(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2006-511615
(P2006-511615A)
(43)公表日　平成18年4月6日(2006.4.6)

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| A61K 45/00 | (2006.01) | A61K | 45/00 | 4C084 |
| A61K 31/4422 | (2006.01) | A61K | 31/4422 | 4C085 |
| A61K 31/4439 | (2006.01) | A61K | 31/4439 | 4C086 |
| A61K 31/506 | (2006.01) | A61K | 31/506 | |
| A61K 31/52 | (2006.01) | A61K | 31/52 | |

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 56 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2005-505542 (P2005-505542)
(86)(22)出願日　平成15年7月21日 (2003.7.21)
(85)翻訳文提出日　平成17年3月22日 (2005.3.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/022892
(87)国際公開番号　WO2004/008946
(87)国際公開日　平成16年1月29日 (2004.1.29)
(31)優先権主張番号　60/397,481
(32)優先日　平成14年7月19日 (2002.7.19)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/451,796
(32)優先日　平成15年3月3日 (2003.3.3)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/467,390
(32)優先日　平成15年5月2日 (2003.5.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　505023559
ベス・イスラエル・ディーコニス・メディカル・センター
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２２１５，ボストン，ブルックリン・アベニュー　３３０
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】子癇前症または子癇の診断方法および治療方法

(57)【要約】
本明細書に開示されているのは、子癇前症または子癇を診断するための方法である。また本明細書に開示されているのは、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦレベルを増加させる化合物、またはｓＦｌｔ－１レベルを減少させる化合物を使用する、子癇前症または子癇を治療するための方法である。ｓＦｌｔ－１に対するＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの結合を阻害する化合物もまた、子癇前症または子癇の治療のために本明細書に開示されている。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するための方法であって、被験者に可溶性Ｆｌｔ－１レセプター（ｓＦｌｔ－１）へ結合可能な化合物を投与する工程を含み、投与は被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分な時間および量である、前記方法。
【請求項２】
被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するための方法であって、被験者にｓＦｌｔ－１へ結合可能な成長因子のレベルを増加させる化合物を投与する工程を含み、投与は被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分な時間および量である、前記方法。
【請求項３】
化合物がニコチンである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
化合物がテオフィリンである、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
化合物が、アデノシン、ニフェジピンおよびミノキシジルから成る群より選択される、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
化合物が、精製されたｓＦｌｔ－１抗体またはｓＦｌｔ－１抗原結合断片である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するための方法であって、被験者にｓＦｌｔ－１核酸配列の少なくとも一部と相補的なアンチセンス核酸塩基オリゴマーを投与する工程を含み、投与は被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分である、前記方法。
【請求項８】
アンチセンス核酸塩基オリゴマーが長さ８～３０ヌクレオチドである、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するための方法であって、被験者にｓＦｌｔ－１核酸配列の少なくとも一部を含む２本鎖ＲＮＡを投与する工程を含み、投与は被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分である、前記方法。
【請求項１０】
２本鎖ＲＮＡが長さ１９～２５ヌクレオチドの小さな干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）へプロセッシングされる、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
化合物が成長因子である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項１２】
成長因子が血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
成長因子がＶＥＧＦ１２１である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
成長因子がＶＥＧＦ１６５である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
成長因子が胎盤成長因子（ＰｌＧＦ）である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
被験者に抗高血圧化合物を投与する工程をさらに含む、請求項１、２、７または９に記載の方法。

【請求項１７】
被験者が妊娠したヒトである、請求項１、２、７または９に記載の方法。
【請求項１８】
被験者が産後のヒトである、請求項１、２、７または９に記載の方法。
【請求項１９】
被験者が非ヒトである、請求項１、２、７または９に記載の方法。
【請求項２０】
被験者が、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌまたはネコから成る群より選択される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
子癇前症または子癇を治療または予防するための方法であって、そのような治療を必要とする被験者に、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドを含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項２２】
組成物がＶＥＧＦポリペプチドを含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
組成物がＰｌＧＦポリペプチドを含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】
子癇前症または子癇を治療または予防するための方法であって、そのような治療を必要とする被験者に、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦをコードする核酸分子を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項２５】
組成物がＶＥＧＦ核酸分子を含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
組成物がＰｌＧＦ核酸分子を含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するための方法であって、被験者にｓＦｌｔ－１ポリペプチドへの成長因子の結合を阻害する化合物を投与する工程を含み、投与は被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分である、前記方法。
【請求項２８】
化合物がｓＦｌｔ－１へ結合し、成長因子の結合をブロックする、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
被験者に抗高血圧化合物を投与する工程をさらに含む、請求項２１、２４または２７に記載の方法。
【請求項３０】
被験者が妊娠したヒトである、請求項２１、２４または２７に記載の方法。
【請求項３１】
被験者が産後のヒトである、請求項２１、２４または２７に記載の方法。
【請求項３２】
被験者が非ヒトである、請求項２１、２４または２７に記載の方法。
【請求項３３】
被験者が、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌまたはネコから成る群より選択される、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
子癇前症若しくは子癇を有している、または発現する傾向を有していると被験者を診断するための方法であって、被験者から得た試料中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドレベルを測定することを含む、前記方法。
【請求項３５】

被験者から得た試料中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドのうち少なくとも２つのレベルを測定し、１つの測定基準を使用してｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベル間の関係を計算することにより、子癇前症若しくは子癇を有しているか、または発現する傾向を有していると被験者を診断するための方法であって、基準試料に対する被験者試料中のレベル間の関係における変化で、被験者における子癇前症若しくは子癇、または子癇前症若しくは子癇を発現する傾向を診断する、前記方法。

【請求項３６】

測定基準が子癇前症抗血管形成指標（ＰＡＡＩ）：［ｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ＋ＰｌＧＦ］である、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

２０より大きなＰＡＡＩ値が子癇前症または子癇の診断指標である、請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

免疫学的アッセイを使用して測定される、請求項３４または３５に記載の方法。

【請求項３９】

免疫学的アッセイがＥＬＩＳＡである、請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

試料が血清である、請求項３４または３５に記載の方法。

【請求項４１】

２ｎｇ／ｍｌより高いｓＦｌｔ－１のレベルが子癇前症または子癇の診断指標である、請求項３４または３５に記載の方法。

【請求項４２】

ｓＦｌｔ－１のレベルが遊離の、結合したまたは全体のｓＦｌｔ－１のレベルである、請求項３４または３５に記載の方法。

【請求項４３】

ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルが遊離のＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルである、請求項３４または３５に記載の方法。

【請求項４４】

子癇前症若しくは子癇を有しているか、または発現する傾向を有していると被験者を診断するための方法であって、被験者から得た試料中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子レベルを測定し、それを基準試料と比較することを含み、レベルの変化で被験者における子癇前症若しくは子癇を診断するか、または子癇前症若しくは子癇を発現する傾向を診断する、前記方法。

【請求項４５】

子癇前症若しくは子癇を有している、または発現する傾向を有していると被験者を診断するための方法であって、被験者から得た試料中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの遺伝子の核酸配列を決定し、それを基準配列と比較することを含み、被験者中の遺伝子産物の発現レベルを変える変化である被験者の核酸配列における変化で、子癇前症若しくは子癇を有しているか、または子癇前症若しくは子癇を発現する傾向を有する被験者を診断する、前記方法。

【請求項４６】

試料が、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦを正常に検出可能である被験者の体液である、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。

【請求項４７】

体液が、尿、羊水、血清、血漿または脳脊髄液から成る群より選択される、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

試料が細胞である、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。

【請求項４９】

細胞が内皮細胞である、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】
細胞が白血球である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５１】
細胞が単球である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５２】
細胞が胎盤由来の細胞である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５３】
試料が組織である、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項５４】
組織が胎盤組織である、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
被験者が妊娠していないヒトであり、子癇前症または子癇を発現する傾向を診断する、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項５６】
被験者が妊娠したヒトである、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項５７】
被験者が産後のヒトである、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項５８】
被験者が非ヒトである、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項５９】
被験者が、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌまたはネコから成る群より選択される非ヒトである、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項６０】
測定されるレベルの少なくとも１つがｓＦｌｔ－１のレベルである、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項６１】
ＶＥＧＦのレベルが測定される場合、ｓＦｌｔ－１またはＰｌＧＦのレベルも測定される、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項６２】
基準に対するｓＦｌｔ－１核酸またはポリペプチドのレベルにおける増加が、子癇前症または子癇の診断指標である、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項６３】
基準に対する遊離ＶＥＧＦ核酸またはポリペプチドのレベルにおける減少が、子癇前症または子癇の診断指標である、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項６４】
基準に対する遊離ＰｌＧＦ核酸またはポリペプチドのレベルにおける減少が、子癇前症または子癇の診断指標である、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項６５】
レベルを測定することが、２回以上の機会に行われ、測定間のレベルの変化が子癇前症または子癇の診断指標である、請求項３４、３５、４４または４５に記載の方法。
【請求項６６】
被験者における子癇前症または子癇を診断するためのキットであって、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの核酸分子若しくはその相補的配列、またはその任意の組み合わせから成る群より選択される核酸配列を含む、前記キット。
【請求項６７】
核酸配列が、核酸分子の検出のための少なくとも２つの核酸プローブを含む、請求項６６に記載のキット。
【請求項６８】
被験者における子癇前症または子癇を診断するためのキットであって、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチド、またはその任意の組み合わせを検出する手段を

含む、前記キット。
【請求項６９】
検出する手段が、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイおよび比色分析アッセイから成る群より選択される、請求項６８に記載のキット。
【請求項７０】
妊娠または非妊娠被験者における子癇前症または子癇を発現する傾向を診断する、請求項６６または６８に記載のキット。
【請求項７１】
ｓＦｌｔ－１を検出する、請求項６６または６８に記載のキット。
【請求項７２】
ＰｌＧＦを検出する、請求項６６または６８に記載のキット。
【請求項７３】
ＶＥＧＦを検出する場合、ｓＦｌｔ－１またはＰｌＧＦも検出される、請求項６６または６８に記載のキット。
【請求項７４】
子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定するための方法であって、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子を発現する細胞と候補化合物とを接触させ、候補化合物と接触させた細胞中の核酸分子発現レベルと、候補化合物と接触させていない対照細胞中の発現レベルとを比較することを含み、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子の発現における変化で、候補化合物が子癇前症または子癇を改善させる化合物であると同定する、前記方法。
【請求項７５】
変化がｓＦｌｔ－１レベルの減少である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
変化がＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルの増加である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７７】
発現における変化が転写における変化である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７８】
発現における変化が翻訳における変化である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７９】
医薬として受容可能な担体に処方された、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドまたはその一部、および高血圧を低下させる化合物を含む医薬組成物。
【請求項８０】
妊娠哺乳動物への投与に適した医薬として受容可能な担体に処方された、ＰｌＧＦ核酸分子またはその一部を含む医薬組成物。
【請求項８１】
ＶＥＧＦ核酸分子またはその一部をさらに含む、請求項７９に記載の組成物。
【請求項８２】
ｓＦｌｔ－１を特異的に結合させる、精製された抗体またはその抗原結合断片を含む組成物。
【請求項８３】
抗体または抗原結合断片が、ｓＦｌｔ－１への成長因子の結合を妨げる、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８４】
抗体がモノクローナル抗体である、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８５】
抗体またはその抗原結合断片がヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８６】
抗体がＦｃ部分を欠失している、請求項８２に記載の組成物。

【請求項８７】
抗体がＦ（ａｂ’）$_2$構造、Ｆａｂ構造、又はＦｖ構造である、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８８】
抗体またはその抗原結合断片が、医薬として受容可能な担体中に存在している、請求項８２に記載の組成物。
【請求項８９】
子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定するための方法であって、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドを発現する細胞と候補化合物とを接触させ、候補化合物と接触させた細胞中のポリペプチド発現レベルと、候補化合物と接触させていない対照細胞中のポリペプチド発現レベルとを比較することを含み、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチド発現における変化で、候補化合物が子癇前症または子癇を改善させる化合物であると同定する、前記方法。
【請求項９０】
発現における変化が、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイまたはイムノアッセイを使用してアッセイされる、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
発現における変化がｓＦｌｔ－１レベルの減少である、請求項８９に記載の方法。
【請求項９２】
発現における変化がＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルの増加である、請求項８９に記載の方法。
【請求項９３】
子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定するための方法であって、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドを発現する細胞と候補化合物とを接触させ、候補化合物と接触させた細胞中のポリペプチドの生物活性と、候補化合物と接触させていない対照細胞中の生物活性のレベルとを比較することを含み、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドの生物活性における変化で、候補化合物が子癇前症または子癇を改善させる化合物であると同定する、前記方法。
【請求項９４】
生物活性における変化がｓＦｌｔ－１活性の減少である、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】
生物活性における変化がＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの活性の減少である、請求項９３に記載の方法。
【請求項９６】
生物活性における変化が、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイまたはイムノアッセイを使用してアッセイされる、請求項９３に記載の方法。
【請求項９７】
子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定するための方法であって、候補化合物存在下でｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を検出することを含み、候補化合物非存在下でのｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合に対する結合の減少で、候補化合物が子癇前症または子癇を改善させる化合物であると同定する、前記方法。
【請求項９８】
ｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を妨げるポリペプチドまたはその断片を同定するための方法であって、候補ポリペプチド存在下でｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を検出することを含み、候補ポリペプチド非存在下でのｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合に対する結合の減少で、候補ポリペプチドがｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を妨げるポリペプチドであると同定する、前記方法。
【請求項９９】
成長因子がＶＥＧＦである、請求項９７または９８に記載の方法。
【請求項１００】

成長因子がＰｌＧＦである、請求項９７または９８に記載の方法。
【請求項１０１】
子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定するための方法であって、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドと候補化合物との結合を検出することを含み、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドを結合させる化合物は子癇前症または子癇を改善させる、前記方法。
【請求項１０２】
請求項１０１に記載の方法に従って同定された化合物であって、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドを特異的に結合させ、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドがＶＥＧＦまたはＰｌＧＦを結合させることを妨げるポリペプチドを含む、前記化合物。
【請求項１０３】
ポリペプチドが抗体である、請求項１０２に記載の化合物。
【請求項１０４】
ポリペプチドがｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの断片である、請求項１０２に記載の化合物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
一般に、本発明は、子癇前症または子癇を有する被験者の検出および治療に関する。
【背景技術】
【０００２】
子癇前症とは、妊娠の５～１０％に影響し、母体および胎児に相当な罹患率および死亡率をもたらす、高血圧症、浮腫および蛋白尿症の症候群である。子癇前症は、年当たり世界中で少なくとも２０，０００人の母体死亡の原因である。子癇前症の症状は典型的には、妊娠２０週後に現れ、通常、女性の血圧および尿の日常的モニタリングにより検出される。しかしながら、これらのモニタリング法は、有効な治療が利用できる場合は被験者または発育している胎児の危険性を減少させる、初期段階での症候群の診断には無効である。
【０００３】
現在、子癇前症のための療法は知られていない。子癇前症は中程度から生命を脅かすまでの重度で変化しうる。子癇前症の軽度型はベッドでの療養および頻繁なモニタリングにより治療することが可能である。中程度から重度の場合、入院が推奨され、発作を予防するため血圧投薬もしくは抗痙攣薬投薬が処方される。状態が母親および子供の生命を脅かすまでになった場合は、妊娠が終結され、そして子供は早期に分娩される。
【０００４】
適切な胎児および胎盤の発育は、いくつかの成長因子により仲介される。これらの成長因子の１つは血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）である。ＶＥＧＦは内皮細胞特異的マイトジェン（血管形成誘導剤）、および血管透過性のメディエーターである。ＶＥＧＦはまた、糸球体係蹄修復に重要であることが示されている。ＶＥＧＦは、多くの異なった組織から得られた内皮細胞中で区別的に発現される、２つの相同的膜貫通型チロシンキナーゼレセプターであるｆｍｓ様チロシンキナーゼ（Ｆｌｔ－１）およびキナーゼドメインレセプター（ＫＤＲ）の１つへホモ２量体として結合する。Ｆｌｔ－１は、胎盤形成に寄与する栄養膜細胞層（ｔｒｏｐｈｏｂｌａｓｔ）細胞で高度に発現されるが、ＫＤＲは発現されない。胎盤成長因子（ＰｌＧＦ）は、胎盤発育にも関与しているＶＥＧＦファミリーメンバーである。ＰｌＧＦは栄養膜細胞層および合胞体栄養細胞（ｓｙｎｃｙｔｉｏｔｒｏｐｈｏｂｌａｓｔ）により発現され、内皮細胞の増殖、移動および活性化を誘導することが可能である。ＰｌＧＦはホモ２量体としてＦｌｔ－１レセプターへ結合するが、ＫＤＲレセプターには結合しない。ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦの両方が、胎盤の発育に決定的である、分裂促進活性および血管形成に寄与している。
【０００５】
最近、Ｆｌｔ－１レセプターの可溶型（ｓＦｌｔ－１）がヒト臍帯静脈内皮細胞の培養

培地で同定され、続いてインビボ発現が胎盤組織中で示された。ｓＦｌｔ－１はＦｌｔ－１レセプターのスプライス変異体であり、それは膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインが欠失している。ｓＦｌｔ－１はＶＥＧＦへ高親和性で結合するが、内皮細胞の有糸分裂誘発は刺激しない。ｓＦｌｔ－１は、ＶＥＧＦシグナル伝達経路を下方制御するための「生理学的シンク（ｓｉｎｋ）」として働くと信じられている。それ故、ｓＦｌｔ－１レベルの制御は、ＶＥＧＦおよびＶＥＧＦシグナル伝達経路を変調するために作用する。ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦシグナル伝達経路の注意深い制御は、発育している胎盤における栄養膜細胞層細胞による適切な増殖、移動および血管形成を維持するために決定的である。子癇前症の危険があるかまたは有している被験者を、特に最も重度な症状の発症前に、正確に診断する方法が必要とされている。治療もまた必要とされている。

【発明の開示】

【０００６】

発明の概要

我々は、症状の発現に先立って、子癇前症および子癇を診断し、有効に治療するための手段を発見した。

【０００７】

遺伝子発現分析を使用して、我々は、ｓＦｌｔ－１レベルが子癇前症に罹患する妊娠女性から得た胎盤組織試料で顕著に上昇していることを発見した。ｓＦｌｔ－１は、「生理学的シンク」として作用することによりＶＥＧＦおよびＰｌＧＦに拮抗することが知られており、子癇前症または子癇の女性において、ｓＦｌｔ－１は、胎盤のこれら必須の血管形成因子および分裂促進因子の必要量を枯渇させることができる。過剰のｓＦｌｔ－１はまた、血液脳関門を維持する内皮細胞および／または脳脈絡叢を区画している内皮細胞を破壊することにより子癇へと導き、こうして子癇において観察される脳浮腫および発作をもたらす。本発明においては、上昇したｓＦｌｔ－１の影響を押しとどめることにより、子癇前症または子癇を治療または予防するため、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦのレベルを増加させる化合物を被験者に投与する。加えて、ｓＦｌｔ－１へのＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの結合を競合的に阻害するため、ｓＦｌｔ－１へ方向付けられた抗体を使用し、それにより、遊離のＶＥＧＦおよびＰｌＧＦのレベルを増加させる。ｓＦｌｔ－１レベルを減少させるため、ＲＮＡ干渉およびアンチセンス核酸塩基オリゴマーも使用する。最後に、本発明は、子癇前症または子癇の早期診断および管理、またはそれらの素因のための検出手段として、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの使用およびモニタリングを提供する。

【０００８】

従って、１つに側面において、本発明は、被験者へｓＦｌｔ－１に結合可能な化合物を投与することにより、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供し、その投与は、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分な時間および量である。

【０００９】

関連する側面において、本発明は、被験者へｓＦｌｔ－１に結合可能な、成長因子のレベルを増加させる化合物（例えば、ニコチン、テオフィリン、アデノシン、ニフェジピン、ミノキシジルまたは硫酸マグネシウム）を投与することにより、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供し、その投与は、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分な時間および量である。

【００１０】

他の関連する側面において、本発明は、被験者へ精製ｓＦｌｔ－１抗体またはその抗原結合断片を、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分な時間および量で投与することにより、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供する。

【００１１】

さらに他の関連した側面において、本発明は、被験者へｓＦｌｔ－１核酸配列の少なくとも一部と相補的なアンチセンス核酸塩基オリゴマーを投与することにより、被験者の子

癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供し、その投与は被験者の子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分である。１つの態様において、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは長さ８～３０ヌクレオチドである。

【００１２】

他の関連した側面において、本発明は、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供する。本方法は、ｓＦｌｔ－１核酸配列の少なくとも一部を含有する２本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を被験者に投与する工程を含み、その投与は被験者の子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分である。１つの態様において、２本鎖ＲＮＡは長さ１９～２５ヌクレオチドの、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）へプロセッシングされる。

【００１３】

上記側面の多様な態様において、候補化合物は、ＶＥＧＦ１８９、ＶＥＧＦ１２１またはＶＥＧＦ１６５などの全てのアイソフォームを含む血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）；全てのアイソフォームを含む胎盤成長因子（ＰｌＧＦ）；またはそれらの断片、のような成長因子である。好ましい態様において、候補化合物はｓＦｌｔ－１を結合させる抗体である。上記側面の他の態様において、方法は抗高血圧化合物を被験者に投与することをさらに含む。上記側面のさらに他の態様において、被験者は妊娠したヒト、産後のヒト、または非ヒト（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌまたはネコ）である。

【００１４】

他の側面において、本発明は子癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供する。本方法は、そのような治療を必要とする被験者に、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドを含む有効量の医薬組成物を投与することを含む。１つの態様において、組成物はＶＥＧＦポリペプチドを含有する。他の態様において、組成物はＰｌＧＦポリペプチドを含有する。

【００１５】

関連する側面において、本発明は子癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供する。この方法は、そのような治療を必要とする被験者に、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦをコードする核酸分子を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む。１つの態様において、組成物はＶＥＧＦ核酸分子を含有する。他の態様において、組成物はＰｌＧＦ核酸分子を含有する。

【００１６】

他の関連した側面において、本発明は、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防する方法を提供する。本方法は、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドへの成長因子の結合を阻害する化合物（例えば、化学化合物、ポリペプチド、ペプチド、抗体またはその断片）を被験者に投与する工程を含み、その投与は被験者の子癇前症または子癇を治療または予防するのに十分である。１つの態様において、化合物はｓＦｌｔ－１へ結合し、成長因子の結合を阻止する。

【００１７】

上記側面の多様な態様において、方法は抗高血圧化合物（例えば、アデノシン、ニフェジピン、ミノキシジルおよび硫酸マグネシウム）を被験者に投与する工程をさらに含む。上記側面の他の態様において、被験者は妊娠したヒト、産後のヒト、または非ヒト（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌまたはネコ）である。

【００１８】

他の側面において、本発明は、被験者が、子癇前症若しくは子癇を有しているか、または発現する傾向を有していると診断する方法を提供し、本方法は被験者から得た試料中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドのレベルを測定することを含む。

【００１９】

関連する側面において、本発明は、被験者から得た試料中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドのうち少なくとも２つのレベルを測定し、１つの測定基準を使用してＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベル間の関係を計算することにより、子癇前症若しくは子癇を有しているか、または発現する傾向を有していると被験者を診断

する方法を提供し、ここにおいて、基準に対する被験者試料の変化で、被験者における子癇前症または子癇を診断する。１つの態様において、測定基準は子癇前症抗血管形成指標（ＰＡＡＩ）：［ｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ＋ＰｌＧＦ］であり、ここにおいて、ＰＡＡＩは抗血管形成活性の指標として使用される。１つの態様において、２０より大きなＰＡＡＩは子癇前症または子癇を暗示する。他の態様において、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドのレベルは、ＥＬＩＳＡのような免疫学的アッセイにより測定される。

【００２０】

上記側面の多様な態様において、試料は血清または尿のような体液である。１つの態様において、２ｎｇ／ｍｌより高いｓＦｌｔ－１レベルは子癇前症または子癇を暗示する。上記側面の好ましい態様において、測定されたｓＦｌｔ－１ポリペプチドレベルは、遊離の、結合した、または全体のｓＦｌｔ－１ポリペプチドのレベルである。上記側面の他の好ましい態様において、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルは、遊離のＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルである。

【００２１】

他の側面において、本発明は、子癇前症若しくは子癇を有しているか、または発現する傾向を有していると被験者を診断する方法を提供する。この方法は、被験者から得た試料中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子レベルを測定し、基準試料と比較することを含み、ここにおいて、レベルの変化で、被験者における子癇前症若しくは子癇を診断し、または子癇前症若しくは子癇を発現する傾向を診断する。

【００２２】

他の側面において、本発明は、子癇前症若しくは子癇を有しているか、または発現する傾向を有していると被験者を診断する方法を提供する。この方法は、被験者中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの遺伝子の核酸配列を決定し、基準配列と比較することを含み、ここにおいて、被験者における遺伝子産物のレベルを変える、被験者の核酸配列の変化から、子癇前症若しくは子癇を有しているか、または子癇前症若しくは子癇を発現する傾向がある被験者を診断する。１つの態様において、変化は核酸配列における遺伝子多型である。

【００２３】

上記側面の多様な態様において、試料は、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦを正常に検出可能な被験者の体液である（例えば、尿、羊水、血清、血漿または脳脊髄液）。さらなる態様において、試料は組織または細胞である。非限定的な例には、胎盤組織又は胎盤細胞、内皮細胞、および白血球（例えば単球）が含まれる。上記側面の他の態様において、被験者は、妊娠していないヒト、妊娠したヒトまたは産後のヒトである。上記側面の他の態様において、被験者は非ヒト（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌまたはネコ）である。上記側面の他の態様において、測定されるレベルの少なくとも１つはｓＦＬｔ－１（遊離、結合または全体）レベルである。上記側面の他の態様において、ＶＥＧＦレベルが測定される場合、ｓＦｌｔ－１またはＰｌＧＦのレベルも測定される。上記側面の多様な態様において、基準に対する、ｓＦｌｔ－１の核酸またはポリペプチドのレベル増加は、子癇前症または子癇の診断指標である。上記側面の他の態様において、基準に対する、遊離のＶＥＧＦポリペプチドまたはＶＥＧＦ核酸のレベルの減少は、子癇前症または子癇の診断指標である。上記側面の他の態様において、基準に対する、遊離のＰｌＧＦポリペプチドまたはＰｌＧＦ核酸のレベルの減少は、子癇前症または子癇の診断指標である。

【００２４】

上記側面のさらなる態様において、レベルは２回以上の機会に測定され、測定間のレベルの変化が、子癇前症または子癇の診断指標である。１つの好ましい態様において、ｓＦｌｔ－１レベルが第１の測定から次の測定にかけて増加する。他の好ましい態様において、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルが、第１の測定から次の測定にかけて減少する。

【００２５】

他の側面において、本発明は、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの核酸分子、またはそれに相補的な配列、またはその任意の組み合わせから成る群より選択される、核酸配列またはその断片を含む、被験者の子癇前症または子癇を診断するための診断キットを提供する。好ましい態様において、キットは、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子検出のための少なくとも２つのプローブを含む。

【００２６】

関連する側面において、本発明は、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチド、およびそれらの任意の組み合わせを検出する手段を含む、被験者の子癇前症または子癇を診断するためのキットを提供する。１つの態様において、検出する手段は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイおよび比色分析アッセイから成る群より選択される。上記側面の他の態様において、キットは妊娠した被験者または妊娠していない被験者において、子癇前症または子癇が発現する傾向を診断する。上記側面の好ましい態様において、キットはｓＦｌｔ－１またはＰｌＧＦを検出する。上記側面の他の好ましい態様において、キットがＶＥＧＦを検出する場合、ｓＦｌｔ－１またはＰｌＧＦも検出される。

【００２７】

他の側面において、本発明は、子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定する方法を提供し、本方法は、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子を発現する細胞と候補化合物とを接触させ、候補化合物を接触させた細胞中の核酸分子の発現レベルと、候補化合物が接触していない対照細胞中の発現レベルを比較することを含み、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子の発現における変化で、候補化合物を子癇前症または子癇を改善させる化合物として同定する。

【００２８】

１つの態様において、変化はｓＦｌｔ－１レベルの減少である。他の態様において、変化はＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルの増加である。他の態様において、変化は転写または翻訳におけるものである。他の態様において、本方法がＶＥＧＦの発現を増加させる候補化合物を同定する場合、候補化合物はまた、ＰｌＧＦの発現を増加させるか、またはｓＦｌｔ－１の発現を減少させる。

【００２９】

他の側面において、本発明は、医薬として受容可能な坦体に処方された、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチド、またはその一部を含む医薬組成物を提供する。

関連する側面において、本発明は、医薬として受容可能な坦体に処方された、ＰｌＧＦ核酸分子またはその一部を含む医薬組成物を提供する。１つの態様において、組成物はさらにＶＥＧＦ核酸分子またはその一部を含有する。

【００３０】

他の側面において、本発明は、ｓＦｌｔ－１を特異的に結合させる、精製された抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を提供する。１つの好ましい態様において、抗体は、ｓＦｌｔ－１への成長因子の結合を妨げる。他の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。他の好ましい態様において、抗体またはその抗原結合断片はヒト抗体またはヒト化抗体である。他の態様において、抗体はＦｃ部分を欠失している。さらに他の態様において、抗体は$F(ab')_2$構造、Ｆａｂ構造またはＦｖ構造である。他の態様において、抗体またはその抗原結合断片は医薬として受容可能な坦体中に存在している。

【００３１】

他の側面において、本発明は、子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定する方法を提供する。この方法は、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドを発現する細胞と候補化合物とを接触させ、候補化合物を接触させた細胞中のポリペプチド発現レベルと、候補化合物が接触していない対照細胞中のポリペプチド発現レベルとを比較することを含み、ここにおいて、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧのポリペプチドの発現における変化で、候補化合物を子癇前症または子癇を改善させる化合物として同定する。１つの態様において、発現の変化は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイまたはイムノアッセイを使用してアッセイされる。１つの態様において、発現の変化はｓＦｌｔ－１レ

ベルの減少である。他の態様において、発現の変化はＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルの増加である。

【００３２】

他の側面において、本発明は、子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定する方法を提供する。本方法は、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドを発現する細胞と候補化合物とを接触させ、候補化合物を接触させた細胞中のポリペプチドの生物活性と、候補化合物が接触していない対照細胞中のポリペプチドの生物活性とを比較することを含み、ここにおいて、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドの生物活性における増加で、候補化合物を子癇前症または子癇を改善させる化合物として同定する。１つの態様において、生物活性の増加は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイまたはイムノアッセイを使用してアッセイされる。１つの態様において、発現の変化はｓＦｌｔ－１活性の減少である。他の態様において、発現の変化はＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの活性の増加である。

【００３３】

他の側面において、本発明は、子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定する方法を提供する。本方法は、候補化合物存在下でｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を検出することを含み、ここにおいて、候補化合物非存在下でのｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合に対する結合の減少で、候補化合物を子癇前症または子癇を改善させる化合物として同定する。１つの態様において、成長因子はＶＥＧＦである。１つの態様において、成長因子はＰｌＧＦである。

【００３４】

他の側面において、本発明は、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を妨げる、ポリペプチドまたはその断片を同定する方法を提供する。本方法は、候補ポリペプチド存在下でｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を検出することを含み、ここにおいて、候補ポリペプチド非存在下でのｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合に対する結合の減少で、候補ポリペプチドをｓＦｌｔ－１ポリペプチドと成長因子との結合を妨げるポリペプチドとして同定する。１つの態様において、成長因子はＶＥＧＦである。１つの態様において、成長因子はＰｌＧＦである。

【００３５】

他の側面において、本発明は、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドと候補化合物との結合を検出することを含む、子癇前症または子癇を改善させる化合物を同定する方法を提供し、ここにおいて、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドを結合させる化合物は子癇前症または子癇を改善させる。

【００３６】

関連する側面において、本発明は、前記側面に従って同定された化合物を提供し、その化合物はｓＦｌｔ－１を特異的に結合させ、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドのＶＥＧＦまたはＰｌＧＦへの結合を妨げるポリペプチドである。１つの好ましい態様において、ポリペプチドは抗体である。他の好ましい態様において、ポリペプチドは、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの断片である。

【００３７】

上記側面の好ましい態様において、子癇前症または子癇を改善させる化合物は、ｓＦｌｔ－１の発現レベルまたは生物活性を減少させる。上記側面の好ましい態様において、子癇前症または子癇を改善させる化合物は、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの発現レベルまたは生物活性を増加させる。

【００３８】

本発明の目的のため、次の略語および用語を以下に定義する。

「変化」とは、前記のような公知の方法の標準技術により検出される、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルにおける変化（増加または減少）を意味している。本明細書において、増加または減少とは、発現レベルの１０％の変化、好ましくは２５％の変化、より好ましくは４０％の変化、最も好ましくは５０％以上の発現レベルの変化を含んでいる。

【００３９】
「変化」は、本発明の任意のポリペプチド（例えば、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ）の生物活性における変化（増加または減少）も示すことができる。ＰｌＧＦまたはＶＥＧＦの生物活性の例には、イムノアッセイ、リガンド結合アッセイまたはスキャッチャードプロット分析により測定されるようなレセプターへの結合、ＢｒｄＵ標識、細胞計数実験または$^{3}$Ｈ－チミジン取り込みなどのＤＮＡ合成の定量的アッセイにより測定されるような細胞増殖または遊走の誘導が含まれる。ｓＦｌｔ－１の生物活性の例には、イムノアッセイ、リガンド結合アッセイまたはスキャッチャードプロット分析により測定されるようなＰｌＧＦおよびＶＥＧＦへの結合が含まれる。各々のポリペプチドの生物活性のさらなる例は、本明細書に記載されている。本明細書において、増加または減少とは、生物活性の１０％の変化、好ましくは２５％の変化、より好ましくは４０％の変化、最も好ましくは５０％以上の生物活性の変化を含んでいる。
【００４０】
「アンチセンス核酸塩基オリゴマー」とは、長さにかかわらず、ｓＦｌｔ－１遺伝子のコード鎖またはｍＲＮＡに相補的である核酸塩基オリゴマーを意味している。「核酸塩基オリゴマー」とは、連鎖基により共に連結された、少なくとも８核酸塩基、好ましくは少なくとも１２塩基、最も好ましくは少なくとも１６塩基の鎖を含む化合物を意味している。この定義には、修飾および未修飾の、天然および非天然のオリゴヌクレオチド、ならびにプロテイン核酸、ロックされた（ｌｏｃｋｅｄ）核酸およびアラビノ核酸のようなオリゴヌクレオチド模倣体が含まれる。本明細書に援用される、米国特許出願第２００３０１１４４１２号および第２００３０１１４４０７号に記載されているものを含む、多数の核酸塩基および連鎖基を、本発明の核酸塩基オリゴマーに用いることができる。核酸塩基オリゴマーは、翻訳開始部位および終止部位を標的とすることもできる。好ましくは、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは約８～３０ヌクレオチドを含む。アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、ｓＦｌｔ－１　ｍＲＮＡまたはＤＮＡに相補的である、少なくとも４０、６０、８５、１２０以上の連続したヌクレオチドを含有することもでき、完全長ｍＲＮＡまたは遺伝子と同じくらい長くてもよい。
【００４１】
「化合物」とは、小分子化学化合物、抗体、核酸分子またはポリペプチド、またはそれらの断片を意味している。
「キメラ抗体」とは、他のタンパク質（典型的には免疫グロブリン定常ドメイン）の少なくとも一部に連結された抗体分子の少なくとも抗原結合部分を含むポリペプチドを意味している。
【００４２】
「２本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）」とは、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含むリボ核酸分子を意味している。ｄｓＲＮＡは典型的には、ＲＮＡ干渉を仲介するために使用される。
【００４３】
「発現」とは、公知の方法の標準技術による遺伝子またはポリペプチドの検出を意味している。例えば、ポリペプチド発現はウェスタンブロッティングにより検出されることが多く、ＤＮＡ発現はサザンブロッティングまたはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により検出されることが多く、そしてＲＮＡ発現はノーザンブロッティング、ＰＣＲまたはＲＮＡｓｅ保護アッセイにより検出されることが多い。
【００４４】
「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を意味している。この部分は、好ましくは、基準核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％または６０％を含んでいる。断片は、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０または１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００または１０００のヌクレオチドまたはアミノ酸を含有することができる。

【００４５】
「相同的」とは、公知の遺伝子またはタンパク質配列に対し、比較配列の長さについて少なくとも３０％相同性、より好ましくは４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、最も好ましくは９０％以上の相同性を有する、遺伝子またはタンパク質配列を意味している。「相同的」タンパク質は、比較タンパク質の少なくとも１つの生物活性を有することもできる。ポリペプチドに関し、比較配列の長さは、一般的に少なくとも１６アミノ酸、好ましくは少なくとも２０アミノ酸、より好ましくは少なくとも２５アミノ酸、最も好ましくは３５アミノ酸以上であろう。核酸に関し、比較配列の長さは、一般的に少なくとも５０ヌクレオチド、好ましくは少なくとも６０ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも７５ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも１１０ヌクレオチドであろう。「相同性」とは、抗体を産生するために使用されるエピトープと、抗体が方向付けられるタンパク質またはその断片との実質的類似性を指すこともできる。この場合、相同性とは、問題とするタンパク質を特異的に認識可能な抗体の産生を惹起するのに十分な類似性を指している。

【００４６】
「ヒト化抗体」とは、前もって決定された抗原へ結合可能である、免疫グロブリンアミノ酸配列変異体またはその断片を意味している。通常、抗体は軽鎖及び少なくとも重鎖の可変ドメインを含有するであろう。抗体は、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３またはＣＨ４領域を含むこともできる。ヒト化抗体は、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有しているフレームワーク領域（ＦＲ）および実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列（「移入（ｉｍｐｏｒｔ）」配列）を有している相補性決定領域を含む。

【００４７】
一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源から導入される１つ以上のアミノ酸残基を有している。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも１つの、典型的には２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂｃ、Ｆｖ）の実質的に全てを含み、全てまたは実質的に全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てまたは実質的に全てのＦＲ領域がヒト免疫グロブリン共通配列のものであろう。ヒト化抗体は最適には、少なくとも免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含むであろう。

【００４８】
「相補性決定領域（ＣＤＲ）」とは、免疫グロブリン軽鎖および重鎖内の可変領域における、３つの超可変配列を意味している。
「フレームワーク領域（ＦＲ）」とは、免疫グロブリン軽鎖および重鎖の３つの超可変配列（ＣＤＲ）の両側に位置しているアミノ酸配列を意味している。

【００４９】
ヒト化抗体のＦＲ領域およびＣＤＲ領域は、親配列へ正確に対応している必要はなく、例えば、移入ＣＤＲまたは共通ＦＲは、その部位でのＣＤＲまたはＦＲ残基が共通にも移入抗体にも対応しないように、少なくとも１つの残基での置換、挿入または欠失により突然変異誘発することができる。しかしながら、そのような突然変異は、広範囲ではないであろう。通常、少なくとも７５％、好ましくは９０％、最も好ましくは少なくとも９５％のヒト化抗体残基が、親ＦＲおよびＣＤＲ配列のものに対応するであろう。

【００５０】
「ハイブリダイズ」とは、多様なストリンジェンシー条件下、相補的ポリヌクレオチド配列またはその一部間で２本鎖分子を形成する対を意味している。（例えば、ＷａｈｌおよびＢｅｒｇｅｒ（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：３９９；Ｋｉｍｍｅｌ、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：５０７、１９８７を参照されたい。）例えば、ストリンジェントな塩濃度は通常、約７５０ｍＭ　ＮａＣｌおよび７５ｍＭクエン酸３ナトリウム未満、好ましくは約５００ｍＭ　ＮａＣｌおよび５０ｍＭクエン酸３ナトリウム未満、最も好ましくは約２５０ｍＭ　ＮａＣｌおよび２５ｍＭクエン酸３ナトリウム未満であろう。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、有機溶媒、例えば、ホルムアミド非存在下で得ることができ、一方、高ストリンジェンシーハイブリダ

イゼーションは、少なくとも約３５％ホルムアミド、最も好ましくは少なくとも約５０％ホルムアミド存在下で得ることができる。ストリンジェントな温度条件は通常、少なくとも約３０℃、より好ましくは少なくとも約３７℃、最も好ましくは少なくとも約４２℃の温度を含んでいる。ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）の濃度、および坦体ＤＮＡの包含または排除のように、さらなるパラメーターを変化させることは、当業者には周知である。多様なレベルのストリンジェンシーは、必要とされるこれらの多様な条件を組み合わせることにより達成される。好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、７５０ｍＭ　ＮａＣｌ、７５ｍＭクエン酸３ナトリウムおよび１％ＳＤＳ中、３０℃にて起こるであろう。より好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、５０ｍＭクエン酸３ナトリウム、１％ＳＤＳ、３５％ホルムアミドおよび１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）中、３７℃にて起こるであろう。最も好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２５ｍＭクエン酸３ナトリウム、１％ＳＤＳ、５０％ホルムアミドおよび２００μｇ／ｍｌ　ｓｓＤＮＡ中、４２℃にて起こるであろう。これらの条件に対する有用な変形が、当業者には容易に明らかになるであろう。

【００５１】

ほとんどの応用において、ハイブリダイゼーションに続く洗浄工程もストリンジェンシーを変化させるであろう。洗浄ストリンジェンシー条件は、塩濃度および温度により決定することが可能である。前記のように、洗浄ストリンジェンシーは、塩濃度を減少させることにより、または温度を上昇させることにより増加させることが可能である。例えば、洗浄工程のためのストリンジェントな塩濃度は、好ましくは約３０ｍＭ　ＮａＣｌおよび３ｍＭクエン酸３ナトリウム未満、最も好ましくは約１５ｍＭ　ＮａＣｌおよび１．５ｍＭクエン酸３ナトリウム未満であろう。洗浄工程のためのストリンジェントな温度条件は通常、少なくとも約２５℃、より好ましくは少なくとも約４２℃、最も好ましくは少なくとも約６８℃の温度を含んでいるであろう。好ましい態様において、洗浄工程は３０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭクエン酸３ナトリウムおよび０．１％ＳＤＳ中、２５℃にて行われるであろう。より好ましい態様において、洗浄工程は１５ｍＭ　ＮａＣｌ、１．５ｍＭクエン酸３ナトリウムおよび０．１％ＳＤＳ中、４２℃にて行われるであろう。最も好ましい態様において、洗浄工程は１５ｍＭ　ＮａＣｌ、１．５ｍＭクエン酸３ナトリウムおよび０．１％ＳＤＳ中、６８℃にて行われるであろう。これらの条件に対するさらなる変形が、当業者には容易に明らかになるであろう。ハイブリダイゼーション技術は当業者には周知であり、そして、例えば、ＢｅｎｔｏｎおよびＤａｖｉｓ（Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９６：１８０、１９７７）；ＧｒｕｎｓｔｅｉｎおよびＨｏｇｎｅｓｓ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、ＵＳＡ　７２：３９６１、１９７５）；Ａｕｓｕｂｅｌら、（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ、ニューヨーク、２００１）；ＢｅｒｇｅｒおよびＫｉｍｍｅｌ（Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１９８７、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク）；ならびにＳａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、ニューヨークに記載されている。

【００５２】

「子宮内成長遅延（ＩＵＧＲ）」とは、胎児の在胎齢に対して予想される胎児体重の１０パーセントより軽い出生時体重を生じる症候群を意味している。低出生時体重に対する現在の世界保健機構基準は、人種、出産経歴および乳児の性による在胎齢のための出生時体重の米国表（ＺｈａｎｇおよびＢｏｗｅｓ、Ｏｂｓｔｅｔ．Ｇｙｎｅｃｏｌ．８６：２００－２０８、１９９５）によると、２，５００ｇｍ（５ポンド６オンス）未満、または在胎齢の１００分の１０以下である。これらの低出生体重乳児も、「在胎齢より小さい（ＳＧＡ）」と呼ばれる。子癇前症は、ＩＵＧＲまたはＳＧＡに関連していることが知られている状態である。

【００５３】
「測定基準」とは、１つの測定を意味している。測定基準は、例えば、目的のポリペプチドまたは核酸分子のレベルを比較するために使用することができる。測定基準の例には、数学式、または比のようなアルゴリズムが含まれるが、それらに限定されるわけではない。使用されるべき測定基準は、子癇前症または子癇を有している被験者または正常対照被験者におけるｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベル間を最もよく区別するものである。使用される測定基準に依存して、子癇または子癇前症の診断指標は、（例えば、子癇前症または子癇を有していない対照被験者からの）基準値より有意に上または下であることができる。
【００５４】
ｓＦｌｔ－１レベルは、遊離の、結合した（即ち、成長因子へ結合した）または全体のｓＦｌｔ－１（遊離＋結合）の量を測定することにより測定される。ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルは、遊離ＶＥＧＦまたは遊離ＰｌＧＦ（即ち、ｓＦｌｔ－１へ結していない）の量を測定することにより決定される。測定基準の１つの例は、子癇前症抗血管形成指標（ＰＡＡＩ）とも呼ばれる、［ｓＦｌｔ－１／（ＶＥＧＦ＋ＰｌＧＦ）］である。
【００５５】
「子癇前症抗血管形成指標（ＰＡＡＩ）」とは、抗血管形成活性の指標として使用される、ｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ＋ＰｌＧＦの比を意味している。２０より大きなＰＡＡＩは、子癇前症、または子癇前症の危険性の指標であると考えられている。
【００５６】
「機能可能なように連結された」とは、遺伝子および制御配列が、適切な分子（例えば、転写活性化因子タンパク質）が制御配列に結合される場合に、遺伝子発現を可能にするように接続されていることを意味している。
【００５７】
「医薬として受容可能な坦体」とは、処置される哺乳動物に生理学的に受容可能であり、一方、ともに投与される化合物の療法特性を保持する坦体を意味している。医薬として受容可能な坦体物質の１つの例は生理食塩水である。他の医薬として受容可能な坦体およびその処方は当業者に公知であり、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ‘ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、（第２０版）、編者、Ａ．Ｇｅｎｎａｒｏ、２０００、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ、Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ、フィラデルフィア、ＰＡに記載されている。
【００５８】
「胎盤成長因子（ＰｌＧＦ）」とは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｐ４９７６３により定義されるタンパク質と相同的であり、ＰｌＧＦ生物活性を有する哺乳動物成長因子を意味している。ＰｌＧＦは、ＶＥＧＦファミリーに属するグリコシル化ホモダイマーであり、代替的なスプライシング機構を通して２つの異なったアイソフォームで見出すことが可能である。ＰｌＧＦは胎盤中の細胞－または合胞体栄養細胞により発現され、ＰｌＧＦ生物活性には、増殖、遊走の誘導、および内皮細胞、特に栄養膜細胞層細胞の活性化が含まれる。
【００５９】
「子癇前症」とは、タンパク尿または浮腫、またはその両方を伴う高血圧、腎糸球体不全、脳浮腫、肝臓浮腫、または妊娠または最近の妊娠の影響による血液凝固異常により特徴付けられる多システム障害を意味している。子癇前症は一般に、妊娠期間の２０週目より後に発現する。子癇前症は一般的に、以下の症状のいくつかの組合わせとして定義される：（１）妊娠２０週後に収縮期血圧（ＢＰ）＞１４０ｍｍＨｇおよび拡張期ＢＰ＞９０ｍｍＨｇ（一般に４～１６８時間あけて２回測定される）、（２）新規タンパク尿発症（尿分析の尿試験紙で１＋、２４時間尿採取で＞３００ｍｇのタンパク質、またはタンパク質／クレアチニン比＞０．３を有している１回無作為尿試料）、ならびに（３）産後１２週までの高血圧およびタンパク尿の回復。重度子癇前症は一般的に以下のように定義される：（１）拡張期ＢＰ＞１１０ｍｍＨｇ（一般に４～１６８時間あけて２回測定される）

、または（２）２４時間尿採取における３．５ｇ以上のタンパク質の測定、または尿試験紙で少なくとも３＋タンパク質を示す２回無作為尿検体により特徴付けられるタンパク尿。子癇前症において、一般に、高血圧およびタンパク尿は互いに７日以内に発症する。重度子癇前症において、重度高血圧、重度タンパク尿およびＨＥＬＬＰ症候群（溶血、上昇した肝臓酵素、低血小板）または子癇は、同時かまたは１度に１つの症状のみで発症しうる。時折、重度子癇前症はてんかんの発現をもたらすことがありうる。この症候群の重度の型は「子癇」と称されている。子癇は、肝臓（例えば、肝細胞損傷、門脈周囲壊死）および中枢神経系（例えば、脳浮腫および脳溢血）のようないくつかの臓器または組織の機能不全または損傷も含んでいる。てんかんの病因は、脳浮腫および腎臓における小血管の局所的攣縮発症の２次的なものであると考えられている。

【００６０】

「タンパク質」または「ポリペプチド」または「ポリペプチド断片」とは、翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）に関わらず、全てまたは一部が天然のポリペプチドまたはペプチドで構成されているか、または非天然のポリペプチドまたはペプチドで構成されている、２つより多くのアミノ酸鎖を意味している。

【００６１】

「減少または阻害する」とは、ＲＮＡ干渉に使用されるアンチセンス核酸塩基オリゴマーまたはｄｓＲＮＡで処理されていない試料と比較して、前述のアッセイ（「発現」参照）により検出されたタンパク質または核酸のレベルが、好ましくは２０％以上、より好ましくは５０％以上、最も好ましくは７５％以上の全体の減少を起こす能力を意味している。

【００６２】

「短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）」とは、分解されるべき標的遺伝子またはｍＲＮＡを同定するために使用される、好ましくは長さ１０ヌクレオチドより長い、より好ましくは長さ１５ヌクレオチドより長い、最も好ましくは長さ１９ヌクレオチドより長い、単離ｄｓＲＮＡを意味している。１９～２５ヌクレオチドの範囲が、ｓｉＲＮＡの最も好ましいサイズである。ｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡ２本鎖の両方の鎖が単一ＲＮＡ分子内に含まれている、短いヘアピンＲＮＡも含むことが可能である。ｓｉＲＮＡはｄｓＲＮＡの任意の形態（より長いｄｓＲＮＡのタンパク質分解的切断生成物、部分的に精製したＲＮＡ、本質的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、組換え的に製造されたＲＮＡ）、ならびに１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または改変により、天然のＲＮＡとは異なった改変ＲＮＡを含んでいる。こうした改変は、２１～２３ｎｔＲＮＡの末端または内部などへ（ＲＮＡの１つ以上のヌクレオチドで）、非ヌクレオチド物質を付加することを含むことが可能である。好ましい態様において、ＲＮＡ分子は３’ヒドロキシル基を含有する。本発明のＲＮＡ分子中のヌクレオチドは、非天然ヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含めた非標準ヌクレオチドを含むことも可能である。集合的に、全てのこのような改変ＲＮＡはＲＮＡ類似体と称される。本発明のｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を仲介する能力を有する、天然ＲＮＡに十分に類似していることのみを必要とする。本明細書において、ＲＮＡｉは、細胞または生体内への短鎖干渉ＲＮＡまたはｄｓＲＮＡの導入を通した、特異的ｍＲＮＡ分子のＡＴＰ依存性標的化切断および分解を指している。本明細書において、「ＲＮＡｉを仲介する」とは、どのＲＮＡが分解されるべきかを区別または同定する能力を指している。

【００６３】

「可溶性Ｆｌｔ－１（ｓＦｌｔ－１）」（ＶＥＧＦ－Ｒ１としても知られている）とは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｕ０１１３４により定義されるタンパク質と相同的であり、ｓＦｌｔ－１生物活性を有する、Ｆｌｔ－１レセプターの可溶型を意味している。ｓＦｌｔ－１ポリペプチドの生物活性は、標準法を使用して、例えば、ＶＥＧＦへのｓＦｌｔ－１の結合をアッセイすることにより、アッセイすることができる。ｓＦｌｔ－１は、Ｆｌｔ－１レセプターの膜貫通ドメインおよび細胞質チロシンキナーゼドメインを欠失している。ｓＦｌｔ－１は高親和性でＶＥＧＦおよびＰｌＧＦへ結合できるが、増殖および血管形

成は誘導できず、それ故、Ｆｌｔ－１およびＫＤＲレセプターとは機能的に異なっている。ｓＦｌｔ－１は、最初、ヒト臍帯内皮細胞から精製され、その後、インビボで栄養膜細胞層細胞により産生されることが示された。本明細書において、ｓＦｌｔ－１は任意のｓＦｌｔ－１ファミリーメンバーおよびアイソフォームを含んでいる。

【００６４】

「特異的に結合する」とは、本発明のポリペプチドを認識し、結合させる化合物または抗体を意味するが、本発明のポリペプチドを天然に含んでいる試料、例えば、生物学的試料中の他の分子は実質的に認識も結合もしないことを意味している。１つの例において、ｓＦｌｔ－１を特異的に結合させる抗体は、Ｆｌｔ－１を結合させない。

【００６５】

「被験者」とは、限定するわけではないが、ヒト、またはウシ、ウマ、イヌ、ヒツジまたはネコのごとき非ヒト哺乳動物を含めた哺乳動物を意味している。妊娠、産後および非妊娠哺乳動物がこの定義に含まれている。

【００６６】

「実質的に同一」とは、例えば、１つのアミノ酸を同じクラスの別のもの（例えば、グリシンの代わりにバリン、リジンの代わりにアルギニンなど）で置換した保存的アミノ酸置換、またはタンパク質の機能を破壊しないアミノ酸配列位置にある１つ以上の非保存的置換、欠失または挿入のみにより異なっているアミノ酸配列を意味している。好ましくは、アミノ酸配列は少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、最も好ましくは少なくとも約９０％、他のアミノ酸配列と相同的である。同一性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータープログラムが利用できる。２つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータープログラム法には、限定されるものではないが、ＧＣＧプログラムパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２：３８７、１９８４）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮおよびＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３（１９９０）が含まれる。周知のＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムもまた同一性を決定するために使用できる。ＢＬＡＳＴプログラムは、ＮＣＢＩおよび他の供給源から公に入手可能である（ＢＬＡＳＴマニュアル、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、ＮＣＢＩ ＮＬＭ ＮＩＨ、ベセスダ、ＭＤ ２０８９４；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／のＢＬＡＳＴ ２．０）。これらのソフトウェアープログラムは、多様な置換、欠失および他の修飾に対する相同性の程度を割り当てることにより、類似の配列をマッチさせる。保存的置換は典型的には以下のグループ内の置換を含んでいる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

【００６７】

「子癇前症の症状」とは、以下の症状を意味している：（１）妊娠２０週後に収縮期血圧（ＢＰ）＞１４０ｍｍＨｇおよび拡張期ＢＰ＞９０ｍｍＨｇ、（２）新規タンパク尿発症（尿分析の尿試験紙で１＋、２４時間尿採取で＞３００ｍｇのタンパク質、または無作為尿のタンパク質／クレアチニン比＞０．３）、ならびに（３）産後１２週までの高血圧およびタンパク尿の回復。子癇前症の症状は、腎機能不全および糸球体内皮症または肥大を含むことも可能である。「子癇の症状」とは、妊娠、または最近の妊娠の影響による以下の症状の発現を意味している：てんかん、昏睡、血小板減少、肝浮腫、肺浮腫および脳浮腫。

【００６８】

「治療量」とは、子癇前症または子癇に罹患する患者に投与された場合、本明細書に記載されたような子癇前症または子癇の症状の定性的または定量的減少を起こすのに十分な量を意味している。「治療量」は、子癇前症または子癇に罹患する患者に投与された場合、本明細書に記載されたアッセイにより測定されるような、ｓＦｌｔ－１発現レベルの減少、またはＶＥＧＦもしくはＰｌＧＦの発現レベルの増加を起こすのに十分な量を意味することも可能である。

【００６９】
「治療する」とは、予防目的および／または治療目的のために、化合物または医薬組成物を投与することを意味している。「疾患を治療する」、または「治療上の処置」への使用とは、被験者の状態を改善するため、すでに疾患を患う被験者への投与処置を指している。好ましくは、以下に記載した特徴的症状の同定、または本明細書に記載した診断方法の使用に基づいて、被験者は子癇前症または子癇を患っていると診断される。「疾患を予防する」とは、病気ではないが、特定の疾患を発症しやすい、または発症する危険性のある被験者の予防的処置を指している。好ましくは、被験者は、本明細書に記載した診断法を使用して、子癇前症または子癇を発症する危険性があると決定される。それ故、特許請求の範囲および態様において、治療とは、治療目的または予防目的のための哺乳動物への投与である。
【００７０】
「栄養膜細胞層」とは、子宮粘膜を浸食する芽細胞を覆っている外胚葉系中胚葉細胞層を意味しており、それを通って胎児が母から栄養分を受け取っている；細胞は胎盤の形成に寄与している。
【００７１】
「血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）」とは、米国特許第５，３３２，６７１号；第５，２４０，８４８号；第５，１９４，５９６号；およびＣｈａｒｎｏｃｋ－Ｊｏｎｅｓら（Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ、４８：１１２０－１１２８、１９９３）に定義されている成長因子に相同的な哺乳動物成長因子を意味しており、ＶＥＧＦ生物活性を有している。ＶＥＧＦはグリコシル化ホモダイマーとして存在し、代替的にスプライスされた少なくとも４つの異なったアイソフォームを含んでいる。天然ＶＥＧＦの生物活性には、血管内皮細胞または臍静脈内皮細胞の選択的増殖の促進、および血管形成の誘導が含まれる。本明細書において、ＶＥＧＦは、任意のＶＥＧＦファミリーメンバーまたはアイソフォームを含んでいる（例えば、ＶＥＧＦ－Ａ、ＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｃ、ＶＥＧＦ－Ｄ、ＶＥＧＦ－Ｅ、ＶＥＧＦ１８９、ＶＥＧＦ１６５またはＶＥＧＦ１２１）。好ましくは、ＶＥＧＦはＶＥＧＦ１２１またはＶＥＧＦ１６５アイソフォームであり（Ｔｉｓｃｈｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６、１１９４７－１１９５４、１９９１；Ｎｅｕｆｅｄら、Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ １５：１５３－１５８、１９９６）、それは本明細書に援用される米国特許第６，４４７，７６８号；第５，２１９，７３９号；および第５，１９４，５９６号に記載されている。Ｇｉｌｌｅら（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：３２２２－３２３、２００１）に記載されているＫＤＲ選択的ＶＥＧＦおよびＦｌｔ－１選択的ＶＥＧＦのようなＶＥＧＦの突然変異形も含まれる。ヒトＶＥＧＦが好ましいが、本発明はヒト型に限定されるものではなく、ＶＥＧＦの他の動物型（例えば、マウス、ラット、イヌまたはニワトリ）を含むことが可能である。
【００７２】
「ベクター」とは、通常プラスミドまたはバクテリオファージ由来のＤＮＡ分子を意味し、その中へＤＮＡ断片を挿入またはクローン化することができる。組換えベクターは、１つ以上の独特の制限部位を含有し、クローン化配列が複製可能であるように、決められた宿主または媒体生物体中で自律増殖可能であることができる。ベクターは、受容体細胞内へのトランスフェクションでＲＮＡが発現されるように、遺伝子またはコード領域に機能可能なように連結されたプロモーターを含有する。
【００７３】
本発明の他の特徴および利点は、以下の好ましい態様についての説明から、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。
【発明を実施するための最良の形態】
【００７４】
詳細な説明
我々は、子癇前症女性から採取された血清試料中で、ｓＦｌｔ－１レベルが上昇していることを発見した。ｓＦｌｔ－１はＶＥＧＦおよびＰｌＧＦへ高親和性で結合し、これら

の成長因子の分裂促進活性および血管形成活性を阻止する。それ故、ｓＦｌｔ－１は子癇前症の優れた診断マーカーであり、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦは子癇前症を治療するために使用できる。さらに、精製されたＶＥＧＦまたはＰｌＧＦへのｓＦｌｔ－１の結合を妨害する治療剤、または生物学的に活性なＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルを増加させる薬剤が、被験者の子癇前症または子癇を治療または予防するために使用することが可能であることを発見した。そのような薬剤には、限定されるわけではないが、ｓＦｌｔ－１に対する抗体、ｓＦｌｔ－１レベルを減少させるアンチセンスまたはＲＮＡｉのためのオリゴヌクレオチド、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルを増加させる化合物、ｓＦｌｔ－１に結合し、成長因子結合部位を遮断する小分子が含まれる。本発明はまた、成長因子レベルを測定するための方法も特徴としている；本方法は、子癇前症の早期検出、または子癇前症もしくは子癇の発現する危険性増加を診断する道具として使用することが可能である。

【００７５】

本明細書に提示する詳細な説明は具体的にはｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦを指すが、当業者には、詳細な説明が、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのファミリーメンバー、アイソフォームおよび／または変異体、ならびにｓＦｌｔ－１に結合することが示された成長因子にも応用できることが明らかであろう。以下の実施例は、本発明の例示が目的であり、限定されるものと解釈されるべきではない。

【実施例１】

【００７６】

子癇前症を有する妊娠女性におけるｓＦｌｔ－１　ｍＲＮＡおよびタンパク質のレベル増加。

子癇前症において病理的役割を果たしている新規分泌因子を同定するため、アフィメトリックスＵ９５Ａマイクロアレイチップを使用し、子癇前症を有する女性および有しない女性からの胎盤組織の遺伝子発現プロファイリングを実施した。子癇前症を有する女性において、ｓＦｌｔ－１遺伝子が上方制御されていたことを発見した。

【００７７】

子癇前症におけるｓＦｌｔ－１の上方制御を確認するため、正常圧妊娠女性と比較して、子癇前症妊娠女性における、胎盤ｓＦｌｔ－１　ｍＲＮＡレベルを分析するためのノーザンブロット（図１Ａ）およびｓＦｌｔ－１の血清タンパク質レベルを測定するためのＥＬＩＳＡアッセイ（図１Ｂ）を実施した。子癇前症は（１）妊娠２０週後の収縮期血圧（ＢＰ）＞１４０ｍｍＨｇおよび拡張期ＢＰ＞９０ｍｍＨｇ、（２）新規タンパク尿発症（尿分析の尿試験紙で１＋、２４時間尿採取で＞３００ｍｇのタンパク質、または無作為尿のタンパク質／クレアチニン比＞０．３）、および（３）産後１２週までの高血圧およびタンパク尿の回復、として定義されている。潜在的高血圧、タンパク尿または腎疾患を有する患者は除外した。患者は、腎炎範囲のタンパク尿（２４時間尿採取で＞３ｇのタンパク質、または尿タンパク質／クレアチニン比が０．３より大きい）の存在の有無に基づいて、軽度および重度の子癇前症に分割した。軽度子癇前症群における平均尿タンパク質／クレアチニン比は０．９４±０．２であり、重度子癇前症群は７．８±２．１であった。種々の群の平均在胎齢は以下の通りである：正常３８．８±０．２週、軽度子癇前症３４±１．２週、重度子癇前症３１．３±０．６週、および早期２９．５±２．０週。胎盤試料は、出産後直ちに得た。各々の胎盤から４つの無作為試料を採取し、ＲＮＡｌａｔｅｒ安定化溶液（アンビオン、オースチン、ＴＸ）に入れ、－７０℃で保存した。ＲＮＡ単離は、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮＡｅａｓｙ　Ｍａｘｉ　Ｋｉｔ（キアゲン、バレンシア、ＣＡ）を使用して実施した。

【００７８】

正常圧妊娠女性と比較し、子癇前症妊娠女性において、胎盤ｓＦｌｔ－１　ｍＲＮＡおよび母体血清ｓＦｌｔ－１タンパク質の増加を検出した。ｓＦｌｔ－１の平均血清レベルは、対照妊娠女性と比較して、重度子癇前症患者ではほぼ４倍高かった。この効果が子癇前症例の早期の在胎齢によるものであった可能性を除外するため、他の理由で早産した、在胎期間的に一致した正常圧女性（在胎齢２３～３６週）におけるｓＦｌｔ－１レベルも

測定し、正常圧満期妊娠と比較してこの群に有意差がないことを見出した。ノーザンブロットに使用されたプローブはＰＣＲ反応によって得たものであり、ｐＵＣ１１８ヒトｆｌｔ－１　ｃＤＮＡからのコード領域中の５００ｂｐ断片、および規格化対照として使用されたＧＡＰＤＨ　ｃＤＮＡを含む。

【００７９】

正常妊娠においては、胎盤により分泌されるプロ血管形成因子と抗血管形成因子の間に平衡が存在し、それは適切な胎盤発育に必要である。子癇前症においては、ｓＦｌｔ－１の産生増加、並びにＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの産生減少が、平衡を抗血管形成へ移動させることを仮説として設けた。純抗血管形成活性に取り組むため、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの血清レベルを測定し、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの血清レベルが、以前に記載されているように（Ｔｉｄｗｅｌｌら、Ａｍ．Ｊ．Ｏｂｓｔｅｔ．Ｇｙｎｅｃｏｌ．、１８４：１２６７－１２７２、２００１）、子癇前症を有する患者では、正常対照患者と比較してより低いことがわかった（平均ＰｌＧＦ、２３５．３±４５．３ｐｇ／ｍｌ対４６４±１１６．６ｐｇ／ｍｌ）。純抗血管形成活性の指標として、抗血管形成指標またはＰＡＡＩにｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦのレベルを取り込んだとき、正常患者から子癇前症を明らかに分離できたこと、そしてＰＡＡＩは子癇前症の重症度に相関しているようであることを見出した（図１Ｃ）。このＰＡＡＩは妊娠女性における子癇前症検出のための診断道具として使用することができる。

【実施例２】

【００８０】

子癇前症を有する女性からの血清は、インビトロ内皮管アッセイにおいて血管形成を阻害する。

子癇前症を有する患者における過剰の循環ｓＦｌｔ－１は内皮機能不全を起こし、抗血管形成状態へ導くということを仮説として設けた。これに取り組むため、血管形成のインビトロモデルとして内皮管アッセイを使用した。成長因子低下マトリゲル（７ｍｇ／ｍＬ、Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、ベッドフォード、ＭＡ）を、前もって冷却した４８ウェル細胞培養プレートのウェルへ加え（１００μｌ／ウェル）、３７℃で２５～３０分インキュベートして重合させた。継代３～５のヒト臍静脈内皮細胞（３００μｌの血清を含まない内皮細胞基本培地中３０，０００＋、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ、ウォーカースヴィル、ＭＤ）を１０％患者血清で処理し、マトリゲル被覆ウェル上に置き、３７℃で１２～１６時間インキュベートした。次に管形成を、４倍での逆位相差顕微鏡（ニコン社、東京、日本）を通して評価し、Ｓｉｍｐｌｅ　ＰＣＩイメージングソフトウェアーを使用して定量的に分析した（管領域および全長）。

【００８１】

管形成アッセイの条件は、正常ヒト臍静脈内皮細胞が外来性のＶＥＧＦのような成長因子存在下でのみ管を形成するように調節された。これらの条件下、正常圧女性からの血清が、規則的な管様構造を形成するように内皮細胞を誘導する一方、子癇前症を有する女性からの血清が管形成を阻害したことを見出した（図２）。注目に値するのは、産後４８時間までにこの抗血管形成効果が消滅したことであり、子癇前症患者からの血清で注目された管の阻害は、おそらく胎盤から放出された循環因子によるものであったことを示唆している。ｓＦｌｔ－１を正常圧血清に、子癇前症を有する患者で観察された量と類似の用量で添加した場合、管形成は起こらず、子癇前症女性からの血清で観察された効果を模倣している。外来性ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦを、子癇前症血清を使用しているアッセイへ添加した場合、管形成が復活した（図２）。組換えヒトＶＥＧＦ、ヒトＶＥＧＦおよびヒトＦｌｔ－１Ｆｃを、これらのアッセイに使用した。これらの結果は、子癇前症血清の抗血管形成特性は、内在性ｓＦｌｔ－１によるＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの拮抗作用によるものであったことを示唆している。これらの結果はまた、精製ＶＥＧＦおよび／またはＰｌＧＦの添加は、子癇前症状態を逆行させ、または和らげることが可能であり、そして治療的に使用することが可能であることも示唆している。

【実施例３】

【００８２】
ｓＦｌｔ－１は腎微小血管のＶＥＧＦおよびＰｌＧＦに誘導される血管拡張を抑制する。
血管収縮を引き起こすｓＦｌｔ－１の役割を、インビトロ微小血管反応性実験を使用して決定した。微小血管反応性実験は、ラット腎微小血管を使用して以前に記載されているように行った（Ｓａｔｏら、Ｊ．Ｓｕｒｇ．Ｒｅｓ．、９０：１３８－１４３、２０００）。腎臓動脈微小血管（内径７０～１７０μｍ）を、１０倍～６０倍の切開用顕微鏡（オリンパス光学、東京、日本）を使用して、ラット腎臓から切開した。単離された微小血管チャンバーに微小血管を置き、直径３０～６０μｍの２重のガラスマイクロメスピペットでカニューレ処置し、１０－０ナイロン単一繊維縫い糸（Ｅｔｈｉｃｏｎ、サマヴィル、ＮＪ）で確保した。３７℃に温め、酸素を含ませた（９５％酸素および５％二酸化炭素）クレブス緩衝液を、血管チャンバーおよび総計１００ｍｌの溶液を含有する貯蔵器を通して連続的に循環させた。血管は、クレブス緩衝液を満たしたビューレットマノメーターを使用して、流動していない状態で４０ｍｍＨｇまで加圧した。ビデオカメラへ連結した倒立顕微鏡（４０倍～２００倍；オリンパスＣＫ２、オリンパス光学）を使用し、血管像を白黒テレビジョンモニター上へ投影した。電子次元分析器（Ｌｉｖｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔａｔｉｏｎ、バーリントン、ＶＴ）を、内部管腔直径を測定するために使用した。測定はストリップチャート記録器（Ｇｒａｐｈｔｅｃ、アーヴィン、ＣＡ）で記録した。血管は、介入に先立って少なくとも３０分間微小血管チャンバーに浸しておいた。全ての実験群において、腎臓微小血管の弛緩応答は、Ｕ４６６１９（トロンボキサンアゴニスト）で微小血管を膨張圧４０ｍｍＨｇでのベースライン直径の４０～６０％へ前収縮させた後に試験した。定常状態へ達したら、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦおよびｓＦｌｔ－１のごとき種々の試薬への応答を試験した。組換えラットＶＥＧＦ、マウスＰｌＧＦおよびマウスＦｌｔ－１Ｆｃをこれらのアッセイで使用した。全ての薬剤は管腔外から適用した。応答が安定化したとき（通常、薬剤が投与されて２～３分）に測定を行った。１～４回の介入を各々の血管へ実施した。血管をクレブス緩衝液で洗浄し、介入の間に薬剤を含まないクレブス緩衝液中で２０～３０分間平衡化させた。

【００８３】
ｓＦｌｔ－１単独では有意な血管収縮を起こさないが、それはＶＥＧＦまたはＰｌＧＦにより誘導される血管拡張における用量応答性増加を阻止することを観察した（図３Ａ）。さらに、妊娠で観察される生理学的レベルでＶＥＧＦおよびＰｌＧＦが有意な用量応答性動脈弛緩を誘導すること、そしてこの効果は、重度の子癇前症女性において観察される濃度である１０ｎｇ／ｍｌ　ｓＦｌｔ－１の添加により阻止されたことを観察した（図３Ｂ）。この結果は、子癇前症を有する患者で循環しているｓＦｌｔ－１が血管弛緩に対抗し、これ故に高血圧へ寄与していることを示唆した。これらの結果は、ｓＦｌｔ－１が、高血圧を含む子癇前症の臨床的および病理学的症状の多くに関係しているという結論を支持している。例えば、方向付けられた抗体の使用を通したｓＦｌｔ－１の抑制は、子癇前症におけるこのタンパク質の効果を取り消すことができ、そしてそのようなｓＦｌｔ－１阻害剤は治療剤として使用できる可能性がある。

【実施例４】

【００８４】
子癇前症動物モデルにおけるｓＦｌｔ－１の効果。
前記の結果に基づき、外来性ｓＦｌｔ－１の添加が、動物モデルにおいて高血圧およびタンパク尿を引き起こすであろうという仮説を設けた。ｓＦｌｔ－１を発現するアデノウイルスは、有意な抗腫瘍活性に関連した、持続性の全身性ｓＦｌｔ－１レベルを生じることが示されている（Ｋｕｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９８：４６０５－４６１０、２００１）。マウスｓＦｌｔ－１をコードしているこの組換えアデノウイルスを、妊娠８～９日の妊娠Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの尾静脈内へ注射した。等量の、マウスＦｃおよびｓＦｌｋ１－Ｆｃ（マウスＶＥＧＦレセプター１　Ｆｌｋ１外部ドメインとＦｃタンパク質との融合タンパク質）をコードしているアデノウイルスを対照として使用した。Ｆｌｋ１はＶＥＧＦへ結合するが、ＰｌＧＦへは結合しない

ことが示されている。それゆえ、ｓＦｌｋ１－Ｆｃを、ｓＦｌｔ－１の抗ＶＥＧＦ活性と抗ＰｌＧＦ活性との識別を助けるための対照として選択した。

【００８５】

妊娠および非妊娠Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに、尾静脈注射により、Ａｄ　Ｆｃ、Ａｄ　ｓＦｌｔ－１またはＡｄ　ｓＦｌｋ－１Ｆｃを$1\times10^{9}$ｐｆｕを注射した。これらのアデノウイルスは以前に記載されており（Ｋｕｏら、前記文献）、Ｈａｒｖａｒｄ　Ｖｅｃｔｏｒ　Ｃｏｒｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙにて発生させた。妊娠ラットは、妊娠８～９日（第２期初期）にアデノウイルスを注射し、妊娠１６～１７日（第３期初期）に血圧を測定した。非妊娠動物においては、アデノウイルス注射８日後にＢＰを測定した。ＢＰはペントバルビタールナトリウム（６０ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．）で麻酔した後にラットで測定した。頸動脈を分離し、圧力変換器（Ｍｉｌｌａｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、ヒューストン、ＴＸ）へ連結された、３－Ｆｒ高フィデリティーマイクロチップカテーテルでカニューレ処置した。Ｍｉｌｌａｒ　Ｍｉｋｒｏ－Ｔｉｐカテーテルを動脈内へ進め、血圧を記録した。血圧および心拍数はチャートストリップレコーダー（モデル５６－１Ｘ　４０－００６１５８、Ｇｏｕｌｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、クリーブランド、ＯＨ）により記録し、１０分間を平均した。血液、組織および尿試料は、麻酔前に得た。尿アルブミンは標準尿試験紙で測定し、そして、別の文献（Ｃｏｈｅｎら、Ｋｉｄｎｅｙ　Ｉｎｔｌ．、４５：１６７３－１６７９、１９９４）に記載されているような競合的酵素連結イムノアッセイ（ＥＬＩＳＡ）により定量した。尿クレアチニンは、ピクリン酸比色法キット（シグマ、セントルイス、ＭＯ）により測定した。子癇前症の天然の病態を模倣するため、妊娠第３期初期に動脈内血圧を測定した。これらの実験はまた、ｓＦｌｔ－１の効果が、胎盤への効果を通した直接的または間接的なものであるかどうかを決定するため、非妊娠メスＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおいても実施した。血圧測定日のｓＦｌｔ－１全身レベルは、ウェスタンブロット分析により、ＢＰ測定日の種々のｓＦｌｔ－１処理動物において２５～３５０ｎｇ／ｍＬの範囲であることを確認した。異なった実験群における高血圧およびタンパク尿が表１に示されている。

【００８６】

【表１】

表１．ラットの血圧およびタンパク尿

| | N | MAP (mmHg) | U alb:cr 比 |
|---|---|---|---|
| Fc (P) | 5 | 75.6 ± 11.1 | 62 ± 21 |
| sFlt-1 (P) | 4 | 109.0 ± 19.3* | 6923 ± 658* |
| sFlk-1Fc (P) | 4 | 72.8 ± 14.7 | 50 ± 32 |
| Fc (NP) | 5 | 89.3 ± 5.7 | 138 ± 78 |
| sFlt-1 (NP) | 6 | 117.9 ± 12.9* | 12947 ± 2776* |
| sFlk-1Fc (NP) | 4 | 137.3 ± 2.3* | 2269 ± 669* |

妊娠(P)および非妊娠ラット(NP)に、Fc(対照)、sFlt-1 または sFlt-1Fc タンパク質を発現しているアデノウイルスを投与した。平均動脈血圧(MAP=拡張期＋1/3 パルス圧、mmHg)±S.E.M および尿アルブミン：Cr 比（クレアチニングラム当たりのアルブミン mg）±S.E.M を 8 日後に測定した、妊娠ラットにおいては第 3 三半期初期に相当。N=各々の実験群における動物の数。*は対照群(Fc)と比較した場合、p<0.01 の統計的有意性を示した。

【００８７】

ｓＦｌｔ－１で処理した妊娠ラットは、Ｆｃ対照と比較して、有意な高血圧およびネフローゼ範囲のアルブミン尿を有していた。ｓＦｌｔ－１が投与された非妊娠ラットもまた高血圧およびタンパク尿を発症した。注目すべきは、ｓＦｌｋ－Ｆｃ処理非妊娠ラットは高血圧およびタンパク尿を発症したが、ｓＦｌｋ－Ｆｃ処理妊娠ラットは発症しなかったことである。それ故、妊娠において、おそらく高レベルのＰｌＧＦが存在するため、ＶＥＧＦの拮抗作用単独では子癇前症を引き起こすには不十分である。非妊娠ラットにおいては、ＰｌＧＦが実質的に存在しない場合、ＶＥＧＦの拮抗作用単独でも前／抗血管形成平衡を破壊するのに十分であり、子癇前症に関連する病態と類似した腎病態を引き起こす。全てのｓＦｌｔ－１処理ラットで観察された腎病変を試験するために多様な染色技術を使用した（図４）。ラットから採取された腎臓はブアン溶液で固定し、切片にしてＨ＆ＥおよびＰＡＳ染色で染色した。電子顕微鏡のためには、腎組織をグルタルアルデヒドで固定し、アラルダイト－エポン混合物に包理し、そして超薄腎臓切片（１μｍ）を切断し、トルエンブルーで染色し、そして色々の倍率で、Ｚｅｉｓｓ　ＥＭ１０を使用して評価した。糸球体内のフィブリン沈着のための免疫蛍光は、ポリクローナル抗フィブリン抗体（ＩＣＮ、スイス）を使用して行われた。全体的および散在的糸球体内皮症は、ｓＦｌｔ－１処理ラットで普遍的に観察される腎病変であった。毛管内細胞の膨潤および肥大による毛細血管係蹄の閉塞を伴う糸球体拡大を検出した。糸球体内皮細胞中に、多数の明らかなタンパク質再吸収小滴が観察された。分節性糸球体硬化症は観察されなかった。糸球体内に、フィブリンの分離された「２重輪郭」および巣状沈着が見られた。有意なメサンギウム中間挿入が存在しないフィブリン沈着のこの発見は、ヒト疾患の分娩前段階に典型的と記載されているものに類似している（Ｋｉｎｃａｉｄ－Ｓｍｉｔｈ、Ａｍ．Ｊ．Ｋｉｄｎｅｙ　Ｄｉｓ．、１７：１４４－１４８、１９９１）。フィブリンのための免疫蛍光は、ｓＦｌｔ－１処理動物の糸球体内でのフィブリン沈着の病巣を示したが、Ｆｃ処理動物では示さなかった。ｓＦｌｋ１処理非妊娠ラットは同一の病変を発現した。実際、ｓＦｌｋ１

をｓＦｌｔ－１と同一のレベルで使用した場合、ｓＦｌｔ－１に対して拮抗するための循環前血管形成分子がより少ないので、非妊娠ラットにおいて腎損傷はより重度であった。これらの結果は、上昇したレベルのｓＦｌｔ－１が、子癇前症に関連する糸球体内皮症の原因であり得ること、しかし、糸球体変化は非妊娠ならびに妊娠ラットで検出されるため、この効果は胎盤と無関係であることを示唆した。これらの結果はまた、高血圧およびタンパク尿がｓＦｌｔ－１処理非妊娠マウスで発生したが、ＰｌＧＦレベルが高いｓＦｌｔ－１処理妊娠マウスでは発生しないので、ＶＥＧＦとＰｌＧＦの拮抗作用が子癇前症の病理学において重要であることも示唆している。

【００８８】

本明細書で作製された動物モデルは、新規治療化合物を試験するための実験動物としても使用することが可能である。可能性がある治療化合物の効能、ならびに薬理学および毒性を、この動物モデルを使用して研究することが可能である。

【実施例５】

【００８９】

子癇動物モデルにおけるｓＦｌｔ－１の効果。

妊娠第２期初期の妊娠ラットに外来性ｓＦｌｔ－１を注射した。次にその第３期初期の間、ラットの子癇発現をモニターし、試験した。子癇検出のために使用した試験には、浮腫発現のためのラット脳のＭＲＩ、てんかん発現のためのラット脳のＥＥＧ、および特異的内皮マーカーを使用した、内皮損傷が血液脳関門および脈絡叢に沿って発現したかどうかを決定するためのラット脳の組織学を含むことができる。

【００９０】

本明細書で作製された動物モデルは、新規治療化合物を試験するための実験動物としても使用することが可能である。可能性がある治療化合物の効能、ならびに薬理学および毒性を、この動物モデルを使用して研究することが可能である。

【実施例６】

【００９１】

尿中のＰｌＧＦ／クレアチニン比は子癇前症の診断となるものである。

尿試料は妊娠期間１６週の１０人の女性から得られた（５人正常、４人軽度子癇前症、および１人重度子癇前症）。これらの試料はマサチューセッツ総合病院のＲａｖｉ　Ｔｈａｄｈａｎｉ博士から提供された。正常妊娠女性に対する平均尿遊離ＰｌＧＦ／クレアチニン比（クレアチニンｍｇ当たりのｐｇ　ＰｌＧＦ）は７８±１０．７であり、４人の軽度子癇前症は３３±５．０であり、そして１人の重度子癇前症患者では１７であった。それ故、尿中のクレアチニンに対するＰｌＧＦの比の変化は、患者の子癇前症のための診断指標として有用である。

【実施例７】

【００９２】

女性の子癇前症および子癇の診断指標としてのｓＦｌｔ－１およびＰｌＧＦのタンパク質レベル。

この研究のためには、正常圧および子癇前症妊娠における循環ｓＦｌｔ－１、遊離ＰｌＧＦおよび遊離ＶＥＧＦの妊娠パターンを分析するため、カルシウムによる子癇前症予防研究の試行からの記録として保存された試料を使用した。カルシウムによる子癇前症予防研究またはＣＰＥＰは、子癇前症の発現率および重度に対する２ｇの基本的カルシウムまたはプラセボの毎日の補充の影響を評価するため、１９９２～１９９５年の期間に実施された、無作為化２重盲検臨床試行である（Ｌｅｖｉｎｅら、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３７７：６９－７６、１９９７；Ｌｅｖｉｎｅら、Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｃｌｉｎ．Ｔｒｉａｌｓ　１７：４４２－４６９、１９９６）。健康で、単生児を有する未産女性が、妊娠１３～２１週の間に、５カ所の関与している米国医科センターで登録され、そして共通のプロトコールおよび同一のデータ収集様式を使用して産後２４時間まで追跡した。登録時には、全てのＣＰＥＰ参与者は＜１３５／８５ｍｍＨｇの血圧を有しており、そしてだれも腎機能不全またはタンパク尿を有していなかった。在胎齢は超音波試験により決定した。

血清検体は、試行での登録前（１３～２１週）、２６～２９週、まだ妊娠している場合は３６週、そして高血圧またはタンパク尿に気付いたときに、参与者から得られた。「エンドポイント検体」とは、別の所に記載してあるように（Ｌｅｖｉｎｅら、１９９６、上記文献）、子癇前症症状および徴候の発症時またはその後、しかし分娩および出産前に得られた検体である。ＣＰＥＰ試行からの保存された血液試料は、ＮＩＨのＲｉｃｈａｒｄ Ｌｅｖｉｎｅ博士との共同研究を通して得られた。

参与者

完全な結果情報、＜２２週で得られた血清試料、および男性生産児を有する被験者を選択した。４，５８９人のＣＰＥＰ参与者の内、追跡調査が失われた２３５人、２０週より前に妊娠が終結した２１人、母親または出生時結果データがなくなった１３人、喫煙履歴がない４人、チャート検査チームにより高血圧が確かめられなかった９人、および死産の３２人を除外し、適切な情報および出産を有する４，２５７人が残った。これらの内、２，１５６人が男の乳児を有していた。その乳児が染色体異常を有していた１人の女性、妊娠性高血圧の３８１人、およびベースライン血清検体がない４３人を除外すると、１，７３１人の女性が残った。これらの内、１７５人が子癇前症を発症し、そして１，５５６人が妊娠を通じて正常圧でとどまっていた。

【００９３】

カルシウム補充は、子癇前症の危険性および重度には何の影響もなく、そして前および抗血管形成分子の濃度に関連していなかったので、症例および対照はＣＰＥＰ処置に関係なく選択した。各々の子癇前症症例に対し、１つの正常圧対照は、登録現場、最初の血清検体を採取した在胎齢（１週間以内）、および－７０℃での冷凍保存時間（１２ヶ月以内）が一致するように選択した。分娩前に得られた６５７の血清検体全てから、１２０の一致した対（「症例」および「対照」）を、無作為に分析のために選んだ（下記表２）。最初の血清検体採取時の平均在胎齢は症例および対照で、各々１１２．８日および１３日であった；平均冷凍保存継続時間は９．３５年および９．３９年であった。

【００９４】

【表２】

表２．ＣＰＥＰ登録での症例および対照およびその新生乳児の特性

| 特性 | 症例 (n=120) | 対照 (n=120) |
|---|---|---|
| 年齢(年) | 20.8 ± 4.5 | 20.2± 3.6 |
| 身長(cm) | 161.0± 6.7 | 163.0± 6.9 * |
| 体重(kg) | 71.0± 19.4 | 66.8± 17.1 |
| 肥満度指数 | 27.3± 6.8 | 25.1± 6.1 ** |
| 収縮期血圧 (mmHg) | 109.5± 8.8 | 105.7± 9.0 ** |
| 拡張期血圧(mmHg) | 62.0 ± 7.9 | 59.4± 7.4 ** |
| 以前の妊娠喪失[n(%)] | 23 (19.2) | 25 (20.8) |
| 現喫煙者[n(%)] | 9 (7.5) | 13 (10.8) |
| 私的健康保険[n(%)] | 8 (6.7) | 13 (10.8) |
| 既婚[n(%)] | 25 (20.8) | 24 (20.0) |
| 人種／民族性 | | |
| 白人、非ﾗﾃﾝｱﾒﾘｶ系[n(%)] | 24 (20.0) | 35 (29.2) |
| 白人、ﾗﾃﾝｱﾒﾘｶ系[n(%)] | 21 (17.5) | 14 (11.7) |
| ｱﾌﾘｶ系ｱﾒﾘｶ人[n(%)] | 69 (57.5) | 68 (56.7) |
| その他、不明[n(%)] | 6 (5.0) | 3 (2.5) |
| 出生時体重(g) | 3100± 796 | 3255± 595 |
| <37 週での出産[n(%)] | 29 (24.2) | 9 (7.5) ** |
| 在胎齢に比して小さい (<100 分の 10)[n(%)] | 18 (15.0) | 4 (3.3) ** |

特に指示しない限り平均±標準偏差　* p<0.05　** p<0.01

【００９５】

この研究のため、高血圧は、４～１６８時間あけた２つの機会に少なくとも拡張期血圧９０ｍｍＨｇとして定義された。重度高血圧は、４～１６８時間あけた２つの機会に、または女性が抗高血圧治療を受けている場合は１つの機会に、少なくとも拡張期血圧９０ｍｍＨｇとして定義された。タンパク尿は、２４時間尿採取でタンパク質３００ｍｇ以上、尿試験紙により少なくとも１＋タンパク質を含んでいる４～１６８時間あけた２つの無作為尿検体、少なくともタンパク質／クレアチニン比０．３５を有する１回無作為尿検体、または尿試験紙により少なくとも２＋タンパク質を含んでいる１回無作為尿検体、として定義された。重度タンパク尿は、少なくとも３．５ｇのタンパク質を含んでいる２４時間尿採取試料により、または尿試験紙により少なくとも３＋タンパク質を含んでいる２回無

作為尿検体により診断した。子癇前症は、互いに７日以内に起こっている高血圧およびタンパク尿として定義した；重度子癇前症は、重度高血圧、重度タンパク尿、ＨＥＬＬＰ症候群（溶血、肝臓酵素上昇、低血小板）、または子癇を有する子癇前症として定義した。子癇前症の発症は最初の上昇した血圧の検出時点であり、または尿試料中のタンパク尿は子癇前症の診断を導いている。

【００９６】

在胎齢に比して小さい（ＳＧＡ）とは、人種、出産経歴および乳児の性による在胎齢のための出生時体重の米国表（ＺｈａｎｇおよびＢｏｗｅｓ、１９９５、上記文献）に従って、在胎齢について１００分の１０より軽い出生時体重として定義した。

方法

アッセイはＢｅｔｈ Ｉｓｒａｅｌ Ｄｅａｃｏｎｅｓｓ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒにおいて、患者の診断およびその他の関連情報を何も知らされていない実験室職員により実行された。検体は分析のため無作為に指図した。ヒトｓＦｌｔ－１、遊離ＰｌＧＦおよび遊離ＶＥＧＦのための酵素連結免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）は、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（ミネアポリス、ＭＮ）から購入したキットを使用し、製造者の指示に従って実施した。－７０℃で保存されていた血清試料の一部を室温で融解し、ＢＳＡ／トリス－緩衝液で希釈し、ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦまたはＶＥＧＦに対して方向付けられた捕捉抗体で前もって被覆された９６ウェルプレート中で、２時間インキュベートした。次にウェルを３回洗浄し、過酸化水素およびテトラメチルベンジジンを含有する基質溶液と２０分インキュベートし、そして反応を２Ｎ硫酸で停止させた。光学密度を４５０ｎｍで測定した（波長補正５５０ｎｍ）。全てのアッセイは２重に実施した。タンパク質濃度は、既知濃度の各々の組換えタンパク質から誘導される標準曲線を使用して計算した。２回の実験間の相違が２５％を超えていたらアッセイを繰り返し、元々の結果は廃棄した。アッセイはｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦに対して５、７および５ｐｇ／ｍｌの感度を有しており、ｓＦｌｔ－１に対して７．６％および３．３％、ＰｌＧＦに対して１１．２％および５．４％、およびＶＥＧＦに対して７．３％および５．４％のアッセイ間およびアッセイ内変動係数を有していた。

統計分析

$\chi^2$検定およびｔ検定を、母親または乳児特性の分析に使用し、各々カテゴリーまたは連続変数を比較した。濃度の算術平均値が本文および図に与えられているが、特に示さない限り、統計試験は対数変換後に実施した。調整は、対数変換した濃度に対するロジェスティック回帰を使用して実施した。

結果

１２０症例の内、８０は軽度、４０は重度（ＨＥＬＬＰ症候群３および子癇３を含む）の子癇前症を発症した。症例患者は対照患者よりも小さく、より高い肥満度指数を有しており、そしてより高いベースライン血圧であった（表２）。加えて、より多くの比率の症例患者は、早期産または在胎齢に比して小さい（ＳＧＡ）乳児によって複雑にされた妊娠であった。症例患者は本研究に対し、２．９血清検体の平均で寄与した；対照、２．６検体。

【００９７】

最初に、活動性疾患時の子癇前症を有する患者において、ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦが、このＣＰＥＰ研究群からの妊娠期間が一致した対照と比較して変化していることを確認した。確立された臨床子癇前症の時点で採取された検体（エンドポイント検体）は、以前に公表された報告（Ｍａｙｎａｒｄら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１１：６４９－６５８、２００３）と類似して、一致した在胎齢を有する対照と比較して劇的に増加したｓＦｌｔ－１レベル、減少したＰｌＧＦレベルおよび減少したＶＥＧＦレベルを有していた（２３の在胎齢一致対において、症例および対照に対し、各々、４３８２対１６４３ｐｇ／ｍｌ ｓＦｌｔ－１、ｐ＜０．０００１；１３７対６６９ｐｇ／ｍｌ ＰｌＧＦ、ｐ＜０．０００１；および６．４１対１３．８６ｐｇ／ｍｌ ＶＥＧＦ、ｐ＝０．０６）

ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦレベルの妊娠期間パターンを調べるため、種々の在胎齢領域内の、症例患者および対照から得られた血清検体から、ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦの循環濃度を測定した。子癇前症１２０人および対照女性１２０人に対するｓＦｌｔ－１タンパク質の妊娠期間パターンが図５Ａに示されている。対照患者におけるｓＦｌｔ－１レベルは３３～３６週までは一定に保たれており、その後分娩および出産まで、週当たり約１４５ｐｇ／ｍｌで上昇した。臨床症状前の症例患者間では、ｓＦｌｔ－１はより急勾配の上昇で、２１～２４週で上昇し始めるようであり、２９～３２週で対照とは統計的に有意に異なっている（図５Ａ）。全体的に、臨床症状発症前に測定された症例と対照患者との相違は、妊娠中期で１７％（ｐ＜０．０５）であった。エンドポイント検体は、疾患以前に採取された検体と比較して有意に上昇していた。臨床症状発症に先立ったｓＦｌｔ－１上昇の機構を調べるため、全ての子癇前症でのｓＦｌｔ－１濃度を、子癇前症の発症以前の週についてプロットした（図５Ｂ）。症例患者からの検体中の平均ｓＦｌｔ－１濃度を、子癇前症発症前の完了した週についてプロットした。子癇前症前５週から始まり、ｓＦｌｔ－１濃度は疾患発症前１週まで実質的に上昇し、その時点でエンドポイント検体に観察される濃度に到達した。子癇前症前４、３、２および１週における増加は、平均在胎齢におけるわずかな変化と共に起こり、進行している在胎齢に伴って増加する第３期後期によっては説明することができない。子癇前症前８～６週から５週で、ｓＦｌｔ－１は９６２ｐｇ／ｍｌ増加し、一方、平均在胎齢は３１日上昇した。ｓＦｌｔ－１におけるこの増加の約３分の１は、進行している妊娠期間へ帰することができない。子癇前症の発症前≦５週に得られた検体を除いた後の、対照および症例において、ｓＦｌｔ－１の在胎齢によるグラフを作った場合、実質的相違は観察されなかった（図５Ｃ）。これらのデータは、子癇前症発症前の症例患者におけるより高いｓＦｌｔ－１濃度は、臨床疾患の発症前５週以内の、ｓＦｌｔ－１の急な上昇によるものであることを示唆している。

【００９８】

次に、図６Ａに示したように、同一患者群のＰｌＧＦタンパク質の妊娠パターンをプロットした。対照ＰｌＧＦタンパク質濃度は最初の２つの三半期間に上昇し（２９～３２週でピーク）、そして妊娠後期の間に低下した。子癇前症前の症例患者の間のＰｌＧＦタンパク質濃度は類似の妊娠パターンに従ったが、１３～１６週からは対照よりも有意に低かった。全体的に、臨床症状の発症前に測定された症例と対照患者とのＰｌＧＦの相違は、妊娠中期で３５％（ｐ＜０．０００１）であった。子癇前症発症前の症例のＰｌＧＦレベルが、子癇前症前の週により（図６Ｂ）、および検体を除去した後の在胎齢子癇前症前＜５週の検体を除いた後の在胎齢により（図６Ｃ）、描かれてある。子癇前症発症より前の１週までに、濃度は、子癇前症発症後に観察された濃度に達した（図６Ｂ）。対照と比較して、症例患者のＰｌＧＦレベルは、出産前５週および３週のより実質的減少を伴って、出産から遠く離れて穏やかに減少した。対照患者の濃度は出産前１７～１５週から３週にかけて高く維持され、その後劇的に低下した。子癇前症前＜５週に得られた献体を除いたＰｌＧＦレベルを示しているグラフは、対照と比較して、妊娠２９～３２週では症例におけるより小さな減少を、そして３３～３６週での症例患者から得られた検体中では少しも変わっていなかった（図６Ｃ）。このことは、疾患より前の週におけるＰｌＧＦ濃度の低下が、疾患の発症時（または図６Ａに示されたエンドポイント検体）に注目されるＰｌＧＦの劇的な低レベルの原因であることを示唆している。

【００９９】

妊娠を通したＶＥＧＦ濃度は非常に低く、３７～４１週での症例患者における有意な減少を除いて、対照および症例で類似していた。子癇前症前５週間に得られた検体を除いた症例において、２３～３２週での平均ＶＥＧＦ濃度は、対照とは有意に異なっていない（１１．６対１２．８ｐｇ／ｍｌ）のに対し、出産前≦５週の検体を含む症例中の濃度は異なっていた（５．１対１２．８ｐｇ／ｍｌ、ｐ＜０．０１）。３３～４１週において、子癇前症前＞５週または≦５週のＶＥＧＦ濃度は、各々対照より高いかまたは低かったが（１１．２ｐｇ／ｍｌおよび８．３対９．７ｐｇ／ｍｌ）、これらの差は有意ではなかった

。

【０１００】

図７は２３～３２週（図７Ａ）および３３～４１週（図７Ｂ）での、子癇前症状態および重度による、ｓＦｌｔ－１およびＰｌＧＦを示している。グラフは、子癇前症発症前のｓＦｌｔ－１増加およびＰｌＧＦ減少は、疾患重度、発症時期、およびＳＧＡ乳児の存在に関連していることを示している。２３～３２週では、子癇前症の発症前のＳＧＡを有する症例患者におけるｓＦｌｔ－１およびＰｌＧＦは、各々、ＳＧＡを有する対照患者の対応する濃度より、有意により高いかまたはより低かった。さらに、早期産した対照患者との比較において、早期産の症例患者はより高いｓＦｌｔ－１および有意に低いＰｌＧＦを有していた。

【０１０１】

次に、子癇前症発現の危険性がある女性を同定するために、第１期のＰｌＧＦおよび／またはｓＦｌｔ－１の循環濃度が使用できるかどうかを決定した。８～２０週では、在胎齢、肥満度指数およびｓＦｌｔ－１を調節した後、対照値分布の最も低い四分位置にＰｌＧＦを有する症例患者は、３つのより高い四分位置にＰｌＧＦを有する場合と比較して、＜３４週での子癇前症がほぼ１２倍増加した危険性を有していた（オッズ比［ＯＲ］１１．７、ｐ＜０．０５）（表３）。最も低い四分位置における＜３４週での子癇前症の危険性は、最も高い四分位置と比較すると、ほぼ１６倍に増加した（ＯＲ　１５．８、ｐ＜０．０１）

【０１０２】

【表３】

表３：８－２０週における対照ＰｌＧＦ分布の四分位置による、初期発症子癇前症のオッズ比（ＯＲ）

| | ＰＥ発症＜３４週 | | | ＰＥ発症＜３７週 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PlGF (pg/ml) | 症例 (N) | 対照 (N) | 調節ＯＲ* (95% CI) | 症例 (N) | 対照 (N) | 調節ＯＲ* (95% CI) |
| Q4 >267.5 | 2 | 30 | 1.0 指示対象 | 4 | 30 | 1.0 指示対象 |
| Q3 >128.6-267.5 | 1 | 30 | 0.7 (0.1- 8.9) | 4 | 30 | 1.3 (0.3- 5.8) |
| Q2 > 70.1-128.6 | 3 | 30 | 2.3 (0.3-19.3) | 6 | 30 | 2.6 (0.6- 12.1) |
| Q1 < 70.1 | 5 | 30 | 15.8 (1.5-172.8)** | 17 | 30 | 22.3 (3.7-135.6)*** |

*在胎齢、肥満度指数、log sFlt-1により調節されたオッズ比

**p<0.01　　***p<0.001　　95%CI=95%信頼限界

【０１０３】

これらの結果は、ｓＦｌｔ－１レベルが子癇前症症状の発症前約５週に劇的に上昇し始めることを示している。ｓＦｌｔ－１の上昇と平行して、遊離ＰｌＧＦおよび遊離ＶＥＧＦレベルは低下し、ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦの減少は、少なくとも部分的にはｓＦｌｔ－１による拮抗作用によるものであり、そしてＰｌＧＦおよびＶＥＧＦの胎盤での産生の減少によるものではないであろう。３つの子癇前症サブグループ－重度子癇前症、疾患の早期発症、およびＳＧＡ乳児－は、対照または軽度子癇前症を有する女性よりも、２３～３２週および３３～４１週で、より高いｓＦｌｔ－１およびより低いＰｌＧＦ濃度を有していた。また、子癇前症を発現すると運命付けられている女性間で、第２期初期に遊離ＰｌＧＦの小さいがしかし有意な減少が始まっていることも示された。これらの結果は、ＰｌＧＦレベルの減少は、早期発症子癇前症の有用な前兆であることができることを示している。

【０１０４】

本明細書において初めて、正常妊娠におけるｓＦｌｔ－１の妊娠パターンが記述され、妊娠を通しての比較的安定なレベル、続いて３３～３６週に始まる定常的な増加が観察された。この上昇は、他の研究者による正常妊娠（Ｔｏｒｒｙら、Ｊ．Ｓｏｃ．Ｇｙｎｅｃｏｌ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０：１７８－１８８、１９９８；Ｔａｙｌｏｒら、Ａｍ．Ｊ．Ｏｂｓｔｅｔ．Ｇｙｎｅｃｏｌ．１８８：１７７－１８２、２００３）、および本明細書における結果で観察されたＰｌＧＦの妊娠後期での低下に対応している。時間的関連は、ｓＦｌｔ－１がＰｌＧＦ　ＥＬＩＳＡ測定を妨害するという知見（Ｍａｙｎａｒｄら、上記文献）と共にして、妊娠後期間の遊離ＰｌＧＦの低下が、ｓＦｌｔ－１レベルの上昇によるものであり得ることを示唆している。胎児の要求の増加とともに胎盤成長が速度を保つことが必要とされる第１期および第２期の間、ＰｌＧＦ濃度は高く、そしてｓＦｌｔ－１濃度は低く、比較的に前血管形成状態を作り出している。胎盤血管成長が平静化および停止されることが必要であろう妊娠後期は、抗血管形成性ｓＦｌｔ－１の上昇および結果としてのＰｌＧＦの減少がある。子癇前症を有する女性において、ｓＦｌｔ－１上昇は妊娠初期、症状発症前約５週、平均して約２９～３２週に始まる。それ故、子癇前症においては、抗血管形成「ブレーキ（ｂｒａｋｅ）」があまりに早くおよびあまりに強く適用されるため、胎盤成長を阻止する、正常生理学的プロセスの誇張を生じる。子癇前症を特徴付ける病理学的胎盤変化が妊娠初期（１０～１４週）、ｓＦｌｔ－１の劇的上昇のかなり前に起こることは明白なようである。生じた胎盤虚血それ自身が、ｓＦｌｔ－１産生を促進することができ、最終的にｓＦｌｔ－１バースト（ｂｕｒｓｔ）を引き起こす。

【０１０５】

臨床症状発現前５週で見られる大きな相違に加え、子癇前症を発現すると運命付けられている女性は、早くも妊娠１３～１６週に、小さいがしかし統計的に有意な遊離ＰｌＧＦの減少を示した。このＰｌＧＦの低下は、一般的に、ｓＦｌｔ－１レベルの相反する増加を伴ってはいなかった。しかしながら、統計的に有意ではないが、第１期の症例において、ｓＦｌｔ－１レベルがわずかに高い傾向があった（例えば、１７～２０週期間で、症例の平均ｓＦｌｔ－１レベルは、対照の７９５．２５ｐｇ／ｍｌに対して８６５．７７であった）。妊娠初期におけるこのＰｌＧＦの減少は、子癇前症またはＳＧＡのごとき条件に歩み寄った、妊娠におけるＰｌＧＦのより少ない胎盤産生を反映しているのかもしれない。重要なことは、ＳＧＡにより複雑化された子癇前症を有する患者において、疾患発現より前に、ｓＦｌｔ－１上昇およびＰｌＧＦ低下において、統計的に有意な増加が観察されたことである。子癇前症においてＰｌＧＦの胎盤産生に変化がないこと、そして胎盤における局所ｓＦｌｔ－１レベルの上昇が、循環遊離ＰｌＧＦの減少に寄与できることも可能である。このことは、免疫組織化学により測定された胎盤ＰｌＧＦは、子癇前症において変化しないという発見に支えられている（Ｚｈｏｕら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１６０：１４０５－１４２３、２００２）。

【０１０６】

要約すると、ｓＦｌｔ－１は、臨床疾患の少なくとも５週前に、子癇前症において上昇し始め、それは循環遊離ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦの減少を伴うことが示された。第１期の間に減少したＰｌＧＦは、子癇前症の前兆として働くことができ、そして上昇したｓＦｌｔ－１は臨床疾患が近い前兆として働くことができる。このデータは、ｓＦｌｔ－１単独で齧歯類において子癇前症様症状を誘導することが示されている前記動物研究と共に、子癇前症の病理学におけるｓＦｌｔ－１の可能な病原学的役割を示唆している。対照におけるＳＧＡ乳児および早期産の我々の限定されたデータは、ＳＧＡ乳児を有する子癇前症妊娠で観察されたタンパク質レベルの増加した変化は、症例患者と比較して、子癇前症が存在しない場合の子宮内成長制限または早期産のみによる相違よりもより実質的であることを示唆している。

診断

本発明は、子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する傾向を検出するための診断を特色としている。ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたはｓＦｌｔ－１のレベル（遊離または全体のレベル）を被験者試料で測定し、そして子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する

傾向の指標として使用する。

【０１０７】

１つの態様において、少なくとも２つのタンパク質のレベル間における関係が子癇前症または子癇の指標であるかどうかを決定するために、測定基準を使用する。標準的方法を、尿、血清、血漿、唾液、羊水または脳脊髄液を含むがこれらに限定されない任意の体液中の、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたはｓＦｌｔ－１のポリペプチドレベルを測定するために使用することができる。そのような方法には、イムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたはｓＦｌｔ－１に方向付けられた抗体を使用するウェスタンブロット、およびＯｎｇら（Ｏｂｓｔｅｔ．Ｇｙｎｅｃｏｌ．、９８：６０８－６１１、２００１）およびＳｕら（Ｏｂｓｔｅｔ．Ｇｙｎｅｃｏｌ．、９７：８９８－９０４、２００１）により記載されている定量的酵素イムノアッセイ技術が含まれる。ＥＬＩＳＡアッセイはＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたはｓＦｌｔ－１のレベルを測定するために好ましい方法である。２ｎｇ／ｍｌを超えるｓＦｌｔ－１の血清レベルは、子癇前症の陽性指標と考えられる。さらに、正常レベルに関して、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたはｓＦｌｔ－１のレベルの検出可能な変化は、子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する傾向の指標である。好ましくはｓＦｌｔ－１を測定し、より好ましくはＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの測定がこの測定と組み合わされ、最も好ましくは３つ全てのタンパク質（またはタンパク質レベルの指標としてのｍＲＮＡレベル）を測定する。

【０１０８】

他の態様において、ＰＡＡＩ（ｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ＋ＰｌＧＦ）を、子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する傾向を診断するものである抗血管形成指標として使用する。ＰＡＡＩが２０を超えている場合は、被験者は子癇前症を有しているか、またはそれを発現する差し迫った恐れがあると考えられる。ＰＡＡＩ（ｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ＋ＰｌＧＦ）比は、診断指標として使用することができる有用な測定基準の１例にすぎない。本発明を限定することを意図していない。実質的には、正常対照に関して、子癇を有する被験者における抗血管形成指標の変化を検出する任意の測定基準を、診断指標として使用することができる。

【０１０９】

特定の核酸またはポリペプチドの発現レベルは、特定の疾患状態（例えば、子癇前症または子癇）と相関させることができ、それ故、診断において有用である。ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦまたはＶＥＧＦの核酸配列に由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片は、発現をモニターするだけでなく、状態を発現する素因の指標である、ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦまたはＶＥＧＦの核酸分子中の遺伝子変異、突然変異または多型を有している被験者を同定するためにも使用することができる。そのような多型は当業者には公知であり、Ｐａｒｒｙら（Ｅｕｒ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ．２６：３２１－３、１９９９）により記載されている。そのような遺伝子変化は、プロモーター配列、読み取り枠、イントロン配列、またはｓＦｌｔ－１遺伝子の非翻訳３’領域に存在することができる。遺伝子変化に関する情報は、子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する傾向を有する被験者を診断するために使用することが可能である。本明細書を通して注目されるように、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦおよび／またはＰｌＧＦの生物活性レベルにおける特定の変化は、子癇前症もしくは子癇、またはその素因の見込みと相関させることができる。その結果、既定の突然変異を検出すると、当業者は次に、突然変異が子癇前症もしくは子癇を起こすかまたは見込みを増加させるかどうかを決定するため、タンパク質の生物活性の１つ以上の測定基準をアッセイすることが可能である。

【０１１０】

１つの態様において、子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する傾向を有している被験者は、ｓＦｌｔ－１をコードする核酸の発現増加、またはＰｌＧＦもしくはＶＥＧＦのレベルの改変を示すであろう。そのような改変を検出するための方法は、本技術分野では標準であり、Ａｕｓｕｂｅｌら、上記文献、に説明されている。１つの例において、ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦまたはＶＥＧＦ　ｍＲＮＡレベルを検出するため、ノーザンブロ

ッティングまたはリアルタイムＰＣＲを使用する。

【０１１１】

他の態様において、ゲノム配列または密接に関連した分子を含む、ｓＦｌｔ－１核酸分子を検出可能なＰＣＲプローブとのハイブリダイゼーションを、子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する危険性を有する被験者から誘導された核酸配列へハイブリダイズさせるために使用することができる。プローブが高度に特異的な領域（例えば、５’制御領域）から作製されても、より低い特異性領域（例えば、保存モチーフ）から作製されても、プローブの特異性、およびハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジェンシー（最高、高、中、または低）が、プローブが天然に存在する配列、対立変異体または他の関連する配列へハイブリダイズするかどうかを決定する。ハイブリダイゼーション技術は、ｓＦｌｔ－１核酸分子中の子癇前症または子癇を指し示している突然変異を同定するために使用することができ、またはｓＦｌｔ－１ポリペプチドをコードしている遺伝子の発現レベルをモニターするために使用することができる（例えば、ノーザン分析により、Ａｕｓｕｂｅｌら、上記文献）。

【０１１２】

さらに他の態様において、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの核酸分子配列の直接分析により、子癇前症または子癇を発現する傾向についてヒトを診断することができる。

【０１１３】

子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する傾向を有する被験者は、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドの発現増加を示すであろう。ｓＦｌｔ－１ポリペプチドを特異的に結合する抗体を、子癇前症または子癇を診断するために、またはそのような状態を発現する危険性がある被験者を同定するために使用することができる。免疫学的方法（ＥＬＩＳＡおよびＲＩＡのような）を含む、そのようなポリペプチドの発現における変化を測定するための多様なプロトコールが知られており、子癇前症または子癇、またはそのような状態を発現する危険性を診断するための基礎を提供する。再び、本ポリペプチドのレベルにおける増加は、子癇前症、子癇またはそのような状態を発現する傾向を有している被験者の診断となるものである。

【０１１４】

１つの態様において、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのポリペプチドまたは核酸、またはその任意の組み合わせのレベルを、少なくとも２つの異なった時点で測定し、時間を通して、正常基準レベルと比較したレベルの改変を、子癇前症または子癇、またはそのような状態を発現する傾向の指標として使用する。

【０１１５】

子癇前症または子癇、またはそのような状態を発現する傾向を有する被験者の体液中のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルは、正常対照のｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルに対して、最少でわずか１０％、２０％、３０％または４０％、または最大で５０％、６０％、７０％、８０％または９０％ほど変化することができる。子癇前症または子癇、またはそのような状態を発現する傾向を有する被験者の体液中に存在しているｓＦｌｔ－１レベルは、正常対照被験者のレベルに対して、１．５倍、２倍、３倍、４倍または最大で１０倍以上増加することができる。

【０１１６】

１つの態様において、体液（例えば、尿、血清、血漿、羊水）の被験者試料を、子癇前症症状の発症前の妊娠初期に採取する。他の例において、試料は子癇前症症状の発症前の妊娠初期に採取された組織または細胞であることが可能である。非制限的例には、胎盤組織、内皮細胞および単球のごとき白血球が含まれる。ヒトにおいて、例えば、妊娠の第１期、第２期または第３期の間に、妊娠女性の前肘静脈から母親血液血清試料を採取する。好ましくは、アッセイを第１期の間に（例えば、４、６、８、１０または１２週に）、または第２期の間に（例えば、１４、１６、１８、２０、２２または２４週に）実行する。そのようなアッセイはまた、第２期の終わりに、または第３期の始めに（２８週付近）に

も実施することができる。ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルをこの期間に２回測定するのが好ましい。産後子癇前症または子癇の診断のため、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのアッセイを産後に実行することができる。

【０１１７】

１つの特別な例において、連続的血液試料を妊娠間に採取することができ、可溶性ｓＦｌｔ－１のレベルをＥＬＩＳＡにより決定した。この技術を使用する１つの研究において、ｓＦｌｔ－１をコードしている代替的にスプライスされたｍＲＮＡが栄養膜細胞層により高く発現され、そしてタンパク質は、妊娠女性の血漿中に容易に検出可能であった。ｓＦｌｔ－１のレベルは、２０～３６週の間の妊娠期間に約３倍増加することが観察された。レベルは、引き続いて子癇前症を発現するように進行した、危険性が高い女性において有意により高いことが観察された（Ｃｈａｒｎｏｃｋ－Ｊｏｎｅｓら、Ｊ．Ｓｏｃ．Ｇｙｎｅｃｏｌ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．１０（２）：２３０、２００３）。

【０１１８】

獣医学実行において、アッセイは妊娠間の任意の時間に実行することができるが、好ましくは、妊娠の初期、子癇前症症状の発症より前に実施する。妊娠の期間が種間で広範囲に変化するとすれば、アッセイの時期は獣医師により決定されるであろうが、しかし一般的には、ヒト妊娠間のアッセイの時期に対応しているであろう。

【０１１９】

本明細書に記載した診断法は、個々に、または子癇前症または子癇の存在、重度または発症の推定時期のより正確な診断のための、本明細書に記載した他の診断法と組み合わせて使用することが可能である。加えて、本明細書に記載した診断法は、子癇前症または子癇の存在、重度または発症の推定時期の正確な診断のために有用であると決定されている他の診断法と組み合わせて使用することが可能である。

【０１２０】

本明細書に記載した診断法はまた、被験者における子癇前症または子癇をモニターおよび管理するためにも使用することが可能である。１つの例において、被験者が１０ｎｇ／ｍＬの血清ｓＦｌｔ－１タンパク質レベル、および１００ｐｇ／ｍＬの遊離ＰｌＧＦの血清レベルを有していると決定された場合、ＶＥＧＦを、血清ＰｌＧＦレベルが約４００ｐｇ／ｍＬへ上昇するまで投与することができる。この態様において、ｓＦｌｔ－１、ＰｌＧＦおよびＶＥＧＦ、またはこれらの任意のものおよび全て、のレベルを、疾患を診断するのみでなく、子癇前症または子癇の治療および管理をモニタリングする方法として、繰り返し測定する。

診断キット

本発明はまた、診断試験キットも提供する。例えば、診断試験キットはｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦに対する抗体、および抗体およびｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチド間の結合を検出する、そしてより好ましくは評価するための手段を含むことができる。検出のためには、抗体およびｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチド間の結合後に、基質へ結合された標識の量を決定することにより、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチド－抗体相互作用が証明できるように、抗体かまたはｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドが標識され、そして抗体かまたはｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドが基質－結合されている。通常のＥＬＩＳＡは、抗体－基質相互作用を検出するための、普通に当該技術分野で知られている方法であり、本発明のキットと共に提供することが可能である。ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドは、事実上、尿、血清、血漿、唾液、羊水または脳脊髄液を含む（限定されるわけではない）任意の体液で検出することが可能である。正常対照中に存在するレベルのごとき基準に対する、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドのレベルの変化を決定するキットは、本発明の方法における診断キットとして有用である。

スクリーニングアッセイ

前に議論したように、ｓＦｌｔ－１核酸またはポリペプチドの発現は、子癇前症または

子癇、またはそのような状態を発現する傾向を有している被験者において増加している。これらの発見に基づいて、本発明の組成物は、その発現が子癇前症または子癇を有する被験者において変化している、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドまたは核酸分子の発現を変調する、候補化合物の高スループット、低コストスクリーニングに有用である。

【０１２１】

ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ核酸分子の発現を変化させる新規候補化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを実施するために、かなり多数の方法が利用可能である。１つの作業例において、候補化合物を多様な濃度で、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ核酸配列を発現している培養細胞の培養培地へ加える。遺伝子発現を、例えば、ハイブリダイゼーションプローブとして、核酸分子から調製された適切な断片を使用する、マイクロアレイ、ノーザンブロット分析（Ａｕｓｕｂｅｌら、上記文献）、またはＲＴ－ＰＣＲにより測定する。候補化合物存在下での遺伝子発現のレベルを、候補化合物を欠く、対照培養培地で測定されたレベルと比較する。ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ遺伝子、核酸分子またはポリペプチドの発現の増加、またはｓＦｌｔ－１遺伝子、核酸分子またはポリペプチドの発現の減少のごとき変化を促進する化合物、またはその機能的均等物は、本発明において有用であると考えられる；そのような分子は、例えば、被験者における子癇前症または子癇を治療するための治療剤として使用することができる。

【０１２２】

他の作業例において、候補化合物の効果は、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドに対して特異的な抗体を用いるウェスタンブロッティングまたは免疫沈降のごとき、同一の一般法および標準免疫学的技術を使用して、ポリペプチド産生のレベルで測定することができる。例えば、イムノアッセイを、生物体における本発明のポリペプチドの少なくとも１つの発現を検出またはモニターするために使用することができる。そのようなポリペプチドへ結合することが可能であるポリクローナルまたはモノクローナル抗体（前に説明したように製造される）を、ポリペプチドのレベルを測定するため、標準イムノアッセイ様式（例えば、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロットまたはＲＩＡアッセイ）で使用することができる。いくつかの態様において、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドの発現または生物活性の増加、またはｓＦｌｔ－１ポリペプチドの発現または生物活性の減少のごとき変化を促進する化合物は特に有用であると考えられる。再び、そのような分子は、例えば、被験者における子癇前症または子癇、または子癇前症または子癇の症状を遅延、改善または治療するための治療剤として使用することができる。

【０１２３】

さらに他の作業例において、候補化合物を、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドへ特異的に結合する化合物としてスクリーニングすることができる。そのような候補化合物の有効性は、そのようなポリペプチドまたはその機能的均等物と相互作用するその能力に依存している。そのような相互作用は、かなり多数の標準結合技術および機能性アッセイ（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌらにより記載されているアッセイ、上記文献）を使用して容易にアッセイすることが可能である。１つの態様において、候補化合物を、本発明のポリペプチドへ特異的に結合するその能力について、インビトロで試験することができる。他の態様において、候補化合物を、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドおよびＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのごとき成長因子の結合を減少させることにより、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドの生物活性を減少させる、その能力について試験する。

【０１２４】

他の作業例において、ｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ核酸は、検出可能なレポーターとの転写または翻訳融合物として発現され、そして誘導可能なプロモーターのごとき異種プロモーターの制御下の単離された細胞（例えば、哺乳動物または昆虫細胞）中で発現される。融合タンパク質を発現している細胞を次ぎに、候補化合物と接触させ、その細胞中の検出可能レポーターの発現を、非処理対照細胞中の検出可能なレポーターの発現と比較する。ｓＦｌｔ－１検出可能レポーターの発現を減少させる、またはＶＥＧＦまた

はＰｌＧＦ検出可能レポーターの発現を増加させる候補化合物は、子癇前症または子癇の治療のために有用な化合物である。好ましい態様において、候補化合物は核酸へ融合されたレポーター遺伝子または核酸の発現を変化させる。

【０１２５】

１つの特別な作業例において、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドへ結合する候補化合物は、クロマトグラフィーに基づいた技術を使用して同定することができる。例えば、本発明の組換えポリペプチドを、ポリペプチドを発現するように工学処理された細胞（例えば、前記のように）から、標準技術により精製することができ、そしてカラム上に固定化することができる。候補化合物の溶液はカラムを通過させ、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドに対して特異的な化合物が、ポリペプチドへ結合するその能力に基づいて同定され、カラムへ固定化される。化合物を単離するためには、カラムを洗浄して非特異的結合分子を除去し、そして次ぎに目的の化合物を放出させ、そして採集する。ポリペプチドマイクロアレイに結合されている化合物を単離するため、類似の方法を使用することができる。この方法（または任意の他の適切な方法）により単離された化合物は、必要に応じ、さらに精製することができる（例えば、高速液体クロマトグラフィーにより）。加えて、これらの候補化合物は、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドの活性を減少させる、またはＶＥＧＦシグナル伝達経路の活性を増加させるその能力を試験することができる（例えば、前記のように）。この方法により単離された化合物はまた、例えば、ヒト被験者における子癇前症または子癇を治療するための治療剤として使用することもできる。１０ｍＭ以下の親和定数で、本発明のポリペプチドへ結合すると同定された化合物は、本発明に特に有用であると考えられる。もしくは、任意のインビボタンパク質相互作用検出システム、例えば、二－ハイブリッドアッセイを、本発明のポリペプチドへ結合する化合物またはタンパク質を同定するために利用することができる。

【０１２６】

可能なアンタゴニストには、ｓＦｌｔ－１核酸配列またはｓＦｌｔ－１ポリペプチドへ結合する、有機分子、ペプチド、ペプチド模倣物、ポリペプチド、核酸および抗体が含まれる。

【０１２７】

ｓＦｌｔ－１　ＤＮＡ配列はまた、子癇前症または子癇の治療のための、治療化合物の発見および発生に使用することもできる。コードされているタンパク質は、発現すると同時に、薬剤のスクリーニングのための標的として使用することができる。加えて、コードされているタンパク質のアミノ末端領域、または各々のｍＲＮＡのシャイン－ダルガルノまたは他の翻訳促進配列をコードしているＤＮＡ配列は、ｓＦｌｔ－１コード配列の発現を減少させる配列を構築するために使用することが可能である。そのような配列は標準技術により単離することができる（Ａｕｓｕｂｅｌら、上記文献）。

【０１２８】

随意に、前記のアッセイで同定された化合物は、ｓＦｌｔ－１の生物活性を減少させる、またはＶＥＧＦシグナル伝達経路の活性を増加させる化合物のためのアッセイに有用であると確認することができる。

【０１２９】

本発明の小分子の分子量は、好ましくは２，０００ダルトン以下、より好ましくは３００～１，０００ダルトン、最も好ましくは４００～７００ダルトンである。これらの小分子は有機分子であることが好ましい。

ＶＥＧＦシグナル伝達経路を標的とした治療剤

ＶＥＧＦは、血管形成、血管透過性亢進および血管拡張を刺激する、強力な内皮細胞特異的分裂促進因子である。ＶＥＧＦに対し３つのチロシンキナーゼシグナル伝達レセプターが同定されている。ＶＥＧＦ－レセプター結合は、ホスホリパーゼＣγ１のチロシンリン酸化を生じるシグナル伝達カスケードの引き金を引き、イノシトール１，４，５－三リン酸の細胞内レベルの増加およびカルシウムの細胞内レベルの増加を導き、それは一酸化窒素合成酵素を活性化して一酸化窒素（ＮＯ）を産生する。ＮＯ形成は、血管平滑筋細胞

および内皮細胞内のグアニレートシクラーゼを活性化し、ｃＧＭＰ産生を起こす。このＮＯ／ｃＧＭＰカスケードは、ＶＥＧＦの血管活性効果を仲介すると考えられている。ＶＥＧＦの血管活性効果の仲介に関与していると思われる他の経路は、プロスタサイクリン放出経路である。ＶＥＧＦは、ＭＡＲＫカスケードの開始の結果として、ホスホリパーゼＡ２の活性化を経るＰＧＩ２産生を誘導する。

【０１３０】

ＶＥＧＦレベルの増加は、子癇前症または子癇の治療のために有用である。ＶＥＧＦシグナル伝達経路、ＶＥＧＦシグナル伝達経路の成分を標的とし、ＶＥＧＦシグナル伝達経路の活性を促進する治療化合物もまた、子癇前症または子癇の治療のために有用である。そのような化合物には、シルデナフィル、フローラン、レモジュリンおよびトラクリールのごときプロスタサイクリン類似物が含まれる。

試験化合物および抽出物

一般に、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドの活性を減少させ、またはＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの活性を増加させることが可能な化合物は、当該技術分野で公知の方法に従って、天然物または合成（または半合成）両方の抽出物または化学ライブラリーの大きなライブラリーから、またはポリペプチドまたは核酸のライブラリーから同定する。薬剤発見および開発の当業者は、試験抽出物または化合物の正確な起源は、本発明のスクリーニング手法には決定的ではないことを理解するであろう。スクリーニングに使用された化合物は既知の化合物を含むことができる（例えば、他の疾患または障害に使用された公知の治療剤）。もしくは、事実上、かなり多数の未知の化学抽出物または化合物を、本明細書に記載した方法を使用してスクリーニングすることが可能である。そのような抽出物または化合物の例には、限定するわけではないが、植物、真菌、原核動物または動物に基づいた抽出物、発酵ブロスおよび合成化合物、ならびに存在している化合物の修飾が含まれる。多数の方法もまた、糖類、脂質、ペプチドおよび核酸に基づいた化合物を含む、しかし限定されるわけではない、かなり多数の化学化合物の無作為または方向付けられた合成（例えば、半合成または全合成）を生じるために利用可能である。合成化合物ライブラリーはＢｒａｎｄｏｎ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ（メリマック、ＮＨ）およびＡｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ（ミルウォーキー、ＷＩ）から商業的に入手可能である。もしくは、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形での、天然化合物のライブラリーは、Ｂｉｏｔｉｃｓ（サセックス、英国）、Ｘｅｎｏｖａ（スラウ、英国）、Ｈａｒｂｏｒ　Ｂｒａｎｃｈ　Ｏｃｅａｎｇｒａｐｈｉｃｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｆｔ．ピアス、ＦＬ）およびＰｈａｒｍａＭａｒ、Ｕ．Ｓ．Ａ．（ケンブリッジ、ＭＡ）を含む多数の供給元から商業的に入手可能である。加えて、天然におよび合成的に製造されたライブラリーを、所望により、当該技術分野で知られている方法に従って、例えば、標準的抽出および分画法により製造する。さらに、所望により、ライブラリーまたは化合物は、標準的な化学的、物理的または生化学的方法を使用して容易に修飾される。

【０１３１】

加えて、薬剤発見および開発の当業者は、脱複製（例えば、分類学的脱複製、生物学的脱複製および化学的脱複製、またはその任意の組み合わせ）、または、その脱皮攪乱活性がすでに知られている物質の複製または反復物の除去のための方法を、いつでも可能なときに用いねばならないことを容易に理解するであろう。

【０１３２】

粗抽出物がｓＦｌｔ－１ポリペプチドの活性を減少させる、またはｓＦｌｔ－１ポリペプチドへ結合することが見出された場合、さらなる陽性導出抽出物の分画が、観察された効果の原因となる化学成分を単離するために必要である。それ故、抽出、分画および精製プロセスの到達点は、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドの活性を減少させる、粗抽出物内の化学実体の注意深い特徴付けおよび同定である。そのような不均一抽出物の分画および精製のための方法は、当該技術分野で知られている。所望により、ヒト子癇前症または子癇の治療のための治療剤として有用であると示された化合物を、当該技術分野で知られている方法に従って化学的に修飾する。

治療剤

本発明は、被験者における被験者における子癇前症または子癇を治療または予防するための方法を特色としている。好ましくは、治療剤を子癇前症または子癇の治療または予防のために妊娠の間に、または産後子癇前症または子癇を治療するために妊娠の後に投与する。投与のための技術および用量は、化合物の型（抗体、アンチセンス、核酸ベクターなど）に依存して変化し、当業者にはよく知られているか、または容易に決定される。

【０１３３】

本発明の治療化合物は、医薬として受容可能な希釈剤、坦体または賦形剤と、単一剤形で投与することができる。投与は、非経口、静脈内、皮下、経口または羊水内への直接注射による局所であることができる。連続的注入による静脈内搬送が、本発明の治療化合物を投与するために好ましい方法である。

【０１３４】

組成物は、ピル剤、錠剤、カプセル剤、液体または経口投与のための持続放出性錠剤；または静脈内、皮下または非経口投与のための液体；または局所投与のためのポリマーまたは他の持続放出性媒体であることが可能である。

【０１３５】

処方を作製するために当該技術分野で周知の方法は、例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：製剤の科学及び実践」（第２０版、Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ　Ａ．Ｒ．編、２０００、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ、フィラデルフィア、ＰＡ）にみられる。非経口投与のための処方は、例えば、賦形剤、滅菌水、食塩水、ポリエチレングリコールのごときポリアルキレングリコール、植物起源の油または水素化ナフタレンを含むことができる。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマーを、化合物の放出を制御するために使用することができる。ナノ粒子処方（例えば、生分解性ナノ粒子、固体液体ナノ粒子、リポソーム）を、化合物の生体分布を制御するために使用することができる。他の潜在的に有用な非経口搬送システムには、エチレン－ビニル酢酸コポリマー粒子、浸透圧ポンプ、移植可能な注入システムおよびリポソームが含まれる。処方中の化合物の濃度は、投与されるべき薬剤の用量および投与経路を含む、多くの因子の依存して変化する。

【０１３６】

化合物は随意に、医薬産業で普通に使用されている、非毒性酸付加塩または金属複合体のごとき医薬として受容可能な塩として投与することができる。酸付加塩の例には、酢酸、乳酸、パモ酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸またはトリフルオロ酢酸などのごとき有機酸；タンニン酸、カルボキシメチルセルロースなどのごとき重合体酸；および塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などのごとき無機酸が含まれる。金属複合体には亜鉛、鉄などが含まれる。

【０１３７】

経口使用のための処方には、非毒性の医薬として受容可能な賦形剤と混合された活性成分を含んでいる錠剤が含まれる。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤または充填剤（例えば、ショ糖およびソルビトール）、平滑剤、滑走剤、および抗粘着剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、シリカ、硬化植物油またはタルク）であることができる。

【０１３８】

経口使用のための処方はまた、咀しゃく錠として、または活性成分が不活性固形希釈剤と混合されている硬ゼラチンカプセルとして、または活性成分が水または油性媒質と混合されている軟ゼラチンカプセルとしても提供することができる。

【０１３９】

用量および化合物の投与時期は、被験者の全体の健康度および子癇前症の症状の重度を含む、多様な臨床因子に依存する。一般に、子癇前症または子癇前症を発現する傾向が検

出されたら、状態のさらなる進行を治療または予防するために、精製したタンパク質の連続的注入を使用する。治療は１～１００日、より好ましくは１～６０日、最も好ましくは１～２０日の時間範囲の期間、または妊娠の完了まで続けることが可能である。用量は、各々の化合物および状態の重度に依存して変化し、１～５００ｎｇ／ｍＬのＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ、またはその両方、好ましくは１～１００ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは５～５０ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは５～１０ｎｇ／ｍＬのＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ、またはその両方、の範囲の定常状態血液血清濃度を達成するまで滴定する。

ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦタンパク質発現を増加させる方法

本発明は、子癇前症または子癇と診断された被験者における、ＶＥＧＦおよびＰＩＧＦのレベルを増加させるための方法を特色としている。増加したＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルは、なかでも、以下に記載されたいくつかの異なった方法論を使用して達成することが可能である。

精製されたタンパク質

本発明の好ましい態様において、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦまたはその両方の精製された形を、子癇前症または子癇を治療または予防するために被験者に投与する。

【０１４０】

精製されたＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ様タンパク質には、ＶＥＧＦまたは血管形成を誘導可能な、または血管内皮細胞または臍帯静脈内皮細胞の選択的増殖を促進することが可能である、任意のＶＥＧＦファミリーメンバーのアミノ酸配列と相同的である、より好ましくは同一であるアミノ酸配列を有する任意のタンパク質が含まれる。精製されたＶＥＧＦ化合物の例は、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｉｎｃ．（サンフランシスコ、ＣＡ）からのヒト組換えＶＥＧＦである。

【０１４１】

精製されたＰｌＧＦまたはＰｌＧＦ様タンパク質には、ＰｌＧＦまたは血管形成を誘導可能な、または血管内皮細胞または臍帯静脈内皮細胞の選択的増殖を促進することが可能である、任意のＰｌＧＦファミリーメンバーのアミノ酸配列と相同的である、より好ましくは同一であるアミノ酸配列を有する任意のタンパク質が含まれる。商業的に入手可能な精製されたＰｌＧＦの例はＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（カタログ番号２６４－ＰＧ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ミネアポリス、ＭＮ）からのヒト組換えＰｌＧＦである。ＴｈｒｏｍｂｏＧｅｎｉｃｓ　Ｌｔｄもまた、虚血性発作の治療のためのＰｌＧＦの精製形を開発している；多分、ＰｌＧＦのこの形は、本発明に記載されている応用に有効であろう。

ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ活性を増加させる治療化合物

本発明は、被験者の子癇前症の治療または予防のための、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの血液血清レベル、またはこれらのポリペプチドの生物活性を刺激または増加させることが知られている化合物の使用を提供する。これらの化合物は、単独でも、または前記の精製タンパク質または本明細書に記載したＶＥＧＦまたはＰｌＧＦタンパク質レベルを増加させるために使用された、任意の他の方法と組み合わせて使用することができる。

【０１４２】

ＶＥＧＦ産生を刺激することが示された化合物の例はニコチンである。喫煙は、妊娠女性およびその発育している胎児の全体の健康に対する多くの危険性を提起しているが、ニコチンそれ自身は巻きタバコより安全であると信じられており、高リスクの被験者に対する短期間治療のために使用することが可能である。例には、ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　Ｂｅｅｃｈａｍにより製造された店頭用ニコチンガム製品であるＮｉｃｏｒｅｔｔｅ（ニコチン　ポラクリレックス）およびＨｏｅｃｈｓｔ　Ｍａｒｉｏｎ　Ｒｏｕｓｓｅｌ　Ｉｎｃ．（以前はＭａｒｉｏｎ　Ｍｅｒｒｅｌｌ　Ｄｏｗ）により製造された店頭用ニコチンパッチであるＮｉｃｏＤｅｒｍ　ＣＱ、が含まれる。タバコを経て搬送されたニコチンは、患者が本発明の方法を使用してまだ診断されていない場合、本発明の方法から特に排除した。

【０１４３】

ニコチンは、子癇前症または子癇の診断後、パッチかまたはガムを使用して投与した。

用量は、状態の重度および被験者の全体の健康に依存して変化した。一般に、５～５００ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは５～１００ｎｇ／ｍＬ、および最も好ましくは５０～１００ｎｇ／ｍＬの範囲のニコチン血清レベルを達成するように、製造者の指示に従った。

【０１４４】

テオフィリンは、子癇前症または子癇を治療または予防するために使用することが可能な、追加の化合物の他の例である。テオフィリンは気管支拡張剤であり、喘息の治療のためにしばしば使用され、多くのブランド名（例えば、Ａｅｒｏｌａｔｅ　Ｓｒ、Ａｓｍａｌｉｘ、Ｅｌｘｏｐｈｙｌｌｉｎなど）ならびにジェネリック医薬品として入手可能である。投与法および用量は、各々の製造者で変化し、被験者の全体の健康および状態の重度に基づいて選択する。一般に、日用量は、１～５００ｍｇ、より好ましくは１００～４００ｍｇ、および最も好ましくは２５０～３５０ｍｇの範囲であり、５～５０μｇ／ｍＬのテオフィリンの血清レベルを達成するため、１日２回与える。

【０１４５】

アデノシンは、子癇前症または子癇を治療または予防するために使用することが可能な、追加の化合物の他の例である。アデノシン（藤沢薬品）は通常、抗高血圧薬として使用されている。投与法および用量は、各々の製造者で変化し、被験者の全体の健康および状態の重度に基づいて選択する。一般に、１日２回与えられ、５０ｍｇ／ｋｇの日用量がアデノシンに典型的である。

【０１４６】

ニフェジピンは、子癇前症または子癇を治療または予防するために使用することが可能な、追加の化合物の他の例である。ニフェジピン（バイエル薬品）は通常、抗高血圧薬として使用されている。投与法および用量は、各々の製造者で変化し、被験者の全体の健康および状態の重度に基づいて選択する。一般に、経口または皮下で１日２回与えられ、１～２ｍｇ／ｋｇの日用量がニフェジピンに典型的である。

【０１４７】

ミノキシジルは、子癇前症または子癇を治療または予防するために使用することが可能な、追加の化合物の他の例である。ミノキシジル（ファイザー社）は通常、抗高血圧薬として使用されている。投与法および用量は、各々の製造者で変化し、被験者の全体の健康および状態の重度に基づいて選択する。一般に、経口または皮下で１日２回与えられ、０．２５～１．０ｍｇ／ｋｇの日用量がミノキシジルに典型的である。

【０１４８】

硫酸マグネシウムは、子癇前症または子癇を治療または予防するために使用することが可能な、追加の化合物の他の例である。硫酸マグネシウムはジェネリック医薬品であり、典型的には抗高血圧薬として使用されている。投与法および用量は、各々の製造者で変化し、被験者の全体の健康および状態の重度に基づいて選択する。一般に、４時間ごとに静脈内へ与えられ、１～２ｇｍの日用量が、硫酸マグネシウムの典型的用量である。

【０１４９】

ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの血清レベルを増加させることが可能な化合物の使用に加え、本発明は、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦに方向付けられた化合物と組み合わせて使用される、慢性高血圧薬物療法の使用を提供する。妊娠の間に、高血圧の治療のために使用される薬物療法には、メチルドーパ、ヒドララジン塩酸塩またはラベタロールが含まれる。これらの薬物療法の各々に対し、投与様式および用量は、医者により、そして製造者の指示により決定される。

治療核酸

最近の研究は、血管損傷の部位への、ＶＥＧＦのごとき内皮細胞分裂促進因子を発現可能な核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）の搬送は、損傷された血管の増殖および再内皮細胞化を誘導するであろうことを示している。本発明は血管損傷には関係していないが、これらの研究で使用されたＶＥＧＦおよびＰＩＧＦのごとき、内皮細胞分裂促進因子をコードしている核酸の搬送のための技術はまた、本発明でも使用することが可能である。これらの技術は、米国特許第５，８３０，８７９号および第６，２５８，７８７号に記載されており

、それらは本明細書において援用される。

【０１５０】

本発明において核酸とは、ＶＥＧＦまたはＰＩＧＦ、または任意のＶＥＧＦまたはＰＩＧＦファミリーメンバーをコードしている、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡおよびｍＲＮＡを含む任意の核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）であることができる。核酸はまた、ｓＦｌｔ－１レセプターへ結合することが示されているタンパク質をコードする、任意の核酸も含んでいる。所望のタンパク質をコードしている核酸は、当該技術分野での日常的な方法、例えば、組換えＤＮＡ、ＰＣＲ増幅、を使用して得ることができる。

ｓＦｌｔ－１発現を阻害する治療核酸

本発明はまた、直接的にｓＦｌｔ－１　ｍＲＮＡの発現を下方制御するための、アンチセンス核酸塩基オリゴマーの使用も特色としている。相補的核酸配列（センスまたはコード鎖）への結合により、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、たぶん、ＲＮＡｓｅＨによるＲＮＡ鎖の酵素的切断を通して、タンパク質発現を阻害できる。好ましくは、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、過剰なレベルのｓＦｌｔ－１を発現する細胞中で、ｓＦｌｔ－１タンパク質発現を減少させることが可能である。好ましくは、ｓＦｌｔ－１タンパク質発現の減少は、対照オリゴヌクレオチドで処理した細胞と比較して少なくとも１０％、より好ましくは２５％、最も好ましくは５０％以上である。アンチセンス核酸塩基オリゴマーを選択し、調製するための方法は、当該技術分野では周知である。ＶＥＧＦ発現を下方制御するためのアンチセンス核酸塩基オリゴマーの使用例は、本明細書において援用される米国特許第６，４１０，３２２号を参照されたい。タンパク質発現のレベルをアッセイするための方法も、当該技術分野ではよく知られており、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、およびＥＬＩＳＡが含まれる。

【０１５１】

本発明はまた、ｓＦｌｔ－１の発現を阻害するための、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）も特色としている。ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は最近発見された翻訳後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）の機構であり、そこでは、目的の遺伝子またはｍＲＮＡに対応する２本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）が生物体内へ導入され、対応するｍＲＮＡの分解が生じる。ＲＮＡｉ反応において、ｄｓＲＮＡ分子のセンスおよびアンチセンス鎖の両方が、２１～２３ヌクレオチド（ｎｔ）長の範囲の、および２－ヌクレオチド３’尾部を有している、小さなＲＮＡ断片またはセグメントへプロセシングされる。もしくは、２１～２３ｎｔ長であり、および２－ヌクレオチド３’尾部を有する合成ｄｓＲＮＡが合成でき、精製でき、および反応で使用できる。これら２１～２３ｎｔのｄｓＲＮＡは「ガイドＲＮＡ」または「短干渉ＲＮＡ」（ｓｉＲＮＡ）として知られている。

【０１５２】

ｓｉＲＮＡ２重鎖は次ぎに、複合体内のｓｉＲＮＡと相同性を有している内因性ｍＲＮＡを標的化しおよび破壊するタンパク質により組み立てられている、ヌクレアーゼ複合体へ結合させる。複合体内のタンパク質の同一性は不明なままであるが、複合体の機能は、ｓｉＲＮＡの１つの鎖および内因性ｍＲＮＡ間の塩基対形成相互作用を通して、相同的ｍＲＮＡ分子を標的化することである。ｍＲＮＡは次ぎに、ｓｉＲＮＡの３’末端から、約１２ｎｔに切断され、分解される。この方法において、特異的遺伝子を標的化しおよび破壊することができ、それにより標的化遺伝子からのタンパク質発現の喪失を生じる。

【０１５３】

ｄｓＲＮＡの特別の要求および修飾は、ＰＣＴ出願ＷＯ０１／７５１６４号（本明細書において援用される）に記載されている。ｄｓＲＮＡ分子はその長さを変化することが可能であるが、典型的には（２’－デオキシ）チミジンかまたはウラシルの、特徴的２－から３－ヌクレオチド３’オーバーハング末端を有する２１～２３ヌクレオチドｄｓＲＮＡである、ｓｉＲＮＡ分子を使用することが最も好ましい。ｓｉＲＮＡは典型的には、３’ヒドロキシル基を含んでなる。１本鎖ｓｉＲＮＡならびにｄｓＲＮＡの平滑末端形もまた使用することが可能である。ＲＮＡの安定性をさらに促進するため、３’オーバーハングを分解に対して安定化することが可能である。そのような態様の１つにおいて、ＲＮＡは

、アデノシンまたはグアノシンのごときプリンヌクレオチドを含むことにより安定化される。もしくは、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、（２’－デオキシ）チミジンによるウリジン２－ヌクレオチドオーバーハングの置換、が許容され、そしてＲＮＡｉの効率には影響しない。２’ヒドロキシル基の不在は、組織培養培地における、オーバーハングのヌクレアーゼ耐性を有意に促進する。

【０１５４】

もしくは、ｓｉＲＮＡを、ＰＣＴ出願ＷＯ０１／７５１６４号（本明細書において援用される）に示された方法を使用して、またはＥｌｂａｓｈｉｒら（Ｇｅｎｅｓ＆Ｄｅｖ．、１５：１８８－２００、２００１）により記載されているＲＮＡおよびｄｓＲＮＡアニーリング法のインビトロ転写のための標準法を使用して調製することが可能である。ｓｉＲＮＡはまた、Ｅｌｂａｓｈｉｒらにより記載されているように、標的遺伝子の配列に対応するｄｓＲＮＡを、ｄｓＲＮＡが約２１～約２３ヌクレオチドのｓｉＲＮＡを発生するようにプロセッシングされる条件下、シンチウム胚盤葉ショウジョウバエ胎児からの無細胞ショウジョウバエ溶解物中でインキュベートし、次ぎに当業者には既知の技術を使用して単離することによっても得られる。例えば、２１～２３ｎｔ　ＲＮＡを分離するためにゲル電気泳動を使用でき、そしてＲＮＡをゲルスライスから溶出することが可能である。加えて、クロマトグラフィー（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー）、グリセロール濃度勾配遠心分離、および抗体を用いるアフィニティー精製を、２１～２３ｎｔのＲＮＡを単離するために使用することが可能である。

【０１５５】

本発明において、ｄｓＲＮＡ（またはｓｉＲＮＡ）はｓＦｌｔ－１　ｍＲＮＡのｍＲＮＡ配列と相補的であり、そしてｓＦｌｔ－１の発現を減少または阻害することが可能である。好ましくは、ｓＦｌｔ－１タンパク質発現の減少は、対照ｄｓＲＮＡまたはｓｉＲＮＡで処理した細胞と比較して少なくとも１０％、より好ましくは２５％、最も好ましくは少なくとも５０％である。タンパク質発現のレベルをアッセイするための方法も、当該技術分野ではよく知られており、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、およびＥＬＩＳＡが含まれる。

【０１５６】

本発明において、使用された核酸は、核酸の安定性または機能を任意の方法で促進する修飾を含んでいる。例としては、リン酸主鎖、ヌクレオチド間結合または糖部分への修飾が含まれる。

【０１５７】

ｓＦｌｔ－１結合タンパク質をコードしている核酸の操作および取り扱いを単純化するため、核酸を、好ましくは、プロモーターに機能可能であるように連結されたカセット内へ挿入する。プロモーターは、所望の宿主細胞中で、ｓＦｌｔ－１結合タンパク質の発現を駆動可能でなければならない。適切なプロモーターの選択は、容易に達成することが可能である。好ましくは、高発現プロモーターを使用する。適したプロモーターの例は、７６３－塩基対サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターである。ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）（Ｄａｖｉｓら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．４：１５１－１５９、１９９３）およびマウス乳腺癌ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーターもまた使用することができる。ある種のタンパク質は、その天然のプロモーターを使用して発現することが可能である。発現を促進できる他の要素も含むことができる（例えば、エンハンサーまたはｔａｒ遺伝子またはｔａｒ要素のごとき高レベルの発現を生じるシステム）。組換えベクターは、ｐＵＣ１１８、ｐＢＲ３２２、または、例えば、大腸菌の複製開始点を含む、他の公知のプラスミドベクターのごときプラスミドベクターであることが可能である（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｐｒｅｓｓ、１９８９、を参照されたい）。プラスミドベクターはまた、マーカーポリペプチドが処理されている生物体の代謝に不利に影響しないとしたら、アンピシリン耐性のためのβラクタマーゼ遺伝子のごとき選択可能マーカーを含むことができる。カセットは、ＰＣＴ出願ＷＯ

９５／２２６１８に開示されているシステムのごとき、合成搬送システム中の核酸結合部分へ結合させることも可能である。

【０１５８】

核酸は、用いられたベクターに適した任意の手段により細胞内へ導入することが可能である。多くのそのような方法が当該技術分野では周知である（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、上記文献、およびＷａｔｓｏｎら、「組換えＤＮＡ」、１２章、第２版、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｂｏｏｋｓ、１９９２）。組換えベクターは、リン酸カルシウム沈降、エレクトロポレーション、リポソーム仲介導入、遺伝子銃、マイクロインジェクション、ウイルスカプシド仲介導入、ポリブレン仲介導入またはプロトプラスト融合のごとき方法により導入することが可能である。リポソーム調製、標的化および内容物搬送のための方法についての総説としては、ＭａｎｎｉｎｏおよびＧｏｕｌｄ－Ｆｏｇｅｒｉｔｅ、（Ｂｉｏ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、６：６８２－６９０、１９８８）、ＦｅｌｇｎｅｒおよびＨｏｌｍ、（Ｂｅｔｈｅｓｄａ　Ｒｅｓ．Ｌａｂ．Ｆｏｃｕｓ、１１：２１、１９８９）およびＭａｕｒｅｒ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ　Ｒｅｓ．Ｌａｂ．Ｆｏｃｕｓ、１１：２５、１９８９）を参照されたい。

【０１５９】

組換えベクター（プラスミドベクターかまたはウイルスベクター）の導入は、羊水内への直接注射または静脈内搬送を通して達成することが可能である。

アデノウイルスまたはアデノ関連ベクター（ＡＡＶ）を使用する遺伝子導入も使用することが可能である。アデノウイルスは大多数の動物種に存在し、非常に病原性ではなく、分裂している、および静止状態の細胞中で等しくよく複製することが可能である。一般的規則として、遺伝子導入に使用されるアデノウイルスは、ウイルス複製に必要とされる１つ以上の遺伝子を欠失している。ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたは任意のｓＦｌｔ－１結合タンパク質の搬送に使用される複製欠陥組換えアデノウイルスベクターは、当該技術分野で公知の技術に従って製造することが可能である（Ｑｕａｎｔｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：２５８１－２５８４、１９９２；Ｓｔｒａｔｆｏｒｄ－Ｐｅｒｒｉｃａｄｅｔら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９０：６２６－６３０、１９９２；およびＲｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｃｅｌｌ、６８：１４３－１５５、１９９２、を参照されたい）。子宮内遺伝子治療の使用の例としては、米国特許第６，３９９，５８５号を参照されたい。

【０１６０】

哺乳動物細胞内への、ｄｓＲＮＡまたはオリゴヌクレオチドのトランスフェクションまたは導入には、多様な方法が利用可能である。例えば、ＴｒａｎｓＩＴ－ＴＫＯ（登録商標）（Ｍｉｒｕｓ、カタログ番号ＭＩＲ　２１５０）、Ｔｒａｎｓｍｅｓｓｅｎｇｅｒ（登録商標）（キアゲン、カタログ番号３０１５２５）およびＯｌｉｇｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）（インビトロジェン、カタログ番号ＭＩＲ　１２２５２－０１１）を含む、しかし限定されるわけではない、いくつかの商業的に入手可能なトランスフェクション試薬が存在する。各々のトランスフェクション試薬のプロトコールは、製造元から入手可能である。

【０１６１】

導入されたら、損傷の部位で、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたは任意の他のｓＦｌｔ－１結合タンパク質の血液血清レベルを増加させるのに十分な期間、細胞により核酸が発現される。核酸を含んでいるベクターは通常、細胞のゲノム内へ取り込まれないので、目的のタンパク質の発現は限られた時間しか起こらない。典型的には、タンパク質は治療レベルで、約２日～数週間、好ましくは約１～２週間、発現される。ＤＮＡの再適用が、治療タンパク質の発現の追加期間を提供するために利用できる。哺乳動物における血管疾患の治療のためにＶＥＧＦを使用する、遺伝子治療の最近の例をＤｅｏｄａｔｏら（Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．、９：７７７－７８５、２００２）；Ｉｓｎｅｒら（Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．、１２：１５９３－１５９４、２００１）；Ｌａｉら（Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．、９：８０４－８１３、２００２）にみることができ；そしてＦｒｅｅｄｍａｎおよびＩｓｎ

ｅｒ（Ａｎｎ．Ｉｎｔｅｒｎ．Ｍｅｄ．、１３６：５４－７１、２００２）およびＩｓｎｅｒ　ＪＭ（Ｎａｔｕｒｅ、４１５：２３４－２３９、２００２）により概説されている。

遺伝子およびタンパク質発現のためのアッセイ

以下の方法は、タンパク質または遺伝子発現を評価するため、およびＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたは任意の他のｓＦｌｔ－１結合タンパク質レベルを増加させるための、またはｓＦｌｔ－１タンパク質レベルを減少させるための、任意の前記方法の効率を決定するために使用することが可能である。

【０１６２】

被験者からの血液血漿の、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたはｓＦｌｔ－１へ結合することが知られている任意のタンパク質リガンドのレベルを測定する。タンパク質の血清レベルを測定するために使用された方法には、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロッティングまたは特異的抗体を使用するイムノアッセイが含まれる。加えて、被験者の血液が、抗血管形成状態から前血管形成状態へ変換されたかどうかを決定するために、インビトロ血管形成アッセイを実施することが可能である。そのようなアッセイは前記実施例２に記載されている。陽性結果とは、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦまたはｓＦｌｔ－１へ結合することが知られている任意のタンパク質リガンドの、少なくとも２０％、好ましくは３０％、より好ましくは少なくとも５０％、最も好ましくは少なくとも６０％の増加と考えられる。陽性結果とはまた、インビトロ血管形成アッセイを使用する、抗血管形成状態から前血管形成状態への変換と考えられる。

【０１６３】

遺伝子発現をアッセイするための、いくつかの当該技術分野で知られている方法が存在する。いくつかの例は、被験者の血液試料からのＲＮＡの調製、ノーザンブロッティングのためのＲＮＡの使用、ＰＣＲに基づいた増幅、またはＲＮＡｓｅ保護アッセイを含んでいる。

治療処置のための抗体の使用

子癇前症を患った妊娠女性から採った血清試料中に観察される、ｓＦｌｔ－１の上昇したレベルは、ｓＦｌｔ－１が、機能性ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦの栄養膜細胞層および母親内皮細胞へ結合し、および枯渇させるための「生理学的シンク」として働いていることを示唆している。ｓＦｌｔ－１へ結合し、そしてＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ結合を阻止する、抗体のごとき化合物の使用は、遊離ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの増加を生み出すことにより、子癇前症または子癇を予防または治療することができる。そのような増加は、胎盤発育および胎児栄養状態に、および全身的な母親内皮細胞の健康に必要とされる、栄養膜細胞層細胞の増殖、遊走および血管形成における増進を許容する。

【０１６４】

本発明は、ｓＦｌｔ－１のリガンド結合ドメインへ特異的に結合する抗体を提供する。抗体は、ｓＦｌｔ－１を阻害するために使用され、そして、最も有効な機構は、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのための結合部位の直接ブロッキングであると信じられているけれども、他の機構を除外することはできない。治療目的のための抗体の調製および使用は、米国特許第６，０５４，２９７号；第５，８２１，３３７号；第６，３６５，１５７号；および第６，１６５，４６４号を含むいくつかの特許に記載されており、それらは本明細書において援用される。抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよい；モノクローナル抗体が好ましい。

【０１６５】

モノクローナル抗体、特にマウスを含む齧歯動物に由来するモノクローナル抗体は、多様な疾患の治療に使用されてきた；しかしながら、迅速なクリアランスおよび治療の有効性の減少を起こす、ヒト抗マウス免疫グロブリン応答の誘導を含む、それらの使用の制限が存在する。例えば、齧歯動物モノクローナル抗体の臨床使用における主たる制限は、治療間の抗グロブリン応答である（Ｍｉｌｌｅｒら、Ｂｌｏｏｄ、６２：９８８－９９５、１９８３；Ｓｃｈｒｏｆｆら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、４５：８７９－８８５、１９８

５）。

【０１６６】

この問題を克服するために、動物抗原結合可変領域がヒト定常ドメインへカップルされた、「キメラ」抗体を構築することが試みられた（米国特許第４，８１６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８１：６８５１－６８５５、１９８４；Ｂｏｕｌｉａｎｎｅら、Ｎａｔｕｒｅ、３１２：６４３－６４６、１９８４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、３１４：２６８－２７０、１９８５）。そのようなキメラ抗体の製造および使用が以下に説明されている。

【０１６７】

ｓＦｌｔ－１に対する競合的阻害は、子癇前症または子癇の予防および治療に有用である。ｓＦｌｔ－１へ方向付けられた抗体は、ｓＦｌｔ－１へのＶＥＧＦまたはＰｌＧＦの結合を遮断し、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦレベルの増加を生じる。そのような増加は、内皮細胞不全の救出、および前血管形成／抗血管形成因子の平衡の血管形成へ向かった移行を生じる。

【０１６８】

本発明のモノクローナル抗体のカクテルは、子癇前症または子癇に対する有効な治療として使用することが可能である。カクテルは、少なくて２、３または４の異なった抗体、多くて６、８または１０の異なった抗体を含むことができる。加えて、本発明の抗体は、抗高血圧薬（例えば、メチルドーパ、ヒドララジン塩酸塩またはラベタロール）、または子癇前症、子癇または子癇前症または子癇に関係する症状を治療するために使用される他の薬物と組み合わせることが可能である。

抗体の調製

ｓＦｌｔ－１レセプターへ特異的に結合するモノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の方法により製造することができる。これらの方法には、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５－４９７、１９７５）およびＣａｍｐｂｅｌｌ（Ｂｕｒｄｏｎら編、生化学と分子生物学の実験室技術、第１３巻、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、アムステルダム、１９８５、中の「モノクローナル抗体技術、齧歯動物およびヒトハイブリドーマの製造および特徴付け」）により記載されている免疫学的方法、ならびに、Ｈｕｓｅら（Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４６、１２７５－１２８１、１９８９）により記載されている組換えＤＮＡ法が含まれる。

【０１６９】

モノクローナル抗体は、培養ハイブリドーマ細胞の上清から、またはマウス内へのハイブリドーマ細胞の腹膜内接種により誘導された腹水から調製することができる。最初にＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、６、５１１－５１９、１９７６）により記載されたハイブリドーマ技術が、多くの特異的抗原に対して高レベルのモノクローナル抗体を分泌する、ハイブリッド細胞株を産生するために広く応用されてきた。

【０１７０】

宿主動物の免疫化の経路およびスケジュールまたはそれらからの培養抗体産生細胞は、一般的に、抗体刺激および産生のための確立されたおよび慣習的な技術が守られる。典型的には、マウスが試験動物として使用されるけれども、ヒト被験者を含む哺乳動物被験者またはそれらからの抗体産生細胞が、ヒトを含む哺乳動物ハイブリッド細胞株産生の基盤として働くように、本発明の方法に従って操作することが可能である。

【０１７１】

免疫化後、多量のモノクローナル抗体を産生するため、免疫リンパ球を骨髄腫細胞と融合させて、培養および無限に継代培養できるハイブリッド細胞株を発生させる。本発明の目的のためには、融合に選択された免疫リンパ球は、リンパ球およびその正常に分化した子孫であり、免疫化動物からのリンパ節組織かまたは脾臓組織から採られた。脾臓細胞は、マウス系に関して、抗体産生細胞のより濃縮されたおよび都合のよい供給源であるので、脾臓細胞の使用が好ましい。骨髄腫細胞は、融合したハイブリッドの連続的繁殖の基盤

を提供する。骨髄腫細胞は形質細胞に由来する腫瘍細胞である。マウス骨髄腫細胞は、例えば、American Type Culture Collection（ATCC；マナッサス、VA）から得ることが可能である。ヒト骨髄腫およびマウス－ヒト異種骨髄腫細胞株も記載されている（Kozborら、J. Immunol.、133：3001－3005、1984；Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、Marcel Dekker、Inc.、ニューヨーク、pp. 51－63、1987）。

【0172】

ハイブリッド細胞株は細胞培養培地中、インビトロで維持することが可能である。ハイブリドーマ細胞株が確立されたら、ヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン（HAT）培地のごとき、多様な栄養的に適切な培地で維持することが可能である。さらに、ハイブリッド細胞株は、液体窒素下での凍結および貯蔵を含む、かなり多数の都合のよい方法で貯蔵および保存することが可能である。凍結細胞株は復活でき、そしてモノクローナル抗体の合成および分泌を回復して無限に培養することが可能である。分泌された抗体は、沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどのごとき常法により、組織培養上清から回収する。

【0173】

抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギおよびヒトを含む、任意の哺乳動物で調製することができる。抗体は、以下の免疫グロブリンクラスの1つのメンバーであることができる：IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE、およびそのサブクラス、および好ましくはIgG抗体。

【0174】

モノクローナル抗体を産生するための好ましい動物がマウスである場合、本発明はそのように限定されるわけではない；実際に、ヒト抗体を使用することができ、そして好ましいと証明することができる。そのような抗体は、ヒトハイブリドーマを使用して得ることが可能である（Coleら、「モノクローナル抗体及びがん治療」、Alan R. Liss Inc.、p. 77－96、1985）。本発明において、適切な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子と共にヒト抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることによる、キメラ抗体の産生のために開発された技術を使用することが可能である（Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81、6851－6855、1984；Neubergerら、Nature 312、604－608、1984；Takedaら、Nature 314、452－454、1985）；そのような抗体は本発明の範囲内であり、以下に説明されている。

【0175】

細胞融合技術に代わる他の方法として、エプスタイン－バーウイルス（EBV）不死化B細胞を、本発明のモノクローナル抗体を産生するために使用する（Crawford D.ら、J. of Gen. Virol.、64：697－700、1983；KozborおよびRoder、J. Immunol.、4：1275－1280、1981；Kozborら、Methods in Enzymology、121：120－140、1986）。一般に、本方法は、適した起源（一般には感染細胞株）からエプスタイン－バーウイルスを単離し、そして標的抗体分泌細胞を、ウイルスを含んでいる上清に暴露する。細胞を洗浄し、適切な細胞培養培地で培養する。続いて、細胞培養物に存在するウイルスで形質転換された細胞は、エプスタイン－バーウイルス核抗原の存在で同定することが可能であり、そして形質転換された抗体分泌細胞は、当該技術分野で知られている標準法を使用して同定することが可能である。組換えDNAのごとき、モノクローナル抗体を産生するための他の方法もまた本発明の範囲内に含まれている。

sFlt－1免疫原の調製

sFlt－1はそれ自身でも免疫原として使用することができ、または坦体タンパク質またはセファロースビーズのごとき他の物質へ結合させることもできる。sFlt－1は

、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ；Ｋｅｎｄａｌｌら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．、２２６：３２４－３２８、１９９６）のごとき内因性タンパク質を発現することが知られている細胞から精製することができる。加えて、ｓＦｌｔ－１またはその一部をコードする核酸分子を、標準組換えＤＮＡ技術を使用して、宿主細胞で発現するための既知のベクター内へ挿入することが可能である。ｓＦｌｔ－１発現のために適した宿主細胞には、バキュロウイルス細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）、細菌細胞（例えば、大腸菌）および哺乳動物細胞（例えば、ＮＩＨ３Ｔ３細胞）が含まれる。

【０１７６】

加えて、免疫原として、ペプチドを合成および使用することが可能である。ペプチドに対する抗体を作製するための方法は、よく知られており、そして一般的に、血清アルブミンのごとき適した坦体分子へのペプチドのカップリングを必要とする。ペプチドは、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号Ｕ０１１３４に対応するｓＦｌｔ－１アミノ酸配列の任意の一部と実質的に同一である任意のアミノ酸配列を含んでいる。ペプチドは任意の長さ、好ましくは１０アミノ酸以上、より好ましくは２５アミノ酸以上、最も好ましくは４０、５０、６０、７０、８０または１００アミノ酸以上であることが可能である。好ましくは、アミノ酸配列は少なくとも６０％、より好ましくは８５％、最も好ましくは９５％、Ｕ０１１３４の配列と同一である。ペプチドは商業的に得ることもできるし、または、例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ固相法（Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３２：３４１－３４７、１９８５）のごとき当該技術分野ではよく知られている技術を使用して作製することも可能である。この方法は、Ｂｉｏｓｅａｒｔｈ　９５００自動化ペプチド合成機のごとき商業的に入手可能な合成機を使用することができ、ブロックされたアミノ酸の切断はフッ化水素で達成され、そしてペプチドは１５～２０μｍ　Ｖｙｄａｃ　Ｃ４　ＰｒｅｐＰＡＫカラム上、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔａ　Ｐｒｅｐ　３０００装置を使用する、分取ＨＰＬＣにより精製する。

抗体の機能的均等物

本発明はまた、本明細書に記載されているような抗体の機能的均等物も含んでいる。機能的均等物には、本発明の抗体の可変または高頻度可変領域のアミノ酸配列と、実質的に同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。機能的均等物は、抗体の結合特性に匹敵する特性を有しており、そして、例えば、キメラ化、ヒト化および単鎖抗体ならびにその断片を含んでいる。そのような機能的均等物を製造する方法は、ＰＣＴ出願ＷＯ９３／２１３１９号；欧州特許出願第２３９，４００号；ＰＣＴ出願ＷＯ８９／０９６２２号；欧州特許出願第３３８，７４５号；欧州特許出願第３３２４２４号；および米国特許第４，８１６，５６７に開示されており、その各々が本明細書において援用される。

【０１７７】

キメラ化抗体は好ましくは、ヒト抗体から実質的にまたは排他的に誘導された定常領域、およびヒト以外の哺乳動物からの可変領域の配列から実質的にまたは排他的に誘導された可変領域を有している。そのようなヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最少配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$または抗体の他の抗原結合サブ配列）である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野ではよく知られている（総説として、ＶａｓｗａｎｉおよびＨａｍｉｌｔｏｎ、Ａｎｎ　Ａｌｌｅｒｇｙ　Ａｓｔｈｍａ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、８１：１０５－１１９、１９９８およびＣａｒｔｅｒ、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｃａｎｃｅｒ、１：１１８－１２９、２００１、を参照されたい）。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源から、その中に導入された１つ以上のアミノ酸残基を有している。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば移入された残基と称され、それは典型的には移入可変ドメインからとられる。ヒト化は、齧歯動物ＣＤＲまたは他のＣＤＲ配列を、ヒト抗体の対応する配列で置換することにより、本質的に当該技術分野で既知の方法に従って実行することが可能である（Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２－５２５、１９８６；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３３２：３２３－３２９、１９８８；およびＶｅｒｈｏｅｙｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３９：１５３４－１５３６　１９８８）。従って、そのようなヒト化抗体はキメラ抗体であり、ここにおいて、実質上、

無傷のヒト可変ドメインより少ない部分が、非ヒト種からの対応する配列で置換されている（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）。実際、ヒト化抗体は典型的には、いくつかのＣＤＲ残基およびあるいはいくつかのＦＲ残基が、齧歯動物抗体中の類似の部位からの残基で置換されているヒト抗体である（Ｐｒｅｓｔａ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、２：５９３－５９６、１９９２）。

【０１７８】

ヒト化抗体を調製する追加の方法は、本明細書において援用される米国特許第５，８２１，３３７号および第６，０５４，２９７号、ならびにＣａｒｔｅｒ（上記文献）に見ることができる。ヒト化抗体はＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥを含む免疫グロブリンの任意のクラス、およびＩｇ$G_1$、Ｉｇ$G_2$、Ｉｇ$G_3$およびＩｇ$G_4$を含む任意のアイソタイプから選択される。本発明におけるごとく、細胞毒性活性が必要とされない場合、定常領域ドメインは好ましくはＩｇ$G_2$クラスである。ヒト化抗体は、１つ以上のクラスまたはアイソタイプからの配列を含んでなることができ、所望のエフェクター機能を最適にするための特定の定常ドメインを選択することは、当業者の範囲内である。

【０１７９】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー（Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２２：５８１－５９７、１９９１およびＷｉｎｔｅｒら、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１２：４３３－４５５、１９９４）を含む、当該技術分野で知られている多様な技術を使用して製造することが可能である。Ｃｏｌｅら、およびＢｏｅｒｎｅｒらの技術もまたヒトモノクローナル抗体の製造に有用である（Ｃｏｌｅら、上記文献；Ｂｏｅｒｎｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４７：８６－９５、１９９１）。

【０１８０】

ヒト以外の適した哺乳動物には、モノクローナル抗体を作製することができる任意の哺乳動物が含まれる。ヒト以外の哺乳動物の例には、例えば、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ヤギまたは霊長類が含まれ；マウスが好ましい。

【０１８１】

抗体の機能的均等物には、単鎖抗体（ｓｃＦｖｓ）としても知られている、単鎖抗体断片も含まれる。単鎖抗体断片は、典型的には、抗原またはレセプターを結合する組換えポリペプチドである；これらの断片は、１つ以上の相互接続されたリンカーを有するまたは有していない、少なくとも１つの抗体可変軽鎖配列（$V_L$）の断片へ繋ぎ止められた、少なくとも１つの抗体可変重鎖アミノ酸配列（$V_H$）の断片を含んでいる。そのようなリンカーは、単鎖断片が誘導された全抗体の標的分子結合特異性を維持するように、ひとたびそれらが連結されると、$V_L$および$V_H$ドメインの適切な３次元折り畳みが起こることを確実にするように選択された、短い、可動性のペプチドであることができる。一般に、$V_L$または$V_H$配列のカルボキシル末端は、そのようなペプチドリンカーにより、相補的$V_L$または$V_H$配列のアミノ末端へ共有結合で連結されている。単鎖抗体断片は、分子クローニング、抗体ファージディスプレイライブラリーまたは類似の技術により発生させることが可能である。これらのタンパク質は、真核生物細胞かまたは細菌を含む原核生物細胞中で産生することが可能である。

【０１８２】

単鎖抗体断片は、本明細書に記載した全抗体の少なくとも１つの可変領域またはＣＤＲを有しているが、これらの抗体の定常領域のいくつかまたは全部を欠失している。これらの定常領域は抗原結合には必要ではないが、全抗体の構造の主たる部分を構成している。単鎖抗体断片はそれ故、定常領域の一部または全部を含んでいる抗体の使用に関連した、いくつかの問題を克服することができる。例えば、単鎖抗体断片は、望まれない生物学的分子および重鎖定常領域間の相互作用、または他の求められていない生物活性が取り除かれる傾向がある。さらに、単鎖抗体断片は全抗体よりもかなり小さく、それ故、全抗体よりも大きな毛細血管透過性を有しており、単鎖抗体断片が局在化するのを可能にし、そしてより効率的に標的抗原結合部位へ結合する。また、抗体断片は、原核生物細胞中で比較的大規模に産生することが可能であり、それ故その産生を容易にする。さらに、比較的小

さなサイズの単鎖抗体断片は、全抗体よりもレシピエントの免疫応答を誘発し難くしている。

【０１８３】

機能的均等物はさらに、全抗体の結合特性と同一のまたは匹敵する結合特性を有する抗体の断片を含んでいる。そのような断片は、Ｆａｂ断片またはＦ（ａｂ’）$_2$断片の１つまたは両方を含むことができる。好ましくは、抗体断片は全抗体の６つ全てのＣＤＲ含んでいるけれども、３つ、４つまたは５つのＣＤＲのごとく、そのような領域全てを含んでいない断片もまた機能的である。

【０１８４】

さらに、機能的均等物は、以下の免疫グロブリンクラスの、任意の１つのメンバーでもよく、または組み合わせてもよい：ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤまたはＩｇＥ、またはそのサブクラス。

抗体の機能的均等物の調製

抗体の均等物は、当該技術分野で知られている方法により調製される。例えば、抗体の断片は、全抗体から酵素的に調製することができる。好ましくは、抗体の均等物は、そのような均等物をコードしているＤＮＡから調製される。抗体の断片をコードしているＤＮＡは、完全長抗体をコードしているＤＮＡの所望の部分を除いた全てを除去することにより調製することができる。

【０１８５】

キメラ化抗体をコードしているＤＮＡは、実質的にまたは排他的にヒト定常領域をコードしているＤＮＡ、およびヒト以外の哺乳動物の可変領域の配列から実質的にまたは排他的に誘導された可変領域をコードしているＤＮＡを組換えることにより調製することができる。ヒト化抗体をコードしているＤＮＡは、対応するヒト抗体領域から実質的にまたは排他的に誘導された定常領域およびＣＤＲ以外の可変領域をコードしているＤＮＡ、およびヒト以外の哺乳動物から実質的にまたは排他的に誘導されたＣＤＲをコードしているＤＮＡを組換えることにより調製することができる。

【０１８６】

抗体の断片をコードするＤＮＡ分子の適した供給源には、完全長抗体を発現する、ハイブリドーマのごとき細胞が含まれる。断片はそれ自身で抗体均等物として使用することもでき、若しくは、前記のように均等物内へ組換えることもできる。

【０１８７】

この節で記載されたＤＮＡ除去および組換えは、前に掲げた公開特許出願に記載されている方法のごとき、既知の方法により実行することができる。

抗体スクリーニングおよび選択

モノクローナル抗体は、標準の当該技術分野で知られている方法を使用して単離および精製する。例えば、抗体は、ｓＦｌｔ－１ペプチド抗原に対するＥＬＩＳＡまたはウェスタンブロット分析のごとき、標準の当該技術分野で知られている方法を使用してスクリーニングすることが可能である。そのような技術の例は、本明細書において援用される米国特許第６，３６５，１５７号の実施例ＩＩおよびＩＩＩに記載されている。

抗体の治療的使用

子癇前症または子癇の治療または予防のためにインビボで使用される場合、本発明の抗体を、被験者に治療的に有効量で投与する。好ましくは、抗体は非経口で、または連続的注入により静脈内で投与する。用量および投与計画は、疾患の重度、および被験者の全体の健康度に依存する。投与される抗体の量は、典型的には約０．０１～約１０ｍｇ／ｋｇ被験者体重、の範囲である。

【０１８８】

非経口投与には、抗体は、医薬として受容可能な非経口媒体に会合した単一用量注入可能形（溶液、懸濁液、乳濁液）に処方する。そのような媒体は、本質的に非毒性および非治療的である。そのような媒体の例は、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液および５％ヒト血清アルブミンである。固定油およびオレイン酸エチルのごとき非水媒体も

また使用することができる。リポソームは坦体として使用することができる。媒体は、等張性および化学的安定性を促進する物質、例えば、緩衝液および保存剤のごとき添加物を少量含むことができる。抗体は典型的には、そのような媒体に、約１ｍｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌの濃度で処方する。

ｓＦｌｔ－１を阻害する治療化合物

子癇前症、子癇を有している、またはそのような状態を発現する傾向を有している被験者において、ｓＦｌｔ－１のレベルが増加しているとすると、ｓＦｌｔ－１ポリペプチドまたは核酸分子の発現を減少させる任意の剤は、本発明の方法に有用である。そのような剤には、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦへのｓＦｌｔ－１結合を破壊できる小分子、アンチセンス核酸塩基オリゴマー、およびＲＮＡ干渉を仲介するために使用されるｄｓＲＮＡが含まれる。

組み合わせ治療

随意に、子癇前症または子癇治療剤は、任意の他の標準子癇前症または子癇治療と組み合わせて投与することができる；そのような方法は当業者には知られており、そして本明細書に記載されている。本発明の子癇前症または子癇治療剤は、ＶＥＧＦ経路の活性を増加させる任意の化合物と組み合わせて投与することができる。内因性ＶＥＧＦ産生も誘導する剤の非制限例には、ニコチン、ミノキシジル、ニフィデピン、アデノシン、硫酸マグネシウムおよびテオフィリンが含まれる。１つの態様において、ＰｌＧＦタンパク質を、前に掲げた内因性ＶＥＧＦ産生を誘導する剤の任意のものと組み合わせて使用することが可能である。

被験者モニタリング

子癇前症、子癇、またはそのような状態を発現する傾向を有している被験者の疾患状態または治療は、本発明の方法および組成物を使用してモニターすることが可能である。１つの態様において、尿、血漿、羊水またはＣＳＦのごとき体液中に存在するｓＦｌｔ－１、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦポリペプチドの発現をモニターする。そのようなモニタリングは、例えば、被験者における特定の薬剤の有効性を評価すること、または疾患進行を評価することにおいて有用であることができる。ｓＦｌｔ－１核酸分子またはポリペプチドの発現を減少させる、またはＶＥＧＦまたはＰｌＧＦ核酸分子またはポリペプチドの発現を増加させる治療剤が、本発明において特に有用であるとみなされた。

他の態様

前記の説明から、多様な使用および条件に適応させるため、本明細書に記載した本発明に、変更および修飾を行うことができることは明白である。そのような態様もまた、別記の特許請求の範囲内である。

【０１８９】

本明細書で言及する全ての刊行物は、各々の刊行物または特許出願が特別におよび個々に本明細書に援用されることが示されているのと同じ程度で、本明細書に援用される。加えて、２００３年３月３日提出の米国仮出願第６０／４５１７９６号、２００２年７月１９日提出の第６０／３９７，４８１号、および２００３年５月２日提出の第６０／４６７，３９０号は、その全体が本明細書において援用される。

【図面の簡単な説明】

【０１９０】

【図１】図１は、子癇前症におけるｓＦｌｔ－１のｍＲＮＡおよびタンパク質の発現を示している。図１Ａは、ノーザンブロット分析により決定された、子癇前症の３人の患者（Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３）および３人の正常圧出産期妊娠者（Ｎ１、Ｎ２、Ｎ３）からの胎盤ｓＦｌｔ－１のｍＲＮＡ発現を示している。より高いバンド（７．５ｋｂ）は完全長ｆｌｔ－１　ｍＲＮＡであり、より低く、より豊富なバンド（３．４ｋｂ）は代替的にスプライスされたｓＦｌｔ－１　ｍＲＮＡである。ＧＡＰＤＨが対照として含まれており、そして矢じりは２８Ｓ　ＲＮＡを示している。患者Ｐ１およびＰ２は重度の子癇前症を患っており、患者Ｐ３は軽度の子癇前症を患っていた。図１Ｂは軽度子癇前症患者（軽度ＰＥ）、重度子癇前症患者（重度ＰＥ）、および出産期の正常圧妊娠女性（対照）からの血清中の

ｓＦｌｔ－１レベルを示すグラフである。ｓＦｌｔ－１レベルは、市販のキット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ミネアポリス、ＭＮ）を使用して、ｓＦｌｔ－１に対して実行されるＥＬＩＳＡにより測定した。他の理由のために早産した患者（早期）が、在胎齢特異的変化を除外するための追加の対照として含まれている。試験された患者数はＸ軸の括弧に示されている。試料は、分娩前（ｔ＝０）および分娩後４８時間（ｔ＝４８）に回集した。図１Ｃは、図１Ｂで説明した全ての患者に対して、ＥＬＩＳＡにより決定された分娩時点（ｔ＝０）での抗血管形成指標比（ＰＡＡＩ＝ｓＦｌｔ－１／（ＶＥＧＦ＋ＰｌＧＦ））を示すグラフである。

【図２】図２Ａ～２Ｆは、子癇前症における過剰ｓＦｌｔ－１の抗血管形成効果を示す顕微鏡写真である。内皮管アッセイは、４人の正常妊娠対照および４人の子癇前症患者からの血清を使用して実施された。１人の正常対照および１人の子癇前症患者からの代表的実験が示されている。図２Ａ、２Ｂおよび２Ｃは、正常患者からの血清を使用して実施されたアッセイを示しており、一方、図２Ｄ、２Ｅおよび２Ｆは、子癇前症患者からの血清を使用して実施されたアッセイを示している。図２Ａにおいてはｔ＝０（出産期の正常妊娠女性からの１０％血清）；図２Ｂにおいてはｔ＝４８（分娩後４８時間の正常妊娠女性からの１０％血清）；図２Ｃにおいてはｔ＝０＋外来ｓＦｌｔ－１（１０ｎｇ／ｍｌ）；図２Ｄにおいてはｔ＝０（分娩前の子癇前症女性からの１０％血清）；図２Ｅにおいてはｔ＝４８（分娩後４８時間の子癇前症女性からの１０％血清）；および図２Ｆにおいてはｔ＝０＋外来ＶＥＧＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）＋ＰｌＧＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）。管アッセイを定量し、平均管長±ＳＥＭが、各々のパネルの下にピクセルで示されている。

【図３】図３Ａおよび３Ｂは、腎微小血管のＶＥＧＦおよびＰｌＧＦにより誘導される血管拡張の、ｓＦｌｔ－１による阻害を示すグラフである。図３Ａは、ｓＦｌｔ－１（Ｓ）、ＶＥＧＦ（Ｖ）、ＰｌＧＦ（Ｐ）に対するラット腎細動脈の弛緩応答の増加が、３つの異なった用量で測定されたことを示している。Ｖ＋およびＰ＋は、１００ｎｇ／ｍｌのｓＦｌｔ－１存在下での、個々の試薬の血管拡張応答を表している。全ての実験は６つの異なった切開ラット腎微小血管で実施され、データは、平均±ＳＥＭで示されている。＊は、個々の試薬単独と比較して、ｐ＜０．０１の統計的有意性を表している。図３Ｂは、生理学的用量での弛緩応答の増加を示している：ＶＥＧＦ　１００ｐｇ／ｍｌ（Ｖ）、ＰｌＧＦ　５００ｐｇ／ｍｌ（Ｐ）、ｓＦｌｔ－１　１０ｎｇ／ｍｌ（Ｓ）、ＶＥＧＦ（１００ｐｇ／ｍｌ）＋ＰｌＧＦ　５００ｐｇ／ｍｌ（Ｖ＋Ｐ）またはＶＥＧＦ（１００ｐｇ／ｍｌ）＋ＰｌＧＦ　５００ｐｇ／ｍｌ＋ｓＦｌｔ－１　１０ｎｇ／ｍｌ（Ｖ＋Ｐ＋Ｓ）。全ての実験は６つの異なった切開ラット腎微小血管で実施され、データは、平均±ＳＥＭで示されている。＊は、Ｖ＋Ｐと比較して、ｐ＜０．０５の統計的有意性を表している。

【図４Ａ】図４Ａは、糸球体内皮症のｓＦｌｔ－１による誘導を示している。図４Ａは、糸球体肥大および細胞質膨張を有するｓＦｌｔ－１処置動物における毛細管閉塞のヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色を対照と比較して示す顕微鏡写真である。泡状細胞質を有する「糸球体内皮症」は、ｓＦｌｔ－１処置動物において、過ヨウ素酸シッフ（ＰＡＳ）染色で示されている。全ての光学顕微鏡写真は、６０倍の原拡大率で撮影した。

【図４Ｂ】図４Ｂは、糸球体内皮症のｓＦｌｔ－１による誘導を示している。図４Ｂは、毛管内細胞の細胞質膨潤を確認する、ｓＦｌｔ－１処置糸球体の電子顕微鏡写真である。フィブリン写真のための免疫蛍光（ＩＦ）は４０倍で撮影し、ＥＭ写真は２４００倍の原拡大率で撮影した。全ての図を同一拡大率で再現した。

【図５】図５Ａ～５Ｃは、在胎齢に対する、子癇前症発症前および発症後に測定されたｓＦｌｔ－１レベルを示している。図５Ａは、正常圧対照（細線に白三角）、子癇前症発症前の症例（黒丸）、および分娩開始前４～５週以内の在胎齢時期の子癇前症発症後－「エンドポイント」検体－の症例（黒四角）に関し、平均血清濃度をｐｇ／ｍｌで示すグラフである。ブラケットは平均の標準誤差を示している。アスタリスクは、対数変換後の、同一在胎齢時期内の対照検体に対する有意差を示している：$^{*}$ｐ＜０．０５、$^{**}$ｐ＜０．０１、$^{***}$ｐ＜０．００１。図５Ｂは、子癇前症前数週間の間隔内での子癇前症発症前および発症後の症例におけるｓＦｌｔ－１の平均血清濃度をｐｇ／ｍｌで示すグラフである。

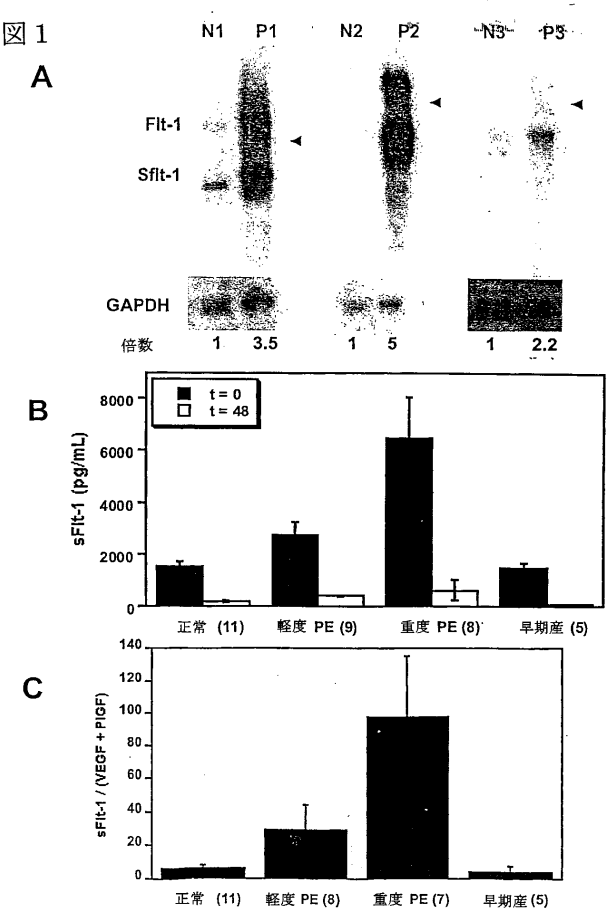
ＰＥは、４３のエンドポイント検体（子癇前症の発症時点またはその後に得られた）の算術平均を示している。平均在胎齢（日）が各々の時間間隔の下に括弧で示されている。水平線はエンドポイント検体におけるレベルを示している。垂直線は、子癇前症前≦５週の期間の境界を画している。図５Ｃは、在胎齢時期に対する、正常圧対照、および子癇前症の発症５週間以内に得られた検体を除いた後の子癇前症前の症例のｓＦｌｔ－１の平均血清濃度をｐｇ／ｍｌで示すグラフである。有意差はない。

【図６】図６Ａ～６Ｃは、在胎齢に対する、子癇前症前および後のＰｌＧＦレベルを示している。図６Ａは、分娩および出産の前に得られた全検体におけるＰｌＧＦレベルを示すグラフである。ブラケットは平均の標準誤差を示している。アスタリスクは、対数変換後の、同一間隔内の対照検体に対する有意差を示している：$^{**}$ｐ＜０．０１、$^{***}$ｐ＜０．００１。図６Ｂは、子癇前症前数週間の間隔内での子癇前症の発症前および発症後におけるＰｌＧＦの平均血清濃度をｐｇ／ｍｌで示すグラフである。ＰＥは、４３のエンドポイント検体（子癇前症の発症時点またはその後に得られた）の算術平均を示している。平均在胎齢（日）が各々の時間間隔の下に括弧で示されている。水平線はエンドポイント検体におけるレベルを示している。垂直線は、子癇前症前≦５週の期間の境界を画している。図６Ｃは、在胎齢時期に対する、正常圧対照、および子癇前症発症例のＰｌＧＦの平均血清濃度をｐｇ／ｍｌで示すグラフである。

【図７】図７Ａおよび７Ｂは、子癇前症の状態および重度に対する、ｓＦｌｔ－１およびＰｌＧＦのレベルを示している。図７Ａは、対照、および軽度子癇前症例（臨床疾患発症前）、重度子癇前症例、発症＜３７週の子癇前症例、在胎齢に比して小さい（ＳＧＡ）児を有する子癇前症例、および発症＜３４週の子癇前症例における、妊娠２３～３２週でのｓＦｌｔ－１（黒棒）およびＰｌＧＦ（白棒）の算術平均血清濃度を示すグラフである。検体数は各々のカラム対の下に記録されている。在胎齢および肥満度指数の調整は有意水準に影響しない少しの変化しか与えなかった。図７Ｂは、対照、および軽度子癇前症例（臨床疾患発症前）、重度子癇前症例、発症＜３７週の子癇前症例、およびＳＧＡ児を有する子癇前症例における、妊娠３３～４１週でのｓＦｌｔ－１（黒棒）およびＰｌＧＦ（白棒）の算術平均血清濃度を示すグラフである。検体数は各々のカラム対の下に記録されている。在胎齢および肥満度指数の調整は有意水準に影響しない少しの変化しか与えなかった。

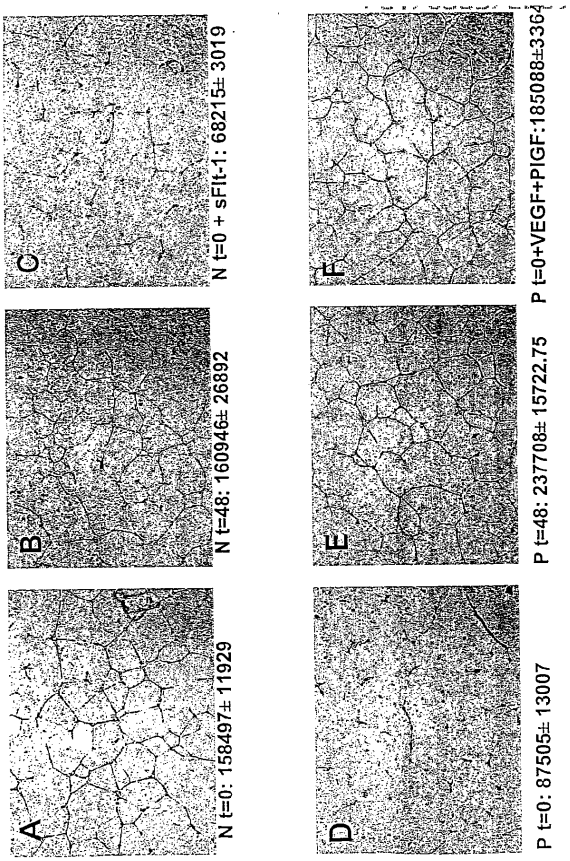
【図１】

図１



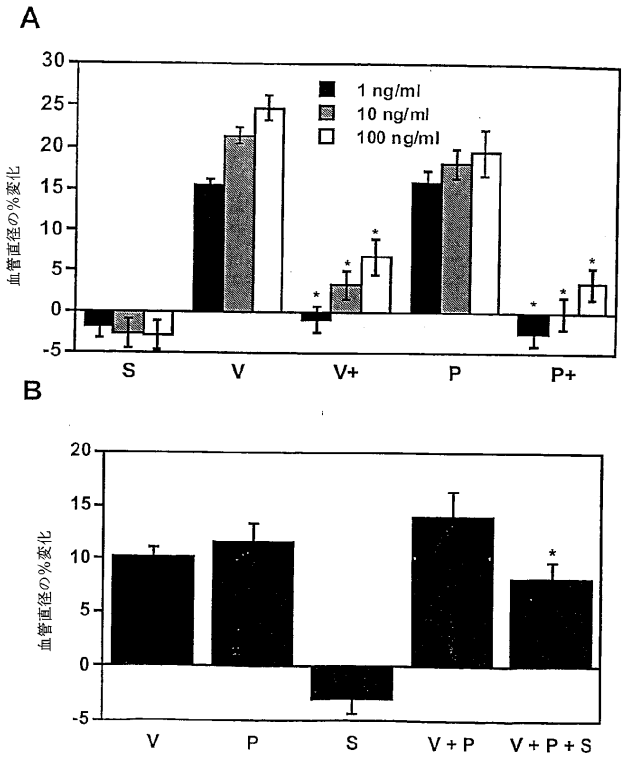

【図２】

図２



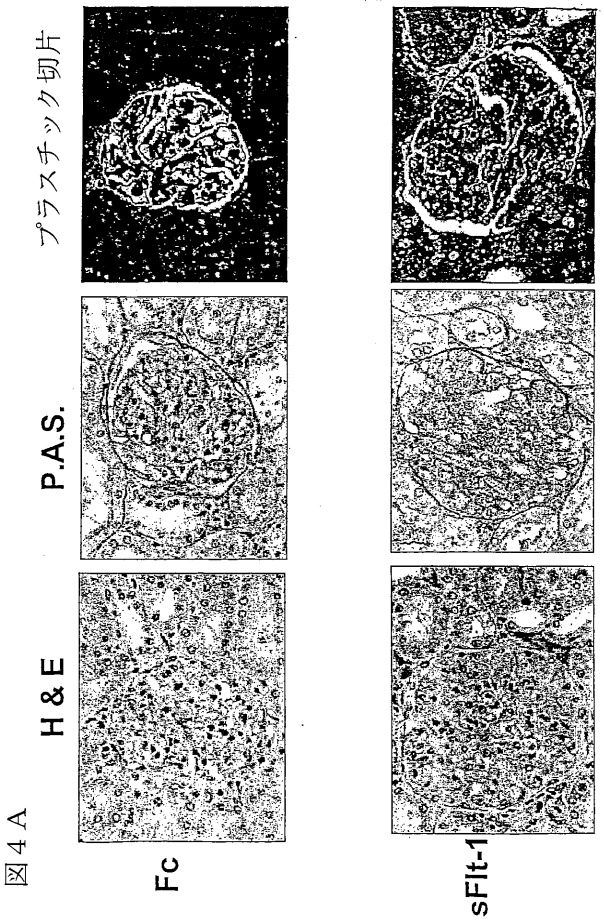

【図３】

図３




【図４Ａ】

図４Ａ



【図４Ｂ】

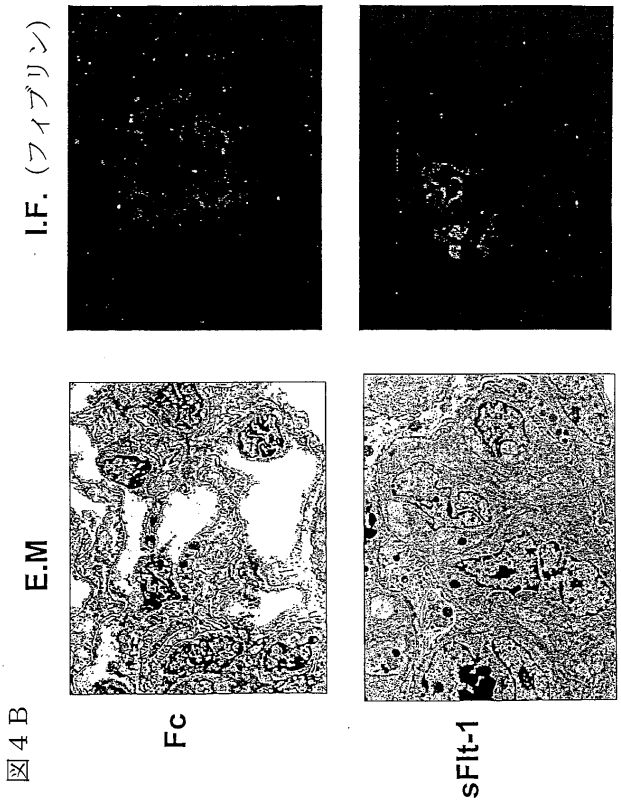
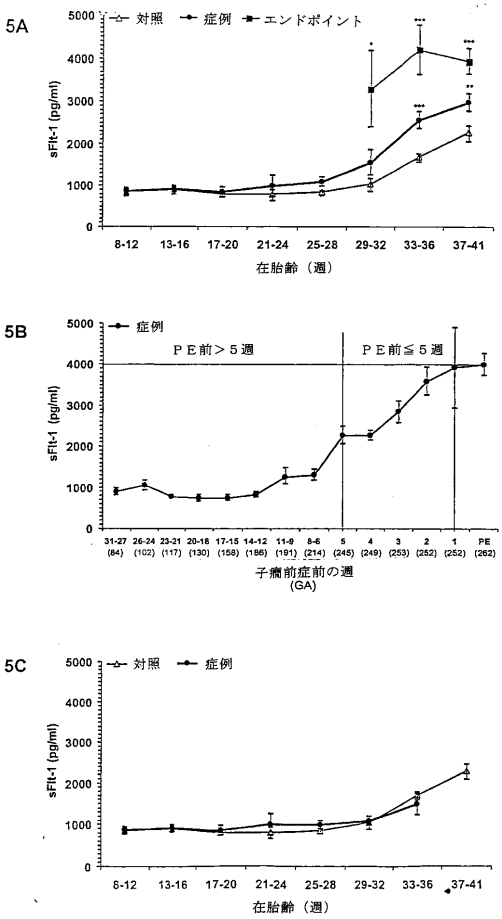
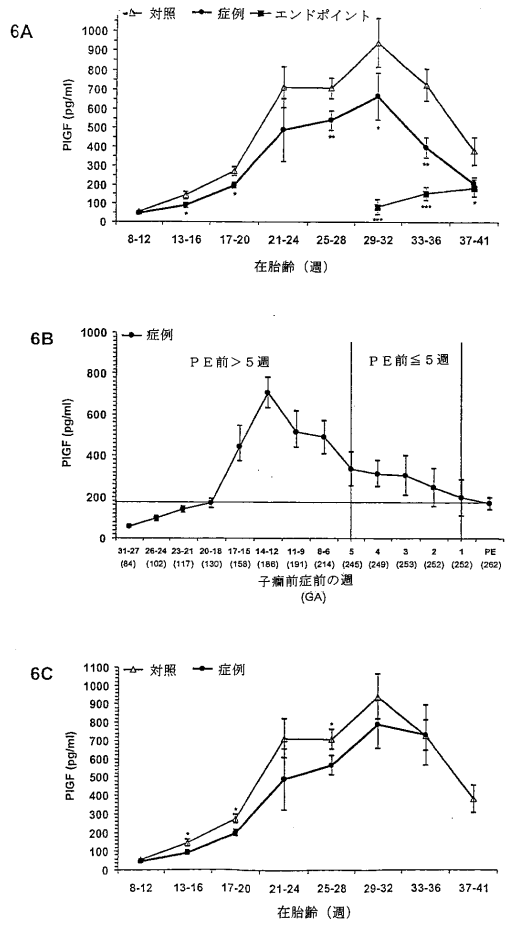



図４Ｂ

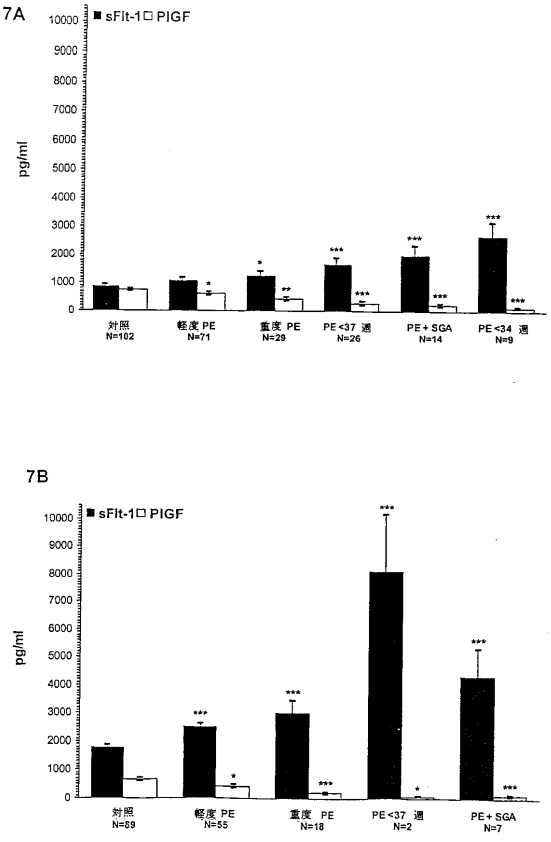
【図５】




【図６】




【図７】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***31/7076*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 31/7076 | |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***39/395*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 39/395 Ｄ | |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***48/00*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 39/395 Ｎ | |
| ***Ａ６１Ｐ*** | ***15/08*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｋ | 48/00 | |
| ***Ｇ０１Ｎ*** | ***33/53*** | ***(2006.01)*** | Ａ６１Ｐ | 15/08 | |
| ***Ａ６１Ｋ*** | ***38/00*** | ***(2006.01)*** | Ｇ０１Ｎ | 33/53 Ｄ | |
| | | | Ｇ０１Ｎ | 33/53 Ｍ | |
| | | | Ａ６１Ｋ | 37/02 | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(72)発明者 カルマンチ，エス・アナンス
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３２，ウエスト・ロックスベリー，ワシントン・ストリート ５２８１
(72)発明者 メイナード，シャロン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５８，ニュートン，リッカー・ロード １９，アパートメント・ナンバー２
(72)発明者 スカトメ，ヴィカス・ピー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５９，ニュートン・センター，スカイ・ビュー・サークル ３６

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 DB52 MA02 NA14 ZA81
4C085 AA13 AA14 BB17 BB44 EE01
4C086 AA01 AA02 BC16 BC17 BC42 CB07 EA18 GA07 GA08 MA01
MA02 MA04 NA14 ZA81

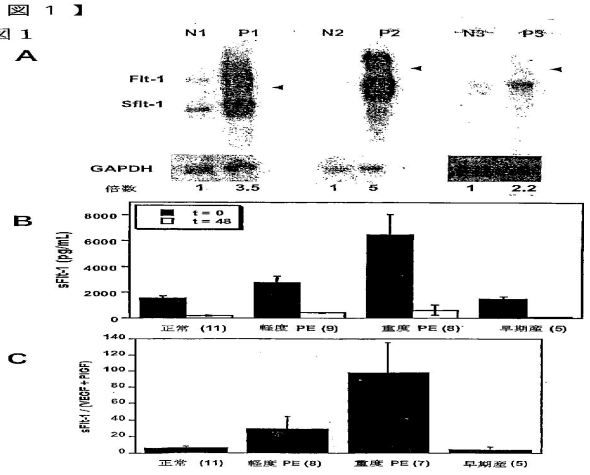
| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 诊断先兆子痫或子痫的方法和治疗方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2006511615A | 公开(公告)日 | 2006-04-06 |
| 申请号 | JP2005505542 | 申请日 | 2003-07-21 |
| 申请(专利权)人(译) | 贝斯以色列Dikonisu医疗中心 | | |
| [标]发明人 | カルマンチエスアナンス<br>メイナードシャロン<br>スカトメヴィカスピー | | |
| 发明人 | カルマンチ,エス·アナンス<br>メイナード,シャロン<br>スカトメ,ヴィカス·ピー | | |
| IPC分类号 | A61K45/00 A61K31/4422 A61K31/4439 A61K31/506 A61K31/52 A61K31/7076 A61K39/395 A61K48/00 A61P15/08 G01N33/53 A61K38/00 A61B10/00 A61K31/522 A61K38/18 A61K38/19 C07K16/12 C07K16/28 C12Q1/48 G01N33/68 G01N33/74 | | |
| CPC分类号 | A61K31/522 A61K38/1866 A61K38/1891 A61K2039/505 A61P9/12 A61P15/00 A61P15/08 A61P25/08 A61P43/00 C07K16/1217 C07K16/2863 C12N15/1137 C12N15/1138 C12N2310/14 C12Q1/485 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2500/00 G01N2800/368 | | |
| FI分类号 | A61K45/00 A61K31/4422 A61K31/4439 A61K31/506 A61K31/52 A61K31/7076 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P15/08 G01N33/53.D G01N33/53.M A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DB52 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA81 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB44 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC16 4C086/BC17 4C086/BC42 4C086/CB07 4C086/EA18 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 | | |
| 代理人(译) | 小林 泰<br>千叶昭夫 | | |
| 优先权 | 60/397481 2002-07-19 US<br>60/451796 2003-03-03 US<br>60/467390 2003-05-02 US | | |
| 其他公开文献 | JP2006511615A5<br>JP5650876B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |


摘要(译)

本文公开了用于诊断先兆子痫和子痫的方法。本文还公开了使用增加VEGF或PlGF水平的化合物或降低sFlt-1水平的化合物治疗先兆子痫和子痫的方法。本文还公开了抑制VEGF或PlGF与SF1t1结合的化合物，用于治疗先兆子痫或子痫。

【図１】

図１


A
N1
P1
N2
P2
N3
P3
Flt-1
Sflt-1
GAPDH
倍数
1
3.5
1
5
1
2.2
B
t = 0
t = 48
sFlt-1 (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
正常 (11)
軽度 PE (9)
重度 PE (8)
早期産 (5)
C
sFlt-1 /(PlGF+PlGF)
140
120
100
80
60
40
20
0
正常 (11)
軽度 PE (8)
重度 PE (7)
早期産 (5)

【図３】