

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5270161号

(P5270161)

(45) 発行日 平成25年8月21日(2013.8.21)

(24) 登録日 平成25年5月17日(2013.5.17)

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

請求項の数 39 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2007-533722 (P2007-533722)	(73) 特許権者	507316413
(86) (22) 出願日	平成17年9月26日(2005.9.26)		ベス イスラエル デアコネス メディカル センター
(65) 公表番号	特表2008-514631 (P2008-514631A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ブルックリン アベニュー 330
(43) 公表日	平成20年5月8日(2008.5.8)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/034483	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02006/034507		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成18年3月30日(2006.3.30)	(74) 代理人	100128048
審査請求日	平成20年9月25日(2008.9.25)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	60/613,170	(72) 発明者	カルマンチ エス. アナンス
(32) 優先日	平成16年9月24日(2004.9.24)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チェストナット ヒル ウッドクリフ ロード 117
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠合併症を診断および処置する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

妊娠関連高血圧性障害を有するか、または妊娠関連高血圧性障害に対する素因を有するかについて検査する方法であって、被検体由来の試料における可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルを測定する段階を含み、正常な参照試料に対する該可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルにおける増加が、妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向の指標である、前記方法。

【請求項 2】

妊娠関連高血圧性障害が、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児を伴う妊娠である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

妊娠関連高血圧性障害が子癇前症または子癇である、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

可溶性エンドグリンのレベルが、遊離型、結合型、または全ての可溶性エンドグリンのレベルである、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

20ng/mlより高い可溶性エンドグリンのレベルが、妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向の指標である、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

測定段階が免疫学的アッセイを用いて行われる、請求項1～5のいずれか一項記載の方法

。

【請求項 7】

免疫学的アッセイがELISAである、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

レベルの測定段階が2回またはそれ以上の機会に行われ、測定間の該レベルにおける変化が妊娠関連高血圧性障害の指標である、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

測定段階が、被検体由来の試料における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段階をさらに含み、正常な参照試料に対するsFlt-1の増加、またはVEGFもしくはPlGFの減少が、妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向の指標である、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 10】

計量を用いて可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPlGFのレベル間の関係を計算する段階をさらに含み、正常な参照試料に対する被検体試料における該レベル間の関係の変化が、該被検体における妊娠関連高血圧性障害の指標である、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

計量が子癇前症抗血管形成指数(PAAI)：[sFlt-1/VEGF+PlGF]である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

10より高いPAAI値が被検体における妊娠関連高血圧性障害の指標である、請求項11記載の方法。

20

【請求項 13】

計量が可溶性エンドグリン抗血管形成指数： $[(sFlt-1 + 0.25 \text{ 可溶性エンドグリン}) / PlGF]$ である、請求項10記載の方法。

【請求項 14】

100より高い可溶性エンドグリン抗血管形成指数値が、被検体における妊娠関連高血圧性障害の指標である、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

計量が $[(\text{可溶性エンドグリン} + sFlt-1) / PlGF]$ である、請求項10記載の方法。

【請求項 16】

計量が、母親のボディマス指数または胎児の在胎齢をさらに含む、請求項11、13、または15記載の方法。

30

【請求項 17】

可溶性エンドグリンが可溶性エンドグリンアイソフォーム、可溶性エンドグリンバリエント、またはエンドグリンの分解産物である、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

妊娠関連高血圧性障害を有するか、または妊娠関連高血圧性障害に対する素因を有するかについて検査する方法であって、被検体由来の試料における可溶性エンドグリン核酸分子のレベルを測定する段階、およびそれを正常な参照と比較する段階を含む方法であり、該参照と比較した該レベルにおける増加が、該被検体が妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を有することを示す、前記方法。

40

【請求項 19】

妊娠関連高血圧性障害が、子癇前症、子癇、妊娠性高血圧、HELLP症候群、慢性高血圧、または胎内発育遅延児を伴う妊娠である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

妊娠関連高血圧性障害が子癇前症または子癇である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

被検体由来の試料におけるsFlt-1、VEGF、またはPlGF核酸分子の少なくとも1つのレベルを測定する段階、およびそれを正常な参照試料と比較する段階をさらに含む方法であって、該参照試料と比較した該レベルにおける変化が、該被検体が妊娠関連高血圧性障害ま

50

たは妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を有することを示す、請求項18～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

妊娠関連高血圧性障害を有するか、または妊娠関連高血圧性障害に対する素因を有するかについて検査する方法であって、被検体由来の試料においてエンドグリン遺伝子の核酸配列を決定する段階、およびそれを正常な参照配列と比較する段階を含む方法であり、該被検体における遺伝子産物の発現レベルを該参照と比較して変化させる被検体の核酸配列における変化が、該被検体が妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を有することを示す、前記方法。

【請求項23】

妊娠関連高血圧性障害が、子癇前症、子癇、妊娠性高血圧、HELLP症候群、慢性高血圧、また胎内発育遅延児を伴う妊娠である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

妊娠関連高血圧性障害が子癇前症または子癇である、請求項23記載の方法。

【請求項25】

前記試料が、可溶性エンドグリンが通常には検出可能である、被検体の体液である、請求項1～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

前記体液が、尿、羊水、血液、血清、血漿、および脳脊髄液からなる群より選択される、請求項25記載の方法。

【請求項27】

前記試料が細胞または組織である、請求項1～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

細胞が、内皮細胞、白血球、単球、または胎盤由来の細胞からなる群より選択される、請求項27記載の方法。

【請求項29】

組織が胎盤組織である、請求項27記載の方法。

【請求項30】

被検体が、妊娠していないヒト、妊娠したヒト、分娩後のヒト、または非ヒトである方法であって、子癇前症または子癇を発症する性向を検査する、請求項1～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

非ヒトが、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30記載の方法。

【請求項32】

レベルの測定段階が2回またはそれ以上の機会に行われ、測定間の該レベルにおける変化が、妊娠関連高血圧性障害の指標である、請求項18～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

症状の発生の少なくとも4週間前に妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を検査するために用いられる、請求項1～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

可溶性エンドグリン核酸配列またはそれと相補的な配列、またはそれらの任意の組み合わせを有する核酸分子、および妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向に対して該核酸分子を用いるための使用説明書を含む、被検体において妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向の検査のためのキット。

【請求項35】

VEGF、sFlt-1、もしくはPlGFの核酸配列、またはそれらと相補的な配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、請求項34記載のキット。

【請求項36】

可溶性エンドグリン結合分子、および妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障

10

20

30

40

50

害を発症する性向の検査のための該可溶性エンドグリン結合分子の使用についての使用説明書を含む、被検体における妊娠関連高血圧性障害の検査のためのキット。

【請求項 37】

可溶性エンドグリン結合分子が、可溶性エンドグリンを特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片である、請求項36記載のキット。

【請求項 38】

VEGF、sFlt-1、またはPlGF結合分子をさらに含む、請求項36または37記載のキット。

【請求項 39】

妊娠関連高血圧性障害が、子癇前症、子癇、慢性高血圧、HELLP症候群、妊娠性高血圧、またSGA児を伴う妊娠である、請求項34～38のいずれか一項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

一般的に、本発明は、妊娠関連高血圧性障害をもつ被検体の検出および処置に関する。

【0002】

連邦政府資金援助による研究に関する言明

本発明は、一部、NIH認可番号DK 064255およびHL 079594による政府からの援助でなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

子癇前症は、妊娠の5～10%を冒し、結果として、実質的な母親および胎児の罹患ならびに死亡を生じる、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、1年あたり世界中の少なくとも200,000人の妊産婦死亡を占める。子癇前症の症状は、典型的には、妊娠第20週目後に現れ、通常、女性の血圧および尿の日常的測定により検出される。しかしながら、これらのモニタリング方法は、効果的な処置が利用できる場合には、被検体または発育中の胎児へのリスクを低減させうる、初期での症候群の診断について効果がない。

【0004】

現在、子癇前症についての公知の治療法はない。子癇前症は、重症度において、軽度から生命を脅かすまで変わりうる。子癇前症の軽度型は、安静および頻繁なモニタリングで処置されうる。中等度から重度までの場合について、入院が勧められ、発作を予防するために血圧薬物療法または抗痙攣薬物療法が処方される。状態が、母親または赤ん坊の生命を脅かすようになる場合には、妊娠は終わらせられ、赤ん坊は出産予定日より早く分娩される。

【0005】

胎児および胎盤の適切な発育は、いくつかの成長因子または血管形成因子により媒介される。これらの血管形成因子の一つは、CD105としても知られている、エンドグリン(endoglin)である。エンドグリンは、主に、シンシチウム栄養芽層、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のような内皮細胞上に、および血管内皮細胞上に発現されるホモ二量体の細胞膜糖タンパク質である。エンドグリンは、 β グリカン、トランスフォーミング成長因子(TGF)- β 受容体III型との配列同一性を有する。エンドグリンは、血管形成、増殖、分化およびアポトーシスを調節するTGF- β 受容体複合体の制御成分であることが示されている。エンドグリンはまた、アクチビン-A、骨形成タンパク質(BMP)-2およびBMP-7を含むTGF- β スーパーファミリーのいくつかの他のメンバーを結合する。特に、エンドグリンは、TGF- β 1およびTGF- β 3を高親和性で結合し、TGF- β シグナル伝達受容体I型およびII型とのヘテロ三量体の会合を形成する。エンドグリン遺伝子のコード領域における突然変異は、出血性毛細血管拡張症1型(HHT1)、多系性血管異形成および再発性出血に特徴づけられる優性遺伝性血管障害、の原因である。エンドグリンの可溶性型もまた同定されており、転移性乳癌

10

20

30

40

50

および結腸直腸癌をもつ患者において増加したレベルで存在することが見出されている；しかしながら、可溶性エンドグリンの癌の発生における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産生は、子癇前症または正常な妊娠と関連しているとは報告されていない。

【0006】

いくつかの要因が、胎児および胎盤の発育と、およびより具体的には、子癇前症と関連があると報告されている。それらは、血管内皮成長因子(VEGF)、可溶性Flt-1受容体(sFlt-1)、および胎盤成長因子(PlGF)を含む。VEGFは、内皮細胞特異的分裂促進因子、血管形成誘導物質、および血管透過性の介在物質である。VEGFはまた、糸球体糸状修復に重要であることが示されている。VEGFは、多くの異なる組織から得られる内皮細胞において異なって発現される、2つの相同性の膜内外にまたがるチロシンキナーゼ受容体、fms様チロシンキナーゼ(fms-like tyrosine kinase)(Flt-1)およびキナーゼドメイン受容体(kinase domain receptor)(KDR)、の1つにホモ二量体として結合する。KDRではなく、Flt-1は、胎盤形成に寄与する栄養芽細胞により高く発現される。PlGFは、また胎盤発育に関与するVEGFファミリーメンバーである。PlGFは、細胞栄養芽層およびシンシチウム栄養芽層により発現され、内皮細胞の増殖、遊走、および活性化を誘導する能力がある。PlGFは、KDR受容体ではなく、Flt-1受容体にホモ二量体として結合する。PlGFおよびVEGFの両方は、発育中の胎盤にとって重大な意味をもつ、分裂促進活性および血管形成に寄与する。

10

【0007】

受容体の膜貫通および細胞質ドメインを欠損するsFlt-1が、最近、ヒト臍静脈内皮細胞の培養培地において同定され、インビボ発現は、その後、胎盤組織において実証された。sFlt-1は、高親和性でVEGFに結合するが、内皮細胞の有糸分裂誘発を刺激しない。

20

【0008】

血管形成および分裂促進のシグナル伝達経路の慎重な制御は、発育中の胎盤において栄養芽細胞による適切な増殖、遊走および血管形成を維持することによって重大な意味をもつ。

【0009】

特に、最も重篤な症状の発生の前に、子癇前症もしくは子癇のリスクがある、または子癇前症もしくは子癇に罹っている被検体を正確に診断する方法の必要性がある。処置もまた必要とされている。

30

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

本発明者らは、子癇前症および子癇を含む妊娠関連高血圧性障害を診断および処置するための方法を発見した。

【0011】

遺伝子発現分析を用いて、本発明者らは、可溶性エンドグリン(sE)のレベルが、子癇前症を含む、高血圧と関連した妊娠合併症を患っている妊婦由来の胎盤組織試料において著しく上昇していることを発見した。エンドグリンは、血管形成を制御するように働くTGF- β 受容体複合体の一部である。エンドグリンは、TGF- β 受容体のリガンドであるTGF- β ファミリーメンバーに高い親和性で結合することができる。冒された個体において、過剰可溶性エンドグリンは、胎盤から必須の血管形成因子および分裂促進因子の必要な量を枯渇させている可能性がある。本発明において、可溶性エンドグリンに結合する、または可溶性エンドグリンを中和する化合物が、可溶性エンドグリンの上昇したレベルを低下させるために用いられる。さらに、可溶性エンドグリンに方向づけられた抗体、加えて生物活性のある可溶性エンドグリンのレベルを低下させることに向けられたRNA干渉およびアンチセンス核酸塩基オリゴマーもまた提供される。最後に、本発明は、子癇前症および子癇、またはそれらに対する素因を含む妊娠関連高血圧性障害の初期診断ならびに管理のための検出ツールとして可溶性エンドグリンレベルの測定を提供する。

40

【0012】

50

従って、一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリンに結合する能力がある化合物を被検体に投与することにより、被検体において子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を処置または予防する方法であって、前記投与が、被検体において妊娠関連高血圧性障害の少なくとも1つの症状を処置または予防するのに十分な時間および量である方法を提供する。妊娠関連高血圧性障害の非限定的例は、子癇前症、子癇、妊娠性高血圧、慢性高血圧、HELLP症候群、および胎内発育遅延(SGA)を伴う妊娠を含む。好ましい態様において、化合物は、可溶性エンドグリンへ特異的に結合する精製された可溶性エンドグリン抗体またはその抗原結合断片である。もう一つの好ましい態様において、化合物は、可溶性エンドグリンを特異的に結合する能力があるTGF- β ファミリーメンバー(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7)のような成長因子またはその断片である。

10

【0013】

もう一つの好ましい態様において、前記方法はまた、精製sFlt-1抗体、sFlt-1抗原結合断片、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、硫酸マグネシウム、VEGF189、VEGF121、VEGF165のようなすべてのアイソフォームもしくはそれらの断片を含む血管内皮成長因子(VEGF)、またはすべてのアイソフォームおよびそれらの断片を含む胎盤成長因子(PlGF)のような化合物を投与する段階を含む方法であって、投与段階が、被検体において妊娠関連高血圧性障害を処置または予防するのに十分な時間および量である方法である。

【0014】

20

もう一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリンに結合する能力がある成長因子のレベルを増加させる化合物(例えば、化学化合物、ポリペプチド、ペプチド、抗体またはその断片)を被検体に投与することにより、被検体において子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を処置または予防する方法を特徴とする。化合物は、妊娠関連高血圧性障害を処置または予防するのに十分な時間および量で投与される。好ましい態様において、化合物は、TGF- β ファミリーメンバー(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7)およびそれらの断片のレベルを増加させる。そのような化合物の非限定的例は、シクロスポリン、 α トコフェロール、メチセルジド、プロモクリプチン、およびアルドメットを含む。

【0015】

30

もう一つの関連局面において、本発明は、成長因子の可溶性エンドグリンポリペプチドへの結合を阻害する化合物(例えば、化学化合物、ポリペプチド、ペプチド、抗体、またはその断片)を被検体に投与することにより、被検体において妊娠関連高血圧性障害を処置または予防する方法を特徴とする。化合物は、妊娠関連高血圧性障害を処置または予防するのに十分な時間および量で投与される。好ましい態様において、化合物は、可溶性エンドグリンに結合して、成長因子の結合を阻止する。そのような化合物の非限定的例は、スクリーニングを通して得られる抗体および低分子化合物を含む。

【0016】

もう一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリン発現または生物活性を低下させる能力がある化合物を被検体に投与することにより、被検体において子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を処置または予防する方法であって、前記投与が被検体において妊娠関連高血圧性障害を処置または予防するのに十分である方法を提供する。好ましい態様において、化合物は、精製された抗体もしくはその抗原結合断片、または以下からなる群より選択されるタンパク分解酵素の酵素活性を阻害する化合物である：マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、カテプシン、またはエラスターゼ。MMPは、MMP 1～26のいずれか1つ、好ましくはMMP9または膜型MMP1を含む。

40

【0017】

望ましくは、可溶性エンドグリンの生物活性を阻害する能力がある化合物は、血管形成アッセイにより測定されるような、エンドグリンの血管形成性活性を阻害するその能力により同定される。そのようなアッセイの一つの例において、子癇前症患者由来の血清が、

50

抗血管形成状態を誘導するためにマトリゲル(matrigel)管形成アッセイにおいて用いられる。化合物は、その後、添加され、抗血管形成状態における10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の低下が、治療的有效化合物を示している。

【0018】

可溶性エンドグリンの生物活性を阻害する能力がある化合物は、可溶性エンドグリンの配列の少なくとも一部と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、99%、または100%相補性である少なくとも1つの鎖を有するアンチセンス核酸塩基オリゴマーでありうる。一つの態様において、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、可溶性エンドグリンの少なくとも8個、10個、好ましくは20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、またはそれ以上の連続したヌクレオチドと相補的であり、可溶性エンドグリンの発現もしくは生物活性を低下または阻害することができる。望ましくは、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、長さが8~30ヌクレオチドである。

10

【0019】

可溶性エンドグリンの生物活性を阻害する能力がある化合物はまた、可溶性エンドグリン核酸分子の配列の少なくとも一部と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、99%、または100%相補性である少なくとも1つの鎖を有する二本鎖RNA(dsRNA)分子でありうる。一つの態様において、二本鎖RNAは、長さが19~25ヌクレオチドである小分子干渉RNA(siRNA)であり、可溶性エンドグリンの発現もしくは生物活性を低下または阻害することができる。追加の好ましい態様において、dsRNAは、可溶性エンドグリン分子の核酸配列の少なくとも18個、好ましくは19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、35個、45個、50個、またはそれ以上の連続したヌクレオチドと100%核酸同一性をもつ。望ましくは、dsRNAはsiRNAである。

20

【0020】

上記局面のいずれかの様々な態様において、方法はさらに、抗高血圧性化合物(例えば、アデノシン、ニフェジピン、ミノキシジル、および硫酸マグネシウム)を被検体に投与する段階を含む。上記局面の他の態様において、被検体は、妊娠したヒト、分娩後のヒト、非妊娠のヒト、または非ヒト(例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコ)である。本発明の治療方法は、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児を伴う妊娠を含む妊娠関連高血圧性障害を処置または予防するために用いられうる。好ましい障害は、子癇前症および子癇である。上記局面の様々な態様において、方法は、治療中に被検体をモニターするために、または有効治療的用量を決定するために、下に記載された本発明の診断方法と組み合わせることができる。

30

【0021】

本発明の任意の治療的局面はまた、精製sFlt-1抗体、sFlt-1抗原結合断片、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、硫酸マグネシウム、VEGF189、VEGF121、もしくはVEGF165のようなすべてのアイソフォームまたはそれらの断片を含む血管内皮成長因子(VEGF)；すべてのアイソフォームおよびそれらの断片を含む胎盤成長因子(PlGF)のような、1つまたは複数の追加の化合物を投与する段階を含み、投与段階は、被検体において子癇前症もしくは子癇を処置または予防するのに十分な時間および量である。そのような化合物の好ましい例は、米国特許出願公開番号20040126828および20050025762、ならびにPCT公開番号WO 2004/008946に記載されている。望ましくは、化合物は、sFlt-1に結合する、またはsFlt-1発現を減少させる能力がある化合物である。

40

【0022】

本発明の治療的局面のいずれかは、単独で、または本発明の1つもしくは複数の追加の方法と組み合わせて用いられうる。一つの例において、MMP阻害剤および抗体が、存在する可溶性エンドグリンを中和するために、および膜結合型の切断による可溶性エンドグリンのさらなる生成をブロックするために、組み合わせて用いられうる。

【0023】

もう一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリンを特異的に結合する精製抗体またはその抗原結合断片を特徴とする。一つの好ましい態様において、抗体は、成長因子

50

(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7)の可溶性エンドグリンへの結合を阻止する。もう一つの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。他の好ましい態様において、抗体またはその抗原結合断片は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。他の態様において、抗体はFc部分を欠損する。さらに他の態様において、抗体は、F(ab')₂、Fab、またはFv構造である。他の態様において、抗体またはその抗原結合断片は、薬学的に許容される担体に存在する。

【0024】

もう一つの局面において、本発明は、被検体由来の試料における可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルを測定する段階を含む、子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害をもつか、またはこれに対する素因をもつと被検体を診断する方法を提供する。好ましい態様において、可溶性エンドグリンのレベルは、遊離型、結合型、または全ての可溶性のエンドグリンのレベルである。いくつかの態様において、可溶性エンドグリンのレベルは、分解または酵素的切断から生じる可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルである。妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向の診断は、正常参照試料と比較した可溶性エンドグリンの相対的レベルにおける変化(例えば、増加)から、または正常な参照値より上である可溶性エンドグリンの絶対的レベルの検出からもたらされうる。例えば、正常には、可溶性エンドグリンの循環血清または血漿濃度は、非妊娠状態で2~7ng/ml、および正常な妊娠中10~20ng/mlの範囲である。可溶性エンドグリンの絶対的レベルの測定を含む態様について、15ng/ml、20ng/mlより高い、または好ましくは25ng/mlより高いレベルが、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の診断指標とみなされる。追加の好ましい態様において、前記方法はさらに、米国特許出願公開番号20040126828、20050025762、および2005017044、ならびにPCT公開番号WO 2004/008946およびWO 2005/077007に記載されているように、被検体由来の試料における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段階を含む。前記方法はまた、被検体由来の試料におけるsFlt-1、VEGF、またはPlGFポリペプチドの少なくとも2つのレベルを測定する段階、および計量(metric)を用いてsFlt-1、VEGF、またはPlGFのレベル間の関係を計算する段階を含むことができ、参照試料に対する被検体試料における変化が、妊娠関連高血圧性障害、または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を診断する。好ましい態様において、前記方法はまた、ボディマス指数(BMI)、胎児の在胎齢(GA)、または両方を測定する段階を含み、このBMIもしくはGAまたは両方を計量に含む。一つの態様において、計量は、子癇前症抗血管形成指数(PAAI)：[sFlt-1/VEGF+PlGF]であり、PAAIが抗血管形成活性の指標として用いられる。一つの態様において、10より大きい、より好ましくは20より大きいPAAIが、子癇前症または子癇を示している。もう一つの態様において、計量は、以下の可溶性エンドグリン抗血管形成指数である：(sFlt-1+0.25(可溶性エンドグリンポリペプチド))/PlGF。可溶性エンドグリン抗血管形成指数の値における増加は、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の診断指標である。例えば、21週~32週の間の75より上の値、または>32週以降の100より上の値は、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害と診断する。本発明の診断方法において有用なもう一つの計量は以下である：(可溶性エンドグリン+sFlt-1)/PlGF。任意の前記方法はまた、ボディマス指数(BMI)、胎児の在胎齢(GA)、または両方を測定する段階を含むことができ、このBMIもしくはGAまたは両方を計量に含む。

【0025】

上記局面の様々な態様において、試料は、尿、羊水、血液、血清、血漿、および脳脊髄液のような体液である。望ましくは、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPlGFポリペプチドのレベルは、ELISAのような免疫学的アッセイにより測定される。もう一つの例において、単独での、または増加したsFlt-1および減少した遊離PlGFもしくはVEGFと組み合わせ、20ng/mlより大きい、好ましくは25ng/mlより大きい可溶性エンドグリンのレベルは、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の診断に用いられる。

【0026】

一つの態様において、可溶性エンドグリンのレベルにおける増加は、子癇前症もしくは

子癇を、または子癇前症もしくは子癇を発症する性向を示している。上記局面の好ましい態様において、測定されるsFlt-1ポリペプチドのレベルは、遊離型、結合型、または全てのsFlt-1ポリペプチドのレベルである。追加の態様において、sFlt-1ポリペプチドはまた、sFlt-1断片、分解生成物、または酵素的切断生成物を含みうる。上記局面の他の好ましい態様において、VEGFまたはPlGFのレベルは、遊離VEGFまたはPlGFのレベルである。

【0027】

もう一つの局面において、本発明は、被検体由来の試料における、エンドグリン核酸分子(例えば、mRNA)、好ましくは可溶性エンドグリン核酸のレベルを測定する段階、およびそれを参照試料と比較する段階を含む、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害をもつか、またはこれに対する素因をもつと被検体を診断する方法であって、参照試料(例えば、正常参照))に対するレベルにおける変化(例えば、増加)が、被検体において子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を有すると診断する、または子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を有すると診断する方法を提供する。追加の態様において、本方法はさらに、被検体由来の試料における、sFlt-1、VEGF、またはPlGF核酸分子(例えば、mRNA)のレベルを測定する段階、およびそれを参照試料と比較する段階を含むことができ、正常な参照試料に対するレベルにおける変化(例えば、VEGFもしくはPlGFのレベルにおける減少、またはsFlt-1のレベルにおける増加)が、被検体において子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を有すると診断するか、または子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を有すると診断する。

【0028】

上記診断局面の好ましい態様において、前記レベルは、2回またはそれ以上の機会に測定され、測定間のレベルにおける変化が、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の診断指標である。一つの好ましい態様において、第一測定から次の測定までの可溶性エンドグリンのレベルにおける増加(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)は、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を診断するために用いられる。上記診断局面のもう一つの態様において、可溶性エンドグリンのレベルは正常な参照試料と比較され、正常な参照試料と比較した可溶性エンドグリンのレベルにおける増加(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)は、子癇前症または子癇を示している。

【0029】

もう一つの局面において、本発明は、被検体においてエンドグリンの核酸配列を決定する段階およびそれを参照配列と比較する段階を含む、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害をもつか、またはこれに対する素因をもつと被検体を診断する方法であって、被検体において遺伝子産物のレベルまたは生物活性を変化させる被検体の核酸配列における変化により、被検体は妊娠関連高血圧性障害、または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向を有すると診断される方法を提供する。一つの態様において、変化は、核酸配列における多型である。もう一つの態様において、sFlt-1、VEGF、もしくはPlGF、またはそれらの任意の組み合わせの遺伝子の核酸配列もまた決定され、参照配列と比較される。被検体において遺伝子産物のレベルまたは生物活性を変化させる、これらの配列のいずれか1つまたは複数における変化により、被検体は妊娠関連高血圧性障害と診断される。

【0030】

上記局面の様々な態様において、前記試料は、可溶性エンドグリンおよびsFlt-1、VEGF、またはPlGFが正常には検出可能である、被検体の体液(例えば、尿、羊水、血液、血清、血漿、または脳脊髄液)である。追加の態様において、試料は、組織または細胞(例えば、胎盤組織または胎盤細胞、内皮細胞、白血球、および単球)である。上記局面の他の態様において、被検体は、非妊娠のヒト、妊娠したヒト、または分娩後のヒトである。上記局面の他の態様において、被検体は、非ヒト(例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコ)である。一つの態様において、被検体は、妊娠していないまたは妊

娠したヒトであり、本方法は、子癇前症または子癇を発症する性向を診断するために用いられる。追加の態様において、BMIまたはGAまたは両方もまた測定される。上記局面の様々な態様において、参照に対する可溶性エンドグリン核酸またはポリペプチドのレベルにおける増加は、子癇前症または子癇の診断指標である。

【0031】

もう一つの局面において、本発明は、被検体由来の試料における、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7のような可溶性エンドグリンリガンドのレベルを測定する段階を含む、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害をもつか、またはこれに対する素因をもつと被検体を診断する方法を提供する。

【0032】

上記の診断局面の任意の様々な態様において、妊娠関連高血圧性障害は、子癇前症、子癇、妊娠性高血圧、慢性高血圧、HELLP症候群、またはSGA児を伴う妊娠である。診断局面のいずれかにおいて、レベルの測定は2回またはそれ以上の機会になされ、測定間のレベルにおける増加は、妊娠関連高血圧性障害の診断指標である。診断方法は、望ましくは、症状の発生の前に(例えば、少なくとも4、5、6、7、8、9、または10週間前に)、妊娠関連高血圧性障害を診断するために用いられる。

【0033】

もう一つの局面において、本発明は、エンドグリン核酸、またはその断片、またはそれと相補的な配列を検出するのに有用な核酸配列を含む、被検体における子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の診断のためのキットを提供する。好ましい態様において、核酸配列は、可溶性エンドグリンをコードする核酸またはその断片に、好ましくは高いストリンジェンシーでハイブリダイズする。好ましい態様において、キットはさらに、sFlt-1、VEGF、またはPlGFを検出するための核酸配列を含む。

【0034】

関連局面において、本発明は、可溶性エンドグリン結合分子(例えば、可溶性エンドグリンを特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片)を含む、被検体における、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の診断のためのキットを提供する。一つの態様において、構成要素は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイ、または比色アッセイである。上記局面の他の態様において、キットは、妊娠した、または妊娠していない被検体において子癇前症または子癇を発症する性向を診断する。上記局面の好ましい態様において、キットはまた、sFlt-1、VEGF、またはPlGFポリペプチドを検出するための構成要素を含む。追加の好ましい態様において、キットは、可溶性エンドグリンを検出するために、ならびにVEGF、sFlt-1、およびPlGFをさらに検出して、試料についての診断用比(例えば、PAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管形成指数)を決定するために用いられる。

【0035】

好ましい態様において、診断用キットは、キット構成要素の意図された使用についてのラベルまたは使用説明書を含む。一つの態様において、診断用キットは、被検体における、子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害、または子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を発症する性向の診断における使用について、ラベルを付されているか、または使用説明書を含む。好ましい態様において、診断用キットは、被検体試料の可溶性エンドグリンのレベルを測定するための、および可溶性エンドグリンレベルを参照値と比較するためのキットの使用についてのラベルまたは使用説明書を含む。参照値は、キットの意図された使用に依存するものであることが、理解されていると思われる。例えば、試料は、正常な可溶性エンドグリン参照値と比較することができ、可溶性エンドグリンレベルにおける増加は、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を示している。試料はまた、子癇前症に罹っていることがわかっている被検体からの値または試料である参照と比較することができ、可溶性エンドグリンレベルにおける減少が、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を示している。

【0036】

関連局面において、本発明は、可溶性エンドグリンポリペプチドもしくは核酸のレベル

10

20

30

40

50

を測定する、および/または参照試料と比較するための構成要素を提供することにより、子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害をもつか、またはこれに対する素因をもつと被検体を診断するための装置であって、正常な参照値と比較しての可溶性エンドグリンのレベルにおける変化が、被検体において子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を診断する装置を特徴とする。好ましい態様において、装置は、尿試料におけるポリペプチドレベルを測定かつ比較するために用いられる側方流動またはディップスティック形式での膜を含む。

【0037】

装置はまた、被検体由来の試料における、可溶性エンドグリンのレベル、ならびにsFlt-1、VEGF、およびPlGFの少なくとも1つの核酸分子またはポリペプチドのレベルを、参照試料に対して比較するための構成要素を含むことができ、可溶性エンドグリン、ならびにsFlt-1、VEGF、およびPlGFの少なくとも1つの核酸分子またはポリペプチドのレベルにおける変化が、被検体において、子癇前症もしくは子癇、または子癇前症もしくは子癇を発症する性向を診断する。好ましい態様において、装置は、可溶性エンドグリンのレベル、ならびにsFlt-1、VEGF、およびPlGFの少なくとも1つの、ポリペプチドのレベルを比較する計量のための構成要素を含む。

【0038】

本明細書に記載された任意の診断方法およびキットはまた、治療中に被検体をモニターするために、または有効治療的用量を決定するために、子癇前症または子癇に罹っている、またはこれらに罹るリスクがあるとすでに診断された被検体をモニターするために用いられうる。一つの例において、治療のモニタリングに用いられるキットは、子癇前症または子癇を示している参照可溶性エンドグリン値をもち得、参照試料に対する被検体試料の可溶性エンドグリン値における減少は、治療用化合物の治療効力または有効量を示すために用いられうる。好ましい態様において、キットは、治療のモニタリングまたは治療用量決定における使用についてラベルを付される、または使用説明書を含み、治療用化合物は、キットに含まれうる。可溶性エンドグリンタンパク質または核酸のレベルは、単独で、またはsFlt-1、VEGF、もしくはPlGFタンパク質もしくは核酸、もしくはそれらの組み合わせのレベルと組み合わせて測定される。追加の好ましい態様において、可溶性エンドグリンのレベルは、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を示している参照試料と比較され、参照試料に対する可溶性エンドグリンのレベルにおける変化(例えば、減少)が、治療用化合物の治療効力または有効量を示している。一つの例において、治療が施される前の値に対する、治療を施している間または後に測定され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における減少(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上)が、妊娠関連高血圧性障害における改善を示す。もう一つの例において、血清または血漿における可溶性エンドグリンの絶対的レベルが測定され、その化合物の治療効力をモニターするために用いられる。例えば、治療用化合物は、好ましくは、可溶性エンドグリンのレベルが、25ng/ml未満、好ましくは20ng/ml未満であるような用量で投与される。

【0039】

sFlt-1の測定を含む上記の治療のモニタリング局面の態様において、sFlt-1ポリペプチドまたは核酸のレベルにおける減少が、子癇前症または子癇における改善を示す。もう一つの態様において、治療用化合物は、sFlt-1ポリペプチドのレベルが2ng/ml未満であるような用量で投与される。VEGFまたはPlGFの測定を含む態様において、治療前の値に対する、治療を施している間または後に測定されるVEGFもしくはPlGFポリペプチドまたは核酸のレベルにおける増加が、子癇前症または子癇における改善を示す。可溶性エンドグリンの測定に加えてのsFlt-1、VEGF、またはPlGFの測定を含む態様において、前記方法は、計量を用いて、sFlt-1、VEGF、またはPlGFのレベル間の関係を計算する段階を含むことができ、参照試料に対する被検体試料におけるそのレベル間の関係における変化が、子癇前症または子癇の診断指標である。そのような計量の一つの例は、PAAIである。この例において、被検体のPAAI値における減少(例えば、20未満、好ましくは10未満)は、子癇前症または

子癇における改善を示す。PAAIにおける減少(例えば、20未満、好ましくは10未満)はまた、治療用化合物の有効量を示しうる。もう一つの例は、以下の可溶性エンドグリン抗血管形成指数であり、その値における増加が、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の診断指標である。

【0040】

診断または治療処置のモニタリングに関する局面の好ましい態様において、ポリペプチドは、ELISAまたはウェスタンブロットのような免疫学的アッセイを用いて測定される。可溶性エンドグリンのレベルは、遊離型、結合型(すなわち、リガンドに結合した)、または全(すなわち、遊離型+結合型)可溶性エンドグリンのレベル、加えて、分解または酵素的切断から生じる可溶性エンドグリンのレベルでありうる。任意のモニタリング方法について、レベルの測定は、2回またはそれ以上の機会に行うことができ、測定間のレベルにおける変化が、子癇前症または子癇の診断指標である。

10

【0041】

もう一つの局面において、本発明は、エンドグリン核酸分子を発現させる細胞を候補化合物と接触させる段階、および候補化合物により接触させられた細胞における核酸分子の発現のレベルを、候補化合物により接触させられていない対照細胞における発現のレベルと比較する段階を含む、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を寛解させる化合物を同定する方法であって、エンドグリン核酸分子の発現における変化が、候補化合物を、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を寛解させるために有用でありうる化合物と同定する方法を提供する。

20

【0042】

もう一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリンポリペプチドを発現させる細胞を候補化合物と接触させる段階、および候補化合物により接触させられた細胞におけるポリペプチドの発現のレベルを、候補化合物により接触させられていない対照細胞におけるポリペプチド発現のレベルと比較する段階を含む、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を寛解させる化合物を同定する方法であって、可溶性エンドグリンポリペプチドの発現における変化が、候補化合物を、妊娠関連高血圧性障害を寛解させるために有用でありうる化合物と同定する方法を提供する。一つの態様において、発現における変化は、免疫学的アッセイ、酵素的アッセイ、またはイムノアッセイを用いてアッセイされる。一つの態様において、発現における変化は、可溶性エンドグリンのレベルにおける減少である。発現における変化は、転写における変化または翻訳における変化に起因しうる。

30

【0043】

もう一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリンポリペプチドを発現させる細胞を候補化合物と接触させる段階、および候補化合物により接触させられた細胞における可溶性エンドグリンポリペプチドの生物活性を、候補化合物により接触させられていない対照細胞における生物活性のレベルと比較する段階を含む、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を寛解させる化合物を同定する方法であって、可溶性エンドグリンポリペプチドの生物活性における変化が、候補化合物を、妊娠関連高血圧性障害を寛解させる化合物と同定する方法を提供する。一つの態様において、変化は、血管形成アッセイ、成長因子結合アッセイ、または本明細書に記載される任意のアッセイを用いてアッセイされるような可溶性エンドグリンの生物活性における減少である。

40

【0044】

もう一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリンポリペプチドおよび候補化合物の結合を検出する段階を含む、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を寛解させる化合物を同定する方法であって、可溶性エンドグリンポリペプチドを結合する化合物が、妊娠関連高血圧性障害を寛解させるために有用でありうる方法を提供する。

【0045】

もう一つの局面において、本発明は、候補化合物の存在下において可溶性エンドグリンポリペプチドと成長因子の間の結合を検出する段階を含む、子癇前症または子癇のような

50

妊娠関連高血圧性障害を寛解させる化合物を同定する方法であって、候補化合物の非存在下における可溶性エンドグリンポリペプチドと成長因子の間の結合に対する結合における減少が、候補化合物を、妊娠関連高血圧性障害を寛解させるために有用でありうる化合物と同定する方法を提供する。一つの態様において、成長因子は、TGF- β ファミリーメンバーである。

【0046】

もう一つの局面において、本発明は、可溶性エンドグリンポリペプチドと成長因子の間の結合を阻止するポリペプチドを同定する方法を提供する。本方法は、候補ポリペプチドの存在下において、可溶性エンドグリンポリペプチドと成長因子の間の結合を検出する段階を含み、候補ポリペプチドの非存在下における可溶性エンドグリンポリペプチドと成長因子の間の結合に対する結合における減少が、候補ポリペプチドを、可溶性エンドグリンポリペプチドと成長因子の間の結合を阻止するポリペプチドと同定する。一つの態様において、成長因子は、TGF- β ファミリーメンバーである。

10

【0047】

関連局面において、本発明は、前の局面に従って同定される化合物を提供し、本化合物は可溶性エンドグリンポリペプチドを特異的に結合し、この可溶性エンドグリンポリペプチドは、TGF- β ファミリーメンバーを結合するのを阻止するポリペプチドである。一つの好ましい態様において、前記ポリペプチドは、可溶性エンドグリンを結合する抗体、好ましくは、可溶性エンドグリンを特異的に結合する抗体である。

【0048】

20

本明細書に記載された方法は、具体的には子癇前症および子癇に言及しているが、本発明の診断方法およびモニタリング方法はまた、限定されるわけではないが、妊娠性高血圧、HELLP症候群、および胎内発育遅延(SGA)児を伴う妊娠を含む高血圧に関連した妊娠の一般的な合併症に適用される。

【0049】

本発明の目的のために、以下の略語および用語が下記に定義される。

【0050】

「変化」とは、下に記載されたもののような標準的な技術分野公知の方法により検出されるような、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルにおける変化(増加または減少)を意味する。本明細書に用いられる場合、変化は、発現レベルにおける10%変化、好ましくは、発現レベルにおける、25%変化、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の変化を含む。「変化」はまた、本発明のポリペプチド(例えば、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPlGF)のいずれかの生物活性における変化(増加または減少)を示しうる。本明細書に用いられる場合、変化は、生物活性における10%変化、好ましくは、生物活性における、25%変化、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の変化を含む。可溶性エンドグリンについての生物活性の例は、血管形成、ならびに、アクチビン-A、BMP-2、BMP-7、TGF- β 1、およびTGF- β 3のような公知のリガンドを用いる結合アッセイである。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であるか、または本明細書に記載されている、リガンド結合アッセイ、免疫アッセイ、および血管形成アッセイにより測定されうる。そのようなアッセイの例は、エンドグリンシグナル伝達の拮抗作用が毛細血管形成の大量の損失へと導く、インビトロのマトリゲル内皮管形成アッセイである(Li et al., FASEB Journal 14:55-64 (2000))。PlGFまたはVEGFについての生物活性の他の例は、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分析により測定されるような受容体への結合、およびBrdU標識、細胞計数実験、または³H-チミジン取り込みのようなDNA合成についての定量的アッセイにより測定されるような細胞増殖または遊走の誘導を含む。sFlt-1についての生物活性の例は、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分析により測定されるような、PlGFおよびVEGFへの結合を含む。ポリペプチドのそれぞれについての生物活性のためのアッセイの追加の例は、本明細書に記載されている。

30

40

【0051】

50

「アンチセンス核酸塩基オリゴマー」とは、長さに関わらず、エンドグリン遺伝子のコード鎖またはmRNAに相補的である核酸塩基オリゴマーを意味する。「核酸塩基オリゴマー」とは、結合群により共に連結された、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。この定義には、共に修飾されたおよび修飾されていない、天然および非天然のオリゴヌクレオチド、加えて、タンパク質核酸、ロックド(locked)核酸、およびアラビノ核酸のようなオリゴヌクレオチド模倣体が含まれる。多数の核酸塩基および結合群を、本発明の核酸塩基オリゴマーに用いることができ、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許公開番号20030114412(例えば、刊行物のパラグラフ27~45参照)および20030114407(例えば、刊行物のパラグラフ35~52参照)に記載されたものを含む。核酸塩基オリゴマーはまた、翻訳開始および終止部位へターゲットされうる。好ましくは、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、約8ヌクレオチドから30ヌクレオチドまでを含む。アンチセンス核酸塩基オリゴマーはまた、エンドグリンmRNAまたはDNAに相補的である少なくとも40個、60個、85個、120個、またはそれ以上の連続したヌクレオチドを含むことができ、完全長mRNAまたは遺伝子と同じくらい長いものであってもよい。

10

【0052】

「ボディマス指数」とは、体重が健康的な範囲内にあるかどうかの一般的な指標を与える、身長および体重測定値を用いることにより導かれる数を意味する。ボディマス指数を決定するために一般的に用いられる式は、2乗されたメートルでの人の身長で割られた、キログラムでの人の体重、すなわち、 $\text{体重(kg)} / (\text{身長(m)})^2$ である。

20

【0053】

「化合物」とは、任意の低分子化学化合物、抗体、核酸分子、もしくはポリペプチド、またはそれらの断片を意味する。本発明の治療方法に特に有用な化合物は、可溶性エンドグリンの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、変化させうる、好ましくは減少させうる。

【0054】

「キメラ抗体」とは、もう一つのタンパク質の少なくとも部分(典型的には、免疫グロブリン定常ドメイン)に連結した、抗体分子の少なくとも抗原結合部分を含むポリペプチドを意味する。

【0055】

「二本鎖RNA(dsRNA)」とは、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方で構成されるリボ核酸分子を意味する。dsRNAは、典型的には、RNA干渉を媒介するために用いられる。

30

【0056】

CD105としても知られている「エンドグリン」とは、エンドグリン生物活性をもち(Fonsatti et al., Oncogene 22:6557-6563, 2003; Fonsatti et al., Curr. Cancer Drug Targets 3:427-432, 2003参照)、以下のGenBankアクセッション番号のいずれかにより定義されるか、またはU.S.P.N. 6,562,957に記載されている、タンパク質と相同性である、哺乳動物の成長因子を意味する：AAH29080およびNP_031958(マウス)；AAS67893(ラット)；NP_000109、P17813、VSP_004233、およびCAA80673(ヒト)；ならびにA49722(ブタ)。エンドグリンは、胎盤由来の増殖性血管細胞およびシンシチウム栄養芽層において高レベルで発現されるホモ二量体の細胞膜糖タンパク質である。細胞内側の末端において47アミノ酸だけ異なる、エンドグリンの2つの別個のアイソフォーム、LおよびS、がある。両方のアイソフォームは、本明細書に用いられる場合、エンドグリンという用語に含まれる。エンドグリンは、TGF- β ファミリーメンバーに結合し、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と会合して、成長因子への応答を増強することができる。エンドグリン生物活性は、アクチビン-A、BMP-2、BMP-7、TGF- β 1、およびTGF- β 3のようなTGF- β ファミリーメンバーへの結合；血管形成の誘導、細胞増殖、接着、遊走、浸潤の制御；ならびに、内皮細胞の活性化を含む。エンドグリン生物活性についてのアッセイは、当技術分野において公知であり、リガンド結合アッセイまたはスクッチャードプロット分析；細胞増殖を測定するために用いられる、BrdU標識、細胞計数実験、ま

40

50

たは³H-チミジン取り込みのようなDNA合成についての定量的アッセイ；ならびに本明細書に、またはMcCarty et al., Intl. J. Oncol. 21:5-10, 2002; Akhtar et al. Clin. Chem. 49:32-40, 2003; およびYamashita et al., J. Biol. Chem. 269:1995-2001, 1994に記載されたもののような血管形成アッセイを含む。「可溶性エンドグリン」とは、そのタンパク質の細胞外部分の少なくとも一部を含む(図1参照)、エンドグリンの任意の循環している、非膜結合型を意味する。可溶性エンドグリンは、タンパク分解酵素によりエンドグリンの膜結合型の切断から生じうる。1つの可能性のある切断部位は、エンドグリンポリペプチドのアミノ酸1位～437位を含む可溶性エンドグリンポリペプチドを生じるアミノ酸437位にある(図2Aおよび2B参照)。理論に縛られるつもりはないが、可溶性エンドグリンにより保持された細胞外リガンド結合ドメインは、それがTGF-β1およびTGF-β3のようなリガンドを結合するのを可能にし、それにより、結果として生じる、TGF-βにおける欠乏を引き起こしている可能性が高い。さらに、エンドグリンは内皮特異的分子であるため、TGF-β欠乏が、内皮細胞において最大である可能性が高い。可溶性エンドグリンはまた、エンドグリンの酵素的切断から生じ、かつエンドグリン生物活性を維持する、循環している分解生成物または断片を含みうる。可溶性エンドグリンの生物学的機能は、現時点では知られていないが、TGF-βおよび他の公知のリガンドの欠乏を引き起こすことが予想される。可溶性エンドグリン生物活性は、遊離アクチビンAまたは遊離TGF-β3のレベルを測定することにより、または当技術分野において公知の、もしくは本明細書に記載された血管形成アッセイを用いることにより、アッセイされうる。

【0057】

「エンドグリン核酸」とは、上記の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、ヒトエンドグリンについての遺伝子は、14個のエクソンからなり、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、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参照)。望ましくは、エンドグリン核酸は、可溶性エンドグリンをコードする(図2A参照)。

【0058】

「発現」とは、標準的な技術分野公知の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、ポリペプチド発現は多くの場合ウェスタンブロッティングにより検出され、DNA発現は多くの場合サザンブロッティングまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により検出され、RNA発現は多くの場合ノーザンブロッティング、PCR、またはRNアーゼプロテクションアッセイにより検出される。

【0059】

「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の部分を意味する。この部分は、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個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、もしくは100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、もしくは1000個のヌクレオチドまたはアミノ酸を含みうる。好ましくは、可溶性エンドグリンの断片は、4個から437個までのアミノ酸、および10個から1311個までのヌクレオチドを含む。

【0060】

「在胎齢」とは、通常、週で呼ばれる、母親の最後の月経期間の第1日目から数えた、胎児の週齢を意味する。

【0061】

「妊娠性高血圧」とは、妊娠20週間後の、タンパク尿を伴わない、高い血圧の発生を意味する。

【0062】

「子癇前症または子癇の病歴」とは、被検体自身における、または関係のある家族メンバーにおける、子癇前症または子癇または妊娠誘導性高血圧の以前の診断を意味する。

【0063】

「相同的な」とは、比較配列の長さに対して公知の遺伝子またはタンパク質配列と少なくとも30%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%またはそれ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。「相同的な」タンパク質はまた、比較タンパク質の少なくとも1つの生物活性をもちうる。一般的に、タンパク質について、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、または少なくとも437アミノ酸もしくはそれ以上である。核酸について、比較配列の長さは、一般的に、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、または少なくとも1311ヌクレオチドもしくはそれ以上である。「相同性」はまた、抗体を産生するために用いられるエピトープと、抗体が向けられるタンパク質またはその断片との間の実質的な類似性を指しうる。この場合、相同性は、問題になっているタンパク質を特異的に認識することができる抗体の産生を誘発するのに十分な類似性を指す。

10

【0064】

「ヒト化抗体」とは、あらかじめ決められた抗原に結合する能力がある免疫グロブリンアミノ酸配列変異体またはその断片を意味する。通常、抗体は、軽鎖、加えて重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含む。抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、またはCH4領域を含みうる。ヒト化抗体は、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するフレームワーク領域(FR)、および実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列(「インポート(import)」配列)を有する相補性決定領域(CDR)を含む。

20

【0065】

一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト起源から抗体へ導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。一般的に、ヒト化抗体は、CDR領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのそれらと対応し、FR領域の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれらである、少なくとも1つの、および典型的には2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab_c、Fv)の実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも部分を含む。「相補性決定領域(CDR)」とは、免疫グロブリン軽鎖および重鎖のそれぞれの内の可変領域における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および重鎖の3つの超可変配列(CDR)のどちらの側にも位置しているアミノ酸の配列を意味する。

30

【0066】

ヒト化抗体のFRおよびCDR領域は、親の配列と正確に対応している必要はなく、例えば、インポートCDRまたはコンセンサスFRは、その部位でのCDRまたはFR残基がコンセンサスまたはインポート抗体のいずれとも対応していないように、少なくとも1つの残基の置換、挿入または欠失により突然変異させられうる。そのような突然変異は、しかしながら、広範ではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%、好ましくは90%、および最も好ましくは少なくとも95%が、親のFRおよびCDR配列のそれらと対応している。

【0067】

「ハイブリダイズする」とは、様々なストリンジェンシー条件下で、相補的ポリヌクレオチド配列またはその部分の間で二重鎖分子を形成しうる対を意味する。(例えば、Wahl and Berger Methods Enzymol. 152:399, 1987; Kimmel, Methods Enzymol. 152:507, 1987参照。)例えば、ストリンジェントな塩濃度は、普通、約750mM NaClおよび75mM クエン酸三ナトリウム未満、好ましくは約500mM NaClおよび50mMクエン酸三ナトリウム未満、および最も好ましくは約250mM NaClおよび25mMクエン酸三ナトリウム未満である。低ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、有機溶媒、例えば、ホルムアミドの非存在下で得ることができ、一方、高ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、少なくとも約35%ホルムアミド、および最も好ましくは少なくとも約50%ホルムアミドの存在下で得られうる。ストリンジェントな温度条件は、普通、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℃の温度を含む。ハイブリダイゼーシ

40

50

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の包含または排除のような変化する追加のパラメーターは、当業者に周知である。様々なストリンジェンシーレベルは、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り達成される。好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム、および1% SDSにおいて30℃で起こる。より好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、500mM NaCl、50mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、35%ホルムアミド、100 µg/ml変性サケ精子DNA(ssDNA)において37℃で起きる。最も好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、250mM NaCl、25mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、50%ホルムアミド、および200 µg/ml ssDNAにおいて42℃で起きる。これらの条件における有用なバリエーションは、当業者にとって容易に明らかであると思われる。

10

【0068】

たいていの適用について、ハイブリダイゼーションに続く洗浄段階もまた、ストリンジェンシーによって異なる。洗浄ストリンジェンシー条件は、塩濃度により、および温度により定義されうる。上記のように、洗浄ストリンジェンシーは、塩濃度を減少させることにより、または温度を上昇させることにより、増加されうる。例えば、洗浄段階についてのストリンジェントな塩濃度は、好ましくは約30mM NaClおよび3mM クエン酸三ナトリウム未満、および最も好ましくは約15mM NaClおよび1.5mMクエン酸三ナトリウム未満である。洗浄段階についてのストリンジェントな温度条件は、普通、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℃の温度を含む。好ましい態様において、洗浄段階は、30mM NaCl、3mMクエン酸三ナトリウム、および0.1% SDSにおいて25℃で起きる。より好ましい態様において、洗浄段階は、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1% SDSにおいて42℃で起きる。最も好ましい態様において、洗浄段階は、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および0.1% SDSにおいて68℃で起きる。これらの条件における追加のバリエーションは、当業者にとって容易に明らかであると思われる。ハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知であり、例えば、Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel 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に記載されている。

20

30

【0069】

「子宮内発育遅延(IUGR)」とは、胎児の在胎齢に対して予想される胎児体重の10パーセント少ない出生時体重を結果として生じる症候群を意味する。低出生時体重についての最新のWorld Health Organization基準は、人種、経産回数、および産児性別による在胎齢についての出生時体重のU.S.表により、2,500gm(5lbs. 8oz.)未満、または在胎齢について第10パーセンタイルより下の体重である(Zhang and Bowes, Obstet. Gynecol. 86:200-208, 1995)。これらの低出生時体重の赤ん坊はまた、「胎内発育遅延(SGA)」とも呼ばれる。子癇前症は、IUGRまたはSGAに関連していることが知られている状態である。

【0070】

40

「計量」とは測度を意味する。計量は、例えば、対象となるポリペプチドまたは核酸分子のレベルを比較するために用いられうる。例示的な計量は、限定されるわけではないが、比率のような、数式またはアルゴリズムを含む。用いられうる計量は、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害に罹っている被検体、および正常な対照被検体において、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、PlGFまたはそれらの任意の組み合わせのレベル間を最善に識別するものである。用いられる計量に依存して、妊娠関連高血圧性障害の診断指標は、有意に、参照値(例えば、妊娠関連高血圧性障害に罹っていない対照被検体からの)より上または下でありうる。可溶性エンドグリンレベルは、遊離型、結合型(すなわち、成長因子に結合した)、または全(遊離型+結合型)可溶性エンドグリンの量を測定することにより決定される。sFlt-1レベルは、遊離型、結合型(すなわち、成長因子に結合

50

した)、または全sFlt-1(結合型+遊離型)の量を測定することにより測定される。VEGFまたはPlGFレベルは、遊離PlGFまたは遊離VEGF(すなわち、sFlt-1に結合していない)の量を測定することにより決定される。1つの例示的な計量は、子癇前症抗血管形成指数(PAAI)とも呼ばれる、 $[sFlt-1/(VEGF+PlGF)]$ である。もう一つの例は、以下の可溶性エンドグリン抗血管形成指数である： $(sFlt-1+0.25(\text{可溶性エンドグリンポリペプチド}))/PlGF$ 。可溶性エンドグリン抗血管形成指数の値における増加は、子癇前症または子癇の診断指標である。さらにもう一つの例示的な計量は以下である： $(\text{可溶性エンドグリン}+sFlt-1)/PlGF$ 。任意の本発明の計量のいずれかはさらに、母親のBMIまたは乳児のGAを含みうる。

【0071】

「子癇前症抗血管形成指数(PAAI)」とは、抗血管形成活性の指標として用いられるsFlt-1/VEGF+PlGFの比率を意味する。10より大きい、好ましくは20より大きいPAAIは、子癇前症または子癇前症のリスクのような、妊娠関連高血圧性障害を示している。

10

【0072】

「可溶性エンドグリン抗血管形成指数」とは、 $(sFlt-1+0.25\text{可溶性エンドグリン})/PlGF$ の比率を意味する。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、子癇前症または子癇のような高血圧に関連した妊娠合併症を示している。

【0073】

「実施可能に連結された」とは、適切な分子(例えば、転写活性化タンパク質)が制御配列に結合している場合、遺伝子発現を可能となるように、遺伝子および制御配列が接続されていることを意味する。

20

【0074】

「薬学的に許容される担体」とは、それが共に投与される化合物の治療的性質を保持すると同時に、処置される哺乳動物にとって生理学的に受け入れられる担体を意味する。1つの例示的な薬学的に許容される担体物質は、生理食塩水である。他の生理学的に受け入れられる担体およびそれらの製剤は、当業者に公知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, (第20版), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PAに記載されている。

【0075】

「胎盤成長因子(PlGF)」は、GenBankアクセッション番号P49763により定義されるタンパク質と相同的であり、かつPlGF生物活性をもつ、哺乳動物成長因子を意味する。PlGFは、VEGFファミリーに属するグリコシル化ホモ二量体であり、選択的スプライシング機構を通して2つの別個のアイソフォームに見出されうる。PlGFは、胎盤における細胞栄養芽層およびシンシチウム栄養芽層により発現され、PlGF生物活性は、内皮細胞、特に栄養芽細胞の増殖、遊走、および活性化の誘導を含む。

30

【0076】

「多型」とは、子癇前症または子癇を発症する性向を示す、可溶性エンドグリン、sFlt-1、PlGF、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。そのような多型は、当業者に公知であり、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'領域に存在しうる。エンドグリン遺伝子におけるそのような多型の公知の例は、エクソン7の3'末端を越えた26塩基でのイントロン7におけるGGGGGAの6塩基挿入を含む(Ann. Neurol. 41:683-6, 1997)。

40

【0077】

「妊娠関連高血圧性障害」とは、血圧における上昇と関連している、または、により特徴づけられる任意の妊娠の状態または疾患を意味する。これらの状態の中には、子癇前症(早発性子癇前症、重度子癇前症を含む)、子癇、妊娠性高血圧、HELLP症候群(溶血、肝臓酵素の上昇、血小板の低下)、胎盤早期剥離、慢性高血圧、子宮内発育制限を伴う妊娠、および胎内発育遅延(SGA)児を伴う妊娠が含まれる。SGA児を伴う妊娠は高血圧とあまり関連していないが、この定義に含まれることは留意されるべきである。

50

【0078】

「子癇前症」とは、妊娠もしくは最近の妊娠の影響による、タンパク尿もしくは浮腫もしくは両方をもつ高血圧、糸球体機能不全、脳浮腫、肝臓浮腫、または凝固異常により特徴づけられる多系障害を意味する。早発性、軽度、中程度、および重度子癇前症のような子癇前症のすべての型がこの定義に含まれる。子癇前症は、一般的に、妊娠期間の第20週目後に起こる。子癇前症は、一般的に、以下の症状のいくつかの組み合わせとして定義される：(1)妊娠20週間後の収縮期血圧(BP)>140mmHgおよび拡張期BP>90mmHg(一般的に、4～168時間離して、2回測定される)、(2)新たに発生したタンパク尿(尿検査におけるディップスティックで1+、24時間尿収集における>300mgのタンパク質、またはタンパク質/クレアチニン比率>0.3をもつ単一ランダム尿試料)、ならびに(3)分娩後12週間目までの高血圧およびタンパク尿の消散。重度子癇前症は、一般的に、(1)収縮期BP>110mmHg(一般的に、4～168時間離して、2回測定される)、または(2)24時間尿収集における3.5g以上のタンパク質の測定もしくはディップスティックで少なくとも3+のタンパク質をもつ2つのランダム尿検体により特徴づけられるタンパク尿として定義される。子癇前症において、高血圧およびタンパク尿は、一般的に、お互いの7日間以内に起こる。重度子癇前症において、重度高血圧、重度タンパク尿およびHELLP症候群(溶血、肝臓酵素の上昇、血小板の低下)または子癇が、同時に、または一度に一症状のみ起きうる。HELLP症候群は、血小板減少(<100000細胞/ μ l)、LDH増加(>600IU/L)、およびAST増加(>70IU/L)の徴候により特徴づけられる。時々、重度子癇前症は、発作の発生をもたらし得る。この重度型症候群は、「子癇」と呼ばれる。子癇はまた、肝臓(例えば、肝細胞損傷、門脈周囲壊死)および中枢神経系(例えば、脳浮腫および脳出血)のようないくつかの器官もしくは組織への機能不全または損傷を含む。発作の病因は、脳浮腫の発生、および腎臓における微小血管の焦点性痙攣に続発すると考えられる。

10

20

【0079】

「早発性子癇前症」とは、<37週間または<34週間で症状が発生する子癇前症を意味する。

【0080】

「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もしくはペプチドの全部もしくは一部を構成する、または天然に存在しないポリペプチドもしくはペプチドを構成する、翻訳後修飾(例えば、グリコシル化またはリン酸化)に関わらず、2個より多いアミノ酸の任意の鎖を意味する。

30

【0081】

「参照試料」とは、比較目的のために用いられる、任意の試料、標準、またはレベルを意味する。「正常な参照試料」は、同じ被検体から採取された以前の試料、子癇前症または子癇のようないずれの妊娠関連高血圧性障害にも罹っていない妊娠した被検体由来の試料、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害に罹っていない妊娠した被検体由来の試料、妊娠している被検体であるが、試料が妊娠初期に(例えば、妊娠第1期もしくは第2期において、または子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害の検出の前)採取された、妊娠しており、かつ子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害の病歴をもたない被検体、妊娠していない被検体、公知の正常な濃度での(すなわち、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害を示していない)精製参照ポリペプチドの試料でありうる。「参照標準またはレベル」とは、参照試料から引き出された値または数を意味する。正常な参照標準またはレベルは、以下の基準の少なくとも1つにより試料被検体と一致している正常被検体から引き出された値または数でありうる：胎児の在胎齢、母親の年齢、母親の妊娠前の血圧、母親の妊娠中の血圧、母親のBMI、胎児の体重、子癇前症または子癇の前の診断、および子癇前症または子癇の家族歴。「陽性参照」試料、標準、または値は、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害に罹っていることが分かっており、以下の基準の少なくとも1つより試料被検体と一致している、被検体から引き出された試料または値または数である：胎児の在胎齢、母親の年齢、母親の妊娠前の血圧、母親の妊娠中の血圧、母親のBMI、胎児の体重、妊娠関連高血圧性障害の前の診断、

40

50

および妊娠関連高血圧性障害の家族歴。

【0082】

「低下させる、または阻害する」とは、未処理の試料と比較して、前記のアッセイ(「発現」参照)により検出される、タンパク質または核酸のレベルにおける、好ましくは20%以上の、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の変化の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。

【0083】

「試料」とは、被検体から得られる、組織生検、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)または他の検体を意味する。望ましくは、生体試料は、可溶性エンドグリン核酸分子またはポリペプチドまたは両方を含む。

10

【0084】

「小分子干渉RNA(siRNA)」とは、分解されるべき標的遺伝子またはmRNAを同定するために用いられる、好ましくは10ヌクレオチド長より長い、より好ましくは15ヌクレオチド長より長い、および最も好ましくは19ヌクレオチド長より長い、単離されたdsRNA分子を意味する。19~25ヌクレオチドの範囲が、siRNAについての最も好ましいサイズである。siRNAはまた、siRNA二重鎖の両方の鎖が単一のRNA分子内に含まれる短いヘアピンRNAを含みうる。siRNAは、dsRNAの任意の型(より大きなdsRNAのタンパク分解性に切断された生成物、部分的に精製されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え技術によって産生されたRNA)、加えて、1つもしくは複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換、および/または変化により天然に存在するRNAと異なる変化したRNAを含む。そのような変化は、19、20、21、22、23、24、もしくは25 nt RNAの末端または内部(RNAの1個または複数のヌクレオチドにおいて)等への、非ヌクレオチド物質の付加を含みうる。好ましい態様において、RNA分子は、3'ヒドロキシル基を含む。本発明のRNA分子におけるヌクレオチドはまた、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む非標準ヌクレオチドを含みうる。集合的に、すべてのそのような変化したRNAは、RNAの類似体と呼ばれる。本発明のsiRNAは、RNA干渉(RNAi)を媒介する能力をもつように天然RNAに十分類似しさえすればよい。本明細書に用いられる場合、RNAiは、小分子干渉RNAもしくはdsRNAの細胞または生物体への導入を通じた特定のmRNA分子のATP依存性ターゲット化切断および分解を指す。本明細書に用いられる場合、「RNAiを媒介する」とは、どのRNAが分解されることになっているかを識別または同定する能力を指す。

20

30

【0085】

「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を特異的に結合するタンパク質または低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の1つもしくは複数のCDR領域、または可溶性エンドグリン相互作用タンパク質でありうる。

【0086】

「可溶性Flt-1(sFlt-1)」(sVEGF-R1としても知られている)とは、GenBankアクセッション番号U01134により定義されるタンパク質と相同的であり、かつsFlt-1生物活性をもつ、Flt-1受容体の可溶性型を意味する。sFlt-1ポリペプチドの生物活性は、任意の標準方法を用いて、例えば、VEGFへのsFlt-1結合をアッセイすることにより、アッセイされうる。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損する。sFlt-1は、高親和性でVEGFおよびPlGFに結合することができるが、それは、増殖または血管形成を誘導することができず、それゆえに、Flt-1およびKDR受容体とは機能的に異なる。sFlt-1は、最初は、ヒト臍内皮細胞から精製されたが、後に、インビボで栄養芽細胞により産生されることが示された。本明細書に用いられる場合、sFlt-1は、任意のsFlt-1ファミリーメンバーまたはアイソフォームを含む。sFlt-1はまた、Flt-1受容体の酵素的切断から生じ、かつsFlt-1生物活性を維持する、分解生成物または断片も意味する。一つの例において、胎盤から放出される特定の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末端部分を循環へ放出しうる。

40

【0087】

50

「特異的に結合する」とは、自然に本発明のポリペプチドを含む試料、例えば生体試料において、本発明のポリペプチドを認識かつ結合するが、他の分子を実質的に認識かつ結合しない、化合物または抗体を意味する。一つの例において、可溶性エンドグリンを特異的に結合する抗体は、膜結合型エンドグリンを結合しない。もう一つの例において、可溶性エンドグリンへ特異的に結合する抗体は、可溶性エンドグリンに固有であるエンドグリンのアミノ酸1位～437位内の領域を認識するが、完全長エンドグリンを認識しない。

【0088】

「被検体」とは、限定されるわけではないが、ヒト、またはウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、もしくはネコのような非ヒト哺乳動物を含む、哺乳動物を意味する。この定義には、妊娠した、分娩後の、および妊娠していない哺乳動物が含まれる。

【0089】

「実質的に同一の」とは、例えば、下記の方法を用いて、最適に整列された場合、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%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。「実質的同一性」は、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、ならびにゲノム配列のような、様々な型および長さの配列に言及するために用いられうる。2つのポリペプチドまたは核酸配列の間のパーセント同一性は、当技術分野における技術範囲内である様々な方法で決定され、例えば、Smith Waterman Alignment(Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) J Mol Biol 147:195-7); GeneMatcher Plus(商標)へ組み入れられているような「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 pp 353-358; BLASTプログラム(Basic Local Alignment Search Tool; (Altschul, S.F., W. Gish, et al. (1990) J Mol Biol 215:403-10)), BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL, またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを用いる。さらに、当業者は、比較されることになっている配列の長さに対して最高アラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメーターを決定することができる。一般的に、タンパク質について、比較配列の長さは、少なくとも10個のアミノ酸、好ましくは、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、110個、120個、130個、140個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、または少なくとも437個のアミノ酸もしくはそれ以上である。核酸について、比較配列の長さは、一般的に、少なくとも25個、50個、100個、125個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、550個、600個、650個、700個、800個、900個、1000個、1100個、1200個、または少なくとも1311個のヌクレオチドもしくはそれ以上である。DNA配列をRNA配列と比較する場合の配列同一性を決定する目的のために、チミンヌクレオチドは、ウラシルヌクレオチドと等価であることは理解されている。保存的置換は、典型的には、以下の群内での置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

【0090】

「子癇前症の症状」とは、以下のいずれかを意味する：(1)妊娠20週間後の収縮期血圧(BP)>140mmHgおよび拡張期BP>90mmHg、(2)新たに発生したタンパク尿(尿検査におけるディップスティックで1+、24時間尿収集における>300mgのタンパク質、またはランダム尿のタンパク質/クレアチニン比率>0.3)、ならびに(3)分娩後12週間目までの高血圧およびタンパク尿の消散。子癇前症の症状はまた、腎臓機能障害および糸球体内皮症または肥大を含むうる。「子癇の症状」とは、妊娠または最近の妊娠の影響による以下の症状のいずれかの発生を意味する：発作、昏睡、血小板減少、肝臓浮腫、肺浮腫、および脳浮腫。

【0091】

「トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)」とは、TGF- β 生物活性をもち、かつ脊椎動物において偏在的に見出される構造的に関連したパラ分泌ポリペプチドのファミリーのメンバーで、後生動物の成長、分化、および形態形成因子の大ファミリーの原型である、哺乳動物成長因子を意味する(概説として、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) 参照)。Kingsley, 前記において記載されているように、TGF- β スーパーファミリーは、少なくとも25のメンバーを有し、高度に関連した配列で別個のサブファミリーへグループ化される。最も明らかなサブファミリーは以下を含む: TGF- β スーパーファミリーの他のメンバーとよりも著しくTGF- β 1と類似している少なくとも4つの遺伝子を含む、TGF- β サブファミリー; 2つのサブユニットであるインヒビン β -Aおよびインヒビン β -Bのホモ二量体またはヘテロ二量体を含むアクチビンサブファミリー。皮膚下または筋肉内へ移植された場合、異所性骨および軟骨の形成を誘導しうる、哺乳動物因子BMP2およびBMP4を含む、decapentaplegicサブファミリー。BMP5~8を含む、骨誘導性活性をもつ、いくつかの哺乳動物相同体を含む60Aサブファミリー。TGF- β スーパーファミリーの他のメンバーは、グロス分化因子1(gross differentiation factor 1)(GDF-1)、GDF-3/VGR-2、dorsalin、nodal、ミューラー管抑制物質(MIS)、およびグリア由来神経栄養性成長因子(GDNF)を含む。DPPおよび60Aサブファミリーは、TGF- β スーパーファミリーの他のメンバーとよりも互いにより密接に関連し、DVR(dppおよびvg1関連)と呼ばれる分子のより大きな集団の一部として共に多くの場合分類されていることが注目される。それが用いられている文脈から明らかでない限り、本明細書を通して用いられる場合、TGF- β という用語は、それぞれに見合ったTGF- β スーパーファミリーのメンバーを一般的に指すと理解されているものと思われる。(Massague et al, *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-91, 1998; Josso et al, *Curr. Op. Gen. Dev.*, 7:371-377, 1997)。TGF- β は、多くの細胞型において、成長、分化、運動性、組織リモデリング、神経形成、創傷修復、アポトーシス、および血管形成を制御するように機能する。TGF- β はまた多くの細胞型において細胞増殖を阻害し、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。

【0092】

「治療的量」とは、子癇前症または子癇を患っている患者へ投与された場合、本明細書に記載されているような子癇前症または子癇の症状において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。「治療的量」はまた、子癇前症または子癇を患っている患者へ投与された場合、本明細書に記載されたアッセイにより測定されるような、エンドグリンもしくはsFlt-1の発現レベルにおける低下、またはVEGFもしくはPlGFの発現レベルにおける増加を引き起こすのに十分である量を意味する。

【0093】

「処置すること」とは、治療的目的として、化合物または薬学的組成物を投与することを意味する。「疾患を処置する」、または「治療的処置」の使用は、疾患をすでに患っている被検体へ、被検体の状態を改善するように処置を施すことを指す。好ましくは、被検体は、下記の特徴的な症状のいずれかの同定、または下記の診断方法の使用に基づいて、子癇前症または子癇のような高血圧に関連した妊娠合併症を患っていると診断されている。「疾患を予防する」とは、まだ病気ではないが、特定の疾患を発症しやすいか、でなければ発症するリスクがある被検体の予防的処置を指す。好ましくは、被検体は、本明細書に記載された診断方法を用いて、子癇前症または子癇を発症するリスクがあると決定されている。このように、特許請求の範囲および態様において、処置するとは、治療的または予防的のいずれかを目的としての哺乳動物への施与である。

【0094】

「栄養芽層」とは、子宮粘膜を浸食し、それを通して胚芽が母親から栄養を受ける、胚盤胞を覆う外胚葉系中胚葉細胞層を意味する; 細胞は、胎盤の形成に寄与する。

【0095】

「血管内皮成長因子(VEGF)」とは、米国特許第5,332,671号; 第5,240,848号; 第5,194,

10

20

30

40

50

596号；およびCharnock-Jones et al. (Biol. Reproduction, 48:1120-1128, 1993)に定義された成長因子と同族であり、かつVEGF生物活性をもつ、哺乳動物成長因子を意味する。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つの異なる選択的にスプライスされたアイソフォームを含む。天然のVEGFの生物活性は、血管内皮細胞または臍静脈内皮細胞の選択的増殖の促進および血管形成の誘導を含む。本明細書に用いられる場合、VEGFは、任意のVEGFファミリーメンバーまたはアイソフォームを含む(例えば、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF189、VEGF165、またはVEGF121)。好ましくは、VEGFは、VEGF121またはVEGF165アイソフォーム(Tischer et al., J. Biol. Chem. 266, 11947-11954, 1991; Neufeld et al. Cancer Metastasis 15:153-158, 1996)であり、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,447,768号；第5,219,739号；および第5,194,596号に記載されている。Gille et al. (J. Biol. Chem. 276:3222-3230, 2001)に記載されたKDR選択性VEGFおよびFlt選択性VEGFのようなVEGFの突然変異型もまた含まれる。本明細書に用いられる場合、VEGFはまた、LeCouter et al. (Science 299:890-893, 2003)に記載されたもののようなVEGFの任意の改変型も含まれる。ヒトVEGFが好ましいが、本発明は、ヒト型に限定されず、VEGFの他の動物の型を含みうる(例えば、マウス、ラット、イヌ、またはニワトリ)。

【0096】

「ベクター」とは、DNAの断片が挿入されうる、またはクローニングされうる、通常、プラスミドまたはバクテリオファージに由来するDNA分子を意味する。組換えベクターは、1つまたは複数の固有の制限部位を含み、クローニングされた配列が再生可能であるように、確定した宿主または媒体生物体において自律複製の能力がありうる。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で、RNAが発現されるように、遺伝子またはコード領域に実施可能に連結されたプロモーターを含む。

【0097】

本発明の他の特徴および利点は、それらの好ましい態様の以下の説明から、および特許請求の範囲から明らかであると思われる。

【0098】

詳細な説明

本発明者らは、可溶性エンドグリンが、子癇前症または子癇のような妊娠関連高血圧性障害をもつ女性から採取された血清試料において上昇していることを発見した。可溶性エンドグリンは、タンパク分解酵素による膜結合型の細胞外部分の切断により形成されうる。過剰可溶性エンドグリンは、胎盤から、これらの必須の血管形成因子および分裂促進因子の必要な量を枯渇させている可能性がある。従って、可溶性エンドグリンは、子癇前症または子癇を含む妊娠関連高血圧性障害の優れた診断マーカーである。さらに、本発明者らは、可溶性エンドグリンの成長因子への結合に干渉する治療作用物質、可溶性エンドグリン発現もしくは生物活性を低下させる作用物質、または成長因子のレベルを増加させる作用物質が、被検体において、子癇前症もしくは子癇のような妊娠関連高血圧性障害を処置または予防するために用いられうることを発見した。そのような作用物質は、限定されるわけではないが、可溶性エンドグリンに対する抗体、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についてのオリゴヌクレオチド、成長因子のレベルを増加させる化合物、エンドグリンの膜結合型のタンパク分解性切断を阻止し、それにより可溶性エンドグリンの放出を阻止する化合物、および可溶性エンドグリンを結合し、成長因子結合部位をブロックする低分子を含む。本発明はまた、子癇前症または子癇を含む妊娠関連高血圧性障害の初期診断および管理のための検出ツールとして可溶性エンドグリンのレベルを測定するための方法の特徴とする。

【0099】

本明細書に示された詳細な説明は、具体的には、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、またはPlGFに言及しているが、詳細な説明はまた、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、もしくはPlGFのファミリーメンバー、アイソフォーム、および/または変異体に適用できる。

【0100】

診断

本発明は、子癇前症、子癇のような妊娠関連高血圧性障害、またはそのような状態を発症する性向に関する、可溶性エンドグリンの検出に基づいたアッセイを特徴とする。本明細書に記載された方法は、具体的には、子癇前症および子癇に言及しているが、本発明の診断およびモニタリングは、限定されるわけではないが、妊娠性高血圧、胎内発育遅延(SGA)児を伴う妊娠、HELLP、慢性高血圧、子癇前症(軽度、中程度、および重度)、および子癇を含む任意の妊娠関連高血圧性障害に適用されることは理解されるべきである。

【0101】

エンドグリンのレベル、遊離型レベル、結合型レベルまたは全レベルのいずれか、は被検体試料において測定され、子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向の指標として用いられる。

【0102】

子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体は、可溶性エンドグリンポリペプチドの発現における増加を示す。可溶性エンドグリンポリペプチドは、完全長可溶性エンドグリン、分解生成物、可溶性エンドグリンの選択的にスプライスされたアイソフォーム、可溶性エンドグリンの酵素的切断生成物などを含みうる。可溶性エンドグリンポリペプチドを特異的に結合する抗体は、子癇前症もしくは子癇の診断のために、またはそのような状態を発症するリスクがある被検体を同定するために、用いられうる。本発明の方法において有用な抗体の1つの例は、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である(カタログ#sc-20072)。そのようなポリペプチドの発現における変化を測定するための様々なプロトコールは、免疫学的方法(ELISAおよびRIAなど)を含め、公知であり、子癇前症もしくは子癇またはそのような状態を発症するリスクを診断するための基盤を提供する。繰り返すが、可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルにおける増加は、子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体の診断となる。

【0103】

可溶性エンドグリンのレベルの上昇は、子癇前症または子癇の陽性指標である。例えば、可溶性エンドグリンのレベルが参照に対して増加している(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上)場合には、これは、子癇前症または子癇の陽性指標とみなされる。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PlGFのレベルにおける任意の検出可能な変化は、子癇、子癇前症、またはそのような状態を発症する性向を示している。正常には、可溶性エンドグリンの循環血清濃度は、非妊娠状態における2~7ng/ml、正常な妊娠における10~20ng/mlの範囲である。可溶性エンドグリンの、15ng/mlより高い、好ましくは20ng/mlより高い、および最も好ましくは25ng/mlより高い上昇した血清レベルは、子癇前症の陽性指標とみなされる。

【0104】

一つの態様において、可溶性エンドグリンのレベルは、sFlt-1、VEGF、もしくはPlGFポリペプチドまたは核酸、またはそれらの任意の組み合わせのレベルと組み合わせて測定される。sFlt-1、VEGF、およびPlGFの測定のための方法は、全体として参照により本明細書に組み入れられている、PCT公開番号WO 2004/008946および米国公開番号20040126828に記載されている。追加の好ましい態様において、ボディマス指数(BMI)および胎児の在胎齢もまた測定され、診断用の計量に含まれる。

【0105】

一つの態様において、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、もしくはPlGF、またはそれらの任意の組み合わせを組み入れる計量は、そのタンパク質の少なくとも2つのレベル間の関係が、子癇前症または子癇を示しているかどうかを決定するために用いられる。一つの例において、計量は、子癇前症、子癇またはそのような状態を発症する性向の診断となる抗血管形成指数として可溶性エンドグリン測定と組み合わせて用いられる、PAAI(sFlt-1/VEGF+PlGF)である。可溶性エンドグリンのレベルが参照試料に対して増加し(例えば、

1.5倍、2倍、3倍、4倍、または10倍もしくはそれ以上ほどまでも)、かつPAAIが10より大きい、より好ましくは20より大きい場合には、被検体は、子癇前症、子癇に罹っている、または同じものを発症する差し迫ったリスクの状態にあるとみなされる。PAAI(sFlt-1/VEGF+PlGF)比率は、単に、診断指標として用いられうる有用な計量の一つの例にすぎない。それは、本発明を限定することを意図されない。事実上、正常な対照に対して、被検体において、可溶性エンドグリン、sFlt-1、PlGF、もしくはVEGFまたはそれらの任意の組み合わせのレベルにおける変化を検出する任意の計量は、診断指標として用いられうる。もう一つの例は、以下の可溶性エンドグリン抗血管形成指数である： $(sFlt-1+0.25(\text{可溶性エンドグリンポリペプチド}))/PlGF$ 。可溶性エンドグリン計量の値における増加は、子癇前症または子癇の診断指標である。100より上の、好ましくは200より上の、可溶性エンドグリン指数は、子癇前症または子癇の診断指標である。もう一つの例は、以下の指数である： $(\text{可溶性エンドグリン}+sFlt-1)/PlGF$ 。指数はさらに、母親のBMIまたは産児のGAを含みうる。

10

【0106】

標準方法は、限定されるわけではないが、尿、血清、血漿、唾液、羊水、または脳脊髄液を含む、任意の体液において可溶性エンドグリン、VEGF、PlGF、またはsFlt-1ポリペプチドのレベルを測定するために用いられうる。そのような方法は、イムノアッセイ；ELISA；可溶性エンドグリン、VEGF、PlGF、またはsFlt-1に方向づけられた抗体を用いるウェスタンブロッティング；ならびにOng et al. (Obstet. Gynecol. 98:608-611, 2001)およびSu et al. (Obstet. Gynecol., 97:898-904, 2001)に記載されたもののような定量的酵素イムノアッセイ技術を含む。ELISAアッセイは、可溶性エンドグリン、VEGF、PlGF、またはsFlt-1のレベルを測定するための好ましい方法である。好ましくは、可溶性エンドグリンが測定される。

20

【0107】

エンドグリン、sFlt-1、PlGF、もしくはVEGF核酸配列由来のオリゴヌクレオチドまたはそれより長い断片は、発現をモニターするためだけでなく、子癇前症または子癇を発症しうる素因を示している、エンドグリン、sFlt-1、PlGF、もしくはVEGF核酸分子における遺伝的変異、突然変異、または多型を有する被検体を同定するためにも、プローブとして用いられうる。これらの多型は、核酸もしくはポリペプチドの発現レベルまたは生物活性に影響を及ぼしうる。そのような多型は、当業者に公知であり、例えば、Raab et al., 前記、およびParry et al. (Eur. J Immunogenet. 26:321-3,1999)により記載されている。例えば、エンドグリン遺伝子における多型が記載されており、これらの多くは、遺伝性出血性毛細血管拡張症I型(HHT1)として知られている優性血管障害と関連している。これらの突然変異の多くは、不安定である可溶性型のエンドグリンの産生をもたらし、結果として、HHT患者の内皮細胞および単球に見出されるエンドグリンの発現の減少を生じる(Raab et al., 前記)。もう一つの例において、GenBankデータベース(www.ncbi.nlm.nih.gov)の調査により、Flt-1/sFlt-1の遺伝子およびプロモーター領域における少なくとも330個の既知の多型が明らかになる。正常な参照試料に対する遺伝的変異、突然変異、または多型の検出は、子癇前症、子癇、または子癇前症もしくは子癇を発症する性向の診断指標として用いられうる。

30

40

【0108】

そのような遺伝的变化は、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'領域に存在しうる。遺伝的变化に関連した情報は、被検体を、子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつと診断するために用いられうる。全体を通して述べられているように、可溶性エンドグリン、sFlt-1、VEGF、もしくはPlGF、またはそれらの任意の組み合わせのレベルまたは生物活性における特定の変化は、子癇前症もしくは子癇、またはそれらに対する素因の可能性と相関しうる。結果として、所定の突然変異を検出した当業者は、その後、その突然変異が、子癇前症もしくは子癇の可能性を引き起こすまたは増加させるかどうかを決定するために、そのタンパク質の生物活性の1つまたは複数をアッセイしうる。

50

【0109】

一つの態様において、子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体は、エンドグリン、好ましくは可溶性エンドグリン、もしくはsFlt-1をコードする核酸の発現における増加、またはPlGFもしくはVEGFレベルにおける変化を示す。そのような変化を検出するための方法は、当技術分野において標準であり、Ausubel et al., 前記に記載されている。一つの例において、ノーザンブロットングまたはリアルタイムPCRは、エンドグリン、好ましくは可溶性エンドグリン、sFlt-1、PlGF、またはVEGF mRNAレベルを検出するために用いられる。

【0110】

ゲノム配列を含むエンドグリンもしくは可溶性エンドグリン核酸分子、または密接に関連した分子を検出する能力があるPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションは、子癇前症もしくは子癇に罹っている、またはそのような状態を発症するリスクがある被検体由来の核酸配列にハイブリダイズさせるために用いられうる。プローブの特異性、それが高度に特異的な領域、例えば、5'制御領域から作製されているか、またはより低い特異性の領域、例えば、保存されたモチーフから作製されているか、およびハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジент性(最高、高い、中間、または低い)が、プローブが天然に存在する配列、対立遺伝子変異体、または他の関連配列にハイブリダイズするかどうかを決定する。ハイブリダイゼーション技術は、可溶性エンドグリン核酸分子において子癇前症もしくは子癇を示す突然変異を同定するために用いられうる、または可溶性エンドグリンポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルをモニターするために用いられうる(例えば、ノーザン分析により、Ausubel et al., 前記)。

【0111】

さらにもう一つの態様において、被検体は、エンドグリンまたは可溶性エンドグリン核酸分子の配列の直接的分析により、子癇前症または子癇を発症する性向について診断されうる。

【0112】

本明細書に記載された核酸またはポリペプチドのいずれかの測定は、少なくとも2つの異なる時において起こる可能性があり、経時的な、正常な参照レベルと比較したレベルにおける変化は、子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向の指標として用いられる。

【0113】

子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体の体液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いずれかのレベルは、正常な対照被検体におけるレベルに対して、または同じ被検体の同じ体液から得られた以前の試料採取に対して、少なくとも10%、20%、30%、もしくは40%、または多くも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上、増加しうる。子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体の体液におけ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つの測定から次へと経時的に、少なくとも10%、20%、30%、もしくは40%、または多くも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、変化しうる。

【0114】

子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体の体液における可溶性エンドグリンのレベルと共に測定されるsFlt-1、VEGF、またはPlGFのレベルは、正常な対照におけるsFlt-1、VEGF、またはPlGFのレベルに対して、少なくとも10%、20%、30%、もしくは40%、または多くも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上変化しうる。子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体の体液における可溶性エンドグリンのレベルと共に測定されるsFlt-1、VEGF、またはPlGFのレベルは、1つの測定から次へと時間が経って、少なくとも10%、20%、30%、もしくは40%、または多くも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、変化しうる。

【0115】

一つの態様において、体液(例えば、尿、血漿、血清、羊水、または脳脊髄液)の被検体

10

20

30

40

50

試料は、子癇前症症状の発生の前の妊娠の初期に収集される。もう一つの例において、試料は、子癇前症症状の発生の前の妊娠の初期に収集された組織または細胞でありうる。組織および細胞の非限定的例は、胎盤組織、胎盤細胞、内皮細胞、および単球のような白血球を含む。ヒトにおいて、例えば、母親の血清試料が、妊娠の第1期、第2期または第3期中に妊婦の肘正中静脈から収集される。好ましくは、アッセイは、妊娠第1期中、例えば、4、6、8、10、もしくは12週間目、もしくはその中での任意の間隔において、または妊娠第2期中、例えば、14、16、18、20、22、もしくは24週間目、もしくはその中での任意の間隔において行われる。そのようなアッセイはまた、妊娠第2期または第3期の終わりに、例えば、26、28、30、32、34、36、または38週間目、またはその中での任意の間隔において行われうる。可溶性エンドグリンのレベルは、この期間中2回、測定されることが好ましい。分娩後の子癇前症または子癇の診断について、可溶性エンドグリンについてのアッセイは、分娩後に行われうる。子癇前症または子癇を発症する性向の診断について、アッセイは、妊娠の発生の前に行われる。一つの例において、治療のモニタリングおよび管理について、アッセイは、子癇前症の診断後、妊娠中に行われる。

10

【0116】

一つの特定の例において、連続的な血液試料が妊娠中に収集され、可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルがELISAにより測定されうる。もう一つの例において、試料は、妊娠第2期中および妊娠第3期の初期に収集され、最初の試料採取から次回までの可溶性エンドグリンのレベルにおける増加は、子癇前症もしくは子癇、またはいずれをも発症する性向を示している。

20

【0117】

本発明はまた、被検体由来の体液、好ましくは尿における可溶性エンドグリン(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7)リガンドの任意のリガンドの測定を含み、可溶性エンドグリンリガンドのレベルにおける変化(例えば、増加または減少)が、子癇前症または子癇を示している。

【0118】

獣医学診療において、アッセイは、妊娠中のいつでも行われうるが、好ましくは、子癇前症症状の発生の前の妊娠の初期に行われる。妊娠の期間が種間で幅広く変動することを考慮すれば、アッセイのタイミングは、獣医により決定されるが、一般的に、ヒト妊娠中のアッセイのタイミングに対応する。

30

【0119】

本明細書に記載された診断方法は、子癇前症もしくは子癇の、存在、重症度、または発症の推定時期のより正確な診断のために、個々に、または本明細書に記載された任意の他の診断方法と組み合わせて用いられうる。さらに、本明細書に記載された診断方法は、子癇前症もしくは子癇の、存在、重症度、または発症の推定時期の正確な診断に有用であると決定された任意の他の診断方法と組み合わせて用いられうる。

【0120】

本明細書に記載された診断方法はまた、被検体において子癇前症または子癇をモニターし、かつ管理するために用いられうる。一つの例において、治療は、血液、血漿、または血清可溶性エンドグリンレベルが25ng/mlより低くなるまで施される。もう一つの例において、被検体が、正常な対照に対して可溶性エンドグリンの増加したレベルをもつと測定された場合には、治療は、血清PlGFレベルが約400pg/mLまで上昇するまで施されうる。この態様において、可溶性エンドグリン、sFlt-1、PlGFおよびVEGF、またはこれらのあらゆるすべてのレベルが疾患を診断するだけでなく、子癇前症および子癇の処置ならびに管理をモニターする方法として繰り返して測定される。

40

【0121】**診断用キット**

本発明はまた、診断用検査キットを提供する。例えば、診断用検査キットは、可溶性エンドグリンに対する抗体、および抗体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、およびより好ましくは評価するための手段を含みうる。検出について、抗体かま

50

たは可溶性エンドグリンポリペプチドのいずれかが標識され、可溶性エンドグリンポリペプチド-抗体相互作用が、抗体と可溶性エンドグリンポリペプチドの間の結合後、基質に付着した標識の量を測定することにより確立されうるように、抗体かまたは可溶性エンドグリンポリペプチドのいずれかは、基質に結合している。通常のELISAは、抗体-基質相互作用を検出するための一般的な、技術分野公知の方法であり、本発明のキットと共に提供されう。可溶性エンドグリンポリペプチドは、限定されるわけではないが、尿、血清、血漿、唾液、羊水、または脳脊髄液を含む、事実上いかなる体液においても、検出されう。本発明はまた、可溶性エンドグリン核酸のレベルを検出かつ測定するために用いられう可溶性エンドグリン核酸を含む診断用検査キットを提供する。正常な対照に存在するレベルのような参照に対する、可溶性エンドグリンポリペプチドのレベルにおける変化を測定するキットは、本発明の方法において診断用キットとして有用である。

10

【0122】

本発明の診断用キットは、米国特許出願公開番号20040126828、20050025762、および2005017044、ならびにPCT公開番号WO 2004/008946およびWO 2005/077007に記載されているような、sFlt-1、VEGF、もしくはPlGFポリペプチドまたは核酸の検出のための抗体または核酸を含みう。

【0123】

望ましくは、キットは、上記の任意の診断方法を行うために必要とされる任意の構成要素を含む。例えば、キットは、望ましくは、膜を含み、可溶性エンドグリン結合性作用物質または可溶性エンドグリン結合性作用物質を結合する作用物質が、膜に固定化されている。膜はディップスティック構造により支持することができ、試料はディップスティック構造を試料中へ置くことにより膜上に沈着させる、または膜は側方流動カセットに支持させることができ、試料はカセットにおける開口部を通して膜上に沈着される。

20

【0124】

診断用キットはまた、一般的に、キット構成要素の意図された使用についてのラベルまたは使用説明書、および標準曲線を確立するために用いられう参照試料または精製タンパク質を含む。一つの例において、キットは、子癇前症、子癇、または子癇前症もしくは子癇を発症する性向の診断のためのキットの使用についての使用説明書を含む。さらにもう一つの例において、キットは、子癇前症もしくは子癇の処置のための治療的処置または投与計画をモニターするためのキットの使用についての使用説明書を含む。診断用キットはまた、被検体試料のPAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管形成指数を決定するための、およびPAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管形成指数を参照試料値と比較するためのキットの使用についてのラベルまたは使用説明書を含みう。参照試料値は、キットの意図された使用に依存することは理解されているものと思われる。例えば、試料は、正常な参照値と比較することができ、PAAIもしくは可溶性エンドグリン抗血管形成指数における、または可溶性エンドグリン値における増加が、子癇前症もしくは子癇、または子癇前症もしくは子癇を発症する性向を示している。もう一つの例において、治療のモニタリングのために用いられるキットは、子癇前症または子癇を示している、参照PAAIまたは可溶性エンドグリン抗血管形成指数値または可溶性エンドグリン値を有することができ、参照試料に対する被検体試料の、PAAIもしくは可溶性エンドグリン抗血管形成指数値における減少、または可溶性エンドグリン値における減少が、治療用化合物の治療的抗力または有効量を示すように用いられう。

30

40

【0125】

スクリーニングアッセイ

上で考察されているように、可溶性エンドグリン核酸またはポリペプチドのレベルは、子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体において増加している。これらの発見に基づいて、本発明の組成物は、発現が子癇前症または子癇に罹っている被検体において変化している、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調節するものを同定するための候補化合物の高処理量で低コストなスクリーニングに有用である。

50

【0126】

任意の数の方法が、可溶性エンドグリン核酸分子の発現を変化させる新しい候補化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを行うのに利用できる。一つの実施例において、候補化合物は、可溶性エンドグリン核酸配列を発現させる培養細胞の培地へ様々な濃度で添加される。例示的な細胞培養物は、栄養芽層(例えば、BEWO、JAR、およびJEG細胞)およびHUVECを含む。高レベルの膜結合型エンドグリンを発現させる細胞は、可溶性エンドグリンを形成するようにエンドグリンの細胞外ドメインを切断するプロテイナーゼ(例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ)で処理されうる。これらの細胞は、その後、新しい候補化合物についてスクリーニングするために用いられうる。遺伝子発現は、その後、例えば、マイクロアレイ、ノーザンブロット分析(Ausubel et al., 前記)、またはRT-PCRにより、ハイブリダイゼーションプローブとしてその核酸分子から調製された任意の適切な断片を用いて測定される。候補化合物の存在下における遺伝子発現のレベルは、候補化合物を欠く対照培地において測定されたレベルと比較される。可溶性エンドグリン遺伝子、核酸分子、またはポリペプチド、またはそれらの機能的等価物の発現において減少を促進する化合物は、本発明において有用とみなされる；そのような分子は、例えば、被検体において子癇前症または子癇を処置するための治療用物質として用いられうる。

10

【0127】

もう一つの実施例において、候補化合物の効果が、ポリペプチド産生のレベルにおいて、同じ一般的なアプローチ、および可溶性エンドグリンポリペプチドに特異的な抗体でのウェスタンブロットティングまたは免疫沈降のような標準免疫学的技術を用いて、測定されうる。例えば、イムノアッセイは、生物体において本発明のポリペプチドの少なくとも1つの発現を検出またはモニターするために用いられうる。そのようなポリペプチドへ結合する能力があるポリクローナルまたはモノクローナル抗体(上記のように産生された)が、ポリペプチドのレベルを測定するために任意の標準イムノアッセイ形式(例えば、ELISA、ウェスタンブロット、またはRIAアッセイ)で用いられうる。いくつかの態様において、可溶性エンドグリンポリペプチドの発現または生物活性における減少を促進する化合物は、特に有用とみなされる。繰り返すが、そのような分子は、例えば、被検体において、子癇前症もしくは子癇、または子癇前症もしくは子癇の症状を遅らせる、寛解させる、または処置するための治療用物質として用いられうる。

20

【0128】

さらにもう一つの実施例において、候補化合物は、可溶性エンドグリンポリペプチドへ特異的に結合するものについてスクリーニングされうる。そのような候補化合物の効力は、そのようなポリペプチドまたはその機能的等価物と相互作用するその能力に依存している。そのような相互作用は、任意の数の標準結合技術および機能アッセイ(例えば、Ausubel et al., 前記、に記載されたもの)を用いて容易にアッセイされうる。一つの態様において、候補化合物は、本発明のポリペプチドを特異的に結合するその能力についてインビトロで試験されうる。もう一つの態様において、候補化合物は、可溶性エンドグリンポリペプチドならびにTGF- β 、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP-2、およびBMP-7のような成長因子の結合を減少させることにより可溶性エンドグリンポリペプチドの生物活性を減少させるその能力について試験される。

30

40

【0129】

もう一つの実施例において、可溶性エンドグリン核酸は、検出可能なレポーターとの転写性または翻訳性融合物として発現され、誘導性プロモーターのような異種性プロモーターの制御下で単離された細胞(例えば、哺乳動物または昆虫細胞)において発現される。融合タンパク質を発現させる細胞は、その後、候補化合物と接触させられ、その細胞における検出可能なレポーターの発現が、未処理の対照細胞における検出可能なレポーターの発現と比較される。可溶性エンドグリン検出可能レポーターの発現を減少させる候補化合物は、子癇前症または子癇の処置に有用である化合物である。好ましい態様において、候補化合物は、核酸に融合したレポーター遺伝子または核酸の発現を変化させる。

【0130】

50

ある特定の実施例において、可溶性エンドグリンポリペプチドに結合する候補化合物は、クロマトグラフィーに基づいた技術を用いて同定されうる。例えば、本発明の組換えポリペプチドは、ポリペプチド(例えば、上記のもの)を発現させるように操作された細胞から標準技術により精製することができ、カラムに固定化されうる。候補化合物の溶液をその後カラムに通過させ、可溶性エンドグリンポリペプチドに特異的な化合物がポリペプチドに結合し、カラム上に固定化されるその能力に基づいて同定される。化合物を単離するために、カラムは、非特異的に結合した分子を除去するために洗浄され、対象となる化合物は、その後、カラムから遊離されて、収集される。類似した方法は、ポリペプチドマイクロアレイに結合した化合物を単離するために用いられうる。この方法(または任意の他の適切な方法)により単離された化合物は、必要ならさらに精製されうる(例えば、高速液体クロマトグラフィーにより)。さらに、これらの候補化合物は、可溶性エンドグリンポリペプチドの活性を減少させるそれらの能力について試験されうる。このアプローチにより単離された化合物はまた、例えば、ヒト被検体において、子癇前症または子癇を処置するための治療用物質として用いられうる。10mM以下の親和性定数で本発明のポリペプチドに結合すると同定される化合物は、本発明において特に有用とみなされる。または、任意のインビボタンパク質相互作用検出系、例えば、任意の2-ハイブリッドアッセイが、本発明のポリペプチドに結合する化合物またはタンパク質を同定するために利用されうる。

10

【0131】

可能性のあるアンタゴニストは、可溶性エンドグリン核酸配列または可溶性エンドグリンポリペプチドに結合する有機分子、ペプチド、ペプチド模倣体、ポリペプチド、核酸、および抗体を含む。

20

【0132】

可溶性エンドグリンDNA配列はまた、子癇前症または子癇の処置のための治療用化合物の発見および開発において用いられうる。発現による、コードされたタンパク質は、薬物のスクリーニングのための標的として用いられうる。さらに、コードされたタンパク質のアミノ末端領域をコードするDNA配列またはシャイン・ダルガノもしくは他の翻訳促進配列が、標準技術により単離されうる(Ausubel et al., 前記)。

【0133】

任意で上記アッセイのいずれかにおいて同定された化合物は、可溶性エンドグリンの生物活性を減少させる化合物についてのアッセイにおいて有用と確認されうる。

30

【0134】

本発明の小分子は、好ましくは、2,000ダルトン未満、より好ましくは330ダルトンと1,000ダルトンの間、および最も好ましくは400ダルトンと700ダルトンの間の分子量をもつ。これらの小分子は有機分子であることが好ましい。

【0135】

試験化合物および抽出物

一般的に、可溶性エンドグリンポリペプチドの活性を減少させる能力がある化合物は、当技術分野において公知の方法により、天然産物もしくは合成(もしくは半合成)抽出物の両方の大きなライブラリーまたは化学的ライブラリーから、またはポリペプチドもしくは核酸ライブラリーから同定される。試験抽出物または化合物の正確な源が本発明のスクリーニング手順にとって重要ではないことを、薬物発見および開発の分野における業者は理解しているものと思われる。スクリーニングにおいて用いられる化合物は、公知の化合物(例えば、他の疾患または障害に用いられる公知の治療用物質)を含みうる。または、事実上、未知の化学的抽出物または化合物のいくつでも、本明細書に記載された方法を用いてスクリーニングされうる。そのような抽出物または化合物の例は、限定されるわけではないが、植物に、真菌に、原核生物に、または動物に基づいた抽出物、発酵ブロス、および合成化合物、加えて現存の化合物の改変を含む。多数の方法もまた、限定されるわけではないが、糖に、脂質に、ペプチドに、および核酸に基づいた化合物を含む任意の数の化学化合物のランダムなまたは定方向性合成(例えば、半合成または全合成)を生じるのに有効

40

50

である。合成化合物ライブラリーは、Brandon Associates(Merrimack, NH)およびAldrich Chemical(Milwaukee, WI)から市販されている。または、細菌、真菌、植物、および動物抽出物の形をとる天然化合物のライブラリーは、Biotics(Sussex, UK)、Xenova(Slough, UK)、Harbor Branch Oceanographics Institute(Ft. Pierce, FL)およびPharmaMar, U.S.A.(Cambridge, MA)を含む、いくつかの供給元から市販されている。加えて、天然のおよび合成的に作製されたライブラリーは、必要に応じて、当技術分野において公知の方法に従って、例えば、標準抽出および分画方法により作製される。さらに、必要に応じて、任意のライブラリーまたは化合物は、標準の化学的、物理的、または生化学的方法を用いて容易に改変される。

【0136】

10

加えて、薬物発見および開発の技術分野における業者は、デレプリケーション(dereplication)(例えば、分類学的デレプリケーション、生物学的デレプリケーション、および化学的デレプリケーション、またはそれらの任意の組み合わせ)、または脱皮攪乱活性について既知の物質の反復試験もしくは繰り返しの排除のための方法が、可能ならいつでも用いられるべきであることを容易に理解している。

【0137】

粗抽出物が、可溶性エンドグリンポリペプチドの活性を減少させること、または可溶性エンドグリンポリペプチドに結合することが見出される場合、陽性リード抽出物のさらなる分画が、観察された効果の原因である化学的成分を単離するために必要である。従って、抽出、分画、および精製過程の目的は、可溶性エンドグリンポリペプチドの活性を減少させる粗抽出物内の化学的実体の注意深い特徴づけおよび同定である。そのような不均一な抽出物の分画および精製の方法は、当技術分野において公知である。必要に応じて、ヒト子癇前症または子癇の処置のための治療用物質として有用であることが示された化合物は、当技術分野において公知の方法により化学修飾される。

20

【0138】

治療用物質

本発明は、被検体において子癇前症もしくは子癇を処置または予防するための方法および組成物を特徴とする。可溶性エンドグリンのレベルが、子癇前症、子癇をもつ、またはそのような状態に対する素因をもつ被検体において増加していることを考慮すれば、可溶性エンドグリンポリペプチドもしくは核酸分子の発現レベルおよび/または生物活性を減少させる任意の作用物質が、本発明の方法において有用である。そのような作用物質は、可溶性エンドグリンのリガンドへの結合を乱すことができるTGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、またはBMP7のような化合物；可溶性エンドグリンを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干渉を媒介するために用いられるdsRNAを含む。追加の有用な化合物は、例えば、血管形成アッセイにより測定されるような、可溶性エンドグリンの生物活性を変化させることができる任意の化合物を含む。例示的な処置方法は下で詳細に記載されている。これらの方法はまた、PCT公開番号WO 2004/008946およびU.S.特許公開番号20040126828に記載されているような、sFlt-1レベルを減少させるための、またはVEGFもしくはPlGFレベルを増加させる、もしくはsFlt-1レベルを減少させるための方法と組み合わせられうる。

30

40

【0139】

TGF- β シグナル伝達経路をターゲティングする治療用物質

TGF- β は、多くの細胞型において増殖、分化、運動性、組織リモデリング、神経形成、創傷修復、アポトーシス、および血管形成を制御する少なくとも25個の成長因子のファミリーの原型である。TGF- β はまた、多くの細胞型において細胞増殖を抑制し、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。それが用いられている文脈から証明されない限り、本明細書全体を通して用いられる場合、TGF- β という用語は、一般的には、それぞれに見合ったTGF- β スーパーファミリーのありとあらゆるメンバーを指すと理解されるものとする。可溶性エンドグリンは、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン、BMP-2、およびBMP-7を含むTGF- β ファミリーのいくつかの特定のメンバーを結合し、発育中の胎児または胎

50

盤からこれらの必要な分裂促進性および血管形成性因子を枯渇させるように働きうる。本発明は、可溶性エンドグリンに結合しうる、および可溶性エンドグリンの効果を中和しうるこれらのリガンドのレベルを増加させる方法の特徴とする。

【0140】

精製タンパク質

本発明の好ましい態様において、限定されるわけではないが、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、およびBMP7を含むTGF- β ファミリータンパク質のような任意の可溶性エンドグリンリガンドの精製された形が、子癇前症もしくは子癇を処置または予防するために被検体に投与される。

【0141】

精製TGF- β ファミリータンパク質は、血管形成を誘導することができる、TGF- β 1もしくはTGF- β 3、または任意の公知のTGF- β ファミリーメンバーのアミノ酸配列と、相同的である、より望ましくは、実質的に同一である、アミノ酸配列をもつ任意のタンパク質を含む。非限定的例は、R & D Systems, MNからのヒトTGF- β 1(カタログ#240-B-002)およびヒトTGF- β 3(カタログ#243-B3-002)を含む。

【0142】

エンドグリンのタンパク分解性切断を阻害する治療用化合物

本発明者らは、タンパク分解酵素がエンドグリンの膜結合型を切断し、可溶性型として細胞外ドメインを放出しうる、エンドグリンの細胞外ドメインにおける可能性のある切断部位を同定した。本発明者らの、切断部位の配列アラインメントは、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)が、可溶性エンドグリンの切断および放出に関与しうることを示唆している。または、カテプシンまたはエラスターゼもまた、切断事象に関与しうる。MMPはまた、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、およびストロメライシンとしても知られており、現在、26個の公知のファミリーメンバーがある(概説として、Whittaker and Ayscough, Cell Transmissions 17:1 (2001)参照)。好ましいMMPは、子癇前症患者由来の胎盤において上方制御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インヒビター(TIMPS)のような内因性インヒビターによる抑制を通して制御される。MMPのインヒビターは、亜鉛結合タンパク質である。Whittaker et al., 前記、に概説されているが、4つの公知の内因性インヒビター(TIMP1~4)がある。一つの好ましいMMPインヒビターは、 β グリカン、エンドグリンとの類似性を有する分子を切断することが示されている膜型MMP1のインヒビターである(Velasco-Loyden et al., J. Biol. Chem. 279:7721-7733 (2004))。加えて、様々な天然に存在するおよび合成のMMPインヒビターが同定されており、またWhittaker et al., 前記、に概説されている。例は、MMPへ方向づけられた抗体、ならびにマリマスタット(marimastat)、バチマスタット(batimastat)、CT1746、BAY 12-9566、プリノマスタット(Prinomastat)、CGS-27023A、D9120、BMS275291(Bristol Myers Squibb)、およびトロケード(trocade)を含む様々な化合物を含み、それらの一部は、現在、臨床試験中である。可溶性エンドグリンレベルの放出および上方制御におけるMMP、カテプシン、またはエラスターゼの可能性のある役割を仮定すれば、本発明はまた、被検体における子癇前症もしくは子癇の処置または予防のための、可溶性エンドグリンの切断および放出に関与する任意の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上記のもののような任意の化合物の使用を提供する。

【0143】

可溶性エンドグリン結合タンパク質を増加させる治療用化合物

本発明は、被検体における子癇前症の処置または予防のための、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、およびBMP7を含む可溶性エンドグリン結合タンパク質の血清レベルを刺激するまたは増加させ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、または上記の精製タンパク質、もしくは本明細書に記載されたTGF- β ファミリータンパク質のタンパク質レベルを増加させるために用いられる他の方法のいずれかと組み合わせて用いられうる。一つの例において、シクロスポリンが、1日2回、100

10

20

30

40

50

～200mgの用量でTGF- β 1産生を刺激するために用いられる。

【0144】

可溶性エンドグリン結合タンパク質の血清レベルを増加することができる化合物の使用に加えて、本発明は、本明細書に記載された治療方法のいずれかと組み合わせて用いられる任意の慢性高血圧薬物療法の使用を提供する。妊娠中の高血圧の処置に用いられる薬物療法のそれぞれについて、投与様式および用量は、医師により、および製造会社の使用説明書により、決定される。

【0145】

可溶性エンドグリンの抗血管形成活性を変化させる治療用化合物

10

追加の治療用化合物は、血管形成アッセイを用いて同定されうる。例えば、可溶性エンドグリンの上昇したレベルをもつ子癇前症血清はマトリゲル管形成アッセイへ添加され、抗血管形成状態を誘導する。試験化合物は、その後、アッセイへ添加され、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の抗血管形成状態における逆転が、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している。

【0146】

治療用核酸

最近の研究は、血管傷害の部位へVEGFのような内皮細胞分裂促進因子を発現させる能力がある核酸(DNAまたはRNA)の送達、傷害された血管の増殖および再内皮化を誘導する。本発明は血管傷害に関連していないが、核酸の内皮細胞への送達のためのこれらの一般的な技術は、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、およびBMP7のような可溶性エンドグリン結合タンパク質をコードする核酸の送達のために本発明において用いられうる。その技術はまた、被検体における子癇前症もしくは子癇の処置または予防のための、可溶性エンドグリンの切断および放出に関与する任意のMMP、カテプシン、またはエラスターゼの活性を抑制することが知られている上記のもののようなタンパク質をコードする核酸の送達のために用いられうる。これらの一般的な技術は、米国特許第5,830,879号および第6,258,787号に記載されており、参照により本明細書に組み入れられている。

20

【0147】

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のような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を含む任意の核酸(DNAまたはRNA)でありうる。所望のタンパク質をコードする核酸は、当技術分野における日常的な手順、例えば、組換えDNA、PCR増幅を用いて得られうる。

30

【0148】

核酸を送達するための様式

本明細書に記載された核酸のいずれかについて、核酸を投与するための標準的方法が用いられうる。例えば、可溶性エンドグリン結合タンパク質をコードする核酸の操作および取扱いを簡単にするために、核酸は、好ましくは、プロモーターへ実施可能に連結されているカセットへ挿入される。プロモーターは、所望の標的宿主細胞において可溶性エンドグリン結合タンパク質の発現を作動させることができなければならない。適切なプロモーターの選択は、容易に達成されうる。好ましくは、高発現プロモーターを用いる。適したプロモーターの例は、763塩基対サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターである。ラウス肉腫ウイルス(RSV)(Davis et al., Hum. Gene Ther. 4:151-159, 1993)およびマウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーターもまた用いられうる。特定のタンパク質は、それらの天然のプロモーターを用いて発現されうる。発現を増強しうる他のエレメントもまた、含まれる(例えば、エンハンサー、または結果として、tat遺伝子およびtatエレメントのような発現の高レベルを生じる系)。組換えベクターは、pUC118、pBR322、または、例えば、大腸菌(E. coli)複製起点を含む他の公知のプラスミドベクターでありうる(Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989参照)。プラスミドベクターはまた、マーカーポリペプチドが、処置されることにな

40

50

っている生物体の代謝に有害に影響を及ぼさないとの条件で、アンピシリン耐性についてのβラクタマーゼのような選択マーカーを含みうる。カセットはまた、PCT公開番号WO 95/22618に開示されている系のような合成送達系において核酸結合部分に結合させられうる。

【0149】

核酸は、用いられるベクターに適切な任意の手段により細胞へ導入されうる。多くのそのような方法が当技術分野において周知である(Sambrook et al., 前記、およびWatson et al., 「Recombinant DNA」, Chapter 12, 第12版, Scientific American Books, 1992)。組換えベクターは、リン酸カルシウム沈殿法、電気穿孔法、リポソーム媒介トランスフェクション法、遺伝子銃、微量注入法、ウイルスキャプシド媒介移入、ポリブレン媒介移入、またはプロトプラスト融合法のような方法により移入されうる。リポソーム調製、内容物のターゲティングおよび送達についての手順の概説として、Mannino and Gould-Fogertite (Bio Techniques, 6:682-690, 1988)、Felgner and Holm (Bethesda Res. Lab. Focus, 11:21, 1989)、およびMaurer (Bethesda Res. Lab. Focus, 11:25, 1989)参照。

【0150】

組換えベクター(プラスミドベクターまたはウイルスベクターのいずれか)の移入は、羊水への直接的注入または静脈内送達を通して達成されうる。

【0151】

アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ベクター(AAV)を用いる遺伝子送達もまた用いられうる。アデノウイルスは、多数の動物種に存在し、あまり病原性ではなく、分裂中および静止細胞において等しく十分に複製できる。一般的ルールとして、遺伝子送達に用いられるアデノウイルスは、ウイルス複製に必要とされる1つまたは複数の遺伝子を欠損している。可溶性エンドグリン結合タンパク質の送達に用いられる複製欠損組換えアデノウイルスベクターは、技術分野公知の技術に従って作製されうる(Quantin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2581-2584, 1992; Stratford-Perricadet et al., J. Clin. Invest., 90:626-630, 1992;およびRosenfeld et al., Cell, 68:143-155, 1992参照)。子宮内での遺伝子治療の使用の例として、米国特許第6,399,585号を参照されたい。

【0152】

いったん移入されたならば、核酸は、可溶性エンドグリン結合タンパク質の血清レベルを増加させるのに十分な時間、傷害の部位で細胞により発現される。核酸を含むベクターは、正常には細胞のゲノムへ組み入れられないため、対象となるタンパク質の発現は、限られた時間のみ起こる。典型的には、タンパク質は、約2日間～数週間、好ましくは約1～2週間、治療的レベルで発現される。DNAの再適用は、治療用タンパク質の発現の追加の期間を与えるために利用されうる。

【0153】

可溶性エンドグリン発現を阻害する治療用核酸

本発明はまた、可溶性エンドグリンmRNAの発現を直接的に下方制御するためにアンチセンス核酸塩基オリゴマーの使用を特徴とする。相補的核酸配列(センス鎖またはコード鎖)への結合により、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、おそらく、RNアーゼHによるRNA鎖の酵素的切断を通して、タンパク質発現を阻害することができる。好ましくは、アンチセンス核酸塩基オリゴマーは、可溶性エンドグリンの増加したレベルを発現させる細胞において可溶性エンドグリンタンパク質発現を低下させる能力がある。好ましくは、可溶性エンドグリンタンパク質発現における減少は、対照オリゴヌクレオチドで処理された細胞に対して少なくとも10%、好ましくは20%またはそれ以上、より好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。アンチセンス核酸塩基オリゴマーを選択し、かつ調製するための方法は、当技術分野において周知である。VEGF発現を下方制御するためのアンチセンス核酸塩基オリゴマーの使用の例として、参照により本明細書に組み入れられている、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また、当技術分野において周知であり、ウェスタンブロットティング、免疫沈降、およびELISAを含む。

【0154】

本発明はまた、可溶性エンドグリンの発現を阻害するためのRNA干渉(RNAi)の使用を特徴とする。RNA干渉(RNAi)は、対象となる遺伝子またはmRNAに対応する二本鎖RNA(dsRNA)が生物体へ導入され、結果として対応するmRNAの分解を生じる、最近発見された、転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)の機構である。RNAi反応において、dsRNA分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方が、長さが21~23ヌクレオチド(nt)の範囲であり、かつ2-ヌクレオチド3'テールを有する、小さなRNA断片またはセグメントへプロセシングされる。または、長さが21~23ntであり、かつ2-ヌクレオチド3'テールを有する合成dsRNAが、合成され、精製され、反応に用いられうる。これらの21~23nt dsDNAは、「ガイドRNA」または「短鎖干渉RNA」(siRNA)と呼ばれる。

10

【0155】

siRNA二重鎖は、その後、複合体内でsiRNAと相同性をもつ内因性mRNAをターゲティングし、かつ破壊するタンパク質で構成される核酸塩基複合体に結合する。複合体内のタンパク質の同定は明らかにされないままであるが、複合体の機能は、siRNA鎖の1つおよび内因性mRNAの間の塩基対形成相互作用を通して相同性mRNA分子をターゲティングすることである。mRNAは、その後、siRNAの3'末端から約12ntを切断され、分解される。この様式において、特定の遺伝子がターゲティングされ、かつ分解され、それにより、結果として、ターゲティングされた遺伝子からのタンパク質発現の喪失を生じうる。siRNAはまた、化学合成されうる、またはsiRNAを化学合成する会社(例えば、Dharmacon Research Inc., PharmaciaまたはABI)から入手されうる。

20

【0156】

dsRNAの特定の必要条件および改変は、PCT公開番号WO 01/75164(参照により本明細書に組み入れられている)に記載されている。dsRNA分子は長さが様々でありうるが、典型的には(2'-デオキシ)チミジンまたはウラシルのいずれかの特徴的な2-ヌクレオチド~3-ヌクレオチド3'オーバーハング末端をもつ21-ヌクレオチド~23-ヌクレオチドのdsRNAであるsiRNA分子を用いることが最も好ましい。siRNAは、典型的には、3'ヒドロキシル基を含む。一本鎖siRNAおよびdsRNAの平滑末端型もまた用いられうる。RNAの安定性をさらに増強するために、3'オーバーハングは、分解に対して安定化されうる。一つのそのような態様において、RNAは、アデノシンまたはグアノシンのようなプリンヌクレオチドを含むことにより安定化される。または、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、(2'-デオキシ)チミジンによるウリジン2-ヌクレオチドオーバーハングの置換は耐容性を示し、RNAiの効力に影響を及ぼさない。2'ヒドロキシル基の不在は、組織培地においてオーバーハングのヌクレアーゼ抵抗性を有意に増強する。

30

【0157】

あるいは、siRNAは、PCT公開番号WO 01/75164(参照により本明細書に組み入れられている)に示された方法のいずれかを用いて、またはRNAのインビトロ転写についての標準の手順、およびElbashir et al. (Genes & Dev., 15:188-200, 2001)に記載されているようなdsRNAアニーリング手順を用いて、調製されうる。siRNAはまた、dsRNAが、約21~約23ヌクレオチドのsiRNAを生成するようにプロセシングされ、その後、当業者に公知の技術を用いて単離される条件下で、シンシチウム胚盤葉ショウジョウバエ(Drosophila)胚由来の無細胞ショウジョウバエ可溶化物における標的遺伝子の配列に対応するdsRNAのインキュベーションにより、Elbashir et al., 前記、に記載されているように得られる。例えば、ゲル電気泳動は、21~23nt RNAを分離するために用いられうる。RNAは、その後、ゲルスライスから溶出されうる。加えて、クロマトグラフィー(例えば、サイズ排除クロマトグラフィー)、グリセロール勾配遠心分離、および抗体でのアフィニティー精製が、21~23nt RNAを単離するために用いられうる。

40

【0158】

様々な方法が、哺乳動物細胞へのdsRNAもしくはオリゴヌクレオチドのトランスフェクションまたは導入に利用できる。例えば、限定されるわけではないが、以下を含むいくつかの市販されているトランスフェクション試薬がある: TransIT-TKO(商標)(Mirus, カタ

50

ログ# MIR 2150)、Transmessenger(商標)(Qiagen, カタログ# 301525)、およびOligofect amine(商標)(Invitrogen, カタログ# MIR 12252-011)。各トランスフェクション試薬についてのプロトコールは、製造会社から入手できる。

【0159】

本発明において、dsRNAまたはsiRNAは、可溶性エンドグリンmRNAのmRNA配列に相補的であり、可溶性エンドグリンの発現を低下または阻害することができる。好ましくは、可溶性エンドグリンタンパク質発現における減少は、対照dsRNAまたはsiRNAで処理された細胞に対して少なくとも10%、より好ましくは25%、および最も好ましくは少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。タンパク質発現のレベルをアッセイするための方法もまた、当技術分野において周知であり、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、およびELISAを含む。

10

【0160】

本発明において、用いられる核酸は、多少なりとも核酸の安定性または機能を増強する任意の改変を含む。例は、リン酸バックボーン、ヌクレオチド内結合、または糖部分への改変を含む。

【0161】

初期妊娠に有用な、可溶性エンドグリンに基づいた治療用化合物

完全長エンドグリンシグナル伝達の阻害は、絨毛外植片培養において栄養芽層侵襲性を増強することが示された(Caniggia I et al., Endocrinology, 1997, 138:4977-88)。可溶性エンドグリンは、それゆえに、初期妊娠中に栄養芽層侵襲性を増強する可能性が高い。従って、妊娠関連高血圧性障害または妊娠関連高血圧性障害を発症する性向をもたない女性において妊娠の初期に可溶性エンドグリンレベルを増加させる組成物は、胎盤形成を増強するために有益でありうる。可溶性エンドグリンレベルを増加させる組成物の例は、精製された可溶性エンドグリンポリペプチド、可溶性エンドグリンをコードする核酸分子、および可溶性エンドグリンのレベルもしくは生物活性を増加させる化合物または成長因子を含む。

20

【0162】

遺伝子およびタンパク質発現についてのアッセイ法

以下の方法は、タンパク質または遺伝子発現を評価し、可溶性エンドグリン結合タンパク質レベルを増加させるための、または可溶性エンドグリンタンパク質レベルを減少させるための上記方法のいずれかについての効力を測定するために用いられうる。

30

【0163】

被検体由来の血清は、特定の抗体を用いる、ELISA、ウェスタンブロッティングまたはイムノアッセイのような方法を用いて、可溶性エンドグリンのレベルについて測定される。被検体由来の血清はまた、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に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ついて測定されうる。タンパク質の血清レベルを測定するために用いられる方法は、特定の抗体を用いる、ELISA、ウェスタンブロッティング、またはイムノアッセイを含む。加えて、インビトロ血管形成アッセイが、被検体の血液が、抗血管形成状態から血管形成促進状態へ変換したかどうかを測定するために行われうる。そのようなアッセイは、実施例4において上に記載されている。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、または可溶性エンドグリンに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おいて、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%またはそれ以上の増加とみなされる。陽性結果はまた、インビトロ血管形成アッセイを用いて抗血管形成状態から血管形成促進状態へ、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%またはそれ以上の変換とみなされうる。

40

【0164】

被検体由来の血清または尿試料はまた、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7

50

、もしく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について測定されうる。遺伝子発現についてアッセイするためのいくつかの技術分野公知の方法がある。いくつかの例は、被検体の血液試料由来のRNAの調製、およびノーザンブロッティング、PCRに基づいた増幅、またはRNアーゼプロテクションアッセイについてのRNAの使用を含む。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核酸のレベルにおいて、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%またはそれ以上の増加とみなされる。

【0165】

治療的処置のための抗体の使用

子癇前症を患っている妊婦から採取された血清試料に見出される可溶性エンドグリンのレベルの上昇は、可溶性エンドグリンが、胎児または胎盤の適切な発育および血管形成に必要とされる機能性成長因子に結合して、栄養芽細胞および母親の内皮細胞から枯渇させる「生理学的シンク(sink)」として働いている。可溶性エンドグリンに結合し、可溶性エンドグリンの活性を中和しうる(例えば、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、BMP7への結合)、抗体のような化合物の使用は、遊離TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、およびBMP7における増加を生じることにより、子癇前症もしくは子癇を予防または処置するのを助けうる。そのような増加は、胎盤の発育および胎児の栄養ならびに全身的な母親の内皮細胞健康に必要とされる栄養芽層増殖、遊走、および血管形成における増加を可能にする。

【0166】

本発明は、可溶性エンドグリンのリガンド結合ドメインへ特異的に結合する抗体を提供する。抗体は、可溶性エンドグリンの活性を中和するために用いられ、最も効果的な機構は、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビン-A、BMP2、またはBMP7についての結合部位の直接的ブロックングを通してであると考えられているが、他の機構を、無視することはできない。治療的目的のための抗体の調製および使用のための方法は、米国特許第6,054,297号；第5,821,337号；第6,365,157号；および第6,165,464号を含むいくつかの特許に記載されており、参照により本明細書に組み入れられている。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルでありうる；モノクローナル抗体が好ましい。

【0167】

モノクローナル抗体、特に、マウスを含む齧歯類由来のものは様々な疾患の処置に用いられている；しかしながら、急速なクリアランスおよび処置の効力における低下を引き起こすヒト抗マウス免疫グロブリン応答の誘導を含む、それらの使用の限界がある。例えば、齧歯類モノクローナル抗体の臨床的使用における主要な限界は、治療中の抗グロブリン応答である(Miller et al., Blood, 62:988-995 1983; Schroff et al., Cancer Res., 45:879-885, 1985)。

【0168】

当技術分野は、動物抗原結合可変ドメインがヒト定常ドメインに結合している「キメラ」抗体を構築することによりこの問題を克服しようと試みた(米国特許第4,816,567号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Boulianne et al., Nature, 312:643-646, 1984; Neuberger et al., Nature, 314:268-270, 1985)。そのようなキメラ抗体の産生および使用は下に記載されている。

【0169】

リガンドの可溶性エンドグリンへの結合の競合的阻害は、子癇前症もしくは子癇の予防または処置に有用である。そのような増加は、結果として、内皮機能障害の救出、および血管形成促進性/抗血管形成性の因子のバランスにおける血管形成へのシフトを生じうる。

【0170】

本発明のモノクローナル抗体のカクテルは、子癇前症または子癇についての効果的処置として用いられうる。カクテルは、少なくとも2個、3個、もしくは4個の異なる抗体、ま

10

20

30

40

50

たは多くも6個、8個、もしくは10個の異なる抗体を含みうる。加えて、本発明の抗体は、抗高血圧性薬物(例えば、メチルドーパ、塩酸ヒドララジン、またはラベタロール)、または、子癇前症、子癇、または子癇前症もしくは子癇に関連した症状を処置するために用いられる任意の他の薬物療法と組み合わせられうる。

【0171】

抗体の調製

sFlt-1受容体へ特異的に結合するモノクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法により産生されうる。これらの方法は、Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975)およびCampbell (「Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas」, Burdon et al., Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985)により、加えてHuse et al. (Science, 246, 1275-1281, 1989)により記載された組換えDNA方法により、記載された免疫学的方法を含む。

10

【0172】

モノクローナル抗体は、培養されたハイブリドーマ細胞の上清から、またはマウスへのハイブリドーマ細胞の腹腔内接種により誘導された腹水から調製されうる。Kohler and Milstein(Eur. J. Immunol., 6, 511-519, 1976)により最初に記載されたハイブリドーマ技術は、多くの特定の抗原に対する高レベルのモノクローナル抗体を分泌するハイブリッド細胞系を作製するために広く適用されている。

【0173】

宿主動物またはそれ由来の培養された抗体産生細胞の免疫の経路およびスケジュールは、一般的に、抗体刺激および産生についての確立された、通常の技術に沿っている。典型的には、マウスは、試験モデルとして用いられるが、ヒト被検体を含む任意の哺乳動物被検体またはそれ由来抗体産生細胞が、ヒトを含む哺乳動物のハイブリッド細胞系の作製の基盤としての役割を果たすように、本発明のプロセスに従って操作されうる。

20

【0174】

免疫後、免疫リンパ球は、骨髓腫細胞と融合されて、無期限に培養および継代培養されるハイブリッド細胞系を生じ、大量のモノクローナル抗体を産生する。本発明の目的のために、融合のために選択される免疫リンパ球は、免疫化動物由来のリンパ節組織または脾臓のいずれかから採取されたリンパ球およびそれらの正常な分化した子孫である。脾臓細胞の使用は、それらが、マウス系に関して抗体産生細胞のより濃縮され、便利な供給源を提供するため、好ましい。骨髓腫細胞は、融合したハイブリッドの連続的増殖の根拠を与える。骨髓腫細胞は、血漿細胞由来の腫瘍細胞である。マウス骨髓腫細胞系は、例えば、American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA)から入手されうる。ヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞系もまた、記載されている(Kozbor et al., J. Immunol., 133:3001-3005, 1984; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63, 1987)。

30

【0175】

ハイブリッド細胞系は、インビトロで細胞培地において維持されうる。いったんハイブリッド細胞系が確立されたならば、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン(HAT)培地のような様々な栄養的に十分な培地において維持されうる。さらに、ハイブリッド細胞系は、液体窒素下での凍結および保存を含む、任意の数の通常の方法において、保存および貯蔵されうる。凍結された細胞系は、生き返らせられ、無期限に培養されて、モノクローナル抗体の合成および分泌が再開されうる。分泌された抗体は、沈降、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのような通常の方法により組織培養上清から回収される。

40

【0176】

抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、およびヒトを含む任意の哺乳動物において調製されうる。抗体は、以下の免疫グロブリンクラス: IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE、およびそれらのサブクラスの1つのメンバーであってもよく、好ましくは、IgG抗体である

50

。

【0177】

モノクローナル抗体を産生するための好ましい動物はマウスであるが、本発明はそうに限定されない；実際、ヒト抗体が用いられてもよく、好ましいと判明している場合がある。そのような抗体は、ヒトハイブリドーマを用いることにより得られうる(Cole et al., 「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」, Alan R. Liss Inc., p. 77-96, 1985)。本発明において、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライスすることによるキメラ抗体の作製のために開発された技術が用いられうる(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855, 1984; Neuberger et al., Nature 312, 604-608, 1984; Takeda et al., Nature 314, 452-454, 1985)；そのような抗体は、本発明の範囲内であり、以下に記載されている。

10

【0178】

細胞融合技術のもう一つの代替として、エプスタイン・バーウイルス(EBV)不死化B細胞が、本発明のモノクローナル抗体を作製するために用いられる(Crawford et al., J. Gen. Virol., 64:697-700, 1983; Kozbor and Roder, J. Immunol., 4:1275-1280, 1981; Kozbor et al., Methods Enzymol., 121:120-140, 1986)。一般的に、本手順は、適切な供給源、一般的には感染した細胞系、からエプスタイン・バーウイルスを単離する段階、および標的抗体分泌細胞を、ウイルスを含む上清に曝す段階からなる。細胞は洗浄され、適切な細胞培地において培養される。その後、細胞培養物に存在するウイルス性に形質転換された細胞は、エプスタイン・バーウイルスの核抗原の存在により同定することができ、形質転換された抗体分泌細胞は、当技術分野において公知の標準的方法を用いて同定される。組換えDNAのようなモノクローナル抗体を作製するための他の方法もまた、本発明の範囲内に含まれる。

20

【0179】

可溶性エンドグリン免疫原の調製

可溶性エンドグリンは、それ自身が免疫原として用いられうる、または担体タンパク質に、もしくはセファロースビーズのような他の物体に付着しうる。可溶性エンドグリンは、ヒト臍静脈内皮細胞(栄養芽層またはHUVEC; Burrows et al., Clin. Cancer Res. 1:1623-1634, 1995; Fonsatti et al., Clin. Cancer Res. 6:2037-2043, 2000)のような内因性タンパク質を発現させることが知られている細胞から精製されうる。膜結合エンドグリンを発現させる細胞は、細胞外ドメインを切断し、それにより可溶性型を産生するために、タンパク分解酵素(例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ)で処理されうる。追加として、可溶性エンドグリンまたはその部分をコードする核酸分子が、標準的組換えDNA技術を用いて宿主細胞における発現のために公知のベクターへ挿入されうる。可溶性エンドグリン発現のための適切な宿主細胞は、バキュロウイルス細胞(例えば、Sf9細胞)、細菌細胞(例えば、大腸菌)、および哺乳動物細胞(例えば、NIH3T3細胞)を含む。

30

【0180】

加えて、ペプチドが合成され、免疫原として用いられうる。ペプチドに対する抗体を作製するための方法は当技術分野において周知であり、一般的に、血清アルブミンのような適切な担体分子にペプチドを結合することを必要とする。ペプチドは、GenBankアクセッション番号AAH29080およびNP_031958(マウス)；AAS67893(ラット)；NP_000109、P17813、VSP_004233およびCAA80673(ヒト)；ならびにA49722(ブタ)に対応する可溶性エンドグリンアミノ酸配列の任意の部分と実質的に同一である任意のアミノ酸配列を含む。ペプチドは任意の長さであることができ、好ましくは10アミノ酸またはそれ以上、より好ましくは25アミノ酸またはそれ以上、および最も好ましくは40、50、60、70、80、100、200、300、400、437アミノ酸またはそれ以上である。好ましくは、アミノ酸配列は、ヒトエンドグリン配列のいずれかの配列と少なくとも60%、より好ましくは85%、および最も好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である。ペプチドは、商業的に入手されうる、または例えば、Merrifield固相方法(Science, 232:341-347, 1985)のような当技術分野において周知の技術を用いて作製されうる。手順は、Biosearch 9500自動化ペプチド装置

40

50

のような市販されている合成機を用いてもよく、ブロックされたアミノ酸の切断はフッ化水素で達成され、ペプチドは、15~20 μ m Vydac C4 PrepPakカラム上でのWaters Delta Prep 3000装置を用いる分取HPLCにより精製される。

【0181】

抗体の機能的等価物

本発明はまた、本明細書に記載された抗体の機能的等価物を含む。機能的等価物は、本発明の抗体の可変または超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列をもつポリペプチドを含む。機能的等価物は、抗体の結合特性に匹敵する結合特性をもち、例えば、キメラ化、ヒト化、および一本鎖抗体、加えてそれらの断片を含む。そのような機能的等価物を作製する方法は、例えば、PCT公開番号WO 93/21319；欧州特許出願第239,400号；PCT公開番号WO 89/09622；欧州特許出願第338,745号；欧州特許出願第332424号；および米国特許第4,816,567号に開示されている；それぞれは参照により本明細書に組み入れられている。

10

【0182】

キメラ化抗体は、好ましくは、ヒト抗体定常領域に実質的にまたは独占的に由来する定常領域、およびヒト以外の哺乳動物からの可変領域の配列から実質的にまたは独占的に由来する可変領域を有する。そのようなヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはその断片(抗体のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗原結合配列のような)である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当技術分野において周知である(概説として、Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 81:105-119, 1998およびCarter, *Nature Reviews Cancer*, 1:118-129, 2001参照)。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト起源から抗体へ導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は多くの場合インポート残基と呼ばれ、典型的には、インポート可変ドメインから取られる。ヒト化は、本質的には、齧歯類CDRまたは他のCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに用いることにより、当技術分野において公知の方法に従って行われうる(Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986；Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329, 1988;およびVerhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536, 1988)。従って、そのようなヒト化抗体は、無傷ヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が、非ヒト種由来の対応する配列により置換されている、キメラ抗体である(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかのCDR残基、および場合によりいくつかのFR残基が齧歯類抗体における類似の部位からの残基により置換されている、ヒト抗体である(Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596, 1992)。

20

30

【0183】

ヒト化抗体の調製のための追加の方法は、参照により本明細書にその全てが組み入れられている、米国特許第5,821,337号および第6,054,297号、ならびにCarter, (前記)に見出されうる。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、およびIgEを含む免疫グロブリンの任意のクラス、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃、およびIgG₄を含む任意のアイソタイプから選択される。本発明においてのように、細胞傷害性が必要ではない場合、定常ドメインは、好ましくは、IgG₂クラスである。ヒト化抗体は、1つより多いクラスまたはアイソタイプからの配列を含む可能性があり、所望のエフェクター機能を最適化するように特定の定常ドメインを選択することは、当技術分野における普通の技術範囲内である。

40

【0184】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー(Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991およびWinter et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:433-455, 1994)を含む当技術分野において公知の様々な技術を用いて作製されうる。Cole et al.およびBoerner et al.の技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に有用である(Cole et al., 前記；Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86-95, 1991)。

【0185】

ヒト以外の適切な哺乳動物は、モノクローナル抗体が作製されうる任意の哺乳動物を含

50

む。ヒト以外の哺乳動物の例は、例えば、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ヤギ、または霊長類を含み、マウスが好ましい。

【0186】

抗体の機能的等価物はまた、一本鎖抗体(scFv)としても知られている、一本鎖抗体断片を含む。一本鎖抗体断片は、典型的には、抗原または受容体を結合する組換えポリペプチドである；これらの断片は、1つもしくは複数の相互連結させるリンカーにより、またはリンカーによらずに抗体可変軽鎖配列(V_L)の少なくとも1つの断片に繋がれた、抗体可変重鎖アミノ酸配列(V_H)の少なくとも1つの断片を含む。そのようなリンカーは、一本鎖抗体断片が由来している抗体全体の標的分子結合特異性を維持するように、いったんそれらが連結されたならば、 V_L および V_H ドメインの本来の3次元折り畳みが生じることを保証するように選択される、短く、柔軟なペプチドでありうる。一般的に、 V_L または V_H 配列のカルボキシル末端は、相補性 V_L および V_H 配列のアミノ酸末端へそのようなペプチドリinkerにより共有結合される。一本鎖抗体断片は、分子クローニング、抗体ファージディスプレイライブラリー、または類似した技術により作製されうる。これらのタンパク質は、真核細胞、または細菌を含む原核細胞のいずれかにおいて産生されうる。

10

【0187】

一本鎖抗体断片は、本明細書に記載された抗体全体の可変領域またはCDRの少なくとも1つを有するアミノ酸配列を含むが、それらの抗体の定常ドメインの一部または全部を欠損している。これらの定常ドメインは、抗原結合に必要なではないが、抗体全体の構造の大部分を構成する。一本鎖抗体断片は、それゆえに、定常ドメインの一部または全部を含む抗体の使用に関連した問題の一部を克服しうる。例えば、一本鎖抗体断片は、生体分子と重鎖定常領域の間の望ましくない相互作用、または他の不要な生物活性が取り除かれる傾向にある。加えて、一本鎖抗体断片は、抗体全体よりかなり小さく、それゆえに、抗体全体より大きな毛細血管透過性をもち、一本鎖抗体断片を、抗原結合部位をより効率的にターゲットさせるように局在化し、かつ結合するのを可能にする。また、抗体断片は、原核細胞において比較的大規模で製造することができ、それに従って、それらの製造を促進する。さらに、一本鎖抗体断片の相対的に小さいサイズは、レシピエントにおいて免疫応答を誘発する可能性を抗体全体より少なくさせる。

20

【0188】

機能的等価物はさらに、抗体全体と同じまたは匹敵する結合特性をもつ抗体の断片を含む。そのような断片は、1つもしくは両方のFab断片、または $F(ab')_2$ 断片を含みうる。好ましくは、抗体断片は抗体全体のすべての6つのCDRを含むが、そのような領域の全部より少ない、例えば、3つ、4つ、または5つのCDRもまた機能しうる。

30

【0189】

さらに、機能的等価物は、次の免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE、およびそれらのサブクラスのいずれか1つのメンバーである場合があり、またはこれらを含む場合もある。

【0190】

抗体の機能的等価物の調製

抗体の等価物は、当技術分野において公知の方法により調製される。例えば、抗体の断片は、抗体全体から酵素的に調製されうる。好ましくは、抗体の等価物は、そのような等価物をコードするDNAから調製される。抗体の断片をコードするDNAは、完全長抗体をコードするDNAの所望の部分を除く全てを除去することにより調製されうる。

40

【0191】

キメラ化抗体をコードするDNAは、ヒト定常領域を実質的にまたは独占的にコードするDNA、およびヒト以外の哺乳動物の可変領域の配列に実質的にまたは独占的に由来する可変領域をコードするDNAを再結合することにより調製されうる。ヒト化抗体をコードするDNAは、対応するヒト抗体領域に実質的にまたは独占的に由来する定常領域およびCDR以外の可変領域をコードするDNA、ならびにヒト以外の哺乳動物に実質的にまたは独占的に由来するCDRをコードするDNAを再結合することにより調製されうる。

50

【0192】

抗体の断片をコードするDNA分子の適切な起源は、完全長抗体を発現させるハイブリドーマのような細胞を含む。断片は、それらのみで抗体等価物として用いられてもよく、または上記のように、等価物へ再結合されてもよい。

【0193】

このセクションに記載されたDNA欠失および再結合は、上記で列挙された公開特許出願に記載された方法のような、公知の方法により行われうる。

【0194】

抗体スクリーニングおよび選択

モノクローナル抗体は、標準的な技術分野公知の方法を用いて単離および精製される。例えば、抗体は、可溶性エンドグリンペプチド抗原に対するELISAまたはウェスタンブロッティング分析のような標準的な技術分野公知の方法を用いてスクリーニングされうる。そのような技術の非限定的例は、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,365,157号の実施例IIおよびIIIに記載されている。

10

【0195】

抗体の治療的使用

子癇前症もしくは子癇の処置または予防のためにインビボで用いられる場合、本発明の抗体は、治療の有効量で被検体に投与される。好ましくは、抗体は、持続注入により、非経口でまたは静脈内に投与される。用量および投与計画は、疾患の重症度および被検体の全体的な健康状態に依存する。投与される抗体の量は、典型的には、被検体体重の約0.001~約10mg/kg、好ましくは被検体体重の0.01~約5mg/kgの範囲である。

20

【0196】

非経口投与のため、前記抗体は、薬学的に許容される非経口媒体と併せて、単位用量注射剤型(溶液、懸濁液、乳液)に製剤化される。そのような媒体は、本質的に非毒性であり、かつ非治療的である。そのような媒体の例は、水、生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。固定油およびオレイン酸エチルのような非水性媒体もまた用いられうる。リポソームは担体として用いられうる。媒体は、等張性および化学的安定性を増強する物質、例えば、緩衝液および保存剤のような添加物の微量を含みうる。抗体は、典型的には、約1mg/ml~10mg/mlの濃度でそのような媒体中に製剤化される。

30

【0197】

併用療法

任意で、子癇前症または子癇治療用物質は、任意の他の標準的な子癇前症または子癇治療と併用して投与されうる；そのような方法は当業者に公知であり、米国特許出願公開番号20040126828、20050025762、および2005017044、ならびにPCT公開番号WO 2004/008946 およびWO 2005/077007に記載された方法を含む。

【0198】

投与の用量および様式

好ましくは、治療用物質は、子癇前症もしくは子癇の処置もしくは予防のために妊娠中に、または分娩後の子癇前症もしくは子癇を処置するために妊娠後に投与される。投与についての技術および用量は、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)に依存して変わり、当業者に周知であるか、または容易に決定される。

40

【0199】

本発明の治療用化合物は、単位剤形で、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤と共に投与されうる。投与は、非経口、静脈内、皮下、経口、または羊水への直接的注入による局所でありうる。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ための好ましい方法である。

【0200】

組成物は、経口投与について丸剤、錠剤、カプセル、液体、もしくは徐放性錠剤；また

50

は静脈内、皮下、もしくは非経口投与について液体；または局所投与についてポリマーもしくは他の徐放性媒体の形をとりうる。

【0201】

製剤を作製するための当技術分野において周知の方法は、例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」(第20版, ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)に見出される。非経口投与についての製剤は、例えば、賦形剤、滅菌水、生理食塩水、ポリエチレングリコールのような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みうる。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は、化合物の放出を制御するために用いられうる。ナノ粒子製剤(例えば、生分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リポソーム)は、化合物の体内分布を制御するために用いられうる。他の可能性のある有用な非経口送達系は、エチレン-ビニルアセテートコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み式注入システム、およびリポソームを含む。製剤における化合物の濃度は、投与されるべき薬物の用量および投与経路を含むいくつかの因子に依存して変わる。

10

【0202】

化合物は、製薬産業において一般的に用いられる非毒性酸付加塩または金属錯体のような薬学的に許容される塩として投与されてもよい。酸付加塩の例は、酢酸、乳酸、パモン酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、またはトリフロロ酢酸などのような有機酸；タンニン酸、カルボキシメチルセルロースなどのようなポリマーの酸；および塩化水素酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などのような無機酸を含む。金属錯体は、亜鉛、鉄などを含む。

20

【0203】

経口使用のための製剤は、非毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物において活性成分を含む錠剤を含む。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤または増量剤(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、および抗接着剤でありうる(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、硬化植物油、またはタルク)。

【0204】

経口使用についての製剤はまた、チャアブル錠として、または活性成分が不活性固体希釈剤と混合されている硬ゼラチンカプセルとして、または活性成分が水もしくは油媒体と混合されている軟ゼラチンカプセルとして供給されうる。

30

【0205】

化合物を投与する用量およびタイミングは、被検体の全体的な健康状態および子癇前症の症状の重症度を含む様々な臨床的因子に依存する。一般的に、いったん子癇前症または子癇前症を発症する性向が検出されたならば、精製タンパク質の持続注入が、その状態のさらなる進行を処置または予防するために用いられる。処置は、1日から100日まで、より好ましくは1日~60日、および最も好ましくは1日~20日の範囲である期間、または妊娠の終了まで継続されうる。用量は、各化合物および状態の重症度に依存して変わり、10ng/mlから20ng/mlまでの可溶性エンドグリン；および/または1~500pg/mL遊離VEGFもしくは遊離PlGF、もしくはその両方、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 VEGFもしくはPlGF、または1~5ngのsFlt-1の範囲である定常状態血清濃度を達成するように滴定される。

40

【0206】

本明細書に記載された診断方法は、治療中の子癇前症もしくは子癇をモニターするために、または治療用化合物の用量を決定するために用いられうる。一つの例において、治療用化合物が投与され、PAAIが治療の過程で測定される。PAAIが20未満、好ましくは10未満である場合には、治療用量は有効量であるとみなされる。もう一つの例において、治療用化合物が投与され、可溶性エンドグリン抗血管形成指数が治療の過程で測定される。可溶

50

性エンドグリン抗血管形成指数が200未満、好ましくは100未満である場合には、治療用量は有効量であるとみなされる。

【0207】

被検体モニタリング

子癇前症、子癇、またはそのような状態を発症する性向をもつ被検体の疾患状態または処置は、本発明の方法および組成物を用いてモニターされうる。例えば、尿、血漿、羊水、またはCSFのような体液に存在する可溶性エンドグリンポリペプチドの発現がモニターされる。可溶性エンドグリンモニタリングは、sFlt-1、VEGFまたはPlGFポリペプチドの発現をモニターするための方法と組み合わせられうる。そのようなモニタリングは、例えば、被検体において特定の薬物の効力を評価するにおいて、または疾患進行を評価するにおいて有用でありうる。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を減少させる治療用物質は、本発明において特に有用であるとみなされる。

10

【0208】

実施例

以下の実施例は、本発明を例証することを意図される。それらは、決して、本発明を限定することを意図されない。

【0209】

実施例1. 子癇前症をもつ妊婦におけるエンドグリンmRNAおよびタンパク質のレベルの増加

子癇前症において病態的役割を果たす新規な分泌される因子を同定しようとする試みにおいて、本発明者らは、Affymetrix U95Aマイクロアレイチップを用いて、子癇前症をもつ17人の妊婦および13人の正常な妊婦から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、エンドグリンの遺伝子が子癇前症をもつ女性において上方制御されていることを見出した。

20

【0210】

子癇前症においてエンドグリンの上方制御を確認するために、本発明者らは、正常血圧の妊婦と比較した、子癇前症の妊婦における、胎盤エンドグリンmRNAレベル(図3)を分析するためのノーザンブロット、およびエンドグリンの血清タンパク質レベル(図4)を測定するためのウェスタンブロット分析を行った。子癇前症は、(1)妊娠20週間後の収縮期血圧(BP)>140mmHgおよび拡張期BP>90mmHg、(2)新たに発生したタンパク尿(尿検査におけるディップスティックにより1+、24時間尿収集における>300mgのタンパク質、またはランダム尿のタンパク質/クレアチニン比率>0.3、ならびに(3)分娩後12週間目までの高血圧およびタンパク尿の消散として定義された。根底にある高血圧、タンパク尿、または腎疾患をもつ患者は、除外された。患者は、腎炎性範囲タンパク尿(24時間尿収集における>3gのタンパク質、または3.0より大きい尿タンパク質/クレアチニン比率)の存在または非存在に基づいて軽度および重度の子癇前症へ分けられた。軽度子癇前症群における平均尿タンパク質/クレアチニン比率は、 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齢は以下のとおりであった：正常 38.8 ± 0.2 週間、軽度子癇前症 34 ± 1.2 週間、重度子癇前症 31.3 ± 0.6 週間、および早産児 29.5 ± 2.0 週間。胎盤試料は、分娩後すぐに獲得された。4つのランダムな試料が、各胎盤から採取され、RNAlater安定化溶液(Ambion, Austin, TX)に入れられ、 -70°C で保存された。RNA単離は、Qiagen RNAeasy Maxi Kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いて行われた。

30

40

【0211】

エンドグリンのコード領域における400塩基対プローブ(Unigene Hs.76753)、および標準化対照としてのGAPDHプローブで探索されたノーザンブロットは、胎盤エンドグリンmRNAにおいて増加を示した。エンドグリンのアミノ末端に対する抗体で探索されたウェスタンブロットは、正常血圧の妊婦と比較して、子癇前症の妊婦におけるエンドグリンタンパク質の胎盤および母親の血清レベルの両方において増加を示した。

【0212】

実施例2. 子癇前症の患者の胎盤および血清における可溶性エンドグリンポリペプチドの

50

実証

子癇前症の女性由来の胎盤および血清においてエンドグリンタンパク質のレベルを測定するために用いられるウェスタンブロット分析は、子癇前症の妊婦の胎盤および血清に存在するより小さいタンパク質(63kDa)の存在を示唆した。本発明者らは、このより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。この切り詰められたバージョンは、子癇前症をもつ患者において、胎盤のシンシチウム栄養芽層および内皮細胞から分断され、過剰量で循環される可能性が高い。このエンドグリンの可溶性型は、正常な血管健康に必要である循環リガンドに結合することにより、抗血管形成性作用物質として働きのうる。

【0213】

実施例3. 正常対子癇前症の妊娠の女性における可溶性エンドグリンの循環濃度

正常、軽度子癇前症、または重度子癇前症の女性の血清由来の循環している可溶性エンドグリンのレベルを比較するために、本発明者らは、これらの女性から採取された血液試料においてELISA分析を行った。患者は、腎炎性範囲タンパク尿(24時間尿収集における>3gのタンパク質、または3.0より大きい尿タンパク質/クレアチニン比率)の存在または非存在に基づいて軽度および重度の子癇前症へ分けられた。軽度子癇前症群における平均尿タンパク質/クレアチニン比率は、 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(図5)。ELISAは、以前に記載されているように(Maynard et al, J. Clin. Invest. 111:649-658, 2003)、R & D Systems, MN(カタログ# DNDG00)から市販されているELISAキットを用いて行われた。

【0214】

実施例4. 血管形成についてのモデルアッセイ

内皮管アッセイは、血管形成のインビトロモデルに用いられうる。成長因子低減マトリゲル(Matrigel)(7mg/mL, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)が、あらかじめ冷却された48ウェル細胞培養プレートのウェル(100 μ l/ウェル)に置かれ、重合を可能にするように25~30分間、37°Cでインキュベートされる。3~5継代におけるヒト臍静脈内皮細胞(30,000+ 300 μ lの無血清内皮基本培地中、Clonetics, Walkersville, MD)は、10%患者血清で処理され、マトリゲルコーティング化ウェル上へ蒔かれ、37°Cで12~16時間、インキュベートされる。管形成は、その後、4Xでの倒立位相差顕微鏡(Nikon Corporation, Tokyo, Japan)を通して評価され、Simple PCI画像化分析ソフトウェアを用いて分析される(管面積および全長)。

【0215】

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(Romero研究)

この研究は、可溶性エンドグリンが臨床的子癇前症中に変化するかどうか、およびそれが女性において子癇前症および子癇を予測するために用いられうるかどうかを評価するように設計された。

【0216】

この研究は、Wayne State University/NICHD Perinatology Branch, Detroit, MIにおけるRoberto Romero博士との共同研究下で行われた。遡及的長期的症例対照法は、Chaiworapongsa et al.(The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, January 2005, 17(1):3-18)に以前に記載されているようにバンクされた生体試料を用いて行われた。すべての女性は、Sotero del Rio Hospital, Santiago, Chileにおける出生前診療室に登録され、出産まで追跡された。出生前診察は、妊娠第1期および第2期において4週間間隔、および出産までの妊娠第3期において2週間毎に、スケジュールされた。血漿試料は、以下の6つの間隔のそれぞれについて1回のみ、各患者から選択された：妊娠期間の(1)7~16週間目、(2)16~24週間目、(3)24~28週間目、(4)28~32週間目、(5)32~37週間目、および(6)>37週間目。各子癇前症症例について、子癇前症の臨床診断の時点において在胎齡(+/-2週間)を一致させることにより1つの対照が選択された。子癇前症の診断についての臨床基準は、Chaiworapongsa et al., 前記、に以前に記載されているのと同じであった。

【0217】

血漿エンドグリンレベルの測定

-70℃で保存された血漿試料は、解凍され、血漿可溶性エンドグリンレベルが、R&D systems, Minneapolis, MN(カタログ# DNDG00)から市販されているELISAキットを用いて1パッチにおいて測定された。

【0218】

統計学的解析

共分散分析が、子癇前症を発症する運命にある患者と、血液試料採取における在胎齢および試料保存の間隔について適合させた後の正常な妊娠においてとの間での可溶性エンドグリンの血漿濃度における差を評価するために用いられた。カイ二乗またはフィッシャーの直接確率検定が、割合の比較に用いられた。用いられた統計学パッケージは、SPSS V.12(SPSS Inc., Chicago, IL)。有意性は、0.05未満のp値として仮定された。

【0219】

結果

研究集団の臨床的特徴は、表1に記載されている。子癇前症をもつ群は、対照群より多くの未経産女性を含み、より早く出産した。重要なことには、胎児の出生時体重が、子癇前症群においてより小さく、胎内発育遅延(SGA)児を身ごもる女性の割合がより高かった。

【0220】

(表1)研究集団の臨床的特徴

	正常妊娠 n = 44	子癇前症 n = 44	p
年齢(年)	29 ± 6	26 ± 6	0.04*
未経産	11 (25%)	30 (68.2%)	<0.001 *
喫煙	10 (22.7%)	1 (2.3%)	0.007*
出産時の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 *
出生時体重<第10パーセンタイル	0	16 (36.4 %)	<0.001 *

値は平均 ± sdまたは数(パーセント)として表されている。

GA：在胎齢

【0221】

子癇前症をもつ患者の臨床的特徴は、表2に記載されている。患者の32人(72%)は、重度子癇前症に罹っており、10人の患者は、発症<34週間として定義される重度の早発性子癇前症に罹っていた。

【0222】

(表2)子癇前症をもつ患者の臨床的特徴

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
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
血小板計数 ^β (x10 ³) (μ/L)	206 ± 59
重度の子癇前症	32 (72.7%)
子癇前症と診断された時点のGA ≤ 34週間	10 (22.7%)
子癇前症と診断された時点のGA ≥ 37週間	27 (61.4%)

10

値は平均 ± sd または数 (パーセント) として表されている。

^α (n=26) ; ^β (n=42)

【0 2 2 3】

6つの在胎齢時期において測定された対照および子癇前症の女性における血清可溶性エンドグリンレベルは、表3に示されている。子癇前症間中で、それらの検体は、2つの群 — 臨床的子癇前症(子癇前症の症状の時点に採取された試料)および前臨床的子癇前症(臨床症状の前に採取された試料)、へ分けられた。データは、妊娠半ば(妊娠期間の24～28週間目)時点で、血清可溶性エンドグリン濃度が、子癇前症を発症する運命にある女性において上昇し始め、妊娠期間の28～32週間目までに対照より少なくとも3倍高くなる。臨床的子癇前症をもつ女性から採取された血液試料は、在胎齢の一致した対照と比較した場合、非常に劇的な(ほとんど10～15倍)上昇を示す。

20

【0 2 2 4】

(表3) 正常妊娠および子癇前症における血漿可溶性エンドグリン濃度

	正常妊娠	p	前臨床的試料 子癇前症	p	臨床的試料 子癇前症	p ^β
<u>第1回血液試料採取(7.1~16週間目)</u>						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.89 ± .928	0.9	3.96 ± 1.28			
在胎齡(週)	12.3 ± 2.2	0.2	11.6 ± 2.4			
範囲	8.4 -15.9		7.7 - 15.1			
	n=37		n=34			
<u>第2回血液試料採取(16.1~24週間目)</u>						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.36 ± 1.11	0.1	3.79 ± 1.37			
在胎齡(週)	19.4 ± 1.7	0.0	20.2 ± 2.1			
範囲	16.3 -23.4	6	16.7 -24.0			
	n=44		n=36			
<u>第3回血液試料採取(24.1~28週間目)</u>						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.18 ± .729	0.0	5.27 ± 4.12			
在胎齡(週)	25.9 ± 1.3	09*	26.4 ± 1.1			
範囲	24.1 -28.0	0.2	24.6 -28.0			
	n=38		n=29			
<u>第4回血液試料採取(28.1~32週間目)</u>						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	3.7 ± 1.1	<0.	10.2 ± 9.8	0.01*	96.1 ± 25.7	0.05
在胎齡(週)	29.9 ± 1.1	001	30.2 ± 1.0	1.0	30.4 ± 1.4	1.0
範囲	28.3-32.0	*	28.7 -32.0		29.4 -31.4	
	n=42	1.0	n=33		n=2 ^δ	
<u>第5回血液試料採取(32.1~36.9週間目)</u>						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	5.79 ± 2.42	0.0	10.51 ± 6.59	<0.001*	43.14 ± 25.6	<0.00
在胎齡(週)	34.7 ± 1.3	03*	34.8 ± 1.5	1.0	34.5 ± 1.2	1*
範囲	32.4 -36.6	1.0	32.6 -36.7		32.6 -36.6	1.0
	n=37		n=20		n=13	
<u>第6回血液試料採取(>=37週間目)</u>						
可溶性エンドグリン(ng/ml)	8.9 ± 4.5		--		15.23 ±	0.006
在胎齡(週)	39.4 ± 1.0				10.61	*
範囲	37.0 - 40.7				38.8 ± 1.1	0.05
	n=27				37.6 - 41.4	
					n=27	

p^β : 子癇前症の臨床症状時点の試料と正常妊娠の間に比較される。

値は平均±sdとして表されている。

^δ 2人の子癇前症患者は、臨床症状時点で入手できる血液試料がなかった。

【0225】

血漿可溶性エンドグリン濃度と子癇前症の臨床診断までの間隔の間の関係を調べるために、異なる在胎齡における子癇前症患者の血漿試料は、血液採取から臨床診断までの間隔により以下の5群へ階層化された：(1)臨床診断時点、(2)臨床症状の2~5.9週間前、(3)臨床症状の6~10.9週間前、(4)臨床症状の11~15.9週間前、および(5)臨床症状の16~25週間前。表4に示されたデータは、血漿可溶性エンドグリンレベルが、子癇前症を発症する運命にある女性において、子癇前症の症状の発生の6~10.9週間前において上昇し始めて、症状の2~5.9週間前に少なくとも3倍高いことを実証している。

【0226】

(表4) 正常および子癇前症の妊婦における血漿可溶性エンドグリン濃度

血液試料採取	正常妊娠	子癇前症	p	
<u>臨床症状発現時点</u>				
可溶性エンドグリン(ng/ml)	7.63 ± 4.22	27.72 ± 26.20	<0.001*	
在胎齡(週)	37.2 ± 3.0	37.1 ± 2.7	0.9	
範囲	28.9 - 40.7	29.4 - 41.4		
	n=42	n=42 ^δ		
<u>臨床症状発現の2～5.9週間</u>				
前	4.67 ± 2.32	15.07 ± 10.15	<0.001*	
可溶性エンドグリン(ng/ml)	31.6 ± 3.8	32.8 ± 2.8	0.2	10
在胎齡(週)	24.1 - 36.3	27.1 - 36.7		
範囲	n=27	n=27		
		3.8 ± 1.1		
臨床症状発現前の間隔 (週)				
<u>臨床症状発現の6～10.9週間</u>				
前	3.61 ± 1.05	5.89 ± 3.07	<0.001*	
可溶性エンドグリン(ng/ml)	28.5 ± 2.9	28.5 ± 2.9	0.9	
在胎齡(週)	19.7 - 32.6	19.6 - 34.4		
範囲	n=37	n=37		
		8.3 ± 1.4		
臨床症状発現前の間隔 (週)				
<u>臨床症状発現の11～15.9週間</u>				
前	3.35 ± 0.77	3.57 ± 0.92	0.5	
可溶性エンドグリン(ng/ml)	24.5 ± 3.1	24.2 ± 3.3	0.8	
在胎齡(週)	17.6 - 27.9	17.7 - 28.0		
範囲	n=19	n=19		
		13.2 ± 1.3		
臨床症状発現前の間隔 (週)				
<u>臨床症状発現の16～25週間</u>				
前	3.44 ± 1.07	3.69 ± 1.18	0.3	30
エンドグリン(ng/ml)	17.6 ± 3.5	16.5 ± 4.5	0.2	
在胎齡(週)	9.1 - 23.4	8.0 - 22.7		
範囲	n=42	n=42		
		20.6 ± 3.6		
臨床症状発現前の間隔 (週)				

値は平均±sdとして表されている。

^δ 2人の子癇前症患者は、臨床症状時点で入手できる血液試料がなかった。

【0227】

子癇前症を発症する運命にある者を同定しうる血漿可溶性エンドグリン濃度の診断的可能性を調べるために、患者は、早発性子癇前症(PE<34週間)および遅発性子癇前症(PE>34週間)へ階層化された。早発性子癇前症をもつ患者について、平均血漿可溶性エンドグリンレベルは、妊娠期間の16～24週間前後で始まって、正常妊娠においてより子癇前症において(臨床診断の前に)有意により高く(表5)、24～28週間目および28～32週間目の妊娠期間の時期において非常に劇的な差があった。対照的に、遅発性子癇前症をもつ患者について、前臨床的子癇前症における血漿可溶性エンドグリン濃度は、28～32週間目においてのみ正常妊娠においてより有意により高く、妊娠期間の32～36週間目において非常に劇的な差があった(表6)。

【0228】

(表5) 正常な妊婦および妊娠期間の34週間目以前において臨床的子癇前症を発症した患者における血漿可溶性エンドグリン濃度

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

p^β : 子癇前症の臨床症状時点の試料と正常妊娠の間で比較される。

値は平均±sdとして表されている。

^δ : 2人の子癇前症患者は、臨床症状時点で入手できる血液試料がなかった。

【0229】

(表6)正常な妊婦および子癇前症妊婦(妊娠期間の34週間目)における血漿可溶性エンドグリン濃度

10

20

30

40

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

p^β : 子癇前症の臨床症状時点の試料と正常妊娠の間で比較される。
値は平均±sdとして表されている。

【0230】

要約

これらの実験の結果は、臨床的子癇前症をもつ女性が、在胎齢の一致した対照と比較した場合、非常に高いレベルの循環可溶性エンドグリンを有することを実証している。結果はまた、子癇前症を発症する運命にある女性(前臨床的子癇前症)が、正常な妊娠をしていると予想される者より高い血漿可溶性エンドグリンレベルをもつことを実証している。可溶性エンドグリンレベルにおける増加は、臨床症状の発生の少なくとも6~10週間前に検出可能である。最後に、これらの結果は、早発性および遅発性子癇前症の両方が、上昇し

10

20

30

40

50

た循環可溶性エンドグリン濃度を有するが、変化は、早発性子癇前症においてより劇的である。

【0231】

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研究)

上記のように、本発明者らは、可溶性エンドグリン、血管形成促進性タンパク質TGF- β についての細胞表面受容体で、内皮およびシンシチウム栄養芽層上に発現されている、が子癇前症の胎盤において上方制御されていることを発見した。上記の実験において、本発明者らは、子癇前症において、過剰可溶性エンドグリンが、細胞外ドメインの分断を通して胎盤から循環へ放出されることを示した；可溶性エンドグリンは、その後、sFlt1、胎盤成長因子(PlGF)およびVEGFを結合する抗血管形成性因子、と協力して内皮機能障害を引き起こしうる。この仮説を試験するために、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)および胎内発育遅延(SGA)児を伴った妊娠のような他の妊娠合併症をもつ女性における、妊娠中を通して可溶性エンドグリン、sFlt1、および遊離PlGFの血清濃度を、正常血圧の対照妊娠の女性のそれらと比較した。この研究は、NIHにおけるRichard Levine博士と共同して行われた。

【0232】

この研究の2つの主な目的があった。第一の目的は、正常血圧の対照と比較して、可溶性エンドグリン、sFlt1の血清濃度の上昇、およびPlGFのレベルの低下が、子癇前症および妊娠性高血圧または胎内発育遅延(SGA)児を伴う妊娠のような他の妊娠性障害の発症の前に検出されうるかどうかを決定することであった。第二の目的は、子癇前症、妊娠性高血圧またはSGAをもつ女性において臨床症状の発症の前および後に得られた検体の別々の試験で、ならびに正常血圧の対照において、在胎齢に対する可溶性エンドグリン、sFlt1、および遊離PlGFの母親の血清濃度の経時変化を記載することであった。

【0233】

方法

臨床的情報

この研究は、子癇前症予防試験のためのカルシウム(Calcium for Pre-eclampsia Prevention trial)(CPEP)に参加した4,589人の健康な未経産女性の cohorts にネストされた妊娠合併症の症例対照法(早発性子癇前症、満期子癇前症、妊娠性高血圧、SGA児を伴う妊娠、正常血圧の対照妊娠)であった。120の無作為症例が、研究群のそれぞれから選択された。研究方法は、子癇前症について最近行われたネスト化症例対照法と同一であった(Levine et al., N. Eng. J. Med. 2004, 350:672-83)。各女性からの血液検体は、研究登録(13~21週間)の前に、26~29週間目に、36週間目に、および高血圧またはタンパク尿の疑いで、得られた。陣痛の発生および分娩の前に妊娠中のいかなる時点でも収集されたすべての血清検体は、研究に対して適格であった。症例は、満期子癇前症、妊娠性高血圧、またはSGAを発症し、かつ既知の主要な構造的または染色体異常のない男の生産児または死産児を出産し、かつベースライン血清検体が得られた、120人の女性を含んだ。(PE<37週間)と定義される早発性子癇前症について、CPEP cohortからのすべての72人の患者が研究された。子癇前症の臨床基準は、Levine et al., (2004), 前記、に記載されている。妊娠性高血圧のすべての症例は、妊娠性高血圧の発症の1日前から次に続く7日間までの間隔内に正常な尿タンパク質測定値をもつことが必要とされた。SGAは、人種、未経産、および産児性別に特異的な在胎齢についての出生時体重のZhang & Bowesの表を用いて、<第10および<第5(重度SGA)パーセンタイルとして定義された。対照は、既知の主要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出産した、子癇前症または妊娠性高血圧またはSGAのない女性から無作為に選択され、臨床センターにより、第1血清検体の収集時の在胎齢(± 1 週間)により、フリーザー保存期間(± 1 年間)により、および凍結融解の数により、1つの対照対1つの症例を一致させた。合計1674個の血清検体が研究された。在胎齢による一致は、sFlt1、VEGF、およびPlGFのレベルにおける在胎齢に関連した差について調整するために行われた。フリーザー保存期間についての一致は、フリーザー保存中の

可能性のある分解による差を最小にするために行われた。臨床センターによる一致は、子癇前症率が、センター間で、おそらく疾患の病態生理学における違いにより、有意に異なるという事実について調整するために行われた。加えて、センターは、検体の収集、調製および保存することについてわずかに異なる手順を用いた可能性がある。融解の数による一致もまた、症例および対照が、等しく凍結融解分解に曝されたであろうことを保証するために行われた。

【0234】

ELISA測定

様々な抗血管形成マーカーについてのELISAは、臨床転帰に目隠しされた単一の研究助手によりKarumanchi研究所において行われた。

10

【0235】

可溶性エンドグリン(DNDG00)、sFlt1(DVR100)、PlGF(DPG00)についての市販されているELISAキットは、R&D systems(Minneapolis, MN)から入手された。

【0236】

統計学的解析

t検定が、有意性を決定するために、対数変換後の様々な測定値の比較について用いられた。 $P < 0.05$ が統計学的有意とみなされた。

【0237】

結果

方法に記載されているような様々な在胎齡群時期中の妊娠中を通じての妊婦の5つの異なる研究群についての平均可溶性エンドグリン(図6)、sFlt1(図7)、およびPlGF(図8)濃度が、図6~8に示されている。子癇前症群および妊娠性高血圧群について、臨床症状の発症後に採取された検体は、ここには示されていない。在胎齡を一致させた対照検体と比較して、早発性子癇前症の9~11週間前に始まって、可溶性エンドグリンおよびsFlt1が増加し、かつ遊離PlGFが減少し、子癇前症発症後、それぞれ、5倍高い(46.4ng/ml対9.8ng/ml、 $P < .0001$)および3倍高い(6356pg/ml対2316pg/ml、 $P < .0001$)、ならびに4倍低い(144pg/ml対546pg/ml、 $P < .0001$)レベルに達した。満期子癇前症について、可溶性エンドグリンは、子癇前症発症の、12~14週間前に始まって増加し、遊離PlGFは9~11週間前に始まって減少し、sFlt1は<5週間前に始まって増加した。sFlt1および遊離PlGFの血清濃度は、妊娠期間の10~42週間目のSGA、または在胎齡に比して平均/不当過大(AGA/LGA)児を伴う妊娠間で有意には異ならなかった。血清可溶性エンドグリンは、17~20週間目から始まってSGA妊娠においてやや増加し(7.2ng/ml対5.8ng/ml、 $P = .03$)、AGA/LGA妊娠における12.9ng/mlと比較して、軽度および重度SGAについて、それぞれ、37~42週間目に、15.7ng/ml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一致の対照検体と比較して、可溶性エンドグリンにおける穏やかな増加が、妊娠性高血圧の<1~5週間前に明らかになり、妊娠性高血圧の発症後、可溶性エンドグリンについて2倍高いレベル(29.7ng/ml対12.5ng/ml、 $P = .002$)に達した。対照可溶性エンドグリン濃度の最高四分位値にある(>7.2ng/ml)21~32週間目に得られた検体についてその後の早発性PEで調整したオッズ比は、9.8であった(95% CI 4.5~21.5)。

20

30

【0238】

子癇前症についての可溶性エンドグリン抗血管形成指数は、(sFlt1+0.25可溶性エンドグリン)/PlGFとして定義された。指数は、5つの異なる研究群について、様々な在胎齡群に渡って計算された。臨床症状の前に採取された試料の子癇前症抗血管形成についての可溶性エンドグリン抗血管形成指数は、図9に示されている。可溶性エンドグリン抗血管形成指数についての上昇した値は、重度早発性子癇前症において、早くも妊娠の17~20週間目に示され、妊娠が進むにつれて、より劇的になるように思われた。満期子癇前症、SGAおよびGHにおいて、対照女性と比較した場合、妊娠末期中(33~36週間)、穏やかな上昇があった。

40

【0239】

図10および図11は、臨床的早発性子癇前症($PE < 37$ 週間)前の週の数による可溶性エンド

50

グリンの平均濃度(図10)および可溶性エンドグリン抗血管形成指数(図11)を描く。満期子癇前症の発症の早い9~11週間前でさえも、子癇前症を発症する運命にある女性において、可溶性エンドグリンおよび可溶性エンドグリン抗血管形成指数の2~3倍の上昇があり、臨床症状の1~5週間前において劇的な上昇(>5倍)があった。

【0240】

図12および図13は、症状の前および後の、満期子癇前症(PE>37週間)についての妊娠中を通じて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形成指数(図13)における変化を示す。妊娠の33~36週間目に始まって、臨床的子癇前症の時点において平均して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形成指数における上昇が注目される。

10

【0241】

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週間前(妊娠の33~36週間目中)で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形成指数(図15)の穏やかな上昇を示している。

【0242】

図16および図17は、対照妊娠と比較した場合の、重度のSGAをもつ女性においてであって、SGAをもつすべての女性においてではない、33~36週間妊娠期間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形成指数(図17)の穏やかな上昇を示す。

【0243】

20

要約

この研究の結果は、妊娠33週間目の前に測定された場合の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形成指数レベルが、正常な対照妊娠と比較した場合、早発性子癇前症を発症する運命にある女性において、および臨床的早発性子癇前症(PE<37週間)をもつ女性において、劇的に上昇したことを示している。それゆえに、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形成指数レベル(33週間目の前)は、早発性子癇前症の診断だけでなく、子癇前症の予測にも用いられうる。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形成指数レベルにおける上昇が、早くも子癇前症の症状の10~12週間前に始まると思われる。

【0244】

30

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形成指数レベルはまた、妊娠後期(33~36週間目妊娠時期)に測定された場合、満期子癇前症(PE>37週間)において有意に上昇し、妊娠性高血圧および重度SGAにおいて穏やかに上昇した。それゆえに、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形成指数レベルはまた、妊娠33週間目の後に測定される場合、SGAおよび妊娠性高血圧のような他の妊娠合併症を同定するために用いられうる。

【0245】

実施例7. 子癇前症の病気の発生における可溶性エンドグリンの関与

本発明者らは、血管形成促進性タンパク質TGF- β に対する細胞表面受容体で、内皮およびシンシチウム栄養芽層上に発現されたエンドグリンが、子癇前症の胎盤において上方制御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、過剰可溶性エンドグリンが、細胞外ドメインの分断を通して、胎盤から循環へ放出されることを示した。下記の実験は、可溶性エンドグリンが、sFlt1、胎盤成長因子(PlGF)およびVEGFを結合する抗血管形成因子、と協力して、内皮機能障害を引き起こすという仮説を試験するために設計された。

40

【0246】

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、R&D systems(Minneapolis, MN)から入手された。ヒトエ

50

ンドグリンの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# sc 20072)およびポリクローナル抗体(sc 20632)は、Santa Cruz Biotechnology, Inc.から入手された。ヒトsFlt1、マウスsFlt1、およびヒト可溶性エンドグリンについてのELISAキットは、R&D systems, MNから入手された。

【0247】

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))、Richard Mulligan博士と共同してHarvard Medical Core施設において作製された。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、Adeasy Kit(Stratagene)を用いた。簡単には、ヒト可溶性エンドグリン(Thr27~Leu586)は、鋳型としてヒトcDNA完全長エンドグリンクローン(Invitrogen, CA)およびプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを用いてPCR増幅された：

フォワード 5'- ACG AAG CTT GAA ACA GTC CAT TGT GAC CTT-3' (SEQ ID NO: 3)

および リバース5'TTA GAT ATC TGG CCT TTG CTT GTG CAA CC-3' (SEQ ID NO: 4)

増幅されたPCR断片は、最初、pSecTag2-B(Invitrogen, CA)へサブクローニングされ、DNA配列は確認された。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の発現構築物は、鋳型としてpSecTag2 B-可溶性エンドグリンを用いてPCR増幅され、アデノウイルス作製のために、pShuttle-CMVベクター(Stratagene; Kpn1およびSca1部位)、アデノウイルス転移ベクター、へサブクローニングされた。アデノウイルス発現可溶性エンドグリン(sE)は、その後、製造会社の使用説明書による標準プロトコルを用いて産生され、ウェスタンブロッティングにより発現について確認された。確認されたクローンは、その後、293細胞において増幅され、以前に記載されているように(Kuo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:4605-4610 (2001))、CsCl2密度勾配上で精製された。最終産物は、光吸収度方法により力価測定された(Sweeney et al., Virology, 2002, 295:284-288)。力価は、標準プラーク希釈に基づいた力価アッセイキット(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, カタログ番号K1653-1)および光吸収度方法を用いて力価測定された以前のウイルスプレップに由来する式に基づいたプラーク形成単位(pfu)/mLとして表される。

【0248】

患者

この研究についてのすべての患者は、適切なIRB認可の同意を得た後に、Beth Israel Deaconess Medical Centerにおいて採用された。子癇前症は、(1)本来正常血圧の患者において妊娠20週間後の収縮期BP>140および拡張期BP>90、(2)新たに発生したタンパク尿(尿検査におけるディップスティックにより1+、または24時間尿収集における>300mgのタンパク質、またはランダム尿タンパク質/クレアチニン比率>0.3)、ならびに(3)分娩後12週間目までの高血圧およびタンパク尿の消散と定義された。ベースライン高血圧、タンパク尿、または腎疾患をもつ患者は除外された。この研究の目的のために、患者は、ネフローゼ範囲のタンパク尿(24時間尿収集における>3gのタンパク質、または3.0より高い尿のクレアチニンに対するタンパク質比率)の非存在または存在に基づいて軽度および重度子癇前症へ分けられた。HELLP症候群は、患者が血小板減少(<100000細胞/ μ l)、増加したLDH(>600IU/L)、および増加したAST(>70IU/L)の証拠をもつ場合と定義された。健康な妊婦は、対照として含まれた。他の医学的根拠のための早期産を伴った8人の患者は、追加の対照として含まれた。胎盤試料は、分娩後すぐに採取された。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)に妊娠した患者から収集された。これらの実験は、Beth Israel Deaconess Medical CenterにおけるInstitutional Review Boardにより認可された。

【0249】

ELISAおよびウェスタンブロット

様々なタンパク質(sFlt1、可溶性エンドグリン)についてのELISAは、R&D systems, MN

10

20

30

40

50

からの商業的キットを用いて製造会社の使用説明書のとおり行われた。ウェスタンブロットおよびELISAは、他の所で記載されているように(Maynard et al., 前記)、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チェックするために用いられた。

【0250】

免疫沈降(IP)実験

ウェスタンブロットに続くIPは、子癇前症をもつ患者由来の胎盤組織および血清検体において可溶性エンドグリンを同定し、かつ特徴づけるために用いられた。ヒト胎盤組織は、冷PBSで洗浄され、ホモジナイゼーション緩衝液[Roche(Indianapolis, IN)からの10mM Tris-HCl, pH7.4; 15mM NaCl; 60mM KCl; 1mM EDTA; 0.1mM EGTA; 0.5% Nonidet P-40; 5%スクロース; プロテアーゼ混合物]において10分間、溶解された。胎盤可溶化液は、その後、抗ヒトモノクローナルマウスエンドグリン抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)での免疫沈降にかけられた。免疫親和性カラムは、immunopure IgG orientation kit(Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA)を用いて製造会社の使用説明書に従って、3~5mgの精製抗体を2ml プロテインA-セファロースへ方向性結合により調製された。カラムは、その後、プロテアーゼ混合物を含むRIPA緩衝液で広範に洗浄され、結合したタンパク質は、0.1mol/Lグリシン-HCl緩衝液、pH2.8で溶出された。溶離液は、1 mol/L Tris-HCl緩衝液を含む0.5ml画分に収集された。タンパク質含有画分は、プールされ、CENTRICON Centrifugal Concentrator(Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA)で9~10倍に濃縮された。免疫沈降された試料は、4~12%勾配ゲル(Invitrogen)上で分離され、タンパク質は、ポリニフッ化ビニリデン(PVDF)膜へ転写された。エンドグリンタンパク質は、ポリクローナル抗ヒトウサギエンドグリン一次抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)を用いるウェスタンブロットにより検出された。

【0251】

内皮管アッセイ

成長因子低減マトリゲル(7mg/mL, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)を、あらかじめ冷却された48ウェル細胞培養プレートのウェル(100 μ l/ウェル)に置き、37℃で30分間、インキュベートして、重合させておいた。HUVEC細胞(30,000+ 300 μ lの無血清内皮基本培地中, Clonetics, Walkersville, MD)は、組換えタンパク質の様々な組み合わせ(可溶性エンドグリン、sFlt1、または両方)で処理され、マトリゲルコーティング化ウェル上へ置かれ、37℃で12~16時間、インキュベートされた。管形成は、その後、4Xでの倒立位相差顕微鏡(Nikon Corporation, Tokyo, Japan)を通して評価され、Simple PCI画像化分析ソフトウェアを用いて量的に分析される(管面積および全長)。

【0252】

微小血管透過性実験

Balb-Cマウスは、GFPまたは可溶性エンドグリンまたはsFlt1または組み合わせを発現させるアデノウイルスの 1×10^8 pfuを、後眼窩静脈叢を通して注射され、微小血管透過性アッセイは、48時間後、行われた。マウスは、0.5ml AvertinのIP注射により麻酔をかけられた。100mlの1%エバンスブルー色素(PBS中)が尾静脈へ注射された。40分後、マウスは、2mM EDTAを含むPBSで20分間、心臓穿刺を通して灌流された。器官(脳、肺、肝臓、腎臓)が摘出され、エバンスブルー色素を溶出するようにホルムアミド中で3日間、インキュベートされた。ホルムアミド溶液のODは、620nm波長を用いて測定された。

【0253】

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(70~170 μ m内径)を用いて以前に記載されているように(Maynard et al., 前記)行われた。すべての実験群において、腎臓微小血管の弛緩反応が、40mmHgの拡張圧力におけるそれらのベースライン直径の40~60%へのU46619(トロンボキサノグアニスト)での微小血管の事前収縮後、調べられた。いったん、定常状態緊張が達せられたならば、TGF- β 1またはTGF- β 3またはVEGFのような様々な試薬に対する応答は、標準化された順番で調べられた。すべての薬物は管腔外に適用された。

【0254】

動物モデル

妊娠したおよび妊娠していないSprague-Dawleyラットの両方は、尾静脈注射により 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)を注射された。妊娠したラットは、妊娠8~9日目(妊娠第2期初期)に注射され、血圧は、妊娠16~17日目(妊娠第3期初期)に測定された。血圧は、ペントバルビタールナトリウム(60mg/kg、腹腔内)での麻酔後、ラットにおいて測定された。頸動脈は単離され、血圧変換器(Millar Instruments, Houston, TX)へ接続された3-Fr高忠実度マイクロチップカテーテルでカニューレ処置された。血圧は、記録され、10分間に渡って平均された。血液、組織および尿試料は、その後、安楽死前に採取された。血漿レベルは血圧測定の日(アデノウイルスの注射後8日目)に測定され、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の発現のピークレベルに対応すると認識された。循環sFlt-1および可溶性エンドグリンレベルは、最初、ウェスタンブロッティングにより確認され、その後、市販されているマウスELISAキット(R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いて定量化された。尿アルブミンは、標準ディップスティックにより測定され、かつ市販されているラットアルブミンELISAキット(Nephurat kit, Exocell Inc, Philadelphia, PA)を用いる競合酵素結合免疫測定法により定量化された。尿クレアチニンは、ピクリン酸比色手順キット(Metra creatinine assay kit, Quidel Corp, San Diego, CA)により測定された。ASTおよびLDHは、市販されているキット(Thermo Electron, Louisville, CO)を用いて測定された。ラット血液からの血小板計数は、自動化血球計数器(Hemavet 850, Drew Scientific Inc, Oxford, CT)を用いて測定された。ライト(Wright)の染色での血液の末梢血液塗沫は、循環血液における分裂赤血球の検出のために行われた。血圧の測定および検体の収集後、ラットは屠殺され、器官は組織学のために摘出された。同腹仔が数えられ、個々の胎盤および胎仔の重さが計られた。摘出された腎臓は、ボーインズ溶液中に置かれ、パラフィン包埋され、切片にされ、H&E、PASまたはマッソン(Masson)の三重染色で染色された。

【0255】

統計学的比較

結果は、平均±標準誤差(SEM)として示され、複数の群間の比較は、ANOVAを用いる分散分析によりなされた。有意差は、 $p < 0.05$ の場合、報告される。

【0256】

結果

子癇前症をもつ患者における可溶性エンドグリンの上昇

表7に示された患者由来の血清検体を用いて、本発明者らは、子癇前症患者および対照の妊娠した患者の様々な群において可溶性エンドグリンの循環濃度を測定した。

【0257】

(表7)様々な患者群における臨床的特徴および循環可溶性エンドグリン

	正常 (n=30)	軽度の 子癇前症 (n=11)	HELLPのない 重度の 子癇前症 (n=17)	HELLPをもつ 重度の 子癇前症 (n=11)	早産 (n=8)
母親の年齢(年)	32.43	33.18	29.5	33.73	31.88
在胎齢(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
ヘマトクリット値(%)	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
含まれる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

10

20

30

40

50

【0258】

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、重度子癇前症をもつ患者において3~4倍高かった。HELLP症候群を併発する子癇前症患者において、可溶性エンドグリンの濃度は、在胎齢の一致した対照検体より少なくとも5~10倍高かった。さらに、妊娠した患者における可溶性エンドグリンのレベルは、sFlt1のレベルと相関した(図18)。相関性についてのR2値は0.6であった。(本明細書に報告されたsFlt1-1の循環濃度が以前に発表されたもの(Maynard et al., 前記)より少なくとも4~5倍高いことに留意されたい。これは、アッセイ希釈剤に尿素を欠くR&D systemsからの新しいELISAキットの感受性における違いのせいであり、それゆえに、以前に発表されたものより一貫して高い値を与える。)換言すれば、可溶性エンドグリンの最高レベルをもつ患者はまた、sFlt1の最高循環レベルをもった。可溶性エンドグリンの起源は、本発明者らの胎盤免疫組織化学上に見られた染色の増強により明らかなように、胎盤のシンシチウム栄養芽層である可能性が最も高い(図19および図20)。これらの図は、エンドグリンタンパク質がシンシチウム栄養芽層により発現され、子癇前症において非常に上方制御されることを示している。本発明者らのウェ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は、可溶性エンドグリンが、エンドグリンタンパク質の細胞外ドメインの分断された型であり、サイズが約65kDAであり、子癇前症胎盤において過剰量で発現されていること、およびそれが子癇前症胎盤において過剰量で循環していることをさらに確認している。タンパク質の推定の長さは、約437アミノ酸である。

10

【0259】

20

可溶性エンドグリンは抗血管形成性分子であり、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血管形成のインビトロモデルを用いた。可溶性エンドグリンは、内皮管形成を穏やかに阻害し、それは、sFlt1の存在によりさらに増強される(図22)。子癇前症において、内皮機能障害に加えて、浮腫およびエバンスブルー結合アルブミンの細胞外への漏出の増強により明らかなように、微小血管透過性の増強もある。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見るために、本発明者らは、可溶性エンドグリンおよびsFlt1で48時間、処理されたマウスを用いた。可溶性エンドグリンおよびsFlt1の組み合わせは、エバンスブルーアッセイを用いて実証されているように、肺、肝臓および腎臓におけるアルブミン漏出における劇的な増加、ならびに脳における穏やかな漏出を引き起こした(図23)。可溶性エンドグリン単独は、肝臓において穏やかな漏出を引き起こした。これらのデータは、可溶性エンドグリンおよびsFlt1の組み合わせが、強力な抗血管形成性分子であり、有意な血管漏出を引き起こしうることを示唆している。

30

【0260】

可溶性エンドグリンの血行力学的効果を評価するために、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が行われた。本発明者らは、まず、TGF- β 1およびTGF- β 3 — エンドグリンの2つの公知のリガンド — の効果を研究した。TGF- β 1およびTGF- β 3の両方は、血管直径において用量依存性増加を引き起こした。重要なことには、過剰可溶性エンドグリンの存在下において、両方のTGFの効果は、有意に減弱された(図24)。最後に、VEGFおよびTGF- β 1の組み合わせは、過剰可溶性エンドグリンおよびsFlt1によりブロックされる血管拡張を誘導した(図25)。これは、sFlt1および可溶性エンドグリンが、VEGFおよびTGF- β 1のような血管形成性成長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うることを示唆している。

40

【0261】

可溶性エンドグリンおよびsFlt1のインビボ効果

可溶性エンドグリンおよびsFlt1の血管性効果を評価するために、本発明者らは、妊娠したラットにおけるアデノウイルス発現系に頼った。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が、Sprague Dawleyラットにおいて妊娠8日目に尾静脈を経由して注射された。17日目において、動物は、子癇前症表現型について調べられた。表8は、血行力学的および生化学的デ

50

ータを含む。

【0262】

(表8)アデノウイルス処理されたラット動物モデルについての血行力学的および生化学的データ

群	N	MAP (mmHg)	尿 Alb/creat μg/mg	血小板数 ×1000/μl	LDH U/L	AST U/L	胎児の 体重(g)
対照 (CMV)	4	86.33	84.17	1378	257	43	4.56
sFlt1	4	134*	3478.3*	1247	324	78	3.55
sE	4	112*	366.90	1406	463	95	3.20
sFlt1 + sE	4	145*	6478.2*	538*	1428*	187*	2.50*

MAP—平均動脈圧(拡張期血圧+1/3脈圧)；Alb/Creat—アルブミン/クレアチニン比率；LDH—乳酸デヒドロゲナーゼ；AST—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

胎仔体重は、群あたり無作為に選択された4匹の胎仔の合計である。

sFlt1の平均循環濃度は、sFlt1群において410ng/mlであり、sFlt1+sE群において430ng/mlであった。sEの平均循環濃度は、sE群において318ng/mlであり、sFlt1+sE群において319ng/mlであった。

【0263】

可溶性エンドグリン単独は、軽度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。重要なことには、sFlt1および可溶性エンドグリンの組み合わせは、重度高血圧、ネフローゼ範囲タンパク尿、胎仔の成長制限、およびHELLP症候群(LDH上昇、AST上昇および血小板数減少)の発症の生化学的証拠を誘導した(表8)。可溶性エンドグリン+sFlt1における溶血の証拠は、分裂赤血球および網状赤血球増加を現す末梢血液塗抹により確認された(図26A~B)。最後に、腎臓組織像はまた、可溶性エンドグリン+sFlt1群における重度糸球体内皮症を確認した(図27A~27D)。

【0264】

要約

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上方制御され、子癇前症をもつ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。可溶性エンドグリンの最高レベルは、HELLP症候群、子癇前症の最も重篤な型の一つをもつ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、妊娠した患者においてsFlt1上昇と相関し、より高い循環sFlt1レベルがある患者においてより高かったことを実証している。加えて、結果は、可溶性エンドグリンが抗血管形成性分子であり、血管形成アッセイ、微小血管透過性アッセイ、および微小血管反応性実験のような複数の内皮アッセイにおいて内皮機能を乱すことを示している。重要なことには、可溶性エンドグリンは、これらのインビトロ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、インビボアッセイにおいて、可溶性エンドグリンのアデノウイルス発現は、少しの有意なタンパク尿もなく、軽度高血圧を引き起こす。しかしながら、sFlt1の存在下において、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仔成長制限の存在により明らかなように、有意な血管損傷を引き起こした。これらのデータは、可溶性エンドグリンが母親の子癇前症の症候群の因果関係において重要な役割を果たしていることを示唆し、子癇前症の処置のために可溶性エンドグリンを中和する作用物質の必要性を浮き彫りにしている。

【0265】

可溶性エンドグリン放出の機構は、エンドグリン分子の細胞外領域のタンパク分解性切

断である可能性が高い。子癇前症組織において上方制御されている特定のプロテアーゼは、候補分子となりうる。一つの例は、 β グリカン、エンドグリンとの類似性を有する分子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)であると思われる(Velasco-Loyden G et al., J. Biol. Chem. 279:7721-33 (2004))。それゆえに、そのようなプロテアーゼのインヒビターは、子癇前症の処置のための価値のある標的となりうる。

【0266】

他の態様

本発明の特定の態様の説明は、例証を目的として示されている。それは、網羅的であること、または本発明の範囲を本明細書に記載された特定の型に限定することを意図されない。本発明はいくつかの態様に関して記載されているが、様々な改変が、特許請求の範囲に示されているような本発明の真意および範囲から逸脱することなくなされうること、当業者により理解されているものと思われる。本明細書に引用されたすべての特許、特許出願、および刊行物は、参照により本明細書に組み入れられている。

【0267】

他の態様は、本特許請求の範囲にある。

【図面の簡単な説明】

【0268】

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含む本特許または特許出願刊行物のコピーは、依頼および必要な手数料の支払いによってOfficeより提供される。

【図1】エンドグリンタンパク質を示す概略図である。SP：シグナルペプチド、ZP：透明帯ドメイン、CL：可溶性エンドグリンの放出についての可能性のある切断部位(アミノ酸437位)、TM：膜貫通ドメイン、Cyto：細胞質ドメイン。

【図2】図2Aは、可溶性エンドグリンの推定cDNA配列(SEQ ID NO:1)を示す。図2Bは、可溶性エンドグリンの推定アミノ酸配列(SEQ ID NO:2)を示す。

【図3】正常な妊娠由来の胎盤(N)、軽度子癇前症の妊娠由来の胎盤(p)、および重度子癇前症の妊娠由来の胎盤(P)におけるエンドグリンmRNAレベルを示すノーザンブロットである。

【図4】胎盤におけるエンドグリンタンパク質レベルを示すウェスタンブロットである。試料は、2003年にBeth Israel Deaconess Medical Centerへ提出された2人の子癇前症患者、p32およびp36由来、および妊婦由来の母体血清である。ウェスタンブロットは、Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Santa Cruz, CA)から入手されたN末端抗体を用いて探索され、胎盤における110kDバンド、ならびに胎盤および血清試料に存在するより小さい63kDバンドの両方を示している。

【図5】正常な妊娠、軽度子癇前症、重度子癇前症、および早期産を伴った非子癇前症の妊娠をもつ女性における可溶性エンドグリンの循環濃度を示すグラフである。すべての血液検体は、分娩前の24時間以内に採取された。可溶性エンドグリンは、R&D Systems, MNからのELISAキット(カタログ# DNDG00)を用いて測定された。これらのデータは、可溶性エンドグリンレベルが、臨床的疾患の時点で子癇前症患者において有意に上昇していることを示す。

【図6】様々な在胎齢群時期中の妊娠中を通じての妊婦の5つの異なる研究群についての平均可溶性エンドグリン濃度を示すグラフである。

【図7】様々な在胎齢群時期中の妊娠中を通じての妊婦の5つの異なる研究群についての平均sFlt1濃度を示すグラフである。

【図8】様々な在胎齢群時期中の妊娠中を通じての妊婦の5つの異なる研究群についての平均PlGF濃度を示すグラフである。

【図9】臨床的症状の前に採取された試料について、子癇前症抗血管形成に関する可溶性エンドグリン抗血管形成指数の値を示すグラフである。

【図10】臨床的早発性子癇前症(PE<37週間)の前の週の数による可溶性エンドグリンの

10

20

30

40

50

平均濃度を示すグラフである。

【図1 1】臨床的早発性子癇前症(PE<37週間)の前の週の数による可溶性エンドグリン抗血管形成指数を示すグラフである。

【図1 2】症状の前および後の満期子癇前症(PE>37週間)についての妊娠中を通じての可溶性エンドグリンにおける変化を示すグラフである。

【図1 3】症状の前および後の満期子癇前症(PE>37週間)についての妊娠中を通じての可溶性エンドグリン抗血管形成指数レベルにおける変化を示すグラフである。

【図1 4】妊娠性高血圧中および妊娠性高血圧前(妊娠性高血圧の1~5週間前(妊娠33~36週間目中))の女性、ならびに正常血圧の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。

10

【図1 5】妊娠性高血圧中および妊娠性高血圧前(妊娠性高血圧の1~5週間前(妊娠33~36週間目中))の女性、ならびに正常血圧の対照における可溶性エンドグリン抗血管形成指数レベルを示すグラフである。

【図1 6】重度SGA、軽度SGAをもつ女性、および正常血圧の対照における、33~36週間の妊娠時期中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1 7】重度SGA、軽度SGAをもつ女性、および正常血圧の対照における、33~36週間の妊娠時期中に検出された可溶性エンドグリン抗血管形成指数レベルを示すグラフである。

【図1 8】お互いに対してプロットされた同じ妊娠患者における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。

【図1 9】25.2週間目に採取された子癇前症の胎盤についてのエンドグリン(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を示す。エンドグリンを検出するために用いられた抗体は、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。適切な妊娠時期についての対照胎盤は、早期陣痛をもつ患者由来であった。

20

【図2 0】41.3週間目に採取された子癇前症の胎盤についてのエンドグリン(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を示す。エンドグリンを検出するために用いられた抗体は、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。適切な妊娠時期についての対照胎盤は、早期陣痛をもつ患者由来であった。

【図2 1】図21Aは、子癇前症の胎盤および血清の両方を用いる、エンドグリンについての免疫沈降およびウェスタンブロット実験からのオートラジオグラムの写真である。図21Bは、子癇前症の胎盤を用いる、エンドグリンについての免疫沈降およびウェスタンブロット実験からのオートラジオグラムの写真である。3つの異なるNおよびP試料は、個々の患者を表す。両方の図について、市販されているモノクローナル抗体が、免疫沈降に用いられ、ポリクローナル抗体がウェスタンブロットに用いられた。両方のこれらの抗体は、エンドグリンタンパク質のN末端領域に対して産生され、完全長および切り詰められた可溶性エンドグリンタンパク質の両方を検出する。

30

【図2 2】成長因子低減マトリゲルにおけるHUVECを用いる血管形成アッセイの結果を示すグラフである。血管形成アッセイは、可溶性エンドグリンまたはsFlt1または両方の存在下において行われ、内皮管の長さが定量化された。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の組み合わせを表す。データは、3つの独立した実験の平均を表す。

40

【図2 3】材料および方法に記載されているように、マウスにおいてエバンスブルー漏出を用いて評価されたいくつかの器官ベッドにおける微小血管透過性を示すグラフである。C-対照(GFP)、E-可溶性エンドグリン、S-sFlt1、およびS+E-sFlt1+可溶性エンドグリン。データは、4つの独立した実験の平均を表す。

【図2 4】200pg/ml~200ng/mlの範囲である用量のTGF- β 1(B1)およびTGF- β 3(B3)の存在下における微小血管反応性実験にかけられた、ラット腎臓微小血管直径におけるパーセント変化を示すグラフである。これらの同じ実験は、1 μ g/mlでの可溶性エンドグリン(E)の存在下において繰り返された。示されたこれらのデータは、4つの独立した実験の平均である。

【図2 5】1ng/mlのVEGF(V)、TGF- β 1(B1)、および組み合わせ(V+B1)の存在下における

50

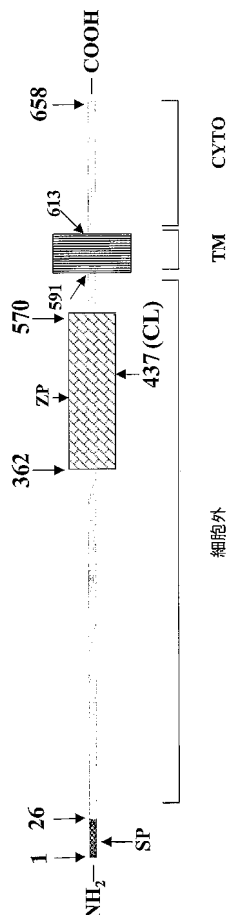
腎臓微小血管の血管直径のパーセント変化を示すグラフである。sFlt1(S)および可溶性エンドグリン(E)のそれぞれ1 μ g/mlの存在下におけるこの組み合わせ(V+B1+S+E)の効果もまた示されている。データは、4つの独立した実験の平均を表す。

【図26】図26Aは、sFlt1および対照アデノウイルス(CMV)の組み合わせを注射された妊娠したラットから屠殺時点に採取された血液試料の末梢血液塗抹の写真である。図26Bは、sFlt1、および可溶性エンドグリンを発現させるアデノウイルスの組み合わせを注射された妊娠したラットから屠殺時点に採取された血液試料の末梢血液塗抹の写真であり、分裂赤血球および増加した網状赤血球数により明らかなように、活発な溶血を示している。矢印は分裂赤血球を示す。

【図27】図27A~Dは、表8に記載された様々な動物群の腎臓の組織像(H&E染色)を示す一連の顕微鏡写真である。図27Aは、糸球体内皮症の証拠をもたない対照群についての腎臓組織像を示す。図27Bは、糸球体内皮症の証拠をもたない可溶性エンドグリンを注射された群についての腎臓組織像を示す。図27Cは、中等度の内皮症(矢じりにより示された)を示すsFlt1注射されたラットについての腎臓組織像を示す。図27Dは、極度に腫れた糸球体および、有足細胞におけるタンパク質再吸収滴(protein resorption droplet)をもつ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注射されたラットについての腎臓組織像を示す。すべての光学顕微鏡写真は、60X(原倍率)で撮影された。

10

【図1】



【図2】

A. 可溶性エンドグリン(437アミノ酸)の予想されるcDNA配列:

```

1 atggacacgc gcaagctccc tctgctgtt gccctgtgc tggcagctg cagcctcagc
61 cccacaagtc ttgcagaaac agtccattgt gacctcagc ctgtgggccc cagagaggac
121 gaggtgacat ataccactag ccaggtctcg aagggtgctg tggctcagcc cccaatgcc
181 atccttgaaq tccatgtcct ctctctggag ttcccaacgg gccctgcaca gctggagctg
241 actctccagg catccaaaga aaatggcacc tggcccccag aggtgcttct ggtctcagct
301 gtaaacagca gtgtcttctt gcatctcag gccctgggaa tccactgca ctggcctac
361 aatcccaagc tggctcctct ccaagagccc ccgggggtga acacacaga gctgcaatcc
421 ttcccaaga ccagatcctt tgagtgggaa gctggagggg gcccaatac ctctgctgt
481 gagctgaatg acccccagag catctctcct cgaatggggc aagcccaggg gtaactgtcc
541 ttctgcatgc tggaaagccg ccagagcatg ggccgcacgc toagtgagg ccgcgtact
601 ccagccttgg tccggggctg ccacttgaa ggctggccg gccacaagga ggccacatc
661 ctgagggctc tgcggggcca ctccggcggg ccccggaagg tgacgtgaa ggtggaactg
721 agctggcgac ccggggatct cgaatggcgc ctcatcctgc aggttcccc ctactgttcc
781 tggctcatcg accccaacca caacatgcag atctggacca ctggagaata ctcttcaag
841 atctttccag agaaaaacat tctgtgcttc aagctccag acacaccca aggcctctgt
901 ggggagggcc ggaatgtcaa tgccagcact gtggctcct tctggagct accgtggcc
961 agaatgtctc cacttcagc ctcacagctg gctggtagc tgcaagctc acccgacgg
1021 atccagacca ctctcccaa ggacacttgt agccggagg tgcctatgc ctgatccag
1081 acaagtggtg ccagcagcgc catgacctg gtactaaaga aagagcttgt tgcgcatctg
1141 aagtgacaca tcacgggact gacctctgg gacccagct gtgagcgaga ggacaggggt
1201 gacaagtttg tcttgccag tgcctactcc agctgtgcca tgcaggtatg agcaagtatg
1261 atcagcaatg aggggtggt caatatcctg toagactcat caccacagcg g

```

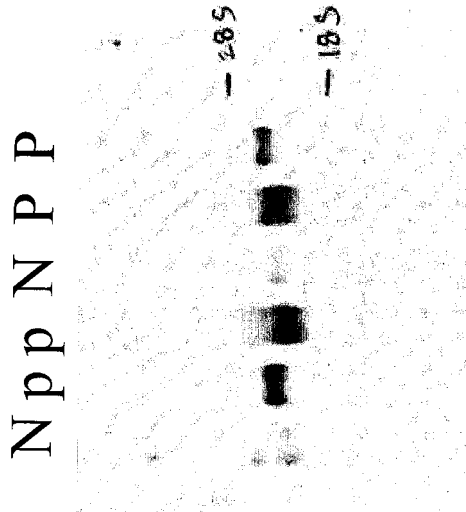
B. 予想されるタンパク質配列:

```

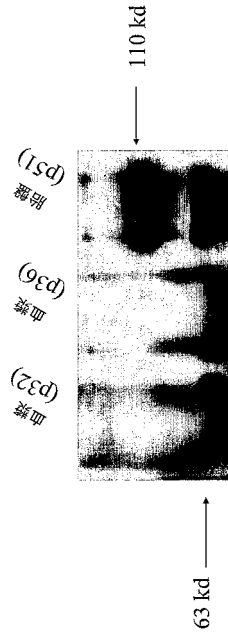
MetDRGTLPLAVALLASCSLSPTSLAETVHCDLQFVGPERGEV
TYTTSQVSKGCVAPNAILEVHVLFLFPFTGFSQLELTLQAS
KQNGTWPREVLLVLSVNSSVFLHLQALGIPLHAYNSSLVTFQ
EPPGVNTTELPSPFKTQILEWAAERGPITSAEELNDPQSILLRL
GQAQGSLSFCMetLEASQDMetGRILEWRPRTPALVRGCHLEGV
AGHKEAHILRVLPGHSAAGPRVTVTVKVELSCAPGDLDAVLILQG
PPYVSWLIDANHNMetQIWTTTGEYSFKIFPEKNIRGFKLPDTPQG
LLGEARMetLNASIVASFVELPLASIVSLHASSCGGRILQTSAPPI
QTTPPKDTCPSELLMetSLIQTKCADDAMetTLVLKKELVHLKC
TITGLTFWDPSCAEADRGDKFVLRSAYSSCGMetQVSASMetISN
EAVVNILSSSPQR

```

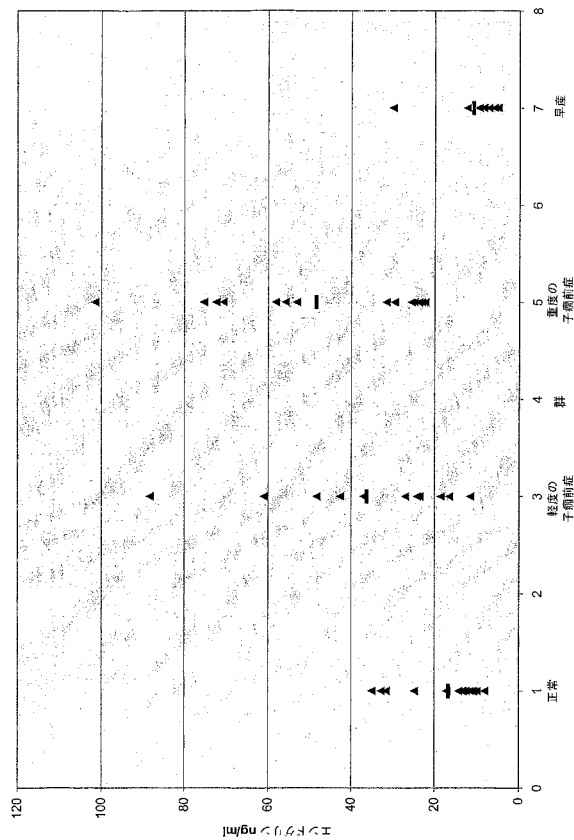
【図 3】



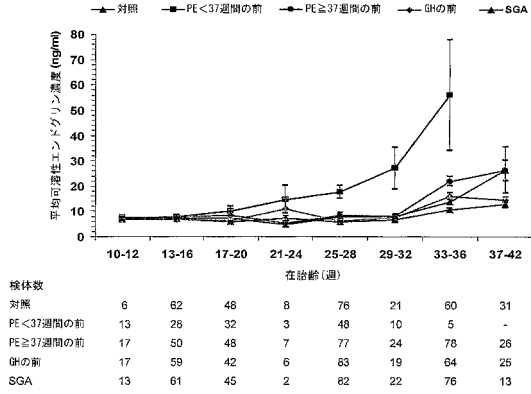
【図 4】



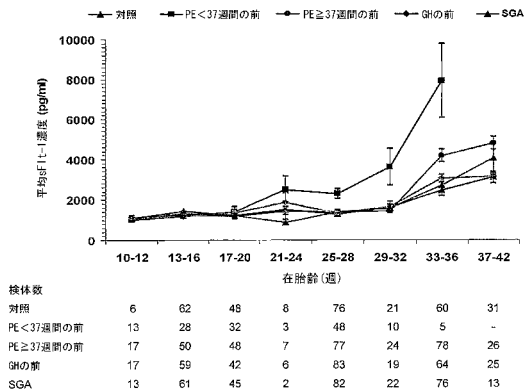
【図 5】



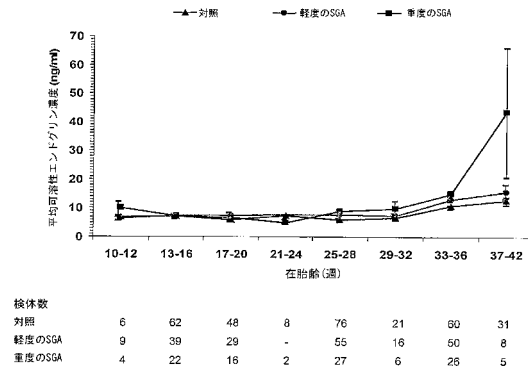
【図 6】



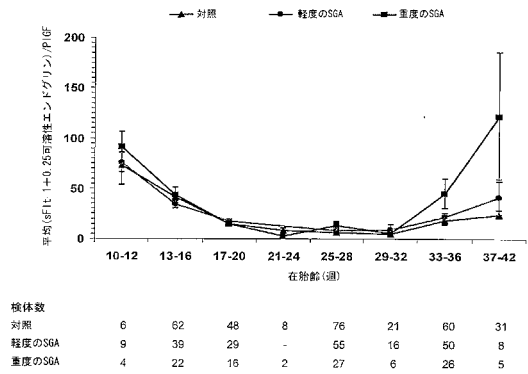
【図 7】



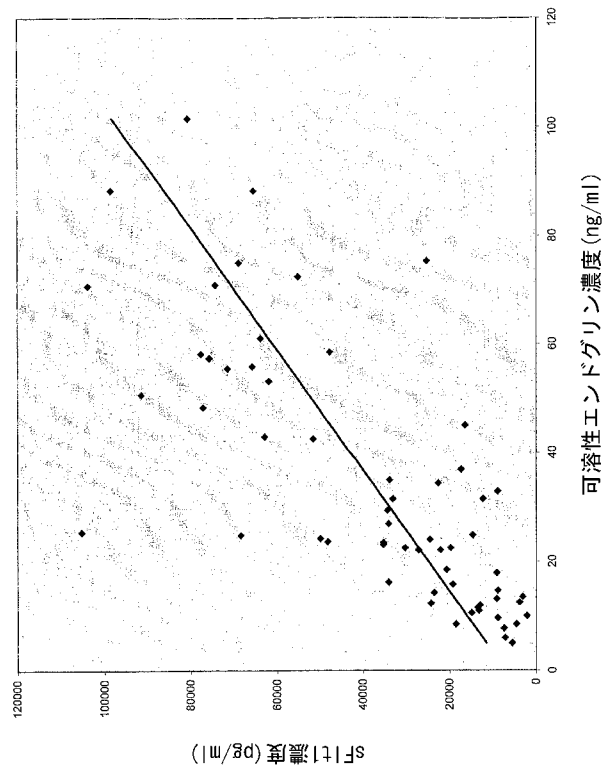
【図 16】



【図 17】

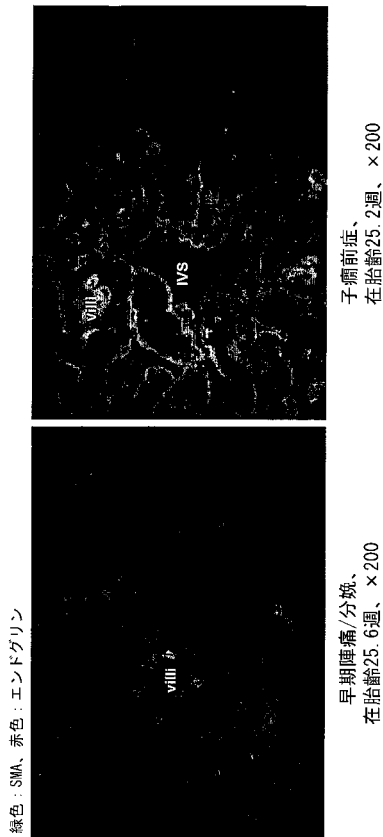


【図 18】



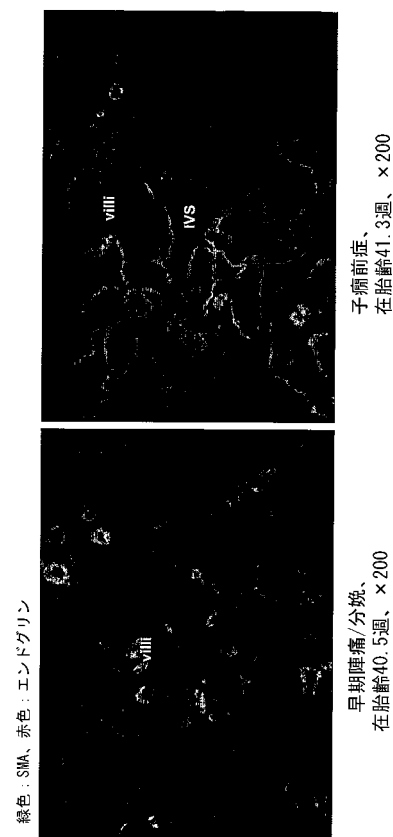
【図 19】

エンドグリンおよび平滑筋アクチン(SMA)の
二重免疫蛍光染色

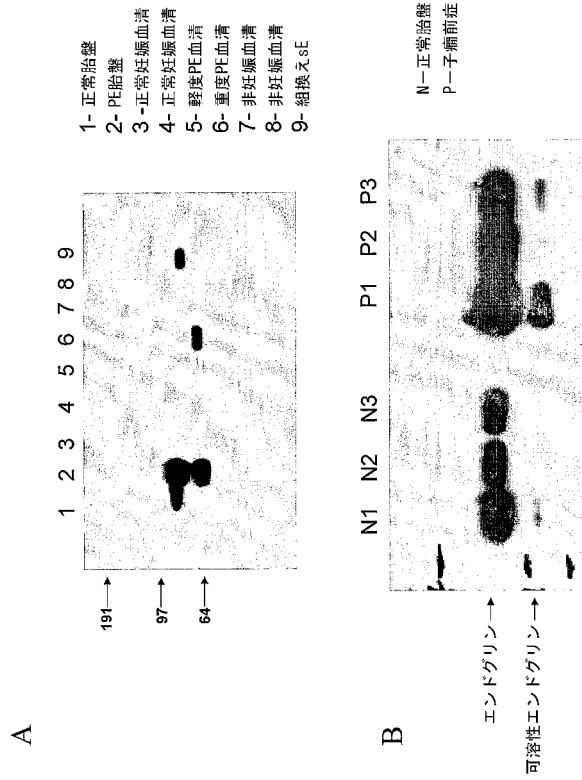


【図 20】

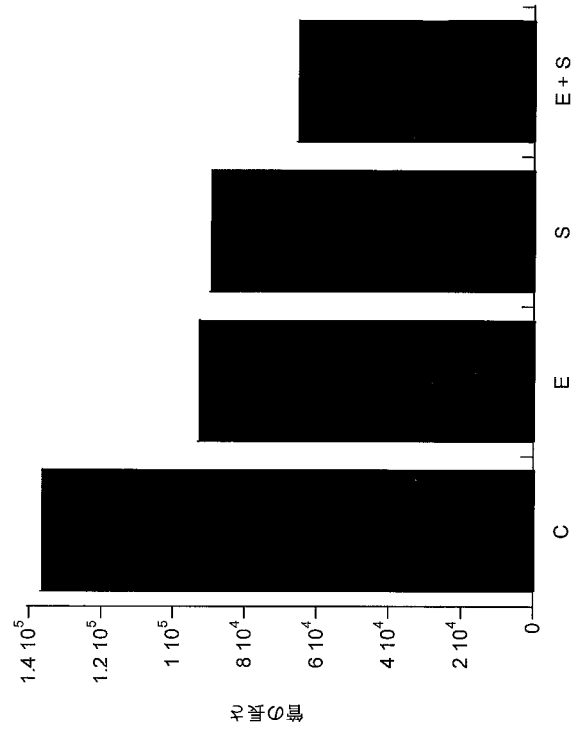
エンドグリンおよび平滑筋アクチン(SMA)の
二重免疫蛍光染色



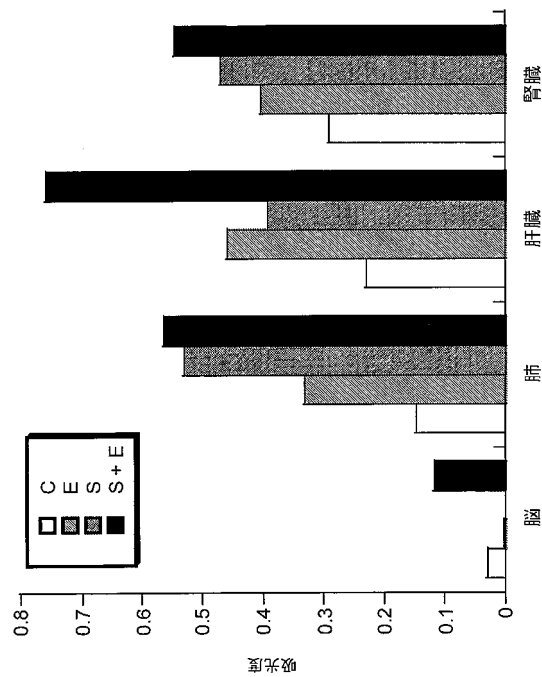
【図 2 1】



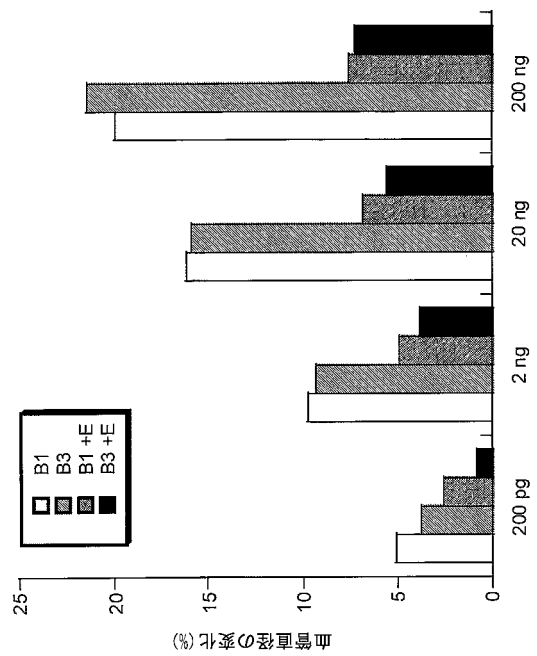
【図 2 2】



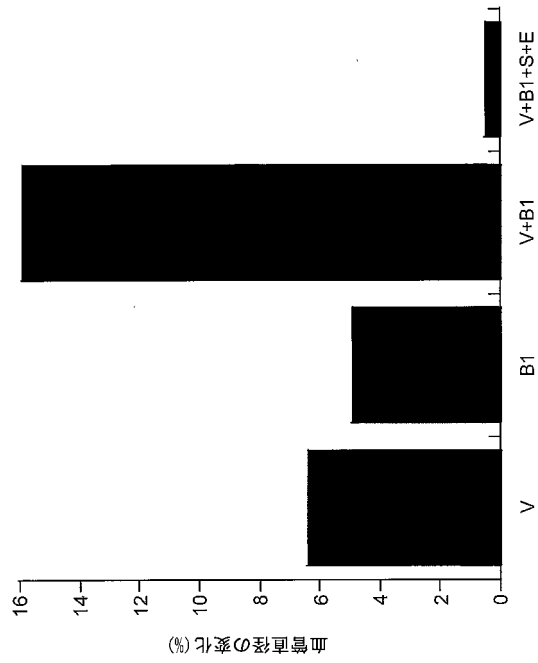
【図 2 3】



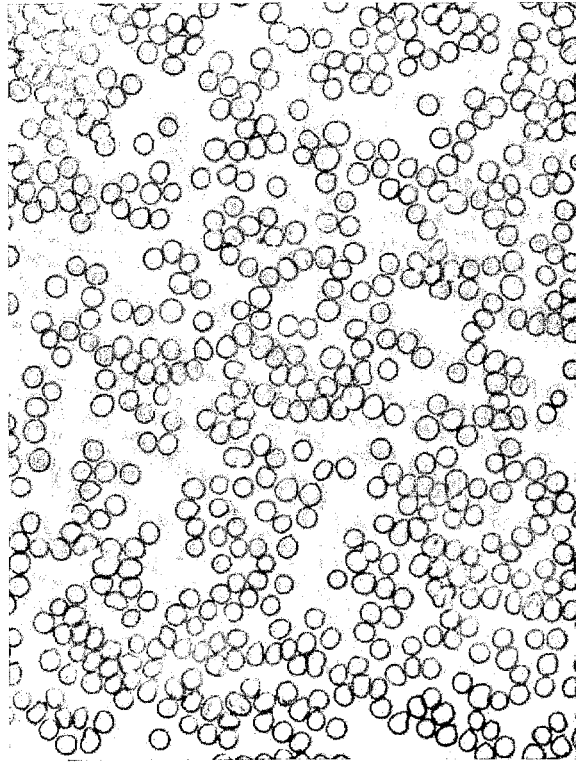
【図 2 4】



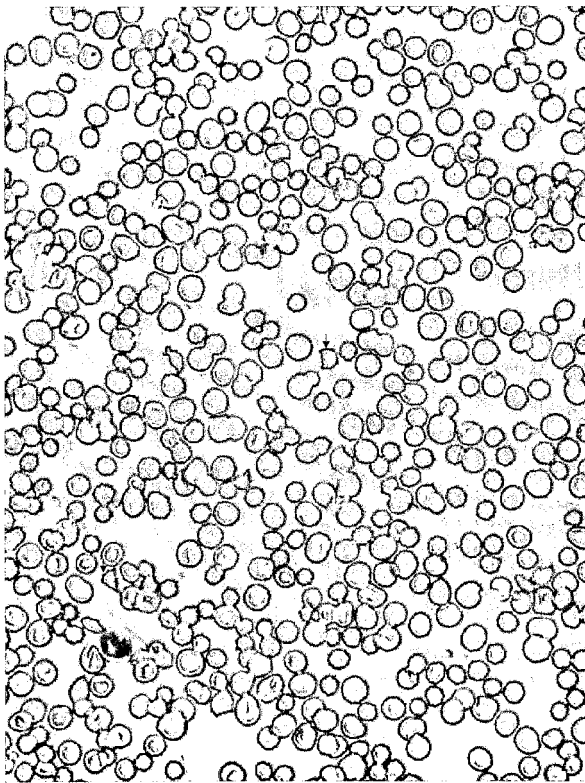
【図 2 5】



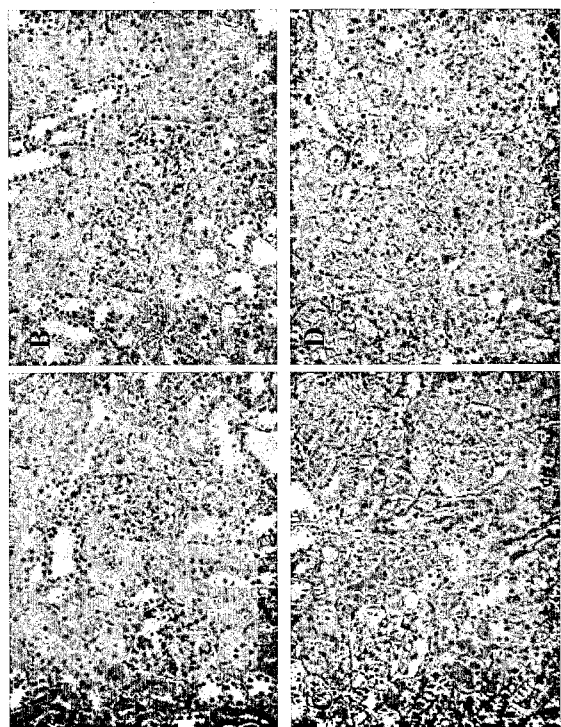
【図 2 6 A】



【図 2 6 B】



【図 2 7】



【配列表】

0005270161000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 スクハトム ヴィカス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン スカイ ビュー サークル 36

審査官 原田 隆興

(56)参考文献 国際公開第98/040747 (WO, A1)

国際公開第2004/008946 (WO, A1)

LI, C., et al., PLASMA LEVELS OF SOLUBLE CD105 CORRELATE WITH METASTASIS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER, Int. J. Cancer, 2000年 3月20日, Vol.89, No.2, p.122-126

CALABRO, L., et al., Differential Levels of Soluble Endoglin (CD105) in Myeloid Malignancies, JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, 2003年 2月, Vol.194, No.2, p.171-175

藤本 学, 他., 全身性強皮症患者血清中の可溶性endoglin値の検討, 日本皮膚科学会雑誌, 日本, 2004年 9月20日, Vol.114, No.10, p.1683

LI, C.G., et al., Immunodetection and characterisation of soluble CD105-TGF β complexes, Journal of Immunological Methods, 1998年 9月 1日, Vol.218, No.1/2, p.85-93

Placental syncytin expression in normal and preeclamptic pregnancies, KEITH, J.C., et al., American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2002年10月, Vol.187, No.4, p.1122-1123

KORFF, T., et al., Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies, Experimental Cell Research, 2004年, Vol.297, p.415-423

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 45/00

A01K 67/00

A61B 10/00

A61K 31/355

A61K 31/4422

A61K 31/465

A61K 31/48

A61K 31/505

A61K 31/522

A61K 31/7076

A61K 31/7088

A61K 31/711

A61K 38/22

A61K 39/395

A61K 48/00

A61P 15/00

A61P 43/00

C07K 16/28

C12Q 1/02

C12Q 1/68

G01N 33/15

G01N 33/50

G01N 33/53

C12N 15/09

C12P 21/08

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

专利名称(译)	诊断和治疗妊娠并发症的方法		
公开(公告)号	JP5270161B2	公开(公告)日	2013-08-21
申请号	JP2007533722	申请日	2005-09-26
申请(专利权)人(译)	贝斯以色列女执事医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	贝丝以色列医疗中心Deakonesu		
[标]发明人	カルマンチエスアナンス スクハトムヴィカス		
发明人	カルマンチ エス. アナンス スクハトム ヴィカス		
IPC分类号	G01N33/53 A61B10/00		
CPC分类号	A61K31/4439 A61K31/455 A61K31/513 A61K31/522 A61K38/1841 A61K38/1866 A61K38/1875 A61K38/1891 A61K38/22 A61P9/00 A61P9/12 A61P15/00 A61P43/00 C07K16/2896 G01N33/689 G01N2500/00 G01N2800/368 Y10T436/143333 A61K2300/00 A61K39/3955 A61K45/06 C07K14/495 C07K16/2863 G01N33/74 G01N2333/71 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/53.M A61B10/00.N		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/613170 2004-09-24 US		
其他公开文献	JP2008514631A5 JP2008514631A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了通过测量可溶内皮糖蛋白的水平或生物活性来诊断发展妊娠相关的高血压病症或妊娠相关的高血压病症的倾向的方法。本文还公开了使用改变可溶内皮糖蛋白水平或生物活性的化合物治疗妊娠相关的高血压病症如先兆子痫和子痫的方法。

【 0 2 2 0 】

表1) 研究集団の臨床的特徴

	正常妊娠 n = 44	子癇前症 n = 44	p
年齢(年)	29 ± 6	26 ± 6	0.04*
未経産	11 (25%)	30 (68.2%)	<0.001 *
喫煙	10 (22.7%)	1 (2.3%)	0.007*
出産時の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 *
出生時体重<第10パーセンタイル	0	16 (36.4 %)	<0.001 *