

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-511375

(P2014-511375A)

(43) 公表日 平成26年5月15日(2014.5.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Z N A N	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 9
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 M 1/34 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/34 F	4 C 0 8 5
<b>C 0 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-552737 (P2013-552737)  
 (86) (22) 出願日 平成24年2月7日 (2012.2.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年9月30日 (2013.9.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/024198  
 (87) 国際公開番号 W02012/109282  
 (87) 国際公開日 平成24年8月16日 (2012.8.16)  
 (31) 優先権主張番号 61/440,169  
 (32) 優先日 平成23年2月7日 (2011.2.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513198917  
 アガミン・ファーマシューティカルズ・エルエルシー  
 アメリカ合衆国・ニューヨーク・10032・ニュー・ヨーク・ブロードウェイ・3960・スイート・330ビー  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠関連高血圧性障害を治療または予防するための方法およびシステム

(57) 【要約】

固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 受容体 ( s F l t - 1 ) 抗体を用いたエクスピロ治療を s F l t - 1 の血中レベルを低下させるために使用して、子癇前症および子癇等の妊娠関連高血圧性障害を治療するための方法および装置を開示する。

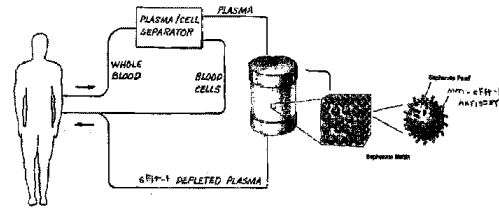


Fig. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法であって、配列番号 1 8、配列番号 2 0、および配列番号 2 2 を有する重鎖 C D R と、配列番号 2 4、配列番号 2 6、および配列番号 2 8 を有する軽鎖 C D R とを含む抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエクスピボで提供することを含む、方法。

**【請求項 2】**

前記重鎖は、配列番号 3 0、またはそれと少なくとも 8 5 % 同一の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記軽鎖は、配列番号 3 2、またはそれと少なくとも 8 5 % 同一の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法であって、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を有する重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 1 0、および配列番号 1 2 を有する軽鎖 C D R とを含む抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエクスピボで提供することを含む、方法。

**【請求項 5】**

前記重鎖は、配列番号 1 4、またはそれと少なくとも 8 5 % 同一の配列を含む、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記軽鎖は、配列番号 1 6、またはそれと少なくとも 8 5 % 同一の配列を含む、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 7】**

対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法であって、配列番号 1 8、配列番号 2 0、および配列番号 2 2 を有する重鎖 C D R と、配列番号 2 4、配列番号 2 6、および配列番号 2 8 を有する軽鎖 C D R とを含む抗体と結合について競合する抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエクスピボで提供することを含む、方法。

**【請求項 8】**

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、s F l t - 1 との結合について配列番号 3 0 を含む抗体と競合する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、s F l t - 1 との結合について配列番号 3 2 を含む抗体と競合する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 1 0】**

対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法であって、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を有する重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 1 0、および配列番号 1 2 を有する軽鎖 C D R とを含む抗体と結合について競合する抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエクスピボで提供することを含む、方法。

**【請求項 1 1】**

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、s F l t - 1 との結合について配列番号 1 4 を含む抗体と競合する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 1 2】**

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、s F l t - 1 との結合について配列番号 1 6 を含む抗体と競合する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 1 3】**

前記抗 s F l t - 1 抗体は、s F l t - 1 のドメイン 1 ~ 3 のうちの 1 つ以上に結合する、請求項 1 ~ 1 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 1 4】**

10

20

30

40

50

前記抗 s F l t - 1 抗体は、s F l t - 1 へのリガンド結合をブロックしない、請求項 1 ~ 1 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記妊娠関連高血圧性障害は、子癇または子癇前症である、請求項 1 ~ 1 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記妊娠関連高血圧性障害は、子癇前症である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記対象は、妊娠中のヒトまたは分娩後のヒトである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記対象は、妊娠中のヒトである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法であって、

( a ) 前記対象から血液を取り出すことと、

( b ) 血液またはその構成成分中の s F l t - 1 のレベルを低下させるために、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片が付着した固体支持体に前記血液またはその構成成分を通過させることと、

( c ) 前記血液またはその構成成分を前記対象の体に戻すことと、を含む、方法。

【請求項 2 0】

前記血液またはその構成成分は、血漿を含み、前記方法は、ある量の前記対象の血液を取り出すことと、前記血液を血漿と細胞成分とに分離することと、前記固体支持体に前記血漿を通過させることと、を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法であって、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエキスピボで提供することを含み、前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片が固体支持体に付着され、前記抗体 : s F l t - 1 の比率が 5 0 であるとき、前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、インビトロ分析において、ヒト血漿から少なくとも 7 0 %、または少なくとも 8 0 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 9 % の s F l t - 1 を枯渇させる、方法。

【請求項 2 2】

対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法であって、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエキスピボで提供することを含み、前記抗体またはその s F l t - 1 結合断片が固体支持体に付着され、前記抗体 : s F l t - 1 の比率が 1 0 0 であるとき、前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、インビトロ分析において、ヒト血漿から少なくとも 8 0 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 9 % の s F l t - 1 を枯渇させる、方法。

【請求項 2 3】

対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法であって、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエキスピボで提供することを含み、前記抗体またはその s F l t - 1 結合断片が固体支持体に付着され、前記抗体 : s F l t - 1 の比率が 2 5 0 であるとき、前記抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、インビトロ分析において、ヒト血漿から少なくとも 8 0 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 9 % の s F l t - 1 を枯渇させる、方法。

【請求項 2 4】

配列番号 1 8、配列番号 2 0、および配列番号 2 2 と実質的に同一の配列を有する 1 つ以上の重鎖 C D R と、配列番号 2 4、配列番号 2 6、および配列番号 2 8 と実質的に同一である 1 つ以上の軽鎖 C D R と、を含む、抗 s F l t - 1 抗体。

【請求項 2 5】

10

20

30

40

50

配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 を有する重鎖 CDR と、配列番号 24、配列番号 26、および配列番号 28 を有する軽鎖 CDR と、を含む、請求項 24 に記載の抗 sFlt-1 抗体。

【請求項 26】

前記重鎖は、配列番号 30、またはそれと少なくとも 85% 同一の配列を含む、請求項 24 または 25 に記載の抗 sFlt-1 抗体。

【請求項 27】

前記軽鎖は、配列番号 32、またはそれと少なくとも 85% 同一の配列を含む、請求項 24 または 25 に記載の抗 sFlt-1 抗体。

【請求項 28】

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 と実質的に同一の配列を有する 1 つ以上の重鎖 CDR と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 に少なくとも 85% の類似性を有する軽鎖 CDR と、を含む、抗 sFlt-1 抗体。

【請求項 29】

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を有する重鎖 CDR と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 を有する軽鎖 CDR と、を含む、請求項 28 に記載の抗 sFlt-1 抗体。

【請求項 30】

前記重鎖は、配列番号 14、またはそれと少なくとも 85% 同一の配列を含む、請求項 28 または 29 に記載の抗 sFlt-1 抗体。

【請求項 31】

前記軽鎖は、配列番号 16、またはそれと少なくとも 85% 同一の配列を含む、請求項 28 または 29 に記載の抗 sFlt-1 抗体。

【請求項 32】

前記抗 sFlt-1 抗体は、sFlt-1 のドメイン 1～3 のうちの 1 つ以上に結合する、請求項 24～31 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 33】

前記抗 sFlt-1 抗体は、sFlt-1 へのリガンド結合をブロックしない、請求項 24～31 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 34】

以下を含むシステム：

(a) 抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片であって、前記抗体が固体支持体に付着され、前記抗体：sFlt-1 のモル比が 50 であるとき、インビトロ分析において、ヒト血漿から少なくとも 70%、または少なくとも 80%、または少なくとも 90%、または少なくとも 95%、または少なくとも 99% の sFlt-1 を枯渇させる、抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片と、

(b) 対象からの血液またはその構成成分を前記固体支持体に結合した前記抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片まで運んで、前記血液またはその構成成分を前記抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片と接触させ、それによって前記血液またはその構成成分から sFlt-1 を除去するようにするための第 1 の手段と、

(c) 前記血液またはその構成成分が前記抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片と接触した後に、前記血液またはその構成成分を前記対象まで運ぶための第 2 の手段。

【請求項 35】

請求項 24～31 のいずれか 1 項に記載の抗 sFlt-1 抗体、または sFlt-1 との結合について請求項 24～31 のいずれか 1 項に記載の抗 sFlt-1 抗体と競合する抗体を含む、請求項 34 に記載のシステム。

【請求項 36】

請求項 34 または 35 のいずれか 1 項に記載のシステムであって、第 1 の手段は、

(i) 対象の血液系に到達するための、前記対象の血管に挿入される、アクセスデバイ

10

20

30

40

50

スト、

( i i ) 前記アクセスデバイスを、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片に流体的に接続し、それによって、前記対象の血液またはその構成成分を前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片まで流れさせ、それと接触させる、導管システムと、を備える、システム。

【請求項 37】

請求項 34 または 35 のいずれか 1 項に記載のシステムであって、前記第 2 の手段は、

( i ) 導管システムと、

( i i ) 戻しデバイスと、を備え、前記戻しデバイスは、前記対象の血管に挿入され、前記導管システムは、前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片に接触している前記血液またはその構成成分を前記戻しデバイスに流体的に接続して、前記血液またはその構成成分の前記対象への戻しが可能となるようにさせる、システム。

10

【請求項 38】

前記第 1 の手段は、前記対象の血液を血漿と細胞成分とに分離するためのデバイスを備える、請求項 34 ~ 37 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 39】

前記対象の血液を血漿と細胞成分とに分離するための前記デバイスは、遠心分離機またはアフレスデバイスである、請求項 38 に記載のシステム。

【請求項 40】

固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を含むカラムであって、前記抗体が固体支持体に付着され、前記抗体：s F l t - 1 のモル比が 50 であるとき、前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、インビトロ分析において、ヒト血漿から少なくとも 70 %、または少なくとも 80 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %、または少なくとも 99 % の s F l t - 1 を枯渇させる、カラム。

20

【請求項 41】

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 と実質的に同一の配列を有する 1 つ以上の重鎖 C D R と、配列番号 24、配列番号 26、および配列番号 28 と実質的に同一である 1 つ以上の軽鎖 C D R と、を含む、請求項 40 に記載のカラム。

30

【請求項 42】

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 を有する重鎖 C D R と、配列番号 24、配列番号 26、および配列番号 28 を有する軽鎖 C D R と、を含む、請求項 41 に記載のカラム。

【請求項 43】

前記重鎖は、配列番号 30、またはそれと少なくとも 85 % 同一の配列を含む、請求項 41 または 42 に記載のカラム。

【請求項 44】

前記軽鎖は、配列番号 32、またはそれと少なくとも 85 % 同一の配列を含む、請求項 41 または 42 に記載のカラム。

40

【請求項 45】

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 と実質的に同一の配列を有する 1 つ以上の重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 と実質的に同一である 1 つ以上の軽鎖 C D R と、を含む、請求項 40 に記載のカラム。

【請求項 46】

前記抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を有する重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 を有する軽鎖 C D R と、を含む、請求項 45 に記載のカラム。

【請求項 47】

50

前記重鎖は、配列番号 14、またはそれと少なくとも 85% 同一の配列を含む、請求項 45 または 46 に記載のカラム。

【請求項 48】

前記軽鎖は、配列番号 16、またはそれと少なくとも 85% 同一の配列を含む、請求項 45 または 46 に記載のカラム。

【請求項 49】

前記抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、ヒト sFlt-1 のドメイン 1~3 のうちの 1 つ以上に結合する、請求項 40 に記載のカラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、子癇前症および子癇等の妊娠関連高血圧性障害を治療するための方法、システム、デバイス、および装置に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年2月7日に提出された米国特許出願第 61/440,169 号に対する優先権を主張するものであり、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

子癇前症は、妊娠の 5~10% に影響を及ぼし、その結果、母体および胎児の高い罹患率ならびに死亡率をもたらす、高血圧、浮腫、およびタンパク尿の症候群である。子癇前症は、1年当たり世界中で少なくとも 200,000 人の妊産婦死亡の原因である。子癇前症の症状は、典型的には、妊娠第 20 週後に現れ、通常、血圧および尿を日常的に監視することによって検出される。しかしながら、これらの監視方法は、効果的な治療が利用可能な場合には、対象または発育中の胎児へのリスクを低減させることができる初期段階の子癇前症の診断には無効である。

【0004】

子癇前症の症状は、一般的に、以下のうちのいずれかを含む：(1) 妊娠 20 週後の収縮期血圧 (BP) 140 mmHg 超および拡張期 BP 90 mmHg 超、(2) 新たに発症したタンパク尿 (尿検査時のディップスティックで 1+、24 時間蓄尿中のタンパク質 300 mg 超、もしくはタンパク質/クレアチニン比 0.3 超のランダム尿)、または (3) 分娩後 12 週までの高血圧およびタンパク尿の解消。子癇前症の症状は、腎障害および糸球体内皮症または糸球体肥大も含み得る。子癇の他の症状は、妊娠または最近の妊娠の影響に起因する以下の症状のうちのいずれかであり得る：発作、昏睡、血小板減少、肝浮腫、肺水腫、または脳浮腫。

【0005】

子癇前症は、軽度から致死的まで重症度が異なり得る。軽度型の子癇前症は、床上安静および頻りに監視することによって治療することができる。中程度から重度の場合は入院を勧められ、発作を予防するための血圧薬または抗痙攣薬が処方される。状態が母体または胎児の生命を脅かすようになった場合、妊娠が中止され、胎児を早産させる。

【0006】

いくつかの要因が、胎児および胎盤の発育ならびに子癇前症に関連していると報告されている。それらは、血管内皮増殖因子 (VEGF)、可溶性 Flt-1 受容体 (sFlt-1)、および胎盤増殖因子 (PlGF) を含む。VEGF は、内皮細胞特異的マイトゲン、血管新生誘導因子、および血管透過性の媒介物質である。VEGF はまた、糸球体毛細血管の修復に重要であることも示されている。VEGF は、米国特許第 5,332,671 号、米国特許第 5,240,848 号、および米国特許第 5,194,596 号、ならびに Charnock-Jones et al., 1993, Biol. Reproduction, 48:1120-1128 に開示されている。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 つの異なる代替スプライシングされたアイソ

10

20

30

40

50

フォームを含む。天然 VEGF の生物活性は、血管内皮細胞または臍帯静脈内皮細胞の選択的増殖の促進、および血管新生の誘導を含む。VEGF は、いくつかのファミリーメンバーまたはアイソフォーム（例えば、VEGF - A、VEGF - B、VEGF - C、VEGF - D、VEGF - E、VEGF 189、VEGF 165、または VEGF 121）を含み、例えば、Tischer et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 11947 - 11954、Neufed et al., 1996, Cancer Metastasis 15: 153 - 158、米国特許第 6,447,768 号、米国特許第 5,219,739 号、および米国特許第 5,194,596 号を参照されたい。Gille et al., 2001, J. Biol. Chem. 276: 3222 - 3230 に記載される KDR 選択的 VEGF および Flt 選択的 VEGF 等の VEGF の突然変異型も知られている。VEGF の改良型は、LeCouter et al., 2003, Science 299: 890 - 893 に記載されている。

10

## 【0007】

VEGF は、多くの異なる組織から得られる内皮細胞中に差次的に発現される 2 つの相同性の膜貫通型チロシンキナーゼ受容体である fms 様チロシンキナーゼ (Flt - 1) およびキナーゼドメイン受容体 (KDR) にホモ二量体として結合する。GenBank 受託番号 AF063657 は、ヒト Flt - 1 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を提供する。Flt - 1 は、胎盤の形成に寄与する栄養膜細胞によって高度に発現されるが、KDR は発現されない。PlGF は、同じく胎盤の発育に関与する VEGF ファミリーのメンバーである。PlGF は、細胞栄養芽層およびシンシチウム栄養芽層によって発現され、内皮細胞の増殖、遊走、および活性化を誘導することができる。PlGF は、ホモ二量体として Flt - 1 受容体に結合するが、KDR 受容体には結合しない。PlGF および VEGF の両方が、胎盤の発育に非常に重要な分裂促進活性および血管形成に寄与する。

20

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0008】

【特許文献 1】米国特許出願第 61/440,169 号

【特許文献 2】米国特許第 5,332,671 号

【特許文献 3】米国特許第 5,240,848 号

【特許文献 4】米国特許第 5,194,596 号

【特許文献 5】米国特許第 6,447,768 号

【特許文献 6】米国特許第 5,219,739 号

【特許文献 7】米国特許第 5,194,596 号

## 【非特許文献】

## 【0009】

【非特許文献 1】Charnock - Jones et al., 1993, Biol. Reproduction, 48: 1120 - 1128

【非特許文献 2】Tischer et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 11947 - 11954

【非特許文献 3】Neufed et al., 1996, Cancer Metastasis 15: 153 - 158

【非特許文献 4】Gille et al., 2001, J. Biol. Chem. 276: 3222 - 3230

【非特許文献 5】LeCouter et al., 2003, Science 299: 890 - 893

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0010】

完全長 Flt - 1 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、ヒ

30

40

50

ト臍帯静脈内皮細胞の培養培地において同定され、後に、胎盤組織においてsFlt-1のインビボでの発現が実証された。sFlt-1は、VEGFに高親和性で結合するが、内皮細胞の有糸分裂誘発を刺激しない。妊娠関連高血圧性障害（例えば、子癇前症もしくは子癇）に罹患しているかまたはそれを発症するリスクのある妊娠中の女性から採取された血清試料中に見られたsFlt-1レベルの上昇は、sFlt-1が、胎児および/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的な増殖因子の栄養膜細胞および母体の内皮細胞に結合して枯渇させる「生理的シンク」としての役割を果たしていることを示唆するものである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、対象におけるsFlt-1に関連する障害を治療または予防するために、対象の血中sFlt-1レベルを低下させるのに十分な量でおよび十分な時間の間、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片またはsFlt-1リガンドを対象にエクスピボで提供することを含む、対象における妊娠関連高血圧性障害等のsFlt-1に関連する障害を治療または予防する方法を提供する。

【0012】

特定の実施形態において、本方法は、ある量の対象の血液を除去することと、対象の血液またはその構成成分中のsFlt-1を、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片またはsFlt-1リガンドに結合させ、それによって、対象の血液またはその構成成分中のsFlt-1の量を減少させるために、血液またはその構成成分（例えば、血漿）を、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片またはsFlt-1リガンドと接触させること（抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片またはsFlt-1リガンドは、固体支持体に結合している）と、血液またはその構成成分を対象に戻すこととを含む。

【0013】

本発明は、抗sFlt-1抗体およびそのsFlt-1結合断片を提供する。抗体は、前述のエクスピボ法において使用され、また対象に投与することもできる。特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、配列番号18、配列番号20、および配列番号22を有する1つ、2つ、または3つの重鎖CDRと、配列番号24、配列番号26、および配列番号28を有する1つ、2つ、または3つの軽鎖CDRとを含む。特定の実施形態において、sFlt-1抗体は、配列番号18、配列番号20、および配列番号22と実質的に同じ配列を有する1つ、2つ、または3つの重鎖CDRと、配列番号24、配列番号26、および配列番号28と実質的に同じ配列を有する1つ、2つ、または3つの軽鎖CDRとを含む。いくつかの実施形態において、抗sFlt-1抗体またはその結合断片は、配列番号30および32、またはそれと少なくとも85%もしくは少なくとも90%同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの可変領域を含む。

【0014】

特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、配列番号2、配列番号4、および配列番号6を有する1つ、2つ、または3つの重鎖CDRと、配列番号8、配列番号10、および配列番号12を有する1つ、2つ、または3つの軽鎖CDRとを含む。特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体は、配列番号2、配列番号4、および配列番号6と実質的に同じ配列を有する1つ、2つ、または3つの重鎖CDRと、配列番号8、配列番号10、および配列番号12と実質的に同じ配列を有する1つ、2つ、または3つの軽鎖CDRとを含む。いくつかのそのような実施形態において、抗sFlt-1抗体またはその結合断片は、配列番号14および16、またはそれと少なくとも85%もしくは少なくとも90%同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの可変領域を含む。

【0015】

本発明の特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体は、sFlt-1へのリガンド

10

20

30

40

50

結合をブロックしない。s F l t - 1 リガンドは、P l G F、V E G F (それらのアイソフォームを含む)を含む。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、F l t - 1 中には存在しない s F l t - 1 中のエピトープに結合する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、s F l t - 1 アイソフォームのカルボキシ末端からのアミノ酸を含むエピトープに結合する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、ヒト s F l t - 1 のドメイン 1 ~ 3 のうちの 1 つ以上に結合する。

【 0 0 1 6 】

抗体が、血液またはその構成成分から s F l t - 1 を枯渇させる能力は、必ずしも結合親和性に依存するわけではなく、抗体が結合する s F l t - 1 の領域による影響を受け得ることが観察される。本発明の特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、配列番号 1 8、配列番号 2 0、および配列番号 2 2 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 2 4、配列番号 2 6、および配列番号 2 8 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体は、配列番号 1 8、配列番号 2 0、および配列番号 2 2 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 2 4、配列番号 2 6、および配列番号 2 8 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。いくつかの実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその結合断片は、配列番号 3 0 および 3 2、またはそれと少なくとも 8 5 % もしくは少なくとも 9 0 % 同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの可変領域を含む抗体との結合について競合する。

10

20

【 0 0 1 7 】

本発明の特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 1 0、および配列番号 1 2 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 1 0、および配列番号 1 2 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。いくつかの実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその結合断片は、配列番号 1 4 および 1 6、またはそれと少なくとも 8 5 % もしくは少なくとも 9 0 % 同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの可変領域を有する抗体との結合について競合する。

30

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態において、妊娠関連高血圧性障害は、子癇または子癇前症である。特定の実施形態において、妊娠関連高血圧性障害は、子癇前症である。特定の実施形態において、s F l t - 1 関連障害は、腎疾患である。

【 0 0 1 9 】

特定の実施形態において、血液またはその構成成分は血漿であり、方法は、ある量の対象の血液を除去することと、血漿を、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片と接触させる前に、血液を血漿と細胞成分とに分離することを含む。

40

【 0 0 2 0 】

特定の実施形態において、対象は、妊娠中のヒト、分娩後のヒト、またはヒト以外 (例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコ) である。特定の実施形態において、対象は、妊娠中のヒトまたは分娩後のヒトである。特定の実施形態において、対象は、妊娠中のヒトである。

【 0 0 2 1 】

本発明は、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片または s F l t - 1 リガンドと、血液を、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t -

50

1 抗原結合断片と接触させ、それによって血液から s F l t - 1 を除去するために、対象からの血液を、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片または s F l t - 1 リガンドまで運ぶための第 1 の手段と、血液が抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片と接触した後に、血液を対象まで運ぶための第 2 の手段とを備えるシステムを提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明の特定の実施形態において、妊娠関連高血圧性障害を治療または予防するために、血液よりもむしろ血漿が、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片または s F l t - 1 リガンドと接触させられる。したがって、特定の実施形態において、第 1 の手段は、対象の血液を血漿と細胞成分とに分離するためのデバイスを含む。

10

【 0 0 2 3 】

特定の実施形態において、第 1 の手段は、対象の血液系にアクセスするために対象の血管に挿入される、カテーテル、針、カニューレ等のアクセスデバイスと、アクセスデバイスを、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片に流体的に接続し、それによって対象の血液を抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片まで流れさせ、それらと接触させる、チューブ、パイプ、中空ファイバ等の導管システムと、任意選択的に、アクセスデバイスおよび導管システムを通して抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片まで対象からの血液を移動させるためのポンプ（例えば、蠕動ポンプ）等を備える。

20

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態において、第 2 の手段は、チューブ、パイプ、中空ファイバ等の導管システムと、カテーテル、針、カニューレ等の戻しデバイスとを備え、戻しデバイスは、対象の血管（例えば、静脈）に挿入され、導管システムは、血液または血漿の対象への戻しを可能にするように、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片または s F l t - 1 リガンドと接触している血液または血漿を戻しデバイスに流体的に接続する。任意選択的に、第 2 の手段は、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片または s F l t - 1 リガンドから導管システムを通して戻しデバイスまで血液または血漿を移動させるためのポンプ（例えば、蠕動ポンプ）等も備える。このポンプ等は、第 1 の手段の一部であるものと同じポンプ等であり得るか、または代替として、血液または血漿を対象まで運ぶための第 2 の手段のための原動力は、第 2 の手段に特有の別個のポンプ等であり得る。

30

【 0 0 2 5 】

特定の実施形態において、対象の血液を血漿と細胞成分とに分離するためのデバイスは、遠心分離機またはアフエレシスデバイス、例えば、プラスマフェレシスデバイスである。

【 0 0 2 6 】

特定の実施形態において、第 1 および / または第 2 の手段はまた、導管システムにおいて血液の圧力および / または流速を測定するための 1 つ以上のセンサを含み得る。

【 0 0 2 7 】

本発明はまた、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドを含むカラムを提供し、カラムは、子癩または子癩前症等の妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する際に使用するのに好適である。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 8 】

【 図 1 】本発明の一実施形態の略図を示し、対象からの血液が血漿と細胞成分とに分離され、細胞成分が対象に戻され、抗 s F l t - 1 抗体との接触が s F l t - 1 の血漿を枯渇させるように抗 s F l t - 1 抗体が付着された S E P H A R O S E（登録商標）ビーズで充填したカラムまで血漿が運ばれ、s F l t - 1 の枯渇した血漿が対象に戻される。

【 図 2 】固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体および V E G F <sub>1 2 1</sub> を含む s F l t

50

- 1 結合構成成分の使用による s F l t - 1 を含む溶液からの s F l t - 1 の枯渇 ( パネル A ) と、 F o r t e B i o O c t e t による精製されたモノクローナル抗体および F l t - 1 の見かけの  $K_d$  測定 ( パネル B ) を示す。

【図 3】固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその抗 s F l t - 1 抗原結合断片を含むカラムの一実施形態を示す。カラムは、円筒状の筐体 1 と、2 つの接続キャップ 2 および 3 とを備え、キャップ 2 は、対象からの血液または血漿を、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片まで送達するための手段に接続され、キャップ 3 は、血液または血漿が、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 抗原結合断片と接触した後に、s F l t - 1 の枯渇した血液または血漿を対象に戻すための手段に接続されている。上方ディスク 4 は、キャップ 2 内に挿入された障壁であり、固体支持体 5 を入り口開口部から離して維持する。同様のディスクが下方キャップ 3 内に存在するが、図示されていない。固体支持体 5 は、この図においてビーズの形態で表されているが、いずれの便利な形状であってもよい。抗 s F l t - 1 抗体は図示されていないが、固体支持体 5 に結合している。1、2、3、および 4 は、血液適合性の合成材料からできており、従来技術によって相互接続されている。

【図 4】流速が抗体 A G 1 0 B による s F l t - 1 の枯渇に与える影響を示す。

【図 5】線流速が抗体 A G 1 0 B による s F l t - 1 の枯渇に与える影響を示す。

【図 6】滞留時間が抗体 A G 1 0 B による s F l t - 1 の枯渇に与える影響を示す。

【図 7】A G 1 0 B の密度が s F l t - 1 の枯渇に与える影響を示す。

【図 8】様々な A G 1 0 B : s F l t - 1 比にわたる血漿からの s F l t - 1 の枯渇を示す。非特異的抗体 E r b i t u x は s F l t - 1 を枯渇させず、A G 1 0 B の効果が特異的であることが示唆される。

【図 9】様々な A G 1 0 B : s F l t - 1 比にわたる血清からの s F l t - 1 の枯渇を示す。

【図 10】s F l t - 1 の枯渇がカラム床体積による影響を受けないことを示す。

【図 11】ヘパリンの存在下における抗体 A G 1 0 B による s F l t - 1 の枯渇を示す。

【図 12】抗体 A G 1 0 B と s F l t - 1 との結合が V E G F 結合をブロックしないことを示す。

【図 13】セファロースビーズ上に固定化された A G 1 0 B が補体系を活性化させないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明は、対象の血中 s F l t - 1 レベルを低下させるのに十分な量でおよび十分な時間の間、限定されないが、s F l t - 1 リガンドおよび結合タンパク質、抗 s F l t - 1 抗体およびその s F l t - 1 結合断片を含む抗 s F l t - 1 結合物質を対象にエクスピボで提供することを含み、s F l t - 1 に関連する疾患または障害を治療または予防する方法を提供する。一実施形態において、本発明は、対象の血中 s F l t - 1 レベルを低下させるのに十分な量でおよび十分な時間の間、限定されないが、s F l t - 1 リガンドおよび結合タンパク質、抗 s F l t - 1 抗体およびその s F l t - 1 結合断片を含む抗 s F l t - 1 結合物質を対象にエクスピボで提供し、それによって、対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防することを含み、妊娠関連高血圧性障害を有するかまたは発症するリスクがあり、したがって妊娠関連高血圧性障害の治療または予防を必要とする対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、早期分娩を治療する方法を提供する。s F l t - 1 レベルは、典型的には正常な妊娠の最後の数週間の間を上昇し、高血圧性障害を伴わない場合がある。したがって、本発明は、妊娠後期および分娩の非高血圧性 s F l t - 1 関連障害を治療するため、またはそのような障害を回避するために予防的に使用される。別の実施形態において、本発明は、慢性腎疾患を治療または予防する方法を提供する。

【0030】

「可溶性 F l t - 1 ( s F l t - 1 )」( s V E G F - R 1 としても知られる ) は、G

10

20

30

40

50

enBank 受託番号 AF063657 によって定義されるタンパク質と同一または相同である Flt-1 受容体の可溶型を指し、sFlt-1 の生物活性を有する。sFlt-1 の生物活性は、任意の標準的な方法を使用して、例えば、VEGF への sFlt-1 の結合を測定することによって測定することができる。sFlt-1 は、Flt-1 受容体の膜貫通ドメインおよび細胞内チロシンキナーゼドメインを欠損している。sFlt-1 は、VEGF および PlGF に高親和性で結合することができるが、増殖または血管新生を誘導することはできず、したがって、Flt-1 受容体および KDR 受容体とは機能的に異なる。sFlt-1 は、最初にヒト臍帯内皮細胞から精製され、後に、栄養膜細胞によってインビボで産生されることが示された。本明細書において使用される場合、sFlt-1 は、あらゆる sFlt-1 のファミリーメンバーまたはアイソフォームを含む。非限定的な例として、スプライス変異体として認識される sFlt-1 のアイソフォームが挙げられる。スプライス変異体は、共通の転写開始部位を有するが、Flt-1 をコードする 30 個全部のスプライシングされたエキソンを含まない。あるアイソフォームは、最初に 13 個のエキソン、続いてイントロン 13 の一部およびポリ(A)シグナル配列を有する mRNA によってコードされ、最初の 6 つの Ig 様ドメインを含むが、7 番目の Ig 様ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞内ドメインは含まない (GenBank 受託番号 AF063657、Kendall et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90:10705-9)。別のアイソフォームは、最初に 14 個のエキソン、続いて新しい代替スプライシングされた末端エキソン 15、およびポリ(A)シグナル配列を有する mRNA によってコードされる。アイソフォームは、7 番目の細胞外 Ig 様ドメインで切断される (GenBank 受託番号 AI188382、Thomas et al., 2007, FASEB J. 21:3885-3895)。他のいくつかの代替スプライシングされた mRNA およびそれらの翻訳産物も報告されるかまたは予測されている。これらのタンパク質の各々は、最初の翻訳終止コドンまで mRNA の代替スプライシングされた 3' 末端によってコードされるアミノ酸を含む固有の C 末端配列を含む。また、sFlt-1 は、Flt-1 受容体の酵素的切断から生じる分解産物または断片を意味することもでき、そのような分解産物または断片が sFlt-1 の生物活性を維持する。1 つの例において、胎盤から放出される特異的メタロプロテイナーゼは、Flt-1 受容体の細胞外ドメインを切断して Flt-1 の N 端部分を循環中に放出し得る。

10

20

30

#### 【0031】

「エクスピボ」は、本明細書に開示される治療または予防の方法を対象の体の外で、すなわち体外で、実施することを指し、それによって、対象の血液または血液成分（例えば、血漿）が、対象の体外で抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片と接触せられる。

#### 【0032】

「抗 sFlt-1 抗体」は、sFlt-1 に結合することができる抗体を指す。抗 sFlt-1 抗体の「sFlt-1 結合断片」は、sFlt-1 に結合する能力を保持する抗 sFlt-1 抗体の一部を指す。

#### 【0033】

「sFlt-1 リガンド」は、sFlt-1 に結合する増殖因子またはその誘導体を指す。自然発生型の sFlt-1 リガンドは、限定されないが、血管内皮増殖因子 (VEGF) および胎盤増殖因子 (PlGF) を含む。VEGF は、好ましくは VEGF-A または VEGF-B である。VEGF は、限定されないが、VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub>、および VEGF<sub>189</sub> を含むそのアイソフォームを含む。PlGF は、限定されないが、PlGF-1、PlGF-2、PlGF-3、および PlGF-4 を含むそのアイソフォームを含む。誘導体は、限定されないが、VEGF および PlGF の融合タンパク質、ならびに sFlt-1 に結合する VEGF および PlGF の配列変異体を含む。

40

#### 【0034】

「sFlt-1 結合物質」は、抗体、抗体断片、リガンド、および sFlt-1 に選択

50

的に結合するあらゆる他の結合分子（例えば、天然または合成のタンパク質、ポリペプチド、およびポリマー）を含む。

【0035】

本発明の抗体は、患者からの血液または血漿中の s F l t - 1 を効率的に枯渇させるのに効果的である。s F l t - 1 は、可溶性であり得るかまたは血流中に循環する微小粒子であり得る。本発明によれば、組織に結合した s F l t - 1 を放出するため、対象にヘパリンを投与することができ、s F l t - 1 のエクスピボでの枯渇を促進し、対象内に残された非循環 s F l t - 1 のプールを最小限に抑える。

【0036】

抗体配列の非限定的な例を提供する。本発明は、配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 24、配列番号 26、および配列番号 28 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む、単離された s F l t - 1 抗体（その s F l t - 1 結合断片を含む）を提供する。また、本発明は、配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 と実質的に同一である 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 24、配列番号 26、および配列番号 28 と実質的に同一である 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む s F l t - 1 抗体を提供する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその結合断片は、配列番号 30 および 32、またはそれと少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% 同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの可変領域を含む。

10

20

【0037】

本発明は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む単離された s F l t - 1 抗体、ならびに配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 と実質的に同一である 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 と実質的に同一である 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む s F l t - 1 抗体をさらに提供する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその結合断片は、配列番号 14 および 16、またはそれと少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% 同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの可変領域を含む。

30

【0038】

「同一性」は、2 つの配列の最適な整列のために導入される必要があるギャップの数およびギャップの長さを考慮に入れた、2 つのアミノ酸または核酸配列によって共有される同一の位置の数またはパーセンテージを指す。「実質的に同一である」とは、保存的アミノ酸置換、例えば、1 つのアミノ酸の同じクラスの別のアミノ酸への置換（例えば、バリンをグリシンに、アルギニンをリジンに等）によってのみ、またはタンパク質の機能を破壊しないアミノ酸配列の位置における 1 つ以上の非保存的置換、欠失、もしくは挿入によってのみ異なるアミノ酸配列を意味する。好ましくは、アミノ酸配列は、別のアミノ酸配列に、少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも約 85%、最も好ましくは少なくとも約 90% 類似する。配列類似性を決定するための方法およびコンピュータプログラムは公に入手可能であり、限定されないが、G C G プログラムパッケージ（Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12:387, 1984）、BLASTP、BLASTN、FASTA（Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)、およびALIGNプログラム（バージョン 2.0）を含む。周知の Smith Waterman アルゴリズムも類似性を決定するために使用することができる。BLAST プログラムは、NCBI および他の供給源から公に入手可能である（BLAST Manual, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>))

40

50

。配列を比較する際に、これらの方法によって種々の置換、欠失、および他の修飾が説明される。保存的置換は、典型的には、以下の群の中での置換を含む：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；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

#### 【0039】

抗体が血液またはその構成成分から s F l t - 1 を枯渇させる能力は、必ずしも結合親和性に依存するわけではなく、抗体が結合する s F l t - 1 のドメインまたはエピトープ等の特定の他の特徴にも依存し得ることが本明細書において観察される。本発明の特定の実施形態において、本発明の抗 s F l t - 1 抗体または s F l t - 1 結合断片は、配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 24、配列番号 26、および配列番号 28 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体は、配列番号 18、配列番号 20、および配列番号 22 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 24、配列番号 26、および配列番号 28 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。いくつかのそのような実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその結合断片は、配列番号 30 および 32、またはそれと少なくとも 85 % もしくは少なくとも 90 % 同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの可変領域を含む抗体との結合について競合する。

10

20

#### 【0040】

本発明の特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの重鎖 C D R と、配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12 と実質的に同じ配列を有する 1 つ、2 つ、または 3 つの軽鎖 C D R とを含む抗体との結合について競合する。いくつかのそのような実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその結合断片は、配列番号 14 および 16、またはそれと少なくとも 85 % もしくは少なくとも 90 % 同一の配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの可変領域を含む抗体との結合について競合する。

30

#### 【0041】

次の表 1 は、本明細書に開示される抗 s F l t - 1 抗体「101」および「102」の可変ドメインおよび C D R のヌクレオチドおよびアミノ酸配列に対応する配列番号を列挙する。

#### 【0042】

【表 1】

抗体の配列番号				
抗体名称	101		102	
	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列
CDR1H	1	2	17	18
CDR2H	3	4	19	20
CDR3H	5	6	21	22
CDR1L	7	8	23	24
CDR2L	9	10	25	26
CDR3L	11	12	27	28
VH	13	14	29	30
VL	15	16	31	32

10

## 【0043】

特定の実施形態において、抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、本明細書において 101、102、または AG10A~D と称される抗体のうちの一つ以上によって結合されるヒト sFlt-1 上のエピトープに結合する。各々の抗体が、他方の抗体と抗原との結合を競合的に阻害する（ブロックする）場合、2つの抗体は競合する（すなわち、同じまたは重複するエピトープに結合する）。つまり、競合結合アッセイにおいて測定した場合に、1x、5x、10x、20x、または 100x 過剰な一方の抗体が、他方の結合を少なくとも 50%、好ましくは、75%、90%、またはさらには 99% 阻害する（例えば、Junghans et al., Cancer Res. 50: 1495, 1990 を参照）。一方の抗体が、別の抗体と同じかまたは重複するエピトープに結合するかどうかを決定するさらなる方法は、当該技術分野において周知である。

20

## 【0044】

特定の実施形態において、抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、ヒト sFlt-1 に結合するが、ヒト Flt-1 には結合しない。特定の実施形態において、sFlt-1 に結合する抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、Flt-1 の細胞外ドメインを認識する。特定の実施形態において、抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、Flt-1 中には存在しない sFlt-1 中のエピトープを認識する。特定の実施形態において、そのような Flt-1 中には存在しないエピトープは、sFlt-1 のカルボキシ末端からのアミノ酸を含む。特定の実施形態において、そのような Flt-1 中には存在しないエピトープは、sFlt-1 の不連続エピトープまたは立体構造エピトープである。特定の実施形態において、抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、Flt-1 のリガンド結合部位に結合する。

30

40

## 【0045】

本発明によると、特定の実施形態において、抗 sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、対象への投与に特に好適である。例えば、抗体は、対象の免疫原性および/または過敏症を最小限に抑えるように修飾することができる。そのような修飾は、対象のエキスピボでの治療に使用されるカラムまたは他の固体支持体から抗体が浸出した場合、さらなる安全要因を提供することができる。さらに、特定の実施形態において、sFlt-1 抗体またはその sFlt-1 結合断片は、子癩または子癩前症を治療するためにインピボで投与することができる。したがって、エキスピボおよびインピボの両方の治療のために、本発明に従って使用される抗体は、キメラまたはヒト化抗体、および抗 sFlt-1 抗体の抗原結合断片を含む。キメラ抗体 10A (V<sub>H</sub>: 配列番号 35、V<sub>L</sub>: 配

50

列番号36)は、抗体102の可変領域およびヒトIgG1の定常領域を含む。抗体はまた、他の効果を最小限に抑えるかまたは排除するように修飾することができる。例えば、本明細書に提供されるキメラ抗体10B(V<sub>H</sub>:配列番号37、V<sub>L</sub>:配列番号36)の定常領域は、グリコシル化を防止する突然変異N298Qを含む。この突然変異を含む抗体は、補体活性化およびFcとの結合等のエフェクター機能が欠如している。キメラ抗体AG10C(V<sub>H</sub>:配列番号38、V<sub>L</sub>:配列番号36)は、抗体の新生児Fc受容体(FcRn)との結合を妨害する突然変異I254Aを含む。FcRn受容体は、胎児への胎盤全体にわたる母体のIgGの輸送を促進する。したがって、AG10Cは、治療対象においてsFlt-1に結合するだろうが、成長中の胎児には輸送されない。本発明の一実施形態において、エキスピボまたはインピボ投与のための抗体は、両方の突然変異(例えば、キメラ抗体AG10D、V<sub>H</sub>:配列番号39、V<sub>L</sub>:配列番号36)を含む。

10

**【0046】**

sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片またはsFlt-1リガンドは、sFlt-1の活性を中和するために使用され、1つの考えられる機構は、VEGFまたはPLGF等の増殖因子のためのsFlt-1上の結合部位の直接的なブロックによるものである。しかしながら、他の機構もまた考えられる。例えば、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、VEGFまたはPLGFとsFlt-1との結合がブロックされないように、sFlt-1上の部位に結合することができる。いずれの場合においても、sFlt-1は、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片によって捕捉されることによって血液または血漿から除去され、もはや血液または血漿中のVEGFまたはPLGF等の遊離増殖因子に結合するために利用することができず、よってそれらの濃度を低下させる。さらに、固体支持体に結合した抗体またはその結合断片によって捕捉されると、sFlt-1は、もはや膜に結合したFlt-1またはKDRとのヘテロ二量体を形成するために利用することができない。

20

**【0047】**

本発明の抗sFlt-1抗体は、Flt-1の1つ以上の細胞外Ig様ドメインに結合する。特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、sFlt-1のドメイン1~3のうちの1つ以上に結合し、リガンド結合をブロックする。Flt-1のドメインの構造について記述されている。(例えば、Davis-Smyth et al., 1996, EMBO Journal, 15(18):4919-27を参照)。例えば、1番目のIg様ドメインは、Pro32の辺りからIle128の辺りに及ぶ。2番目のIg様ドメインは、Pro134の辺りからThr226の辺りに及ぶ。3番目のIg様ドメインは、Val232の辺りからLys331の辺りに及ぶ。受容体二量体の形成のために重要であると考えられる4番目のIg様ドメインは、Phe333の辺りからPro428の辺りに及ぶ。5番目のIg様ドメインは、Tyr431の辺りからThr553の辺りに及ぶ。6番目のIg様ドメインは、Gly558の辺りからArg656の辺りに及ぶ。7番目のIg様ドメインは、Tyr662の辺りからThr751の辺りに及ぶ。

30

**【0048】**

そのような抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片またはsFlt-1リガンドが本明細書に開示されるエキスピボ法において用いられる場合、それはsFlt-1リガンドによって結合されないsFlt-1分子に結合し、血液または血漿からそれらのsFlt-1分子を除去する。他の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、sFlt-1のドメイン1~3のうちの1つ以上に結合し、リガンド結合をブロックしない。特定の他の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、sFlt-1に結合し、結合されたりリガンドが置換される。よって、特定の実施形態において、sFlt-1リガンドを大きく減少させることなく、対象におけるsFlt-1の量が減少される。

40

**【0049】**

特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片または

50

s F l t - 1 リガンドは、二量体化を防止するように s F l t - 1 に結合する。安定した受容体 - リガンド複合体が受容体二量体に結合したリガンド二量体を含むように、F l t - 1 リガンドと F l t - 1 との結合は協同的であると考えられる。したがって、受容体二量体化をブロックすることは、受容体 - リガンドの相互作用を不安定化させる。本明細書に開示されるエクスピボ法において二量体化をブロックする抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドが用いられる場合、そのような抗体または結合断片は、s F l t - 1 に結合し、循環する s F l t - 1 の量を減少させる。よって、s F l t - 1 リガンドを大きく減少させることなく、対象における s F l t - 1 の量が減少される。結合した s F l t - 1 の二量体化がブロックされるため、リガンドを含む任意の s F l t - 1 単量体の安定性が低下する。よって、対象における s F l t - 1 リガンドのいかなる減少も不十分であり得る。

10

**【0050】**

特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、s F l t - 1 に結合するが、リガンド結合または s F l t - 1 の二量体化を実質的にはブロックまたは阻害しない。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、s F l t - 1 の全てのアイソフォームに存在するエピトープに結合する。

**【0051】**

一実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドは、s F l t - 1 の I g 様ドメイン 1 に結合する。別の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドは、s F l t - 1 の I g 様ドメイン 2 に結合する。別の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドは、s F l t - 1 の I g 様ドメイン 3 に結合する。さらに別の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドは、s F l t - 1 の I g 様ドメイン 1 ~ 2 に結合する。別の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドは、s F l t - 1 の I g 様ドメイン 2 ~ 3 に結合する。さらに別の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドは、s F l t - 1 の I g 様ドメイン 1 および 3 に結合する。

20

**【0052】**

本発明の方法およびシステムにおいて使用するのに好適な抗 s F l t - 1 抗体（例えば、101、102、AG10A ~ D）が本明細書において開示される。これらの抗 s F l t - 1 抗体に基づいて、本発明の方法およびシステムにおいて使用するのにさらなる抗 s F l t - 1 抗体を設計および生成すること、例えば、本明細書に開示される抗 s F l t - 1 抗体の可変領域配列および/または C D R を含むさらなる抗 s F l t - 1 抗体を設計および生成することは、当業者にとって日常的な事柄であろう。さらに、本明細書に開示される抗 s F l t - 1 抗体の可変領域配列および/または C D R に対して、アミノ酸においてある特定のレベルの同一性を有する可変領域配列または C D R を含むさらなる抗 s F l t - 1 抗体を設計することも日常的な事柄であろう。

30

**【0053】**

さらなる抗 s F l t - 1 抗体を設計および生成する際に、当業者は、抗体の特定の周知の特徴によって誘導されるかもしれない。典型的な自然発生型抗体の構造は周知であり、2つの同一の重鎖および2つの同一の軽鎖を含み、各軽鎖は、鎖間ジスフィルド結合によって重鎖に共有結合的に結合している。2つの重鎖は、さらなるジスフィルド結合によって互いに結合している。個々の重鎖および軽鎖は、同様のサイズ（110 ~ 125個のアミノ酸）および構造を有するが機能の異なるドメイン内に折り畳むことができる。軽鎖は、1つの可変ドメイン（V<sub>L</sub>）および/または1つの定常ドメイン（C<sub>L</sub>）を含むことができる。重鎖も同様に、抗体のクラスまたはアイソタイプに応じて1つの可変ドメイン（V<sub>H</sub>）および/または3つもしくは4つの定常ドメイン（C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>、およびC<sub>H4</sub>）を含むことができる。ヒトにおいて、アイソタイプは、I g A、I g D、I g

40

50

E、IgG、およびIgMであり、IgAおよびIgGは、サブクラスまたはサブタイプ (IgA<sub>1-2</sub> および IgG<sub>1-4</sub>) にさらに細分化される。

【0054】

それらの名前から分かるように、可変ドメインは、抗体ごとに著しいアミノ酸配列の可変性を示す。この可変性は、通常、抗原結合部位の位置で最大となる。超可変領域または相補性決定領域 (CDR) と称される3つの領域は、フレームワーク可変領域と称される可変性のより低い領域によって支持されるV<sub>L</sub> およびV<sub>H</sub> の各々に見出される。

【0055】

抗体分子の特定の部分を個別に検討することが都合がよいことが分かっている。V<sub>L</sub> およびV<sub>H</sub> ドメインからなる抗体の部分は、Fv (可変断片) と表され、抗原結合部位を構成する。1つのポリペプチド鎖上にV<sub>L</sub> ドメインおよびV<sub>H</sub> ドメインを含む抗体断片は、一本鎖Fv (scFv) と称され、通常、可動性リンカーによって結合された一方のドメインのN末端および他方のドメインのC末端を含む (例えば、米国特許第4,946,778号および国際公開第88/09344号を参照)。

【0056】

本明細書に開示される特定の実施形態の場合、scFv断片は全長抗体の定常ドメインのいくらかまたは全てを欠損しているため、scFv断片を用いることが有利であるかもしれない。したがって、それらは、全長抗体の使用に関連する副作用のうちのいくつかを克服することができる。例えば、scFv断片は、重鎖定常領域と他の生体分子との間の特定の望ましくない相互作用を示さない傾向がある。

【0057】

特定の実施形態において、固体支持体には多価一本鎖抗体を付着させることができ、それぞれの一本鎖が第1のペプチドリinkerによって共有結合的に結合された1つのV<sub>H</sub> および1つのV<sub>L</sub> ドメインを有する複数の一本鎖抗体が、少なくとも1つ以上の第2のペプチドリinkerによって共有結合的に結合されて多価一本鎖抗体を形成する。多価一本鎖抗体のそれぞれの鎖は、可変軽鎖断片および可変重鎖断片を含み、第2のペプチドリinkerによって少なくとも1つの他の鎖に結合される。第2のペプチドリinkerは、好ましくは、少なくとも15個~100個未満のアミノ酸残基からなる。

【0058】

特定の実施形態において、固体支持体には二重特異性抗体を付着させることができ、2つの一本鎖抗体が合わさって二重特異性抗体を形成する。二重特異性抗体は、2つの鎖および2つの結合部位を有し、それぞれがsFlt-1に特異的である。二重特異性抗体のそれぞれの鎖は、V<sub>L</sub> ドメインに接続されたV<sub>H</sub> ドメインを含む。ドメインは、同じ鎖上のドメイン間の対形成を防止するのに十分短いリンカーによって接続され、したがって、異なる鎖上の相補性ドメイン間の対形成を促進して2つの抗原-結合部位を再形成する。

【0059】

特定の実施形態において、固体支持体には三重特異性抗体を付着させることができ、3つの一本鎖抗体が合わさって三重特異性抗体を形成する。三重特異性抗体では、V<sub>L</sub> またはV<sub>H</sub> ドメインのアミノ酸末端が、V<sub>L</sub> またはV<sub>H</sub> ドメインのカルボキシ末端に直接、すなわち、いずれのリンカー配列も使用せずに融合される。三重特異性抗体は、頭尾様式で環状に配置されたポリペプチドを含む3つのFv頭部を有する。

【0060】

特定の実施形態において、固体支持体にはFab断片を付着させることができる。Fab断片は、V<sub>L</sub>、C<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、およびC<sub>H</sub>1ドメインからなる抗体の断片である。パイリン消化に続いて単純に産生されるものはFabと称され、重鎖ヒンジ領域が欠損している。ペプシン消化後に、重鎖ヒンジを保持する種々のFabが産生される。鎖間ジスフィルド結合が損なわれていないこれらの二価断片はF(ab')<sub>2</sub>と称され、一方、一価Fab'は、ジスフィルド結合が保持されない場合に生じる。

【0061】

よって、本明細書に開示される方法およびシステムにおいて使用するための抗sFlt

10

20

30

40

50

- 1抗体およびその s F l t - 1 結合断片は、限定されないが、s F l t - 1 に結合する、自然発生型抗体、( F a b ' )<sub>2</sub> 等の二価断片、F a b 等の一価断片、一本鎖抗体、一本鎖 F v ( s c F v )、単ドメイン抗体、多価一本鎖抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体等を含む。

#### 【0062】

特定の実施形態において、抗体またはその断片の特異性は、親和性および/または結合活性に基づいて決定することができる。抗原と抗原の解離 ( $K_d$ ) の平衡定数によって表される親和性は、抗原決定基と抗体-結合部位との間の結合強度の尺度である。結合活性は、抗体とその抗原との間の結合の強度の尺度である。結合活性は、エピトープと抗体上のその抗原結合部位との間の親和性と、特定のエピトープの抗原結合部位の数を意味する抗体の価数との両方に関連する。抗体は、典型的には、 $10^{-5} \sim 10^{-11}$  リットル/モルの解離定数 ( $K_d$ ) で結合する。通常、 $10^{-4}$  リットル/モルよりも大きくないずれの  $K_d$  も、非特異的結合を示唆すると考えられる。 $K_d$  の値が低いほど、抗原決定基と抗体結合部位との間の結合強度が強い。

10

#### 【0063】

特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体または s F l t - 1 結合断片は、約  $10^{-5} \sim 10^{-11}$  リットル/モル、約  $10^{-6} \sim 10^{-10}$  リットル/モル、または約  $10^{-7} \sim 10^{-9}$  リットル/モルの解離定数 ( $K_d$ ) で s F l t - 1 に結合する。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体または s F l t - 1 結合断片は、少なくとも約  $10^{-5}$  リットル/モル、少なくとも  $10^{-6}$  リットル/モル、少なくとも  $10^{-7}$  リットル/モル、少なくとも  $10^{-8}$  リットル/モル、少なくとも  $10^{-9}$  リットル/モル、少なくとも  $10^{-10}$  リットル/モル、または少なくとも  $10^{-11}$  リットル/モルの解離定数 ( $K_d$ ) で s F l t - 1 に結合する。特定の実施形態において、 $K_d$  は、 $10^{-9}$  リットル/モル  $\sim 10^{-10}$  リットル/モルである。特定の実施形態において、 $K_d$  は、 $10^{-10}$  リットル/モル  $\sim 10^{-11}$  リットル/モルである。

20

#### 【0064】

本明細書に開示される方法およびシステムにおいて使用するのに好適な抗 s F l t - 1 抗体は、直接突然変異、親和性成熟の方法、ファージディスプレイ、または鎖シャッフリングによって結合特性が向上されたものをさらに含む。親和性および特異性は、CDRを突然変異させ、所望の特徴を有する抗原結合部位についてスクリーニングすることによって修飾または向上させることができる(例えば、Yang et al., J. Mol. Biol., 254:392-403 (1995)を参照)。CDRは、様々な方法で突然変異させることができる。1つの方法は、さもなければ同一の抗原結合部位の集団において、特定の位置で20個全てのアミノ酸が見出されるように、個々の残基または残基の組み合わせを無作為化することである。代替として、エラープローンPCR法によって様々なCDR残基に突然変異を誘導することができる(例えば、Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)を参照)。例えば、重鎖および軽鎖可変領域の遺伝子を含むファージディスプレイベクターは、大腸菌の突然変異誘発株において増殖させることができる(例えば、Low et al., J. Mol. Biol., 250:359-368 (1996)を参照)。これらの突然変異誘発の方法は、当業者に既知の多くの方法を例示するものである。

30

40

#### 【0065】

抗 s F l t - 1 抗体は、標準的なハイブリドーマ技術によって(例えば、参照により、本明細書に組み込まれるHarlow & Lane, ed., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998))、またはヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖を生成するトランスジェニックマウスを使用することによって(例えば、Medarex, San Jose, Calif. から調達したKMマウス)得ることができる。当該技術分野で既知の特定のマウスにおいて、ヒト抗体を生成するゲノムのかなりの部分がマウスのゲノムに挿入され、マウスの内因性マウス抗体の生成を不足させる。そのようなマウスは、任意選択

50

的に、好適なアジュバント、例えば、完全または不完全フロインドアジュバント中、s F l t - 1 (例えば、ヒト s F l t - 1)の一部または全てを用いて免疫することができる。

【0066】

本明細書に開示される方法およびシステムにおいて使用するのに好適な抗体の調製方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、米国特許第6,054,297号、米国特許第5,821,337号、米国特許第6,365,157号、および米国特許第6,165,464号、米国特許出願公開第2006/0067937号、国際公開第06/034507号に記載される(これらは、参照により、本明細書に組み込まれる)。

【0067】

本明細書に開示される方法およびシステムにおいて使用するのに好適な抗 s F l t - 1 抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化もしくはキメラ抗体、F v 断片、一本鎖 F v 断片、F a b 断片、または F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片を含み得る。特定の実施形態において、抗体は、マウスモノクローナル抗体である。抗 s F l t - 1 抗体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、分泌型 I g A、I g D、および I g E 等の様々な抗体アイソタイプを含み得る。

【0068】

「キメラ抗体」は、別のタンパク質の少なくとも一部(典型的には、免疫グロブリン定常ドメイン)に結合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指す。

【0069】

「ヒト化抗体」は、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するフレームワーク領域(FR)と、実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する相補性決定領域(CDR)(「インポート」配列)とを含む抗体を指す。一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外の供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化抗体は、通常、少なくとも1つの、そして典型的には2つの可変ドメイン(F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F a b c、F v)の全てを実質的に含み、全てまたは実質的に全てのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、全てまたは実質的に全てのFR領域は、ヒト免疫グロブリンまたはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含むことが最適である。「相補性決定領域(CDR)」とは、免疫グロブリンの軽鎖および重鎖の各々の中の可変領域中の3つの超可変配列を意味する。「フレームワーク領域(FR)」とは、免疫グロブリンの軽鎖および重鎖の3つの超可変配列(CDR)のいずれかの側に位置するアミノ酸の配列を意味する。ヒト化抗体のFRおよびCDR領域は、親配列に正確に対応する必要はなく、例えば、インポートCDRまたはヒトまたはコンセンサスヒトFRは、その部位のCDRまたはFR残基がコンセンサス配列またはインポート配列のどちらにも対応しないように、少なくとも1つの残基の置換、挿入、または欠失によって突然変異誘発させることができる。しかしながら、そのような突然変異は、広範囲には及ばない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%、好ましくは90%、最も好ましくは少なくとも95%が、親のFR配列およびCDR配列の残基に対応する。

【0070】

抗 s F l t - 1 抗体は、抗 s F l t - 1 抗体を発現するハイブリドーマから直接得ることができるか、またはクローン化して、好適な宿主細胞(例えば、CHO細胞、NS/O細胞、HEK293細胞)中に組み換えることによって発現させることができる。好適な宿主細胞は、植物細胞、哺乳類細胞、および大腸菌および酵母等の微生物を含む。代替として、抗 s F l t - 1 抗体は、トランスジェニック非ヒト動物または植物、例えば、トランスジェニックマウスにおいて組み換えることによって生成することもできる。

【0071】

特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体は、固体支持体に付着する前または後に修飾され得る。可能な修飾は、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化

10

20

30

40

50

、保護基またはブロック基による誘導体化、タンパク質切断、または細胞リガンドまたは他のタンパク質との結合を含む。特定の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

【0072】

抗 s F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、s F l t - 1 関連障害のエクスピボでの治療に好適である。好適とは、抗体が、有効な量で有効な時間の間使用されたときに、対象の血液または血漿中の s F l t - 1 濃度を効果的に低下させることを意味する。例えば、50 ml / 分の流速を用いると、100分で5リットルの血漿（約2.5（倍）のヒトの血液量）が生成される。本明細書に例示されるように、あるアッセイにおいて、1 ml カラムに適用した1 ml / 分の流速を用いたところ、抗体 A G 1 0 B は、試験液から s F l t - 1 の94%を枯渇させた。これは、50 ml カラムを使用した場合の50 ml / 分の流速に相当する（また、滞留時間1分に相当する）。別のアッセイは、固体支持体上の A G 1 0 B の濃度を0.8 mg / ml のビーズから0.4 mg / ml ビーズに減少させたときに、試験試料中の s F l t - 1 の枯渇がわずかに減少されたのみであったことを示している。

10

【0073】

研究目的で、抗 s F l t - 1 抗体が結合した0.1 ~ 50 mLのセファロースビーズを含む種々の寸法のカラムを、緩衝液または動物血清またはヒト血漿中に添加した組換え s F l t - 1、あるいは子癇前症患者の羊水または血漿中の天然 s F l t - 1 を枯渇させる能力について検査する。s F l t - 1 枯渇実験は、流速0.05 ~ 50 mL / 分、線流速10 ~ 300 cm / 時間、および滞留時間0.25 ~ 5分で、ビーズ1 mL 辺り0.025 ~ 20 mg の抗体（ビーズ1個当たり6500万 ~ 520億個の抗体分子）で抗 s F l t - 1 抗体が結合したセファロースビーズを含むカラムを用いて行われる。これらの s F l t - 1 枯渇実験では、カラム床体積の1 ~ 400倍の、s F l t - 1 を含む緩衝液、血清、または血漿が、5 : 1 ~ 5,000 : 1 (w / w) の抗 s F l t - 1 抗体 : s F l t - 1 比、または1.25 : 1 ~ 1,250 : 1 のモル比でカラムに適用される。これらの様々な条件下で、抗 s F l t - 1 抗体が結合したセファロースビーズを含むカラムは、緩衝液、血清、または血漿中の s F l t - 1 を50 ~ 100% 枯渇させる。

20

【0074】

臨床治療の場合、抗 s F l t - 1 抗体が結合した25 ~ 750 mLのセファロースビーズを含む種々の寸法のカラムを使用して、子癇前症を含む高い血中 s F l t - 1 レベルに関連する疾患に罹患している患者の血漿由来の V E G F または P L G F のアイソフォーム等の単独のまたはリガンドと複合させた種々のアイソフォームの天然 s F l t - 1 を枯渇させる。臨床治療に使用されるカラムは、流速10 ~ 100 ml / 分、線流速30 ~ 180 cm / 時間、および滞留時間0.5 ~ 3分で、ビーズ1 ml 辺り0.1 ~ 5 mg の抗体（ビーズ50 ml 当たり5 ~ 100 mg、ビーズ1個当たり2億6000万 ~ 52億個の抗体分子）で抗 s F l t - 1 抗体が結合したセファロースビーズを含む。平均体重の患者は、体内を循環する約8リットルの血液（約4リットルの血漿）を有する。種々の形態の0.08 ~ 0.48 mg の天然 s F l t - 1（血漿中の s F l t - 1 レベル40 ng / ml の患者の場合）を含む、カラム床体積の血漿の40 ~ 240倍（50 ml カラムの場合）に相当する体内の総血漿体積の約0.5 ~ 3倍（2 ~ 12リットルの血漿）が、50 : 1 ~ 2,000 : 1 (w / w) の抗 s F l t - 1 抗体 : s F l t - 1 比、または12.5 : 1 ~ 500 : 1 のモル比で抗 s F l t - 1 抗体が結合したビーズを含むカラムに適用される。これらの様々な条件下で、抗 s F l t - 1 抗体が結合したセファロースビーズを含むカラムは、高い血中 s F l t - 1 レベルを有する患者の血漿から s F l t - 1 の50 ~ 100% を枯渇させることができる。

30

40

【0075】

よって、本発明は、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を対象にエクスピボで提供することを含む、対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法を提供し、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片が固体支持体に付着

50

され、抗体：sFlt-1のモル比が500であるとき、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、インビトロ分析において、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも99%、または70%~80%、または80%~90%、または90%~95%、または95%~99%のsFlt-1をヒト血漿から枯渇させる。別の実施形態において、本発明は、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を対象にエクスピボで提供することを含み、対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法を提供し、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片が固体支持体に付着され、抗体：sFlt-1比が250であるとき、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、インビトロ分析において、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも99%、または70%~80%、または80%~90%、または90%~95%、または95%~99%のsFlt-1をヒト血漿から枯渇させる。別の実施形態において、本発明は、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を対象にエクスピボで提供することを含み、対象における妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法を提供し、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片が固体支持体に付着され、抗体：sFlt-1モル比が100であるとき、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、インビトロ分析において、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも99%、または70%~80%、または80%~90%、または90%~95%、または95%~99%のsFlt-1をヒト血漿から枯渇させる。さらに他の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片が固体支持体に付着され、抗体：sFlt-1のモル比が50、25、または12.5であるとき、インビトロ分析において、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも99%、または70%~80%、または80%~90%、または90%~95%、または95%~99%のsFlt-1が、ヒト血漿から枯渇する。抗sFlt-1抗体およびそのsFlt-1結合断片は、Flt-1 Ig様ドメイン1~3に種々の組み合わせで結合するもの、ならびに、単独で、または組み合わせで、またはIg様ドメイン2および/もしくは3と組み合わせでIg様ドメイン4、5、6、または7に結合する抗体も含む。

10

20

30

40

50

#### 【0076】

分析方法に従って、ヒト血清にsFlt-1が添加される。本明細書に例示されるように、ドメイン1~3からなるsFlt-1タンパク質を使用した。他のドメインまたはドメインの組み合わせに対するsFlt-1抗体が検査される場合、関連するドメインを含むsFlt-1分子が使用される。sFlt-1分子の比限定的な例は、sFlt-1のドメイン1~3、ドメイン1~4、ドメイン1~5、ドメイン1~6、ドメイン1~7、ドメイン2~3、ドメイン2~4、ドメイン2~5、ドメイン2~6、またはドメイン2~7を含む(sFlt-1の種々のドメインの発現を示すことに関しては、例えば、Barleon et al., 1997, J Biol. Chem. 272:10382-88を参照)。特定の実施形態において、分析は、sFlt-1を添加した血漿中に混合した、セファロースビーズに結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を使用して行われる。特定の実施形態において、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、または5分の臨床カラム上の滞留時間を再現した期間にわたって分析が行われる。そのような分析は、カラム内のビーズに結合した抗sFlt-1抗体またはsFlt-1結合断片の溶液と、所望の滞留時間を実現するための流速で適用されるsFlt-1を添加した血漿を使用して行うことができる。代替として、羊水、血清(例えば、ウマ血清)、または緩衝液(例えば、PBS)に添加したsFlt-1を使用して分析を行うこともできるが、血漿、特にヒト血漿が好ましい。分析は、種々の密度でカラム支持体(例えば、セファロースビーズ)に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片、および種々の濃度で血漿中に添加されたsFlt-1を使用して分析を行うことができる。抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片は、0.025、0

．050、0.1、0.25、0.5、1、または2mg/ビーズの量でセファロースビーズに結合させることができる。流速は、0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50、または100ml/分であってもよく、線流速は、10、20、30、50、100、150、180、240、または300cm/時間であってもよい。

#### 【0077】

本発明の抗体は、患者からの血液または血漿中のsFlt-1を効率的に枯渇させるのに効果的である。sFlt-1は、可溶性であり得るおよび/または血流中に循環する微小粒子であり得る。特定の実施形態において、本発明の抗体が固体支持体（例えば、セファロースビーズ）に付着され、抗体：sFlt-1比が50になるようにsFlt-1を含む溶液と接触させられると、sFlt-1抗体は、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%のsFlt-1を枯渇させる（それらに結合する）。特定の実施形態において、sFlt-1抗体は、70%~80%、80%~90%の、または90%~95%、95~99%のsFlt-1を枯渇させる。溶液は、血液、血漿、血清、または緩衝液であってもよい。特定の実施形態において、本発明の抗体が固体支持体（例えば、セファロースビーズ）に付着され、抗体：sFlt-1比が100になるようにsFlt-1を含む溶液と接触させられると、sFlt-1抗体は、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%のsFlt-1を枯渇させる。特定の実施形態において、sFlt-1抗体は、70%~80%、または80%~90%、または90%~95%、または95~99%のsFlt-1を枯渇させる。特定の実施形態において、本発明の抗体は、固体支持体（例えば、セファロースビーズ）に付着され、抗体：sFlt-1比が250になるようにsFlt-1を含む溶液と接触させられると、sFlt-1抗体は、少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%のsFlt-1を枯渇させる。特定の実施形態において、sFlt-1抗体は、70%~80%、80%~90%の、または90%~95%、95~99%のsFlt-1を枯渇させる。

#### 【0078】

特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体またはsFlt-1結合断片は、好適な条件下において、sFlt-1を含む対象の血液または血漿中のsFlt-1の濃度を、約50ng/ml未満、約40ng/ml未満、約25ng/ml未満、約10ng/ml未満、約5ng/ml未満、約4ng/ml未満、約3ng/ml未満、約2ng/ml未満、約1ng/ml未満、約0.75ng/ml未満、または約0.5ng/mlまで低下させることができる。

#### 【0079】

特定の実施形態において、例えば、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を使用して、固体支持体に固定化することによってsFlt-1分子が血漿から除去される。sFlt-1が固体支持体に固定化されると、sFlt-1が溶液中に遊離している場合と比較してリガンド結合には不利である。したがって、対象におけるsFlt-1レベルが低下し、循環するsFlt-1リガンドのいずれの減少も不十分であり得る。

#### 【0080】

特定の実施形態において、抗sFlt-1抗体は固体支持体に結合し、固体支持体には抗エンドグリン抗体またはそのエンドグリン結合断片は結合していない。本明細書に開示される方法の特定の実施形態において、方法は、対象の血液中のエンドグリンの量を実質的に減少させない。本明細書に開示されるシステムの特定の実施形態において、システムは、対象の血液からエンドグリンを大幅に除去することはできない。

#### 【0081】

特定の実施形態において、本発明の方法は、

(a) 対象から血液を除去することと、

(b) 血液またはその構成成分中のsFlt-1のレベルを低下させるために、抗

10

20

30

40

50

s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片または s F l t - 1 リガンドが付着した固体支持体に血液またはその構成成分を通過させることと、

( c ) 血液またはその構成成分を対象の体に戻すこととを含む。

【 0 0 8 2 】

特定の実施形態において、血液は血漿と細胞成分とに分離され、血漿のみが抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片と接触させられ、細胞成分は、そのような接触なしに対象に戻されるか、または特定の実施形態において、対象に戻されるのではなく廃棄される。

【 0 0 8 3 】

したがって、特定の実施形態において、本方法は、ある量の対象の血液を除去することと、血液を血漿と細胞成分とに分離することと、血漿中の s F l t - 1 を抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片に結合させ、それによって対象の血漿中の s F l t - 1 の量を減少させるために、血漿を抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片と接触させることと、血漿を対象に戻すことと、任意選択的に、細胞成分を対象に戻すこととを含む。

10

【 0 0 8 4 】

上記実施形態を実施する場合、細胞成分は任意の時点で対象に戻すことができる。すなわち、細胞成分は、血漿が抗 s F l t - 1 抗体もしくはその s F l t - 1 結合断片と接触させられる前に対象に戻されてもよいか、または細胞成分は、血漿が抗 s F l t - 1 抗体もしくはその s F l t - 1 結合断片と接触させられた後に対象に戻されてもよい。特定の実施形態において、細胞成分は、血漿が抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片と接触された後に血漿と合わされてもよく、合わされた細胞成分および血漿は、同じ導管システムおよび/または同じ戻しデバイスを通して同時に対象に戻される。

20

【 0 0 8 5 】

特定の実施形態において、妊娠関連高血圧性障害は子癇または子癇前症である。特定の実施形態において、妊娠関連高血圧性障害は子癇である。特定の実施形態において、障害は慢性腎疾患である。

【 0 0 8 6 】

特定の実施形態において、患者は、妊娠中のヒト、分娩後のヒト、または妊娠中もしくは分娩後の非ヒト（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコ）である。特定の実施形態において、対象は、妊娠中のヒトまたは分娩後のヒトである。特定の実施形態において、対象は妊娠中のヒトである。

30

【 0 0 8 7 】

任意選択的に、本明細書に開示される方法は、標準的な子癇前症または子癇の治療を用いて治療中の対象に対して実施することができる。そのような標準的な治療は、当業者に既知であり、米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 2 6 8 2 8 号、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 2 5 7 6 2 号、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 7 0 4 4 4 号、および米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 6 7 9 3 7 号、ならびに国際公開第 2 0 0 4 / 0 0 8 9 4 6 号、国際公開第 2 0 0 5 / 0 7 7 0 0 7 号、および国際公開第 0 6 / 0 3 4 5 0 7 号に記載される方法を含む。

40

【 0 0 8 8 】

本明細書に開示される方法は、s F l t - 1 結合物質の組み合わせを使用して実施することができる。例えば、抗 s F l t - 1 抗体、その s F l t - 1 結合断片、および s F l t - 1 リガンドのうち2つ以上が使用されてもよい。

【 0 0 8 9 】

本明細書に開示される方法は、慢性高血圧症薬を用いて治療中の対象に対して実施することができる。妊娠中の高血圧症を治療するために使用される薬物は、メチルドパ、ヒドラジン塩酸塩、またはラベタロールを含む。

【 0 0 9 0 】

特定の実施形態において、本発明の方法は、対象に降圧薬化合物を投与するステップを

50

さらに含むことができる。そのような投与は、従来の方法、例えば、降圧薬化合物を含む経口剤形を投与することによるものであってもよい。

【0091】

特定の実施形態において、本発明の方法は、限定されないが、VEGFRリガンドを含む増殖因子またはサイトカインを対象に投与することをさらに含むことができる。一実施形態において、増殖因子はVEGFである。別の実施形態において、増殖因子はPLGFである。

【0092】

本明細書に開示される方法は、子癇前症または子癇の治療または予防のために妊娠中に、あるいは分娩後の子癇前症または子癇を治療するために妊娠後に実施することができる。

10

【0093】

「治療」とは、治療目的で、本明細書に開示されるエクスピボ法を実施することを指す。「治療する」こと、または「治療」のために使用することは、既に妊娠関連高血圧性障害を有するかまたはそれに罹患していると診断された対象に、その対象の状態を改善するために治療薬を投与することを指す。例えば、本明細書に記載されるように、本明細書に記載される特徴的な症状のうちのいずれかの同定に基づいて、または対象の血液中のsFlt-1の濃度の測定に基づいて、対象が子癇前症または子癇を有するかまたはそれに罹患していると診断することができる。

【0094】

「予防する」とは、まだ病気ではないが、妊娠関連高血圧性障害を発症しやすいか、またはさもなくば発症するリスクのある対象、例えば、子癇前症または子癇を発症するリスクがあると判断される対象の予防的処置を意味する。

20

【0095】

「妊娠関連高血圧性障害」は、血圧の上昇と関連するかまたはそれによって特徴付けられる妊娠中の任意の状態または疾患を指す。これらの状態および疾患の中に含まれるのは、子癇前症（早期子癇前症、重度子癇前症を含む）、子癇、妊娠高血圧、HELLP症候群（溶血、肝酵素の上昇、血小板減少）、胎盤剥離、妊娠中の慢性高血圧症、子宮内胎児発育遅延を伴う妊娠、および胎内発育遅延（SGA）児を伴う妊娠である。

【0096】

「子癇前症」とは、タンパク尿もしくは浮腫、または両方を伴う高血圧、腎系球体不全、脳浮腫、肝浮腫、あるいは妊娠または最近の妊娠の影響による血液凝固異常によって特徴付けられる多系統障害を指す。早期、軽度、中程度、および重度子癇前症等の全ての形態の子癇前症が、この定義に含まれる。子癇前症は、通常、妊娠20週後に起こる。子癇前症は、通常、以下の症状のうちのいくつかの組み合わせとして定義される：（1）妊娠20週後の収縮期血圧（BP）140 mmHg超および拡張期BP90 mmHg超（通常、4～168時間空けて2回測定される）、（2）新たに発症したタンパク尿（尿検査時のディップスティックで1+、24時間蓄尿中のタンパク質300 mg超、またはタンパク質/クレアチニン比0.3超のランダム尿試料が1つ）、ならびに（3）分娩後12週までの高血圧およびタンパク尿の解消。重度子癇前症は、通常、（1）拡張期BP110 mmHg超（通常、4～168時間空けて2回測定される）、または（2）24時間蓄尿中のタンパク質が3.5グラム以上の測定値、もしくはディップスティックでタンパク質が少なくとも3+の2つのランダム尿標本によって特徴付けられるタンパク尿として定義される。子癇前症では、高血圧およびタンパク尿は、通常、互いに7日以内に起こる。重度子癇前症では、重度の高血圧、重度のタンパク尿、およびHELLP症候群（溶血、肝酵素の上昇、血小板減少）、または子癇が、同時に起こり得るか、または1度に1つの症状のみが起こり得る。HELLP症候群は、血小板減少症（100,000細胞/μl未満）、LDHの増加（600 IU/L超）、およびASTの増加（70 IU/L超）の兆候によって特徴付けられる。時に、重度子癇前症は、発作の発生につながる可能性がある。この重症型の症状を「子癇」という。子癇はまた、例えば、肝臓（例えば、肝細胞障害

30

40

50

、門脈周囲の壊死)ならびに中枢神経系(例えば、脳浮腫および脳出血)等の、いくつかの臓器または組織の機能不全または損傷を含むこともできる。発作の病因は、脳浮腫および腎臓の微小血管の局所痙攣の発症に対して2次性であると考えられる。

【0097】

「対象」は、限定されないが、ヒト、またはヒト以外の哺乳動物、例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、もしくはネコを含む哺乳動物である。

【0098】

子癇前症または子癇等の妊娠関連高血圧性障害を「発症するリスクがある」とは、現在は妊娠関連高血圧性障害を有していないが、妊娠関連高血圧性障害を発症する確率が平均よりも高い対象を指す。そのようなリスクのある対象は、約3 ng/ml超、約4 ng/ml超、約5 ng/ml超、約6 ng/ml超、約7 ng/ml超、約8 ng/ml超、約9 ng/ml超、約10 ng/ml超、約15 ng/ml超、約20 ng/ml超、約25 ng/ml超、約30 ng/ml超、約40 ng/ml超、または約45 ng/ml超の血中sFlt-1濃度を有するが、子癇前症等の妊娠関連高血圧性障害の他の徴候を示さない妊娠中の女性を含む。

10

【0099】

本明細書に記載される方法を実施することができる妊娠の段階は、対象の総体的な健康および子癇前症の症状の重症度を含む種々の臨床的要因に依存する。一般に、一旦、子癇前症または子癇前症の素因が検出されてから本方法を用いることができる。治療は、1~100日、より好ましくは1~60日、1~10日、または1~5日、最も好ましくは1~20日の範囲の期間の間継続することができる。

20

【0100】

特定の実施形態において、本方法は、妊娠14週目、妊娠16週目、妊娠18週目、妊娠20週目、妊娠22週目、妊娠24週目、妊娠26週目、妊娠28週目、妊娠30週目、妊娠32週目、妊娠34週目、または妊娠36週目以降に対象に対して実行される。特定の実施形態において、本方法は、妊娠14週目~16週目、妊娠16週目~18週目、妊娠18~20週目、妊娠20~22週目、妊娠22~24週目、妊娠24~26週目、妊娠26~28週目、妊娠28~30週目、妊娠30~32週目、妊娠32~34週目、または妊娠34~36週目に対象に対して実行される。

30

【0101】

特定の実施形態において、対象の血液または血漿は、sFlt-1を所望のレベルまで低下させるために必要な程度のみ抗sFlt-1抗体またはリガンドと接触させられる。所望のレベルは、例えば、正常な妊娠に特徴的なsFlt-1のレベルであり得る。正常な妊娠において、sFlt-1の血清濃度は、8~12週から16~20週に低下し、26~30週で徐々に上昇し、35~39週で急上昇し、分娩後に正常レベルに戻ることが観察されている。したがって、一実施形態において、所望のレベルは、対象の妊娠の段階の正常レベルである。別の実施形態において、レベルは、対象の妊娠の段階の正常レベルよりも高いかまたは低い。当業者は、例えば、エクスピボ手技が行われる患者および頻度に応じて、所望のレベルを決定することができるであろう。

40

【0102】

所望のsFlt-1レベルは、例えば、対象が治療を受ける期間の長さ(すなわち、特定の流速で処理される血液または血漿の体積)、固定化した抗体もしくはリガンド上の流速、および/またはsFlt-1に結合する抗体もしくはリガンドを担持する固体支持体の結合能を制御することによって達成することができる。一実施形態において、治療時のsFlt-1レベルを測定するために診断薬が使用される。別の実施形態において、治療薬は、リアルタイムでのsFlt-1レベルの測定値を提供し、所望のsFlt-1レベルに達すると治療が中止される。別の実施形態において、期間、流速、および/または能力は、手技の開始時に対象において診断されるsFlt-1レベルおよび達成することが所望されるsFlt-1レベルに基づいてあらかじめ決められる。

50

【0103】

特定の実施形態において、本方法は、対象に本方法が実施される前の対象における血中 s F l t - 1 レベルと比較して 10% ~ 90%、20% ~ 80%、または 30% ~ 50% 対象の血中 s F l t - 1 レベルを低下させる。特定の実施形態において、本方法は、対象に本方法が実施される前の対象における血中 s F l t - 1 レベルと比較して 10% ~ 20%、20% ~ 30%、30% ~ 40%、40% ~ 50%、50% ~ 60%、60% ~ 70%、70% ~ 80%、80% ~ 90%、または 90% ~ 100% 対象の血中 s F l t - 1 レベルを低下させる。

#### 【0104】

固体支持体に付着した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、子癇前症または子癇に罹患しているかまたはそれを発症するリスクのある対象の体液から s F l t - 1 を除去するために使用することができる。特定の実施形態において、固体支持体に付着した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、血液または血漿から s F l t - 1 を除去するために使用される。特定の実施形態において、固体支持体に付着した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片は、当該技術分野で既知の体外免疫吸着剤デバイスにおいて使用される。血液または血漿は、付着させた支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片に暴露され、(遊離しているかまたは他の血中タンパク質との複合体として)循環する s F l t - 1 の部分的なまたは完全な除去をもたらし、続いて血液または血漿が対象の体に戻される。本明細書に開示される方法は、血液または血漿を抗 s F l t - 1 抗体に接触させる前に介在する細胞除去ステップ、例えば、遠心分離ステップを含むかまたは含まない、連続フロー構成において実行され得る。

10

20

#### 【0105】

本明細書に記載される方法において使用するための固体支持体は、好ましくは、無毒性であるべきであり、血液または血液成分に暴露されたときに安定であるべきである。固体支持体は、当該技術分野で周知であるものの中から選択することができる。例えば、任意の好適な多孔質材料が固体支持体として使用され得る。好適な固体支持体の例として、例えば、炭水化物に基づく材料、例えば、種々の種類の S E P H A R O S E (登録商標) (架橋されたビーズ形態のアガロース)、例えば、S E P H A R O S E 4 B (登録商標)、4 F F (登録商標)、C L - 4 B (登録商標)、および C L - 6 B が挙げられる。

#### 【0106】

固体支持体は、有機分子、無機分子、または有機分子と無機分子との組み合わせからなってもよく、1つ以上の官能基、例えば、活性化剤との共有結合を形成するのに好適なヒドロキシ基からなってもよい。固体支持体は、親水性化合物、疎水性化合物、またはそれらの任意の組み合わせからなってもよい。固体支持体は、ポリマーまたはコポリマーからなってもよい。

30

#### 【0107】

固体支持体において使用するための好適な材料の例として、限定されないが、アガロース、セルロース、ポリエーテルスルホン、ポリアミド、多糖類、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエステル、ポリウレタン、フッ化ポリビニリデン、ポリプロピレン、フルオロカーボン、例えば、ポリ(テトラフルオロエチレン-コ-ペルフルオロ(アルキルビニルエーテル))、ポリエチレン、ガラス、ポリカーボネート、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリ(アゾラクトン)、ポリスチレン、セラミック、およびナイロンが挙げられる。

40

#### 【0108】

固体支持体はいずれか特定の形状である必要はない。例えば、固体支持体は、ビーズ、膜、ゲル、カラム、チップ、プレート、チューブ、シート、繊維、または中空ファイバの形態であり得る。固体支持体はまた、その中を血液または血漿が通るチューブ、パイプ、または中空ファイバの1つ以上の長さの内部のコーティングの形態であってもよい。そのような実施形態において、チューブ、パイプ、または中空ファイバは、該チューブ、パイプ、または中空ファイバを通る血液または血漿によって接触される固体支持体の量を最大

50

化するために、好ましくはコイル状であるか、またはさもなければ屈曲もしくは湾曲している。

#### 【0109】

抗体およびリガンドを固体支持体に付着させる方法は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載される方法において使用される抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を固体支持体に付着させるために使用することができる。そのような方法は、限定されないが、臭化シアン、1, 1' - カルボニルイミダゾール ( C D I )、またはトリエチルアミンの使用を含む。

#### 【0110】

一般に、固体支持体をアルデヒド、エポキシド、シアン、活性化カルボン酸等の活性化剤と接触させることにより、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片の付着のために固体支持体を活性化することができる。

#### 【0111】

抗体を固体支持体に付着させる方法は、当該技術分野で周知である。例えば、H e r m a n s o n e t a l . 1 9 9 2 , I m m o b i l i z e d A f f i n i t y L i g a n d T e c h n i q u e s , A c a d e m i c P r e s s , 米国特許第 5 , 8 7 4 , 1 6 5 号、米国特許第 3 , 9 3 2 , 5 5 7 号、米国特許第 4 , 7 7 2 , 6 3 5 号、米国特許第 4 , 2 1 0 , 7 2 3 号、米国特許第 5 , 2 5 0 , 6 1 2 3 号、欧州特許出願第 E P 1 3 5 2 9 5 7 A 1 号、および国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 4 4 7 1 号を参照されたい。典型的には、固体支持体は、エポキシド (例えば、エピクロロヒドリンの使用による)、シアン (例えば、臭化シアン ( C N B r ) )、N , N - 炭酸ジスクシンイミジル ( D S C )、アルデヒド、または活性化カルボン酸 (例えば、N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) エステル、またはカルボニルイミダゾール ( C D I ) 活性化エステル)等の反応性官能基で活性化される。活性化基は、C N B r の場合に一般的であるように、固体支持体に直接的に付着させることができるか、または活性化基は、典型的には、酸素および/または窒素原子で任意選択的に置換された炭素の直鎖であるリンカーまたはスペーサー分子の一部であってもよい。そのようなリンカーの典型的な例は、リンカーのブタンジオールジグリシジルエステル (一般的なエポキシドカップリング剤)に見られる炭素と酸素の 1 0 員鎖である。活性化された固体支持体は、次いで、カップリング条件下で抗体と接触させられる。

#### 【0112】

他のリンカーは、1 ~ 3 0 個の炭素原子を含む分岐鎖、非分岐鎖、または環状炭素鎖を含み得る。特定の実施形態において、リンカーは、3 0 個以上の炭素原子からなり得る。リンカーは、窒素、酸素、または硫黄等の少なくとも 1 つのヘテロ原子を含み得る。

#### 【0113】

市販品 A F F I - G E L 1 5 (登録商標) ( B i o R a d , H e r c u l e s , C a l i f . ) がリンカーの介在によるカップリングに使用されてもよい。A F F I - G E L 1 5 (登録商標)は、正電荷を帯びた二級アミンを含むリンカーアームの一部として N H S 活性化カルボン酸で誘導体化されたアガロース支持体である。電荷を帯びた別のリンカーは、米国特許第 5 , 2 6 0 , 3 7 3 号に開示される。アルギニンからなるより短いリンカーが、アガロース支持体へのカップリングを促進するために使用されてもよい。アルギニンリンカーは、N H S で活性化され、正電荷を帯びる。

#### 【0114】

抗 s F l t - 1 抗体、その結合断片、ならびに s F l t - 1 特異的ポリペプチドおよびリガンドは、より均一な配向および効率的な s F l t - 1 結合を提供するような様式で固体支持体に共有結合的に結合することができる。大半の方法は、所定の位置で固有の化学基を用いてタンパク質を修飾し、その基を固体支持体上の相補基と反応させることを伴う。別の実施形態において、抗 s F l t - 1 抗体、抗体断片、およびリガンドは、固体支持体に結合させることができる N 末端または C 末端リンカーを用いて生成される。特定の実施形態において、ポリペプチドおよびリガンドは、固体支持体上で直接合成される。

## 【0115】

本明細書に開示される方法に従う治療の有効性を判定するために、当該技術分野で既知の診断方法を使用して治療中に対象の子癇前症または子癇を監視することができる。好適な診断方法は、例えば、米国特許第7,335,362号、米国特許第7,435,419号、および米国特許第7,407,659号に開示される。

## 【0116】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法を使用した治療または予防に好適な対象を特定するために、対象の血液中のsFlt-1の濃度を測定および/または監視する診断方法が用いられる。特定の実施形態において、診断方法は、子癇前症または子癇等の妊娠関連高血圧性障害を発症するリスクのある対象を特定するために用いられ、対象は、約5 ng/ml超、約6 ng/ml超、約7 ng/ml超、約8 ng/ml超、約9 ng/ml超、約10 ng/ml超、約15 ng/ml超、約20 ng/ml超、約25 ng/ml超、約30 ng/ml超、約40 ng/ml超、または約45 ng/ml超の血中sFlt-1濃度を有するが、子癇前症等の妊娠関連高血圧性障害の他の徴候を示さない妊娠中の女性である。

10

## 【0117】

したがって、本発明は、妊娠関連高血圧性障害を有するかまたは発症するリスクのある対象を特定し、次いで、そのように特定された対象に対して本明細書に開示されるエクスピボ法を実行し、それによって妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する方法を提供する。特定の実施形態において、妊娠中のヒトは、妊娠中期の間の対象の血液中のsFlt-1濃度が、約3.5 ng/ml超、約4 ng/ml超、約5 ng/ml超、約7.5 ng/ml超、約10 ng/ml超、約20 ng/ml超、約30 ng/ml超、約40 ng/ml超、または約50 ng/ml超であると測定された場合に、本明細書に開示される方法による治療または予防に好適な対象として特定される。

20

## 【0118】

対象の血中sFlt-1レベルが測定されるおよび/または監視される特定の実施形態において、本明細書に記載される方法は、対象の血液中のsFlt-1濃度が、約50 ng/ml未満、約45 ng/ml未満、約40 ng/ml未満、約35 ng/ml未満、約30 ng/ml未満、約25 ng/ml未満、約20 ng/ml未満、約15 ng/ml未満、約10 ng/ml未満、約7.5 ng/ml未満、約5 ng/ml未満、約4 ng/ml未満、約3 ng/ml未満、約2 ng/ml未満、約1.5 ng/ml未満、または約1 ng/ml未満になるまで用いることができる。

30

## 【0119】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法は、妊娠関連高血圧性障害の症状に改善が検出されるまで用いることができる。特定の実施形態において、妊娠関連高血圧性障害は子癇前症であり、改善とは、140 mmHg未満（収縮期）および/または90 mmHg未満（拡張期）の値まで血圧が低下することである。

## 【0120】

本発明は、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含むカラム等の筐体またはチャンバを提供し、該筐体またはチャンバは、子癇または子癇前症等の妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する際に使用するのに好適である。

40

## 【0121】

特定の実施形態において、筐体またはチャンバはカラムである。「カラム」は、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片またはsFlt-1リガンドが、付着することができるかまたは付着された固体支持体を含む、略円筒状の容器、チャンバ、または筐体を指す。

## 【0122】

特定の実施形態において、カラムは、約5 ml~2000 ml、約10 ml~約1000 ml、約50 ml~約500 ml、または約200 ml~約400 mlの体積の、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含む。特定の実

50

施形態において、カラムは、約5ml、約10ml、約25ml、約50ml、約100ml、約200ml、約300ml、約500ml、約750ml、約1000ml、約1500ml、または約2000mlの体積の、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含む。特定の実施形態において、カラムは、1つ以上の抗凝血性物質、例えば、ヘパリンを含む。特定の実施形態において、カラム内部の細菌、マイコプラズマ、および/またはウイルスの量を減少させることが企図される様式でカラム内部が処理されている。特定の実施形態において、カラム内部は滅菌される。

#### 【0123】

特定の実施形態において、カラムは、ヒト血液または血漿から少なくとも10 $\mu$ g、少なくとも25 $\mu$ g、少なくとも50 $\mu$ g、少なくとも75 $\mu$ g、少なくとも100 $\mu$ g、少なくとも150 $\mu$ g、少なくとも200 $\mu$ g、少なくとも300 $\mu$ g、少なくとも400 $\mu$ g、少なくとも500 $\mu$ g、少なくとも600 $\mu$ g、少なくとも700 $\mu$ g、少なくとも800 $\mu$ g、少なくとも900 $\mu$ g、少なくとも1000 $\mu$ g、少なくとも1500 $\mu$ g、または少なくとも2000 $\mu$ gのsFlt-1を除去するために十分な、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含む。特定の実施形態において、カラムは、ヒト血液または血漿から少なくとも10 $\mu$ g~2000 $\mu$ g、少なくとも20 $\mu$ g~1000 $\mu$ g、少なくとも50 $\mu$ g~500 $\mu$ g、または少なくとも100 $\mu$ g~200 $\mu$ gのsFlt-1を除去するために十分な、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含む。

#### 【0124】

本発明は、子癇または子癇前症等の妊娠関連高血圧性障害を治療または予防するためのデバイスを作製する方法であって、

(a) 固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を生成するために、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を固体支持体に付着させることと、

(b) 固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含む筐体またはチャンバを生成するために、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片をカラム等の筐体またはチャンバ内に導入することと、

(c) 固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含む筐体またはチャンバを、対象からの血液または血漿を固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはその抗sFlt-1抗原結合断片まで運ぶための手段に流体的に接続することと、

(d) 固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含む筐体またはチャンバを、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片からの血液または血漿を対象まで運ぶための手段に流体的に接続することと、を含み、該手段は、対象からの血液または血漿を固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはその抗sFlt-1抗原結合断片に接触させ、それによって血液または血漿からsFlt-1を除去することができるよう筐体またはチャンバに接続される、方法を提供する。

#### 【0125】

本発明は、透析またはアフレスイスデバイスまたはシステムが、患者からの血液または血漿と固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはその抗sFlt-1抗原結合断片との接触を提供し、それによって血液または血漿からsFlt-1を除去してsFlt-1の枯渇した血液または血漿を生成することができるよう、透析またはアフレスイスデバイスまたはシステムに、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片を含むカラム等の筐体またはチャンバを提供するように透析またはアフレスイスデバイスまたはシステムを改良することを含む、子癇または子癇前症等の妊娠関連高血圧性障害を治療または予防するためのデバイスを作製する方法を提供する。

#### 【0126】

特定の実施形態において、本発明は、子癇または子癇前症等の妊娠関連高血圧性障害を

治療または予防するエクスピボ法において使用するのに好適な抗 s F l t - 1 抗体を同定する方法であって、

( a ) s F l t - 1 に結合する抗体を得ることと、

( b ) 結合した抗 s F l t - 1 抗体を含む固体支持体を生成するために、 s F l t - 1 に結合する抗体を固体支持体に付着させることと、

( c ) 結合した抗 s F l t - 1 抗体を含む固体支持体が、対象由来の流体試料中の s F l t - 1 に結合し、それによって流体試料から s F l t - 1 を除去することができるかどうかを判定することと、を含み、

結合した抗 s F l t - 1 抗体を含む固体支持体が対象由来の流体試料中の s F l t - 1 に結合し、それによって流体試料から s F l t - 1 を除去できる場合、ステップ ( a ) の抗体は、子癇または子癇前症等の妊娠関連高血圧性障害を治療または予防するエクスピボ法において使用するのに好適な抗 s F l t - 1 抗体として同定される、方法を提供する。

【 0 1 2 7 】

特定の実施形態において、対象は哺乳動物である。特定の実施形態において、対象はヒトである。

【 0 1 2 8 】

特定の実施形態において、流体試料は、血液、血漿、羊水、または尿である。

【 0 1 2 9 】

改良された透析またはアフェレシスシステムは、本明細書に開示される方法を実施するために使用することができ、改良された透析またはアフェレシスシステムは、血液が、除去され、結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を含む固体支持体を通過させられ、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片によって血液から s F l t - 1 が除去された後に対象の体に戻される手段を提供する。いくつかの実施形態において、アフェレシスシステムは、プラスマフェレシスシステムであり、血液ではなく血漿が、結合した抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片を含む固体支持体を通過させられ、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片によって血漿から s F l t - 1 が除去された後に対象の体に戻される。

【 0 1 3 0 】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法は、全血または血漿等の体液の除去および体外治療を可能にする当該技術分野で既知のデバイスの改良版を使用して実行することができる。そのようなデバイスの一つは、透析機である。透析機は日常的に使用されており、流速を制御する方法、気泡を除去する方法、ならびに透析の間に適切な電解質バランス、血糖、酸素負荷、温度、無菌性、および他の重要な要因を維持する方法は、当該技術分野において周知であり、また確立されている。特定の実施形態において、本明細書に開示される方法は、既存の透析システムを使用して実行されてもよく、その場合、ダイヤライザーが、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片が付着した固体支持体を含むカラム等の筐体またはチャンバによって置き換えられる。筐体またはチャンバを通過して血液が流れると、抗 s F l t - 1 抗体またはその s F l t - 1 結合断片が血液から s F l t - 1 を除去し、それによって血液中の s F l t - 1 濃度を低下させ、子癇前症または子癇等の妊娠関連高血圧性障害を治療または予防する。

【 0 1 3 1 】

本明細書に記載される方法を実施するために使用することができる別の周知のデバイスは、アフェレシスシステム、例えば、プラスマフェレシスシステムである。プラスマフェレシスは、血液の特定の細胞成分の体外操作および除去を伴い、その後、所望の臨床効果を誘発するために血液が対象に再注入される。プラスマフェレシスの間、最初に、針またはカテーテル等のアクセスデバイスを介して体から血液が取り出される。次いで、細胞分離装置によって血液から血漿が除去される。血液細胞から血漿を分離するためには一般的に3つの手段が使用される：( 1 ) 不連続フロー遠心分離：典型的には1度に300mlの体積の血液が除去され、血液細胞から血漿を分離するために遠心分離される、( 2 ) 連続フロー遠心分離：連続的に回転させて血漿を取り出すために遠心分離が使用される、(

10

20

30

40

50

3) 血漿濾過：標準的な血液透析機器を使用して血漿が濾過される。

【0132】

本明細書に開示される方法において使用するための改良に好適なアフェレシスデバイスは、例えば、米国特許第5,098,372号、米国特許第5,112,298号、および米国特許第6,319,471号に記載される。他の好適なデバイスは、Plasma Select (Munich, Germany)のLIFE-18(登録商標)血漿療法デバイス、B. Braun (Melsungen, Germany)のDiapact(登録商標)CRRT、1201 Oak Street, Lakewood, Co. 80215所在のCobe BCT, Incorporatedの製品であるCOBE SPECTRA(登録商標)、および Gambro BCT, Inc.のELUTRA(登録商標)Cell Separation Systemを含む。

10

【0133】

本明細書に開示されるシステムの特定の実施形態において、対象の血液系に到達するためのアクセスデバイスおよび/または対象に血液、血漿、または血液の細胞成分を戻すための戻しデバイスは、例えば、Fresenius Medical Care (Bad Homburg, Germany)によって販売される単ルーメンカテーテルまたは二重ルーメンカテーテル等の単ルーメンカテーテルまたは二重ルーメンカテーテルである。そのようなカテーテルは、ポリウレタンが体温まで加熱すると血管の輪郭に適合する感熱性ポリウレタンでできていてもよい。

20

【0134】

本明細書に開示される方法の特定の実施形態において、対象から血液を除去することは、血液から少なくとも約650ミリリットルの血漿を得るのに十分な量の血液を対象から除去することを含む。特定の実施形態において、対象から血液を除去することは、少なくとも2リットルの血液を対象から除去することを含む。特定の実施形態において、対象から血液を除去することは、実質的に全ての対象の血液量が、少なくとも1回、少なくとも2回、または少なくとも3回、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片と接触させられるまで、対象から連続的に血液を除去することを含む。特定の実施形態において、対象から血液を除去することは、対象の全血液量の約2/3、約1/2、約1/4、約1/5、または約1/10が、抗sFlt-1抗体またはそのsFlt-1結合断片と接触させられるまで、対象から連続的に血液を除去することを含む。特定の実施形態において、対象から血液を除去することは、対象の血液中のsFlt-1濃度が事前に選択された濃度に達するまで対象から連続的に血液を除去することを含む。特定の実施形態において、事前に選択された濃度は、約50 ng/ml未満、約40 ng/ml未満、約25 ng/ml未満、約10 ng/ml未満、約5 ng/ml未満、約4 ng/ml未満、約3 ng/ml未満、約2 ng/ml未満、約1 ng/ml未満、約0.75 ng/ml未満、または約0.5 ng/ml未満である。特定の実施形態において、事前に選択された濃度は、約40~50 ng/ml、約30~40 ng/ml、約20~30 ng/ml、約10~20 ng/ml、約5~10 ng/ml、約5~8 ng/ml、約3~7 ng/ml、約1~5 ng/ml、約1~3 ng/ml、約0.75~2 ng/ml、または約0.5~1 ng/mlである。

30

40

【0135】

血液または血漿中のsFlt-1の濃度は、連続的にまたは所定の間隔で自動的に測定することができる。例えば、対象由来の血漿試料は、sFlt-1またはsFlt-1を含む粒子に結合する標識化試薬と反応させることができ、sFlt-1の量が測定できる。代替として、sFlt-1(sFlt-1を含む粒子を含む)に特異的に結合するリンカー試薬を含むセンサが、結合したsFlt-1の量を連続的に検出するために使用されてもよい。血液濾過の手順は、対象からの血液または血漿中で検出されるsFlt-1の濃度が所定値を下回ったときに終了する。

【実施例】

【0136】

50

## 実施例 1

抗 s F l t - 1 抗体またはリガンドが結合した固体支持体を含むカラムデバイスを使用したヒト羊水からの s F l t - 1 の除去

実験条件は、臨床設定における使用に近いものとなるように設計したが、それよりも小規模である。約 40 ng / ml の高い s F l t - 1 レベルを有するヒト子癇前症患者から羊水を得た。

## 【 0 1 3 7 】

ヒト第 V I I I 因子に対するポリクローナル抗体を使用した対照カラム 1 本を除いて、使用した抗体は全て s F l t - 1 に結合するマウスモノクローナル抗体であった。アミノ酸 S e r 2 7 ~ I l e 3 2 8 を含むヒト s F l t - 1 タンパク質 ( I g 様ドメイン 1 ~ 3 ) でマウスを免疫することにより、抗 s F l t - 1 モノクローナル抗体を作製した。このタンパク質はまた、カルボキシ末端にポリ ヒスチジン親和性タグを有していた。s F l t - 1 に結合した 1 2 個の抗体を選択し、s F l t - 1 に対する結合親和性について検査した。

10

## 【 0 1 3 8 】

抗 s F l t - 1 抗体を固相 ( アガロースビーズ ) に付着させることにより、生体液から s F l t - 1 タンパク質を除去するためのデバイスを作製した。アガロースビーズを臭化シアンで化学処理してビーズ上に反応性化学基を作製した。次いで、これらの活性化ビーズを抗体と混合し、該抗体をビーズに共有結合的に付着させた。

20

## 【 0 1 3 9 】

次いで、スクリーン / フリットを底に含む 1 m l カラムに、抗体の付着したビーズを注入し、カラム内にビーズを保持するが、流体または溶液はカラムを通過させる、。ビーズに付着した抗 s F l t - 1 抗体を含む得られたデバイスに、子癇前症患者からの羊水をデバイスの上に加え、デバイスを通してカラムから流れ出した溶液を回収した。デバイスを通過させる前および後の羊水中の s F l t - 1 の量を測定し、枯渇した s F l t - 1 の割合 ( % ) を計算した。

## 【 0 1 4 0 】

さらなる詳細は以下の通りである :

## 【 0 1 4 1 】

( 1 ) 抗 s F l t - 1 抗体に結合した 0 . 1 m l のアガロースビーズを 1 m l カラムに加えた。

30

## 【 0 1 4 2 】

( 2 ) 5 0 0 μ g の抗体をアガロースビーズに結合させた。

## 【 0 1 4 3 】

( 3 ) 4 m l のリン酸緩衝食塩水 ( P B S ) でカラムを洗浄した。

## 【 0 1 4 4 】

( 4 ) 子癇前症患者からの羊水 1 m l ( 約 4 0 n g の s F l t - 1 タンパク質を含む ) をカラムの上に加えた。

## 【 0 1 4 5 】

( 5 ) 約 1 m l / 1 5 分の流速でカラム上に羊水を流した ( 2 1 ~ 2 4 ) 。

40

## 【 0 1 4 6 】

( 6 ) 羊水を回収し、再度、デバイスに 2 回適用し、合計で 3 回カラムを通過させた。

## 【 0 1 4 7 】

( 7 ) 3 回目にカラムを通過させた後、フロースルー液を回収し、s F l t - 1 の濃度を検査した。

## 【 0 1 4 8 】

( 8 ) 4 m l の緩衝液でデバイスを洗浄し、ビーズ / カラムに非特異的に結合したあらゆる材料を除去した。次いで、0 . 5 m l の 0 . 5 M 酢酸 ( p H 3 . 0 ) をデバイスに加え、結合した s F l t - 1 をデバイスから分離した。溶出液の画分を回収し、s F l t - 1 の濃度を測定して何らかの変化があったかどうかを判定した。

50

## 【 0 1 4 9 】

s F l t - 1 に対する親和性および羊水から除去された s F l t - 1 の割合 ( % ) を含む例示的な抗体についての結果を下の表 2 に示す。

## 【 0 1 5 0 】

## 【 表 2 】

試料	Kd (M)	sFlt-1 が除去された割合 (%)
カラム前の羊水		0
カラム(抗体を含まない)		0
第 VIII 因子抗体を含むカラム		1 未満
抗体 101 を含むカラム	1.44E-09	53
抗体 102 を含むカラム	2.17E-10	85
抗体 103 を含むカラム	3.12E-10	87
抗体 104 を含むカラム	n.d.	85
抗体 105 を含むカラム	7.05E-08	1 未満
抗体 106 を含むカラム	1.58E-09	59
抗体 107 を含むカラム	8.11E-09	1 未満
抗体 108 を含むカラム	4.99E-09	11
抗体 109 を含むカラム	7.66E-10	48
抗体 110 を含むカラム	3.36E-10	58
抗体 111 を含むカラム	3.18E-10	50
抗体 112 を含むカラム	5.35E-10	28
VEGF <sub>121</sub> を含むカラム	n.d.	50

10

20

30

## 【 0 1 5 1 】

V E G F <sub>1 2 1</sub> を用いて同様の方法を使用した。細菌中に V E G F <sub>1 2 1</sub> を発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製し、臭化シアンで活性化したアガロースビーズに結合させた。その他の点においては、アガロースビーズに結合した V E G F <sub>1 2 1</sub> を含むカラムに羊水を適用するための手順は、抗体の場合と実質的に同じであった。

## 【 0 1 5 2 】

抗 s F l t - 1 抗体および V E G F <sub>1 2 1</sub> についての結果を図 2 に示す。

## 【 0 1 5 3 】

この結果は、固体支持体に結合した抗 s F l t - 1 抗体および s F l t - 1 リガンドが、子癇前症患者の羊水から s F l t - 1 を特異的に除去することができたことを示す。抗体またはリガンドが付着していない、マトリクス/ビーズのみを含む対照カラムデバイスは、羊水から s F l t - 1 タンパク質を除去しなかった。血液凝固因子 V I I I に結合する抗体を含む対照カラムデバイスも、s F l t - 1 を除去しなかった。しかしながら、s F l t - 1 に結合する抗体またはリガンドがカラム内に使用されたときに、フロースルー羊水の s F l t - 1 タンパク質レベルが 8 7 % まで低下した。個々の抗体が s F l t - 1 を除去する際にどれくらい効果的であるかにおいて有意な変動が観察された ( 1 1 ~ 8 7 % ) 。精製モノクローナル抗体と s F l t 1 との間の結合の見かけの K d を表面プラズモン共鳴法 ( S P R ) により測定した ( 図 2 B ) 。抗体を固相に固定化し、s F l t - 1 ( ドメイン 1 ~ 3 ) は液相中にあった。抗体親和性 ( 動力学的な結合実験にて測定 ) ( 図 2

40

50

B)とデバイスの有効性(図2A)との間に直接的な相関関係は認められなかった。また、オン速度またはオフ速度とデバイスの有効性との間にも相関関係は認められなかった。これらの結果は、子癩前症を含む妊娠関連高血圧性障害を治療するために、固体支持体に結合した抗sFlt-1抗体を含むデバイスを使用することができることを示す。

【0154】

#### 実施例2

##### キメラ化

マウス可変領域およびヒトIgG1定常領域を有するキメラモノクローナル抗体を生成した。キメラ抗体のいくつかの変種を生成した。抗体AG10A(V<sub>H</sub>:配列番号35、V<sub>L</sub>:配列番号36)は、抗体102の重鎖および軽鎖可変ドメインとヒトIgG1定常領域とからなる。抗体AG10B(V<sub>H</sub>:配列番号37、V<sub>L</sub>:配列番号36)には、定常領域のグリコシル化部位を除去する突然変異(N298Q)が組み込まれている。抗体AG10C(V<sub>H</sub>:配列番号38、V<sub>L</sub>:配列番号36)にはFcRnとの結合を妨害する突然変異(I254A)が組み込まれている。抗体AG10D(V<sub>H</sub>:配列番号39、V<sub>L</sub>:配列番号36)には上述の突然変異が両方とも組み込まれている。

【0155】

#### 実施例3

##### 固定化された抗体AG10Bの特徴

抗体AG10BのsFlt-1枯渇特性に関する種々の検査を行った。

【0156】

流速 40 ng/mLのsFlt1(インプット)を添加した40床体積のウマ血清を、AG10Bモノクローナル抗体(0.8 mg)に結合した充填セファロースビーズ1 mLを含むカラムに適用し、フロースルー画分(FT)を回収した。R&D Flt-1 Duo Set Kit(DY321)を使用して、インプット中のsFlt1およびFT画分の濃度を測定した。式、sFlt1の枯渇の割合(%) = [(sFlt1<sub>インプット</sub> - sFlt1<sub>FT</sub>) / sFlt1<sub>インプット</sub>]を用いてsFlt1の枯渇の割合(%)を計算した。流速によるsFlt-1の枯渇の変動を表3および図4に示す。

【0157】

【表3】

流速(mL/分)	sFlt1の枯渇の割合(%)
0.5	98%
1.0	94%
1.5	87%
3.0	77%

【0158】

線流速 40 ng/mLのsFlt1(インプット)を添加した40床体積のウマ血清を、AG10Bモノクローナル抗体(0.8 mg)に結合したセファロースビーズ1 mLを含むカラムに適用し、フロースルー画分(FT)を回収した。R&D Flt-1 Duo Set Kit(DY321)を使用して、インプット中のsFlt1およびFT画分の濃度を測定した。式、sFlt1の枯渇の割合(%) = [(sFlt1<sub>インプット</sub> - sFlt1<sub>FT</sub>) / sFlt1<sub>インプット</sub>]を用いてsFlt1の枯渇の割合(%)を計算した。線流速によるsFlt-1の枯渇の変動を表4および図5に示す。

【0159】

10

20

30

40

【表 4】

線流速(cm/時間)	sFlt1の枯渇の割合 (%)
38	98%
76	94%
113	87%
230	77%

10

## 【0160】

滞留時間 40 ng/mLのsFlt1 (インプット) を添加した40床体積のウマ血清を、AG10Bモノクローナル抗体 (0.8 mg) に結合したセファロースビーズ1 mLを含むカラムに適用し、フロースルー画分 (FT) を回収した。R&D Flt-1 DuoSetキット (DY321) を使用して、インプット中のsFlt1およびFT画分の濃度を測定した。式、 $sFlt1 \text{の枯渇の割合} (\%) = [(sFlt1_{インプット} - sFlt1_{FT}) / sFlt1_{インプット}]$  を用いてsFlt1の枯渇の割合 (%) を計算した。カラム滞留時間によるsFlt1の枯渇の変動を表5および図6に示す。

## 【0161】

20

【表 5】

滞留時間(分)	sFlt1の枯渇の割合 (%)
0.33	77%
0.67	87%
1.00	94%
2.00	98%

30

## 【0162】

モノクローナルAb密度 組換えsFlt1を添加したウマ血清を、種々の量のAG10Bに結合させたセファロースビーズ (約  $1.5 \times 10^6$  ビーズ/mL) を含む1-mLカラム上に流速0.5 mL/分 (滞留時間2分) で適用した。

## 【0163】

1 mL当たり0.8 mgのAb (約  $3.2 \times 10^{15}$  個の分子) の場合、これはビーズ1個当たり約  $2.1 \times 10^9$  個の分子に相当する。同様に、0.4 mgのAb ( $1.6 \times 10^{15}$  個の分子) では、1ビーズ当たり約  $1.05 \times 10^9$  個の分子が存在する。ビーズの表面積が  $2.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  であると仮定すると、ビーズ1 mL当たり0.8 mgのAbは、ビーズ表面積  $1 \text{ cm}^2$  (細孔を含まない) 当たり約  $8.4 \times 10^{12}$  個のAb分子に相当する。sFlt1の枯渇量をsFlt1インプット合計で除すことによりsFlt1の枯渇の割合 (%) を測定した。R&D Flt-1 DuoSetキット (DY321) を使用してsFlt1の濃度を測定した。MAb密度によるsFlt1の枯渇の変動を表6および図7に示す。

40

## 【0164】

【表 6】

Ab 密度(mg/mL ビーズ)	sFlt1 の枯渇の割合 (%)
0.025	74%
0.050	82%
0.100	84%
0.200	90%
0.400	96%
0.800	97%

10

## 【0165】

血漿および血清からの sFlt-1 の枯渇

組換え sFlt1 を添加した正常なヒト血漿を、AG10B または ErbB2 に結合したセファロースビーズを含有する 0.1 mL カラム上に適用した。広範囲の Ab : リガンド比について枯渇の割合 (%) を測定した。AG10B : sFlt1 比が 200 : 1 未満のときにカラム能力の低下が生じる (図 8)。滞留時間および流速が変数になるように重力によりカラム操作を行った。R & D Flt-1 DuoSet キット (DY321) により sFlt1 の量を測定した。

20

## 【0166】

組換え sFlt1 を添加したウマ血清を、AG10B に結合したセファロースビーズを含む 1-mL カラム上に適用した。様々な範囲の MAbs : リガンド比について枯渇の割合 (%) を測定した。AG10B : sFlt1 比が 25 : 1 未満のときにカラム能力の低下が生じる (図 9)。滞留時間 1 分で 1 mL / 分のカラム操作を行った。R & D Flt-1 DuoSet キット (DY321) により sFlt1 の量を測定した。

30

## 【0167】

AG10B による sFlt-1 の枯渇は、カラムサイズによって変動しない。40 床体積の 40 ng / mL の sFlt1 を添加したウマ血清を、AG10B モノクローナル抗体 (それぞれ、0.8 mg または 40 mg) に結合したセファロースビーズを含む 1-mL または 50-mL カラムのいずれかに滞留時間 2 分で適用し、フロースルー画分 (FT) を回収した。R & D Flt-1 DuoSet キット (DY321) を使用して、インプット中の sFlt1 および FT 画分の濃度を測定した。式、sFlt1 の枯渇の割合 (%) =  $[(sFlt1_{インプット} - sFlt1_{FT}) / sFlt1_{インプット}]$  を用いて sFlt1 の枯渇の割合 (%) を計算した。図 10 は、1 mL および 50 mL 両方のデバイスカラムが血清中の sFlt1 タンパク質のほぼ全てを枯渇させることができることを示す。

40

## 【0168】

ヘパリンは、AG10B による sFlt-1 の枯渇に干渉しない。0.45 U のヘパリンを含むかまたは含まない組換え sFlt1 を含むウマ血清を、AG10B に結合したセファロースビーズを含む 0.1-mL カラム上に適用した。AG10B を含むカラムに流通させる前 (負荷) および後 (FT) に、sFlt1 レベルについて試料をアッセイした。R & D Flt-1 DuoSet キット (DY321) を使用して sFlt1 レベルをアッセイした (表 7、図 11)。

## 【0169】

【表 7】

sFlt-1 レベル (ng/ml)	血清	血清+ヘパリン
合計 sFlt-1	29.3	26.2
Ag10B によって枯渇し た sFlt-1	21.6	20.9
枯渇の割合 (%)	74%	80%

10

## 【0170】

sFlt-1 に結合した AG10B は、sFlt-1 と VEGF との結合をブロックしない。図 12 に示すように、sFlt-1 または VEGF のいずれかで ELISA プレートを被覆した。洗浄後、sFlt-1 で被覆されたウェルには PBS を加え、VEGF で被覆されたウェルには PBS または sFlt-1 のいずれかを加えた。洗浄後、sFlt-1 に結合した固定化 VEGF を含むウェルには AG10B または 18F1 (sFlt-1-VEGF 相互作用をブロックする抗体) を加え、PBS で被覆されたウェルには、AG10B と事前に複合体化した sFlt-1、または 18F1 と事前に複合体化した sFlt-1 を加えた。図 12 に示されるように、AG10B は、sFlt-1 および sFlt-1/VEGF 複合体に結合する。事前に複合体化した sFlt-1/AG10B も VEGF に結合する。対照的に、ブロッキング抗体である 18F1 は sFlt-1/VEGF 複合体に結合しない。同様に、18F1 の sFlt-1 への添加は、VEGF および sFlt-1 の相互作用を防止する。

20

## 【0171】

補体活性化 ビーズに結合された AG10B は、ビーズ単独の場合と同じ程度にしか補体を活性化しない (図 13)。精製モノクローナル抗体 AG10B に結合したセファロースビーズを含む 0.1-mL カラム、または抗体を含まない陰性対照カラム (PBS (pH 7.4)、ビーズ) に、精製 sFlt-1 を添加したヒト血漿を適用した。試料を 37 まで加熱し、製造者の指示に従って Quidel MicroVue C3a Plus EIA キットを使用して、補体活性化産物 C3a についてアッセイした。キット内に提供される C3a 標準物質を使用して、血漿画分中の C3a 濃度を測定するために使用される標準曲線を作成した。

30

## 【0172】

AG10B は、sFlt-1 の d1 ~ d3 ドメインのエピトープに結合する。表 8 は、AG10B が、PE 患者の羊水 (AF) 中に存在する天然 sFlt-1 の形態、および sFlt-1 の 2 つの組換え形態 (d1 ~ d3 ドメインまたは完全長) のエピトープに結合することを示す。sFlt-1 上の結合部位について VEGF と競合するブロッキング抗体 18F1 は、VEGF の存在下において sFlt-1 (d1 - d3) に効率的に結合することができない。508 抗体は sFlt-1 (d1 ~ d3) に結合することはできないが、AF 中の天然 sFlt-1 アイソフォームに結合することができることから、sFlt-1 上の結合エピトープが d1 ~ d3 ドメインの外部に位置する可能性が示唆される。陰性対照抗体 Ebx は、sFlt-1 の天然形態または組換え形態に結合することはできない。

40

## 【0173】

【表 8】

	羊水中の天然 sFlt1	組換え sFlt1 (d1~d3)	組換え sFlt1 (d1-d3) +VEGF	組換え sFlt1 (完全長)
AG10B	+	+	+	+
18F1	非検出	+	+/-	非検出.
508	+	-	非検出	-
Ebx	-	-	-	-

10

【図 3】

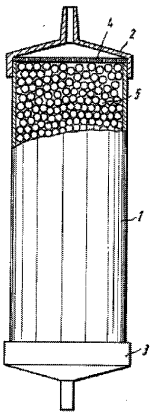
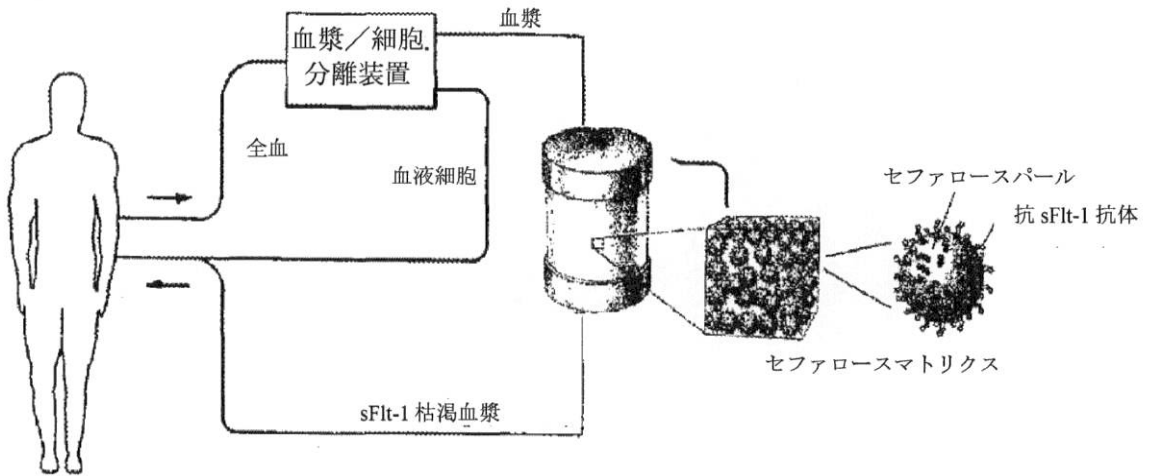


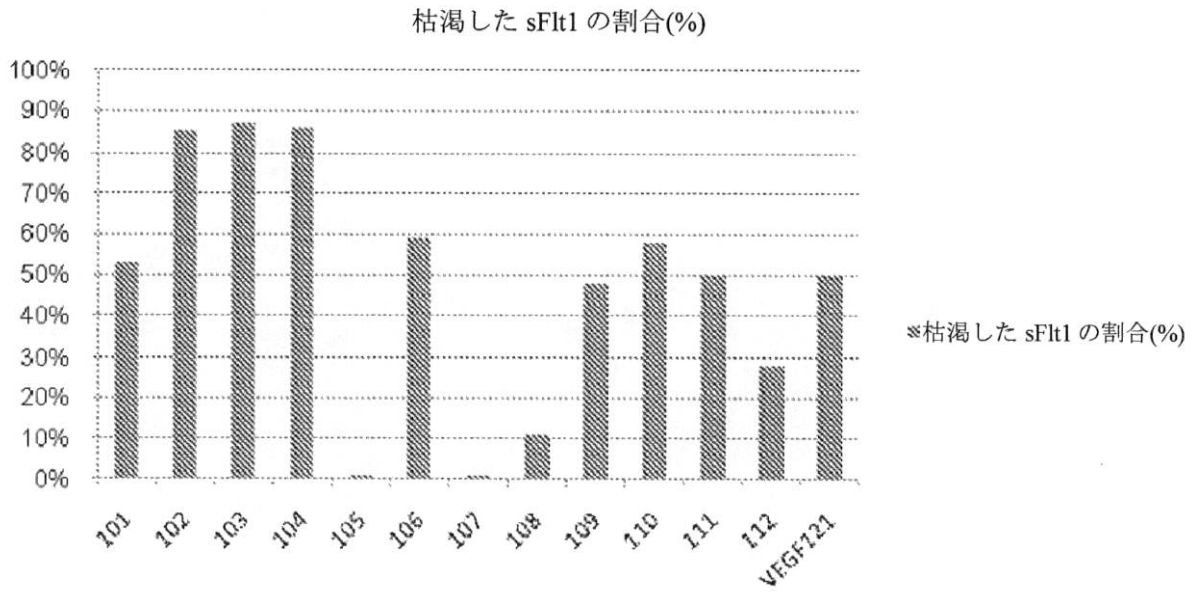
Fig. 3

【 図 1 】

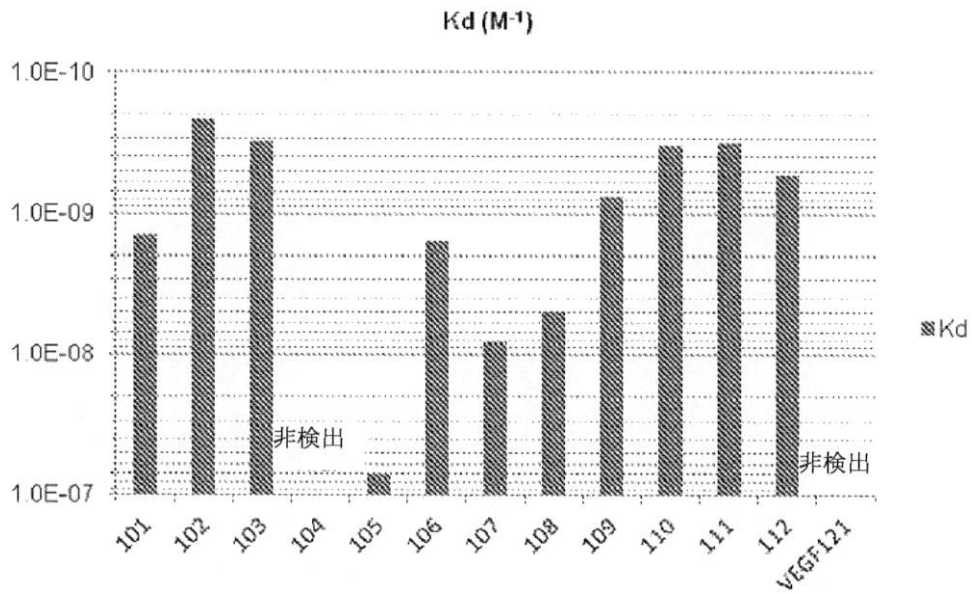


【図2】

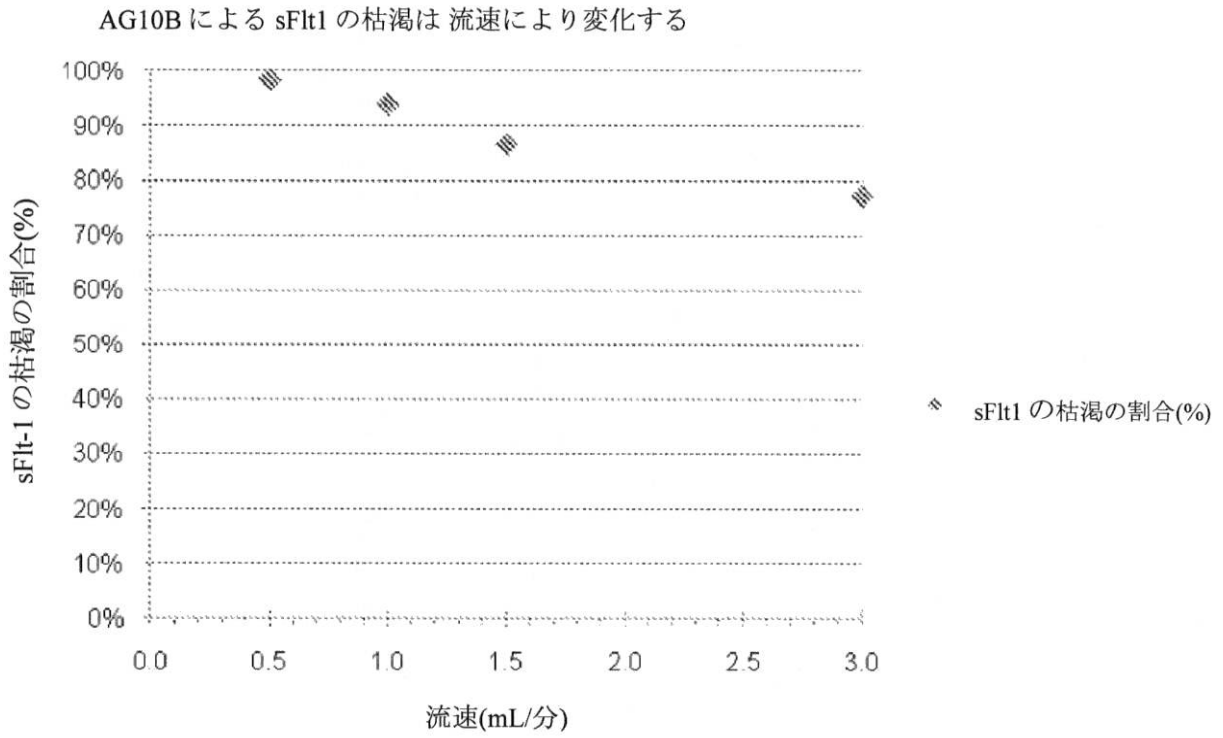
A.



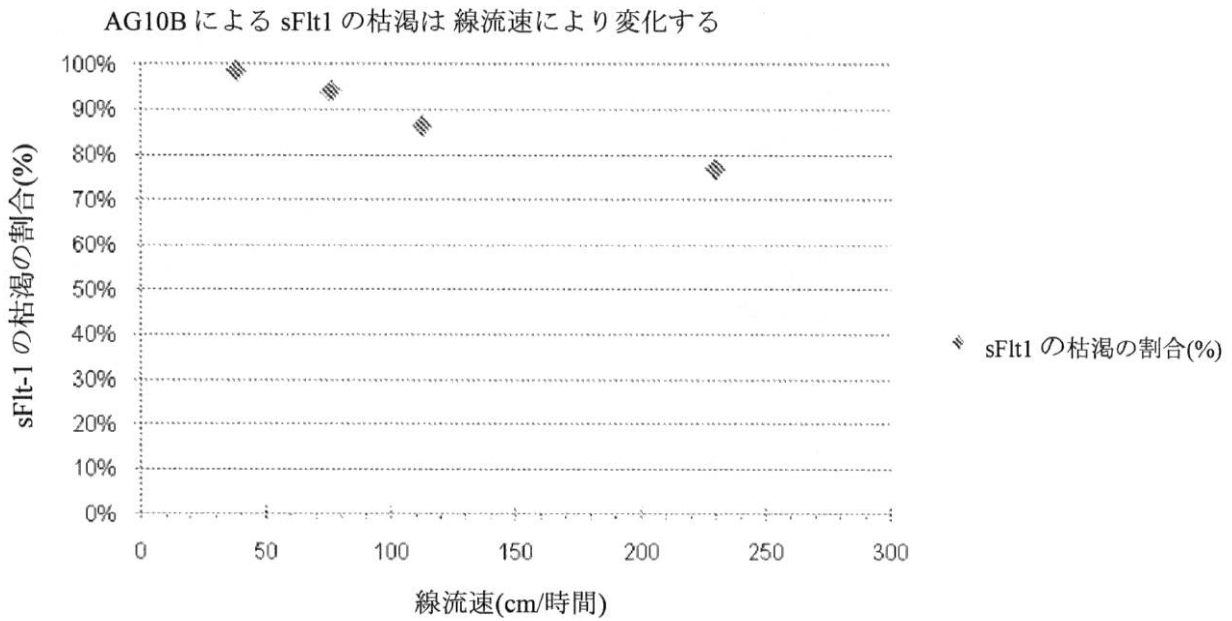
B.



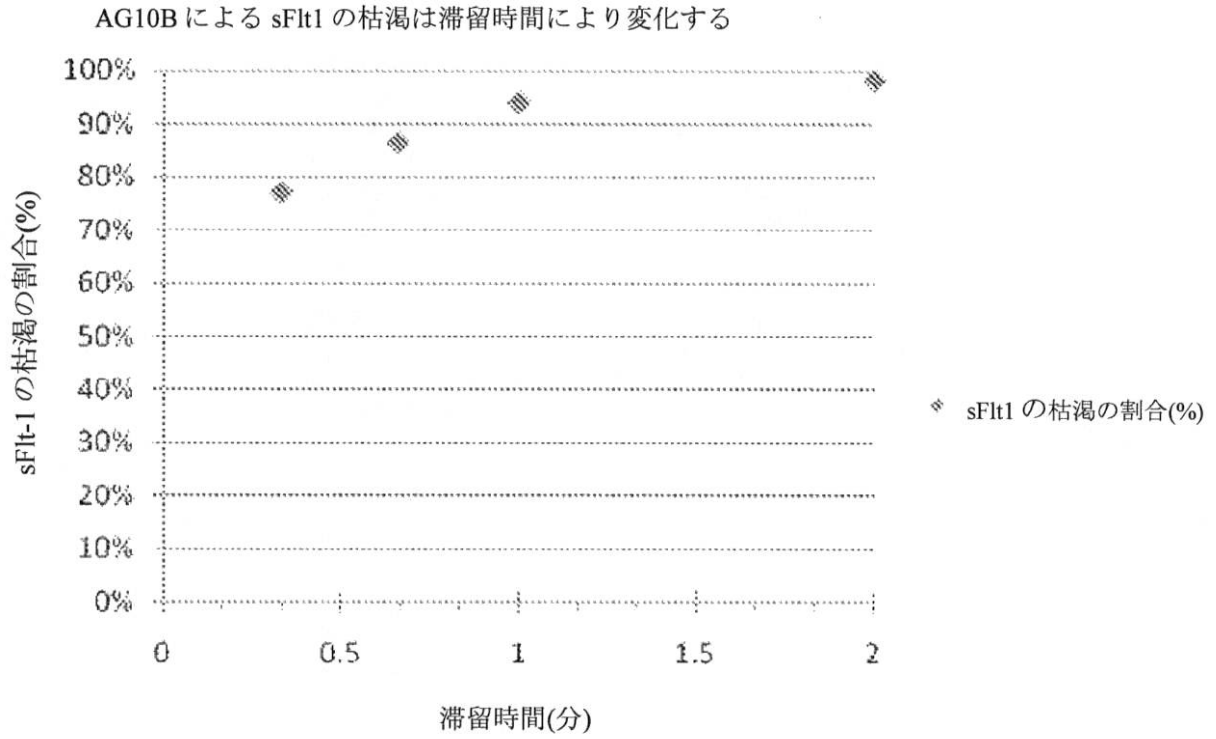
【 図 4 】



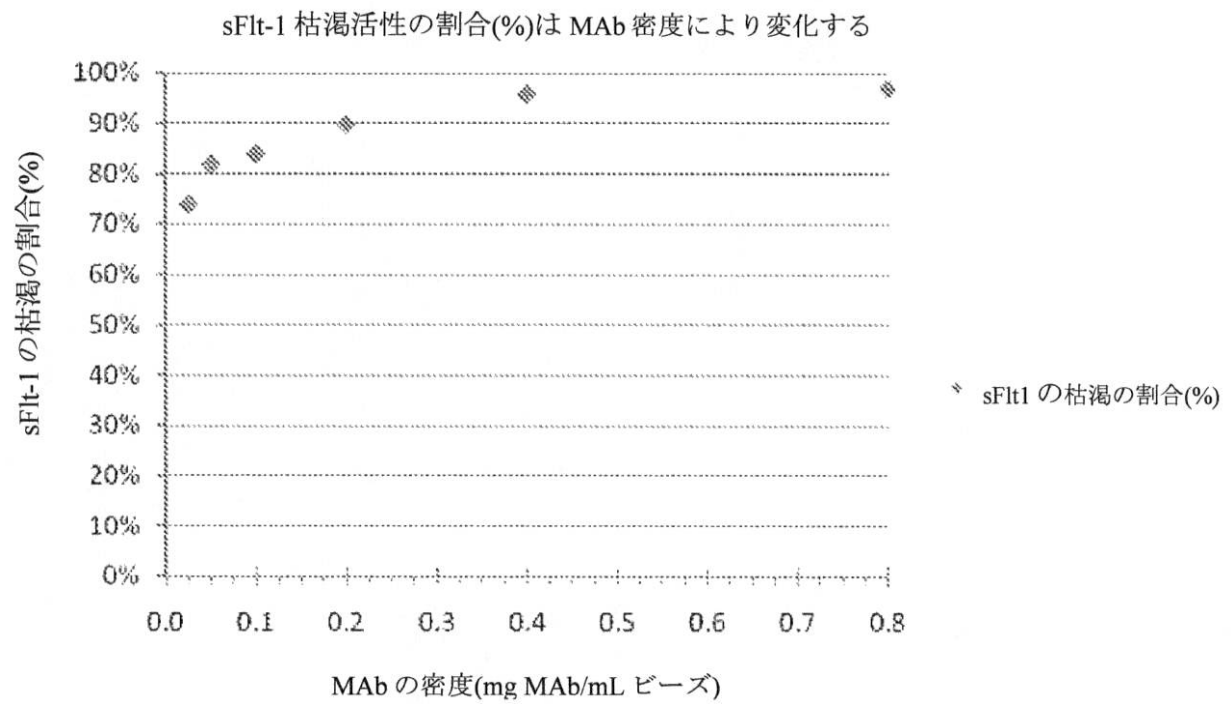
【 図 5 】



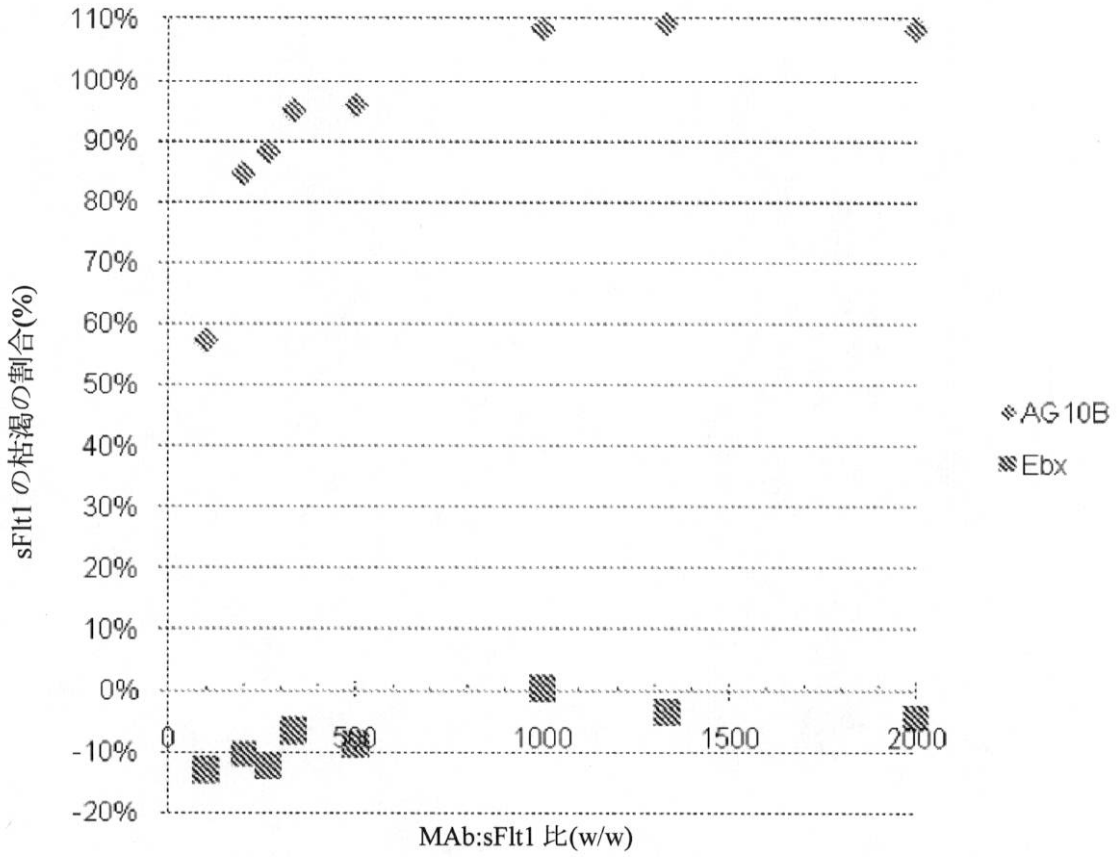
【 図 6 】



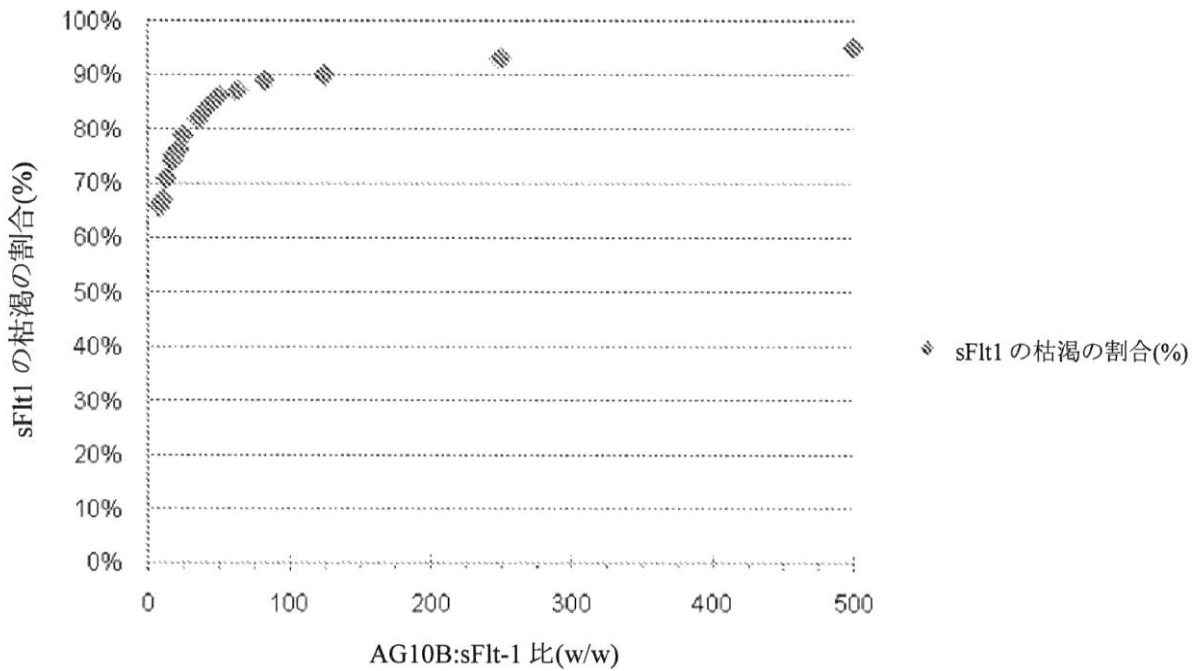
【 図 7 】



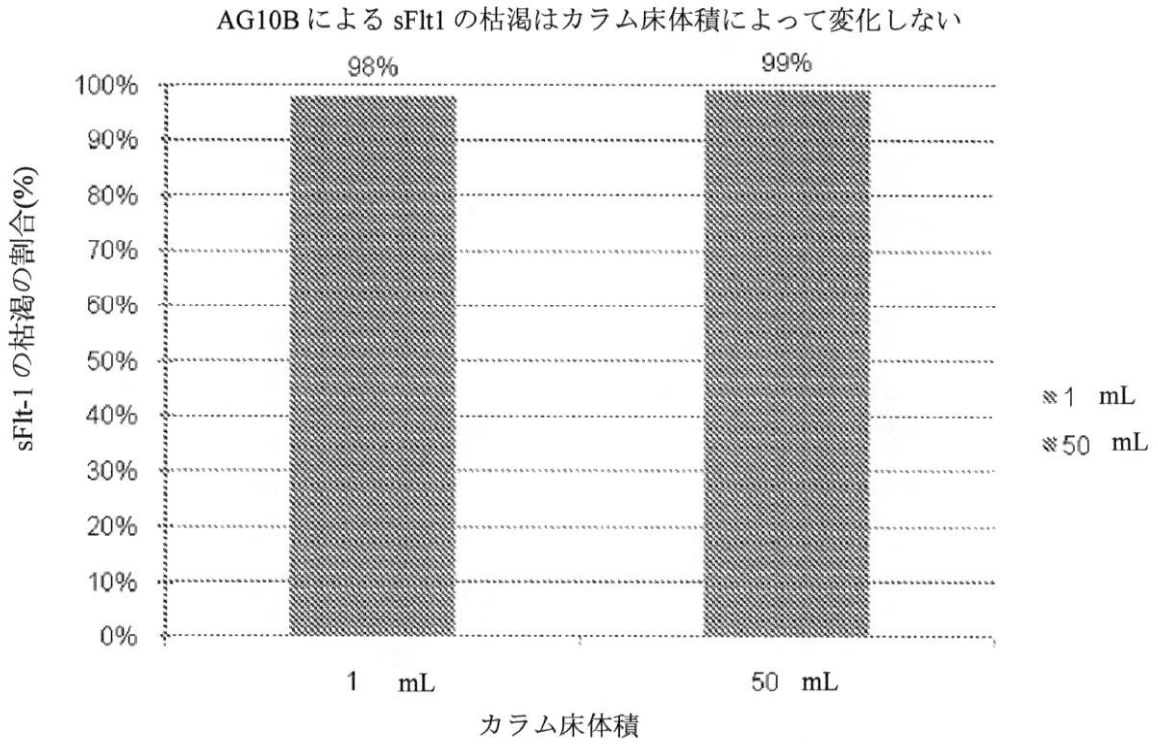
【 図 8 】



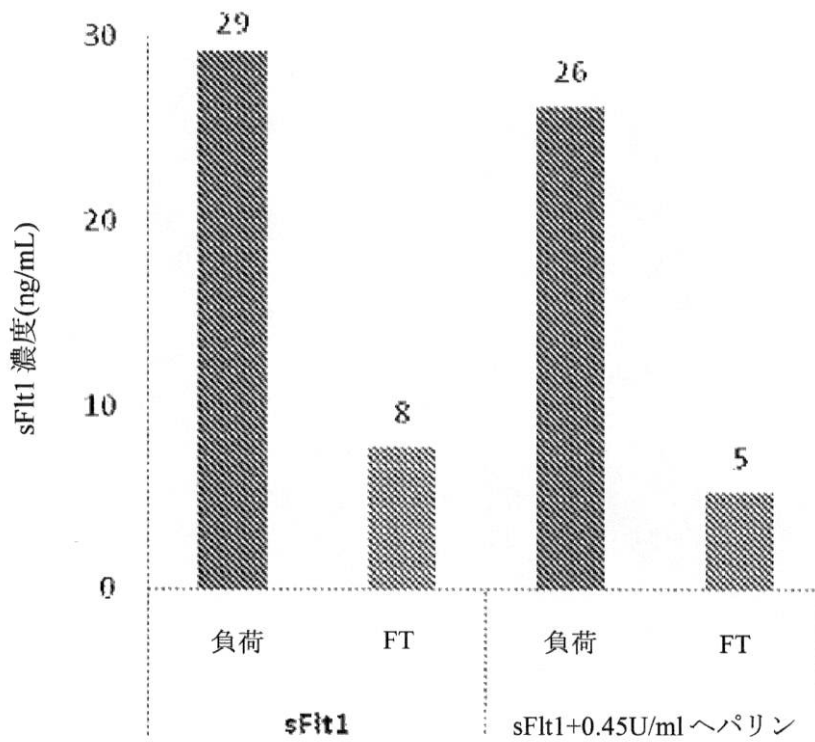
【 図 9 】



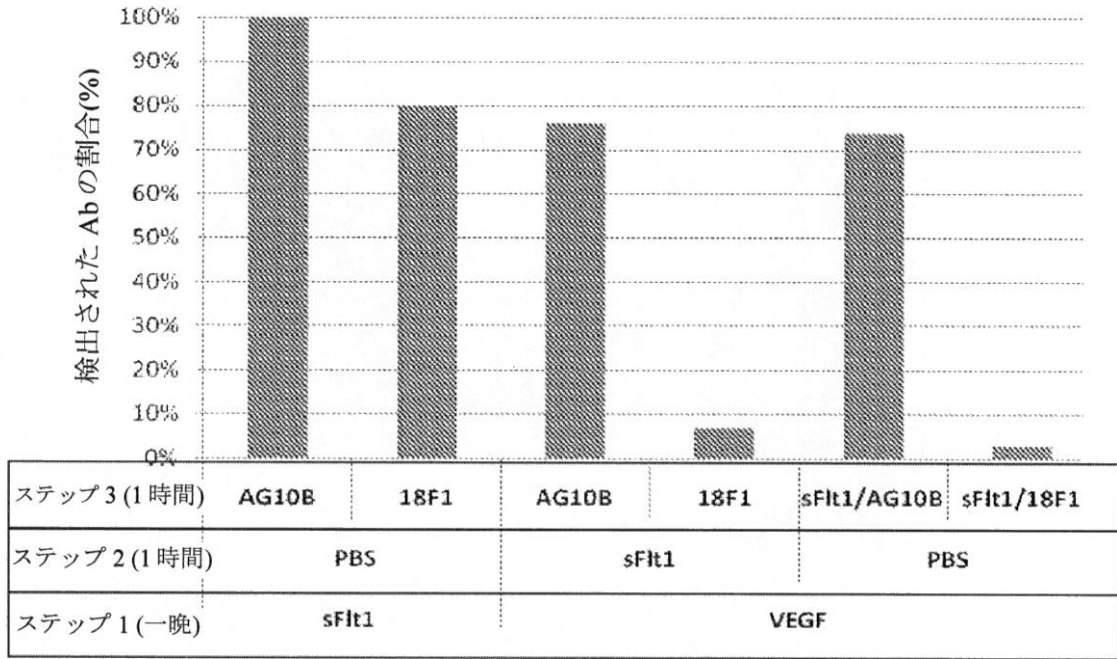
【図10】



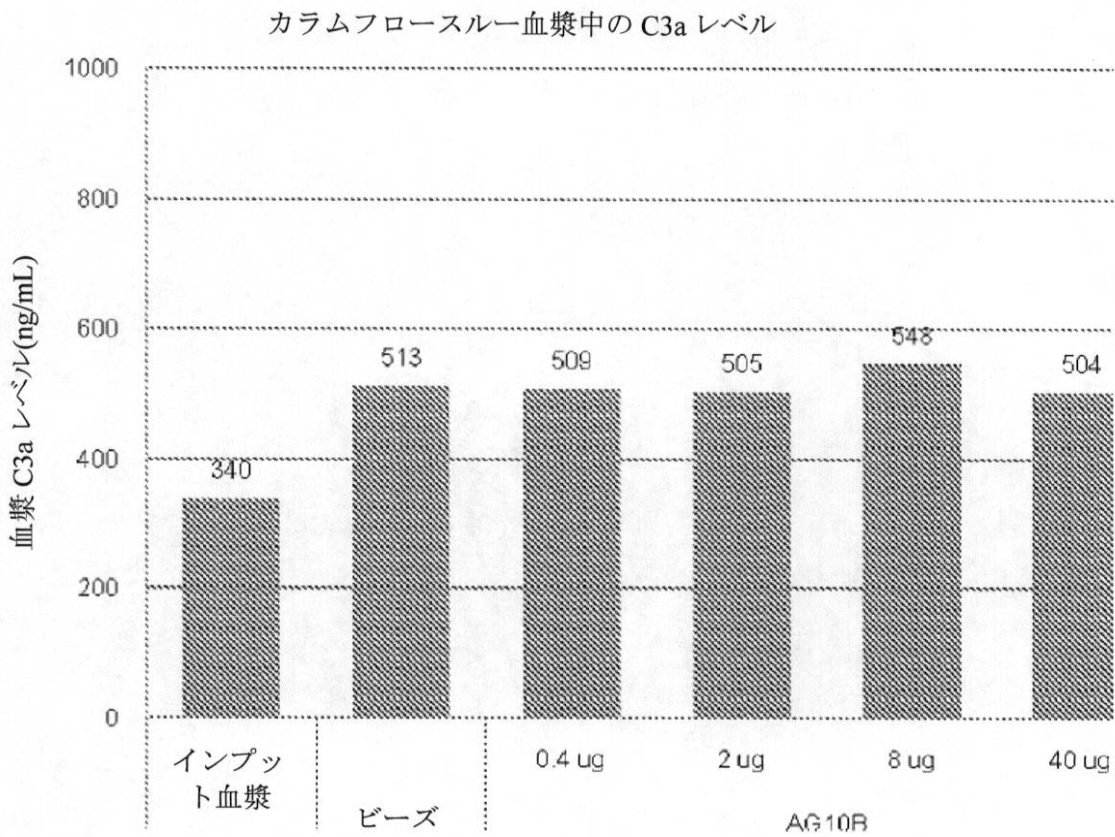
【図11】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配列表 】

2014511375000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/24198
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - A61K 39/395; A61K 39/00; C07K 16/00 (2012.01) USPC - 424/141.1; 424/178.1; 530/388.1, 530/389.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B) - A61K 39/395; A61K 39/00; C07K 16/00; G01N 33/566; G01N 33/543 (2012.01) USPC - 424/141.1; 424/178.1; 530/388.1, 530/389.1; 436/501; 436/518 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(B) - A61K 39/395; A61K 39/00; C07K 16/00; G01N 33/566; G01N 33/543 (2012.01) - see keyword below USPC - 424/141.1; 424/178.1; 530/388.1, 530/389.1; 436/501; 436/518 - see keyword below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google: sFlt-1, soluble frns-like tyrosine kinase 1, Soluble VEGF Receptor sFlt1, sVEGF-R1, sVEGFR, Pre-eclampsia, binds, domain, not block ligand binding, pregnancy-related, hypertensive, eclampsia, pre-eclampsia, pregnant human, postpartum, human		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0286271 A1 (KARUMANCHI et al.) 19 November 2009 (19.11.2009), Abstract, para [0012], [0014], [0064], [0065], [0096], [0211], and [0213]	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	US 2007/0231333 A1 (BOGHAERT et al.) 04 October 2007 (04.10.2007), Abstract, para[0006], [0013], [0246], SEQ ID NO: 78 (a.a 26-35), and SEQ ID NO: 6 (a.a 65-84)	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	US 2003/0086924 A1 (Sliwkowski) 08 May 2003 (08.05.2003), para [0015], [0036], and SEQ ID NO: 1 (a.a. 46-56)	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	UniProt_A2N1N1, B cell antigen receptor, Last modified: 20 February 2007 [online]. [Retrieved on 2012.04.19]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/A2N1N1>, Protein names, and Sequence (a.a. 114-122)	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	US 2008/0177045 A1 (LEE et al.) 24 July 2008 (24.07.2008), para [0002], [0010], and SEQ ID NO: 37(10 a.a; a.a.2-10)	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	US 2007/0202113 A1 (YOUNG et al.) 30 August 2007 (30.08.2007), para [0017], [0056], [0107], and SEQ ID NO: 8 (a.a. 24-36)	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	US 2009/0169547 A1 (SAHIN et al.) 02 July 2009 (02.07.2009), SEQ ID NO: 136(118 a.a.), which is the best prior art on record and is only 87.1% to the claimed SEQ ID NO: 30 (118 a.a.)	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	US 2007/0065425 A1 (BEHRENS et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), SEQ ID NO: 4(143 a.a.) comprising a region between amino acid residues 21-129, which is the best prior art on record, but only has the best local similarity of 94.5% to the claimed SEQ ID NO: 32 (109 a.a)	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 July 2012 (16.07.2012)	Date of mailing of the international search report <b>03 AUG 2012</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/24198

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 32-33, 35-39 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.	
Group I+: claims 1-20, 24-31 drawn to a method of treating or preventing a pregnancy-related hypertensive disorder in a subject comprising providing ex vivo to the subject an anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof, which comprises heavy chain CDRs and light chain CDRs. The first named invention (claims 1-3, 13-18, 24-27) is limited to the antibody comprises heavy chain CDRs having SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, and SEQ ID NO:22, as comprised by SEQ ID NO: 30, and light chain CDRs having SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:28, as comprised by SEQ ID NO: 32. *****Continued in the extra sheet*****	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 13-18/(1-3), 24-27, limited to an antibody comprises heavy chain CDRs having SEQ ID NOs:18, 20, and 22, including SEQ ID NO: 30, and light chain CDRs having SEQ ID NOs:24, 26, and 28, including SEQ ID NO: 32.
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/24198

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHOU et al. Angiotensin II Induces Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1 Release via Calcineurin Signaling Pathway in Pregnancy. <i>Circ Res.</i> 2007, Vol. 100(1), p. 88-95. Epub 2006 Dec 7. pg 88, col 2, top para; and pg 89, col 1, para 2	1-3, 13-18/(1-3), 24-27
A	BELGORE et al. Measurement of free and complexed soluble vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, in fluid samples: development and application of two new immunoassays. <i>Clin Sci (Lond)</i> . 2001, Vol. 100(5), p. 567-75. Entire documentation especially Abstract	1-3, 13-18/(1-3), 24-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 12/24198

Continuation of:  
Box No III (unity of invention is lacking)

(Continuation of Group I+) Applicant is invited to elect an antibody that competes with the antibody in the first named invention (claims 7-9), or/and an additional set of SEQ ID NOs such as SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 (claims 4-6, 28-31), representing heavy chain and light chain CDRs1-3 and associated heavy chain and light chain, respectively, for a second antibody, or an antibody that competes with the second antibody (claims 10-12), or/and a specified SEQ ID NO(s) for CDR(s) comprising (a) specified amino acid substitution(s) at (a) specified position(s), or/and the method further comprising steps of (a) to (c) as indicated in claim 19 (claims 19-20), to be searched by paying additional fee for each election. The exact extra number of additional claims and the scope of each claim will be searched will depend upon the election.

Note: Claims 4-12, 19-20, 28-31 are excluded from the search because they require a search of nonelected sequences.

Group II, claims 21-23, drawn to a method of treating or preventing a pregnancy-related hypertensive disorder in a subject comprising providing ex vivo to the subject an anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof, wherein the anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof, depletes at least 70%, or at least 80%, or at least 90%, or at least 95%, or at least 99% of sFlt-1 from human plasma in an in vitro analysis.

Group III+, claims 34, 40-49, drawn to a system comprising: (a) anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof, wherein the anti-sFlt-1 antibody or sFlt-1 binding fragment thereof depletes at least 70%, or at least 80%, or at least 90%, or at least 95%, or at least 99% of sFlt-1 from human plasma in an in vitro analysis, when the antibody is attached to a solid support, and the antibody:sFlt-1 molar ratio is 50; (b) first means for conveying blood or a component thereof from a subject to the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof, bound to the solid support so as to contact the blood or a component thereof with the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof, and thereby remove sFlt-1 from the blood or a component thereof; and (c) second means for conveying the blood or a component thereof to the subject following contact of the blood or a component thereof with the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof, or a column containing anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof, bound to a solid support, wherein the anti-sFlt-1 antibodies or sFlt-1 binding fragments thereof deplete at least 70%, or at least 80%, or at least 90%, or at least 95%, or at least 99% of sFlt-1 from human plasma in an in vitro analysis, when the antibody is attached to a solid support, and the antibody:sFlt-1 molar ratio is 50. The first named invention (claims 34, 40, 49) is limited to wherein the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof, bind to one or more of domains 1-3 of human sFlt-1. Note: if the first named invention in Group III+ is elected, claims 41-45 will also be searched based on the antibody comprising heavy chain CDRs having SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, and SEQ ID NO:22, and light chain CDRs having SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:28 as in the first name invention of Group I+. Applicant is invited to elect an additional set of SEQ ID NOs such as SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 (claims 45-48), representing heavy chain and light chain CDRs1-3 and associated heavy chain and light chain, respectively, or a specified SEQ ID NO(s) for CDR(s) comprising (a) specified amino acid substitution(s) at (a) specified position(s), to be searched by paying additional fee for each election. Note: In the cases that claims 4-6, 28-31 are elected for Group I+, claims 45-48 will also be searched based on the same scope for each SEQ ID NO if the first named invention of Group III+ is elected. The exact extra number of additional claims and the scope of each claim will be searched will depend upon the election.

The inventions listed as Groups I+-III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I+ do not include the inventive concept of anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof, depletes at least 70%, or at least 80%, or at least 90%, or at least 95%, or at least 99% of sFlt-1 from human plasma in an in vitro analysis, as required by Groups II and III+.

Groups III+ do not include the inventive concept of a method of treating or preventing a pregnancy-related hypertensive disorder in a subject comprising providing ex vivo to the subject an anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof, as required by Groups I+ and II.

Group II does not include the inventive concept of an anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof, which comprises heavy chain CDRs and light chain CDRs with specified SEQ ID NOs, as required by Group I+.

Furthermore, among Groups I+ or III+, an antibody comprising heavy chain CDRs having SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, and SEQ ID NO:22 and light chain CDRs having SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:28, is structurally different from an antibody comprising heavy chain CDRs having SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:6 and light chain CDRs having SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 10, and SEQ ID NO:12 in CDR regions. Therefore, the antibodies are functionally different from each other including binding specificity to different epitopes or binding affinities to the same epitope. Furthermore, antibodies that compete with the antibody comprising CDRs with disclosed SEQ ID NOs, are read as different antibodies having different structures. In addition, each set of CDR regions with (an) amino acid substitution(s), will further alter the antibody structure in variable regions and influence the antibody binding specificity and affinity to the specified antigen, without specifying the position(s) for amino acid substitution(s), the resulting antibody is unpredictable.

The inventions of Groups I+ through II share the technical feature of a method of treating or preventing a pregnancy-related hypertensive disorder in a subject comprising providing ex vivo to the subject an anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof; the Group I+ and the claims 41-48 of Group III+ further share the technical feature of an anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof, which comprises heavy chain CDRs and light chain CDRs. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2009/0286271 A1 to KARUMANCHI et al. (hereinafter "Karumanchi") as follows:

\*\*\*\*\*Continued in the next extra sheet\*\*\*\*\*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 12/24198

Continuation of:  
The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

Karumanchi discloses a method of treating or preventing a pregnancy-related hypertensive disorder in a subject (Abstract - 'methods for treating a pregnancy related hypertensive disorder, such as pre-eclampsia and eclampsia, using combinations of compounds that alter ...sFlt-1 expression levels') comprising

— providing ex vivo to the subject an anti-sFlt-1 antibody, or sFlt-1 binding fragment thereof (para [0014] - 'a compound capable of decreasing sFlt-1 expression levels or biological activity include a compound capable of specifically binding to sFlt-1, such as a purified sFlt-1 antibody or an sFlt-1 antigen-binding fragment'; para [0096] - 'administration ... to the patient ... by an ex vivo approach, to a patient suffering from pre-eclampsia'; para [0211] - 'a combination of antibodies against... sFlt-1 may be used ... in an ex vivo approach (e.g., using a column that is lined with anti-... sFlt-1 and circulating the patient's blood through the column'; para [0213] - 'using an ex vivo approach during pregnancy for the treatment or prevention of pre-eclampsia or eclampsia or after pregnancy to treat post-partum pre-eclampsia or eclampsia'),

—which comprises heavy chain CDRs and light chain CDRs (para [0064] - 'the antibody will contain both the light chain as well as at least the variable domain of a heavy chain. ...The humanized antibody comprises ... a complementarity determining region (CDR); para [0065] - 'By "complementarity determining region (CDR)" is meant the three hypervariable sequences in the variable regions within each of the immunoglobulin light and heavy chains'). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of Groups II and III+ further share the technical feature of anti-sFlt-I antibodies, or sFlt-I binding fragments thereof, wherein the anti-sFlt-I antibody or sFlt-I binding fragment thereof depletes at least 70%, or at least 80%, or at least 90%, or at least 95%, or at least 99% of sFlt-I from human plasma in an in vitro analysis, when the antibody is attached to a solid support; and Group III+ further share the technical feature of a system/column comprising: anti-sFlt-I antibodies, or sFlt-I binding fragments thereof, wherein the anti-sFlt-I

antibody or sFlt-I binding fragment thereof depletes at least 70%, or at least 80%, or at least 90% of sFlt-I from human plasma in an in vitro analysis, when the antibody is attached to a solid support, and the antibody:sFlt-I molar ratio is 50. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, Karumanchi further discloses a system (para [0211] - 'a column that is lined with anti-... sFlt-1', wherein the column and the circulation of patient plasma is the system see discussion that follows) comprising:

(a) anti-sFlt-I antibodies, or sFlt-I binding fragments thereof, wherein the anti-sFlt-I antibody or sFlt-I binding fragment thereof depletes at least 70%, or at least 80%, or at least 90% of sFlt-I from human plasma in an in vitro analysis, when the antibody is attached to a solid support (para [0211] - 'antibodies against... sFlt-1 may be used ... in an ex vivo approach (e.g., using a column that is lined with anti-... sFlt-1 and circulating the patient's blood through the column', wherein 'a column that is lined with anti-... sFlt-1' is 'the antibody is attached to a solid support', and 'using a column that is lined with anti-... sFlt-1 and circulating the patient's blood through the column' is for depleting 'sFlt-I from human plasma in an in vitro analysis'; para [0012] - 'Preferred compounds will decrease ... sFlt-1 expression levels or biological activity by at least ... 70%, 80%, 90%, or more', which includes ex vivo or in vitro depleting sFlt-1 level; para [0014] - 'a compound capable of decreasing sFlt-1... levels ... such as a purified sFlt-1 antibody or an sFlt-1 antigen-binding fragment'; para [0211] - 'antibodies against... sFlt-1 may be used ... in an ex vivo approach'; Please also see ZHOU et al.: pg 89, col 1, para 2 ? 'To deplete sFlt-1 from CM, CM was first incubated with monoclonal anti-sFlt-1 antibody (1:250 dilution)'; pg 88, col 2, top para - 'conditioned medium (CM) from human placental explants obtained from uncomplicated pregnancies')

(b) first means for conveying blood or a component thereof from a subject to the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-I binding fragments thereof, bound to the solid support so as to contact the blood or a component thereof with the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof, and thereby remove sFlt-1 from the blood or a component thereof (para [0211] - 'antibodies against... sFlt-1 may be used ... in an ex vivo approach (e.g., using a column that is lined with anti-... sFlt-1 and circulating the patient's blood through the column', wherein 'using a column that is lined with anti-... sFlt-1 and circulating the patient's blood through the column' is 'for conveying blood or a component thereof from a subject to the anti-sFlt-1 antibodies, ... bound to the solid support so as to contact the blood or a component thereof with the anti-sFlt-1 antibodies, ...and thereby remove sFlt-1 from the blood or a component thereof, as discussed in (a)); and

(c) second means for conveying the blood or a component thereof to the subject following contact of the blood or a component thereof with the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof (para [0211] - 'antibodies against... sFlt-1 may be used ... in an ex vivo approach (e.g., using a column that is lined with anti-... sFlt-1 and circulating the patient's blood through the column', wherein 'circulating the patient's blood through the column' is 'conveying the blood or a component thereof to the subject following contact of the blood or a component thereof with the anti-sFlt-1 antibodies, or sFlt-1 binding fragments thereof'). Although Karumanchi does not specifically teach the antibody:sFlt-1 ratio is 50, one of ordinary skill in the art at the time the invention was made would have known to use sufficient amount of antibody to deplete sFlt-1 including using 50X of extra volume of antibody to sFlt-1 to obtain a desired effect, especially Karumanchi teaches using the system for depleting at least 90% of sFlt-I from human plasma (para [0012], [0014], [0211]). Please Note: higher affinity of an antibody to sFlt-1, the lower ratio of antibody:sFlt-1 is required for achieving the same result. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

\*\*\*\*\*Continued in the next extra sheet\*\*\*\*\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/24198

## Continuation of:

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

Furthermore, claim 24 in Group I+ and claim 41 in Group III+ further share the technical feature of an anti-sFlt-1 antibody which comprises one or more heavy chain CDRs having sequences that are substantially identical to SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, and SEQ ID NO:22 and one or more light chain CDRs that are substantially identical to SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:28; and claim 28 in Group I+ and claim 45 in Group III+ further share the technical feature of an anti-sFlt-1 antibody which comprises one or more heavy chain CDRs having sequences that are substantially identical to SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:6 and one or more light chain CDRs that are substantially identical to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:12. However, without specifying amino acid(s) for substitution at specified site(s), the resulted substitution sequences will share little homologies when substituting different numbers of amino acids in the different position of the sequence. Specifically, US 2007/0231333 A1 to BOGHAERT et al. discloses an anti-5T4 antibody heavy chain (para [0015] - 'an anti-5T4 antibody can comprise....(b) a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence derived from residues 19-135 of SEQ ID NO:6'), which comprises a region between amino acid residues 26-35 (CDR1 region), that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 18 (heavy chain CDR1), and a region between amino acid residues 65-84 that is 95% identical to the claimed SEQ ID NO: 20 (heavy chain CDR2), the antibody is specific to a different antigen - 5T4 (Abstract; para [0006] - 'The 5T4 oncofetal antigen is a 72 kDa highly glycosylated transmembrane glycoprotein'). Furthermore, US 2003/0086924 A1 to Sliwkowski discloses an antibody light chain sequence (para [0036] - 'the amino acid sequences of the variable light (V.sub.L) ... of murine monoclonal antibody 2C4 ...SEQ ID Nos. 1'), which comprises a region between amino acid residues 46-56, that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 26, but the antibody is specifically binds to ErbB receptor (para [0015] - 'the antibody used for therapy herein blocks ligand activation of an ErbB receptor and/or has a biological characteristic of monoclonal antibody 2C4'). Moreover, UniProt accession number A2N1N1 (hereinafter 'UniProt\_A2N1N1'; B cell antigen receptor, Last modified: 27 February 2007 [online]. [Retrieved on 2012.04.19]. Retrieved from the Internet: <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/A2N1N1>>) discloses an B cell antigen receptor comprising a region between amino acid residues 114-122 (Protein Name; Sequences; Signal peptide: 1-19; Chain: 20-134), which is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 28 (CDR3 of light chain). Since an antibody comprising the same CDR region with different combination of other CDR regions, can bind to different antigens, without specified specific amino acid(s) for substitution(s) at specific site(s) for each CDR, the binding specificity of the resulting antibodies are unpredictable. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+-III+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note re Item 4: Claims 32-33, 35-39 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

Note: Claims 11 and 12, each is assumed to depend upon claim 10, because of SEQ ID NO: 14 comprising SEQ ID NOs: 2, 4, 6; and SEQ ID NO: 16 comprising SEQ ID NOs: 8, 10, 12 (Specification: para [0051] - Table 1)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	39/395		D
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/12		
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/02</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53		N
			C 1 2 N	15/00		C

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

(72) 発明者 ポール・クシー  
 アメリカ合衆国・ニューヨーク・10013・ニュー・ヨーク・ハドソン・ストリート・16

(72) 発明者 ウー・エス・ジョー  
 アメリカ合衆国・ニューヨーク・10128・ニュー・ヨーク・イースト・ナインティーシックス  
 ス・ストリート・115

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 DA02 GA05 HA15  
 4B029 AA07 BB17 CC13 FA12  
 4B064 AG27 CA20 DA01 DA13  
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 DD61 EE01  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	用于治疗或预防妊娠相关的高血压病的方法和系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014511375A</a>	公开(公告)日	2014-05-15
申请号	JP2013552737	申请日	2012-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	阿迦民制药有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Agamin制药有限责任公司		
[标]发明人	ポールクシー ウーエスジョー		
发明人	ポール・クシー ウー・エス・ジョー		
IPC分类号	A61K39/395 C07K16/18 C12P21/08 C12M1/34 C07K16/46 A61P9/12 G01N33/53 C12N15/02		
CPC分类号	A61M1/3486 A61P9/12 C07K14/71 C07K16/2863 C07K2317/24 C07K2317/41 C07K2317/52 C07K2317/71 C07K2317/734 C07K2317/92 A61M1/34		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.N C07K16/18 C12P21/08 C12M1/34.F C07K16/46 A61K39/395.D A61P9/12 G01N33/53.N C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/CC13 4B029/FA12 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/DD61 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	61/440169 2011-02-07 US		
其他公开文献	JP6169495B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了使用与固体支持物结合的抗sFlt-1受体 ( sFlt-1 ) 抗体进行离体治疗以降低血液水平的方法和装置，用于治疗妊娠相关的高血压病，例如先兆子痫和子痫。 sFlt-1。进一步公开了抗-sFlt-1抗体的重链和轻链CDR的序列。

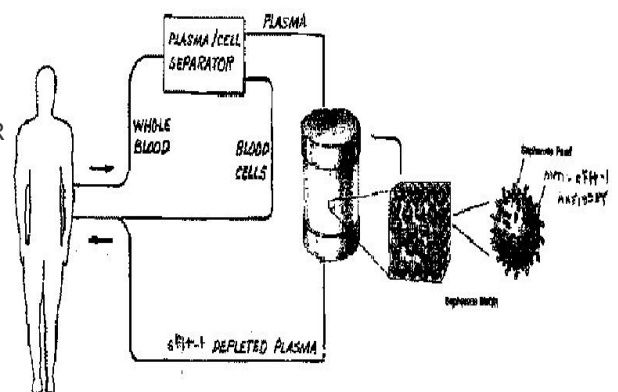


Fig. 1