

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4711972号
(P4711972)

(45) 発行日 平成23年6月29日(2011.6.29)

(24) 登録日 平成23年4月1日(2011.4.1)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D
A 6 1 B 10/00 (2006.01) A 6 1 B 10/00 N

請求項の数 14 (全 75 頁)

(21) 出願番号	特願2006-552339 (P2006-552339)	(73) 特許権者	500511615
(86) (22) 出願日	平成17年2月4日(2005.2.4)		ベス・イスラエル・ディーコニス・メディカル・センター・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2007-522457 (P2007-522457A)		アメリカ合衆国 02215 マサチューセッツ州 ボストン ブルックリン アベニュー 330
(43) 公表日	平成19年8月9日(2007.8.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/003884	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開番号	W02005/077007		弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開日	平成17年8月25日(2005.8.25)	(74) 代理人	100140109
審査請求日	平成20年1月21日(2008.1.21)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	10/771,518	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成16年2月4日(2004.2.4)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100080137
(31) 優先権主張番号	11/019,559		弁理士 千葉 昭男
(32) 優先日	平成16年12月21日(2004.12.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子癇前症又は子癇を鑑別するための *in vitro* 分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト妊娠被験者を、子癇前症若しくは子癇であるか又はそれらを発症する傾向にあると鑑別するための *in vitro* 分析方法であって、ヒト妊娠被験者の血清サンプル中の可溶性 Flt-1 (sFlt-1) 及び遊離胎盤成長因子 (PlGF) のレベルを測定することを含み、sFlt-1 と遊離 PlGF との関係性を sFlt-1 / PlGF 測定基準を用いて計算することを更に含む、前記方法。

【請求項 2】

ヒト妊娠被験者の sFlt-1 / PlGF 測定基準値を正常基準値と比較し、正常基準値と比較したヒト妊娠被験者の値の増加によって子癇前症若しくは子癇であるか又はそれらを発症する傾向にあると鑑別するための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

sFlt-1 / PlGF 比が少なくとも 5 であるとき出産予定日前の子癇前症若しくは子癇であるか又はそれらを発症する傾向にあると鑑別するための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ヒト妊娠被験者の尿サンプル中の遊離 PlGF レベルを測定することを更に含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

尿サンプル中の遊離 PlGF レベルの測定を、血清サンプル中の sFlt-1 及び遊離

P L G F を測定する前に行う、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

子癇前症が出産予定日前の子癇前症である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

P L G F が、選択的スプライシングに由来する P L G F のアイソフォームである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

s F l t - 1 が、遊離の、結合した、又は全 s F l t - 1 のレベルである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 9】

s F l t - 1 が、選択的スプライシングに由来する s F l t - 1 のアイソフォームである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

s F l t - 1 レベルが、分解されているか酵素的に切断されている s F l t - 1 ポリペプチドのポリペプチド副産物レベルである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

基準が、ヒト妊娠被験者の前サンプル又はレベルである、請求項 2 及び 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

基準が、妊娠しているが子癇前症でも子癇でもなく又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向もない正常被験者から採取されたサンプルである、請求項 2 及び 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 13】

測定が 2 回以上の機会に行われ、測定基準値又は尿遊離 P L G F レベルの測定間の変化が子癇前症又は子癇の鑑別指標である、請求項 1、2 及び 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

ヒト妊娠被験者が妊娠 21 ~ 32 週の被験者である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

一般に、本発明は、子癇前症又は子癇を有する被験者の検出及び治療に関するものである。

【背景技術】

【0002】

子癇前症とは、妊娠の 5 ~ 10 % に影響し、母体及び胎児に相当な罹患率及び死亡率をもたらす、高血圧、浮腫、及びタンパク尿症の症候群である。子癇前症は、世界中で 1 年に少なくとも 200,000 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、女性の血圧及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、初期段階での症候群の診断には効果がない。そのような初期の検出により、有効な治療が利用可能であれば、被験者又は発育中の胎児の危険性を減少させるであろう。

40

【0003】

現在、子癇前症の治療法は知られていない。子癇前症は軽度から生命を脅かすまでの重篤度で変化し得る。軽度の子癇前症は、ベッドでの療養と頻繁なモニタリングにより治療することができる。中程度から重度の場合、入院が必要であり、発作を予防するために血圧の薬又は抗痙攣薬が投与される。病態が母親又は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、子供は早産させられる。

50

【0004】

胎児及び胎盤の適切な発育は、いくつかの成長因子によって介在される。これら成長因子の1つは、血管内皮成長因子(VEGF)である。VEGFは、内皮細胞特異的分裂促進因子、血管形成誘発剤、及び血管透過性のメディエーターである。VEGFは、糸球体係蹄修復に重要であることも示されている。VEGFは、多くのさまざまな組織から得られる内皮細胞においてさまざまに発現する、2つの相同な膜貫通型チロシンキナーゼ受容体であるfms様チロシンキナーゼ(Flt-1)及びキナーゼドメイン受容体(KDR)の1つにホモダイマーとして結合する。Flt-1は、胎盤形成に寄与する栄養膜細胞で高度に発現するが、KDRは発現しない。胎盤成長因子(PlGF)は、やはり胎盤発育に関与するVEGFファミリーのメンバーである。PlGFは、細胞栄養芽層及びシンシウム栄養芽層で発現し、内皮細胞の増殖、遊走、及び活性化を誘導可能である。PlGFはホモダイマーとしてFlt-1受容体に結合するが、KDR受容体には結合しない。PlGFとVEGFはともに、胎盤の発育に重要な分裂促進活性及び血管形成に寄与している。

10

【0005】

可溶性Flt-1受容体(sFlt-1)が、近年、ヒト臍帯静脈内皮細胞の培地において同定され、続いて*in vivo*発現が胎盤組織で立証された。sFlt-1は、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを欠失した、Flt-1受容体のスプライス変異体である。sFlt-1は高親和性でVEGFに結合するが、内皮細胞の有糸分裂誘発を刺激しない。sFlt-1は、VEGFシグナル伝達経路を下方制御するための「生理的シンク」として作用すると考えられている。したがって、sFlt-1レベルの調節は、VEGF及びVEGFシグナル伝達経路をモジュレートするように作用する。VEGF及びPlGFのシグナル伝達経路の慎重な調節は、発育中の胎盤の栄養膜細胞による適切な増殖、遊走、及び血管形成を維持するのに重要である。子癇前症の危険性があるか又は子癇前症である被験者を、特に最も重篤な症状の発症前に、正確に診断する方法が必要とされている。治療も必要とされている。

20

【発明の開示】

【0006】

発明の概要

発明者らは、子癇前症及び子癇を診断し、有効に治療するための手段を発見した。

30

発明者らは、遺伝子発現解析により、子癇前症を患う妊娠女性からの胎盤組織サンプルにおいてsFlt-1レベルが顕著に上昇していることを発見した。sFlt-1は、「生理的シンク」として作用することにより、VEGF及びPlGFと拮抗することが知られており、子癇前症又は子癇の女性では、sFlt-1は、胎盤からこれら必須の血管新生因子及び分裂促進因子の必要量を奪っているかもしれない。また、過剰量のFlt-1は、血液脳関門を維持する内皮細胞及び/又は脳の脈絡叢を裏打ちする内皮細胞を崩壊させることにより子癇へと導くことができ、子癇において見られる脳浮腫及び発作をもたらす。本発明では、VEGF及びPlGFのレベルを増加させる化合物を被験者に投与し、上昇したsFlt-1の効果に対抗することによって子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する。更に、sFlt-1に対する抗体は、VEGF又はPlGFのsFlt-1への結合を競合的に阻害するために用いられ、それにより遊離のVEGF及びPlGFのレベルを増加させる。RNA干渉及びアンチセンス核酸塩基オリゴマーもsFlt-1レベルを低下させるために用いられる。また、本発明は、子癇前症若しくは子癇又はその傾向、あるいは心血管病態若しくはその傾向の初期診断及び管理のための、sFlt-1、VEGF、及びPlGFの検出ツールとしての使用及びモニタリングを提供する。

40

【0007】

また、本発明者らは、尿のPlGFレベルが、子癇前症若しくは子癇又はその傾向を検出するための診断ツールとして使用できることを発見した。遊離型PlGFの平均分子量は約30kDaであり、非常に小さいため、腎臓によつて過されて尿に放出される。PlGFは、sFlt-1と複合体を形成すると、分子量が非常に大きくなり、したがって

50

尿に放出されないであろう。s F l t - 1 レベルが増加すると、s F l t - 1 は P l G F と複合体を形成することができ、よって、尿に放出される遊離の P l G F レベルが低下する。その結果、遊離の P l G F レベルについての尿解析は、子癇前症若しくは子癇又はそれらを有する危険性のある患者を診断するために用いることができる。

【 0 0 0 8 】

したがって、1つの側面では、本発明は、被験者に s F l t - 1 に結合可能な化合物を投与することによって、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する方法を提供し、投与は、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するのに十分な時間及び量である。好ましい態様では、化合物は、精製した s F l t - 1 抗体又はその抗原結合断片である。

10

【 0 0 0 9 】

関連する側面では、本発明は、被験者に s F l t - 1 に結合可能な成長因子のレベルを増加させる化合物（たとえばニコチン、テオフィリン、アデノシン、ニフェジピン、ミノキシジル、又は硫酸マグネシウム）を投与することによって、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する方法を提供し、投与は、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するのに十分な時間及び量である。

【 0 0 1 0 】

更に他の関連する側面では、本発明は、被験者に s F l t - 1 核酸配列の少なくとも1部分に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って、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する方法を提供し、投与は、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するのに十分である。1つの態様では、アンチセンス核酸塩基オリゴマーの長さは8～30ヌクレオチドである。

20

【 0 0 1 1 】

他の関連する面では、本発明は、被験者に s F l t - 1 核酸配列の少なくとも1部分を含有する2本鎖RNA (d s RNA) を投与することによって、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する方法を提供し、投与は、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するのに十分である。1つの態様では、2本鎖RNAは、長さ19～25ヌクレオチドの小さな干渉RNA (s i RNA) にプロセッシングされる。

【 0 0 1 2 】

上記側面のさまざまな態様では、候補化合物は、V E G F 1 8 9、V E G F 1 2 1、若しくはV E G F 1 6 5のような全てのアイソフォームを含めた血管内皮成長因子 (V E G F) ; 全てのアイソフォームを含めた胎盤成長因子 (P l G F) ; などの成長因子、又はそれらの断片、及び改変型のV E G F 又はP l G F である。好ましい態様では、候補化合物はs F l t - 1 に結合する抗体である。上記側面の他の態様では、本発明の方法は、被験者に抗高血圧化合物を投与することを更に含む。上記側面の更に他の態様では、被験者は、妊娠したヒト、産後のヒト、又はヒト以外（例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、又はネコ）である。

30

【 0 0 1 3 】

他の側面では、本発明は、そのような治療を必要とする被験者に、V E G F 又はP l G F 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によって、子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する方法を提供する。1つの態様では、組成物はV E G F ポリペプチドを含有する。他の態様では、組成物はP l G F ポリペプチドを含有する。

40

【 0 0 1 4 】

関連する側面では、本発明は、そのような治療を必要とする被験者に、V E G F 又はP l G F 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によって、子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する方法を提供する。1つの態様では、組成物はV E G F 核酸分子を含有する。他の態様では、組成物はP l G F 核酸分子を含有する。

【 0 0 1 5 】

他の関連する側面では、本発明は、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防する方法を提供する。本発明の方法は、被験者に、成長因子がs F l t - 1 ポリペプチドに結

50

合するのを阻害する化合物（例えば化学化合物、ポリペプチド、ペプチド、抗体、またはそれらの断片）を投与する工程を含み、投与は、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するのに十分である。1つの態様では、化合物はs F 1 t - 1に結合し、成長因子の結合をブロックする。

【0016】

上記側面のさまざまな態様では、本発明の方法は、被験者に抗高血圧化合物（例えばアデノシン、ニフェジピン、ミノキシジル、及び硫酸マグネシウム）を投与する工程を更に含む。上記側面の他の態様では、被験者は、妊娠したヒト、産後のヒト、又はヒト以外（例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、又はネコ）である。

【0017】

他の側面では、本発明は、被験者の尿サンプルの遊離のP 1 G Fレベルを測定することを含む、被験者を子癇前症若しくは子癇であるか又は発症する傾向があると診断する方法を特徴とする。この方法は、閾値レベルよりも低い遊離のP 1 G Fの絶対レベルを決定するために用いることができ、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断法（diagnostic）である。妊娠中期の正常な尿P 1 G F濃度は、およそ400 ~ 800 pg / mlである。好ましい態様では、400 pg / mlより低い遊離のP 1 G Fレベル、好ましくは300、200、100、50、又は10 pg / mlより低い遊離のP 1 G Fレベルは、子癇前症若しくは子癇又は又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断法である。この方法は、基準サンプルと比較した、遊離のP 1 G Fの相対レベルを決定するために用いることもでき、正常基準サンプルと比較した、遊離のP 1 G Fレベルの低下（例えば10%、20%、25%、50%、75%、90%、又はそれより高い）は、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断法である。この場合、正常基準サンプルは、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向のない、同一被験者から採取した前サンプルであるか、又は匹敵する被験者（例えば在胎週数が匹敵）から採取したサンプルであり得る）。更なる好ましい態様では、基準サンプルは、基準サンプルから派生した標準、レベル、又は数である。また、基準の標準又はレベルは、少なくとも1つの以下の判断基準によってサンプル被験者に匹敵する正常被験者に由来する値であり得る：胎児の在胎週数、母親の年齢、妊娠前の血圧、妊娠中の血圧、母親のBMI、胎児の体重、子癇前症又は子癇の前診断、及び子癇前症又は子癇の家族歴。好ましい態様では、測定は、E L I S A、好ましくはサンドイッチE L I S A、又は蛍光イムノアッセイなどの免疫学的アッセイによって行われる。

【0018】

好ましい態様では、本方法はまた、（a）尿、血液、羊水、血清、血漿、又は脳脊髄液からなる群より選択される体液である被験者サンプルのs F 1 t - 1、P 1 G F、及びV E G Fのポリペプチドのうちの少なくとも1つのレベルを測定する工程、及び（b）被験者のs F 1 t - 1、P 1 G F、及びV E G Fのうちの少なくとも1つのレベルを、基準サンプルの同一ポリペプチドレベルと比較する工程、を含み、基準サンプルと比較した、被験者サンプルのs F 1 t - 1レベルの増加又はV E G F若しくはP 1 G Fのポリペプチドレベルの低下は、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断指標である。好ましい態様では、s F 1 t - 1、又はs F 1 t - 1及びP 1 G Fは、尿P 1 G Fアッセイによって子癇前症又は子癇を発症する危険性があると同定された被験者の血清サンプル中で測定される。この方法は、上記工程（a）で得たs F 1 t - 1、V E G F、及びP 1 G Fのうちの少なくとも1つのレベル間の関係を測定基準を用いて計算する工程を更に含むことが望ましく、基準サンプルの測定基準に対する被験者サンプルの変化により、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向を診断する。好ましくは、測定基準はP A A I（上記のような）であり、20より大きいP A A I値は子癇前症又は子癇の診断指標である。好ましい態様では、s F 1 t - 1は、遊離の、結合した、又は全量のs F 1 t - 1であり、P 1 G F及びV E G Fは遊離のP 1 G F及び遊離のV E G Fである。

【0019】

他の側面では、本発明は、被験者を子癇前症若しくは子癇であるか又は発症する傾向にあると診断する方法を特徴とし、以下の工程を含む：

- (a) 被験者から尿サンプルを得；
- (b) サンプルを固定された第1のP1GF結合物質を含む固体支持体に、第1のP1GF結合物質がサンプル中に存在する遊離のP1GFに結合するのに十分な時間接触させ；
- (c) 工程(b)の後、固体支持体を第2の標識P1GF結合物質の調製品に、第2の標識P1GF結合物質が第1の固定されたP1GF結合物質に結合した遊離のP1GFに結合するのに十分な時間接触させ；
- (d) 第2の標識P1GF結合物質の、遊離のP1GFに結合した固定されたP1GF結合物質への結合を、P1GF結合物質が固定された位置で観察し；そして
- (e) 工程(d)で観察された結合を、既知濃度のP1GFである基準サンプルを用いて観察された結合と比較する；更に、基準サンプルを用いて観察された結合と比較した、工程(d)で観察された結合の低は、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断指標である。

10

【0020】

他の関連する側面では、本発明は、被験者を子癇前症若しくは子癇であるか又は発症する傾向にあると診断する方法を特徴とすし、以下の工程を含む：

- (a) 被験者から尿サンプルを得；
- (b) 乾燥標識P1GF結合物質とP1GF結合物質に結合する固定された第2の物質を含む固体支持体に、尿サンプルを、標識P1GF結合物質を再水和し、サンプルの遊離のP1GFを標識P1GF結合物質に結合させるのに十分な時間接触させ、ここで、標識P1GF結合物質に結合した遊離のP1GFは、固定された第2の物質に向かって移動することができ（例えば毛細管運動によって）；
- (c) 遊離のP1GF-P1GF結合物質複合体の、固定された第2の物質への結合を、第2の物質が固定された位置で標識の存在を検出することにより観察し；そして
- (d) 工程(c)で観察された結合を、10pg/ml~1ng/mlの既知濃度のP1GFである基準サンプルを用いて観察された結合と比較する。

20

【0021】

上記2つの側面の好ましい態様では、標識は比色標識である（例えば金コロイド）。更なる好ましい態様では、P1GFに結合する物質は、抗体、若しくはその精製断片、又はペプチドである。抗体又はその精製断片は遊離のP1GFに特異的に結合することが望ましい。P1GFに結合する物質は、抗免疫グロブリン抗体若しくはその断片、プロテインA、又はプロテインGであることが望ましい。1つの態様では、基準サンプルは、既知の正常濃度のP1GFサンプルであ、基準サンプルと比較した被験者サンプルの遊離のP1GFの低下は、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断法である。

30

【0022】

他の側面では、本発明は、被験者を子癇前症若しくは子癇であるか又は発症する傾向にあると診断する方法を特徴とし、以下の工程を含む：

- (a) 被験者から尿サンプルを得；
- (b) 検出可能に標識された固定されたP1GF結合物質を有する固体支持体に、サンプルを、標識がP1GFを遊離のP1GFに結合しているときと遊離のP1GFに結合していないときとで区別できるように接触させる。好ましい標識には蛍光標識が含まれる。メンブレンは、被験者から得た尿サンプルに、P1GF結合物質をサンプル中に存在する遊離のP1GFに結合させるのに十分な時間曝される。次に、遊離のP1GFに結合した標識P1GF結合物質を測定する。そのようなアッセイは、P1GFの相対レベルを決定するため（例えば基準サンプル又は標準又は段階からのレベルと比較した）又は上記のようにP1GFの絶対濃度を決定するために用いることができる。結合の測定に好ましいアッセイには蛍光イムノアッセイが含まれる。

40

50

【0023】

他の側面では、本発明は、被験者を子癇前症若しくは子癇であるか又は発症する傾向にあると診断する方法を特徴とし、以下の工程を含む：

- (a) 被験者から尿サンプルを得；
 - (b) 固定された第1のP1GF結合物質を含む固体支持体に、サンプルを、第1のP1GF結合物質をサンプル中に存在する遊離のP1GFに結合させるのに十分な時間接触させ；
 - (c) 工程(b)の後、固体支持体を、酵素とカップリングした第2のP1GF結合物質の調製品に、第2のP1GF結合物質を第1の固定されたP1GF結合物質に結合したP1GFに結合させるのに十分な時間接触させ；そして
 - (d) 工程(c)の酵素の基質の調製品を、酵素が基質を検出可能な基質に変換させるのに十分な時間及び量で加え；
 - (e) 検出可能な基質のレベルを観察し；そして
 - (f) 工程(e)で観察されたレベルを、既知濃度のP1GFである基準サンプルを用いて観察された結合と比較する、
- ここで、基準サンプルと比較した、工程(e)で観察されたレベルの変化は、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断指標である。

10

【0024】

1つの態様では、基準サンプルは既知の正常濃度のP1GFサンプルであり、基準サンプルと比較した、被験者サンプルの遊離のP1GFの低下は、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断法である。

20

【0025】

上記方法の好ましい態様では、基質は分光分析又は化学発光によって視覚的に検出される。更なる好ましい態様では、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、又はアルカリホスファターゼであり、基質はTMB(テトラメチルベンジジン)、Xgal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド)、又は1,2-ジオキセタンである。更なる好ましい態様では、基準サンプルは、正常濃度の精製P1GFを有するサンプルであり、被験者サンプルは、基準サンプルと比較して低下を示す(10%、25%、50%、75%、90%又はそれより大きい)。この方法の好ましい態様では、P1GF結合物質は、精製抗P1GF抗体、若しくはその断片、又はペプチドである。精製抗P1GF抗体、若しくはその断片は、遊離のP1GFに特異的に結合することが望ましい。

30

【0026】

上記診断方法の好ましい態様では、固体支持体は、ディップスティック構造又は側方流動形式に支持されることができるメンブレンであり、それらの例はU.S.P.N.6,660,534に記載されている。更なる好ましい態様では、被験者は、妊娠していないヒト、妊娠したヒト、又は産後のヒトである。上記側面の他の態様では、被験者はヒト以外である(例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、又はネコ)。1つの態様では、被験者は妊娠していないヒトであり、本方法は、子癇前症又は子癇を発症する傾向を診断するために用いられる。他の態様では、被験者は子癇前症の病歴を有するヒトであり(妊娠しているか又は妊娠していない)、本方法は、その後の妊娠において子癇前症又は子癇を発症する傾向を診断するために用いられる。望ましくは、レベルの測定は2回以上の機会に行われ、測定間のレベルの変化は子癇前症又は子癇の診断指標である。

40

【0027】

更なる好ましい態様では、被験者の尿サンプルのP1GFレベルを検出する方法は、sFlt-1、P、GF、又はVEGFの核酸又はポリペプチドのレベルを測定するために用いられる以下に記載の診断法と組み合わせることができる。

【0028】

他の側面では、本発明は、被験者を、子癇前症若しくは子癇であるか、又は発症する傾向にあると診断する方法を提供し、この方法は、被験者サンプルのsFlt-1、VEG

50

F、又はP1GFのポリペプチドレベルを測定することを含む。

【0029】

関連する側面では、本発明は、被験者サンプルのsFlt-1、VEGF、又はP1GFのポリペプチドのうち少なくとも2つのレベルを決定し、sFlt-1、VEGF、又はP1GFのレベル間の関係を、測定基準を用いて計算することによって、被験者を、子癇前症若しくは子癇であるか、又は発症する傾向にあると診断する方法を提供し、基準に対する被験者サンプルの変化により、被験者の癇前症又は子癇を診断する。好ましい態様では、本方法は、肥満度指数(BMI)、胎児の在胎週数(GA)、又は両方を決定し、BMI又はGA又は両方を測定基準に含めることを更に含む。1つの態様では、測定基準は子癇前症抗血管新生指標(PAAI)： $[sFlt-1 / VEGF + P1GF]$ であり、PAAIは、抗血管新生活性の指標として用いられる。1つの態様では、10より大きい、より好ましくは20より大きいPAAIは、子癇前症又は子癇の指標である。他の態様では、sFlt-1、VEGF、又はP1GFのポリペプチドレベルは、ELISAなどの免疫学的アッセイによって決定される。

10

【0030】

上記側面のさまざまな態様では、サンプルは、血清又は尿などの体液である。1つの態様では、2ng/mlより大きいsFlt-1レベルは子癇前症又は子癇の指標である。上記側面の好ましい態様では、測定したsFlt-1ポリペプチドのレベルは、遊離の、結合した、又は全量のsFlt-1ポリペプチドレベルである。更なる態様では、sFlt-1ポリペプチドは、sFlt-1断片、又はsFlt-1の分解若しくは酵素的切断により生ずるポリペプチド副産物も含むことができる。上記側面の他の好ましい態様では、VEGF又はP1GFのレベルは、遊離のVEGF又はP1GFのレベルである。

20

【0031】

他の側面では、本発明は、被験者を、被験者サンプルのsFlt-1、VEGF、又はP1GFの核酸分子レベルを測定し、それを基準サンプルと比較することを含む、子癇前症若しくは子癇であるか、又は発症する傾向にあると診断する方法を提供し、レベルの変化により、被験者の子癇前症若しくは子癇を診断するか、又は、子癇前症若しくは子癇を発症する傾向を診断する。

【0032】

他の側面では、本発明は、被験者のsFlt-1、VEGF、又はP1GF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によって、被験者を、子癇前症若しくは子癇であるか、又は発症する傾向にあると診断する方法を提供し、被験者の遺伝子産物のレベル又は生物活性を変える被験者の核酸配列の変化により、子癇前症若しくは子癇、又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向を有する被験者を診断する。1つの態様では、変化は核酸配列の多型である。

30

【0033】

上記側面のさまざまな態様では、サンプルは、sFlt-1、VEGF、又はP1GF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、又は脳脊髄液)。更なる態様では、サンプルは組織又は細胞である。非限定的な例には、胎盤組織又は胎盤細胞、内皮細胞、リンパ球、及び単球が含まれる。上記側面の他の態様では、被験者は、妊娠していないヒト、妊娠しているヒト、又は産後のヒトである。上記側面の他の態様では、被験者はヒト以外である(例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、又はネコ)。1つの態様では、被験者は妊娠していないヒトであり、本方法は、子癇前症又は子癇を発症する傾向を診断するために用いられる。上記側面の他の態様では、測定したレベルのうちの少なくとも1つは、(遊離の、結合した、又は全量の)sFlt-1のレベルである。更なる態様では、測定したsFlt-1レベルには、sFlt-1の分解産物又は酵素的に切断された産物のレベルが含まれる。上記側面の他の態様では、VEGFレベルが測定された場合、次にsFlt-1又はP1GFのレベルも測定される。更なる態様では、BMI又はGA又は両方も測定される。上記側面のさまざまな態様では、基準に対するsFlt-1の核酸又はポリペプチドのレベルの増加は、子癇前症又は子癇の診

40

50

断指標である。上記側面の他の態様では、基準に対する遊離の V E G F ポリペプチド又は V E G F 核酸のレベルの低下は、子癇前症又は子癇の診断指標である。上記側面の他の態様では、基準に対する遊離の P L G F ポリペプチド又は P L G F 核酸のレベルの低下は子癇前症又は子癇の診断指標である。

【 0 0 3 4 】

上記側面の更なる態様では、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は子癇前症又は子癇の診断指標である。1 つの好ましい態様では、s F l t - 1 レベルは、1 回目の測定から次の測定までに増加する。他の好ましい態様では、V E G F 又は P L G F のレベルは、1 回目の測定から次の測定までに低下する。

【 0 0 3 5 】

関連する側面では、本発明は、s F l t - 1、V E G F、若しくは P L G F のポリペプチド、又はそれらの組み合わせの検出に有用な成分を含む、被験者の子癇前症又は子癇を診断するためのキットを提供する。1 つの態様では、この成分は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイ、及び比色アッセイから成る群より選択されるアッセイである。上記側面の他の態様では、キットは、妊娠しているか又は妊娠していない被験者の、子癇前症又は子癇を発症する傾向を診断する。上記側面の好ましい態様では、キットは、V E G F、s F l t - 1、又は P L G F を検出する。上記側面の他の好ましい態様では、キットが V E G F を検出する場合、次に s F l t - 1 又は P L G F も検出される。更なる好ましい態様では、キットは、V E G F、s F l t - 1、及び P L G F を検出し、サンプルの P A A I を決定するために使用される。

【 0 0 3 6 】

他の側面では、本発明は、s F l t - 1、V E G F、及び P L G F の核酸分子、又はそれらに相補的な配列、又はそれらの組み合わせから成る群より選択される核酸配列又はその断片を含む、被験者の子癇前症又は子癇を診断するための診断キットを提供する。好ましい態様では、キットは、s F l t - 1、V E G F、又は P L G F の核酸分子を検出するための少なくとも 2 つのプロープを含む。

【 0 0 3 7 】

また、本発明は、被験者の子癇前症若しくは子癇、又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向を診断するための、尿サンプル中の遊離の P L G F を検出するための P L G F 結合物質及び使用説明書を含む、被験者の子癇前症又は子癇を診断するためのキットを提供する。このキットは、以下から選択されるアッセイに有用な成分を含むこともできる：免疫学的アッセイ（例えば E L I S A）、酵素的アッセイ、又は比色アッセイ。望ましくは、キットは、上記診断方法の実施に必要な成分を含む。例えば、キットはメンブランを含むことが望ましく、P L G F 結合物質又は P L G F 結合物質に結合する物質はメンブランに固定される。メンブランはディップスティック構造上に支持されることができ、この場合、ディップスティック構造をサンプル中に置くことによってサンプルがメンブラン上に置かれる。又はメンブランは側方流動カセット中に支持されることができ、この場合、サンプルはカセットの開口によってメンブラン上に置かれる。

【 0 0 3 8 】

上記診断キットの好ましい態様では、診断キットは、キット成分の意図する使用のためのラベル又は使用説明書、及び検量線を定めるために使用される基準サンプル又は精製タンパク質を含む。1 つの態様では、診断キットは、被験者の子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断に使用するためにラベル表示されているか又は又は使用説明書を含む。他の態様では、診断キットは、心血管病態又は心血管病態を発症する傾向の診断に使用するためにラベル表示されているか又は使用説明書を含む。更に他の態様では、診断キットは、治療のモニタリング又は治療用量の決定に使用するためにラベルされているか又は使用説明書を含む。好ましい態様では、診断キットは、被験者サンプルの P A A I を決定し、この P A A I を基準サンプル値と比較するためにキットを使用するためにラベル又は使用説明書を含む。基準サンプル値はキットの意図する使用に依存することが理解されるであろう。例えば、サンプルは、正常な P A A I 基準値又は正常な

10

20

30

40

50

P L G F 値と比較することができ、P A A I の増加又は P L G F 値の低下は、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の指標である。他の例では、治療のモニタリングに用いられるキットは、子癇前症又は子癇の指標である基準の P A A I 値又は P L G F 値を有することができ、基準サンプルに対する被験者サンプルの P A A I 値の低下又は P L G F 値の増加は、治療用化合物の治療の有効性又は有効用量を示すために用いることができる。

【 0 0 3 9 】

本明細書に記載の方法及びキットは、以前に妊娠していた女性又は子癇前症の病歴を有する女性において、子癇前症又は子癇を診断するため又はその後の子癇前症を予測するために用いることができる。

10

【 0 0 4 0 】

本明細書に記載の診断法は、被験者の子癇前症又は子癇をモニターするために用いることもできる。好ましい態様では、診断法は、療法のあいだ被験者をモニターするため又は有効な治療用量を決定するためにも用いられる。1つの態様では、投与療法前の値に対する、療法のあいだ又は後に測定された s F 1 t - 1 のポリペプチド又は核酸のレベルの低下は、子癇前症又は子癇の改善を示す。好ましい態様では、2 n g / m l より小さい s F 1 t - 1 ポリペプチドレベルは、子癇前症又は子癇の改善を示す。他の態様では、治療用化合物は、s F 1 t - 1 ポリペプチドレベルが 2 n g / m l より小さくなるような用量で投与される。他の態様では、投与療法前の値に対する、療法のあいだ又は後に測定された V E G F 若しくは P L G F のポリペプチド又は核酸のレベルの増加は、子癇前症又は子癇の改善を示す。更に他の態様では、被験者の P A A I 値の低下は、子癇前症又は子癇の改善を示す。好ましい態様では、P A A I は 2 0 より小さく、より好ましくは 1 0 より小さい。P A A I の低下は、治療用化合物の有効用量を示すこともできる。1つの例では、治療用化合物は、P A A I が 2 0 より小さくなるような用量で投与される。他の例では、治療用化合物は、P A A I が 1 0 より小さくなるような用量で投与される。好ましい態様では、s F 1 t - 1、P L G F、又は V E G F のレベルの測定は 2 回以上の機会に行われ、測定間のレベルの変化は、療法をモニターするため又は化合物の治療用量を決定するために用いられる。

20

【 0 0 4 1 】

尿サンプルの遊離の P L G F の測定を含む上記診断法は、療法のあいだ被験者をモニターするため又は有効な治療用量を決定するために用いることができる。例えば、上記のような P L G F レベルについての尿検査は、療法のあいだ被験者をモニターするために定期的に行なうことができる（例えば、毎月、毎週、隔日、毎日、又は毎時）。1つの態様では、治療用化合物は、P L G F 濃度が 2 0 0 p g / m l、3 0 0 p g / m l、4 0 0 p g / m l、5 0 0 p g / m l、6 0 0 p g / m l、7 0 0 p g / m l、又は 8 0 0 p g / m l より大きくなるような用量で投与される。P L G F を用いたアッセイをモニターするため、基準サンプルは子癇前を示す P L G F 濃度（4 0 0 p g / m l より小さい）であり、基準サンプルと比較した P L G F 濃度の増加は、治療用化合物の有効用量を示すであろう。

30

【 0 0 4 2 】

関連する側面では、本発明は、被験者サンプルの s F 1 t - 1、V E G F、及び P L G F のポリペプチドのうちの少なくとも1つのレベルを基準サンプルと比較するための成分を含む、被験者を子癇前症若しくは子癇であるか又は発症する傾向があると診断するための装置を特徴とし、s F 1 t - 1、V E G F、及び P L G F のうちの少なくとも1つのレベルの変化により、被験者の子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向を診断する。好ましい態様では、装置は、s F 1 t - 1、V E G F、及び P L G F のポリペプチドのうちの少なくとも2つのレベルを比較するために測定基準を用いるための成分を含む。

40

【 0 0 4 3 】

関連する側面では、本発明は、被験者サンプルの s F 1 t - 1、V E G F、及び P L G

50

Fの核酸分子のうちの少なくとも1つのレベルを基準サンプルと比較するための成分を含む、被験者を子癩前症若しくは子癩であるか又は発症する傾向があると診断するための装置を特徴とし、sFlt-1、VEGF、及びPLGFのうちの少なくとも1つのレベルの変化により、被験者の子癩前症若しくは子癩又は子癩前症若しくは子癩を発症する傾向を診断する。好ましい態様では、装置は、sFlt-1、VEGF、及びPLGFの核酸分子のうちの少なくとも2つのレベルを比較するために測定基準を用いるための成分を含む。

【0044】

他の側面では、本発明は、sFlt-1、VEGF、又はPLGFの核酸分子を発現する細胞を、候補化合物と接触させ、候補化合物と接触させた細胞の核酸分子発現レベルを、候補化合物と接触させていない対照細胞の発現レベルと比較することによって、子癩前症又は子癩を改善させる化合物を同定する方法を提供し、sFlt-1、VEGF、又はPLGFの核酸分子の発現の変化は、候補化合物を子癩前症又は子癩を改善させる化合物として同定する。

10

【0045】

1つの態様では、変化はsFlt-1レベルの低下である。他の態様では、変化はVEGF又はPLGFのレベルの増加である。他の態様では、変化は転写又は翻訳における変化である。他の態様では、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又はsFlt-1の発現を低下させる。

20

【0046】

他の側面では、本発明は、医薬的に許容可能な担体中に製剤化された、VEGF若しくはPLGFのポリペプチド又はその部分を含む医薬組成物を提供する。

関連する側面では、本発明は、医薬的に許容可能な担体中に製剤化された、PLGF核酸分子又はその部分を含む医薬組成物を提供する。1つの態様では、本組成物は、VEGF核酸分子、又はその部分を更に含有する。

【0047】

他の側面では、本発明は、sFlt-1に特異的に結合する精製抗体又はその抗原結合断片を含む組成物を提供する。1つの好ましい態様では、抗体は、成長因子によるsFlt-1への結合を妨げる。他の態様では、抗体はモノクローナル抗体である。他の好ましい態様では、抗体又はその抗原結合断片は、ヒト抗体又はヒト化抗体である。他の態様では、抗体はFc部分を欠失している。更に他の態様では、抗体は、F(ab')₂構造、Fab構造、又はFv構造である。他の態様では、抗体又はその抗原結合断片は医薬的に許容可能な担体中に存在する。

30

【0048】

他の側面では、本発明は、sFlt-1、VEGF、又はPLGFのポリペプチドを発現する細胞を候補化合物と接触させ、候補化合物を接触させた細胞のポリペプチド発現レベルを、候補化合物を接触させていない対照細胞のポリペプチド発現レベルと比較することを含む、子癩前症又は子癩を改善させる化合物を同定する方法を提供し、sFlt-1、VEGF、又はPLGFのポリペプチドの発現の変化により、候補化合物を子癩前症又は子癩を改善させる化合物として同定する。1つの態様では、発現の変化は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイ、又は免疫アッセイを用いてアッセイされる。1つの態様では、発現の変化はsFlt-1レベルの低下である。他の態様では、発現の変化は、VEGF又はPLGFのレベルの増加である。

40

【0049】

他の側面では、本発明は、sFlt-1、VEGF、又はPLGFのポリペプチドを発現する細胞を候補化合物と接触させ、候補化合物を接触させた細胞のポリペプチドの生物活性を、候補化合物を接触させていない対照細胞の生物活性レベルと比較することを含む、子癩前症又は子癩を改善させる化合物を同定する方法を提供し、sFlt-1、VEGF、又はPLGFのポリペプチドの生物活性の増加により、候補化合物を子癩前症又は子

50

瘍を改善させる化合物として同定する。1つの態様では、生物活性の増加は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイ、又はイムノアッセイを用いてアッセイされる。1つの態様では、発現の変化はs F l t - 1活性の低下である。他の態様では、発現の変化は、V E G F又はP l G Fの活性の増加である。

【 0 0 5 0 】

他の側面では、本発明は、候補化合物存在下でs F l t - 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む、子癇前症又は子癇を改善させる化合物を同定する方法を提供し、候補化合物非存在下のs F l t - 1ポリペプチドと成長因子との結合に対する結合の低下により、候補化合物を子癇前症又は子癇を改善させる化合物として同定する。1つの態様では、成長因子はV E G Fである。他の態様では、成長因子はP l G Fである。

10

【 0 0 5 1 】

他の側面では、本発明は、s F l t - 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又はその断片を同定する方法を提供する。この方法は、候補ポリペプチド存在下でs F l t - 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のs F l t - 1ポリペプチドと成長因子との結合に対する結合の低下により、候補ポリペプチドをs F l t - 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つの態様では、成長因子はV E G Fである。他の態様では、成長因子はP l G Fである。

【 0 0 5 2 】

他の側面では、本発明は、s F l t - 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、子癇前症又は子癇を改善させる化合物を同定する方法を提供し、s F l t - 1ポリペプチドに結合する化合物は子癇前症又は子癇を改善させる。

20

【 0 0 5 3 】

関連する側面では、本発明は、先の側面にしたがって同定される化合物を提供し、化合物は、s F l t - 1ポリペプチドに特異的に結合し、s F l t - 1ポリペプチドがV E G F又はP l G Fに結合するのを妨げるポリペプチドである。1つの好ましい態様では、ポリペプチドは抗体である。他の好ましい態様では、ポリペプチドは、s F l t - 1、V E G F、又はP l G Fの断片である。

【 0 0 5 4 】

上記側面の好ましい態様では、子癇前症又は子癇を改善させる化合物は、s F l t - 1の発現レベル又は生物活性を低下させる。上記側面の好ましい態様では、子癇前症又は子癇を改善させる化合物は、V E G F若しくはP l G Fの発現レベル又は生物活性を増加させる。

30

【 0 0 5 5 】

更に他の側面では、本発明は、被験者を心血管病態であるか又は発症する傾向があると診断する方法を特徴とする。この方法は、被験者サンプルのs F l t - 1ポリペプチドレベルを測定し、それを基準サンプルと比較することを含み、被験者サンプルレベルの変化により、被験者の心血管病態又は心血管病態を発症する傾向を診断する。好ましい態様では、測定は、E L I S Aなどの免疫学的アッセイにより行われる。

【 0 0 5 6 】

関連する側面では、本発明は、被験者を心血管病態であるか又は発症する傾向にあると診断する方法を特徴とする。この方法は、被験者サンプルのs F l t - 1核酸分子レベルを測定し、それを基準サンプルと比較することを含み、レベルの変化により、被験者の心血管病態又は心血管病態を発症する傾向を診断する。

40

【 0 0 5 7 】

上記側面の好ましい態様では、被験者は妊娠しているか又は妊娠していた女性（雌）である。更なる好ましい態様では、女性（雌）被験者は、子癇前症又は子癇の病歴がある。更なる好ましい態様では、基準サンプルは、子癇前症又は子癇の病歴のない女性（雌）から採取される。

【 0 0 5 8 】

50

関連する側面では、本発明は、被験者を心血管病態であるか又は発症する傾向にあると診断する方法を特徴とする。この方法は、被験者サンプルの s F 1 t - 1、V E G F、又は P 1 G F 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、被験者の遺伝子産物の発現レベル又は生物活性を変える変化である被験者の核酸配列の変化により、被験者の心血管病態又は心血管病態を発症する傾向を診断する。

【 0 0 5 9 】

上記側面の好ましい態様では、サンプルは、s F 1 t - 1 を正常に検出できる細胞、組織、又は体液である。好ましいサンプルには、尿、羊水、血清、血漿、脳脊髄液、及び胎盤の細胞又は組織が含まれる。上記側面の好ましい態様では、心血管病態は、粥状動脈硬化、一次性心筋梗塞、二次性心筋梗塞、狭心症、うっ血性心不全、突然心臓死、脳梗塞、再狭窄、失神、虚血、再灌流障害、血管閉塞、頸動脈閉塞性疾患、及び一過性脳虚血発作から成る群より選択される。

10

【 0 0 6 0 】

本発明の目的のために、以下の略語及び用語を定義する。

「変化」とは、上記のような標準技術の公知の方法で検出されるような遺伝子又はポリペプチドの発現レベルが変わることを意味する（増加又は低下）。本明細書において、変化には、発現レベルの 10% 変化、好ましくは 25% 変化、より好ましくは 40% 変化、最も好ましくは 50% 以上の変化が含まれる。「変化」は、本発明のポリペプチド（例えば s F 1 t - 1、V E G F、又は P 1 G F）の生物活性の変化（増加又は低下）を表すこともできる。P 1 G F 又は V E G F の生物活性の例としては、免疫アッセイ、リガンド結合アッセイ、又はスキャッチャードプロット解析によって測定されるような受容体に対する結合、及び B r d U 標識、細胞計数実験、又は ³ H - チミジン取り込みなどの DNA 合成の定量によって測定されるような細胞増殖又は遊走の誘発が挙げられる。s F 1 t - 1 の生物活性の例としては、免疫アッセイ、リガンド結合アッセイ、又はスキャッチャードプロット解析によって測定されるような P 1 G F 及び V E G F への結合が挙げられる。それぞれのポリペプチドの生物活性に関するアッセイの更なる例が本明細書に記載される。本明細書において、変化には、生物活性の 10% 変化、好ましくは 25% 変化、より好ましくは 40% 変化、最も好ましくは 50% 以上の変化が含まれる。

20

【 0 0 6 1 】

「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、s F 1 t - 1 遺伝子のコード鎖又は m R N A に相補的な核酸塩基オリゴマーを意味する。「核酸塩基オリゴマー」とは、連結基によって連結された、少なくとも 8 核酸塩基、好ましくは少なくとも 12、最も好ましくは少なくとも 16 塩の鎖を含む化合物を意味する。この定義に含まれるのは、修飾及び未修飾の、天然及び非天然オリゴヌクレオチド、並びにタンパク質核酸、ロケット核酸、及びアラビノ核酸などのオリゴヌクレオチド模倣体である。多数の核酸塩基及び連結基は、本明細書に援用される米国特許出願第 2 0 0 3 0 1 1 4 4 1 2 号及び第 2 0 0 3 0 1 1 4 4 0 7 号に記載のものを含めた本発明の核酸塩基オリゴマーに使用することができる。核酸塩基オリゴマーは、翻訳開始及び終止部位を標的とすることもできる。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ことが好ましい。アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、s F 1 t - 1 の m R N A 又は D N A に相補的な、少なくとも 40、60、85、120、又はそれより長い連続したヌクレオチドを含有することもでき、全長の m R N A 又は遺伝子と同様であってもよい。

30

40

【 0 0 6 2 】

「肥満度指数」とは、身長と体重の測定値を用いて得られる数を意味し、体重が健常範囲内にあるかどうかの一般的指標を与える。肥満度指数を決定するために一般に用いられる式は、個人の身長 (m) の 2 乗で割った個人の体重 (k g)、即ち $\text{体重 (k g)} / (\text{身長 (m)})^2$ である。

【 0 0 6 3 】

「心血管病態」とは、心血管システムのイベント又は障害を意味する。心血管病態の非限定的な例には、粥状動脈硬化、一次性心筋梗塞、二次性心筋梗塞、狭心症（安定及び不

50

安定狭心症を含む)、うっ血性心不全、突然心臓死、脳梗塞、再狭窄、失神、虚血、再灌流障害、血管閉塞、頸動脈閉塞性疾患、及び一過性脳虚血発作などが含まれる。

【0064】

「化合物」とは、小分子化学化合物、抗体、核酸分子、若しくはポリペプチド、又はそれらの断片を意味する。

「キメラ抗体」とは、他のタンパク質の少なくとも一部(典型的には免疫グロブリン定常ドメイン)に連結し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する。

【0065】

「2本鎖RNA(dsRNA)」とは、センス鎖及びアンチセンス鎖で構成されるリボ核酸分子を意味する。dsRNAsは典型的にはRNA干渉を介在するために用いられる。

【0066】

「発現」とは、標準技術の公知の方法で遺伝子又はポリペプチドを検出することを意味する。例えば、ポリペプチド発現はウエスタンブロッティングで検出され、DNA発現はサザンブロッティング又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で検出され、RNA発現はノーザンブロッティング、PCR、又はRNaseプロテクションアッセイで検出されることが多い。

【0067】

「断片」とは、ポリペプチド又は核酸分子の一部を意味する。この部分は、基準核酸分子又はポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%を含有することが好ましい。断片は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100、200、300、400、500、600、700、800、900、又は1000ヌクレオチド又はアミノ酸を含有することができる。

【0068】

「在胎週数」とは、胎児の年齢の言及を意味し、母親の最終月経期間の初日から計算され、通常週で表される。

「子癇前症又は子癇の病歴」とは、被験者自身又は親類の子癇前症若しくは子癇又は妊娠高血圧の以前の診断を意味する。

【0069】

「相同な」とは、比較配列の長さにわたり、公知の遺伝子又はタンパク質の配列に対して少なくとも30%の相同性、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又はタンパク質の配列を意味する。また、「相同な」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ができる。ポリペプチドでは、比較配列の長さは一般に少なくとも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。核酸では、比較配列の長さは一般に少なくとも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」は、抗体を作製するために用いられるエピトープと、抗体が指向するタンパク質又はその断片とのあいだの実質的類似性を表すこともできる。この場合、相同性は、問題のタンパク質を特異的に認識できる抗体の産生を引き出すのに十分な類似性を表す。

【0070】

「ヒト化抗体」とは、所定の抗原に結合可能な免疫グロブリンアミノ酸配列変異体又はその断片を意味する。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、又は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するフレームワーク領域(FR)と、実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する相補性決定領域(CDR)(「インポート」配列)とを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 1 】

一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外の供給源から導入された1以上のアミノ酸残基を有する。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv)の全てを実質的に含むであろう。ここで、全て又は実質的に全てのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、全ての又は実質的に全てのFR領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部分を含むことが最適である。「相補正決定領域(CDR)」とは、免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖のそれぞれの可変領域中の3つの超可変配列を意味する。「フレームワーク領域(FR)」とは、免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の3つの超可変配列(CDR)の両側に位置するアミノ酸配列を意味する。

10

【 0 0 7 2 】

ヒト化抗体のFR及びCDR領域は、正確に親配列に相当する必要はない。例えば、インポートCDR又はコンセンサスFRは、その部位のCDR又はFRの残基がコンセンサス抗体にもインポート抗体にも相当しないように、少なくとも1残基の置換、挿入、又は欠失によって突然変異誘発させることができる。しかしながら、そのような突然変異は、広範囲に及ばないであろう。通常、ヒト化抗体の残基の少なくとも75%、好ましくは90%、最も好ましくは少なくとも95%が、親のFR及びCDR配列のものに相当するであろう。

【 0 0 7 3 】

「ハイブリダイズ」とは、さまざまなストリンジェンシーの条件下で、相補的なポリヌクレオチド配列間又はその部分間で2本鎖分子を形成するための対を意味する。(例えば、Wahl及び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及び75mMクエン酸三ナトリウムより低く、好ましくは約500mM NaCl及び50mMクエン酸三ナトリウムより低く、最も好ましくは約250mM NaCl及び25mMクエン酸三ナトリウムよりも低いであろう。低ストリンジェンシーな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の非存在下で得ることができるが、高ストリンジェンシーな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%ホルムアミドの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℃の温度を含むであろう。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、及びキャリアーDNAの有無などのさまざまな更なるパラメータは、当該技術分野に熟練した者に周知である。さまざま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さまざまな条件を組み合わせることによって達成される。好ましい態様では、ハイブリダイゼーションは、750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム、及び1% SDS中で、30℃で起こるのである。より好ましい態様では、ハイブリダイゼーションは、500mM NaCl、50mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、35%ホルムアミド、及び100µg/ml変性サケ精子DNA(ssDNA)中、37℃で起こるのである。最も好ましい態様では、ハイブリダイゼーションは、250mM NaCl、25mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、50%ホルムアミド、及び200µg/ml ssDNA中、42℃で起こるのである。これらの条件の有用な変形は、当該技術分野に熟練した者に容易に明らかになるであろう。

20

30

40

【 0 0 7 4 】

ほとんどの応用では、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がさまざまであろう。洗浄のストリンジェンシー条件は、塩濃度及び温度によって定義することができる。上記のように、洗浄のストリンジェンシーは、塩濃度を下げるか温度を上げることによって強めることができる。例えば、洗浄工程のストリンジェントな塩濃度

50

は、好ましくは約30 mM NaCl及び3 mMクエン酸三ナトリウムよりも低く、最も好ましくは約15 mM NaCl及び1.5 mMクエン酸三ナトリウムよりも低いであろう。洗浄工程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℃の温度を含むであろう。好ましい態様では、洗浄工程は、30 mM NaCl、3 mMクエン酸三ナトリウム、及び0.1% SDS中、25℃で起こるのである。より好ましい態様では、洗浄工程は、15 mM NaCl、1.5 mMクエン酸三ナトリウム、及び0.1% SDS中、42℃で起こるのである。最も好ましい態様では、洗浄工程は、15 mM NaCl、1.5 mMクエン酸三ナトリウム、及び0.1% SDS中、68℃で起こるのである。これらの条件の更なる変形は、当該技術分野に熟練した者に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該技術分野に熟練した者には周知であり、例えば、Benton及びDavis (Science 196:180, 1977); Grunstein及びHogness (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961, 1975); Ausubelら (分子生物学の最新プロトコール、Wiley Interscience、ニューヨーク、2001); Berger及びKimmel (分子クローニング技術の手引き、1987、アカデミック出版、ニューヨーク); 並びに Sambrookら、分子クローニング: 実験室マニュアル、コールドスプリングハーバー研究所出版、ニューヨーク、に記載されている。

10

【0075】

「子宮内胎児発育遅延 (IUGR)」とは、胎児の在胎週数から予測される胎児の体重の10%よりも少ない出生体重を生ずる症候群を意味する。低出生体重に関する最近の世界保険機構の基準は、2,500 g (5ポンド又は8オンス)よりも少ない体重、又は米国の人種、出産経歴、及び乳児の性別による在胎週数に対する出生体重表に照らして在胎週数の10パーセントよりも少ない体重である (Zhang及びBowes, Obstet. Gynecol. 86:200-208, 1995)。これらの低出生体重児は、「在胎週数に比して小さい (SGA)」ともいう。子癩前症は、IUGR又はSGAに関連することが知られている病態である。

20

【0076】

「測定基準」とは、尺度を意味する。測定基準は、例えば目的のポリペプチド又は核酸分子のレベルを比較するために用いることができる。例示的測定基準には、限定されるものではないが、比などの数式又はアルゴリズムが含まれる。使用すべき測定基準は、子癩前症又は子癩を有する被験者と正常対照被験者とのあいだのsFlt-1、VEGF、又はPlGFのレベルを最も区別するものである。使用する測定基準に応じて、子癩又は子癩前症の診断指標は、(例えば子癩前症でも子癩でもない対照被験者からの) 基準値よりも顕著に高いか又は低いかもしれない。

30

【0077】

sFlt-1レベルは、遊離の、結合した (即ち成長因子に結合した)、又は全量の (結合+遊離) sFlt-1の量を測定することによって決定する。VEGF又はPlGFのレベルは、遊離のPlGF又は遊離のVEGF (即ちsFlt-1に結合していない) の量を測定することによって決定する。1つの例示的測定基準は、 $[sFlt-1 / (VEGF + PlGF)]$ であり、子癩前症抗血管新生指標 (PAAI) ともいう。

40

【0078】

「機能可能に連結された」とは、適切な分子 (例えば転写アクチベータータンパク質) が調節配列に結合したとき遺伝子発現を可能にするような方法で遺伝子と調節配列が連結されることを意味する。

【0079】

「医薬的に許容可能な担体」とは、ともに投与される化合物の治療特性を保持しながら、処置される哺乳動物にとって生理的に許容可能な担体を意味する。1つの例示的な医薬的に許容可能な担体物質は生理食塩水である。他の生理的に許容可能な担体及びその製剤は当該技術分野に熟練した者に公知であり、例えばレミントンの薬学 (第20版)、A.

50

Gennaro編、2000、Lippincott、Williams & Wilkins、フィラデルフィア、ペンシルバニア州に記載されている。

【0080】

「胎盤成長因子(PLGF)」とは、GenBank受託番号P49763によって定義されたタンパク質と相同性があり、PLGF生物活性を有する哺乳動物成長因子を意味する。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、選択的スプライシング機構を介して2つの異なるアイソフォームで見出される。PLGFは胎盤の細胞栄養芽層及びシンシチウム栄養芽層によって発現され、PLGF生物活性には内皮細胞、特に栄養膜細胞の増殖、遊走、及び活性化の誘導が含まれる。

【0081】

「多型」とは、病態を発症する傾向の指標である、sFlt-1、PLGF、又はVEGFの核酸分子内の遺伝的変異、突然変異、欠失又は付加を意味する。そのような多型は当業者に公知であり、Parryら(Eur. J. Immunogenet. 26:321-3, 1999)に記載されている。多型は、sFlt-1遺伝子のプロモーター配列、オープンリーディングフレーム、イントロン配列、又は3'非翻訳領域に存在することができる。

【0082】

「子癇前症」とは、タンパク尿若しくは浮腫、または両方を伴う高血圧、腎系球体不全、脳浮腫、肝性浮腫、又は妊娠若しくは最近の妊娠の影響による血液凝固異常を特徴とする多臓器障害を意味する。子癇前症は通常妊娠20週後に発症する。子癇前症は、通常、以下の症状のいくつかの組み合わせとして定義される：(1)妊娠20週後の収縮期血圧(BP) > 140 mmHg及び拡張期BP > 90 mmHg(通常4~168時間あけて2回測定する)、(2)新たに発症したタンパク尿症(尿検査で1+、24時間畜尿中のタンパク質が > 300 mg、又はタンパク質/クレアチニン比 > 0.3の無作為尿サンプルが1つ)、及び(3)産後12週までの高血圧及びタンパク尿症の解消。重度子癇前症は、通常、(1)拡張期BP > 110 mmHg(通常4~168時間あけて2回測定する)、又は(2)24時間畜尿中のタンパク質が3.5 g以上の測定値若しくは尿検査でタンパク質が少なくとも3+の2つの無作為尿標本によって特徴付けられるタンパク尿症、として定義される。子癇前症では、高血圧及びタンパク尿症は、通常、互いに7日以内に発症する。重度子癇前症では、重度高血圧、重度タンパク尿症、及びHELLP症候群(溶血、肝酵素の上昇、血小板低下)、又は子癇は、一度に同時に発症するか、たった1つの症状が起こり得る。時折、重度子癇前症は発作を発症させる得る。この重度型の症状を「子癇」という。子癇には、いくつかの臓器若しくは組織の機能不全又は損傷、例えば肝臓(例えば肝細胞障害、門脈周囲の壊死)及び中枢神経系(例えば脳浮腫及び脳出血)などを含めることもできる。発作の病因は、脳浮腫及び腎微小血管の局所痙攣の発症に対して2次性であると考えられる。

【0083】

「子癇前症抗血管形成指標(PAAI)」とは、抗血管新生活性の指標として用いられるsFlt-1/VEGF+PLGFの比を意味する。10より大きいPAAI、より好ましくは20より大きいPAAIは、子癇前症の指標又は子癇前症の危険性とみなされる。

【0084】

「タンパク質」又は「ポリペプチド」又は「ポリペプチド断片」とは、翻訳後修飾(例えばグリコシル化又はリン酸化)にかかわりなく、天然ポリペプチド若しくはペプチドの全部若しくは部分で構成されているか、又は非天然ポリペプチド若しくはペプチドで構成されている、2より多いアミノ酸の鎖を意味する。

【0085】

「低下又は阻害する」とは、上記アッセイによって検出されたタンパク質又は核酸のレベル(「発現」を参照されたい)の、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%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。タンパク質又

10

20

30

40

50

は核酸のレベルを低下又は阻害するためのアンチセンス核酸塩基オリゴマー又はRNA干渉の使用に関する態様の場合、%低下又は阻害は、アンチセンス核酸塩基オリゴマー又はdsRNAで処置したサンプルのレベルを、処置していないサンプルのレベルと比較することによって決定される。

【0086】

「基準サンプル」とは、試験サンプルの時間の前の被験者、子癇前症も子癇も有していない妊娠被験者、妊娠しているがサンプルは妊娠初期に採取した被験者（例えば妊娠第一期若しくは第二期又は又は子癇前症若しくは子癇の検出前）、妊娠しているが子癇前症も子癇も有しておらず子癇前症又は子癇の病歴もない被験者、あるいは妊娠している被験者から採取したサンプルを意味する。基準サンプルは、子癇前症又は子癇の診断法ではなく、正常濃度であることが知られている濃度の精製ポリペプチド（例えばPLGF、VEGF、又はsFlt-1）であることもできる。例えば、正常妊娠中の尿PLGF濃度は400~800pg/mlの範囲であるが、妊娠中期に活性な子癇前症を有する場合は200pg/mlより低い範囲であり得る。400pg/ml又は200pg/mlよりも低い尿PLGFレベルは、子癇前症又は子癇前症を発症する傾向の指標である。「基準サンプル」は、基準標準又はレベルであることもできる。「基準標準又はレベル」とは、基準サンプルに由来する値又は数を意味する。基準標準又はレベルは、以下の基準のうちの少なくとも1つによってサンプル被験者に匹敵する正常被験者に由来する値又は数であることもできる：胎児の在胎週数、母体年齢、妊娠前の母体血圧、妊娠中の母体血圧、母親のBMI、胎児の体重、子癇前症又は子癇の前診断、及び子癇前症又は子癇の病歴。基準サンプル中の具体的ポリペプチドの値に基づいて決定される基準値を用いることもできる。

【0087】

「小さな干渉RNA (siRNA)」とは、分解されるべき標的遺伝子又はmRNAを同定するために用いられる、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分子を意味する。19~25の範囲のヌクレオチドが最も好ましいサイズのsiRNAである。siRNAには、siRNA 2本鎖の両方の鎖が1本のRNA分子内に含まれている短いヘアピンRNAを含めることもできる。siRNAには、あらゆる形態のdsRNA（より大きなdsRNAがタンパク質分解により切断された産物、部分精製されたRNA、実質的に純粋なRNA、合成RNA、組換えにより産生されたRNA）、並びに1以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、及び/又は改変によって天然RNAとは異なる改変RNAが含まれる。そのような改変には、例えば21~23ヌクレオチドRNAの末端又は内部への（RNAの1以上のヌクレオチドに）非ヌクレオチド物質の付加を含めることができる。好ましい態様では、RNA分子は3'ヒドロキシル基を含有する。本発明のRNA分子のヌクレオチドは、非天然ヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含めた非標準的ヌクレオチドを含むこともできる。そのような改変RNAの全てを総称してRNAアナログという。本発明のsiRNAは、RNA干渉 (RNAi) を介在する能力を有する天然RNAに十分類似することのみが必要である。本明細書において、RNAiとは、小さな干渉RNA又はdsRNAの細胞又は生物への導入を介した、特定mRNA分子のATP依存性の標的切断及び分解を意味する。本明細書において、「RNAiを介在する」とは、どのRNAが分解されるか区別又は同定する能力を意味する。

【0088】

「可溶性Flt-1 (sFlt-1)」（sVEGF-R1としても知られている）とは、GenBank受託番号U01134によって定義されるタンパク質と相同であり、sFlt-1生物活性を有する可溶性Flt-1受容体を意味する。sFlt-1ポリペプチドの生物活性は、標準法を用いて、例えばVEGFへのsFlt-1の結合をアッセイすることによって測定することができる。sFlt-1は、Flt-1受容体の膜貫通ドメイン及び細胞内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及びPLGFに結合することができるが、増殖又は血管新生を誘導することができず、したがって、Flt-1受容体及びKDR受容体とは機能的に異なっている。

sFlt-1は初めにヒト臍帯内皮細胞から精製され、後に栄養膜細胞によって産生されることが*in vivo*で示された。本明細書において、sFlt-1には、あらゆるsFlt-1ファミリーメンバー又はアイソフォームが含まれる。更なる態様では、sFlt-1は、Flt-1受容体の酵素的な切断によって生じ、Flt-1生物活性を維持する分解産物又は断片を意味することもできる。1つの例では、胎盤から放出される特異的メタロプロテイナーゼはFlt-1受容体の細胞外ドメインを切断することができ、Flt-1のN端部分を循環中に放出する。

【0089】

「特異的に結合する」とは、本発明のポリペプチドを認識して結合するが、サンプル、例えば天然に本発明のポリペプチドを含む生体サンプル中の他の分子は実質的に認識も結合もしない化合物又は抗体を意味する。1つの例では、sFlt-1に特異的に結合する抗体はFlt-1に結合しない。

10

【0090】

「被験者」とは、限定されるものではないが、ヒト又はヒト以外の哺乳動物、例えばウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、又はネコなどを含めた哺乳動物を意味する。この定義に含まれるのは、妊娠した、産後の、及び妊娠していない哺乳動物である。

【0091】

「実質的に同一」とは、保存的アミノ酸置換、例えば、1つのアミノ酸の同一クラスの他のアミノ酸への置換（例えばバリンをグリシンに、アルギニンをリジンに、など）、又はタンパク質の機能を破壊しないアミノ酸配列の位置における1以上の非保存的置換、欠失、若しくは挿入によってのみ異なっているアミノ酸配列を意味する。アミノ酸配列は、他のアミノ酸配列に対し、好ましくは少なくとも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%相同である。同一性を決定する方法は、公に入手可能なコンピュータプログラムを利用できる。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、及びFASTA（Altschulら、*J. Mol. Biol.* 215:403（1990））が含まれる。周知のスミス・ウォーターマンのアルゴリズムを用いて同一性を決定してもよい。BLASTプログラムはNCBI及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、ベセズダ、メリーランド州20894；BLAST 2.0、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>）。これらのソフトウェアプログラムは、さまざまな置換、欠失、及び他の改変に相同性を割り当てることによって類似配列を適合させる。保存的置換には、典型的には以下の群の中での置換が含まれる：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；トレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン。

20

30

【0092】

「子癇前症の症状」とは、以下のいずれかを意味する：（1）妊娠20週後の収縮期血圧（BP）>140mmHg及び拡張期BP>90mmHg、（2）新たに発症したタンパク尿症（尿検査で1+、24時間畜尿中のタンパク質が>300mg、又は無作為尿タンパク質/クレアチニン比が>0.3）、並びに（3）産後12週までの高血圧及びタンパク尿症の解消。子癇前症の症状には、腎機能不全及び糸球体内皮症又は肥大を含めることもできる。「子癇の症状」とは、妊娠又は最近の妊娠の影響による以下の症状のいずれかの発症を意味する：発作、昏睡、血小板減少症、肝浮腫、肺浮腫、及び脳浮腫。

40

【0093】

「治療量」とは、子癇前症又は子癇の患者に投与した場合に、本明細書に記載の子癇前症又は子癇の症状に質的又は量的な軽減を引き起こすのに十分な量を意味する。「治療量」は、子癇前症又は子癇の患者に投与した場合に、本明細書に記載のアッセイによって測定して、sFlt-1発現レベルの低下又はVEGF若しくはPLGFの発現レベルの増

50

加を引き起こすのに十分な量を意味することもできる。

【0094】

「処置する」とは、化合物又は医薬組成物を予防及び/又は治療目的で投与することを意味する。「疾患を処置する」又は「治療的処置」のための使用とは、既に疾患に罹患している被験者に、被験者の病態を改善するために処置を施すことを意味する。被験者は、以下に記載の特徴的な症状のいずれかの同定又は本明細書に記載の診断法の使用に基づいて、子癇前症又は子癇に罹患しているを診断されることが好ましい。「疾患を予防する」とは、まだ病気ではないが、具体的疾患を発症しやすいか、又は発症する危険性がある被験者の予防的処置を意味する。被験者は、本明細書に記載の診断法を用いて、子癇前症又は子癇を発症する危険性があると決定されることが好ましい。したがって、特許請求の範囲及び態様において、処置するとは治療又は予防目的での哺乳動物への施行である。

10

【0095】

「栄養膜」とは、子宮内膜を侵食してそこから胎児が母親から栄養を摂取する胚盤胞を覆う中外胚葉細胞層を意味する；細胞は胎盤形成に寄与している。

「血管内皮成長因子(VEGF)」は、米国特許第5,332,671号；第5,240,848号；第5,194,596号；及びCharnock-Jonesら(Biol.Reproduction,48:1120-1128,1993)に定義された成長因子と相同なVEGF生物活性を有する哺乳動物成長因子を意味する。VEGFはグリコシル化ホモダイマーとして存在し、少なくとも4つの選択的にスプライシングされた異なるアイソフォームを含む。天然VEGFの生物活性には、血管内皮細胞又は臍帯静脈内皮細胞の選択的増殖の促進及び血管新生の誘発が含まれる。本明細書において、VEGFには、あらゆるVEGFファミリーメンバー又はアイソフォーム(例えばVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF189、VEGF165、又はVEGF121)が含まれる。VEGF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；及び第5,194,596号に記載のVEGF121又はVEGF165アイソフォームであることが好ましい(Tischerら、J.Biol.Chem.266,11947-11954,1991；Neufeldら、Cancer Metastasis 15:153-158,1996)。Gilleら(J.Biol.Chem.276:3222-3230,2001)に記載のKDR選択的VEGF及びFlt選択的VEGFのようなVEGFの変異体型も含まれる。本明細書において、VEGFには、LeCouterら(Science 299:890-893,2003)に記載のもののような改変型VEGF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、他の動物型(例えばマウス、ラット、イヌ、又はニワトリ)のVEGFを含めることができる。

20

30

【0096】

「ベクター」とは、通常、プラスミド又はバクテリオファージに由来するDNA分子を意味し、それにDNA断片を挿入又はクローン化することができる。組換えベクターは、1以上のユニーク制限部位を含有し、クローン化配列が再生できる規定の宿主又は媒体生物において自律複製可能である。ベクターは、遺伝子又はコード領域に、受容細胞に形質移入されるとRNAが発現するように機能可能に連結したプロモーターを含有する。

40

【0097】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の好ましい態様の説明及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】

【0098】

詳細な説明

発明者らは、sFlt-1レベルが、子癇前症の女性から採取した血清サンプルにおいて上昇していることを発見した。sFlt-1は高親和性でVEGF及びPlGFに結合し、これら成長因子の分裂促進活性及び血管新生活性をブロックする。したがって、sFlt-1は子癇前症の優れた診断マーカーであり、VEGF及びPlGFは子癇前症の治

50

療に用いることができる。発明者らは、尿中P1GFレベルは、子癇前症若しくは子癇又はそれらになりやすい傾向を検出するための診断ツールとして使用できることも発見した。遊離型P1GFの平均分子量は約30kDaであり、非常に小さいため、腎臓でろ過されて尿に放出される。P1GFは、sFlt-1と複合体を形成すると、分子量が非常に大きくなり、したがって尿に放出されないであろう。sFlt-1レベルが上昇すると、sFlt-1はP1GFと複合体を形成することができ、尿に放出される遊離のP1GFレベルが低下する。その結果、遊離のP1GFレベルについての尿解析は、子癇前症若しくは子癇又はそれらを有する危険性のある患者を診断するために用いることができる。

【0099】

更に、発明者らは、精製したVEGF若しくはP1GFへのsFlt-1の結合を妨げる治療用物質、又は生物学的に活性なVEGF若しくはP1GFのレベルを増加させる物質が、被験者の子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するために使用できることを発見した。そのような物質には、限定されるものではないが、sFlt-1に対する抗体、sFlt-1レベルを低下させるアンチセンス又はRNAiのためのオリゴヌクレオチド、VEGF又はP1GFのレベルを増加させる化合物、及びsFlt-1に結合し、成長因子結合部位をブロックする小分子が含まれる。また、本発明は、成長因子レベルを測定する方法を特徴とする；この方法は、子癇前症、又は子癇前症若しくは子癇を発症する危険性の増加を初期検出するための診断ツールとして用いることができる。

【0100】

本明細書に提示した詳細な説明はsFlt-1、VEGF、又はP1GFについて具体的に参照するが、当該技術分野に熟練した者には、詳細な説明が、sFlt-1、VEGF、又はP1GFのファミリーメンバー、アイソフォーム、及び/又は変異体、並びにsFlt-1に結合することが示された成長因子にも当てはめられることは明らかであろう。以下の実施例は本発明を具体的に説明するためのものであり、限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例1】

【0101】

子癇前症を有する妊娠女性におけるsFlt-1のmRNA及びタンパク質のレベルの増加

子癇前症において病理学的役割を果たしている新規分泌因子を同定しようとして、Affymetrix U95Aマイクロアレイチップを用いて、子癇前症女性及び子癇前症でない女性の胎盤組織の遺伝子発現プロファイリングを行った。遺伝子が子癇前症の女性において上方制御されていることが発見された。

【0102】

子癇前症におけるsFlt-1の上方制御を確認するため、正常血圧の妊娠女性と比較して、子癇前症の妊娠女性においてノーザンブロットを行って胎盤sFlt-1 mRNAレベルを解析し(図1A)、ELISAアッセイを行ってsFlt-1の血清タンパク質レベルを測定した(図1B)。子癇前症は、(1)妊娠20週の収縮期血圧(BP) > 140 mmHg及び拡張期BP > 90 mmHg、(2)新たなタンパク尿症の発症(尿検査1+、24時間畜尿のタンパク質が > 300 mg、又は無作為に集めた尿のタンパク質/クレアチニン比 > 0.3)、及び(3)産後12週までの高血圧及びタンパク尿症の回復、として定義される。潜在的な高血圧、タンパク尿症、又は腎疾患の患者は排除した。腎臓の範囲のタンパク尿症(24時間畜尿のタンパク質が > 3 g又は尿タンパク質/クレアチニン比が3.0より大きい)の有無に基づいて患者を軽度及び重度の子癇前症に分けた。軽度子癇前症群の平均尿タンパク質/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。さまざまな群の平均在胎週数は以下の通りであった：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、及び早産 29.5 ± 2.0 週。出産後、直ちに胎盤サンプルを得た。それぞれの胎盤から4つの無作為サンプルをとり、RNAlater安定化溶液(Ambion、オースティン、テキサス州)に入れ、 -70°C で保存した。キアゲンRNAeasy Ma

10

20

30

40

50

xiキット（キアゲン、バレンシア、カリフォルニア州）でRNAを単離した。

【0103】

子癇前症の妊娠女性において、正常血圧の妊娠女性に対する胎盤sFlt-1 mRNA及び母体血清sFlt-1タンパク質の増加を検出した。重度子癇前症患者のsFlt-1の平均血清レベルは、正常対照妊娠女性と比較してほぼ4倍高かった。この効果が子癇前症例の初期の在胎週数によるものである可能性を排除するため、他の理由で早産している妊娠期間が匹敵した正常血圧女性（在胎週数23～36週）のsFlt-1レベルも測定したところ、正常血圧満期妊娠と比較して、この群に顕著な相違は見られなかった。ノーザンブロットに用いたプローブはPCRによって得たもので、pUC118hit-flt-1cDNA由来コード領域の500bp断片、及び標準化対照として用いたGAPDH cDNAを含んでいた。

10

【0104】

正常妊娠では、適切な胎盤発育に必要な、胎盤によって分泌される血管新生促進因子と抗血管新生因子とのあいだにはバランスがある。子癇前症では、sFlt-1の産生増加並びにVEGF及びPLGFの産生低下は、抗血管新生に有利な方へバランスがシフトすると仮定された。正味の抗血管新生活性に取り組むため、VEGF及びPLGFの血清レベルを測定したところ、既に記載されているように（Tidwellら、Am. J. Obstet. Gynecol.、184：1267-1272、2001）、PLGF及びVEGFの血清レベルは、正常対照患者と比較して、子癇前症患者において低いことがわかった（平均PLGF、 235.3 ± 45.3 pg/ml対 464 ± 116.6 pg/ml）。sFlt-1、VEGF及びPLGFのレベルを正味の抗血管新生活性の指標としての抗血管新生指標、即ちPAAIに入れると、子癇前症患者を正常患者から明確に分離することができ、PAAIは子癇前症の重篤度と相関するらしいことを発見した（図1C）。このPAAIは、妊娠女性の子癇前症を検出するための診断ツールとして有用であり得る。

20

【実施例2】

【0105】

子癇前症の女性の血清は、in vitro内皮管腔形成アッセイにおいて血管新生を阻害する

子癇前症患者の過剰な循環sFlt-1は内皮機能不全を引き起こし、抗血管新生状態をもたらすと仮定された。これに取り組むため、in vitro血管新生モデルとして内皮管腔形成アッセイを用いた。成長因子を減らしたマトリゲル（7mg/mL、Collaborative Biomedical Products、ベッドフォード、マサチューセッツ州）を予め冷却した48ウェル細胞培養プレートのウェルに入れ（100μl/ウェル）、37℃で25～30分間インキュベートして重合させた。継代数3～5のヒト臍帯静脈内皮細胞（300μlの血清不含の内皮細胞基本培地中に30,000個、クローンテック、ウォーカーズビル、メリーランド州）を10%患者血清で処理し、マトリゲルでコーティングしたウェルに巻き、37℃で12～16時間インキュベートした。次に倒立位相差顕微鏡（ニコン、東京、日本）を用いて4倍で管形成を評価し、Simple PCI画像解析ソフトウェアで定量解析した（管腔面積及び全長）。

30

40

【0106】

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞がVEGFなどの外因性成長因子の存在下でのみ管腔を形成するように管腔形成アッセイの条件を調節した。これらの条件下では、正常血圧女性の血清は内皮細胞の標準の管腔様構造形成を誘発するが、子癇前症女性の血清は管腔形成を阻害することがわかった（図2）。特に、産後48時間までに、この抗血管新生効果は消滅し、子癇前症患者の血清で注目された管腔の阻害はおそらく胎盤によって放出される循環因子によるものであることを示唆している。sFlt-1を正常血圧血清に子癇前症患者に見られるのと同様の用量で加えると、管腔形成は起こらず、子癇前症の女性の血清で見られた効果を模倣した。外因性VEGF及びPLGFを子癇前症の血清を用いたアッセイに加えると、管腔形成が回復した（図2）。組換えヒトVEGF、ヒトPLGF、及びヒ

50

トFlt-1Fcをこれらのアッセイに用いた。これらの結果は、子癇前症血清の抗血管新生特性は内因性sFlt-1によるVEGF及びPLGFの拮抗作用によるものであることを示唆した。これらの結果は、精製VEGF及び/又はPLGFの添加は子癇前症病態を逆転又は緩和させることができ、治療的に用いることができることも示唆した。

【実施例3】

【0107】

sFlt-1はVEGF及びPLGFによって誘発される腎微小血管の血管拡張を阻害する

血管収縮におけるsFlt-1の病原的役割を、*in vitro*微小血管反応性実験を用いて決定した。微小血管反応性実験は以前に記載されたようにラット腎微小血管を用いて行った(Satoら、*J. Surg. Res.*、90:138-143、2000)。腎臓動脈微小血管(内径70~170 μ m)を、10倍~60倍の解剖顕微鏡(オリンパス光学工業、東京、日本)を用いてラット腎から切り出した。微小血管を分離した微小血管チャンバーにおき、直径30~60 μ mを測定する2連ガラスマイクロピペットでカニューレを挿入し、10-0ナイロンモノフィラメント系(Ethicon、サマービル、ニュージャージー州)で固定した。37 $^{\circ}$ Cに温めた酸素化(95%酸素及び5%二酸化炭素)クレブスバッファー溶液を、血管チャンバーと全量100mlの溶液を含有するリザーバーとに連続的に循環させた。流れを止めた状態で血管にクレブスバッファー溶液を満たしたピュレット・マンメーターを用いて40mmHgまで加圧した。ビデオカメラに接続された倒立顕微鏡(40倍~200倍;オリンパスCK2、オリンパス光学工業)で、血管画像を白黒テレビモニターに写し出した。電子寸法分析器(Living System Instrumentation、パーリントン、バーモント州)を用いて管腔の内径を測定した。ストリップ・チャート式記録計(Graph Tec、アービン、カリフォルニア州)で測定値を記録した。介入前、血管を微小血管チャンバーに少なくとも30分間浸した。全ての実験群において、腎微小血管の弛緩反応を、40mmHgの膨張圧で基底径の40~60%までU46619(トロンボキサランアゴニスト)で微小血管を予備収縮させた後に試験した。いったん定常状態の調子に達してから、VEGF、PLGF、及びsFlt-1などのさまざまな試薬に対する反応を試験した。組換えラットVEGF、マウスPLGF、及びマウスFlt-1Fcをこれらのアッセイに用いた。全ての薬物は管腔外に適用した。反応が安定したときに測定した(通常薬物投与後2~3分)。それぞれの血管について1~4回の介入を行った。血管をクレブスバッファー溶液で洗浄し、介入のあいだ薬物不含クレブスバッファー溶液に20~30分間平衡化させた。

【0108】

sFlt-1単独では顕著な血管収縮を引き起こさないが、VEGF又はPLGFによって誘発される血管拡張の用量依存的増加をブロックすることを発見した(図3A)。更に、VEGF及びPLGFは、妊娠において見られる生理的レベルで、顕著な用量依存的細動脈弛緩を誘発し、この効果は重度子癇前症女性において観察される濃度である10ng/ml sFlt-1の添加によってブロックされることを発見した(図3B)。この結果は、子癇前症患者の循環sFlt-1が血管緊張低下に対抗し、高血圧に寄与し得ることを示唆した。これらの結果は、sFlt-1が高血圧を含めた子癇前症の多くの臨床症状及び生理的症状に関与するという結論を支持している。sFlt-1の阻害は、指向性抗体の使用を介して、例えば、子癇前症女性のタンパク質の効果を逆転し、そのようなsFlt-1インヒビターは潜在的に治療剤として使用できるであろう。

【実施例4】

【0109】

子癇前症動物モデルにおけるsFlt-1の効果

上記結果に基づいて、外因性sFlt-1の添加が動物モデルにおいて高血圧及びタンパク尿症を作り出すと仮定された。sFlt-1を発現するアデノウイルスは、顕著な抗腫瘍活性に関連する持続した全身sFlt-1レベルを作り出すことが示されている(Kuoら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、98:4605-4610、

10

20

30

40

50

2001)。マウス sFlt-1 をコードするこの組換えアデノウイルスを、妊娠 8 ~ 9 日のスプラーグドローリーラット尾静脈に注入した。マウス Fc 及び sFlk1-Fc (マウス VEGF 受容体 1 Flk1 細胞外ドメインと Fc タンパク質との融合タンパク質) を等量でコードするアデノウイルスを対照として用いた。Flk1 は VEGF に結合することが示されているが、PlGF には結合しない。したがって、sFlk-1Fc を対照として選択し、sFlt1 の抗 VEGF 活性と抗 PlGF 活性との区別に役立てた。

【0110】

妊娠及び非妊娠スプラーグドローリーラットに、 1×10^9 pfu の Ad Fc、Ad sFlt-1、又は Ad sFlk-1Fc を尾静脈注射によって注入した。これらのアデノウイルスは依然に記載されており (Kuora、上記)、Harvard Vector Core Laboratory で作製された。妊娠ラットに、妊娠 8 ~ 9 日 (妊娠第二期初期) でアデノウイルスを注入し、妊娠 16 ~ 17 日 (妊娠第三期初期) に血圧を測定した。非妊娠動物では、アデノウイルス注入後 8 日に BP を測定した。ペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg、腹腔内) で麻酔後のラットの BP を測定した。頸動脈を単離し、圧力変換器に接続した 3-Fr 高性能マイクロチップカテーテル (Millar Instruments、ヒューストン、テキサス州) でカニューレを挿入した。Millar マイクロチップカテーテルを動脈内に進めて血圧を記録した。ストリップ・チャート式記録計で血圧及び心拍数を記録し (モデル 56-1X 40-006158、Gould Instrument Systems、クリーブランド、オハイオ州)、10 分間の平均をとった。次に、安楽死させる前に血液、組織、及び尿のサンプルを得た。標準の尿検査で尿アルブミンを測定し、他の場所に記載されているように (Cohenら、Kidney Intl.、45:1673-1679、1994)、競合的酵素結合イムノアッセイ (ELISA) で定量した。ピクリン酸比色法キット (シグマ、セントルイス、ミズーリ州) で尿クレアチンを測定した。子癇前症の自然の病状を模倣するため、妊娠第三期初期に動脈内血圧を測定した。これらの実験は、非妊娠雌性スプラーグドローリーラットにおいても行い、sFlt-1 の効果が胎盤の効果を介した直接的なものか又は間接的なものかを決定した。さまざまな sFlt-1 で処理した動物の血圧測定日の全身 sFlt-1 レベルは、ウエスタンブロット解析によって、25 ~ 350 ng/mL の範囲であることが確認された。さまざまな実験群の血圧及びタンパク尿症を表 1 に示す。

【0111】

【表 1】

ラットの血圧及びタンパク尿症

	N	MAP (mmHg)	尿アルブミン:クレアチン比
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) 及び非妊娠 (NP) ラットに、Fc (対照)、sFlt-1、又は sFlk-1Fc のタンパク質を発現するアデノウイルスを投与した。平均動脈圧 (MAP = 拡張期 + 1/3 脈圧 mmHg) ± S. E. M. 及び尿アルブミン:クレアチン比 (mg アルブミン/g クレアチン) ± S. E. M. を、妊娠ラットの妊娠第三期初期に相当する 8 日後に測定した。N = 各実験群の動物数。* は対照群 (Fc) と比較した統計的有意差 $p < 0.01$ を表す。

【0112】

sFlt-1 で処理した妊娠ラットは、Fc 対照と比較して顕著な高血圧及び腎炎の範

困のタンパク尿症を有していた。sFlt1を投与された非妊娠ラットも高血圧及びタンパク尿症を発症した。特に、sFlk-Fcで処理した非妊娠ラットは高血圧及びタンパク尿症を発症したが、sFlk-Fcで処理した妊娠ラットは発症しなかった。したがって、妊娠ラットでは、おそらく高レベルPLGFの存在により、VEGFの拮抗作用単独は子癇前症の作製には不十分である。非妊娠状態では、PLGFが事実上存在しない場合は、VEGFの拮抗作用単独で、血管新生促進/抗血管新生バランスのバランスを崩壊させ、子癇前症に関連したものに類似した腎臓の病状を作り出すのに十分である。さまざまな染色技術を用いてsFlt-1で処理したラット全てで観察された腎病変を調べた(図4)。ラットから取り出した腎をブアン溶液で固定して切り出し、H&E染色及びPAS染色を行った。電子顕微鏡の場合、腎組織をグルタルアルデヒドで固定し、アラルダイト-エボン混合物中に包埋し、超薄腎切片(1 μ m)を切り出し、トルエンブルーで染色し、そしてツァイスEM10を用いてさまざまな倍率で評価した。糸球体内のフィブリン沈着について、ポリクローナル抗フィブリン抗体(ICN、スイス)を用いて免疫蛍光を行った。広範囲に拡散した糸球体内皮症は、sFlt-1で処理したラットにおいていたるところに観察される腎病変であった。血管内皮細胞の腫脹及び肥大によるループ状毛細血管の閉塞を伴う糸球体肥大を検出した。糸球体上皮細胞において多数の明らかなタンパク質吸収液滴が見られた。分節性糸球体硬化症は観察されなかった。糸球体内に孤立性「二重輪郭像」及び巣状フィブリン沈着が見られた。顕著なメサンギウム介入の非存在下でのこのフィブリン沈着の発見は、産前期のヒト疾患の典型的なものとして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)。フィブリンについての免疫蛍光は、sFlt-1で処理した動物の糸球体内にフィブリン沈着巣を示したが、Fcで処理した動物には見られなかった。sFlk1で処理した非妊娠ラットは同一病変を発症した。実際、sFlk1をsFlt-1と同一レベルで用いると、sFlt-1に対して拮抗する循環血管新生促進分子が少ないため、非妊娠ラットにおいて腎損傷はより重篤であった。これらの結果は、sFlt-1レベルの増加は、子癇前症と関連する糸球体内皮症に関与し得るが、糸球体変化が妊娠ラットに加えて非妊娠ラットにおいても検出されたため、この効果は胎盤と無関係であることを示唆していた。これらの結果は、VEGF及びPLGFの拮抗作用は、sFlk-1で処理した非妊娠マウスでは起こるが、sFlk-1で処理した妊娠マウスではPLGFレベルの高いと起こらない高血圧及びタンパク尿症のように、子癇前症の病理に重要であることも示唆していた。

【0113】

本明細書において作製した動物モデルは、新規治療用化合物を試験するための動物モデルとして用いることができる。この動物モデルを用いて潜在的治療用化合物の有効性並びに薬理及び毒性を試験することができる。

【実施例5】

【0114】

子癇動物モデルにおけるsFlt-1の効果

妊娠第二期初期の妊娠ラットに外因性sFlt-1を注入する。次に、子癇の発症についてラットを妊娠第三期初期のあいだモニターし、試験する。子癇の検出に用いる試験には、浮腫の発症に関するラット脳のMRI、発作の発症に関するラット脳のEEG、並びに内皮損傷が血液脳関門及び脈絡叢に沿って起こっているかどうかを決定するための特異的内皮マーカーを用いたラット脳の組織像を含めることができる。

【0115】

本明細書において作製した動物モデルは、新規治療用化合物を試験するための動物モデルとして用いることができる。この動物モデルを用いて、潜在的治療用化合物の有効性並びに薬理及び毒性を試験することができる。

【実施例6】

【0116】

尿のPLGF/クレアチニン比は子癇前症の診断法である

10

20

30

40

50

妊娠16週の10人の女性から尿サンプルを得た（正常5人、軽度子癇前症4人、及び重度子癇前症1人）。これらのサンプルは、マサチューセッツ総合病院のRavi Thadhani博士より提供された。正常妊娠女性では、尿の平均の遊離P1GF/クレアチニン比（クレアチニン1mgあたりのP1GF pg）は 78 ± 10.7 であり、4人の軽度子癇前症患者では 33 ± 5.0 であり、1人の重度子癇前症患者は17であった。したがって、尿中のクレアチニンに対するP1GFの比の変化は、患者の子癇前症の診断指標として有用である。

【実施例7】

【0117】

尿P1GFレベルは対照及び子癇前症妊娠女性を判定する

10

NIHのRichard Levine博士と共同して、CPEP試験に（実施例8を参照されたい）からの保管尿標本を用いて、対照妊娠女性及び子癇前症の女性の尿P1GFを測定した（表2）。以下の表は、妊娠初期（<20週）ではなく、妊娠中期（22~30週）及び妊娠後期（>30週）のあいだで、後に子癇前症を発症した患者において尿P1GFの顕著な減少を示す。子癇前症の臨床症状の前に全ての尿標本を得た。

【0118】

【表2】

子癇前症妊娠患者と対照妊娠患者との比較における尿P1GFレベル（pg/ml）

	対照 (n=118)	PE (n=120)
妊娠初期	39.80	42.28
妊娠中期	193.11	98.66 (p<0.0001)
妊娠後期	107.82	62.05 (p=0.0213)

20

【実施例8】

【0119】

女性における子癇前症及び子癇の診断指標としてのsFlt-1及びP1GFのタンパク質レベル

この試験には、NIHのRichard Levine博士との共同で、正常血圧妊娠及び子癇前症妊娠における循環sFlt-1、遊離のP1GF、及び遊離のVEGFの妊娠パターンを解析するために、子癇前症予防のためのカルシウム試験からの保管サンプルを用いた。子癇前症予防のためのカルシウム試験、即ちCPEPは、2gのカルシウム元素又はプラセボの毎日の補給による子癇前症の罹患率及び重篤度へお効果を評価するために1992~1995年に実施された無作為化2重盲検臨床試験である（Levineら、N. Engl. J. Med. 337: 69-76, 1997; Levineら、Control Clin. Trials 17: 442-469, 1996）。独身で妊娠している健常な未経産女性は、5つの関係米国医療センターで、共通プロトコール及び同一のデータ採取形式を用いて妊娠13~21週に記録され、産後24時間まで追跡調査された。記載では、全てのCPEP参加者の血圧は<135/85mmHgであり、誰も腎機能不全及びタンパク尿症でなかった。在胎週数は超音波検査で測定した。血清標本は、試験に参加前（13~21週）、26~29週、未だ妊娠している場合は36週、及び高血圧又はタンパク尿症に気づいたときに参加者から得た。「終点標本」(活性PE)は、どこかに記載されているように、子癇前症の症状及び徴候の発症時又は発症後であるが、陣痛及び出産前に得た標本である（Levineら、1996、上記）。CPEP試験からの保管血液サンプルは、NIHのRichard Levine博士と共同して得た。

30

40

【0120】

参加者

完全な結果情報、<22週に採取した血清サンプル、及び生産男児を有する被験者を選択した。4,589人のCPEP参加者のうち、追跡調査できなかつた253人、20週より前に妊娠が終了した21人、母体又は周産期の結果データのない13人、喫煙歴のな

50

い4人、カルテ調査チームによって検証されていない高血圧を有する9人、及び死産だったその他の32人を除外し、適切な情報と生産児を有する4,257人の女性を残した。このうち、2,156人は男児を有していた。染色体異常児を有する1人の女性、妊娠性高血圧のある381人、及び基本血清標本のない43人を除外した後、1,731人の女性が残った。このうち、175人が子癇前症を発症し、1,556人が妊娠を通して正常血圧のままであった。

【0121】

カルシウム補充は子癇前症の危険性及び重篤度に効果がなく、血管新生促進因子及び抗血管新生分子の濃度に関連しなかったため、CPEP処置に関係なく症例及び対照を選択した。それぞれの子癇前症症例に対し、1人の正常血圧対照を選択し、記録部位、最初の血清標本採取時の在胎週数（1週間以内）、及び-70℃での凍結保存期間（12ヶ月以内）を一致させた。陣痛前に得た657の血清標本全てを解析するために、120の一致させたペア（「症例」と「対照」）を無作為に選択した（以下の表3）。最初の血清標本採取時の平均在胎齢は症例と対照でそれぞれ112.8日と113.6日であった；平均凍結保存期間は9.35年と9.39年であった。

【0122】

【表 3】

C P E P 参加時の症例及び対照並びに新生児の特徴

特徴	症例 (n=120)	対照 (n=118)
年齢 (歳)	20.8±4.5	20.0±3.4
肥満度指数	27.3±6.8	25.0±6.1**
収縮期血圧 (mmHg)	109.0±9.0	106.0±9.0†
拡張期血圧 (mmHg)	62.0±8.0	59.0±7.0‡
出産時在胎週数 (週)	38.1±2.6	38.9±2.5*
現喫煙者 [n (%)]	9 (7.5)	13 (11.0)
既婚者 [n (%)]	25 (20.8)	22 (18.6)
人種/民族		
白人、非ヒスパニック系 [n (%)]	24 (20.0)	33 (28.0)
白人、ヒスパニック系 [n (%)]	21 (17.5)	14 (11.9)
アフリカ系アメリカ人 [n (%)]	69 (57.5)	68 (57.6)
その他、不明 [n (%)]	6 (5.0)	3 (2.5)
出生児体重 (g)	3100±796	3247±596
<37週の出産 [n (%)]	26 (21.7)	9 (7.6) §
在胎週数に比して小さい (<第10パーセンタイル) [n (%)]	18 (15.0)	4 (3.4) §

記載がない場合は平均±標準偏差を表す

* p=0.03 ** p=0.007 † p=0.001 ‡ p=0.006 § p=0.002

人種又は民族は自己申告

【0123】

この試験では、高血圧を、4～168時間あけた2回の機会の拡張期血圧が少なくとも90 mmHgと定義した。重度高血圧は、4～168時間あけた2回の機会の拡張期血圧が、又は女性が抗高血圧療法を受けた場合は1回の機会の拡張期血圧が少なくとも110 mmHgと定義した。タンパク尿症は、24時間畜尿中のタンパク質が300 mg以上、4～168時間あけた2つの無作為尿標本のタンパク質が尿検査で少なくとも1+、1つの尿サンプルのタンパク質/クレアチニン比が少なくとも0.35、又は1つの無作為尿標本のタンパク質が尿検査で少なくとも2+、と定義した。重度タンパク尿症は、24時間畜尿サンプルのタンパク質が少なくとも3.5 g、又は2つの無作為尿標本のタンパク質が尿検査で少なくとも3+で診断した。子癇前症は、高血圧及びタンパク尿症が互いに7日以内に発症と定義した；重度子癇前症は、重度高血圧、重度タンパク尿症、HELLP

10

20

30

40

50

Pシンドローム（溶血、肝酵素の上昇、血小板低下）を有する子癇前症、又は子癇と定義した。子癇前症の発症は、最初の血圧上昇又は尿サンプルのタンパク尿症の検出時であり、子癇前症の診断へと導く。

【0124】

在胎週数に比して小さい（SGA）は、米国の人種、出産経歴、及び乳児の性別による在胎週数に関する出生体重表（Zhang及びBowes 1995、上記）による在胎週数の第10パーセンタイルより小さい出生体重で定義される。

【0125】

手順

アッセイは、ベス・イスラエル・ディーコネス医療センターで、患者の診断及び他の関連臨床情報について盲目的検査技師によって行われた。解析のため、標本を無作為に順序付けた。ヒトsFlt-1、遊離のPlGF、及び遊離のVEGFに関し、R&D Systems（ミネアポリス、ミネソタ州）から購入したキットを用いて、製造者の指示にしたがい酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を行った。-70℃で保存していた血清サンプルのアリコート室温まで融解し、BSA/Tris-緩衝食塩水で希釈し、sFlt-1、PlGF、又はVEGFに対するキャプチャー抗体で予めコーティングした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、過酸化水素とテトラメチルベンジジンとを含有する基質溶液で20分間インキュベーションし、2N硫酸で反応を止めた。450nmで光学密度を測定した（波長補正550nm）。全てのアッセイは2回行った。既知濃度のそれぞれの組換えタンパク質から得た検量線を用いてタンパク質濃度を計算した。2回の測定間の差が25%を越える場合は、アッセイを繰り返し、最初の結果を破棄した。sFlt-1、PlGF、及びVEGFのアッセイの感度はそれぞれ5、7、及び5pg/mlであり、アッセイ間及びアッセイ内の変動係数はsFlt-1で7.6%及び3.3%、PlGFで11.2%及び5.4%、VEGFで7.3%及び5.4%であった。

【0126】

統計解析

母体又は乳児の特徴解析に²検定及びt検定を用いてそれぞれカテゴリ変数又は連続型変数を比較した。明細書及び図面には濃度の相加平均値を示しているが、統計的検定は特に記載のない限り対数変換後に行った。対数変換した濃度に対するロジスティック回帰を用いて修正を行った。

【0127】

結果

120人の症例のうち、HELLP症候群を伴う3人及び子癇を伴う3人を含め、80人が軽度子癇前症を、40人が重度子癇前症を発症した。症例患者は対照患者よりも背が低く、肥満度指数が高く、基準血圧が高かった（表2）。更に、症例患者のかなりの割合が、早産又は在胎週数に比して小さい（SGA）乳児を伴う妊娠をしていた。症例患者は平均2.9の血清標本を試験に提供した；対照は2.6標本であった。

【0128】

最初に、妊娠期間が一致したこのCPEP試験群からの対照と比較して、疾患の活動期、子癇前症患者でsFlt-1、PlGF、及びVEGFが変化していることを確認した。臨床子癇前症が確立したとき（終点標本）に採取した標本では、以前に公開された報告書（Maynardら、J.Clin.Invest.111:649-658、2003）と類似の在胎週数を有する対照と比較して、sFlt-1レベルが劇的に増加し、PlGFレベルは低下し、VEGFレベルも低下していた（在胎週数23週で一致させたペアにおける症例及び対照に関し、それぞれsFlt-1は4382対1643pg/ml、 $p < 0.0001$ ；PlGFは137対669pg/ml、 $p < 0.0001$ ；及びVEGFは6.41対13.86pg/ml、 $p = 0.06$ ）。

【0129】

sFlt-1、PlGF及びVEGFのレベルの妊娠パターンを評価するために、さま

さまざまな在胎週数期間の症例患者及び対照患者から得た血清標本の s F l t - 1、P l G F、及び V E G F の循環濃度を測定した。120 人の子癇前症と 120 人の対照女性の s F l t - 1 タンパク質の妊娠パターンを図 5 A に示す。対照患者の s F l t - 1 レベルは 33 ~ 36 週まで一定のままであったが、陣痛及び出産まで 1 週間あたりおよそ 145 pg / m l 増加した。臨床症状前の症例患者では、s F l t - 1 は 21 ~ 24 週で増加し始めたように見え、より急勾配の増加と 29 ~ 32 週の対照に対し統計的有意差を示した (図 5 A)。全体的に、臨床症状発症前に測定した症例患者と対照患者との差は妊娠中期で 17 % ($p < 0.05$) であった。終点標本は、疾患前に採取した標本と比較して顕著に増加していた。臨床疾患発症前の s F l t - 1 上昇のメカニズムを評価するため、全ての子癇前症について、子癇前症発症前の週に関して s F l t - 1 濃度をプロットした (図 5 B)。子癇前症発症前の完全な週に関し、症例患者標本の平均 s F l t - 1 濃度をプロットした。子癇前症前 5 週に始まり、疾患発症前 1 週間まで s F l t - 1 濃度は実質的に増加し、終点標本で観察された濃度に達した。子癇前症前 4、3、2、及び 1 週間の s F l t - 1 の増加は平均在胎週数がほとんど変化することなく起こり、妊娠第三期後期の在胎週数の進行に伴う増加によって説明することができない。子癇前症前 8 ~ 6 週から 5 週まで、s F l t - 1 は 962 pg / m l に増加し、平均在胎週数は 31 日に上昇した。この s F l t - 1 の増加の約 1 / 3 は、妊娠期間の進行に起因し得ない。子癇前症発症前 < 5 週に得た標本を除去した後の対照及び症例において s F l t - 1 を在胎週数についてグラフにすると、実質的な差は観察されなかった (図 5 C)。これらのデータは、子癇前症発症前の症例患者のより高濃度の s F l t - 1 は、臨床疾患発症前 5 週以内の s F l t - 1 の急激な上昇によることが示唆される。

10

20

【 0 1 3 0 】

次に、図 6 A に示すように、同一患者群における P l G F タンパク質の妊娠パターンをプロットした。対照 P l G F タンパク質濃度は妊娠第一期及び第二期に上昇し、29 ~ 32 週にピークに達し、妊娠後期に低下した。症例患者の中で、子癇前症前、P l G F タンパク質濃度は類似の妊娠パターンを追うが、13 ~ 16 週の対照よりも顕著に低かった。全体的に、臨床症状発症前に測定した症例患者と対照との P l G F の差は、妊娠中期で 35 % であった ($p < 0.0001$)。子癇前症発症前の症例の P l G F レベルを子癇前症前の週について (図 6 B)、及び子癇前症前 < 5 週の標本を除去した後の在胎週数について (図 6 C) 表す。子癇前症発症前 1 週までに、濃度は子癇前症発症後観察されたものに近づいた (図 6 B)。対照と比較すると、症例患者の P l G F レベルは、出産から離れた時期は穏やかに低下し、出産前 5 週及び 3 週ではより実質的に低下した。対象患者の濃度は、17 ~ 15 週から出産前 3 週まで高いままであり、その後劇的に低下した。子癇前症前 5 週に得た標本を除外した P l G F レベルを示すグラフは、妊娠 29 ~ 32 週で症例において対照よりも小さな低下を示し、33 ~ 36 週に症例患者から得た標本では全く示さなかった (図 6 C)。これは、疾患前の週における P l G F 濃度の低下は、疾患発症時に注目される (又は図 6 A に示す終点標本) 劇的に低い P l G F レベルに関与することを示唆している。

30

【 0 1 3 1 】

妊娠を通した V E G F 濃度は、非常に低く、37-41 週の症例患者における劇的な低下を除いて、子癇前症前の対照と症例で類似している。子癇前症前 5 週に得た標本を除外した症例における 23 ~ 32 週の平均 V E G F 濃度は、対照と有意に異ならなかった (11.6 対 12.8 pg / m l) が、出産前 5 週の標本を含めた症例の濃度は有意に異なっていた (5.1 対 12.8 pg / m l、 $p < 0.01$)。33 ~ 41 週に、子癇前症前 > 5 週、及び 5 週の症例 V E G F 濃度は、これらの差は有意ではないが、それぞれ対照よりも高く、及び低かった (11.2 pg / m l 及び 8.3 対 9.7 pg / m l)。

40

【 0 1 3 2 】

図 7 は、23 ~ 32 週 (図 7 A) 及び 33 ~ 41 週 (図 7 B) の、子癇前症状態及び重篤度に関する s F l t - 1 及び P l G F を表す。グラフは、子癇前症発症前の s F l t - 1 の増加及び P l G F の低下は疾患の重篤度、発症時期、及び S G A 児の存在に関連した

50

ことを示している。23～32週に、子癩前症発症前のSGA児を有する症例患者のsFlt-1及びPLGFは、SGA児を有する対照患者の対応する濃度よりも、それぞれ有意に高く、及び低かった。更に、早産した対照患者と比較して、早産した症例患者はsFlt-1が高く、PLGFが有意に低かった。

【0133】

子癩前症の臨床徴候前のsFlt-1又はPLGFの濃度がこの病態の危険性と関連するかどうかを決定するために、sFlt-1及びPLGFの対照値のそれぞれの四分位数について子癩前症に関するオッズ比を、それぞれ最低又は最高四分位数と比較して計算した(表4)。他の全ての四分位数に関し、両極端の四分位数の子癩前症の危険性についても以下のように調べた。妊娠第二期及び妊娠第三期初期に得た標本の場合、最低四分位数のPLGFは、出産前(妊娠<37週)子癩前症の危険性の増加に関連していた(13～20週標本のOR7.4、95%CI 1.8～30.2; 21～32週標本のOR7.9、95%CI 2.9～21.5)。しかしながら、最低四分位数のPLGFレベルは、満期(37週)子癩前症の有意な予測材料ではなかった。sFlt-1の場合、子癩前症との関連性は、疾患発症近くでのみ観察された。妊娠21～32週(しかし初期ではない)の最高四分位数のsFlt-1レベルは出産前子癩前症を予測し(OR5.1、95%CI 2.0～13.0)、33～41週(しかし初期ではない)の最高四分位数のレベルは満期子癩前症を予測した(OR6.0、95%CI 2.9～12.5)。これは、臨床疾患発症の5週以内にsFlt-1が大きく上昇することを示す図5Bと一致する。最低四分位数のVEGFは子癩前症の予測材料ではなかった。

【0134】

10

20

【 附 4 】

妊娠 13～20週、21～32週、及び33～41週の対照における全量 sFlt-1 及び遊離の P1GF の四分位数に
対する臨床症状前<37週及び≥37週の子癩前症に関するオッズ比 (OR)

sFlt-1 (pg/ml)	対照		PE < 37 週		PE ≥ 37 週		PIGF (pg/ml)		対照		PE < 37 週		PE ≥ 37 週	
	N	OR*	N	OR*	N	OR*	Q4:>307	N	OR*	N	OR*	N	OR*	
13-20 週														
Q4:>1047	25		6	1.3 (0.4-5.0)	20	1.5 (0.6-3.7)	Q4:>307	25		4	1.0 指示対象	4	1.0 指示対象	
Q3:>698-1047	25		8	2.2 (0.6-7.8)	23	1.9 (0.8-4.5)	Q3:>160-307	25		2	0.6 (0.1-3.5)	22	5.6 (1.7-19.0)	
Q2:>531-698	25		4	0.5 (0.1-2.3)	16	1.1 (0.4-2.7)	Q2:>87-160	25		6	1.9 (0.4-8.2)	26	6.4 (1.9-22.1)	
Q1:≤531	25		6	1.0 指示対象	16	1.0 指示対象	Q1:≤87	25		12	9.6 (1.6-57.6)	23	6.7 (1.6-27.5)	
21-32 週														
Q4:>1131	25		16	4.7 (1.3-16.6)	18	1.7 (0.7-4.4)	Q4:>1021	25		1	1.0 指示対象	14	1.0 指示対象	
Q3:>743-1131	26		5	1.4 (0.3-6.0)	21	1.7 (0.7-4.2)	Q3:>677-1021	26		1	1.1 (0.1-18.2)	19	1.2 (0.5-3.1)	
Q2:>512-743	25		1	0.3 (0.0-2.8)	21	1.9 (0.8-4.7)	Q2:>363-677	25		5	5.3 (0.6-49.3)	20	1.3 (0.5-3.2)	
Q1:≤512	26		4	1.0 指示対象	14	1.0 指示対象	Q1:≤363	26		19	19.6 (2.3-163.8)	21	1.2 (0.5-3.1)	
33-41 週														
Q4:>2191	22				44	7.5 (2.6-21.8)	Q4:>948	22				6	1.0 指示対象	
Q3:>1633-2191	22				12	1.7 (0.5-5.5)	Q3:>377-948	22				18	2.7 (0.9-8.3)	
Q2:>1287-1633	22				7	1.0 (0.3-3.3)	Q2:>175-377	22				19	2.8 (0.9-8.5)	
Q1:≤1287	23				8	1.0 指示対象	Q1:≤175	23				28	4.1 (1.4-12.2)	

*在胎齢及び肥満度指数に関してオッズ比を調整した (95%CI)。
95%CIのOR > 1.0 を太字で示す。
子癩前症の臨床症状前に症例標本を得た。

【 0 1 3 5 】

これらの結果は、sFlt-1レベルは、子癩前症症状発症前約5週に劇的に増加し始めることを示している。sFlt-1の増加と平行して、遊離のP1GF及び遊離のVE

10

20

30

40

50

G F のレベルは低下し、P L G F 及び V E G F の低下は少なくとも部分的に s F l t - 1 による拮抗作用によるものであり、P L G F 及び V E G F の胎盤産生低下によるものではないことを示唆している。子癩前症の3つのサブグループ - 重度子癩前症、初期に発症する疾患、及び S G A 児 - は、対照又は軽度子癩前症を有する女性よりも、23 ~ 32 週及び 33 ~ 41 週で、s F l t - 1 濃度が高く、P L G F 濃度が低かった。子癩前症を発症することが必至の女性における遊離の P L G F の妊娠第二期初期に始まる小さいが有意な低下も証明した。これらの結果は、P L G F レベルの低下は、初期に発症する子癩前症の有用な予測材料であり得ることを証明している。

【0136】

妊娠期間を通して比較的安定なレベルの後、33 ~ 36 週に始まる安定な増加を観察する、正常妊娠の s F l t - 1 の妊娠パターンについて本明細書に初めて記載する。この増加は、正常妊娠において他者が観察し (T o r r y ら、J . S o c . G y n e c o l . I n v e s t . 10 : 178 - 188、1998 ; T a y l o r ら、A m . J . O b s t e t . G y n e c o l . 188 : 177 - 182、2003)、そして本明細書に記載の結果に見られる妊娠後期の P L G F の低下に対応する。一時的な関連性は、s F l t - 1 が P L G F E L I S A 測定を妨げるという知識 (M a y n a r d ら、上記) と共に、妊娠後期の遊離の P L G F レベルの低下は s F l t - 1 レベルの増加によるものであり得ることを示唆している。妊娠第一期及び妊娠第二期のあいだ、胎児の要求の増加に伴い、胎盤成長が速度を維持する必要がある場合、P L G F 濃度は高く、s F l t - 1 濃度は低く、相対的に血管新生促進状態を作り上げる。妊娠期間後期、胎盤血管の増殖が和らげられ、抑制される必要があると、抗血管新生性の s F l t - 1 が増加し、P L G F が低下する。子癩前症の女性では、s F l t - 1 の増加は妊娠初期、症状発症前およそ5週、平均して妊娠約 29 ~ 32 週に始まる。したがって、子癩前症では、抗血管新生の「ブレーキ」は、非常に迅速に、非常に強力に適用することができ、胎盤成長を拘束する正常な生理的過程を強調する。子癩前症を特徴とする病的な胎盤の変化は妊娠初期 (10 ~ 14 週)、s F l t - 1 の劇的な増加よりもかなり前に起こるのは明らかなようである。その結果の胎盤虚血自体は s F l t - 1 産生を高めることができ、最終的に s F l t - 1 のバーストを引き起こす。

【0137】

臨床症状発症前5週に見られる大きな差に加えて、子癩前症を発症することが必至の女性では、妊娠13 ~ 16 週においても遊離の P L G F が、小さいが統計的に有意に低下した。この P L G F の低下は、通常、s F l t - 1 レベルの相反する増加を伴わなかった。しかしながら、妊娠第一期の症例において、統計的に有意ではないが、s F l t - 1 レベルがわずかに高い傾向があった (例えば 17 ~ 20 週期間では、症例の平均 s F l t - 1 レベルは 865 . 77 p g / m l であったのに対し、対照では 795 . 25 p g / m l であった)。妊娠初期のこの P L G F レベルの低下は、子癩前症や S G A のような病態の危険にさらされた妊娠において胎盤による P L G F 産生がより少ないことを反映しているであろう。重要なことには、S G A の危険にさらされた子癩前症患者において、疾患提示前の s F l t - 1 上昇及び P L G F 低下に統計的に有意な増加を見出した。子癩前症における胎盤の P L G F 産生に変化がなく、胎盤の局所 s F l t - 1 レベルの増加が循環する遊離の P L G F の低下に寄与し得る可能性もある。これは、免疫組織化学的に測定された胎盤 P L G F は子癩前症において変化していないという発見によって支持されている (Z h o u ら、A m . J . P a t h o l . 160 : 1405 - 1423、2002)。

【0138】

要約すれば、s F l t - 1 は子癩前症において少なくとも臨床疾患発症前5週に増加し始め、これは循環する遊離の P L G F 及び遊離の V E G F の低下を伴うことを示した。妊娠第一期に低下した P L G F は、子癩前症の予測材料として役立ち、増加した s F l t - 1 は臨床疾患の近接性の予測材料として役立ち得る。このデータは、齧歯類において s F l t - 1 単独で子癩前症様症状を誘発することを示す上記動物実験と組み合わせて、子癩前症の発症機序における s F l t - 1 の有望な病因的役割を示唆している。対照における S G

10

20

30

40

50

A 乳児及び早産に関する限られたデータは、症例患者と比較して、SGA児を有する子癩前症妊娠におけるタンパク質レベルの増加した変化は、子癩前症のない子宮内増殖制限又は早産のみによる差よりも実質的であることを示唆している。

【実施例 9】

【0139】

正常患者及び子癩前症患者の単球において検出された sFlt-1 タンパク質及びタンパク質断片

単球に富んだ末梢血単核細胞を正常及び子癩前症患者から単離し、sFlt-1 及び sFlt-1 断片のレベルの測定に用いた。タンパク質抽出物を PBMC から抽出し、Flt-1 / sFlt-1 レベルをウエスタンブロットで、Flt-1 タンパク質の N 端（両タンパク質に共通する領域）を認識する抗体を用いて解析した。この実験の結果は、子癩前症患者の単球における Flt-1 及び sFlt-1 のレベル増加を示した（図 8）。更に、全長 sFlt-1 よりも速い移動度を示すいくつかのバンドを検出した。これらの移動度の速いバンドは、分解産物、あるいはスプライシングアイソフォーム、酵素的に切断された産物、又は他の型の sFlt-1 であり得る。

10

【実施例 10】

【0140】

子癩前症の病歴を有する女性における心血管病態の診断指標としての sFlt-1 タンパク質レベル

子癩前症の病歴を有する女性は、心血管病態を発症する傾向にあることが示されている（例えば Kestenbaumら、Am. J. Kidney Dis. 42: 982-989、2003 を参照されたい）。子癩前症若しくは子癩又は子癩前症若しくは子癩を発症する傾向の診断指標としての sFlt-1 の使用の発見を前提として、sFlt-1 が心血管病態を発症する傾向又は子癩前症の病歴を有する女性のイベントの診断指標としても使用できるかどうかを決定するために研究を行った。この研究の結果を表 5 に示す。

20

【0141】

マサチューセッツ総合病院の Ravi Thadhani 博士との共同研究で、マサチューセッツ工科大学の総合臨床研究センターにおいて、子癩前症の病歴を有する 29 人の正常血圧女性と、産後 18.0 ± 9.7 ヶ月の先の正常妊娠を有する 32 人の正常血圧女性について検査した。子癩前症はしばしば出産近くに現れ、他の障害は早産をもたらすため、妊娠結果の誤分類を避けるため、全ての正常血圧女性は満期出産した（> 38 週）。最近の妊娠、糖尿病又は妊娠性糖尿病の病歴、慢性高血圧、タンパク尿症又は血清クレアチニン > 1.0 mg/dL を有する女性を除外した。同意書を提出後、被験者は病歴の聴取及び身体検査並びに尿による妊娠検査を受けた。一晩の断食後の朝、遊離の VEGF 及び sFlt-1 を測定するために血液を採取した。サンプルを直ちに処理し、-80

30

で 18 ヶ月以内保存し、現行の研究のためにのみ融解した。sFlt-1 及び遊離の VEGF に市販の ELISA キットを用いた（R&D systems、ミネソタ州、米国）。sFlt-1 及び VEGF に関するアッセイ内とアッセイ間の変動係数（CV）はそれぞれ 3.5 と 5.6、及び 8.1 と 10.9 であった。妊娠結果について盲目の技術者によって全てのサンプルは 2 回試験した。

40

【0142】

妊娠結果群間の一変量比較を、必要に応じて 2 群 t 検定、ウィルコクソンの順位和検定、又はフィッシャーの正確確立検定を用いて行った。ロジスティック回帰を用いて産後マーカーレベルを提示した先の子癩前症についてオッズ比を計算し、潜在的交絡を調整した。

【0143】

【表 5】

妊娠結果による産後 s F l t - 1 データ

	子癇前症 N=29	正常血圧 N=32	P
年齢 (歳)	33.7 ± 5.8	30.7 ± 7.1	0.08
人種 (%白人)	86	84	0.6
産後月数	18.0 ± 10	18.0 ± 10	1.0
肥満度指数 (kg/m ²)	29.2 ± 7.8	25.0 ± 5.8	0.02
収縮期血圧 (mmHg)	111 ± 10	105 ± 8	0.01
拡張期血圧 (mmHg)	73 ± 10	68 ± 7	0.04
平均動脈圧 (mmHg) *	86 ± 10	81 ± 7	0.01
経口又は皮下避妊 (%)	31	34	0.8
空腹時血糖 (mg/dL)	81 ± 7	80 ± 6	0.5
可溶性 f m s 様チロシン キナーゼ (pg/ml)	41.6 ± 6.7	30.4 ± 10.2	<0.01

連続型変数を必要に応じて平均±標準偏差又は中央値 (四分位範囲) で報告する

【0144】

これらの結果は、妊娠中子癇前症の病歴を有する女性は、妊娠後の長期間、s F l t - 1 レベルが上昇することを示した。統計解析が、子癇前症又は子癇の病歴を有する女性は心血管病態を発症する傾向があることを示していることを前提として、これらの結果は、心血管病態又は心血管病態を発症する傾向の診断指標としての s F l t - 1 産後レベルの使用を指示している。

【実施例 11】

【0145】

子癇前症の診断指標としての尿 P l G F レベル

VEGF、s F l t - 1、及び P l G F の血清測定値を得ることが最前でない状況では、代替の、あまり侵襲性でないスクリーニング法はこれらのタンパク質を尿中で測定することであり得る。s F l t - 1 は非常に大きい分子である (110 kDa) ため、タンパク尿症でなければ尿中にろ過されないが、P l G F 及び V E G F はずっと小さなタンパク質である (それぞれ ~ 30 kDa 及び 45 kDa) ため、容易にろ過される。完全に循環血液に由来する尿 P l G F とは異なり、尿 V E G F の主な供給源は腎臓自体の細胞：糸球体足細胞及び尿管細胞である。したがって、尿 V E G F は循環血管新生状態を反映しそうにない。保管尿サンプルを用いて、尿 P l G F は高血圧及びタンパク尿症の発症前にかなり低下し、子癇前症を予測するという仮説について試験した。

【0146】

参加者及び標本

C P E P 臨床試験 (実施例 8 を参照されたい) 参加者から、試験参加前、妊娠 26 ~ 29 週、依然として妊娠している場合は 36 週、及び高血圧又はタンパク尿症が記録されたときに血清標本と尿標本を求めた。最初の朝の標本と 24 時間畜尿標本とを求めた；い

れも入手できない場合は無作為の又は「スポット」尿標本を採取した。子癇前症と疑われる患者から24時間畜尿を求めた。「終点標本」とは、子癇前症の徴候の発症（以下に定義）時又は発症後であるが、陣痛及び出産前に得たものを意味する。

【0147】

現行の研究のため、完全な結果情報、妊娠22週より前に得た血清サンプル、及び生産男児を有する女性を選択した。この群は、胎児及び母体のDNAがY染色体上の遺伝子の増幅によって区別された胎児DNAと子癇前症の研究のために先に選択されている。先の研究の解析は、乳児の性別によって母体の血清sFlt-1又はPLGF濃度に有意差がないことを示した。

【0148】

カルシウム補充は、子癇前症の危険性若しくは重篤度（Levineら、上記）、又は血管新生因子の血清（Levineら、N. Engl. J. Med. 350:672-683、2004）若しくは尿の濃度に効果がなかったため、カルシウム補充を受けたかプラセボを受けたかに関係なく女性を選択した。子癇前症を有するそれぞれの女性に関し、1人の正常血圧対照を選択し、記録部位、最初の血清標本採取時の在胎週数、及び-70でのサンプル保存期間に関して一致させた。陣痛前に得た全ての血清及び尿の標本を解析するために合計120の一致させたペアを無作為に選択した。同日に得た尿標本が1より多くある女性の場合、無作為尿標本より最初の朝の標本を、24時間畜尿より無作為を好んで1つの標本を選択した。120の子癇前症症例から348尿標本を、118の正常血圧対照から318の尿標本を特定した。血清試験からの2つの正常血圧対照には適格な尿標本がなく、更なる解析から除外した。

【0149】

妊娠21~32週に対照及び出産前（<37週）に子癇前症を発症した症例から得た尿サンプルを別個に試験した。血清標本は同一女性から3日以内に採取している。出産前子癇前症症例の20人と69人の正常血圧対照から得た尿-血清標本ペアが合計89あった。

【0150】

子癇前症は上記の通り定義した。子癇前症発症時（終点）は、血圧又は尿タンパク測定値が最初に上昇した時点と定義し、子癇前症の診断をもたらず。在胎週数に比して小さい乳児は、米国の人種、出産経歴、及び乳児の性別による在胎週数に対する出生体重表に照らして出生体重が第10パーセンタイル以下の乳児と定義した。

【0151】

手順

出産結果について知らない人員がアッセイした。解析のため、標本を無作為に順位付けした。sFlt-1、遊離のPLGF、及び遊離のVEGFに関する酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を先に記載のように市販のキット（R&D Systems、ミネソタ州）を用いて2重で行った。sFlt-1、PLGF、及びVEGFに関するアッセイの最小検出可能用量は、それぞれ5、7、及び5 pg/mlであり、アッセイ間及びアッセイ内変動係数はそれぞれsFlt-1で7.6及び3.3%；PLGFで10.9及び5.6%；並びにVEGFで7.3及び5.4%であった。市販のピクリン酸比色アッセイ（Metra クレアチニンアッセイキット、Quidel社、カリフォルニア州）を用いて尿クレアチニンを測定した。

【0152】

統計解析

² 検定を用いてカテゴリ変数を比較し；t検定で連続型変数を比較した。明細書及び図面には相加平均濃度を報告しているが、粗解析及びさまざまな標本数の被験者を計上する調整解析にSAS/PROC GENMOD法（SAS v8.0、カーリー、ノースカロライナ州）を用いて対数変換後に統計的検定を行った。ロジスティック回帰分析を用いてオッズ比を補正した。

【0153】

10

20

30

40

50

結果

子癇前症を有する120人の女性のうち、80人は軽度疾患を、40人は重度疾患を有していた。対照と比較して、子癇前症を有する女性は、肥満度指数が大きく、CPEP試験参加時の血圧が高く、最近の妊娠が早産を伴うか又は在胎週数に比して小さい乳児を生ずる割合が大きい。患者と乳児の特徴は先に記載しており、表3に簡単にまとめる。

【0154】

子癇前症発症後の尿P1GFの差

初めに、臨床子癇前症発症後の女性で尿P1GFレベルが変化していることが判明した。子癇前症を有する女性と在胎週数が一致する対照との22のペアの中で、終点標本は対照標本よりもP1GFレベルが低かった(平均P1GFレベル、32対234 pg/ml、 $p < 0.001$; 及び50対227 pg/mgクレアチニン、 $p < 0.001$)。

10

【0155】

尿P1GFの妊娠性変化

妊娠パターンを評価するために、在胎週数期間4~5週に得た尿と、濃度(図9A)又はpg/mgクレアチニン(図9B)で表したP1GFレベルとの断面解析を行った。図9AのP値は、対数変換後、同一在胎週数期間に得た対照標本との比較したものであり、さまざまな標本数の被験者を計上している。臨床子癇前症を既に発症している女性から29~36週に得た標本と、後に子癇前症を発症した女性から29~36週に得た標本との対数変換後の差も有意であった(29~32週の比較で $p < 0.001$ 、33~36週の比較で $p < 0.001$ 、及び37~42週の比較で $p = 0.003$)。子癇前症発症前のP1GF濃度に、高血圧又はタンパク尿症の出現後に得た終点標本は含まれないことに注意されたい。図9Aは、その後子癇前症を発症した女性の、子癇前症発症前5週以内に得た標本を除外後のP1GF平均血清濃度も示す(赤い破線)。図9Bのグラフは、既に臨床子癇前症を発症した女性から29~36週に得た標本と、子癇前症を後に発症した女性から29~36週に得た標本との対数変換後の差も有意であったことを示す(29~32週の比較で $p = 0.004$ 、33~36週の比較で $p < 0.001$ 、37~42週の比較で $p = 0.02$)。

20

【0156】

対照のP1GFレベルは、妊娠第一期及び第二期に増加し、21~24週後により急速に増加し、29~32週にピークに達し、その後低下した。その後子癇前症を発症した女性のレベルも同様のパターンを追ったが、25~28、29~32、及び33~36週で有意に低かった。子癇前症発症前5週以内に得た標本を除外すると、先行する在胎週数期間における対照と後に子癇前症を発症した女性との差はあまり顕著でなかった。同一在胎週数期間に得た標本を有する女性の中で、既に臨床子癇前症を発症した女性は、その後子癇前症を発症した女性よりも、29~32、33~36、及び37~42週における濃度が顕著に低かった。標本の解析を最初の朝(図9C)又は無作為(図9D)尿に限定すると、対照と臨床子癇前症発症前後の症例とのあいだで類似在胎週数パターンが観察された。

30

【0157】

尿P1GFと子癇前症の重篤度との関係

子癇前症発症前、対照の尿P1GFレベルと、その後37週より前に子癇前症を発症した女性又は子癇前症及び在胎週数に比して小さい乳児を有する女性のレベルとのあいだに特に大きな差があった。図10は、妊娠21~32週のP1GF濃度と、pg/mgクレアチニンで表すP1GFを示す。

40

【0158】

尿P1GFレベルの変化も、その後満期前に子癇前症を発症した女性(妊娠<37週)において、満期時に子癇前症を発症した女性(37週)よりも顕著であった(21~32週のP1GF濃度は、満期前に子癇前症を有する女性の87 pg/mlに対し満期時に子癇前症を有する女性で223 pg/ml、 $p < 0.001$; 33~42週のP1GF濃度は、満期前に子癇前症を有する女性の22 pg/mlに対し満期時に子癇前症を有する

50

女性で 118 pg/ml 、 $p < 0.001$)。 pg/mg クレアチニンで表した P l G F を用いた場合又はクレアチニン、標本採取時の在胎週数、保存期間、肥満度指数、及び母体年齢に対して P l G F 濃度を補正した後で、結果は類似していた。更に、後に子癩前症を発症し、在胎週数に比して小さい乳児を有する女性から子癩前症発症前に得た標本の P l G F レベルは、後に子癩前症を発症したが、乳児は在胎週数に比して小さくない女性のレベルよりも低かった (21 ~ 32 週の P l G F 濃度は 62 対 205 pg/ml 、 $p = 0.002$; 33 ~ 42 週の P l G F 濃度は 42 対 123 pg/ml 、 $p = 0.06$)。

【 0 1 5 9 】

尿 P l G F に関連した、子癩前症に関するオッズ比

臨床徴候発症前に得た標本の尿 P l G F に照らして子癩前症の危険性を決定するため、対照における分布に基づいて P l G F 値を四分位数に分け、最高四分位数と比較して (表 6) 又は他の全ての四分位数と比較して (以下に記載)、各四分位数について子癩前症に関する補正オッズ比を計算した。

【 0 1 6 0 】

【表6】

尿P1GFの四分位数*による妊娠37週前及び妊娠37週以降の子癩前症のオッズ比

P1GF	対照 標本数	PE<37週		PE≥37週	
		標本数	OR(95%CI)**	標本数	OR(95%CI)**
13-20週					
Q1: ≤29 pg/ml	25	6	0.6 (0.2-2.4)	19	0.9 (0.3-2.3)
Q2: 29-59 pg/ml	24	12	1.3 (0.4-4.3)	25	1.4 (0.6-3.3)
Q3: 59-88 pg/ml	24	5	0.7 (0.2-2.7)	19	1.1 (0.5-2.8)
Q4: >88 pg/ml	24	6	1.0	17	1.0
21-32週					
Q1: ≤118 pg/ml	29	30	31.3 (5.6-174.7)	33	2.2 (1.0-5.1)
Q2: 118-230 pg/ml	29	4	2.6 (0.4-16.8)	21	1.3 (0.6-3.0)
Q3: 230-309 pg/ml	29	1	0.6 (0.1-7.6)	11	0.7 (0.3-1.7)
Q4: >309pg/ml	29	2	1.0	18	1.0
33-41週					
Q1: ≤55pg/ml	25	2	N/A	31	4.2 (1.4-12.5)
Q2: 55-113pg/ml	25	0	N/A	21	2.5 (0.8-7.7)
Q3: 113-318pg/ml	25	0	N/A	17	2.1 (0.7-6.5)
Q4: >318pg/ml	24	0	N/A	6	1.0
pg P1GF/mgクレアチニン					
13-20週					
Q1 ≤26 pg/mg	25	8	0.5 (0.1-2.2)	21	0.9 (0.3-2.5)
Q2: 26-52pg/mg	24	9	0.7 (0.2-3.0)	25	1.3 (0.5-3.2)
Q3: 52-78pg/mg	24	5	0.4 (0.1-1.8)	15	0.8 (0.3-2.2)
Q4: >78pg/mg	24	7	1.0	19	1.0
21-32週					
Q1: ≤120 pg/mg	29	29	15.4 (3.7-64.3)	33	2.6 (1.1-6.3)
Q2: 120-180pg/ml	29	2	0.9 (0.1-6.1)	13	1.0 (0.4-2.6)
Q3: 180-323pg/mg	29	3	0.9 (0.2-5.1)	22	1.7 (0.7-4.0)
Q4: >323pg/mg	29	3	1.0	15	1.0
33-41週					
Q1: ≤69pg/mg	24	2	N/A	34	2.6 (1.0-6.6)
Q2: 69-153pg/mg	25	0	N/A	23	1.7 (0.6-4.5)
Q3: 153-268pg/mg	25	0	N/A	8	0.6 (0.2-1.8)
Q4: >268pg/mg	24	0	N/A	10	1.0

- ・対照標本に基づいて四分位数を決定した。
- ・標本採取時の在胎週数、標本保存期間、母体の年齢及び肥満度指数に関してオッズ比を調整した(95%信頼区間)。基準カテゴリーは最高四分位数: Q4であった。
- ・症例標本は全て子癩前症の臨床症状発症前に得た。

【0161】

妊娠21~32週に得た標本の中で、最低四分位数のP1GFは、出産前子癩前症の危険性の大きな増加と満期時子癩前症の危険性の小さな増加に関連していた。出産前子癩前症の場合、標本採取時の在胎週数、保存期間、肥満度指数、及び年齢に関して補正後、P1GF濃度を用いた最低四分位数対他の全てに関するオッズ比は22.5、95%信頼区間は7.4~67.8であり; pg P1GF/mgクレアチニンを用いたオッズ比は16.4、95%信頼区間は5.9~45.5であった。標本を最初の朝の尿に限定すると、補正オッズ比は、P1GF濃度について39.5、95%信頼区間は6.5~240.8であり; P1GF/mgクレアチニンについて20.4、95%信頼区間は4.5~92.3であった。無作為尿標本を用いると、補正オッズ比はそれぞれ、13.5、95%

10

20

30

40

50

信頼区間 2.3 ~ 79.8 ; 及び 11.1、95% 信頼区間 2.0 ~ 61.3 であった。満期時子癇前症の場合、上記因子に関して補正後、全ての尿標本を用いると、それぞれ、オッズ比 2.2、95% 信頼区間 1.2 ~ 4.3 ; 及び 2.1、95% 信頼区間 1.1 ~ 4.1 であった。妊娠 13 ~ 20 週に得た標本の場合、最低四分位数の P1GF は、出産前子癇前症の危険性増加にも出産時子癇前症の危険性増加にも関連していなかった。しかしながら、最低四分位数の P1GF は、妊娠 33 ~ 42 週に得た標本の他の全ての四分位数に対し、満期時子癇前症の危険性増加に関連していた : $p g \text{ P1GF} / m g \text{ クレアチニン}$ で補正オッズ比 2.3、95% 信頼区間 1.2 ~ 4.5。

【0162】

子癇前症を在胎週数に比して小さい乳児を伴って発症した女性の妊娠 21 ~ 32 週に得た標本について同一解析を行なったところ、評価は不安定であることを発見した ($p g \text{ P1GF} / m g \text{ クレアチニン}$ に関し補正 OR 405、95% 信頼区間 27 ~ 5983)。これは、そのような女性はわずか 20 人であり、その全てが最低 ($N = 19$) 又は次に低い ($N = 1$) 四分位数の尿 P1GF にあったためである。それにもかかわらず、データは、低尿 P1GF が、在胎週数に比して小さい乳児を伴う子癇前症の危険性の実質的増加に関連していることを示している。

【0163】

個々の女性における尿 P1GF の妊娠変化

図 11 は、縦軸に出産前子癇前症 (子癇前症 < 37 週) を有する 13 人の患者と在胎週数を一致させた標本を有する 13 人の対照の P1GF 濃度変化を表す。少なくとも基本尿、妊娠 21 ~ 32 週以内に得た尿、及び 21 ~ 32 週標本としても役立つかもしれない終点尿を有する、妊娠 37 週より前に子癇前症を発症した 13 人の女性全てが選択された。各症例は、同様の在胎週数に得た標本数が同一か又はそれより多い対照と一致させた。1 人の対照は妊娠を通して尿 P1GF / mg クレアチニンが非常に低かった : 妊娠 116 日、177 日、及び 248 日でそれぞれ 17、5、及び 0 pg / ml。この女性は 1 つのエピソードが 1 + タンパク尿症であり、妊娠 266 日の出産前 2 時間に記録した 1 つの拡張期血圧が 90 mmHg であった。出産前子癇前症を有する患者は通常妊娠を通して P1GF レベルが低かったが、対照はレベルが妊娠の進行とともに増加し、出産近くに低下する傾向を示した。

【0164】

尿 P1GF と子癇前症への近接性との関係

妊娠 21 ~ 32 週に得た標本と子癇前症発症前 5 週以内の標本の尿 P1GF 濃度は (43 pg / ml)、臨床疾患前 5 週よりも以前に得た標本よりも (196 pg / ml、 $p < 0.001$) 低かった。妊娠 33 ~ 42 週で得た標本では、濃度はそれぞれ 110 pg / ml 対 187 pg / ml であった ($p = 0.05$)。P1GF をクレアチニンに関して標準化するとほとんど差はなかった。

【0165】

図 12 A は、69 人の対照及びその後出産前に子癇前症を発症した (< 37 週) 20 人の症例からの 21 ~ 32 週の尿 P1GF 濃度の散布図である。出産前に子癇前症を発症した女性は、尿 P1GF 濃度が正常血圧対照よりも低かった。臨床疾患発症前 5 週以内に得た標本において濃度は最低であった (即ち 150 pg / ml より低い)。しかしながら、多くの対照標本も尿 P1GF が低かった。これらの標本を子癇前症前 5 週以内に得た標本から区別するために、P1GF に対する sFlt-1 の比の血清測定値を調べた。この比は、子癇前症発症前に観察された sFlt-1 の増加と P1GF の低下を説明する。ペアにした血清中の P1GF 濃度に対する sFlt-1 濃度の比の散布図を図 12 B に示す。子癇前症発症前 5 週以内で得た全ての標本で比は増加し (> 5)、ほとんど全ての対照値を超えていた。

【0166】

子癇前症における尿 sFlt-1 と尿 VEGF

臨床子癇前症発症前の妊娠 21 ~ 32 週以内の尿 sFlt-1 と VEGF を解析するた

10

20

30

40

50

めに、22人の症例と22人の対照を無作為に選択した。22症例標本中16(73%)及び22対照標本中19(86%)において、尿sFlt-1が検出できなかった。逆に、尿VEGFは全ての標本で検出されたが、高血圧及びタンパク尿症の発症前又は後の症例で有意な変化はなかった(前:22の無作為に選択された症例及び対照の群においてそれぞれ272対248pg/ml、 $p=0.56$;後:22の在胎週数を一致させた症例及び対照においてそれぞれ167対103pg/ml、 $p=0.61$)。

【0167】

結論

子癇前症を有する120人の女性及び118人の正常血圧対照のこの研究では、その後子癇前症を発症した女性の中で尿P1GF濃度は妊娠25~28週に有意に低下し始めた。29~36週に2群間の差はより顕著になった。血清の遊離のP1GFは妊娠13~16週に症例において対照よりも低くなり始め、妊娠25週にはかなり低くなっていることが先に示されている。血清測定値を用いたときのように、最近の研究では、37週より前に子癇前症を発症したか又は在胎週数に比して小さい乳児を伴う症例及び臨床徴候発症前5週以内の症例において妊娠21~32週の尿P1GFが有意に低下していた。更に、妊娠21~32週に最低四分位数の尿P1GF濃度($<118\text{pg/ml}$)にある女性の中で、妊娠37週より前に子癇前症を発症するか又は在胎週数に比して小さい乳児を伴う危険性は顕著に増加した。尿クレアチニン濃度の補正にかかわらず危険性は高く、無作為尿においてさえも明らかであった。しかしながら、より濃縮されていると思われる最初の朝の標本に関して関連性はより強かった。したがって、尿P1GFは、初期診断から大部分の恩恵を受けるであろう患者の同定に特に有用であった。選択された患者において尿P1GF測定の後、血清のsFlt-1及びP1GF測定を伴う戦略は、尿検査の偽陽性を最小にすることができることも立証した。

【0168】

最近、尿VEGF濃度が重度子癇前症を有する37人の女性において、合併症を伴わない妊娠を有する32人と比較して穏やかに上昇していることが報告された。子癇前症発症前後の尿VEGFの有意でない上昇を発見し、尿VEGFは初期の局所腎VEGF産生を反映するという仮説と一致した。尿VEGFはほぼ全部が腎足細胞及び尿細管細胞に由来するため、非常に大きい分子であるため完全な糸球体を通して自由にろ過されない循環sFlt-1に曝されていない。したがって、子癇前症女性の尿P1GFの低下は循環している遊離のP1GFの低下を反映すると思われるが、過剰な循環sFlt-1に対する結合の結果、尿VEGFレベルは血中の血管新生の不均衡を反映していない。

【0169】

子癇前症の母体症候群を介在すると思われる血管新生タンパク質の同定は、適切な血管新生バランスを回復させる治療行為のための特定標的を提示することができる(Maynardら、上記)。予防及び治療は、在胎週数に比して小さい乳児を伴って、子癇前症又は子癇前症を初期に発症している女性にとって特に必要とされる。しかしながら、そのような女性は、まず臨床疾患発症前に同定されなければならない。これらのデータは、信頼性のある有効な尿検査を開発し、低尿P1GF濃度の女性全てをスクリーニングするために用いることができることを証明している。低尿P1GFレベルと同定されたそのような女性の追跡調査として、次に血清sFlt-1及びP1GFの連続的測定値を用いて危険性の高い個人がより正確に同定されるであろう。

【実施例12】

【0170】

妊娠中期の尿P1GFを示す補助試験は子癇前症を予測する特定判断材料である補助試験を行い、妊娠21~32週の尿P1GFが男児を有する女性と女児を有する女性とのあいだで異なるかどうかを確かめ、妊娠性高血圧を有する女性及び妊娠を通して正常血圧のままであるが在胎週数に比して小さい(SGA)乳児を出産した女性において尿P1GF濃度が正常より低いかどうかを決定した。適切なデータを有するCPEP試験における、染色体異常があると知られていない生産児を出産した4256人の女性の中で、

満期子癇前症（37週）を有する239人を除外した。残った4017人の女性のうち、3303人には、陣痛又は出産前及び子癇前症又は妊娠性高血圧発症前の妊娠21～32週に得た少なくとも1つの尿標本があった。これらの女性の中から、正常血圧妊娠でSGA児でなかった120人、正常血圧妊娠でSGA児を出産した60人、妊娠性高血圧の60人、及び出産前（<37週）子癇前症の59人を無作為に選択した。それぞれの群において、男児を出産した女性の半分と女児を出産した女性の半分を選択し、出産前子癇前症を有する群を除いた。この群では、男児を有する30人を選択したが、女児を有するわずか29人を見出すであろう。妊娠21～32週に得た全ての尿標本についてPLGFを解析した。

【0171】

子癇前症、妊娠性高血圧、在胎週数に比して小さい乳児、及び研究所の審査委員会

子癇前症は、それぞれ4～168時間あけた2回の機会に、新たに上昇した拡張期血圧が少なくとも90mmHg、及びタンパク尿が尿検査で少なくとも1+（30mg/dl）と定義した。重度子癇前症は、HELLP症候群（溶血、肝臓の酵素レベルの上昇、及び血小板数の低下）、子癇、又は重度高血圧（拡張期血圧110mmHg）若しくは重度タンパク尿症（尿タンパク質の排出が3.5g/24時間又は尿検査による検出で3+[300mg/dl]）を有する子癇前症として定義した。妊娠性高血圧は、上記のように定義されたタンパク尿症のない高血圧である。詳細な定義は公開されている（Levineら、N. Engl. J. Med. 337:69-76（1997）及びLevineら、Control Clin. Trials 17:442-469（1996））。子癇前症発症時は、血圧又は尿タンパク質の測定値が最初に上昇したときとして定義され、子癇前症の診断をもたらす。同様に、妊娠性高血圧の発症は、血圧が最初に上昇したときと定義され、診断へと導く。在胎週数に比して小さい乳児とは、出生体重が、米国の人種、出産経歴、及び乳児の性別による在胎週数に対する出生体重表に照らして第10パーセンタイルより少ない乳児である（Zhangら、Obstet. Gynecol. 86:200-208（1995））。研究には特定可能な女性に結び付けられなかったデータ及び標本を用いるため、国立衛生研究所のヒト被験者研究オフィスは、研究所の審査委員会によって検討され、承認される必要性を免除を認めた。

【0172】

手順

妊娠結果について知らない人員によってアッセイが行われた。解析のため、標本を無作為に順位付けした。sFlt-1、遊離のPLGF、及び遊離のVEGFに関する酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を、市販のキット（R&D Systems、ミネソタ州）を用いて先に記載のように2重で行った（Maynardら、上記）。sFlt-1、PLGF、及びVEGFに関するアッセイの最小検出可能用量はそれぞれ5、7、及び5pg/mlであり、アッセイ間及びアッセイ内変動係数はそれぞれsFlt-1で7.6及び3.3%；PLGFで10.9及び5.6%；並びにVEGFで7.3及び5.4%であった。sFlt-1、VEGF、及びPLGFに関するELISAキットは、尿標本の使用に有効であり、加えた尿サンプルからの回収はそれぞれ96%、98%、及び99%であった。尿クレアチニンは市販のピクリン酸比色アッセイ（Metra クレアチニンアッセイキット、Quidel社、カリフォルニア州）を用いて測定した。

【0173】

統計解析

²乗検定を用いてカテゴリ変数を比較し；t検定を用いて連続型変数を比較した。明細書及び図面には相加平均濃度が報告されているが、統計的検定は、個別に対数変換した後、粗解析及びさまざまな標本数の被験者を計上する補正解析に一般化推定方程式（GEE）法（SAS/PROC GENMOD法、SAS v8.0、カリー、ノースカロライナ州）を用いてそれぞれの区間内で行った。ロジスティック回帰分析を用いてオッズ比を補正した。照合が完了したのは全試験集団中の最初の血清標本の解析についてのみであったため、統計解析において照合は説明しなかった。

10

20

30

40

50

【0174】

結果

尿P1GFの低下は初期に発症した子癩前症に特異的であるという仮説を更に試験するために、類似の発症機序を共有するかもしれない他の産科病態を有する女性から21~32週に得た尿標本を解析する第2の試験を行った。妊娠性高血圧を有する女性、及び妊娠を通して正常血圧のままであったがSGA児を出産した女性と、SGA児でなかった正常血圧女性(対照)、及び37週より前に子癩前症を有する女性とを比較した。この試験の女性及び新生児の臨床的特徴を表7にまとめる。子癩前症を有する女性及び乳児の特徴は、主要な研究においてそのような女性に関して報告されてもものと類似していた。

【0175】

【表7】

CPEP参加時の補助試験における女性及び新生児の特徴

特徴	正常血圧 SGAなし (n=120)	正常血圧 SGAあり (n=60)	妊娠性高血圧 (n=60)	PE<37週 (n=59)
年齢(歳)	21.8±4.6	21.3±4.9	22.2±5.3	21.1±4.7
肥満度指数	25.8±6.1	22.8±3.6***	28.3±7.4*	27.6±6.9
収縮期血圧(mmHg)	106±9	106±8	108±9	111±8†
拡張期血圧(mmHg)	60±7	60±8	62±9	65±7***
出産時在胎週数(週)	39.0±1.8	38.7±1.4	39.6±1.7	34.6±2.3***
現喫煙者[n(%)]	15(12.5)	13(21.7)	3(5.0)	4(6.8)
既婚者[n(%)]	34(28.3)	16(26.7)	15(25.4)	16(27.1)
人種/民族 ^φ				
白人、非ヒスパニック系 [n(%)]	46(38.3)	20(33.3)	20(33.3)	16(27.1)
白人、ヒスパニック系 [n(%)]	16(13.3)	16(26.7)	6(10.0)	10(17.0)
アフリカ系アメリカ人 [n(%)]	55(45.8)	24(40.0)	33(55.0)	30(50.9)
その他、不明[n(%)]	3(2.5)	0(0.0)	1(1.7)	3(5.1)
出生児体重(g)	3273±456	2538±278***	3437±559**	2193±726***
<37週前出産[n(%)]	13(10.8)	6(10.0)	3(5.0)	50(84.8)***
在胎週数に比して小さい (<第10パーセンタイル) [n(%)]	0(0.0)	60(100.0)***	2(3.3)	18(30.5)***

記載がない場合は平均±標準偏差を表す

「正常血圧、SGAなし」との差に関するp値

*p=0.02 **p=0.04 ***p<0.01 †p=0.001

^φ人種又は民族は自己申告

【0176】

SGA児でなかった正常血圧女性と比較して、妊娠性高血圧の女性は、肥満度指数が高

10

20

30

40

50

く、乳児の出生体重が大きい；そしてSGA児を有する正常血圧女性は、肥満度指数が小さく、乳児の出生体重が小さい。SGA児を有する正常血圧女性は妊娠中喫煙していた可能性が非常に高く、妊娠性高血圧の女性は、妊娠中喫煙していた可能性が非常に低かった。

【0177】

図13は、妊娠21～32週の尿P1GFを濃度(pg/ml)及びpg/mgクレアチニンで表す。妊娠を通して正常血圧のままであったがSGA乳児を出産した女性のP1GFレベルは、SGA児でなかった正常血圧対照と異ならなかった。同様に、妊娠性高血圧を有する被験者のレベルは、正常血圧対照と異ならなかった。しかしながら、妊娠37週より前に子癇前症を発症した患者の尿P1GFレベルは - 臨床疾患前、平均42日間採取した - 対照よりも非常に低かった(77対206 pg/ml、 $p < 0.0001$)。それぞれの群の中で、男児を出産した女性と女児を出産した女性とのあいだでP1GF濃度は顕著に異ならなかった。

10

【0178】

結論

37週より前に子癇前症を発症した女性の尿P1GFは、妊娠21～32週で、子癇前症と類似する2つの産科病態である妊娠性高血圧を発症した女性又は在胎週数に比して小さい乳児を出産した女性よりも非常に低かった。したがって、この妊娠時期での低尿P1GF濃度は、子癇前症を妊娠性高血圧及び子宮内発育遅延と区別できそうである。

【実施例13】

20

【0179】

子癇前症に対するVEGF₁₂₁療法の有効性を動物モデルにおいて決定するために、SciosのSteve Pollitt博士及びUte Schellenberger博士と共に共同実験を行った。平均体重250gの雌性ラットを用いた。第0日に、全てのラットに 2×10^9 pfuのsFlt-1発現アデノウイルスを注射した。療法の目的は、ヒト子癇前症に関連して見出した濃度を模倣するために、sFlt-1濃度およそ10～20 ng/mlを達成することであった。動物を2群に分けた。動物59～64にPBSを注射して対照とした。動物65～70にVEGF₁₂₁を25 µg/ラットの濃度(およそ100 µg/kg体重)で1日2回、第3～第7日に皮下注射した。

【0180】

30

第7日の午後、VEGFの最終投与からおよそ4～5時間後に動物を屠殺した。血圧を測定した。結果を以下の表7にまとめる。血漿、尿、及び腎組織も得た。血漿sFlt-1レベル及び遊離のVEGFレベルをELISAで測定した。これらのデータも表7にまとめる。

【0181】

循環sFlt-1レベルの変動にもかかわらず、平均して、VEGF₁₂₁療法を受けた動物は血圧低下及びタンパク尿症を示した。これらの結果は、sFlt-1によって誘発される高血圧及びタンパク尿症の有効な処置としてのVEGF₁₂₁の可能性を示唆している。

【0182】

40

【表 8】

表 7 VEGF₁₂₁療法の in vivo 結果

ラット	動物コード	BP	尿 mg アルブミン /mg クレアチン	sFlt-1 ng/ml	遊離の VEGF pg/ml	採血 (時間)*	
1	Flt59	168/118	1460.65	4.6	0	3	
2	Flt60	160/120	3440.32	112.89	0	3	
3	Flt61	175/114	3271.52	122.5	0	4	
4	Flt62	180/120	1478.3	90.09	0	4	
5	Flt63	130/92	1574.8	17.01	0	9	10
6	Flt64	122/90	755.92	1.95	0	9	
平均		156/109	1997	58	0	5	
7	Flt65	104/60	0	1.82	319.26	6	
8	Flt66	144/86	1690.04	122.39	0	6	
9	Flt67	116/82	235.32	1.76	189.34	7	
10	Flt68	102/80	0	5.22	47.6	7	
11	Flt69	128/65	354.95	52.39	0	8	
12	Flt70	116/86	1465.4	100.76	0	8	20
平均		118/77	624	47	93	7	
p 値		0.01	0.03				

* VEGF 最終投与後の採血

【0183】

診断法

本発明は、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向を検出するための診断アッセイを特徴とする。VEGF、PlGF、又はsFlt-1のレベル、遊離のレベルが全量のレベルを被験者サンプルについて測定し、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向の指標として用いる。

30

【0184】

1つの態様では、測定基準を用いて、タンパク質の少なくとも2つのレベル間の関係が子癇前症又は子癇を表示しているかどうかを決定する。標準法を用いて、限定するものではないが尿、血清、血漿、唾液、羊水、又は脳脊髄液を含めた体液のVEGF、PlGF、又はsFlt-1のポリペプチドレベルを測定することができる。そのような方法には、VEGF、PlGF、又はsFlt-1を指向する抗体を用いたイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチアッセイ」、ウエスタンブロッティング、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインA又はG イムノアッセイ、並びにOngら(Obstet. Gynecol. 98: 608-611, 2001)及びSuら(Obstet. Gynecol. 97: 898-904, 2001)に記載のような免疫電気泳動アッセイ及び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、又はsFlt-1のレベルの測定に好ましい方法である。検出の容易さと簡便さ、及び定量的の性質に関して特に好ましいのは、多くの変形が存在するサンドイッチアッセイ又は2抗体アッセイであり、それらの全てが本発明によって意図される。例えば、典型的なサンドイッチアッセイでは、抗原(即ちsFlt-1、PlGF、又はVEGFのポリペプチド)を認識する未標識抗体を固相、例えばマイクロタイタープレートに固定し、試験すべきサンプルを加える。抗体-抗原複合体を形成させる一定時間のインキュベーション後、検出可能シグナルを誘導可能なレポーター分子で標識した2次抗体を加え、異なる部位で抗原と結合させるのに十分な時間インキュベーションを継続し、抗体

40

50

- 抗原 - 標識抗体の複合体を形成する。抗原の存在は、既知量の抗原を含有する対照サンプルとの比較によって定量できるシグナルの観察によって決定される。

【0185】

血清 sFlt-1 レベルの上昇は、子癇前症の陽性指標であるとみなされる。この sFlt-1 値は、好ましくは 2 ng/ml 以上であり得る。更に、レベルの正常レベルに対する sFlt-1、VEGF、又は PlGF の検出可能な変化は、子癇、子癇前症、又はそのような病態発症する傾向の指標である。sFlt-1 を測定することが好ましく、VEGF 及び PlGF の測定をこの測定と組み合わせることがより好ましく、3 つ全てのタンパク質（又はタンパク質レベルの指標である mRNA レベル）を測定することが最も好ましい。更なる好ましい態様では、肥満度指数 (BMI) 及び胎児の在胎週数も測定し、診断測定基準に含める。

10

【0186】

他の態様では、PAAI (sFlt-1 / VEGF + PlGF) を、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向の診断法である抗血管新生指標として用いる。PAAI が 10 より大きい場合、より好ましくは 20 より大きい場合、被験者は、子癇前症、子癇を有するか、又はそれらを発症する切迫した危険性があるとみなされる。PAAI (sFlt-1 / VEGF + PlGF) 比は、診断指標として用いることができる有用な測定基準の単なる 1 例である。本発明を限定することを意図するものではない。実際に、被験者の sFlt-1、PlGF、又は VEGF のいずれかのレベルの正常対照に対する変化を検出する測定基準は診断指標として用いることができる。

20

【0187】

具体的な核酸又はポリペプチドの発現レベルは、具体的な病状（例えば子癇前症又は子癇）と相関するかもしれないが、したがって診断に有用である。sFlt-1、PlGF、又は VEGF の核酸配列に由来するオリゴヌクレオチド又はより長い断片は、発現をモニターするだけでなく、病態を発症する傾向の指標である sFlt-1、PlGF、又は VEGF の核酸分子に遺伝的変異、突然変異、又は多型を有する被験者を同定するためのプローブとして用いることができる。そのような多型は当業者に公知であり、例えば Parry ら (Eur. J. Immunogenet. 26: 321-3, 1999) によって記載されている。GenBank データベース (www.ncbi.nlm.nih.gov) の調査は、Flt-1 / sFlt-1 の遺伝子及びプロモーター領域に少なくとも 330 の公知の多型を示している。これらの多型は sFlt-1 の核酸若しくはポリペプチドの発現レベル又は生物活性に影響し得る。正常な基準サンプルに対する遺伝的変異、突然変異、又は多型の検出は、子癇前症、子癇、又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向の診断指標であり得る。

30

【0188】

そのような遺伝子変化は、sFlt-1 遺伝子のプロモーター配列、オープンリーディングフレーム、イントロン配列、又は 3' 非翻訳領域中に存在し得る。遺伝子変化に関する情報は、被験者を子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向を有すると診断するために用いることができる。全体に記載しているように、sFlt-1、VEGF、及び / 又は PlGF の生物活性レベルの特定の変化は、子癇前症若しくは子癇又はそれらが発症する傾向の可能性と相関し得る。その結果、当該技術分野に熟練した者は、突然変異を検出し、次にタンパク質の生物活性の 1 以上の測定基準をアッセイして、突然変異が子癇前症又は子癇の可能性を引き起こすか又は増加させるかどうかを決定することができる。

40

【0189】

1 つの態様では、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向を有する被験者は、sFlt-1 をコードする核酸の発現増加又は PlGF 若しくは VEGF のレベルの変化を示すであろう。そのような変化を検出する方法は、当該技術分野において標準的なものであり、Ausubel ら、上記、に記載されている。1 つの例では、ノーザンブロットティング又はリアルタイム PCR を用いて sFlt-1、PlGF、又は VEGF の m

50

R N A レベルを検出する。

【 0 1 9 0 】

他の態様では、ゲノム配列又は密接に関連のある分子を含めた s F l t - 1 核酸分子を検出可能な P C R プローブを用いたハイブリダイゼーションを、子癇前症若しくは子癇であるか又はそのような病態を発症する危険性がある被験者に由来する核酸配列をハイブリダイズさせるために用いることができる。プローブの特異性、高度に特異的な領域、例えば 5' 調節領域から作製されているか又は特異性の低い領域、例えば保存モチーフから作製されているか、及びハイブリダイゼーション又は増幅のストリンジェンシー（最高、高、中、又は低）は、プローブが天然配列、対立遺伝子多型、又は他の関連のある配列に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を用いて、子癇前症若しくは子癇の指標である s F l t - 1 核酸分子の突然変異を同定することができ、又は s F l t - 1 ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルをモニターすることができる（例えばノーザン解析によって、A u s u b e l ら、上記）。

10

【 0 1 9 1 】

更に他の態様では、s F l t - 1、V E G F、又は P l G F の核酸分子の配列を直接解析することによって、子癇前症又は子癇を発症する傾向についてヒトを診断することができる。

【 0 1 9 2 】

子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向を有する被験者は、s F l t - 1 ポリペプチドの発現増加を示すであろう。s F l t - 1 ポリペプチドには、全長 s F l t - 1、分解産物、s F l t - 1 の選択的スプライシングアイソフォーム、s F l t - 1 の酵素的切断産物などを含めることができる。s F l t - 1 ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、子癇前症若しくは子癇を診断するため、又はそのような病態を発症する危険性がある被験者を同定するために用いることができる。そのようなポリペプチドの発現の変化を測定するためのさまざまなプロトコールが免疫学的方法（E L I S A 及び R I A など）を含めて知られており、子癇前症若しくは子癇又はそのような病態を発症する危険性を診断するための基準を提供する。やはり、s F l t - 1 ポリペプチドレベル増加は、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向を有する被験者の診断法である。

20

【 0 1 9 3 】

1つの態様では、s F l t - 1、V E G F、若しくは P l G F のポリペプチド又は核酸、あるいはそれらの組み合わせのレベルは、少なくとも2回の異なる時間に測定され、正常な基準レベルと比較した長期にわたるレベルの変化は、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向の指標として用いられる。他の態様では、s F l t - 1、V E G F、若しくは P l G F のポリペプチド又は核酸、あるいはそれらの組み合わせのレベルは、基準サンプルのレベルと比較される。

30

【 0 1 9 4 】

s F l t - 1、V E G F、又は P l G F のポリペプチドレベルは、検量線と比較して、ポリペプチドレベルの「正常範囲」内にあるかどうかを決定することもできる。この態様では、比較のための精製又は組換え型（例えば純度 80%、90%、95%、99% より高いか又は 100%）のポリペプチドを用いて、それぞれのポリペプチドについて検量線を作成する。検量線を作成し、同一ポリペプチドについて作成した検量線と比較することによってポリペプチド濃度を決定する。例えば、s F l t - 1 について検量線を作成することができ、検量線と比較して 2 n g / m L より多い s F l t - 1 濃度を有する被験者サンプルは、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向の指標とみなされる。

40

【 0 1 9 5 】

子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向を有する被験者の体液中の s F l t - 1、V E G F、又は P l G F のレベルは、正常対照の s F l t - 1、V E G F、又は P l G F のレベルに対し、わずか 10%、20%、30%、又は 40%、あるいは 50%、60%、70%、80%、又は 90% 以上までも変化し得る（増加又は低下）。子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向を有する被験者の体液中に存在する s F l

50

t - 1 レベルは、正常対照被験者のレベルに対し、1.5倍、2倍、3倍、4倍まで、または10倍以上でさえも増加し得る。

【0196】

1つの態様では、被験者の体液サンプル（例えば尿、血漿、血清、羊水、又は脳脊髄液）を子癇前症症状発症前の妊娠初期に採取する。他の例では、サンプルは、子癇前症症状発症前の妊娠初期に採取した組織又は細胞であり得る。非限定的な例には、胎盤組織、胎盤細胞、内皮細胞、及び単球のようなリンパ球が含まれる。ヒトでは、例えば、母体血清サンプルを妊娠女性の肘正中静脈から妊娠第一期、第二期、又は第三期に採取する。妊娠第一期のあいだ、例えば4、6、8、10、若しくは12週に、又は妊娠第二期のあいだ、例えば14、16、18、20、22、若しくは24週にアッセイを実施することが好ましい。そのようなアッセイは、妊娠第二期後期又は妊娠第三期、例えば26、28、30、32、34、36、37、38、39、若しくは40週に実施してもよい。この期間のあいだにsFlt-1、VEGF、又はPLGFのレベルを2回測定することが好ましい。産後の子癇前症又は子癇の診断には、sFlt-1、VEGF、又はPLGFのアッセイを産後に実施してもよい。

10

【0197】

1つの具体的例では、妊娠のあいだ連続血液サンプルを採取することができ、可溶性sFlt-1レベルはELISAによって決定される。この技術を用いた1つの研究では、sFlt-1をコードする選択的にスプライシングされたmRNAが栄養膜細胞によって非常に多く発現され、妊娠女性の血漿においてタンパク質を容易に検出可能であった。妊娠20~36週におよそ3倍に増加したsFlt-1レベルを観察した。その後子癇前症を発症した高危険率女性においてレベルが顕著に高いことが観察された(Charnock-Jonesら、J. Soc. Gynecol. Invest. 10(2):230、2003)。

20

【0198】

1つの好ましい態様では、体液サンプル、好ましくは尿のPLGFポリペプチドレベルが測定され、子癇前症、子癇、又はそれらを発症する傾向の診断指標として用いられる。尿のPLGFポリペプチドレベルの測定は、子癇前症又は子癇の潜在的危険性の初期評価として用いることもでき、PLGF測定によって「危険性がある」と決定された女性は、その後、本明細書に記載のもの又は当該技術分野に公知のもののような更なる診断アッセイを受けることができる。1つの例では、尿サンプルのPLGFポリペプチド測定によって子癇前症又は子癇を発症する危険性があると診断された女性は、上記のようなVEGF、sFlt-1、及び/又はPLGFのレベルの血清解析によって更にモニターされる。他の例では、これらのポリペプチドのそれぞれの血清値を用いてPAAIが決定される。PLGFの尿解析によって子癇前症又は子癇を発症する危険性があると同定された女性は、妊娠前、妊娠中（例えば毎月、3週間ごと、2週間ごと、毎週、3日ごと、1日おき、又は毎日）、又は妊娠後に日常的にモニターされることができる。

30

【0199】

遊離型PLGFの平均分子量は約30kDaであり、非常に小さいため、腎臓でろ過されて尿に放出される。PLGFは、sFlt-1と複合体を形成すると、分子量が非常に大きくなり、したがって、尿に放出されないであろう。理論に拘束されるものではないが、発明者らは、子癇前症のあいだ、sFlt-1レベルが増加すると、sFlt-1はPLGFと複合体を形成することができ、尿に放出される遊離のPLGFレベルが低下することを発見した。その結果、遊離のPLGFレベルについての尿解析を用いて、子癇前症若しくは子癇、又はそれらを有する危険性のある患者を診断することができる。遊離のPLGFを検出するには、遊離のPLGFを特異的に認識する抗体をこれらのアッセイに用いることが好ましい。そのような抗体は、例えばPLGFのsFlt-1結合ドメインを認識することができる。そのような特異的抗体の例には、ヒトPLGF ELISAキット(カタログ番号DGG00、R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州)に用いるキャプチャー抗体、抗胎盤成長因子モノクローナル抗体(クローン37203.1

40

50

11、シグマ - アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州)が含まれる。これらの抗体は、ヒト P L G F タンパク質の N 端領域の特異配列を認識する。P L G F の s F l t - 1 結合領域は P L G F タンパク質の 39 ~ 105 アミノ酸にあり、P L G F の全長は P L G F のアイソフォームに応じて 149 ~ 221 アミノ酸で変化する。更なる好ましい抗体には、N 端領域 (P L G F の 39 ~ 105 アミノ酸が好ましい) を認識し、遊離の P L G F に特異的に結合するが、s F l t - 1 に結合した P L G F には結合しない抗体が含まれる。C 端に対して作製した抗体はこの特性を有さないであろう。

【0200】

本発明の診断アッセイのいずれかを用いて、被験者サンプルの P L G F レベルを基準サンプルと比較し、相対レベルを決定することができる。基準サンプルは、診断アッセイの所望の使用に応じて、子癇前症を有する患者の尿サンプル (通常、遊離の P L G F レベルは 400 p g / m l より低く、好ましくは 200 p g / m l より低い) であるか、又は正常尿サンプル (P L G F 濃度が 200 p g / m l ~ 800 p g / m l) であることができる。P L G F レベルは、基準値又は標準を比較して、絶対レベルを決定することもできる。基準値又は標準は、比較のための P L G F の精製型又は組換え型 (例えば純度が 80 %、90 %、95 %、99 % より高いか又は 100 %) に基づいて作成した検量線を用いて決定することができる。400 p g / m l より低い P L G F 値、好ましくは 200 p g / m l より低い値、最も好ましくは 100 p g / m l より低い値か、又は 200 p g / m g クレアチニンより低い P L G F / クレアチニン値、好ましくは 100 p g / m g クレアチニンより低い値は、子癇前症若しくは子癇、又はそれらを有する危険性のある患者の診断指標とみなされる。検量線には、10 p g / m l ~ 1 n g / m l の組換え P L G F を用いることができる。検量線の作成に使用できる組換えタンパク質の他の例には、P L G F のアミノ末端を包含する特定ペプチド、好ましくは P L G F タンパク質の 39 ~ 105 アミノ酸 (s F l t - 1 に結合する P L G F の領域) が含まれる。あるいは、組換え P L G F / V E G F ヘテロダイマー (カタログ番号 297 - V P として市販されている、R & D S y s t e m s、ミネソタ州) を用いることもできる。後者は、このタンパク質は遊離の V E G F の測定における V E G F の検量線を作成するために用いることもできるという利点を有する。

【0201】

E L I S A アッセイは、遊離の P L G F レベルを測定する好ましい方法である。検出の容易さと簡便さ、及び定量的性質に関して特に好ましいのは、多くの変形が存在するサンドイッチアッセイ又は 2 抗体 E L I S A アッセイであり、それらの全ては本発明に意図される。例えば、典型的なサンドイッチアッセイでは、P L G F ポリペプチドを認識する未標識抗体が固相、例えばマイクロタイタープレートに固定し、試験すべきサンプルを加える。抗体 - 抗原複合体を形成させるために一定期間インキュベーションした後、検出可能シグナルを誘発可能なレポーター分子で標識した 2 次抗体を加え、異なる部位で抗原と結合させるのに十分な時間インキュベーションを継続し、抗体 - 抗原 - 標識抗体の複合体を形成する。抗原の存在は、既知量の抗原を含有する対象サンプルとの比較によって定量できるシグナルの観察によって決定される。

【0202】

定量サンドイッチ E L I S A の例では、固体支持体 (例えばマイクロタイタープレート又はメンブラン) は予め抗 P L G F 結合物質 (例えば 1 次抗体) でコーティングされる。標準又はサンプルを基質に加えると、存在する場合は P L G F が抗体に結合するであろう。やはり P L G F を認識する酵素結合抗体の標準的調整品を次に加え、プレートに固定された P L G F を「サンドイッチ」する。基質を加え、酵素と基質を短時間のインキュベーションで反応させる。酵素 - 基質反応を終了させ、公知の方法で変化を測定する (例えば目で、分光光度計を用いて、又は化学発光を測定して)。そのようなアッセイを用いて P L G F の相対レベル (例えば基準サンプル、標準、又はレベルのレベルと比較して) を決定することができ、又は P L G F 絶対濃度を決定することができる。非常に所望であれば、さまざまな濃度の精製 P L G F の較正基準セットを用いて P L G F 濃度を決定すること

ができる。校正基準は同一時間にアッセイされ、サンプルとして例えば光学密度によって測定した P L G F 濃度に対する検量線を作成するために用いられる。次にサンプル中の P L G F 濃度を、例えばサンプルの光学密度を検量線と比較することによって決定する。正常妊娠の妊娠中期及び妊娠後期の P L G F 濃度は、母親の在胎週数に応じて 200 ~ 800 pg / ml であろう。400 pg / ml より低い尿 P L G F 値、好ましくは 200 pg / ml より低い値、又は 200 pg / mg クレアチニンより低い尿 P L G F 値は、子癩前症の診断法であろう。一般に、E L I S A キットの検量線は、濃度範囲 10 pg / ml ~ 1 ng / ml の組換え又は精製 P L G F を含むであろう。

【0203】

他の例では、尿サンプル中の P L G F を検出するアッセイには、遊離の P L G F に結合したときと遊離の P L G F に結合していないときの P L G F を区別できるような方法で検出可能に標識した固定された P L G F 結合物質を有するメンブランが含まれる。好ましい標識には蛍光標識が含まれる。メンブランは P L G F 結合物質をサンプル中に存在する遊離の P L G F に結合させるのに十分な時間、サンプルに曝される。次に遊離の P L G F に結合した標識 P L G F 結合物質を測定する。そのようなアッセイを用いて、上記のように、P L G F の相対レベルを決定することができ（例えば基準サンプル又は標準又はレベルからのレベルと比較して）、又は P L G F の絶対濃度を決定することができる。結合を測定するための好ましいアッセイには蛍光イムノアッセイが含まれる。

10

【0204】

他の例では、尿サンプル中の P L G F を検出するためのアッセイには、無水標識（例えば比色検出用）P L G F 結合物質（1次物質）及び固定された抗 P L G F 結合物質（2次物質）を有するメンブランが含まれる。メンブランをサンプルに曝す。サンプルは標識 P L G F 結合物質を再水和し、P L G F がサンプル中存在する場合は P L G F 結合物質に結合するであろう。P L G F - 1次物質複合体は毛細管移動によってメンブランに落下移動し、固定された2次物質と相互作用するであろう。この相互作用は、2次物質が固定された位置で比色標識から可視線を生ずるであろう。

20

【0205】

他の例では、尿サンプル中の P L G F を検出するアッセイには、無水標識（例えば比色検出用）P L G F 結合物質（1次物質）及び固定された抗 P L G F 結合物質（2次物質）を有するメンブランが含まれる。また、メンブランは、やはりメンブランに固定された精製 P L G F を閾値濃度で含む。この例では、メンブランは尿サンプルに曝される。サンプルは標識1次物質を再水和し、閾値濃度よりも高濃度で P L G F がサンプル中に存在する場合は P L G F 結合物質に結合するであろう。P L G F - 標識1次物質複合体は毛細管移動によってメンブランに落下移動する。1次物質はサンプル由来の P L G F に既に結合しているので、固定された精製 P L G F には結合せず、この「試験」位置には可視線は現れないであろう。P L G F - 1次物質複合体はメンブランに向かって落下し続け、固定された2次物質と相互作用するであろう。この相互作用は、抗 P L G F 結合物質が固定された「対照」位置で比色標識から可視線を生ずるであろう。この例では、たった1本の可視線が現れ、閾値濃度よりも高い P L G F 濃度を示すであろう。P L G F 濃度が閾値濃度より低い場合は、標識1次物質は固定された P L G F に結合し、「対照」位置に加えてこの「試験」位置にも可視線が現れるであろう。試験アッセイは、サンプル中の P L G F のいくつかの濃度を検出するために複数の試験ラインを含めることもできる。そのような段階的アッセイは米国特許第 6, 660, 534 号に記載されている。

30

40

【0206】

他の例では、類似のメンブランに基づいたアッセイを用いるが、標準サンドイッチ E L I S A 法に基づいている。この例では、メンブランは、酵素に結合した固定された1次 P L G F 結合物質を有する反応ゾーン；P L G F のある領域に結合するが第1の P L G F 結合物質は結合しない他の固定された P L G F 結合物質を有する試験ゾーン；及び1次 P L G F 結合物質を認識する固定された物質を有する対照ゾーンを含む。第1の固定された P L G F 結合物質に結合した酵素に対する検出可能基質が試験ゾーンにも対照ゾーンにも含

50

まれる。メンブランをサンプルに曝すと、サンプルは毛管作用によって反応ゾーンに移動する。P L G F がサンプル中に存在する場合は酵素に結合した第 1 の固定された P L G F 結合物質に結合し、複合体を形成し、そして毛管流動によって試験ゾーンへ運ばれるであろう。次に、P L G F - 酵素に結合した固定された P L G F 結合物質複合体は第 2 の P L G F 結合物質に結合し、固定された第 2 の P L G F 結合物質（「試験」ゾーン）の位置で可視線を形成する。残りの第 1 の P L G F 結合物質は、毛管流動によって運ばれ、第 1 の結合物質を認識するか又は結合する固定された物質に結合し、この位置（「対照」ゾーン）に可視線を生ずるのである。P L G F がサンプル中に存在しない場合は第 2 の線のみが対照ゾーンに現れるであろう。好ましい態様では、第 1 及び第 2 の P L G F 結合物質は抗体であり、第 1 の結合物質を認識するか又は結合する物質は、第 1 の抗体の免疫グロブリンを特異的に認識する 2 次抗免疫グロブリン抗体である。標準量の精製 P L G F タンパク質を用いて試験ゾーンの線の強度を比較してアッセイし、サンプルが閾値濃度より多いか又は少ない P L G F を含有するかどうかを決定することができる。

10

【0207】

本明細書に記載のアッセイでは、正常妊娠血清を更なる対照として用いることができ、P L G F 活性を測定し、正常妊娠血清から測定された P L G F 活性の割合として定量することができる。

【0208】

本明細書に記載のアッセイでは、サンプルは如何なる体液でもよい。P L G F に基づいた診断アッセイには尿サンプルが好ましい。メンブランは標準のディップスティック型形式でも側方流動形式でもよい。ディップスティック型のアッセイは、妊娠検査（その場合はホルモンレベルを測定）、又は腎疾患の診断におけるクレアチニン若しくはアルブミンの尿検査による検出のようなアッセイに関して当該技術分野に公知である。ディップスティック型アッセイのさまざまな形式の例は、本明細書に援用される米国特許第 6, 6 6 0, 5 3 4 号に記載されている。

20

【0209】

上記 P L G F 検出アッセイは、単独で又は本明細書若しくは当該技術分野に記載されている更なる診断アッセイと組み合わせて使用することができる。好ましい態様では、P L G F 診断アッセイを初期スクリーニングとして使用し、本明細書に記載のような血清 s F 1 t - 1、P L G F 及び / 又は V E G F のレベルの測定のためのアッセイが続く。このように、「危険性のある」患者を同定し、注意深くモニターし、又はより高精度の診断のために更にスクリーニングすることができる。

30

【0210】

上記の P L G F に基づいた診断アッセイの好ましい態様では、P L G F 結合物質は、P L G F 又は P L G F と相互作用するタンパク質若しくはペプチドを認識する 1 次抗体であることが好ましい。2 次抗 P L G F 結合物質は、1 次抗体又は 1 次抗体に結合するタンパク質（例えばプロテイン A 又はプロテイン G）を認識する 2 次抗体、あるいは P L G F と相互作用するペプチドに特異的に結合する抗体であることが好ましい。P L G F 結合物質が酵素で標識された態様では、用いる酵素は、目で検出及び / 又は分光分析で測定できる比色反応を触媒することが好ましい。好ましい酵素 / 基質の組み合わせの非限定的な例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ / T M B、 α -ガラクトシダーゼ / X G A L、及びアルカリホスファターゼ / 1, 2 - ジオキセタンである。標識 P L G F 結合物質を含む態様の場合、好ましい標識には比色（例えば金コロイド）、化学発光、又は蛍光標識が含まれる。

40

【0211】

獣医学診療では、妊娠中いつでもアッセイを行うことができるが、子癇前症症状発症前の妊娠初期に行うことが好ましい。妊娠期間が種間で広く変化することを考えると、アッセイのタイミングは獣医によって決定されが、一般にヒトの妊娠中のアッセイのタイミングに対応するであろう。

【0212】

本明細書に記載の診断法は、個別に用いても、又は子癇前症若しくは子癇の存在、重篤

50

度又は発症の推定時期をより正確に診断するために本明細書に記載の他の診断法と組み合わせ用いてもよい。更に、本明細書に記載の診断法は、子癇前症若しくは子癇の存在、重篤度又は発症の推定時期の正確な診断に有用であると断定された他の診断法と組み合わせ用いることができる。

【0213】

本明細書に記載の診断法は、被験者の子癇前症又は子癇をモニターし、管理するために用いることもできる。1つの例では、被験者が、血清sFlt-タンパク質レベルが10ng/mL、血清の遊離のPlGFレベルが100pg/mLであると断定された場合、血清PlGFレベルがおよそ400pg/mLに上昇するまでVEGFを投与することができる。この態様では、疾患を診断するだけでなく子癇前症及び子癇の処置及び管理をモニターする方法として、sFlt-1、PlGF、及びVEGFのレベル、又はこれらの全てを繰り返し測定する。上記のように、正常妊娠では、妊娠20週後の尿PlGFレベルは200~800pg/mL又は200~800pg/mgクレアチニンの範囲である。400pg/mLより低いPlGF値、好ましくは200pg/mLより低い値又は尿サンプルの200pg/mgクレアチニンよりも低い値は、子癇前症又は子癇前症を発症する傾向の診断法であるとみなされる。

10

【0214】

また、本発明は、心血管病態又は心血管病態を発症する傾向を検出するための診断アッセイを特徴とする。好ましい態様では、子癇前症又は子癇の病歴のある女性のsFlt-1レベルを測定し、基準サンプルのsFlt-1レベルと比較する。基準サンプルは、以前に妊娠していたか又は子癇前症若しくは子癇の病歴のない女性から採取したサンプルを含むことが好ましい。sFlt-1のポリペプチド又は核酸のレベルの基準サンプルに対する変化は、心血管病態を診断し、又は心血管病態を発症する傾向を予測するために用いることができる。sFlt-1、PlGF、又はVEGFの核酸配列の基準サンプルに対する変化も、心血管病態を診断し、又は心血管病態を発症する傾向を予測するために用いることができる。上記の診断法及び測定基準を用いて、子癇前症又は子癇の病歴のある女性を産後モニターし、又は心血管病態を診断し、又は心血管病態を発症する傾向を予測することができる。産後モニタリングは定期的に（例えば、1ヶ月に1回、6ヶ月に1回、毎年、1年おき、又はもっと少なく）実施し、診断、予測、又は将来の心血管イベント若しくは病態の予防を補助することができる。

20

30

【0215】

診断キット

また、本発明は、上記診断アッセイの実施に必要な成分、及び成分の使用説明書を含む、子癇前症若しくは子癇又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向を診断するための診断試験キットを提供する。例えば、診断試験キットは、sFlt-1、VEGF、又はPlGFに対する抗体、並びに抗体とsFlt-1、VEGF、又はPlGFのポリペプチドとの結合を検出し及びより好ましくは評価するのに有用な成分を含めることができる。検出には、抗体か、sFlt-1、VEGF、又はPlGFのポリペプチドのいずれかを標識し、抗体か、sFlt-1、VEGF、又はPlGFのポリペプチドのいずれかを基質に結合させ、その結果、sFlt-1、VEGF、又はPlGFのポリペプチド-抗体相互作用が、抗体とsFlt-1、VEGF、又はPlGFのポリペプチドとの結合後、基質に結合した標識の量を測定することによって立証できる。1つの例では、キットは、PlGF結合物質とPlGFの存在を検出するための成分とを含む。慣用のELISA又はサンドイッチELISAは抗体-基質相互作用を検出するための一般的で公知の方法であり、本発明のキットを提供できる。sFlt-1、VEGF、又はPlGFのポリペプチドは、限定されるものではないが尿、血清、血漿、唾液、羊水、又は脳脊髄液を含めた如何なる体液においても実際に検出できる。sFlt-1、VEGF、又はPlGFのポリペプチドレベルの、正常対照に存在するレベルのような基準に対する変化を測定するキットは、本発明の方法における診断キットとして有用である。キットは、sFlt-1、VEGF、又はPlGFのレベルを検出するために用いるアッセイで標準として用いられる

40

50

精製タンパク質を含むこともできる。キットはキットの使用説明書を含有することが望ましい。1つの例では、キットは、子癇前症、子癇、又は子癇前症若しくは子癇を発症する傾向を診断するためのキットの使用説明書を含有する。他の例では、キットは、心血管病態又は心血管病態を発症する傾向を診断するための説明書を含有する。更に他の例では、キットは、治療的処置又は用量をモニターするためのキットの使用説明書を含有する。

【0216】

本発明の1つの態様では、そのようなキットは、1次物質（例えば、抗原を認識する抗体又はタンパク質）でコーティングされた固体支持体（例えばメンブラン又はマイクロタイタープレート）、検量線を作成するための精製タンパク質の標準溶液、分析実行の品質検査のための体液（例えば血清又は尿）対照、西洋ワサビペルオキシダーゼ若しくは標識された他のもののような標識又は酵素に結合した2次物質（例えば、検出すべき抗原の第2のエピトープに反応する2次抗体又は1次抗体を認識する抗体若しくはタンパク質）、基質溶液、終止溶液、洗浄バッファー、及び指示マニュアルを含む。

10

【0217】

スクリーニングアッセイ

上で論じたように、sFlt-1の核酸又はポリペプチドの発現は、子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向のある被験者において増加する。こうした発見に基づき、本発明の組成物は、子癇前症又は子癇の被験者では変化しているsFlt-1、VEGF、又はPLGFのポリペプチド又は核酸分子の発現を調節するものを同定するための候補化合物のハイスループット低コストスクリーニングに有用である。

20

【0218】

sFlt-1、VEGF、又はPLGFの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の実施に多くの方法が利用できる。1つの実施例では、候補化合物は、sFlt-1、VEGF、又はPLGFの核酸配列を発現する培養細胞の培地にさまざまな濃度で加えられる。次に、例えばマイクロアレイ解析、ノーザンブロット解析（Ausubelら、上記）、又はRT-PCRによって、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した適当な断片を用いて遺伝子発現を測定する。候補化合物存在下での遺伝子発現レベルを、候補化合物のない対照培地で測定したレベルと比較する。VEGF若しくはPLGFの遺伝子、核酸分子、又はポリペプチドの発現増加、あるいはsFlt-1の遺伝子、核酸分子、又はポリペプチドの発現低下のような変化を促進する化合物、又はその機能的同等物は、本発明に有用であると思われる；そのような分子は、例えば被験者の子癇前症又は子癇を処置するための療法として用いることができる。

30

【0219】

他の実施例では、候補化合物の効果は、sFlt-1、VEGF、又はPLGFのポリペプチドに特異的な抗体を用いたウエスタンブロットティング又は免疫沈降のような同様の一般的アプローチ及び標準免疫学的技術を用いてポリペプチド産生レベルで測定することができる。例えば、イムノアッセイは、生体における本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つの発現を検出し、モニターするために用いることができる。そのようなポリペプチドに結合可能なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体（上記のように製造）は、標準的イムノアッセイ形式（例えばELISA、ウエスタンブロット、又はRIAアッセイ）に用いて、ポリペプチドレベルを測定することができる。ある態様では、VEGF若しくはPLGFのポリペプチドの発現又は生物活性の増加、あるいはsFlt-1ポリペプチドの発現又は生物活性の低下のような変化を促進する化合物は特に有用であると思われる。やはり、そのような分子は、例えば被験者の子癇前症若しくは子癇、又は子癇前症若しくは子癇の症状を遅延させ、改善し、又は処置するための療法として用いることができる。

40

【0220】

更に他の実施例では、sFlt-1、VEGF、又はPLGFのポリペプチドに特異的に結合するものに関し、候補化合物をスクリーニングすることができる。そのような候補

50

化合物の有効性は、そのようなポリペプチド又はその機能的同等物と相互作用する能力に依存する。そのような相互作用は、多くの標準結合技術及び機能分析（例えばA u s u b e lら、上記に記載のもの）を用いて容易にアッセイすることができる。1つの態様では、候補化合物を、本発明のポリペプチドに特異的に結合する能力について*in vitro*で試験することができる。他の態様では、s F l t - 1ポリペプチドとV E G F又はP l G Fのような成長因子との結合を低下させることによってs F l t - 1ポリペプチドの生物活性を低下させる能力について候補化合物を試験する。

【0221】

他の実施例では、s F l t - 1、V E G F、又はP l G Fの核酸は、検出可能レポーターとの転写融合体又は翻訳融合体として発現し、誘導性プロモーターのような異種プロモーターの制御下、単離細胞（例えば哺乳動物細胞又は昆虫細胞）中で発現する。次に融合タンパク質発現細胞を候補化合物と接触させ、その細胞内での検出可能レポーターの発現を、未処理対照細胞内での検出可能レポーターの発現と比較する。s F l t - 1検出可能レポーターの発現を低下させる候補化合物、又はV E G F若しくはP l G Fの検出可能レポーターの発現を増加させる候補化合物は、子癇前症又は子癇の処置に有用な化合物である。好ましい態様では、候補化合物は、核酸に融合したレポーター遺伝子の発現を変化させる。

10

【0222】

1つの具体的な例では、s F l t - 1ポリペプチドに結合する候補化合物をクロマトグラフィに基づいた技術で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遺伝子操作した細胞（例えば上記のもの）から標準技術で精製し、カラムに固定することができる。次に候補化合物溶液をカラムに通し、s F l t - 1ポリペプチドに特異的な化合物を、ポリペプチドに結合し、カラムに固定される能力に基づいて同定する。化合物を単離するには、カラムを洗浄して非特異的に結合した分子を除去し、その後目的化合物をカラムから溶出させて回収する。類似の方法を用いてポリペプチドマイクロアレイに結合した化合物単離することができる。この方法（又は他の適切な方法）で単離した化合物は、所望により更に精製する（例えば高性能液体クロマトグラフィによって）。更に、s F l t - 1ポリペプチドの活性を低下させる能力又はV E G Fシグナル伝達経路（例えば上記のような）の活性を増加させる能力に関して、これらの候補化合物を試験することができる。このアプローチで単離した化合物を、例えばヒト被験者の子癇前症又は子癇を処置するための療法として用いることもできる。10mM以下の親和定数で本発明のポリペプチドに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。あるいは、いずれかの*in vivo*タンパク質相互作用検出システム、例えば2ハイブリッドアッセイを利用して、本発明のポリペプチドに結合する化合物又はタンパク質を同定することができる。

20

30

【0223】

潜在的アンタゴニストには、有機分子、ペプチド、ペプチド模倣体、ポリペプチド、核酸、及びs F l t - 1核酸配列又はs F l t - 1ポリペプチドに結合する抗体が含まれる。

【0224】

s F l t - 1 DNA配列は、子癇前症又は子癇を処置するための治療用化合物の発見及び開発に用いることもできる。コードされたタンパク質は、発現すると、薬物スクリーニングの標的として用いることができる。更に、コードされたタンパク質のアミノ末端領域をコードするDNA配列、又はそれぞれのmRNAのシャイン-ダルフアルノ配列若しくは他の翻訳促進配列を、s F l t - 1コード配列の発現を低下させる配列を構築するために用いることができる。そのような配列は標準技術（A u s u b e lら、上記）で単離することができる。

40

【0225】

場合により、上記アッセイで同定された化合物は、s F l t - 1の生物活性を低下させる化合物又はV E G Fシグナル伝達経路の活性を増加させる化合物のアッセイに有用であ

50

ると確認することができる。

【0226】

本発明の小分子の分子量は2,000ダルトン以下が好ましく、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。

【0227】

VEGFシグナル伝達経路を標的とする療法

VEGFは、血管新生、血管透過性増大、及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型シグナル伝達受容体が同定されている。VEGF-受容体結合は、シグナル伝達カスケードを引き起こし、ホスホリパーゼC-1のチロシンリン酸化を生じ、イノシトール1,4,5-三リン酸の細胞内レベルを増加させ、一酸化窒素合成酵素を活性化する細胞内カルシウムを増加させ、一酸化窒素(NO)を産生する。NO形成は、血管平滑筋細胞及び内皮細胞でグアニル酸シクラーゼを活性化し、GMP産生を引き起こす。このNO/cGMPカスケードはVEGFの血管作用効果を介在すると考えられる。VEGFの血管作用効果の介在に関与す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、MAPKカスケード開始の結果としてホスホリパーゼA₂の活性化を介してPGI₂産生を誘導する。

10

【0228】

VEGFレベルの増加は、子癇前症及び子癇の処置に有用である。VEGFシグナル伝達又はVEGFシグナル伝達の成分を標的とする治療用化合物、及びVEGFシグナル伝達の活性化を促進する治療用化合物も、子癇前症及び子癇の処置に有用である。そのような化合物には、シルデナフィル、プロスタサイクリンアナログ、例えばフローラン、Remodulin、及びトラクリアが含まれる。

20

【0229】

試験化合物及び抽出物

一般に、sFlt-1ポリペプチドの活性を低下可能な化合物又はVEGF若しくはPLGFの活性を増加可能な化合物は、当該技術分野に公知の方法にしたがい、天然産物又は合成(若しくは半合成)抽出物の大きなライブラリー、化学ライブラリー、又はポリペプチド若しくは核酸のライブラリーから同定される。薬物の発見及び開発の分野に熟練した者は、試験抽出物又は化合物の正確な供給源は本発明のスクリーニング法に重要ではないことを理解するであろう。スクリーニングに用いる化合物は、公知化合物(例えば他の疾患又は障害に用いる公知療法)を含むことができる。あるいは、実際に、本明細書に記載の方法を用いて多くの未知の化学抽出物又は化合物をスクリーニングすることができる。そのような抽出物又は化合物の例には、限定されるものではないが、植物、真菌、原核生物、又は動物に基づいた抽出物、発酵ブロス、及び合成化合物、並びに既存化合物の変形が含まれる。限定されるものではないが、糖、脂質、ペプチド、及び核酸に基づいた化合物を含めた多くの化学化合物の無作為合成又は指令合成(例えば半合成又は全合成)に、数多くの方法も利用可能である。合成化合物ライブラリーは、Brandon Associates(メリマク、ニューハンプシャー州)及びAldrich Chemical(ミルウォーキー、ウィスコンシン州)から市販されている。あるいは、細菌、真菌、植物、及び動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが、Biotics(サセックス、英国)、Xenova(スラウ、英国)、Harbor Branch Oceanographic Institute(Ft. Pierce、フロリダ州)及びPharmaMar, U.S.A.(ケンブリッジ、マサチューセッツ州)を含めた多くの供給元から市販されている。その上、天然ライブラリー及び合成的に作製されたライブラリーが所望により当該技術分野に公知の方法、例えば標準的抽出及び分画法にしたがい作製される。更に、所望により、ライブラリー又は化合物は、標準の化学的、物理的、又は生化学的方法を用いて容易に改変される。

30

40

【0230】

50

その上、薬物の発見及び開発の分野に熟練した者は、脱複製（例えば分類学的脱複製、生物学的脱複製、及び化学的脱複製、又はそれらの組み合わせ）、又はmolt - 破壊活性について既に知られている材料の複製物若しくは反復物の除去の方法を可能ならいつでも採用すべきであることを容易に理解する。

【0231】

粗抽出物がsFlt - 1ポリペプチドの活性を低下させるか又はsFlt - 1ポリペプチドに結合することがわかっているときは、観察された効果に関与する化学成分を単離するために陽性リード抽出物の更なる分画が必要である。したがって、抽出、分画、及び精製工程の目的は、sFlt - 1ポリペプチドの活性を低下させる粗抽出物内の化学物質の慎重な特徴付け及び同定である。そのような異種抽出物の分画及び精製方法は当該技術分野に公知である。所望により、ヒトの子癇前症又は子癇を処置するための療法として有用であることが示された化合物は、当該技術分野に公知の方法にしたがい化学的に改変される。

10

【0232】

療法

本発明は、被験者の子癇前症又は子癇を治療又は予防する方法を特徴とする。療法は、子癇前症若しくは子癇の治療又は予防のため妊娠中に、あるいは産後子癇前症又は子癇を治療するために妊娠の後に投与することが好ましい。投与の技術及び用量は、化合物の種類（例えば化学化合物、抗体、アンチセンス、又は核酸ベクター）に応じて変化し、当該技術分野に熟練した者に周知であるか、又は容易に決定される。

20

【0233】

本発明の治療用化合物は、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、又は賦形剤とともに単位剤形で投与することができる。非経口投与、経静脈投与、皮下投与、経口投与、又は羊水への直接注入により局所投与することができる。持続注入による経静脈送達の本発明の治療用化合物の投与に好ましい方法である。

【0234】

組成物は、経口投与用には丸剤、錠剤、カプセル、液体、若しくは徐放性錠剤の形態で；又は経静脈、皮下若しくは非経口投与には液体で；又は局所投与用にはポリマー若しくは他の徐放性ビヒクルであり得る。

【0235】

当該技術分野に周知の製剤作製方法は、例えば『レミントン：製剤の科学と実践』（第20版、A. R. Gennaro A.R. 編、2000、Lippincott Williams & Wilkins、フィラデルフィア、ペンシルバニア州）にみられる。非経口投与用製剤は、例えば、賦形剤、滅菌水、生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物性オイル、又は水素化ナフタレンを含有することができる。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、又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用いて化合物の放出を制御することができる。ナノ粒子製剤（例えば生分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リポソーム）を用いて化合物の生体分布を制御することができる。他の潜在的に有用な非経口送達システムには、エチレン - 酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み型注入システム、及びリポソームが含まれる。製剤中の化合物濃度は、投与すべき薬物の用量、及び投与経路を含めた多くの因子に応じて変化する。

30

40

【0236】

化合物は、場合により、医薬産業で一般に用いられる非毒性の酸付加塩又は金属複合体のような医薬的に許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、パモン酸、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、又はトリフルオロ酢酸などの有機酸；タンニン酸、カルボキシメチルセルロースなどのポリマー酸；及び塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などの無機酸が含まれる。金属複合体には、亜鉛、鉄などが含まれる。

50

【0237】

経口用製剤には、非毒性の医薬的に許容可能な賦形剤との混合物中に活性成分を含有する錠剤が含まれる。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤又は充填剤（例えばショ糖及びソルビトール）、潤滑剤、流動促進剤、及び粘着防止剤（例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、硬化植物油、又はタルク）であり得る。

【0238】

経口用製剤は、チュアブル錠として、又は活性成分が不活性固体賦形剤と混合されている硬ゼラチンカプセルとして、又は活性成分が水若しくは油性媒体と混合されている軟ゼラチンカプセルとして提供することもできる。

10

【0239】

用量及び化合物を投与するタイミングは、被験者の全般的な健康及び子癇前症症状の重篤度を含めたさまざまな臨床因子に依存する。一般に、いったん子癇前症又は子癇前症を発症する傾向が検出されると、精製タンパク質の持続注入により病態の更なる進行を治療又は予防する。治療は、1～100日間、より好ましくは1～60日間、最も好ましくは1～20日間、又は妊娠終了までの期間継続することができる。用量は、それぞれの化合物及び病態の重篤度に応じて変化し、VEGF又はPLGF、又は両方の血清濃度範囲が1～500 ng/mL、好ましくは1～100 ng/mL、より好ましくは5～50 ng/mL、最も好ましくは5～10 ng/mLの定常状態に達するまで漸増される。

【0240】

本明細書に記載の診断法を用いて、療法中、子癇前症若しくは子癇をモニターし、又は治療用化合物の用量を決定することもできる。1つの例では、治療用化合物を投与し、療法のあいだPAAIを決定する。PAAIが10より小さい場合、好ましくは20より小さい場合は、治療用量は有効用量であるとみなされる。

20

【0241】

VEGF又はPLGFのタンパク質発現を増加させる方法

本発明は、子癇前症又は子癇であると診断された被験者のVEGF及びPLGFのレベルを増加させる方法を特徴とする。VEGF又はPLGFのレベルの増加は、とりわけ以下に記載のいくつかの異なる方法で達成することができる。

【0242】

精製タンパク質

本発明の好ましい態様では、子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するために精製型のVEGF又はPLGF又は両方を被験者に投与する。

30

【0243】

精製VEGF又はVEGF様タンパク質には、VEGFのアミノ酸配列と相同な、より望ましくは実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質、あるいは血管新生を誘発できるか、又は血管内皮細胞若しくは臍帯静脈内皮細胞の選択的増殖を促進可能なVEGFファミリーメンバーが含まれる。精製VEGF化合物の1つの例は、ジェネンテック社（サンフランシスコ、カリフォルニア州）製のヒト組換えVEGF-165である。他の例は、Scios社（フレモント、カリフォルニア州）製のヒト組換えVEGF-121である。

40

【0244】

精製PLGF又はPLGF様タンパク質には、PLGFアミノ酸配列と相同な、より望ましくは実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質、あるいは血管新生を誘発できるか、又は血管内皮細胞若しくは臍帯静脈内皮細胞の選択的増殖を促進可能なPLGFファミリーメンバーが含まれる。市販の精製PLGFの例は、R&D Systems（カタログ番号264-PG、R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州）製のヒト組換えPLGFである。ThromboGenics社も虚血性脳卒中の治療用に精製型PLGFを開発している；おそらくこの型のPLGFは本発明に記載の適用に有効であろう。

50

【 0 2 4 5 】

VEGF又はPLGF活性を増加させる治療用化合物

本発明は、被験者の子癇前症の治療又は予防のための、VEGF若しくはPLGFの血清レベル、又はこれらのポリペプチドの生物活性を刺激又は増加す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、単独で用いることも、あるいは上記精製タンパク質と、又は本明細書に記載のVEGF若しくはPLGFのタンパク質レベルを増加させるために用いる他の方法と組み合わせて用いることもできる。

【 0 2 4 6 】

VEGF産生を刺激することが知られている化合物の1例はニコチンである。喫煙は妊娠女性及び発育中の胎児の全般的な健康に多くの危険をもたらすが、ニコチン自体はシガレットよりも安全であると考えられており、高危険率被験者に対する短期療法に用いることができる。例には、スミスクリン・ビーチャム製の市販のニコチンガム製品であるニコレット(ニコチン polacrilex)、及びヘキスト・マリオン・ルセル社(以前はマリオン・メレル・ダウ)製の市販のニコチンパッチであるニコダームCQが含まれる。タバコを介して送達されるニコチンは、特に本発明の方法から除外されており、患者は本発明の方法で診断されてもいない。

10

【 0 2 4 7 】

ニコチンは、子癇前症又は子癇の診断後にパッチ又はガムを用いて投与される。用量は、病態の重篤度及び被験者の全般的な健康に応じて変化する。一般に、製造者の指示は血清ニコチンレベルが5 ~ 500 ng/mL、より好ましくは5 ~ 100 ng/mL、最も好ましくは50 ~ 100 ng/mLに達するまで続いている。

20

【 0 2 4 8 】

テオフィリンは、子癇前症若しくは子癇の治療又は予防に用いることができる追加の化合物の他の例である。テオフィリンは喘息の治療にしばしば用いられる気管支拡張薬であり、多くの商標名で(例えばAerolate Sr、Asmalix、Elxophyllinなど)、及びジェネリックで市販されている。投与方法及び用量はそれぞれの製造者で異なっており、被験者の全般的な健康及び病態の重篤度に基づいて選択される。一般に、日用量は1 ~ 500 mg、より好ましくは100 ~ 400 mg、最も好ましくは250 ~ 350 mgであり、1日2回、血清テオフィリンレベルが5 ~ 50 µg/mLに達するまで投与される。

30

【 0 2 4 9 】

アデノシンは、子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するために用いることができる更なる化合物の他の例である。アデノシン(藤沢薬品工業)は一般に抗高血圧薬として用いられている。投与方法及び用量はそれぞれの製造者で異なっており、被験者の全般的な健康及び病態の重篤度に基づいて選択される。一般に、日用量50 mg/kg、1日2回投与がアデノシンには典型的である。

【 0 2 5 0 】

ニフェジピンは、子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するために用いることができる更なる化合物の他の例である。ニフェジピン(バイエル薬品)は一般に抗高血圧薬として使用される。投与方法及び用量はそれぞれの製造者で異なっており、被験者の全般的な健康及び病態の重篤度に基づいて選択される。一般に、日用量1 ~ 2 mg/kg、1日2回、経口又は皮下投与がニフェジピンには典型的である。

40

【 0 2 5 1 】

ミノキシジルは、子癇前症若しくは子癇を治療又は予防するために用いることができる更なる化合物の他の例である。ミノキシジルは一般に抗高血圧薬として用いられる。投与方法及び用量はそれぞれの製造者で異なっており、被験者の全般的な健康及び病態の重篤度に基づいて選択される。一般に、日用量0.25 ~ 1.0 mg/kg、1日2回、経口又は皮下投与がミノキシジルには典型的である。

【 0 2 5 2 】

硫酸マグネシウムは、子癇前症若しくは子癇の治療又は予防に使用できる追加の化合物

50

他の例である。硫酸マグネシウムは、典型的には抗高血圧薬として用いられるジェネリック薬品である。投与方法及び用量はそれぞれの製造者で異なっており、被験者の全般的な健康及び病態の重篤度に基づいて選択される。一般に、日用量 1 ~ 2 g、4 時間毎に経静脈投与が、硫酸マグネシウムの典型的用量である。

【 0 2 5 3 】

VEGF 又は PLGF の血清レベルを増加させることができる化合物の使用に加えて、本発明は、VEGF 又は PLGF 指向性の化合物と組み合わせて使用される慢性高血圧薬の使用を提供する。妊娠高血圧の治療に用いられる薬物には、メチルドーパ、塩酸ヒドララジン、又はラベタロールが含まれる。これら薬物のそれぞれに関し、投与様式及び用量は医師によって、及び製造者の指示によって決定される。

10

【 0 2 5 4 】

治療用核酸

最近の研究は、VEGF のような内皮細胞分裂促進因子を発現可能な核酸 (DNA 又は RNA) の血管障害部位への送達は、障害血管の増殖及び再内皮化 (reendothelialization) を誘発することを示している。本発明は血管障害に関するものではないが、これらの研究で用いられる VEGF 及び PLGF のような内皮細胞分裂促進因子をコードする核酸の送達技術は本発明にも利用できる。これらの技術は米国特許第 5, 830, 879 号及び第 6, 258, 787 号に記載されており、本明細書に援用される。

【 0 2 5 5 】

本発明では、核酸は、VEGF 若しくは PLGF 又は VEGF 若しくは PLGF のファミリーのメンバーをコードする、ゲノム DNA、cDNA、及び mRNA を含めて如何なる核酸 (DNA 又は RNA) でもよい。核酸には、sFlt-1 受容体に結合することが示されているタンパク質をコードする核酸を含めることもできる。当該技術分野で日常的な手順、例えば組換え DNA、PCR 増幅を用いて所望のタンパク質をコードする核酸を得ることができる。

20

【 0 2 5 6 】

sFlt-1 発現を阻害する治療用核酸

また、本発明は、sFlt-1 mRNA の発現を直接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を特徴とする。相補的核酸配列 (センス鎖又はコード鎖) に結合させることによって、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、おそらく RNAse H による RNA 鎖の酵素的切断を介してタンパク質発現を阻害することができる。アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、過剰レベルの sFlt-1 を発現する細胞において sFlt-1 タンパク質の発現を減少可能であることが好ましい。sFlt-1 タンパク質発現の低下は、対照オリゴヌクレオチドで処理した細胞に対して少なくとも 10%、より好ましくは 25%、最も好ましくは 50% 以上であることが好ましい。アンチセンス核酸塩基オリゴマーの選択及び調製方法は当該技術分野に周知である。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として、本明細書に援用される米国特許第 6, 410, 322 号を参照されたい。タンパク質発現レベルのアッセイ法も当該技術分野に周知であり、それにはウエスタンブロッティング、免疫沈降、及び ELISA が含まれる。

30

40

【 0 2 5 7 】

また、本発明は、sFlt-1 の発現を阻害するための RNA 干渉 (RNAi) の使用を特徴とする。RNA 干渉 (RNAi) は、目的遺伝子又は mRNA に対応する 2 本鎖 RNA (dsRNA) を生体に導入し、対応の mRNA を分解する、近年発見された転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) メカニズムである。RNAi 反応では、dsRNA 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖がともに長さ 21 ~ 23 ヌクレオチド (nt) の 2 - ヌクレオチド 3' 尾部を有する小さな RNA 断片又はセグメントにプロセッシングされる。あるいは、長さ 21 ~ 23 nt で 2 - ヌクレオチド 3' 尾部を有する合成 dsRNA を合成し、精製し、反応に用いることができる。これらの 21 ~ 23 nt dsRNA は、「ガイド RNA」又は「短い干渉 RNA」(siRNA) としても知られている。

50

【0258】

次に *siRNA* 2本鎖は、複合体内で *siRNA* と相同性を有する内因性 *mRNA* を標的として破壊するタンパク質で構成されるヌクレアーゼ複合体に結合する。複合体内のタンパク質の正体は依然として未知であるが、複合体の機能は、*siRNA* 鎖の1本と内因性 *mRNA* との塩基対相互作用を介して相同な *mRNA* 分子を標的とすることである。次に *mRNA* は *siRNA* の3'端からおよそ12 ntに切断され、分解される。この方法では、特定遺伝子を標的として分解することができ、それにより標的遺伝子からのタンパク質発現の喪失をもたらす。

【0259】

dsRNA の特定の必要性及び改変は、PCT公開番号WO01/75164号(本明細書に援用される)に記載されている。*dsRNA* 分子は長さがさまざまであり得るが、典型的には(2'-デオキシ)チミジン又はウラシルである2~3ヌクレオチド3'突出末端を特徴とする21~23ヌクレオチド *dsRNA* の *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む。1本鎖 *siRNA* 及び平滑末端型 *dsRNA* を用いることもできる。*RNA* の安定性を更に増大させるために、3'突出を分解に対して安定化させることができる。1つのそのような態様では、アデノシン又はグアノシンのようなプリンヌクレオチドを含めることによって *RNA* を安定化させる。あるいは、改変アナログ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)thymideによるウリジン2-ヌクレオチド突出の置換は許容され、*RNA* i効率は影響しない。2'ヒドロキシル基が存在しなければ、組織培養培地において突出部分のヌクレアーゼ耐性を顕著に増大させる。

【0260】

あるいは、PCT公開番号WO01/75164号(本明細書に援用される)に記載の方法を用いて、又は *RNA* の *in vitro* 転写の標準的手法及び Elbashirらに記載の *dsRNA* アニリング法(Genes & Dev., 15:188-200, 2001)を用いて *siRNA* を調製することができる。また、*siRNA* は、Elbashirらに記載のように、無細胞系ショウジョウバエ溶解物において標的遺伝子の配列に対応する *dsRNA* をインキュベーションすることによって合胞体胚盤葉ショウジョウバエ胚から、*dsRNA* がプロセシングされて約21~約23ヌクレオチドの *siRNA* を生じ、その後、当該技術分野に熟練した者に公知の技術を用いて単離される条件下で得られる。例えば、ゲル電気泳導を用いて21~23 nt *RNA* を分離することができ、その後、ゲル切片から *RNA* を溶出させることができる。その上、クロマトグラフィ(例えばサイズ排除クロマトグラフィ)、グリセロール勾配遠心、及び抗体を用いた親和性精製を用いて21~23 nt *RNA* を単離することができる。

【0261】

本発明では、*dsRNA* 又は *siRNA* は、*sFlt-1 mRNA* の *mRNA* 配列に相補的であり、*sFlt-1* の発現を低下又は阻害する。好ましくは、*sFlt-1* タンパク質発現の低下は、対照の *dsRNA* 又は *siRNA* で処理された細胞に対して少なくとも10%であり、より好ましくは25%、最も好ましくは少なくとも50%である。タンパク質発現レベルをアッセイする方法も、当該技術分野に周知であり、ウエスタンブロットティング、免疫沈降、及びELISAが含まれる。

【0262】

本発明では、用いる核酸は、何らかの方法で核酸の安定性又は機能を高める改変を含む。例には、リン酸骨格、ヌクレオチド間連結、又は糖鎖部分への改変が含まれる。

sFlt-1 結合タンパク質をコードする核酸の操作及び取り扱いを簡便にするために、核酸は、プロモーターに機能可能に連結されたカセットに挿入されることが好ましい。プロモーターは、所望の標的宿主細胞において *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できる。好ましくは、高発現プロモーターを使用するであろう。好適なプロモーターの例は、763塩基対の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(R

10

20

30

40

50

SV) (Davisら、Hum. Gene Ther. 4: 151-159、1993) 及びマウス乳癌ウイルス(MMTV)のプロモーターを用いることもできる。それらの天然プロモーターを用いて一定のタンパク質を発現させることができる。発現を促進させることができる他の配列も含めることができる(例えばエンハンサー、又は高発現レベルを生ずるシステム例えばtat遺伝子及びtar配列)。組換えベクターは、pUC118、pBR322、又は例えば大腸菌複製オリジンを含む他の公知のプラスミドベクターのようなプラスミドベクターであり得る(Sambrookら、分子クローニング: 実験室マニュアル、コールドスプリングハーバー研究所出版、1989を参照されたい)。プラスミドベクターは、アンピシリン耐性のためのラクタマーゼ遺伝子のような選択可能マーカールを含むこともできる。但し、マーカールポリペプチドが、処理される生物の代謝に悪影響を及ぼさないことを条件とする。カセットは、PCT公開番号W095/22618号に開示されたシステムのような合成送達システムの核酸結合部分に結合させることもできる。

10

【0263】

核酸は、使用するベクターに適した手段で細胞に導入することができる。そのような方法の多くは当該技術分野に周知である(Sambrookら、上記; 及びWatsonら、「組換えDNA」、第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殿法、エレクトロポレーション、リポソーム介在トランスフェクション、遺伝子銃、マイクロインジェクション、ウイルスキャプシド介在移送、ポリブレン介在移送、又は原形質融合のような方法で移送することができる。リポソーム調製、ターゲティング、及び内容物の送達の手順の概説として、Mannino及びGould-Fogerite(Bio Techniques、6: 682-690、1988)、Felgner及びHolm(Bethesda Res. Lab. Focus、11: 21、1989)、及びMaurer(Bethesda Res. Lab. Focus、11: 25、1989)を参照されたい。

20

【0264】

組換えベクター(プラスミドベクター又はウイルスベクター)の移送は、羊水への直接注入又は経静脈送達によって達成することができる。

アデノウイルスベクター又はアデノ関連ベクター(AAV)を用いた遺伝子送達を用いることもできる。アデノウイルスは非常に多くの動物種に存在し、あまり病原性ではないが、分裂細胞でも静止細胞でも同様に十分に複製できる。原則として、遺伝子送達に用いられるアデノウイルスは、ウイルス複製に必要な1以上の遺伝子を欠失している。VEGF、PLGF又はsFlt-1結合タンパク質の送達に用いる複製欠損組換えアデノウイルスベクターは、当該技術分野に公知の技術にしたがい作製できる(Quantinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89: 2581-2584、1992; Stratford-Perricadetrら、J. Clin. Invest.、90: 626-630、1992; 及びRosenfeldら、Cell、68: 143-155、1992を参照されたい)。子宮内遺伝子療法の使用例として、米国特許第6,399,585号を参照されたい。

30

【0265】

dsRNA若しくはオリゴヌクレオチドの哺乳動物細胞へのトランスフェクション又は導入に、さまざまな方法が利用できる。例えば、市販のトランスフェクション試薬は、限定されるものではないが: TransIT-TKOTM(Mirus、カタログ番号MIR 2150)、TransmessengerTM(キアゲン、カタログ番号301525)、及びオリゴフェクタミンTM(インビトロジェン、カタログ番号MIR 12252-011)を含めていくつもある。それぞれのトランスフェクション試薬のプロトコールは製造者より入手可能である。

40

【0266】

いったん移送されると、核酸は、VEGF、PLGF、又は他のsFlt-1結合タンパク質の血清レベルを増加させるのに十分な時間、障害部位で、細胞によって発現される

50

。核酸を含有するベクターは、通常、細胞のゲノムに組み込まれないので、目的タンパク質の発現は限られた時間のみで起こる。典型的には、タンパク質は、約2日間～数週間、好ましくは約1日～2週間、治療レベルで発現される。DNAの再適用により、治療タンパク質の更なる発現期間を提供することができる。哺乳動物において血管疾患を治療するためにVEGFを用いた遺伝子療法の最近の例は、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)に見ることができ; reviewed in Freedman及びIsner(Ann. Intern. Med. 136:54-71, 2002)、並びにIsner JM(Nature, 415:234-239, 2002)に概説されている。

10

【0267】

遺伝子及びタンパク質の発現アッセイ

以下の方法を用いてタンパク質又は遺伝子の発現を評価し、VEGF、PlGF、又は他のsFlt-1結合タンパク質のレベルを増加させるか、あるいはsFlt-1タンパク質レベルを低下させる上記方法の有効性を決定することができる。

【0268】

VEGF、PlGF、又はsFlt-1に結合することが知られているタンパク質リガンドのレベルについて被験者の血清を測定する。タンパク質の血清レベルを測定するために用いられる方法には、特異的抗体を用いたELISA、ウエスタンブロッティング、又はイムノアッセイが含まれる。更に、in vitro血管新生アッセイを用いて生物活性を測定し、被験者の血液が抗血管新生状態から血管新生促進状態へ転換したかどうかを決定することができる。そのようなアッセイは、先の実施例2に記載されている。

20

【0269】

VEGF、PlGF、又はsFlt-1の核酸レベルについて被験者の血清サンプルを測定することもできる。遺伝子発現をアッセイする公知の方法がいくつかある。いくつかの例には、被験者の血液サンプルからのRNAの調製、及びノーザンブロッティング、PCRに基づいた増幅、又はRNaseプロテクションアッセイのためのRNAの使用が含まれる。

【0270】

治療的処置のための抗体の使用

子癇前症の妊娠女性から採取した血清サンプル中に見られるsFlt-1レベルの増加は、sFlt-1が栄養膜細胞及び母体内皮細胞に結合し、機能性VEGF及びPlGFを枯渇させる「生理的シンク」として作用することを示唆している。sFlt-1に結合し、VEGF又はPlGFの結合をブロックする抗体などの化合物の使用は、遊離のVEGF又はPlGFを増加させることによって、子癇前症若しくは子癇の予防又は治療に役立つことができる。そのような増加は、胎盤発育及び胎児の栄養、並びに全身的な母体内皮細胞の健康に必要な栄養膜の増殖、遊走及び血管新生を増加させるであろう。

30

【0271】

本発明は、sFlt-1のリガンド結合ドメインに特異的に結合する抗体を提供する。sFlt-1を阻害するために抗体が用いられ、最も有効なメカニズムはVEGF又はPlGFへの結合部位を直接ブロックすることによると考えられるが、他のメカニズムを無視することはできない。治療目的での抗体の調製及び使用方法は、本明細書に援用される米国特許第6,054,297号;第5,821,337号;第6,365,157号;及び第6,165,464号を含めたいくつかの特許に記載されている。抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよく;モノクローナル抗体が好ましい。

40

【0272】

モノクローナル抗体、特にマウスを含めた齧歯類に由来する抗体はさまざまな疾患の治療に用いられているが、治療の有効性の迅速な一掃及び軽減を引き起こすヒト抗マウス免疫グロブリン反応の誘導を含め、使用に限界がある。例えば、齧歯類モノクローナル抗体

50

の臨床的使用の主な限界は、療法中の抗グロブリン反応である (Millerら、Blood、62:988-995、1983; Schroffら、Cancer Res., 45:879-885、1985)。

【0273】

当該技術分野では動物の抗原結合可変ドメインをヒトの定常ドメインにカップリングさせた「キメラ」抗体を構築することによってこの問題を克服することを試みてきた (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産生及び使用について以下に

10

【0274】

sFlt-1へのリガンド結合の競合的阻害は、子癇前症若しくは子癇の予防又は治療に有用である。sFlt-1に対する抗体は、VEGF又はPlGFのsFlt-1への結合をブロックすることができ、VEGF又はPlGFのレベルの増加をもたらす。そのような増加は、内皮機能不全を救済し、血管新生促進因子/抗血管新生因子のバランスを血管新生の方向へシフトさせることができる。

【0275】

本発明のモノクローナル抗体の混合物を子癇前症又は子癇の有効処置として用いることができる。混合物には、わずか2、3、若しくは4種の異なる抗体、又は6、8、若しくは10もの異なる抗体を含めることができる。その上、本発明の抗体は、抗高血圧薬 (例えばメチルドーパ、塩酸ヒドララジン、又はラベタロール)、あるいは子癇前症、子癇、又は子癇前症若しくは子癇に関連した症状の処置に用いられる他の医薬と組み合わせることができる。

20

【0276】

抗体の調製

sFlt-1受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体は、当該技術分野に公知の方法で作製できる。これらの方法には、Kohler及びMilstein (Nature、256:495-497、1975)、及びCampbell (『モノクローナル抗体技術 齧歯類及びヒトのハイブリドーマの産生及び特徴付け』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年)に記載の免疫学的方法、並びにHuseら (science、246、1275-1281、1989)に記載の組換えDNA法が含まれる。

30

【0277】

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、又はマウスへのハイブリドーマ細胞の腹腔内接種によって誘発された腹水から調製することができる。最初にKohler及びMilstein (Eur. J. Immunol、6、511-519、1976)によって記載されたハイブリドーマ技術は、多くの特異抗原に対するモノクローナル抗体を高レベルで分泌するハイブリッド細胞株の作製に広く応用されている。

40

【0278】

宿主動物又はそれに由来する培養抗体産生細胞の免疫経路やスケジュールは、通常、抗体の刺激及び産生に関する確立された慣用技術にしたがう。典型的には試験モデルとしてマウスを用いるが、ヒト被験者を含めた哺乳動物被験者、またはそれらに由来する抗体産生細胞を、本発明の方法にしたがい、ヒトを含めた哺乳動物のハイブリッド細胞株作製の基礎として役立つようにを操作することもできる。

【0279】

免疫後、免疫リンパ細胞をミエローム細胞と融合し、永久に培養及びサブ培養できるハイブリッド細胞株を作製し、多量のモノクローナル抗体を産生する。本発明の目的には、融合のため選択された免疫リンパ細胞は、免疫動物のリンパ節組織又は脾臓組織から採取

50

されるリンパ球及びそれらが正常に分化した子孫細胞である。マウス系に関し、より濃縮された便利な抗体産生細胞の供給源を提供するため、脾臓細胞の使用が好ましい。ミエローマ細胞は、融合されたハイブリッドの持続増殖の基礎を提供する。ミエローマ細胞は血漿細胞由来の腫瘍細胞である。マウスミエローマ細胞株は、例えば American Type Culture Collection (ATCC; マナッサス、ヴァージニア州) から得ることができる。ヒトミエローマ細胞株及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株についても記載されている (Kozborら、J. Immunol. 133: 3001-3005、1984; Brodeurら、モノクローナル抗体の作製技術と応用、Marcel Dekker, Inc.、ニューヨーク、pp. 51-63、1987)。

【0280】

10

ハイブリッド細胞株は、*in vitro*で細胞培地中に維持することができる。いったんハイブリドーマ細胞株が確立されると、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン (HAT) 培地などの栄養的に適切なさまざまな培地に維持できる。更に、ハイブリッド細胞株は、液体窒素凍結保存を含めた多くの慣用の方法で保管及び貯蔵することができる。凍結細胞株は、よみがえらせ、永久に培養することができ、モノクローナル抗体の合成及び分泌が再開する。分泌抗体は、沈殿、イオン交換クロマトグラフィ、親和性クロマトグラフィなどの慣用の方法で組織培養上清から回収する。

【0281】

マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、及びヒトを含めた如何なる哺乳動物でも抗体を作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: IgG、IgM、IgA、IgD、又はIgE、及びそれらのサブクラス、の1つのメンバーであり得、IgG抗体が好ましい。

20

【0282】

モノクローナル抗体作製に好ましい動物はマウスであるが、本発明はあまり限定されない; 実際、ヒト抗体を使用することができ、好ましいことが判明するかもしれない。そのような抗体はヒトハイブリドーマを用いることによって得ることができる (Coleら、「モノクローナル抗体とがん治療」、Alan R. Liss Inc.、p. 77-96、1985)。本発明では、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子由来の遺伝子をヒト抗体分子由来の遺伝子とともにスプライシングすることによりキメラ抗体を作製するために開発された技術を用いることができる (Morrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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、以下に記載される。

30

【0283】

細胞融合の他の代替技術として、エプスタイン-バーウイルス (EBV) で免役したB細胞を用いて本発明のモノクローナル抗体を作製する (Crawford D.ら、J. of Gen. Virol. 64: 697-700、1983; Kozbor及びRoder、J. Immunol. 4: 1275-1280、1981; Kozborら、Methods in Enzymology、121: 120-140、1986)。一般に、手順は、好適な供給源、通常は感染細胞株からエプスタイン-バーウイルスを単離し、標的抗体分泌細胞を、ウイルスを含有する上清に曝すことから成る。細胞を洗浄し、適切な細胞培地中で培養する。その後、細胞培養物中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によって同定することができ、形質転換された抗体分泌細胞は、当該技術分野に公知の標準的方法を用いて同定することができる。組換えDNAなどのモノクローナル抗体を産生するための他の方法も本発明の範囲内に含まれる。

40

【0284】

sFlt-1免疫源の調製

sFlt-1は、それ自体を免疫源として用いることができ、又は担体タンパク質若し

50

くはセファロースビーズのような他の物質に結合させることができる。sFlt-1は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC; Kendallら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 226:324-328、1996)などの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。更に、sFlt-1又はその部分をコードする核酸分子を、標準組換えDNA技術を用いて宿主細胞で発現させるための公知のベクターに挿入することができる。sFlt-1発現に好適な宿主細胞には、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)、哺乳動物細胞(例えばNIH3T3細胞)が含まれる。

【0285】

更に、ペプチドを合成し、免疫源として用いることができる。ペプチドに対する抗体の作製方法は当該技術分野に周知であり、通常、ペプチドを血清アルブミンなどの好適な担体分子へカップリングさせることが必要である。ペプチドには、GenBank受託番号U01134に相当するsFlt-1アミノ酸配列の部分に実質的に同一なアミノ酸配列が含まれる。ペプチドは如何なる長さでもよく、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、又は100アミノ酸以上である。好ましくは、アミノ酸配列は、U01134の配列と少なくとも60%同一であり、より好ましくは85%、最も好ましくは95%同一である。ペプチドは商業的に得ることができ、又は例えばMerrifield固相法(Science、232:341-347、1985)のような当該技術分野に周知の技術を用いて作製することができる。手順には、Bioearth 9500自動ペプチド作製機のような市販の合成機を用いることができ、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、ペプチドはWaters Delta Prep 3000機器を用いて分離用HPLCで15-20 μ m Vydac C4 PrepPAKカラムにかけて精製される。

【0286】

抗体の機能的同等物

本発明には、本明細書に記載の抗体の機能的同等物も含まれる。機能的同等物には、本発明の抗体の可変領域及び超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。機能的同等物は、抗体に匹敵する結合特性を有し、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、及び1本鎖抗体、並びにそれらの断片が含まれる。そのような機能的同等物の作製方法は、例えば、本明細書に援用されるPCT公開番号第WO93/21319号; 欧州特許出願第239,400号; PCT公開公報WO89/09622号; 欧州特許出願第338,745号; 欧州特許出願第332424号; 及び米国特許第4,816,567号に開示されている。

【0287】

キメラ抗体は、実質的に又は専らヒト抗体定常領域に由来する定常領域と、実質的に又は専らヒト以外の哺乳動物の可変領域の配列に由来する可変領域とを有することが好ましい。そのようなヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はそれらの断片(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、又は抗体の他の抗原結合サブ配列など)である。非ヒト抗体をヒト化する方法は当該技術分野に周知である(概説として、Vaswani及びHamilton、Ann Allergy Asthma Immunol. 81:105-119、1998; 及びCarter、Nature Reviews Cancer、1:118-129、2001を参照されたい)。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源から組み込まれた1以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしばインポート残基と呼ばれ、典型的にはインポート可変ドメインから取られる。ヒト化は、実質的に当該技術分野に公知の方法にしたがい、ヒト抗体の対応配列を齧歯類CDR又は他のCDR配列に置換することによって実施される(Jonesら、Nature、321:522-525、1986; Riechmannら、Nature、332:323-329、1988; 及びVerhoeyenら、Science、239:1534-1536、1988)。したがって、そのようなヒト化抗体は、完全なヒト可変ドメインよりも実質

的に小さい領域が非ヒト種由来の対応する配列に置換されたキメラ抗体である（例えば米国特許第4,816,567号を参照されたい）。実際に、ヒト化抗体は、典型的には、あるCDR残基とおそらくFR残基が齧歯類抗体の類似部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である（Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992）。

【0288】

ヒト化抗体を調製するための更なる方法は、本明細書に援用される米国特許第5,821,337号及び第6,054,297号、並びにCarter（上記）に見出すことができる。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、及びIgE、並びにIgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄を含めたアイソタイプを含めた免疫グロブリンのクラスから選択される。本発明のように細胞毒性が必要ではない場合は、定常ドメインはIgG₂クラスが好ましい。ヒト化抗体は、1より多いクラス又はアイソタイプに由来する配列を含むことができ、具体的な定常ドメインを選択して所望のエフェクター機能を最適にすることは当該技術分野において通常の技術である。

10

【0289】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含めた当該技術分野に公知のさまざまな技術を用いて作製することもできる（Marksら、J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991；及びWinterら、Annu. Rev. Immunol. 12:433-455, 1994）。Coleら及びBoernerらの技術もモノクローナル抗体の調製に有用である（Coleら、上記；Boernerら、J. Immunol. 147:86-95, 1991）。

20

【0290】

ヒト以外の好適な哺乳動物には、モノクローナル抗体を作製できるあらゆる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、又は霊長類が含まれ；マウスが好ましい。

【0291】

抗体の機能的同等物には、1本鎖抗体（scFv）としても知られる1本鎖抗体断片も含まれる。1本鎖抗体断片は、典型的には抗原又は受容体に結合する組換えポリペプチドである；これらの断片は、1以上の相互接続リンカーを伴って又は伴わずに、抗体可変軽鎖配列（V_L）の少なくとも1つの断片につながれた抗体可変重鎖アミノ酸配列（V_H）の少なくとも1つの断片を含有する。そのようなリンカーは、1本鎖抗体断片が由来する完全な抗体の標的分子結合特異性を維持するようにいったん連結されると、V_L及びV_Hドメインの適切な3次元フォールディングが確実に起こるように選択される短く屈曲性のペプチドであり得る。一般に、V_L又はV_H配列のカルボキシル末端は、そのようなペプチドリinkerによって、相補的V_L及びV_H配列のアミノ酸末端に共有結合的に連結されている。1本鎖抗体断片は、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又は類似技術によって作製できる。これらのタンパク質は、真核細胞においても細菌を含めた原核細胞においても作製することができる。

30

【0292】

1本鎖抗体断片は、本明細書に記載の完全な抗体の少なくとも1つの可変領域又はCDRを有するアミノ酸配列を含有するが、それらの抗体の定常ドメインのいくつか又は全てを欠失している。これらの定常ドメインは抗原結合に必要なではないが、完全な抗体の構造の主要部分を構成する。したがって、1本鎖抗体断片は、定常ドメインの部分又は全てを含有する抗体の使用に関連した問題のいくつかを克服することができる。例えば、1本鎖抗体断片は、生体分子と重鎖定常領域との望ましくない相互作用や他の無用の生物活性が取り除かれる傾向にある。更に、1本鎖抗体断片は、完全な抗体よりもかなり小さく、したがって、完全な抗体よりも毛細管透過性が高く、1本鎖抗体断片を標的抗原結合部位により効率的に局在させ、結合させることができる。また、抗体断片は、原核細胞において比較的大規模で製造でき、したがって、産生を容易にする。更に、比較的サイズの小さな1本鎖抗体断片は、完全な抗体よりもレシピエントの免疫応答を誘発しそうにない。

40

50

【0293】

機能的同等物には、完全な抗体と同一か又は匹敵する結合特性を有する抗体断片が更に含まれる。そのような断片は、Fab断片又はF(ab')₂断片の1つ又は両方を含有することができる。抗体断片は、完全な抗体の6つのCDR全てを含有することが好ましいが、3つ、4つ又は5つのCDRなど、そのような領域の全てよりも少ない領域を含有する断片も機能的である。

【0294】

更に、機能的同等物は、以下の免疫グロブリンクラス：IgG、IgM、IgA、IgD、又はIgE、及びそれらのサブクラスのうち1つのメンバーであるか、あるいはそれらと組み合わせることができる。

10

【0295】

抗体の機能的同等物の調製

抗体の同等物は、当該技術分野に公知の方法によって調製される。例えば、抗体の断片は完全な抗体から酵素的に調製することができる。抗体の同等物はそのような同等物をコードするDNAから調製されることが好ましい。抗体の断片をコードするDNAは、全長抗体をコードするDNAの所望の部分を除く全てを欠失させることによって作製することができる。

【0296】

キメラ抗体をコードするDNAは、実質的に又は専らヒト定常領域をコードするDNAを、実質的に又は専らヒト以外の哺乳動物の可変領域の配列に由来する可変領域をコードするDNAと組換えることによって作製することができる。ヒト化抗体をコードするDNAは、定常領域と実質的に又は専ら対応するヒト抗体領域に由来するCDR以外の可変領域とをコードするDNAと、実質的に又は専らヒト以外の哺乳動物に由来するCDRをコードするDNAとを組換えることによって作製することができる。

20

【0297】

抗体断片をコードするDNA分子の好適な供給源には、全長抗体を発現するハイブリドーマなどの細胞が含まれる。断片は、上記のように、それ自体を抗体同等物として用いることも、同等物と組換えることもできる。

【0298】

この節に記載のDNAの欠失及び組換えは、上記公開特許出願に記載のもののような公知の方法で実施することができる。

30

抗体のスクリーニング及び選択

モノクローナル抗体は標準的な公知の方法で単離され、精製される。例えば、抗体は、sFlt-1ペプチド抗原に対するELISA又はウエスタンブロット解析などの標準的な公知の方法を用いてスクリーニングすることができる。そのような技術の非限定的な例は、本明細書に援用される米国特許第6,365,157号の実施例II及びIIIに記載されている。

【0299】

抗体の治療的使用

子癇前症若しくは子癇の治療又は予防に*in vivo*で用いる場合、本発明の抗体は、治療的有效量で被験者に投与される。抗体は非経口投与又は持続注入によって経静脈投与されることが好ましい。用量及び用法は、疾患の重篤度、及び被験者の全般的健康に依存する。抗体投与量は、典型的には、被験者の体重1kgあたり、約0.001～約10mg、好ましくは0.01～約5mgの範囲である。

40

【0300】

非経口投与の場合、抗体は、医薬的に許容可能な非経口ビヒクルと組み合わせて、単位用量の注射剤型（溶液、懸濁液、エマルジョン）に製剤化される。そのようなビヒクルは、本質的に非毒性で、非治療的である。そのようなビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロス溶液、及び5%ヒト血清アルブミンである。揮発性油及びオレイン酸エチルなどの非水性ビヒクルを用いてもよい。リポソームを担体として用いるこ

50

とができる。ビヒクルは、等張性や化学的安定性を高める物質、例えばバッファー及び保存料のような微量の添加物を含有してもよい。抗体は典型的にはそのようなビヒクル中に約1mg/ml～10mg/mlの濃度で製剤化される。

【0301】

sFlt-1を阻害する治療用化合物

sFlt-1レベルが子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向のある被験者において増加しているならば、sFlt-1のポリペプチド又は核酸分子の発現を低下させる物質は本発明の方法に有用である。そのような物質には、VEGF又はPlGFへのsFlt-1結合を崩壊させることができる小分子、アンチセンス核酸塩基オリゴマー、及びRNA干渉を介在するために用いるdsRNAが含まれる。

10

【0302】

組み合わせ療法

場合により、子癇前症又は子癇の療法は、他の標準的な子癇前症又は子癇の療法と組み合わせ投与することができる；そのような方法は熟練した者に公知であり、本明細書に記載されている。本発明の子癇前症又は子癇の療法は、VEGF経路の活性を増加させる化合物と組み合わせ投与することができる。内因性VEGFの産生も誘導する物質の非限定的な例には、ニコチン、ミノキシジル、ニフェジピン、アデノシン、硫酸マグネシウム、及びテオフィリンが含まれる。1つの態様では、PlGFタンパク質は、上記内因性VEGF産生を誘導する物質と組み合わせ投与することができる。

【0303】

被験者のモニタリング

疾患状態、あるいは子癇前症、子癇、又はそのような病態を発症する傾向のある被験者の治療、本発明の方法及び組成物を用いてモニターすることができる。1つの態様では、尿、血漿、羊水、又はCSFのような体液中に存在するsFlt-1、VEGF、又はPlGFの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具体的薬物の有効性の評価、又は疾患の進行の評価に有用であり得る。sFlt-1の核酸分子若しくはポリペプチドの発現を低下させる、又はVEGF若しくはPlGFの核酸分子若しくはポリペプチドの発現を増加させる療法は、特に本発明に有用であるとみなされる。

20

【0304】

他の態様

上記説明から、本明細書に記載の発明を変形及び改変して、さまざまな使用及び条件に適合させることができることは明らかである。そのような態様も以下の特許請求の範囲の範囲内である。

30

【0305】

本明細書に記載の全ての出版物は、それぞれ個々の出版物又は特許出願が特に及び個別に援用されると示された場合と同一範囲で本明細書に援用される。加えて、米国特許出願公開番号第2004-0126828号及びPCT公開番号WO2004/008946A2は、本明細書にその全体が援用される。

【図面の簡単な説明】

40

【0306】

【図1】図1は、子癇前症におけるsFlt-1のmRNA及びタンパク質の発現レベルを表すオートラジオグラムである。図1Aは、ノーザンプロット解析によって決定した、3人の子癇前症患者(P1、P2、P3)及び3人の正常血圧満期妊娠(N1、N2、N3)の胎盤sFlt-1のmRNA発現を示す。長いバンド(7.5kb)は全長flt-1 mRNAであり、短く量の多いバンド(3.4kb)は選択的にスプライシングされたsFlt-1 mRNAである。GAPDHは対照として含まれており、矢尻は28S RNAを示す。患者P1及びP2は重度子癇前症であるが、患者P3は軽度子癇前症であった。図1Bは、軽度子癇前症(軽度PE)患者、重度子癇前症(重度PE)患者、及び正常血圧満期妊娠女性(正常)の血清sFlt-1レベルを示すグラフである。sF

50

1 t - 1レベルは、市販のキット (R & D S y s t e m s 、ミネアポリス、ミネソタ州) を用いて s F l t - 1 について行った E L I S A で測定した。他の理由で早産した患者 (早産) を、在胎週数特異的变化を除外するために更なる対照として含めた。試験患者数を X 軸の括弧に示す。出産前 (t = 0) 及び出産後 4 8 時間 (t = 4 8) にサンプルを採取した。図 1 C は、図 1 B に記載の患者全てについて E L I S A によって決定した出産時 (t = 0) の抗血管形成指標比 (P A A I = s F l t - 1 / (V E G F + P l G F)) 比を示すグラフである。

【図 2】図 2 A ~ 2 F は、子癇前症における過剰の s F l t - 1 の抗血管新生作用を示す顕微鏡写真である。4 人の正常妊娠対照と 4 人の子癇前症患者の血清を用いて内皮管腔形成アッセイを行った。1 人の正常対照と 1 人の子癇前症患者の代表的な実験を示す。図 2 A、2 B、及び 2 C は、正常患者の血清を用いて行ったアッセイを示し、図 2 D、2 E、及び 2 F は、子癇前症患者の血清を用いて行ったアッセイを示す。図 2 A は t = 0 (正常満期妊娠女性の 1 0 % 血清) ; 図 2 B は t = 4 8 (出産後 4 8 時間の正常妊娠女性の 1 0 % 血清) ; 図 2 C は t = 0 + 外因性 s F l t - 1 (1 0 n g / m l) ; 図 2 D は t = 0 (出産前の子癇前症女性の 1 0 % 血清) ; 図 2 E は t = 4 8 (出産後 4 8 時間の子癇前症女性の 1 0 % 血清) ; 及び図 2 F は t = 0 + 外因性 V E G F (1 0 n g / m l) + P l G F (1 0 n g / m l) 。管腔形成アッセイを定量化し、各パネルの下のピクセルに平均管長 ± S E M を示す。

【図 3】図 3 A 及び 3 B は、V E G F 及び P l G F によって誘発された腎微小血管の血管拡張の s F l t - 1 による障害を示すグラフである。図 3 A は、3 つの異なる用量で測定した s F l t - 1 (S)、V E G F (V)、P l G F (P) に対するラット腎細動脈の弛緩反応増加を示す。V + 及び P + は、1 0 0 n g / m l s F l t - 1 存在下における個々の試薬の血管拡張反応を表す。全ての実験は 6 つの異なる解離ラット腎微小血管で行なった。データを平均 ± S E M で示す。* は、個々の試薬単独と比較した統計的有意差 p < 0 . 0 1 を表す。図 3 B は、生理的用量における弛緩反応の増加を示す：V E G F 1 0 0 p g / m l (V)、P l G F 5 0 0 p g / m l (P)、s F l t - 1 1 0 n g / m l (S)、V E G F 1 0 0 p g / m l + P l G F 5 0 0 p g / m l (V + P) 又は V E G F 1 0 0 p g / m l + P l G F 5 0 0 p g / m l + s F l t - 1 1 0 n g / m l (V + P + S) 。全ての実験は 6 つの異なる解離ラット腎微小血管で行なった。データを平均 ± S E M で示す。* は、V + P と比較した統計的有意差 p < 0 . 0 5 を表す。

【図 4 A】図 4 A は、糸球体内皮症の s F l t - 1 誘導を示す画像である。図 4 A は、肥大した糸球体及び腫脹した細胞質を有する s F l t - 1 で処理した動物における毛細血管閉塞のヘマトキシリン及びエオジン (H & E) 染色を、対照を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」を s F l t - 1 で処理した動物において過ヨウ素酸シッフ (P A S) 染色で示す。全ての光学顕微鏡写真はオリジナル倍率 6 0 倍で撮影した。全ての図は同一倍率で再現した。

【図 4 B】図 4 B は、糸球体内皮症の s F l t - 1 誘導を示す画像である。図 4 B は、血管内皮細胞の細胞質腫脹を確認する s F l t - 1 で処理した糸球体の電子顕微鏡写真である。フィブリンについての免疫蛍光 (I F) 写真はオリジナル倍率 4 0 倍で撮影し、E M 写真は 2 4 0 0 倍で撮影した。全ての図は同一倍率で再現した。

【図 5】図 5 A ~ 5 C は、在胎週数に関して子癇前症発症前後に測定した s F l t - 1 レベルを示すグラフである。図 5 A は、正常血圧対照 (細線に白三角)、子癇前症前症例 (黒丸)、及び陣痛発生前の在胎週数 4 ~ 5 週の時期内にある子癇前症後症例 - 「終点」標本 - (黒四角) に関する平均血清濃度を p g / m l で示すグラフである。括弧は平均の標準誤差を示す。アスタリスクは、対数変換後の、同一在胎週数時期内にある対照標本に対する有意差を示す：* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1。図 5 B は、子癇前症前の週区間内にある子癇前症発症前後の症例について s F l t - 1 の平均血清濃度を p g / m l で示すグラフである。P E は 4 3 の終点標本 (子癇前症発症時又は発症後に得た) の相加平均を示す。平均在胎週数 (日) を各時間間隔の下に括弧内に示す。横線は終点標本のレベルを示す。縦線は子癇前症前 5 週の期間を区別している。図 5 C は

10

20

30

40

50

、正常血圧対照及び子癇前症発症5週以内に得た標本を除外した後の子癇前症前症例について、在胎週数時期に関して $sFlt-1$ 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、在胎週数に関して子癇前症前後の $PlGF$ レベルを示すグラフである。図6Aは、陣痛及び出産前の全ての標本の $PlGF$ レベルを示すグラフである。括弧は平均の標準誤差を示す。アスタリスクは、対数変換後の、同一区間内にある対照標本に対する有意差を示す： $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 。図6Bは、子癇前症前の週区間内にある子癇前症発症前後の症例について $PlGF$ 平均血清濃度を pg/ml で示すグラフである。PEは、43の終点標本（子癇前症発症時及び発症後に得た）の相加平均を示す。平均在胎週数（日）を各時間区間の下の括弧内に示す。横線は終点標本のレベルを示す。縦線は子癇前症前5週の期間を区別している。図6Cは、正常血圧対照及び子癇前症発症例について、在胎週数期間に関し、 $PlGF$ 平均血清濃度を pg/ml で示すグラフである。

【図7】図7A及び7Bは、子癇前症状態及び重篤度に関し、 $sFlt-1$ 及び $PlGF$ のレベルを示すグラフである。図7Aは、対照、並びに軽度子癇前症、重度子癇前症、 < 37 週に発症した子癇前症、在胎週数に比して小さい（SGA）乳児を有する子癇前症、及び < 34 週に発症した子癇前症の症例（臨床疾患発症前）における妊娠23～32週の $sFlt-1$ （黒棒）及び $PlGF$ （白棒）の相加平均血清濃度を示すグラフである。それぞれのカラム対の下に標本数が記録されている。在胎週数及び肥満度指数に対する調整によりわずかに変化を生じたが有意差のレベルに影響はなかった。図7Bは、対照、並びに軽度子癇前症、重度子癇前症、 < 37 週に発症した子癇前症、及びSGA乳児を有する子癇前症の症例（臨床疾患発症前）における妊娠33～41週の $sFlt-1$ （黒棒）及び $PlGF$ （白棒）の相加平均血清濃度を示すグラフである。それぞれのカラム対の下に標本数が記録されている。在胎週数及び肥満度指数に対する調整によりわずかに変化を生じた。

【図8】図8は、正常及び子癇前症患者から単離したPBMC中の flt 、 $sFlt-1$ 、及び関連変異体又は断片の発現を示すオートラジオグラムである。タンパク質溶解物を $Flt-1$ タンパク質のN端を認識する抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

【図9A】図9は、在胎週数の区間に関して尿 $PlGF$ 濃度を示すグラフである。図9Aは、在胎週数に関し、臨床子癇前症発症前後の平均 $PlGF$ 濃度を示すグラフである。I棒は標準誤差を表す。

【図9B】図9は、在胎週数の区間に関して尿 $PlGF$ 濃度を示すグラフである。図9Bは、臨床子癇前症発症前後の平均 $PlGF$ を pg/mg クレアチニンで示すグラフである。I棒は標準誤差を表す。

【図9C】図9は、在胎週数の区間に関して尿 $PlGF$ 濃度を示すグラフである。図9Cは、最初のモニタリング尿標本のみを用いた臨床子癇前症発症前後の平均 $PlGF$ 濃度を示すグラフである。I棒は標準誤差を表す。

【図9D】図9は、在胎週数の区間に関して尿 $PlGF$ 濃度を示すグラフである。図9Dは、無作為尿標本のみを用いた臨床子癇前症発症前後の平均 $PlGF$ 濃度を示すグラフである。I棒は標準誤差を表す。

【図10】図10は、子癇前症状態及び重篤度に関し、クレアチニンに対して標準化前後の $PlGF$ 平均濃度を示すグラフである。対照、及び軽度子癇前症、重度子癇前症、妊娠37週より前に発症した子癇前症、子癇前症と在胎週数に比して小さい（SGA）乳児、又は妊娠34週より前に発症した子癇前症を有するかどうかによって後に臨床子癇前症（PE）を発症した女性における妊娠21～32週の $PlGF$ 濃度及び pg/mg クレアチニンを示す。子癇前症を発症した女性の標本は臨床疾患発症前に得た。提示したP値は対照標本との比較によるものである。I棒はSEを表す。

【図11】図11は、個々の女性の胎盤成長因子濃度の経時プロットを在胎週数に関して示すグラフである。

10

20

30

40

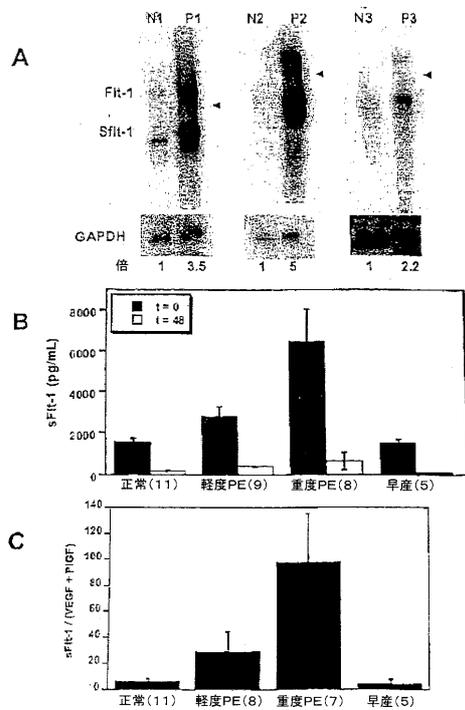
50

【図12】図12A及び12Bは、21～32週における尿P1GF濃度及び血清中のP1GFに対するsFlt-1の比の散布図を妊娠期間に関して示すグラフである。値は、妊娠37週より前の子癩前症発症前の20人の女性及び69人の正常血圧対照からの尿及び血清の対標本から得た。図12Aは尿P1GF濃度を示す。図12Bは血清のP1GFに対するsFlt-1の比を示す。

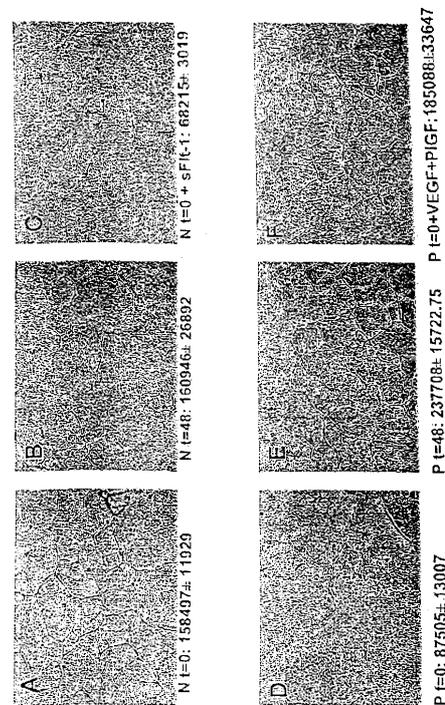
【図13】図13は、在胎週数に比して小さい(SGA)乳児でない乳児を有する正常血圧女性、SGA乳児を有する正常血圧女性、妊娠性高血圧女性、及び妊娠37週より前に子癩前症を発症した女性における胎盤成長因子(P1GF)の平均尿濃度を示すグラフである。乳児が在胎週数に比して小さくない正常血圧女性(NT-SGA)、SGA乳児を有する正常血圧女性(NT+SGA)、その後妊娠性高血圧(GH)を発症した女性、その後の妊娠37週より前に子癩前症を発症した女性(PE<37週)における妊娠21～32週の尿P1GF濃度をpg/ml及びpg/mgクレアチニンで示す。妊娠性高血圧又は子癩前症を発症した女性の標本は臨床疾患発症前に得た。標本採取時の平均在胎週数は全ての群で同様である。Nは標本数を示す。提示したP値は対照(NT-SGA)標本との比較によるものである。I棒はSEを表す。

10

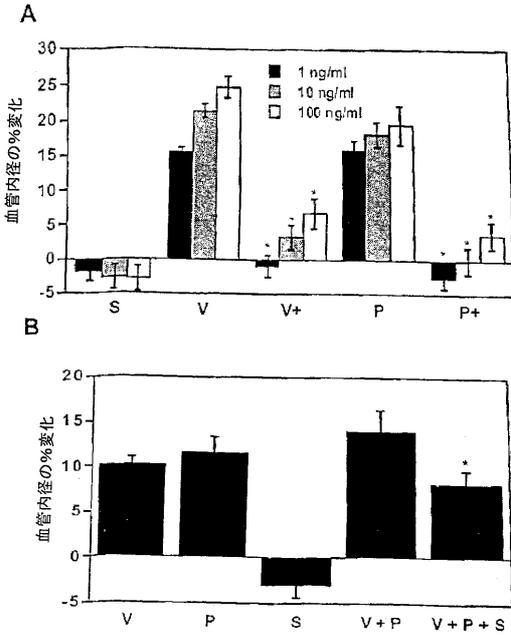
【図1】



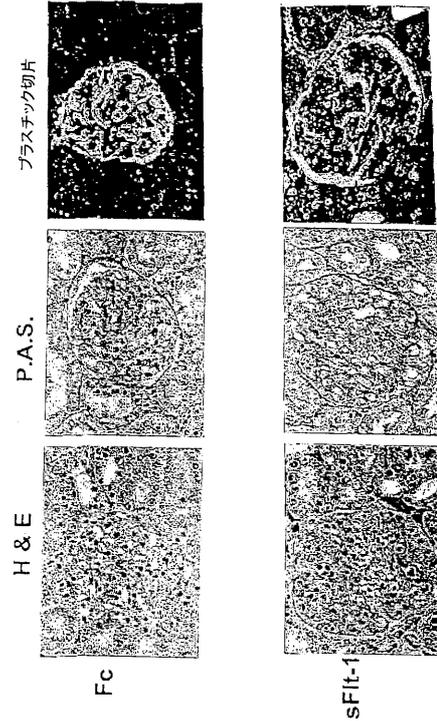
【図2】



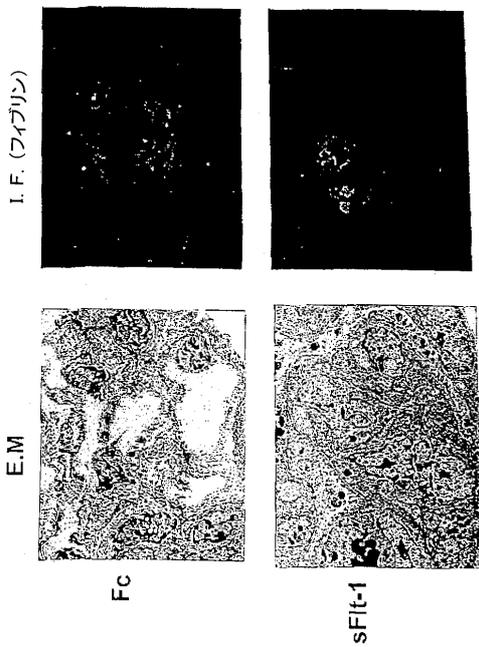
【 図 3 】



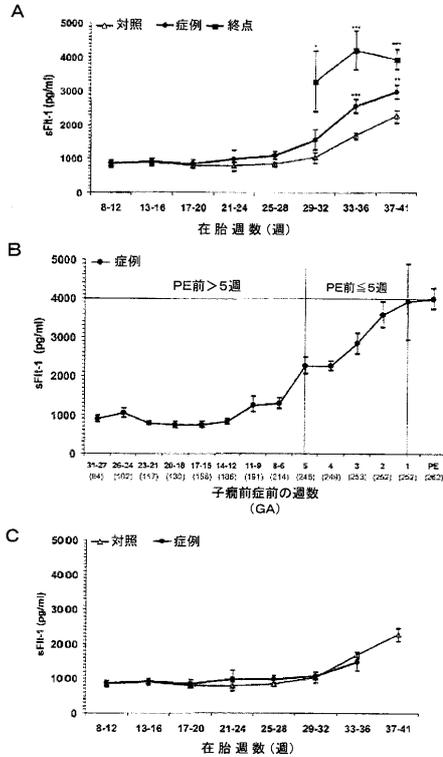
【 図 4 A 】



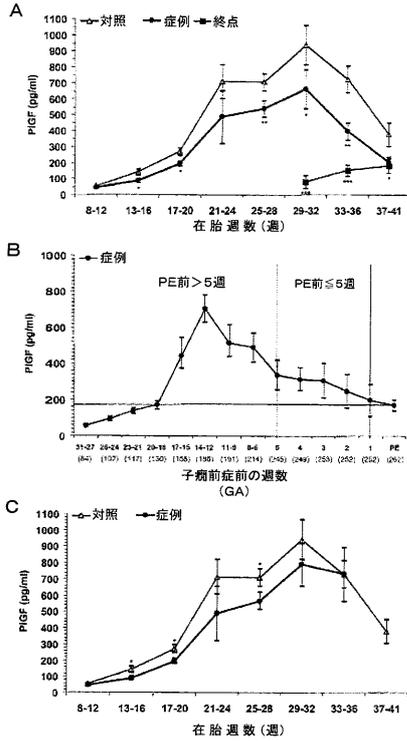
【 図 4 B 】



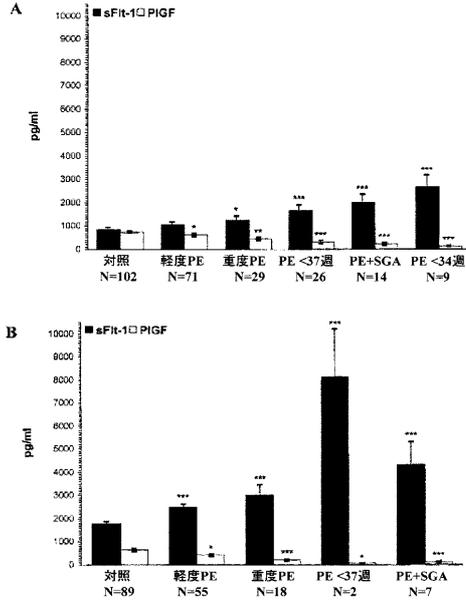
【 図 5 】



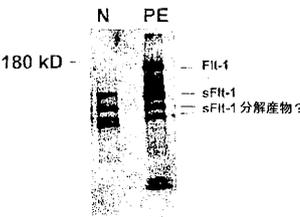
【図6】



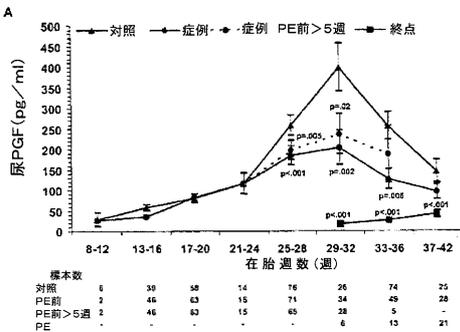
【図7】



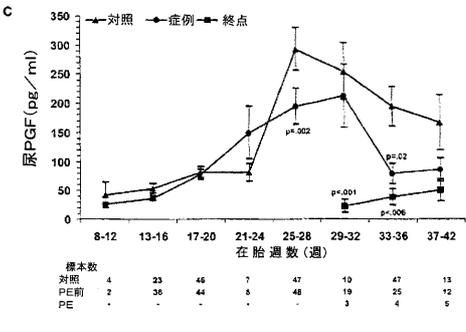
【図8】



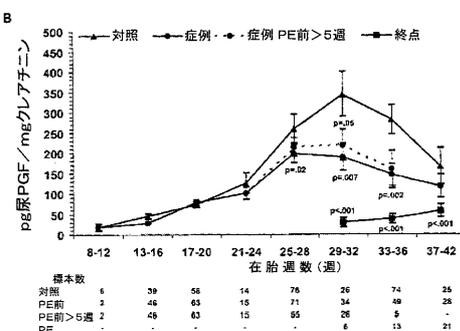
【図9A】



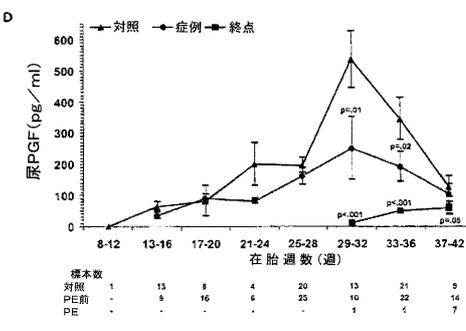
【図9C】



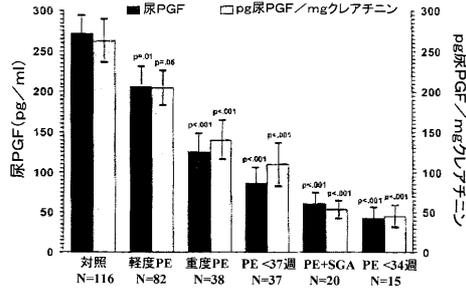
【図9B】



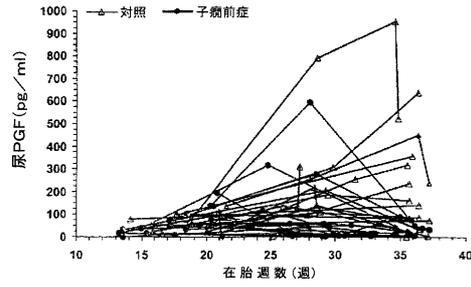
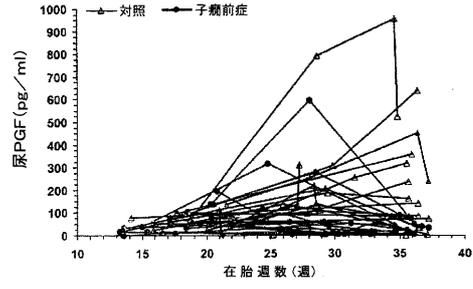
【図9D】



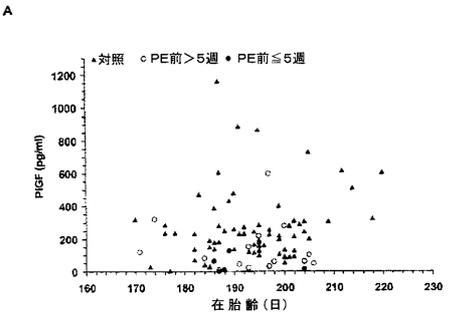
【図10】



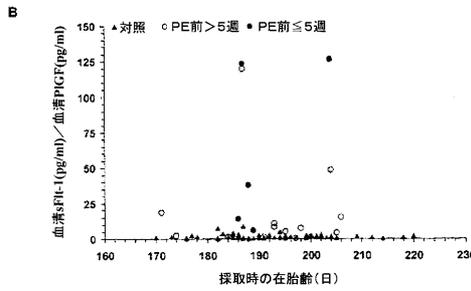
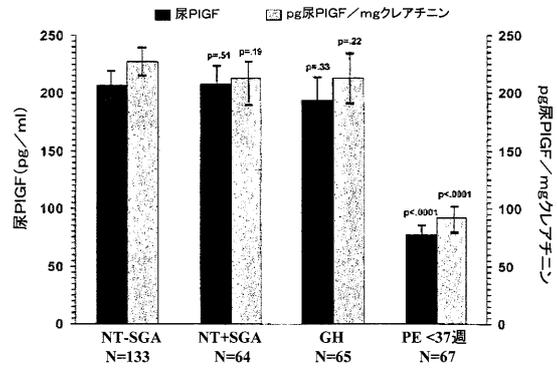
【図11】



【図12】



【図13】



フロントページの続き

- (74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
- (74)代理人 100106080
弁理士 山口 晶子
- (72)発明者 カルマンチ, アナンス・エス
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 3 2 , ウエスト・ロックスベリー, ワシントン・ストリート 5 2 8 1
- (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 0 2 4 5 8 , ニュートン, リッカー・ロード 1 9 , アパートメント ナンバー 2
- (72)発明者 スクハトメ, ヴィカス・ピー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 4 5 9 , ニュートン, スカイ・ビュー・サークル 3 6

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 0 8 9 4 6 (W O , A 1)
BROCKELSBY, J. , LABORATORY INVESTIGATION , 1 9 9 9 年 9 月 , V79 N9 , P1101-1111
LEVINE, R. , THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDECINE , 2 0 0 4 年 2 月 1 2 日 , V350 N7 , P672-683
VUORELA, P. , OBSTETRICS AND GYNECOLOGY , 2 0 0 0 年 3 月 , V9 N3 , P353-357
MAYNARD, S. , THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION , 2 0 0 3 年 3 月 , V111 N5 , P649-658
HELKSKE, S. , MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION , 2 0 0 1 年 , V7 N2 , P205-210
- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/53-33/68

专利名称(译)	用于鉴别先兆子痫或子痫的invitro分析方法		
公开(公告)号	JP4711972B2	公开(公告)日	2011-06-29
申请号	JP2006552339	申请日	2005-02-04
申请(专利权)人(译)	贝斯以色列Dikonisu医疗中心有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝斯以色列Dikonisu医疗中心有限公司		
[标]发明人	カルマンチアナスエス メイナードシャロン スクハトメヴィカスピー		
发明人	カルマンチ,アナス・エス メイナード,シャロン スクハトメ,ヴィカス・ピー		
IPC分类号	G01N33/53 A61B10/00 A61K31/522 C07K16/12 C07K16/28 C12Q1/48 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	A61K31/522 A61K2039/505 A61P15/00 C07K16/1217 C07K16/2863 C12Q1/485 G01N33/689 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2500/00 G01N2800/368		
FI分类号	G01N33/53.D A61B10/00.N		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 山口明子		
优先权	10/771518 2004-02-04 US 11/019559 2004-12-21 US		
其他公开文献	JP2007522457A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种诊断人类妊娠受试者具有或具有发生先兆子痫或子痫倾向的方法，所述方法包括测量可溶性Flt-1受体 (sFlt-1) 和游离胎盘生长因子 (PlGF) 的水平。来自所述怀孕的人受试者的血清样品，并且还包括使用度量计算所述sFlt-1水平与游离PlGF之间的关系，其中所述度量是sFlt-1 / PlGF。

ラットの血圧及びタンパク尿症

	N	MAP (mmHg)	尿アルブミン/クレアチニン比
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) 及び非妊娠 (NP) ラットに、Fc (対照)、sFlt-1、又はsFlk-1Fcのタンパク質を発現するアデノウイルスを投与した。平均動脈圧 (MAP=拡張期+1/3脈圧 mmHg) ± S. E. M. 及び尿アルブミン:クレアチニン比 (mgアルブミン/gクレアチニン) ± S. E. M. を、妊娠ラットの妊娠第三期初期に相当する8日後に測定した。N=各実験群の動物数。*は対照群 (Fc) と比較した統計的有意差p<0.01を表す。