

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-504031

(P2019-504031A)

(43) 公表日 平成31年2月14日(2019.2.14)

(51) Int.Cl.	F 1				テーマコード (参考)
C07K 16/36 (2006.01)	C07K	16/36	Z N A	4 C O 8 4	
C12N 15/113 (2010.01)	C12N	15/113	1 4 O Z	4 C O 8 5	
A61K 45/00 (2006.01)	A61K	45/00		4 C O 8 6	
A61P 43/00 (2006.01)	A61P	43/00	1 1 1	4 H O 4 5	
A61P 7/04 (2006.01)	A61P	7/04			

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-533051 (P2018-533051)	(71) 出願人	506261534 ユリウス-マクシミリアンズ-ユニヴェル ジテート ウュルツブルグ ドイツ, 97070 ウュルツブルグ, サ ンデルリング 2
(86) (22) 出願日	平成28年12月23日 (2016.12.23)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(85) 翻訳文提出日	平成30年8月17日 (2018.8.17)	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/082572	(72) 発明者	ベルンハルト・ニエスワント ドイツ連邦共和国 97246 アイベルシュ タット. アム・モルゲンロート 6
(87) 國際公開番号	W02017/109180	(72) 発明者	ザーラ・ベック ドイツ連邦共和国 97070 ウュルツブル グ. レンヴェーガー・リング 13 最終頁に続く
(87) 國際公開日	平成29年6月29日 (2017.6.29)		
(31) 優先権主張番号	15202582.1		
(32) 優先日	平成27年12月23日 (2015.12.23)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 血液凝固剤として使用するための糖タンパク質V阻害剤

(57) 【要約】

本発明は、血液凝固剤として処置するための、および／または出血状態の処置もしくは予防で使用するための血小板糖タンパク質V (G P V) の阻害剤に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液凝固剤として使用するための、血小板糖タンパク質 V (G P V) の阻害剤。

【請求項 2】

出血状態の処置または予防で使用するための、血小板糖タンパク質 V (G P V) の阻害剤。

【請求項 3】

前記出血状態が血小板障害によって引き起こされる、請求項 2 に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 4】

前記血小板障害が血小板数の減少を特徴とする、請求項 3 に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 5】

前記出血状態が、炎症性出血、出血性卒中、敗血症が原因の過度の出血、血小板減少が原因の過度の出血、播種性血管内凝固 (D I C) が原因の過度の出血、化学療法が原因の過度の出血、溶血性尿毒症症候群が原因の過度の出血、可溶性 G P V の投与の際の過度の出血および H I V 感染症が原因の過度の出血からなる群から選択される、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 6】

前記 G P V がヒト G P V である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 7】

G P V の細胞外ドメインに対する抗体または抗体の機能的断片もしくは誘導体であり、前記断片または誘導体が G P V の細胞外ドメインに結合することができる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 8】

前記抗体、断片または誘導体が、G P V のコラーゲン結合部位と異なる、G P V の細胞外ドメインの領域に結合する、請求項 7 に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 9】

前記抗体、断片または誘導体がコラーゲン誘導性凝集を遅らせない、請求項 7 に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 10】

前記抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片もしくは機能的誘導体である、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 11】

G P 5 m R N A の発現を低減させることができる核酸である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 12】

対象に投与する際に、前記対象の血小板の数に影響を及ぼさない、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 13】

血液凝固剤として使用される、請求項 2 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 14】

前記処置または予防が、医薬的に有効量の前記阻害剤を対象に、好ましくはヒトに投与することを含む、請求項 2 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 15】

前記処置または予防が、前記阻害剤以外の血液凝固剤を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 14 に記載の使用のための阻害剤。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記阻害剤以外の前記血液凝固剤が、抗線溶剤、血小板濃縮物、凝固因子濃縮物および新鮮な凍結血漿からなる群から選択される、請求項15に記載の使用のための阻害剤。

【請求項17】

請求項1～16のいずれか1項に記載の阻害剤および医薬的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項18】

出血状態の処置または予防で使用するための、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項19】

対象、好ましくはヒトにおいて、出血状態を処置する方法であって、有効量の請求項1～13のいずれか1項に記載の阻害剤または請求項17に記載の医薬組成物を該対象に投与することを含む、前記方法。10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

血管損傷部位における血小板活性化および引き続く血栓形成は正常な止血に極めて重要であるが、これはまた、心筋梗塞および卒中の原因になり得る（非特許文献1）。血小板の接着および活性化は、複数の血小板受容体 - リガンド相互作用が関与する多段階プロセスである。血管壁損傷の際に、循環血小板は、露出した内皮下細胞外基質（例えばコラーゲン）上に固定化されたフォンヴィルブランド因子（vWF）との糖タンパク質（GP）Ib - V - IX複合体の一過的な相互作用によって、急速に減速する（非特許文献2）。この相互作用は、血小板を血管壁の近くにとどめておき、GPIVとコラーゲンの間の接触を促進する（非特許文献3）。 GPIV - コラーゲン相互作用は、血小板の活性化ならびに第2の血小板アゴニスト、例えば、トロンボキサンA₂（TXA₂）およびアデノシン二リン酸（ADP）の放出につながる細胞内シグナリングカスケードを誘導する。これらの可溶性アゴニストは、局部的に生成されたトロンビンとともに、Gタンパク質（Gi、Gq、G_{12/13}）結合受容体を介して、さらに血小板活性化に寄与する（非特許文献4）。これらシグナリング経路のすべてが協力して、複雑な細胞応答、例えば、インテグリンの活性化、顆粒内容物の放出および凝固カスケードの活性化のための凝固促進表面の供給を誘導する（非特許文献5；非特許文献6）。最終的な血栓は、フィブリンネットワークに埋め込まれ、流動している血液によって生成される剪断力に耐える。新しく形成された血栓の安定化は、血管損傷部位で出血を止めるのに必須である。20

【0002】

血小板接着におけるこれらの中心的役割は、以下の2つの受容体複合体を血小板研究の中心にする：i) 損傷した血管壁または活性化した血小板上に固定化されたvWFと相互作用し、それによって、剪断が高まった条件下で血流から血小板を反応表面に動員するGPIb - V - IX複合体。ii) アゴニスト受容体によって媒介されるインサイドアウトの活性化を必要とし、剪断抵抗性血小板接着を安定させるのに寄与し、凝集体形成に必須である、フィブリノーゲンおよびvWFに対する受容体である、GPIIb / IICa（インテグリン IIb 3）。GPIb - V - IX複合体は、4つの関連する膜貫通型GP : GPIb、GPIb、GPIVおよびGPIXからなり、これらは、2 : 4 : 2 : 1の化学量で結合している（非特許文献7）。この複合体内で、GPIb およびGPIb はジスルフィド結合しており、GPIXと非共有結合的に結合している。GPIVは、GPIb - IXと非共有結合的に結合している（非特許文献8）。およそ30,000コピーのGPIb - IX複合体がヒト血小板の表面に見いだされる（非特許文献9）。GPIb - V - IXの機能の喪失により、重度の出血障害であるベルナール - スリエ症候群（BSS）が引き起こされる。BSSは、vWFへの接着に欠陥があり、トロンビン応答性が低減している、異常で巨大な循環血小板を特徴とする（非特許文献10）。GPIbまたはGPIXの欠如または機能障害はBSSに関連するが、GPIVの機能喪失変異は報告されておらず、マウスのGPIVの欠如はBSS表現型をもたらさない（非特許文献11；非特許文献12）。GPIVは、複合体の正確な発現に必要とされない唯一のサブユニット30

10

20

30

40

50

である（非特許文献13）。G P Vは高度にグリコシル化されており、トロンビンの存在下で、血小板の表面からのG P Vの量的な除去および可溶性G P V（s G P V）の生成につながるトロンビン切断部位を含む（非特許文献14；非特許文献15）。注目すべきことに、このトロンビン切断部位は、マウス、ラットおよびヒトのタンパク質で保存されている（非特許文献14）。しかし、トロンビン刺激の際に応答しないプロテアーゼ活性化受容体（P A R）4-欠損マウス（非特許文献12；非特許文献16）と対照的に、G p 5^{-/-}マウスは、肉眼的に正常な血小板機能性を示す。

【0003】

*in vitro*では、G p 5^{-/-}血小板は野生型血小板とほとんど識別できない（非特許文献11；非特許文献12）。閾値用量のトロンビンで活性化した後のみ応答性の増大が観察され（非特許文献11）、これは、P A Rと競合するトロンビンの代替の基質としてのG P Vの欠如の結果とみなされた。2つのG p 5^{-/-}マウス系統のうちの1つについては、尾の出血時間の低減、血栓形成の加速および塞栓形成の増大が報告されたが（非特許文献11；非特許文献17）、第2のマウスラインの解析によって、尾の出血時間の未変化および血栓形成の障害が明らかになった（非特許文献12；非特許文献18）。後者の群は、不完全な血栓形成をコラーゲンシグナリングにおけるG P Vの役割のせいにされ、それによって、コラーゲンをG P Vに対するリガンドとして証明した（非特許文献18）。G p 5^{-/-}マウスに関する最新の報告は、C 5 7 B 1 / 6 バックグラウンドと戻し交配したマウスを使用し、トロンビン応答性の増大およびコラーゲンに対するわずかに低減した接着を確認した。レーザー損傷を使用して、本発明者らは、血栓形成に対するG P V欠損の影響は損傷の重症度に依存することを示し、G P Vは動脈の血栓形成について関連性はわずかしかないと結論した（非特許文献19）。これまで、血栓形成および止血におけるG P Vの役割は、止血および血小板機能の維持について、関連性はわずかしかないように思われる。しかし、血栓形成、止血および血栓炎症性脳梗塞におけるG P Vの正確な機能は、依然としてほとんど理解されていないままである。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】C o u g h l i n S R . N a t u r e . 2 0 0 0 ; 4 0 7 : 2 5 8 ~ 6 4

【非特許文献2】S h a p i r o M J ら、J B C . 2 0 0 0 ; 2 7 5 : 2 5 2 1 6 ~ 2 1

【非特許文献3】N i e s w a n d t B ら、B l o o d . 2 0 0 3 ; 1 0 2 : 4 4 9 ~ 6 1

【非特許文献4】O f f e r m a n n s S . C i r c u l a t i o n r e s e a r c h . 2 0 0 6 ; 9 9 : 1 2 9 3 ~ 3 0 4

【非特許文献5】N a k a n i s h i - M a t s u i M ら、N a t u r e . 2 0 0 0 ; 4 0 4 : 6 0 9 ~ 1 3

【非特許文献6】C u n n i n g h a m M A ら、J E x p M e d . 2 0 0 0 ; 1 9 1 : 4 5 5 ~ 6 2

【非特許文献7】L u o S . - Z ら、B l o o d , 2 0 0 7 . 1 0 9 (2) : 6 0 3 ~ 9

【非特許文献8】N i e s w a n d t B ら、J T h r o m b H a e m o s t . 2 0 0 9 ; 7 : 2 0 6 ~ 9

【非特許文献9】V a r g a - S z a b o D ら、J T h r o m b H a e m o s t . 2 0 0 9 ; 7 : 1 0 5 7 ~ 6 6

【非特許文献10】C a n o b b i o I ら、C e l l u l a r s i g n a l l i n g . 2 0 0 4 ; 1 6 : 1 3 2 9 ~ 4 4

【非特許文献11】R a m a k r i s h n a n V ら、P N A S . 1 9 9 9 ; 9 6 : 1 3 3 3 6 ~ 4 1

【非特許文献12】Kahn M Lら、Blood. 1999; 94: 4112~21
 【非特許文献13】Dong J-fら、J Biol Chem. 1998; 273: 31449~54
 【非特許文献14】Ravananat Cら、Blood. 1997; 89: 3253~62

【非特許文献15】Azorsa DOら、Thrombosis and Haemostasis. 1999; 81: 131~8

【非特許文献16】Kahn M Lら、Nature. 1998; 394: 690~4

【非特許文献17】Ni Hら、Blood. 2001; 98: 368~73

【非特許文献18】Moog Sら、Blood. 2001; 98: 1038~46

10

【非特許文献19】Nonne Cら、J Thromb Haemost. 2008; 6: 210~2

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者らは、驚いたことに、GPVのコラーゲン結合部位と異なる、GPVの細胞外ドメインの領域に対する抗体で処置したマウスが、in vivoで血栓形成に対する時間の加速を示すことを発見した。さらに、GPVの抗体媒介性遮断は、in vivoの血栓形成および止血において、GPVIの欠如を十分に補うことができる。

【課題を解決するための手段】

20

【0006】

したがって、本発明は以下の実施形態[1]～[28]に関する：

[1] 血液凝固剤として使用するための、糖タンパク質V(血小板糖タンパク質V；GPV)の阻害剤。

20

[2] 出血状態の処置または予防で使用するための、糖タンパク質V(血小板糖タンパク質V；GPV)の阻害剤。

[3] 前記出血状態が血小板障害によって引き起こされる、実施形態[2]に記載の使用のための阻害剤。

[4] 前記血小板障害が血小板数の減少を特徴とする、実施形態[3]に記載の使用のための阻害剤。

30

[5] 血小板障害が、血小板減少症、例えば、特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、化学療法に起因する血小板減少症または免疫性血小板減少症である、実施形態[3]または[4]に記載の使用のための阻害剤。

[6] 前記出血状態が、炎症性出血、出血性卒中、敗血症が原因の過度の出血、血小板減少が原因の過度の出血、播種性血管内凝固(DIC)が原因の過度の出血、化学療法が原因の過度の出血、溶血性尿毒症症候群が原因の過度の出血、可溶性GPVの投与の際の過度の出血およびHIV感染症が原因の過度の出血からなる群から選択される、実施形態[2]～[4]のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

[7] 前記GPVがヒトGPVである、実施形態[1]～[6]のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

40

[8] 前記ヒトGPVが配列番号3に示すアミノ酸配列を含む、またはその配列からなる、実施形態[7]に記載の使用のための阻害剤。

[9] ポリペプチドである、実施形態[1]～[8]のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

[10] (i) GPVの細胞外ドメインに結合することができる抗体、(ii) GPVの細胞外ドメインに結合することができる、抗体の断片もしくは誘導体、(iii) GPVの細胞外ドメイン内のエピトープに結合することができる抗体、または(iv) GPVの細胞外ドメイン内のエピトープに結合することができる、抗体の断片もしくは誘導体である、実施形態[9]に記載の使用のための阻害剤。

[11] 前記細胞外ドメインが配列番号3のアミノ酸1～503を含む、またはそれから

50

なる、実施形態〔10〕に記載の使用のための阻害剤。

〔12〕前記抗体、断片または誘導体が、G P Vのコラーゲン結合部位と異なる、G P Vの細胞外ドメインの領域に結合する、実施形態〔10〕または〔11〕に記載の使用のための阻害剤。

〔13〕前記抗体、断片または誘導体がコラーゲン誘導性凝集を遅らせない、実施形態〔10〕～〔12〕のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

〔14〕前記エピトープがG P Vのコラーゲン結合部位の外側にある、および／またはG P Vのコラーゲン結合部位と重複しない、実施形態〔10〕～〔13〕のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

〔15〕前記抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片もしくは機能的誘導体である、実施形態〔10〕～〔14〕のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。 10

〔16〕核酸である、実施形態〔1〕～〔15〕のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

〔17〕前記核酸がG P Vの発現を低減させることができる、実施形態〔16〕に記載の使用のための阻害剤。

〔18〕前記核酸がアンチセンス核酸、s i R N A およびs h R N A からなる群から選択される、実施形態〔17〕に記載の使用のための阻害剤。

〔19〕前記核酸がG P Vの細胞外ドメインに結合することができる、実施形態〔16〕に記載の使用のための阻害剤。

〔20〕前記核酸がアプタマーである、実施形態〔19〕に記載の使用のための阻害剤。

〔21〕対象に投与する際に、前記対象の血小板の数に実質的に影響を及ぼさない、実施形態〔1〕～〔20〕のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

〔22〕血液凝固剤として使用される、実施形態〔2〕～〔21〕のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

〔23〕前記処置または予防が、医薬的に有効量の前記阻害剤を対象に、好ましくはヒトに投与することを含む、実施形態〔2〕～〔22〕のいずれか1つに記載の使用のための阻害剤。

〔24〕前記処置または予防が、前記阻害剤以外の血液凝固剤を前記対象に投与することをさらに含む、実施形態〔23〕に記載の使用のための阻害剤。

〔25〕前記阻害剤以外の前記血液凝固剤が、抗線溶剤、血小板濃縮物、凝固因子濃縮物および新鮮な凍結血漿からなる群から選択される、実施形態〔24〕に記載の使用のための阻害剤。 30

〔26〕実施形態〔1〕～〔25〕のいずれか1つに記載の阻害剤および医薬的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

〔27〕出血状態の処置または予防で使用するための、実施形態〔26〕に記載の医薬組成物。

〔28〕対象、好ましくはヒトにおいて、出血状態を処置する方法であって、有効量の、実施形態〔1〕～〔21〕のいずれか1つに記載の阻害剤または実施形態〔26〕に記載の医薬組成物を該対象に投与することを含む、前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】モノクローナル抗G P V抗体89F12がG P Vの細胞外ドメインに結合することを示す図である。(A)フローサイトメトリーによって評価した場合に、89F12-FITCはWTに結合するが、G P V欠損血小板には結合しない。(B)ELISA系において、89F12-HRPは組換えマウスs G P Vを検出する。

【図2】モノクローナル抗G P V抗体89F12が、血小板数およびG P Vのトロンビン媒介性切断に影響を及ぼすことなく、G P Vの細胞外ドメインに結合することを示す図である。(A、B)89F12 100 μgを静脈内注射し、その後、血小板数およびG P Vの表面発現を解析した。(C)フローサイトメトリーによって評価した場合に、抗体89F12はG P Vのトロンビン媒介性切断に影響を及ぼさない。(D)89F12は、ト 50

ロンビンに反応する I I b 3 インテグリン媒介性血小板活性化および P - セレクチン曝露を変化させない。

【図 3】 89H11 は G P V のコラーゲン結合部位を遮断するが、 89F12 は遮断しないことを示す図である。コラーゲン結合インテグリン 2 1 (I t g a 2 - / -) を欠くマウス由来の洗浄したマウス血小板を、 ビヒクル (黒色の曲線) または抗 G P V 抗体 89H11 (ライトグレー) もしくは 89F12 (ダークグレー) の存在下で、 2 μg / m¹ の線維性コラーゲンで刺激した。各群あたり 4 マウスを用いる 2 つの独立した実験の代表的な凝集測定曲線を示す。

【図 4】 抗体 89F12 が野生型マウスにおいて止血を増し、 G P V I / C L E C - 2 二重欠損動物において止血を回復させることを示す図である。指定されるマウスラインの尾の出血時間を示す。各記号は 1 匹の動物を示す。マウスが出血を止めることができない場合には、 フィッシャーの正確確率検定を使用して P 値を計算した。

【図 5】 抗体 89F12 が G P V I / I T G A 2 二重欠損マウスにおいて止血を回復させることを示す図である。指定されるマウスラインの尾の出血時間を示す。各記号は 1 匹の動物を示す。マウスが出血を止めることができない場合には、 フィッシャーの正確確率検定を使用して P 値を計算した。

【図 6】 モノクローナル抗 G P V 抗体 89F12 が、 i n v i v o 血栓形成モデルにおいて、 G P V I の欠如を補うことを示す図である。 20% F e C l₃ で腸間膜細動脈に損傷を与え、 生体顕微鏡によって、 蛍光標識した血小板の接着および血栓形成をモニターした。各ドットは 1 つの血管を示し、 横線は中央値を示す。 * P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 。

【図 7】 抗体 89F12 が、 止血において R h o A の欠如を補うことができるることを示す図である。指定されるマウスラインの尾の出血時間を示す。各記号は 1 匹の動物を示し、 横線は中央値を示す (中央値が 1200 秒より大きかったと思われる場合は、 示さない) 。マウスが出血を止めることができない場合には、 フィッシャーの正確確率検定を使用して、 P 値を計算した。 * P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明は、 血液凝固剤として使用するための血小板糖タンパク質 V (G P V) の阻害剤、 および / または出血状態の処置もしくは予防で使用するための G P V の阻害剤に関する。

【0009】

糖タンパク質 V

本明細書で使用する場合、 用語「糖タンパク質 V 」または「 G P V 」は、 配列番号 3 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 50 % の配列同一性を有する膜タンパク質を意味する。好ましくは、 G P V は、 配列番号 3 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 60 % 、 または少なくとも 70 % 、 または少なくとも 80 % 、 または少なくとも 90 % 、 または少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有する。 G P V は、 機能的膜貫通ドメインを有する。

【0010】

本発明によれば、 評価される配列 (「 比較配列 」) は、 2 つの配列のアライメント後に、 特許請求されるもしくは記載される配列 (「 参照配列 」) と特定の「 パーセント同一性 」を有する、 またはそうした配列に特定の「 パーセントが同一である 」。 「 パーセント同一性 」は、 次の式 :

$$\text{パーセント同一性} = 100 [1 - (C / R)]$$

に従って決定される。

【0011】

この式では、 C は、 2 つの配列間のアライメントの長さにわたる、 参照配列と比較配列の間の相違の数であり、 (i) 比較配列中に対応する整列した塩基を有さない参照配列中の各塩基、 および (i i) 参照配列中の各ギャップ、 および (i i i) 比較配列中の整列した塩基と異なる参照配列中の整列した各塩基が、 相違を構成する。 R は、 比較配列との

アライメントの長さにわたる参照配列の塩基の数であり、参照配列中に生成された任意のギャップも塩基として数えられる。

【0012】

パーセント同一性（上記のように計算される）が指定された最小値にほぼ等しい、または指定された最小値を超えるアライメントが比較配列と参照配列の間に存在する場合、その指定されたものよりも低いパーセント同一性を示すアライメントが配列の他の個所に存在し得る場合でさえも、比較配列は、その指定された最小パーセント同一性を有する。

【0013】

好ましい実施形態では、比較のために整列される配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より一層好ましくは少なくとも60%、およびより一層好ましくは少なくとも70%、80%、または90%である。10

【0014】

2つのアミノ酸配列間の配列の比較およびパーセント同一性（およびパーセント類似性）の決定は、任意の適切なプログラム、例えば、次のパラメーター：マトリックス BLOSUM62；開始ギャップ11および伸長ギャップ1のペナルティー；ギャップ \times d r o p off 50；期待値 10.0 ワードサイズ3；フィルター：無し、を有する、プログラム「BLAST 2 SEQUENCES (blastp)」（Tatusovaら、FEMS Microbiol. Lett. 1999; 174: 247~250）を使用して達成することができる。本発明によれば、配列比較は、少なくとも40アミノ酸、好ましくは少なくとも80アミノ酸、より好ましくは少なくとも100アミノ酸および最も好ましくは少なくとも120アミノ酸をカバーする。20

【0015】

本明細書で言及する G P V は、典型的には血小板糖タンパク質 V である。

【0016】

典型的には、G P V は天然に存在する G P V である。好ましくは、G P V は哺乳類起源のものである。最も好ましくは、G P V はヒト G P V である。本実施形態によれば、G P V は、好ましくは、配列番号3に示すアミノ酸配列を含む、またはその配列からなる。

【0017】

G P V の阻害剤

G P V の阻害剤（以降、「G P V 阻害剤」と呼ぶ）は、(i) 凝固促進活性を有し、(ii) G P V の細胞外ドメインに結合することができる、または G P V mRNA の発現を弱めることができる化合物である。好ましくは、G P V 阻害剤は、(i) 凝固促進活性を有し、(ii) G P V の細胞外ドメインに結合することができる化合物である。本発明によれば、凝固促進活性は、実施例に記載されているように「出血時間アッセイ」で決定されるが、但し、出血時間アッセイで使用されるマウスは内在性の G P V を欠き、ヒト G P V を発現する遺伝子組換えマウスである。G P V の細胞外ドメインへの結合は、実施例に記載されているように E L I S A で決定することができる。一実施形態では、G P V の細胞外ドメインへの結合は、図 1B に示すように、組換え可溶性 G P V を使用して E L I S A で決定されるが、但し、組換え可溶性ヒト G P V が使用される。最も好ましくは、G P V の細胞外ドメインへの結合は、図 1B で示すように、組換え可溶性 G P V を使用して E L I S A で決定されるが、但し、配列番号3のアミノ酸 1 ~ 503 から実質的になる組換え可溶性ヒト G P V が使用される。3040

【0018】

G P V 阻害剤は、G P V 阻害剤を対象に投与する際に、対象の G P V のトロンビン媒介性切断に影響を及ぼす、例えば、この切断を阻害することができる。別の実施形態では、G P V 阻害剤を対象に投与する際に、G P V 阻害剤は対象の G P V のトロンビン媒介性切断に影響を及ぼさない。

【0019】

G P V 阻害剤のタイプまたはクラスは、特に制限されない。しかし、好ましくは、この

10

20

30

40

50

化合物はペプチドまたはポリペプチドであり、より好ましくは、この化合物は抗体またはその断片である。さらに別の実施形態では、G P V 阻害剤は核酸である。

【0020】

抗体

好ましい実施形態では、G P V 阻害剤は抗体である。本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、特定の抗原に結合する、または特定の抗原と免疫学的に反応性である免疫グロブリン分子を指し、これには、抗体のポリクローナル形態、モノクローナル形態、遺伝子操作形態ならびに他の改変形態、例えば、限定されないが、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディおよびテトラボディ）、シングルドメイン抗体（ナノボディ）、ならびに例えば、F ab'、F (ab') 2、Fab、Fv、rlg G および sc Fv 断片を含めた抗体の抗原結合断片が含まれる。さらに、別段指示がない限り、用語「モノクローナル抗体」（mAb）は、インタクトな分子ならびにタンパク質に結合することができる抗体断片（例えば、Fab および F (ab') 2 断片など）の両方を含むことが意図される。Fab および F (ab') 2 断片は、インタクトな抗体のFc 断片を欠き、動物の循環からより急速に消え、インタクトな抗体よりも少ない非特異的組織結合を有し得る（Wahlら、J. Nucleic Med. 1983; 24: 316）。

10

【0021】

典型的には、抗体はG P V の、好ましくはヒトG P V の細胞外ドメインに結合することができる。分子または抗体がG P V の細胞外ドメインに結合できるかどうかは、実施例／図1A または 1B に記載されている結合アッセイによって決定することができる（以下を参照されたい）。

20

【0022】

本明細書で言及する抗体、断片または誘導体は、好ましくは、G P V のコラーゲン結合部位と異なる、G P V の細胞外ドメイン内の領域に結合する。別の実施形態では、抗体、断片または誘導体は、コラーゲン誘導性凝集を遅らせない。これは、実施例に記載されているように、凝集アッセイで決定することができる（図3ならびに材料および方法を参照されたい）。

30

【0023】

さらに好ましい阻害剤は、ヒトG P Vへの結合について抗体 89F12 と競合する抗体、その断片および誘導体である。さらに好ましい阻害剤は、抗体 89F12 のG P V 上のエピトープと重複するG P V 上のエピトープに結合する、抗体、その断片および誘導体である。さらに好ましい阻害剤は、G P V 上の、抗体 89F12 同じエピトープに結合する、抗体、その断片および誘導体である。

40

【0024】

他の実施形態では、阻害剤は、ヒトG P Vへの結合について抗体 89H11 と競合しない、抗体、その断片または誘導体である。別の実施形態では、阻害剤は、抗体 89H11 のG P V 上のエピトープと重複しないG P V 上のエピトープに結合する、抗体、その断片または誘導体である。さらに別の実施形態では、阻害剤は、抗体 89H11 のG P V 上のエピトープと異なるG P V 上のエピトープに結合する、抗体、その断片または誘導体である。

40

【0025】

他の実施形態では、阻害剤は、ヒトG P Vへの結合について抗体 V.3 (Azorsa DOら、Thrombosis and Haemostasis. 1999; 81: 131~8; Moog Sら、Blood. 2001; 98: 1038~46) と競合しない、抗体、その断片または誘導体である。別の実施形態では、阻害剤は、抗体 V.3 のG P V 上のエピトープと重複しないG P V 上のエピトープに結合する、抗体、その断片または誘導体である。さらに別の実施形態では、阻害剤は、抗体 V.3 のG P V 上のエピトープと異なるG P V 上のエピトープに結合する、抗体、その断片または誘導体である。

50

【0026】

上記の段落の実施形態は、互いに組み合わせることができる。

【0027】

抗体は、好ましくは、配列番号3のアミノ酸1～503内のエピトープに結合する。例えば、本発明は、限定はされないが次の実施形態を含む：

【0028】

【表1】

表1.

実施形態番号	抗体は、配列番号3の以下のアミノ酸内で エピトープに結合する
1	1-30
2	16-45
3	31-60
4	46-75
5	61-90
6	76-105
7	91-120
8	106-135
9	121-150
10	136-165
11	151-180
12	166-195
13	181-210
14	196-225
15	211-240
16	226-255
17	241-270
18	256-285
19	271-300
20	286-315
21	301-330
22	316-345
23	331-360
24	346-375
25	361-390
26	376-405
27	391-420

10

20

30

40

50

【0029】

【表2】

実施形態番号	抗体は、配列番号3の以下のアミノ酸内でエピトープに結合する
28	406-435
29	421-450
30	436-465
31	451-480
32	466-495
33	481-503

10

【0030】

G P V の細胞外ドメインおよび抗体によって形成される複合体の解離定数 K_D は、好ましくは $100 \mu M$ 未満、より好ましくは $10 \mu M$ 未満、最も好ましくは $5 \mu M$ 未満である。典型的には、 K_D は、約 $1 pM$ ~ 約 $10 \mu M$ または約 $10 pM$ ~ 約 $1 \mu M$ または約 $100 pM$ ~ 約 $100 nM$ の範囲にわたる。好ましくは、抗体 - G P V 複合体は、 $5 pM$ ~ $1 nM$ 、最も好ましくは $10 pM$ ~ $500 pM$ の範囲内の K_D を有する。

20

【0031】

好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術を介して生成される抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、任意の真核生物、原核生物またはファージのクローンを含めた単一クローンに由来する抗体を指し、それが生成される方法を指すものではない。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換えおよびファージディスプレイ技術またはこれらの組合せの使用を含めた、当技術分野で既知の多種多様な技法を使用して調製することができる (Harlow および Lane, 「Antibodies, A Laboratory Manual」 CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.)。

30

【0032】

他の実施形態では、ヒトにおける抗 G P V 抗体の *in vivo* での使用を含めて、キメラ抗体、靈長類化抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体を使用することができる。好ましい実施形態では、抗体はヒト抗体またはヒト化抗体、より好ましくはモノクローナルヒト抗体またはモノクローナルヒト化抗体である。

【0033】

本明細書で使用する場合、用語「キメラ」抗体は、非ヒト免疫グロブリン、例えば、ラットまたはマウス抗体に由来する可変配列、および典型的にはヒト免疫グロブリン鑄型から選択されるヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体を指す。キメラ抗体を生成する方法は当技術分野で既知である。例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、Morrison. Science. 1985; 229 (4719): 1202 ~ 7; Oiら、Biotechniques. 1986; 4: 214 ~ 221; Gilliesら、J. Immunol. Methods. 1985; 125: 191 ~ 202; USS, 807, 715; US4, 816, 567; およびUS4, 816, 397を参照されたい。

40

【0034】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形態は、キメラの免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはこれらの断片(例えば、抗体の Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂)

50

または他の標的結合サブ配列)であり、これは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む。一般に、ヒト化抗体は、実質的にすべての少なくとも1つのおよび典型的には2つの可変ドメインを含み、すべてまたは実質的にすべての相補性決定領域(CDR)は非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、すべてまたは実質的にすべてのフレームワーク(FR)領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的には、選択されるヒト免疫グロブリン錆型のものを含むこともできる。ヒト化は、ヒト可変ドメインの1つまたはそれ以上のアミノ酸または部分が非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体を作製する技法である。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つまたはそれ以上のCDRおよびヒト免疫グロブリン分子由来のFRを有する、所望の抗原に結合する、非ヒト種において生成される抗体分子である。多くの場合、ヒトフレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは向上させるために、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するためのCDRとフレームワーク残基の相互作用のモデリング、および特定の位置における異常なフレームワーク残基を特定するための配列比較によって、特定される。例えば、Riechmannら、Nature 1988.332:323~7ならびにQueenら、USS5,530,101; USS5,585,089; USS5,693,761; USS5,693,762;およびUSS6,180,370(これらのそれぞれは、参照によってその全体を組み入れる)を参照されたい。抗体は、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、CDRグラフト化(EP239400; WO91/09967; USS5,225,539; USS5,530,101およびUSS5,585,089)、ベニア化(veneering)または再表面化(resurfacing)(EP0592106; EP0519596; Padlan.MoI Immunol.1991; 28:489~98; Stu dnickaら、Prot Eng.1994; 7:805~814; Roguskaら、PNAS 1994; 91:969~973、ならびに鎖シャッフリング(USS5,565,332))を含めた当技術分野で既知の様々な技法を使用して、ヒト化することができる。

【0035】

いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、Queenら、USS5,530,101; USS5,585,089; USS5,693,761; USS5,693,762;およびUSS6,180,370(これらのそれぞれは、参照によってその全体を組み入れる)に記載されているように調製される。

【0036】

いくつかの実施形態では、抗GPV抗体はヒト抗体である。ヒト患者の治療的処置にとって完全「ヒト」抗GPV抗体が望ましい可能性がある。本明細書で使用する場合、「ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、または1つもしくはそれ以上のヒト免疫グロブリンについて遺伝子組換えされ、内在性免疫グロブリンを発現しない動物から単離した抗体を含む。ヒト抗体はヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用する上記のファージディスプレイ方法を含めた、当技術分野で既知の様々な方法によって作製することができる。参照によってその全体を本明細書に組み入れる、USS4,444,887およびUSS4,716,111;ならびにWO98/46645;WO98/50433;WO98/24893;WO98/16654;WO96/34096;WO96/33735;およびWO91/10741を参照されたい。ヒト抗体は、機能的な内在性免疫グロブリンを発現することができないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができる、遺伝子組換えマウスを使用して生成することもできる。例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、WO98/24893;WO92/01047;WO96/34096;WO96/33735;USS5,413,923;USS5,625,126;USS5,633,425;USS5,569,825;USS5,661,016;USS5,545,8

10

20

30

40

50

06 ; U S S , 814 , 318 ; U S S , 885 , 793 ; U S S , 916 , 771 ; および U S S , 939 , 598 を参照されたい。選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド選択 (guided selection)」と呼ばれる技法を使用して生成することができる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を使用して、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドする (Jespersら、Biotechnology. 1988; 12: 899 ~ 903)。

【0037】

いくつかの実施形態では、抗 G P V 抗体は靈長類化抗体である。用語「靈長類化抗体」は、サル可変領域およびヒト定常領域を含む抗体を指す。靈長類化抗体を生成する方法は当技術分野で既知である。例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、U S S , 658 , 570 ; U S S , 681 , 722 ; および U S S , 693 , 780 を参照されたい。

10

【0038】

いくつかの実施形態では、抗 G P V 抗体は誘導体化抗体である。例えば、限定するものではないが、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、既知の保護 / ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解性切断または細胞のリガンドもしくは他のタンパク質への結合（抗体コンジュゲートの議論については以下を参照されたい）によって、修飾された誘導体化抗体である。限定されないが、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化またはツニカマイシンの代謝的合成などを含めた既知の技法によって、多数の化学修飾のうちのいずれかを行うことができる。さらに、誘導体は、1つまたはそれ以上の非古典的なアミノ酸を含むことができる。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、抗 G P V 抗体またはその断片は、その配列が、対応する野生型配列と比べて、少なくとも1つの定常領域媒介性生物学的エフェクター機能を低減させるように改変された、抗体または抗体断片でもよい。Fc受容体への結合の低減を示すように抗 G P V 抗体を改変するために、Fc受容体 (FcR) 相互作用に必要な特定の領域で、抗体の免疫グロブリン定常領域セグメントを変異させることができる（例えば、C anfield および Morrison. J Exp Med. 1991; 173: 1483 ~ 1491；ならびに Lundら、J Immunol. 1991; 147: 2657 ~ 2662 を参照されたい）。抗体のFcR結合能力の低減は、FcR相互作用に依拠する他のエフェクター機能、例えば、オプソニン作用、食作用および抗原依存的細胞傷害性を低減させることもできる。

30

【0040】

さらに別の態様では、抗 G P V 抗体またはその断片は、胎児性Fc受容体、FcRnへのその結合親和性を増大または低減させるように改変された、抗体または抗体断片でもよい。FcRnへの結合親和性を変化させるために、FcRn相互作用に必要な特定の領域で、抗体の免疫グロブリン定常領域セグメントを変異させることができる（例えば、WO 2005/123780 を参照されたい）。FcRnへの結合親和性の増大は抗体の血清半減期を増大させるべきであり、FcRnへの結合親和性の低減は、逆に、抗体の血清半減期を低減させるべきである。適切なアミノ酸置換の特定の組合せは、WO 2005/123780 の表1で特定され、その表は、参照によってその全体を本明細書に組み入れる。参照によってその全体を本明細書に組み入れる、Hintonら、U S 7, 217, 797、U S 7, 361, 740、U S 7, 365, 168 および U S 7, 217, 798 も参照されたい。さらに他の態様では、抗 G P V 抗体は、例えば、U S 2007/0280931 に記載されているように、その超可変領域の1つまたはそれ以上の中に入れた1つまたはそれ以上アミノ酸を有する。

40

【0041】

抗体コンジュゲート

いくつかの実施形態では、抗 G P V 抗体は、例えば、共有結合が G P V への結合を妨げ

50

ないように、抗体への任意のタイプの分子の共有結合によって修飾された抗体コンジュゲートである。エフェクター部分を抗体にコンジュゲートする技法は当技術分野で周知である（例えば、Hellstromら、Controlled Drug Delivery、第2版、623～53（Robinsonら編、1987）；Thorpeら、Immunol Rev. 1982; 62: 119～58およびDubowchikら、Pharmacology and Therapeutics 1999; 83: 67～123を参照されたい）。

【0042】

一例を挙げれば、抗体またはその断片は、別のタンパク質（またはその部分；好ましくはタンパク質の少なくとも10、20または50アミノ酸部分）のアミノ酸配列に場合によりN末端またはC末端で、共有結合（例えば、ペプチド結合）を介して融合している。好ましくは、抗体またはその断片は、抗体の定常ドメインのN末端で他のタンパク質に連結している。例えば、WO 86/01533およびEP 0392745に記載されているように、組換えDNA手順を使用して、そのような融合体を生成することができる。別の例では、エフェクター分子はin vivoで半減期を増大させることができる。このタイプの適切なエフェクター分子の例としては、ポリマー、アルブミン、アルブミン結合タンパク質またはアルブミン結合化合物、例えば、WO 2005/117984に記載されているものが挙げられる。

【0043】

いくつかの実施形態では、抗GPV抗体はポリ（エチレングリコール）（PEG）部分と結合していてもよい。例えば、抗体が抗体断片である場合、抗体断片にある任意の利用可能なアミノ酸側鎖または末端アミノ酸官能基、例えば、任意の遊離アミノ基、イミノ基、チオール基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基を介して、PEG部分を結合させることができる。そのようなアミノ酸は、抗体断片中に天然に存在し得るか、組換えDNA法を使用して断片中に作り出すことができる。例えば、USS 219, 996を参照されたい。複数の部位を使用して、2つ以上のPEG分子を結合させることができる。好ましくは、PEG部分は、抗体断片にある少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して共有結合している。結合点としてチオール基が使用される場合、適切に活性化されたエフェクター部分、例えばチオール選択的誘導体、例えば、マレイミドおよびシステイン誘導体を使用することができる。

【0044】

別の例では、抗GPV抗体コンジュゲートは、例えば、EP 0948544に開示されている方法に従って、PEG化された、すなわち、共有結合したPEG（ポリ（エチレングリコール））を有する、修飾Fab'断片である。Poly(ethylene glycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications、（J. Milton Harris（編）、Plenum Press、New York、1992）；Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications、（J. Milton HarrisおよびS. Zalipsky編、American Chemical Society、Washington D. C、1997）；ならびにBioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences、（M. AslamおよびA. Dent編、Grove Publishers、New York、1998）；ならびにChapman. Advanced Drug Delivery Reviews 2002; 54: 531～545も参照されたい。

【0045】

核酸

本発明の他の実施形態では、GPV阻害剤は核酸である。特定の実施形態では、核酸は、GPV mRNAの発現を弱めることができる。例えば、siRNAまたはshRNAを使用することによるRNA干渉によって、GPVの発現を阻害するまたは低減させるま

10

20

30

40

50

たは無効にすることができる。別の可能性は、アンチセンス核酸、例えば、アンチセンスRNAの使用である。

【0046】

本明細書で使用する場合、語句「mRNAの発現を弱める」は、ある量の干渉RNA(例えば、siRNA)を投与して、または発現させて、mRNAの切断または翻訳の直接的阻害のいずれかを介して、タンパク質への標的mRNAの翻訳を低減させることを意味する。標的mRNAまたは対応するタンパク質の発現の低減は、一般に「ノックダウン」と呼ばれ、非標的対照RNA(例えば、非標的対照siRNA)の投与または発現の後に存在するレベルと比べて報告される。50%以上~100%以下の間の量の発現のノックダウンが本明細書の実施形態で意図される。しかし、本発明の目的のために、そのようなノックダウンレベルが達成される必要はない。ノックダウンは、一般に、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)増幅を使用して、mRNAレベルを測定することによって、またはウェスタンプロット法もしくは酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によりタンパク質レベルを測定することによって、評価される。タンパク質レベルの解析によって、mRNAの切断と翻訳阻害の両方が評価される。ノックダウンを測定するためのさらなる技法としては、RNA溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼプロテクション、ノーザンハイブリダイゼーション、マイクロアレイを用いる遺伝子発現のモニタリング、抗体結合、ラジオイムノアッセイおよび蛍光活性化細胞解析が挙げられる。10

【0047】

GPV mRNAの発現阻害は、例えば、GPV干渉RNAのトランスフェクション後のヒト細胞において、GPV mRNAレベルまたはGPVタンパク質レベルを評価することによって、in vitroで決定することもできる。20

【0048】

本発明の一実施形態では、干渉RNA(例えば、siRNA)は、センス鎖およびアンチセンス鎖を有し、センス鎖およびアンチセンス鎖は、少なくとも19ヌクレオチドの少なくともほぼ完全な連続的な相補性の領域を含む。本発明のさらなる実施形態では、干渉RNA(例えば、siRNA)はセンス鎖およびアンチセンス鎖を有し、それぞれ、アンチセンス鎖は、GPV mRNAの標的配列に対して、少なくとも19ヌクレオチドの少なくともほぼ完全な連続的な相補性の領域を含み、センス鎖は、GPV mRNAの標的配列と、少なくとも19ヌクレオチドの少なくともほぼ完全な連続的な同一性の領域を含む。本発明のさらなる実施形態では、干渉RNAは、mRNA内の対応する標的配列の3'末端の最後から2番目のそれぞれ13、14、15、16、17または18ヌクレオチドに対して、配列相補性パーセンテージを有するか、または配列同一性パーセンテージを有する、少なくとも13、14、15、16、17または18個の連続的なヌクレオチドの領域を含む。30

【0049】

干渉RNAの各鎖の長さは19~49ヌクレオチドを含み、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48または49ヌクレオチドの長さを含むことができる。siRNAのアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖がRISCに組み込まれ、それによって、RISCが、切断または翻訳抑制のために、アンチセンスsiRNA鎖に対して少なくとも部分的に相補的な標的mRNAを特定することが可能になるという点において、siRNAの活性なガイド因子である。本発明の実施形態では、GPV mRNA配列内の干渉RNA標的配列(例えば、siRNA標的配列)は、利用可能な設計ツールを使用して選択される。次いで、GPV標的配列に対応する干渉RNAを、標的mRNAを発現する細胞のトランスフェクションによって試験し、次いで、上記のようにノックダウンの評価を行う。siRNAに対する標的配列を選択する技法は、「siRNA Design: Methods and Protocols」、Debra J. Taxman編、2012 (ISBN-13: 9781627031189) 中に提供される。40

【0050】

第2の特定の実施形態では、核酸はヒトG P Vの細胞外ドメインに結合することができる。この実施形態によれば、核酸は好ましくはアプタマーである。アプタマーは、「*De novo Molecular Design*」、2013、*Gisbert Schneider*編、第21章 (ISBN-13: 9783527677030)；または「*The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*」、2006、*Sven Klussmann*編 (ISBN-13: 9783527607914) に記載されているように設計することができる。

10

【0051】

出血状態

本明細書に記載の阻害剤は、好ましくは、出血状態の処置または予防で使用される。出血状態は過度の出血を特徴とする。過度の出血は、様々な原因を有し得る。

【0052】

一実施形態では、出血状態は血小板障害によって引き起こされる。

【0053】

血小板障害は、例えば血小板減少症の場合には、血小板数の減少を特徴とし得る。特定の血小板減少症としては、限定されないが、特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、（例えば、ヘパリン、トリメトプリム／スルファメトキサゾールによる）免疫媒介性血小板破壊が原因の薬物誘発性血小板減少症、（例えば、化学療法剤による）用量依存的骨髄抑制が原因の薬物誘発性血小板減少症、全身感染症に付随する血小板減少症、化学療法に起因する血小板減少症、妊娠性血小板減少症および免疫性血小板減少症 (ITP、以前は、免疫性血小板減少性紫斑病と呼ばれた) が挙げられる。

20

【0054】

血小板障害は、例えば、血小板受容体またはシグナリング分子の欠如が原因の不完全な血小板シグナリングの場合には、血小板の機能障害を特徴とし得る。

【0055】

好ましい実施形態では、出血状態は、炎症性出血、出血性卒中、敗血症が原因の過度の出血、血小板減少が原因の過度の出血、播種性血管内凝固 (DIC) が原因の過度の出血、化学療法が原因の過度の出血、溶血性尿毒症症候群が原因の過度の出血およびHIV感染症が原因の過度の出血からなる群から選択される。

30

【0056】

特定の実施形態では、本発明は、可溶性G P Vの投与に対する解毒薬としての、本明細書に記載の阻害剤の使用に関する。

【0057】

医薬組成物および処置

疾患の処置は、任意の臨床病期もしくは臨床徵候において任意の形態の疾患を有すると既に診断された患者の処置；疾患の症状もしくは症候の発症もしくは進展 (evolution) もしくは増悪もしくは悪化の遅延；ならびに／または疾患の予防および／もしくは疾患の重症度の低減を包含する。

40

【0058】

G P V阻害剤、例えば抗G P V抗体が投与される「対象」または「患者」は、哺乳動物、例えば、非靈長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）または靈長類（例えば、サルもしくはヒト）でもよい。ある種の態様では、ヒトは小児患者である。他の態様では、ヒトは成人患者である。

【0059】

G P V阻害剤、および場合により1つまたはそれ以上のさらなる治療剤、例えば、以下に記載の第2の治療剤を含む組成物が本明細書に記載される。組成物は、典型的には、医薬的に許容可能な担体を含む無菌の医薬組成物の一部として供給される。この組成物は、任意の適切な形態で存在することができる（それを患者に投与する所望の方法に依存する

50

)。

【0060】

G P V 阻害剤、例えば抗 G P V 抗体は、例えば、経口的、経皮的、皮下、鼻腔内、静脈内、筋肉内、髄腔内、局所的または局部的な様々な経路によって、患者に投与することができる。任意の所与のケースにおける投与に最も適した経路は、特定の抗体、対象ならびに疾患の性質および重症度ならびに対象の健康状態に依存する。典型的には、G P V 阻害剤、例えば抗 G P V 抗体は静脈内に投与される。

【0061】

本発明の別の態様は、本発明の抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬組成物である。抗体またはその抗原結合性断片は、医薬組成物を調製するための既知の方法に従って製剤化することができる。例えば、抗体またはその抗原結合性断片を、1つまたはそれ以上の医薬的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤と混合することができる。例えば、滅菌水または生理食塩水を使用することができる。pH緩衝溶液、粘性低減剤または安定化剤などの他の物質も含めることができる。

10

【0062】

多種多様な医薬的に許容可能な賦形剤および担体が当技術分野で既知である。そのような医薬担体および賦形剤ならびに適切な医薬製剤は、様々な刊行物に十分に記載されている（例えば、「Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins」、Frøkjaerら、Taylor & Francis (2000)、または「Handbook of Pharmaceutical Excipients」、第3版、Kibbeら、Pharmaceutical Press (2000) A. Gennaro (2000) 「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」、第20版、Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Anselら編、第7版、Lippincott, Williams, & Wilkins; およびHandbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbeら編、第3版、Pharmaceutical Assocを参照されたい）。特に、本発明の抗体を含む医薬組成物は、凍結乾燥形態または安定な可溶性形態で製剤化することができる。当技術分野で既知の様々な手順によって、ポリペプチドを凍結乾燥することができる。凍結乾燥製剤は、1つまたはそれ以上の医薬的に許容可能な希釈剤、例えば、無菌注射用水または無菌生理的食塩水を加えることによって、使用前に再構成される。

20

30

【0063】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で周知である、投薬量および技法によって投与することができる。投与の量およびタイミングは、所望の目的を達成するように、処置する医師または獣医師によって決定される。投与経路は、安全かつ治療的に有効な量を処置される対象の血液に送達するいかなる経路を介してもよい。あり得る投与経路としては、全身的経路、局所的経路、経腸経路および非経口経路、例えば、静脈内、動脈内、皮下、皮内、腹腔内、経口、経粘膜的、硬膜外または髄腔内が挙げられる。好ましい経路は、静脈内または皮下である。

40

【0064】

有効投薬量および投与経路は、対象の年齢および体重などの要因によって、ならびに抗体またはその抗原結合性断片の性質および治療域によって、決定される。投薬量の決定は、既知の方法によって決定され、過度の実験を必要としない。

【0065】

治療有効量は、処置を必要とする患者または対象において正の治療効果をもたらす、本発明の抗体またはその抗原結合性断片の用量である。治療有効量は、約0.01～50mg/kg、約0.01～30mg/kg、約0.1～30mg/kg、約0.1～10mg/kg、約0.1～5mg/kg、約1～5mg/kg、約0.1～2mg/kgまた

50

は約 0.1 ~ 1 mg / kg の範囲である。処置は、単回（例えば、ボーラス）用量または複数回用量を与えることを含むことができる。あるいは、継続投与が可能である。複数回用量が必要とされる場合、これは、毎日、隔日、毎週、隔週、毎月もしくは隔月または必要に応じて、投与することができる。抗体またはその抗原結合性断片を緩徐にかつ継続的に放出する貯蔵場所（depository）を使用することもできる。治療有効量は、対象において G P V を少なくとも 50%、好ましくは、少なくとも 60%、70%、80%、90%、より好ましくは、少なくとも 95%、99% またはさらに 100% 阻害する用量でもよい。

【0066】

抗体は、水性液剤として製剤化することができる。

10

【0067】

医薬組成物は、好都合には、用量あたり所定量の G P V 阻害剤、例えば抗 G P V 抗体を含む単位用量形態で提供される。そのような単位は、0.5 mg ~ 5 g、例えば、限定はされないが、1 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、750 mg、1000 mg または前述の値の任意の 2 つの間の任意の範囲、例えば、10 mg ~ 1000 mg、20 mg ~ 50 mg もしくは 30 mg ~ 300 mg を含むことができる。医薬的に許容可能な担体は、例えば、処置すべき状態または投与経路に応じて、多種多様な形態をとることができる。

【0068】

G P V 阻害剤、例えば抗 G P V 抗体を用いる、有効投薬量、投与の総回数および処置の長さの決定は、十分に当業者の能力内であり、標準的な用量漸増研究を使用して、決定することができる。

20

【0069】

本明細書に記載の方法において適切な、G P V 阻害剤、例えば抗 G P V 抗体の治療製剤は、所望の程度の純度を有する阻害剤、例えば抗体を、当技術分野で典型的に用いられる随意の医薬的に許容可能な担体、賦形剤または安定化剤（これらすべてを本明細書では「担体」と呼ぶ）、すなわち、緩衝剤、安定化剤、防腐剤、等張化剤、非イオン性界面活性剤、抗酸化剤および種々の他の添加剤と混合することによって、凍結乾燥製剤または水性液剤として貯蔵用に調製することができる。Remington's Pharmaceutical Sciences、第 16 版（Osolら、1980）を参照されたい。そのような添加剤は、用いられる投薬量および濃度において受容者に対して無毒でなければならない。

30

【0070】

緩衝剤は、生理的条件に近い範囲内に pH を維持するのに役立つ。これは、約 2 mM ~ 約 50 mM に及ぶ濃度で存在し得る。適切な緩衝剤としては、有機酸および無機酸の両方ならびにそれらの塩、例えば、クエン酸緩衝液（例えば、クエン酸一ナトリウム - クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸一ナトリウム混合物など）、コハク酸緩衝液（例えば、コハク酸 - コハク酸一ナトリウム混合物、コハク酸 - 水酸化ナトリウム混合物、コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸緩衝液（例えば、酒石酸 - 酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸 - 酒石酸カリウム混合物、酒石酸 - 水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸緩衝液（例えば、フマル酸フマル酸一ナトリウム混合物、フマル酸 - フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸一ナトリウム - フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸緩衝液（例えば、グルコン酸 - グルコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸 - 水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸 - グルコン酸カリウム混合物など）、シウ酸緩衝液（例えば、シウ酸 - シウ酸ナトリウム混合物、シウ酸 - 水酸化ナトリウム混合物、シウ酸 - シウ酸カリウム混合物など）、乳酸緩衝液（例えば、乳酸 - 乳酸ナトリウム混合物、乳酸 - 水酸化ナトリウム混合物、乳酸 - 乳酸カリウム混合物など）および酢酸緩衝液（例えば、酢酸 - 酢酸ナトリウム混合物、酢酸 - 水酸化ナトリウム混合物）が挙げられる。さらに、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液およ

40

50

びトリメチルアミン塩、例えばTri sを使用することができる。

【0071】

微生物の増殖を妨げるために防腐剤を加えることができ、0.2%~1% (w/v) に及ぶ量でこれを加えることができる。適切な防腐剤としては、フェノール、ベンジルアルコール、メタ-クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ベンザルコニウムハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物およびヨウ化物）、塩化ヘキサメトニウムならびにアルキルパラベン、例えば、メチルパラベンまたはプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサンノールおよび3-ペンタノールが挙げられる。液体組成物の等張性を確実にするために、「安定化剤」として知られることがある等張化剤を加えることができ、等張化剤としては、多価糖アルコール、好ましくは、三価または高級糖アルコール、例えば、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトールが挙げられる。安定化剤は、機能が充填剤から添加剤におよび、治療剤を可溶化する、または変性もしくは容器の壁への接着を防止するのに役立つ、賦形剤の広範なカテゴリーを指す。典型的な安定化剤は、（上記に列挙した）多価糖アルコール；アミノ酸、例えば、アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなど、有機糖または糖アルコール、例えば、ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイノシトール、ガラクチトール、グリセロールグリセリンなど（シクリトール、例えば、イノシトールを含める）；ポリエチレングリコール；アミノ酸ポリマー；含硫還元剤、例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロールグリセリン、-モノチオグリセロールグリセリンおよびチオ硫酸ナトリウム；低分子量ポリペプチド（例えば、10残基以下のペプチド）；タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、単糖類、例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース；二糖類、例えば、ラクトース、マルトース、ショ糖および三糖、例えば、ラフィノース；ならびに多糖、例えばデキストランでもよい。安定化剤は、活性タンパク質重量部あたり0.1~10,000重量の範囲内に存在し得る。

【0072】

治療剤の可溶化を助長する、および治療用タンパク質を搅拌誘導性凝集から保護するために、非イオン性表面活性剤または界面活性剤（「湿潤剤」としても知られる）を加えることができ、これはまた、タンパク質を変性させることなく、応力が加えられた剪断表面に製剤を曝露することを可能にする。適切な非イオン性表面活性剤としては、ポリソルベート（20、80など）、ポロキサマー（184、188など）、ブルロニックポリオール、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル（TWEEN（登録商標）-20、TWEEN（登録商標）-80など）が挙げられる。非イオン性表面活性剤は、約0.05mg/ml~約1.0mg/mlの範囲内または約0.07mg/ml~約0.2mg/mlの範囲内に存在し得る。

【0073】

さらなる種々の賦形剤としては、充填剤（例えばデンプン）、キレート剤（例えばEDTA）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE）および共溶媒が挙げられる。

【0074】

本明細書の製剤は、G P V阻害剤、例えば抗G P V抗体に加えて、第2の治療剤を含むこともできる。適切な第2の治療剤の例を以下に提供する。

【0075】

投薬スケジュールは、疾患のタイプ、疾患の重症度およびG P V阻害剤、例えば抗G P V抗体に対する患者の感受性を含めたいくつかの臨床的要因に応じて、月1回から毎日まで変動し得る。特定の実施形態では、G P V阻害剤、例えば抗G P V抗体は、毎日、週2

10

20

30

40

50

回、週3回、5日ごと、10日ごと、2週ごと、3週ごと、4週ごともしくは月1回、または前述の値の任意の2つの間の任意の範囲、例えば、4日ごとから毎月、10日ごとから2週ごと、もしくは週2回から週3回などで投与される。投与されるG P V阻害剤、例えば抗G P V抗体の投薬量は、特定の抗体、対象ならびに疾患の性質および重症度、対象の健康状態、治療レジメン（例えば、第2の治療剤が使用されるかどうか）、ならびに選択される投与経路に従って変動し；当業者が適切な投薬量を容易に決定することができる。

【0076】

G P V阻害剤、例えば抗G P V抗体の最適な量およびそれぞれの投薬の間隔は、処置される状態の性質および程度、投与の形態、経路および部位、ならびに処置を受ける特定の対象の年齢および状態によって決定されること、ならびに医師が使用される適切な投薬量を最終的に決定することが、当業者に認識されるであろう。この投薬量は、適切な頻度で繰り返すことができる。副作用が発生する場合、通常の臨床診療に基づいて、投薬の量および／または頻度を変えるまたは低減させることができる。

10

【0077】

併用療法

好ましくは、G P V阻害剤、例えば抗G P V抗体で処置を受ける患者は、従来の血液凝固剤でも処置される。例えば、過度の出血を罹患する患者は、典型的には、抗線溶剤、血小板濃縮物、凝固因子濃縮物および／または新鮮な凍結血漿でも処置される。

20

【0078】

本発明のさらに別の態様は、止血を促進するための、上記で定義した阻害剤（好ましくは抗体）の使用である。

【0079】

本発明のさらに別の態様は、過度の出血を罹患する患者における出血時間の低減で使用するための、上記で定義した化合物（好ましくは抗体）である。

【0080】

本発明は、有効量の、上記で定義した阻害剤（好ましくは抗体）を対象に投与することを含む、出血時間を低減させる方法にさらに関する。

30

【0081】

本発明のさらなる態様は、有効量の、上記で定義した阻害剤（好ましくは抗体）を、それを必要とする患者に投与することを含む、出血状態を処置する方法である。出血状態は、好ましくは上記の状態のうちの1つである。

【0082】

本発明のさらなる態様は、有効量の、上記で定義した阻害剤（好ましくは抗体）を、それを必要とする患者に投与することを含む、出血状態を予防する方法である。出血状態は、好ましくは上記の状態のうちの1つである。

【0083】

スクレオチドおよびアミノ酸配列の概説：

【表3】

配列番号	説明
1	ヒト GPV をコードする核酸配列
2	配列番号 1 にコードされるアミノ酸配列、すなわちシグナルペプチドを含むヒト GPV
3	シグナルペプチドを欠くヒト GPV のアミノ酸配列
4	マウス GPV をコードする核酸配列
5	配列番号 4 にコードされるアミノ酸配列、すなわちシグナルペプチドを含むマウス GPV
6	シグナルペプチドを欠くマウス GPV のアミノ酸配列

10

【実施例】

【0084】

20

結果

89F12は、モノクローナルラット抗マウスGPV抗体である。これは、不死化したAG14骨髄腫細胞およびマウス血小板で免疫化したラットの脾臓細胞の融合によって生成した。89F12は野生型に結合するが、GPV欠損マウスの血小板には結合せず（図1A）、89F12は受容体のトロンビン切断の際に形成される可溶性GPVに結合する（図1B）。さらに、89F12は、マウスGPVの組換えで発現させた細胞外ドメインに結合する（図1B）。

【0085】

30

in vivoでは、89F12-IgGまたは89F12-Fab断片は、血小板数に影響がなく、GPVのトロンビン媒介性切断に影響しない（図2およびデータ非表示）。さらに、89F12は、フローサイトメトリー（図2D）、凝集測定法または流動接着アッセイ（flow adhesion assay）（非表示）によって評価した場合に、in vitroで血小板活性化に影響を及ぼさない。注目すべきことは、これは、コラーゲン誘導性凝集を遅らせないので、GPVのコラーゲン結合部位に干渉せず（図3）、GPVのコラーゲン結合部位を遮断する抗GPV抗体である89H11と対照的である。

【0086】

40

止血および血栓形成に対する抗GPV抗体の効果をin vivoで試験した。WTマウスにおける89F12 100 μgの静脈内注射は、尾の出血時間アッセイにおいて、血液喪失の停止に対する時間を加速した。それぞれJAQ1注射およびINU1注射によるGPVIおよびCLEC-2の同時枯渇は、14匹のマウスのうちの5匹が20分の観察期間内に出血を止めることができなかったので、明白な止血異常をもたらした。89F12によるGPVの細胞外ドメインの遮断は、GPVI / CLEC-2二重枯渇マウスの止血異常を補うことができ、89F12処置WTマウスに匹敵する、これらのマウスにおける尾の出血時間をもたらした。これは、89F12が、GPVI / CLEC-2二重枯渇マウスにおいて止血を回復させることができることを意味する。それによって、89F12は、GPVIおよびCLEC-2の非存在下で、止血性合併症を予防する（図4）。受容体の二量体化または抗体のFc部分が血栓形成に対するその作用に必要とされるかどうかを試験するために、GPVI枯渇化2-欠損（Intgα2^{-/-}）マウスをビヒクルまたは89F12-Fab断片で処置した。ビヒクル処置GPVI枯渇化Intgα2^{-/-}マウスは20分を超えて出血したが、89F12-Fab断片は、これらのマウスの止血機能を回復させた（図5）。

50

【0087】

G P V 遮断は止血を促進するので、89F12処置マウスにおいて血栓形成も研究した。89F12処置マウスは、*in vivo*で血栓形成に対する時間の加速を示した。J A Q 1 を使用してコラーゲン受容体 G P V I を活性化する主要な血小板の枯渇はW T マウスで血栓形成時間を遅らせ、13の血管うちの6個しか観察期間内に閉塞しなかった。G P V I の非存在下でさえ、G P V の89F12媒介性遮断は、血栓形成の早期開始をもたらし（データ非表示）、最終的に、未処置W T 対照と比較した場合でさえも、より速い血管閉塞に至った（P < 0.001、図6）。G P V の89F12媒介性遮断は、*in vivo*の血栓形成および止血において、G P V I の欠如を十分に補うことができた。

10

【0088】

G P V 遮断が（hem）I T A M 受容体 G P V I およびC L E C - 2 の欠如の埋め合わせをすることことができたという事実は、G P V が血小板活性化の一般的な負の制御因子として働くことを示唆する。したがってG P V 遮断が他の重要なシグナリング分子の欠如を補うことができるかどうかを調べた。

【0089】

血管壁損傷時の血小板活性化は、円盤状から球状の血小板形状への転換に、顆粒の分泌および拡散に極めて重要である、細胞骨格再配列をもたらす。低分子量G T P a s e のR h o ファミリー、例えばR h o A は、これらのプロセスの多くに関与すると考えられる。R h o A は、ストレスファイバーの形成を介するアクチン細胞骨格の組織化、アクトミオシンの収縮性の調節および微小管動態の調節において中心的役割を果たす（B u s t e l o X R ら、B i o E s s a y s . 2 0 0 7 ; 2 9 : 3 5 6 ~ 7 0 ）。さらに、R h o A は、G q - およびG 1 3 - 結合アゴニスト受容体の下流の様々な細胞プロセスに関与する（P l e i n e s I ら、B l o o d . 2 0 1 2 ; 1 1 9 : 1 0 5 4 ~ 6 3 ）。

20

【0090】

巨核球および血小板特異的R h o A 欠損マウスは、血小板数の50%の減少をともなう、明白な巨大血小板性血小板減少症を示した（P l e i n e s I ら、B l o o d . 2 0 1 2 ; 1 1 9 : 1 0 5 4 ~ 6 3 ）。R h o A の欠如は、尾の出血時間を延ばした（W T マウスの430 ± 267秒と比較して720 ± 321秒）。これに対して、R h o A 欠損マウスの89F12処置は、R h o A f l / f l , P F 4 - c r e マウスの止血異常をレスキューすることができ、W T マウスと比較して尾の出血時間を短縮した（89F12処置R h o A 欠損マウスについて286 ± 118秒、R h o A - 欠損マウスと比較してP < 0.01、図7）。これによって、抗体媒介性G P V 遮断が重要な下流シグナリング分子の欠如も補うことができることが示された。

30

【0091】

血小板減少は、出血の重大な危険因子である。これらの条件下でG P V 遮断の役割を評価するために、免疫エフェクター機構から独立して、マウスにおいて循環血小板を枯渇させる2つのモノクローナル抗G P I b 抗体（N i e s w a n d t B ら、B l o o d . 2 0 0 0 ; 9 6 : 2 5 2 0 ~ 7 ; B e r g m e i e r W ら、B l o o d . 2 0 0 0 ; 9 5 : 8 8 6 ~ 9 3 ）を注射することによって、血小板減少をマウスで誘導した。最初の血小板数を各マウスについて上記のように評価し、100%とみなした。その後の数を抗体の注射から1時間後に評価し、最初の値に対して標準化した。血小板数が正常の15%未満に減少した野生型マウスは、出血時間の延長を示すか、20分の観察期間内に出血を止めることができなかった。これに対して、正常の5%までの血小板数の減少は、正常な血小板数を有する89F12処置マウスと比較して尾の出血時間を変化させなかつたが、血小板枯渇化W T マウスと比較した場合に、有意に短縮された尾の出血時間を示し、これによって、G P V の遮断が正常な止血を維持するために必要とされる血小板数を下げる事が示された（非表示）。

40

【0092】

材料および方法

マウス

50

C57BL/6JRj (Janvier Labs) を野生型対照マウスとして使用した。GPV (Gp5^{-/-})、2-インテグリンサブユニット (Itgα2^{-/-}) を欠くマウスは、以前に記載されている (Kahn Mら、Blood 1999; 94: 4112~21、Holtkotter O.ら、J Biol Chem. 2002; 277(13): 10789~94)。巨核球 / 血小板においてRhoAを欠くマウス (RhoA^{f1/f1, Ptf4-cre+/-}) は以前に記載されている (Pleines I.ら、Blood 2012; 119: 1054~63)。GPVIは、抗GPVI抗体 100 μg、JAQ1 (Nieswandt Bら、J Exp Med. 2001; 193: 459~69.) を実験の6日前にi.p. 注射することによって枯渇させた。CLEC-2は、INU1 200 μg ((May Fら、Blood. 2009; 114: 3464~72); 抗CLEC-2抗体) のi.p. 注射によって枯渇させた。GPV遮断は、50 μgの89F12-IgGまたはFab断片を実験の30分から12時間前に注射することによって達成した。動物研究は、Lower Franconia (Bezirksregierung Unterfranken) の行政区政府によって承認された。
10

【0093】

モノクローナル抗体

抗GPV抗体の生成

6~8週齢の雌のウィスターラットをマウス血小板で繰り返し免疫化した。次いで、ラットの脾臓細胞をマウス骨髄腫細胞 (AG14.653) と融合し、HAT培地中でハイブリドーマを選択した。血小板表面抗原に対するモノクローナル抗体 (mAb) を分泌するハイブリドーマをフローサイトメトリーによって特定した (以下を参照されたい)。Gp5^{-/-}血小板を対照として使用して、GPVに対する抗体特異性を試験した。陽性のハイブリドーマを2回サブクローニングしてから、大規模に生成した。
20

【0094】

使用するさらなる抗体を以下の表に概説する。

【0095】

【表4】

抗体	内部名	抗原	記載文献
INU1	11E9	CLEC-2	[7]
JAQ1	98A3	GPVI	[31]
p0p/B	57E12	GPIb	[33]
JON/A	4H5	GPIIb/IIIa	Bergmeier ら、Cytometry 2002

30

【0096】

緩衝液および培地

すべての緩衝液は、再蒸留水を用いて調製した。

リン酸緩衝食塩水 (PBS)、pH 7.14

40

【表5】

NaCl	137mM
KCl	2.7mM
KH ₂ PO ₄	1.5mM
Na ₂ HPO ₄	8mM

【0097】

in vitroでの血小板解析

50

血小板の調製および洗浄

イソフルラン麻酔下で後眼窩叢からマウスを出血させた。300 μl のヘパリンを入れたTBS (20U/ml、pH 7.3) を含む1.5ml の反応チューブに700 μl の血液を採取した。800 rpm (52g; Eppendorf遠心分離機5415C) で5分間、室温で血液を遠心分離した。上清およびバフィーコートを新しいチューブに移し、800 rpm で6分間、室温で遠心分離して、多血小板血漿 (PRP) を得た。洗浄した血小板を調製するために、プロスタサイクリン (PGI₂) (0.1 μg/ml) の存在下で、2800 rpm (639g) で5分間、室温でPRPを遠心分離し、PGI₂ (0.1 μg/ml) およびアピラーゼ (0.02U/ml) を含むCa²⁺フリータイロード緩衝液1ml にペレットを再懸濁した。10分間37℃でインキュベートした後、2800 rpm で5分間サンプルを遠心分離した。1ml のCa²⁺フリータイロード緩衝液に血小板をもう一度再懸濁してから、1:10希釈の血小板溶液を利用し、Sysmexカウンターで血小板数を測定して、血小板レベルを決定した（以下を参照されたい）。ペレットを、500,000血小板/μlを得るのに必要とする容積のアピラーゼ (0.02U/ml) 含有タイロード緩衝液に再懸濁し、少なくとも30分間37℃でインキュベートしたままにしてから、解析した。血小板の数およびサイズの決定については、ヘパリン添加したマイクロキャビラリーを使用して、麻酔をかけたマウスの後眼窩叢から50 μl の血液を取り出し、300 μl のヘパリンを入れたTBS (20U/ml、pH 7.3) を含む1.5ml の反応チューブに採取した。ヘパリン添加血をPBSで希釈し、Sysmex KX-21N自動血液アナライザー (Sysmex Corp., Kobe, Japan) を使用して、血小板の数およびサイズを決定した。

【0098】

フローサイトメトリー

糖タンパク質の発現レベルを決定するために、飽和量の、フルオロフォアをコンジュゲートした上記の抗体で血小板 (1 * 10⁶) を10分間室温で染色し、500 μl のPBSを加えた直後に解析した。500 μl のPBSを加えることにより反応を止め、FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) でサンプルを解析した。血小板活性化研究については、JON/A-P-E および抗P-セレクチン - FITCの存在下で、洗浄した血液を指示アゴニストとともに15分間インキュベートした。

【0099】

ELISA

洗浄した血小板を上記のように調製し、0.1U/ml のトロンビンで15分間、37℃で刺激した。その後、血小板懸濁液を2800 rpm で5分間遠心分離し、上清を新しい反応チューブに移し、最大スピードで5分間再度遠心分離した。トロンビンで刺激した血小板の上清100 μl を、前もって89H11（抗GPV抗体）30 μg でコーティングし、5%BSA/PBSでブロッキングした96ウェルプレートに移した。1時間インキュベートしてから、96ウェルプレートを洗浄し、第2の抗GPV抗体であるHRP標識化89F12とともにインキュベートして、切断されたGPVを検出した。TMBを使用してHRP基質を発色させ、H₂SO₄で反応を止め、405 nmにおいてELISAリーダーで進行させた。

【0100】

血小板凝集

50 μl の洗浄した血小板 (0.5 × 10⁶ 血小板/μl の濃度) またはヘパリン添加PRPを、タイロード緩衝液110 μl (2 mM のCaCl₂ および100 μg/ml のヒトフィブリノーゲンを有する) を含むキュベットに移した。凝集の測定のために、抗体を加えて10 μg/ml の終濃度にし、100倍濃縮されたアゴニストを加え、光透過を、Apact 4 - チャネルオプティカル凝集システム (APACT, Hamburg, Germany) で10分間にわたって記録した。アゴニストを加える前の各測定のキャリブレーションのために、タイロード緩衝液を100%凝集と設定し、洗浄した血小板懸

10

20

30

40

50

濁液または P R P を 0 % 凝集と設定した。

【 0 1 0 1 】

血小板機能の *in vivo* 解析

血小板の枯渇

各マウスについて、上記のように最初の血小板数を評価した。これらの値を 100 % とみなし、その後の数をこれらの値に対して標準化した。マウス 1 gあたり 0.2 μg 抗 G P I b 抗体をマウスに静脈内注射して、Fc 非依存的血小板減少を誘導した。実験の 1 時間前にマウスを注射して、5 ~ 10 % の残存血小板数を達成して、Fc R 非依存的血小板減少を誘導した。注射してから 1 時間後に、血小板数を再び評価した。

【 0 1 0 2 】

腹部大動脈の機械的損傷

麻酔をかけたマウス (10 ~ 16 週齢) の腹腔を切開するために、縦断正中切開 (longitudinal midline incision) を行い、腹部大動脈を露出させた。ドップラー超音波フロープローブ (Transonic Systems, Maastricht, Netherlands) を大動脈の周囲に設置し、フロープローブの上流の鉗子の単回の力強い加圧 (15 秒) による機械的損傷によって、血栓形成を誘導した。完全な閉塞が起こるまで、または 30 分が経過するまで、血流をモニターした。

【 0 1 0 3 】

出血時間アッセイ

三倍麻酔 (triple anesthesia) の腹腔内注射によってマウスに麻酔をかけ、尾端の 2 mm のセグメントをメスで除去した。創傷部位に直接的に接触することなく、20 秒間隔で血液を濾紙で軽く吸収することによって、尾の出血をモニターした。濾紙上に血液が観察されなくなったときに、出血が終わったと決定した。焼灼によって、20 分後に手作業で実験を止めた。

【 0 1 0 4 】

統計解析

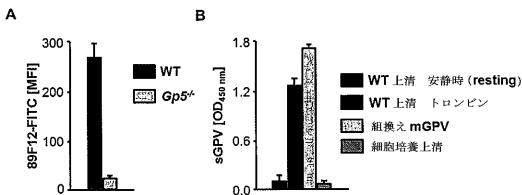
結果は、群当たり少なくとも 3 回の個々の実験からの平均 ± SD として示す。適用可能な場合、フィッシャーの正確確率検定 (Fisher's exact test) を統計解析に使用した。そうでなければ、ウェルチの t 検定を統計解析について行った。P 値 < 0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

10

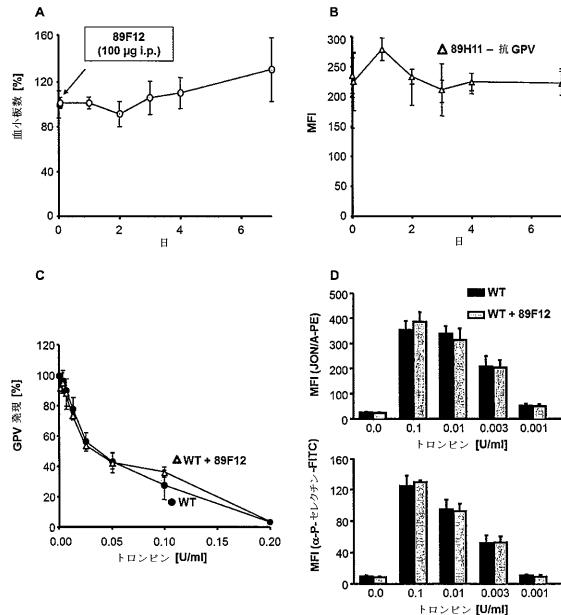
20

30

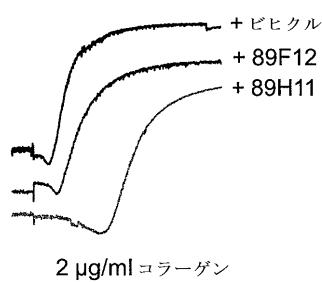
【図1】



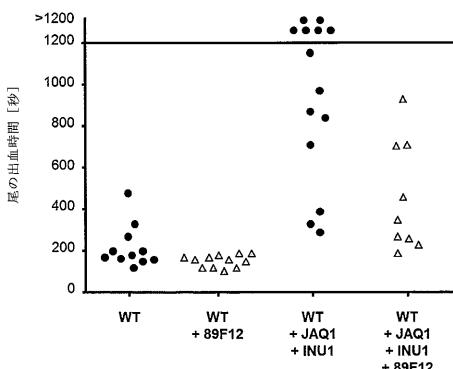
【図2】



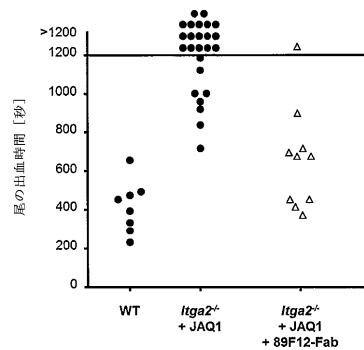
【図3】



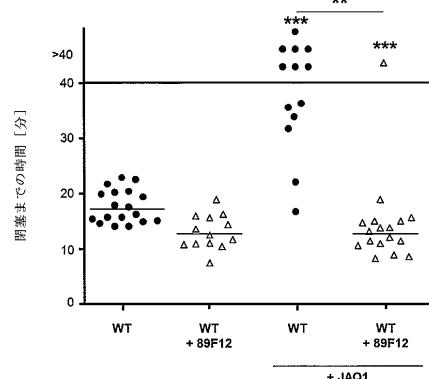
【図4】



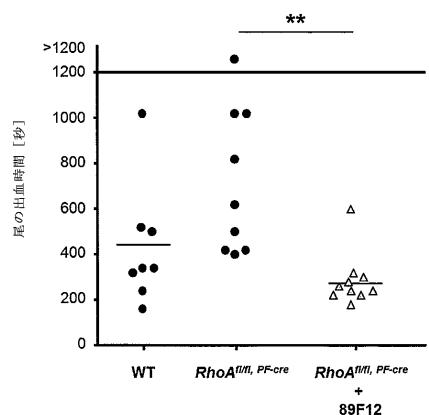
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

2019504031000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2016/082572						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/36 A61P7/04 A61K39/395 ADD.								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;"> H. NI ET AL: "Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V", BLOOD, vol. 98, no. 2, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 368-373, XP055254460, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood.V98.2.368 abstract figures ----- -/-/ </td> <td style="padding: 2px;">1-19</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	H. NI ET AL: "Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V", BLOOD, vol. 98, no. 2, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 368-373, XP055254460, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood.V98.2.368 abstract figures ----- -/-/	1-19
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
Y	H. NI ET AL: "Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V", BLOOD, vol. 98, no. 2, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 368-373, XP055254460, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood.V98.2.368 abstract figures ----- -/-/	1-19						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
Date of the actual completion of the international search 16 March 2017		Date of mailing of the international search report 11/04/2017						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bernhardt, Wiebke						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/082572

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RAMAKRISHNAN V ET AL: "INCREASED THROMBIN RESPONSIVENESS IN PLATELETS FROM MICE LACKING GLYCOPROTEIN V", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 96, no. 23, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 13336-13341, XP000869655, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.96.23.13336 abstract figures -----	1-19
X	S. MOOG: "Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation", BLOOD, vol. 98, no. 4, 15 August 2001 (2001-08-15), pages 1038-1046, XP055048230, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood.V98.4.1038 abstract pages 1038-139 figures -----	17
Y	AZORSA D O ET AL: "Measurement of GPV released by activated platelets using a sensitive immunocapture ELISA--its use to follow platelet storage in transfusion", THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, SCHATTAUER GMBH, DE, vol. 81, no. 1, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 131-138, XP002754916, ISSN: 0340-6245 abstract pages 132-133 -----	1-16,18, 19
X	LANZA F ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE GENE ENCODING THE HUMAN PLATELET GLYCOPROTEIN V", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 268, no. 28, 5 October 1993 (1993-10-05), pages 20801-20807, XP000867216, ISSN: 0021-9258 abstract figures, in particular figure 5 -----	17
Y		1-19
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/082572

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95/02054 A2 (COR THERAPEUTICS INC [US]) 19 January 1995 (1995-01-19) pages 3, 24-30 examples claims -----	1-19
A	NORIHIDE SATO ET AL: "Characterization of Monoclonal Antibodies Against Mouse and Rat Platelet Glycoprotein V (CD42d)", HYBRIDOMA, vol. 19, no. 6, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 455-461, XP055265469, US ISSN: 0272-457X, DOI: 10.1089/027245700750053940 abstract figures -----	1-19
A	KUNISHIMA SHINJI ET AL: "Further characterization of anti-platelet monoclonal antibody HPL5 as anti-glycoprotein V antibody", ACTA HAEMATOLOGICA, S. KARGER, BASEL, CH, vol. 115, no. 1-2, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 128-130, XP009189540, ISSN: 0001-5792 128-129 -----	1-19
A	KINCHINGTON P R ET AL: "THE GLYCOPROTEIN PRODUCTS OF VARICELLA-ZOSTER VIRUS GENE 14 AND THEIR DEFECTIVE ACCUMULATION IN A VACCINE STRAIN (OKA)", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 9, 1 July 1990 (1990-07-01), pages 4540-4548, XP009000474, ISSN: 0022-538X abstract -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/082572

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9502054	A2	19-01-1995	AU 7325794 A 06-02-1995
		CA 2166872 A1	19-01-1995
		EP 0707648 A1	24-04-1996
		JP H09500017 A	07-01-1997
		SG 70981 A1	21-03-2000
		WO 9502054 A2	19-01-1995

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	A
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
	A 6 1 K 31/7105	

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

(72)発明者 ダーヴィト・ステグナー

ドイツ連邦共和国 9 7 0 8 0 ウュルツブルグ . コップベルクヴェーク 1 8

F ターム(参考) 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA531 ZA532 ZC411 ZC412
 4C085 AA13 AA14 BB36 BB41 CC02 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 ZA53 ZC41
 4H045 AA11 AA30 DA76 EA24 FA74 GA26