

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-538915

(P2009-538915A)

(43) 公表日 平成21年11月12日(2009.11.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18 ZNA	2GO45
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	4BO24
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	4BO63
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4BO64
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4CO84
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-513263 (P2009-513263)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月31日 (2007.5.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年1月20日 (2009.1.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/012787
 (87) 国際公開番号 W02008/030283
 (87) 国際公開日 平成20年3月13日 (2008.3.13)
 (31) 優先権主張番号 11/443, 920
 (32) 優先日 平成18年5月31日 (2006.5.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/852, 761
 (32) 優先日 平成18年10月19日 (2006.10.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 303036197
 ベス イスラエル ディーコネス メディ
 カル センター
 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 アヴ
 ェニュー 330
 (71) 出願人 501181075
 ザ・ホスピタル・フォー・シック・チルド
 レン
 THE HOSPITAL FOR SI
 CK CHILDREN
 カナダ, エム5ジー・1エクス8, オン
 タリオ, トロント, ユニバーシティ・アベ
 ニュー555番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠の合併症を診断および治療する方法

(57) 【要約】

可溶性エンドグリン、内皮一酸化窒素合成酵素、PGI₂、TGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP2、BMP7、およびsFlt-1の発現レベルまたは生物活性を改変する化合物の組合せを使用して、子癇前症および子癇などの妊娠関連高血圧障害を治療するための方法を本明細書で開示する。可溶性エンドグリン、内皮一酸化窒素合成酵素、PGI₂、TGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP2、BMP7、およびsFlt-1の発現レベルまたは生物活性のいずれか1つまたは複数の測定を含む、子癇前症および子癇などの妊娠関連高血圧障害を診断する方法も開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における妊娠関連高血圧障害を治療または予防する方法であって、NOSの発現レベルまたは生物活性を増大させることができる化合物を該被験体に投与するステップを含み、該投与ステップが該被験体における該妊娠関連高血圧障害を治療または予防するのに十分な時間および量である、上記方法。

【請求項 2】

前記NOSがeNOSである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記化合物がeNOSのSer1177のリン酸化を増大させる、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記化合物がVEGFまたはその生物学的に活性な断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記VEGFがVEGF121、VEGF165、または修飾型VEGF、またはその生物学的に活性な断片である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記化合物がPlGFまたはその生物学的に活性な断片である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記化合物がeNOSのThr495の脱リン酸化を増大させる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記化合物がTGF- β 1、TGF- β 3、アクチビンA、BMP-2、BMP-7、およびそれらの生物学的に活性な断片からなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

20

【請求項 9】

可溶性エンドグリンの発現または可溶性エンドグリンの生物活性を低下させることができる化合物を前記被験体に投与するステップをさらに含み、該投与ステップが該被験体における前記妊娠関連高血圧障害を治療または予防するのに十分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記化合物が可溶性エンドグリンと特異的に結合する精製抗体または可溶性エンドグリン抗原結合断片である、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記抗体が図30Bに示されるヒトエンドグリン配列のアミノ酸26~437、40~406、または26~587からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む可溶性エンドグリンポリペプチドまたはその断片と結合する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体が図30Bに示されるヒトエンドグリン配列のアミノ酸40~86、144~199、206~222、289~304、または375~381を含む可溶性エンドグリン上のエピトープと結合する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記化合物がマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、カテプシン、およびエラスターゼからなる群より選択されるタンパク質分解酵素を阻害する化合物である、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記妊娠関連高血圧障害が正常参照と比較して増大したsFlt-1のレベルを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

sFlt-1の発現レベルまたはsFlt-1の生物活性を低下させることができる化合物を前記被験体に投与するステップをさらに含み、該投与ステップが該被験体における前記妊娠関連高血圧障害を治療または予防するのに十分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記化合物がsFlt-1と結合する精製増殖因子または抗体または抗原結合断片である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記被験体が妊娠したヒト、産後のヒト、または妊娠したヒト以外の動物である、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記被験体における前記妊娠関連高血圧障害をモニタリングするステップをさらに含み、該モニタリングステップが該被験体由来の血清または血漿サンプル中の可溶性エンドグリリンポリペプチドのレベルを測定することを含み、25ng/ml未満の可溶性エンドグリリンポリペプチドのレベルが該妊娠関連高血圧障害の改善を示すものである、請求項1に記載の方法。

10

【請求項19】

前記被験体における前記妊娠関連高血圧障害をモニタリングするステップをさらに含み、該モニタリングステップが該被験体由来のサンプル中の可溶性エンドグリリンポリペプチドのレベルを測定することを含み、該レベルの測定を2回以上行い、測定間の該可溶性エンドグリリンレベルの低下が該妊娠関連高血圧障害の改善の指標である、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記被験体における前記妊娠関連高血圧障害をモニタリングするステップをさらに含み、該モニタリングステップが該被験体由来のサンプル中の可溶性エンドグリリンポリペプチドのレベルを測定すること、および陽性参照サンプルと該レベルを比較することを含み、該陽性参照サンプルに対する可溶性エンドグリリンレベルの低下が該被験体における該妊娠関連高血圧障害の改善を示すものである、請求項1に記載の方法。

20

【請求項21】

前記モニタリングを使用して化合物の治療用量を決定する、請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記測定が免疫アッセイの使用を含む、請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

可溶性エンドグリリンのレベルが遊離、結合、または全可溶性エンドグリリンのレベル、または分解もしくは酵素的切断から生成されるエンドグリリンポリペプチドのレベルである、請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項24】

前記モニタリングが前記被験体由来のサンプル中のsFlt-1、VEGF、またはPIGFポリペプチドの少なくとも1つのレベルを測定することをさらに含む、請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

測定基準(metric)を使用して可溶性エンドグリリン、sFlt-1、VEGF、またはPIGFの前記レベル間の関係を予測することをさらに含み、参照サンプルに対する被験体サンプルにおける該レベル間の関係の変化が前記被験体における前記妊娠関連高血圧障害の改善を示すものである、請求項24に記載の方法。

40

【請求項26】

前記測定基準が $[(sFlt-1+0.25 \text{ 可溶性エンドグリリン})/PIGF]$ 、 $[(\text{可溶性エンドグリリン}+sFlt-1)/PIGF]$ 、および $[sFlt-1 \times \text{可溶性エンドグリリン}]$ からなる群より選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記測定基準が $[dproduct = \text{妊娠第二期中の}(sFlt1 \times sEng) - \text{妊娠第一期中の}(sFlt1 \times sEng)]$ であり、0を超えるdproduct値が前記被験体における妊娠関連高血圧障害を示し、陽性参照サンプルと比較した該dproduct値の低下が該被験体における該妊娠関連高血圧障害の

50

改善を示す、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

可溶性エンドグリンポリペプチドと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、該抗体が図30Bに示されるヒトエンドグリン配列のアミノ酸40～86、144～199、206～222、289～304、または375～381を含むエピトープと結合する、上記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 29】

増殖因子と可溶性エンドグリンの結合を妨げる、請求項 28 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 30】

前記増殖因子がTGF-1、TGF-3、アクチビンA、BMP-2、およびBMP-7からなる群より選択される、請求項 29 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 31】

モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 28 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 32】

Fc部分、F(ab')₂、Fab、またはFv構造を欠く、請求項 28 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 33】

製薬上許容される担体中に存在する、請求項 28 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 34】

妊娠関連高血圧障害を有するか、またはそれに対する素因を有する被験体を診断する方法であって、該被験体由来のサンプル中の可溶性エンドグリンポリペプチドならびにTGF-1、TGF-3、アクチビンA、BMP2、BMP7、eNOS、およびPGI₂からなる群より選択される少なくとも1つの他のポリペプチドのレベルを測定することを含み、正常参照サンプル、標準、またはレベルと比較した可溶性エンドグリンレベルの増大および該少なくとも1つの他のポリペプチドのレベルの低下が、妊娠関連高血圧障害の診断指標または妊娠関連高血圧障害を発症する傾向の診断指標である、上記方法。

【請求項 35】

前記測定が免疫アッセイの使用を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記免疫アッセイがELISAである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記正常参照サンプルが前記被験体由来の事前サンプルである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 38】

妊娠関連高血圧障害を有するか、またはそれに対する素因を有する被験体を診断する方法であって、該被験体由来の可溶性エンドグリンポリペプチドおよびsFlt-1ポリペプチドのレベルを測定すること、および[可溶性エンドグリン × sFlt-1]の測定基準 (metric) を使用して可溶性エンドグリンとsFlt-1の該レベル間の関係を算出することを含み、正常参照サンプルに対する被験体サンプルにおける該測定基準の増大が該被験体における妊娠関連高血圧障害の診断指標である、上記方法。

【請求項 39】

前記測定基準が母親の体格指数または胎児の在胎期間をさらに含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

妊娠関連高血圧障害を有するか、またはそれに対する素因を有する被験体を診断する方法であって、妊娠第一期および妊娠第二期中の該被験体由来の可溶性エンドグリンポリペプチドおよびsFlt-1ポリペプチドのレベルを測定すること、および以下の測定基準 (metr

10

20

30

40

50

ic) : [dproduct=妊娠第二期中の(sFlt1 × sEng) - 妊娠第一期中の(sFlt1 × sEng)] を使用して可溶性エンドグリンとsFlt-1の該レベル間の関係を算出することを含み、0を超えるdproduct値が該被験体における妊娠関連高血圧障害の診断指標である、上記方法。

【請求項 4 1】

1を超えるdproduct値が前記被験体における妊娠関連高血圧障害の診断指標である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

1を超えるdproduct値が早産の子癩前症の診断指標である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記サンプルが、前記可溶性エンドグリンが通常検出可能である前記被験体の体液、細胞、または組織である、請求項 3 4、3 8、または 4 0 に記載の方法。

10

【請求項 4 4】

前記体液が尿、羊水、血液、血清、および血漿からなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記細胞が内皮細胞、白血球、単球、および胎盤由来の細胞からなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記組織が胎盤組織である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記被験体が非妊娠状態のヒト、妊娠したヒト、産後のヒト、またはヒト以外の動物であり、かつ前記方法が妊娠関連高血圧障害を発症する傾向を診断する、請求項 3 4、3 8、または 4 0 に記載の方法。

20

【請求項 4 8】

前記ヒト以外の動物がウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコからなる群より選択される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

症状の発現前に少なくとも4週間、前記方法を使用して、妊娠関連高血圧障害または妊娠関連高血圧障害を発症する傾向を診断する、請求項 3 4、3 8、または 4 0 に記載の方法。

30

【請求項 5 0】

前記妊娠関連高血圧障害が子癩前症、子癩、妊娠性高血圧、慢性高血圧、HELLP症候群、およびSGA幼児を伴う妊娠である、請求項 1、3 4、3 8、または 4 0 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記妊娠関連高血圧障害が子癩前症または子癩である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

被験体における妊娠関連高血圧障害を診断するためのキットであって、(i)可溶性エンドグリン結合物質および(ii)TGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP2、BMP7、eNOS、およびPGI₂からなる群より選択されるポリペプチドと結合する少なくとも1つの他の結合物質、ならびに(iii)妊娠関連高血圧障害または妊娠関連高血圧障害を発症する傾向を診断するための(i)の結合物質および(ii)の少なくとも1つの結合物質の使用説明書を含む、上記キット。

40

【請求項 5 3】

前記(i)の結合物質が可溶性エンドグリンと特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片であり、かつ(ii)の少なくとも1つの結合物質がTGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP2、BMP7、eNOS、またはPGI₂と特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片である、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 4】

前記キットがVEGF、sFlt-1、またはPlGF結合分子をさらに含む、請求項 5 2 に記載のキット。

50

【請求項 5 5】

前記妊娠関連高血圧障害が子癇前症、子癇、慢性高血圧、HELLP症候群、妊娠性高血圧、またはSGA幼児を伴う妊娠である、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 6】

妊娠関連高血圧障害を改善する化合物を同定する方法であって、

(a)細胞を可溶性エンドグリン化合物と接触させるステップ、

(b)ステップ(a)の該細胞中のeNOSのThr495のリン酸化状態を測定するステップ、

(c)該細胞を候補化合物と接触させるステップ、

(d)ステップ(c)の前記細胞中のeNOSのThr495のリン酸化状態を測定するステップ、および

(e)ステップ(b)およびステップ(d)において測定したリン酸化状態を比較するステップを含み、ステップ(b)と比較したステップ(d)におけるeNOSのThr495の脱リン酸化の増大によって、該候補化合物が妊娠関連高血圧障害を改善する化合物として同定される、上記方法。

10

【請求項 5 7】

妊娠関連高血圧障害を改善する化合物を同定する方法であって、

(a)細胞をSmad2/3依存性レポーター構築物および可溶性エンドグリン化合物と接触させるステップ、

(b)ステップ(a)の細胞中のSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルを測定するステップ、

(c)ステップ(a)の該細胞を候補化合物と接触させるステップ、

(d)ステップ(c)の細胞中のSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルを測定するステップ、および

(e)ステップ(b)およびステップ(d)において測定したSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルを比較するステップ

を含み、ステップ(b)と比較したステップ(d)におけるSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルの増大によって、該候補化合物が妊娠関連高血圧障害を改善する化合物として同定される、上記方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

一般に本発明は、妊娠関連高血圧障害を有する被験体の検出および治療に関する。

【背景技術】

【0002】

子癇前症は、妊娠の5~10%に影響を与え、母体および胎児の相当な罹患率および死亡率をもたらす、高血圧、浮腫およびタンパク尿の症候群である。子癇前症は、世界中で年間少なくとも200,000の母体の死亡を占める。子癇前症の症候群は、典型的には妊娠第20週後に現れ、女性の血圧および尿の日常的な測定によって通常検出される。しかしながら、これらのモニタリング法は初期段階の症候群の診断には無効である。有効な治療が利用可能であるとすれば、初期段階の診断は被験体または発育中の胎児に対するリスクを低下させ得る。

40

【0003】

現在、子癇前症の治療法は分かっていない。子癇前症は、軽度から致死的まで重度が異なることがある。軽度の子癇前症は、床上安静および頻繁なモニタリングによって治療することができる。中等度から重度の症例に関しては、入院が勧められ、発作を予防するための血圧薬または抗痙攣薬が処方される。状態が母親または赤ん坊にとって致死的になる場合、妊娠は中断され、赤ん坊は早産となる。

【0004】

胎児および胎盤の適切な発達は、いくつかの増殖因子または抗血管新生因子によって媒介される。これらの抗血管新生因子の1つは、CD105としても知られるエンドグリンである

50

。エンドグリンは、合胞体栄養細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、血管内皮細胞などの内皮細胞で主に発現されるホモ二量体細胞膜糖タンパク質である。エンドグリンは、形質転換増殖因子(TGF)- 受容体(T R)III型であるベータグリカンと配列同一性を共有する。エンドグリンは、血管新生、増殖、分化およびアポトーシスを調節するTGF- 受容体複合体の制御成分であることが示されている。エンドグリンは、アクチビン-A、骨形成タンパク質(BMP)-2およびBMP-7を含めたTGF- スーパーファミリーのいくつかの他のメンバーとも結合する。特に、エンドグリンは高い親和性でTGF- 1およびTGF- 3と結合し、TGF- シグナル伝達受容体I型およびII型とのヘテロ三量体会合を形成する。エンドグリン遺伝子のコード領域の突然変異は、多臓器血管形成不全および再発性出血によって特徴付けられる優性遺伝性の血管障害である出血性毛細管拡張症1型(HHT1)の原因である。エンドグリンの免疫反応性はこれまで、転移性の乳癌および結腸直腸癌を有する患者の血漿において高レベルで検出されてきたが、その生化学的特徴は決定されておらず、癌の発病におけるその正確な機能的役割は明らかではない。可溶性エンドグリンの生成が、子癇前症または正常な妊娠と関係があることは報告されていない。

10

20

30

40

50

【0005】

いくつかの因子が、胎児および胎盤の発達、より詳細には子癇前症と関係があることが報告されてきている。その因子は血管内皮増殖因子(VEGF)、可溶性Flt-1受容体(sFlt-1)、および胎盤増殖因子(PlGF)を含む。VEGFは内皮細胞特異的マイトジェン、血管新生誘導因子、および血管透過性のメディエーターである。VEGFは糸球体毛細血管の修復に重要であることも示されている。VEGFは、多くの異なる組織から得た内皮細胞において異なった形で発現される2つの相同的な膜貫通チロシンキナーゼ受容体、fms様チロシンキナーゼ(Flt-1)およびキナーゼドメイン受容体(KDR)の1つにホモ二量体として結合する。KDRではなくFlt-1が、胎盤形成に寄与するトロホプラスト細胞によって高度に発現される。PlGFは、胎盤の発達とも関係があるVEGFファミリーのメンバーである。PlGFは細胞栄養芽層および合胞体栄養細胞によって発現され、内皮細胞の増殖、移動および活性化を誘導することができる。PlGFはホモ二量体として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の両方が、胎盤の発達に重要であるマイトジェン活性および血管新生に寄与する。

【0006】

最近、受容体の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠くsFlt-1が、ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養培地において同定され、後にin vivo発現が胎盤組織において実証された。sFlt-1はVEGFと高い親和性で結合するが、内皮細胞の有糸分裂誘発を刺激しない。血管新生および有糸分裂シグナル伝達経路の入念な制御は、発達中の胎盤におけるトロホプラスト細胞による適切な増殖、移動および血管新生を維持するのに重要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

特に、最も重大な症状が発現する前に、子癇前症もしくは子癇のリスクがあるか、またはそれらを有する被験体を正確に診断する方法に関する必要性が存在する。治療も必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、子癇前症および子癇を含めた、妊娠関連高血圧障害を診断および治療するための方法を発見した。

【0009】

遺伝子発現分析を使用して、可溶性エンドグリン(sEng)のレベルは、子癇前症を含めた高血圧を伴う妊娠合併症を患う妊婦由来の胎盤組織サンプルにおいて著しく上昇することを、本発明者らは発見した。ウエスタンブロッティングを使用して、可溶性エンドグリンのタンパク質レベルは、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を有する女性から採取した血清サンプル中で上昇することも、本発明者らは発見した。可溶性エンドグリン

は、タンパク質分解酵素による膜結合型の細胞外部分の切断によって形成され得る。これらのサンプル中で検出される可溶性エンドグリンは、完全長エンドグリンのアミノ末端部分の少なくとも最初の381アミノ酸(リーダーペプチドを除く、リーダーペプチドを含めると406アミノ酸)を含むことを、本発明者らは発見した。子癩前症における過剰な可溶性エンドグリンは、本明細書に記載の通り内皮細胞上のTGF- β 1とT RIIの結合を妨げてシグナル伝達が低減されることにより、必要量のこれらの必要不可欠な抗血管新生因子およびマイトジェン因子を胎盤から奪い得る。可溶性エンドグリンは内皮細胞中のTGF- β 1のシグナル伝達および内皮一酸化窒素合成酵素(eNOS)の活性化に干渉し、それによって血管の健康状態の維持に必要な主要ホメオスタシスのメカニズムを混乱させることも、本発明者らは発見した。可溶性エンドグリンは内皮細胞上のTGF- β 1とT RIIの結合を妨げて、シグナル伝達が低減されることを本発明者らは実証する。循環TGF- β 1は、潜伏関連ペプチドおよび潜在TGF- β 1結合タンパク質と複合体形成するので、活性化されない限り、その受容体と結合することはできない。したがって、可溶性エンドグリンは、活性TGF- β 1が生成される場所で局所的にTGF- β 1作用しか阻害しない可能性がある。総合するとこれらのデータから、TGF- β 1受容体活性化を一酸化窒素(NO)合成と結びつける上でのエンドグリンの役割が重大であることが示唆される。さらに、本発明者らの機能的な研究から、可溶性エンドグリンとsFlt1は協調して、おそらくNOSの下流活性化を阻害することによって、それぞれTGF- β 1およびVEGFのシグナル伝達に干渉することにより血管の損傷およびHELLP症候群を誘導することを示唆される。

10

20

30

40

50

【0010】

本発明では、可溶性エンドグリンと結合する、またはそれを中和する化合物を使用して、可溶性エンドグリンの上昇したレベルを低下させ、子癩前症または子癩を含めた高血圧を伴う妊娠合併症を治療する。例えば、可溶性エンドグリンに対して作られた抗体、ならびに生物活性がある可溶性エンドグリンのレベルを低下させるために作られたRNA干渉およびアンチセンス核酸塩基オリゴマーも提供する。本発明はさらに、可溶性エンドグリンのレベルまたは生物活性を低下させる、または可溶性エンドグリン結合タンパク質(例えば、可溶性エンドグリン結合タンパク質(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビンA、骨形成タンパク質(BMP)-2およびBMP-7)、NOS、およびプロスタサイクリン(PGI₂)のレベルまたは生物活性を増大させる、任意の化合物(例えば、ポリペプチド、小分子、抗体、核酸、およびミメティクス)を単独で、あるいは互いに組み合わせて、またはsFlt-1のレベルを低下させるかVEGFまたはPIGFのレベルまたは活性を増大させる任意の化合物と組み合わせて(例えば、米国特許出願公開第20040126828号、同第20050025762号、および同第20050170444号およびPCT国際公開第2004/008946号および同第2005/077007号を参照)使用して、被験体における子癩前症または子癩などの妊娠関連高血圧障害を治療または予防することを特徴とする。本発明は、子癩前症および子癩を含めた妊娠関連高血圧障害の初期診断または管理の検出ツールとして、単独で、またはsFlt-1、VEGF、PIGF、TGF- β 1、eNOS、もしくはPGI₂と組み合わせて可溶性エンドグリンのレベルを測定するための方法も特徴とする。

【0011】

したがって、第一の態様では本発明は、被験体における妊娠関連高血圧障害を治療または予防する方法であって、(i)可溶性エンドグリンの発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物、および(ii)sFlt-1の発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物を、妊娠関連高血圧障害を治療または予防するのに十分な時間および量で被験体に投与することを含む方法の特徴とする。妊娠関連高血圧障害には、例えば子癩前症、子癩、妊娠性高血圧、慢性高血圧、HELLP症候群、および在胎期間に比べて小さい(SGA)幼児を伴う妊娠がある。妊娠関連高血圧障害は、子癩前症または子癩であることが好ましい。

【0012】

可溶性エンドグリンまたはsFlt-1の発現レベルまたは生物活性に関するアッセイは、当該技術分野で知られている。好ましい化合物は可溶性エンドグリンまたはsFlt-1の発現レベ

ルまたは生物活性を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上低下させるはずである。可溶性エンドグリンの発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物の非制限的な例には、可溶性エンドグリンと特異的に結合する任意の化合物、例えば精製可溶性エンドグリン抗体、可溶性エンドグリン抗原結合断片、または可溶性エンドグリン結合タンパク質(例えば、TGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP-2およびBMP-7)がある。

【0013】

可溶性エンドグリンの発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物の他の例には、タンパク質分解酵素を阻害する任意の化合物(例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、カテプシン、およびエラスターゼ)、または可溶性エンドグリンと結合することができる増殖因子のレベルを増大させる化合物がある。TGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP-2、BMP-7、またはこれらの断片などの増殖因子は、可溶性エンドグリンと結合することができる増殖因子のレベルを増大させる化合物の例であり、シクロスポリン、トコフェロール、メチセルギド、プロモクリプチン、およびアルドメットなどがある。

10

【0014】

sFlt-1の発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物の非制限的な例には、精製sFlt-1抗体またはsFlt-1抗原結合断片などのsFlt-1と特異的に結合することができる化合物;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、および硫酸マグネシウムなどの、sFlt-1と結合することができる増殖因子、VEGF(例えば、VEGF121、VEGF165、または修飾型VEGF)、PlGF、またはその断片のレベルを増大させる化合物がある。

20

【0015】

前述の方法の好ましい実施形態では、可溶性エンドグリンの発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物、またはsFlt-1の発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物、またはその両方が、一酸化窒素合成酵素(NOS)活性を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上増大させることも可能である。NOS活性に関するアッセイは当技術分野で知られており、本明細書に記載する。

【0016】

第二の態様では本発明は、被験体における妊娠関連高血圧障害を治療または予防する方法であって、NOSの発現レベルまたは生物活性を増大させることができる化合物を、被験体において妊娠関連高血圧障害を治療または予防するのに十分な時間および量で被験体に投与するステップを含む方法の特徴とする。NOSはeNOSであることが望ましい。一実施形態では化合物は、VEGF(例えば、VEGF121、VEGF165、または修飾型のVEGF)、またはその生物学的に活性な断片、またはPlGFまたはその生物学的に活性な断片などのeNOSのSer1177のリン酸化を増大させる化合物である。他の実施形態では化合物は、TGF- 1またはTGF- 3、アクチビンA、BMP-2、およびBMP-7などのeNOSのThr495の脱リン酸化を増大させる化合物である。他の実施形態では化合物は、eNOSのレベルの低下を妨げるかまたはeNOSの安定性を増大させる化合物である。

30

40

【0017】

場合によっては、この方法は、可溶性エンドグリンの発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物を被験体に投与することをさらに含み、その投与は被験体における妊娠関連高血圧障害を治療または予防するのに十分である。可溶性エンドグリンの発現または生物活性を低下させることができる化合物の非制限的な例には、可溶性エンドグリンと特異的に結合する精製抗体もしくは可溶性エンドグリン抗原結合断片、またはマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、カテプシン、およびエラスターゼからなる群より選択されるタンパク質分解酵素を阻害する化合物、またはTGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP-2、BMP-7、またはそれらの断片などの増殖因子がある。可溶性エンドグリンと特異的に結合する代表的な抗体には、図30Bに示すヒトエンドグリン配列のアミノ酸26~437

50

、40～406、または26～587からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む可溶性エンドグリンポリペプチドと結合する抗体がある。本発明の方法において有用である他の代表的な抗体には、図30Bに示すヒトエンドグリン配列のアミノ酸40～86、144～199、206～222、289～304、または375～381を含むヒトエンドグリン上のエピトープと結合する抗体がある。

【0018】

一実施形態では、妊娠関連高血圧障害は、正常参照と比較したsFlt-1ポリペプチドのレベルの増大によって特徴付けられる。場合によっては、この方法は、sFlt-1の発現レベルまたは生物活性を低下させることができる化合物を被験体に投与することをさらに含み、その投与は被験体における妊娠関連高血圧障害を治療または予防するのに十分である。可溶性sFlt-1の発現または生物活性を低下させることができる化合物の非制限的な例には、sFlt-1と特異的に結合する精製抗体もしくはsFlt-1抗原結合断片、またはsFlt-1と結合するVEGF(例えば、VEGF121、VEGF165、または修飾型のVEGF)、PlGF、またはその断片などの増殖因子がある。

【0019】

任意の前述の方法に関して、方法は降圧化合物を被験体に投与するステップをさらに含み得る。任意の前述の方法の好ましい実施形態では、被験体は妊娠したヒト、産後のヒト、またはヒト以外の動物(例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、およびネコ)である。

【0020】

任意の前述の方法に関して、この方法は、被験体における妊娠関連高血圧障害をモニタリングするステップをさらに含むことができ、モニタリングは被験体由来の血清または血漿サンプル中の可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルを測定することを含む。可溶性エンドグリンの絶対レベルを測定する場合、25ng/ml未満の可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルは妊娠関連高血圧障害の改善を示す。代替的または追加的に、可溶性エンドグリンのレベルは2回以上測定することができ、または(例えば、妊娠関連高血圧障害に罹患している被験体由来の)陽性参照サンプルと比較することができ、この場合測定間または陽性参照と比較したいずれかの可溶性エンドグリンレベルの低下は、妊娠関連高血圧障害の改善の指標である。可溶性エンドグリンレベルの測定は、免疫アッセイの使用を含み得る。可溶性エンドグリンは、遊離、結合、もしくは全可溶性エンドグリン、または分解もしくは酵素切断から生成するエンドグリンポリペプチドのレベルを含み得る。モニタリング法は、子癇前症または子癇の診断に関して本明細書に記載する任意の測定基準(metric)も含むことができる。例えばモニタリング法は、被験体における妊娠第一期および妊娠第二期中のsFlt-1および可溶性エンドグリンのレベルを測定すること、および分数を含めた0、1、2を超える値、またはそれより大きな値(例えば、陽性値)が子癇前症または子癇の診断指標である、以下の等式: $dproduct = \text{妊娠第二期中の}(sFlt1 \times sEng) - \text{妊娠第一期中の}(sFlt1 \times sEng)$ を使用して、それぞれの妊娠期中のsFlt1 × 可溶性エンドグリン(sEng)のデルタ値を計算することを含むことができる。経時的な値の減少は、妊娠関連高血圧障害の改善を示す。他の例では、妊娠第一期と妊娠第二期の間のsFlt-1レベル(dsFlt-1)またはsEngレベル(dsEng)に関するdproductを計算し、分数を含めた0、1、2を超える値、またはそれより大きな値(例えば、陽性値)は子癇前症または子癇の診断指標である。経時的な値の減少は、妊娠関連高血圧障害の改善を示す。

【0021】

任意のモニタリング法に関して、それらの方法を使用して化合物の治療用量を決定することができる。方法は被験体由来のサンプル中のsFlt-1、VEGF、またはPlGFポリペプチドの少なくとも1つのレベルを測定することもさらに含むことができ、これらのレベル間の関係は測定基準(metric)を使用して計算することもできるが、そうする必要はない。代表的な測定基準には、前に記載したように $[(sFlt-1+0.25 \text{可溶性エンドグリン})/PlGF]$ 、 $[(\text{可溶性エンドグリン}+sFlt-1)/PlGF]$ 、 $[sFlt-1 \times \text{可溶性エンドグリン}]$ 、およびdsFlt-1、dsEng、および $dproduct = \text{妊娠第二期中の}(sFlt1 \times sEng) - \text{妊娠第一期中の}(sFlt1 \times sEng)$ が

ある。

【0022】

他の態様では本発明は、可溶性エンドグリンポリペプチドと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を特徴とし、この抗体は、図30Bに示すヒトエンドグリン配列のアミノ酸40～86、144～199、206～222、289～304、または375～381を含むヒトエンドグリン上のエピトープと結合する。一実施形態では、抗体または抗原結合断片は、増殖因子(例えば、TGF-1、TGF-3、アクチビンA、BMP-2、およびBMP-7)と可溶性エンドグリンの結合を妨げる。

【0023】

抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、Fc部分、F(ab')₂、Fab、またはFv構造を欠く抗体をはじめとする、任意の型の抗体または抗体断片であってよい。一実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、製薬上許容される担体中に存在する。

【0024】

他の態様では本発明は、妊娠関連高血圧障害を有するか、またはそれに対する素因を有する被験体を診断する方法であって、被験体由来のサンプル中の、可溶性エンドグリンポリペプチド、および可溶性エンドグリン結合タンパク質(例えば、TGF-1、TGF-3、アクチビンA、BMP-2、およびBMP-7)からなる群より選択される少なくとも1つの他のポリペプチド、および可溶性エンドグリンシグナル伝達の下流メディエーター(例えば、eNOSおよびPGI₂)のレベルを測定することを含み、正常参照サンプル、標準、またはレベルと比較した可溶性エンドグリンレベルの増大および少なくとも1つの他のポリペプチドのレベルの低下が、妊娠関連高血圧障害の診断指標または妊娠関連高血圧障害を発症する傾向の診断指標である方法の特徴とする。

【0025】

他の態様では本発明は、妊娠関連高血圧障害を有するか、またはそれに対する素因を有する被験体を診断する方法であって、被験体由来の可溶性エンドグリンポリペプチドおよびsFlt-1ポリペプチドのレベルを測定すること、および[可溶性エンドグリン×sFlt-1]の測定基準(metric)を使用して可溶性エンドグリンとsFlt-1のレベル間の関係を予測することを含み、正常参照サンプルに対する被験体サンプルにおける測定基準の増大が被験体における妊娠関連高血圧障害の診断指標である方法の特徴とする。

【0026】

他の態様では本発明は、妊娠関連高血圧障害を有するか、またはそれに対する素因を有する被験体を診断する方法であって、妊娠第一期および妊娠第二期中の被験体におけるsFlt-1および可溶性エンドグリンのレベルを測定すること、および分数を含めた0、1、2を超える値、またはそれより大きな値(例えば、陽性値)が子癇前症または子癇の診断指標である、以下の等式:[dproduct=妊娠第二期中の(sFlt1×sEng)-妊娠第一期中の(sFlt1×sEng)]を使用して、それぞれの妊娠期中のsFlt1×可溶性エンドグリン(sEng)のデルタ値を計算することを含む方法の特徴とする。陽性値が早産の子癇前症の指標である可能性もある。このような測定値は妊娠第一期および妊娠第二期中に多数回得ることができ、dproductは経時的に追跡される場合がある。

【0027】

他の態様では本発明は、妊娠関連高血圧障害を有するか、またはそれに対する素因を有する被験体を診断する方法であって、妊娠第一期および妊娠第二期中の被験体におけるsFlt-1および可溶性エンドグリンのレベルを測定すること、および妊娠第一期と妊娠第二期の間のsFlt-1レベル(dsFlt-1)またはsEngレベル(dsEng)に関するdproductを計算することであって、分数を含めた0、1、2を超える値、またはそれより大きな値(例えば、陽性値)が子癇前症または子癇の診断指標であることを含む方法の特徴とする。

【0028】

本発明の任意の診断法に関して、測定はELISAなどの免疫アッセイの使用を含むことができる。一実施形態では、正常参照サンプルは被験体由来の事前サンプルである。他の実

10

20

30

40

50

施形態では、測定基準は母親の体格指数または胎児の在胎期間をさらに含む。サンプルは可溶性エンドグリンが通常検出可能である被験体の体液(例えば、尿、羊水、血液、血清、および血漿)、細胞(例えば、内皮細胞、白血球、単球、および胎盤由来の細胞)、または組織(例えば、胎盤組織)であってよい。被験体は非妊娠状態のヒト、妊娠したヒト、産後のヒト、またはヒト以外の動物(例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコ)であってよく、方法を使用して、妊娠関連高血圧障害または妊娠関連高血圧障害を発症する傾向を診断することができる(例えば、症状の発現前に少なくとも4週間)。

【0029】

さらに他の態様では本発明は、被験体における妊娠関連高血圧障害を診断するためのキットであって、(i)可溶性エンドグリン結合物質および(ii)TGF- β 1、TGF- β 3、eNOS、およびPGI₂からなる群より選択されるポリペプチドと結合する少なくとも1つの他の結合物質、ならびに(iii)妊娠関連高血圧障害または妊娠関連高血圧障害を発症する傾向を診断するための(i)の結合物質および(ii)の少なくとも1つの結合物質の使用説明書を含むキットを特徴とする。結合物質は、可溶性エンドグリンと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、またはTGF- β 1、TGF- β 3、eNOS、またはPGI₂と特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であってよい。

10

【0030】

場合によっては、キットはVEGF、sFlt-1、またはPIGF結合分子も含むことができる。

【0031】

他の態様では本発明は、妊娠関連高血圧障害を改善する化合物を同定する方法であって、

20

(a)細胞を可溶性エンドグリン化合物と接触させるステップ、

(b)可溶性エンドグリン化合物と接触させた後の、細胞中のeNOSのThr495のリン酸化状態を測定するステップ、

(c)該細胞を候補化合物と接触させるステップ、

(d)細胞を候補化合物と接触させた後の、細胞中のeNOSのThr495のリン酸化状態を測定するステップ、および

(e)ステップ(b)およびステップ(d)において測定したリン酸化状態を比較するステップを含み、ステップ(b)と比較したステップ(d)におけるeNOSのThr495の脱リン酸化の増大によって、妊娠関連高血圧障害を改善する化合物として前記候補化合物が同定される方法を特徴とする。

30

【0032】

さらに他の態様では本発明は、妊娠関連高血圧障害を改善する化合物を同定する方法であって、

(a)細胞をSmad2/3依存性レポーター構築物および可溶性エンドグリン化合物と接触させるステップ、

(b)ステップ(a)の細胞中のSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルを測定するステップ、

(c)ステップ(a)の細胞を候補化合物と接触させるステップ、

(d)ステップ(c)の細胞中のSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルを測定するステップ、および

40

(e)ステップ(b)およびステップ(d)において測定したSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルを比較するステップを含み、

ステップ(b)と比較したステップ(d)におけるSmad2/3レポーター構築物の活性化のレベルの増大によって、妊娠関連高血圧障害を改善する化合物として前記候補化合物が同定される方法を特徴とする。

【0033】

任意の前述の態様に関して、妊娠関連高血圧障害は、子癇前症、子癇、妊娠性高血圧、慢性高血圧、HELLP症候群、およびSGA幼児を伴う妊娠であってよい。一実施形態では、妊娠関連高血圧障害は子癇前症または子癇である。

50

【0034】

以下に記載したように、可溶性エンドグリン/TGF- とsFlt-1/VEGF/PlGFシグナル伝達経路の両方の脱制御は一緒に働いて、妊娠関連高血圧障害の病状を促進することが可能であることを、本発明者らは発見した。したがって本発明は、米国特許出願公開第20040126828号、同第20050025762号、同第20050170444号、同第2006/0067937号、および同第20070104707号およびPCT国際公開第2004/008946号、同第2005/077007号、および同第06/034507号中に記載された治療、診断、またはモニタリング法のいずれかと、本明細書に記載する方法の組合せも特徴とする。

【0035】

本発明の目的のために、以下の略語および用語を以下のように定義する。

【0036】

「**改変**」とは変化(増大または低下)を意味する。改変は、以下に記載する方法などの標準的な当技術分野で知られている方法によって検出される、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルの変化を含み得る。本明細書で使用する改変は、発現レベルの10%の変化、好ましくは25%の変化、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の発現レベルの変化を含む。「**改変**」は、本発明の任意のポリペプチド(例えば、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、PlGF、eNOS、またはTGFファミリーのメンバー)の生物活性の変化(増大または低下)も示すことができる。本明細書で使用する改変は、生物活性の10%の変化、好ましくは25%の変化、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の生物活性の変化を含む。可溶性エンドグリンに関する生物活性の例は、血管新生およびアクチビン-A、BMP2、BMP-7、TGF-1およびTGF-3などの基質との結合である。可溶性エンドグリンの生物活性は、当技術分野において標準的であるかまたは本明細書に記載する、リガンド結合アッセイ、免疫アッセイ、および血管新生アッセイによって測定することができる。このようなアッセイの一例は、*in vitro*マトリゲル内皮管形成アッセイであり、ここではエンドグリンシグナル伝達のアンタゴニズムが毛細管形成の多大な消失をもたらした(Li et al., *Faseb Journal* 14: 55~64 (2000))。eNOSに関する生物活性の例は当技術分野で知られており、酸素およびアルギニンからの一酸化窒素すなわち「NO」の形成の触媒を含む。TGF-に関する生物活性の例には、多くの細胞型における増殖、分化、運動性、組織再編成、神経発生、創傷修復、アポトーシス、および血管新生の制御がある。このような活性は、当技術分野において知られているかまたは本明細書に記載するアッセイによって測定することができる。TGF-は多くの細胞型における細胞増殖も抑制し、マトリックスタンパク質の合成を刺激することができる。PlGFまたはVEGFに関する生物活性の他の例には、免疫アッセイ、リガンド結合アッセイまたはスキャッチャードプロット解析によって測定される受容体との結合、およびBrdU標識、細胞計数実験、または³H-チミジンの取り込みなどのDNA合成の定量アッセイによって測定される細胞増殖または移動の誘導がある。sFlt-1に関する生物活性の例には、免疫アッセイ、リガンド結合アッセイ、またはスキャッチャードプロット解析によって測定されるPlGFおよびVEGFとの結合がある。ポリペプチドの各々の生物活性に関するアッセイの他の例は、本明細書に記載する。

【0037】

「**アンチセンス核酸塩基オリゴマー**」とは、エンドグリン遺伝子のコード鎖またはmRNAと相補的である核酸塩基オリゴマーを、長さとは無関係に意味する。「**核酸塩基オリゴマー**」とは、連結基によって1つに結合した、少なくとも8個の核酸塩基、好ましくは少なくとも12個、および最も好ましくは少なくとも16個の塩基の鎖を含む化合物を意味する。この定義内に含まれるのは、天然および非天然オリゴヌクレオチド、修飾型と非修飾型の両方、およびタンパク質核酸、ロックド核酸、およびアラビノ核酸などのオリゴヌクレオチドミメクスである。参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20030114412号(例えば、この公開のパラグラフ27~45を参照)および米国特許出願公開第20030114407号(例えば、この公開のパラグラフ35~52を参照)中に記載された核酸塩基および連結基を含めた、多数の核酸塩基および連結基を本発明の核酸塩基オリゴマーにおいて利用する

10

20

30

40

50

ことができる。核酸塩基オリゴマーは、翻訳開始および停止部位を標的とすることも可能である。アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、約8~30個の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、エンドグリンのmRNAまたはDNAと相補的である少なくとも40、60、85、120、またはそれ以上の連続したヌクレオチドを含むこともでき、完全長mRNAまたは遺伝子と同程度の長さであってよい。

【0038】

「結合」とは、非共有または共有結合相互作用、好ましくは2つの分子を一緒に保持する非共有結合を意味する。例えば、2つのこのような分子はリガンドとその受容体、酵素とその酵素の阻害剤、酵素とその基質、または抗体と抗原であり得る。非共有結合相互作用には、水素結合、帯電基間のイオン相互作用、ファンデルワールス相互作用、および無極性基間の疎水性相互作用があるが、これらだけには限られない。1つまたは複数のこれらの相互作用は、2つの分子の結合を互いに仲介することができる。結合は特異性または選択性などの差別的性質を示し得る。

10

【0039】

「体格指数」(body mass index)とは、体重が健康範囲の範疇にあるかどうかの一般的指標を与える、身長と体重の測定値を使用することによって導いた数字を意味する。体格指数を決定するために一般に使用される式は、人の体重、キログラム単位÷人の身長、メートル単位の二乗、すなわち体重(kg)/(身長(m))²である。

【0040】

「化合物」とは、任意の小分子化学化合物(ペプチジルまたは非ペプチジル)、抗体、核酸分子、ポリペプチド、またはその断片を意味する。本発明の治療法に特に有用な化合物は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上可溶性エンドグリンのレベルまたは生物活性を変えるか、好ましくは低下させることが可能である。

20

【0041】

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

【0042】

「二本鎖RNA(dsRNA)」とは、センス鎖とアンチセンス鎖の両方から構成されるリボ核酸分子を意味する。典型的にはdsRNAを使用してRNA干渉を仲介する。

30

【0043】

CD105としても知られる「エンドグリン」または「Eng」とは、エンドグリンの生物活性を有し(Fonsatti et al., Oncogene22: 6557~6563, 2003; Fonsatti et al., Curr.Cancer Drug Targets 3: 427~432, 2003;およびCheifetz et al., J.Biol.Chem.267: 19027~19030(1992)を参照)、以下のGenBank登録番号:AAH29080およびNP_031958(マウス);AAS67893(ラット);NP_000109、P17813、VSP_004233、CAA80673(ブタ);ならびにCAA50891およびAAC63386(ヒト)のいずれかによって定義されるかまたはU.S.P.N.6,562,957中に記載されるタンパク質と相同的である、哺乳動物の増殖因子を意味する。エンドグリンは、増殖する血管内皮細胞および胎盤由来の合胞体栄養細胞において高レベルで発現されるホモ二量体細胞膜糖タンパク質である。それらの細胞質尾部が47アミノ酸異なるエンドグリンの2つの異なるアイソフォーム、LおよびSが存在する。両方のアイソフォームが、本明細書で使用する用語エンドグリンに含まれる。エンドグリンはTGF- β ファミリーのメンバーと結合し、TGF- β の存在下においてエンドグリンは、TGF- β シグナル伝達受容体RIおよびRIIと結合し、増殖因子に対する応答性を高めることができる。エンドグリンの生物活性には、アクチビンA、BMP2、BMP-7、TGF- β 1およびTGF- β 3などのTGF- β ファミリーのメンバーなどの基質との結合、血管新生の誘導、細胞増殖、結合、移動、浸潤の制御、および内皮細胞の活性化がある。エンドグリンの生物活性に関するアッセイは当技術分野で知られており、リガンド結合アッセイまたはスキャッチャードプロット解析、細胞増殖を測定するために使用されるBrdU標識、細胞計数実験、または³H-チミジンの取り込みなどのDNA合成の定量アッセイ、および本明細書またはMcCarty et al., Intl.J.Oncol.21:5~10, 200

40

50

2; Akhtar et al. Clin. Chem. 49:32~40, 2003; および Yamashita et al, J. Biol. Chem. 269: 1995~2001、1994中に記載されるアッセイなどの血管新生アッセイを含む。

【0044】

「可溶性エンドグリンポリペプチド」または「sEng」とは、エンドグリンタンパク質の細胞外部分の少なくとも一部分を含み、エンドグリンタンパク質の細胞外部分をコードするアミノ酸配列(図1および2B参照)と(例えば60%、70%、80%、90%、99.5%、96%、97%、98%、99%、または100%)実質的に同一である、エンドグリンの任意の循環、非膜結合型を意味する。可溶性エンドグリンは、タンパク質分解酵素によるエンドグリンの膜結合型の切断から生成し得る。1つの考えられる切断部位は、ERにおいて典型的には切断されるペプチドリーダー配列(図3Aおよび3B参照)を含むエンドグリンポリペプチドのアミノ酸1~437を含む可溶性エンドグリンポリペプチド、またはエンドグリンポリペプチドのアミノ酸1~437と実質的に同一であるタンパク質を生成するヒトエンドグリンのアミノ酸437である。本発明によって企図される可溶性エンドグリンの他の形には、図30Bに示すヒトエンドグリンのアミノ酸40(グリシン)~406(アルギニン)と実質的に同一、ヒトエンドグリンのアミノ酸1~587(細胞外ドメイン全体、R&D Systemsから市販されているペプチドリーダー配列、カタログ番号1097-ENを含む)と実質的に同一、図30Bに示すヒトエンドグリンのアミノ酸40~587(これがペプチドリーダー配列を除いた細胞外ドメイン全体である)と実質的に同一であるタンパク質、図30B中において太線および下線で確認されるペプチドを含む任意のポリペプチド、およびTGF- β またはTGF- β 受容体との結合に必要とされる可溶性エンドグリンの領域またはドメインを含む任意のポリペプチドがある。エンドグリンと可溶性エンドグリンの両方の番号処理は、リーダーペプチド配列が含まれるかどうかによって依存することを記さなければならない。図30Bに示すエンドグリンの番号処理は、アミノ酸26で始まる(この場合、不在リーダーペプチド配列はアミノ酸1~25であり得る)。可溶性エンドグリンは、酵素によるエンドグリンの切断から生成しエンドグリンの生物活性を維持する、循環する分解産物または断片も含み得る。好ましい可溶性エンドグリンポリペプチドは、TGF- β ファミリーのメンバーまたはTGF- β 受容体などの基質との結合、TGF- β ファミリーのメンバーの生物活性の阻害、または少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の血管新生の無効または阻害などの可溶性エンドグリンの生物活性を有する。これらの活性を測定するためのアッセイの例は当技術分野で知られており、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20060067937号、同第20050267021号、および同第20070104707号およびPCT国際公開第06/034507号中に記載されている。例えば、可溶性エンドグリンの生物活性は、TGF- β によって誘導される血管新生を無効にする、減少させる、もしくは阻害する能力、またはSmad2/3の活性化もしくはSmad2/3依存性の転写活性化を無効にする能力を含み得る。可溶性エンドグリンポリペプチドは様々な供給源から、哺乳動物の組織または細胞(例えば、胎盤組織または細胞)などから単離することができ、または組換えもしくは合成法によって調製することができる。用語可溶性エンドグリンは、エンドグリンポリペプチドのポリペプチド、断片、誘導體、類似体、および変異体に対する修飾も含み、それらの例は以下に記載する。

【0045】

「エンドグリン核酸」とは、前に記載したエンドグリンタンパク質のいずれかをコードする核酸を意味する。例えば、ヒトエンドグリンの遺伝子は14エクソンからなり、この場合エクソン1はシグナルペプチド配列をコードし、エクソン2~12は(エクソン9aおよび9bを含む)細胞外ドメインをコードし、エクソン13は膜貫通ドメインをコードし、かつエクソン14はC末端細胞質ドメインをコードする(図1、2A、および2Bを参照)。エンドグリン核酸は、前に記載したかまたは図2Aに示す核酸配列と(60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)実質的に同一である可溶性エンドグリンポリペプチドのいずれかをコードすることが望ましい。循環タンパク質はペプチドリーダー配列(アミノ酸1~25)を欠くことが予想されることを、記さなければならない。

【0046】

「エピトープ」とは、線状構造または三次元立体配座のいずれかの結果として抗体の結合部位を形成する、アミノ酸の配列を意味する。

【0047】

「発現」とは、標準的な当技術分野で知られている方法による遺伝子またはポリペプチドの検出を意味する。例えば、ポリペプチドの発現はウエスタンブロッティングによって検出されることが多く、DNAの発現はサザンブロッティングまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって検出されることが多く、かつRNAの発現はノーザンブロッティング、PCR、またはRNAse保護アッセイによって検出されることが多い。タンパク質の発現レベルを測定するための方法には、一般にウエスタンブロット、イムノブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫沈降、表面プラズモン共鳴、化学発光、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析、マイクロサイトメトリー、マイクロアレイ、顕微鏡法、蛍光活性化細胞選別(FACS)、およびフローサイトメトリー、ならびに酵素活性または他のタンパク質パートナーとの相互作用だけには限られないが、これらを含めたタンパク質の性質に基づくアッセイがあるが、これらだけには限られない。代表的なアッセイは、米国特許出願公開第2006/0067937号およびPCT国際公開第06/034507号中に詳細に記載されている。可溶性エンドグリンのレベルを少なくとも10%、20%、好ましくは30%、より好ましくは少なくとも40%または50%、および最も好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%以上低下させる任意の化合物が、本発明の治療用化合物であると考えられる。

10

【0048】

「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を意味する。この一部分は、好ましくは、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を含む。断片は10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1250、1500、1750、1800またはそれ以上のヌクレオチド、または10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、640またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。可溶性エンドグリンの代表的な断片には、1~437のアミノ酸(ペプチドリーダー配列を含む)、26~437のアミノ酸(ペプチドリーダー配列を除く)、40~406のアミノ酸、または1~587のアミノ酸、および1~1311、10~1311、80~1030、または1~1761のヌクレオチドがある。

20

30

【0049】

「在胎期間」とは、通常数週間と言われる母親の最終月経期の初日から数えた、胎児の年齢に関する言及を意味する。

【0050】

「妊娠性高血圧」とは、妊娠第20週後のタンパク尿を伴わない高血圧の発症を意味する。

【0051】

「子癇前症または子癇の病歴」とは、被験体自体または関係がある家族のメンバーにおける子癇前症または子癇または妊娠誘導型高血圧の以前の診断歴を意味する。

【0052】

「相同的」とは、比較配列の長さで知られている遺伝子またはタンパク質配列と少なくとも30%の相同性、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、および最も好ましくは90%以上の相同性を有する任意の遺伝子またはタンパク質配列を意味する。「相同的」タンパク質は、比較タンパク質の少なくとも1つの生物活性も有することができる。一般にタンパク質に関して、比較配列の長さは少なくとも10アミノ酸、好ましくは20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、250、300、350、400、437、または少なくとも587アミノ酸以上であるはずである。核酸に関して、比較配列の長さは一般に少なくとも25、50、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1000、1100、1200、1311、または少なくとも1761ヌクレオチド以上であるはずである。「相同性」は、抗体を作製するために使用されるエピトープ

40

50

と抗体が対象とするタンパク質またはその断片の間の、実質的類似性も指すことができる。この場合相同性は、当該のタンパク質を特異的に認識することができる抗体の生成を誘導するのに十分な類似性を指す。

【0053】

「ヒト化抗体」とは、所定の抗原と結合することができる免疫グロブリンアミノ酸配列変異体またはその断片を意味する。通常、抗体は、軽鎖と重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含むはずである。抗体は重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、またはCH4領域も含むことができる。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域(FR)、および非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列(「輸入」配列)を実質的に有する相補性決定領域(CDR)を含む。

10

【0054】

一般にヒト化抗体は、ヒト以外の動物である供給源からそこに導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。一般にヒト化抗体は、ヒト以外の動物の免疫グロブリンの領域に対応する全てのまたは実質的に全てのCDR領域および全てのまたは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列の領域である、少なくとも1つ、および典型的には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はずである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むことが最適であるはずである。「相補性決定領域(CDR)」とは、それぞれの免疫グロブリン軽鎖と重鎖内の可変領域中の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、免疫グロブリン軽鎖と重鎖の3つの超可変配列(CDR)の片側に位置するアミノ酸の配列を意味する。

20

【0055】

ヒト化抗体のFRおよびCDR領域は親配列に正確に対応する必要はない、例えば輸入CDRまたはコンセンサスFRは、その部位におけるCDRまたはFR残基がコンセンサスまたは輸入抗体のいずれかに対応しないように、少なくとも1つの残基の置換、挿入または欠失によって突然変異を誘発することが可能である。しかしながら、このような突然変異は広範囲ではないはずである。通常、少なくとも75%、好ましくは90%、および最も好ましくは少なくとも95%のヒト化抗体の残基が、親FRおよびCDR配列の残基に対応するはずである。

【0056】

「ハイブリダイズ」とは、様々なストリンジェンシー条件下において相補的ポリヌクレオチド配列、またはその一部分の間で二本鎖分子を形成するための対を意味する(例えば、Wahl and Berger Methods Enzymol.152: 399、1987; Kimmel、Methods Enzymol.152: 507、1987を参照)。例えば、厳密な塩濃度は通常約750mM未満のNaClおよび75mMのクエン酸三ナトリウム、好ましくは約500mM未満のNaClおよび50mMのクエン酸三ナトリウム、および最も好ましくは約250mM未満のNaClおよび25mMのクエン酸三ナトリウムであるはずである。低ストリンジェンシーの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不在下で得ることができ、一方で高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは少なくとも約35%のホルムアミド、および最も好ましくは少なくとも約50%のホルムアミドの存在下で得ることができる。厳密な温度条件は少なくとも約30℃、より好ましくは少なくとも約37℃、および最も好ましくは少なくとも約42℃の温度を通常含むはずである。ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の濃度、および担体DNAを含むか含まないかなどの他のパラメータの変更は、当業者にはよく知られている。必要に応じてこれらの様々な条件を組み合わせることによって、様々なレベルのストリンジェンシーに到達する。好ましい実施形態では、750mMのNaCl、75mMのクエン酸三ナトリウム、および1%のSDS中で30℃においてハイブリダイゼーションが起こるはずである。より好ましい実施形態では、500mMのNaCl、50mMのクエン酸三ナトリウム、1%のSDS、35%のホルムアミド、および100 µg/mlの変性したサケ精子DNA(ssDNA)中で37℃においてハイブリダイゼーションが起こるはずである。最も好ましい実施形態では、250mMのNaCl、25mMのクエン酸三ナトリウム、1%のSDS、50%のホルムアミド、および200 µg/mlのssDNA中で42℃においてハイブリダイゼーションが起こるはずである。これらの条件の有用

30

40

50

なバリエーションは、当業者には容易に明らかであるはずである。

【0057】

大部分の適用例に関して、ハイブリダイゼーション後の洗浄ステップもストリンジェンシーが変わるはずである。洗浄ストリンジェンシーの条件は、塩濃度および温度によって定義することができる。前述のように、洗浄ストリンジェンシーは塩濃度を低下させることによって、または温度を上昇させることによって増大することが可能である。例えば、洗浄ステップに関する厳密な塩濃度は好ましくは約30mM未満のNaClおよび3mMのクエン酸三ナトリウム、および最も好ましくは約15mM未満のNaClおよび1.5mMのクエン酸三ナトリウムであるはずである。洗浄ステップに関する厳密な温度条件は少なくとも約25℃、より好ましくは少なくとも約42℃、および最も好ましくは少なくとも約68℃の温度を通常含むはずである。好ましい実施形態では、洗浄ステップは30mMのNaCl、3mMのクエン酸三ナトリウム、および0.1%のSDS中で25℃において行うはずである。より好ましい実施形態では、洗浄ステップは15mMのNaCl、1.5mMのクエン酸三ナトリウム、および0.1%のSDS中で42℃において行うはずである。最も好ましい実施形態では、洗浄ステップは15mMのNaCl、1.5mMのクエン酸三ナトリウム、および0.1%のSDS中で68℃において行うはずである。これらの条件の他のバリエーションは、当業者には容易に明らかであるはずである。ハイブリダイゼーション技法は当業者にはよく知られており、例えばBenton and Davis(Science 196: 180, 1977); Grunstein and Hogness(Prot.Natl.Acad. Sci., USA72: 3961, 1975); A usubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel(Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York中に記載されている。

10

20

30

40

50

【0058】

「子宮内発育遅延(IUGR)」とは、胎児の在胎期間の予想される胎児の体重の10パーセント未満である出生体重をもたらす症候群を意味する。低出生体重に関する現在の世界保健機関の基準は、2,500グラム(5ポンド8オンス)未満、または人種、出産経歴、および幼児の性別による在胎期間に関する出生体重のU.S.表に従った在胎期間の10パーセント未満の体重である(Zhang and Bowes, Obstet.Gynecol.86: 200~208, 1995)。これらの低出生体重の赤ん坊は、「在胎期間に比べて小さい(SGA)」とも呼ばれる。子癩前症は、IUGRまたはSGAと関係があることが知られている状態である。

【0059】

「測定基準」(metric)とは、尺度を意味する。測定基準を使用して、例えば当該のポリペプチドまたは核酸分子のレベルを比較することができる。代表的な測定基準には、数式またはアルゴリズム、比などがあるが、これらだけには限られない。使用される測定基準は、子癩前症または子癩などの妊娠関連高血圧障害を有する被験体、および正常な対照である被験体において、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、PlGF、またはこれらの任意の組合せのレベルを最もよく区別する測定基準である。使用される測定基準に応じて、妊娠関連高血圧障害の診断指標は(例えば、妊娠関連高血圧障害を有さない対照である被験体からの)参照値より著しく上または下である可能性がある。可溶性エンドグリンのレベルは、遊離、結合(すなわち、増殖因子と結合した)、または全(遊離+結合)可溶性エンドグリンの量を測定することによって決定する。sFlt-1のレベルは、遊離、結合(すなわち、増殖因子と結合した)、または全sFlt-1(遊離+結合)の量を測定することによって決定する。VEGFまたはPlGFのレベルは、遊離PlGFまたは遊離VEGF(すなわち、sFlt-1と結合しない)の量を測定することによって決定する。1つの代表的な測定基準は子癩前症抗血管新生指数(PAAI)とも呼ばれる $[sFlt-1/(VEGF+PlGF)]$ である。他の例は以下の可溶性エンドグリン抗血管新生指数: $(sFlt-1+0.25(\text{可溶性エンドグリンポリペプチド}))/PlGF$ である。さらに他の代表的な測定基準は以下の: $(\text{可溶性エンドグリン}+sFlt-1)/PlGF$ である。正常参照と比較したこれら2つの代表的な測定基準のいずれかの値の増大は、子癩前症または子癩の診断指標である。他の例は、妊娠第一期および妊娠第二期中の被験体におけるsFlt-1および可溶性エンドグリンのレベルの測定、および0、1、2を超える値、またはそれより大

きな値(例えば、陽性値)が子癩前症または子癩の診断指標である、以下の等式:[dproduct =妊娠第二期中の(sFlt1 × sEng) - 妊娠第一期中の(sFlt1 × sEng)]を使用して、それぞれの妊娠期中のsFlt1 × 可溶性エンドグリン(sEng)のデルタ値を計算することを含む。他の測定基準は、(dsFlt-1)または(dsEng)に関する0、1、2を超える値、またはそれより大きな値(例えば、陽性値)が子癩前症または子癩の診断指標である、妊娠第一期と妊娠第二期の間のsFlt-1レベル(dsFlt-1)およびsEngレベル(dsEng)のdproductを含む。

【0060】

本発明の任意の測定基準が、母親のBMIまたは幼児の在胎期間、または出産経歴をさらに含むことができる。任意の測定基準は、eNOS、TGF- β 1または β 3またはPGI₂のレベルもさらに含むことができる。

10

【0061】

「一酸化窒素合成酵素」または「NOS」とは、酸素およびアルギニンからの一酸化窒素(NO)の形成を触媒する酵素を意味する。NOSは数種のコファクター、触媒部位、ヘム-チオレートタンパク質のクラスに属するN末端オキシゲナーゼドメイン、およびNADPH:P450レダクターゼと相同的であるC末端レダクターゼドメインの一部であるヘム基を含む複合酵素である。L-アルギニン(L-Arg)のグアニジノ窒素の5電子の酸化を触媒することによって、NOSはNOを生成する。L-シトルリンへのL-Argの酸化は、中間体としてN-ヒドロキシ-L-アルギニンを生成する2回の連続した一原子酸化反応によって起こる。オキシゲナーゼドメインとレダクターゼドメインの間のドメイン間リンカーは、CaM結合配列を含む。NOは低濃度では血圧調節、神経伝達、学習および記憶などの多くの多様な生理的プロセスにおいてシグナルとして機能し、高濃度では防御性細胞毒素として機能する。

20

【0062】

哺乳動物では、3つの異なる遺伝子はNOSアイソザイム:ニューロン(nNOSまたはNOS-1)、サイトカイン誘導型(iNOSまたはNOS-2)および内皮(eNOSまたはNOS-3)をコードする。eNOSは膜と結合しており、内皮細胞膜へのeNOSの局在は共翻訳N末端ミリスチル化および翻訳後パルミチル化によって仲介される。本発明の好ましい実施形態では、NOSはeNOSである。

【0063】

「子癩前症抗血管新生指数(PAAI)」とは、抗血管新生活性の指標として使用するsFlt-1/VEGF+PIGFの比を意味する。10を超える、より好ましくは20を超えるPAAIは、子癩前症または子癩前症のリスクなどの妊娠関連高血圧障害を示す。

30

【0064】

「可溶性エンドグリン抗血管新生指数」とは、(sFlt-1+0.25可溶性エンドグリン)/PIGFの比を意味する。例えば、75以上、好ましくは100以上、またはより好ましくは200以上の値は子癩前症または子癩などの高血圧を伴う妊娠合併症を示す。

【0065】

「機能的に連結した」とは、適切な分子(例えば、転写活性化因子タンパク質)が制御配列と結合したときに遺伝子の発現を可能にするような形式で、遺伝子と制御配列が結びついていることを意味する。

40

【0066】

「製薬上許容される担体」とは、投与する化合物の治療特性を保ちながら、治療される哺乳動物にとって生理的に許容される担体を意味する。1つの代表的な製薬上許容される担体物質は生理食塩水である。他の生理的に許容される担体およびその配合物は当業者に知られており、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences、(20th edition)、ed.A.Gennaro、2000、Lippincott、Williams & Wilkins、Philadelphia、PA中に記載されている。

【0067】

「胎盤増殖因子(PIGF)」とは、GenBank登録番号P49763によって定義されるタンパク質と相同的でありPIGF生物活性を有する、哺乳動物の増殖因子を意味する。PIGFはVEGFファ

50

ミリーに属するグリコシル化ホモ二量体であり、選択的スプライシング機構によって2つの異なるアイソフォームにおいて見ることができる。PIGFは胎盤中で細胞栄養層細胞および合胞体栄養細胞によって発現され、PIGFの生物活性には、内皮細胞、特にトロホプラスト細胞の増殖、移動、および活性化の誘導がある。

【0068】

「多型」とは、子癇前症または子癇を発症する素因を示す、可溶性エンドグリン、sFlt-1、PIGF、またはVEGF核酸分子における遺伝的変異、突然変異、欠失または付加を意味する。このような多型は当業者には知られており、例えばRaab et al. (Biochem. J. 339: 579 ~ 588, 1999) および Parry et al. (Eur. J. Immunogenet. 26: 321 ~ 323, 1999) によって記載されている。多型は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、または非翻訳3'領域に存在し得る。エンドグリン遺伝子におけるこのような多型の知られている例には、エクソン7の3'端後の26塩基におけるイントロン7中のGGGGGAの6塩基の挿入がある (Ann. Neurol. 41: 683 ~ 6, 1997)。

10

【0069】

「妊娠関連高血圧障害」とは、血圧の上昇を伴うか、またはそれによって特徴付けられる、任意の状態または疾患または妊娠を意味する。これらの状態に含まれるのは、子癇前症(早産の子癇前症、重度の子癇前症を含む)、子癇、妊娠性高血圧、HELLP症候群、(溶血、肝酵素の上昇、血小板の減少)、胎盤早期剥離、慢性高血圧、子宮内発育制限を伴う妊娠、および在胎期間に比べて小さい(SGA) 幼児を伴う妊娠である。SGA 幼児を伴う妊娠が高血圧を伴うことは多くないが、それがこの定義内に含まれることは記さなければならない。

20

【0070】

「子癇前症」とは、タンパク尿または浮腫、または両方を伴う高血圧、糸球体機能障害、脳浮腫、肝臓浮腫、または妊娠または近年の妊娠の影響による凝固異常によって特徴付けられる多系統障害を意味する。早期、軽度、中等度、および重度の子癇前症などの全ての形の子癇前症が、この定義内に含まれる。子癇前症は一般に妊娠第20週後に生じる。子癇前症は、以下の症状:(1) 妊娠第20週後の140mmHgを超える収縮期血圧(BP)および90mmHgを超える拡張期BP(一般に4~168時間間隔で2回測定する)、(2) 初発のタンパク尿(ディップスティック(dipstick)により尿検査において1+、>300mgのタンパク質、24時間採尿、またはタンパク質/クレアチニン比>0.3を有する1つのランダムな尿サンプル)、および(3) 産後第12週までの高血圧およびタンパク尿の消散、の何らかの組合せとして一般に定義される。重度の子癇前症は、(1)110mmHgを超える拡張期BP(一般に4~168時間間隔で2回測定する)または(2)24時間採尿における3.5グラム以上のタンパク質の測定値、またはディップスティックにより少なくとも3+タンパク質を有する2つのランダムな尿検体によって特徴付けられるタンパク尿として一般に定義される。子癇前症では、高血圧とタンパク尿は互いに7日以内に一般に生じる。重度の子癇前症では、重度の高血圧、重度のタンパク尿およびHELLP症候群(溶血、肝酵素の上昇、血小板の減少)または子癇が同時に生じる可能性があり、または一度に1つの症候群のみが生じる可能性がある。HELLP症候群は、血小板減少症(<100000細胞/ μ l)、増大したLDH(>600IU/L)および増大したAST(>70IU/L)の兆候によって特徴付けられる。時折、重度の子癇前症は発作の発症をもたらす可能性がある。この重度の形の症候群は「子癇」と呼ばれる。子癇は、肝臓(例えば、肝細胞障害、門脈周囲の壊死)および中枢神経系(例えば、脳浮腫および脳出血)などの、いくつかの臓器または組織に対する機能障害または損傷も含む可能性がある。発作の病状は、脳浮腫および腎臓中の小血管の限局的痙攣の発症に続発すると考えられている。

30

40

【0071】

「早期の(premature)子癇前症」とは、第37週以内または第34週以内での症状の発現を伴う子癇前症を意味する。

【0072】

「プロスタサイクリン」または「PGI₂」とは、エイコサノイドとして知られる脂質分子のファミリーのメンバーを意味する。それは内皮細胞において酵素プロスタサイクリンシ

50

ンターゼの作用によりプロスタグランジンH₂(PGH₂)から生成され、主に血管内皮および平滑筋によって合成される。PGI₂の生物活性には、血小板凝集の阻害、平滑筋の弛緩、直接的な血管拡張による全身および肺血管耐性の低下、および腎臓におけるナトリウム利尿がある。

【0073】

「タンパク質」または「ポリペプチド」または「ポリペプチド断片」とは、天然に存在するポリペプチドまたはペプチドの全体または一部分を構成するか、非天然ポリペプチドまたはペプチドを構成する3つ以上のアミノ酸の任意の鎖を、翻訳後修飾(例えば、グリコシル化またはリン酸化)とは無関係に意味する。

【0074】

「参照サンプル」とは、比較目的で使用される任意のサンプル、標準、またはレベルを意味する。「正常参照サンプル」は、同じ被験体由来の事前サンプル、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を有さない妊娠被験体、妊娠しているが妊娠の初期(例えば、妊娠第一期もしくは妊娠第二期中、または子癇前症もしくは子癇などの妊娠関連高血圧障害の検出前)にサンプルを採取した被験体、妊娠しており子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害の病歴がない被験体、妊娠していない被験体由来のサンプル、知られている正常濃度での精製参照ポリペプチドのサンプル(すなわち、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を示さない)であってよい。「参照標準またはレベル」とは、参照サンプルから導いた値または数字を意味する。正常参照標準またはレベルは、以下の基準:胎児の在胎期間、母親の年齢、妊娠前の母親の血圧、妊娠中の母親の血圧、母親のBMI、胎児の体重、子癇前症または子癇の以前の診断歴、および子癇前症または子癇の家族歴の少なくとも1つによってサンプル被験体に適合する正常な被験体から導いた値または数字であってよい。「陽性参照」サンプル、標準または値は、以下の基準:胎児の在胎期間、母親の年齢、妊娠前の母親の血圧、妊娠中の母親の血圧、母親のBMI、胎児の体重、子癇前症または子癇の以前の診断歴、および妊娠関連高血圧障害の家族歴の少なくとも1つによってサンプル被験体に適合する、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を有することが知られている被験体由来するサンプルまたは値または数字である。

【0075】

「低下または阻害」とは、未処理サンプルと比較して前述のアッセイによって検出される(「発現」を参照)、全体的な減少、好ましくは20%以上、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のタンパク質または核酸のレベルの変化を引き起こす能力を意味する。

【0076】

「サンプル」とは、組織バイオプシー、細胞、体液(例えば血液、血清、血漿、尿、唾液、羊水、または脳脊髄液)または被験体から得られる他の検体を意味する。生物学的サンプルは、可溶性エンドグリン核酸分子もしくはポリペプチド、または両方を含むことが望ましい。

【0077】

「低分子干渉RNA(siRNA)」とは、分解対象の標的遺伝子またはmRNAを同定するために使用される、好ましくは10ヌクレオチド(nt)長を超える、より好ましくは15ヌクレオチド長を超える、および最も好ましくは19ヌクレオチド長を超える、単離dsRNA分子を意味する。19~25ヌクレオチドの範囲がsiRNAの最も好ましい大きさである。siRNAは、siRNA二本鎖の両方の鎖が1つのRNA分子内に含まれる短いヘアピンRNAも含み得る。siRNAは、任意の形のdsRNA(大きなdsRNAのタンパク質分解切断産物、一部分が精製されたRNA、ほぼ純粋なRNA、合成RNA、組換えによって生じたRNA)、および1つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換、および/または改変によって天然に存在するRNAと異なる改変型RNAを含む。このような改変は、19、20、21、22、23、24、または25ntのRNAの末端などへの、または内部(RNAの1つまたは複数のヌクレオチド)への非ヌクレオチド物質の付加を含むことができる。好ましい実施形態では、RNA分子は3'ヒドロキシル基を含む。本発明のRNA分子中のヌクレオチドは、天然に存在しないヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含

10

20

30

40

50

めた、非標準的なヌクレオチドも含むことができる。集合的に、全てのこのような改変型RNAはRNAの類似体と呼ぶ。本発明のsiRNAは、それがRNA干渉(RNAi)を仲介する能力を有するほど十分に天然RNAと類似していることのみ必要である。本明細書で使用するRNAiは、細胞または生物中への小さな干渉RNAまたはdsRNAの導入による、特異的mRNA分子のATP依存性の標的型切断および分解を指す。本明細書で使用する「RNAiを仲介する」は、どのRNAが分解されるかを区別または同定する能力を指す。

【0078】

「可溶性エンドグリン結合分子」とは、可溶性エンドグリンポリペプチドと結合する、好ましくは特異的に結合する、タンパク質または小分子化合物を意味する。可溶性エンドグリン結合分子は、例えば抗体、抗体関連ペプチド、可溶性エンドグリン結合抗体、または可溶性エンドグリン相互作用タンパク質の1つまたは複数のCDR領域であってよい。

10

【0079】

(sVEGF-R1としても知られる)「可溶性Flt-1(sFlt-1)」とは、GenBank登録番号U01134により定義されるタンパク質と相同的であり、sFlt-1の生物活性を有する可溶性のFlt-1受容体を意味する。sFlt-1ポリペプチドの生物活性は、任意の標準的な方法を使用して、例えばsFlt-1とVEGFの結合をアッセイすることによって、アッセイすることができる。sFlt-1は、Flt-1受容体の膜貫通ドメインおよび細胞質チロシンキナーゼドメインを欠いている。sFlt-1は高い親和性でVEGFおよびPlGFと結合することはできるが、sFlt-1は増殖または血管新生を誘導することはできず、したがってFlt-1およびKDR受容体とは機能的に異なる。sFlt-1は当初はヒト臍帯静脈内皮細胞から精製され、*in vivo*でトロホブラスト細胞によって生成されることが後に示された。本明細書で使用するsFlt-1は、任意のsFlt-1ファミリーのメンバーまたはアイソフォームを含む。sFlt-1は、Flt-1受容体の酵素による切断から生じsFlt-1の生物活性を維持している、分解産物または断片も意味することができる。一例では、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して、Flt-1のN末端部分を循環中に切り離すことができる。

20

【0080】

「特異的に結合する」とは、本発明のポリペプチドを認識し結合するが、本発明のポリペプチドを本来含むサンプル、例えば生物学的サンプル中の他の分子を認識しそれらと結合することは実質的にない、化合物または抗体を意味する。一例では、可溶性エンドグリンと特異的に結合する抗体は、膜結合エンドグリンとは結合しない。他の例では、可溶性エンドグリンと特異的に結合する抗体は、エンドグリンの細胞外ドメイン内のエピトープ、特に(例えば、可溶性エンドグリンの三次元構造において)可溶性エンドグリンに特有であるかまたはそうではない可能性がある、アミノ酸26~437(ペプチドリーダー配列を除く)、ヒトエンドグリンのアミノ酸40~406(図30B参照)、またはアミノ酸26~587(ペプチドリーダー配列を除く)内のエピトープと結合する。他の例では、可溶性エンドグリンと特異的に結合する抗体は、図30B中において太線および下線で示すアミノ酸配列の1つまたは複数を認識する。

30

【0081】

「被験体」とは、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコなどだけには限られないが、これらを含めた哺乳動物を意味する。この定義に含まれるのは、妊娠状態、産後、および非妊娠状態の哺乳動物である。

40

【0082】

「実質的に同一」とは、例えば以下に記載する方法を使用して最適にアライメントをとらせると、第二の核酸またはアミノ酸配列、例えばエンドグリンまたは可溶性エンドグリン配列と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を共有する核酸またはアミノ酸配列を意味する。「実質的に同一」を使用して、様々な型および長さの配列、完全長配列、エピトープまたは免疫原性ペプチド、機能性ドメイン、コードおよび/または制御配列、エクソン、イントロン、プロモーター、およびゲノム配列などを指すことができる。2つのポリペプチドまたは核酸配列間の同一率は、当分野の技術範疇内の様々な方法で、例えば公に利用可能で

50

あるコンピュータソフトウェア、GeneMatcher Plus(商標)に組み込んだSmith Waterman Alignment(Smith, T.F.and M.S.Waterman(1981) J Mol Biol 147: 195~7); 「BestFit」(Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics、482~489(1981))、Schwarz and Dayhof(1979) Atlas of Protein Sequence and Structure、Dayhof、M.O.、Ed pp353~358; BLASTプログラム(Basic Local Alignment Search Tool;(Altschul、S.F.、W.Gish、et al.(1990) J Mol Biol215: 403~10)、BLAST-2、BLAST-P、BLAST-N、BLAST-X、WU-BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、CLUSTAL、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどを使用して測定する。さらに当業者は、比較する配列の長さに関する最大アライメントを得るのに必要とされる任意のアルゴリズムを含めた、アライメントを測定するのに適したパラメータを決定することができる。一般に、タンパク質に関しては、比較配列の長さは少なくとも10アミノ酸、好ましくは20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、250、300、350、400、437、または少なくとも587アミノ酸以上であるはずである。核酸に関しては、比較配列の長さは一般に少なくとも25、50、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1000、1100、1200、1311、または少なくとも1761ヌクレオチド以上であるはずである。DNA配列とRNA配列の比較時に配列同一性を決定する目的で、チミンヌクレオチドはウラシルヌクレオチドに相当することは理解される。保存的置換は典型的には、以下の基:グリシン、アラニン;バリン、イソロイシン、ロイシン;アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン;セリン、スレオニン;リシン、アルギニン;およびフェニルアラニン、チロシン内の置換を含む。

10

20

【0083】

「子癇前症の症候群」とは、以下の:(1)妊娠第20週後の140mmHgを超える収縮期血圧(BP)および90mmHgを超える拡張期BP、(2)初発のタンパク尿(ディップスティックによる尿検査における1+、24時間の採尿における>300mgのタンパク質、またはランダムな尿タンパク質/クレアチニン比>0.3)、および(3)産後第12週までの高血圧およびタンパク尿のいずれかを意味する。子癇前症の症候群は、腎機能障害および糸球体内皮症または肥大も含み得る。「子癇の症候群」とは、妊娠または最近の妊娠の影響が原因である以下の症候群:発作、昏睡、血小板減少症、肝浮腫、肺浮腫、および脳浮腫のいずれかの発症を意味する。

【0084】

「形質転換増殖因子 (TGF-)」とは、TGF- の生物活性を有し、脊椎動物において偏在的に見られ、後生動物の増殖、分化、および形態形成因子の大ファミリーの原型である、構造上関連があるパラクリンポリペプチドのファミリーのメンバーである、哺乳動物の増殖因子を意味する(総説に関しては、Massague et al. Ann. Rev. Cell. Biol. 6: 597~641(1990); Massague et al. Trends Cell Biol 4: 172~178(1994); Kingsley Gene Dev. 8: 133~146 (1994); および Sporn et al. J. Cell. Biol. 119: 1017~1021(1992)を参照。Kingsley、上記中に記載されたように、TGF- のスーパーファミリーには少なくとも25のメンバーがあり、非常に関連する配列を有する異なるサブファミリーに分類することができる。最も明白なサブファミリーには、以下の:TGF- のスーパーファミリーの他のメンバーよりTGF- 1と一層類似する少なくとも4個の遺伝子を含むTGF- のサブファミリー、骨形成タンパク質、ホモもしくはヘテロ二量体または2つのサブユニット、インヒビン-Aおよびインヒビン-Bを含むアクチビンのサブファミリーがある。皮膚下または筋肉内に移植すると異所性骨および軟骨の形成を誘導することができる哺乳動物因子BMP2およびBMP4を含む、デカペンタプレジックのサブファミリー。BMP5~8を含めた骨誘導活性を有するいくつかの哺乳動物相同体を含む、60Aのサブファミリー。TGF- のスーパーファミリーの他のメンバーには、全身分化因子1(GDP-1)、GDF-3/GR-2、ドルザリン、ノーダル、ミューラー管抑制物質(MIS)、およびグリア細胞系由来神経栄養因子(GDNF)がある。DPPと60Aのサブファミリーは、TGF- のスーパーファミリーの他のメンバーより互いにより密接に関連しており、DVR(dppおよびvgl関連)と呼ばれる分子の大集合の一部として1つに分類されていることが多いことを記す。それが使用されている文脈から明らかにならない限り、本明細書

30

40

50

を通じて使用する用語TGF- は、必要に応じてTGF- のスーパーファミリーのメンバーを一般に指すことは理解されるはずである(Massague et al., Annu.Rev.Biochem.67: 753~91, 1998; Joss et al., Curr.Op.Gen.Dev., 7: 371~377, 1997)。TGF- は多くの細胞型において、増殖、分化、運動性、組織再編成、神経発生、創傷修復、アポトーシス、および血管新生を制御するために機能する。TGF- は多くの細胞型における細胞増殖も抑制し、マトリックスタンパク質の合成を刺激することができる。

【0085】

「治療量」とは、患者への直接投与、または子癇前症もしくは子癇に罹患する患者へのex vivo手法のいずれかによって投与したとき、本明細書に記載する子癇前症または子癇の症状の定性的または定量的低下を引き起こすのに十分である量を意味する。「治療量」は、患者への直接投与、または子癇前症もしくは子癇に罹患する患者へのex vivo手法のいずれかによって投与したとき、本明細書に記載するアッセイにより測定される、可溶性エンドグリンもしくはsFlt-1の発現レベルの低下、またはVEGFもしくはPIGFの発現レベルの増大を、引き起こすのに十分である量も意味することができる。

10

【0086】

「治療」とは、治療目的で化合物または医薬組成物を投与することを意味する。「疾患を治療する」こと、または「療法治療」の使用は、既に疾患を患っている被験体に治療を施してその被験体の状態を改善することを指す。被験体は、以下に記載する特徴的な症状のいずれかの同定または本明細書に記載する診断法の使用に基づいて、子癇前症または子癇などの高血圧を伴う妊娠合併症を患っていると診断されることが好ましい。「疾患を予防する」ことは、まだ病気にはなっていないが、特定の疾患を発症しやすい、または他の場合はそのリスクがある被験体の予防的治療を指す。被験体は、本明細書に記載する診断法を使用して、子癇前症または子癇を発症するリスクがあると測定されることが好ましい。したがって、特許請求の範囲および実施形態では、治療目的または予防目的のいずれかで哺乳動物に治療を施す。

20

【0087】

「栄養芽層」(トロホブラスト; trophoblast)とは、子宮内粘膜を腐食する胚盤胞を覆い、それを介して胚が母親から栄養を受け取り、その細胞が胎盤の形成に寄与する中外胚葉細胞層を意味する。

【0088】

「血管内皮増殖因子(VEGF)」とは、米国特許第5,332,671号、米国特許第5,240,848号、米国特許第5,194,596号、およびCharnock-Jones et al.(Biol. Reproduction, 48: 1120~1128, 1993)中で定義された増殖因子と相補的であり、VEGFの生物活性を有する哺乳動物の増殖因子を意味する。VEGFはグリコシル化ホモ二量体として存在し、少なくとも4つの異なる選択的スプライシングアイソフォームを含む。原型VEGFの生物活性には、血管内皮細胞または臍帯静脈内皮細胞の選択的増殖の促進、および血管新生の誘導がある。本明細書で使用するVEGFは、任意のVEGFファミリーのメンバーまたはアイソフォーム(例えば、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF189、VEGF165、またはVEGF121)を含む。VEGFはVEGF121またはVEGF165アイソフォームであることが好ましく(Tischer et al., J Biol.Chem.266, 11947~11954, 1991; Neufed et al.Cancer Metastasis15: 153~158, 1996)、これは参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,447,768号、米国特許第5,219,739号および米国特許第5,194,596号中に記載されている。Gille et al.(J.Biol.Chem.276: 3222~3230, 2001)中に記載されたKDR選択的VEGFおよびFlt選択的VEGFなどの突然変異型のVEGFも含まれる。本明細書で使用するVEGFは、LeCouter et al.(Science299: 890~893, 2003)中に記載されたVEGFなどの、任意の修飾型のVEGFも含む。ヒトVEGFが好ましいが、本発明はヒト型に限られず、他の動物型のVEGF(例えば、マウス、ラット、イヌ、またはニワトリ)を含むことができる。

30

40

【0089】

「ベクター」とは、その中にDNAの断片を挿入またはクローニングすることができる、プラスミドまたはバクテリオファージに通常由来するDNA分子を意味する。組換えベクタ

50

ーは1つまたは複数の特有の制限部位を含むはずであり、クローニング配列が再生可能であるように一定の宿主または媒体生物中で自己複製することができる。ベクターは、レシピエント細胞へのトランスフェクションによってRNAが発現されるように、遺伝子またはコード領域と作動可能に連結したプロモーターを含む。

【0090】

本発明の他の特徴および利点は、以下のその好ましい実施形態の記載から、および特許請求の範囲から明らかであるはずである。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】エンドグリタンパク質を示す略図である。SP:シグナルペプチド(ペプチドリーダー配列とも呼ばれる)、ZP:透明帯ドメイン、CL:可溶性エンドグリ放出のための推定切断部位(アミノ酸437)、TM:膜貫通ドメイン、Cyto:細胞質ドメイン。いったんシグナルペプチドが切断されると、残りの成熟タンパク質はアミノ酸26のグルタミン酸残基から始まる。

10

【図2】図2Aは、可溶性エンドグリンの推定cDNA配列(配列番号1)を示す。図2Bは、シグナルペプチド(アミノ酸1~25)を含む可溶性エンドグリンの推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。配列は、通常ERで切断されることになるリーダーペプチド配列を含むことに注意すべきである。

【図3】正常妊娠由来胎盤(N)、早産の子癩前症妊娠由来胎盤(p)および満期産の子癩前症妊娠由来胎盤(P)におけるエンドグリnmRNAレベルを示すノーザンブロットである。

20

【図4】胎盤中のエンドグリタンパク質レベルを示すウエスタンブロットである。サンプルは2003年にベイスラエルディーコネスメディカルセンター(Beth Israel Deaconess Medical Center)を受診した2人の子癩前症患者p32およびp36に由来し、母体血清は妊娠女性に由来する。ウエスタンブロットは、サンタクルーズバイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)(サンタクルーズ、カリフォルニア州)から入手したN末端抗体を使用してプローブした。ウエスタンブロットは、胎盤における110kDのバンドと、胎盤および血清サンプルにおいて存在する小さい63kDのバンドの2つのバンドを示す。

【図5】正常妊娠、軽度子癩前症、重度子癩前症および早産を合併した非子癩前症妊娠の女性における可溶性エンドグリンの血中濃度を示すグラフである。全ての血液検体を分娩前24時間以内に得た。可溶性エンドグリンを、ミネソタ州のオールアンドディーシステムズ(R&D systems)社製ELISAキット(カタログ番号DNDG00)を使用して測定した。これらのデータは、可溶性エンドグリレベルが臨床疾患時に子癩前症患者において顕著に上昇することを示している。

30

【図6】様々な在胎期間群ウインドウの、妊娠中の5つの異なる妊婦研究群の平均可溶性エンドグリ濃度を示すグラフである。

【図7】様々な在胎期間群ウインドウの、妊娠中の5つの異なる妊婦研究群の平均sFlt1濃度を示すグラフである。

【図8】様々な在胎期間群ウインドウの、妊娠中の5つの異なる妊婦研究群の平均PIGF濃度を示すグラフである。

【図9】臨床症状の前に採取したサンプルの子癩前症抗血管新生に関する、可溶性エンドグリ抗血管新生指数の値を示すグラフである。

40

【図10】臨床早発型子癩前症(PE<37週)前の週数に応じた可溶性エンドグリンの平均濃度を示すグラフである。

【図11】臨床早発型子癩前症(PE<37週)前の週数に応じた可溶性エンドグリ抗血管新生指数値を示すグラフである。

【図12】症状前後の満期産の子癩前症(PE>37週)に関する、妊娠中の可溶性エンドグリレベルの変化を示すグラフである。

【図13】症状前後の満期産の子癩前症(PE>37週)に関する、妊娠中の可溶性エンドグリ抗血管新生指数レベルの変化を示すグラフである。

【図14】妊娠性高血圧の間および妊娠性高血圧前(妊娠性高血圧の1~5週前(妊娠33~36

50

週の間))の女性、および正常血圧対照において検出された可溶性エンドグリンレベルを示すグラフである。

【図15】妊娠性高血圧の間および妊娠性高血圧前(妊娠性高血圧の1~5週前(妊娠33~36週の間))の女性、および正常血圧対照における可溶性エンドグリン抗血管新生指数レベルを示すグラフである。

【図16】重度SGA、軽度SGAおよび正常血圧対照の女性において妊娠33~36週の期間帯に検出された可溶性エンドグリンレベルを示すグラフである。

【図17】重度SGA、軽度SGAおよび正常血圧対照の女性において妊娠33~36週の期間帯に検出された可溶性エンドグリン抗血管新生指数レベルを示すグラフである。

【図18】同じ妊娠患者のsFlt1および可溶性エンドグリンの濃度を示すグラフである。互いに対してプロットしてある。

【図19】25.2週で採取した子癩前症胎盤の、エンドグリン(赤色)および平滑筋アクチン(緑色)の二重免疫蛍光染色の顕微鏡写真である。エンドグリン検出のために使用した抗体は、完全長エンドグリンおよび可溶性エンドグリンの両方を染色する。適切な妊娠期間帯の対照胎盤を早産患者から得た。

【図20】41.3週で採取した子癩前症胎盤の、エンドグリン(赤色)および平滑筋アクチン(緑色)の二重免疫蛍光染色の顕微鏡写真である。エンドグリン検出のために使用した抗体は、完全長エンドグリンおよび可溶性エンドグリンの両方を染色する。適切な妊娠期間帯の対照胎盤を早産患者から得た。

【図21】図21Aは、子癩前症胎盤および血清の両方を使用した、エンドグリンの免疫沈降およびウエスタンブロット実験のオートラジオグラムを示す。図21Bは、子癩前症胎盤を使用した、エンドグリンの免疫沈降およびウエスタンブロット実験のオートラジオグラムを示す。3つの異なるNおよびPサンプルは個々の患者を表す。両方の図に関して、免疫沈降には市販のモノクローナル抗体を使用し、ウエスタンブロットにはポリクローナル抗体を使用した。これらの抗体はともに、エンドグリンタンパク質のN末端領域に対して作製され、完全長および切断型の可溶性エンドグリンタンパク質の両方を検出する。

【図22】増殖因子低減マトリゲル中のHUVECを使用した血管新生アッセイの結果を示すグラフである。血管新生アッセイは可溶性エンドグリンまたはsFlt1または両方の存在下で行い、内皮管の長さを定量した。Cは対照を表し、Eは1 μ g/mlの可溶性エンドグリンを表し、Sは1 μ g/mlのsFlt1を表す。E+Sは1 μ g/mlのE+1 μ g/mlのsFlt1の組合せを表す。データは、3回の独立した実験の平均を表す。

【図23】材料および方法に記載したマウスにおけるエバンスブルー漏出を使用して評価したいくつかの器官床(organs)の微小血管透過性を示すグラフである。Cは対照(GFP)、Eは可溶性エンドグリン、SはsFlt1、およびS+EはsFlt1+可溶性エンドグリンを示す。データは、4回の独立した実験の平均を表す。

【図24】200pg/ml~200ng/mlの範囲の用量のTGF- β 1(B1)およびTGF- β 3(B3)存在下において微小血管反応性実験に供した場合の、ラット腎臓微小血管径の変化パーセントを示すグラフである。1 μ g/mlの可溶性エンドグリン(E)存在下で、これらの同じ実験を繰り返した。これらのデータは、4回の独立した実験の平均を表す。

【図25】1ng/mlのVEGF(V)、TGF- β 1(B1)および組合せ(V+B1)の存在下における、腎臓微小血管の血管径の変化パーセントを示すグラフである。各1 μ g/mlのsFlt1(S)および可溶性エンドグリン(E)の存在下におけるこの組合せ(V+B1+S+E)の作用もまた示す。データは、4回の独立した実験の平均を表す。

【図26A】図26Aは、sFlt1および対照アデノウイルス(CMV)の組合せを注射した妊娠ラットから屠殺時に採取した血液サンプルの末梢血液塗抹の写真である。

【図26B】図26Bは、sFlt1および可溶性エンドグリン発現アデノウイルスの組合せを注射した妊娠ラットから屠殺時に採取した血液サンプルの末梢血液塗抹の写真であり、分裂赤血球および網状赤血球数増加から明らかなように高度の溶血を実証している。矢印は分裂赤血球を表す。

【図27】図27A~Dは、表8に記載した様々な動物群の腎臓組織構造(H&E染色)を示す一連

10

20

30

40

50

の顕微鏡写真である。図27Aは、糸球体内皮症の知見がない対照群の腎臓組織構造を示す。図27Bは、糸球体内皮症の知見がない可溶性エンドグリン注射群の腎臓組織構造を示す。図27Cは、中等度内皮症(矢頭で示す)を示すsFlt1注射ラットの腎臓組織構造を示す。図27Dは、極度に腫脹した糸球体および有足細胞内に再吸収されたタンパク質小滴を伴う重度の糸球体内皮症を示す、可溶性エンドグリンおよびsFlt1注射ラットの腎臓組織構造を示す。全ての光学顕微鏡は60×(原倍率)で撮影した。

【図28】実施例3に記載した、様々な程度の子癩前症患者、対照妊娠および4人の非妊娠健常ボランティアの血清における、可溶性エンドグリン(sEng)およびsFlt1のELISAの結果を示すグラフである。早産対照と比較した $^*P < 0.05$ および重度子癩前症と比較した $^{\#}P < 0.05$ 。

【図29】分娩前(0~12時間)および後(48時間)に採血した、実施例3に記載の妊娠患者部分集団(正常:n=6;子癩前症:n=11)における可溶性エンドグリンのELISAの結果を示すグラフである。T=0サンプルと比較して $^*P < 0.05$ 。

【図30A】図30Aは、子癩前症患者の血清を精製後の、可溶性エンドグリンを示すウエスタンブロットである。44G4-IgG(抗Eng)セファロースから溶出した画分4および5を、還元条件下でSDS-PAGEにかけ、エンドグリンに対するポリクローナル抗体を使用するウエスタンブロットにより試験した。溶出画分を質量分析に供した(3回のラン)。

【図30B】図30Bは、ヒトエンドグリンの配列を示す(配列番号5)。質量分析により同定したペプチドを太字および下線で示す。下線を引いたアミノ酸はヒト細胞表面エンドグリンの膜貫通ドメインを表す。アミノ酸1~25はリーダーペプチドを表すため、アミノ酸配列番号付けが26から始まることに注意されたい。配列表に配列番号5として記載された配列はアミノ酸1から始まるため、図中のアミノ酸26が配列表中のアミノ酸1となり、図中のアミノ酸658が配列表中のアミノ酸633となることに注意されたい。アミノ酸の番号付けは参照配列に応じて調整する(すなわち、図30Bを参照したアミノ酸26~658は配列番号5を参照した配列のアミノ酸1~633と同じである)。

【図31】可溶性エンドグリンが毛細管形成を阻害し、血管透過性を増大させることを示す一連の顕微鏡写真である。血管新生アッセイを、増殖因子低減マトリゲル(Matrigel)(商標)中のHUVECを使用して、1μgの組換え可溶性エンドグリン、sFlt1、または両方の存在下で行い、内皮管の長さを定量した。代表的な実験(n=4)を、パネルの下にピクセルで示した管の長さとともに示す。

【図32】可溶性エンドグリンによる、腸管膜血管におけるTGF- β 1に仲介される血管反応性の阻害を示す一連のグラフである。ラット腸管膜微小血管の微小血管反応性を、200pg/mlから200ng/mlのTGF- β 1またはTGF- β 3の存在下で測定した。1μg/mlの組換え可溶性エンドグリンの存在下で実験を繰り返した。4回の独立した実験の平均±標準誤差を示す(上のパネル)。1ng/mlでのTGF- β 1に対するL-NAMEの阻害作用も示す(下のパネル)。

【図33】妊娠ラットにおける糸球体内皮症を示す一連の顕微鏡写真である。対照妊娠ラット(上のパネル)、可溶性エンドグリン(sEng)処理した妊娠ラット(中央パネル)、可溶性エンドグリン(sEng)+sFlt1の併用群(下のパネル)由来の糸球体の電子顕微鏡写真(EM)を示す。これらの写真は、上および中央のパネルについては6200×(原倍率)で、下のパネルについては5000×(原倍率)で撮影した。

【図34】図34A~Hは、可溶性エンドグリンおよびsFlt1処理後の妊娠ラットにおける、腎臓、胎盤および肝臓の組織学的変化ならびに末梢血液塗抹を示す一連の顕微鏡写真である。対照(図34A)、sEng(図34B)、sFlt1(図34C)およびsFlt1+sEng(図34D)群の胎盤組織構造(H&E染色)。可溶性エンドグリンおよびsFlt1処理された動物はともに、対照では見られない、母体-胎児境界でのびまん性炎症(矢頭)を示す。腸管膜血管の管腔閉塞(矢印)を伴う出血性梗塞およびフィブリノイド壊死が、sFlt1+sEng処理胎盤の脱落膜に存在する(図34D)。スケールバー、200μm(図34E~H)。対照(図34E)、sEng(図34F)、sFlt1(図34G)およびsFlt1+sEng(図34H)群における肝臓の組織構造。多発性巣状壊死(矢頭)を伴う虚血性変化が、sFlt1+sEng群において認められる(図34H)。対照群およびsEngまたはsFlt1を与えられたラットは変化を示さなかった。スケールバー、200μm。

10

20

30

40

50

【図35A】図35A~Dは、組換えsEngがTGF- β 1結合および活性、ならびにeNOS活性化を介する血管拡張に対する作用を抑制することを示す一連のグラフおよびオートラジオグラムである。図35Aは、1ng/mlのVEGF、TGF- β 1およびこの組合せに対する腎臓微小血管の微小血管反応を示すグラフである。組み合わせた反応に対する各100ng/mlのsFlt1およびsEngの作用を示す(n=4)。TGF- β 1およびVEGFに刺激される反応に対するL-NAMEの阻害作用もまた示す。

【図35B】図35A~Dは、組換えsEngがTGF- β 1結合および活性、ならびにeNOS活性化を介する血管拡張に対する作用を抑制することを示す一連のグラフおよびオートラジオグラムである。図35Bは、マウス内皮細胞のTRILへの $[^{125}I]$ TGF- β 1結合の用量依存的な増加の代表的なオートラジオグラムおよびグラフである。5nM組換え可溶性エンドグリンによる処理は、50pMおよび100pMで結合を顕著に減少させた(未処理群に対する $^*P < 0.05$)。100pM $[^{125}I]$ TGF- β 1で処理した細胞における40xの過剰な非標識TGF- β 1との競合は、受容体結合を消失させ、バックグラウンド対照の役割をした。

【図35C】図35A~Dは、組換えsEngがTGF- β 1結合および活性、ならびにeNOS活性化を介する血管拡張に対する作用を抑制することを示す一連のグラフおよびオートラジオグラムである。図35Cは、HUVECにトランスフェクトされたSmad2/3依存性CAGA-Lucレポーター構築物の、TGF- β 1に誘導される活性化の顕著な増大、およびsEng処理による阻害を示すグラフである(n=3、sEng未処理群に対する $^{**}P < 0.01$)。

【図35D】図35A~Dは、組換えsEngがTGF- β 1結合および活性、ならびにeNOS活性化を介する血管拡張に対する作用を抑制することを示す一連のグラフおよびオートラジオグラムである。図35Dは、TGF- β 1処理後のeNOSのThr495の顕著な脱リン酸化、およびsEngによる抑制を示す代表的なウエスタンブロットおよびグラフ(n=4)である(未処理に対する $^*P < 0.05$)。Ser1177においてリン酸化は変化せず、全eNOSレベルは実験を通して一定のままであった。

【図36】組換えsFlt1および可溶性エンドグリンの発現を実証する、ラット血漿の2つのウエスタンブロットを示す図である。上のパネル:妊娠ラット(妊娠第三期初期)由来の血漿検体を方法に記載したように使用した。レーン1、2および3は、陽性対照として使用した200pg、500pgおよび2ngの組換えマウスFlt1-Fcタンパク質を表す。1匹の対照ラットおよび2匹のsFlt1処理ラット由来の20 μ lの血漿検体を示す。sFlt1(53 kDa)のバンドはsFlt1処理ラットにおいて検出された。sFlt1発現の定量化を、市販のELISAを使用して行った(表8)。下のパネル:sEng発現を検出するために、妊娠ラット由来の血漿検体を使用した(妊娠第三期初期において)。レーン1は500pgの組換えヒト可溶性エンドグリンを表し、レーン2および3はそれぞれsEng処理および対照ラット由来の30 μ lの血漿を表す。プロットは対照ラットにおいて可溶性エンドグリンを示さないが、処理ラットにおいて組換えsEngの大量発現を示す。可溶性エンドグリンの定量化を、市販のELISAを使用して行った(表8)。

【図37】対照、全ての子癩前症における、および<37週の子癩前症におけるsFlt1およびsEng(妊娠第一期-妊娠第二期の値)の分布を示すグラフである。

【図38】対照、全ての子癩前症における、および<37週の子癩前症における、妊娠第一期の積sFlt x sEng(積1)、妊娠第二期の積sFlt x sEng(積2)、積(積1-積2)の分布を示すグラフである。

【図39】積の三分位数による子癩前症の危険性を示すグラフである。積レベルが-1未満の女性と比較して、積レベルが+1より大きい群[aOR 5.5、95%CI 1.4~22.4]において早産の子癩前症の危険性の増加は、統計的に有意であった($P < 0.05$)。

【図40】図40Aは、エンドグリンがTGF- β 1に誘導されるeNOSのThr495脱リン酸化に必要であることを示すウエスタンブロットである。図40Bは、全eNOSに対するeNOSのThr495リン酸化のパーセントを示すグラフである。結果は、リン酸化されたThr495レベルがTGF- β 1の存在下で、可溶性エンドグリンの存在下で減少し、可溶性エンドグリンの非存在下で減少しないことを示している。

【発明を実施するための形態】

【0092】

10

20

30

40

50

本発明者らは、可溶性エンドグリンのレベルが、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を有する女性から採取した血液の血清サンプル中で上昇することを発見した。可溶性エンドグリンは、タンパク質分解酵素による膜結合型の細胞外部分の切断によって形成され得る。胎盤における選択的スプライス変異体が検出されないこと、および本明細書に記載する精製可溶性エンドグリンの一部のペプチド配列は、それが完全長エンドグリンのN末端切断産物であることを示唆する。過剰な可溶性エンドグリンは、必要量のこれらの必要不可欠な抗血管新生因子およびマイトジェン因子を胎盤から奪い得る。本発明者らは、子癇前症を有する患者における可溶性エンドグリンとsFlt1の過剰な循環濃度は、子癇前症および他の妊娠関連高血圧障害の病因の一因となることを発見した。本発明者らは、可溶性エンドグリンはTGF- β 1およびTGF- β 3とその受容体の結合に干渉し、内皮細胞中のeNOSの活性化の低下など、シグナル伝達を低減し、それによって血管の健康状態の維持に必要な主要ホメオスタシスのメカニズムを混乱させることも発見した。これらのデータから、TGF- β 1受容体活性化をNO合成と結びつける上でのエンドグリンの役割が重大であることが示唆される。さらに本発明者らは、可溶性エンドグリンとsFlt1は協調して、おそらくeNOSの下流活性化を阻害することによって、それぞれTGF- β 1およびVEGFシグナル伝達に干渉することにより血管の損傷および子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を誘導することを発見した。

10

20

30

40

50

【0093】

本発明は、可溶性エンドグリンと増殖因子の結合に干渉する治療物質、可溶性エンドグリンの発現または生物活性を低下させる物質、または増殖因子のレベルを増大させる物質の使用を特徴とし、本発明を使用して、被験体における子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を治療または予防することができる。このような物質には、可溶性エンドグリンと結合し可溶性エンドグリンの生物活性を阻害する抗体、可溶性エンドグリンのレベルを低下させるアンチセンスまたはRNAiのオリゴヌクレオチド、可溶性エンドグリンと結合する増殖因子のレベルを増大させる化合物、タンパク質分解による膜結合型のエンドグリンの切断を妨げ、それによって可溶性エンドグリンの放出を妨げる化合物、および可溶性エンドグリンと結合し増殖因子結合部位を塞ぐ小分子があるが、これらだけには限られない。追加的または代替的に、本発明は、TGF- β 、eNOS、およびPGI₂のレベルまたは生物活性を増大させる任意の化合物(例えば、ポリペプチド、小分子、抗体、核酸、およびミメティクス)を使用して、被験体における子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を治療または予防することを特徴とする。さらに本発明は、sFlt-1のレベルを低下させるかVEGFまたはPIGFのレベルまたは活性を増大させる(例えば、米国特許出願公開第20040126828号、同第20050025762号、および同第20050170444号およびPCT国際公開第2004/008946号および同第2005/077007号を参照)、任意の化合物を、前に記載した任意の治療用化合物と組み合わせて使用して、被験体における子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を治療または予防することを特徴とする。さらに本発明は、子癇前症および子癇を含めた妊娠関連高血圧障害の診断マーカーとしての、単独または組み合わせた、可溶性エンドグリン、eNOS、TGF- β 、またはPGI₂の使用を特徴とする。

【0094】

本明細書で示す詳細な説明は、可溶性エンドグリン、TGF- β 1、eNOS、sFlt-1、VEGF、またはPIGFを明確に指すが、この詳細な説明は、可溶性エンドグリン、TGF- β 1、eNOS、sFlt-1、VEGF、またはPIGFのファミリーのメンバー、アイソフォーム、および/または変異体に適用することもできることは当業者には明らかであるはずである。

【0095】

診断

本発明者らは、可溶性エンドグリンのレベルが、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害を有する女性から採取した血液の血清サンプル中で上昇することを発見した。可溶性エンドグリンは、子癇前症の臨床症状の6~10週前に上昇し始める。したがって、場合によっては遊離PIGFと組み合わせて、血清中の可溶性エンドグリンおよびsFlt1を測定する診断試験は高い感受性および特異性を有するはずであり、子癇前症誘導型の死を予防

する際の強力なツールとなる。診断試験は、遊離VEGF; TGF- β ファミリーのメンバー、好ましくはTGF- β 1、TGF- β 3、遊離アクチビンA、BMP2、BMP7; NOS、好ましくはeNOS; またはPGI₂のレベルを、単独またはこれらの任意の組合せで測定することも含むことができる。任意のこれらのタンパク質のレベルの変化は、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害の診断指標である。一例では、遊離BMP2、BMP7、またはアクチビンAのレベルの低下は、子癇前症または子癇などの妊娠関連高血圧障害の診断指標である。

【0096】

本明細書に記載する方法は子癇前症および子癇を明確に指すが、本発明の診断およびモニタリング法は、妊娠性高血圧、在胎期間に比べて小さい(SGA)幼児を伴う妊娠、HELLP症候群、慢性高血圧、子癇前症(軽度、中等度、および重度)、および子癇だけには限られないが、これらを含めた任意の妊娠関連高血圧障害に当てはまることは理解されるはずである。

10

【0097】

被験体サンプル中の可溶性エンドグリンのレベル、遊離、結合、または全体レベルのいずれかを測定し、子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向の指標として使用する。

【0098】

子癇前症、子癇、またはこのような疾患に対する素因を有する被験体は、可溶性エンドグリンポリペプチドの発現の増大を示すはずである。可溶性エンドグリンポリペプチドは、完全長の可溶性エンドグリン、分解産物、可溶性エンドグリンの選択的スプライスアイソフォーム、可溶性エンドグリンの酵素切断産物などを含むことができる。可溶性エンドグリンポリペプチドと特異的に結合する抗体を子癇前症または子癇の診断用に使用して、このような疾患を発症するリスクがある被験体を同定することができる。本発明の方法において有用な抗体の一例は、Santa Cruz Biotechnology, Inc.から市販されているエンドグリンのN末端領域に対するモノクローナル抗体(カタログ番号sc-20072)である。他の例は、エンドグリンの細胞外ドメイン(例えば、エンドグリンのアミノ酸1~437、エンドグリンのアミノ酸1~587、または図30B中において太線および下線で示される任意のアミノ酸配列)と特異的に結合する抗体を含む。免疫法(ELISAおよびRIAなど)を含めた、このようなポリペプチドの発現の変化を測定するための様々なプロトコルが知られており、子癇前症または子癇、またはこのような疾患を発症するリスクを診断するための基盤を与える。

20

30

【0099】

可溶性エンドグリンの増大したレベルは、子癇前症または子癇の陽性指標である。例えば、被験体由来の1つまたは複数のサンプル中で、可溶性エンドグリンのレベルが正常参照に対して増大する(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上)、または経時的に増大する場合、これは子癇前症または子癇の陽性指標であると考えられる。さらに、正常レベルに対する可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPIGFのレベルの任意の検出可能な変化は、子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向を示す。通常、可溶性エンドグリンの循環血清濃度は非妊娠状態中で2~7ng/ml、正常な妊娠中で10~20ng/mlの範囲である。15ng/mlを超える、好ましくは20ng/mlを超える、および最も好ましくは25ng/mlを超える、またはそれを超える、可溶性エンドグリンの上昇した血清中レベルは、子癇前症または子癇の陽性指標であると考えられる。

40

【0100】

一実施形態では、sFlt-1、VEGF、またはPIGFポリペプチドまたは核酸、またはこれらの任意の組合せのレベルと組み合わせて、可溶性エンドグリンのレベルを測定する。sFlt-1、VEGF、およびPIGFを測定するための方法は、参照によりその全容が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20040126828号、同第20050025762号、および同第20050170444号およびPCT国際公開第2004/008946号および同第2005/077007号中に記載されている。他の好ましい実施形態では、体格指数(BMI)および胎児の在胎期間も測定し、診断測定基準に含まれる。

50

【 0 1 0 1 】

他の実施形態では、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPIGFポリペプチドまたは核酸のレベルと組み合わせて、TGF- β 1、TGF- β 3、またはeNOSポリペプチドまたは核酸のレベルを測定する。TGF- β 1および β 3ポリペプチドのレベルを測定するのに有用な抗体は、例えばAbcam、Abgent、BD Biosciences Pharmingen、Chemicon、GeneTex、and R&D Systemsから市販されている。任意の前述のポリペプチドのレベルと組み合わせて、PGI₂のレベルを使用することもできる。PGI₂のレベルは、例えば前に記載した診断アッセイのいずれかにおいて結合分子としてPGI₂受容体を使用して、または例えば尿中プロスタサイクリン比色分析ELISAキット(Assay Designs)を使用して測定することができる。eNOSポリペプチドのレベルを測定するのに有用な抗体は、例えばResearch Diagnostics Inc.、Santa Cruz、Cayman Chemicals、and BD Biosciencesから市販されている。

10

【 0 1 0 2 】

他の実施形態では、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPIGFポリペプチドの生物活性と組み合わせて、任意の1つまたは複数のTGF- β 1、TGF- β 3、またはeNOSポリペプチドの生物活性を測定し、生物活性の低下が子癇前症または子癇の陽性指標である。生物活性は、例えば酵素活性または下流シグナル伝達活性用のアッセイを使用して測定することができる。一例では、シトルリンの変換を測定することによってeNOSの酵素活性を測定し、eNOSの酵素活性の低下が子癇前症または子癇の陽性指標である。

【 0 1 0 3 】

一実施形態では、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPIGF、またはこれらの任意の組合せを組み込んだ測定基準を使用して、少なくとも2つのタンパク質のレベル間の関係が子癇前症または子癇を示すかどうか測定する。一例では、測定基準は、可溶性エンドグリンの測定値と組み合わせて、子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向の診断指標である抗血管新生指数として使用するPAAI(sFlt-1/VEGF+PIGF)である。可溶性エンドグリンのレベルが参照サンプルに対して増大し(例えば、1.5倍、2倍、3倍、4倍、またはさらに10倍以上ほど多く)、PAAIが10を超える、より好ましくは20を超える場合、したがって被験体は子癇前症、子癇を有するか、またはこれらを発症する差し迫った危険な状態にあると考えられる。PAAI(sFlt-1/VEGF+PIGF)の比は、診断指標として使用することができる有用な測定基準の単なる一例である。それが本発明を制限するとは考えられない。正常対照に対する被験体における可溶性エンドグリン、sFlt-1、PIGF、またはVEGF、またはこれらの任意の組合せのレベルの変化を検出するほぼ任意の測定基準を、診断指標として使用することができる。他の例は、以下の可溶性エンドグリン抗血管新生指数:(sFlt-1+0.25(可溶性エンドグリンポリペプチド))/PIGFである。経時的または参照のサンプルまたは値と比較した可溶性エンドグリンの測定基準の値の増大は、子癇前症または子癇の診断指標である。100を超える、好ましくは200を超える可溶性エンドグリンの指数は、子癇前症または子癇の診断指標である。他の例には以下の指数:(可溶性エンドグリン+sFlt-1)/PIGFまたはsFlt-1×可溶性エンドグリンがある。

20

30

【 0 1 0 4 】

他の例は、被験体における妊娠第一期および妊娠第二期中のsFlt-1および可溶性エンドグリンのレベルの測定、および分数を含めた0、1、2を超える値、またはそれより大きな値(例えば、陽性値)が子癇前症または子癇の診断指標である、以下の等式:[dproduct=妊娠第二期中の(sFlt1×sEng)-妊娠第一期中の(sFlt1×sEng)]を使用して、それぞれの妊娠期中のsFlt1×可溶性エンドグリン(sEng)のデルタ値を計算することを含む。陽性値が早産の子癇前症の指標である可能性もある。このような測定値は妊娠第一期および妊娠第二期中に多数回得ることができ、dproductは経時的に続く可能性がある。さらに、妊娠第一期と妊娠第二期の間のsFlt-1レベル(dsFlt-1)およびsEngレベル(dsEng)のdproductのみを計算することもでき、この場合(dsFlt-1)または(dsEng)に関する分数を含めた0、1、2を超える値、またはそれより大きな値(例えば、陽性値)が、子癇前症または子癇の診断指標である。

40

【 0 1 0 5 】

50

さらに測定基準は、TGF- β 1、TGF- β 3、PGI₂、またはeNOSポリペプチドのレベルをさらに含むことができる。任意の測定基準が、母親のBMIまたは幼児のGAをさらに含むことができる。

【0106】

標準的な方法を使用して、尿、血清、血漿、唾液、羊水、または脳脊髄液だけには限られないが、これらを含めた任意の体液中の可溶性エンドグリン、遊離VEGF、遊離PIGF、sFlt-1、TGF- β 1、TGF- β 3、PGI₂、またはeNOSポリペプチドのレベルを測定することができる。このような方法には、可溶性エンドグリン、遊離VEGF、遊離PIGF、sFlt-1、TGF- β 1、TGF- β 3、PGI₂、またはeNOSポリペプチドを対象とする抗体を使用するイムノアッセイ、ELISA、ウエスタンブロッティング、およびOng et al. (Obstet. Gynecol. 98: 608~611、2001) および Su et al. (Obstet. Gynecol., 97: 898~904、2001) 中に記載された技法などの定量的酵素イムノアッセイ技法がある。ELISAは可溶性エンドグリン、VEGF、PIGF、sFlt-1、TGF- β 1、TGF- β 3、PGI₂、またはeNOSポリペプチドのレベルを測定するのに好ましい方法である。可溶性エンドグリンは単独で、または任意の1つまたは複数の残りのポリペプチドと組み合わせて測定することが好ましい。

10

【0107】

エンドグリン、sFlt-1、PIGF、またはVEGF核酸配列由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片は、発現をモニタリングするためだけでなく、子癇前症または子癇を発症する素因を示す、可溶性エンドグリン、sFlt-1、PIGF、またはVEGF核酸分子の遺伝的変異、突然変異、または多型を有する被験体も同定するための、プローブとして使用することができる。このような方法は、Abdalla et al., Hum. Mutat. 25: 320~321 (2005)、米国特許出願公開第2006/0067937号およびPCT国際公開第06/034507号中に詳細に記載されている。好ましいオリゴヌクレオチドは、エンドグリンの細胞外ドメインまたは図30B中において太線および下線で示すペプチドのいずれかをコードする任意の核酸配列と、高ストリンジェンシーでハイブリダイズするはずである。

20

【0108】

本明細書に記載する任意の核酸またはポリペプチドの測定は少なくとも2つの異なるときに行うことができ、経時的に正常参照レベルと比較したレベルの変化は、子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向の指標として使用する。

【0109】

一例では、子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向を有する被験体の体液中に存在する可溶性エンドグリンポリペプチドまたは核酸のレベルは、正常対照である被験体のレベルに対して、または同じ被験体の同じ体液から得た事前サンプルに対して、わずか10%、20%、30%もしくは40%、または50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上ほども増大する可能性がある。他の例では、子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向を有する被験体の体液中に存在する可溶性エンドグリンポリペプチドまたは核酸のレベルは、1回の測定から次の測定まで経時的に、わずか10%、20%、30%もしくは40%、または50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上ほども変わる可能性がある。

30

【0110】

子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向を有する被験体の体液中の可溶性エンドグリンのレベルと組み合わせて測定したsFlt-1、VEGF、またはPIGFのレベルは、正常対照中のsFlt-1、VEGF、またはPIGFのレベルに対して、わずか10%、20%、30%もしくは40%、または50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上ほども変わる可能性がある。子癇前症、子癇、またはこのような疾患を発症する傾向を有する被験体の体液中の可溶性エンドグリンのレベルと組み合わせて測定したsFlt-1、VEGF、またはPIGFのレベルは、1回の測定から次の測定まで経時的に、わずか10%、20%、30%もしくは40%、または50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上ほども変わる可能性がある。

40

【0111】

50

一実施形態では、体液(例えば、尿、血漿、血清、羊水、または脳脊髄液)の被験体サンプルを、子癇前症症状の発現前の妊娠初期に収集する。他の例ではサンプルは、子癇前症症状の発現前の妊娠初期に収集した組織または細胞であってよい。組織および細胞の非制限的な例には、胎盤組織、胎盤細胞、循環内皮細胞、および白血球、単球などがある。例えばヒトでは、母親の血清サンプルは妊娠の第一期、第二期、または第三期中に妊婦の肘正中静脈から収集する。アッセイは妊娠第一期、例えば第4、6、8、10もしくは12週、またはこの間の任意の間隔、または妊娠第二期、例えば第14、16、18、20、22もしくは24週、またはこの間の任意の間隔で実施するのが好ましい。一例では、妊娠第13週と第16週の間アッセイを実施する。このようなアッセイは、妊娠第二期または妊娠第三期の最後、例えば第26、28、30、32、34、36もしくは38週、またはこの間の任意の間隔で実施することもできる。可溶性エンドグリンおよび/または本明細書に記載する任意の他のポリペプチドのレベルは、この期間中に2回測定することが好ましい。産後の子癇前症または子癇を診断するために、可溶性エンドグリンに関するアッセイを産後に実施することができる。子癇前症または子癇に対する素因を診断するために、妊娠の開始前または子癇前症もしくは子癇の症状の発症前にアッセイを実施する。一例では、治療をモニタリングおよび管理するために、子癇前症の診断後の妊娠中、および/または治療中にアッセイは実施する。

10

20

30

40

50

【0112】

特定の実例では、一連の血液サンプルを妊娠中に収集することができ、可溶性エンドグリンポリペプチドおよび/または本発明の任意の他のポリペプチドのレベルはELISAによって測定することができる。他の例では、サンプルは妊娠第二期および妊娠第三期の初期中に収集し、最初のサンプリングから次のサンプリングまでの、本発明の任意の他のポリペプチドの可溶性エンドグリンのレベルの増大は、子癇前症もしくは子癇、またはいずれかを発症する傾向を示す。

【0113】

本発明は、被験体由来の体液、好ましくは尿中の、任意の可溶性エンドグリン結合タンパク質(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7)または可溶性エンドグリンシグナル伝達の下流メディエーター(例えば、PGI₂およびeNOS)の測定も含み、可溶性エンドグリン結合タンパク質のレベルの変化(例えば、増大または減少)は子癇前症または子癇を示す。本明細書に記載する可溶性エンドグリンの測定に関する方法およびタイミングは、可溶性エンドグリン結合タンパク質、PGI₂またはeNOSのいずれかの測定に使用することもできる。

【0114】

獣医学診療では、アッセイは妊娠中の任意の時期に実施することができるが、妊娠初期、子癇前症症状の発現前に実施することが好ましい。妊娠の期間は種間で広く変わることを考慮すると、アッセイのタイミングは獣医により決定されるはずであるが、一般的にはヒトの妊娠中のアッセイのタイミングに相当するはずである。

【0115】

本明細書に記載する診断法は個別に、または本明細書に記載するかまたは子癇前症もしくは子癇の存在、重度もしくは発症の推定時間をより正確に診断するための当技術分野で知られている、任意の他の診断法と組み合わせて使用することができる。さらに、本明細書に記載する診断法は、子癇前症または子癇の存在、重度、または発症の推定時間を正確に診断するのに有用であることが判明している、任意の他の診断法と組み合わせて使用することができる。

【0116】

本明細書に記載する診断法を使用して、被験体における子癇前症または子癇をモニタリングおよび管理することもできる。一例では、血液、血漿、または血清の可溶性エンドグリンレベルが25ng/ml未満となるまで、または血清の可溶性エンドグリンレベル(または可溶性エンドグリン結合タンパク質、PGI₂またはeNOSのレベル)が、子癇前症または子癇の発症前に測定したベースラインレベルに戻るまで治療を施す。他の例では、被験体が正常

対照に対して増大したレベルの可溶性エンドグリンを有すると測定した場合、したがって血清のPIGFレベルが約400pg/mLに上昇するか、または子癇前症もしくは子癇の発症前のベースラインレベルに戻るまで、治療を施すことができる。この実施形態は、可溶性エンドグリン、sFlt-1、PIGF、VEGF、可溶性エンドグリン結合タンパク質、PGI₂、eNOS、またはこれらのいずれかおよび全てのレベルを、疾患を診断するだけでなく、子癇前症および子癇の治療および管理をモニタリングする方法と同様に繰り返し測定する。

【0117】

診断キット

本発明は、診断試験キットも提供する。例えば診断試験キットは、可溶性エンドグリンと特異的に結合する結合物質(例えば、ポリペプチドまたは抗体)、および結合物質と可溶性エンドグリンポリペプチドの間の結合を検出するため、およびより好ましくは評価するための手段を含むことができる。検出用に、結合物質または可溶性エンドグリンポリペプチドのいずれかを標識し、かつ結合物質または可溶性エンドグリンポリペプチドのいずれかを、結合物質または可溶性エンドグリンポリペプチドの間の結合の後に基質と結合した標識の量を測定することによって、可溶性エンドグリンポリペプチドと結合物質の相互作用を確定できるように基質と結合させる。従来のELISAは抗体と基質の相互作用を検出するための一般的で、当技術分野で知られている方法であり、本発明のキットとともに提供することができる。可溶性エンドグリンポリペプチドは、尿、血清、血漿、唾液、羊水、または脳脊髄液だけには限られないが、これらを含めたほぼ任意の体液中で検出することができる。本発明は、可溶性エンドグリン核酸のレベルを検出および測定するために使用することができる可溶性エンドグリン核酸を含む診断試験キットも提供する。正常対照中に存在するレベルなどの参照に対する、可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルの変化、例えば増大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。

10

20

【0118】

米国特許出願公開第20040126828号、同第20050025762号、および同第20050170444号およびPCT国際公開第2004/008946号および同第2005/077007号に記載されたのと同様に、本発明の診断キットは、sFlt-1、VEGF、またはPIGFポリペプチドまたは核酸を検出するための抗体または核酸を含むことができる。

【0119】

他の実施形態では、キットはTGF- β 1、TGF- β 3、またはPGI₂またはeNOSポリペプチドだけには限られないが、これらを含めた可溶性エンドグリンリガンドを検出するための結合物質も含むことができる。TGF- β 1および β 3ポリペプチドのレベルを測定するのに有用な抗体は、例えばAbcam、Abgent、BD Biosciences Pharmingen、Chemicon、GeneTex、and R & D Systemsから市販されている。eNOSポリペプチドのレベルを測定するのに有用な抗体は、例えばResearch Diagnostics Inc.、Santa Cruz、Cayman Chemicals、and BD Biosciencesから市販されている。PGI₂のレベルを検出するための結合物質も含まれる可能性があり、例えば前に記載した診断アッセイのいずれかにおいて結合分子として、PGI₂受容体、またはその断片を例えば含み、または例えば尿中プロスタサイクリン比色分析ELISAキット(Assay Designs)を使用する。正常参照または標準またはレベル、正常対照中に存在するレベルなどに対する、eNOS、TGF- β 1または β 3ポリペプチドまたはPGI₂のレベルの変化、例えば低下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。陽性参照標準またはレベルに対する、変化、例えば可溶性エンドグリンのレベルの低下、または可溶性エンドグリン結合タンパク質(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビンA、BMP 2、およびBMP 7)または可溶性エンドグリンシグナル伝達の下流メディエーター(例えば、eNOSおよびPGI₂)のレベルの増大を測定するキットは、子癇前症または子癇の治療をモニタリングするのに有用である。

30

40

【0120】

前に記載した診断法のいずれかを実施するのに必要とされる任意の構成要素を、キットが含むことが望ましい。例えば、キットはメンブレンを含むことが望ましく、この場合、

50

可溶性エンドグリン結合物質または可溶性エンドグリン結合物質と結合する物質をメンブレン上に固定する。メンブレンはディップスティック構造で支えることができ、この場合ディップスティック構造をサンプル中に配置することによってメンブレン上にサンプルを置き、またはメンブレンは側方流動カセットで支えることができ、この場合カセット中の開口部を介してメンブレン上にサンプルを置く。

【0121】

診断キットは、キット構成要素の目的とする用途の標識または説明書、および標準曲線を定めるために使用する参照サンプルまたは精製タンパク質も一般に含む。一例ではキットは、子癇前症、子癇などの妊娠関連高血圧障害、または子癇前症も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む。さらに他の例では、キットは、子癇前症または子癇の治療に関する療法治療または用量レジメンをモニタリングするための、キットの使用説明書を含む。診断キットは、被験体サンプルのPAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管新生指数を測定するため、およびPAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管新生指数と参照サンプル値を比較するための、キットの使用に関する標識または説明書も含むことができる。参照サンプル値がキットの目的とする用途に依存するであろうことは理解されるはずである。例えば、サンプルは参照サンプル値と比較することができ、PAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管新生指数または可溶性エンドグリンの値の増大は、子癇前症または子癇、または子癇前症もしくは子癇に対する素因を示す。他の例では、治療モニタリングに使用するキットは、子癇前症または子癇を示す参照PAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管新生指数値または可溶性エンドグリンの値を有する可能性があり、参照サンプルに対する被験体サンプルの、PAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管新生指数値の低下または可溶性エンドグリンの値の低下を使用して、治療用化合物の治療有効性または有効用量を示すことができる。キットの使用に応じて、正常または陽性参照範囲内の精製タンパク質のレベルの標準曲線も含まれ得る。

10

20

【0122】

治療薬

本発明は、被験体における子癇前症または子癇を治療または予防する方法および組成物を特徴とする。子癇前症、子癇を有するか、またはこのような疾患に対する素因を有する被験体において可溶性エンドグリンのレベルが増大することを考慮すると、可溶性エンドグリンポリペプチドまたは核酸分子の発現レベルおよび/または生物活性を低下させる任意の化合物が、本発明の方法において有用である。このような化合物には、リガンドと結合する可溶性エンドグリンを破壊し得るTGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、またはBMP7、可溶性エンドグリンと特異的に結合する精製抗体または抗原結合断片、アンチセンス核酸塩基オリゴマー、およびRNA干渉を仲介するために使用するdsRNAがある。他の有用な化合物には、例えば血管新生アッセイにより測定して、可溶性エンドグリンの生物活性を変えることができる任意の化合物がある。代表的な化合物および方法は以下に詳細に記載する。これらの方法は、PCT国際公開第2004/008946号および米国特許出願公開第20040126828号および同第20050170444号中に記載されたのと同様の、sFlt-1のレベルを低下させるかまたはVEGFまたはPlGFのレベルを増大させるかまたはsFlt-1のレベルを低下させるための方法と組み合わせることもできる。さらに、TGF- β 1または3、eNOS、またはPGI₂のレベルまたは生物活性を増大させる任意の化合物は、本発明の方法において有用である。代表的な化合物および方法は以下に詳細に記載する。

30

40

【0123】

本発明者らは、可溶性エンドグリンとsFlt-1の経路は協力的に働いて、子癇前症または子癇の発生を助長する可能性があることを発見したことを記さなければならない。したがって本発明は、妊娠関連高血圧障害を治療または予防するための、本明細書に記載する任意の方法または組成物の任意の組合せを含む。例えば、妊娠関連高血圧障害を治療または予防するために、可溶性エンドグリンの経路を標的化する(例えば、可溶性エンドグリンの発現または生物活性をダウンレギュレーションする、またはTGF- β 、eNOS、またはPGI₂の発現または生物活性をアップレギュレーションする)化合物は、sFlt-1の経路を標的化

50

する化合物(例えば、sFlt-1の発現または生物活性をダウンレギュレーションする、またはVEGFまたはPlGFの発現または生物活性をアップレギュレーションする)と組み合わせて使用することができる。

【0124】

TGF- シグナル伝達経路を標的化する治療薬

TGF- は多くの細胞型において増殖、分化、運動性、組織再編成、神経発生、創傷修復、アポトーシス、および血管新生を制御する少なくとも25の増殖因子からなるファミリーの原型である。TGF- は多くの細胞型における細胞増殖も抑制し、マトリックスタンパク質の合成を刺激することができる。それが使用されている文脈から明らかにならない限り、本明細書を通じて使用する用語TGF- は、必要に応じてTGF- のスーパーファミリーのいずれかまたは全てのメンバーを一般に指すことは理解されるはずである。可溶性エンドグリンはTGF- 1、TGF- 3、アクチビン、BMP-2、およびBMP-7を含めたTGF- ファミリーのいくつかの特異的メンバーと結合し、発育中の胎児または胎盤からこれらの必要不可欠なミトジェン因子および抗血管新生因子を奪うために働く可能性がある。本発明は、可溶性エンドグリンと結合させ可溶性エンドグリンの影響を中和するためのこれらのリガンドのレベルを増大させる方法を特徴とする。

10

【0125】

治療用化合物としての可溶性エンドグリンリガンド

本発明の好ましい実施形態では、TGF- 1、TGF- 3、アクチビンA、BMP2、およびBMP7だけには限られないがこれらを含めたTGF- ファミリーのタンパク質などの精製型の任意の可溶性エンドグリンリガンドを被験体に投与して、子癇前症または子癇を治療または予防する。

20

【0126】

精製TGF- ファミリータンパク質は、TGF- 1またはTGF- 3、または血管新生を誘導し得る任意の知られているTGF- ファミリーのメンバーのアミノ酸配列と相同的、より望ましくは実質的に同一であるアミノ酸配列を有する任意のタンパク質を含む。非制限的な例には、R & D Systems、MNからのヒトTGF- 1(カタログ番号240-B-002)およびヒトTGF- 3(カタログ番号243-B3-002)がある。本発明の方法中で有用である好ましいTGF- ファミリーのタンパク質は、可溶性エンドグリンと結合する能力を有するはずである(例えば、Barbara et al., J.Biol.Chem.274: 584 ~ 94(1999))。

30

【0127】

エンドグリンのタンパク質分解による切断を阻害する治療用化合物

本発明者らはエンドグリンの細胞外ドメイン中の考えられる切断部位を同定しており、そこでタンパク質分解酵素が膜結合型のエンドグリンを切断し、可溶性として細胞外ドメインを切り離す可能性がある。本発明者らの切断部位の配列アライメントは、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)は可溶性エンドグリンの切断および切り離しを担う可能性があることを示唆する。あるいは、カテプシンまたはエラスターゼも切断事象に關与する可能性がある。MMPはコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、およびストロメリシンとしても知られており、現在知られている26のファミリーのメンバーが存在する(総説に関しては、Whittaker and Ayscough, Cell Transmissions 17:1(2001)を参照)。好ましいMMPは、子癇前症患者由来の胎盤中でアップレギュレーションされることが知られているMMP9である(Lim et al., Am.J.Pathol.151: 1809 ~ 1818, 1997)。MMPの活性化は、プロ酵素の活性化およびメタロプロテイナーゼの組織阻害剤(TIMPS)などの内因性阻害剤による阻害によって制御される。MMPの阻害剤は亜鉛結合タンパク質である。4つの知られている内因性阻害剤(TIMP1~4)が存在し、これらはWhittaker et al., 上記中に総説されている。1つの好ましいMMP阻害剤は、ベータグリカン、エンドグリンと類似性を共有する分子を切断することが示されてきている膜型MMP1の阻害剤である(Velasco-Loyden et al., J.Biol.Chem.279: 7721 ~ 7733(2004))。さらに、様々な天然に存在する阻害剤および合成MMP阻害剤が同定されてきており、これらもWhittaker et al., 上記中に総説されている。例にはMMPを対象とする抗体、およびマリマスタット、パチマスタット、CT1746、BAY12-9566、プリノマ

40

50

スタット、CGS-27023A、D9120、BMS275291(Bristol Myers Squibb)、およびトロケードを含めた様々な化合物があり、これらのいくつかは現在臨床試験中である。可溶性エンドグリンの切り離しおよび可溶性エンドグリンレベルのアップレギュレーションにおけるMMP、カテプシン、またはエラスターゼの潜在的な役割を考慮すると、本発明は、被験体における子癇前症または子癇を治療または予防するための、可溶性エンドグリンの切断および切り離しに關与する任意のMMP、カテプシン、またはエラスターゼの活性を阻害することが知られている、前に記載した化合物などの任意の化合物の使用も提供する。

【0128】

可溶性エンドグリン結合タンパク質を増大させる治療用化合物

本発明は、被験体における子癇前症を治療または予防するための、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチピンA、BMP2、およびBMP7だけには限られないがこれらを含めた、可溶性エンドグリン結合タンパク質の血中血清レベルを刺激または増大することが知られている任意の化合物の使用を提供する。これらの化合物は単独で、または前に記載した精製タンパク質、または本明細書に記載するTGF- β ファミリータンパク質のタンパク質レベルを増大させるために使用した任意の他の方法と組み合わせて使用することができる。一例では、シクロスポリンを1日2回100~200mgの用量で使用してTGF- β 1の生成を刺激する。

10

【0129】

可溶性エンドグリンの抗血管新生活性を変える治療用化合物

他の治療用化合物は、血管新生アッセイを使用して同定することができる。例えば、高レベルの可溶性エンドグリンを有する子癇前症の血清をマトリゲルチューブ形成アッセイに加え、抗血管新生状態を誘導するはずである。次いで試験化合物をアッセイに加えることができ、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の抗血管新生状態の復帰は、その化合物が可溶性エンドグリンの生物活性を低下させることができ、治療用化合物として有用であることを示す。

20

【0130】

NOSのレベルまたは生物活性を増大させる治療用化合物

NOSは、数種のコファクター、触媒部位、ヘム-チオレートタンパク質のクラスに属するN末端オキシゲナーゼドメイン、およびNADPH:P450レダクターゼと相同的であるC末端レダクターゼドメインの一部であるヘム基を含む複合酵素である。L-アルギニン(L-Arg)のグアニジノ窒素の5電子の酸化を触媒することによって、NOSはNOを生成する。

30

【0131】

eNOSの活性化は、Ser1177のリン酸化およびThr495の脱リン酸化の同時の増大を含む。本発明者らは、TGF- β 1はThr495でeNOSを脱リン酸化し、これはCa²⁺感受性および酵素活性を増大させるのに必要であり、Ser1177をリン酸化することによってeNOSを活性化するVEGFと相乗的に働く可能性があることを発見した。

【0132】

したがって、NOS、特にeNOSのレベルまたは生物活性を増大させる(例えば、安定性、転写または翻訳を増大させることによって、タンパク質分解を低下させることによって)任意の化合物(例えば、ポリペプチド、核酸分子、小分子化合物、または抗体)、またはeNOS活性のダウンレギュレーションを妨げる任意の化合物は、本発明の方法中で有用である。このような化合物には精製NOS、好ましくはeNOS、またはその生物学的に活性な断片、NOS、好ましくはeNOS、またはその生物学的に活性な断片をコードする核酸、スタチン、パナジン酸塩、肝細胞増殖因子、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)、Akt、VEGF、TGF- β 1、またはSer1177のリン酸化またはThr495の脱リン酸化または両方を増大させる任意の他の化合物がある。一酸化窒素は、内皮および他の細胞中に局在する一酸化窒素合成酵素によってL-アルギニンから合成される。一酸化窒素は、例えばニトロプルシドナトリウム、ニトログリセリン、SIN-1、一硝酸イソソルピド、硝酸イソソルピドなどの様々な一酸化窒素ドナーの適用によって生成することもできる。したがって、NOSのレベルまたは生物活性を(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上)増大させる化合物は、場合によってはL-アルギニンまたは一酸化窒素ドナー(例えば、ニ

40

50

トロブルシドナトリウム、ニトログリセリン、一硝酸イソソルビド、および硝酸イソソルビド)と組み合わせて投与することができる。NOS活性は当技術分野で知られている標準的な方法によってアッセイすることができ、シトルリンアッセイ、および参照によりその全開示が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20050256199号中に記載された他のアッセイを含むが、これらだけには限られない。eNOSのThr495残基はeNOSのカルモジュリン(CaM)結合ドメイン内に位置する。Thr495におけるeNOSのアゴニスト誘導型脱リン酸化はCaMと酵素の結合を増大させ(Fleming et al., Circ Res.2001, 88: E68~75)、これによってそのカルシウム感受性および活性化が増大する。本明細書に記載するTGF- β 1以外に、他のアゴニストは、ブラジキニン、ヒスタミン、およびVEGFを含めた、eNOSのThr495の脱リン酸化を引き起こすことが示されている。Thr495の脱リン酸化は、タンパク質キナーゼC(PKC)阻害剤Ro31-8220(Calbiochem)によって、またはホルボール12-ミリスチン酸13-アセテート(PMA)(Sigma Aldrich)を使用したPKCのダウンレギュレーション後に増大させることが可能である。さらに、Thr495のアゴニスト誘導型脱リン酸化はCa²⁺/カルモジュリン依存性であり、カリクリンA(Sigma Aldrich)、タンパク質ホスファターゼ1(PP1)阻害剤によって阻害可能であることが示されてきている(Fleming I, et al.Circ Res.2001, 88: E68~75)。Thr495におけるeNOSの脱リン酸化に影響を与える他の化合物には、ヒスタミンおよびブラジキニン(Sigma Aldrich)がある。

10

【0133】

PGI₂のレベルまたは生物活性を増大させる治療用化合物

プロスタサイクリンは、エイコサノイドとして知られる脂質分子のファミリーのメンバーである。それは内皮細胞において酵素プロスタサイクリンシンターゼの作用によりプロスタグランジンH₂(PGH₂)から生成される。PGI₂の生物活性には、血小板凝集の阻害、平滑筋の弛緩、直接的な血管拡張による全身および肺血管耐性の低下、および腎臓におけるナトリウム利尿がある。

20

【0134】

PGI₂は、VEGFとTGF- β 1の両方によって刺激される抗血栓因子である。PGI₂の生物活性には血小板凝集の阻害および平滑筋の弛緩があり、PGI₂の生物活性に関するアッセイには、Jakubowski et al., Prostaglandins47: 404(1994)中に記載されたアッセイなどの、当技術分野で知られている任意の血小板凝集アッセイまたは他のPGI₂アッセイがある。本発明は、PGI₂ミメティクス、イロプロスト、シカプロスト、およびアスピリンだけには限られないが、これらを含めた、当技術分野で知られている標準的なアッセイにより測定してPGI₂のレベルまたは活性を(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上)増大させる任意の化合物の使用を特徴とする。他の化合物が当技術分野で知られており、例は参照によりその全開示が本明細書に組み込まれるU.S.P.N.5,910,482中に記載されている。

30

【0135】

精製タンパク質

任意の精製タンパク質、またはその断片に関して、当技術分野で知られている標準的な方法を使用してタンパク質を調製する。前に記載した任意の治療用タンパク質の類似体または相同体も含まれ、例えば残基または配列の様々な置換を施すことによって、生物活性に必要ではない末端または内部残基または配列を削除することによって、または生物活性を増大する可能性がある末端または内部残基を加えることによって構築することができる。アミノ酸の置換、欠失、付加、または突然変異を施して、様々な発現系におけるタンパク質の発現、安定性、または可溶性を改善することができる。一般に置換は保存的に施し、生物活性に対する影響を考慮する。類似のタンパク質またはその断片の発現用に構築したヌクレオチド配列の突然変異、欠失、または付加は当然ながらコード配列のリーディングフレームを保つはずであり、ハイブリダイズしてmRNAの翻訳に悪影響を与え得るループまたはヘアピンなどの二次的mRNA構造を生成する相補的領域を作製しないことが好ましいはずである。

40

【0136】

50

本発明の任意の治療用化合物(例えば、ポリペプチド、抗体、小分子化合物)は任意の修飾型も含むことができる。翻訳後修飾の例には、リン酸化、グリコシル化、ヒドロキシル化、硫酸化、アセチル化、イソプレニル化、プロリン異性化、サブユニット二量体化または多量体化、および任意の他のタンパク質、またはその断片、または膜構成要素、またはその断片との架橋または結合(例えば、膜脂質構成要素が結合した膜からのタンパク質の切断)があるが、これらだけには限られない。ポリペプチドの高い安定性、低いオフレート、可溶性、安定性およびin vivoまたはin vitro循環時間、または低い免疫原性などの、他の利点をもたらす修飾には、例えばアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化反応、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、トランスファーRNA仲介のタンパク質へのアミノ酸の付加、アルギニル化、およびユビキチン化などがある(例えば、Creighton、「Proteins: Structures and Molecular Properties」、2dEd.、W.H.Freeman and Co.、N.Y.、1992; 「Postranslational Covalent Modification of Proteins」、Johnson, ed.、Academic Press、New York、1983; Seifter et al.、*Met h.Enzymol.*、182: 626~646、1990; Rattan et al.、*Ann.NY Acad Sci.*、663: 48~62、1992を参照)。本発明のペプチジル治療用化合物は、野生型配列に対する置換、欠失、または挿入などの1、2、3、4、5個、5個を超える、または10個を超えるアミノ酸の変化を含む変異体などの、任意の化合物の配列変異体も含み得る。さらに、本発明の治療用化合物は1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含むことができる。非古典的アミノ酸は、一般的なアミノ酸、2,4-ジアミノ酪酸、 β -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6-アミノヘキササン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オミチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロ-アミノ酸、デザイナーアミノ酸、例えば β -メチルアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体のD異性体を一般に含むが、これらだけには限らない。さらに、アミノ酸はD(右旋回)またはL(左旋回)であってよい。

【0137】

例えば、本発明によって含まれる他の翻訳後修飾には、例えばN末端またはC末端を処理したN結合またはO結合炭水化物鎖、アミノ酸骨格と化学成分の結合、N結合またはO結合炭水化物鎖の化学修飾、およびN末端メチオニン残基の付加または欠失がある。

【0138】

さらに、ポリペプチドの高い可溶性、安定性および循環時間、または低い免疫原性(米国特許第4,179,337号を参照)などの他の利点をもたらすことができる、本明細書に記載する治療用化合物の化学的に修飾された誘導体も含まれる。誘導体化用の化学成分は、水溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどから選択することができる。化合物は分子内のランダムな位置、または分子内の所定の位置で修飾することができ、1、2、3個またはそれ以上の結合した化学成分を含むことができる。

【0139】

ポリマーは任意の分子量であってよく、分岐状または非分岐状であってよい。ポリエチレングリコールに関しては、取り扱いやすさおよび製造のために、好ましい分子量は約1kDaと約100kDaの間である(用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製中、いくつかの分子は規定分子量より重く、いくつかの分子は軽いはずであることを示す)。所望の治療プロファイル(例えば、所望の徐放期間、存在する場合は生物活性に対する影響、取り扱

10

20

30

40

50

いやすさ、抗原性の程度または欠如、および治療用タンパク質または類似体に対するポリエチレングリコールの他の知られている影響)に応じて、他のサイズを使用することができる。前述のように、ポリエチレングリコールは分岐状構造を有し得る。分岐状ポリエチレングリコールは、例えば参照により開示のそれぞれが本明細書に組み込まれる、米国特許第5,643,575号;Morpurgo et al., Appl.Biochem.Biotechnol.56: 59~72、(1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18: 2745~2750、(1999);およびCaliceti et al., Bioconjug.Chem.10: 638~646、(1999)中に記載されている。

【0140】

本発明の任意の治療用化合物(例えば、ポリペプチド、抗体、または小分子化合物)を1つの方法で修飾して、他の、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列、Fc配列、検出可能な標識、または他の治療用分子などと融合した治療用化合物を含むキメラ分子を形成することもできる。一例では、抗可溶性エンドグリン抗体は、Fc融合タンパク質と融合したペプチドであってよい。

10

【0141】

本発明の方法中で使用する抗体を含めた任意のポリペプチドに関して、それらのポリペプチドまたは抗体、またはその断片をコードする核酸も、当技術分野で知られており本明細書に記載する遺伝子療法用の標準的技法を使用する、本発明の方法中で有用である。本発明は、ポリペプチドまたはペプチド断片の3次元構造のモデリング、および特定の分子形状、サイズおよび電荷特性を有する考えられる阻害剤化合物を与えるための合理的薬剤設計の使用に基づくミメティクスも含む。治療用化合物を同定した後、当技術分野で知られている適切なモデリング技法を使用して機能的相互作用を試験し、それらがこの相互作用を再現することができるような形式で配列した官能基を含むミメティクス化合物を設計することができる。知られている薬理活性化合物に対するミメティクスの設計は、リード化合物ベースの薬剤を開発するための知られている手法である。これは活性化合物の合成が困難または高価である場合、またはそれが個々の投与法に適していない、例えばペプチドが、それらが消化管内でプロテアーゼにより急速に分解される傾向があるため経口組成物の活性物質として十分に適していない場合、望ましい可能性がある。ミメティクスの設計、合成および試験を使用して、標的性に関して多数の分子をランダムにスクリーニングすることを避けることができる。したがって1つまたは複数のミメティクスをスクリーニングして、それらが可溶性エンドグリンのレベルまたは生物活性を低下させるかまたは阻害するかどうかを調べることができ、およびさらなる最適化または修飾を次いで実施して、in vivoまたは臨床試験用の1つまたは複数の最終的なミメティクスに到達することができる。

20

30

【0142】

治療用核酸

近年の実験によって、VEGFなどの内皮細胞マイトジェンの発現を可能にする核酸(DNAまたはRNA)の血管損傷部位への送達は、損傷した血管の増殖および再内皮化を誘導するはずであることが示されている。本発明は血管損傷に関するものではないが、内皮細胞に核酸を送達するためのこれらの一般的な技法は、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2およびBMP7、またはeNOSなどの可溶性エンドグリン結合タンパク質をコードする核酸を送達するために本発明において使用することができる。被験体における子癇前症または子癇を治療または予防するために、可溶性エンドグリンの切断および切り離しに關与する任意のMMP、カテプシン、またはエラスターゼの活性を阻害することが知られている前に記載したタンパク質などのタンパク質をコードする核酸を送達するために、これらの技法を使用することもできる。これらの一般的な技法は米国特許第5,830,879号および米国特許第6,258,787号中に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0143】

本発明において核酸は、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2およびBMP7、またはeNOSなどの可溶性エンドグリン結合タンパク質をコードするゲノムDNA、cDNA、およびmRNAを含めた任意の核酸(DNAまたはRNA)であってよい。所望のタンパク質をコードする核酸は

50

、当技術分野で知られている通常の手順、例えば組換えDNA、PCR増幅を使用して得ることができる。

【0144】

核酸を送達するための形態

本明細書に記載する任意の核酸の適用例に関して、核酸を投与するための標準的な方法を使用することができる。例は米国特許出願公開第20060067937号およびPCT国際公開第06/034507号中に記載されている。

【0145】

可溶性エンドグリンの発現を阻害する治療用核酸

本発明は、可溶性エンドグリンmRNAの発現を直接ダウンレギュレーションするための、アンチセンス核酸塩基オリゴマーの使用も特徴とする。相補的核酸配列(センスまたはコード鎖)との結合によって、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、おそらくRNAseHによるRNA鎖の酵素切断によってタンパク質の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、高レベルの可溶性エンドグリンを発現する細胞中の、可溶性エンドグリンタンパク質の発現を低下させることが可能であることが好ましい。好ましくは、可溶性エンドグリンタンパク質の発現の低下は、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%、好ましくは20%以上、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%以上である。アンチセンス核酸塩基オリゴマーを選択および調製するための方法は、当技術分野でよく知られている。VEGFの発現をダウンレギュレーションするためのアンチセンス核酸塩基オリゴマーの使用の一例に関しては、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,410,322号を参照されたい。タンパク質発現のレベルをアッセイするための方法も当技術分野でよく知られており、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、およびELISAを含む。

10

20

【0146】

本発明は、可溶性エンドグリンの発現を阻害するためのRNA干渉(RNAi)の使用も特徴とする。RNA干渉(RNAi)は転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)の近年発見されたメカニズムであり、その中では当該の遺伝子またはmRNAに対応する二本鎖RNA(dsRNA)が生物中に導入され、対応するmRNAの分解が生じる。RNAi反応では、dsRNA分子のセンス鎖とアンチセンス鎖の両方が、21~23ヌクレオチド(nt)の長さ範囲であり2つのヌクレオチド3'尾部を有する小さなRNA断片またはセグメントに処理される。あるいは、21~23nt長であり2つのヌクレオチド3'尾部を有する合成dsRNAを合成し、精製し、反応中で使用することができる。これらの21~23ntのdsRNAは、「ガイドRNA」または「低分子干渉RNA」(siRNA)として知られている。

30

【0147】

したがってsiRNA二本鎖は、複合体内のsiRNAと相同性を有する内因性mRNAを標的化し破壊するタンパク質で構成されるヌクレアーゼ複合体と結合する。複合体内のタンパク質の同一性は依然として明らかではないが、複合体の機能は、siRNA鎖の一本と内因性mRNAの間の塩基対形成相互作用によって、相同的mRNA分子を標的化することである。mRNAは次いでsiRNAの3'末端から約12nt切断され、分解される。このようにして、特定の遺伝子を標的化し分解することができ、それによって標的遺伝子からのタンパク質発現の消失がもたらされる可能性がある。siRNAは化学的に合成することもでき、またはsiRNAを化学的に合成している会社(例えば、Dharmacon Research Inc.、Pharmacia、またはABI)から入手することもできる。

40

【0148】

dsRNAの具体的な要件および修飾は、参照により本明細書に組み込まれるPCT国際公開第01/75164号中、および米国特許出願公開第20060067937号およびPCT国際公開第06/034507号に記載されている。

【0149】

妊娠初期に有用である可溶性エンドグリンベースの治療用化合物

完全長エンドグリンシグナル伝達の阻害は、様々な移植片培養においてトロホプラスト

50

の侵襲性を増大させることが示されてきている(Caniggia I et al、Endocrinology、1997、138: 4977~88)。したがって可溶性エンドグリンは、妊娠初期中のトロホプラストの侵襲性を増大させる可能性がある。したがって、妊娠関連高血圧障害または妊娠関連高血圧障害に対する素因を有さない女性の、妊娠初期の可溶性エンドグリンレベルを増大させる組成物は、胎盤形成の促進に有益である可能性がある。可溶性エンドグリンレベルを増大させる組成物の例には、精製可溶性エンドグリンポリペプチド、核酸分子をコードする可溶性エンドグリン、および可溶性エンドグリンのレベルまたは生物活性を増大させる化合物または増殖因子がある。

【0150】

遺伝子およびタンパク質の発現のアッセイ

以下の方法を使用してタンパク質または遺伝子の発現を評価することができ、可溶性エンドグリン結合タンパク質のレベルを増大させるため、または可溶性エンドグリンタンパク質のレベルを低下させるための、任意の前述の方法の有効性を決定することができる。

【0151】

被験体由来の血清を、特異的抗体を使用するELISA、ウエスタンブロッティング、またはイムノアッセイなどの方法を使用して、可溶性エンドグリンのレベルに関して測定する。被験体由来の血清は、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7、または可溶性エンドグリンと結合することが知られている任意のタンパク質リガンドのレベルに関して測定することもできる。タンパク質の血清中レベルを測定するために使用する方法には、特異的抗体を使用するELISA、ウエスタンブロッティング、またはイムノアッセイがある。さらに、*in vitro*血管新生アッセイを実施して、被験体の血液が抗血管新生状態から血管新生促進状態に変わったかどうか判定することができる。このようなアッセイは以下の実施例4中に記載する。子癇前症または子癇の診断指標である結果は、可溶性エンドグリンのレベルの少なくとも10%、20%、好ましくは30%、より好ましくは少なくとも40%または50%、および最も好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%以上の増大であると考えられ、子癇前症または子癇の改善を示す結果は、可溶性エンドグリンのレベルの少なくとも10%、20%、好ましくは30%、より好ましくは少なくとも40%または50%、および最も好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%以上の低下である。代替的または追加的に、子癇前症または子癇の診断指標である結果は、eNOS、PGI $_2$ 、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7、または可溶性エンドグリンと結合することが知られている任意のタンパク質リガンドのレベルの少なくとも10%、20%、好ましくは30%、より好ましくは少なくとも40%または50%、および最も好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%以上の低下であると考えられ、子癇前症または子癇の改善を示す結果は、eNOS、PGI $_2$ 、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7、または可溶性エンドグリンと結合することが知られている任意のタンパク質リガンドのレベルの少なくとも10%、20%、好ましくは30%、より好ましくは少なくとも40%または50%、および最も好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%以上の増大である。子癇前症または子癇の改善を示す結果は、*in vitro*血管新生アッセイを使用して、抗血管新生状態から血管新生促進状態への少なくとも10%、好ましくは20%、30%、40%、50%、および最も好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%以上の転換であると考えられることもできる。

【0152】

被験体由来の血清または尿サンプルは、eNOS、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7、または可溶性エンドグリンをコードする核酸またはポリペプチドのレベルを測定することもできる。遺伝子発現をアッセイするための当技術分野で知られているいくつかの方法が存在する。いくつかの例には、被験体の血液サンプルからのRNAの調製、およびノーザンブロッティング用のRNAの使用、PCRベースの増幅、またはRNAse保護アッセイがある。陽性結果は、可溶性エンドグリン、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7核酸のレベルの少なくとも10%、20%、好ましくは30%、より好ましくは少なくとも40%または50%、および最も好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%以上の増大であると考えられる。

10

20

30

40

50

【0153】

治療用抗体

子癇前症に罹患している妊婦から採取した血清サンプル中に見られる高レベルの可溶性エンドグリンは、トロホプラスト細胞および母体の内皮細胞と結合し、それらから胎児または胎盤の正しい発達および血管新生に必要とされる機能的増殖因子を奪うための、「生理的シンク」として可溶性エンドグリンが作用していることを示唆する。可溶性エンドグリンと結合し(例えば、TGF- 1、TGF- 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7と結合し)可溶性エンドグリンの活性を中和する抗体などの化合物の使用は、遊離TGF- 1、TGF- 3、アクチビン-A、BMP2、およびBMP7の増大をもたらすことによって、子癇前症または子癇の予防または治療を手助けすることができる。このような増大は、胎盤の発達および胎児の栄養状態、および母体全身の内皮細胞の健康状態に必要とされるトロホプラストの増殖、移動および血管新生の増大をもたらすはずである。

10

【0154】

本発明は、可溶性エンドグリンと特異的に結合する抗体を提供する。抗体は、エンドグリンの細胞外ドメインまたはリガンド結合ドメインと結合することが好ましい。抗体を使用して可溶性エンドグリンの活性を中和し、最も有効なメカニズムはTGF- 1、TGF- 3、アクチビン-A、BMP2、またはBMP7に関する結合部位の直接阻害によるものであると考えられているが、しかしながら、他のメカニズムを排除することはできない。好ましい抗体は、図30B中において太線および下線で示すペプチド配列(例えば、アミノ酸40~86、144~199、206~222、289~304、または375~381)のいずれか1つまたは複数を含むヒトエンドグリン上のエピトープ(線状構造または三次元立体配座のいずれかの結果として)と、または可溶性エンドグリンの好ましい断片(例えば、ヒトエンドグリンのアミノ酸1~437、4~437、40~406、または1~587)のいずれかと結合することができる。治療目的で抗体を調製および使用するための方法は、米国特許第6,054,297号、米国特許第5,821,337号、米国特許第6,365,157号、および米国特許第6,165,464号、米国特許出願公開第2006/0067937号、およびPCT国際公開第06/034507号を含めたいくつかの特許中に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、モノクローナルヒト化抗体が好ましい。本発明は、図30B中において太線および下線で示すペプチド配列のいずれか1つまたは複数、または可溶性エンドグリンの好ましい断片(例えば、ヒトエンドグリンのアミノ酸1~437、4~437、40~406、または1~587)のいずれかと結合する抗体だけには限らないが、これらを含めた、可溶性エンドグリンと結合する抗体も含む。

20

30

【0155】

抗体の治療用途

子癇前症または子癇の治療または予防のためにin vivoで使用するとき、本発明の抗体は治療有効量で被験体に投与する。好ましくは、抗体は持続注入によって非経口的または静脈内に投与する。用量および投与レジメンは、被験体の疾患の重度、および全体的な健康状態に依存する。投与する抗体の量は、典型的には被験体の体重1kg当たり約0.001~約10mg、好ましくは被験体の体重1kg当たり0.01~約5mgの範囲である。

40

【0156】

非経口投与用に、製薬上許容される非経口賦形剤とともに、注射可能な形の単位剤形で(溶液、懸濁液、エマルジョン)抗体を配合する。このような賦形剤は本質的に無毒であり、非治療的である。このような賦形剤の例は水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロス溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。固定油(fixed oil)およびオレイン酸エチルなどの非水性賦形剤を使用することもできる。リボソームを担体として使用することができる。賦形剤は、等張性および化学安定性を増大させる物質、例えばバッファーおよび防腐剤などの微量の添加剤を含むことができる。抗体は典型的には、約1mg/ml~10mg/mlの濃度でこのような賦形剤に配合する。

【0157】

併用療法

50

場合によっては、任意の他の標準的な子癇前症または子癇療法と組み合わせて治療を施すことができ、このような方法は当業者には知られており、米国特許出願公開第20040126828号、同第20050025762号、同第20050170444号、同第20060067937号、および同第20070104707、ならびにPCT国際公開第2004/008946号、同第2005/077007号、および同第06/034507号中に記載された方法を含む。

【0158】

望ましいことに、本発明は、本明細書に記載する任意の1つまたは複数の治療物質の組合せの使用を特徴とする。可溶性エンドグリンとsFlt-1は一緒に作用して、おそらくNOSシグナル伝達経路に集中するTGF- β 1およびVEGFシグナル伝達経路にそれぞれ干渉することによって、血管損傷および妊娠関連高血圧障害を誘導し得るといふ本発明者らの発見を考慮すると、本発明の望ましい治療法は、sFlt-1のレベルまたは活性を低下させるかまたはVEGFまたはPlGFのレベルまたは活性を増大させる化合物を、可溶性エンドグリンのレベルまたは活性を低下させるかまたはTGF- β 1、NOS、またはPGI₂のレベルまたは活性を増大させる化合物と組み合わせて投与することを含む。任意の物質の任意の組合せをこの目的で使用することができることは、当業者によって理解されるはずである。例えば、可溶性エンドグリンと特異的に結合する抗体をVEGFと組み合わせて投与することができる。他の例では、TGF- β 1のレベルまたは活性を増大させる化合物をVEGFまたはPlGFを増大させる化合物と組み合わせて投与して、エンドグリン経路とVEGF経路の両方を標的化することができる。あるいは、可溶性エンドグリンとsFlt-1の両方に対する抗体の組合せを直接、またはex vivo手法(例えば、抗可溶性エンドグリンまたはsFlt-1を裏打ちしたカラムを使用し、患者の血液をカラム内で循環させる)のいずれかで使用することができる。任意のこれらの組合せは、それぞれの受容体の下流の経路を制御するための、NOS、好ましくはeNOSのレベルまたは活性を増大させる化合物の投与をさらに含むことができる。

【0159】

さらに本発明は、本明細書に記載する任意の治療法と組み合わせて使用する、任意の慢性高血圧の薬剤の使用を提供する。妊娠中の高血圧を治療するために使用する薬剤には、メチルドーパ、塩酸ヒドララジン、またはラベタロールがある。これらの薬剤のそれぞれに関して、投与の形態および用量は医師によって、および製造者の説明書によって決定される。

【0160】

投与の用量および形態

治療は直接、または妊娠中に子癇前症または子癇を治療または予防するためのex vivo手法を使用して施して、または妊娠後に使用して施して産後の子癇前症または子癇を治療することが好ましい。投与に関する技法および用量は化合物の型(例えば、化学化合物、精製タンパク質、抗体、アンチセンス、RNAi、または核酸ベクター)に応じて変わり、当業者にはよく知られており、または容易に決定される。

【0161】

本発明の治療用化合物は、単位剤形で製薬上許容される希釈剤、担体、または賦形薬とともに投与することができる。投与は非経口、静脈内、皮下、経口または羊水への直接注射による局所投与であってよい。持続注入による静脈内送達は、本発明の治療用化合物を投与するのに好ましい方法である。治療用化合物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、輸液用デバイス、または移植用送達デバイスの形であってよく、またはそれは、使用前に水または他の適切な媒体で元の状態に戻す乾燥粉末として示すことができる。

【0162】

組成物は、経口投与用のピル、錠剤、カプセル、液体、または徐放性錠剤、または静脈内、皮下または非経口投与用の液体、または局所投与用のポリマーまたは他の徐放性媒体の形であってよい。

【0163】

製剤を作製するための当技術分野でよく知られている方法は、例えば「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」(20th ed., ed.A.R.Gennaro AR., 2000, Lippinco

10

20

30

40

50

tt Williams & Wilkins、Philadelphia、PA)中に見られる。非経口投与用の製剤は、例えば賦形薬、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、植物起源の油、または水素化ナフタレンを含むことができる。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーを使用して、化合物の放出を制御することができる。ナノ粒子配合物(例えば、生分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リボソーム)を使用して、化合物の生体内分布を制御することができる。他のおそらく有用な非経口送達系には、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、およびリボソームがある。製剤中の化合物の濃度は、投与する薬剤の用量、および投与の経路を含めたいくつかの要因に応じて変わる。

10

【0164】

化合物は、医薬産業において一般的に使用される非毒性の酸添加塩または金属錯体などの、製薬上許容される塩として、場合によっては投与することができる。酸添加塩の例には、例えば酢酸、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、またはトリフルオロ酢酸などの有機酸、例えばタンニン酸、カルボキシメチルセルロースなどのポリマー酸、および例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などの無機酸がある。金属錯体は、亜鉛、鉄などを含む。

【0165】

経口用途の製剤は、非毒性の製薬上許容される賦形薬と混合して活性成分を含む錠剤を含む。これらの賦形薬は、例えば不活性希釈剤または充填剤(例えば、スクロースおよびソルビトール)、潤滑剤、流動促進剤、および粘着防止剤(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、水素化植物油、またはタルク)であってよい。

20

【0166】

経口用途の製剤は、チュアブル錠として、または活性成分を不活性固体希釈剤と混合した硬質ゼラチンカプセルとして、または活性成分を水または油媒体と混合した軟質ゼラチンカプセルとして提供することもできる。

【0167】

化合物を投与する用量およびタイミングは、被験体の全体的な健康状態および子癇前症の症状の重度を含めた、様々な臨床要因に依存する。一般に、ひとたび子癇前症または子癇前症に対する素因を検出したら、精製タンパク質の持続注入を使用して疾患のさらなる進行を治療または予防する。治療は1~100日間、より好ましくは1~60日間、および最も好ましくは1~20日間の範囲の時間の間、または妊娠が終了するまで続けることができる。用量はそれぞれの化合物および疾患の重度に応じて変わり、10~20ng/ml可溶性エンドグリン、および/または1~500pg/mL遊離VEGFまたは遊離PIGF、または両方、好ましくは1~100pg/mL、より好ましくは5~50pg/mL、および最も好ましくは5~10pg/mLのVEGFまたはPIGF、または1~5ngのsFlt-1の範囲の安定状態の血清濃度を得るように力価を設定する。

30

【0168】

本明細書に記載する診断法を使用して、療法中に子癇前症または子癇をモニタリングすることができる。一例では、治療用化合物の用量を決定することができる。一例では、治療用化合物を投与し、PAAIを療法の過程に決定する。PAAIが20未満、好ましくは10未満である場合、したがってその治療用量は有効用量であると考えられる。他の例では、治療用化合物を投与し、可溶性エンドグリン抗血管新生指数を療法の過程に決定する。可溶性エンドグリン抗血管新生指数が200未満、好ましくは100未満である場合、したがってその治療用量は有効用量であると考えられる。

40

【0169】

被験体のモニタリング

子癇前症、子癇、またはこのような疾患に対する素因を有する被験体の疾患状態または治療は、本発明の診断法、キット、および組成物を使用してモニタリングすることができ

50

る。例えば、血液、血清、尿、血漿、羊水、またはCSFなどの体液中に存在する可溶性エンドグリンポリペプチドの発現をモニタリングすることができる。可溶性エンドグリンのモニタリングは、sFlt-1、VEGF、またはPlGF、TGF- β 、またはeNOSポリペプチドまたは核酸、またはPGI₂の発現をモニタリングするための方法と組み合わせることができる。このようなモニタリングは、例えば被験体における特定の薬剤の有効性を評価する際に、または疾患の進行を評価する際に有用である可能性がある。可溶性エンドグリン核酸分子またはポリペプチドの発現または生物活性を低下させる治療は、本発明において特に有用であると考えられる。

【0170】

スクリーニングアッセイ

前に論じたように、可溶性エンドグリン核酸分子またはポリペプチドのレベルは、子癇前症、子癇、またはこのような疾患に対する素因を有する被験体において増大する。これらの発見に基づくと、本発明の組成物は、子癇前症または子癇を有する被験体においてその発現が変化する可溶性エンドグリンポリペプチドまたは核酸分子の発現を制御する化合物を同定するための、候補化合物の高スループット低コストのスクリーニングに有用である。

10

【0171】

いくつかの方法が、スクリーニングアッセイを実施して、可溶性エンドグリン核酸分子の発現を変える新たな候補化合物を同定するために利用可能である。米国特許出願公開第20060067937号およびPCT国際公開第06/034507号中には詳細に例が記載されている。

20

【0172】

一例では、可溶性エンドグリンポリペプチドと特異的に結合する候補化合物をスクリーニングすることができる。このような候補化合物の有効性は、このようなポリペプチドまたはその機能相当物と相互作用するその能力に依存する。このような相互作用は、イムノアッセイまたは親和性クロマトグラフィーベースのアッセイ(例えば、Ausubel et al.上記中に記載されたアッセイ)などの、任意の数の標準的な結合技法および機能アッセイを使用して容易にアッセイすることができる。一実施形態では、可溶性エンドグリンポリペプチドを固定し、標準的な親和性クロマトグラフィーベースのアッセイを使用して固定した可溶性エンドグリンと結合する能力に関して化合物を試験する。固定した可溶性エンドグリンと結合する化合物は次いで溶出させ、精製し、*in vivo*と*in vitro*の両方で可溶性エンドグリンと結合するその能力、または可溶性エンドグリンの生物活性を阻害するその能力に関してさらに試験することが可能である。

30

【0173】

他の例では、候補化合物を、可溶性エンドグリンポリペプチドとTGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7などの増殖因子の結合を低下させることによって可溶性エンドグリンポリペプチドの生物活性を低下させるその能力に関して試験する。これらのアッセイは*in vivo*または*in vitro*で実施することができ、可溶性エンドグリンポリペプチドの生物活性は、当技術分野で知られているかまたは本明細書に記載する任意の可溶性エンドグリン活性に関するアッセイのいずれかを使用してアッセイすることができる。例えば、細胞はSmad2/3依存性レポーター構築物とともにインキュベートすることができる。望む場合、TGF- β の存在下で細胞をインキュベートして、Smad2/3依存性レポーター構築物におけるシグナルを増大させることも可能である。したがって細胞は可溶性エンドグリンの存在下でインキュベートすることができ、それによってSmad2/3依存性レポーター構築物のTGF- β 誘導活性化を低下させるかまたは阻害するはずである。候補化合物を細胞に加えることができ、可溶性エンドグリンで処理していない細胞と比較して、可溶性エンドグリン処理細胞中でのSmad2/3依存性レポーターのTGF- β 誘導活性化の増大をもたらす任意の化合物が、子癇前症または子癇を治療するのに有用であり得る化合物であると考えられる。

40

【0174】

他の例では、Thr495におけるeNOSのTGF- β 誘導脱リン酸化を、可溶性エンドグリンの生

50

物活性の変化に関するアッセイとして使用することもできる。この例では、可溶性エンドグリンの存在下で細胞をインキュベートし、以下に記載する実験に示すように、これはeNOSのThr495のTGF- β 1脱リン酸化を阻害する。次いで候補化合物を細胞に加え、Thr495のリン酸化状態を測定する。可溶性エンドグリンで処理していない細胞と比較して、可溶性エンドグリン処理細胞中でのThr495の脱リン酸化のTGF- β 1誘導活性化の増大をもたらす任意の化合物が、子癇前症または子癇を治療するのに有用であり得る化合物であると考えられる。

【実施例】

【0175】

以下の実施例は、本発明を例示することを意図する。決して本発明を限定するものではない。

【0176】

実施例 1

子癇前症妊婦におけるエンドグリンmRNAおよびタンパク質レベルの増大

子癇前症において病理的役割を果たす新たな分泌因子の同定を試みるため、本発明者らは、アフィメトリックス(Affymetrix)U95Aマイクロアレイチップを使用して17人の子癇前症妊婦および13人の正常妊婦の胎盤組織の遺伝子発現プロファイリングを行った。本発明者らは、エンドグリン遺伝子が子癇前症女性においてアップレギュレーションされていることを見出した。

【0177】

子癇前症におけるエンドグリンのアップレギュレーションを確認するため、本発明者らは正常血圧の妊婦と比較した、子癇前症妊婦における胎盤のエンドグリンmRNAレベルを解析するノーザンブロット解析(図3)およびエンドグリンの血清タンパク質レベルを測定するウエスタンブロット(図4)を行った。子癇前症は(1)妊娠20週以降の収縮期血圧(BP) > 140mmHgおよび拡張期BP > 90mmHg、(2)新たなタンパク尿の発症(ディップスティック尿検査1+、24時間尿採取におけるタンパク質 > 300mg、または無作為の尿タンパク/クレアチニン比 > 0.3)、および(3)分娩後12週までの高血圧およびタンパク尿の消散、と定義された。基礎疾患としての高血圧、タンパク尿、または腎臓病を有する患者は除外した。ネフローゼ域のタンパク尿(24時間尿採取におけるタンパク質 > 3g、または3.0より大きい尿タンパク/クレアチニン比)の有無に基づいて、患者を軽度および重度子癇前症に分類した。軽度子癇前症群における平均尿タンパク/クレアチニン比は0.94+/-0.2であり、重度子癇前症群においては7.8+/-2.1であった。様々な群の平均在胎期間は、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、および早産29.5+/-2.0週。胎盤サンプルは分娩後直ちに採取した。各胎盤から4個のサンプルを無作為に採取し、RNAレイター(later)安定化溶液(アンピオン(Ambion)社、オースティン、テキサス州)に入れ、-70℃で保存した。RNA単離は、キアゲンアールエヌイージーマキシキット(Qiagen RNAeasy Maxi Kit)(キアゲン(Qiagen)社、パレンシア、カリフォルニア州)を使用して行った。

【0178】

N末端領域(ジーンバンク#BC014271)に相当するエンドグリンコード領域(Unigene Hs.76753)中の400塩基対プローブ、および標準化対照として18Sプローブを用いてプローブしたノーザンブロットは、胎盤エンドグリンmRNAの増加を示した(Knebelmann et al., Cancer Res, 58:226-231 (1998)参照)。エンドグリンアミノ末端に対する抗体を用いてプローブしたウエスタンブロットは、正常血圧の妊婦と比較して、子癇前症妊婦における胎盤および母親の血清エンドグリンタンパク質レベル両方の増加を示した。

【0179】

実施例 2

子癇前症患者の胎盤および血清中の可溶性エンドグリンポリペプチドの実証

子癇前症女性の胎盤および血清中のエンドグリンタンパク質レベルを測定するために使用したウエスタンブロット解析によって、子癇前症妊婦の胎盤および血清に存在する小さ

10

20

30

40

50

なタンパク質(約63~65kDa)の存在が示唆された(図4および30A)。本発明者らは、この小さい断片がエンドグリンの細胞外ドメインであることを実証した。この切断型は、胎盤の合胞体栄養細胞および内皮細胞から切り出され、子癩前症患者において、過剰量で循環するようである。この可溶性エンドグリンは、正常な血管の健康状態に必要な血中リガンドに結合することにより抗血管新生薬の機能を果たしている可能性がある。

【0180】

予測されるこの可溶性タンパク質の長さは、約437アミノ酸(ペプチドリーダー配列を含む、リーダー配列を除くと412アミノ酸)である。sEngを、子癩前症患者の血清から精製した。44G4-IgG(抗Eng)セファロースから溶出した画分4および5を、還元条件下でSDS-PAGEに流し、Engに対するポリクローナル抗体を使用してウエスタンブロットにより試験した。溶出した画分を質量分析(3回のラン)に供して同定したペプチドを(図30B)に示す。質量分析による精製および解析によって、Gly40~Arg406のいくつかのEng特異的ペプチドが明らかになり、これは可溶性(可溶性エンドグリン)がヒトエンドグリン配列上ではっきりと完全長タンパク質のN末端領域に相当することを示す。

10

【0181】

実施例3

正常妊婦と子癩前症妊婦における可溶性エンドグリンの血中濃度

正常、軽度子癩前症、または重度子癩前症女性の血清の、血中可溶性エンドグリンレベルを比較するため、本発明者らはこれらの女性から採取した血液サンプルのELISA分析を行った。この研究の患者は全て、適切なIRBの承認を得た後、ベスイスラエルディーコネスメディカルセンター(Beth Israel Deaconess Medical Center)において集められた。子癩前症は、(1)それまで正常血圧であった患者における妊娠20週以降の収縮期BP>140および拡張期BP>90、(2)新たなタンパク尿の発症(ディップスティック尿検査1+、または24時間尿採取におけるタンパク質>300mg、または無作為の尿タンパク/クレアチニン比>0.3)、および(3)分娩後12週までの高血圧およびタンパク尿の消散、と定義された。基礎疾患としての高血圧、タンパク尿、または腎臓病を有する患者は除外した。本研究のために、ネフローゼ域のタンパク尿(24時間尿採取におけるタンパク質>3g、または3.0より大きい尿タンパク対クレアチニン比)の有無に基づいて、患者を軽度および重度子癩前症に分類した。HELLP症候群は、患者が血小板減少症(<100000細胞/ μ l)、LDH上昇(>600IU/L)およびAST上昇(>70IU/L)の知見を有する場合と定義された。健常妊婦を対照として含めた。他の医学的な理由による早産の患者8人を、さらに対照として含めた。胎盤サンプルは分娩後直ちに採取した。血清は、インフォームドコンセントを得た後、分娩時(胎盤娩出の0~12時間前)に妊娠患者から採取した。これらの実験はベスイスラエルディーコネスメディカルセンター(Beth Israel Deaconess Medical Center)の施設内審査委員会により承認された。

20

30

【0182】

表1に記載した患者の血清検体を使用して、本発明者らは様々な子癩前症患者群および対照妊娠患者群における可溶性エンドグリンの血中濃度を測定した。子癩前症患者をHELLPの有無によりさらに分類した場合、在胎期間を一致させた早産対照と比較して、軽度、重度およびHELLP症候群の子癩前症におけるsEng濃度はそれぞれ3、5および10倍高かった(図28)。妊娠患者のsEng濃度は、sEngがsFlt1よりも高かったHELLP群を除いて、sFlt1濃度と相関関係があった($R^2=0.56$)。患者の部分集団では、胎盤娩出の48時間後に得られた血液サンプルは、子癩前症および正常妊娠患者における平均sEng血中レベルが70%減少していた(図29)。

40

【表1】

表1:様々な患者群の臨床的特徴および血中可溶性エンドグリン

	正常 (n=30)	軽度子癇 前症 (n=11)	重度子癇前 症、HELLP 無し(n=17)	重度子癇前 症、HELLP 有り(n=11)	早産(n=8)
母親の年齢(歳)	32.43	33.18	29.5	33.73	31.88
在胎期間(週)	38.65	31.91*	29.06*	26.52*	30.99*
初産(%)	43.3	63.6	47.1	90.9	62.5
収縮期血圧(mmHg)	122	157*	170*	166*	123
拡張期血圧(mmHg)	72	99*	104*	103*	77
タンパク尿 (g タンパク質/g クレアチニ ン)	0.37	2.5*	8.64*	5.16*	0.6
尿酸(mg/dl)	5.27	6.24	7.29*	6.31	7.35
ヘマトクリット(%)	35.5	33.6	33.7	33.5	34.3
血小板数	238	230	249	69.4*	229
クレアチニン(mg/dl)	0.55	0.62	0.62	0.64	0.67
可溶性エンドグリン(ng/ml)	18.73	36.12*	52.55**	99.83***	10.9

*P<0.05, **P<0.005

【0183】

可溶性エンドグリンの平均血清濃度は、軽度子癇前症において少なくとも2倍高く、重度子癇前症患者において3~4倍高かった。HELLP症候群を合併した子癇前症患者において、可溶性エンドグリン濃度は在胎期間を一致させた対照検体より少なくとも5~10倍高かった。さらに、妊娠患者の可溶性エンドグリンレベルはsFlt1レベルと相関する(図18)。相関のR2値は0.6であった(ここで報告されているsFlt1血中濃度は以前発表されているものより少なくとも4~5倍高いことに注意する(Maynard et al., 上記)。これは、アッセイ希釈液に尿素を含まないために以前発表されたものより常に高い値を与える、アールアンドディーシステムズ(R&D systems)社製の新しいELISAキットの感受性の違いによる。)。換言すると、最大の可溶性エンドグリンレベルを有する患者は、最大のsFlt1血中レベルも有していた。胎盤の免疫組織染色で見られた強い染色によっても明らかのように(図19および20)、可溶性エンドグリンの由来は胎盤の合胞体栄養細胞である可能性が最も高い。これらの図は、エンドグリンタンパク質が合胞体栄養細胞により発現され、子癇前症において顕著にアップレギュレーションされていることを示す。本発明者らのウエスタンブロットデータ(図21Aおよび21B)、およびノーザンブロットにより選択的スプライス変異体が検出されなかったことは、可溶性エンドグリンがおそらく膜タンパク質エンドグリンの細胞外ドメインの切断型であるという考えを支持する。大きさは約65kDaであり、子癇前症胎盤において高レベルで産生され、子癇前症血清中で多量に循環する。このタンパク質は正常妊婦の血清中でははるかに低いレベルで存在し、非妊娠女性においてははるかに検出できる程度であった。子癇前症胎盤における可溶性エンドグリン発現は、正常妊娠より4倍高かった(n=1/群、P<0.01)。これらの検体中のsEng/Engの定量は、正常(0.43)および子癇前症(0.56)胎盤で大きな差を示さず(n=10/群、P=0.4)、sEngは完全長タンパク質に由来し、EngおよびsEngはともに子癇前症において同様に増加したことを示唆した。

【0184】

以下の方法を、本実施例に記載した実験の一部に使用した。

【0185】

免疫組織化学

胎盤サンプルにおけるエンドグリンおよび平滑筋アクチン(SMA)の免疫組織染色を、(Leach et al., Lancet 360:1215-1219 (2002))により報告されたように行った。簡潔に言えば、子癇前症無し(n=10)および子癇前症有り(n=10)の患者から得られた凍結胎盤切片スライドを、無血清タンパク質ブロッキング溶液(ダコ(DAKO)社)で30分間室温にて、次い

で一次抗体(マウスモノクローナル抗エンドグリン、1:50希釈、ダコ(DAKO)社)で2時間室温にてインキュベートした。次いでスライドをリン酸緩衝生理食塩水で10分間洗浄した。二次抗体の、ローダミン結合ヒツジ抗マウスIgG、1:200希釈(バイオメダ(Biomed)社)を1時間添加した。切片をリン酸緩衝生理食塩水で再び洗浄し、続いて1:400希釈のFITC結合マウス抗ヒトSMA(ダコ(DAKO)社)で30分間室温にてインキュベートした。エンドグリンの免疫反応性は、SPOTアドバンストイメージングシステム(advanced imaging system)(RT SLIDER、ダイアグノスティックインスツルメンツ(Diagnostic Instruments)社)を使用して、臨床診断を知らされていない病理学者が観察した。

【0186】

ELISAおよびウエスタンブロット

ミネソタ州のオールアンドディシステムズ(R&D systems)社から市販されているELISAキット(例えば、カタログ番号DNDG00)を使用して、以前に記載された(Maynard et al、J. Clin. Invest. 111:649-658、2003)ようにELISAを行った。ウエスタンブロットは、原則的に以前に記載された(Maynard et al、上記、およびKuo et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:4605-4610 (2001))ように行った。

【0187】

免疫沈降(IP)実験

IPに続いてウエスタンブロットを使用して、子癩前症患者の胎盤組織および血清検体中の可溶性エンドグリンの同定および特性評価を行った。ヒト胎盤組織を冷PBSで洗浄し、ホモジナイゼーション緩衝液[10mM Tris-HCl、pH 7.4;15mM NaCl;60mM KCl;1mM EDTA;0.1 mM EGTA;0.5% ノニデット(Nonidet)P-40;5% スクロース;ロシュ(Roche)社(インディアナポリス、インディアナ州)製プロテアーゼミクスチャー]中で10分間溶解した。胎盤溶解物を次いで抗ヒトモノクローナルマウスエンドグリン抗体(mAb P4A4、サンタクルーズバイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、サンタクルーズ、カリフォルニア州)を用いる免疫沈降に供した。イムノピュアIgGオリエンテーション(immunopure IgG orientation)キット(ピアスケミカル社(Pierce Chemical Co.)、ロックフォード、イリノイ州、米国)を製造業者の使用説明書に従って使用して、3~5mgの精製抗体の2mlプロテインAセファロースへの方向性カップリングによってイムノアフィニティーカラムを調製した。次いでカラムをプロテアーゼミクスチャー含有RIPA緩衝液でよく洗浄し、結合したタンパク質を0.1mol/Lグリシン-HCl緩衝液、pH2.8で溶出した。溶出液を、1mol/L Tris-HCl緩衝液を含有する0.5mlの画分に集めた。タンパク質含有画分をプールし、セントリコン(CE NTRICON)遠心濃縮器(ミリポア社(Millipore Corp.)、ベッドフォード、マサチューセッツ州、米国)を用いて9~10倍に濃縮した。免疫沈降したサンプルを4~12%勾配ゲル(インビトロジェン(Invitrogen)社)によって分離し、タンパク質をポリビニリデンジフルオリド(PVDF)メンブレンにトランスファーした。エンドグリンタンパク質を、ポリクローナル抗ヒトウサギエンドグリン一次抗体(H-300、サンタクルーズバイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、サンタクルーズ、カリフォルニア州)を使用してウエスタンブロットにより検出した。

【0188】

可溶性エンドグリンの精製および質量分析による分析

子癩前症患者の血清(10ml)をCMアフィ-ゲルブルー(Affi-gel blue)およびプロテインAセファロース(バイオラッド(Bio-Rad)社)カラムに続けて添加して、アルブミンおよび免疫グロブリンをそれぞれ除去した。フロースルーを、セファロースに結合した、ヒトEngに対するmAb 44G4 IgG(Gougos et al.、Int. Immuno. 4:83-92、(1992))の2.5mlカラムにゆっくりと添加した。結合画分を0.02MジエチルアミンpH11.4によって溶出し、直ちに1M Tris pH7.8で中和した。280nmでの吸光度が高い画分4および5をプールし、10mM DDTで1時間、57 で還元し、0.055Mのヨードアセトアミドでアルキル化した。次いでサンプルをトリプシン(1:100)で完全に消化した。凍結乾燥したサンプルを0.1%トリフルオロ酢酸に再懸濁し、CapLC (ウォーターズ(Waters)社)HPLC装置に注入した。75 μmナノシリーズカラム(Nano Series column)(エルシーパッキング(LC Packings)社)を使用してペプチドを分

10

20

30

40

50

離し、キュースター(Qstar)XL MS/MSシステムを使用して解析した。マスコットサーチエンジン(Mascot search engine)(マトリックスサイエンス(Matrix Science)社)を使用して、ヒトタンパク質データベースNCBI nrを対象にしてデータを検索した。

【0189】

実施例 4

血管新生モデルアッセイ

血管新生のin vitroモデルには内皮管アッセイを使用することができる。増殖因子低減マトリゲル(Growth factor reduced Matrigel)(7mg/ml、コラボレーティブバイオメディカルプロダクツ(Collaborative Biomedical Products)社、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(100 μ l/ウェル)に入れ、37

で25~30分間インキュベートし重合させる。3~5継代のヒト臍帯静脈内皮細胞(無血清の内皮細胞基本培地(クロネティクス(Clonetics)社、ウォーカーズビル、メリーランド州)300 μ l中に30000+)を10%患者血清で処理し、マトリゲルでコートしたウェルにプレATINGし、37

で12~16時間インキュベートする。次いで管形成を、4 \times で倒立位相差顕微鏡(株式会社ニコン(Nikon Corporation)、東京、日本)によって評価し、PCI簡易画像解析(Simple PCI imaging analysis)ソフトウェアを使用して解析する(管腔面積および全長)。

【0190】

実施例 5

女性における子癇前症および子癇の診断指標としての可溶性エンドグリンタンパク質レベル(ロメロ試験)

この試験は、可溶性エンドグリンが臨床子癇前症において変化するか、および女性において子癇前症および子癇を予測するために使用できるか、を評価するために設計された。

【0191】

この試験は、ミシガン州デトロイトのウェイン州立大学/NICHD周産期学部門でロベルトロメロ(Roberto Romero)博士と共同して行われた。Chaiworapongsa et al.(The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine、January 2005、17 (1):3-18)に以前記載されたように保存された生物学的サンプルデータベースを使用して、長期的なレトロスペクティブ症例対照研究を行った。女性は全て、ソテロデルリオ(Sotero del Rio)病院(サンティアゴ、チリ)の出産外来で登録し、分娩までを追跡した。出産前診察は、妊娠第一期

および第二期において4週間間隔、および分娩までの妊娠第三期は2週間毎という予定を組んだ。血漿サンプルは以下の6つの期間のそれぞれについて1回のみ各患者から選択した:(1)妊娠7~16週、(2)16~24週、(3)24~28週、(4)28~32週、(5)32~37週、および(6)>37週。それぞれの子癇前症症例について、子癇前症の臨床診断時における在胎期間を一致させる(\pm 2週)ことにより1つの対照を選択した。子癇前症の診断の臨床基準は、上記のChaiworapongsa et alに以前記載されたものと同じとした。

【0192】

血漿中エンドグリンレベルの測定

-70

で保存された血漿サンプルを融解し、ミネソタ州ミネアポリスのアールアンドデーシステムズ(R&D systems)社から市販されているELISAキット(カタログ番号DNDG00)を使用して血漿中可溶性エンドグリンレベルを1バッチで測定した。

【0193】

統計分析

共分散分析を使用して、血液サンプリングおよびサンプル保存期間による在胎期間の調整後、子癇前症を発症することになる患者および正常妊娠の患者間の血漿中可溶性エンドグリン濃度の差を評価した。割合の比較には二乗検定またはフィッシャーの正確確率検定を採用した。使用した統計パッケージはSPSS V.12(エスピーエスエス社(SPSS Inc.)、シカゴ、イリノイ州)であった。0.05未満のp値を有意と考えた。

【0194】

結果

10

20

30

40

50

研究対象集団の臨床的特徴を表2に記載する。子癩前症群は未経産女性を多く含み、対照群より早く分娩した。重要なことに、胎児の出生時体重は子癩前症群において低く、在胎期間に比して体重が小さい(SGA)幼児を身ごもっている女性の割合が高かった。

【表2】

表2 研究集団の臨床的特徴

	正常妊娠 n = 44	子癩前症 n = 44	p	
年齢(歳)	29 ± 6	26 ± 6	0.04*	10
未経産	11 (25%)	30 (68.2%)	<0.001*	
喫煙	10 (22.7%)	1 (2.3%)	0.007*	
分娩時 GA(週)	39.7 ± 1.1	36.9 ± 2.7	<0.001*	
出生時体重(グラム)	3,372 ± 383	2,710 ± 766	<0.001*	20
出生時体重<第 10 パーセンタイル	0	16 (36.4%)	<0.001*	

値は平均±標準偏差または数値(パーセント)で表す
GA:在胎期間

【0195】

子癩前症患者の臨床的特徴を表3に記載する。32人(72%)の患者が重度の子癩前症であり、10人の患者が<34週の発症と定義される重度の早発型子癩前症であった。

30

【表3】

表3 子癩前症患者の臨床的特徴

血圧(mmHg)				
収縮期			155 ± 15	
拡張期			100 ± 8	
平均動脈圧			118 ± 9	
タンパク尿(ディップスティック)			3 ± 0.8	40
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ ^α (SGOT)(U/L)			29 ± 31	
血小板数 ^β (×10 ³)(μL)			206 ± 59	
重度子癩前症			32 (72.7%)	
子癩前症診断時の GA ≤ 34 週			10 (22.7%)	
子癩前症診断時の GA ≥ 37 週			27 (61.4%)	

値は平均 ± 標準偏差または数値(パーセント)で表す
^α (n = 26); ^β (n = 42)

50

【 0 1 9 6 】

6つの在胎期間帯において測定した対照および子癇前症女性の血清中可溶性エンドグリンレベルを表4に示す。子癇前症の中で、検体を、臨床子癇前症(子癇前症の症状時にサンプルを採取)および前臨床子癇前症(臨床症状の前にサンプルを採取)の2つの群に分類した。データは、妊娠中期(妊娠24~28週)において、血清中可溶性エンドグリン濃度が子癇前症を発症することになる女性において上昇し始め、妊娠28~32週までに対照より少なくとも3倍高くなることを示す。臨床子癇前症女性から採取した血液サンプルは、在胎期間を一致させた対照と比較した場合、非常に劇的な(ほぼ10~15倍)上昇を示す。

【表4】

表4 正常妊娠および子癇前症における血漿中の可溶性エンドグリン濃度

	正常妊娠	p	前臨床サンプル 子癇前症	p	臨床サンプル 子癇前症	p ^β
1回目の血液サンプリング (7.1~16週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.89 ± .928	0.9	3.96 ± 1.28			
在胎期間(週)	12.3 ± 2.2	0.2	11.6 ± 2.4			
分布範囲	8.4 - 15.9		7.7 - 15.1			
	n = 37		n = 34			
2回目の血液サンプリング (16.1~24週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.36 ± 1.11	0.1	3.79 ± 1.37			
在胎期間(週)	19.4 ± 1.7	0.06	20.2 ± 2.1			
分布範囲	16.3 - 23.4		16.7 - 24.0			
	n = 44		n = 36			
3回目の血液サンプリング (24.1~28週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.18 ± .729	0.009*	5.27 ± 4.12			
在胎期間(週)	25.9 ± 1.3	0.2	26.4 ± 1.1			
分布範囲	24.1 - 28.0		24.6 - 28.0			
	n = 38		n = 29			
4回目の血液サンプリング (28.1~32週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.7 ± 1.1	<0.001*	10.2 ± 9.8	0.01*	96.1 ± 25.7	0.05
在胎期間(週)	29.9 ± 1.1	1.0	30.2 ± 1.0	1.0	30.4 ± 1.4	1.0
分布範囲	28.3-32.0		28.7 - 32.0		29.4 - 31.4	
	n = 42		n = 33		n = 2 ^δ	
5回目の血液サンプリング (32.1~36.9週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	5.79 ± 2.42	0.003*	10.51 ± 6.59	<0.001*	43.14 ± 25.6	<0.001*
在胎期間(週)	34.7 ± 1.3	1.0	34.8 ± 1.5	1.0	34.5 ± 1.2	1.0
分布範囲	32.4 - 36.6		32.6 - 36.7		32.6 - 36.6	
	n = 37		n = 20		n = 13	
6回目の血液サンプリング (≥37週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	8.9 ± 4.5		--		15.23 ± 10.61	0.006*
在胎期間(週)	39.4 ± 1.0				38.8 ± 1.1	0.05
分布範囲	37.0 - 40.7				37.6 - 41.4	
	n = 27				n = 27	

p^β:子癇前症および正常妊娠の臨床症状時のサンプル間の比較

値は平均 ± 標準偏差で表す

^δ2人の子癇前症患者は臨床症状時の血液サンプルなし

【 0 1 9 7 】

血漿中可溶性エンドグリン濃度と子癇前症の臨床診断までの期間との関係を調べるため、異なる在胎期間の子癇前症患者の血漿サンプルを、血液サンプリングから臨床診断までの期間に従って5つの群:(1)臨床診断時、(2)臨床症状の2~5.9週前、(3)臨床症状の6~10.9週前、(4)臨床症状の11~15.9週前、および(5)臨床症状の16~25週前、に分類した。表5に示すデータは、血漿中可溶性エンドグリンレベルが子癇前症において症状発現の6~10.9週前に上昇し始め、子癇前症を発症することになる女性において症状の2~5.9週前に少なくとも3倍高くなることを実証する。

【表5】

表5 正常および子癩前症妊婦における血漿中の可溶性エンドグリン濃度

血液サンプリング	正常妊娠	子癩前症	p
臨床症状時			
可溶性エンドグリン(ng/ml)	7.63 ± 4.22	27.72 ± 26.20	<0.001*
在胎期間(週)	37.2 ± 3.0	37.1 ± 2.7	0.9
分布範囲	28.9 - 40.7 n = 42	29.4 - 41.4 n = 42 ^o	
臨床症状の 2~5.9 週前			
可溶性エンドグリン(ng/ml)	4.67 ± 2.32	15.07 ± 10.15	<0.001*
在胎期間(週)	31.6 ± 3.8	32.8 ± 2.8	0.2
分布範囲	24.1 - 36.3 n = 27	27.1 - 36.7 n = 27	
臨床症状前の期間(週)		3.8 ± 1.1	
臨床症状の 6~10.9 週前			
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.61 ± 1.05	5.89 ± 3.07	<0.001*
在胎期間(週)	28.5 ± 2.9	28.5 ± 2.9	0.9
分布範囲	19.7-32.6 n = 37	19.6 - 34.4 n = 37	
臨床症状前の期間(週)		8.3 ± 1.4	
臨床症状の 11~15.9 週前			
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.35 ± 0.77	3.57 ± 0.92	0.5
在胎期間(週)	24.5 ± 3.1	24.2 ± 3.3	0.8
分布範囲	17.6 - 27.9 n = 19	17.7 - 28.0 n = 19	
臨床症状前の期間(週)		13.2 ± 1.3	
臨床症状の 16~25 週前			
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.44 ± 1.07	3.69 ± 1.18	0.3
在胎期間(週)	17.6 ± 3.5	16.5 ± 4.5	0.2
分布範囲	9.1 - 23.4 n = 42	8.0 - 22.7 n = 42	
臨床症状前の期間(週)		20.6 ± 3.6	

値は平均 ± 標準偏差で表す

^o2人の子癩前症患者は臨床症状時の血液サンプルなし

【0198】

子癩前症を発症することになる患者を特定する血漿中可溶性エンドグリン濃度の診断能力を調べるため、患者を早発型子癩前症(PE < 34週)および遅発型子癩前症(PE > 34週)に分類した。早発型子癩前症患者では、平均血漿中可溶性エンドグリンレベルは子癩前症(臨床診断前)において正常妊娠よりも顕著に高く、妊娠16~24週頃から現れ始め(表6)、24~28週および28~32週の妊娠期間帯において非常に大きな差があった。対照的に、遅発型子癩前症患者では、前臨床子癩前症における血漿中可溶性エンドグリン濃度は28~32週になって初めて正常妊娠よりも顕著に高くなり、妊娠32~36週で非常に大きな差があった(表7)。

10

20

30

40

【表 6】

表6 正常妊婦および妊娠34週以下で臨床的子癇前症を発症した患者における血漿中の可溶性エンドグリン濃度

	正常妊娠	p	前臨床サンプル 子癇前症	p	臨床サンプル 子癇前症	p ^β
<u>1 回目の血液サンプリング</u>						
(7.1~16 週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.89 ± .928	0.7	3.81 ± 1.11			
在胎期間(週)	12.3 ± 2.2	0.4	11.6 ± 2.6			
分布範囲	8.4 - 15.9		8.0 - 15.1			
	n = 37		n = 8			
<u>2 回目の血液サンプリング</u>						
(16.1~24 週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.36 ± 1.11	0.02*	4.60 ± 1.72			
在胎期間(週)	19.4 ± 1.7	0.7	19.8 ± 2.9			
分布範囲	16.3 - 23.4		17.3 - 23.9			
	n = 44		n = 7			
<u>3 回目の血液サンプリング</u>						
(24.1~28 週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.189 ± .729	<0.001*	10.22 ± 6.17			
在胎期間(週)	25.9 ± 1.3	0.03*	26.8 ± 0.6			
分布範囲	24.1 - 28.0		26.0 - 27.3			
	n = 38		n = 6			
<u>4 回目の血液サンプリング</u>						
(28.1~32 週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.70 ± 1.10	0.01*	17.66 ± 8.9	0.008*	96.10 ± 25.76	0.05
在胎期間(週)	29.9 ± 1.1	1.0	29.7 ± 1.1	1.0	30.4 ± 1.4	1.0
分布範囲	28.3-32.0		28.7-31.3		29.4 - 31.4	
	n = 42		n = 6		n = 2 ^δ	
<u>5 回目の血液サンプリング</u>						
(32.1~36.9 週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	5.79 ± 2.42				53.38 ± 32.09	0.001*
在胎期間(週)	34.7 ± 1.3				33.5 ± 0.5	<0.001*
分布範囲	32.4 - 36.6				32.6 - 34.0	
	n = 37				n = 6	

10

20

p^β: 子癇前症および正常妊娠の臨床症状時のサンプル間の比較
値は平均±標準偏差で表す

δ: 2人の子癇前症患者は臨床症状時の血液サンプルなし

30

【表 7】

表7 正常妊婦および子癇前症(妊娠34週)における血漿中の可溶性エンドグリン濃度

	正常妊婦	p	前臨床サンプル 子癇前症	p	臨床サンプル 子癇前症	p ^β
1回目の血液サンプリング						
(7.1~16週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.89 ± .928	0.9	4.01 ± 1.35			
在胎期間(週)	12.3 ± 2.2	0.2	11.6 ± 2.4			
分布範囲	8.4 - 15.9		7.7 - 15.1			
	n = 37		n = 26			
2回目の血液サンプリング						
(16.1~24週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.36 ± 1.11	0.4	3.59 ± 1.23			
在胎期間(週)	19.4 ± 1.7	0.04*	20.3 ± 1.9			
分布範囲	16.3 - 23.4		16.7 - 24.0			
	n = 44		n = 29			
3回目の血液サンプリング						
(24.1~28週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.18 ± .729	0.1	3.98 ± 2.13			
在胎期間(週)	25.9 ± 1.3	0.4	26.3 ± 1.1			
分布範囲	24.1 - 28.0		24.6 - 28.0			
	n = 38		n = 23			
4回目の血液サンプリング						
(28.1~32週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.70 ± 1.10	0.001*	8.57 ± 9.45			
在胎期間(週)	29.9 ± 1.1	0.2	30.3 ± 1.0			
分布範囲	28.3-32.0		28.7 - 32.0			
	n = 42		n = 27			
5回目の血液サンプリング						
(32.1~36.9週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	5.79 ± 2.42	<0.001*	10.51 ± 6.59	<0.001*	34.36 ± 16.30	<0.001*
在胎期間(週)	34.7 ± 1.3	1.0	34.8 ± 1.5	0.9	35.4 ± 0.9	0.7
分布範囲	32.4 - 36.6		32.6 - 36.7		34.3 - 36.6	
	n = 37		n = 20		n = 7	
6回目の血液サンプリング						
(≥37週)						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	8.98 ± 45.12		--		15.23 ± 10.61	0.006*
在胎期間(週)	39.4 ± 1.0				38.8 ± 1.1	0.05
分布範囲	37.0 - 40.7				37.6 - 41.4	
	n = 27				n = 27	

p^β:子癇前症および正常妊婦の臨床症状時のサンプル間の比較
値は平均±標準偏差で表す

【 0 1 9 9 】

要約

これらの実験結果は、在胎期間を一致させた対照と比較した場合に臨床子癇前症女性が非常に高い血中可溶性エンドグリンレベルを有することを実証する。また結果は、子癇前症を発症することになる(前臨床子癇前症)女性が、正常妊娠すると予測される女性よりも高い血漿中可溶性エンドグリンレベルを有することも実証する。可溶性エンドグリンレベルの増大は、臨床症状発現の少なくとも6~10週前に検出可能である。結論として、これらの結果は、早発型および遅発型子癇前症がともに高い血中可溶性エンドグリン濃度を有するが、早発型子癇前症における変化の方がより劇的であることを実証する。

【 0 2 0 0 】

実施例 6

女性における子癇前症および子癇の診断指標としての可溶性エンドグリンタンパク質レベル(CPEP試験)

前述のように本発明者らは、血管新生促進タンパク質TGF- の細胞表面受容体であり内皮および合胞体栄養細胞で発現される可溶性エンドグリンが、子癇前症胎盤においてアップレギュレーションされることを発見した。前述の実験において本発明者らは、子癇前症において過剰な可溶性エンドグリンが細胞外ドメインのシェディングによって胎盤から血中に放出されるため、可溶性エンドグリンがその後、胎盤増殖因子(PIGF)およびVEGFに結

合する抗血管新生因子であるsFlt1と相乗作用を示し、内皮機能障害を引き起こし得ることを示した。この仮説を試験するため、本発明者らは、子癇前症を発症した女性における、および妊娠性高血圧(GH)および在胎期間に比して体重が小さい(SGA)幼児を伴う妊娠などの他の妊娠合併症を有する子癇前症女性における妊娠期間中の可溶性エンドグリン、sFlt-1および遊離PIGFの血清中濃度を、正常血圧の対照妊娠女性と比較した。本試験はリチャードレビン(Richard Levine)博士と共同してNIHで行った。

【0201】

本試験の主な目的は2つあった。第1の目的は、子癇前症および妊娠性高血圧(GH)および在胎期間に比して体重が小さい(SGA)幼児を伴う妊娠などの他の妊娠性疾患の発症前に、正常血圧対照と比較して高い可溶性エンドグリン、sFlt1血清濃度および低いPIGFレベルが検出可能であるかを決定することであった。第2の目的は、子癇前症、妊娠性高血圧またはSGAを有する女性における、母体血清中の可溶性エンドグリン、sFlt-1および遊離PIGF濃度の在胎期間に対する経時変化を、臨床症状の発現前後、および正常血圧対照において得られた検体の別個の試験によって示すことであった。

10

【0202】

方法

臨床情報

本研究は、カルシウムによる子癇前症予防試験(CPEP)に参加した4,589人の健康な未経産女性のコホート内にネスト化された妊娠合併症(早発型子癇前症、満期産の子癇前症、妊娠性高血圧、SGA児を伴う妊娠、正常血圧対照妊娠)の症例対照研究であった。各研究群から120例の症例を無作為に選択した。研究方法は、子癇前症について最近行われたコホート内症例対照研究と同一であった(Levine et al, N. Eng. J. Med. 2004, 350:672-83)。各女性から、研究登録前(13~21週)に、26~29週で、36週で、および高血圧またはタンパク尿の疑いのある時点で血液検体を得た。陣痛および分娩開始前の妊娠中に採取した全ての血清検体は、研究の対象となった。症例は、満期産の子癇前症、妊娠性高血圧またはSGAを発症した、および既知の主な構造的または染色体異常のない生産または死産の男児を分娩した、および基準血清検体を採取した、120人の女性を含んでいた。(PE<37週)と定義された早発型子癇前症では、CPEPコホートの72人の患者全てについて研究を行った。子癇前症の診断のための臨床基準は、Levine et al.、(2004)上記に記載されている。妊娠性高血圧の全ての症例について、妊娠性高血圧発症の1日前からその後7日間までの期間内に通常の尿タンパク測定を行う必要があった。SGAは、人種、未経産、および幼児性別に特異的な在胎期間に対する出生体重についてのZhangおよびBowesの表を使用して、<第10および<第5(重度SGA)パーセントイルと定義された。対照は、既知の主な構造的奇形または染色体異常のない生産児または死産児を分娩した、子癇前症または妊娠性高血圧またはSGAを有さない女性から無作為に選択し、1つの対照に1つの症例を、臨床センター、最初の血清検体採取時の在胎期間(±1週)に関して、冷凍保存期間(±1年)に関して、および凍結融解回数に関して一致させた。合計1674例の血清検体を研究した。sFlt-1、VEGF、およびPIGFのレベルにおける在胎期間に関連する差について調整するために、在胎期間に関して一致を行った。冷凍保存中に起こり得る分解による差を最小化するために、冷凍保存期間に関して一致を行った。おそらく疾患の病態生理の差のために子癇前症率がセンター間で著しく異なるという事実について調整するために、臨床センターに関して一致を行った。加えて、センターは、検体の採取、調製、および保存に少し異なる手順を使用した可能性がある。確実に、症例および対照が等しく凍結融解劣化をうけることになるように、融解回数に関する一致も行った。

20

30

40

【0203】

ELISA測定

様々な血管新生マーカーに関するELISAを、Karumanchi研究所で、臨床転帰を知らされていない1人の研究助手が行った。

【0204】

可溶性エンドグリン(DNDG00)、sFlt1(DVR100)、PIGF(DPG00)のための市販のELISAキッ

50

トはアールアンドディーシステムズ(R&D systems)社(ミネアポリス、ミネソタ州)から入手した。

【0205】

統計分析

有意差を決定するための、対数変換後の様々な測定値の比較のためにt検定を使用した。P<0.05を統計的に有意であるとみなした。

【0206】

結果

方法において記載した様々な在胎期間群ウインドウ中の、妊娠中の妊婦の5つの異なる研究グループに関する平均可溶性エンドグリン(図6)、sFlt1(図7)、PlGF(図8)濃度を、図6~8に示す。子癩前症群および妊娠性高血圧群では、臨床症状発現後に採取した検体を示していない。在胎期間を一致させた対照検体と比較して、可溶性エンドグリンおよびsFlt1は増加し、遊離PlGFは減少しており、この変化は早発型子癩前症の9~11週前に発生し、子癩前症発症後にそれぞれ5倍の(46.4対9.8ng/ml、P<.0001)および3倍高い(6356対2316pg/ml、P<.0001)および4倍低い(144対546pg/ml、P<.0001)レベルに達した。満期産の子癩前症では、可溶性エンドグリンは12~14週に発生して増加し、遊離PlGFは9~11週から減少し、sFlt1は子癩前症発症の<5週前に増加した。sFlt1および遊離PlGFの血清濃度は、在胎10~42週のSGAまたは在胎期間に比して体重が平均の/在胎期間に比して体重が大きい(AGA/LGA)幼児を伴う妊娠間で有意に異なっていなかった。血清可溶性エンドグリンは、AGA/LGA妊娠における12.9ng/mlと比較して、SGA妊娠において17~20週から穏やかに増加し(7.2対5.8ng/ml、P=.03)、37~42週で軽度および重度SGAにおいてそれぞれ15.7および43.7ng/mlの濃度に達した(重度SGA対AGA/LGA、P=.002)。妊娠性高血圧研究において、GAを一致させた対照検体と比較して、妊娠性高血圧の<1~5週前に可溶性エンドグリンの穏やかな増加が認められ、妊娠性高血圧発症後に2倍高い可溶性エンドグリンレベル(29.7対12.5ng/ml、P=.002)に達した。他の全ての四分位点と比較した、対照可溶性エンドグリン濃度の最高四分位点(>7.2ng/ml)にある21~32週で得られた検体についてその後の早産PEに関して調整したオッズ比は、9.8(95% CI4.5~21.5)であった。

10

20

【0207】

子癩前症の可溶性エンドグリン抗血管新生指数は、(sFlt1+0.25可溶性エンドグリン)/PlGFと定義された。5つの異なる研究群について、様々な在胎期間群にわたって指数を計算した。臨床症状前に採取されたサンプルの子癩前症抗血管新生についての可溶性エンドグリン抗血管新生指数を、図9に示す。可溶性エンドグリン抗血管新生指数の高い値は、重度の早発型子癩前症において、妊娠17~20週で早くも認められ、妊娠が進むにつれてより劇的になるようであった。満期産の子癩前症、SGAおよびGH(妊娠性高血圧)において、対照女性と比較した場合、妊娠末期中(33~36週)に穏やかな上昇があった。

30

【0208】

図10および11は、臨床早発型子癩前症(PE<37週)前の週数による可溶性エンドグリン平均濃度(図10)および可溶性エンドグリン抗血管新生指数(図11)を表す。早発型子癩前症発症前の9~11週の早期でさえ、子癩前症を発症することになる女性において、可溶性エンドグリンおよび可溶性エンドグリン抗血管新生指数が2~3倍上昇し、臨床症状の1~5週前に劇的に上昇(>5倍)した。

40

【0209】

図12および図13は、症状前後の、満期産の子癩前症(PE>37週間)に関する妊娠中の可溶性エンドグリン(図12)および可溶性エンドグリン抗血管新生指数(図13)の変化を示す。妊娠33~36週に始まって、臨床子癩前症の時点で平均して2倍高いレベルに達する可溶性エンドグリンおよび可溶性エンドグリン抗血管新生指数の上昇が認められる。

【0210】

図14および図15は、正常血圧の対照と比較した場合の、妊娠性高血圧中および妊娠性高血圧の1~5週前(妊娠33~36週の間)の女性において検出される可溶性エンドグリン(図14)および可溶性エンドグリン抗血管新生指数(図15)の穏やかな上昇を示す。

50

【0211】

図16および図17は、対照妊娠と比較した場合の、SGAを有する全ての女性ではなく、重度のSGAを有する女性において33～36週妊娠時期中に検出される可溶性エンドグリン(図16)および可溶性エンドグリン抗血管新生指数(図17)の穏やかな上昇を示す。

【0212】

要約

本研究の結果は、妊娠33週前に測定された場合、可溶性エンドグリンレベルおよび可溶性エンドグリン抗血管新生指数レベルが、正常な対照妊娠と比較した場合、早発型子癇前症を発症することになる女性において、および臨床早発型子癇前症(PE<37週)の女性において、劇的に上昇したことを示す。したがって、可溶性エンドグリンレベルおよび可溶性

10

【0213】

可溶性エンドグリンレベルおよび可溶性エンドグリン抗血管新生指数レベルはまた、妊娠後期(妊娠33～36週の時期)に測定された場合、満期産の子癇前症(PE>37週)において顕著に上昇し、妊娠性高血圧および重度SGAにおいて穏やかに上昇した。したがって、可溶性エンドグリンレベルおよび可溶性エンドグリン抗血管新生指数レベルはまた、妊娠33週

20

【0214】

実施例7子癇前症の病因における可溶性エンドグリンの関与

本発明者らは、血管新生促進タンパク質TGF- β の細胞表面受容体であり、内皮および細胞体栄養細胞で発現されるエンドグリンが、子癇前症胎盤においてアップレギュレーションされていることを示した。本発明者らはまた、子癇前症において、過剰な可溶性エンドグリンが、細胞外ドメインのシェディングによって胎盤から血流中へ放出されることも示した。下記の実験は、可溶性エンドグリンが、胎盤増殖因子(PlGF)およびVEGFに結合する抗血管新生因子sFlt1と相乗作用を示し、内皮機能障害を引き起こし得るという仮説を試

30

【0215】

材料および方法試薬

組換えヒトエンドグリン、ヒトsFlt1、マウスエンドグリン、マウスsFlt1、ヒトTGF- β 1、ヒトTGF- β 3、マウスVEGFは、アールアンドディーシステムズ(R&D systems)社(ミネアポリス、ミネソタ州)から入手した。ヒトエンドグリンN末端領域に対するマウスモノクローナル抗体(カタログ番号sc20072)およびポリクローナル抗体(sc20632)は、サンタクルーズバイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)から入手した。ヒトsFlt1、マウスsFlt1、およびヒト可溶性エンドグリンのためのELISAキットは、アールアンドディー

40

【0216】

アデノウイルスの作製

sFlt1に対するアデノウイルスおよび対照アデノウイルス(CMV)は以前に記載されており(Maynard et al., J. Clin. Invest. 111:649:658 (2003))、リチャードマリガン(Richard Mulligan)博士と共同してハーバードメディカルコア機関(Harvard Medical Core facility)で作製された。可溶性エンドグリンアデノウイルスを作製するために、本発明者らは、アディージー(Adeasy)キット(ストラタジーン(Stratagene)社)を使用した。簡潔に言えば、ヒト可溶性エンドグリン(エンドグリンタンパク質の全細胞外領域をコードする)を、鋳型としてヒトcDNA完全長エンドグリンクローン(インビトロジェン(Invitrogen)社、カ

50

リフォルニア州)およびプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを使用してPCR増幅した:フォワード5'-ACG AAG CTT GAA ACA GTC CAT TGT GAC CTT-3'(配列番号3)およびリバース5' TTA GAT ATC TGG CCT TTG CTT GTG CAA CC-3'(配列番号4)。増幅したPCR断片をまずpSecTag2-B(インビトロジェン(Invitrogen)社、カリフォルニア州)へサブクローニングし、DNA配列を確認した。Hisタグ付きヒト可溶性エンドグリンをコードする哺乳動物発現構築物を、鋳型としてpSecTag2B-可溶性エンドグリンを使用してPCR増幅し、アデノウイルス作製のために、アデノウイルス導入ベクター-pShuttle-CMVベクター(ストラタジーン(Stratagene)社;Kpn1およびSca1部位)にサブクローニングした。次いで可溶性エンドグリン(sE)発現アデノウイルスを、製造業者の使用説明書通りに標準プロトコールを使用して作製し、ウエスタンブロッティングによって発現を確認した。次いで確認されたクローンを293個の細胞で増幅し、以前に記載された(Kuo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:4605-4610 (2001))CsCl2密度勾配により精製した。最終産物を、吸光度法により力価測定した(Sweeney et al., Virology, 2002, 295:284-288)。力価は、標準ブランク希釈に基づく力価アッセイキット(BDバイオサイエンスクロンテック(BD Biosciences Clontech)社、パロアルト、カリフォルニア州、カタログ番号K1653-1)および吸光度法を使用して力価測定した以前のウイルス調製から導かれる式に基づくブランク形成単位(pfu)/mLとして表す。

10

【0217】

ウエスタンブロット

他(Maynard et al、上記)で記載しているように、ラット血漿においてアデノウイルス感染導入遺伝子の発現を確かめるためにウエスタンブロットを使用した。

20

【0218】

免疫沈降(IP)実験

IPとそれに続くウエスタンブロットを使用して、子癩前症患者由来の胎盤組織および血清検体における可溶性エンドグリンの同定および特徴付けを行った。ヒト胎盤組織を冷PBSで洗浄し、ホモジナイゼーション緩衝液[10mM Tris-HCl、pH7.4;15mM NaCl;60mM KCl;1mM EDTA;0.1mM EGTA;0.5% ノニデットP-40;5% スクロース; ロシュ(Roche)社(インディアナポリス、インディアナ州)製プロテアーゼミクスチャー]中で10分間溶解した。胎盤溶解物を、次いで、抗ヒトモノクローナルマウスエンドグリン抗体(サンタクルーズバイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、サンタクルーズ、カリフォルニア州)を用いる免疫沈降に供した。イムノピュアIgGオリエンテーションキット(immunopure IgG orientation kit)(ピアスケミカル社(Pierce Chemical Co.)、ロックフォード、イリノイ州、米国)を製造業者の使用説明書に従って使用して、3~5mgの精製抗体の2mlプロテインAセファロースへの方向性カップリングによってイムノアフィニティーカラムを調製した。次いでカラムをプロテアーゼミクスチャー含有RIPA緩衝液でよく洗浄し、結合したタンパク質を0.1mol/Lグリシン-HCl緩衝液、pH2.8で溶出した。溶出液を、1mol/LのTris-HCl緩衝液を含有する0.5mlの画分に集めた。タンパク質含有画分をプールし、セントリコン(CENTRICON)遠心濃縮器(ミリポア社(Millipore Corp.)、ベッドフォード、マサチューセッツ州、米国)を用いて9~10倍に濃縮した。免疫沈降したサンプルを4~12%勾配ゲル(インビトロジェン(Invitrogen)社)によって分離し、タンパク質をポリビニリデンジフルオリド(PVDF)メンブレンにトランスファーした。エンドグリンタンパク質は、ヒトエンドグリンに対するウサギポリクローナル抗体(サンタクルーズバイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、サンタクルーズ、カリフォルニア州)を使用してウエスタンブロットにより検出した。

30

40

【0219】

内皮管アッセイ

増殖因子低減マトリゲル(7mg/mL、コラボレーティブバイオメディカルプロダクツ(Collaborative Biomedical Products)社、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(100μl/ウェル)に入れ、37℃で30分間インキュベートして重合させた。HUVEC細胞(無血清の内皮細胞基本培地(クロネティクス(Clonetics)

50

社、ウォーカーズビル、メリーランド州)300 μ l中に30,000+)を、組換えタンパク質の様々な組合せ(可溶性エンドグリン、sFlt1、または両方)で処理し、マトリゲルでコートしたウェルにプレーティングし、37 $^{\circ}$ Cで12~16時間インキュベートした。次いで管形成を、4 \times で倒立位相差顕微鏡(株式会社ニコン(Nikon Corporation)、東京、日本)によって評価し、PCI簡易画像解析(Simple PCI imaging analysis)ソフトウェアを使用して定量的に解析した(管腔面積および全長)。

【0220】

微小血管透過性実験

Balb-Cマウスに、GFPまたは可溶性エンドグリンまたはsFlt1または組合せを発現するアデノウイルス 1×10^8 pfuを後眼窩静脈叢から注射し、微小血管透過性アッセイを、48時間後に行った。アベルチン(Avertin)0.5mlのIP注射によりマウスに麻酔をかけた。100mlの1%エバンスブルー色素(PBS中)を尾静脈へ注射した。40分後、マウスに2mMのEDTAを含有するPBSを20分間、心臓穿刺によって灌流した。器官(脳、肺、肝臓、腎臓)を摘出し、エバンスブルー色素を溶出するためにホルムアミド中で3日間インキュベートした。ホルムアミド溶液のODを、620nm波長を使用して測定した。

【0221】

腎臓微小血管反応性実験

微小血管反応性実験は、ラット腎臓微小血管(内径70~170 μ m)を使用して以前に記載された(Maynard et al., 上記)ように行った。全ての実験群において、40mmHgの拡張圧力における基準直径の40~60%までのU46619(トロンボキサランゴニスト)による微小血管の前収縮の後、腎臓微小血管の弛緩反応を試験した。一度静止緊張状態に達した後、TGF- β 1またはTGF- β 3またはVEGFなどの様々な試薬に対する反応を、統一した順番で試験した。全ての薬物は管腔外に適用した。

【0222】

動物モデル

妊娠および非妊娠スプラグドローリー(Sprague-Dawley)ラットの両方に、尾静脈注射によって 2×10^9 pfuのアデノウイルス(Ad CMVまたはAd sFlt1またはAd sEまたはAd sFlt1+Ad sE)を注射した。妊娠8~9日目(妊娠第二期初期)で妊娠ラットに注射し、妊娠16~17日(妊娠第三期初期)に血圧を測定した。ペントバルビタールナトリウム(60mg/kg、腹腔内)による麻酔後、ラットの血圧を測定した。頸動脈を単離し、圧力変換器(ミラーインスツルメンツ(Millar Instruments)社、ヒューストン、テキサス州)に接続した3-Fr高精度マイクロチップカテーテルをカニューレ挿入した。血圧を記録し、10分間について平均した。次いで血液、組織および尿サンプルを、安楽死前に採取した。血漿レベルを血圧測定日(アデノウイルス注射後8日目)に測定し、アデノウイルス注射から7~10日後がこれらのタンパク質発現のピークレベルに対応することを認めた。血中sFlt-1および可溶性エンドグリンレベルを、まず、ウエスタンブロットティングにより確認し、次いで、市販のマウスELISAキット(アールアンドディーシステムズ(R&D systems)社、ミネアポリス、ミネソタ州)を使用して定量化した。尿アルブミンを、標準ディップスティックにより測定し、また市販のラットアルブミンELISAキット(ネフラット(Nephurat)キット、エクソセル社(Exocell Inc)、フィラデルフィア、ペンシルベニア州)を使用する競合酵素免疫測定法により定量化した。尿クレアチニンを、ピクリン酸比色分析キット(メトラクレアチニンアッセイ(Metra creatinine assay)キット、クイデル社(Quidel Corp)、サンディエゴ、カリフォルニア州)により測定した。ASTおよびLDHは、市販のキット(サーモエレクトロン(Thermo Electron)社、ルイビル、コロラド州)を使用して測定した。ラット血液の血小板数は、自動血球計数器(ヘマベット(Hemavet)850、ドリュウサイエンティフィック社(Drew Scientific Inc)、オックスフォード、コネティカット州)を使用して測定した。ライト(Wright)染色による血液の末梢血液塗沫を、循環血液における分裂赤血球を検出するために行った。血圧測定および検体採取後、ラットを屠殺し、組織学的検査のために器官を摘出した。同腹子をカウントし、個々の胎盤および胎児の重さを計った。摘出した腎臓を、ボーイン溶液(Bouin's solution)中に入れ、パラフィン包埋し、切片にして、H&E、PASまたはマッソン(M

10

20

30

40

50

asson)三重染色で染色した。

【0223】

統計比較

結果を平均 ± 標準誤差 (SEM) として示し、ANOVAを使用する分散分析により複数群間の比較を行った。有意差は $p < 0.05$ の場合に報告する。

【0224】

結果

可溶性エンドグリンは抗血管新生分子であり、血管機能障害を引き起こす

本発明者らは、可溶性エンドグリンの機能を理解するために *in vitro* 血管新生モデルを使用した。可溶性エンドグリンは内皮管形成を穏やかに阻害し、これはsFlt1の存在によりさらに強化される(図22および図31)。子癩前症において、浮腫およびアルブミンと結合したエバンスブルー (Evan's blue) の細胞外への漏出増加からも明らかのように、内皮機能障害に加えて微小血管透過性も増強されることが報告されている。可溶性エンドグリンが微小血管漏出を引き起こすかどうかを調べるため、本発明者らは可溶性エンドグリンおよびsFlt1アデノウイルスで48時間処理したマウスを使用した。エバンスブルーアッセイを使用して実証されたように、可溶性エンドグリンおよびsFlt1の組合せは、肺、肝臓および腎臓におけるアルブミン漏出の劇的な増加および脳における穏やかな漏出を引き起こした(図23)。単独の可溶性エンドグリンは肝臓における穏やかな漏出を引き起こした。重要なことには、可溶性エンドグリンおよびsFlt1の組合せは肝臓において相加的な作用を示し、これらの可溶性受容体が、内皮の完全性を崩壊させるため、および顕著な血管損傷および漏出を引き起こすために、協力して作用する可能性があることを示した。これらのデータは、可溶性エンドグリンおよびsFlt1の組合せが強力な抗血管新生分子であること、および顕著な血管漏出を引き起こし得ることを示唆する。

【0225】

可溶性エンドグリンの血行動態作用を評価するために、ラット腎臓微小血管における一連の微小血管反応性実験を行った。本発明者らはまず、エンドグリンの2つの既知のリガンドであるTGF- β 1およびTGF- β 3の作用を研究した。TGF- β 1およびTGF- β 3はともに、血管径の用量依存的な増大を引き起こした。TGF- β 1および β 3はともに動脈径の用量依存的な増大を引き起こしたが、エンドグリンのリガンドではないTGF- β 2は何ら顕著な血管拡張を引き起こさなかった(0.1および1 μ g/mlで <2%)。重要なことには、過剰な可溶性エンドグリンの存在下において、2つのTGF- β の作用は顕著に抑制された(図24)。血管緊張に対するTGF- β 1およびTGF- β 3アイソフォームのこの急激な作用は、腸管膜血管においても見られた(図32)。最後に、VEGFおよびTGF- β 1の組合せは、過剰な可溶性エンドグリンおよびsFlt1により阻害される血管拡張を引き起こした(図25)。このことは、sFlt1および可溶性エンドグリンが、VEGFおよびTGF- β 1などの血管新生増殖因子により誘導される生理学的血管拡張を妨害し、高血圧を引き起こし得ることを示唆する。

【0226】

可溶性エンドグリンおよびsFlt1の *in vivo* 作用

可溶性エンドグリンおよびsFlt1の血管作用を評価するために、本発明者らは、妊娠ラットにおけるアデノウイルス発現系を用いた。対照遺伝子(CMV)または可溶性エンドグリンまたはsFlt1またはsFlt1+可溶性エンドグリンをコードするアデノウイルスを、妊娠8日目にスプラグドローラットに尾静脈から注射した。17日目に、子癩前症表現型について動物を試験した。表8は、血行動態および生化学データを含む。

【表 8】

表8 アデノウイルスで処理したラット動物モデルの血行動態および生化学データ

群	N	MAP mm Hg	尿中 Alb/creat μg/mg	血小板数 × 1000/μl	LDH U/L	AST U/L	胎児体重(g)
対 照 (CMV)	6	83 ± 5	186 ± 94	1,098 ± 75	156 ± 32	54 ± 4	2.1 ± 0.5
sFlt1	6	117 ± 7*	2,295 ± 867*	1,131 ± 91	172 ± 53	94 ± 4*	1.75 ± 0.4
sEng	6	104 ± 6*	432 ± 249	1,195 ± 78	188 ± 46	110 ± 13*	1.6 ± 0.4
sFlt1 + sEng	6	121 ± 9*	9,029 ± 4043*	615 ± 67*	1,952 ± 784*	210 ± 92*	0.75 ± 0.3*

10

データは平均±標準誤差(SEM)で表す。MAPは平均動脈圧(拡張期血圧+1/3脈圧);胎児体重は各群で一緒に生まれた胎児の平均体重グラムである;Alb/Creatはアルブミン/クレアチニン比;LDHは乳酸脱水素酵素;ASTはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ。

*対照群と比較した場合P<0.05。

ラット血漿におけるsFlt1およびsEngの発現をまずウェスタンブロットにより確認し(図36)、市販のELISAキットを使用して血中濃度を定量した。

対照、sEng、sFlt1およびsFlt1+sEng群のsFlt1平均血漿濃度はそれぞれ、0.64ng/ml、0.66ng/ml、249ng/mlおよび204ng/mlであった。これら4群のsEng濃度はそれぞれ、0.39ng/ml、129ng/ml、0.37ng/mlおよび123ng/mlであった。

20

【0227】

単独の可溶性エンドグリンは、軽度の高血圧を引き起こした。sFlt1は、以前に報告されているように、高血圧およびタンパク尿の両方を引き起こした。sFlt1+ sEng群に生まれた子供において、胎盤血管の虚血および損傷におそらく関係する胎児発育遅延が認められた。重要なことには、sFlt1および可溶性エンドグリンの組合せは、重度高血圧、ネフローゼ域タンパク尿、胎児発育遅延、およびHELLP症候群発症の生化学的知見(LDH上昇、AST上昇および血小板数減少)を引き起こした(表8)。可溶性エンドグリン+sFlt1群における溶血の知見を、分裂赤血球および網状赤血球増加を明らかにした末梢血液塗沫により確認した(図26A~B)。最後に、腎臓の組織学的検査によって、可溶性エンドグリン群における限局性内皮症、および可溶性エンドグリン+ sFlt1群における重度の糸球体内皮症も明らかになった(図27A~27D、および33)。図33において、対照群は正常範囲内であることに注意されたい。有窓内皮(fenestrated endothelium)を有する開いた毛細血管ループに注意されたい。可溶性エンドグリンのパネルは、窓(fenestrae)の欠損および管腔の部分閉塞を伴う内皮細胞の腫脹を示す。管腔障害による赤血球の圧縮(squeezing)に注意されたい。可溶性エンドグリン処理されたラットの腎臓の光学顕微鏡検査は顕著な内皮症を思わせるものではなかったが、電子顕微鏡検査により限局性内皮症が明らかになった。重要なことには、可溶性エンドグリンおよびsFlt1の両方を与えた動物は重度の糸球体内皮症を有した。併用療法群(下のパネル)は、腫脹した内皮細胞を伴う大規模な管内閉塞を示す。重度のタンパク尿にも関わらず、有足細胞足突起(矢印)が比較的保存されていることに注意されたい。母体-胎児境界の梗塞を含む胎盤の広範な血管損傷は、sFlt1+ sEng群において観察されたが、対照ラットにおいて、またはどちらかの作用物質単独で処理したラットにおいては観察されなかった(図34A~H)。巨細胞層(ヒトの浸潤性栄養膜細胞に相当)のびまん性炎症が、sFlt1およびsEng群において認められ、併用群においてより強かった。肝組織構造はsFlt1+ sEng群において、HELLP症候群患者において見られるのと同様の、虚血の兆候および壊死部を明らかにした(図34A~H)。重度の母体血管損傷の兆候は、sFlt1+sEngを非妊娠ラットに注射した場合にも見られ、妊娠ラットにおいて認められた表現型は母体血管に対する直接的な作用によるものであり、胎盤を必要としなかったことを示唆した。

30

40

【0228】

要約

50

これらの結果は、可溶性エンドグリンが子癇前症胎盤においてアップレギュレーションされ、子癇前症患者において極めて高いレベルで存在することを実証している。最高レベルの可溶性エンドグリンは、子癇前症の最も重篤な形態の1つであるHELLP症候群の患者において存在した。これらの結果はまた、可溶性エンドグリンレベルが、妊娠患者においてsFlt1上昇と相関し、血中sFlt1レベルが高い患者においてより高かったことも実証している。加えて、結果は、可溶性エンドグリンが抗血管新生分子であり、血管新生アッセイ、微小血管透過性アッセイ、および微小血管反応性実験などの複数の内皮アッセイにおいて内皮機能を障害することを示している。重要なことには、可溶性エンドグリンは、これらの *in vitro* 内皮アッセイにおいてsFlt1の毒性結果を増幅することができる。さらに、*in vivo* アッセイにおいて、可溶性エンドグリンのアデノウイルス発現は、顕著なタンパク尿がない、軽度高血圧を引き起こす。しかしながら、sFlt1の存在下で可溶性エンドグリンは、重度高血圧、タンパク尿、糸球体内皮症、HELLP症候群の発症および胎児発育遅延の存在により明らかなるように、顕著な血管損傷を引き起こす。

【0229】

可溶性エンドグリンの放出機構は、おそらくエンドグリン分子の細胞外領域のタンパク質分解的切断である。子癇前症組織においてアップレギュレーションされる特定のプロテアーゼは、候補分子となり得る。1つの例は、エンドグリンとの類似性を有する分子であるグリカンを切断することが示されている膜型マトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MT1-MMP)であるだろう(Velasco-Loyden G et al., J. Biol. Chem. 279:7721-33 (2004))。したがって、そのようなプロテアーゼの阻害剤は、子癇前症治療のための有益な標的として役立つことができる。

【0230】

実施例 8

可溶性エンドグリンはTGF- β 1およびTGF- β 3に仲介されるNOS依存的血管拡張を抑制する

eNOSは、流体せん断応力および神経体液性刺激により活性化され得る、Ca²⁺/カルモジュリンに調節される一酸化窒素(NO)合成酵素である。内皮由来NOは、全身血圧の調節、血管透過性、および血管新生に寄与する非常に強力な血管弛緩薬である。実は、血管新生および血管緊張に対するVEGFの作用は、eNOS/Hsp90会合の増加およびAkt依存的なeNOSのSer1177のリン酸化を経たeNOSの活性化により一部仲介される。子癇前症患者血清中の胎盤由来sFlt1の増加が血管新生を抑制し、高血圧を引き起こすという本発明者らの最近の実証は、実はVEGF依存的eNOS活性化(Maynard et al., 上記)の障害を反映している可能性がある。つい最近、eNOS Thr495の脱リン酸化がSer1177のリン酸化より先に起こり、これらの協調的な事象が内皮細胞中のeNOS活性を決定することが示された(Fleming et al., Cir. Res. 88:E68-75 (2001))。eNOS活性化を介した血管反応性低下に対するVEGFの既知の作用およびエンドグリンがeNOS依存的血管運動活性を調節する(Toporsian et al., Circ. Res. 96:684-692 (2005))という最近の実証を考慮して、本発明者らは、摘出ラット腎臓微小血管におけるTGF- β 1アイソフォームおよび可溶性エンドグリンの血行力学的作用を評価した。実施例7において、および図24および25において記載したように、TGF- β 1およびTGF- β 3はともに、可溶性エンドグリンによって顕著に抑制される動脈径の用量依存的増加を引き起こした。TGF- β 1およびTGF- β 3アイソフォームの血管緊張に対するこの急激な作用はこれまで認められておらず、腸管膜血管においても見られた(図32)。VEGFおよびTGF- β 1は血管拡張に対して相加的な作用を有し、これは子癇前症患者において記載した濃度のsEng+sFlt1によって阻害された(図25および35A)。L-NAMEはTGF- β 1およびVEGFに仲介される血管拡張を阻害し、NOS依存的反応を示した(図35A)。これらのデータは、血中sFlt1およびsEngが、これらの血管新生増殖因子により誘発される生理学的NO依存的血管拡張を妨害し得、子癇前症に見られる高血圧の発症に寄与していることを示唆している。

【0231】

実施例 9

可溶性エンドグリンは内皮細胞においてTGF- β 1結合およびシグナル伝達を阻害する

エンドグリンがTGF- β 1およびTGF- β 3アイソフォームの共受容体であることを前提に、本

発明者らは、可溶性エンドグリンが細胞表面受容体結合を妨げることによって作用するという仮説を立てた。放射線標識したTGF- β 1を組換え可溶性エンドグリンとプレインキュベートすると、50および100pMとともにII型TGF- β 受容体(T β RII)への結合が顕著に減少した(図35B)。したがって内皮細胞において、可溶性エンドグリンはTGF- β 1の受容体への結合に競合する。このことがシグナル伝達障害をもたらすかどうかを試験するため、CAGA-Lucレポーター構築物の活性をヒト内皮細胞において評価した。TGF- β 1はSmad2/3依存性CAGA-Lucレポーターの活性化を誘導し、この反応は可溶性エンドグリン処理によって消失した(図35C)。

【0232】

実施例10

可溶性エンドグリンはTGF- β 1に仲介されるeNOS活性化を阻害する

TGF- β 1が腎臓および腸管膜抵抗血管の両方においてNOS依存的血管弛緩を引き起こすという本発明者らの発見を前提に、本発明者らはeNOS活性化に対するTGF- β 1の即効作用を調べた。TGF- β 1はeNOSのSer1177リン酸化に影響しなかったが、顕著なThr495の脱リン酸化を引き起こし(図35D)、TGF- β がeNOS活性化における重要な残基のリン酸化状態を調節することを示唆した。この作用は可溶性エンドグリンにより顕著に抑制された(図35D)。

【0233】

まとめると、実施例8~10の結果は、可溶性エンドグリンが内皮細胞においてTGF- β 受容体結合および下流のシグナル伝達を妨げ、eNOS活性化を抑制することを実証している。可溶性エンドグリンおよびsFlt1は協力して働いて、内皮依存的NO活性化、ならびにVEGFおよびTGF- β シグナル伝達経路の両方による血管運動作用を阻害している可能性がある。

【0234】

実施例11

血管新生因子の連続変化により子癇前症または子癇の危険性がある女性を特定することができる

前述の実施例において、本発明者らは、sFlt1および可溶性エンドグリン(sEng)がともに子癇前症の病因に密接に関係していることを示した。下記の実施例において、本発明者らは、妊娠中に予測的に追跡し、妊娠第一期および第二期間のこれらのマーカーの連続変化が子癇前症の発症と関連するかどうかを確認するために妊娠結果を詳細に特徴付けした女性から、妊娠第一期および第二期に採取されたものを対にした血清検体においてsFlt1およびsEngの濃度を測定した。

【0235】

材料および方法

研究対象集団

本発明者らは、方法が以前に記載されている(Thadhani et al., Obstet. Gynecol. 97:515-20 (2001)およびWolf et al., Obstet. Gynecol. 98:757-62 (2001))マサチューセッツ総合病院産婦人科研究(MOMS, Massachusetts General Hospital Obstetrical Maternal Study)に登録した女性について、プロスペクティブな、コホート内症例対照研究を行った。簡潔に言えば、MOMSコホートは、妊娠後期に起こる有害転帰の妊娠初期における危険因子のプロスペクティブ研究のために1998年に確立された。マサチューセッツ総合病院および提携している健康センターで胎児管理を受けた女性が被験体としてコホートに含まれた。本研究のために、2001年6月1日から2003年5月1日の間に単胎妊娠を有し、妊娠12週でまたはそれ以前にMOMSコホートに登録し、20週以降に分娩した、連続した(consecutive)女性が被験体として含まれた。症例(n=39)を、妊娠第一期および第二期に血液採取し、その後子癇前症を発症した人と定義し、対照(n=147)は、満期(>37週)で分娩し、妊娠中を通して正常血圧、正常血糖のまま、およびタンパク尿の知見がないままであった、連続した同時期の同コホート登録女性であった。症例と対照は、曝露による交絡(confounding)の可能性を考慮して年齢(\pm 2歳)および体格指数(\pm 1kg/m²)により一致させた(Thadhani et al., Obstet. Gynecol. 94:543-50 (1999))。全ての被験体は書面によるインフォームドコンセントを提供し、この研究はマサチューセッツ総合病院の施設内審査委員会に承

10

20

30

40

50

認された。

【0236】

一次曝露

全ての女性において、最初の出産前診時(11~13週)および再度妊娠第二期(17~20週)に、血液サンプルを採取した。採取後、サンプルを後の分析のために-80℃で保存した。一次曝露は、市販のELISAキット(アールアンドディーシステムズ(R&D systems)社、ミネアポリス、ミネソタ州)を使用して測定される血清sFlt1およびsEngであった(Maynard et al., 上記、およびVenkatesha et al., Nat Med. 12:642-9 (2006))。sFlt1およびsEng変動のアッセイ内精度係数は、それぞれ3.5および3.2%であった。sFlt1およびエンドグリン変動のアッセイ間精度係数は、それぞれ8.1および9.5%であった。全てのサンプルについて2連で試験を行い、2連間で10%を超える変動があった場合、アッセイを繰り返し、平均を報告した。全てのアッセイは、症例状態を知らされていない者が行った。サンプルは分析のために無作為に順序付けた。

10

【0237】

共変量および交絡因子 (confounder)

マサチューセッツ総合病院で使用されているカルテである電子カルテ(EMR、electronic medical record)は、産後早期までの妊娠事象をプロスペクティブに詳述する臨床および人口統計学的データを提供する。ベースライン(最初の出産前診)で、およびその後の全ての出産前診で集められたEMRから得られた具体的情報は、年齢、人種、身長、体重、喫煙状態、最終月経期から推定し、超音波、血圧および尿検査結果により確認した在胎期間、ならびに胎児の推定在胎期間を含んでいた。ブドウ糖負荷試験および他の定期的に測定される臨床検査値の結果、ならびに出生時体重、分娩経路、および子癇前症診断などの分娩の特徴を含めて、全ての妊娠結果情報もEMRに入れた。

20

【0238】

一次結果

出産前のフローシートおよび検査室測定値を含むカルテの詳細な調査によって、全ての妊娠結果を確認した。各出産前診時に、標準的な血圧計を使用して右腕から、3~5分安静後の座位の女性の血圧を求めた。各患者について、右上腕周囲長に基づいて適切なカフのサイズを選択した。第1相(収縮期)および第5相(拡張期)のコロトコフ音のタイミングと一致した血圧の測定値を記録した。本研究の全ての被験体は、以前からの高血圧または糖尿病の病歴を有さず、胎児管理および妊娠をMOMSネットワーク内で開始および完了し、生産児を分娩し、分娩6週後に高血圧の知見を有さなかった。

30

【0239】

子癇前症は、ディップスティック検査2+以上または尿路感染症がない場合の少なくとも300mg/24hのどちらかのタンパク尿と合併した、妊娠20週以降の少なくとも140mmHgの収縮期血圧の上昇または少なくとも90mmHgの拡張期血圧と定義された(ACOG Committee on Practice Bulletins--Obstetrics. ACOG practice bulletin. diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. Obstet Gynecol. 99:159-67)。子癇前症は、満期産の子癇前症(≥37週)および早産の子癇前症(<37週)として分析した。

40

【0240】

統計分析

人口統計学および臨床的特徴を、必要に応じて二乗検定またはスチューデント(Student)のt検定を使用して比較した。傾斜分布を考慮して、一次曝露について対数変換が必要であった(Levine et al., (2004)、上記、Levine et al., N. Engl. J. Med. 355:992-1005 (2006))。一次曝露は、対照の自然分布に基づいて、連続型変数として、および切点および三分位解析により調べ、臨床的解釈のために単純化した。ロジスティック回帰技術を使用して重回帰分析を行った。全てのP値は両側であり、P値<0.05を統計的に有意とみなした。

【0241】

50

CPEP試験における血管新生マーカーの二次分析

本発明者らはまた、最近発表された前述のCPEPコホート内ネスト化(nested)症例対照研究から、妊娠初期の血管新生因子変化の二次分析も行った。本発明者らは、正常血圧女性、37週より前に子癇前症を発症した女性、および37週以降に子癇前症を発症した女性由来のサンプルを、10~12週、13~16週、および17~20週の3つの異なる期間において分析した。

【0242】

結果

人口統計学および臨床的特徴

MOMS研究対象集団のベースラインおよび分娩の特徴を表9に示す。2つの群間で、年齢および体格指数の顕著な差はなかった。後に子癇前症を発症した女性は、最初の出産前診時に高い収縮期および拡張期血圧を有した。子癇前症発現時に、収縮期および拡張期血圧は予想通り子癇前症群において高かった。

【表9】

表9 人口統計学的特性

変数	正常(n=147)	子癇前症(n=39)	P値
年齢(歳)	31.4 ± 5.4	32.8 ± 5.4	0.06
BMI(kg/m ²)	28.5 ± 6.3	29.8 ± 9.1	0.40
喫煙者(未喫煙%)	47%	60%	0.21
出産回数	0.7 ± 0.9	0.8 ± 1.0	0.47
ベースライン特性			
DBP(mmHg)	70 ± 7	75 ± 8	<0.01
SBP(mmHg)	113 ± 7	120 ± 13	<0.01
UTP(mg/dl)	NA	614 ± 547	
分娩時の在胎期間	39.3 ± 1.9	37.2 ± 2.3	<0.001
出生時体重	3444 ± 532	3300 ± 809	0.35
診察時の特性			
最大DBP(mmHg)	78 ± 5	93 ± 7	<0.01
最大SBP(mmHg)	122 ± 7	147 ± 10	<0.01
最大SPOT(g/g)	0.6 ± 0.3	1.4 ± 0.9	<0.01

BMI=体格指数;DBP=拡張期血圧;SBP=収縮期血圧

UTP=尿中の全タンパク質mg/L;SPOT=尿中タンパク質/クレアチニン比
値は平均±標準偏差。

【0243】

正常および子癇前症妊娠における妊娠第一期および第二期のsFlt1およびsEngのレベル
sFlt1の平均血清レベルは、妊娠第一期に、正常妊娠女性と比較して子癇前症女性において高く、それぞれ3.49 ± 0.35ng/mlと3.03 ± 0.13ng/mlであった(P=NS)。妊娠第二期において、sFlt1の平均血清レベルは、正常群の3.10 ± 0.15ng/mlと比較して、子癇前症群において顕著に高く、平均値が4.12 ± 0.5ng/mlであった(P < 0.01)(表10)。

【0244】

妊娠第一期において顕著な差はないと考えられたsEngの平均血清レベルは、妊娠第二期には正常女性と比較して子癇前症女性において著しく変化し、それぞれ、妊娠第一期では6.9 ± 0.32ng/mlと6.57 ± 0.17ng/ml(P=NS)、妊娠第二期では6.37 ± 0.38ng/mlと5.23 ± 0.12ng/ml(P=0.004)であった(表10)。

【表10】

表10 血清中sFlt1およびsEngレベル

血管新生因子	正常妊娠			子癇前症			P 値
	N	平均	SE	N	平均	SE	
sFlt1 (ng/ml) (妊娠第一期)	147	3.03	0.13	39	3.496	0.35	0.14
sFlt1 (ng/ml) (妊娠第二期)	144	3.10	0.15	35	4.12	0.5	0.01*
sEng (ng/ml) (妊娠第一期)	147	6.57	0.17	39	6.9	0.32	0.37
sEng (ng/ml) (妊娠第二期)	144	5.23	0.12	35	6.37	0.38	0.004*

10

【0245】

血管新生因子の連続変化

図37は、正常、全子癇前症女性における、および37週未満の子癇前症女性における またはd(sFlt1およびsEng値の妊娠第一期および第二期間の差)をグラフで示す。正常妊娠において、妊娠第一期および第二期間でsFlt1の非常に小さな変化がある(dsFlt1=0.05±0.15ng/ml)。dsFlt1は、正常女性における0.0497±0.15ng/mlに対して、子癇前症を発症した女性において0.713±0.47ng/mlと比較的高い(P=0.08)。同様に、37週未満の子癇前症女性において、dsFlt1は高く0.634±0.91ng/mlであった。

20

【0246】

正常妊娠において妊娠第一期および第二期間でsEngレベルの減少がある(-1.322±0.18ng/ml)。この減少は子癇前症患者において鈍化し、dsEngは-0.441±0.42ng/mlである(P=0.04)。37週未満の子癇前症女性において、可溶性エンドグリンレベルの減少は鈍化し、反対方向に傾くようである(0.732±0.77ng/ml、対照と比較してP<0.01)。

【0247】

予測アルゴリズム

これらの変化が重度の早発型子癇前症の予測試験として使用可能かどうかを確認するため、正常血圧女性および子癇前症を発症した女性において、および特に早産子癇前症において、積1(妊娠第一期)および積2(妊娠第二期)として積(sFlt1×sEngの値)を考えた。積1および積2はともに、子癇前症患者において顕著に増加し、重要なことには 積(dproduct)は、正常対照群の負数と対照的に大幅に正であった(図38)。さらに、dproductは正常対照群と比較して早産子癇前症患者において大きく増強された(P=0.004)。

30

【0248】

血管新生因子の変化レベルと早産子癇前症の危険性の関係性を評価するため、本発明者らは、人種/民族、体格指数、および検体採取時の在胎期間に関して調整した後、早産子癇前症について調整オッズ比(aOR)および95%信頼区間(95%CI)を、2つの下位区分に対してdproduct集合分布の最高区分において、計算した(図39)。 積レベルが-1未満の女性と比較して、 積レベルが+1より大きい群[aOR 5.5、95%CI 1.4~22.4]において早産の危険性の大幅な増加が認められた。

40

【0249】

CPEPコホート内症例対照研究の二次分析

CPEP試験の女性の部分集団では、正常血圧のままであった女性コホート内でsFlt1平均値は、10~12週および13~16週の間で3.68ng/mlから4.92ng/mlに増加し、17~20週で4.29ng/mlまで減少したが、早産子癇前症女性においてsFlt1平均値は、妊娠10~12、13~16および17~20週で3.44ng/mlから4.22ng/mlまで増加し、5.39ng/mlまでさらに増加した。このパターンは満期産の子癇前症女性においては明らかでなかった(表11)。

【表 1 1】

表11 CPEP試験における血清中sFlt1およびsEngレベル

	sFlt1 (ng/ml)			sEng (ng/ml)		
	10-12週	13-16週	17-20週	10-12週	13-16週	17-20週
正常	3.68	4.99	4.29	6.8	7.07	5.78
<i>N</i>	6	62	48	6	62	48
PE <37週	3.44	4.22	5.39	7.15	7.9	10.19
<i>N</i>	13	28	32	13	28	32
PE ≥37週	4.06	4.48	4.25	7.41	7.8	8.34
<i>N</i>	17	50	48	17	50	48

10

【 0 2 5 0】

sEngレベルにおいても同様の結果が観察された。正常血圧女性においてsEngレベルは、10～12週および13～16週で6.8ng/mlから7.07ng/mlまで増加し、その後17～20週で5.78ng/mlまで減少したが、早産子癩前症女性においてエンドグリンレベルは、10～12週、13～16週の間で7.15ng/mlから7.95ng/mlまで増加し、17～20週で10.19ng/mlまでさらに増加した。満期産の子癩前症女性において同じ傾向が認められ、sEng平均レベルは、10～12週、13～16週および17～20週で7.41ng/mlから7.80ng/mlまで、8.34ng/mlまで増加した(表11参照)。

20

【 0 2 5 1】

要約

sFlt1およびsEngはともに、子癩前症を発症することになる患者において、妊娠第二期中に上昇した。正常妊娠は、sFlt1の顕著な変化がない、妊娠第一期から第二期までのsEng減少によって特徴付けられる。しかしながら、子癩前症、特に早産の子癩前症を発症する患者において、sFlt1およびsEngはともに妊娠第一期から第二期まで増加し続ける。妊娠第一期および第二期の間のsFlt1およびsEngの変化は、その後早産の子癩前症を発症する危険性の高い患者をスクリーニングするために有用である。

30

【 0 2 5 2】

これらの知見は、早産の子癩前症の予測のための重要な意味合いを有している。安全で信頼性のある子癩前症スクリーニング試験の追及は、研究者の長年の目的であった。以前の試みは、微量アルブミン尿、体重増加および血漿量変化などの疾患の初期症状を検出することに主眼を置いていた。大規模なメタ分析では、Conde-Agudelo A et alは、子癩前症予測における臨床的、生物物理学的、および生化学的試験の有用性を評価するために、関連する可能性のある項目7191個(211369人の女性)のうちの87個を分析した。Conde-Agudelo A et alは、2004年現在で、子癩前症の発症を予測するための臨床的に有用なスクリーニング試験はないと結論付けた(12)。本研究において、本発明者らは、子癩前症になることとなる女性において、疾患の臨床的発症の数週間から数か月前の、妊娠第一期および第二期にsFlt1およびsEngのレベルが上昇する(個々の患者においてとして測定)ことを示した。こうした変化は早産の子癩前症を発症した女性においてより大きい。

40

【 0 2 5 3】

血管新生因子の不均衡は、子癩前症の病因において密接な役割を果たすと考えられる。子癩前症胎盤は、浅い着床および擬似血管新生障害を含む血管リモデリング異常により特徴付けられる(Fisher et al., Semin Cell Biol. 4:183-8 (1993))。こうした胎盤の変化は妊娠12～18週の間起こり、重度の早発型子癩前症の大部分の病因において重要であると考えられる。こうした胎盤形成異常は、子癩前症の母体症候群を引き起こす全身的因子

50

の生成(elaboration)をもたらすと考えられる。本明細書およびPCT出願公開番号WO2004/08946、WO2005/077007、およびWO2006/034507に記載されているように、2つの抗血管新生タンパク質であるsFlt1およびsEngはともに、子癩前症において臨床疾患の間だけでなく症状発現の数週間前にも上昇することが見出されている(Levine et al., (2006)、上記)。重要なことには、2つの因子はともにラットにおいて子癩前症様症候群の誘導に關与していた(Maynard et al., 上記、Venkatesha et al., 上記)。しかしながら、母体血中の血管新生因子濃度の変化が妊娠の比較的後期に起こるので、これらの抗血管新生因子の産生増加は、異常な胎盤形成に反応して起こる二次的な現象である可能性がある。胎盤絨毛外殖片および初代細胞性栄養膜細胞培養試験を使用したin vitroデータは、母体内皮の機能障害を誘導する役割に加えて、抗血管新生因子が細胞性栄養膜細胞の移動および分化に關与している可能性があることを示唆している。抗血管新生因子レベルが正常妊娠において妊娠第一期から第二期まで減少するが、早産の子癩前症を後に発症する妊娠においては減少しないという本発明者らの発見は、血中血管新生因子の異常が胎盤分化の異常と同時に起こっていることを示唆する。

10

【0254】

子癩前症患者における血中sFlt1およびsEng濃度増加の病因は不明である。低酸素、遺伝子、または免疫因子が關与していると考えられる。胎盤低酸素のin vivoおよびin vitroモデルにおいて、sFlt1およびsEngの発現がともに低酸素に反応して上昇し、これらの発現増加がHIF-1に仲介されることは注目に値する(Nevo et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 291:R1085-93 (2006))。さらに、正常妊娠中、胎盤は妊娠初期に低酸素であり、この低酸素は妊娠第二期に胎盤への血流が増加すると消失すると考えられる。低酸素は子癩前症妊娠においてこれまで正式に文書化されていないが、低酸素の増強が転写因子発現および胎盤へのドップラー(Doppler)血流障害を誘導したという代理の知見に基づき、大部分の子癩前症妊娠にとって低酸素は重要であると考えられる。妊娠第一期および第二期間で減少があった正常妊娠と対照的に、sFlt1およびsEngがともに重度子癩前症患者において上昇したままであるという本発明者らの発見は、胎盤虚血が実は子癩前症患者のこれらの抗血管新生タンパク質の産生増加において役割を果たしている可能性があることを示唆する。

20

【0255】

要約すると、sFlt1およびsEngの連続変化は、子癩前症を発症することになる女性、特にその後早産の子癩前症を発症する女性を特定するようである。本発明者らの知見は、より大きなサンプルサイズでの横断的研究において再現されている(表11)。

30

【0256】

実施例 12

エンドグリンはTGF- β 1に誘導されるeNOSのThr495脱リン酸化に必要である

マウス内皮細胞はEng^{+/+}およびEng^{-/-}マウス胚(E8.5)から得、Balconi et al. (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20:1443-51 (2000))に記載されたように培養した。コンフルエント単層を2時間血清飢餓させ、TGF- β 1(125および250pM)ありまたはなしで15分間刺激した。1%Triton X-100を含有する10mMのTris-HCl中で直ちに細胞抽出物を調製し、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を添加した。タンパク質濃度を定量化し、eNOSのThr495に対するリン酸化特異的pAb(セルシグナリング(Cell Signaling)社)および全eNOSに対するmAb(BDバイオサイエンス(Biosciences)社)を使用するウエスタンブロットによりサンプルを分析した。

40

【0257】

図40Aに示した代表的なウエスタンブロットおよび図40Bに示した関連するグラフ(n=3実験の平均)は、TGF- β 1がマウスEng^{+/+}内皮細胞においてeNOSのThr495脱リン酸化を誘導した(ベースラインに対して^{**}P<0.01)が、Eng^{-/-}細胞においては誘導しなかったことを実証している。この結果は、TGF- β 1シグナル伝達とeNOSのThr495脱リン酸化および活性化を結びつけるためのエンドグリンの重要な役割を示唆している。さらに、このプロセスがエンドグリン依存的であることを考慮すると、可溶性エンドグリンを使用して、おそらく

50

TGF- 1に結合およびTGF- 1を阻害することによって、このプロセスを阻害することができる。

【0258】

その他の実施形態

本発明の特定の実施形態の説明を、例示のために示した。この説明は、網羅的なもの、または本発明の範囲を本明細書に記載した特定の形態に限定することを意図していない。いくつかの実施形態を参照して本発明を説明したが、特許請求の範囲に記載の本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更形態を実施できることが当業者に理解されるはずである。

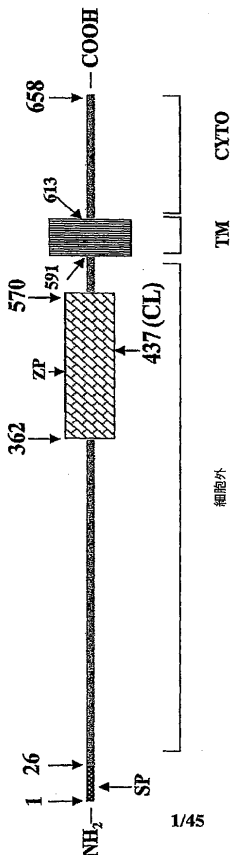
【0259】

PCT出願公開第2004/008946号、同第2005/077007号、および同第2006/034507号；米国特許出願公開第20060067937号および同第20070104707号；および米国仮特許出願第60/852761号を含む、本明細書中で参照された全ての特許、特許出願、および出版物は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0260】

その他の実施形態は特許請求の範囲に示す。

【図1】



【図2】

A. 可溶性エンドグリンの推定cDNA配列(437アミノ酸)

```

1 atggaccgag gcaagctccc tctggtgtt gccctgctg tggccagctg cagcctcagc
61 cccacaagtc ttgcagaaac agtccatgt gacctcagc ctgtggccc cgaagggac
121 gaggtgacat ataccactag ccaggtctcg aagggtctcg tggctaggg cccaatggc
181 atccttgaag tccatgtct cttcctggag ttcccaacgg gccctcaaca gctggagctg
241 actctccagg catccaagca aatggcaac tggccocag aggtgctct ggtcctcag
301 gtaaacagca gtgtcttct gcatctccag gccctgggaa tcccactgca ctggcctac
361 aatccagcc tggtaacct ccaagagccc ccgggggtca acaccacaga gctgccatcc
421 ttcccaga ccaagatct ctagtgggca gctgagaggg gccccatcac ctctgtgct
481 gsgctgatg acccccagag catctctct cagtgggccc aagcccaggg gtaactgtcc
541 ttctgcatg tggaaagcag ccaggacatg ggcccagcgc tcsagtggg gccggtact
601 ccagccttg tccgggctg ccacttgaaa ggcgtggccc gccacaagya ggcgcaatc
661 ctgagggctc tgcggggcca ctggggggg cccggagcg tgaagtgaa ggtggaactg
721 agctgggca cgggggatct ctagcctgc ctcatctgc aggggtccc ctactgtcc
781 tggcctatg acgccaacca caacatgag atctggacca ctggagaata ctcttcaag
841 atcttccag agaaaaaat tctgtggctc aagctccag acacacctca aggcctcctg
901 gggggagccc ggatgctcaa tgcacgatt gtggcatct tctgtgagct accgtggcc
961 agcattgtct cactctatg ctccagctg ggtgtaggc tgcagactc accgcaaccg
1021 atccagacca ctctcccaa ggacactgt agcccggagc tgctcatgt ctgtatccag
1081 acaaagtgt cgcagcagc catgacctg gtactaaga aagagctgt tgcgcatgt
1141 aagtgcacca tccagggcct gacctctgg gaccocagct gtgagcaga ggaaggggt
1201 gacaagttg tcttggcag tgettactcc agctgtggca tgcaggtgtc agcaagtatg
1261 atcagcaatg aggcggtggt caatatctg ttagctcat caccacagag g

```

B. 推定アミノ酸配列

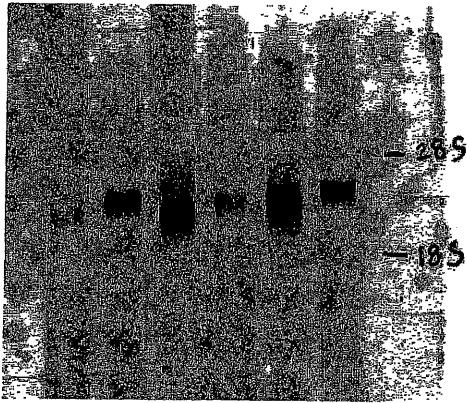
```

MetDRGTLPLAVALLASCSLSPTSLAETVHCDLQPVGPERGEV
TYTTSQVSKGCVAQAPNAILEVHVLFLFPPTGFSQLELTLQAS
KQNGTWPREVLLVLSVNSSVFLHLQLALGIPLHLAYNSSLVTFQ
EPPGVNTEBLPSFPKTQILEWAAERGPITSAEELNDPQSILLRL
GQAQGSLSFCMetLEASQDMetGRTLEWRPRTPALVRGCHLEGV
AGHKEAHILRVLPGHSAGPRTVTVKVELSCAPGDLDAVLIQGG
PPYVSWLIDANHNMetQIWTTEYSFKIFPEKNIRGFKLPDTPQG
LLGEARMetLNASIVASFVELPLASIVSLHASSCGRLQTSFAPPI
QTTFPKDTCSPELLMetSLIQTKCADDAMetTLVVKKELVAHLKC
TITGLTFWDFPSCAEADRGDKFVLRSAYSYSSCGMetQVSASetISN
EAVVNILSSSSPQR

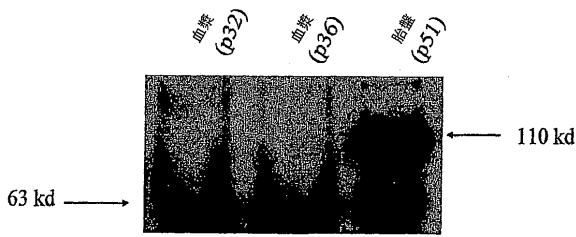
```

【 図 3 】

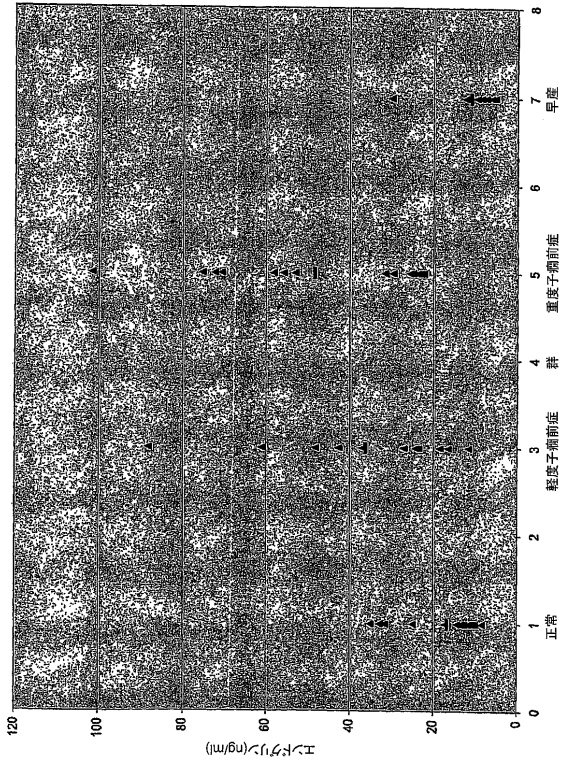
N p p N P P



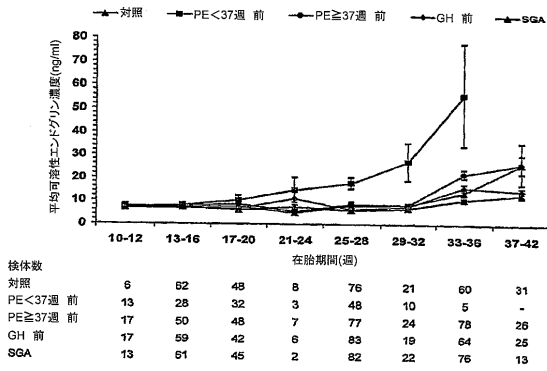
【 図 4 】



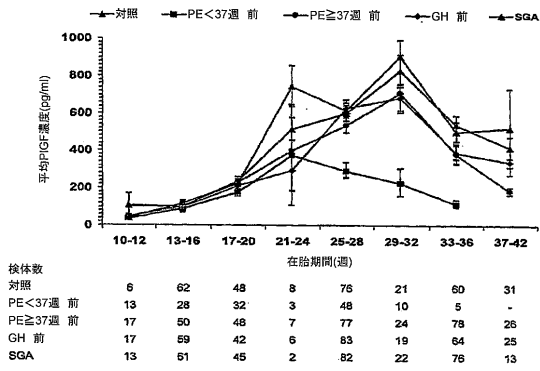
【 図 5 】



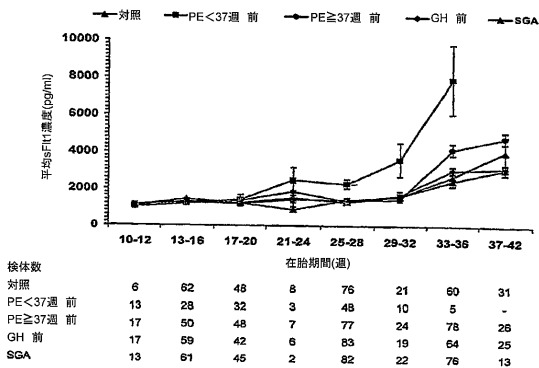
【 図 6 】



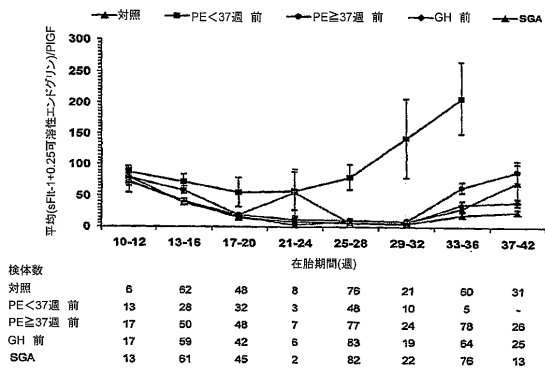
【 図 8 】



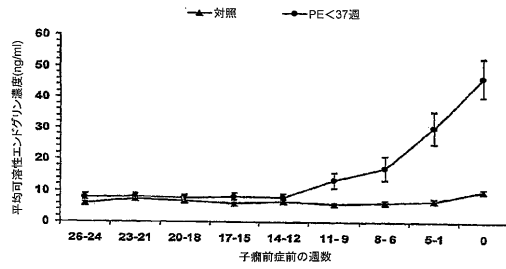
【 図 7 】



【 図 9 】

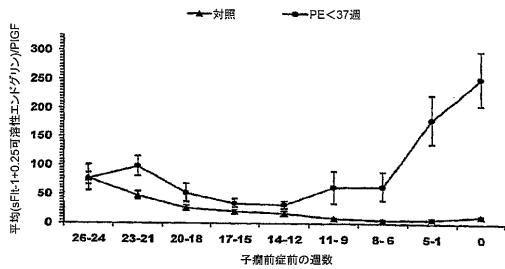


【 図 1 0 】



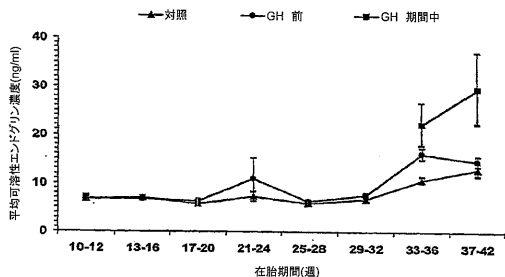
検体数	4	16	19	16	9	25	25	21	40	
検体	検体									
検体	検体									
対照	85	98	118	123	122	171	196	198	241	
PE < 37週	82	96	118	123	122	170	196	198	240	

【 図 1 1 】



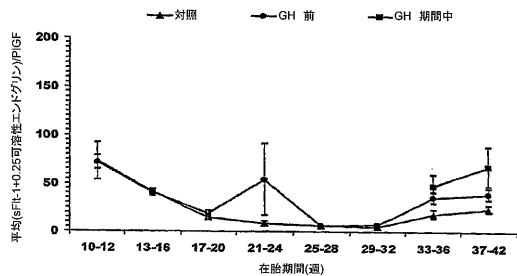
検体数	4	16	19	16	9	25	25	21	40	
検体	検体									
検体	検体									
対照	85	98	118	123	122	171	196	198	241	
PE < 37週	82	96	118	123	122	170	196	198	240	

【 図 1 4 】



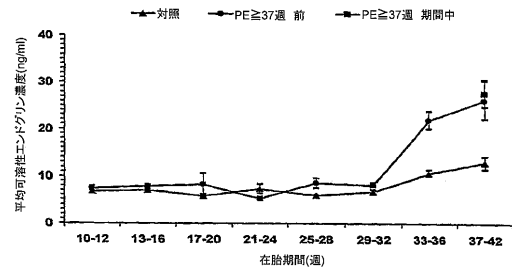
検体数	6	62	48	8	76	21	60	31
対照	17	59	42	6	83	19	64	25
GH 前	-	-	-	-	-	-	5	10
GH 期間中	-	-	-	-	-	-	-	-

【 図 1 5 】



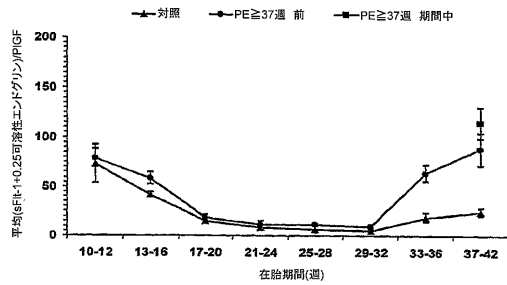
検体数	6	62	48	8	76	21	60	31
対照	17	59	42	6	83	19	64	25
GH 前	-	-	-	-	-	-	5	10
GH 期間中	-	-	-	-	-	-	-	-

【 図 1 2 】



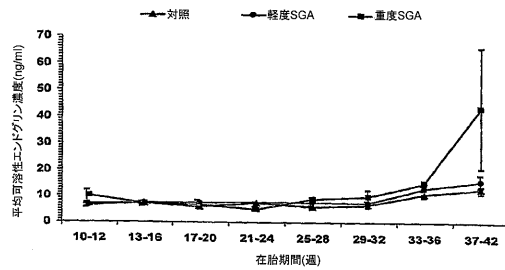
検体数	6	62	48	8	76	21	60	31
対照	17	50	48	7	77	24	78	26
PE >= 37週 前	-	-	-	-	-	-	-	32
PE >= 37週 期間中	-	-	-	-	-	-	-	-

【 図 1 3 】



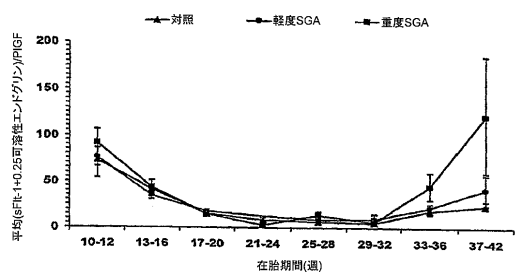
検体数	6	62	48	8	76	21	60	31
対照	17	50	48	7	77	24	78	25
PE >= 37週 前	-	-	-	-	-	-	-	32
PE >= 37週 期間中	-	-	-	-	-	-	-	-

【 図 1 6 】



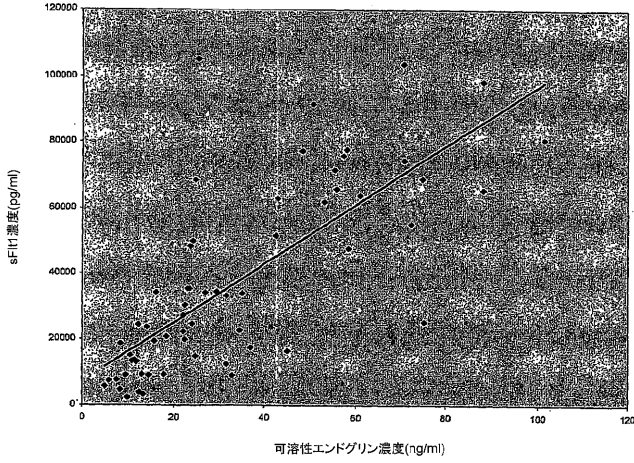
検体数	6	62	48	8	76	21	60	31
対照	9	39	29	-	55	16	50	8
軽度SGA	4	22	16	2	27	6	26	5
重度SGA	-	-	-	-	-	-	-	-

【 図 1 7 】



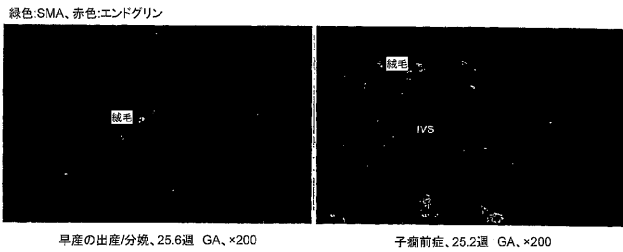
検体数	6	62	48	8	76	21	60	31
対照	9	39	29	-	55	16	50	8
軽度SGA	4	22	16	2	27	6	26	5
重度SGA	-	-	-	-	-	-	-	-

【 図 1 8 】



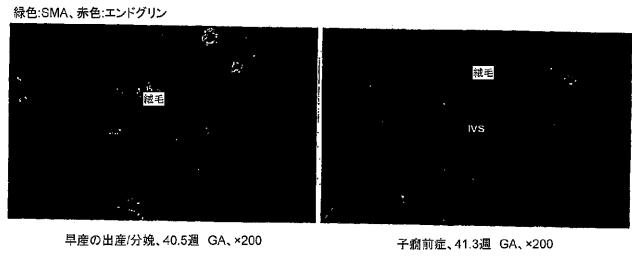
【 図 1 9 】

エンドグリリンおよび平滑筋アクチン(SMA)の二重免疫蛍光染色



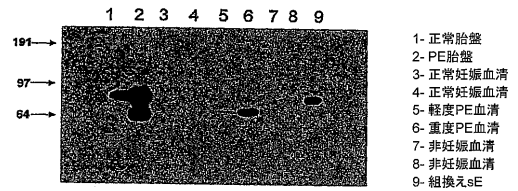
【 図 2 0 】

エンドグリリンおよび平滑筋アクチン(SMA)の二重免疫蛍光染色

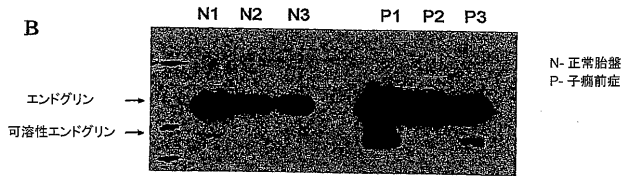


【 図 2 1 】

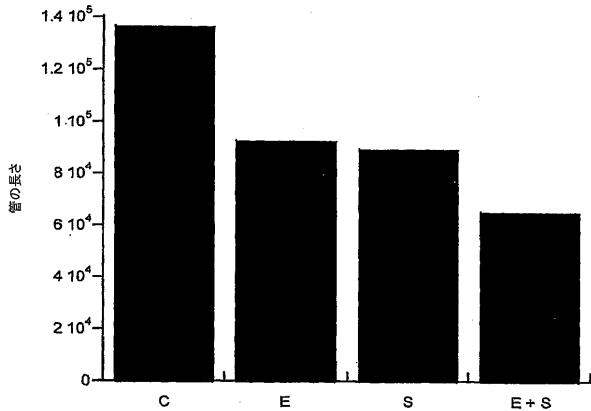
A



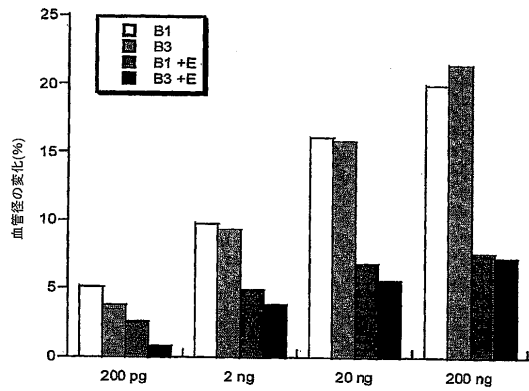
B



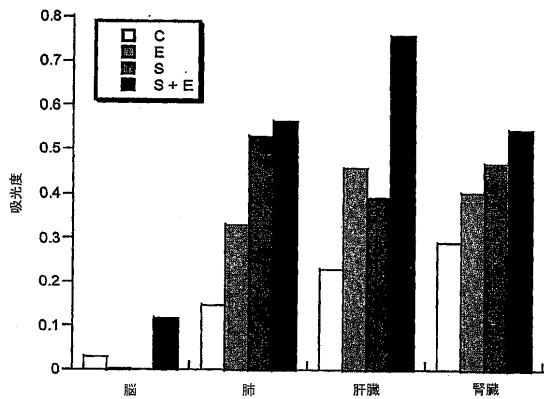
【 図 2 2 】



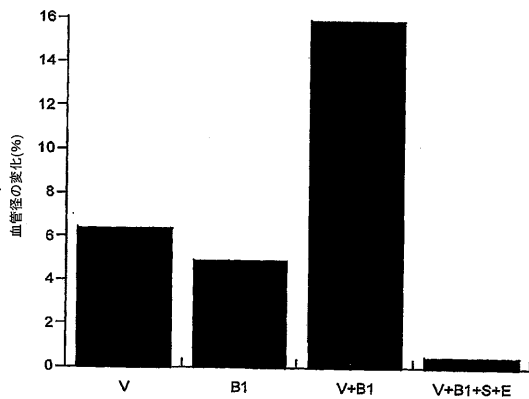
【 図 2 4 】



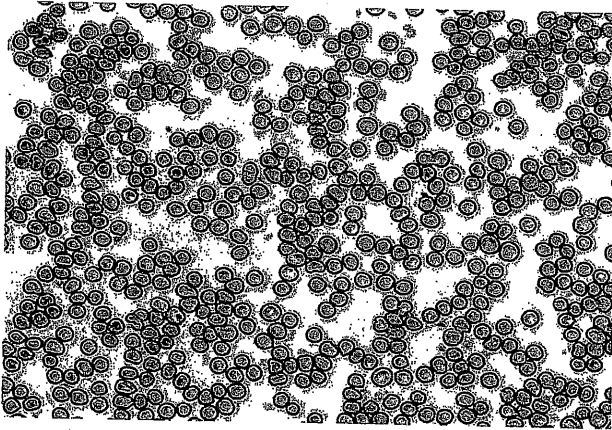
【 図 2 3 】



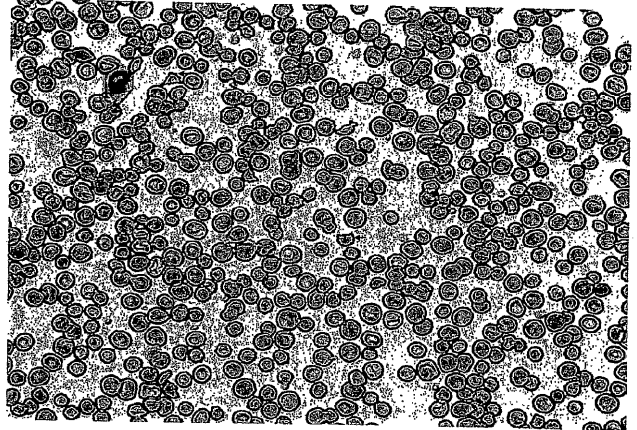
【 図 2 5 】



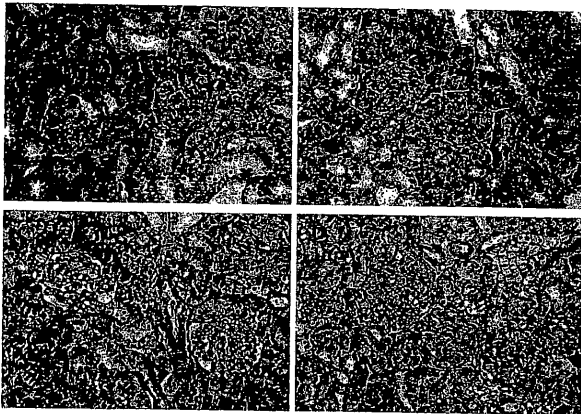
【 図 2 6 A 】



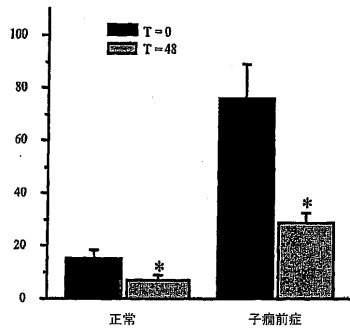
【 図 2 6 B 】



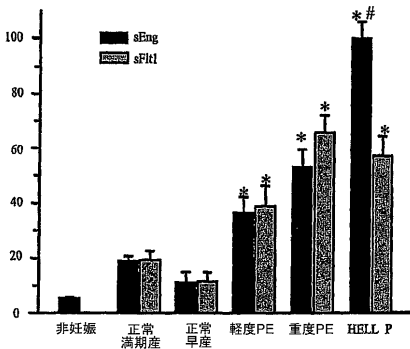
【 図 2 7 】



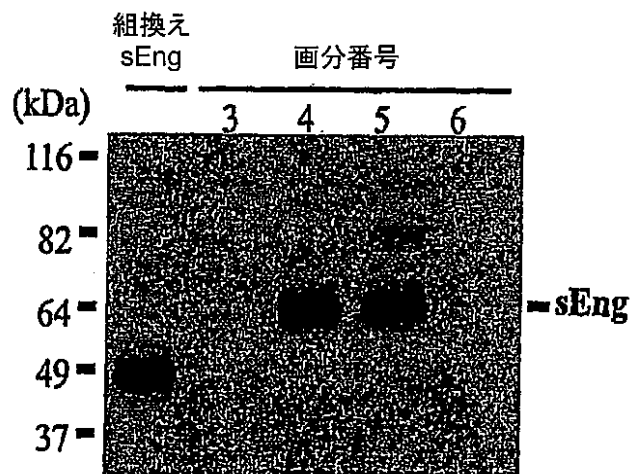
【 図 2 9 】



【 図 2 8 】



【 図 3 0 A 】



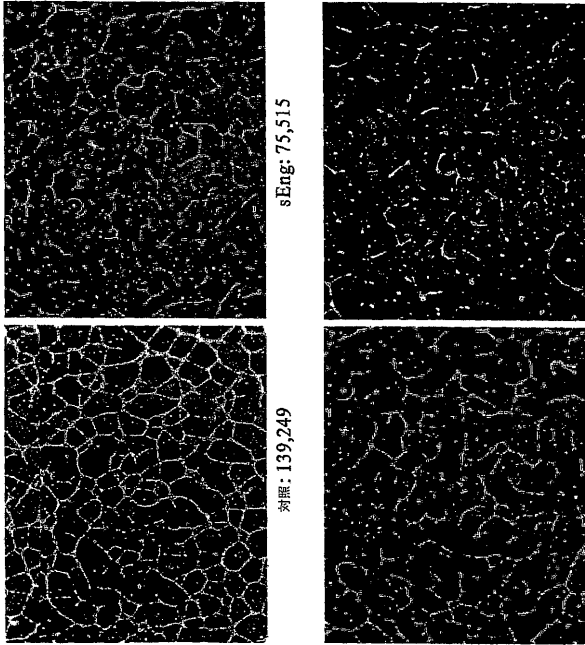
【 図 3 0 B 】

```

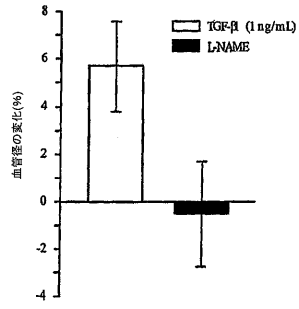
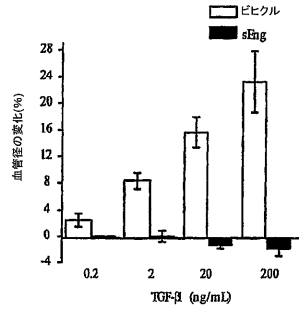
26  ETVHCDLQFV  GPERGEVYIT  TSQVSKGCVL  QAPNALLEVH  VLFLKFPFGE
76  SODELTLQAS  KQNGTWFREV  LLVLSVNSV  FLHLQALGIP  LHLAYNSSLV
126  TFGREPVNT  TELPSPFKFO  ILWAAKRF  ITSAARIANDP  OSILLRLGQA
176  QSLSPMLH  ASDMSETE  VRETFALVR  GHLRGTAGH  KRALILVLP
226  GHSAGFRTVT  VKVELSCAPG  DLDVLLIAG  PPTVSMILDA  NRMQIWTG
276  EYSPKLFPEK  NRSRFLPDT  PQSLLSARM  LNASIVASV  ELPLASIVSL
326  HASSCGRLQ  TSPFIQTF  FKDCSPELL  MSLIQTKCAD  DAMTLVLKKE
376  LVAHLKCTIT  GLTFWDSCE  AEDRGRFVL  RSAYSSCGM  VSASMLSNEA
426  VVMILSSSP  QRKVVHCLM  DLSLFGGLY  LSPHFLQSN  TIEFGQSFV
476  CVKVSFVSE  FLQLDSCHL  DLGPEGTVE  LIQGRAAKN  CVSLLSPSE
526  GDRFSPLH  FTVIYKIG  TSCIVALP  KIGSQGEVH  RIVFRLNII
576  SPDLSSCTS  GLVPAVLG  TFGFLIGAL  LTRALNWIY  HTRSPKREP
626  VVAVAFASS  RSSSTNHSIG  STQSPCSTS  SMA

```

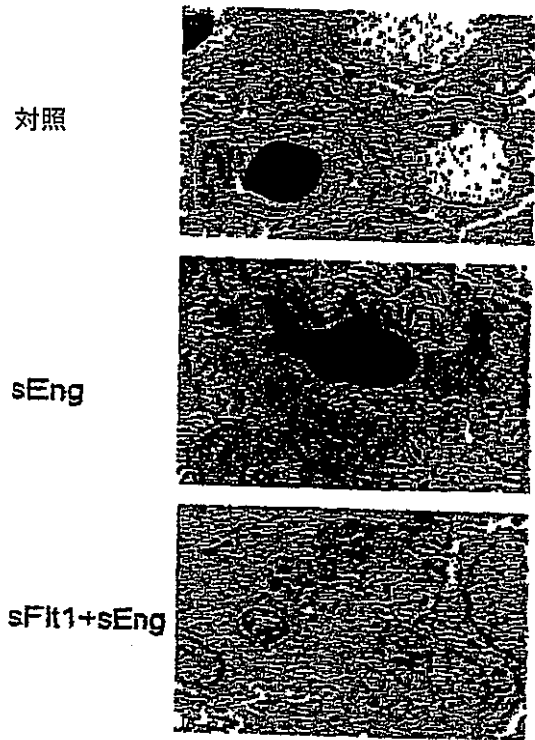
【 図 3 1 】



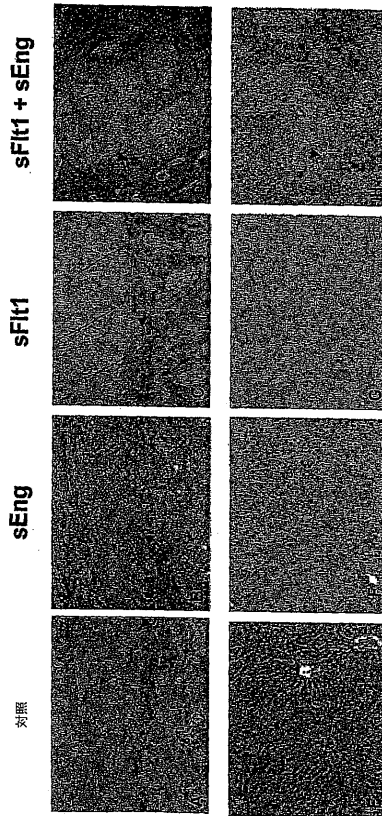
【 図 3 2 】



【 図 3 3 】

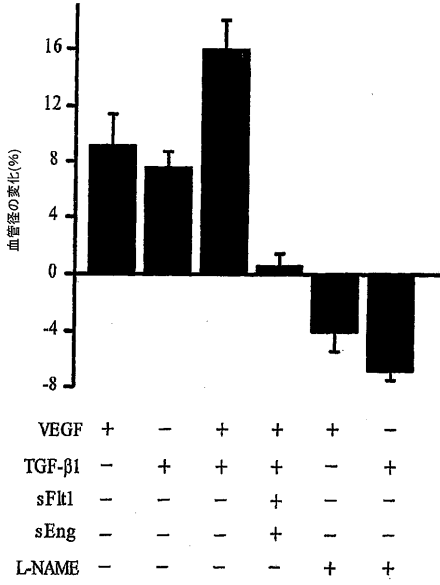


【 図 3 4 】

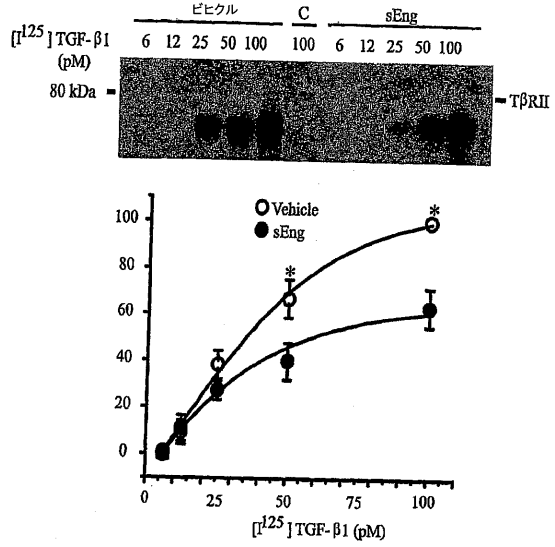


上のパネル: 膵臓
下のパネル: 肝臓

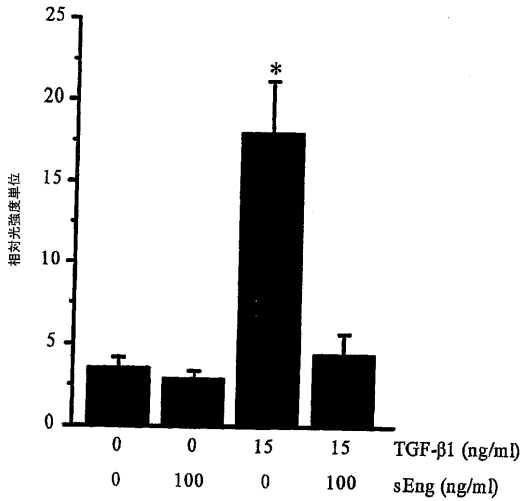
【 図 3 5 A 】



【 図 3 5 B 】



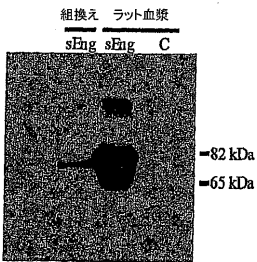
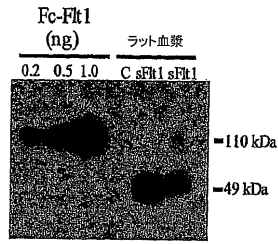
【 図 3 5 C 】



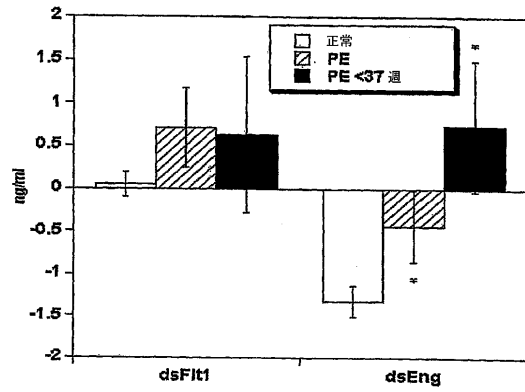
【 図 3 5 D 】



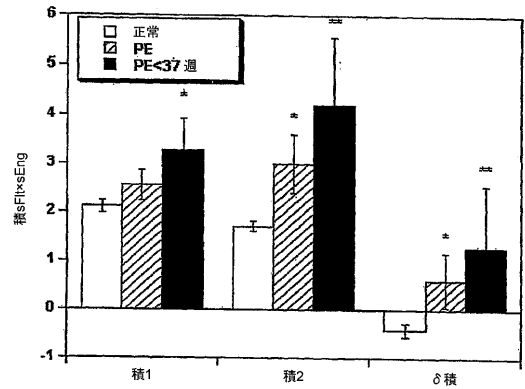
【 図 3 6 】



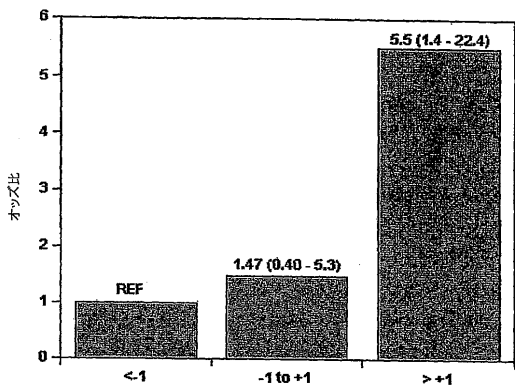
【 図 3 7 】



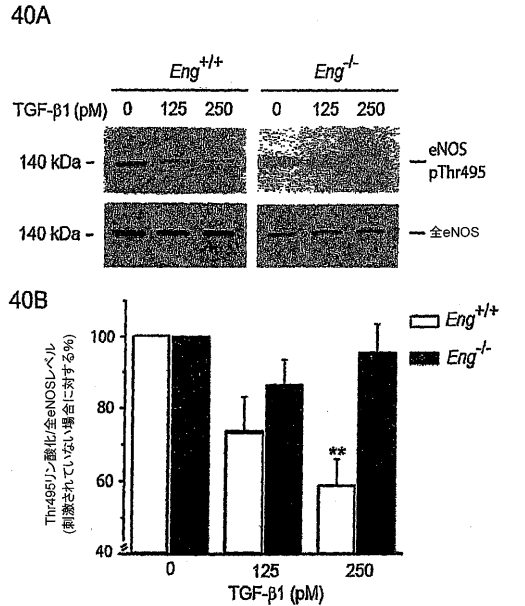
【 図 3 8 】



【 図 3 9 】



【 図 4 0 】



【配列表】

2009538915000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/12787																											
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12N 15/09; A61K 31/70, 38/00 (2007.10) USPC - 435/69.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																													
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 435/69.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/7.4, 320.1, 375; 514/12, 44; 424/94.4, 146.1 (Text Search-see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); DialogPRO (Engineering); Google Scholar and PubMed. Search Terms: pregnancy, eclampsia, hypertens\$, endoglin, nitric, oxide, synthase, eNOS, phosphorylat\$, VEGF, VEGF121, VEGF185, PIGF, dephosphorylat\$, activin A, BMP, TGF, amino acid, antibody, CD105.																													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2003/0099851 A1 (LEIBOVITZ) 29 May 2003 (29.11.2003) para [0108], [0113], [0122], [0138], [0139], [0179]</td> <td>1-2 ----- 3-27 and 56</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2003/0049823 A1 (SESSA) 13 March 2003 (13.03.2003) para [0010]</td> <td>3-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BOULOUMIE et al. Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulates Nitric Oxide Synthase Expression In Endothelial Cells. Cardiovascular Research, March 1999, Vol 41, pp 773-780</td> <td>5-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2005/0043227 A1 (COMPERNOLLE et al.) 24 February 2005 (24.02.2005) para [0066]</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LENASI et al. A Modipline Activates the Endothelial Nitric Oxide Synthase By Altering Phosphorylation On Ser1177 And Thr495. Cardiovascular Research, October 2003, Vol 59, pp 844-853</td> <td>7-8 and 56</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>TAI et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase: A New Paradigm for Gene Regulation in the Injured Blood Vessel. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., March 2004, Vol 24, No 3, pp 405-412</td> <td>8 and 56</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2006/0067937 A1 (KARUMANCHI et al.) 30 March 2006 (30.03.2006) claim 31-34, 93; para [0012]-[0014], [0017], [0021], [0024]-[0026], [0030]-[0031], [0033]-[0036], [0039]-[0042], [0057], [0082], [0149], [0151], [0156]-[0159], [0170], [0198], [0214], [0235]</td> <td>28-55 ----- 9-27 and 56-57</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>OTA et al. Targets of Transcriptional Regulation by Two Distinct Type I Receptors for Transforming Growth Factor-β In Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Journal of Cellular Physiology, December 2002, Vol 193, pp 299-318</td> <td>57</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US 2003/0099851 A1 (LEIBOVITZ) 29 May 2003 (29.11.2003) para [0108], [0113], [0122], [0138], [0139], [0179]	1-2 ----- 3-27 and 56	Y	US 2003/0049823 A1 (SESSA) 13 March 2003 (13.03.2003) para [0010]	3-6	Y	BOULOUMIE et al. Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulates Nitric Oxide Synthase Expression In Endothelial Cells. Cardiovascular Research, March 1999, Vol 41, pp 773-780	5-6	Y	US 2005/0043227 A1 (COMPERNOLLE et al.) 24 February 2005 (24.02.2005) para [0066]	6	Y	LENASI et al. A Modipline Activates the Endothelial Nitric Oxide Synthase By Altering Phosphorylation On Ser1177 And Thr495. Cardiovascular Research, October 2003, Vol 59, pp 844-853	7-8 and 56	Y	TAI et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase: A New Paradigm for Gene Regulation in the Injured Blood Vessel. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., March 2004, Vol 24, No 3, pp 405-412	8 and 56	X — Y	US 2006/0067937 A1 (KARUMANCHI et al.) 30 March 2006 (30.03.2006) claim 31-34, 93; para [0012]-[0014], [0017], [0021], [0024]-[0026], [0030]-[0031], [0033]-[0036], [0039]-[0042], [0057], [0082], [0149], [0151], [0156]-[0159], [0170], [0198], [0214], [0235]	28-55 ----- 9-27 and 56-57	Y	OTA et al. Targets of Transcriptional Regulation by Two Distinct Type I Receptors for Transforming Growth Factor- β In Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Journal of Cellular Physiology, December 2002, Vol 193, pp 299-318	57
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																											
X — Y	US 2003/0099851 A1 (LEIBOVITZ) 29 May 2003 (29.11.2003) para [0108], [0113], [0122], [0138], [0139], [0179]	1-2 ----- 3-27 and 56																											
Y	US 2003/0049823 A1 (SESSA) 13 March 2003 (13.03.2003) para [0010]	3-6																											
Y	BOULOUMIE et al. Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulates Nitric Oxide Synthase Expression In Endothelial Cells. Cardiovascular Research, March 1999, Vol 41, pp 773-780	5-6																											
Y	US 2005/0043227 A1 (COMPERNOLLE et al.) 24 February 2005 (24.02.2005) para [0066]	6																											
Y	LENASI et al. A Modipline Activates the Endothelial Nitric Oxide Synthase By Altering Phosphorylation On Ser1177 And Thr495. Cardiovascular Research, October 2003, Vol 59, pp 844-853	7-8 and 56																											
Y	TAI et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase: A New Paradigm for Gene Regulation in the Injured Blood Vessel. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., March 2004, Vol 24, No 3, pp 405-412	8 and 56																											
X — Y	US 2006/0067937 A1 (KARUMANCHI et al.) 30 March 2006 (30.03.2006) claim 31-34, 93; para [0012]-[0014], [0017], [0021], [0024]-[0026], [0030]-[0031], [0033]-[0036], [0039]-[0042], [0057], [0082], [0149], [0151], [0156]-[0159], [0170], [0198], [0214], [0235]	28-55 ----- 9-27 and 56-57																											
Y	OTA et al. Targets of Transcriptional Regulation by Two Distinct Type I Receptors for Transforming Growth Factor- β In Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Journal of Cellular Physiology, December 2002, Vol 193, pp 299-318	57																											
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																													
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "g" document member of the same patent family																													
Date of the actual completion of the international search 24 November 2007 (24.11.2007)		Date of mailing of the international search report 31 JAN 2008																											
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 <i>DUT</i>																											

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
	C 1 2 P 21/08	

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

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72)発明者 カルマンチ, エス., アナンス

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州, チェスナット ヒル, ウッドクリフ ロード
1 1 7

(72)発明者 スクハトム, ヴィカス, ピー.

アメリカ合衆国 0 2 4 5 9 マサチューセッツ州, ニュートン, スカイ ビュー サークル 3
6

(72)発明者 トポー吉安, ムラド

カナダ国 エム5ジー 1エイチ4 オンタリオ州, トロント, ユニット 3 0 8, エルム スト
リート 7 7

(72)発明者 ルタルト, ミシェル, ヴイ.

カナダ国 エム4ケイ 2ゼット7 オンタリオ州, トロント, ハウランド ロード 3 5

Fターム(参考) 2G045 AA34 CB01 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA02

4B063 QA05 QA18 QA19 QQ08 QQ21 QQ79 QQ89 QR01 QR48 QR77

QS33 QS36

4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA01 DA13

4C084 AA02 AA17 AA20 BA44 CA18 DB52 DB55 DB57 NA14 ZA422

ZA512 ZA752 ZA812

4C085 AA13 AA14 BB11 BB44 CC23 DD62 GG02

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA23 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	如何诊断和治疗妊娠并发症		
公开(公告)号	JP2009538915A	公开(公告)日	2009-11-12
申请号	JP2009513263	申请日	2007-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	儿童医院		
申请(专利权)人(译)	贝斯以色列女执事医疗中心 FOR别致的儿童医院		
[标]发明人	カルマンチエスアナス スクハトムヴィカスピー トポー吉安ムラド ルタルトミシエルヴィ		
发明人	カルマンチ,エス.,アナス スクハトム,ヴィカス,ピー. トポー吉安,ムラド ルタルト,ミシエル,ヴィ.		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 C12Q1/02 C12N15/09 A61K45/00 A61K38/00 A61K39/395 A61P9/12 A61P15/00 A61P7/00 A61P1/16 C12P21/08		
CPC分类号	A61K31/4439 A61K31/455 A61K31/513 A61K31/522 A61K38/1841 A61K38/1866 A61K38/1875 A61K38/486 A61K38/4886 A61P1/16 A61P7/00 A61P9/12 A61P15/00 G01N2800/368		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D C12Q1/02 C12N15/00.A A61K45/00 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/12 A61P15/00 A61P7/00 A61P1/16 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA80 4B024/CA02 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR01 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/DB52 4C084/DB55 4C084/DB57 4C084/NA14 4C084/ZA422 4C084/ZA512 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB44 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
优先权	11/443920 2006-05-31 US 60/852761 2006-10-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了使用改变可溶内皮糖蛋白，内皮型一氧化氮合酶，PGI₂，TGF-β₁，TGF-β₃的化合物的组合治疗妊娠相关的高血压病，例如先兆子痫和子痫的方法。β₃，激活素A，BMP2，BMP7和sFlt-1表达水平或生物活性。还公开了诊断妊娠相关的高血压疾病（例如先兆子痫和子痫）的方法，其包括测量以下任何一种或多种：可溶内皮糖蛋白，内皮型一氧化氮合酶，PGI₂，TGF-β₁，TGF-β₃，激活素A，BMP2，BMP7和sFlt-1表达水平或生物学活性。

表8 アデノウイルスで処理したラット動物モデルの血行動態および生化学データ

群	N	MAP mm Hg	尿中 Alb/creat μg/mg	血小板数 × 1000/μl	LDH U/L	AST U/L	胎児体重(g)
対 照 (CMV)	6	83 ± 5	186 ± 94	1,098 ± 75	156 ± 32	54 ± 4	2.1 ± 0.5
sFlt1	6	117 ± 7*	2,295 ± 867*	1,131 ± 91	172 ± 53	94 ± 4*	1.75 ± 0.4
sEng	6	104 ± 6*	432 ± 249	1,195 ± 78	188 ± 46	110 ± 13*	1.6 ± 0.4
sFlt1 + sEng	6	121 ± 9*	9,029 ± 4043*	615 ± 67*	1,952 ± 784*	210 ± 92*	0.75 ± 0.3*