして、 - 2 0 で凍結させる。

30

【0019】

上記条件下で、融合タンパク質は、 S D S - P A G E によって非還元条件下で測定した分子量 1 6 0 k D a の共有結合した二量体として得られる。融合タンパク質の二量体化は、図 7 に示すアミノ酸配列の G P V I 断片に隣接する特定のドメインにおけるシステインの分子間ジスルフィド結合によって起こると考えられる。融合タンパク質の二量体の性質は、少なくとも図 7 に含まれているような F c 部分と G P V I 部分の間の特定領域の存在ならびに調製プロセスによって決まる。二量体融合タンパク質と比較して単量体融合タンパク質の結合特性が劣っているので、同様の効果を得るためにタンパク質投与量を二量

40

50

体融合タンパク質よりも一桁大きくすることが必要となるので、単量体の融合タンパク質は実際には治療薬として有用ではない。図9(e)を参照のこと。大量のタンパク質の投与は、治療および経済的な点から、特に慢性病の治療において問題である。

【0020】

本発明の融合タンパク質は、イムノアドヘシンである。これは、血小板GPIの細胞外ドメインの機能を有するセグメント(a)を含む。前記GPIは哺乳動物のGPIであってよく、ヒトGPIであることが好ましい。前記機能は、好ましくはGPIリガンドであるコラーゲンと結合することである。コラーゲン結合性を有している限り、GPI細胞外ドメイン全体を前記融合タンパク質またはその任意の断片に使用できる。融合タンパク質の変異体は、前記融合タンパク質の1つまたはいくつかのアミノ酸が修飾されていてよい(例えばグリコシル化、リン酸化、アセチル化、ジスルフィド結合形成、ビオチン化、フルオレセイン標識のような発色団標識など)。変異体は、前記融合タンパク質の同族体であることが好ましい。遺伝子操作した変異体は、本明細書に開示した方法を用いてそのコラーゲンへの結合能力について容易に試験することができる。配列番号1の残基1~267のポリペプチドをセグメント(a)として使用することが最も好ましい。しかし、前記ポリペプチドは、選択したアミノ酸を替えることによって、または前記機能を失わないよう前記配列を切詰めることによって改変することもできる。

【0021】

前記融合タンパク質のセグメント(b)は、以下の目的の少なくとも1つの役割を果たす:前記融合タンパク質を産生する細胞から融合タンパク質を分泌させる、コラーゲンと結合する機能のある形(例えば折りたたみまたは凝集状態)をとっているセグメント(a)を供給する、前記融合タンパク質をアフィニティ精製する、抗体によって融合タンパク質を認識する、医薬品として用いた場合に融合タンパク質に有利な特性を与える。驚くべきことで最も重要なことは、セグメント(b)により、哺乳動物、好ましくはヒトの細胞中で前記融合タンパク質が産生でき、活性形態、すなわちコラーゲンと結合するのに機能的な形で細胞上清へ分泌することが可能になる。セグメント(b)は、免疫グロブリンのFcドメインであることが最も好ましい。適当な免疫グロブリンは、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEである。IgGおよびIgAが好ましい。IgGが最も好ましい。前記Fcドメインは、完全なFcドメインまたはその機能保存的変異体であってよい。Fcの変異体は、セグメント(b)の上記機能の少なくとも1つを保持する場合、機能保存的である。最も好ましいのは、配列番号1の残基273~504のポリペプチドである。しかし、このようなポリペプチドがその機能を失わずに改変または切断され得ることは周知のことである。

【0022】

本発明の融合タンパク質のセグメント(a)および(b)は、リンカーによって結合されていてよい。このリンカーは、約1~100、好ましくは1~10アミノ酸残基からなつていてよい。

【0023】

前記融合タンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列を有することが最も好ましい(本明細書ではFc-GPI-ntと呼ばれる)。

【0024】

本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする核酸配列をさらに提供する。前記核酸配列は、以下のグループ:

(i)配列番号2の核酸配列または遺伝コードの縮重によって同じポリペプチドをコードするその変異体;

(ii)配列番号2によってコードされるポリペプチドに対する配列相同性が少なくとも70%であるポリペプチドをコードする核酸配列;

(iii)そのうちの少なくとも100アミノ酸のセグメントがコラーゲンと結合するのに機能的であり、少なくとも200アミノ酸のセグメントがFcドメインとして機能する、少なくとも300アミノ酸のポリペプチドをコードする核酸;ならびに

10

20

30

40

50

(i v) 請求項 1 の融合タンパク質をコードする核酸配列
から選択される配列を含む。

【0025】

本発明は、糖タンパク質 V I の細胞外ドメインまたはコラーゲンと結合する機能を有するその変異体を含むタンパク質を含有する、動脈内血栓を予防または治療するための医薬品をさらに提供する。前記タンパク質は、本発明の前記融合タンパク質であることが好ましい。前記医薬品が前記融合タンパク質を含有する場合、前記医薬品は、好ましくはさらに適当な担体を含む。前記医薬品は、非経口的に投与することが好ましく、静脈内に投与することがより好ましい。本発明者らが発見したように、G P V I - コラーゲン相互作用は、損傷した血管壁への血小板接着の主要因子である。本発明の融合タンパク質は、他の血小板機能を阻害することなく血液に曝されるコラーゲンをブロックすることによって、血管系の血液に露出したコラーゲンへの血小板の結合を抑制することができる。 10

【0026】

あるいは、本発明の医薬品は、遺伝子療法のために本発明の前記融合タンパク質をコードする核酸を含有していてよい。前記核酸は、上記で定義した核酸配列を含有していることが好ましい。前記核酸は、ベクター、好ましくはウィルスベクターに含まれていることが好ましい。前記融合タンパク質をコードするベクターは、例えば内皮細胞がそれと共に形質導入されるように患者の血管系に導入することができる。遺伝子療法に適したベクターは、当技術分野で周知である。これらは、例えばアデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、レトロウィルス、または単純疱疹ウィルスに基づくものである。ベクターは、患者の必要に応じて導入された細胞が融合タンパク質を長期または短期間発現するように選ぶことができる。融合タンパク質の F c ドメインによって、導入された細胞による活性形態の融合タンパク質の分泌が可能になる。 20

【0027】

本発明は以下のことを含む、糖タンパク質 V I とコラーゲンの結合の阻害剤についての in vitro スクリーニング法をさらに提供する：

(i) コラーゲンを提示する表面を準備し；

(i i) 前記表面の一部分を前記融合タンパク質と前記表面の結合を可能にする所定の条件下で本発明の融合タンパク質と接触させ；

(i i i) 工程 (i i) と同じ条件下で、前記表面の別の部分を試験化合物の存在下で前記融合タンパク質と接触させ； 30

(i v) 前記試験化合物の不在下または存在下で前記表面に結合した前記融合タンパク質の量を測定し；

(v) 前記融合タンパク質と前記表面の結合が、試験化合物の不在下と比較して前記試験化合物の存在下のほうが少ない場合、試験化合物を阻害剤として特定し；また

(v i) 場合によって、血小板凝集および／または血小板活性化に対する前記阻害剤の機能的作用を決定する。

【0028】

工程 (i) の表面は、コラーゲンをコーティングしたガラスまたはプラスチック表面であってよい。前記表面の一部分は、タイタープレートまたはマルチウェルプレートのウェルであってよい。コラーゲンを提示する表面は、実施例に記載のようにガラスまたはプラスチック表面をコラーゲンでコーティングすることによって容易に調製することができる。コラーゲンでコーティングしたプレートまたはマルチウェルプレートは、市販もされている。工程 (i i) では、融合タンパク質と表面の結合を可能にする条件（特に pH、バッファー、温度）下で所定量の前記融合タンパク質を前記表面の第 1 の部分と接触させる。前記表面と最適な結合を可能にする条件を選択することが好ましい。工程 (i i i) では、別の表面部分を、所定の量または濃度の試験化合物の存在下で工程 (i i) の場合と同じ条件下に同じ量の融合タンパク質と接触させる。試験化合物は 1 種以上の量または濃度で使用することができる。工程 (i v) の前記測定には、非結合融合タンパク質を除去するために、工程 (i i) および (i i i) で接触させた前記表面部分を 1 回または複数 40

回洗浄することが含まれることが好ましい。次いで、例えば融合タンパク質に付けた蛍光標識（例えばフルオレセイン、ローダミンなど）の蛍光を測定することによって結合融合タンパク質の量を測定することができる。あるいは、結合融合タンパク質は、前記融合タンパク質に対する抗体を用いて検出することができる。ここで抗体は蛍光標識されていてよい。あるいは、この抗体は、着色または発光反応生成物をもたらし得る酵素（例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ）で標識することもできる。最も好都合には、融合タンパク質は、コラーゲンと結合した後その光吸収または光放出特性が変化するような色素標識で標識することができる。この実施形態では、非結合融合タンパク質の洗浄は必要ではない。

【0029】

10

工程(v)では、阻害剤を特定することができる。特定した阻害剤またはその選択された部分は、阻害剤を改善するためのリード構造として使用することができる。こうしたリード構造は、化学的方法を用いて改変でき、改変した構造を再度このスクリーニング法で試験することができる。阻害特性が改変された改変構造または試験化合物を選択し、場合によっては、化学的方法によりさらに変化させることができる。このようにして、阻害剤を繰返し改変することができる。本発明のスクリーニング法を用いて特定した阻害剤は、血栓および動脈硬化症に対して潜在的な薬物として貴重である。

【0030】

工程(vi)で、血小板凝集および/または血小板活性化に対する前記阻害剤の機能的作用は、以下に記載の方法、例えば生体蛍光顕微鏡検査法によって決定することができる。

20

【0031】

前記スクリーニング法は、試験すべき試験化合物の数に応じて小、中、または大規模で実施することができる。多くの試験化合物を試験すべき場合（例えば化合物のライブラリ）、スクリーニング法は、高スループットスクリーニング（HTS）の形をとることが好ましい。HTSの場合、結合融合タンパク質の量は、蛍光標識した融合タンパク質を用いて検出することができる。

【0032】

30

上記スクリーニング法は、GPVIとコラーゲンの結合を阻害する抗体、特にGPVIの細胞外ドメインに対する抗体についてスクリーニングするために使用することができる。このような抗体スクリーニングは、例えばモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ技術または任意の他の抗体生成技術と組み合わせるとよく、そこでは本発明の融合タンパク質を抗原として使用することが好ましい。ハイブリドーマ細胞培養上清中の抗体を前記試験化合物として使用することができる。

【0033】

本発明は、本発明の融合タンパク質を免疫原として用いることによって生成した抗体をも提供するものである。さらに、本発明は、急性冠状動脈または頸動脈症候群の最初の引き金として活性なアテローム硬化性病変の剥き出しになった内皮下基質コラーゲンに血小板が接着することを予防する医薬品を調製するためにGPVIに対する抗体を使用することを提供する。こうした適応症は、以下のように判断することができる。好ましくは、患者にはさらに不安定アテローム斑があることを特徴とする。前記医薬品は、非経口的に投与することが好ましい。前記抗体がモノクローナル抗体であることが好ましい。こうした抗体は、例えば本発明の融合タンパク質を免疫原として用いて調製することができる。

40

【0034】

さらに、本発明は、活性血管内病変におけるGPVI介在血小板接着の阻害剤のin vitroスクリーニング法を提供し、前記方法は、

(i) コラーゲンを提示する表面を準備し；

(ii) コラーゲンへの血小板の接着を可能にする所定の条件下で表面を血小板と接触させ；

(iii) 試験化合物の存在下で血小板の接着を測定し；また

50

(i v) コラーゲンへの血小板接着が、試験化合物の不在下と比較して試験化合物の存在下でより少ない場合、試験化合物を G P V I の阻害剤として特定し；また
(v) 場合によって、血小板凝集および／または血小板活性化に対する前記阻害剤の機能的作用を決定する

工程を含む。

【0035】

この方法で使用すべき血小板は、既知の手順（実施例 7 を参照のこと）によって単離することができる。これらはマウス、ラット、ウサギ、ブタなどの哺乳動物の血液から単離することができる。好ましくはヒトから単離する。前記血小板は、例えばフルオレセインなどの蛍光色素で標識することができる。前記表面への血小板接着は、実施例に記載のように測定することができる。この方法用の試験化合物は、小有機分子であってよい。この方法用の試験化合物は、G P V I とコラーゲンの結合の阻害剤についての上記スクリーニング法で特定された阻害剤であることが好ましい。このようにして、血小板を用いてスクリーニングすべき化合物の数をかなり減らすことができ、血小板に対して機能的な阻害剤を発見する見込みを増大させることができる。

10

【0036】

活性血管内病変に対する G P V I 媒介血小板接着の阻害剤の *in vivo* スクリーニング法は、

(i) 活性血管内病変の *in vivo* モデルを用意し；

(ii) 試験化合物の存在下で活性な血管内病変への血小板接着を測定し、

20

(iii) 活性な血管内病変への血小板接着が、試験化合物の不在下と比較して試験化合物の存在のほうが少ない場合、試験化合物を G P V I の阻害剤として特定する

工程を含む。

【0037】

前記 *in vivo* モデルは、マウス、ラット、ウサギなどの適当な哺乳動物であってよい。マウスが好ましい。好ましくは蛍光標識した血小板をモデルに導入してから、試験化合物の存在下および不在下で活性な血管内病変への血小板接着を測定する。前記試験化合物は、上記 *in vitro* スクリーニング法の 1 つで阻害剤として特定されていることが好ましい。活性血管内病変への血小板接着は、実施例 8 に記載の *in vivo* 蛍光顕微鏡検査法を用いて実施することができる。

30

【0038】

本発明はまた、糖尿病を治療する医薬品を製造するために

(a) コラーゲンと結合するのに機能的な糖タンパク質 V I の細胞外ドメインまたはその変異体、および

(b) 免疫グロブリンの F c ドメインまたはその機能保存的部分を含む融合タンパク質を使用することを提供する。

【0039】

糖尿病を治療する医薬品を製造するために使用する融合タンパク質は、二量体融合タンパク質であることが好ましい。二量体であるためには、融合タンパク質のドメイン (a) と (b) の間にヒンジ領域が存在しなければならない。ヒンジ領域は、ポリペプチド鎖の適当な配向および鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にするために必要である。したがって、ヒンジ領域は、十分な長さを有し、システイン残基、好ましくは少なくとも 2 個のシステイン残基を含む必要がある。融合タンパク質は、配列番号 1 の残基 1 ~ 267 を含むことが好ましい。融合タンパク質は、糖尿病の急性合併症の治療または糖尿病患者におけるアテローム性動脈硬化症の慢性進行の治療に使用する。融合タンパク質は F c - G P V I - n t であることが好ましい。

40

【0040】

本発明はまた本発明の融合タンパク質 (F c - G P V I - n t) を調製する方法を提供するが、この方法は以下の工程を含む：

(a) 図 7 に示すアミノ酸配列をコードしている、F c - G P V I - n t 用アデノウィル

50

スをHeLa細胞に感染させ、感染から2日後に培養上清を捕集し；
 (b)工程(a)の上清を遠心分離(3800g、30分、4℃)し；
 (c)工程(b)の上清をろ過(0.45μm)し；
 (d)等体積量の硫酸アンモニウム(761g/l)を加えることによってイムノアドヘシンを沈殿させ、4℃で終夜攪拌し；
 (e)遠心分離(3000g、30分、4℃)によってタンパク質をペレット化し、
 (f)工程(e)のペレット化したタンパク質を0.1容のPBS中に溶解し、4℃で終夜PBS中に透析し；
 (g)遠心分離(3000g、30分、4℃)によってタンパク質溶液を清澄化し；
 (h)工程(g)の溶液をプロテインAカラム(HiTrap(商標)プロテインA HP、Amersham Pharmacia Biotech AB、スウェーデン、Uppsala)に導入し；
 (i)OD₂₈₀ < 0.01になるまでカラムを結合バッファー(20mMリン酸ナトリウムバッファーpH7.0、0.02%NaN₃)で洗浄し；
 (k)溶出バッファー(100mMグリシンpH2.7)を用いて画分に分けて溶出し；
 (l)溶出した画分を中和バッファー(1Mトリス/HCl pH9.0、0.02%NaN₃)を用いて中和し；
 (m)画分をプールし；
 (n)プールした画分を4℃で終夜PBS中に透析し、
 (o)透析した生成物を小分けして、-20℃で凍結させる。

10

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0041】

従来の仮説では、フォンビルブランド因子vWFに結合した血小板糖タンパク質(GPIb)が、流れている血小板を損傷した血管壁に動員し(Ruggeri、Z.M. : Mechanisms initiating platelet thrombus formation. Thromb. Haemost. 1997; 78、611~616頁)、内皮下線維性コラーゲンは、血小板の安定した接着および活性化を支持することが示唆されている(van Zanten、G.H.ら.「動脈硬化性冠動脈への血小板付着の増大」Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. J. Clin. Invest. 1994; 93、615~632頁; Clemetson、K.J. & Clemetson、J.M.「血小板コラーゲン受容体」Platelet collagen receptors. Thromb. Haemost. 2001; 86、189~197頁)。しかし、本発明は、マウス頸動脈のin vivo蛍光顕微鏡検査法によって、主要な血小板コラーゲン受容体であるGPVIを阻害または欠損させると、内皮の侵食に続く血小板-血管壁相互作用が起こらないことを実証している。意外なことに、GPVIを阻害すると、内皮下層への血小板の係留および接着が約89%低下する。さらに、血小板の安定な捕集および凝集は、これらの条件下ではほとんど失われている。これらのプロセスにGPVIが必須であることは、GPVI欠損マウスで確認された。その場合、血小板は損傷した血管壁に接着および凝集しなかった。これらの発見により、血管損傷部位での血小板付着の開始におけるGPVIの意外な役割が明らかになり、血小板-コラーゲン相互作用が動脈血小板誘導性アテローム硬化性合併症の主要な決定因子として明確に特定される。

30

40

【0042】

GPVIが一般に内皮下基質コラーゲンの受容体の役目を果たすことは、記載されている(Moroi M、Jung SM、Okuma M、Shinmyozu K.「糖タンパク質VIを欠きコラーゲン誘発凝集/接着のない血小板を有する患者」A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. J. Clin. Invest. 50

1989; 84: 1440~1445頁)。これらの著者らは、G P V I受容体欠損症の患者に由来する血小板を *in vitro* で特徴付けた。しかし、*in vivo* 状況におけるコラーゲンと G P V I受容体の相互作用の生理学的重要性ならびに血管損傷後の接着に関する G P V I受容体の相対的な寄与は、知られていなかった。特に、この受容体を阻害すると、血管内血栓の形成における重要なステップである血小板係留が阻害されることは知られていなかった。本発明は、G P V I受容体を、*in vivo* における内皮下基質コラーゲンに付着することによって、内皮下層へ血小板が接着するために必須な受容体であることを明らかにしている。我々は驚くべきことに、G P I b (フォンビルブランド受容体)、I I b 3インテグリン受容体、2 1インテグリンまたは G P V受容体などの他の様々な血小板表面タンパク質のうち、G P V I受容体が、血管壁への血小板接着を媒介するのに必須な受容体であることを特定した。血小板接着は、生理学的剪断応力条件下での血小板凝集および動脈内血栓形成に関する第1に最も重要なステップである。したがってそれに続く動脈内閉塞をもたらす有害な作用は、心筋梗塞または脳卒中の臨床症候群の機能的ベースとなる。慢性硬化発症の場合、血小板と内皮の相互作用が動脈硬化症の初期段階を增幅する。我々の発明はまた、動脈硬化症の進行における初期の血小板接着および長期の血小板 - 内皮相互作用に関し、いくつかの血小板表面タンパク質の様々な組合せの中で、G P V I受容体が決定的な役割を果たすことを初めて示した。

【0043】

国際公開WO 01/16321およびWO 01/00810では、ヒトG P V I受容体のDNAおよびタンパク質の配列が開示されている。しかし、内皮の病変における血小板の接着および活性化に対する重要性は、*in vivo* の背景において実証されていない。

【0044】

米国特許第6,383,779号では、G P V Iの融合タンパク質が開示されている。しかし、この参考文献では、二量体融合タンパク質を開示せず、またG P V Iの治療効果についてはなにも開示しない。

【0045】

最近では、灌流条件中の*in vitro* における人工コラーゲンに対する血小板 - コラーゲン相互作用の異なるフェーズが研究された (Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tzomiyama Y, Ordinas A および Diaz-Ricart M. 「フロー条件下でのコラーゲン被覆表面への血小板接着の解析：血小板接着におけるグリコプロテインVIの関わり」 Analysis of platelet adhesion to collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. Blood 1997; 88: 2081~2092頁)。その研究の著者らは、剪断応力条件下でのコラーゲン - G P V I相互作用の重要性を既に指摘していた。しかし、内皮下基質コラーゲンの接着との関連性は、この人工の*in vitro* 状況では研究することができなかった。彼らの*in vitro* モデルの限られた関連性の結果として、前述の研究の著者らは、G P V I受容体がむしろ内皮への血小板接着よりも血小板活性化に関与するという結論に達した。対照的に、フォンビルブランドG P I b受容体は、血小板 - 内皮下相互作用にかなり関与している。これらの著者はまた、現在の文献の総説中で血小板 - コラーゲン相互作用についての入手可能なすべての情報に焦点を当てている。これまで、Moroi M および Jung, SM 「コラーゲンに対する血小板の受容体」 Platelet receptors for collagen. Thromb. Haemost. 1997; 78: 439~444頁) は、血小板の接着および血栓形成に関する血小板の様々なコラーゲン受容体とコラーゲン原線維の相互作用について論じている。しかし、著者らは、接着プロセスに対する様々なコラーゲン受容体の重要性を検証できなかったので、臨床的に関連した*in vivo* 状況における接着に関わる G P V I受容体

の役割を予期しなかった。

【0046】

したがって、本発明は、出血合併症の好ましくない副作用を引き起こさずに、血小板-内皮下相互作用および血小板接着に関連した標的を阻害する問題の解決策を提供する。G P V I 受容体によるコラーゲン-血小板のよく知られた相互作用に加えて、我々は、in vivoにおける血小板接着によって測定した天然の内皮下基質と血小板の相互作用についてのデータを提供することができた。その結果、我々は、血管内血栓の初期ステップとして血小板接着に関するG P V I - 内皮相互作用の重要性を検証することができた。したがって、我々の発明により、好ましくない副作用なしで、血小板接着の重要なステップに関する有効な抗血小板薬治療の問題が解決される。

10

【0047】

さらに、本発明は、イムノアドヘシン（本発明の融合タンパク質）を提供する。特定の実施形態では、イムノアドヘシンは、IgG免疫グロブリンのFc部分とG P V I 受容体の細胞外ドメインからなる（Fc - G P V I - nt）。この新規な融合タンパク質は、既に発表されているように、G P V I の元のDNA配列の約50%に基づいている。組換え融合タンパク質は、G P V I 受容体のような膜タンパク質を形成せず、個々の宿主細胞によって放出される可溶性の免疫グロブリン様イムノアドヘシンである。イムノアドヘシンのタンパク質構造は新規である。このイムノアドヘシンは、コラーゲンとG P V I のリガンド-受容体相互作用をブロックすることができる。我々の結果から、イムノアドヘシンは、コラーゲン刺激によって誘導される血小板の主要な生理学的機能に著しい影響を与えることが実証されている。コラーゲン誘導性の凝集、接着および放出機能は、イムノアドヘシンによって、特異的なモノクローナル抗体と同程度に阻害することができる。しかし、そのメカニズムは異なる：抗体はG P V I 受容体のリガンド結合部位に直接結合することによってG P V I 活性化を阻害するが、イムノアドヘシンはG P V I のリガンドであるコラーゲンを捕捉し、その結果リガンドによるG P V I 活性化が阻止される。

20

【0048】

本発明のイムノアドヘシンは、新規なG P V I 阻害剤である。G P V I が介在する複数の効果の活性化されたルートを、リガンド捕捉により選択的に阻害する利点がある。抗体によるG P V I 受容体内部移行のような二次作用を防ぐことができる。Fc - G P V I - ntは、ブラーク破裂または内皮の病変に伴う不安定アテローム斑によって引き起こされるアテローム硬化性合併症の治療に使用することができる。したがって、イムノアドヘシンFc - G P V I - ntは、G P V I 受容体の固有活性と関連シグナル伝達系に影響を与えることなくコラーゲン媒介G P V I 活性化に対する治療用阻害剤として働く。

30

【0049】

さらに、G P V I イムノアドヘシンは、抗体選択の理想的なエピトープとして働く。Fc部分があるので、タンパク質の精製に都合がよく、抗体ライプラリに対して、すなわちファージディスプレイによって大量の抗体選択を行うために表面に簡単に固定することができる。この選択では、天然のタンパク質と同じ構造をもち無傷のタンパク質に類似した関連エピトープに対して選択的な抗体スクリーニングを行うことができる。

【0050】

40

最後に、Fc - G P V I - ntは、G P V I 受容体活性化の阻害剤をスクリーニングするための重要なツールである。我々は、リガンドとしてのコラーゲンをプレコーティングしたプレートによってコラーゲンG P V I 相互作用をシミュレートする、ELISAに基づくin vitroアッセイを確立した。あるいは、このアッセイは、蛍光標識したFc - G P V I - ntを用いて、高スループットのフォーマットにグレードアップすることができる。このアッセイにより、蛍光測定によってG P V I 機能を阻害する能力に関して阻害性抗体または小分子の両方のスクリーニングが可能になる。この無細胞系スクリーニングアッセイを用いて、薬物試験のための高スループットでスケールアップ可能な蛍光スクリーニングアッセイのためのプロトタイプ法を確立した。

【0051】

50

血管内の超音波または核磁気共鳴映像法によるイメージング技術の最近の改良に基づいて、アテローム性動脈硬化症で急性冠状動脈または頸動脈症候群などの急性臨床的合併症のリスクがある患者の確認が可能である。これらの患者は血管内血栓の原因となる可能性のある活性病変を有する。したがって、本発明は、血小板糖タンパク質V I (G P V I)に対する抗体を含有する医薬品を投与することによって好ましくない副作用なしで血管内血栓の形成を予防することを可能にする。

【 0 0 5 2 】

活性な病変は、内皮下基質コラーゲンの露出および血小板活性化を特徴とする。このような病変の発生は、例えば血管内の超音波またはサーモグラフィ（例えば、F a y e d およびF u s t e r 、「高リスクまたは脆弱動脈硬化pla - r e k の臨床イメージング」 C l i n i c a l i m a g i n g o f t h e h i g h - r i s k o r v u l n e r a b l e a t h e r o s c l e r o t i c p l a q u e . C i r c u l a t i o n 2 0 0 1 ; 8 9 : 3 0 5 ~ 3 1 6 頁）または核共鳴映像法（H e l f t ら、「動脈硬化病変の悪化と退行」 P r o g r e s s i o n a n d R e g r e s s i o n o f A t h e r o s c l e r o t i c L e s i o n s . C i r c u l a t i o n 2 0 0 2 ; 1 0 5 : 9 9 3 ~ 9 9 8 頁）によって調べることができる。急性冠状動脈または頸動脈症候群の患者にはこのような病変がある可能性が非常に高く、心筋梗塞または脳卒中など急性臨床的合併症の再発のリスクは極めて高いが、原発性イベントから時間が経つにつれて次第に減少する。

【 0 0 5 3 】

したがって、本発明はまた、急性冠状動脈または頸動脈症候群の患者を治療する方法を提供する。前記方法は、血管内血栓を防止するために

(a) 患者に活性な血管内病変があるか否か判定し；
 (b) 血管内病変がある場合には、血小板糖タンパク質V I (G P V I)に対する抗体を用いて患者を治療する
 工程を含む。

【 0 0 5 4 】

さらに、本発明に基づいて、複合アテローム性pla - r e k の破裂による血管内血栓のリスクがある患者を治療することが可能である。この破裂により、内皮下コラーゲン基質が露出する。動脈内血栓形成の結果として、上記の重要で致命的な臨床症候群によって重要な器官の灌流がブロックされる。

【 0 0 5 5 】

本発明はまた、慢性アテローム硬化性症候群にかかっている患者を治療する方法を提供する。前記方法は、血管内血栓を防止するために

(a) 患者にアテローム進行が起こっているか否かを判定し；
 (b) 血管内病変がある場合には、血小板糖タンパク質V I (G P V I)に対する抗体を用いて患者を治療する
 工程を含む。

【 0 0 5 6 】

したがって、本発明に基づいて、アテローム性動脈硬化症のリスクがある患者を治療することが可能である。アテローム進行を予防するために、血小板と露出した内皮下コラーゲンの相互作用を抑制するために患者を本発明の融合タンパク質を用いて治療する。本発明の融合タンパク質は、血小板と露出した内皮下コラーゲンの相互作用が阻害されるよう、G P V I 血小板受容体に対する血管壁（例えば内皮下層）のリガンドをブロックする。

【 0 0 5 7 】

本発明の融合タンパク質は、適当な薬剤として許容される液体担体中に分散させてから患者に投与する凍結乾燥粉末の形であってよい。本発明の融合タンパク質は、非経口投与、急性合併症の治療の場合には好ましくは動脈内または静脈内投与投与に適した薬剤組成物に取り込むこともできる。こうした組成物は、通常融合タンパク質および薬剤として許

10

20

30

40

50

容される担体を含む。薬剤として許容される担体には、薬剤投与に適合した溶媒、分散媒、抗細菌剤および抗真菌剤ならびに等張化剤がある。本発明は、慢性または急性心血管疾患を治療する薬剤組成物の製造方法を含む。こうした方法は、本発明の融合タンパク質と一緒に薬剤として許容される担体を調製することを含む。急性心血管疾患を治療する場合には、組成物を静脈内または動脈内に投与することが好ましい。慢性心血管疾患を治療する場合には、組成物を皮下および腹膜内にも投与することができる。こうした組成物は、他のポリペプチド（インシュリンなど）または治療上活性な小分子などの追加の活性化合物をさらに含むことができる。したがって、本発明は、本発明の融合タンパク質および1種または複数のインシュリンなどの追加の活性化合物とを薬剤として許容される担体とともに調剤することによって薬剤組成物を調製する方法をさらに含む。糖尿病患者を治療するためには融合タンパク質とインシュリンを同時に処方する場合、異なるタンパク質を別々に保存できるような投与形態にし、タンパク質の混合が組成物の投与直前または投与中に起こるようにすることが好ましい。したがって、マルチチャンバー注射器による適用が考えられる。本発明の薬剤組成物は、その所定の非経口投与経路に適合するように調製する。非経口投与経路の例には、例えば、動脈内および静脈内投与がある。非経口的に使用する液剤または懸濁剤には、注射用水、食塩水、ポリエチレングリコール、固定油、グリセリン、プロピレングリコール、T W E E N または他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などのバッファーおよび塩化ナトリウム、デキストロース、サッカロースまたはマンニトースなどの等張化剤が含まれていてよい。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基を用いて調製することができる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル剤、使い捨て注射器または複数回投与バイアルに封入することができる。注射剤使用に適した薬剤組成物には、無菌の水性液剤または分散剤および無菌の注射用液剤もしくは分散剤を即時調製するための無菌の散剤がある。静脈内投与の場合、適当な担体には、生理学的食塩水、静菌水、またはリン酸緩衝生理食塩水（P B S）がある。この担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコール）、およびその適当な混合物を含む溶媒または分散媒であってよい。適切な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用、分散剤の場合には必要な粒径の維持、あるいは界面活性剤の使用などによって、維持することができる。微生物の活動は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって防ぐことができる。多くの場合、組成物中に等張化剤、例えば、糖、マンニトールなどの多価アルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含んでいることが好ましい。注射用組成物の吸収を長引かせるには、組成物中に、吸収を遅延させる薬物、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含める。無菌注射剤は、必要に応じて上記に挙げた成分の1種または組合せと一緒に、適切な溶媒中に活性化合物（例えば、ポリペプチドまたは抗体）を必要量混合し、続いてろ過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散剤は、基本的分散媒および上記で挙げたもののうち必要とされる他の成分を含有する無菌の賦形剤中に活性化合物を混合することによって調製する。無菌注射剤を調製するための無菌散剤の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥であり、あらかじめ滅菌ろ過した溶液から活性成分と任意の別の望ましい成分の粉末を得る。経口または非経口組成物を単位投与形態で調製するのが特に有利である。単位投与形態は、患者の単位投与量に合わせた個別の単位である。各単位には、所望の治療効果を得るために所定量の活性化合物と必要とされる薬剤用担体とが含まれる。急性合併症を治療するための融合タンパク質の治療有効量（すなわち、有効投与量）は、0.05～5 mg / kg 体重、好ましくは0.1～2 mg / kg 体重、より好ましくは0.1～1 mg / kg 体重である。慢性アテローム進行を治療するための融合タンパク質の治療有効量（すなわち、有効投与量）は、0.5～6 mg / kg 体重、好ましくは1～5 mg / kg 体重、より好ましくは2～5 mg / kg 体重である。治療有効量の融合タンパク質を用いて患者を治療するには、1

10

20

30

40

50

回の治療、好ましくは一連の治療を含めることができる。好ましい例では、本発明の融合タンパク質を、少なくとも週2回、0.5～6mg/kg体重、好ましくは1～5mg/kg体重、より好ましくは2～5mg/kg体重の範囲で用いて慢性アテローム進行患者を治療する。

【0058】

<血小板・コラーゲン相互作用および阻害剤による調節を調べる方法>

血小板凝集およびATP放出

マウスの血小板リッチな血漿を、ウシ型Iコラーゲンの濃度を0.2～4μ/mlに増やしながら刺激すると、2～95%の凝集が用量依存的に誘発され、また0～1.66nMのATP放出が用量依存的に誘発される。ハーフ・マキシマム（最大値の半分を誘発する）コラーゲン濃度を選択してさらなる実験を行った。特異的な抗マウスGPVI抗体JAQ1（50μg/mlおよび100μg/ml）と一緒にマウス血小板リッチな血漿をインキュベーションすると、2μgコラーゲン/mlで刺激した後の血小板凝集がほぼ完全に失われた（50μgJAQ1の場合：2±0.7；100μgJAQ1の場合：1.5±0.3%）。さらに、ATP放出は抗体の用量依存的に、10μg抗体/mlで1.09nM ATPに阻害され、50および100μg抗体/mlで完全になくなつた。

【0059】

同様に、GPVIイムノアドヘシン（Fc-GPVI-nt）（50μg/mlおよび100μg/ml）とマウスの血小板リッチな血漿をインキュベーションすることにより、2μgコラーゲン/mlで刺激した後の血小板凝集がほぼ完全に失われ（50μgFc-GPVI-ntの場合：2±0.7；100μgFc-GPVI-ntの場合：1.5±0.3%）、ATP放出は0nM ATPとなつた。

【0060】

したがって、イムノアドヘシンは、天然のGPVIリガンドであるコラーゲンを捕捉することによってGPVI活性化を十分に阻害した。重大な血小板機能である凝集とATP放出によって測定される血小板の放出メカニズムの両方ともFc-GPVI-ntの影響を受けた。

【0061】

生理学的フロー条件下でのGPVI媒介接着（フローチャンバー）

フローチャンバー中で生理学的剪断条件下における血小板の接着を試験した。血小板の初期接着および強固な接着は、Fc-GPVI-ntイムノアドヘシンを60%加えることによって著しく阻害された（図4を参照のこと）。

【0062】

GPVI結合アッセイ

コラーゲンでコーティングされたプレートへのFc-GPVI-ntの接着は、ELISAに基づいた蛍光アッセイで測定した。イムノアドヘシンFc-GPVI-ntの結合は、0.2～10μgFc-GPVI-ntで用量依存的に増大し飽和レベルにまで達した（図5を参照のこと）。その特異性は、Fc-GPVI-ntの結合を空のイムノアドヘシンFc-ntの結合またはコーティングしていないプラスチック表面への結合とを比較することによって実証した（図6を参照のこと）。

【0063】

<急性血管イベントにおける血小板活性化の重大なステップとしてin vivo血管損傷における血小板接着および凝集を調べる方法>

病変へのin vivo接着プロセスでの血小板・コラーゲン相互作用の生物学的重要性を評価するために、マウス頸動脈の血管損傷後の血小板・血管壁相互作用を評価する。この重要な血管床での血管損傷は、動脈硬化症の初期の内皮の病変、または内皮下層からのコラーゲン原線維の露出が起こる動脈硬化症の後期段階におけるプラーク破裂などの、動脈硬化症の第1のステップのモデルとなり得る。さらに、このモデルにより、その後の血管損傷の合併症の研究が可能になる。小さな内皮病変により、血小板の活性が最大にな

10

20

20

30

40

50

り、その後の血小板接着および凝集のステップへと続く。さらなるステップでは、血小板凝集体は、続発性虚血性脳卒中を伴う頸動脈からの塞栓症を招く可能性がある。したがって、この実験構成は、急性冠状動脈症候群および脳卒中をもたらすplaques破裂および内皮病変を伴う不安定アテローム性動脈硬化症のある、患者のサブグループに関連した *in vivo* モデルとなる。

【0064】

走査型電子顕微鏡で見るとわかるように、頸動脈を5分間強く結さつすると、内皮細胞層が完全に失われ、損傷部位で血小板接着が開始する(図1a)。*in vivo* 蛍光顕微鏡検査法を使用して、血管損傷後の血小板蓄積の動的プロセスを直接可視化し、定量化することができる。多くの血小板は、内皮除去後数分内に血管壁に繋ぎとめられる(4620±205血小板/mm²)。実際内皮下層との接触を確立したすべての血小板は、最初は「stop-start」タイプのゆっくりとした表面移動を示す(Savage, B.、Saldivar, E. & Rugggeri, Z. M.「フィブリノーゲンに捕捉されて起こる血小板接着の開始と、フォンビルブランド因子上での移動」Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. Cell 1996; 84、289~297頁)。我々は、初期の緩慢な表面移動から非可逆的な血小板接着への移行をすべての血小板の88%で観察した(4182±253血小板/mm²)(図1b)が、血小板捕捉が一過性のままで終わったのは12%に過ぎなかった(543±32血小板/mm²)。強固な捕捉が確立された後、接着血小板は、循環系からさらなる血小板を動員し、凝集形成がもたらされる(図1c)。この血小板動員と類似の特徴が、*in vitro*における固定化コラーゲンでも得られる。対照的に、生理学的条件下で無損傷の血管壁に繋ぎとめられる血小板はほんの少しであり(P<0.05 vs. 血管損傷)、実質的にこれらの血小板の100%が強固に捕らえられることなく血管壁から移動させられる(P<0.05 vs. 血管損傷、図1a~c)。

【0065】

<*in vivo* における血管損傷についての血小板中の新規で関連した標的たんぱく質としてのGPVIの同定>

種々の異なる受容体およびシグナル伝達経路が関与する血小板-血管壁相互作用は非常に複雑なので、このプロセスの*in vivo* における阻害は非常に困難になる。フォンビルブランド因子(vWF)によってコラーゲンと間接的に相互作用するGP Ib-Ⅴ-I-Xおよび_{IIb}³インテグリンの他に、多くのコラーゲン受容体が血小板上で同定されており、最も重要なものの1つとして₂¹インテグリン(Santoro, S. A.「初期の2価カチオン依存性の血小板のコラーゲンへの接着を仲介する160000ダルトンの血小板膜タンパク質の同定」Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. Cell 1986; 46、913~920頁)、GPV(Moog, S.ら。「血小板糖タンパク質Vはコラーゲンへの結合と凝集に関与する」Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. Blood 2001; 98、1038~1046頁)、およびGPVI(Moroi, M.、Jung, S. M.、Okuma, M. & Shinmyozu, K.「コラーゲンに誘導される凝集と接着がない、糖タンパク質VIの欠損した血小板を有する患者」A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. J. Clin. Invest. 84、1440~1445頁)が含まれている。*in vitro* で

10

20

30

40

50

働く異なるシグナル伝達系についていくつかの報告があるが、そのなかで G P V I も議論されている (Gibbins, J. M.、Okuma, M.、Farndale, R.、Barnes, M. & Watson, S. P. 「糖タンパク質V I は血小板中でのコラーゲン受容体であり、Fc受容体鎖のチロシンリン酸化の根底をなす」 Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. FEBS Lett. 1997; 413, 255~259頁; Nieswandt, B. ら. 「マウスにおける血小板グリコプロテインV I のインビボ渴による長期抗血栓性保護」 Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001; 193, 459~469頁、Nieswandt, B. ら. 「2 1インテグリンではなく糖タンパク質V I が血小板とpコラーゲンの相互作用に必須である」 Glycoprotein VI but not 2 1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J 2001; 20, 2120~2130頁)。

【0066】

動脈血栓形成における血小板 - コラーゲン相互作用の *in vivo* における関連性を直接試験するために、我々は、*in vivo* で G P V I を阻害または除去した。モノクローナル抗体 (mAb) JAQ1 は、マウス G P V I 上の主要なコラーゲン結合部位をブロックし (Schulte, V. ら. 「マウス血小板の活性化に対するコラーゲン中の2つの異なるエピトープ」 Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. J. Biol. Chem. 2001; 276, 364~368頁)、また高剪断フロー条件下で固定化線維性コラーゲンへの強固な血小板接着をほぼ完全に阻害する (Nieswandt, B. ら. 「2 1インテグリンではなく糖タンパク質V I が血小板とpコラーゲンの相互作用に必須である」 Glycoprotein VI but not 2 1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J 2001; 20, 2120~2130頁)。動脈血栓形成における血小板接着 / 凝集の動的プロセスにおける G P V I - コラーゲン相互作用の重要性を研究するために、JAQ1 の F ab 断片またはアイソタイプの合った対照 IgG と一緒にあらかじめ培養した同系の蛍光標識血小板を与えておいたマウスに、頸動脈損傷を上記のように誘導した。極めて意外なことに、我々は、G P V I の阻害により、内皮除去後の初期の血小板係留が総頸動脈において 89% 減少すること (P < 0.05 vs. 対照 IgG、図 2 a) を発見し、このプロセスは固定化 vWF との G P I b の相互作用によって主に媒介されると考えられた (Goto, S.、Ikeda, Y.、Saldivar, E. & Rugggeri, Z. M. 「異なる剪断流条件の結果としての血小板凝集の異なる機構」 Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. J. Clin. Invest. 1998; 101, 479~486頁; Sixma, J. J.、van Zanten, G. H.、Banga, J. D.、Nieuwenhuis, H. K. & de Groot, P. G. 「血小板接着」 Platelet adhesion. Semin. Hematol. 1995; 32, 89~98頁)。さらに、安定な血小板捕捉は、JAQ1 によって 93% 減少した (図 2 a)。我々は、内皮下表面との初期の接触を確立した血小板のうちのたった 58% で、初期の係留 / 緩慢な表面移動から非可逆的な血小板接着への移行を観察した (対照 IgG 前処理血小板の場合の 89% と比較して、P < 0.05、図 2 b)。接着血小板の凝集は、JAQ1 の F ab 断片を用いて血小板を前処理した場合には実質的になかった

10

20

30

40

50

が、対照の場合はそうではなかった（ $P < 0.05$ v.s. 対照、図2cおよびd）。これらのデータから、直接的な血小板-コラーゲン相互作用が血管損傷部位における初期の血小板係留およびその後の安定な血小板接着および凝集に極めて重要であることが示された。さらに、これらの発見は、GPIVはこのプロセスの重要な制御因子であるが、他の表面受容体、最も重要なことにはGPIb-V-IXおよび₂₁はin vivoにおける内皮下層への血小板接着および凝集を開始するのに十分ではないことを示している。

この作用が表面結合JAK1によって他の受容体、例えばGPIb-V-IXの立体障害に基づいている可能性を排除するために、我々は、血管損傷の5日前にJAK1を注射することによってGPIV欠損マウスを生成した。既に報告されているように、このような処理により、例えば循環血小板中のGPIVの内部移行およびたんぱく質分解によってGPIVの実質的に完全な損失が誘導され、「GPIVノックアウト」様表現型が少なくとも2週間もたらされる（Nieswandt、B.ら、「マウスにおける血小板グリコプロテインVIのインビオ涸渴による長期抗血栓性保護」Long-term anti-thrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001; 193, 459~469頁）。図3aに示すように、GPIVは、対照 IgGではなく100 μg/マウスJAK1を注射してから5日目のJAK1処理マウス由来の血小板では検出されなかつたが、GPIb-V-IX、₂₁₃、および₂₁を含む試験した他のすべての受容体の表面発現および機能は、両方のグループのマウスで変わらず、それまでの結果を裏付けた（図示していないデータおよびNieswandt、B.ら、「マウスにおける血小板グリコプロテインVIのインビオ涸渴による長期抗血栓性保護」Long-term anti-thrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001; 193, 459~469頁）。

【0067】

走査型電子顕微鏡によって示されるように、総頸動脈の内皮除去後の血小板接着および凝集は、実質的にGPIV欠損マウスで起こらないが、IgG前処理マウスではそうではない（図3）。次に、in vivoビデオ蛍光顕微鏡検査法を使用して、GPIV欠損マウスの血管損傷後の血小板接着動力学を定義した（図3c~f）。

【0068】

GPIV欠失により、血管損傷部位での血小板の係留/緩慢な表面移動が著しく減少する（IgG前処理マウスと比較して83%、 $P < 0.05$ ）。このGPIV非依存性の緩慢な表面移動にはvWF-GPIb相互作用が必要である。なぜならばbGPIbに対する機能ブロッキング性mAbのFab断片（pOp/B）と血小板をブレインキュベーションすることによって抑制されるからであり、このプロセスにおけるGPIbの重要な役割を裏付けている（図示していない）。GPIVがない場合、安定な血小板接着は、（IgG処理）対照と比較して約90%減少するが、接着血小板の凝集は実質的に起こらない（図3b~f）。我々は、血小板係留から安定な血小板接着への移行が見られたのは、損傷部位に初期に繋ぎとめられたすべての血小板のうち58%だけであり（対照mAb前処理血小板の場合の89%に比較して、 $P < 0.05$ 、図3d）、GPIb依存性表面移動は安定な血小板接着およびその後の凝集を促進するのに十分ではないことを示している。

【0069】

GPIVブロックによる血小板係留の完全な阻害は驚くべきことであり、血管病変への強固な血小板接着の極めて初期のフェーズでのこの受容体のこれまでに認識されていない機能を示唆した。線維性コラーゲンは、ヒトアテローム硬化性病変の主要な成分であり（Rekhter、M.D.「動脈硬化におけるコラーゲンの過剰合成および不十分合成」Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. Cardiovasc. Res. 1999

10

20

30

40

50

; 41、376~384頁; Rekhter, M. D. ら. ヒト動脈硬化におけるI型コラーゲンの遺伝子発現」Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. Am. J. Pathol. 1993; 143、1634~1648頁); (内膜平滑筋細胞および線維芽細胞での)コラーゲン合成の亢進は、アテローム発生のプロセスにおける管腔狭窄に著しく寄与する (Opsahl, W. P. 、 De Luca, D. J. & Ehrhart, L. A. 「インビオで定量された動脈硬化性動脈におけるコラーゲン合成の亢進」Accelerated rates of collagen synthesis in atherosclerotic arteries quantified in vivo. Arteriosclerosis 1987; 7、470~476頁)。 プラーク破裂または開裂 (自然発生的またはバルーン血管形成後) は、血流へのコラーゲン原線維の露出をもたらす。

【0070】

本発明は、このような内皮下コラーゲンが動脈血栓形成の主なきっかけであることを初めて教示し、損傷した血管壁への血小板動員におけるコラーゲン受容体GPIVの予期しない機能を明らかにするものである。高い剪断条件下での血小板係留および緩慢な表面移動のプロセスは、固定化vWFとのGPIb相互作用に大きく依存することが知られている。しかし機能的なGPIVも必要とされるので、この相互作用は *in vivo* における初期の血小板-血管壁相互作用を確立するのには十分ではない (図2および3)。したがって、内皮下層に血小板を動員するためにGPIbとGPIVの両方が協力しなければならない。血小板係留中にGPIVが連結すると、₁₁_b₃ および ₂₁ インテグリンを低親和性状態から高親和性状態にシフトさせることができる。次いで、₁₁_b₃ と ₂₁ の両方は協力してその後のコラーゲン上への血小板の安定な捕捉を促進する。₁₁_b₃ はその後の接着血小板の凝集に必須である。したがって、血小板と内皮下コラーゲンの初期の接触中にGPIVが結合することにより、その後の安定な血小板接着および凝集に必須の活性化シグナルがもたらされる。重要なことは、*in vitro* では低レベルの ₁₁_b₃ インテグリン活性化を誘導した、GPIbの占有または横並びクラスター形成 (GPIb依存性表面移動中) (Kasirer Friede, A. ら. 「血小板GPIB-IX複合体の横並びクラスター形成はインテグリン ₁₁_b₃ の接着機能をアップレギュレートする」Lateral clustering of platelet GPIb-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin ₁₁_b₃. J. Biol. Chem. 2002; Vol 277: 11949~11956頁) は、*in vivo* における血小板接着を促進するのに十分ではないことである。

【0071】

したがって、本発明は、内皮下層への血小板付着を阻害するのに必須の受容体を同定した。露出したコラーゲンとのGPIVの相互作用をブロックする抗体は、血栓形成のすべての主なフェーズ、すなわち動脈損傷部位での血小板係留、強固な接着、および凝集を特に阻害することができる (例えば急性冠状動脈症候群において)。GPIVの阻害または欠乏によって極めて大きい保護が得られるということは、病理学的なアテローム硬化性病変の発生および進行を制御するためにGPIV-コラーゲン相互作用を選択的薬理学的に調節することの重要性を確立するものである。

【0072】

アテローム斑の破裂に続いて、内皮下コラーゲンの露出が損傷部位での血小板接着および凝集を開始させる主な引き金であり、その後に動脈血栓が起こる (1; 24; 25)。近年クローニングされた (5; 6) 血小板糖タンパク質GPIVは、本発明によって主要な血小板コラーゲン受容体 (4) であることが確認されており、*in vitro* (22) と *in vivo* (病態) 生理学的条件下 (3) の両方で血小板接着を媒介する。したが

つて、本発明に示すように、*in vitro* および *in vivo* における血小板接着に対する特異的な融合タンパク質 Fc - GPVI - nt の阻害活性による GPVI 阻害により、進行型アテローム性動脈硬化症にかかっている患者の血小板動員および動脈血栓が抑制される。

【0073】

Fc - GPVI - nt 融合タンパク質は、可溶性 Fc - GPVI - nt を得るためにアデノウイルス発現系を用いて HeLa 細胞中に発現させる。可溶形態の GPVI の特徴付けによって、Fc - GPVI - nt が分子量約 160 kDa の二量体として分泌されることが明らかになった。一貫して Miura および共同研究者らは、GPVI - Fc - 二量体が二量体として存在しており、2 個の GPVI - Fc - 二量体分子が、各分子の Fc ドメインの Cys が形成するジスルフィド結合によって架橋されていることを最近報告した (21)。重要なことには、GPVI の細胞外ドメインの単量体ではなく、二量体型の GPVI だけが、コラーゲン結合親和性を示し、コラーゲン誘導性血小板凝集を弱めることが報告されている (21)。

【0074】

結合アッセイを行って、GPVI - Fc - 二量体 - コラーゲン相互作用を明らかにした。可溶性 GPVI は、飽和するように固定化コラーゲンと結合する。線維性コラーゲンと GPVI - Fc - 二量体の結合は、固定化 vWF または BSA では結合がおこらなかつたので、極めて特異的であった。さらに、固定化コラーゲンと GPVI の結合は、可溶性コラーゲンによって阻害することができる。GPVI - Fc - 二量体結合をブロックするには高濃度の可溶性コラーゲンが必要であり、融合タンパク質が高い親和性で固定化コラーゲンと結合することを示した。同様に、高い結合解離定数 (K_D 約 5.8×10^{-7} M) が GPVI - コラーゲン相互作用について報告されている (21)。

【0075】

可溶性 Fc - GPVI - nt は、コラーゲンまたは高い親和性で GPVI と結合するヘビ毒のコンバルキシン (convulxin) による血小板活性化および凝集を軽減させることが以前に実証されている (6; 21; 27)。血小板凝集の他に、GPVI は、コラーゲンへの血小板接着のプロセスに決定的に関与している (3; 22)。したがって、本研究では、我々は、*in vitro* における生理学的フロー条件での血小板接着に対する Fc - GPVI - nt の影響を試験した。我々は、可溶性 Fc - GPVI - nt が用量依存的に *in vitro* における低および高剪断条件で血小板接着を阻害することを示す。Fc - GPVI - nt の存在下では接着血小板の凝集が実質的に起こらないが、対照 Fc ペプチドの存在下では起こるので、GPVI が血小板接着とその後の固定化コラーゲンによる活性化の両方のプロセスに寄与することが示唆される。GPVI は、受容体密度依存性のコラーゲン応答 (すなわち接着および凝集) を与える (22)。同様に、トランスクレクトされた RBL - 2H3 細胞では GPVI 発現が 50% 以上低下しており、これらの細胞がコラーゲン誘導性凝集を欠くことに関連していることが報告されている (22) ので、コラーゲン - GPVI 結合の約 50% の阻害が、露出したコラーゲンへの血小板動員を弱めるのに十分であることが予想可能である。本研究では、フロー下での血小板接着の著しい阻害を誘導するのに用量 1 mg / kg の Fc - GPVI - nt が必要であった。このことは、各コラーゲン線維には複数の GPVI 結合部位があるという考え方を支持している。同様の量の機能ブロッキング抗 GPVI 抗体が、*in vivo* における血小板 - 血管壁損傷を軽減するのに必要であった (3)。

【0076】

線維性コラーゲンは、正常な血管壁の主な成分であるが、アテローム硬化性病変の主な成分でもある (28)。アテローム斑の破裂または開裂により、循環血小板にコラーゲン原線維が露出することになる。以前に報告されたように、GPVI - コラーゲン相互作用は、血管損傷後の動脈血栓形成に本質的に関与している (3)。ここでは我々は、動脈損傷後の血小板動員に対する可溶性 Fc - GPVI - nt の *in vivo* における効果を

10

20

30

40

50

実証する。頸動脈の可逆的な結さつによって内皮除去を誘導し、血小板付着の動的プロセスを生体ビデオ蛍光顕微鏡検査法によってモニターした(3)。我々は、可溶性Fc-GPVI-ntによって内皮除去後の安定な血小板係留、接着および血小板凝集が軽減されることをin vivoで初めて実証している。Fc-GPVI-ntによる血小板動員の阻害は、用量依存的であった。血小板の安定な制止の抑制以外に、Fc-GPVI-ntは、内皮除去部位での初期の血小板係留/緩慢な表面移動を著しく低減させた。我々は、GPIbまたはGPVIの阻害により、血小板係留が同程度弱められることを示し(3)、内皮下コラーゲンへの血小板係留を促進するのにはGPVIおよびGPIbの相互作用が接触して働く必要があること(2; 29~31)を支持している。事実、GPVI-リガンド相互作用について報告されている高い「オン」および「オフ」の速度(22)は、係留受容体としてのGPVIの役割と整合性がある。

【0077】

本発明は、Fc-GPVI-ntを、血管損傷後の動脈血栓を軽減する医薬品の活性成分として特定している。免疫組織化学によって示されるように、Fc-GPVI-ntが、血管損傷部位で露出した内皮下層を標的としているという観察はさらにこの考えを支持する。これは、GPVI-コラーゲン相互作用の阻害はおそらく血管損傷部位に限られており、一方非結合Fc-GPVI-ntの予想される半減期は短いので、血小板機能が全身的に長期に阻害されることには制限があることを意味している。対照的に、GPVIを対象としたモノクローナル抗体を投与すると、すべての循環血小板のGPVIが全身的阻害を受ける。さらに、Fc-GPVI-ntの投与は、血小板数に影響を与えたかった。対照的に、抗GPVI mAbsは、最終的に免疫性血小板減少症または循環血小板上のGPVIの完全欠失につながる可能性があり(14; 32)、臨床で使用できない。したがって、Fc-GPVI-nt療法は、抗GPVI mAbに基づく戦略と比較して、臨床出血を伴う危険性がより低いと思われる。

【0078】

血管損傷部位での血小板接着および凝集は、止血に関して極めて重要であるが、アテローム性動脈硬化症の状況下では動脈閉塞を招き、冠状動脈血栓および心筋梗塞などの疾患を誘起する。静脈内GPIIb-IIIa受容体阻害剤の使用により、冠状動脈ステント術を受けた患者の臨床成功が著しく向上している(33~35)。しかし、重篤な出血合併症がアブシキシマブ(abciximab)で治療した患者の予後を悪くすることが報告されている(36)。本発明は、Fc-GPVI-ntによるGPVI-コラーゲン相互作用の阻害が、in vitroとin vivoの両方で血小板接着を著しく減少させるのに十分であることを実証する;しかし、可溶形態のGPVIは、尾部出血時間を適度に延長しただけであった。同様に、GPVI欠損血小板を有する患者で軽い出血障害が報告されており(37)、GPVIが完全にない場合でも凝結および止血が有効であることが示唆されている。一部には、この矛盾は、GPVIの阻害または不在により、コラーゲン以外の血小板アゴニスト、例えばADP、組織因子またはトロンビンに対して血小板凝集が妨害されないことによるものであるかもしれない。対照的に、例えば7E3またはそのヒト化誘導体によるGPIIb-IIIaの直接的な阻害は、血小板に結合しているフィブリノーゲンをブロックし、血小板凝集に必須のプロセスであり、これまで知られているほとんどの血小板アゴニストに対して実質的に血小板凝集を軽減させる。したがって、Fc-GPVI-nt療法は、抗GPIIb-IIIaに基づく戦略と比較して、リスクが低い臨床出血を伴う。

【0079】

結論として、本発明は、Fc-GPVI-ntがin vitroにおけるフローライトおよびin vivoにおけるマウス頸動脈の内皮除去後での血小板接着を軽減させる初めてのin vivoにおける証拠を提供している。これは、GPVI-コラーゲン相互作用が、血栓形成のすべての主なフェーズ、すなわち動脈損傷部位での血小板係留、強固な接着、および凝集で中心的な役割を果たすという概念をさらに支持している(例えば急性冠状動脈症候群中)。本発明は、GPVIがアテローム性動脈硬化症の進行において主要

な役割を果たすという概念をさらに支持している。さらに、本発明は、G P V I と糖尿病の間の因果関係を初めて示している。

次に、以下の具体例を参照して本発明をさらに詳細に説明する。

【0080】

【実施例】

実験動物。特定病原体不在 C 5 7 B L 6 / J マウスを Charles River 社 (スルツフェルト、ドイツ) から入手した。実験には 12 週齢の雄マウスを使用した。実験動物に行ったすべての実験手順はドイツの動物保護に関する法律で承認されるものである。

【0081】

モノクローナル抗体。抗 G P V I モノクローナル抗体 (mAb) (J A Q 1) 及び抗 G P I b モノクローナル抗体 (p0p/B)、ならびに J A Q および p0p/B の F a b 断片を、既報 (Bergmeier, W., Rakebrandt, K., Schröder, W., Zirngibl, H. & Nieswandt, B. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor G Plb-IX with novel monoclonal antibodies. Blood 2000; 95, 886~893 頁; Nieswandt, B., Bergmeier, W., Rakebrandt, K., Gessner, J. E. & Zirngibl, H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. Blood 2000; 96, 2520~2527 頁) のように作製した。特異性に無関係な対照 (irrelevant control) のラット IgG は Pharmingen 社 (ハンブルク、ドイツ) から入手した。

10

【0082】

G P V I 欠損マウスの作製。

G P V I 欠損マウスを作製するため、野生型 C 5 7 B L 6 / J マウスに J A Q 1 を 100 μ g 投与した。血小板接着の in vivo での評価のためにはモノクローナル抗体注射後 5 日目の動物を使用した。血小板上での G P V I の発現が欠損していることは、ウエスタンプロット解析とフローサイトメトリーにより確認した。

30

【0083】

フローサイトメトリー

野生型 C 5 7 B L 6 / J マウスまたは G P V I 欠損マウスから得たヘパリン化全血を、タイロード - HEPES バッファー (134 mM NaCl、0.34 mM Na₂HPo₄、2.9 mM KCl、12 mM NaHCO₃、20 mM HEPES、5 mM グルコース、1 mM MgCl₂、pH 6.6) で 30 倍に希釈した。試料を蛍光標識した抗 G P V I (J A Q 1) および抗 C D 4 1 モノクローナル抗体とともに室温で 10 分間培養し、直接 F A C S c a n (商標) (B e c t o n D i c k i n s o n 社) で解析した。

40

【0084】

ヒトおよびマウスの可溶性 G P V I のクローニング、ウィルス発現および精製

可溶型ヒト G P V I を作製するため、以下の実施例 1 から実施例 3 に従い、ヒトまたはマウス G P V I 細胞外ドメインをクローン化し、ヒト免疫グロブリン F c ドメインに融合した。G P V I - F c 融合タンパク質もしくは対照である F c をコードするアデノウィルス構築体を調製し、組換えタンパク質を作製した。発現タンパク質のミスフォルディングとグリコシル化の欠損を防ぐため、ヒト HeLa 細胞系を使用して、G P V I - F c および対照 F c を可溶性分泌タンパク質として発現させた。

【実施例 1】

【0085】

50

G P V I のイムノアドヘシン (F c - G P V I - n t) のクローニング

G P V I 細胞外ドメインをコードする G P V I の N 端末部と、 I g G の F c 部との組換え融合タンパク質を作製することにより、 G P V I 受容体のイムノアドヘシンを作製した。 F c は、正方向プライマー 5' - c g c g g g g c g g c c g c g a g t c c a a a t c t t g t g a c a a a a c - 3' および逆方向プライマー 5' - g c g g g a a g c t t t c a t t a c c c g g a g a c a g g g a g - 3' を用い、ヒト心臓 c D N A ライブライア (Clonetech 社、パロ・アルト、カルフォルニア) から P C R により増幅した。 P C R 反応は Expand High Fidelity P C R System (Roche Molecular Biochemicals 社、マンハイム、ドイツ) を用い、アニール温度を 58 として 20 サイクル行った。 P C R 断片を Not I / Hind III を用いて p A D T r a c k C M V プラスミドでクローニングし、配列をシーケンサー (MediGenomix 社、マルティンスリート、ドイツ) により確認した。 10

ヒト G P V I 細胞外ドメインのクローニングのために、培養巨核球から RNA (R N e a s y M i n i K i t ; Q i a g e n 社、ヒルデン、ドイツ) を製造社のプロトコールに従って単離し、 2 μ g の RNA を用いて 37 で一晩逆転写を行った (O m n i s c r i p t R T K i t ; Q i a g e n 社)。 100 ng の上記反応生成物を鋳型として用い、プライマー 5' - g c g g g g a g a t c t a c c a c c a t g t c t c c a t c c c c g a c c - 3' および 5' - c g c g g g g c g g c c g c c g t t g c c c t t g g t g t a g t a c - 3' を用いて h G P V I の P C R により増幅を行った。 P C R 反応は Expand High Fidelity P C R System (Roche Molecular Biochemicals 社、マンハイム、ドイツ) を用い、アニール温度を 54 として 24 サイクル行った。 P C R 断片を B g I I I / Not I を用い上記 p D A T r a c k C M V · F c プラスミドでクローニングし、配列を確認した。 20

【 0086 】

F c - G P V I - n t に基づく単量体融合タンパク質の構築

F c 単量体断片を、プライマー対 5' - c g c g g g g c g g c c g c c a g c a c c t g a a c t c c t g - 3' および 5' - c g c g g g g a t a t c t c a t t a c c c g g a g a c a g g g a g - 3' を用い、鋳型として p A D T r a c k C M V g p V I - F c を用いて P C R 増幅した。 P C R 反応は Expand High Fidelity P C R System (Roche Molecular Biochemicals 社、マンハイム、ドイツ) を用い、 58 でアニールを行い、 20 サイクル行った。 F c 単量体の P C R 断片 (Not I / E c o R V) および p A D T r a c k C M V g p V I - F c (B g I I I / Not I) からの g p V I 断片を、上述と同様にクローニングした。 30

【 実施例 2 】

【 0087 】

F c - G P V I - n t (A d - F c - G P V I - n t) のためのアデノウィルスの作製

プラスミド p A D T r a c k C M V F c - G P V I - n t を P m e I (New England Biolabs 社、ビバリー、マサチューセッツ) で一晩直線化し、脱リン酸化し、精製した (G F X D N A and Gel Purification K i t ; A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h A B 社、ウプサラ、スウェーデン)。組換えのため、 1 μ g の直線化プラスミドと 0.1 μ g の p A d e a s y 1 を用いて、エレクトロコンピテント大腸菌 B J 5 1 8 3 (S t r a t a g e n e 社、ラジヨラ、カルフォルニア) を 2500 V 、 200 、 25 μ F D で形質転換し (E . c o l i - p u l s e r ; B i o r a d 社、ハイデルベルク、ドイツ) 、培地に塗布し、 37 で一晩培養した。コロニーから小規模で調製したプラスミド D N A を P a c I を用いて確認し、陽性クローンで大腸菌 D H 5^R を再形質転換した。 40

【 0088 】

プラスミド D N A を P a c I で消化し、これを用いて 293 細胞の形質転換を行った (E f f e c t n e n e トランスフェクション試薬 ; Q i a g e n 社、ヒルデン、ドイツ) 50

。細胞を7日間培養し、剥がしとり、遠心分離して回収した。ペレットはダルベッコP B Sに再懸濁し、凍結(-80)と融解(37)のサイクルを4回繰り返すことにより溶解した。細胞残屑を遠心分離で取り除き、溶菌液を-80で保存した。

【0089】

組換えウィルスのブラーク選択のために、段階希釈したトランスフェクション溶菌液を用い、293細胞をダルベッコP B S中で、緩和に攪拌しながら、室温で1時間、感染させた。感染後、0.5%アガロースを含む培養培地(20%血清を含む改変イーグル培地(#21935; Gibco Life Technologies社)2x、2xペニシリン/ストレプトマイシン、2xL-グルタミン、および1%アガロース(Seacam)溶液との1対1混合物)で細胞を重層した。感染後5日目から14日目まで細胞のブラーク形成をモニターし、形成されたブラークはパストールピペットを用いて収集し、0.5mLダルベッコP B Sに再懸濁し、-80で保存した。ブラークは293細胞を用い、さらに増幅を行った。

【0090】

ヒトgpVII-Fc単量体を安定に発現するCHO細胞の構築
単量体を発現する細胞を実施例2に従って作製した。

【実施例3】

【0091】

Fc-GPVI-ntタンパク質および対照イムノアドヘシン(Fc)の精製

Ad-Fc-GPVI-ntを感染させたHeLa細胞の培養上清を感染2日後に収集、遠心分離し(3800g、30分、4)、濾過した(0.45μm)。イムノアドヘシンに1体積の硫酸アンモニウム(761g/1)を加えて、4で一晩攪拌した。タンパク質を遠心分離(3000g、30分、4)でペレット化し、0.1体積のP B Sに溶解し、P B Sを用いて4で透析した。タンパク質溶液を遠心分離(3000g、30分、4)で清澄化し、Protein Aカラム(HiTrap(商標)Protein A HP; Amersham Pharmacia Biotech AB社、ウブサラ、スウェーデン)で精製した。カラム洗浄はOD₂₈₀が0.01未満になるまで結合バッファー(20mMリン酸ナトリウムバッファーpH7.0、0.02%NaH₃)を用いてを行い、溶出バッファー(100mMグリシン、pH2.7)で溶出した。溶出画分を中和バッファー(1M Tris/HCl pH9.0、0.02%NaH₃)で中和し、回収したものを、P B Sで4で一晩透析し、分注して-20で凍結した。

精製されたFc-GPVI-ntは還元条件下でSDSゲル電気泳動した後に、クマシープルーカー染色もしくはヤギ抗ヒトFcペルオキシダーゼ結合抗体または抗GPVIモノクローナル抗体5C4を用いたイムノプロット法により、分子量約80kDaで検出された(図1a上段と中段)。一方、非還元条件下では約160kDaのタンパク質が同定され(図1下段)、これはGPVI-Fcは全て二量体として得られるという報告を裏付けるものであった(21)。

【実施例4】

【0092】

GPVI阻害剤のスクリーニング試験

ELISAプレート(Immulation 2 HB; Dynex Technologies社、チャンティリー、バージニア)を1μg/ウェルのコラーゲン(ウシ由来I型; BD Bioscience社、ベッドフォード、マサチューセッツ)を含む50mMのTris/HCl(pH8.0)100μLを用い4で一晩コーティングした。プレートを250μL/ウェルのP B S-0.05%Tween 20(P B S T)で2回洗浄し、250μL/ウェルのRoti-Block(Roth社、カールスルーエ、ドイツ)で一晩ブロッキングした。プレートを250μL/ウェルのP B S Tで2回洗浄し、Fc-GPVI-ntを含むP B S Tを100μL加え(最適値2μg/ウェル)、プレートを室温で1時間インキュベートした。250μLのP B S Tで5回洗浄した後、1:10000に希釈したヤギ抗ヒトIgGペルオキシダーゼ結合抗体(Dianova社、ハンブル

10

20

30

40

50

ク、ドイツ)を100μL加え、室温で1時間インキュベートした。250μLのPBS-Tで繰り返し洗浄した後、100μLの検出試薬(BMブルーPOD基質; Roche社、マンハイム、ドイツ)を加え、15分間インキュベートした。1MのH₂SO₄を100μL加えて反応を停止させ、690nmを参照として450nmにおける吸光度を測定した。阻害剤のスクリーニングには、PBS-Tで様々な濃度に調製した試験物質100μLをインキュベートの際に加えた。

【実施例5】

【0093】

血小板凝集と発光測定法

ex vivoおよびin vitroでの血小板凝集は、クエン酸処理した血試料を用いて、37で2チャンネルChronolog凝集測定装置(Nobis社、ドイツ)を用いて、光学式凝集測定法により評価した。多血小板血漿はクエン酸処理した全血から遠心分離(200gで20分間)により調製し、自家血漿を用いて最終血小板数を2×10⁸血小板/mLに調節した。ベースライン補正した後、0.2ないし0.4μg/mLのコラーゲン(ウシ由来I型)を加え、凝集を5分間記録した。また、ATPの放出をホタル発光測定法で記録した。50μg/mLの抗GPIモノクローナル抗体JAQ1と15分間インキュベートした。

【実施例6】

【0094】

血小板接着試験を用いたGPI-コラーゲン相互作用試験

ACD血液(最終濃度20%)から多血小板血漿を調製し、HEPES-タイロード液(pH6.5)により最終濃度を10⁸血小板/mLに調節した。異なる濃度の種類の異なる血小板接着タンパク質(コラーゲン、vWF)でカバーガラスを単層コーティングした。灌流実験はこれらのカバーガラスを用いて作製した灌流チャンバーで行った。灌流は低~中500/s、また高速流2000/sの剪断速度で行った。血小板接着を37で20分間測定し、自動シリンジポンプを使用して一定の壁剪断速度で5分間チャンバーに引き流した。灌流後、チャンバーから取りはずしたカバーガラスをHEPES-タイロード液で軽く洗浄した。カバーガラスをHEPES-タイロード液で繰り返し洗浄して、接着血小板を完全に取り除いた。懸濁液中の血小板をFACS測定により定量分析した。標準的なフローサイトメトリーの手順に従い、表面マーカー発現分析(CD41, CD61およびCD62P)の解析により血小板の機能状態をさらに評価した。

【実施例7】

【0095】

生体顕微鏡検査法のための血小板の調製

血小板(野生型もしくはGPI欠損型)を既報(Massberg, S. et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. Blood 1998; 92, 507~515頁)のように全血から単離し、5-カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル(DCF)で標識した。DCF標識した血小板懸濁液を最終濃度200×10⁶血小板/250μLに調製した。必要な場合には、蛍光野生型血小板を50μg/mLの抗GPI(JAQ1)Fab断片もしくは抗GPIb(p0p/B)Fab断片と10分間前培養した。その後、前処理した血小板をFab断片とともに野生型レピシエントマウスに注入し、下記のように、血小板接着を頸動脈損傷の前後でin vivoビデオ顕微鏡検査法により評価した。

【実施例8】

【0096】

生体顕微鏡検査法による血小板接着および凝集の評価

野生型C57BL6/JマウスまたはGPI欠損マウスに、ミダゾラム(5mg/体重kg、Ratiopharm社、ウルム、ドイツ)、メデトミジン(0.5mg/体重

10

20

30

40

50

kg、Pfizer社、カールスルーエ、ドイツ)およびフェンタニル(0.05mg/体重kg、Curamed Pharma社、ミュンヘン、ドイツ)の溶液を腹腔内注射して麻酔した。ポリエチレン製カテーテル(Portex社、ハイズ、イギリス)を右頸静脈に植え込み、蛍光血小板(200×10⁶/250μL)を静脈注入した。右総頸動脈を切開して開放し、頸動脈分岐部付近を5分間きつく結紮して血管損傷を引き起こした。血管損傷の前後で、右総頸動脈のin vivoビデオ顕微鏡検査法により、蛍光血小板をin situで視覚化した。血小板と血管壁の相互作用は、落射照明用100W・HBO水銀ランプを付けたZeiss社製Axio tech顕微鏡(20×水浸対物レンズ、W20×/0.5、Zeiss社)を使いモニターした。ビデオに撮った画像はすべて、コンピュータ援用画像解析プログラム(Cap Image 7.4; Zeint1博士、ハデルベルク、ドイツ)を使用して評価した。一過性接着血小板を、中心線速度より著しく低い速度で血管の仮想垂線を横切る細胞と定義した。その数は内皮表面1mm²あたりの細胞数で決定される。接着血小板の数は、10秒以内に動かないか内皮表面から離れない細胞数を数えて評価した。血管損傷部位での血小板凝集数も定量化し、1mm²あたりの数で表した。
10

【実施例9】

【0097】

走査型電子顕微鏡検査法

生体ビデオ蛍光顕微鏡検査の後、上記頸動脈にPBS(37℃)を1分間還流させ、続いてリン酸緩衝グルタルアルデヒド(1%vol/vol)で灌流固定した。頸動脈を切除し、縦方向に開き、1%のPBS緩衝グルタルアルデヒドに12時間浸してさらに固定化し、エタノールで脱水し、CO₂を用いた臨界点乾燥法により処理した。その後、頸動脈検体の管腔を露出させ、炭素ペーストを用いて試料台に載せ、プラチナをスパッタコーティングし、電界放出形走査電子顕微鏡(JSM-6300F;日本電子(株))を使用して測定した。
20

【実施例10】

【0098】

Fc-GPVI-ntの固定化コラーゲンへの結合評価

Fc-GPVI-ntの固定化コラーゲンへの結合は以下のとおり測定した。すなわち、ELISAプレート(Immulation 2 HB; Dynex Technologies、チャンティリー、バージニア)を1μg/ウェルのコラーゲン(ウシ由来I型; BD Bioscience社、ベッドフォード、マサチューセッツ)を含むコーティングバッファー(1.59g/L Na₂CO₃、2.93g/l NaHCO₃、0.2g/L NaNO₃、pH 9.6)100μLを用い4℃で一晩コーティングした。プレートを250μL/ウェルのPBS-0.05%Tween 20(PBST)で2回洗浄し、250μL/ウェルのRoti-Block(Roth社、カールスルーエ、ドイツ)で一晩ブロッキングし、さらに250μL/ウェルのPBSTで2回洗浄し、3.0、6.0、12.5、25.0、50.0もしくは100μg/mLのFc-GPVI-ntを含むPBSTを加え、室温で1時間培養した。必要に応じ、Fc-GPVI-nt(20μg/mL)を可溶性コラーゲンとともに10分間ブレインキュベートした。インキュベート後、プレートを250μLのPBSTで5回洗浄し、1:10000に希釈したFc断片特異的ヤギ抗ヒトIgGペルオキシダーゼ結合抗体(109-035-098; Dianaova社、ハンブルク、ドイツ)を加え、室温で1時間培養した。250μLのPBSTで5回洗浄した後、100μLの検出試薬(BMブルーPOD基質; Roche社、マンハイム、ドイツ)を加え、10分間培養した。1MのH₂SO₄を100μLを加えて反応を停止させ、プレートを690nmを対照として450nmにおける吸光度を測定した。
30
40

【0099】

Fc-GPVI-ntは、固定化コラーゲンへの濃度依存的に結合し、その後結合は飽和状態を示した(図9b)。コラーゲンへの結合はFc-GPVI-ntの最終濃度が6
50

.0 μ g / mL のときに飽和量の 2 分の 1 の結合を示した。G P V I - F c の結合は、B S A、v W F (図 9 c 左段) あるいはポリ - L - リジン (データ略) に対しては起こないことより、F c - G P V I - n t の結合が特異的であることが分かる。さらに、同一の条件下で、外部 G P V I ドメインを欠く対照 F c タンパク質では有意な結合は検出されなかった (図 9 c 右段)。

【0100】

G P V I 結合の特異性についてさらに解析するため、F c - G P V I - n t との会合について、可溶化線維性コラーゲンを用いて固定化コラーゲンに対する競争阻害実験を行った。ところ、可溶化コラーゲンは F c - G P V I - n t の固定化コラーゲンへの結合を濃度依存的に阻害した (図 9 d)。F c - G P V I - n t の結合を 50 % 以上減少させるには、濃度 100 μ g / mL の可溶化コラーゲンを必要とした。同時にこの結果は、F c - G P V I - n t のコラーゲンへの結合が特異的で、かつ高親和性が特徴であることを示している。

【実施例 11】

【0101】

抗ヒト G P V I モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体を既報 (17) のように作製した。L ou / C ラットを、アデノウイルスで発現したヒト F c - G P V I - n t 融合タンパク質で免疫した。得られたハイブリドーマの培養上清を F c - G P V I - n t または G P V I ドメインを欠く F c を用いて固相イムノアッセイでスクリーニングした。その結果ハイブリドーマ 5 C 4 の上清が F c - G P V I - n t に特異的に結合し、かつ対照 F c には結合しないことがわかった。免疫グロブリンの型を、ラット Ig クラス (抗 Ig M) およびマウス Ig G サブクラス特異的モノクローナル抗体を用いて決定した。5 C 4 モノクローナル抗体はプロテイン G セファロースカラムを使用して精製した。5 C 4 の抗体特異性を F c - G P V I - n t と対照 F c に対するイムノプロット法により確認したところ、モノクローナル抗体 5 C 4 はアデノウイルスで発現させた F c - G P V I - n t と結合するたが、対照 F c とは結合しないことが示された。さらに、ヒト血小板から得た溶解物よりヒト G P V I を回収した。また、フローサイトメトリーを用いた結果より、5 C 4 は血小板表面に特異的に結合するが、白血球や赤血球の表面には結合しないことが示された (データ略)。

【実施例 12】

【0102】

C D 6 2 P 在外化の F A C S 測定

クエン酸処理ヒト血液を志願者から調製した。多血小板血漿 (P R P) を 4 で 200 0 r p m の遠心分離し、洗浄 (P B S 1 x、p H 7.2) と再懸濁により作製した。染色バッファー (1 x P B S (Ca²⁺ および Mg²⁺ 不含)、0.1 % アジ化ナトリウム、2 % ウシ胎児血清 (F B S) および 2 mM Ca C l) で希釈した P R P を、ウマ I 型コラーゲン (0; 2; 5 および 10 μ g / mL; N o b i s 社) と、F c - G P V I - n t (100 μ g / mL) もしくは等モル濃度の対照 F c の存在下で培養した。フルオロフォア・ペルオキシダーゼで標識した抗 C D 6 2 P 抗体 (Immunotech 社) を加えた。F A C S 測定は B e c t o n D i c k e n s o n 社製 F A C S c a l i b u r 装置を用いて行った。

【0103】

コラーゲン濃度を増加することにより血小板のアルファ顆粒からの分泌が導かれ、それは C D 6 2 P の外在化によって示される。一方、コラーゲンを F c - G P V I - n t とともにインキュベートすることにより、C D 6 2 P の外在化を低下させることができ F A C S により測定された (図 10)。

【実施例 13】

【0104】

血小板凝集と A T P 放出

P R P は上述のとおり作製した。血小板凝集は全血凝集測定装置 5 0 0 V S (Chro

10

20

30

40

50

n o - L o g 社) で測定した。タイロード - H E P E S バッファー (2.5 mmol / L H E P E S, 150 mmol / L NaCl, 12 mmol / L NaHCO₃, 2.5 mmol / L KC1, 1 mmol / L MgCl₂, 2 mmol / L CaCl₂, 5.5 mmol D - グルコース、1 mg / mL BSA, pH 7.4) により、PRP の血小板細胞数を 1.0×10^8 細胞 / mL に調製した。ATP 測定のために Chrono - Lume # 395 (Chrono - Log 社) を加えた。血小板凝集作用効果を持つ様々な物質を血小板に加え、ピペットで凝集測定装置に入れ、規定の攪拌条件下で凝集を誘導した。凝集は凝固する血小板が原因の光透過率の変化により測定し、内部標準に標準化した。ATP の放出は ATP に対する Chrono - Lume の特性波長で測定し、製造会社のプロトコルに従い内部標準に基づいて標準化した。

10

【0105】

コラーゲンによる血小板凝集と ATP 放出は、Fc - G P V I - n t により特異的に阻害された (図 11 a & b)。ADP またはトロンビン (TRAP 10 μM) を介する血小板凝集と ATP 放出は、Fc - G P V I - n t により影響されなかった。

【実施例 14】

【0106】

ヒト血小板からの P D G F 放出

志願者から採取した血液より、PRP を上記のように調製した。ヒト血小板からの P D G F 放出は、キット (DHD 00B; R & D Systems 社) を用い製造会社のプロトコルに従い測定した。P D G F 放出を対照条件下、または Fc - G P V I - n t (100 μg / mL) もしくは等モル濃度の対照 Fc の存在下で、1型コラーゲン (20 μg / mL; Nobis 社) を用い刺激した。P D G F 放出は製造会社の標準プローブに基づいて標準化された。

20

【0107】

コラーゲンの刺激によって誘導される血小板アルファ顆粒からの内在性伝達物質放出によって引き起こされる P D G F の放出も、Fc - G P V I - n t の投与により低下した (図 11 c)。

【実施例 15】

【0108】

Fc - G P V I - n t が in vitro でヒト全血の出血時間に与える影響

30

in vitro での出血時間を PFA - 100 装置 (Dade - Behring 社) を用いて測定した。800 μL のヒト全血を PFA - 100 装置に注入した。出血時間は、製造会社のプロトコルに従い、ADP / コラーゲンおよびエピネフリン / コラーゲンでコーティングされた測定セルを用いて測定した。

【0109】

様々な物質による刺激下で、Fc - G P V I - n t の濃度増加に伴う in vitro (PFA - 100 装置) での出血時間の有意な増加は認められなかった。一方、ReoP r o を治療に用いられる濃度用いた場合は、出血時間を PFA - 100 装置での最大限まで増加させた (図 12)。

【実施例 16】

40

【0110】

可溶性 G P V I が血流中固定化コラーゲンへの血小板接着に与える影響

ヒト全血は既報 (18) と同様に ADC 抗凝固全血から単離した。洗浄血小板をタイロード - H E P E S バッファー (2.5 mmol / L H E P E S, 150 mmol / L NaCl, 12 mmol / L NaHCO₃, 2.5 mmol / L KC1, 1 mmol / L MgCl₂, 2 mmol / L CaCl₂, 5.5 mmol D - グルコースおよび 1 mg / mL BSA, pH 7.4) に再懸濁し、血小板数を 2×10^8 細胞 / mL に調製した。固定化コラーゲンでコーティングしたプレートへの血小板接着を、平行平板型フローチャンバーで、200 μg / mL の Fc - G P V I - n t もしくは対照 Fc の存在下で測定した。

50

【0111】

G P V I は *in vitro* で固定化コラーゲンへの血小板動員過程に決定的な役割を担っている(22)。我々は Fc - G P V I - n t がヒト血小板の固定化コラーゲンへの接着に与える影響を、様々な剪断速度のもと *in vitro* で測定した。別グループによる既報(23)にあるように、血小板は固定化コラーゲンに低剪断速度(500 sec⁻¹)および高剪断速度(1000 sec⁻¹)の両方で強固に接着し血栓を形成する(図13)。可溶性 Fc - G P V I - n t は固定化コラーゲンへの血小板接着性を、剪断速度 500 sec⁻¹ および 1000 sec⁻¹ でそれぞれ 37% および 44% と有意に減少させるが、外部 G P V I ドメインを欠く対照 Fc は減少をもたらさなかった(図13)。Fc - G P V I - n t は固定化 vWFへの血小板接着には影響を与せず、阻害は特異的であることが示された。

10

【実施例17】

【0112】

Fc - G P V I - n t の血漿濃度の測定をヒト IgG 定量キットである IMMUNO-TEK ELISA システム(Cat # 081182; ZephtoMetrix 社)を用いて行った。Fc - G P V I - n t の Fc 部に特異的なヤギ抗ヒト IgG ペルオキシダーゼ結合抗体(Dianova 社)を使用した。製造会社のプロトコルに従い PBS T を用いて複数回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質(BM ブルーポッド; Roche 社)を加え、波長 450 nm における吸光度を ELISA 読取装置(Sunrise; Tecan 社)を用いて測定し、ヒト IgG 内部標準に基づいて定量化した。Fc - G P V I - n t は好ましい *in vivo* 薬物動態を示した。マウスへ 1 回の腹膜内注射した後、24 時間後には高血漿レベルを測定することができ、融合タンパク質の半減期は 96 時間を超えた(図14a)。腹膜内注射を繰り返すと融合タンパク質は血液中に蓄積し(図14b)、慢性疾患治療に長期間用いる場合に好ましい動態といえる。Fc - G P V I - n t の投与量を増やした 1 回の腹膜内注射後では、Fc - G P V I - n t の濃度依存的血漿濃度が 5 分ないし 60 分間、最大 14 時間検出できた(図14c)。

20

【実施例18】

【0113】

生体蛍光顕微鏡検査法のためのマウス血小板の調製

マウス血小板を既報(19)のように全血から単離し、5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(DCF)で標識した。DCF 標識した血小板懸濁液を最終濃度 200×10^6 血小板 / $250 \mu\text{L}$ に調製した。後述のように、マウス血小板の接着を頸動脈損傷の前後で *in vivo* ビデオ顕微鏡検査法により評価した。

30

【実施例19】

【0114】

頸動脈結紮と生体顕微鏡検査法による血小板接着および凝集の評価

内皮除去後の血小板動態を既報(3)のように行なった。すなわち、野生型 C57BL/6J マウスに、ミダゾラム(5 mg / 体重 kg、Ratiopharm 社、ウルム、ドイツ)、メテトミジン(0.5 mg / 体重 kg、Pfizer 社、カールスルーエ、ドイツ)およびフェンタニル(0.05 mg / 体重 kg、Curamed Pharma 社、ミュンヘン、ドイツ)の溶液を腹腔内注射して麻酔した。必要に応じ、Fc - G P V I - n t(1 または 2 mg / 体重 kg) もしくは 2 mg / kg の Fc - G P V I - n t と同モル濃度量の対照 Fc を静脈投与した。その後、頸動脈分岐部付近を 5 分間きつく結紮して内皮除去を引き起こした。血管損傷を引き起こした後、蛍光血小板(200×10^6 / $250 \mu\text{L}$)を右頸静脈に埋め込んだポリエチレン製カテーテル(Portex 社、ハイズ、イギリス)を通じて静脈注入した。落射照明用 100W・HBO 水銀ランプを付けた Zeiss 社製 Axiootech 顕微鏡(20 × 水浸対物レンズ、W20 × / 0.5、Zeiss 社)を用い、右総頸動脈の *in vivo* ビデオ顕微鏡検査法により、蛍光血小板を *in situ* で視覚化した。ビデオ撮影した画像はすべて、コンピュータ援用画像解析

40

50

プログラム (Cap Image 7.4; Zeintl博士、ハイデルベルク、ドイツ(19;20))を使用して評価した。係留血小板はは、血管壁とはじめに接触し、その、非常にゆっくりと(中心における速度より著しく低い速度で)表面を転位する、もしくは強固に接着する「すべての」細胞数と定義される。その数は内皮表面 1 mm^2 あたりの細胞数で与えられる。本実施例においては10秒以内に内皮表面から離れなかった細胞を計数することで接着血小板の数を評価した。血管損傷部位での血小板凝集数も定量化し、 1 mm^2 あたりの数で表した。また、血栓の全部位をCap Image 7.4を使用して評価した。

【実施例20】

【0115】

走査型電子顕微鏡検査法

生体ビデオ蛍光顕微鏡検査の後、1群あたり3匹の実験動物について上記頸動脈にPBS(37)を1分間還流させ、続いてリン酸緩衝グルタルアルデヒド(1%vol/vol)で灌流固定した。頸動脈を切除し、縦方向開き、1%のPBS緩衝グルタルアルデヒドに12時間浸してさらに固定化し、エタノールで脱水し、CO₂を用いた臨界点乾燥法により処理した。その後、頸動脈検体の管腔を露出させ、炭素ペーストを用いて試料台に載せ、プラチナをスパッタコーティングし、電界放出形走査電子顕微鏡(JSM-6300F;日本電子(株))を使用して測定した。

【実施例21】

【0116】

免疫組織化学法によるin vivoでのFc-GPVI-nt結合の評価

Fc-GPVI-ntで処理したマウスから得た頸動脈を急速凍結し、クライオプロック(medite社、Medizintechnik社、ブルクドルフ、ドイツ)に固定した。Fc-GPVI-ntの内皮および内皮下層への結合を、Fc特異的ヤギ抗ヒトIgGペルオキシダーゼ結合抗体(109-035-098; Diana nova社、ハンブルク、ドイツ)で染色した5 μm のクライオスタッフ断面で測定した。Fcで処置したマウスから得た頸動脈を対照として使用した。

【実施例22】

【0117】

可溶性GPVIがin vivoで血小板数、出血時間および血小板接着に与える影響実験動物を2mg/kgまたは4mg/kgのFc-GPVI-nt、もしくは等モル濃度の外部GPVIドメインを欠く対照Fcで処置した。Fc-GPVI-ntもしくは対照Fcを注入した場合も、最大投与量である4mg/kgまでのいずれの濃度においても、末梢血小板数に有意な影響は与えなかった。さらに、Fc-GPVI-nt融合タンパク質は、対照実験動物と比較して尾部出血時間を有意に増大させなかった(図15a)。出血時間の絶対値は、PBS処置マウスでは $1.9 \pm 0.9\text{ min}$ であり、2mg/kgもしくは4mg/kgのFc-GPVI-ntで処置したマウスでは $2.9 \pm 1.9\text{ min}$ および $4.6 \pm 0.6\text{ min}$ であった。これに対して、Integrillin(0.2mg/kg、静脈注射)で処置した実験動物では出血時間が顕著に($42.6 \pm 21.6\text{ min}$)増大した。

【0118】

マウスの頸動脈損傷モデルにおいてFc-GPVI-ntが血小板動態に与える影響は、生体蛍光顕微鏡検査法を使用して調べることができる。実験動物を上記のように1mg/kgまたは2mg/kgのFc-GPVI-nt、もしくは等モル濃度量の外部GPVIドメインを欠くFcで処置した。Fc-GPVI-ntもしくは対照Fcを注入した後、既報のように(3)、マウス頸動脈をきつく結紮して内皮除去を引き起こした。頸動脈結紮が内皮細胞層を完全に喪失することを確認した。血小板接着は生体蛍光顕微鏡検査法を使い直接に視覚化そして定量化された(19;20)(図15d)。対照(Fc処置)マウスでは、内皮除去後1分以内に多数の血小板が血管壁に係留した(12.026 ± 1.115 係留血小板/ mm^2)。内皮下層との接触を確立した血小板は、最初ゆっくりと

10

20

30

40

50

した表面転位を示し、多くの場合その後強固な血小板接着および血小板凝集となる（ 5.494 ± 8.74 接着血小板 / mm^2 および 114 ± 17 血小板血栓 / mm^2 ）。対して、Fc-GPVI-nt の存在下では、血管損傷部位への血小板動員は劇的に減少した。1 mg / kg もしくは 2 mg / kg の Fc-GPVI-nt で前処置すると、Fc 処置した場合と比較して、血小板係留は 65% および 71% 減少した（対照と比較して $P < 0.05$ ）。それと平行して、強固な血小板接着は用量依存的に減少した（1 mg / kg または 2 mg / kg の Fc-GPVI-nt の投与の後、それぞれ 49% および 65% 減少した。対照と比較して $P < 0.05$ ）同様に、2 mg / kg の Fc-GPVI-nt 融合タンパク質で処理した実験動物では、接着血小板の凝集はほとんど存在しなかった（対照 Fc と比較して $P < 0.05$ 、図 15 b ~ d）。走査型電子顕微鏡検査法によても、総頸動脈内皮除去後の血小板接着および凝集は、Fc-GPVI-nt 処置したマウスではほとんど存在しないが、Fc で前処置したマウスではそうではないことがはっきりと示された（図 15 e）。Fc-GPVI-nt が損傷部位に存在していることを確認するため、生体顕微鏡検査法後に頸動脈を切除し、さらに免疫組織染色のためにヤギ抗ヒト IgG ベルオキシダーゼ結合抗体を使用して処理した。Fc-GPVI-nt 処置したマウスでは、Fc-GPVI-nt が血管損傷部位の管腔面上に検出された（図 15 f）。これらの結果は、Fc-GPVI-nt は in vivo で血管傷害部位に特異的に結合し、その後の血小板動員を防げることを示している。

【0119】

可溶性 GPVI がアテローム性動脈硬化に与える影響

生後 4 週目の ApoE-/- マウス（The Jackson Laboratory）に 0.25% コレスステロール食（Harlan Research diets）を 6 週間消費させた。2 週間経過後、コレスステロール食を継続しながら、4 匹の ApoE-/- マウスに 1 匹あたり 200 μg の Fc-GPVI-nt を週 2 回注射した。同様のプロトコールで 4 匹の ApoE-/- マウスに対照 Fc タンパク質（200 μg ）を週 2 回注射し、対照マウスとした。ブラーク形成を評価するため、実験動物を屠殺し血管樹を実験動物から慎重に切開し、大動脈および頸動脈全部の標本を 0.9% 塩化ナトリウム液で洗い流し固定化した。血管全部の標本を Sudan II 赤でブラーク形成を評価するため染色し、顕微鏡で観察した。アテローム性動脈硬化易発性 ApoE-/- ノックアウトマウスを Fc-GPVI-nt で 4 週間処置すると、アテローム進行は著しく減少した（図 16）。

【実施例 23】

【0120】

糖尿病患者由来血小板上 CD61 および CD32 表面発現の FACS 測定

糖尿病患者 111 人または非糖尿病患者 363 人から血液を採取し、クエン酸処理を行った。多血小板血漿（PRP）を 4 において 2000 rpm で遠心分離して洗浄し（PBS 1x、pH 7.2）、再懸濁により作製した。フルオロフォア・ベルオキシダーゼで標識した抗 CD61 および抗 CD32 抗体（Immunotech 社）、もしくは FITC で標識した抗・抗 GPVI モノクローナル抗体 4C9 を加えた。FACS 測定は Becton Dickinson 社製 FACSscalibur 装置を用いて行った。表面発現は蛍光により定量化した。CD32 の蛍光と 4C9 の蛍光の相関は、相関係数 $r = 0.516$ と計算された。

【0121】

統計解析

群中央値の比較を、マン・ホイットニー順位和検定を使用して行った。文中データは中央値 \pm 標準誤差を表す。 $P < 0.05$ ならば有意であるとみなした。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図 1a】 in vivo における C57BL/6J マウスの総頸動脈の血管損傷後の血小板接着および凝集。血管損傷前（左パネル）および血管損傷の 2 時間後（右パネル）の

10

20

30

40

50

頸動脈の走査型電子顕微鏡写真である。内皮除去によって血小板接着および凝集が誘発され、血小板リッチな血栓の形成が起こる（右下）。

【図1b】*in vivo*におけるC57BL/6Jマウスの総頸動脈の血管損傷後の血小板接着および凝集。血管損傷から5分後の血小板内皮細胞相互作用を、*in situ*における総頸動脈の*in vivo*蛍光顕微鏡検査法によって調べた（黒柱）。血管損傷のない動物を対照とした（白抜き柱）。左および右のパネルは、それぞれ1グループ当たり8連の実験における一過性および強固な血小板接着をまとめて示す。血小板は、記載^{2 4}のように内皮細胞の内張りとの相互作用によって分類し、血管表面のmm²当たりで示す。平均値±s.e.m.、星印は対照と比較しての有意差（P<0.05）を示す。

【図1c】*in vivo*におけるC57BL/6Jマウスの総頸動脈の血管損傷後の血小板接着および凝集。血管損傷後の血小板凝集を*in vivo*蛍光顕微鏡検査法によって測定した（黒柱）。血管損傷のない動物を対照とした（白抜き柱）。平均値±s.e.m.、各グループn=8、星印は野生型マウスと比較して有意差があることを示す（P<0.05）。顕微鏡写真（右）は、対照動物（上パネル）または血管損傷後（下パネル）の代表的な*in vivo*蛍光顕微鏡検査像を示す。白い矢印は、接着血小板を示す。

【図2a】GPVIの阻害により、血管損傷後の血小板接着および凝集が妨げられる。血管損傷後の血小板接着を生体ビデオ蛍光顕微鏡検査法によって測定した。蛍光血小板を50μg/ml抗GPVI（JAQ1）Fab断片または対照としてラットIgGと一緒にブレインキュベートした。mAbとのブレインキュベーションをしない血小板を対照とした。左および右のパネルは、それぞれ一過性および強固な血小板接着を示す。平均値±s.e.m.、各グループn=8、星印は対照と比較して有意差があることを示す（P<0.05）。

【図2b】GPVIの阻害により、血管損傷後の血小板接着および凝集が妨げられる。初期の係留/緩慢な表面移動後に非可逆的な接着を形成した血小板のパーセント値を示す。

【図2c】GPVIの阻害により、血管損傷後の血小板接着および凝集が妨げられる。*in vivo*における血管損傷後の血小板凝集。タイロード、関連のないラットIgG、または抗GPVI-Fab（JAQ1）と一緒にブレインキュベートした血小板の凝集を、前述の蛍光顕微鏡検査法によって評価した。平均値±s.e.m.、各グループn=8、星印は対照と比較して有意差がある（P<0.05）ことを示す。

【図2d】GPVIの阻害により、血管損傷後の血小板接着および凝集が妨げられる。顕微鏡写真は、抗GPVI-Fab（JAQ1）または対照IgGの不在下または存在下における血小板接着を示す代表的な*in vivo*蛍光顕微鏡検査像を示す。

【図3a】GPVI欠損マウスの内皮除去後の血小板接着。JAQ1処理マウスには、GPVIがない。上パネル：無関連の対照IgG（左）または抗GPVI（JAQ1）（右）で前処理したマウス由来の血小板を、FITC標識JAQ1およびPE標識抗マウスCD41と一緒に室温で10分間インキュベートと、FACSscan（商標）で直接分析した。1グループ当たり3匹のマウスの代表的なドットプロットを示した。下パネル：3匹の対照IgGまたはJAQ1処理マウス由来の血小板溶解物全体を非還元条件下でSDS-PAGEによって分離し、FITC標識JAQ1を用いてイムノプロットを行い、続いてHRP標識ウサギ抗FITCmAbとインキュベーションした。

【図3b】GPVI欠損マウスの内皮除去後の血小板接着。対照動物（上パネル）またはGPVI除去マウス（下パネル）の血管損傷から2時間後の頸動脈の走査型電子顕微鏡写真。内皮除去により、対照動物の血小板接着および血小板凝集が誘発された。一方GPVI除去マウスにおいて、損傷した血管壁への血小板の付着は非常に少なかった。除去した領域に沿って内皮下コラーゲン線維が認識できる。

【図3c】GPVI欠損マウスの内皮除去後の血小板接着。血小板係留および強固な血小板接着。

【図3d】GPVI欠損マウスの内皮除去後の血小板接着。初期の係留から安定な捕捉への移行（係留血小板のパーセント値）。

【図3e】GPVI欠損マウスの内皮除去後の血小板接着。頸動脈の血管損傷後の血小板

10

20

30

40

50

凝集を、G P V I 欠損 (J A Q 1 前処理マウス) または対照 I g G 前処理マウスで測定した (詳しくは材料と方法 (m a t e r i a l s a n d m e t h o d s) を参照のこと) 。これらのパネルは、1 グループ当り 8 連の実験の血小板接着 (一過性および強固な接着) および血小板凝集をまとめて示す。平均値 \pm s . e . m . 、星印は対照 I g G と比較して有意差があることを示す (P < 0 . 0 5) 。

【図 3 f 】 G P V I 欠損マウスの内皮除去後の血小板接着。顕微鏡写真は、G P V I 欠損 (J A Q 1) および対照 I g G 処理マウスにおける血小板接着を示す代表的な in vivo 蛍光顕微鏡検査像を示す。

【図 4 】生理学的フロー条件下でコラーゲンコーティングしたカバーガラス表面への血小板接着を ex vivo 評価した。関連のない対照 I g G イムノアドヘシン (対照) (左パネル) または抗 G P V I イムノアドヘシン (F c - G P V I - n t) (右パネル) と一緒に前処理したマウス由来の血小板を、生理学的フロー条件下での接着について調べた。血小板の数を、各実験の終了時における洗浄したカバーガラスの F A C S 計測によって評価した。血小板接着の第 1 のステップとしての血小板係留を 30 秒後に、また強固な血小板接着をフロー条件下 (詳しくは実施例 6 を参照のこと) で 5 分後に評価した。これらのパネルは、1 グループ当り 8 連の実験における一過性および強固な血小板接着をまとめたものである。平均値 \pm s . e . m . 、星印は対照 I g G と比較して有意差があることを示す (P < 0 . 0 5) 。

【図 5 】コラーゲンとの F c - G P V I - n t の相互作用を E L I S A に基づくアッセイでモニターした。 G P V I の細胞外ドメインおよび I g G の F c 部分からなるイムノアドヘシン F c - G P V I - n t のコラーゲンコーティングされたプレートに対する接着を、 F c - G P V I - n t (0 . 5 μ g ~ 1 0 μ g) の濃度を徐々に増加させて調べた。この結合は、 F c - G P V I - n t の F c 部分に対するペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて可視化する。最終的に、ペルオキシダーゼを E L I S A によって検出する。この代表的な実験では、 F c - G P V I - n t がコラーゲンへ十分な親和性で結合することが観察され、この結合は μ g 濃度で飽和に達した。

【図 6 】コラーゲンとの F c - G P V I - n t の相互作用および G P V I 阻害剤のスクリーニングの可能性を、阻害的な抗マウス G P V I 抗体 J A Q 1 を用いて実証した。コラーゲンコーティングした E L I S A プレートへのイムノアドヘシン F c - G P V I - n t (2 μ g / ウエル) の接着は特異的であることがわかった : 空イムノアドヘシン F c - n t は、結合を全く示さなかった。したがって、これは、ハイスループットにスケールアップすることができる G P V I 阻害剤のスクリーニング用の E L I S A に基づくアッセイを提供する。

【図 7 】 F c - G P V I - n t のアミノ酸配列 : 配列番号 1 。

【図 8 】イムノアドヘシン F c - G P V I - n t の D N A 配列 : 配列番号 2 。塩基 1 ~ 8 0 7 は、 G P V I の細胞外ドメインをコードする。塩基 8 1 7 ~ 1 5 1 5 は、 I g G の F c 部分をコードする。

【図 9 a 】 G P V I - F c の特徴付け。上パネル : F c - G P V I - n t 、および細胞外 G P V I ドメインを欠く対照 F c を使用して還元条件下で S D S - P A G E を行った。クーマシーブルー染色 (左) およびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト F c 抗体を用いたイムノプロット (右) から、分子量 ~ 8 0 k D a の F c - G P V I - n t が確認された。中央パネル : 抗 G P V I モノクローナル抗体 5 C 4 を用いた F c 、 F c - G P V I - n t 、またはヒト血小板のイムノプロット。 5 C 4 により、アデノウィルスによって発現された F c - G P V I - n t 融合タンパク質も血小板 G P V I も検出されたが、対照 F c は検出されなかった。下パネル : 還元 (右) および非還元 (左) 条件下における分子量。 F c - G P V I - n t の分子量は還元条件下で約 8 0 k D a であったが、 ~ 1 6 0 k D a のタンパク質を含む完全な n t が、非還元条件下で確認された。 (b ~ d) F c - G P V I - n t コラーゲン相互作用の特徴付け。

【図 9 b 】 G P V I - F c の特徴付け。異なる濃度の可溶性 F c - G P V I - n t および固定化コラーゲン (1 0 μ g / m l) を用いた結合アッセイを行って、 F c - G P V I -

10

20

30

40

50

n t - コラーゲン相互作用を明らかにした。結合した Fc - $GPVI$ - n t は抗 Fc mAb 抗体 (希釈 1 : 10,000) によって検出した。結合した Fc - $GPVI$ - n t は 10 $\mu g / ml$ Fc - $GPVI$ - n t で観察された結合に比例する。 Fc - $GPVI$ - n t は、可飽和状態でコラーゲンと結合する。平均値 \pm s.e.m.、各 Fc - $GPVI$ - n t 濃度において $n = 6$ 、星印は 0 $\mu g / ml$ Fc - $GPVI$ - n t と比較して有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

【図 9 c】 $GPVI$ - Fc の特徴付け。(左パネル) Fc - $GPVI$ - n t (20 $\mu g / ml$) の様々な基質への結合を示す。 Fc - $GPVI$ - n t の BSA (10 $\mu g / ml$) または vWF (10 $\mu g / ml$) への結合を、固定化コラーゲンへの $GPVI$ - 二量体結合のパーセント値として示す。 Fc - $GPVI$ - n t の結合は、BSA または vWF では起こらず、 Fc - $GPVI$ - n t 結合の特異性を支持する。平均値 \pm s.e.m.、星印はコラーゲンと比較して有意差があることを示す ($P < 0.05$)。(右パネル) Fc - $GPVI$ - n t (20 $\mu g / ml$) または Fc (20 $\mu g / ml$) の固定化コラーゲン (10 $\mu g / ml$) への結合を示す。結合した Fc - $GPVI$ - n t または Fc を抗 Fc mAb 抗体 (希釈 1 : 10,000) で検出し、 Fc - $GPVI$ - n t で観察された結合との関係で示す。 Fc または抗 Fc mAb ではなく Fc - $GPVI$ - n t だけが固定化コラーゲンと結合する。平均値 \pm s.e.m.、各グループ $n = 8$ 、星印は Fc - $GPVI$ - n t 結合と比較して有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

【図 9 d】 $GPVI$ - Fc の特徴付け。 Fc - $GPVI$ - n t (20 $\mu g / ml$) を異なる濃度の可溶性コラーゲンと一緒に 10 分間プレ培養した。インキュベーション後、プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (希釈 1 : 10,000) によって Fc - $GPVI$ - n t を検出した。 Fc - $GPVI$ - n t の結合は可溶性コラーゲンの不在下で観察された結合に対して示す。可溶性コラーゲンは、濃度依存的に固定化コラーゲンに結合した $GPVI$ - Fc - 二量体 - 二量体を阻害する。平均値 \pm s.e.m.、各コラーゲン濃度 $n = 3$ 、星印は 0 $\mu g / ml$ コラーゲンと比較して有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

【図 9 e】 $GPVI$ - Fc の特徴付け。単量体形態の $GPVI$ - Fc 融合タンパク質と Fc - $GPVI$ - n t の間の結合親和性の差を直接比較して評価した。1型コラーゲンをコーティングした ELISA プレートに対する単量体および二量体の結合を評価した。濃度を徐々に増加させた $GPVI$ 融合タンパク質は、コラーゲンに飽和状態に達するまで結合する。ここでは、親和性評価についてラインウイーバー-バーカプロットを示す (e)。単量体 $GPVI$ 融合タンパク質の親和性は、等モル濃度の二量体型 Fc - $GPVI$ - n t と比較して約 10 分の 1 であった。

【図 10】コラーゲンの投与量を増大することによってひきおこされる、アルファ顆粒由来の細胞内伝達物質の放出のパラメーターとしてのヒト血小板上の CD 62 P 活性化を Fc - $GPVI$ - n t は阻害する。ヒト血小板を全血から単離し、PE で標識した抗 CD 62 抗体と一緒に培養した (詳しくは材料と方法を参照のこと)。蛍光をベクトンディッキンソン FACS 装置で測定した。代表的なヒストグラムを示す。0 ~ 10 $\mu g / ml$ でコラーゲンの濃度を徐々に増加させると、対照 Fc タンパク質 (100 $\mu g / ml$; 青線) の存在下では蛍光のシフトが誘導された。 Fc - $GPVI$ - n t (100 $\mu g / ml$; 赤線) の存在下では、蛍光のシフトは起こらず、したがって CD 62 P 活性化は著しく阻害された。

【図 11 a】 Fc - $GPVI$ - n t によるコラーゲン媒介血小板凝集ならびに濃染顆粒およびアルファ顆粒からの内在性伝達物質の放出の特異的な阻害。ヒト血小板を対照 Fc (80 $\mu g / ml$) または Fc - $GPVI$ - n t (80 $\mu g / ml$)と一緒に培養した。血小板の凝集は、コラーゲン (1 $\mu g / ml$) または ADP (5 μM) または TRAP (10 μM) を用いて誘導し、攪拌条件下で血小板凝集計を用いて凝集を測定した (詳しくは材料と方法を参照のこと)。 $n = 5$ の異なる血液ドナー由来の三連測定を行った。平均値 \pm s.e.m. は、融合タンパク質を含まない対照凝集の凝集 % で示す。

【図 11 b】 Fc - $GPVI$ - n t によるコラーゲン媒介血小板凝集ならびに濃染顆粒お

10

20

30

40

50

およびアルファ顆粒からの内在性伝達物質の放出の特異的な阻害。対照 Fc (80 μg / ml) または Fc - GPVI - nt (80 μg / ml) と一緒にインキュベーション後に同じプローブで ATP 放出を同時に測定した。ATP 放出の量は、融合タンパク質を含まない対照の場合の % で示す。

【図 11c】Fc - GPVI - nt によるコラーゲン媒介血小板凝集ならびに濃染顆粒およびアルファ顆粒からの内在性伝達物質の放出の特異的な阻害。PDGF 放出は、基本条件下およびコラーゲン (20 μg / ml) 刺激後に、ヒト PDGF に特異的な ELISA 系を用いてヒト血小板で測定した (詳しくは材料と方法を参照のこと)。対照 Fc とのブレインキュベーションは、コラーゲン刺激血小板からの PDGF 放出に著しい影響を与えたが、Fc - GPVI - nt (100 μg / ml) は、PDGF 放出を顕著に減少させた。PDGF 放出の阻害は、非刺激血小板では起らなかった。 10

【図 12】Fc - GPVI - nt は、ex vivo でのヒト血液の出血時間に著しい影響を与えない。ヒト血液の出血時間を、ADP / コラーゲン刺激およびエピネフリン / コラーゲン刺激後に PFA - 100 装置で ex vivo で測定した。Fc - GPVI - nt (5 および 20 μg / ml) および Fc (5 および 20 μg / ml) では出血時間が伸びなかったが、治療関連濃度 (5 μg / ml) の Reopro (登録商標) では、療法の条件下で出血時間が最大にまで伸びた。三回測定を行った n = 4 の血液ドナーから得られた平均値 ± s.e.m. をまとめて示す。

【図 13】Fc - GPVI - nt は、フロー条件下での固定化コラーゲンへの血小板接着を阻害する。ヒト血小板 (2 × 10⁸ 細胞 / ml) を全血から単離した (詳しくは「材料と方法」を参照のこと)。プレートを固定化コラーゲン (10 μg / ml) または vWF (10 μg / ml) でコーティングした。Fc - GPVI - nt または細胞外 GPVI ドメインを欠いた Fc (200 μg / ml) の存在下で、パラレルプレートフローチャンバー中でコーティングしたプレートへの血小板接着を測定した。Fc - GPVI - nt による血小板接着の阻害を対照 (Fc 対照) の % で示す。Fc - GPVI - nt は、それぞれ 500 秒⁻¹ および 1000 秒⁻¹ の剪断速度で固定化コラーゲン上への血小板接着を著しく弱めた。対照的に、Fc - GPVI - nt は、固定化 vWF 上への血小板接着に影響を与えたかった。平均値 ± s.e.m.、各グループ n = 4、星印は対照 Fc と比較して有意差があることを示す (P < 0.05)。下パネルは、代表的な顕微鏡像を示す。 20

【図 14a】Fc - GPVI - nt は、in vivo でのマウス腹膜内注射後に血漿中の半減期が長いという、有利な薬物動態を有する。特異的な抗 Fc 抗体および ELISA を用いて Fc - GPVI - nt の血中濃度を測定した (詳しくは「材料と方法」を参照のこと)。Fc - GPVI - nt (4 μg / g) の腹膜内注射を 1 回行うと、Fc - GPVI - nt 血中濃度が急上昇し、約 24 時間後に緩やかに低下する。10 匹の動物から得られた平均値 ± s.e.m. を示す。 30

【図 14b】Fc - GPVI - nt は、in vivo でのマウス腹膜内注射後に血漿中の半減期が長いという、有利な薬物動態を有する。特異的な抗 Fc 抗体および ELISA を用いて Fc - GPVI - nt の血中濃度を測定した (詳しくは「材料と方法」を参照のこと)。腹膜内適用を繰り返し行うと (10 μg / g ; 週 2 回)、28 日間にわたってマウス中 in vivo で連続的な Fc - GPVI - nt の蓄積がもたらされる。6 匹の動物から得られた平均値 ± s.e.m. を示す。 40

【図 14c】Fc - GPVI - nt は、in vivo でのマウス腹膜内注射後に血漿中の半減期が長いという、有利な薬物動態を有する。特異的な抗 Fc 抗体および ELISA を用いて Fc - GPVI - nt の血中濃度を測定した (詳しくは「材料と方法」を参照のこと)。マウス 1 匹当り 30 μg (1 μg / g 体重)、60 μg (2 μg / g 体重) および 100 μg (3 μg / g 体重) の Fc - GPVI - nt を静脈内に 1 回注射すると、イムノアドヘシン血漿濃度の用量依存的増大がもたらされる。2 種のより高い用量 (60 および 100 μg) では、これらのマウスの in vivo における血漿濃度は、5 ~ 60 分間から 24 時間の長期にわたり高レベルに達し、コラーゲン捕捉、つまり血小板上の GPVI 受容体活性化を有效地に阻害するのに十分である。5 匹の動物から得られた平均値 50

± s . e . m . を示す。

【図 15 a】 in vivo における血小板接着および凝集に対する Fc - GPVI - nt の影響。マウス (1 グループ当り n = 6) を 2 mg / kg または 4 mg / kg Fc - GPVI - nt i.v. で処理した。インテグリン (0.2 mg / kg) 処理マウスを正の対照とした (n = 8)。出血時間を記載のように測定した (「材料と方法」を参照のこと)。Fc - GPVI - nt 融合タンパク質では、対照動物と比較して尾部出血時間が増加しなかった。インテグリン処理マウスでは、尾部出血時間は大幅に延長された。** は対照と比較して有意差があることを示す (P < 0.05)。

【図 15 b】 in vivo における血小板接着および凝集に対する Fc - GPVI - nt の影響。GPVI を阻害すると、血管損傷後の血小板接着および凝集が妨げられる。血管損傷後の血小板接着を生体ビデオ蛍光顕微鏡検査法によって測定した。1 または 2 mg / kg Fc - GPVI - nt または等モル量の対照 Fc でマウスを前処理した。左および右のパネルは、それぞれ血小板係留および強固な血小板接着をまとめて示す。平均値 ± s . e . m . 、各グループ n = 5、星印は Fc と比較して有意差があることを示す (P < 0.05)。

【図 15 c】 in vivo における血小板接着および凝集に対する Fc - GPVI - nt の影響。in vivo における血管損傷後の血栓形成に対する Fc - GPVI - nt の影響。血小板血栓数 (右) および全血栓領域 (左) を記載された蛍光顕微鏡検査法によって評価した。平均値 ± s . e . m . 、各グループ n = 5、星印は Fc と比較して有意差があることを示す (P < 0.05)。

【図 15 d】 in vivo における血小板接着および凝集に対する Fc - GPVI - nt の影響。顕微鏡写真は、1 もしくは 2 mg / kg Fc - GPVI - nt または対照 Fc の不在下または存在下での血小板接着を示す代表的な in vivo 蛍光顕微鏡検査像を示す。バーは 50 μm を表す。

【図 15 e】 in vivo における血小板接着および凝集に対する Fc - GPVI - nt の影響。Fc または Fc - GPVI - nt 処理動物における血管損傷から 1 時間後の頸動脈の走査型電子顕微鏡写真。内皮除去により、Fc 処理マウスの血小板接着および血小板凝集が誘発された。対照的に、Fc - GPVI - nt 処理マウスにおいて、損傷した血管壁に沿って付着した血小板はごくわずかであった。除去した領域に沿って内皮下コラーゲン線維が認識できる。バーは、10 μm を表す。

【図 15 f】 in vivo における血小板接着および凝集に対する Fc - GPVI - nt の影響。Fc - GPVI - nt は、頸動脈の内皮下層に特異的に結合する。Fc - GPVI - nt の内皮下層への結合をペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体で染色した頸動脈切片で測定した。Fc 処理マウスから得た頸動脈を対照とした。Fc 対照タンパク質ではなく Fc - GPVI - nt が、茶色染色によって示された内皮下層で検出された。元の倍率：100 倍。

【図 16】 Fc - GPVI - nt は、in vivo で apo e -/- ノックアウトマウスのアテローム進行を著しく弱める。4 週間にわたって週 2 回、apo e -/- マウスの腹膜内に Fc - GPVI - nt (4 μg / g) または対照 Fc (4 μg / g) を投与した。屠殺後、アテロームおよびプラーク形成を可視化するために大血管をスダンレッド染色した後アテローム進行を調べた。対照動物の場合、頸動脈標本における広範なプラーク形成が赤色によって特に分岐領域で示された。Fc - GPVI - nt 処理動物では、apo e -/- マウスの頸動脈ではアテローム性動脈硬化症がほぼ完全に無くなっていた。Fc - GPVI - nt で処理してから 4 週間後の apo e -/- マウス (左側) および対照 Fc タンパク質で処理してから 4 週間後の apo e -/- マウス (右側) の頸動脈の代表的な肉眼的に完全な血管標本を示す。

【図 17】 糖尿病に罹患している患者から新たに単離した血小板は、フィブリノーゲン受容体 (CD61、一番上) の発現低下、Fc 受容体 (CD32、中央) の発現増大を示し、したがって GPVI の発現増大を示す。CD32 発現と GPVI 発現の相関関係 (特異的なモノクローナル抗体 4C9 によって検出する) をヒト血小板について示す (一番下)

10

20

30

40

50

。糖尿病に罹患している患者由来の全血からヒト血小板を単離し、蛍光抗 C D 6 1 および抗 C D 3 2 抗体または F I T C 標識 4 C 9 抗体と一緒に培養した。蛍光をベクトンディッシュキンソン F A C S c a l i b u r 装置で測定した。糖尿病患者 $n = 111$ および糖尿病にかかっていない患者 $n = 363$ から得られた平均値 \pm s . e . m . を示す。相関係数 $r = 0 . 516$ を用いて C D 3 2 蛍光と 4 C 9 蛍光の相関関係を計算した。

【図 18】 F c - G P V I - n t に基づく単量体融合タンパク質のアミノ酸配列。

【0123】

参考文献

Baumgartner,H.R. 1977. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium. *Thromb Haemost* 37:1-16.

Clemetson,K.J. and Clemetson,J.M. 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost*. 86:189-197. 10

Massberg,S., Gawaz,M., Gruner,S., Schulte,V., Konrad,I., Zohlnhöfer,D., Heinzmann,U., and Nieswandt,B. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J.Exp.Med.* 197:41-49.

Moroi,M., Jung,S.M., Okuma,M., and Shinmyozu,K. 1989. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin.Invest* 84:1440-1445. 20

Clemetson,J.M., Polgar,J., Magnenat,E., Wells,T.N., and Clemetson,K.J. 1999. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol.Chem.* 274:29019-29024.

Jandrot-Perrus,M., Busfield,S., Lagrue,A.H., Xiong,X., Debili,N., Chickering,T., Le Couedic,J.P., Goodearl,A., Dussault,B., Fraser,C. et al. 2000. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96:1798-1807. 30

Gibbins,J.M., Okuma,M., Farndale,R., Barnes,M., and Watson,S.P. 1997. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 413:255-259.

Zheng,Y.M., Liu,C., Chen,H., Locke,D., Ryan,J.C., and Kahn,M.L. 2001. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma-chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol.Chem.* 276:12999-13006. 40

Suzuki-Inoue,K., Tulasne,D., Shen,Y., Bori-Sanz,T., Inoue,O., Jung,S.M., Moroi,M., Andrews,R.K., Berndt,M.C., and Watson,S.P. 2002. Association of Fyn and Lyn with the proline rich domain of GPVI regulates intracellular signalling. *J Biol. Chem.*.

Barnes,M.J., Knight,C.G., and Farndale,R.W. 1998. The collagen-platelet interaction. *Curr.Opin.Hematol.* 5:314-320.

Falet,H., Barkalow,K.L., Pivniouk,V.I., Barnes,M.J., Geha,R.S., and Hartwig,J.H. 2000. Roles of SLP-76, phosphoinositide 3-kinase, and gelsolin in the platelet shape changes initiated by the collagen receptor GPVI/FcR gamma-chain complex. *Blood* 96:3786-3792.

Pasquet,J.M., Gross,B., Quek,L., Asazuma,N., Zhang,W., Sommers,C.L., Schweighoffer,E., Tybulewicz,V., Judd,B., Lee,J.R. et al. 1999. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase $\text{c}\gamma 2$ and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol.Cell Biol.* 19:8326-8334.

Berlanga,O., Tulasne,D., Bori,T., Snell,D.C., Miura,Y., Jung,S., Moroi,M., Frampton,J., and Watson,S.P. 2002. The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur.J.Biochem.* 269:2951-2960.

Sugiyama,T., Okuma,M., Ushikubi,F., Sensaki,S., Kanaji,K., and Uchino,H. 1987. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 69:1712-1720.

Sugiyama,T., Ishibashi,T., and Okuma,M. 1993. Functional role of the antigen recognized by an antiplatelet antibody specific for a putative collagen receptor in platelet-collagen interaction. *Int.J.Hematol.* 58:99-104.

Schulte,V., Snell,D., Bergmeier,W., Zirngibl,H., Watson,S.P., and Nieswandt,B. 2001. Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. *J Biol. Chem.* 276:364-368.

Kremmer,E., Kranz,B.R., Hille,A., Klein,K., Eulitz,M., Hoffmann-Fezer,G., Feiden,W., Herrmann,K., Delecluse,H.J., Delsol,G. et al. 1995. Rat monoclonal antibodies

differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* 208:336-342.

Dickfeld,T., Lengyel,E., May,A.E., Massberg,S., Brand,K., Page,S., Thielen,C., Langenbrink,K., and Gawaz,M. 2001. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc.Res.* 49:189-199.

10

Massberg,S., Enders,G., Leiderer,R., Eisenmenger,S., Vestweber,D., Krombach,F., and Messmer,K. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92:507-515.

Massberg,S., Enders,G., Matos,F.C., Tomic,L.I., Leiderer,R., Eisenmenger,S., Messmer,K., and Krombach,F. 1999. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94:3829-3838.

20

Miura,Y., Takahashi,T., Jung,S.M., and Moroi,M. 2002. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J.Biol.Chem.* 277:46197-46204.

Chen,H., Locke,D., Liu,Y., Liu,C., and Kahn,M.L. 2002. The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. *J Biol.Chem.* 277:3011-3019.

30

Savage,B., Almus-Jacobs,F., and Ruggeri,Z.M. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94:657-666.

van Zanten,G.H., de Graaf,S., Slootweg,P.J., Heijnen,H.F., Connolly,T.M., de Groot,P.G., and Sixma,J.J. 1994. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin.Invest* 93:615-632.

40

Baumgartner,H.R., Muggli,R., Tschopp,T.B., and Turitto,V.T. 1976. Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effects of surface properties and platelet function. *Thromb.Haemost.* 35:124-138.

Jandrot-Perrus,M., Lagrue,A.H., Okuma,M., and Bon,C. 1997. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol.Chem.* 272:27035-27041.

10

Rekhter,M.D. 1999. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc.Res.* 41:376-384.

Ruggeri,Z.M. 1997. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb.Haemost.* 78:611-616.

Goto,S., Ikeda,Y., Saldivar,E., and Ruggeri,Z.M. 1998. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J.Clin.Invest.* 101:479-486.

20

Sixma,J.J., van Zanten,G.H., Banga,J.D., Nieuwenhuis,H.K., and de Groot,P.G. 1995. Platelet adhesion. *Semin.Hematol* 32:89-98.

Nieswandt,B., Schulte,V., Bergmeyer,W., Mokhtari-Nejad,R., Rakebrandt,K., Cazenave,J.P., Ohlmann,P., Gachet,C., and Zirngibl,H. 2001. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 193:459-469.

30

Lincoff,A.M., Califf,R.M., and Topol,E.J. 2000. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 35:1103-1115.

Neumann,F.J. and Schömig, A. 1998. Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with coronary stent placement. *Semin.Interv.Cardiol.* 3:81-90.

Bertrand,M.E., Rupprecht,H.J., Urban,P., Gershlick,A.H., and Investigators,f. 2000. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after

40

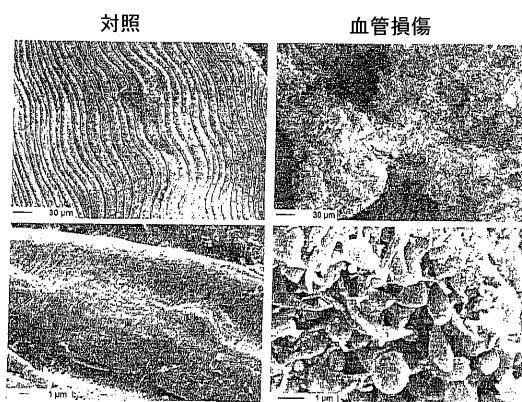
coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 102:624-629.

Foster,R.H. and Wiseman,L.R. 1998. Abciximab. An updated review of its use in ischaemic heart disease. *Drugs* 56:629-665.

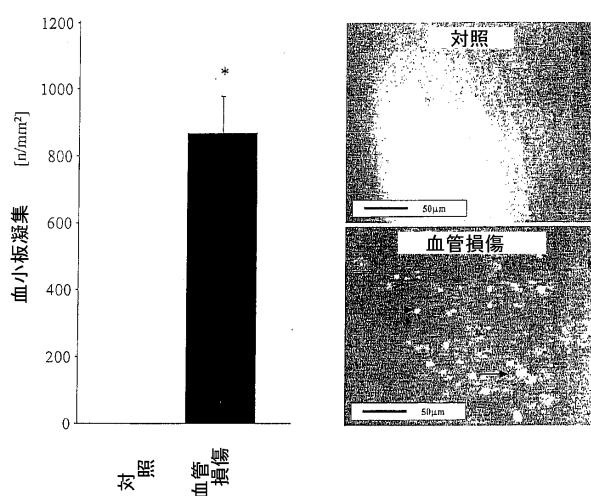
Arai, M., Yamamoto,N., Moroi,M., Akamatsu,N., Fukutake,K., and Tanoue,K. 1995. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br.J Haematol.* 89:124-130.

10

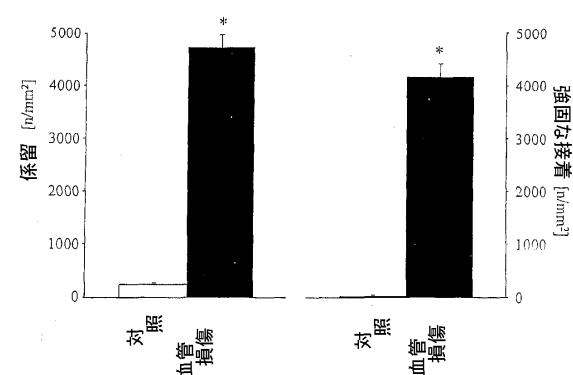
【図1a】



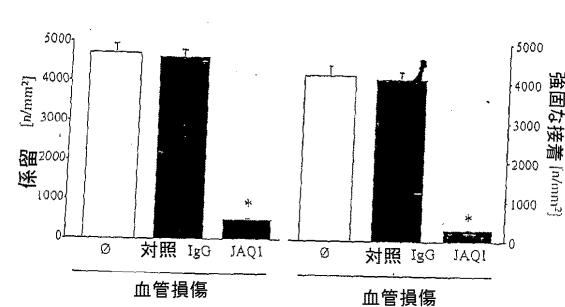
【図1c】



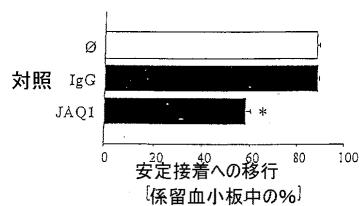
【図1b】



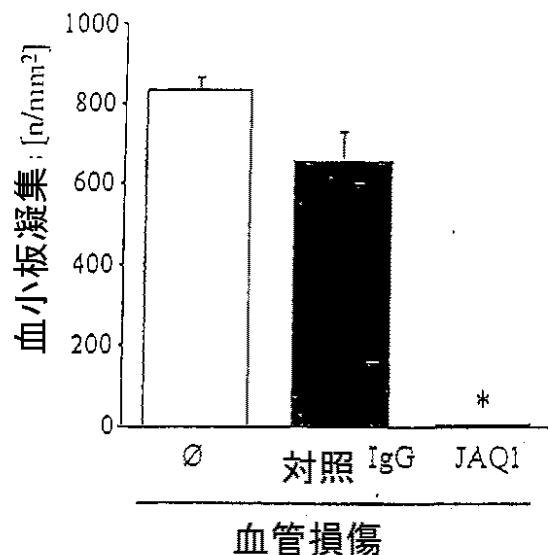
【図2a】



【図2b】



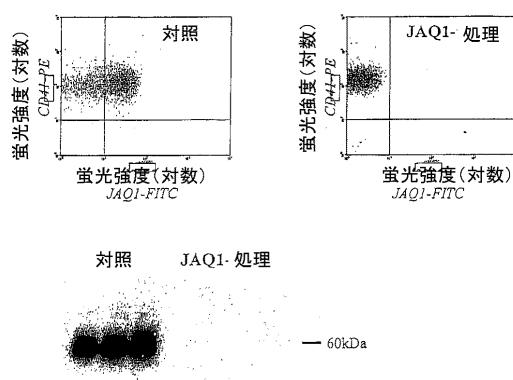
【図2c】



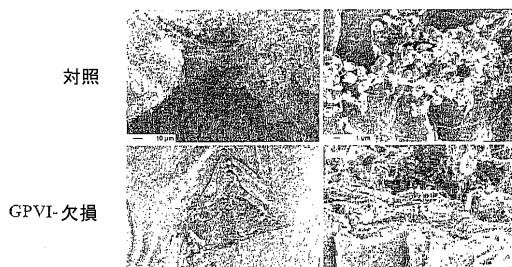
【図2d】



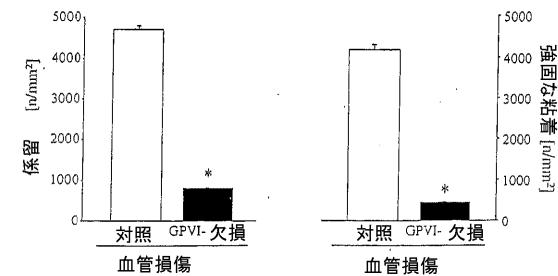
【図3a】



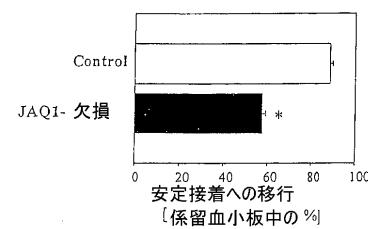
【図3b】



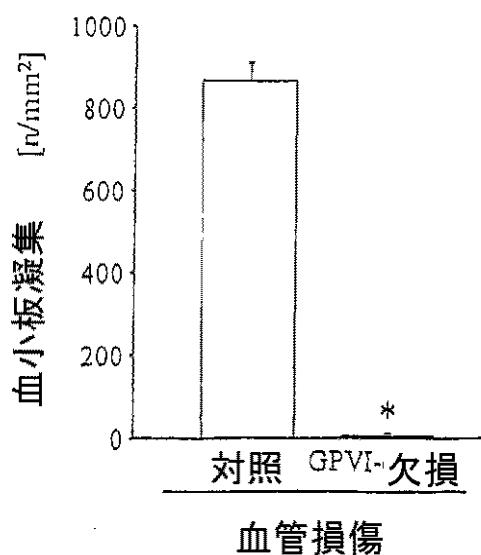
【図3c】



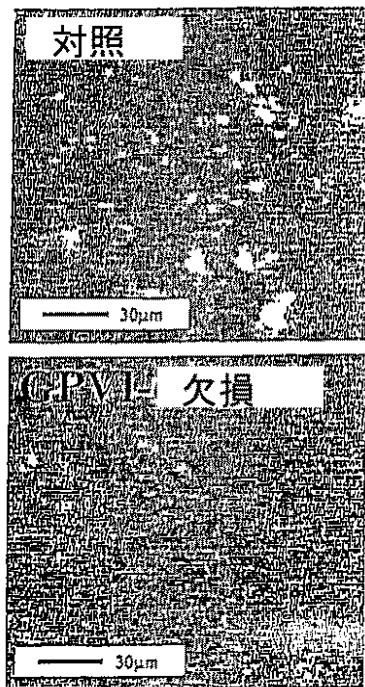
【図3d】



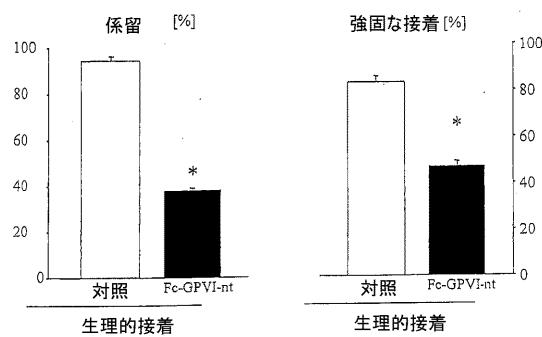
【図3e】



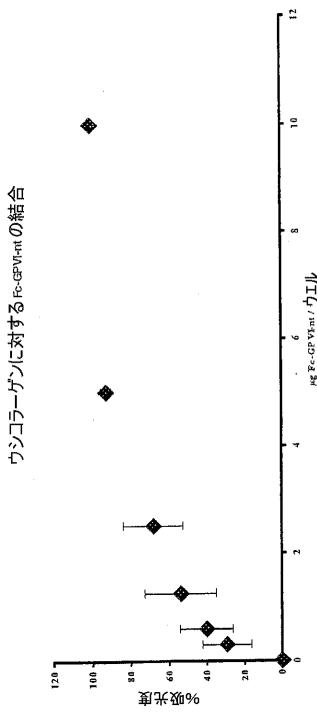
【図3f】



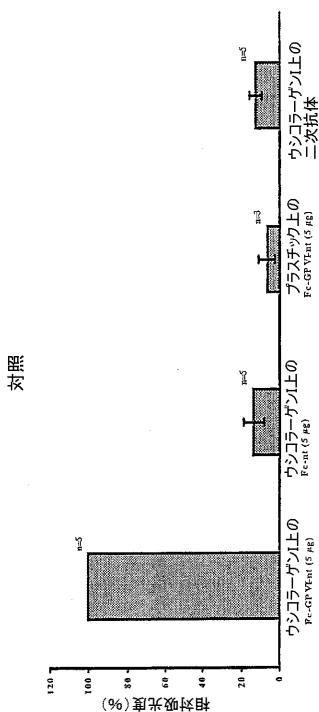
【図4】



【図5】



【図6】



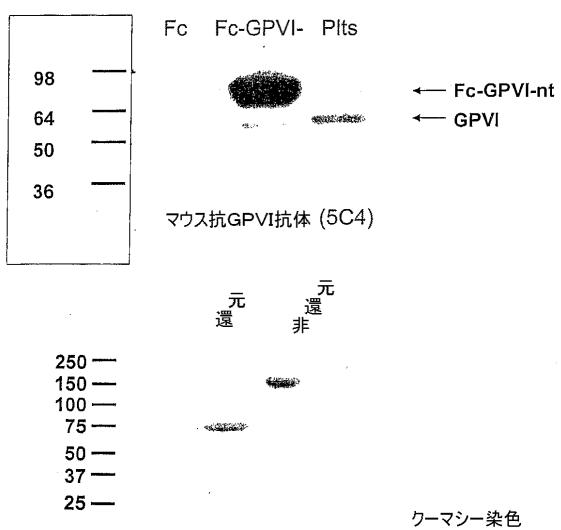
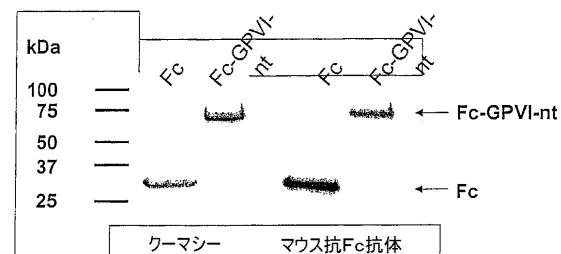
【図7】

1 MSPSPTRALFC LGICLGRVPA QSGPLPKPSL QALPSSLVPL EKPVTLRCQG
 51 PPGVLDYRLLE KLSSSRYQDQ AVLFIPAMKR SLAGRYRCSY QNGSLWSLPS
 101 DQLELVATGV FAKPSLSAQGP GPAVSSGGDV TLQCQTRYGF DDFALYKEGD
 151 PAPYKNPERW YRASPIIITV TAAHSGTYRC YSFSSRDEYL WSAPSDPLEL
 201 VVTGTSVTPS RLTFPPPSV AEFSEATBEL TVSFTNWKVFT TETRSITTS
 251 PKESDSPFAGP ARQYYTKNG GRESKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF
 301 PPKPKDILMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNARTKPRE
 351 EQYNSTYRVVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKQP
 401 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDLAVEWES NGQPENNYKT
 451 TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 501 SPGK*

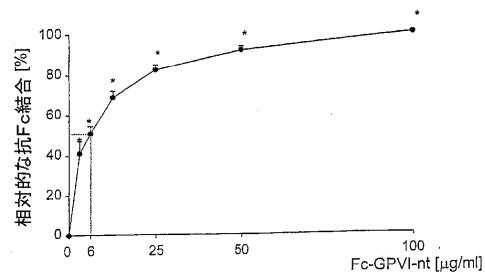
【図8】

1 ATGTCTCCAT CCCCCGACCGC CCTCTCTCTGT CTTGGGCTGT GTCTGGGGCG
 51 TGTGCCAGCG CAGAGTGGAC CGCTCCCCCA GCGCTCCCTC CAGGCTCTGC
 101 CCAGCTCCCT GGTCCCCCTG TGAGAGCCCG TGACCTCCCG TGCCAGGGAA
 151 CCTCCGGGGG TGAGCTCTGTA CGCCCTGGAG AGACTGAGTT CCAGCAGGTA
 201 CCAGGATCAG CGAGTCCCTCT TCATCCCGG CATGAAGAGA AGTCTGGCTG
 251 GAGCCTACCG CTGCTCTAC CAGAACGGAA CCTCTGGTC CCTGCCAGC
 301 GACCAGCTGG AGCTCGTTGC CAGGGAGTT TTTGGGCAAC CCTCCGCTCTC
 351 AGCCCAAGCCC GGGCCGGGGG TGTCGTCAGG AGGGGACGTA ACCCTACAGT
 401 GTCAAGACTCG GTATGGCTTT GACCAATTCT CTCTGTAACAA GGAGGGGGAC
 451 CCTGCCCT ACAAGATCC CGAGAGTGG TACCGGGCTCA GTTCCCTCAT
 501 CATCACGGTG ACGCCCGCCC ACAGCGGACAC CTACCGATGC TACAGCTTCT
 551 CCAGCAGGGA CCCATACCTG TTGTCGGGCC CGAGCGACCC CCTGGAGCTT
 601 GTGGTCACAG GAACCTCTGT GACCCCGAGC CGTTTACCAA CAGAACCCAC
 651 TTCCCTGGTA CGAGAAATTCT CAGAAGCCAC CGCTGAACCT ACCGTCATCAT
 701 TCACAAACAA AGTCTTCACA ACTGAGACTT CTAGGAGTGT CACCCAGCT
 751 CCAAGAGGT CAGACTCTCC AGCTGGTCTT GCGCCGCCAGT ACTACACCAA
 801 GGGCAACGGC GGGCCGGAGT CCAAAATCTTG TGACAAACACT CACACATGCC
 851 CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCCTGGGG GACCGTCAGT CCTCTCTTC
 901 CCCCCAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCCGACCC CTGAGGTCA
 951 ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCGACGAGA CCTGAGGTC AAGTTCAACT
 1001 GGTCAGTGGAA CGGGCTGGAG FGSCATAATG CCAAGACAAA GCGCGGGAG
 1051 GAGCACTACA ACAGCACGCTA CGCTGTGGTC AGCGTCCTCA CGG7CCTGCA
 1101 CCAGGACTTG CTGAGATGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCACACAG
 1151 CCCCTCCAGC CCCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAAGCCAA AGGGCAGCCC
 1201 CGAGAGCCAC AGGTGTACAC CCTGGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA
 1251 GAACCGAGTC AGCGTGACCT CGCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGAA
 1301 TCGCGCTGGAA GTGGGAGAGC ATGGGCGAC CGGGAGACPA CAGACAGGCC
 1351 AGCGCTCCCG TGCTGGACTC CGAGGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT
 1401 CACCGTGGAC AGAGCAGGT GGAGCAGGG GAGCGTCTTC TCATGCTCCG
 1451 TGATGCATGA GGCTCTGCA ACCACTACA CGCGAAGAG CCTCTCCCTG
 1501 TCTCCGGGTA AATGA

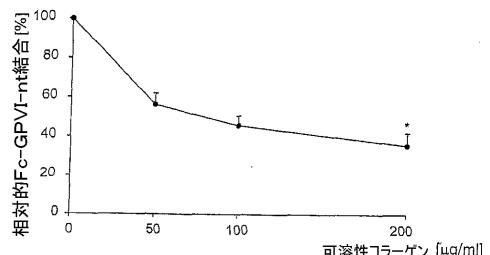
【図9 a】



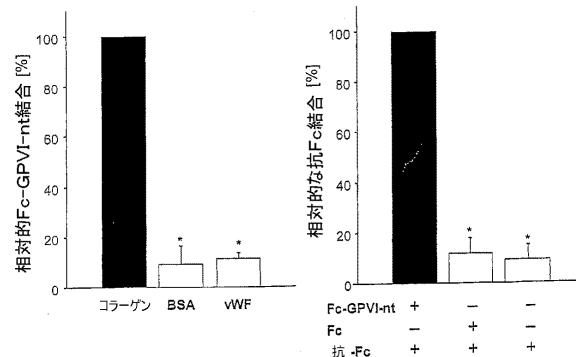
【図 9 b】



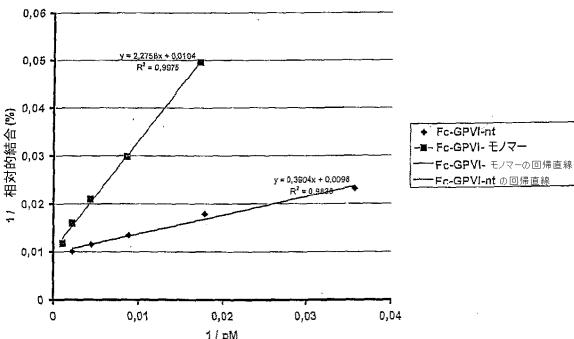
【図 9 d】



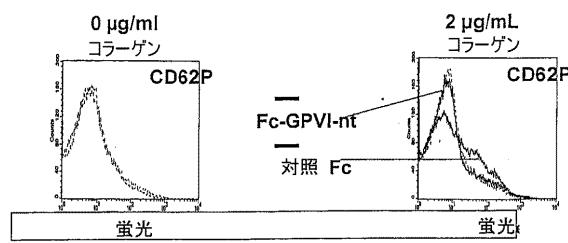
【図 9 c】



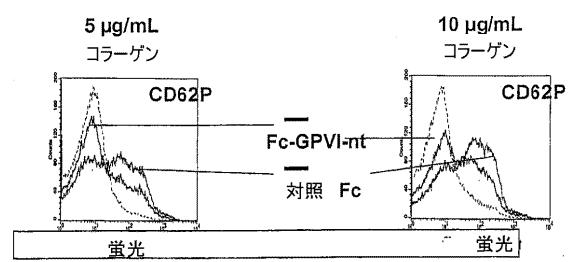
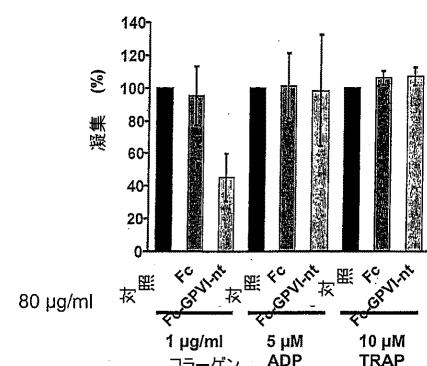
【図 9 e】



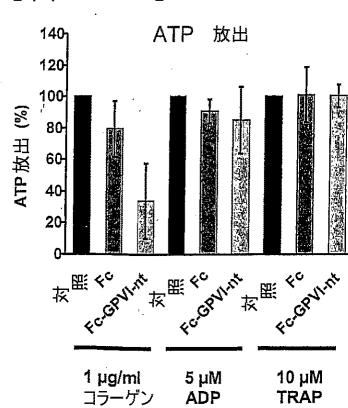
【図 10】



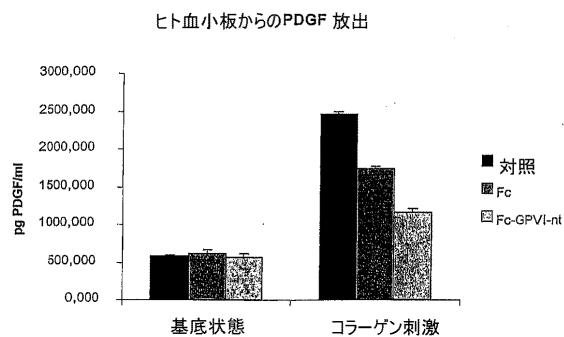
【図 11 a】



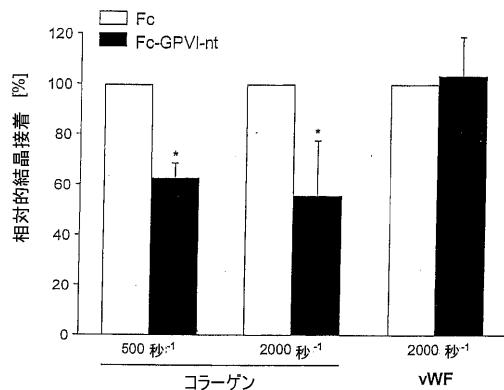
【図 11 b】



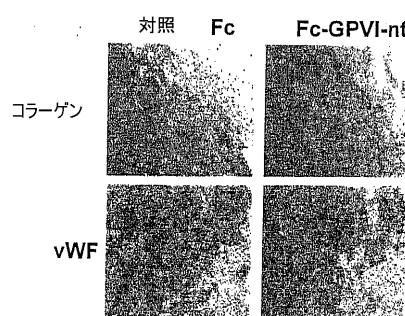
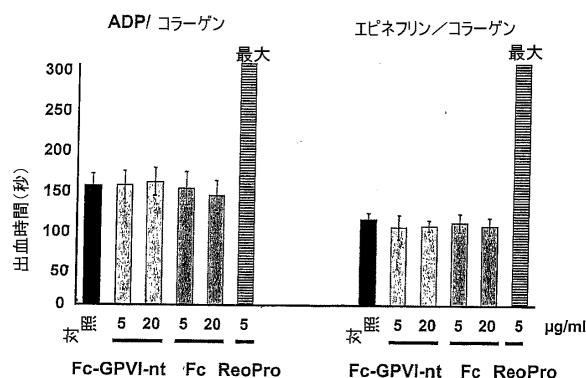
【図 1 1 c】



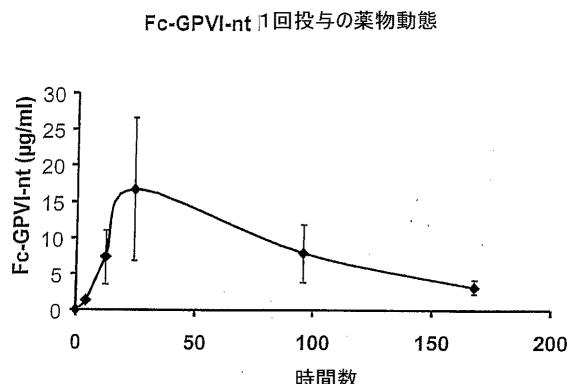
【図 1 3】



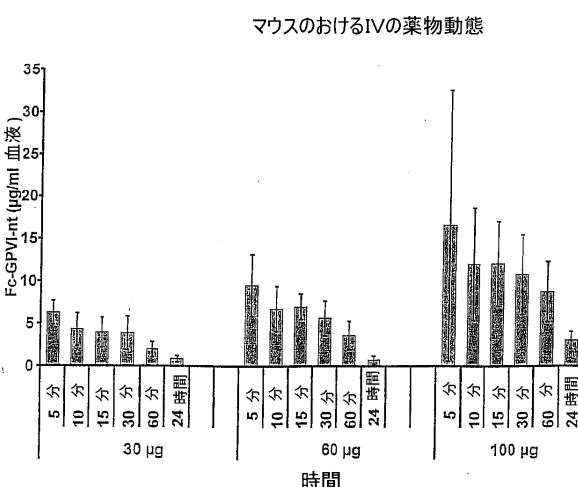
【図 1 2】



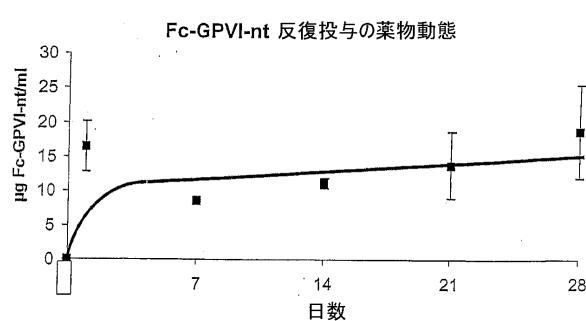
【図 1 4 a】



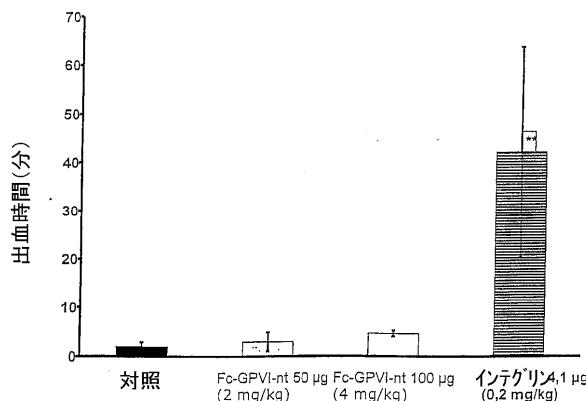
【図 1 4 c】



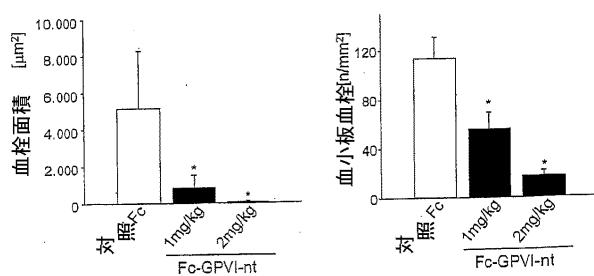
【図 1 4 b】



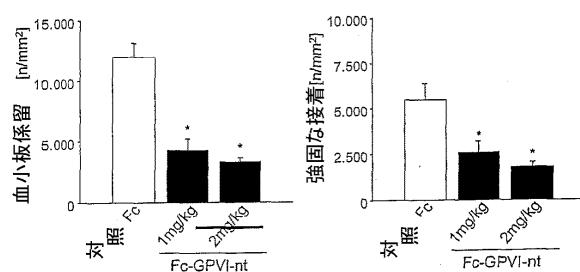
【図15a】



【図15c】



【図15b】



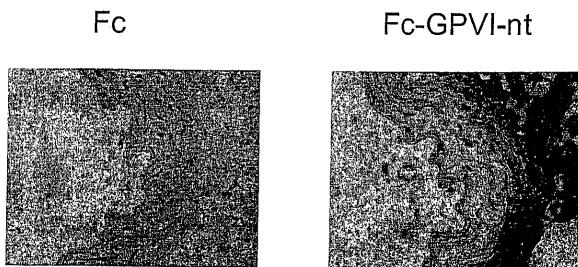
【図15d】



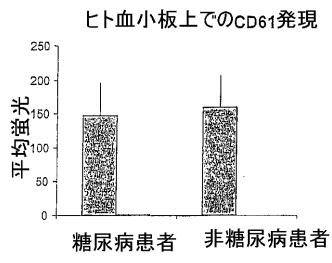
【図15e】



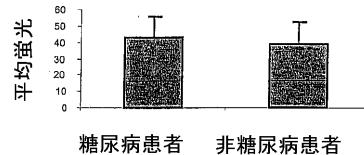
【図15f】



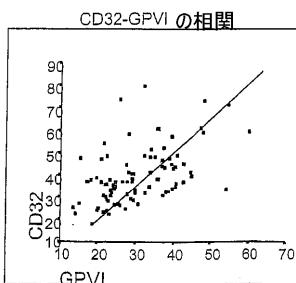
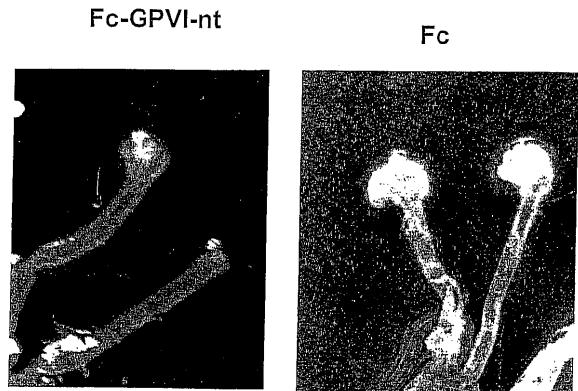
【図17】



ヒト血小板上でのCD32受容体の発現



【図16】



【図18】

MSPSPTALFCGLCLGRVPAQSGPLPKPSLQALPSSLVPLEKPVTLRCQDPPGVDLYRLEKLSRSSRYQDQAVLFIPAMKRSLAGRYRCSYQNGSLWSLPSDQLELVATGVFAKPSLSAOPGPAAVSSGGDVTLQCQTRYGFDQFALYKEGDPAPYKRNPERWYRASPPIITVTAAHSGTYRCYSFSSRDPYLWSAPSDPLELVNTGTSVTPSRLPTEPPSSVAEFSERATELTVSFTNKVFTTETRSRSTTSPKESDSPAGPARQYTKGNGGAAPELLGGPSVFLFPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【配列表】

0004722480000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z
	C 1 2 P 21/08

(72)発明者 マスペルク, シュテフェン
ドイツ国 . 8 0 3 3 9 ミュンヒエン, リドラー・シュトラーセ 29ベー

(72)発明者 ガヴァツ, マインラート
ドイツ国 . 8 0 8 0 5 ミュンヒエン, オスター・ヴァルト・シュトラーセ 129

(72)発明者 ピュルトマン, アンドレアス
ドイツ国 . 8 1 5 4 3 ミュンヒエン, クラウデ - ローライン - シュトラーセ 25

(72)発明者 ミュンヒ, ゲツツ
ドイツ国 . 8 0 7 9 9 ミュンヒエン, シエリング・シュトラーセ 23

(72)発明者 ウンゲレル, マルチン
ドイツ国 . 8 0 7 9 9 ミュンヒエン, ゲオルゲン・シュトラーセ 57

(72)発明者 ペルソ, マリオ
ドイツ国 . 8 2 3 7 7 ペンツベルク, フィッシュハーバー・シュトラーセ 13

審査官 上條 肇

(56)参考文献 国際公開第01/000810 (WO, A1)

国際公開第99/60135 (WO, A1)

日本血栓止血学会学術集会プログラム・抄録集, 2001年10月1日, vol. 24th, p.386(23)

Nature, 1989, vol. 337, p. 525-531

PNAS, Vol.95(1998)p.5929-5934

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/47 - 14/825

C07K 16/00 - 16/36

C07K 19/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

WPI