

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-539694
(P2008-539694A)

(43) 公表日 平成20年11月20日(2008.11.20)

| | | |
|-------------------------------------|--------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 Z N A | 2 G O 4 5 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 B O 2 4 |
| C O 7 K 16/28 (2006.01) | C O 7 K 16/28 | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | 4 C O 8 5 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2007-549752 (P2007-549752)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月24日 (2006. 4. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月24日 (2007. 10. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/309066
 (87) 国際公開番号 W02006/115295
 (87) 国際公開日 平成18年11月2日 (2006. 11. 2)
 (31) 優先権主張番号 60/674, 287
 (32) 優先日 平成17年4月25日 (2005. 4. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

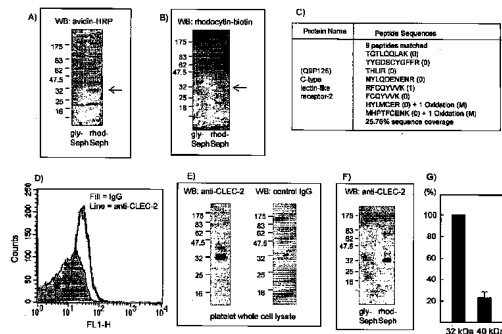
(71) 出願人 304023994
 国立大学法人山梨大学
 山梨県甲府市武田四丁目4番37号
 (74) 代理人 100104754
 弁理士 石川 英毅
 (74) 代理人 100119297
 弁理士 田中 正男
 (72) 発明者 尾崎 由基男
 山梨県中央市下河東1110 国立大学法人山梨大学内
 (72) 発明者 井上 克枝
 山梨県中央市下河東1110 国立大学法人山梨大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C L E C - 2 シグナル伝達により止血疾患を治療するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法において、C L E C - 2 発現細胞をテスト化合物に接触させるステップであって、自由選択でC L E C - 2 リガンドに、テスト化合物が存在しない場合にC L E C - 2 のC L E C - 2 リガンドへの結合を可能にする環境で接触させるステップと、コントロールと比較してC L E C - 2 活性の指標に増強あるいは減弱が確認されるか否かを検出するステップとを具備し、コントロールに対する指標の増強あるいは減弱によりテスト化合物が止血疾患の治療候補であることを示す方法である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法において、

C L E C - 2 を発現する細胞をテスト化合物に接触させるステップであって、自由選択で C L E C - 2 リガンドに、テスト化合物が存在しない場合に C L E C - 2 の C L E C - 2 リガンドへの結合を可能にする環境で接触させるステップと、

コントロールと比較して、前記化合物により C L E C - 2 機能の指標が増強されているか、または減弱されているかを検出するステップとを具備し、

コントロールに対する指標の増強あるいは減弱により、テスト化合物が止血調節の治療候補であることが示される方法。

10

【請求項 2】

前記指標が、a) 細胞活性、b) C L E C - 2 のチロシンリン酸化および c) プロテインキナーゼの S y k ファミリーのメンバーとの C L E C - 2 の相互作用からなる群から選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

細胞活性が細胞凝集や細胞形態の変化で示される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 C L E C - 2 リガンドが C L E C - 2 機能のアンタゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記 C L E C - 2 リガンドが C L E C - 2 機能のアゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 C L E C - 2 リガンドがロドサイチンである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 C L E C - 2 リガンドが抗体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞が血小板である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記指標の減弱が、前記テスト化合物が細胞凝集を減弱させる候補であることを示す、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記指標の減弱が、前記テスト化合物が血小板凝集を減弱させる候補であることを示す、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、

a) C L E C - 2 を発現する細胞をテスト化合物に接触させるステップと、

b) コントロールと比較して、C L E C - 2 機能の指標の変化を検出するステップとを具備する方法。

40

【請求項 12】

前記指標の増強が、前記テスト化合物が細胞凝集を増強させる候補であることを示す、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

止血を調節するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、

テスト化合物と C L E C - 2 リガンドを、C L E C - 2 を発現する非ヒト動物に投与するステップと、

コントロール動物と比較して、該化合物により、該動物における C L E C - 2 機能の指

50

標が増強されているか、または減弱されているかを検出するステップとを具備し、

前記指標における減弱は、前記化合物がCLEC-2の生体内での機能を減弱させることによって細胞凝集を減弱させるための候補であることを示し、

前記指標における増強は、前記化合物がCLEC-2の生体内での機能を増強させることによって細胞凝集を増強させるための候補であることを示す方法。

【請求項14】

前記動物が、CLEC-2をコードする外因性核酸配列に遺伝子組み換えされた遺伝子組み換え非ヒト動物であり、前記CLEC-2が前記動物に発現する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記細胞凝集が血小板凝集である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記指標が、細胞形態の変化と、細胞凝集と、CLEC-2のチロシンリン酸化と、CLEC-2の細胞質尾部のプロテインキナーゼのSykファミリーの一員との相互作用からなる群から選ばれる、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

止血を調節するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、

化合物と、CLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントとを接触させるステップと、

前記CLEC-2の結合ドメインと前記化合物との結合を検出するステップとを具備する方法。

【請求項18】

前記CLEC-2のフラグメントがSEQ ID NO:3である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、

細胞質ドメインにリン酸化したチロシンを有するCLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントと、テスト化合物とを接触させるステップと、

前記化合物が、CLEC-2ポリペプチドへのシグナル伝達パートナーの結合を調節するか否かを検出するステップとを具備し、

前記シグナル伝達パートナーがチロシンキナーゼSykファミリーの一メンバーである方法。

【請求項20】

前記Sykファミリーの一メンバーがSykである、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記化合物が、選択的に前記CLEC-2のリン酸化された細胞質ドメインに結合することにより、前記CLEC-2のシグナル伝達パートナーへの結合を妨げる、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記化合物が、選択的に前記シグナル伝達パートナーに結合することにより、前記CLEC-2のシグナル伝達パートナーへの結合を妨げる、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

前記化合物が、前記CLEC-2と前記シグナル伝達パートナーとの相互作用を妨げ、CLEC-2発現細胞の細胞凝集を減弱させる、請求項19に記載の方法。

【請求項24】

前記細胞凝集が血小板凝集である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

CLEC-2のシグナル伝達を介して病的状態の重症度を軽減させる方法であって、細胞

10

20

30

40

50

質ドメインにリン酸化チロシンを有する C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントを、シグナル伝達パートナーの前記 C L E C - 2 への結合を妨げる化合物に接触させる方法。

【請求項 26】

C L E C - 2 のシグナル伝達を介して病的状態の重症度を軽減させる方法であって、哺乳動物に C L E C - 2 シグナル伝達のアンタゴニストを投与する方法。

【請求項 27】

前記病的状態が、深刻な冠不全症候群、心筋梗塞、不安定狭心症、難治性の狭心症、血栓溶解療後の冠動脈内血栓性閉塞、冠動脈血管形成術後の冠動脈内血栓性閉塞、血栓による脳血管疾患、塞栓性脳卒中、血栓性脳卒中、一過性脳虚血発作、静脈血栓症、深部静脈血栓症、肺動脈塞栓、凝固障害、播種性血管内凝固症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、閉塞性血栓血管炎、ヘパリン起因性血小板減少症に伴う血栓症、体外循環による血栓合併症、心臓または他の血管内カテーテル、大動脈内バルーンポンプ、動脈ステントあるいは心臓弁などの器具による血栓合併症、および人工器官の取り付けを要する状態からなる群から選択される、請求項 26 に記載の方法。

10

【請求項 28】

C L E C - 2 のシグナル伝達の欠如により病的状態の重症度を軽減させる方法であって、哺乳動物に C L E C - 2 シグナル伝達のアゴニストを投与する方法。

【請求項 29】

前記病的状態が大量出血である、請求項 28 に記載の方法。

20

【請求項 30】

単独の抗体を備え、該抗体が特異的に S E Q I D N O : 2 のポリペプチドあるいはそのフラグメントに結合する C L E C - 2 アンタゴニスト。

【請求項 31】

さらに薬学的キャリアを備える、請求項 30 に記載の C L E C - 2 アンタゴニスト。

【請求項 32】

前記抗体が、a) キメラ抗体、b) F a b フラグメント、c) F (a b ')₂ フラグメント、あるいは d) ヒト化抗体である、請求項 30 または 31 に記載の C L E C - 2 アンタゴニスト。

【請求項 33】

S E Q I D N O : 2 のポリペプチドあるいはそのフラグメント、またはその塩、および薬学的キャリアを備える医薬組成物。

30

【請求項 34】

S E Q I D N O : 2 をコードした核酸あるいはそのフラグメント、またはその塩、および薬学的キャリアを備える医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はシグナル伝達に関し、特に、C L E C - 2 により血小板活性を調節する組成物および化合物スクリーニング方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

血小板は小さな円板状の血球であり、止血作用および創傷の治癒に欠かせないものである。循環している血小板は通常の状態ではかなり非活性 (quiescent) の状態であるが、血管が破れたり損傷したりした際には活性化される。血小板の活性化は、コラーゲンなどの成分が露出し、それが血小板表面のレセプタと結合することで行われる。この結合によりシグナル伝達経路が刺激され、血小板凝集や血液凝固および血栓形成が引き起こされる。

【0003】

血栓形成は広範囲に渡る人間の病気の中でも、特に血管疾患の中で主な病因因子の一つである。動脈や静脈で血小板凝集が過剰になるとアテローム性プラークや動脈硬化性プラ

50

ークが起こり、それによって微細な細胞組織への血液の流れが低減される。最終的に、この血小板による血栓の増大や血小板凝集の積み重ねが、深刻な心筋梗塞や、慢性不安定狭心症、一過性虚血、末梢血管障害、動脈血栓症、子癇前症、肺塞栓症そして再狭窄として現れる。

【 0 0 0 4 】

血栓形成や関連する疾病を治療するために、レセプタのシグナル伝達を抑制し、血小板凝集を軽減する薬剤が開発されている。そのターゲットとされてきた表面レセプタの一つが、インテグリン I I b 3レセプタである。このレセプタはフィブリノゲンと結合し、血小板凝集を引き起こす。臨床用途に承認されたインテグリン I I b 3抑制剤には次の三つがある。(1)インテグリン I I b 3の活性構造に対するヒト化マウスモノクローナル抗体、(2)フィブリノゲンの結合を阻止するR G D (Arg-Gly-Asp) 配列を有するペプチド、そして(3)フィブリノゲンの結合に対抗するディスインテグリン模擬化合物である。これらの抑制剤は血小板凝集を低減させるには有効であるが、三つとも安全性が低い。

10

【 0 0 0 5 】

G P V Iもまた、同様に抗血栓剤のターゲットとして使用されてきた血小板表面レセプタである。高等動物の血液を常食する昆虫や無脊椎動物の唾液から得られる化合物がコラーゲン、G P V IリガンドおよびG V I表面レセプタの接触を阻止することが示されている。これらの薬剤は抗血栓効果を示しているが、また出血の危険性が高いとされている。

20

【 0 0 0 6 】

以下は、本発明をより分かりやすく説明するため例として参照した文献であり、参照により本書に組み込むこととする。

【非特許文献1】Andrews RK, Kamiguti AS, Berlanga O, Leduc M, Theakston RD, Watson SP. The use of snakevenom toxins as tools to study platelet receptors for collagen and von Willebrand factor. *Haemostasis*. 2001;31:155-172

【非特許文献2】Morita T. Structures and functions of snakevenom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anti-coagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*. Inpress

【非特許文献3】Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. 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*. 1999;274:29019-29024

30

【非特許文献4】Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TN, Clemetson KJ. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:13576-13583

【非特許文献5】Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin α 2 β 1. *J Biol Chem*. 1997;272:27035-27041

【非特許文献6】Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Watson SP. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem*. 2002;277:21561-21566

40

【非特許文献7】Bori-Sanz T, Inoue KS, Berndt MC, Watson SP, Tulasne D. Delineation of the region in the glycoprotein VI tail required for association with the Fc γ receptor gamma-chain. *J Biol Chem*. 2003;278:35914-35922

【非特許文献8】Lee WH, Du XY, Lu QM, Clemetson KJ, Zhang Y. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. *Thromb Haemost*. 2003;90:662-671

【非特許文献9】Asazuma N, Marshall SJ, Berlanga O, Snell D, Poole AW, Berndt MC,

50

Andrews RK, Watson SP. The snake venom toxin alboaggregin-A activates glycoprotein VI. *Blood*. 2001;97:3989-3991

【非特許文献 1 0】Andrews RK, Gardiner EE, Asazuma N, Berlanga O, Tulasne D, Nieswandt B, Smith AI, Berndt MC, Watson SP. A novel viper venom metalloproteinase, a lborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI. *J Biol Chem*. 2001;276:28092-28097

【非特許文献 1 1】Shin Y, Morita T. Rhodocytin, a functional novel platelet agonist belonging to the heterodimeric C-type lectin family, induces platelet aggregation independently of glycoprotein Ib. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;245:741-745

【非特許文献 1 2】Huang TF, Liu CZ, Yang SH. Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from snake (*Calloselasma rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a glycoprotein Ia/IIa agonist. *Biochem J*. 1995;309 (Pt 3):1021-1027

【非特許文献 1 3】Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Kainoh M, Shin Y, Wu Y, Yatomi Y, Ohmori T, Tanaka T, Satoh K, Morita T. Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin $\alpha 2\beta 1$). Involvement of GPIa/IIa-associated src and protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001;276:1643-1652

【非特許文献 1 4】Navdaev A, Clemetson JM, Polgar J, Kehrel BE, Glauner M, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. Aggretin, a heterodimeric C-type lectin from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper), stimulates platelets by binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and glycoprotein Ib, activating Syk and phospholipase C $\gamma 2$, but does not involve the glycoprotein VI/Fc receptor γ chain collagen receptor. *J Biol Chem*. 2001;276:20882-20889

【非特許文献 1 5】Bergmeier W, Bouvard D, Eble JA, Mokhtari-Nejad R, Schulte V, Zirngibl H, Brakebusch C, Fassler R, Nieswandt B. Rhodocytin (aggretin) activates platelets lacking $\alpha (2)\beta (1)$ integrin, glycoprotein VI, and the ligand-binding domain of glycoprotein Ib α . *J Biol Chem*. 2001;276:25121-25126

【非特許文献 1 6】Suzuki-Inoue K, Garcia A, Eble JA, Fuller G, Pohlmann S, Zitzmann N, Inoue O, Gartner TK, Morita T, Ozaki Y, Watson SP. Identification of CLEC-2 as a Novel Signaling Receptor for Rhodocytin in Platelets [abstract]. *J Thromb Haemost*. 2005 Abstract P1494 in press

【非特許文献 1 7】Suzuki-Inoue K, Inoue O, Frampton J, Watson SP. Murine GPVI stimulates weak integrin activation in PLC $\gamma 2^{-/-}$ platelets: involvement of PLC $\gamma 1$ and PI 3-kinase. *Blood*. 2003;102:1367-1373

【非特許文献 1 8】Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP. The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J*. 1997;16:2333-2341

【非特許文献 1 9】Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase C $\gamma 2$ and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol*. 1999;19:8326-8334

【非特許文献 2 0】Clements JL, Lee JR, Gross B, Yang B, Olson JD, Sandra A, Watson SP, Lentz SR, Koretzky GA. Fetal hemorrhage and platelet dysfunction in SLP-76-deficient mice. *J Clin Invest*. 1999;103:19-25

【非特許文献 2 1】Pearce AC, Senis YA, Billadeau DD, Turner M, Watson SP, Vigorito E. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J Biol Chem*. 2004;279:53955-53962

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 2 2】Eble JA, Beermann B, Hinz HJ, Schmidt-Hederich A. alpha 2beta 1 integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *J Biol Chem.* 2001;276:12274-12284
- 【非特許文献 2 3】Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14440-14445
- 【非特許文献 2 4】Garcia A, Prabhakar S, Hughan S, Anderson TW, Brock CJ, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF, Zitzmann N. Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. *Blood.* 2004;103:2088-2095
- 【非特許文献 2 5】Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol.* 2003;77:4070-4080
- 【非特許文献 2 6】Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2000;30:697-704
- 【非特許文献 2 7】Asselin J, Gibbins JM, Achison M, Lee YH, Morton LF, Farndale RW, Barnes MJ, Watson SP. A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood.* 1997;89:1235-1242
- 【非特許文献 2 8】Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL, Watson SP. Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem.* 1996;271:18095-18099
- 【非特許文献 2 9】Judd BA, Myung PS, Oberfell A, Myers EE, Cheng AM, Watson SP, Pear WS, Allman D, Shattil SJ, Koretzky GA. Differential requirement for LAT and SLP-76 in GPVI versus T cell receptor signaling. *J Exp Med.* 2002;195:705-717
- 【非特許文献 3 0】Chung CH, Wu WB, Huang TF. Aggretin, a snake venom-derived endothelial integrin alpha 2 beta 1 agonist, induces angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor. *Blood.* 2004;103:2105-2113
- 【非特許文献 3 1】Marshall AS, Gordon S. Commentary: C-type lectins on the macrophage cell surface--recent findings. *Eur J Immunol.* 2004;34:18-24
- 【非特許文献 3 2】Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:539-546
- 【非特許文献 3 3】Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science.* 2004;306:1517-1519
- 【非特許文献 3 4】Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighofer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis ES, Sousa C. Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity.* 2005;22:507-517
- 【非特許文献 3 5】Herre J, Marshall AS, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighofer E, Tybulewicz V, Reis ES, Sousa C, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood.* 2004;104:4038-4045
- 【非特許文献 3 6】Fallon RJ, Danaher M, Saylor RL, Saxena A. Defective asialoglycoprotein receptor endocytosis mediated by tyrosine kinase inhibitors. Requirement for a tyrosine in the receptor internalization signal. *J Biol Chem.* 1994;269:11011-11017
- 【非特許文献 3 7】Geffen I, Fuhrer C, Leitinger B, Weiss M, Huggel K, Griffiths G, Spiess M. Related signals for endocytosis and basolateral sorting of the asialo

glycoprotein receptor. J BiolChem. 1993;268:20772-20777

【非特許文献 3 8】Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. Biochem Biophys Res Commun. 2001;282:153-158

【非特許文献 3 9】Dean YD, McGreal EP, Gasque P. Endothelial cells, megakaryoblasts, platelets and alveolar epithelial cells express abundant levels of the mouse AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor involved in homing activities and innate immune host defense. Eur J Immunol. 2001;31:1370-1381

【非特許文献 4 0】Testi R, Pulcinelli F, Frati L, Gazzaniga PP, Santoni A. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. J Exp Med. 1990;172:701-707 10

【非特許文献 4 1】Joseph M, Capron A, Ameisen JC, Capron M, Vorng H, Pancre V, Kunschier JP, Auriault C. The receptor for IgE on blood platelets. Eur J Immunol. 1986;16:306-312

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

以上から、この分野では血小板凝集に関連する疾病の治療に役立つ薬剤を開発するためのターゲットとなる血小板表面レセプタをさらに同定する必要がある。さらに、新たな血小板表面レセプタとそのシグナル伝達経路を阻止するのに有効な薬剤の同定を可能とする方法が求められている。さらに、血栓症に結びつく血小板凝集を引き起こすのに使用することのできる組成物と、異常な血小板表面レセプタ機能による過剰な出血を処置するのに効果的な組成物が求められている。 20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法において、(a) CLEC-2 発現細胞をテスト化合物に接触させるステップであって、自由選択で CLEC-2 リガンドに、テスト化合物が存在しない場合に CLEC-2 の CLEC-2 リガンドへの結合を可能にする環境で接触させるステップと、(b) コントロールと比較して、前記化合物により CLEC-2 機能の指標が増強されているか、または減弱されているかを検出するステップとを具備し、コントロールに対する指標の増強あるいは減弱により、テスト化合物が止血調節の治療候補であることが示される方法を提供する。 30

【0009】

また、本発明は、止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、a) CLEC-2 を発現する細胞をテスト化合物に接触させるステップと、b) コントロールと比較して、CLEC-2 機能の指標の変化を検出するステップとを具備する方法を提供するものである。

【0010】

さらに、本発明は、止血を調節するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、テスト化合物と自由選択で CLEC-2 リガンドを、CLEC-2 を発現する非ヒト動物に投与するステップと、コントロール動物と比較して、該化合物により、該動物における CLEC-2 機能の指標が増強されているか、または減弱されているかを検出するステップとを具備し、前記指標における減弱は、前記化合物が CLEC-2 の生体内での機能を減弱させることによって細胞凝集を減弱させるための候補であることを示し、前記指標における増強は、前記化合物が CLEC-2 の生体内での機能を増強させることによって細胞凝集を増強させるための候補であることを示す方法を提供するものである。 40

【0011】

さらに、本発明は、止血を調節するための治療候補を同定するために化合物をスクリー 50

ニングする方法であって、化合物と、CLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントとを接触させるステップと、前記CLEC-2ペプチドと前記化合物との結合を検出するステップとを具備する方法を提供するものである。

【0012】

さらに、本発明は、止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、細胞質ドメインにリン酸化したチロシンを有するCLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントと、テスト化合物とを接触させるステップと、前記化合物が、CLEC-2ポリペプチドへのシグナル伝達パートナーの結合を調節するか否か検出するステップとを具備し、前記シグナル伝達パートナーがチロシンキナーゼSykファミリーの一メンバーである方法を提供するものである。

10

【0013】

さらに、本発明は、CLEC-2のシグナル伝達を介して病的状態の重症度を軽減させる方法であって、細胞質ドメインにリン酸化チロシンを有するCLEC-2あるいはそのリン酸化した細胞質ドメインを有するフラグメントを、シグナル伝達パートナーの前記CLEC-2への結合を妨げる化合物に接触させる方法を提供するものである。

【0014】

さらに、本発明は、CLEC-2のシグナル伝達を介して病的状態の重症度を軽減させる方法であって、哺乳動物にCLEC-2シグナル伝達のアンタゴニストを投与する方法を提供するものである。

【0015】

さらに、本発明は、CLEC-2のシグナル伝達の欠如により病的状態の重症度を軽減させる方法であって、哺乳動物にCLEC-2シグナル伝達のアゴニストを投与する方法を提供するものである。

20

【0016】

さらに、本発明は、単独の抗体を備え、該抗体が特異的にSEQ ID NO:2のポリペプチドあるいはそのフラグメントに結合するCLEC-2アンタゴニストを提供するものである。

【0017】

さらに、本発明は、SEQ ID NO:2のポリペプチドあるいはそのフラグメント、またはその塩、および薬学的キャリアを備える医薬組成物を提供するものである。

30

【0018】

最後に、本発明は、SEQ ID NO:2をコードした核酸あるいはそのフラグメント、またはその塩、および薬学的キャリアを備える医薬組成物を提供するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

発明者は驚くべきことに、Cタイプレクチン様レセプタ(CLEC-2)がロドサイチン(蛇毒)あるいはCLEC-2抗体により血小板を活性化させることを突き止めた。実施例で示すように、発明者は、ロドサイチンアフィニティークロマトグラフィーとマス・スペクトロメトリーを用いて、ロドサイチンによる血小板活性化を引き起こす一つまたは複数のレセプタの同定を試みた。この取り組みにより、レセプタCLEC-2を同定した。これは単一の炭水化物認識ドメインと細胞内にチロシン残基を含むモチーフを示しているが、CLEC-2を強制発現させた培養細胞はロドサイチンにより活性化シグナルが惹起されることが認められた。意義深いことに、CLEC-2は細胞質内尾部に単一のチロシンを含み、このチロシンが、ITAMモチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)の半分の構造にあたるYXXL配列の中にあり、Srcキナーゼのロドサイチン下流による活性化の際、チロシンリン酸化を受ける。さらに、チロシンリン酸化したCLEC-2は、チロシンキナーゼのSykファミリーに含まれるSykの2つのSH2と結合する。ロドサイチン惹起血小板凝集はSyk欠損の場合には起こらなかった。これによりCLEC-2は蛇毒素のロドサイチンによる活性化を引き起こす血小板活性化レセプタであることが示された。

40

50

【 0 0 2 0 】

これらの観察に基づき、本発明では細胞活性あるいは細胞活性の欠損により止血疾患を治療するための方法および組成物を提供する。好ましくは、細胞が血小板であり、細胞活性には、細胞凝集や細胞形態の変化が含まれるが、これらに限定されることはない。

【 0 0 2 1 】

本書で述べる「止血」とは、流血あるいは出血を効果的に適切に止めることを意味する。本書で使用する「止血疾患」には、過度の出血や異常な血液凝固を含む状態や疾患が含まれるが、これらに限定されることはない。異常な血液凝固は深刻な冠不全症候群、心筋梗塞、不安定狭心症、難治性の狭心症、血栓溶解療後の冠動脈内血栓性閉塞、冠動脈血管形成術後の冠動脈内血栓性閉塞、血栓による脳血管疾患、塞栓性脳卒中、血栓性脳卒中、一過性脳虚血発作、静脈血栓症、深部静脈血栓症、肺動脈塞栓、凝固障害、播種性血管内凝固症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、閉塞性血栓血管炎、ヘパリン起因性血小板減少症に伴う血栓症、体外循環による血栓合併症、心臓または他の血管内カテーテル、大動脈内バルーンポンプ、動脈ステントあるいは心臓弁などの器具による血栓合併症、および人工器官の取り付けを要する状態を含む疾患に関連するものであるが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 0 2 2 】

(本発明のアッセイ)

本発明は、細胞系アッセイおよび無細胞系アッセイを用いて止血疾患を治療するための治療候補を同定する化合物のスクリーニング方法を提供する。

20

【 0 0 2 3 】

[本発明の細胞系アッセイ]

いくつかの実施形態では、本発明の方法に、止血疾患を治療するための治療候補を同定する化合物をスクリーニングするための細胞を用いる。

【 0 0 2 4 】

一実施形態による本発明の方法は、a) C L E C - 2 の発現細胞をテスト化合物と、自由選択で C L E C - 2 リガンドと、前記化合物がない状態では C L E C - 2 が C L E C - 2 リガンドと結合できる状態で接触させるステップと、b) C L E C - 2 機能の指標の増大あるいは低減をコントロール(実験対照)と比較するステップとを含む。指標の増大あるいは低減は、その化合物が C L E C - 2 と相互作用することによって止血を緩和させる候補であることを示すものである。

30

【 0 0 2 5 】

この実施形態において、テスト化合物は C L E C - 2 の発現細胞と細胞表面で接触させる。この接触ステップは、化合物がない状態では、C L E C - 2 と C L E C - 2 リガンドとの結合を可能とする状態で行われる。したがって、たとえば、接触ステップは、生理的に許容されるバッファー溶液で行ったり、細胞が成長する細胞培地で実行したりすることができる。好ましくは、in vivo状態にほぼ等しい状態を選択する。

【 0 0 2 6 】

本書で使用する「C L E C - 2 リガンド」は細胞表面で発現する C L E C - 2 の結合ドメインに結びつく分子を意味するものである。

40

【 0 0 2 7 】

一実施形態において、C L E C - 2 リガンドは C L E C - 2 機能のアンタゴニストである。

【 0 0 2 8 】

他の実施形態では、C L E C - 2 リガンドは C L E C - 2 機能のアゴニストである。好ましくは、アゴニストリガンドは C L E C - 2 抗体であり、例として、R & D Systems (Minneapolis, MN) の C L E C - 2 抗体が挙げられる。さらに好ましくは、C L E C - 2 アゴニストリガンドはロドサイチンである。

【 0 0 2 9 】

C L E C - 2 機能の指標は、血小板細胞がアゴニストである、ロドサイチンや C L E C

50

- 2抗体と接触する際に観察される(実施例を参照のこと)。レセプタリガンドアゴニストと接触すると、CLEC-2はシグナル伝達カスケードを活性化させ、それにより、1) CLEC-2がリン酸化され、さらに好ましくは、CLEC-2細胞質ドメインのYXXLMモチーフがリン酸化される、2) チロシンキナーゼのSykファミリー成分がCLEC-2の細胞質ドメイン、好ましくはSyk成分と相互作用する、3) 細胞活性化が起こるといった指標が現れるが、指標はこれらに限定されない。

【0030】

一実施形態において、細胞活性化は、活性化されてない細胞の形や活性状態の形と比較して、細胞の形に変化が現れている。

【0031】

他の実施形態において、細胞活性化は細胞の凝集で現れる。

【0032】

好ましくは細胞の凝集は血小板凝集である。

【0033】

CLEC-2機能の指標測定方法を以下の実施例で説明する。細胞の活性化は、実施例1(h)に示す方法を含めて周知の方法によって評価することができる。CLEC-2のチロシンリン酸化も、実施例5に示す方法を含めて周知の方法で評価することができる。SykのCLEC-2の細胞質尾部との相互作用は実施例6に示す方法により間接的に評価することができる。

【0034】

これらの指標の存在の有無や数を、コントロール(実験対照)細胞と比較する。コントロール細胞は、自由選択でCLEC-2リガンドと接触させるが、テスト化合物とは接触させていない。コントロール細胞と比較して指標が減ったり、存在がなくなったりしたテスト化合物はCLEC-2のシグナリングのアンタゴニストであり、血液凝固、細胞凝集、好ましくは血小板凝集に関連する止血疾患の治療のための候補化合物として使用することができる。また、コントロール細胞と比較して指標の存在や数に増加が見られたテスト化合物は、過度の出血、たとえば、細胞凝集の低下や欠如、好ましくは血小板凝集の低下や欠如により止血疾患の治療のための候補化合物として使用することができる。

【0035】

他の実施例によると、本発明は、止血疾患を治療するために治療候補を同定するための化合物のスクリーニング方法であって、a) CLEC-2の発現細胞をテスト化合物接触させるステップと、b) コントロールに対してCLEC-2機能の指標の変化を検出するステップを含む方法を提供する。指標における変化が意味するところは、化合物がCLEC-2との相互作用により止血疾患を緩和させるための候補であることである。

【0036】

好ましくは、細胞がまずCLEC-2リガンドで活性する。一実施形態によると、CLEC-2リガンドはアゴニストである。他の実施形態によると、CLEC-2リガンドはアンタゴニストである。

【0037】

好ましくは、本発明によるCLEC-2を発現させる生体細胞を利用する止血疾患の治療候補を同定する化合物のスクリーニング方法は、CLEC-2を自然に発現させる細胞を使用する。他の実施形態では、本発明の方法では、CLEC-2の発現を引き起こす、あるいは高めるために遺伝子操作された細胞を使用する。

【0038】

さらに、好ましい実施形態では、細胞の遺伝子構造を操作して、キメラタンパク質を遺伝子構造を記述した配列を使用する。キメラタンパク質はYXXLMモチーフを含む細胞質ドメインおよび結合ドメインに記述されるものである、自然のCLEC-2とほぼ同様の機能を有する。

【0039】

本発明の細胞は、好ましくは、哺乳類(ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ科動物、

10

20

30

40

50

ハムスター、ウサギ、ヤギなど)の細胞とし、他の真核細胞(昆虫細胞、イースト菌)あるいは原核細胞(細菌性細胞)を使用して、ヒトあるいは他の哺乳動物のC L E C - 2を発現するように遺伝子操作することもできる。細胞は不死化した細胞ライン、細胞培養あるいは主な細胞調合から得ることができ、または直接動物(ヒトあるいは他の哺乳動物、または非ヒトトランスジェニック動物)から得ることができる。

【0040】

さらに好ましい実施形態において、細胞は、ヒトC L E C - 2を発現するヒト、マウス、ネズミ、ハムスターの細胞である。

【0041】

さらに好ましい実施形態において、細胞は、ヒト、マウスであり、ヒトC L E C - 2を発現する。

【0042】

さらに好ましい実施形態において、細胞は血小板である。さらに好ましい実施形態において、細胞は血小板であり、内生的にヒトC L E C - 2を発現する。

【0043】

[遺伝子構造]

本発明の形質転換細胞および/または遺伝子組み換え非ヒト動物(以下参照のこと)を生成するため、様々な標準的遺伝子組み換え構造を採用することができる。

【0044】

遺伝子構造を、特異的あるいは非特異的にターゲット細胞のゲノムに組み込んだ幅広いベクターのいずれかの構成成分としてターゲット細胞に導入する。適当な発現ベクターとしては、バクテリアベクター、プラスミドベクター、酵母ベクター、ウィルスベクターがある。ウィルスベクターには、単純ヘルペスウィルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウィルスベクター、レトロウィルスベクター、レンチウイルスベクター、仮性狂犬病ウィルスベクター、アルファ-ヘルペスウィルスベクター等が含まれるが、これらに限定されるわけではない。ウィルスベクターの徹底した見直しや対象のポリヌクレオチドの発現と併せてかかるベクターの利用方法については、Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications, Caplitt and Loewy, eds., Academic Press, San Diego, 1995に記載されている。

【0045】

レトロウィルスパッケージング細胞ラインと併せてレトロウィルスベクターを用いることもでき、このことは米国特許第5,449,614号に記載されている。非マウス哺乳類細胞を遺伝子組み換えのターゲット細胞として利用する場合、両種性または汎親和性パッケージング細胞ラインを使用して適当なベクターをパッケージングすることができる(Ory et al. (1996), Proc.Natl. Acad. Sci. (USA) 93:11400-11406)。代表的なレトロウィルスベクターは、たとえば、米国特許第5,521,076号に記載されている。

【0046】

C L E C - 2あるいはそのフラグメントの発現を惹起させる、または強化させるための遺伝子構造には通常、Y X X Lモチーフを含む細胞質ドメインを少なくともコードする遺伝子配列があり、それは、C L E C - 2配列に対し外因性の(およびターゲット細胞のゲノムに対して外因性となり得る)転写調節要素と作動可能に結合されている。これらの転写調節要素には、転写プロモーター領域と、自由選択でエンハンサー配列が含まれる。構造に組み込まれる転写プロモーターとエンハンサーには、細胞特異プロモーター、組織特異プロモーター、誘導プロモーターおよび調節可能プロモーターが含まれるが、これに限定されない。具体例としては、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、PGKプロモーター、メタロチオネインプロモーター、アデノウィルスレイトプロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、鳥類ベータグロビンプロモーター、ヒストンプロモーター(e.g., mouse histone H3-614 promoter)、ベータアクチンプロモーター、およびカ

10

20

30

40

50

リフラーモザイクウィルス 3 5 S プロモーター、(Sambrook et al., Molecular Cloning, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), and Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1989-2000 editions) を参照のこと) があるが、これらに限定されるわけではない。

【 0 0 4 7 】

上述の遺伝子構造は、以下で説明する C L E C - 2 ポリペプチド配列をコードする核酸を利用するものである。本書で用いているように、「ペプチド」および「ポリペプチド」の用語は同じ意味で使用することとする。

【 0 0 4 8 】

本発明としては、「核酸」を、以下で定義する S E Q I D N O : 2 を含むポリペプチド、その生体フラグメントをコードする R N A あるいは D N A、または S E Q I D N O : 2 と同等の配列を有するポリペプチドまたはその生体フラグメントをコードする R N A あるいは D N A とする。または、かかるポリペプチドをコードする核酸配列に相補的であったり。かかる核酸の雑種となり、ストリンジェントな条件下ではそれに安定して結合している。具体的には、ゲノム D N A、c D N A、m R N A、アンチセンス分子そして s i R N A について検討することとする。

【 0 0 4 9 】

ヌクレオチドやアミノ酸配列レベルの相同性や同一性を、配列の相同性検索用に作られた blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx プログラムを用いる B L A S T (Basic Local Alignment Search Tool) 分析 (Karlin et al, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 2264-2268 および Altschul, S. F., J. Mol. Evol. (1993) 36: 290-300 を参照のこと。また、この内容は参照により本書に組み込む) で判定する。この BLAST プログラムによる手法は、最初に、クエリ配列とデータベースの配列との類似のセグメントについて検討し、次いで同一であった一致その全てについて統計的有意性を評価し、最後にあらかじめ選択された有意性の閾値を満たしている一致のみをまとめるものである。配列データベースの相同性検索についての基本的事項の考察は Altschul et al. (Nature Genetics (1994) 6: 119-129) (参照により本書に組み込む) を参照されたい。ヒストグラム、説明、アラインメント、期待値 (たとえば、データベース配列に対する一致を報告するための統計的有意性の閾値)、基準値、行列、フィルタなどのパラメータはデフォルト設定である。

【 0 0 5 0 】

blastp, blastx, tblastn, and tblastx が使用しているデフォルトのスコア行列は、B L O S U M 6 2 行列 (Henikoff et al., Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89: 10915-10919, 参照により本書に組み込む) である。Blastn については、N (たとえば、不一致残基のペナルティスコア) に対する M (たとえば、一致残基に対するリワードスコア) の比でスコア行列を設定し、M と N のデフォルト値はそれぞれ、- 5 と - 4 である。

【 0 0 5 1 】

さらなる実施形態において、本発明で使用する核酸配列は、ストリンジェントな条件で開示された配列の雑種となるものである。本書で用いる「ストリンジェントな条件」とは、(1) イオン強度が低く洗浄温度が高い状態で、たとえば 0 . 0 1 5 M の N a C l / 0 . 0 0 1 5 M のクエン酸ナトリウム (チトラート) / 0 . 1 % S D S で温度 5 0、あるいは (2) ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤を使用して、たとえば、5 0 % (vol / vol) ホルムアミドに、0 . 1 % ウシ血清アルブミン / 0 . 1 % F i c o l l / 0 . 1 % polyvinylpyrrolidone / 5 0 m M リン酸ナトリウムバッファ pH 6 . 5、7 5 0 m M N a C l、7 5 m M クエン酸ナトリウムで温度 4 2 とする。別の例としては、5 0 % ホルムアミド、5 x S S C (0 . 7 5 M N a C l, 0 . 0 7 5 M クエン酸ナトリウム)、5 0 m M リン酸ナトリウム (pH 6 . 8)、0 . 1 % ピロリン酸ナトリウム、5 x デンハルト液、超音波処理されたサーモン sperm DNA (5 0 μ g / m l)、0 . 1 % S D S、1 0 % 硫酸デキストラン、温度 4 2 度、洗浄温度 4 2、0 . 2 x S S C、0.1% S D S。当業者であれば、クリアで検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを得るべ

10

20

30

40

50

く、「ストリンジェントな条件」を容易に決定氏適当に変更することができよう。

【0052】

好ましくは、本発明の核酸がSEQ ID NO:2とその生体フラグメントをコードする。好ましいフラグメントは、YXXLモチーフを有するCLEC-2の細胞質ドメインをコードするものであり、それはチロシンキナーゼでリン酸化されるものである。

【0053】

さらに、SEQ ID NO:2の対立遺伝子変異体 (Allelic Variant) の相同部分とそのフラグメントをコードする核酸と、同類 (保存的) アミノ酸置換およびそのフラグメントについても検討する、本書で使用しているように、「対立遺伝子変異体」は本書で説明したものと異なるアミノ酸配列を有する自然発生のCLEC-2を指す。変異は、上述の配列とは異なるアミノ酸配列を有しているが、それでも細胞表面に発現する必須の結合ドメインおよび/またはCLEC-2のシグナル伝達パートナーによって認識されるリン酸化可能なチロシン残基を有しており、関連するシグナル伝達カスケードの一部としてこのパートナーと結合したり作用したりする。

【0054】

本書で使用している通り、「同類アミノ酸置換」は、ペプチドに対し大きな影響を与えることのないアミノ酸配列の改変を指している。置換とは、改変した配列が、細胞表面に発現したときにCLEC-2の結合ドメインとのCLEC-2リガンドの結合を妨げるとき、かつ/またはペプチドのリン酸化あるいはリン酸化したペプチドのシグナル伝達パートナーとの結合力が妨げられたときに、ペプチドに大きな (マイナスの) 影響を与えるものと考えられている。たとえば、ペプチドにマイナス影響を与えることなく、ペプチドの全体変化、構造や、疎水性/親水性が改変されることもある。したがって、ペプチドのリガンドとの結合力にマイナスの影響を与えることなく、および/またはペプチドのリン酸化やおよび/またはリン酸化したペプチドのシグナル伝達パートナーとの結合力にマイナスの影響を与えることなく、上記ペプチドのアミノ酸配列を改変し、たとえば、ペプチドの疎水性または親水性を高めたりすることができる。

【0055】

通常、本発明で使用している核酸は、説明したCLEC-2のペプチドと少なくとも75%のアミノ酸配列の相同性を有するアミノ酸配列を含むペプチドと類似物をコードするものであり、より好ましくは少なくとも80%のアミノ酸配列を、さらには90%、最適には95%のアミノ酸配列の相同性を有するペプチドと類似物をコードする。かかる配列についての相同性や同一性は、本書では、配列のアラインメントを行い、必要ならばギャップを挿入して最高の相同性を得るようにした後の周知のペプチドと同一の候補配列におけるアミノ酸残基の割合で決まる。その際、配列の同一性に同類置換は考慮しない。

【0056】

したがって、本発明で有用なペプチドおよび類似分子をコードする核酸には、本書で説明したペプチドを有するペプチドをコードする分子、そのフラグメントであって、YXXLモチーフを含む対応するCLEC-2の細胞質ドメインにより少なくとも3、4、5、10または15のアミノ酸残基の同類配列を有するもの、上述の周知の配列のアミノ酸配列変異体とそのフラグメントであって、他の残基と置換されているものが含まれる。検討している核酸はまた、所定の突然変異、たとえば、相同組換え、部位特異的あるいはPCR変異と、これらに限定されるわけではないが、ウサギ、ラット、マウス、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマそして非ヒト霊長類動物等の動物のCLEC-2あるいはそのフラグメント、上記種のあるいはヒト配列のCLEC-2細胞質ドメインの変異体あるいは自然発生の変異体と、ペプチドあるいはそのフラグメントが化学、酵素あるいは他の適切な手段で改質され自然発生のアミノ酸以外のmoietyに共有接合する (たとえば、酵素や放射性同位体などの検出可能なmoiety) と、糖鎖変異体 (アミノ酸の欠失、挿入または置換による糖鎖結合部位の挿入あるいは糖鎖結合部位の欠失) と、可溶型や不可逆的リン酸化型が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

[動物アッセイ]

さらに、本発明は、止血調節のための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、全非ヒト動物を使用する方法を提供するものである。この点では、テスト化合物を上述のCLEC-2リガンドとともに動物に投与し、該動物におけるCLEC-2機能の指標の増強あるいは減弱をコントロール動物と比較して検出する。

【 0 0 5 8 】

一実施形態において、コントロール動物をCLEC-2リガンドと接触させるが、テスト化合物は接触させない。

【 0 0 5 9 】

コントロール動物と比較して指標の増強は、上述のとおり、化合物がin vivoでのCLEC-2機能を増強させることにより細胞凝集を増強させるのに有効な候補であることを示している。好ましくは、コントロールと比較して指標に減弱が見られると、それは、化合物がin vivoでのCLEC-2機能を減弱させることにより細胞凝集を減弱させるのに有効な候補であることを示している。好ましくは、細胞凝集は血小板凝集である。

【 0 0 6 0 】

実施形態によっては、動物を、CLEC-2を通常発現する動物とし、レセプタに対し健常動物である。あるいは、動物は遺伝子組み換えの非ヒト動物、あるいはその子孫であり、CLEC-2コードする遺伝子構造に組み換えられており、CLEC-2はその動物に、好ましくは内因性のCLEC-2を発現する細胞組織に現れる。組み換えベクターは生成することができ、胚盤胞やES細胞の組み換えに使用することができる。次いで、これらの組み換えが行われた細胞を用いて遺伝子組み換え動物を周知の方法で生成することができる。(例えば、Solle et al. (2001), J. Biol. Chem. 276:125-132を参照のこと。また、この内容は参照により本書に組み込むこととする)。

【 0 0 6 1 】

[CLEC-2発現のモジュレータのアッセイ]

さらに、本発明は、化合物をスクリーニングするための方法であって、その化合物がCLEC-2遺伝子の転写を調節することによりCLEC-2の発現を調節する方法を提供するものである。かかる化合物は止血疾患を調節するための治療候補である。

【 0 0 6 2 】

好ましくは、内因性CLEC-2を発現する細胞を使用して、CLEC-2をコードする配列の発現を、通常の周知の方法でCLEC-2のmRNAあるいは蛋白のレベルを検出することで測る。

【 0 0 6 3 】

[無細胞結合アッセイ]

さらに本書で提供するのは、無細胞アッセイにおいてCLEC-2に結合する化合物をスクリーニングする方法である。一実施形態において、本発明は、止血疾患を治療する治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、a) 化合物をCLEC-2ポリペプチドまたはそのフラグメントに接触させて、CLEC-2ポリペプチドとテスト化合物の結合を検出することによって、CLEC-2ポリペプチドとテスト化合物の結合によって該化合物が止血調節のための候補であることを示す方法を提供する。

【 0 0 6 4 】

好ましくは、ポリペプチドあるいはSEQ ID NO:2およびそのフラグメントをコードする核酸を本発明の方法で使用する。さらに好ましくは、SEQ ID NO:3のCLEC-2フラグメントをコードする核酸を使用する。さらに好ましくは、CLEC-2ポリペプチドには少なくともYXXLモチーフが含まれる。

【 0 0 6 5 】

さらに他の実施形態において、本発明は、止血疾患を治療するための治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、細胞質ドメインにリン酸化したチロシン残基を有するCLEC-2ポリペプチドあるいはリン酸化したチロシン残基を有する

10

20

30

40

50

そのフラグメントをテスト化合物に接触させ、化合物が C L E C - 2 ポリペプチドへのシグナル伝達パートナーの結合を調節するか否か検出する方法であって、シグナル伝達パートナーがチロシンキナーゼの S y k ファミリーのメンバーである方法を提供する。

【 0 0 6 6 】

この実施形態において、少なくともリン酸化した Y X X L モチーフを含む C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントを使用する。C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントは周知の方法でリン酸化することができる。C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントはテスト化合物とともに、またはテスト化合物を加えないでシグナル伝達パートナーと反応させる。

【 0 0 6 7 】

シグナル伝達パートナーはチロシンキナーゼの S y k ファミリーのメンバーであり、さらに好ましくは、S y k である。

【 0 0 6 8 】

本書で使用する「シグナル伝達パートナー」は分子を示し、それは、C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントとの相互作用を通じて、細胞膜を超えるシグナルの伝達を調節する分子である。たとえば、チロシンキナーゼの S y k ファミリーがこの用語に含まれる。

【 0 0 6 9 】

インキュベーションの後、C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントとシグナル伝達パートナーとの結合を可能とする条件下で、二つの化学組成を分析し、テスト化合物が C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントとシグナル伝達パートナーとの結合を調節することができるかどうか判定する。

【 0 0 7 0 】

一実施形態において、テスト化合物が、C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントのリン酸化した細胞質ドメインと選択的に結合することによって、C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントとシグナル伝達パートナーとの結合を妨げる。

【 0 0 7 1 】

他の実施形態において、テスト化合物が、シグナル伝達パートナーと選択的に結合することによって、C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントの結合を阻止する。

【 0 0 7 2 】

他の実施形態において、テスト化合物が、C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントの相互作用を阻止し、C L E C - 2 発現細胞の細胞凝集を減弱させる。好ましくは、細胞凝集が血小板凝集である。

【 0 0 7 3 】

上記の実施形態の中には、化合物と C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメント、化合物とシグナル伝達パートナー、またはシグナル伝達パートナーと C L E C - 2 ポリペプチドの結合の検出を容易にするために、化合物とシグナル伝達パートナーのいずれかに検出可能なラベルをすることが好ましい。ラベルした成分を C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントと接触させた後、結合されていないラベル成分を洗浄して除き、C L E C - 2 ポリペプチドあるいはそのフラグメントに結合されたラベル成分を検出する。

【 0 0 7 4 】

上述の結合アッセイにおいて使用するラベルには、ラジオアイソトープ（例： ^{32}P 、 ^{35}S ）、蛍光ラベル（例：フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびフルオレサミン）、化学発光法によるラベル（例：ルシフェリン、ルミノール反応、イソルミノール、芳香族アクリジンエステル、イミダゾール、シュウ酸エステル）、酵素ドメイン（例：ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、glucose-6-phosphate dehydrogenase、マレイン酸塩デヒドロゲナーゼ、ブドウ糖酸化酵素、そしてペルオキシダーゼ）、特異結合要素（例： α -マイコエピトープ、ビオチン（ストレプト）アビジン、プロテイン A

10

20

30

40

50

、レクチン、免疫グロブリン)、および金属原子(例:Au)が含まれるが、これらに限定されない。

【0075】

上述の結合アッセイの好ましい実施形態において、ラベルしていない結合成分を固定する。そして実施形態によっては、化合物をラベルして、CLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントを基質上で固定させたり、あるいはシグナル伝達パートナーにラベルをして、CLEC-2ポリペプチドを基質上で固定させたりする。

【0076】

これらの成分の固定化に適した基質としては、アフィニティー・カラム、スライド、ウェル、パーティクルおよび/またはマイクロパーティクルが含まれる。

10

【0077】

また、止血疾患を調節する治療候補を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、凝集アッセイを使用する方法を提供する。この方法では、化合物を第一パーティクルで固定し、CLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントを第二パーティクルで固定する。

【0078】

他の実施形態では、化合物を第一パーティクルで固定し、CLEC-2ポリペプチドを第二パーティクルで固定し、シグナル伝達パートナーを第三パーティクルで固定する。シグナル伝達パートナーを含む実施形態では、パーティクルの接触を、テスト化合物が妨げない限りCLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントのシグナル伝達パートナーへの結合が可能な条件下で行う。

20

【0079】

化合物間の結合の検出は、パーティクルの凝集を検出することで行う。凝集は、化合物が、たとえば、CLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントとの、またはCLEC-2ポリペプチドシグナル伝達パートナーとの相互作用により、止血を調節するための候補であることを示している。凝集の測定には、濁度計測などの通常の技術を使用する。本発明での使用に適したパーティクルにはラテックス、ポリ乳酸(PLA: polylactic acid)、ポリグリコール酸(PGA: polyglycolic acid)、poly co-lactic-glycolic acid(PLGA)、poly ethylene glycol(PEG)および同等のマイクロスフェアが含まれ、大きさは1μm-1000μmである。

30

【0080】

[テスト化合物]

CLEC-2アゴニストまたはアンタゴニストとなる化合物を同定するために上記の全ての実施形態でスクリーニングすることのでき、つまりは止血疾患を調節することのできる化合物クラスの例には、核酸(たとえば、DNAやRNA)、炭水化物、脂質、蛋白質、ペプチド、ペプチド・ミックス、小分子が含まれるが、それらに限定されない。

【0081】

テスト化合物は、自然発生の化合物のライブラリーやコンビナトリアルケミストリーで生成される合成物のライブラリーを含めて、当業界で周知の多数ある方法で得られる薬剤ライブラリーから同定することができる。

40

【0082】

分子ライブラリーの合成(構築)方法は、例えば、米国特許第5,738,996号;米国特許第5,807,683号;DeWitt et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:6909; Erb et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 91:11422; Zuckermann et al. (1994), J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al. (1993), Science 261:1303; Carrell et al. (1994), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carrell et al. (1994), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; Gallop et al. (1994), J. Med. Chem. 37:1233; およびLam (1997), Anticancer Drug Des. 12:145に記載されている。

【0083】

50

薬剤のライブラリーは、溶液については例えば、Houghten (1992), Bio/Techniques 13:412-421、ピーズについてはLam (1991), Nature 354:82-84、チップについてはFodor (1993), Nature 364:555-556、細菌については、米国特許第5,223,409号、胞子については米国特許第5,571,698号；米国特許第5,403,484号；および米国特許第5,223,409号、プラスミドについてはCull et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:1865-1869、ファージについてはScott and Smith (1990), Science 249:386-390, Devlin (1990), Science 249:404-406; Cwirla et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:6378-6382; および Felici (1991), J. Mol. Biol. 222:301-310) に開示されている。

【0084】

(本発明の組成物)

本発明はまた、止血調節に使用しうる化合物を提供するものである。

【0085】

[抗体]

一実施形態において、本発明はCLEC-2機能に拮抗する抗体を提供する。用語「抗体」は完全な(intact)免疫グロブリン分子と、そのフラグメントを指す。例としては、Fab, F(ab')₂、そしてFvフラグメントがあり、それらは抗原決定基を結合することができるものである。CLEC-2ポリペプチドに結合する抗体は、免疫抗原として完全なポリペプチドを用いて、あるいは対象となる小ペプチドを含むフラグメントを使用して生成することができる。ポリペプチドまたはオリゴペプチドは、動物(たとえば、マウス、ラット、ウサギ)に免疫を与えるのに使用するのだが、RNAの転写により得ることができ、化学的に合成したり、所望に応じてキャリア蛋白に共役させることもできる。一般に使用され、化学的にペプチドに結合されるキャリアには、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン(thyroglobulin)、キーホールリンペットヘモシニアン(KLH:key hole limpet hemocyanin)が含まれる。次いで、結合されたペプチドを利用して動物に免疫を与える。

【0086】

用語「抗原決定基」とは、特定の抗体と接触する分子の一領域を指す(例:エピトープ)。蛋白または蛋白質フラグメントを用いて宿主動物に免疫を与える場合、該蛋白の複数の領域で抗体が生成され、それが特異的に抗原決定基(蛋白の特定領域あるいは立体構造)と結合する。抗原決定基は、抗体に結合する完全な抗原(例えば、免疫反応を引き出すのに使用するイムノゲン)に対抗させることもできる。

【0087】

「特異的結合」および「特異的に結合する」はタンパク質あるいはペプチドの、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、または自然のあるいは合成結合組成物との相互作用を指す用語である。相互作用は、抗原決定基あるいはエピトープなど、結合分子によって認識されるタンパク質の固有の構造の存在による。

【0088】

「ヒト化抗体」は、非抗原性の結合領域におけるアミノ酸配列が変更され、抗体をよりヒト抗体に酷似させているが、元来の結合能力は保持している抗体分子を指している。

【0089】

「免疫原性フラグメント」はCLEC-2のポリペプチドあるいはオリゴペプチドフラグメントであり、たとえば哺乳動物などの生体に取り込むと免疫反応を惹き起すことができるものである。「免疫原性フラグメント」にはまた、いかなるCLEC-2のポリペプチドあるいはオリゴペプチドフラグメントも含まれ、本書に記載の、または周知の抗体生成方法のいずれにも有用である。

【0090】

本発明はまた、リガンドの結合とレセプタ活性の両方を阻止するレセプタ特異抗体と、レセプタリガンド複合体を認識し、好ましくは非結合レセプタあるいは非結合リガンドを特異的に認識しない抗体を特徴とする。同様に、本発明には、中和抗体という、リガンド

10

20

30

40

50

と結合してリガンドのレセプタへの結合を妨げる抗体と、リガンドと結合し、それによってレセプタの活性化を抑制するがリガンドのレセプタへの結合は妨げない抗体も含まれる。さらに、本発明には、レセプタを活性化させる抗体も含まれる。これらの抗体はレセプタアゴニストとして作用し、たとえば、レセプタの二重化を引き起こしてリガンドによるレセプタ活性の生物学的機能の全て、あるいは一部を可能にし、活性化させる。抗体は、本書で説明する本発明のペプチドの特定の生物学的機能を含む生物学的機能についてのアゴニスト、アンタゴニスト、インバースアゴニストとする。上記の抗体アゴニストは周知の方法により生成することができる。これについては、例えば、PCT公開公報WO96/40281；米国特許第5,811,097号；Deng et al., Blood 92(6):1981-1988 (1998)；Chenet et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678 (1998)；Harrop et al., J. Immunol. 161(4):1786-1794 (1998)；Zhu et al., Cancer Res. 58(15):3209-3214 (1998)；Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179 (1998)；Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247 (1998)；Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2):177-190 (1997)；Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241 (1997)；Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301 (1997)；Taryman et al., Neuron 14(4):755-762 (1995)；Muller et al., Structure 6(9):1153-1167 (1998)；Bartunek et al., Cytokine 8(1):14-20 (1996)を参照のこと（また、これらの文献については参照により本書に組み込むこととする）。

10

【0091】

好ましいフラグメントはリガンドの結合を減弱させる、または完全に抑制する抗体を生成する。抗体は、レセプタ全体あるいはレセプタの一部に対して、たとえば、細胞内アミノ末端ドメイン、カルボキシ末端細胞外ドメイン、全膜貫通ドメイン、あるいは特異膜貫通セグメント、細胞内あるいは細胞外ロープのいずれか、またはこれらの領域のいずれかの箇所に対して生成することができる。また、たとえば、リガンド結合部位やグリコシル化されたりリン酸化されたりした部位等の特異的な機能部位に対して生成することもできる。

20

【0092】

連続培養細胞ラインによる抗体分子の生成のための技術を使用してCLEC-2に対するモノクローナル抗体を生成する。この技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術およびEBV-ハイブリドーマ技術が含まれるが、これに限定されるものではない（たとえば、Kohler, G. et al. (1975) Nature 256:495-497；Kozbor, D. et al. (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42；Cote, R. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA80:2026-2030；およびCole, S. P. et al. (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120を参照のこと）。

30

【0093】

さらに、「キメラ抗体」の生成のために開発された技術、たとえば、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に挿入して適当な抗原特異性や生物学的機能を備えた分子を得る技術を用いることもできる（たとえば、Morrison, S. L. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:6851-6855；Neuberger, M. S. et al. (1984) Nature 312:604-608；およびand Takeda, S. et al. (1985) Nature 314:452-454を参照のこと）。別の方法としては、単鎖抗体の生成について記載した技術を用いて、周知の方法でCLEC-2特異的単鎖抗体を生成することもできる。イディオタイプ組成は異なるが、関連する特異性を備えた抗体をランダム組み合わせの免疫グロブリンライブラリーからchainシャフリングにより生成することもできる（たとえば、Burton, D. R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137を参照のこと）。

40

【0094】

また、リンパ球生成における生体内(in vivo)生成を惹起したり、以下の文献に開示されているような非常に特異的な結合試薬の免疫グロブリンライブラリーあるいはパネルをスクリーニングしたりすることによっても抗体を生成することができる（たとえば、Orlandi, R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837；およびWinter,

50

G. et al. (1991) Nature 349:293-299を参照のこと)。

【0095】

抗体フラグメント、それはCLEC-2に対する特定の結合部位を備えているが、それもまた生成することができる。たとえば、かかるフラグメントには、抗体分子のペプシン消化により生成された $F(ab')_2$ フラグメントや、 $F(ab')_2$ フラグメントのジスルフィド架橋を低減させることによって生成されるFabフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、Fab発現ライブラリーを構成して、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの同定を迅速にそして容易に行うことができるようにすることもできる(たとえば、Huse, W. D. et al. (1989) Science 246:1275-1281を参照のこと)。

10

【0096】

スクリーニングして所望の特異性を有する抗体を同定するためには様々なイムノ(免疫学的)アッセイを使用することができる。確立された特異性を備えるモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれかを用いた競合的結合アッセイまたはイムノラジオアッセイについては多数のプロトコルが知られている。かかるイムノアッセイは通常、CLEC-2とその特異抗体との複合体形成の測定が含まれる。二つの非干渉CLEC-2エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた二つの部位のモノクローナルベースのイムノアッセイを通常使用するが、競合的結合アッセイも使用することができる(Pound, supra)。

【0097】

スキャッチャード(Scatchard)分析などの様々な方法をラジオイムノアッセイ技術と併せて使用して、CLEC-2抗体のアフィニティを評価することもできる。アフィニティは、関連性定数 K_d で表され、それは平衡状態での遊離抗原と遊離抗体のモル濃度に分離されるCLEC-2抗体複合体のモル濃度で定義される。多数のCLEC-2エピトープについてアフィニティが異なるポリクローナル抗体の生成用に定めた K_d がCLEC-2抗体の平均アフィニティ、あるいはアビディティを示している。特定のCLEC-2エピトープについて単一特異的であるモノクローナル抗体の生成用に定めた K_d がアフィニティを示す真の測定となっている。 $10^9 - 10^{12}$ L/moleの K_d による親和性が高い抗体の生成は、CLEC-2抗体複合体が厳しい操作に耐えなければならない免疫学的アッセイでの使用に好まれている。 $10^6 - 10^{12}$ L/moleの K_d による親和性が低い抗体の生成は、免疫生成や同等の、最終的に抗体からのCLEC-2の好ましくは活性状態での分離を要する処理での使用に好まれる。(Catty, D. (1988) Antibodies, Volume 1: A Practical Approach, IRL Press, Washington D.C.; Liddell, J. E. and A. Cryer (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York N.Y.を参照のこと)

20

30

【0098】

ポリクローナル抗体生成の滴定濃度やアビディティをさらに評価して下流でのかかる生成の質および適合性を判定することもできる。たとえば、ポリクローナル抗体の生成には、1mlにつき少なくとも1-2mgの特異抗体が、好ましくは5-10mgの特異抗体が含まれ、通常CLEC-2抗体複合体の沈降を要する処理に使用される。抗体の特異性、滴定濃度やアビディティを評価する手続や、抗体の質や様々な応用での用途についてのガイドラインは一般に入手可能である(たとえば、Catty, supra, and Coligan et al. supra.を参照のこと)。

40

【0099】

[CLEC-2を含む医薬組成物]

さらに本発明が提供するものは、CLEC-2シグナル伝達の消失による病的状態の重症度を軽減させる組成物である。組成物には、本書で定義したCLEC-2の実質的に精製されたポリペプチドあるいはそのフラグメント、あるいはその塩と以下で説明する薬学的キャリアが含まれる。他の実施形態によると、本発明はCLEC-2ポリペプチドあるいはそのフラグメントをコードした核酸および薬学的キャリアを提供する。精製したCLE

50

C - 2 または C L E C - 2 をコードした核酸のアミノ酸配列は、天然、合成、半合成または組み換えにかかわらず、あらゆる種類の動物、特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマと、好ましくは、ヒトを含む哺乳類動物から得られる。

【 0 1 0 0 】

[止血疾患の治療方法]

また、本発明は、C L E C - 2 シグナル伝達による病的状態の重症度を軽減させる方法を提供する。この方法には、リン酸化された細胞質ドメインを含む C L E C - 2 を、シグナル伝達パートナーの C L E C - 2 への結合を妨げる化合物に接触させるステップを含む。

【 0 1 0 1 】

好ましくは、病的状態には血小板活性が含まれるが、これに限定されない。

【 0 1 0 2 】

好ましくは、シグナル伝達パートナーがプロテインキナーゼの S y k ファミリーの一員である。

【 0 1 0 3 】

他の実施形態によると、本発明は、C L E C - 2 シグナル伝達による病的状態の重症度を軽減させる方法であって、哺乳動物に C L E C - 2 シグナル伝達のアンタゴニストを投与する方法を含む方法を提供する。好ましくは、病的状態には、深刻な冠不全症候群、心筋梗塞、不安定狭心症、難治性の狭心症、血栓溶解療後の冠動脈内血栓性閉塞、冠動脈血管形成術後の冠動脈内血栓性閉塞、血栓による脳血管疾患、塞栓性脳卒中、血栓性脳卒中、一過性脳虚血発作、静脈血栓症、深部静脈血栓症、肺動脈塞栓、凝固障害、播種性血管内凝固症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、閉塞性血栓血管炎、ヘパリン起因性血小板減少症に伴う血栓症、体外循環による血栓合併症、心臓または他の血管内カテーテル、大動脈内バルーンポンプ、動脈ステントあるいは心臓弁などの器具による血栓合併症、および人工器官の取り付けを要する状態が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 4 】

更なる実施形態において、本発明は、C L E C - 2 シグナル伝達の消失による病的状態の重症度を軽減させる方法であって、哺乳動物に C L E C - 2 シグナル伝達のアゴニストを投与する方法を含む方法を提供する。好ましくは、病的状態には多量出血が含まれる。

【 0 1 0 5 】

C L E C - 2 のアンタゴニストあるいはアゴニストの投与は、治療組成物として、生理学的におよび/または薬学的に許可されたキャリアにより行う。たとえば、C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストは、一般に Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th Edition, McGraw-Hill, NY (1998) に記載の方法により患者に投与することができる。キャリアの特徴は投与方法により異なる。

【 0 1 0 6 】

投与は、状態と応答性に応じてボラス投与、間欠投与あるいは連続投与とし、それは当業者が定めるとおりである。実施形態によっては、アゴニストを局所に（たとえば、intralesionally）および/または全体に（systemically）投与する。「局所投与（local administration）」は身体の所定箇所あるいは範囲に投与することであり、「全身投与（systemic administration）」は、経口摂取、筋内投与、静脈内投与、皮下投与あるいは腹腔内注入を含む器官全体への投与を意味する。

【 0 1 0 7 】

かかる組成物には、C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストとキャリアに加えて、希釈剤、賦形剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、他の周知の材料が含まれる。医薬組成物にはまた、他の活性ファクタおよび/または薬剤を含めることができ、細胞活性を減弱させたり、あるいは細胞活性を増強させたりし、好ましくは血小板活性を減弱あるいは増強させることができる。かかる追加ファクタおよび/または薬剤は医薬組成物に含めて、C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストと相乗効果を生み出すこともでき、またはアンタゴニストあるいはアゴニストによる副作用を最小限に抑えることもできる。

10

20

30

40

50

【0108】

医薬組成物の形態は、CLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを、他の薬学的に許容されるキャリアに加えて、水溶液中のラメラ層、液晶、不溶単層、そしてミセル等の凝集した形態で存在する脂質等の両親媒性薬剤と結合させたりリポソムとすることもできる。リポソムに適した脂質には、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、そして胆汁酸等が含まれるが、これらに限定されない。特に有用な一脂質キャリアはリポフェクチンである。かかるリポソムの調合は当業者の自由設計に基づくものであり、たとえば、米国特許第4,235,871;米国特許第4,501,728;米国特許第4,837,028;米国特許第4,737,323に開示されている。医薬組成物にはさらに、細胞への薬剤の伝達を強化するためのシクロデキストリン等の化合物、あるいは持続放出ポリマーを含めることができる。

10

【0109】

本発明による治療法を実施する際、治療上効果的な量の一つあるいは複数のCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを、血小板凝集の増強あるいは減弱による病気や疾患に悩む対象に投与する。アンタゴニストあるいはアゴニストの投与は、本発明の方法のみで行ってもよく、あるいは病気や疾患の他の治療法と組み合わせることもできる。他の一つまたは複数の治療と併せて投与する場合は、CLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを他の治療薬と同時に投与しても、あるいは続けて投与しても良い。続けて投与する場合には、医師が、他の治療を含めてCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニスト投与の適切な順番を決める。

20

【0110】

医薬組成物にてCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを投与し本発明の方法を実施する場合、その方法には、移植、経口投与、吸入、皮膚、皮下、筋内、腹腔内注入など従来より様々な方法がある。

【0111】

CLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを全身ではなく、局所的に、または部分的に投与する場合(たとえば、血栓の場所等)、通常の細胞組織の損取を減らす必要がある。CLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストは、アンタゴニストあるいはアゴニストを生体適合材料に混ぜ、治療部位付近にその混合物を当てることで局所的にまたは部分的に投与することができる。たとえば、poly lactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA), poly co-lactic-glycolic acid (PLGA), poly ethyleneglycol (PEG)等のポリマーをCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを含む生物腐食可能な移植片(bioerodable implants)に形成することもできる。あるいは別の方法として、周知の様々な湿布やワックスをCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストと混ぜて、身体内の該当の場所に(たとえば、血栓の場所)当てる。さらに、リポソムにCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを詰めたり、リポソム表面に蛋白を挿入しそのリポソムを、選択した細胞組織に処方したりする方法を使用することができる(Pagnan et al. (2000), J. Natl. Can. Inst. 92:253-61; Yu et al. (1999), Pharm. Res. 16:1309-15)。

30

【0112】

治療上効果的な量のCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを経口投与する場合、CLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストは、タブレット、カプセル、粉末、溶液またはエリキシル剤の形態とする。タブレットで投与すると、医薬組成物にさらにゼラチンやアジュバントなどの固体キャリアを含めることができる。タブレット、カプセルや粉末には5%から95%のCLEC-2アンタゴニストあるいはアゴニストを含めることができ、好ましくは、25%から95%を含めることができる。液状で投与すると、水、石油、動物性油や、ピーナツ油、ミネラルオイル、大豆油、ごま油、合成潤滑油などの植物性油を加えることができる。液状の医薬組成物にはさらに、生理食塩水、ブドウ糖あるいは他の糖溶液、またはエチレン・グリコール、プロピレン・グリコール、ポリエチレン・グリコールなどのグリコールを含めることができる。液状での投与では、医

40

50

薬組成物に重量で 0.5% から 95% の C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストを含めることができ、好ましくは、1% から 50% の C L E C - 2 アゴニストを含めることとする。

【0113】

治療的に効果的な量の C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストを静脈内、皮下、筋内、腹腔内注入により投与する場合、C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストは発熱物質のない、非経口投与可能な水溶液として投与する。かかる非経口水溶液は pH、isotonicity (等張性)、持続性等に期限があり、その調製は当業者の設計範囲内とする。静脈内、皮下、筋内、腹腔内注入による投与の好ましい医薬組成物には、C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストに加えて、isotonic vehicle (等張溶媒) を含めるべきである。また、医薬組成物には、安定剤、保存剤、緩衝剤、酸化防止剤や他の周知の添加剤を含めるべきである。

10

【0114】

C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストの医薬組成物中の量は、処理される状態の重症度や性質、患者が受ける事前処置によって異なる。最終的には、担当となる医師が個別の患者を治療する際に C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストの量を定める。同様に、医薬組成物を用いた静脈内治療の期間は、治療する病気の重症度や各患者の状態と潜在的な特異体質反応によって変わる。最終的に、本発明の医薬組成物を使用した静脈内治療の適切な治療期間は、担当の医師が決める。最初、医師は少ない量の C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストを投与して患者の反応を観察する。最高の治療効果が出るまで、C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストの量を増やし、最高の治療効果が出たら、投与量を増やすことはない。

20

【0115】

本発明の方法を実践するのに使用する様々な医薬組成物には、患者の体重 1 kg 当たり約 10 μg から 20 mg の C L E C - 2 アンタゴニストあるいはアゴニストを含めるべきであると考えられる。

【0116】

(実施例)

本書で説明してきた発明をよりよく理解するため、以下の例を説明する。これらの例は一例にすぎず、いかなる方法でも本発明を制限するものではないことを理解されたい。

30

【0117】

実施例 1 : C L E C - 2 のシグナル伝達の判定に用いる材料および方法

a) 動物と実験材料

遺伝子操作された P L C 2、Syk、LAT、SLP-76 および Vav1/3 欠損マウスは、先に説明したようにして入手した (非特許文献 17-21)。ロドサイチンは *Calloselasma rhodostoma* の毒から精製した (非特許文献 11, 22)。ポリクローナル C L E C - 2 抗体は R & D systems (アメリカ、ミネアポリス) から得た。ポリクローナルウサギロドサイチン抗体は Takashi Morita と Gavin Laing より得た。Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) ペプチド (SEQ ID NO: 5) はペプチド研究所 (大阪府) より購入した。Ser-Phe-Leu-Leu-Asn (SFLLN) ペプチド (SEQ ID NO: 6) (トロンビン受容体アゴニストペプチド) は Bachem Biochemica (ドイツ、ハイデルベルグ) より購入した。C L E C - 2 の Y X X L モチーフを含むビオチンラベルしたリン酸化、あるいはリン酸を含まないペプチド (Biotin-6-Aminohexanoic acid (Ahx)-MQDEDGY (PO₃H₂) ITLNIK-OH (SEQ ID NO: 7) と Biotin-6-Aminohexanoic acid (Ahx)-MQDEDGYITLNIK-OH) (SEQ ID NO: 7) はクラボウで合成した (大阪府)。その他の実験材料は先の報告通りである (非特許文献 6, 17, 21)。

40

【0118】

b) 血小板の調整

薬を服用していない、健康な供血ボランティアの静脈血を 10% チトラート (クエン酸ナトリウム) にて採取した。マウスは二酸化炭素で安楽死させた後、門脈から 100 μl

50

の A C D (acidcitrate dextrose) を用いて採血した。ヒトとマウスの洗浄血小板は、プロスタサイクリンを用いて隔離工程 (非特許文献 17) の間の活性化を抑えつつ、遠心分離によって先の報告通りに得た。二つの洗浄血小板とも修飾 Tyrode バッファー (非特許文献 17) に、血小板数 2×10^8 あるいは $1 \times 10^9 / \text{ml}$ になるように浮遊させた。

【 0 1 1 9 】

c) ロドサイチンコートビーズを用いた免疫沈降

200 μg の精製ロドサイチンを、122 mg の C N B r 活性化 Sepharose 4B ビーズに、メーカーの取扱説明書にしたがって共有結合させた。グリシンコートビーズをネガティブコントロールに使用した。洗浄血小板表面の膜蛋白またはロドサイチンを ECL Protein Biotinylation System (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) を用いてピオチンラベルした。1 ml のピオチンラベルした、あるいはピオチンラベルしていない洗浄血小板 ($1 \times 10^9 / \text{ml}$) を等量の 2 倍濃縮冷却溶解バッファー (非特許文献 17) で溶解し、100 μl の Sepharose 4B (50% スラリー) で 1 時間プレクリアした。界面活性剤に溶解しない成分を 15000 g で 10 分間遠心して除き、上清を 200 μl のロドサイチンあるいはグリシンコートビーズと 4 で 4 時間反応させた。ビーズは溶解バッファーで 5 回洗浄し、蛋白を 40 μl の還元 SDS サンプルバッファーで溶解し、5 分間加熱した。免疫沈降した蛋白を 4 - 20% SDS - PAGE で分離し、P V D F 膜に転写した。ピオチンラベルされた表面蛋白は西洋わさびペルオキシダーゼを結合したストレプトタオアビジンで検出した。P V D F 膜に転写したラベルのない血小板蛋白はピオチンラベルされたロドサイチンと西洋わさびペルオキシダーゼを結合したストレプトタオアビジンで

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

d) 蛋白消化とマス・スペクトロメトリー分析

上述のようにゲル片を speed-vac で乾燥させて、ゲル中でトリプシン処理した (非特許文献 23)。H P L C (CapLC, Waters, Milford, MA, USA) はナノエレクトロスプレーを備えた Q - T O F マススペクトロメーター (Micromass, Manchester, UK) に結合していた。H P L C の移動相は 5% アセトニトリル、0.1% 蟻酸 (溶媒 A) と 95% アセトニトリル、0.1% 蟻酸 (溶媒 B) であった。トリプシン処理したペプチドを 300 μm 径、5 mm 長の C18 PepMap プレカラム (LC packings, San Francisco, CA, USA) に加えて脱塩し、200 nl / min の速さで 75 μm 径、25 cm 長の C18 PepMap ナノカラム (LC packings, San Francisco, CA, USA) に、5 - 40% 溶媒 B を 40 分と、40 - 80% 溶媒 A を 3 分用いて溶出した。M S / M S 分析は以前の報告通りに行った (非特許文献 24)。データベース検索は MASCOT search tool (Matrix Science, London, UK) を用いて、SWISS-PROT を検索した。図 1 (c) は MASCOTMS search による SWISS-PROT 検索の結果を示す編集データ出力ファイルを示している。八つの一致ペプチドには、TGTLQQLAK (S E Q I D N O : 8), YYGDSCYGFRR (S E Q I D N O : 9), THLIR (S E Q I D N O : 10), NYLQDENENR (S E Q I D N O : 11), RFCQVVVK (S E Q I D N O : 12), FCQYVVVK (S E Q I D N O : 13), HYLMCER (S E Q I D N O : 14), MHPTFCENK (S E Q I D N O : 15) が含まれる。

【 0 1 2 1 】

e) 細胞培養と細胞刺激

C L E C - 2 を tet repressor 蛋白の元で、293T - R E x ^{T M} セルラインに、以前の報告のように発現させた (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) (非特許文献 25)。C L E C - 2 の発現は、実験の 24 - 48 時間前に 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のドキシサイクリンを培地に加えることで誘導した。溶媒を加えた細胞をコントロールとした。細胞を分離させ、改変 Tyrode バッファーに浮遊させた (非特許文献 6)。ドキシサイクリン処理あるいは溶媒で処理した細胞を、500 nM ロドサイチンで 37 で 10 分間刺激した。細胞を 2 倍濃縮 SDS サンプルバッファーで溶解した後、反応を止めた。蛋白のチロシンリン酸化ある

いはCLEC-2の発現は、抗リン酸化チロシン抗体(4G10)と抗CLEC-2抗体でウェスタンブロットして検出した(非特許文献17)。

【0122】

f) フローサイトメーター

ヒト洗浄血小板($1 \times 10^8 / \text{ml}$)と293T-REx^TM細胞($5 \times 10^6 / \text{ml}$)を、 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗CLEC-2抗体で15分処理した後、FITCラベル抗ヤギIgG抗体ともう15分、室温で反応させた。PBSで3倍に希釈した後、FACScanフローサイトメーターと解析ソフトCellQuest software (Becton Dickinson, SanJose, CA)を用いて報告通りに解析した(非特許文献17)。ロドサイチンの直接結合を検出するため、ドキシサイクリンを加えた293T-REx^TM細胞($5 \times 10^6 / \text{ml}$)あるいは加えてない293T-REx^TM細胞($5 \times 10^6 / \text{ml}$)を100nMロドサイチンと室温で15分予め孵置した。余分なロドサイチンを遠心分離で取り除いた後、細胞を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のコントロールウサギIgGまたは抗ロドサイチン抗体と20分室温で孵置した。ついで、サンプルをFITCラベル抗ウサギIgG抗体と反応させ、上述の通り分析した。

10

【0123】

g) 免疫沈降とウェスタンブロット

1mMのGRGDS(SEQ ID NO:5)ペプチドで処理したヒト洗浄血小板($1 \times 10^9 / \text{ml}$)あるいは血小板凝集を抑制するロトラフィバン $10 \mu\text{M}$ を加えたマウス洗浄血小板($2 \times 10^8 / \text{ml}$)を50nMのロドサイチン、 $100 \mu\text{M}$ のSFLLN(SEQ ID NO:6)、あるいは $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ コラーゲンで一定時間刺激した。記載のあるところでは、 $30 \mu\text{M}$ のPP2(Srcキナーゼ抑制剤)あるいはPP3(PP2の不活性類似物)を加えて、37℃で10分間孵置した。2倍濃縮冷却溶解バッファーを加えて反応をとめた。血小板溶解液はプレクリアリ、界面活性剤に溶解しない成分を上述の通り除いた(非特許文献17)。上清の一部を除き、SDSサンプルバッファーで溶解し、全細胞の蛋白質チロシンリン酸化検出用とした。残りの上清に抗CLEC-2抗体、抗PLC-2抗体、抗Syk抗体、抗Btk抗体、抗SLP-76抗体、抗LAT抗体、抗Vav1抗体又は抗Vav3抗体を加えて、一晚反応させた。記載のあるところでは、 $10 \mu\text{g}$ のCLEC-2のYXXLを含むペプチドとアビジンビーズ、あるいはGST融合蛋白とグルタチオンビーズ(glutathione Sepharose)を反応させた。記載した実験では、洗浄ヒト血小板($1 \times 10^9 / \text{ml}$)を、FcγRIIA抗体(IV.3, $10 \mu\text{g} / \text{ml}$)の抗F(ab)₂フラグメントの存在下で $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗CLEC-2抗体あるいはコントロールヤギIgGで刺激した。刺激の前と刺激の5分後でサンプルを2倍濃縮溶解バッファーに溶解させた。刺激前の溶解サンプルに $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗CLEC-2抗体とコントロールヤギIgGを加えた。コントロールヤギIgGに刺激されたサンプルと、抗CLEC-2抗体に刺激されたサンプルにそれぞれ、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗CLEC-2抗体あるいはコントロールヤギIgGを加えた。遠心分離により不溶成分を取り除いた後、蛋白質Gを加えることによってCLEC-2を免疫沈降させた。免疫沈降された蛋白あるいは全血小板溶解液は、SDS-PAGEで電気泳動、PVDF膜に転写の後、記載の抗体でウェスタンブロットされた。

20

30

40

【0124】

h) 血小板凝集

ヒト洗浄血小板($2 \times 10^8 / \text{ml}$)を、FcγRIIA抗体(IV.3, $10 \mu\text{g} / \text{ml}$)の抗F(ab)₂フラグメントの存在下で $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗CLEC-2抗体あるいはコントロールヤギIgGで刺激した。ヒトまたはマウス洗浄血小板($2 \times 10^8 / \text{ml}$)を本文に記載の低濃度、高濃度のロドサイチンで刺激した。凝集は透過光法で、説明したBornの血小板凝集計を用いて測定した(非特許文献17)。

【0125】

実施例2: CLEC-2はロドサイチンビーズに結合する。

膜表面蛋白をビオチンラベルした血小板溶解液から、蛇毒の結合蛋白を分離するため、

50

我々はロドサイチンまたはグリシンを共有結合したSepharose 4Bビーズを使用した。ストレプトアビジンを使用したウェスタンブロットでは、グリシンではなくロドサイチンSepharose 4Bビーズが32 kDaの表面蛋白を結合し、それが両方のビーズに非特異的に結合する他の複数の蛋白とともに沈降している(図1A)。同じ32 kDaバンドがまた、ビオチンラベルされていない血小板のグリシンではなくロドサイチンビーズに結合しており、それはロドサイチンを用いたリガンドブロットによって検出されている(図1B)。32 kDaの部分に相当するゲルの部分を切り取り、トリプシン消化してMS/MS分析にかけた。これにより、CLEC-2が32 kDaの構成成分であると同定された(図1C)。CLEC-2の血小板表面への発現はCLEC-2特異抗体を用いて、フローサイトメーターと、ウェスタンブロットで確認した(図1Dおよび1E)。興味深いことに、CLEC-2は、ウェスタンブロットで32 kDaの主バンドと40 kDaの副バンドの二重バンドとして検出された(図1E)。前者はロドサイチンビーズによる結合である。ロドサイチンアフィニティ溶出液中に40 kDaバンドが明らかに欠如しているのは、非特異的蛋白と共に移動すること(図1Aのみ)によるか、あるいは40 kDaの発現のレベルが低いことに加えてリガンドブロットアッセイにおける感度に制限があることによると思われる。重要なことは、グリシンではなくロドサイチンビーズによる32 kDaバンドと40 kDaバンドの結合はCLEC-2の特異抗体を使用して検出することができることであり、40 kDaバンドのレベルが32 kDaのレベルよりもはるかに低いが、そのことは血小板での結果に一致している(図1F)。複数の血小板サンプルからの抗CLEC-2ウェスタンブロット濃度分析により40 kDaの発現レベルが32 kDaバンドの23.1 ± 5.3%であることが明らかになった(図1G)。

10

20

【0126】

以上より、CLEC-2が血小板表面の新たなロドサイチン結合蛋白として同定された。興味深いことに、CLEC-2はタイプIIの膜貫通型Cタイプレクチンスーパーファミリーで、細胞内ドメインにひとつのチロシン残基をYXXLモチーフの中に持ち、チロシンキナーゼの経路を通じてシグナル伝達が可能であることを示唆している。CLEC-2の血小板での発現は以前に報告されていなかったし、シグナリング受容体としての機能も知られていなかった。

【0127】

実施例3：ロドサイチンはCLEC-2発現細胞ラインでチロシンリン酸化を惹起する。CLEC-2がロドサイチン受容体であること、そしてチロシンキナーゼの細胞内シグナルの生成能力を確認するため、我々は以前報告されていたtet repressorタンパクの制御下でCLEC-2を発現する細胞ラインを利用した。ドキシサイクリンを、核酸を入れた293T-REX^TM細胞に加えると、CLEC-2が表面に発現した。これはレクチンレセプタの特異抗体を用いるか(図2A)、あるいはロドサイチンとロドサイチン抗体の結合(図2B)を用いて測定することができる。さらに、コントロールIgGではなく特異抗体を用いたCLEC-2のウェスタンブロットでは、ドキシサイクリン処理された非コントロール細胞におよそ32と40 kDaの主要な二つのバンドと、34 kDaの薄いバンドが確認された(図2C)。CLEC-2に対して複数のバンドが認められるのは血小板と同様であった。3つのバンドは一つの細胞ラインより検出され、40 kDaバンドが32 kDaバンドと同じレベルで確認されている。重要なことに、ロドサイチンはドキシサイクリン処理(CLEC-2発現)細胞においていくつかの蛋白質チロシンリン酸化の増加を惹起したが、溶媒処理細胞では惹起しなかった(図2D)。以上より、CLEC-2がロドサイチンの機能的な受容体であることが確認された。

30

40

【0128】

実施例4：CLEC-2の抗体を用いた血小板の活性化

発明者はCLEC-2抗体を使用して、レクチンレセプタが他のレセプタからのシグナル伝達がないときに血小板の活性化を惹起させることができるか否か調べた。この実験では、ロドサイチンが少なくとも他の二つの血小板レセプタ、すなわちインテグリン 21とGPIbに結合することに注意する必要がある(非特許文献12-14)。図3A

50

に示すように、CLEC-2抗体は特徴的な遅れの後で血小板凝集を惹起させている。この実験はモノクローナル抗体IV.3の存在下で行われ、抗体のFc部分のFc RIIAへの結合が妨げられている。コントロールヤギIgGは凝集を惹起しなかった。重要なことに、コントロールヤギIgGではなく、CLEC-2抗体が、CLEC-2の32kDaと40kDa形態の基礎にチロシンリン酸化の増強を惹起させ、これはCLEC-2の免疫沈降とリン酸化チロシン、つまりはCLEC-2についてのウェスタンブロットにより確認できた(図3B)。CLEC-2は細胞質尾部に単一のチロシンを有するので、リン酸化はYXXLモチーフで行われたと考えられる。これらの結果より明らかなのは、他のレセプタからのシグナル伝達がなくともCLEC-2の活性により十分に血小板活性を惹起させることである。さらに、レクチンレセプタがチロシンリン酸化の基礎となっていることが確認されたことにより、CLEC-2による血小板活性の潜在的なメカニズムが明らかになった。

10

【0129】

実施例5：CLEC-2はSrcキナーゼによりチロシンリン酸化される

ロドサイチンは血小板凝集を、特徴的な長いラグタイムを伴って惹起し、そのラグタイムは毒濃度の増加に伴って減少する(図3A)。比較的高い濃度のロドサイチン(300nM)で、活性化はほぼ30秒送れて開始される(図4A)が、これは蛇毒素が低いのでかなり長い時間である。これを踏まえて、ロドサイチンによる細胞溶解物全体におけるチロシンリン酸化の惹起は、血小板凝集と同じようなタイムスケールで起こり、ロドサイチンの濃度が高ければ高いほど急速に惹起されることになる(図示せず)。意味深いことに、CLEC-2のほぼリン酸化と思われる現象がロドサイチンに応じて60秒後に見受けられた。これは、形態変化の反応および凝集の始まりのピークに対応する(図4A, B)。これは、同じく、量に応じて遅れて発生し、コラーゲンレセプタの一部をなすFcレセプタ-chainと血小板溶解物のチロシンリン酸化の増加とともに、コラーゲンによる血小板凝集のタイムコースを思い出させるものである(非特許文献27)。

20

【0130】

ロドサイチンによる血小板活性化におけるチロシンリン酸化の意義は、(図示しないが)ロドサイチン(非特許文献13)の刺激に応じて全細胞と全ての機能的な反応においてチロシンリン酸化を抑制するSrcファミリーキナーゼの抑制剤PP1あるいはPP2によって示される。注目すべきは、PP2がまた、CLEC-2のチロシンリン酸化が血小板活性を惹起させる可能性と合わせてCLEC-2の32kDaと40kDaの両方のチロシンリン酸化を抑制する(図4C)ことであり、不活性類似物であるPP3にはこの作用はない。対照的に、CLEC-2は、タイムコース中5分までの間コラーゲンやトロンビン受容体PAR-1の活性化ペプチドSFLLNではリン酸化されず(図4D)、レクチンレセプタのみが直接的な活性化によりリン酸化されることを示している。

30

【0131】

発明者は以前、ロドサイチンが血小板中のSykをチロシンリン酸化することを報告した。このCLEC-2が単一のYXXLモチーフでチロシンリン酸化を受け、YXXLモチーフがITAM配列の半分をなしているという観察により、レクチンレセプタがSykを細胞質内尾部に結合させることによってシグナル伝達し、コラーゲンレセプタGPVIと同じようなシグナル伝達を起こしている可能性が高まった。この可能性を支持することに、ロドサイチンはSykとその他のGPVICASCADEにおける主要なシグナル伝達蛋白をチロシンリン酸化した。この中には、チロシンキナーゼBtk、アダプター蛋白LAT、SLP-76、GTPaseのVav1とVav3、そしてPLC2が含まれる(図4E, 図5A)。これらの蛋白質チロシンリン酸化はSykと同じである(図4E)。これらの蛋白質チロシンリン酸化はSrcキナーゼ抑制剤PP2で完全に抑制された(図示せず)。

40

【0132】

実施例6：Sykはロドサイチンによる血小板活性化を起こしている。

チロシンキナーゼ欠損マウス血小板を使用して、ロドサイチンによるシグナル伝達にお

50

ける Syk の機能的役割をさらに調べた。ロドサイチンは、マウス血小板の健常なチロシンリン酸化を惹起し、それは Syk の欠損で完全に抑制される (図 5 A)。ロドサイチンによるシグナル伝達における Syk の重要な役割は、Syk 欠損血小板における Vav ファミリー、Vav 1 と Vav 3 の二つと PLC 2 のリン酸化の完全な欠如によって示される (図 5 A)。さらに、ロドサイチンによる凝集と形態変化は Syk の欠損で完全に抑制される (図 5 B)。これらの結果よりロドサイチンの血小板活性における Syk の最も上流での役割が確認できる。

【0133】

CLEC-2 のチロシンリン酸化が Syk の結合と、その下流でチロシンリン酸化のシグナル伝達カスケードを起こしているという可能性を、Syk の二つの SH2 ドメインをコードする GST の融合蛋白を用いて検討した。Syk の融合蛋白はロドサイチン刺激後の血小板で、32 / 42 kDa の CLEC-2 を同じレベルで結合したが、コントロール血小板では結合が見られなかった。一方で CLEC-2 の結合が Src キナーゼ抑制剤 PP2 によって抑制された (図 5 C i)。さらに、Syk の融合蛋白はロドサイチンの刺激から 30 秒以内に CLEC-2 の結合を起こさせ、このことは、それが形態変化と凝集の開始と並行して起こっていることを示しており、GPVI アゴニストコンバルキシンでは起こらず (図 5 C i i)、規則の特異性を確認した。この結果に沿って、Syk は、CLEC-2 の細胞質尾部の YXXL モチーフを含むリン酸化したペプチドに結合することができ、同等のリン酸化していないペプチドでは作用はなかった (図 5 C i i i)。これらの結果から、Syk が CLEC-2 のリン酸化した尾部と結合し、下流のシグナル伝達を惹き起しているというモデルが支持される。しかしながら、発明者は、刺激した血小板でのこの結合を CLEC-2 と Syk の抗体を使用した免疫沈降法を通じて確認することができなかったが、それは恐らく Syk の SH2 ドメインと単一の YXXL 配列の結合が弱く、それにより複合体が不安定になったためと考えられる。

【0134】

実施例 7 : ロドサイチン惹起シグナル伝達における LAT , SLP-76 , Vav 1 / 3 , PLC 2 の重要性

我々は、遺伝子操作マウスの血小板を使用してロドサイチンの刺激によりチロシンリン酸化が行われる複数の蛋白の役割を確立させた。ロドサイチンについては低濃度 (3 - 10 nM) と中間濃度 (20 - 30 nM) を使用して、濃度を増加させた蛇毒で抑制効果が克服できるかどうか確かめた。低濃度ロドサイチンに対する反応は PLC 2 の欠損状態では完全に消失したが、中間濃度ではわずかに形態変化が認められる。これはおそらく、低レベルの PLC 1 のためと考えられる (非特許文献 17) (図 6 A)。LAT , SLP-76 , Vav 1 / 3 の欠損状態では低濃度ロドサイチンに対する反応は大きく抑制されたが、高濃度の蛇毒に対してはほぼ凝集の完全な反応が認められた (図 6 B - D)。LAT と PLC 2 の結果は、蛇毒コンバルキシンまたは GPVI 特異的コラーゲンペプチド (CRP) をアゴニストとして使用して GPVI による遺伝子操作マウスの刺激により得られた結果と同じであった (非特許文献 17 , 19)。対照的に、高濃度のロドサイチンが SLP-76 欠損状態で、または Vav 1 と Vav 3 が併せて欠けている状態で最大限の凝集を惹起するという観察は、凝集がかなり抑制されたコンバルキシンや CRP の観察とは対照的である。これらの観察により、CLEC-2 のシグナル伝達経路がコラーゲンレセプターの GPVI で使用するシグナル伝達経路と異なることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図 1】CLEC-2 のロドサイチンコートピースとの結合を示す図である。A) は、洗浄血小板をピオチン化して、等量の 2 倍濃縮溶解バッファーで溶解し、洗浄血小板をプレクリアし、ロドサイチンあるいはグリシンが結合した Sepharose 4B (gly-Seph) と 4 で 4 時間反応させた。十分な洗浄の後、蛋白を還元 SDS サンプルバッファーでピースから溶出した。結合してきた血小板蛋白を 4 - 20 % の SDS - PAGE で分離し、西洋わさびペルオキシダーゼラベルストレプトアビジン (avidin-HRP) で検出した。このデータは

2回の実験を示している。B) (A)に記載したように、ラベルを付していない洗浄血小板を用いて、沈降と電気泳動を行った。リガンドプロットをビオチンラベルしたロドサイチン (rhodocytin-biotin) と avidin-HRP により行った。C) Mascot MS による Swiss-prot の検索結果の出力データ表である。D) 洗浄ヒト血小板をコントロールヤギ IgG 抗体あるいは抗 CLEC-2 抗体と反応させ、続いて FITC ラベル抗ヤギ IgG と反応させてから、Becton Dickinson の FACScan で分析した。E) 洗浄血小板を 4 倍濃縮 SDS サンプルバッファーで溶解した後、SDS-PAGE を行い、抗 CLEC-2 抗体 (左図) とコントロールヤギ IgG (右図) ウェスタンブロットで検出した。このデータは 5 回繰り返された実験のうちの一例である。F) (B) で使用した細胞膜を抗 CLEC-2 抗体で再度調べた。G) (E) における 32、40 kDa の CLEC-2 バンドについてデンシトメトリック分析を Molecular Imager FX and Quantity One (BIO-RAD) ソフトウェアで行った。32、40 kDa バンドの比較強度を \pm S.E. (n=4) を基準として表した。

【図 2】ロドサイチンに対する CLEC-2 発現 293T-REx^TM 細胞の選択的応答を示す図である。(A) tet repressor 蛋白の元で CLEC-2 を発現する 293T-REx^TM を、24-48 時間 1 μ g/ml のドキシサイクリンで培養した。5 \times 10⁶/ml の細胞を抗 CLEC-2 抗体あるいは isotype matched control で培養し、Facscan で分析した。(B) ドキシサイクリンを加えた、あるいは加えない 5 \times 10⁶/ml の 293T-REx^TM 細胞を 100 nM のロドサイチンであらかじめインキュベートした。過剰なロドサイチンを遠心分離により除き、細胞をコントロールウサギ IgG あるいは抗ロドサイチン抗体で処理し、続いて FITC ラベル抗ウサギ IgG で染色した。C) 10 分間 500 nM ロドサイチンで刺激した細胞と、刺激しなかった細胞を SDS サンプルバッファーで溶解した後、SDS-PAGE で分離した。蛋白のチロシンリン酸化を抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) を用いてプロットして検出した。D) 1 \times 10⁷/ml の細胞を 4 倍濃縮 SDS サンプルバッファーで溶解した。蛋白を SDS-PAGE で分離し、抗 CLEC-2 抗体 (左図) とコントロールヤギ IgG (右図) でウェスタンブロットして検出した。このデータは 2-3 回繰り返された実験のうちの一例である。

【図 3】抗 CLEC-2 抗体を用いて CLEC-2 を架橋することにより惹起された血小板凝集および CLEC-2 チロシンリン酸化を示す図である。A) 洗浄ヒト血小板 (2 \times 10⁸/ml) を 10 μ g/ml の抗 CLEC-2 抗体あるいはコントロールヤギ IgG で、抗 Fc γ RIIA 抗体 (IV.3) の F(ab)₂ フラグメントの元で刺激した。血小板凝集を血小板凝集計で観察した。B) 上記の刺激の後、洗浄ヒト血小板 (1 \times 10⁹/ml) を 2 倍濃縮 SDS 溶解バッファーで溶解した。CLEC-2 は免疫沈降し、続いて、CLEC-2 に対し、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) あるいはモノクローナル抗 CLEC-2 抗体によりウェスタンブロットを行った。このデータは 4 回繰り返された実験のうちの一例である。

【図 4】ロドサイチン刺激による CLEC-2 のチロシンリン酸化と、GPVI 下流のシグナル伝達分子のチロシンリン酸化を示す図である。A) 洗浄ヒト血小板 (2 \times 10⁸/ml) を 300 nM ロドサイチンで刺激し、血小板凝集を血小板凝集計で測定した。B-E) 洗浄ヒト血小板 (1 \times 10⁹/ml, 300 μ L 又は 500 μ L) を 300 nM ロドサイチン (B)、50 nM ロドサイチン (C-E)、50 μ g/ml のコラーゲンまたは 100 μ M SFLLRN (SEQ ID NO:6) で所定時間刺激した。D) 血小板にはロドサイチン刺激の前に 30 μ M の PP2 又は PP3 を加えた。等量の 2 倍濃縮溶解バッファーを加えて反応を終えた。溶解した血小板はプレクリアした後、不溶成分を遠心分離した。残りの上清には、それぞれ抗 CLEC-2 抗体 (B)、抗 PLC γ 2 抗体、抗 Syk 抗体、抗 Btk 抗体、抗 SLP-76 抗体、又は抗 LAT 抗体 (E) を加え、プロテイン A セファロースビーズ又はプロテイン G セファロースビーズを加え、一晚反応させた。結合してきた蛋白を SDS-PAGE で分離し、上述の抗体を用いてウェスタンブロットし検出した。このデータは 2-5 回繰り返された実験のうちの一例である。

【図 5】Syk が CLEC-2 による血小板活性化機構の下流で重要な役割を果たしてい

10

20

30

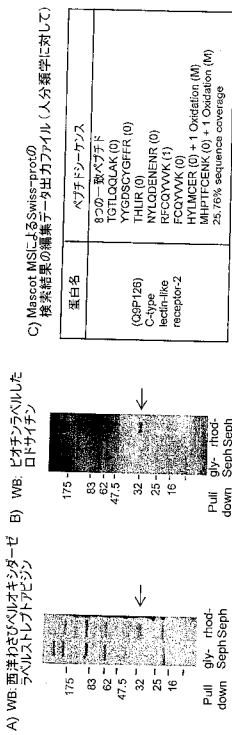
40

50

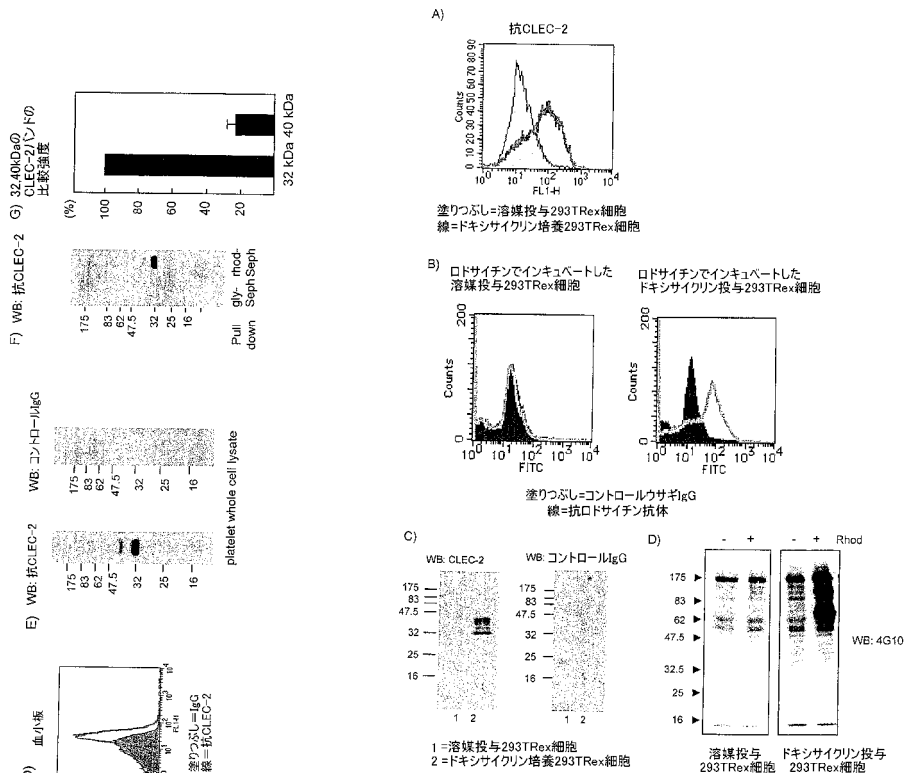
ることを示す図である。(A) 洗浄マウス血小板をロドサイチン50 nMで所定時間刺激する。細胞溶解物あるいは免疫沈降物をPLC 2、Vav1またはVav3に対する抗体とともに、SDS-PAGEで分離し、上述の抗体を用いてウェスタンブロットした。(B) コントロールあるいはSyk欠損血小板を30 nMロドサイチンで刺激し、血小板凝集を血小板凝集計で測定した。(C) (i) (ii) 洗浄したヒト血小板を、あらかじめ30 μMのPP2で、あるいはPP2なしで処理し、50 nMのロドサイチンあるいは10 μg/mlのコンバルキシンで所定の時間刺激した。等量の2倍濃縮溶解バッファを加えて反応を終えた。溶解した血小板はプレクリアした後、不溶成分を遠心分離した。残りの上清は、40 μlのSyk-SH2ドメイン融合蛋白結合グルタチオンビーズを加え、反応させた。結合してきた蛋白をSDS-PAGEで分離し、CLEC-2抗体を用いてウェスタンブロットし検出した。(iii) 10 μgのCLEC-2リン酸YXXLペプチドとアビジンセファロースの混合物に結合したCLEC-2を抗CLEC-2抗体で検出した。このデータは2-5回繰り返された実験のうちの一例である。

【図6】ロドサイチン惹起血小板凝集がPLC 2欠損マウス、LAT欠損マウス、SLP-76欠損マウス又はVav1/3欠損マウスで抑制されることを示す図である。洗浄した健常マウス血小板、PLC 2欠損マウス血小板、LAT欠損マウス血小板、SLP-76欠損マウス血小板又はVav1/3欠損マウス血小板を、示された濃度のロドサイチンで刺激し、血小板凝集を凝集計で測定した。このデータは3-6回繰り返された実験のうちの一例である。

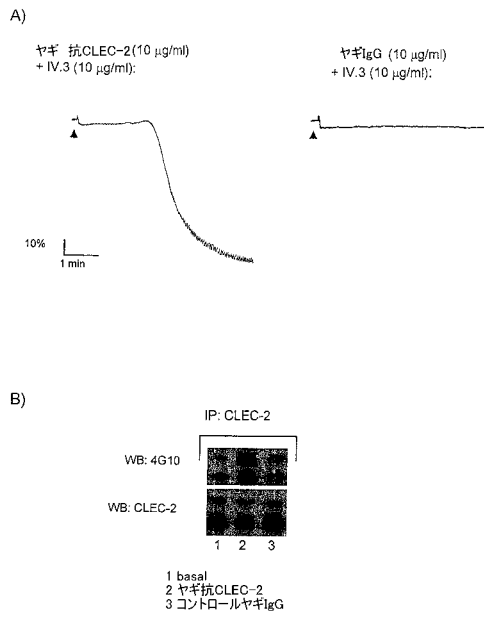
【図1】



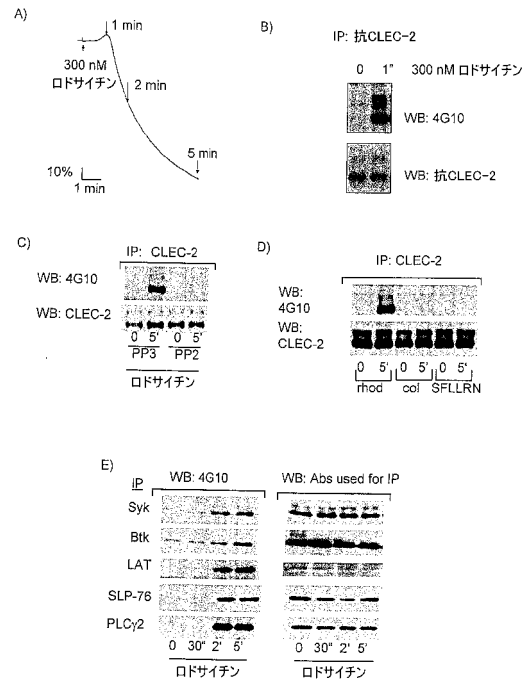
【図2】



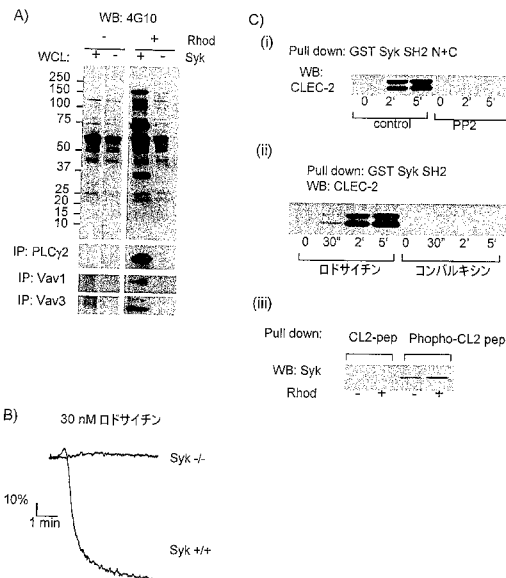
【 図 3 】



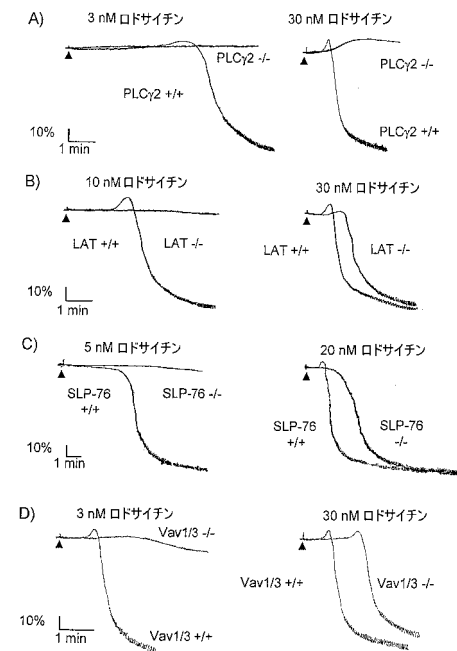
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2008539694000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2006/309066 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12Q1/02, A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61P9/10 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2006 Registered utility model specifications of Japan 1996-2006 Published registered utility model applications of Japan 1994-2006 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus (JDream2) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| PX | Suzuki-Inoue Katsue et al., "A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2", Blood, Jan. 2006, Vol.107, No.2, pp.542-549. | 1-24,30-34 |
| PX | Andrew C. Pearce et al., "Signaling by the Platelet C-Type Lectin Receptor CLEC-2 Is Mediated by a Novel Mechanism Involving Syk and a Single YxxL Motif." Blood, Nov. 2005, Vol.116 (11, Part 1), p.115A. | 1-24,30-34 |
| PX | Aleksandra A. Watson et al., "Crystallization and X-ray diffraction analysis of human CLEC-2", Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, Dec. 2005, | 1-24,30-34 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 19.07.2006 | | Date of mailing of the international search report 08.08.2006 |
| Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan | | Authorized officer Susumu HIKICHI Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3488 |
| | | 4N 9549 |

INTERNATIONALSEARCHREPORT

| |
|----------------------------------------------------|
| International application No. PCT/JP2006/309066 |
|----------------------------------------------------|

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| | Vol.61, Part 12, pp.1094-1096. [online] [retrieved on 2006-05-26]. Retrieved from the Internet:<URL: http://journals.iucr.org/f/issues/2005/12/00/115044/115044bdy.html >. | |
| <u>X</u> A | Marco Colonna et al., "Morecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed human dendritic cells", Eur. J. Immunol., 2000, Vol.30, No.2, pp.697-704. | <u>30-34</u> 1-24 |
| A | Yuri Sobanov et al., "A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex", Eur. J. Immunol., 2001, Vol.31, No.12, pp.3493-3503. | 1-24 |
| A | Wolfgang Bergmeier et al., "Rhodocytin (Aggretin) activates platelets lacking alpha2beta1 Integrin, Glycoprotein VI, and the ligand-binding domain of Glycoprotein Ibalpha", J.Biol.Chem., 2001, Vol.276, No.27, pp.25121-25126. | 1-24 |
| A | Alexei Navdaev et al., "Aggretin, a heterodimeric C-type lectin from Calloselasma rhodostoma (Malayan Pit Viper), stimulates platelets by binding to alpha2beta1 Integrin and Glycoprotein Ib, activating Syk and Phospholipase Cgamma2, but does not involve the Glycoprotein VI/Fc receptor gamma chain collagen receptor", J.Biol.Chem., 2001, Vol.276, No.24, pp.20882-20889. | 1-24 |
| A | Suzuki-Inoue Katsue et al., "Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with Glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin alpha2beta1)", J. Biol. Chem., 2001, Vol.276, No.2, pp.1643-1652. | 1-24 |

INTERNATIONALSEARCHREPORT

| |
|----------------------------------------------------|
| International application No. PCT/JP2006/309066 |
|----------------------------------------------------|

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | James Woodworth et al., "Pharmacokinetics of single-agent lumiliximab (anti-CD23 antibody) in patients with chronic lymphocytic leukemia," <i>Blood</i> , 2004 Nov., Vol.104 (11, Part2), p.290B. [online] [retrieved on 2006-07-19]. Retrieved from the Internet: <URL: http://meeting.bloodjournal.org/cgi/content/abstract/104/11/4831?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=woodworth&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=104&issue=11&resourcetype=HWCIT >. | 30-32 |
| A | Kazutaka Hayashida et al., "Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) supports adhesion of mononuclear leukocytes and a monocyte-like cell line THP-1 cells under static and flow conditions," <i>FEBS Letters</i> , 2002, Vol.511, pp.133-138. | 30-32 |
| A | Valerie Bigouret et al., "Monoclonal T-cell expansions in asymptomatic individuals and in patients with large granular leukemia consist of cytotoxic effector T cells expressing the activating CD94:NKG2C/E and NKD2D killer cell receptors," <i>Blood</i> , 2003, Vol.131, No.8, pp.3198-3204. | 33-34 |
| A | Naoki Matsumoto et al., "H-2 allele specificity of the NK cell C-type lectin-like MHC class I receptor Ly49A visualized by soluble Ly49A tetramer," <i>International Immunology</i> , 2001, Vol.13, No.5, pp.615-623 | 33-34 |

INTERNATIONALSEARCHREPORT

International application No.

PCT/JP2006/309066

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

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

1. Claims Nos.: 25-29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 25-29 recites a method for reducing the severity of a pathological state mediated by CLEC-2 signaling. The language [reducing the severity of a pathological state] is construed as a method of treating a disease. Furthermore, the method substantially includes treatment practiced on a human or animal body. Therefore, the subject matter of Claim 25-29 relates to [a method for treatment of the human or animal body by therapy], which does not require an international search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and [Rule 39.1(iv)].
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Claim 1-24 relates to [a method for screening compounds to identify therapeutic candidates for treating hemostasis disorders].

Claim 30-32 relates to [a CLEC-2 antagonist comprising an antibody binding to CLEC-2, having no connection with these disorders].

Claim 33-34 relates to [a pharmaceutical composition, not only limited for hemostasis disorders but also for any disorder mediated by CLEC-2].

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

Remark on Protest

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

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 38/00 (2006.01) | A 6 1 K 37/02 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 P 7/02 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 0 5 | |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 7/02 | |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| 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) | A 6 1 P 9/10 | |
| | G 0 1 N 33/15 Z | |
| | G 0 1 N 33/50 Z | |

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

(72) 発明者 ワトソン, スティーヴ ピー .

英国, ビー 1 5 2 ティーティール, ウェスト ミッドランド州, バーミンガム, ユニバーシティ
オブ バーミンガム, インスティテュート オブ バイオメディカル リサーチ, センタ フォー
カーディオヴァスキュラー サイエンス

F ターム (参考) 2G045 AA40 BB20 BB51 CA24 CB01 DA20
4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA02 EA04 FA02 GA11 HA11
4B063 QA07 QA18 QQ08 QQ13 QR33 QR59 QR77 QR80 QS05 QS36
QX01
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 MA13 MA24 MA52
MA56 MA63 MA66 NA14 ZA362 ZA402 ZA542 ZB212
4C085 AA13 AA14 AA16 AA19 BB31 BB41 BB43 CC02 DD62 EE01
GG01 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 EA19 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA40 ZA54 ZB21
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74