

(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2015-525870

(P2015-525870A)

(43) 公表日 平成27年9月7日(2015.9.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	Z

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2015-519020 (P2015-519020)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年6月24日 (2013.6.24)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月13日 (2015.1.13)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/063115		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02014/001244		T
(87) 国際公開日	平成26年1月3日 (2014.1.3)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	12173886.8		グレンツァーヘルストラッセ124
(32) 優先日	平成24年6月27日 (2012.6.27)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	12183508.6	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成24年9月7日 (2012.9.7)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特定期間以内の妊娠高血圧腎症発症を除外するために s F l t - 1 / P I G F比またはエンドグリン / P I G F比を適用する手段および方法

(57) 【要約】

本発明は、妊娠高血圧腎症の出生前診断のための診断アッセイの分野に関する。特に、本発明は妊娠対象が短い時間ウインドウ以内に妊娠高血圧腎症のリスクをもたないかどうかを診断するための、下記を含む方法に関する：a) その対象の試料中の s F l t - 1、エンドグリンおよび P I G F からなる群から選択される少なくとも 1 種類の血管形成バイオマーカーの量を決定する；そして b) その量を基準と比較し、それにより、s F l t - 1 およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、また P I G F の場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約 98% の陰性的中率で診断を行なうことができる。さらに、その方法を実施するためのデバイスおよびキットが考慮される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

妊娠対象が短い時間ウインドウ以内に妊娠高血圧腎症のリスクをもたないかどうかを診断するための、下記を含む方法：

a) その対象の試料中の s F l t - 1、エンドグリンおよび P l G F からなる群から選択される少なくとも 1 種類の血管形成バイオマーカの量を決定する；そして

b) その量を基準と比較し、それにより、s F l t - 1 およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、また P l G F の場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約 98% の陰性的中率で診断を行なうことができる。

10

【請求項 2】

その方法が、段階 a) において対象の試料中の s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の量を決定し、段階 b) においてその比の値を基準値と比較し、それにより、その比の値が基準値と比較して等しいかまたは低ければ対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

その方法が、段階 b) の前に、段階 a) において決定した s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の量から比を計算するさらなる段階を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

基準値が約 46 以下、好ましくは約 33 である、請求項 2 または 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

基準値が約 38 以下、好ましくは約 38 である、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

短期間が約 1 週間から約 2 週間までの期間である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

妊娠対象が妊娠の約 20 週目 ~ 約 40 週目である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

試料が血液、血漿、血清または尿の試料である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

その方法がさらに、診断に基づいて患者管理措置を推奨することを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

患者管理措置は、(i) 対象が妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断されなければ下記の措置の群から選択され：緊密なモニタリング、入院、降圧薬の投与、および生活様式推奨事項、(i i) 対象が妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断されれば外来通院モニタリングである、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するための、妊娠対象の試料中の少なくとも 1 種類のバイオマーカ s F l t - 1、エンドグリンおよび P l G F、またはそれに特異的に結合する少なくとも 1 種類のその検出剤の使用。

【請求項 12】

対象が、異常なドップラー超音波診断結果に基づいて妊娠高血圧腎症、子癇および / または H E L L P 症候群を発症するリスクをもつと同定されている、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法または請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

50

請求項 1 ~ 10 または 12 のいずれか 1 項に記載の方法を実施することにより妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するために適合させた、下記のものを含むデバイス：

a) s F l t - 1、エンドグリンおよび P l G F からなる群から選択される少なくとも 1 種類の血管形成バイオマーカーに特異的に結合する少なくとも 1 種類の検出剤を含む分析ユニットであって、妊娠対象の試料中の s F l t - 1、エンドグリンおよび / または P l G F の量を決定するために適合させたユニット；ならびに

b) 下記のためのアルゴリズムを実装したデータプロセッサを含む評価ユニット：前記の量を基準と比較し、それにより、s F l t - 1 およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、また P l G F の場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約 98% の陰性的中率で診断を行なうことができる。

【請求項 14】

分析ユニットが、対象の試料中のバイオマーカー s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の量を決定するための検出剤を含み、評価ユニットに実装されたアルゴリズムが s F l t - 1 またはエンドグリンと P l G F の量の比の値を基準値と比較し、それにより、その比の値が基準値と比較して等しいかまたは低ければ対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断する、請求項 13 に記載のデバイス。

【請求項 15】

評価ユニットに実装されたアルゴリズムが、さらに s F l t - 1 またはエンドグリンと P l G F の量の比を計算する、請求項 13 または 14 に記載のデバイス。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 10 または 12 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するために適合させたキットであって、s F l t - 1、エンドグリンおよび P l G F からなる群から選択される血管形成バイオマーカーの量を決定するための少なくとも 1 種類の検出剤、ならびにその方法を実施するための指示を含むキット。

【請求項 17】

キットが妊娠対象の試料中の s F l t - 1 および / またはエンドグリンの量を決定するための検出剤ならびに P l G F の量を決定するための検出剤を含む、請求項 16 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、妊娠高血圧腎症の出生前診断のための診断アッセイの分野に関する。特に、本発明は妊娠対象が短い時間ウィンドウ以内に妊娠高血圧腎症のリスクをもたないかどうかを診断するための、下記を含む方法に関する：a) その対象の試料中の s F l t - 1、エンドグリン (Endoglin) および P l G F からなる群から選択される少なくとも 1 種類の血管形成バイオマーカーの量を決定する；そして b) その量を基準と比較し、それにより、s F l t - 1 およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、また P l G F の場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約 98% の陰性的中率 (negative predictive value) で診断を行なうことができる。さらに、その方法を実施するためのデバイスおよびキットが考慮される。

【背景技術】

【0002】

妊娠はさまざまな形で合併症を伴う可能性があり、それは一方では妊婦の妊娠関連死亡に関連し、他方では新生児の罹病率および死亡率の増大にも関連する。母体死亡は 100.000 例の出生当たり 14, 5 例の割合であり、39 歳を超える妊婦ではより高頻度であり、出血、血栓性肺塞栓症、感染症、筋障害、ならびに心血管状態および非 - 心血管状態により起きる可能性があり、また高血圧性障害により起きる可能性もあり、そのう

10

20

30

40

50

ち妊娠高血圧腎症が最も高頻度である(Berg 2010, Obstetrics and Gynecology: 116: 1302 - 1309)。

【0003】

妊娠高血圧腎症は妊娠全体の約2～8パーセントで合併し、世界的に母体および胎児の死亡に対する主な原因である(Duley 2009, Semin Perinatol: 33: 130-37)。妊娠高血圧腎症は、一般に、妊娠20週目以後に発症する妊娠関連または妊娠誘発性の高血圧症およびタンパク尿症と定義される。これに関して、高血圧症は2回の独立した測定における140 mmHg (収縮期) および/または90 mmHg (拡張期) 以上の血圧と定義され、その際、これらの2回の測定は少なくとも6時間空けて行なわれたものである。タンパク尿症は、24時間の尿試料における300 mg 以上のタンパク質を指標とする。しかし、妊娠高血圧腎症の定義は論争中であり、学会間で異なる可能性がある。詳細は標準医学書および各種臨床学会のガイドライン中にも見られる；たとえば、ACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists, no.: 33, January 2002、またはLeitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen of the Deutschen Gesellschaft fuer Gynaekologie und Geburtshilfe e.V., August 2008、NICE Clinical Guideline Hypertension in pregnancy: the management of hypertensive disorders during pregnancy, August 2010 (revised reprint January 2011)。

10

【0004】

妊娠高血圧腎症の病因はほとんど分かっていない。しかし、それはらせん動脈のリモデリングの欠陥に関連する胎盤機能障害により引き起こされると考えられる。妊娠高血圧腎症の発症過程で起きる血流異常が虚血を随伴し、その結果、最終的に抗血管形成因子、たとえばsFlt-1およびエンドグリンが循環中へ放出される。

20

【0005】

現在までの妊娠高血圧腎症の唯一の治療法は、早期の経膈分娩または帝王切開分娩のいずれかによる妊娠終止である。前記のように、妊娠34週目以前の妊娠高血圧腎症の症例では母体のリスクおよび胎児生存率が著しく損なわれる。したがって、出産を遅らせて、それにより新生児の生存率を向上させる試みを行なうべきである。

【0006】

妊娠高血圧腎症の早期かつ信頼性のある診断、特に妊娠20～40週目という早い時期に起きる妊娠高血圧腎症の除外(rule-out)は、この疾患を臨床管理するために決定的に重要である。妊娠高血圧腎症に罹患している妊婦が緊密なモニタリング、支持療法措置など特別なケアを必要とし、重篤な妊娠高血圧腎症に進行する症例では母体-胎児集中治療室(maternal fetal intensive care unit) (MFICU)を備えた専門病院への入院が必要であることは理解されるであろう。特に、早発性妊娠高血圧腎症は、重篤な副作用およびそれに付随する有害な転帰からみて、臨床医にとって難題である。さらに、妊娠高血圧腎症の早期かつ信頼性のある診断および妊娠高血圧腎症の予測は、予防介入または治療介入の試験を計画するために決定的に重要である(Ohkuchi 2011, Hypertension 58: 859-866)。他方で、特定の時間ウィンドウ以内における妊娠高血圧腎症の高リスクを除外できるリスクグループに属する患者は、特別なケアの必要性がより低いはずであり、大部分は外来通院(ambulant, out patient setting)で治療できる場合が多い。

30

40

【0007】

異常な子宮血流を伴う患者を同定するためにドップラー超音波診断が適用されており、ドップラー超音波診断により同定された異常な血流を示す患者は妊娠高血圧腎症、子癩および/またはHELLP症候群を発症するリスクをもつことが示唆された(Stepan 2007, Hypertension, 49: 818-824; Stepan 2008, Am J Obstet Gynecol 198: 175.e1-1)。しかし、ドップラー超音波診断の欠点は、実施および結果の評価のために高度の専門医が必要とされることである。

【0008】

最近になって、血管形成因子および抗血管形成因子が妊娠高血圧腎症の指標であることが示唆された。特に、胎盤増殖因子(Placenta growth factor) (PLGF)、エンドグリン

50

ン、および可溶性 f s m 様チロシンキナーゼ 1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) (s F l t - 1) は妊娠高血圧腎症に罹患している患者において変化していることが報告された。健康な個体および妊娠高血圧腎症に罹患している患者または妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもつ患者における個々の因子およびそれらの変化のレポート(たとえば、下記を参照: Rana 2007, Hypertension 50: 137-142; WO2004/008946)のほかに、s F l t - 1 と P l G F の比またはエンドグリンと P l G F の比が診断または予後のパラメーターとして報告された(参照: Young 2010, J Matern Fetal Neonatal Med 23(5): 366-370; Hagmann 2012, Clinical Chemistry 58(5): 1-9)。

【 0 0 0 9 】

s F l t - 1 と P l G F の単一の比が妊娠初期の妊娠高血圧腎症に対する予後の確定(rule-in)因子として報告された(Crispi 2008, Ultrasound Obstet Gynecol 31: 303-309)。さらに、異なる妊娠時点における個々の s F l t - 1 と P l G F の比が、妊娠高血圧腎症のリスクと個々に相関していた(DeVivo 2008, Acta Obstetrica et Gynecologica 87: 837-842; Ohkuchi 2011, 前掲; Kusanovic 2009, J of Maternal- Fetal and Neonatal Medicine 22(11): 1021-1038, Chaiworapongsa 2011, J Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 24(10): 1187-1207; Benton 2011, American Journal of Obstetrics & Gynecology 205: 1.e1)。さらに、それらの変化度が妊娠高血圧腎症の予後(Kusanovic 2009, 前掲)、または切迫分娩のリスク(Verlohren 2012, American Journal of Obstetrics & Gynecology 206(1): 58.e1-58.e8)に関して調査された。

【 0 0 1 0 】

しかし、以上の先行技術は主に切迫妊娠高血圧腎症の確定診断またはその予測に関する。特定の時間ウィンドウ以内における切迫妊娠高血圧腎症の除外に関して分かっていることはより少ない。s F l t - 1 と P l G F の特定の比に基づいて患者の受診日の切迫妊娠高血圧腎症を除外できることを示唆するかなり概括的なレポートはある(Stepan 2010, Z Geburtsh Neonatol 214: 234-238)。

【 0 0 1 1 】

しかし、見掛け上は健康な妊婦において特定期間以内の妊娠高血圧腎症を除外するための信頼性のあるアッセイ法はまだ得られていないが、それにもかかわらず強く要望されている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 2 】

【 特許文献 1 】 WO2004/008946

【 非特許文献 】

【 0 0 1 3 】

【 非特許文献 1 】 Berg 2010, Obstetrics and Gynecology: 116: 1302 - 1309

【 非特許文献 2 】 Duley 2009, Semin Perinatol: 33: 130-37)

【 非特許文献 3 】 ACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists, no.: 33, January 2002

【 非特許文献 4 】 Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen of the Deutschen Gesellschaft fuer Gynaekologie und Geburtshilfe e.V., August 2008

【 非特許文献 5 】 NICE Clinical Guideline Hypertension in pregnancy: the management of hypertensive disorders during pregnancy, August 2010 (revised reprint January 2011)

【 非特許文献 6 】 Ohkuchi 2011, Hypertension 58: 859-866

【 非特許文献 7 】 Stepan 2007, Hypertension, 49: 818-824

【 非特許文献 8 】 Stepan 2008, Am J Obstet Gynecol 198: 175.e1-1

【 非特許文献 9 】 Rana 2007, Hypertension 50: 137-142

【 非特許文献 1 0 】 Young 2010, J Matern Fetal Neonatal Med 23(5): 366-370

【 非特許文献 1 1 】 Hagmann 2012, Clinical Chemistry 58(5): 1-9

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 2】Crispi 2008, Ultrasound Obstet Gynecol 31: 303-309
- 【非特許文献 1 3】DeVivo 2008, Acta Obstetrica et Gynecologica 87: 837-842
- 【非特許文献 1 4】Kusanovic 2009, J of Maternal- Fetal and Neonatal Medicine 22(11): 1021-1038
- 【非特許文献 1 5】Chaiworapongsa 2011, J Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 24(10): 1187-1207
- 【非特許文献 1 6】Benton 2011, American Journal of Obstetrics & Gynecology 205: 1.e1
- 【非特許文献 1 7】Verlohren 2012, American Journal of Obstetrics & Gynecology 206(1): 58.e1-58.e8
- 【非特許文献 1 8】Stepan 2010, Z Geburtsh Neonatol 214: 234-238

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の基礎となる技術的課題は、上記のニーズに応じる手段および方法を提供することであるとみることができる。この技術的課題は、特許請求の範囲および以下に明らかにする態様により解決される。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、妊娠対象が短い時間ウインドウ以内に妊娠高血圧腎症のリスクをもたないかどうかを診断する（すなわち、妊娠高血圧腎症を除外する）ための、下記を含む方法に関する：

20

a) その対象の試料中の sFlt-1、エンドグリンおよび PLGF からなる群から選択される少なくとも 1 種類の血管形成バイオマーカーの量を決定する；そして

b) その量を基準と比較し、それにより、sFlt-1 およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、また PLGF の場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約 98% の陰性的中率で診断を行なうことができる。

【0016】

本発明の方法は、好ましくはエクスピボ法である。さらに、それは前記に明白に述べたものに追加した段階を含むことができる。たとえば、さらなる段階は試料の前処理または本方法により得られた結果の評価に関するものであってもよい。本方法は手動で実施でき、あるいは自動化により支援することができる。好ましくは、段階 (a) および / または (b) の全部または一部を自動化により支援することができる：たとえば、段階 (a) における決定に適したロボット装置およびセンサー装置、段階 (b) におけるデータ処理デバイス上のコンピューター実装 - 計算アルゴリズム、ならびに / あるいはデータ処理デバイス上の比較および / または診断アルゴリズム。

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1 A】図 1 は、種々の妊娠週における sFlt-1 / PLGF の比を示す。中空の丸は試料を採取した（来院）後 1 週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が判定されなかった例、灰色の丸は妊娠高血圧腎症（PE）を伴った例を表わす。（A）n = 94；46 のカットオフより下で PE 症例は検出されなかった；（B）n = 269；38 のカットオフより下で、わずかな PE 症例が検出されたにすぎない。

40

【図 1 B】図 1 は、種々の妊娠週における sFlt-1 / PLGF の比を示す。中空の丸は試料を採取した（来院）後 1 週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が判定されなかった例、灰色の丸は妊娠高血圧腎症（PE）を伴った例を表わす。（A）n = 94；46 のカットオフより下で PE 症例は検出されなかった；（B）n = 269；38 のカットオフより下で、わずかな PE 症例が検出されたにすぎない。

【図 2 A】図 2 は、種々の妊娠週における sFlt-1 / PLGF の比を示す。中空の丸

50

は試料を採取した（来院）後2週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が判定されなかった例を表わす。灰色の丸は妊娠高血圧腎症（PE）を伴った例を表わす。46のカットオフより下でPEの症例は検出されなかった。（A） $n = 94$ ；46のカットオフより下でPEの症例は検出されなかった；（B） $n = 269$ ；38のカットオフより下で、わずかなPEの症例が検出されたにすぎない。

【図2B】図2は、種々の妊娠週におけるsFlt-1/PlGFの比を示す。中空の丸は試料を採取した（来院）後2週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が判定されなかった例を表わす。灰色の丸は妊娠高血圧腎症（PE）を伴った例を表わす。46のカットオフより下でPEの症例は検出されなかった。（A） $n = 94$ ；46のカットオフより下でPEの症例は検出されなかった；（B） $n = 269$ ；38のカットオフより下で、わずかなPEの症例が検出されたにすぎない。

10

【図3A】図3（A）は、sFlt-1/PlGF比の二変量分布分析および妊娠高血圧腎症（PE）発症までの日数を示す；（B）（A）と同じであるが、より大きいコホートに関する。

【図3B】図3（A）は、sFlt-1/PlGF比の二変量分布分析および妊娠高血圧腎症（PE）発症までの日数を示す；（B）（A）と同じであるが、より大きいコホートに関する。

【図4A】図4（A）は、試料を採取した（来院）後1週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が発症しなかったものについてのROC曲線およびその統計分析を示す。1.0のAUC（曲線下面積）は完全な診断検査、0.5のAUCは無効なものと認定される。AUCについての信頼区間は、このデータに基づく推定の精度を反映する； $n = 94$ ；（B）（A）と同じであるが、 $n = 269$ 。

20

【図4B】図4（A）は、試料を採取した（来院）後1週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が発症しなかったものについてのROC曲線およびその統計分析を示す。1.0のAUC（曲線下面積）は完全な診断検査、0.5のAUCは無効なものと認定される。AUCについての信頼区間は、このデータに基づく推定の精度を反映する； $n = 94$ ；（B）（A）と同じであるが、 $n = 269$ 。

【図5A】図5（A）は、試料を採取した（来院）後2週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が発症しなかったものについてのROC曲線およびその統計分析を示す。1.0のAUC（曲線下面積）は完全な診断検査、0.5のAUCは無効なものと認定される。AUCについての信頼区間は、このデータに基づく推定の精度を反映する； $n = 94$ ；（B）（A）と同じであるが、 $n = 269$ 。

30

【図5B】図5（A）は、試料を採取した（来院）後2週間以内に妊娠高血圧腎症（PE）が発症しなかったものについてのROC曲線およびその統計分析を示す。1.0のAUC（曲線下面積）は完全な診断検査、0.5のAUCは無効なものと認定される。AUCについての信頼区間は、このデータに基づく推定の精度を反映する； $n = 94$ ；（B）（A）と同じであるが、 $n = 269$ 。

【図6A】図6は、sFlt-1/PlGF比（A）およびエンドグリン/PlGF比（B）を用いたボックスプロットグラフを示す；1週目のPEについて $n = 94$ 、4週目のPEについて $n = 88$ 。各グラフの左手側は異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者からの測定値（ $mPI-UtA > 95$ 、パーセントイル）を示し、右手側は正常な結果を伴う患者からの測定値を示す。さらに、測定値は、それぞれ1週間以内（左のグラフ）および4週間以内（右のグラフ）にPE/HELLPを発症した患者（赤ボックス）または発症しなかった患者（緑ボックス）について分けられる。これらのグラフは、sFlt-1/PlGF比およびエンドグリン/PlGF比が両方とも、特に異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者において、1週間以内および4週間以内の両方で、患者がPEを発症するか否かを予測する効力をもつことを示す。sFlt-1/PlGF比は、特に4週間以内のPE/HELLPの予測について、エンドグリン/PlGF比より正確に区別すると思われる。

40

【図6B】図6は、sFlt-1/PlGF比（A）およびエンドグリン/PlGF比（

50

B)を用いたボックスプロットグラフを示す；1週目のPEについて $n = 94$ 、4週目のPEについて $n = 88$ 。各グラフの左手側は異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者からの測定値($mPI - UtA > 95$ 、パーセントイル)を示し、右手側は正常な結果を伴う患者からの測定値を示す。さらに、測定値は、それぞれ1週間以内(左のグラフ)および4週間以内(右のグラフ)にPE/HELLPを発症した患者(赤ボックス)または発症しなかった患者(緑ボックス)について分けられる。これらのグラフは、 $sFlt - 1 / PlGF$ 比およびエンドグリン/ $PlGF$ 比が両方とも、特に異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者において、1週間以内および4週間以内の両方で、患者がPEを発症するか否かを予測する効力をもつことを示す。 $sFlt - 1 / PlGF$ 比は、特に4週間以内のPE/HELLPの予測について、エンドグリン/ $PlGF$ 比より正確に区別すると思われる。

10

【図7A】図7は、 $sFlt - 1 / PlGF$ 比を用いたボックスプロットグラフを示す(図示したボックスプロットグラフ, $n = 269$)。各グラフの左手側は異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者からの測定値($mPI - UtA > 95$ 、パーセントイル)を示し、右手側は正常な結果を伴う患者からの測定値を示す。さらに、測定値を、それぞれ1週間以内(A)、2週間以内(B)および4週間以内(C)にPE/HELLPを発症する患者または発症しない患者について分けてある。これらのグラフは、 $sFlt - 1 / PlGF$ が、特に異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者において、1週間以内、2週間以内および4週間以内ともに、患者がPEを発症するか否かを予測する効力をもつことを示す。

20

【図7B】図7は、 $sFlt - 1 / PlGF$ 比を用いたボックスプロットグラフを示す(図示したボックスプロットグラフ, $n = 269$)。各グラフの左手側は異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者からの測定値($mPI - UtA > 95$ 、パーセントイル)を示し、右手側は正常な結果を伴う患者からの測定値を示す。さらに、測定値を、それぞれ1週間以内(A)、2週間以内(B)および4週間以内(C)にPE/HELLPを発症する患者または発症しない患者について分けてある。これらのグラフは、 $sFlt - 1 / PlGF$ が、特に異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者において、1週間以内、2週間以内および4週間以内ともに、患者がPEを発症するか否かを予測する効力をもつことを示す。

【図7C】図7は、 $sFlt - 1 / PlGF$ 比を用いたボックスプロットグラフを示す(図示したボックスプロットグラフ, $n = 269$)。各グラフの左手側は異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者からの測定値($mPI - UtA > 95$ 、パーセントイル)を示し、右手側は正常な結果を伴う患者からの測定値を示す。さらに、測定値を、それぞれ1週間以内(A)、2週間以内(B)および4週間以内(C)にPE/HELLPを発症する患者または発症しない患者について分けてある。これらのグラフは、 $sFlt - 1 / PlGF$ が、特に異常なドップラー超音波診断結果を伴う患者において、1週間以内、2週間以内および4週間以内ともに、患者がPEを発症するか否かを予測する効力をもつことを示す。

30

【図8】図8：予後試験(500人の患者について)のために、4週間以内の妊娠高血圧腎症の $sFlt - 1 - PlGF$ 比に関するカットオフを決定し、それと共にこのカットオフの性能を判定した。オーバーフィッティングを避けるために、交差検定、すなわちモンテカルロ交差検定(Monte Carlo cross-validation)を適用した。このために、すべてのデータを2つの切り離れたサブセット(トレーニングセットとテストセット)に2:1の比で分割した。この分割の後、トレーニングセットについてモデルを決定し、テストセットについて予測を査定した。ランダムに選択したトレーニングセット-テストセット分割についてこの手順を1999回繰り返した。その結果、ボックスプロットにより反映される1999のカットオフをもつ、たとえば中央値が約38の1999の予測モデルが得られた。これは、1週間について妊娠高血圧腎症を除外するための大きなコホートにみられるものと同じカットオフである(実施例4)

40

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 1 8 】

本明細書中で用いる用語“妊娠高血圧腎症”は、高血圧症およびタンパク尿症を特徴とする病的状態を表わす。妊娠高血圧腎症は妊婦対象において起き、この高血圧症は妊娠誘発性高血圧症とも呼ばれる。好ましくは、妊娠誘発性高血圧症は、2回の血圧測定値が140 mmHg（収縮期）および/または90 mmHg（拡張期）以上であることにより対象に存在すると同定され、その際、これらの2回の測定は少なくとも6時間空けて行なわれたものである。タンパク尿症は、好ましくは24時間の尿試料における300 mg以上のタンパク質により存在すると同定される。妊娠高血圧腎症は、子癇、すなわち強直-間代発作または昏睡状態の出現を特徴とする致命的障害にまで進行する可能性がある。重篤な妊娠高血圧腎症に関連する症状は、24時間以内に500 ml未満の乏尿、脳障害または視覚障害、肺浮腫またはチアノーゼ、心窩部-または右上4分の1-疼痛、肝機能障害、血小板減少症、胎児成長制限である。肝併発を伴う妊娠高血圧腎症に罹患している対象は、さらにHELLP症候群を発症する可能性がある。したがって、本発明による妊娠高血圧腎症発症のリスクをもつ対象は、好ましくは潜在的にHELLP症候群を発症するリスクも伴う。HELLP症候群は、有害な転帰、たとえば胎盤剥離、腎不全、肝被膜下血腫、再発性妊娠高血圧腎症、早期産の高リスクに関連し、あるいは母体および/または胎児の死亡の高リスクにすら関連する。妊娠高血圧腎症および随伴症状、ならびに付随する疾患、たとえばHELLP症候群または子癇のさらなる詳細は、標準医学書または関連医学会のガイドライン中に見られる。詳細は、たとえばACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists, no.: 33, January 2002、またはLeitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen of the Deutschen Gesellschaft fuer Gynaekologie und Geburtshilfe e.V., August 2008, NICE Clinical Guideline Hypertension in pregnancy: the management of hypertensive disorders during pregnancy, August 2010 (revised reprint January 2011)中に見ることができる。妊娠高血圧腎症は最大で妊娠の10%において通常は第2または第3の3半期に起きる。しかし、若干の女性は妊娠20週目という早い時期に妊娠高血圧腎症を発症する。

10

20

【 0 0 1 9 】

妊娠20~34週目以内では妊娠高血圧腎症は早発性妊娠高血圧腎症とも呼ばれ、一方、妊娠34週目以後に起きる妊娠高血圧腎症は遅発性妊娠高血圧腎症とも呼ばれる。早発性妊娠高血圧腎症は、通常は比較的軽症である遅発性妊娠高血圧腎症と比較して、通常はより重篤な副作用および有害な転帰を伴うことは理解されるであろう。

30

【 0 0 2 0 】

“妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたない”という句は、妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもつ妊娠対象と比較して、または被験対象を含む集団内での妊娠高血圧腎症の罹患率と比較して、統計的に有意に高い可能性で、将来、予後時間ウィンドウ以内に妊娠高血圧腎症を発症しないであろう妊娠対象を表わす。

【 0 0 2 1 】

本明細書中で用いる用語“対象”は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに関する。本発明による対象は、妊娠対象、すなわち妊婦のはずである。好ましくは、本発明による対象は、顕性の妊娠高血圧腎症、子癇またはHELLP症候群を示していないはずである。好ましくは、本発明による対象は、異常な子宮血流を伴うと同定された対象であり、より好ましくは、既に他の診断法により妊娠高血圧腎症、子癇および/またはHELLP症候群を発症するリスクをもつと同定された対象である可能性がある。より好ましくは、対象は異常なドップラー超音波診断結果により妊娠高血圧腎症、子癇および/またはHELLP症候群を発症するリスクをもつと同定されている。好ましくは、ドップラー超音波診断は腹式(transabdominal)で実施されたものである(たとえば、Albaiges 2000, Obstet Gynecol 96: 559-564を参照)。特に、子宮動脈の拍動指数(pulsatility indices) (PI)を測定し、それらの両動脈についての平均(mPI - UtA)を計算し、正常な結果と異常な結果を区別できる閾値と比較することができる。

40

【 0 0 2 2 】

50

より好ましくは、本発明による妊娠対象は妊娠の約20～約40週目、好ましくは妊娠の約24～約40週目である。したがって、本発明の方法により除外すべき妊娠高血圧腎症は、試料を対象から採取した妊娠週に応じて早発性妊娠高血圧腎症または遅発性妊娠高血圧腎症の可能性がある。

【0023】

本発明の方法は、見掛け上は健康な妊娠対象のルーティンなスクリーニング法に使用できる。しかし、本発明により想定される妊娠対象は、より高い妊娠高血圧腎症罹患率をもつリスクグループに属する可能性もある。脂肪症、高血圧症、自己免疫疾患、たとえばエリテマトーデス、栓友病(thrombophilia)、または糖尿病に罹患している妊娠対象は、一般に妊娠高血圧腎症の発症率が高い。以前の妊娠で妊娠高血圧腎症、子癇および/またはHELLP症候群に罹患した対象についても同じことが言える。さらに、初めて妊娠した高年齢の女性も、妊娠高血圧腎症を発症する素因を実際に示す。しかし、妊娠高血圧腎症を発症する可能性は妊娠回数に伴って低くなる。

10

【0024】

本明細書中で用いる用語“診断する”は、対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを査定することを意味する。好ましくは、その短期間は、4週間未満、好ましくは約1～約2週間の期間である。当業者に理解されるように、そのような査定は通常は、診断すべき対象の100%について正確であることを意図するものではない。しかしこの用語は、その査定が本明細書中の他のいずれかの箇所に述べた陰性的中率で特定部分の対象(たとえば、コホート研究におけるコホート)について正確であることを要求する。将来、特定の時間ウィンドウ内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクまたは発症しないことは、偽陽性/陰性および真の陽性/陰性査定に関して検査の性能を記述する要約統計学(summary statistics)を用いる本発明方法のような検査により診断できる。高い陰性的中率は、診断検査によってなされた陰性査定における高い信頼度の指標となる。陰性的中率は、真の陰性結果を真の陰性結果と偽陰性結果の和(すなわち、その診断検査により決定したすべての陰性転帰)で割った数値として表わすことができる。原則として、陰性的中率は、診断検査の感度および特異度ならびに特定のコホートにおける疾患または状態の罹患率に応じて計算できる。具体的には、陰性的中率は $[(\text{特異度}) \times (1 - \text{罹患率})] / [(\text{特異度}) \times (1 - \text{罹患率}) + (1 - \text{感度}) \times (\text{罹患率})]$ である。罹患率予測値はコホート研究から得ることができ、これに対し症例対照研究では検査についての感度および/または特異度を得ることができ、特に、本発明の方法により確立された診断の陰性的中率は少なくとも約98%、より好ましくは少なくとも約99%、最も好ましくは100%となるはずである。統計学についてのさらなる詳細は、標準テキスト、たとえばDowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983に記載され、あるいは本明細書の他のいずれかの箇所に見られる。

20

30

【0025】

用語“試料”は、体液の試料、分離された細胞の試料、または組織もしくは臓器からの試料を表わす。体液の試料は周知の手法により得ることができ、好ましくは血液、血漿、血清または尿の試料、より好ましくは血液、血漿または血清の試料を含む。組織または臓器の試料は、いずれかの組織または臓器から、たとえば生検により得ることができる。分離された細胞は、体液または組織もしくは臓器から、遠心または細胞選別などの分離法により得ることができる。好ましくは、細胞、組織または臓器の試料は、本明細書中で述べるペプチドを発現または産生する細胞、組織または臓器から得られる。

40

【0026】

本明細書中で用いる用語“sFlt-1”は、可溶性形態のfms様チロシンキナーゼ1であるポリペプチドを表わす。このポリペプチドは、当技術分野で可溶性VEGF受容体1(sVEGF R1)とも呼ばれる(たとえば、下記を参照:Sunderji 2010, *Am J Obstet Gynecol* 202: 40e1-7)。それは、ヒト臍帯静脈内皮細胞の調整培地中で同定された。内因性sFlt1受容体は、クロマトグラフィー的および免疫学的に組換えヒトsFlt1に類似し、[125I]VEGFを同等な高い親和性で結合する。ヒトsFlt1

50

は、インビトロでKDR / Flk - 1の細胞外ドメインとVEGF安定化された複合体を形成することが示された。好ましくは、sFlt 1はKendall 1996, Biochem Biophys Res Commun 226(2): 324-328に記載されたヒトsFlt 1を表わす；アミノ酸配列については、たとえば下記も参照：ヒトsFlt 1についてはGenebank 寄託番号P17948, GI: 125361、およびマウスsFlt - 1についてはBAA24499.1, GI: 2809071 (GenebankはNCBI, USAから、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrezで入手できる)。この用語には、前記のヒトsFlt - 1ポリペプチドのバリエーションも含まれる。そのようなバリエーションは、前記のsFlt - 1ポリペプチドと少なくとも同じ本質的な生物学的および免疫学的特性をもつ。特に、本明細書中に述べる同じ特異的アッセイ法により、たとえばそのsFlt - 1ポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイによりそれらを検出できれば、それらは同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有する。さらに、本発明に従って述べるバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加のため異なるアミノ酸配列をもつはずであり、そのバリエーションのアミノ酸配列はなお、好ましくはそれぞれその特定のsFlt - 1ポリペプチドのアミノ酸配列と、好ましくはヒトsFlt - 1の全長にわたって、少なくとも約50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一であることを理解すべきである。2つのアミノ酸配列間の同一度は当技術分野で周知のアルゴリズムにより決定できる。好ましくは、同一度は最適状態でアラインさせた2つの配列を比較ウィンドウにわたって比較することにより決定すべきであり、その際、その比較ウィンドウ内のアミノ酸配列フラグメントは、最適アラインメントのために、基準配列（付加または欠失を含まないもの）と比較して付加または欠失（たとえば、ギャップまたはオーバーハング）を含むことができる。パーセントは、両配列中に同一アミノ酸残基が現われる位置の数を決定して一致位置の数を求め、その一致位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その算定結果に100を掛けて配列同一パーセントを求めることにより計算される。比較のための最適な配列アラインメントは、下記により実施できる：Smith 1981, Adv. Appl. Math. 2:482により示された局所相同アルゴリズム(local homology algorithm)、Needleman 1970, J. Mol. Biol. 48:443の相同アラインメントアルゴリズム(homology alignment algorithm)、Pearson 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444の類似性検索法(search for similarity method)、これらのアルゴリズムのコンピューター化実装 (GAP、BESTFIT、BLAST、FAST、PASTA、およびTFASTA；Wisconsin Genetics Software Package中、Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)、または目視検査。比較のための2つの配列が同定されると、好ましくはGAPおよびBESTFITを用いてそれらの最適アラインメントを決定し、こうして同一度を決定する。好ましくは、ギャップ重みにつき5.00、ギャップ重み長さにつき0.30のデフォルト値を用いる。前記のバリエーションは、対立遺伝子バリエーション、または他のいずれかの種特異的なホモログ(homolog)、パラログ(paralog)もしくはオルソログ(ortholog)であってもよい。前記のバリエーションは、対立遺伝子バリエーション、または他のいずれかの種特異的なホモログ、パラログもしくはオルソログであってもよい。さらに、本明細書中で述べるバリエーションには、特定のsFlt - 1ポリペプチドまたは前記タイプのバリエーションの、フラグメントまたはサブユニットが含まれる；ただし、これらのフラグメントが前記の本質的な免疫学的および生物学的特性をもつ限りにおいてである。そのようなフラグメントは、たとえばsFlt - 1ポリペプチドの分解生成物であってもよい。バリエーションは、本明細書中に述べる同じ特異的アッセイ法により、たとえばそのsFlt - 1ポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイによりそれらを検出できれば、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有するとみなされる。好ましいアッセイ法を、付随する実施例に記載する。さらに、翻訳後修飾、たとえばリン酸化またはミリスチル化のため異なるバリエーションが含まれる。sFlt - 1は、試料において結合形もしくは遊離形で、または総sFlt - 1量として検出される可能性がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

本明細書中で用いる用語“エンドグリン”は、非還元形態で180kDa、還元後形態で95kDa、その還元およびN-脱グリコシルされた形態で66kDaの分子量をもつポリペプチドを表わす。このポリペプチドは二量体を形成することができ、TGF-およびTGF-受容体に結合する。好ましくは、エンドグリンはヒト-エンドグリンを表わす。より好ましくは、ヒト-エンドグリンはGenebank寄託番号AAC63386.1, GI:3201489に示されるアミノ酸配列をもつ。2つのエンドグリンイソ型、S-エンドグリンおよびL-エンドグリンが記載されている。L-エンドグリンはアミノ酸47個の細胞質テイルを備えた合計633個のアミノ酸からなり、一方、S-エンドグリンはアミノ酸14個の細胞質テイルを備えた600個のアミノ酸からなる。好ましくは、本発明に用いるエンドグリンは可溶性エンドグリンである。本明細書中で述べる可溶性エンドグリンは、好ましくはEP1804836B1に記載されている。さらに、本発明に従って述べるバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加のため異なるアミノ酸配列をもつ可能性があり、そのバリエーションのアミノ酸配列はなお、好ましくはその特定のエンドグリンのアミノ酸配列と、少なくとも約50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一であることを理解すべきである。バリエーションは、対立遺伝子バリエーション、スプライスバリエーション、または他のいずれかの種特異的なホモログ、パラログもしくはオルソログであってもよい。さらに、本明細書中で述べるバリエーションには、特定のエンドグリンまたは前記タイプのバリエーションの、フラグメントが含まれる；ただし、これらのフラグメントが前記の本質的な免疫学的および生物学的特性をもつ限りにおいてである。そのようなフラグメントは、たとえばエンドグリンの分解生成物であってもよい。バリエーションは、本明細書中に述べる同じ特異的アッセイ法により、たとえばそのエンドグリンポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイによりそれらを検出できれば、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有するとみなされる。好ましいアッセイ法を、付随する実施例に記載する。さらに、翻訳後修飾、たとえばリン酸化またはミリスチル化のため異なるバリエーションが含まれる。エンドグリンは、試料において結合形もしくは遊離形で、または総エンドグリン量として検出される可能性がある。

10

20

30

【 0 0 2 8 】

本明細書中で用いる用語“PLGF(胎盤性増殖因子)”は胎盤由来の増殖因子を表わし、それは、アミノ酸149個の長さをもち、ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)の血小板由来増殖因子様領域に対して相同性が高いポリペプチドである。VEGFと同様に、PLGFはインビトロおよびインビボで血管形成活性をもつ。たとえば、トランスフェクションしたCOS-1細胞に由来するPLGFの生化学的および機能特性の解明により、それはインビトロで内皮細胞増殖を刺激することができるグリコシル化された二量体型の分泌タンパク質であることが明らかになった(Maqlione 1993, Oncogene 8(4): 925-31)。好ましくは、PLGFはヒトPLGF、より好ましくはGenebank寄託番号P49763, GI:17380553に示されるアミノ酸配列をもつヒトPLGFを表わす。この用語には、その特定のヒトPLGFのバリエーションが含まれる。そのようなバリエーションは、少なくともその特定のPLGFポリペプチドと同じ本質的な免疫学的および生物学的特性をもつ。バリエーションは、本明細書中に述べる同じ特異的アッセイ法により、たとえばそのPLGFポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイによりそれらを検出できれば、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有するとみなされる。好ましいアッセイ法を、付随する実施例に記載する。さらに、本発明に従って述べるバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加のため異なるアミノ酸配列をもつはずであり、そのバリエーションのアミノ酸配列はなお、好ましくはその特定のPLGFポリペプチドのアミノ酸配列と、少なくとも約50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一であることを理解すべきである。2つのアミノ酸配列間の

40

50

同一度は、当技術分野で周知である本明細書の他のいずれかの箇所に記載するアルゴリズムにより決定できる。前記のバリエーションは、対立遺伝子バリエーション、または他のいずれかの種特異的なホモログ、パラログもしくはオルソログであってもよい。さらに、本明細書中で述べるバリエーションには、特定の P L G F ポリペプチドまたは前記タイプのバリエーションの、フラグメントが含まれる；ただし、これらのフラグメントが前記の本質的な免疫学および生物学的特性をもつ限りにおいてである。そのようなフラグメントは、たとえば P L G F ポリペプチドの分解生成物またはスプライスバリエーションであってもよい。さらに、翻訳後修飾、たとえばリン酸化またはミリスチル化のため異なるバリエーションが含まれる。P L G F は、試料において結合形もしくは遊離形で、または総 P L G F 量として検出される可能性がある。

10

【0029】

本明細書中で述べるいずれかのペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、量または濃度を、好ましくは半定量的または定量的に測定することに関する。測定は直接または間接的に行なうことができる。直接測定は、ペプチドまたはポリペプチド自体から得られる信号であってその強度が試料中に存在するペプチドの分子数と直接相関する信号に基づいて、ペプチドまたはポリペプチドの量または濃度を測定することに関する。そのような信号 - 本明細書中で時には強度信号と呼ぶ - は、たとえばペプチドまたはポリペプチドの特定の物理的または化学的強度特性の強度値を測定することによって得ることができる。間接測定には、二次成分（すなわち、そのペプチドまたはポリペプチド自体ではない成分）または生物学的読出し系、たとえば測定可能な細胞応答、リガンド、標識、または酵素反応生成物から得られる信号を測定することが含まれる。

20

【0030】

本発明によれば、ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、試料中のペプチドの量を決定するためのあらゆる既知手段により達成できる。それらの手段には、標識分子を多様なサンドイッチ、競合その他のアッセイ様式で利用できるイムノアッセイのデバイスおよび方法が含まれる。それらのアッセイは、ペプチドまたはポリペプチドの存在または非存在の指標となる信号を発するであろう。さらに、信号強度を、好ましくは試料中に存在するポリペプチドの量に直接または間接的（たとえば、反比例）に相関させることができる。さらに他の適切な方法は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な物理的または化学的特性、たとえばその厳密な分子質量または N M R スペクトルを測定することを含む。それらの方法は、好ましくはバイオセンサー、イムノアッセイに連携した光学機器、バイオチップ、分析機器、たとえば質量分析計、N M R 分析器、またはクロマトグラフィー機器を含む。さらに、方法にはマイクロプレート E L I S A ベースの方法、全自動またはロボット式イムノアッセイ（たとえば、E l e c s y s（商標）分析器で得られる）、C B A（酵素コバルト結合アッセイ (enzymatic Cobalt Binding Assay)、たとえば R o c h e - H i t a c h i（商標）分析器で得られる）、およびラテックス凝集アッセイ（たとえば、R o c h e - H i t a c h i（商標）分析器で得られる）が含まれる。

30

【0031】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、下記の段階を含む：（a）その強度がペプチドまたはポリペプチドの量の指標となる細胞応答を誘発できる細胞を、適切な期間、そのペプチドまたはポリペプチドと接触させ、（b）細胞応答を測定する。細胞応答を測定するために、試料または処理済み試料を、好ましくは細胞培養物に添加し、細胞内または細胞外の応答を測定する。細胞応答には、測定可能なレポーター遺伝子発現、または物質、たとえばペプチド、ポリペプチドもしくは小分子の分泌を含めることができる。この発現または物質は、ペプチドまたはポリペプチドの量に相関する強度信号を発すべきである。

40

【0032】

同様に好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、試料中のペプチドまたはポリペプチドから得られる特異的な強度信号を測定する段階を含む。前記のように、そのような信号は、質量スペクトルにみられるペプチドもしくはポリペプチドに特異的な m

50

ノ z 変数で観察される信号強度、またはペプチドもしくはポリペプチドに特異的な NMR スペクトルであってもよい。

【0033】

ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、好ましくは下記の段階を含むことができる：(a) ペプチドを特異的リガンドと接触させ、(b) 好ましくは、結合していないリガンドを除去し、(c) 結合したリガンドの量を測定する。結合したリガンドは強度信号を発するであろう。本発明による結合には、共有結合および非共有結合の両方が含まれる。本発明によるリガンドは、本明細書に記載するペプチドまたはポリペプチドに結合するいずれかの化合物、たとえばペプチド、ポリペプチド、核酸、または小分子であってもよい。好ましいリガンドには、抗体、核酸、ペプチドまたはポリペプチド、たとえば前記のペプチドまたはポリペプチドおよびそのフラグメントに対する受容体または結合パートナー（該ペプチドに対する結合ドメインを含むもの）、ならびにアプタマー、たとえば核酸アプタマーまたはペプチドアプタマーが含まれる。そのようなリガンドを作成する方法は当技術分野で周知である。たとえば、適切な抗体またはアプタマーの同定および作成は供給業者によっても提供される。当業者は、そのようなリガンドの、より高い親和性または特異性を備えた誘導体を開発する方法に精通している。たとえば、核酸、ペプチドまたはポリペプチドにランダム変異を導入することができる。これらの誘導体を、次いで当技術分野で既知のスクリーニング法、たとえばファージディスプレイ法に従って、結合について試験することができる。本明細書中で述べる抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびにそのフラグメントであって抗原またはハプテンを結合できるもの、たとえば Fv、Fab および F(ab)₂ フラグメントが含まれる。本発明には、一本鎖抗体、および目的とする抗原特異性を示す非ヒト・ドナー抗体のアミノ酸配列をヒト・アクセプター抗体の配列と組み合わせたヒト化ハイブリッド抗体も含まれる。ドナー配列は通常は少なくともドナーの抗原結合性アミノ酸残基を含むであろうが、ドナー抗体の他の構造関連および/または機能関連アミノ酸残基も含むことができる。そのようなハイブリッドは、当技術分野で周知である幾つかの方法で作成できる。好ましくは、リガンドまたは作用剤は前記のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する。本発明による特異的結合は、リガンドまたは作用剤が、被検試料中に存在する他のペプチド、ポリペプチドまたは物質に実質的に結合（すなわち、それらと“交差反応”）すべきではないことを意味する。好ましくは、特異的に結合されるペプチドまたはポリペプチドは、他のいずれかの関連ペプチドまたはポリペプチドより少なくとも3倍高い、より好ましくは少なくとも10倍高い、よりさらに好ましくは少なくとも50倍高い親和性で結合されるべきである。非特異的結合は、たとえばウェスタンブロット上でのそのサイズに従って、または試料中での相対的に高いその存在量によって、それをなお明白に区別および測定できるならば、許容できる。リガンドの結合は、当技術分野で周知であるいずれかの方法により測定できる。好ましくは、その方法は半定量的または定量的である。ポリペプチドまたはペプチドの決定に適したさらに他の手法を以下に記載する。

【0034】

第1に、リガンドの結合は、直接的に、たとえばNMRまたは表面プラズモン共鳴により測定できる。第2に、リガンドが、目的とするペプチドまたはポリペプチドの酵素活性の基質としても作用するならば、酵素反応生成物を測定してもよい（たとえば、プロテアーゼの量は開裂した基質の量をたとえばウェスタンブロットで測定することにより測定できる）。あるいは、リガンド自体が酵素特性を示してもよく、その“リガンド/ペプチドまたはポリペプチド”複合体、すなわちそれぞれペプチドまたはポリペプチドが結合したリガンドを、強度信号の発生により検出できる適切な基質と接触させることができる。酵素反応生成物の測定のためには、好ましくは基質の量は飽和状態である。反応前に基質を検出可能な標識で標識化することもできる。好ましくは、適切な期間、試料を基質と接触させる。適切な期間は、検出可能な、好ましくは測定可能な量の生成物が生成するのに必要な時間を表わす。生成物の量を測定する代わりに、一定の（たとえば、検出可能な）量の生成物が出現するのに必要な時間を測定することができる。第3に、リガンドを検出お

10

20

30

40

50

よび測定できるようにする標識にリガンドを共有結合または非共有結合により結合させてもよい。標識化は、直接法または間接法により実施できる。直接標識化は、標識をリガンドに直接（共有結合または非共有結合により）結合させることを伴なう。間接標識化は、二次リガンドを一次リガンドに（共有結合または非共有結合により）結合させることを伴なう。二次リガンドは一次リガンドに特異的に結合すべきである。この二次リガンドは適切な標識と結合させることができ、および/または二次リガンドに結合する三次リガンドのターゲット（レセプター）であってもよい。二次、三次またはよりさらに高次のリガンドの使用は、信号を増強するためにしばしば採用される。適切な二次およびより高次のリガンドには、抗体、二次抗体、および周知のストレプトアビジン-ビオチン系（Vector Laboratories, Inc.）を含めることができる。リガンドまたは基質に、当技術分野で既知である1種類以上のタグで“タグ付け”することもできる。その際、そのようなタグはより高次のリガンドにとってのターゲットであってもよい。適切なタグには、ビオチン、ジゴキシゲニン、His-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、myc-タグ、インフルエンザAウイルス-ヘマグルチニン（HA）、マルトース結合タンパク質などが含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの場合、タグは好ましくはN末端および/またはC末端にある。適切な標識は、適切な検出法により検出できるいずれかの標識である。代表的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダン(acridan)エステル、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射性標識、磁性標識（“たとえば、磁性ビーズ”；常磁性および超常磁性標識を含む）、および蛍光標識が含まれる。酵素活性標識には、たとえば西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびその誘導体が含まれる。検出に適した基質には、ジ-アミノ-ベンジジン（DAB）、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT-BCIP（4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリドおよび5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート；既製原液としてRoche Diagnosticsから入手できる）、CDP-Star（商標）（Amersham Biosciences）、ECF（商標）（Amersham Biosciences）が含まれる。適切な酵素-基質の組み合わせは有色反応生成物、蛍光または化学発光を生じることができ、それらを当技術分野で既知の方法に従って測定できる（たとえば、感光性フィルムまたは適切なカメラシステムを用いて）。酵素反応の測定については、前記に挙げた基準を同様に適用する。代表的な蛍光標識には、蛍光タンパク質（たとえば、GFPおよびその誘導体）、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセイン、およびAlexa色素（たとえば、Alexa 568）が含まれる。さらに他の蛍光標識を、たとえばMolecular Probes（オレゴン州）から入手できる。蛍光標識としての量子ドットの使用も考慮される。代表的な放射性標識には、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P などが含まれる。放射性標識は、いずれか既知の適切な方法、たとえば感光性フィルムまたはphosphor imagerにより検出できる。本発明による適切な測定法には、下記のものも含まれる：沈降法（特に免疫沈降法）、電気化学発光（電氣的に発生する化学発光）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素結合イムノソルベントアッセイ）、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ(electrochemiluminescence sandwich immunoassay)（ECLIA）、解離増強型ランタニド蛍光イムノアッセイ(dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immuno assay)（DELFA）、シンチレーション近接アッセイ（SPA）、タービディメトリー（濁度測定）、ネフェロメトリー（比濁分析）、ラテックス増強型のタービディメトリーもしくはネフェロメトリー、または固相免疫試験。当技術分野で周知であるさらに他の方法（たとえば、ゲル電気泳動、2Dゲル電気泳動、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）、ウェスタンブロット法、および質量分析）を、単独で、または前記の標識法もしくは他の検出法と組み合わせて使用できる。

【0035】

ペプチドまたはポリペプチドの量は、同様に好ましくは下記により決定できる：（a）前記に明記したペプチドまたはポリペプチドに対するリガンドを含む固体支持体を、その

10

20

30

40

50

ペプチドまたはポリペプチドを含む試料と接触させ、(b)好ましくは、結合していないペプチドまたはポリペプチドおよび残りの試料材料を除去し、そして(c)支持体に結合しているペプチドまたはポリペプチドの量を測定する。リガンドは、好ましくは核酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体およびアプタマーからなる群から選択され、好ましくは固体支持体上に固定化された形態で存在する。固体支持体を作成するための材料は当技術分野で周知であり、特に市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンのチップおよび表面、ニトロセルロースのストリップ、膜、シート、デュラサイト(duracyte)、反応トレーのウェルおよび壁、プラスチックチューブなどを含む。リガンドまたは作用剤を多種多様なキャリアーに結合させることができる。周知のキャリアーの例には、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鉱が含まれる。本発明の目的について、キャリアーの性質は可溶性または不溶性のいずれであってもよい。リガンドを固定/固定化するのに適した方法は周知であり、イオン性、疎水性、共有結合性の相互作用などを含むが、これらに限定されない。本発明によるアレイとして“懸濁アレイ”を用いることも考慮される(Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1): 9-12)。そのような懸濁アレイ中に、キャリアー、たとえばマクイロビーズまたはマイクロスフェアが懸濁状態で存在する。アレイは、おそらく標識された状態で種々のリガンドを保有する種々のマクイロビーズまたはマイクロスフェアからなる。そのようなアレイを調製する方法、たとえば固相化学および光不安定保護基に基づくものが一般に知られている(US 5,744,305)。

10

20

【0036】

好ましい態様によるリガンドの結合の測定は、本明細書に開示するシステムの分析ユニットにより実施される。その後、測定した結合の量を、本明細書に開示するシステムのコンピューティングデバイスにより計算することができる。

【0037】

本明細書中で用いる用語“量”は、ポリペプチドまたはペプチドの絶対量、そのポリペプチドまたはペプチドの相対量または濃度、およびそれらに相関するかまたはそれらから誘導できるいずれかの数値またはパラメーターを包含する。そのような数値またはパラメーターは、それらのペプチドから直接測定により得られるあらゆる特異的な物理的または化学的特性からの強度信号値、たとえば質量スペクトルまたはNMRスペクトルにおける強度値を含む。さらに、本明細書の他のいずれかの箇所に明記する間接測定により得られるすべての数値またはパラメーター、たとえばペプチドに応答した生物学的読出し系から決定される応答レベル、または特異的に結合したリガンドから得られる強度信号が包含される。前記の量またはパラメーターに相関する数値はあらゆる標準的な数値的操作により得られることも理解すべきである。本発明の好ましい態様によれば、“量”の決定は好ましくは本発明のシステムにより行なわれ、それによればそのシステムの1以上の分析ユニットにより実施される接触および測定の段階に基づいてコンピューティングデバイスが“量”を決定する。

30

【0038】

本明細書中で用いる用語“比較する”は、本明細書に述べる少なくとも1種類の血管形成バイオマーカーについて決定した量を基準と比較することを包含する。本明細書中で用いる比較は、その量についての値と基準との間で行なわれるあらゆる種類の比較を表わすことを理解すべきである。sFlt-1およびエンドグリンの場合はその量について基準と比較して等しいかまたは少ない値、PlGFの場合は等しいかまたは多い値が測定されれば、その妊娠対象は短い時間ウィンドウ以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたない(妊娠高血圧腎症についての“除外(rule-out)”)。

40

【0039】

本発明の方法の段階(b)で述べる比較は、手動で、またはコンピューター支援により実施できる。この量の値と基準をたとえば互いに比較することができ、その比較は比較の

50

ためのアルゴリズムを実行するコンピュータプログラムにより自動的に実施できる。その評価を実施するコンピュータプログラムは、目的とする査定を適切な出力フォーマットで提供するであろう。好ましくは、本発明のデバイスの評価ユニットまたは本発明のシステムのコンピューティングデバイスを、その比較を実施するために使用できる。その評価を実施するコンピュータプログラムは、目的とする査定を適切な出力フォーマットで提供するであろう。コンピュータ支援による比較のために、決定した量の値を、データベースに記憶されている適切な基準に対応する値とコンピュータプログラムにより比較することができる。コンピュータプログラムはさらに比較の結果を評価することができる；すなわち、目的とする査定を適切な出力フォーマットで自動的に提供する。決定した量と基準量の比較に基づいて、目的とする査定を行なうことができる。たとえば、比較の結果を生データ（絶対量または相対量）として、またある場合には特定の診断の指標となりうる言語、字句、記号または数値の形の指標として得ることができる。

10

【0040】

本明細書中で用いる用語“基準”は、少なくとも約98%の陰性的中率で診断を行なうためのカットオフとなる基準量または基準値を表わす。好ましくは、これに関して想定される陰性的中率は約99%、または最も好ましくは100%である。適切なカットオフ量またはカットオフ値は、好ましくは、前記に述べたように、調査対象の特定集団における妊娠高血圧腎症についての感度、特異度、および予想、既知（たとえば、文献から）または推定（たとえば、前向きコホート研究に基づく）罹患率に基づいて決定できる。基準として使用すべきカットオフ値またはカットオフ量は、当技術分野で既知の多様な方法により決定できる。好ましくは、受信者動作特性(receiver-operating characteristic) (ROC) をカットオフ値またはカットオフ量の決定のために使用できる(特に、Zweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577を参照)。ROCグラフは、決定閾値(すなわち、カットオフ値)を観察データの全範囲にわたって連続的に変化させることにより得られる感度および特異度の対をすべてプロットしたものである。ある診断法の臨床性能は、その精度、すなわちそれが対象を特定の予後または診断に正確に割り当てる能力に依存する。ROCプロットは、区別を行なうのに適した閾値の全範囲について、感度を1 - 特異度に対してプロットすることにより、2つの分布(罹患および非罹患サブグループの結果)間のオーバーラップを指示する。y軸には感度、または真の陽性画分があり、これは真の陽性試験結果の数と偽陰性試験結果の数の和に対する真の陽性試験結果の数の比として定義される。これは、ある疾患または状態の存在下での陽性度とも言われている。それは専ら罹患サブグループから計算される。x軸には偽陽性画分、または1 - 特異度があり、これは真の陰性結果の数と偽陽性結果の数の和に対する偽陽性結果の数の比として定義される。それは特異度の指数であり、完全に非罹患サブグループから計算される。真の陽性画分と偽陽性画分は2つの異なるサブグループからの試験結果を用いて完全に分離して計算されるので、ROCプロットはそのコホートにおけるその事象の罹患率とは無関係である。ROCプロット上の各点は、特定の決定閾値に対応する感度と特異度の対を表わす。完全識別を伴う試験(結果の2つの分布にオーバーラップがない)は、上左隅を通るROCプロットをもち、その際、真の陽性画分は1.0、すなわち100%(完全感度)であり、偽陽性画分は0(完全特異度)である。識別されない試験についての理論的プロット(2グループについての結果が同一分布)は、下左隅から上右隅への45°の対角線である。大部分のプロットはこれら両極端の間にある。ROCプロットが完全に45°の対角線の下側にあれば、これは“陽性度”についての基準を“より大”から“より小”に逆転することによって容易に対処され、あるいはその逆も成り立つ。定性的に、プロットが上左隅に近づくほど、その試験の全般的精度は高くなる。カットオフ値をROC曲線から導くことができ、これにより特定の事象についてそれぞれ感度と特異度の適正なバランスで診断または予測することができる。したがって、前記の本発明方法に使用すべき基準、すなわち高いリスクをもたない対象間の識別を可能にするカットオフ値は、好ましくはそのコホートについて前記のようにROCを確立し、それからカットオフ値量を導くことにより作成できる。診断法について希望する前選択した感度および特異度または対応する信頼限界に応じて

20

30

40

50

、ROCプロットは適切なカットオフ値を導くことができる。ある対象を高いリスクをもつという理由で効果的に排除するためには(すなわち、除外(rule-out))偽陰性のグループが最小であるように感度および特異度を調整し、これに対し、ある対象が高いリスクをもつと効果的に査定されるためには(すなわち、確定(rule-in))偽陽性のグループが最小であるように感度および特異度を調整することは理解されるであろう。さらに、バイオマーカーのカットオフとは無関係な全般的性能の指標を与える曲線下面積(AUC)値をROCプロットから導くことができる。さらに、ROC曲線の各点は、特定のカットオフ値における感度および特異度の対を表わす。

【0041】

本発明に関して用語“約”は、示したパラメーターまたは数値から $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ または $\pm 1\%$ を意味する。これは、測定技術などにより生じる通常の偏差も考慮に入れる。ただし、この用語はその厳密に示したパラメーターまたは数値をも含む。

10

【0042】

有利なことに、本発明の基礎となる研究において、被検試料を採取した時点で妊娠高血圧腎症、子癇またはHELLP症候群の臨床顕性症状を全くまたはわずかし示していない妊娠対象におけるsFlt-1、エンドグリンまたはPLGFの量、およびその比(後記も参照)、すなわちsFlt1/PLGF比、またはエンドグリン/PLGF比は、切迫妊娠高血圧腎症、すなわち約1~約2週間という短期間以内の妊娠高血圧腎症および/または切迫HELLP症候群の発症を除外するための指標であることが見出された。特に、前記マーカーを用いる場合、個々のバイオマーカーについてのカットオフ量またはカットオフ値を高い陰性的中率で確立することができる。さらに、約46以下のsFlt1/PLGF比は、または約33以下のsFlt1/PLGF比ですら、本発明方法の、ほぼ100%の陰性的中率を可能にする特に価値ある指標であることが見出された。また、約38のsFlt1/PLGF比は、実施例、特に実施例4および図8に詳細に開示するように特に価値があることが見出された。したがって、本発明の方法は、確立すべき除外診断に関して特に高い信頼度で作動する。さらに、本発明の方法は対象の初回来院時に採取した試料についてだけでなく、その後の来院時に採取した各試料についても信頼性をもって採用できることが認められた。さらにまた、本発明による方法は、他の診断方法により、特に子宮ドップラー超音波診断により、妊娠高血圧腎症、子癇および/またはHELLP症候群を発症するリスクをもつと誤って陽性診断された対象を同定するために採用できる。ドップラー超音波診断検査により妊娠高血圧腎症、子癇および/またはHELLP症候群を発症するリスクをもつと診断された対象に本発明の方法を適用することにより、この診断が誤った陽性である対象を短い時間ウィンドウ以内で効果的に除外することができる。

20

30

【0043】

本発明のおかげで、切迫妊娠高血圧腎症のリスクをより信頼性をもって除外することができる。さらに、本発明の方法を診断の補助として適用すると、現在のスコアリング方式のような時間のかかる高額でやっかいな診断措置、または熟練した医師を必要とするドップラー超音波診断検査を避けることができる。これに関して、たとえばドップラー超音波診断検査と対照的に、本発明による方法は、高度の専門医を必要とするのではなく、自動的に、または医療支援スタッフにより実施することすらできることに注目すべきである。妊娠高血圧腎症に罹患しているかまたは発症のリスクをもつ妊婦に要求される集中的な特別のケア、たとえば緊密なモニタリングおよび入院の必要性をより良好に推定して健康管理のために考慮に入れることができるので、健康管理は本発明の方法から著しい有益性を受けざるを得ない。

40

【0044】

前記および下記で行なう用語の定義および説明は、本明細書および付随する特許請求の範囲に記載するすべての態様にそれに応じて適用されることを理解すべきである。

本発明の方法の好ましい態様において、本方法は、段階a)においてその対象の試料中

50

のバイオマーカー sFlt-1 またはエンドグリンおよび PLGF の量を決定し、そして段階 b) においてその対象の試料中のバイオマーカー sFlt-1 またはエンドグリンと PLGF の量の比の値を基準値と比較し、それにより、その比の値が基準と比較して等しいかまたは低ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断する。より好ましくは、本方法は段階 b) の前に、段階 a) で試料において決定した sFlt-1 またはエンドグリンおよび PLGF の量から比を計算するさらなる段階を含む。

【0045】

本明細書中で述べる用語“比を計算する”は、下記により sFlt-1 またはエンドグリンの量と PLGF の量との比を計算することに関する：それらの量を割るか、あるいはそれに匹敵する他のいずれかの数学計算であって sFlt-1 またはエンドグリンの量を PLGF の量に関係づける計算を実施する。好ましくは、その比を計算するために sFlt-1 またはエンドグリンの量を PLGF の量で割る；すなわち、この比は、好ましくは sFlt-1 の量を PLGF の量で割ったもの (sFlt-1 / PLGF とも言う) またはエンドグリンの量を PLGF の量で割ったもの (エンドグリン / PLGF とも言う) である。

10

【0046】

本明細書中で用いる用語“比較する”は、この比を他のいずれかの箇所に定める基準と比較することを包含する。本明細書中で用いる比較するは、この比と基準との間で行なわれるあらゆる種類の比較を表わすことを理解すべきである。本発明の基礎となる研究において、妊娠高血圧腎症を発症するリスクが低いこと、または高くないことは、sFlt-1 またはエンドグリンと PLGF について決定した比が基準値と比較して等しいかまたは低いことと相関することが見出された。より好ましくは、この基準値は約 4.6 以下、約 4.5 以下、約 4.0 以下、または約 3.5 以下であり、好ましくはそれは約 3.3 以下である。よりいっそう好ましくは、sFlt-1 と PLGF について決定した比に対する基準値は約 3.8 以下である；最も好ましくは、sFlt-1 と PLGF について決定した比に対する基準値は約 3.8 である。上記のカットオフ値は、先行技術における診察日での診断のための他の (非特異的) 除外法について述べられたもの (たとえば、前掲の Stepan を参照) と比較してかなり異なり、本発明の方法に適用すると予測のための驚異的に高い陰性的中率を達成する。

20

30

【0047】

本発明方法のさらに好ましい態様において、本方法はさらにその診断に基づいて患者管理措置を推奨することを含む。

本明細書中で用いる用語“推奨する”は、対象に適用できる、または対象に適用してはならない、患者管理措置またはその組み合わせの提唱を確立することを意味する。しかし、特定の 1 態様において、実際の管理措置の適用がいずれもこの用語に含まれるわけではないことを理解すべきである。本明細書中で用いる患者管理措置は、妊娠高血圧腎症に罹患している対象にその健康状態の治癒、回避または取扱いのために適用できるすべての措置を表わす。たとえば、患者管理措置には、モニタリングの程度 (たとえば、緊密な、普通または軽度のモニタリング)、入院もしくは外来通院維持、薬物処置の適用もしくは差し控え、または生活様式推奨事項が含まれる。好ましくは、患者管理措置は、(i) 対象が妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断されなければ下記の措置の群から選択され：緊密なモニタリング、入院、降圧薬の投与、および生活様式推奨事項、(ii) 対象が妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断されれば外来通院モニタリングである

40

本発明はさらに、妊娠高血圧腎症に罹患する疑いのある対象を管理する方法であって、妊娠対象が本明細書中で前記に述べた短い時間ウィンドウ以内の妊娠高血圧腎症のリスクをもたないかどうかを診断する方法段階、および確立された診断に従って対象を管理するさらなる段階を含む方法に関する。好ましくは、その管理には、対象の外来通院維持、普通または軽度のモニタリング、薬物投与の差し控え、特に降圧薬または出産前コルチコス

50

テロイド（たとえば、ベタメタゾン(bethamethasone)）の投与の差し控えが含まれる；後者は、早期産のリスクをもつ女性において胎児肺成熟を促進するために適用される。

【0048】

本発明はまた、妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するための、妊娠対象の試料中の少なくとも1種類のバイオマーカー sFlt-1、エンドグリンおよびPLGF、またはそれに特異的に結合する少なくとも1種類のその検出剤の使用に関する。本発明はまた、本明細書の他のいずれかの箇所に述べる患者管理措置を推奨するための、妊娠対象の試料中の少なくとも1種類のバイオマーカー sFlt-1、エンドグリンおよびPLGF、またはそれに特異的に結合する少なくとも1種類のその検出剤の使用を含む。

10

【0049】

本発明はまた、妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するための診断剤もしくは薬剤または組成物を調製するための、妊娠対象の試料中の少なくとも1種類のバイオマーカー sFlt-1、エンドグリンおよびPLGF、またはそれに特異的に結合する少なくとも1種類のその検出剤の使用を考慮する。本発明はまた、本明細書の他のいずれかの箇所に述べる患者管理措置を推奨するための診断剤もしくは薬剤または組成物を調製するための、妊娠対象の試料中の少なくとも1種類のバイオマーカー sFlt-1、エンドグリンおよびPLGF、またはそれに特異的に結合する少なくとも1種類のその検出剤の使用を含む。

【0050】

本発明は、本発明の方法を実施することにより妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するために適合させた、下記のものを含むデバイスに関する：

20

a) sFlt-1、エンドグリンおよびPLGFからなる群から選択される少なくとも1種類の血管形成バイオマーカーに特異的に結合する少なくとも1種類の検出剤を含む分析ユニットであって、妊娠対象の試料中のsFlt-1、エンドグリンおよび/またはPLGFの量を決定するために適合させたユニット；ならびに

b) 下記のためのアルゴリズムを実装したデータプロセッサを含む評価ユニット：前記の量を基準と比較し、それにより、sFlt-1およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、またPLGFの場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約98%の陰性的中率で診断を行なうことができる。

30

【0051】

本明細書中で用いる用語“デバイス”は、本発明の方法による診断が可能になるように互いに操作可能な状態で連結した前記ユニットを含むシステムに関する。分析ユニットに使用できる好ましい検出剤は本明細書の他の箇所に開示されている。分析ユニットは、好ましくは、その量を決定すべきバイオマーカーを含む試料に接触させる固体支持体に固定化された形態で、それらの検出剤を含む。さらに、分析ユニットはバイオマーカー（単数または複数）に特異的に結合した検出剤の量を決定する検出器をも含むことができる。決定された量を評価ユニットへ伝達することができる。その評価ユニットはデータ処理素子、たとえばコンピューターを含み、それには、本明細書の他のいずれかの箇所に詳細に述べた本発明方法の段階を実施するコンピューターベースのアルゴリズムの実装により比の計算、計算されたそれらの比の比較、およびその比較の結果の評価を行なうためのアルゴリズムが実装されている。結果をパラメトリック診断生データの出力として得ることができる。これらのデータは通常は臨床医による解釈を必要とすることを理解すべきである。しかし、出力が処理済みの診断生データを含み、その解釈に専門的な臨床医を必要としない、エキスパートシステムデバイスも想定される。

40

【0052】

本発明のデバイスの好ましい態様において、分析ユニットはその対象の試料中のバイオマーカー sFlt-1 またはエンドグリンおよびPLGFの量を決定するための検出剤を

50

含み、その際、評価ユニットに実装されたアルゴリズムは s F l t - 1 またはエンドグリンと P l G F の量の比の値を基準値と比較し、それにより、その比の値が基準値と比較して等しいかまたは低ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断される。好ましくは、評価ユニットに実装されたアルゴリズムは、さらに s F l t - 1 またはエンドグリンと P l G F の量の比の値を計算する。

【 0 0 5 3 】

本発明の他の好ましい態様において、評価ユニットはさらに、本明細書の他のいずれかの箇所に述べるように診断に基づいて患者管理措置に関する推奨を行なう実装アルゴリズムを含む。

【 0 0 5 4 】

以上から、この開示内容のある態様によれば、本明細書に開示および記載した方法の幾つかの段階の一部をコンピューティングデバイスにより実施できることが分かる。コンピューティングデバイスは、たとえば汎用コンピューターまたはポータブルコンピューティングデバイスであってもよい。本明細書に開示する方法の 1 以上の段階を実施するために、多数のコンピューティングデバイスを、たとえばネットワークまたは他のデータ移送方法を介して一緒に使用することも理解すべきである。代表的なコンピューティングデバイスには、デスクトップコンピューター、ラップトップコンピューター、パーソナルデータアシスタント (personal data assistant) (“ P D A ”)、たとえば B L A C K B E R R Y 銘柄のデバイス、セル方式デバイス、タブレットコンピューター、サーバーなどが含まれる。一般に、コンピューティングデバイスは複数の指示 (たとえば、ソフトウェアのプログラム) を実行できるプロセッサを含む。

【 0 0 5 5 】

コンピューティングデバイスはメモリーにアクセスできる。メモリーはコンピューター可読媒体であり、単一記憶デバイスまたは多重記憶デバイスを含むことができ、それらはコンピューティングデバイスと共に局所に配置され、あるいはたとえばネットワークを介してコンピューティングデバイスにアクセス可能であってもよい。コンピューター可読媒体はコンピューティングデバイスがアクセスできる入手可能ないかなる媒体であってもよく、これには持久性 (volatile) および非持久性 (non-volatile) の両方の媒体が含まれる。さらに、コンピューター可読媒体はリムーバブル媒体および非リムーバブル媒体のうち的一方または両方であってもよい。たとえば、限定ではなく、コンピューター可読媒体はコンピューター記憶媒体を含むことができる。代表的なコンピューター記憶媒体には下記のものが含まれるが、それらに限定されない : R A M、R O M、E E P R O M、フラッシュメモリーまたは他のいずれかの記憶テクノロジー、C D - R O M、デジタル多目的ディスク (Digital Versatile Disk) (D V D) もしくは他の光ディスク記憶媒体、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶デバイスもしくは他の磁気記憶デバイス、またはコンピューティングデバイスがアクセスしてコンピューティングデバイスのプロセッサにより実行できる複数の指示を記憶させるために使用できる他のいずれかの媒体。

【 0 0 5 6 】

本明細書に開示する態様によれば、ソフトウェアは、コンピューティングデバイスのプロセッサにより実行された際に本明細書に開示する方法の 1 以上の段階を実施できる指示を含むことができる。ある指示は、他の機械の動作を制御する信号を発するように適合させることができ、こうしてそれらの制御信号によりコンピューター自体から遠く離れた資料を変換する操作を行なうことができる。これらの記述および表現は、データ処理技術分野の専門家が、たとえば彼らの作業の内容を最も効率的に他の当業者へ伝達するために用いる手段である。

【 0 0 5 7 】

複数の指示は、目的とする結果を導く自己矛盾しない一連のステップであると一般に考えられるアルゴリズムをも含むことができる。これらのステップは、理学的量の理学的操作を必要とするものである。通常は (必ずしもそうではないが) これらの量は、記憶、伝達、変換、結合、比較その他の形で操作できる電気的もしくは磁気的なパルスまたは信号

10

20

30

40

50

の形をとる。それは時には、主に、これらの信号をそのような信号が具体化または発生する理学的事項または発現に対する基準としての数値、文字、ディスプレイデータ、番号などとして表わすための共用化という理由で、好都合になる。ただし、これらおよび類似の用語はすべて適宜な理学的量と関連づけられるものであり、ここではこれらの量に適用される好都合なラベルとして用いられるにすぎないことを留意すべきである。本明細書に開示するある態様によれば、本明細書に開示する1種類以上のマーカーの決定量と適切な基準との比較を実施するためのアルゴリズムは、指示を実行することによって具体化および実施される。その結果を、パラメトリック診断生データの出力として、または絶対量もしくは相対量として得ることができる。本明細書に開示するシステムの多様な態様によれば、“診断”は本明細書に開示するシステムのコンピューティングデバイスにより、計算“量”と基準または閾値との比較に基づいて提供できる。たとえば、あるシステムのコンピューティングデバイスは、特定の診断の指標となる言語、記号または数値の形の指標を提供できる。

10

【0058】

コンピューティングデバイスは、出力デバイスにもアクセスできる。代表的な出力デバイスには、たとえばファックス機、ディスプレイ、プリンター、およびファイルが含まれる。本明細書に開示するある態様によれば、コンピューティングデバイスは本明細書に開示する方法の1以上の段階を実施し、その後、本方法の結果、指示、比または他のファクターに関係する出力を出力デバイスにより提供することができる。

20

【0059】

本発明はさらに、本発明の方法を実施することにより妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断する補助を確立するための、下記のものを含むシステムに関する：

a) 試料を、sFlt-1、エンドグリンおよびPLGFからなる群から選択される少なくとも1種類のマーカーに特異的に結合する検出剤(単数または複数)と、検出剤および試料由来の少なくとも1種類のマーカーの複合体を形成させるのに十分な時間接触させるように構成された分析ユニット、

b) 形成された複合体の量を測定するように構成された分析ユニット；その際、形成された複合体の量は試料中に存在する少なくとも1種類のマーカーの量に比例する、

c) プロセッサを備え、かつ操作可能な状態で上記の分析ユニット類と連絡する、コンピューティングデバイス、ならびに

30

d) 非一時性(non-transient)の機械可読媒体であって、プロセッサにより実行可能な複数の指示、すなわち実行した際に、形成された複合体の量を、試料中に存在する少なくとも1種類のマーカーの量を反映する少なくとも1種類のマーカーの量に変換し、その量を基準と比較し、その基準との比較の結果に基づいて短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもつ対象を分類するための臨床予測法則に基づくリスクアセスメントを最適化する補助を確立する指示を含む媒体。

【0060】

本明細書に開示する好ましい態様は、妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもつ対象を分類するための臨床予測法則に基づくリスクアセスメントを最適化するためのシステムを含む。システムの例には、化学反応もしくは生物反応の結果を検出するために、または化学反応もしくは生物反応の進行をモニターするために用いる、臨床化学分析器、凝固化学分析器、免疫化学分析器、尿分析器、核酸分析器が含まれる。より具体的には、ここに開示する代表的システムには、Roche Elecsys(商標)システムおよびCobas(登録商標) eイムノアッセイ分析器、Abbott Architect(商標)およびAxSYM(商標)分析器、Siemens Centaur(商標)およびImmulate(商標)分析器、ならびにBeckman Coulter UniCel(商標)およびAccess(商標)分析器などを含めることができる。

40

【0061】

システムの態様は、本明細書の開示内容を実施するための1以上の分析ユニットを含む

50

ことができる。本明細書に開示するシステムの分析ユニットは、既知のように有線接続、Bluetooth（登録商標）、LANs、または無線信号のいずれかにより、本明細書に開示するコンピューティングデバイスと操作可能な状態で連絡している。さらに、本明細書の開示によれば、分析ユニットは独立型装置、または大型機器内のモジュールを含むことができ、これは診断目的での検出、たとえば試料の定性および/または定量評価のうち一方または両方を実施する。たとえば、分析ユニットは、試料および/または試薬のピペティング、装入、混合を実施または支援することができる。分析ユニットは、アッセイを実施するための試薬を保持する試薬保持ユニットを含むことができる。試薬は、たとえば個々の試薬類または一群の試薬類を収容した容器またはカセットの形態で、貯蔵コンパートメントまたはコンベヤー内の適宜なレセプタクルまたは位置に置かれた状態に配置することができる。検出試薬は、試料と接触させる固体支持体に固定化された形態であってもよい。さらに、分析ユニットは、個々の分析に最適化できる処理用および/または検出用の構成要素を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0062】

ある態様によれば、分析ユニットは、試料について被検体、たとえばマーカを光学検出するために構成できる。光学検出のために構成された代表的な分析ユニットは、電磁エネルギーを電気信号に変換するように構成されたデバイスを含み、それには単一素子および多重素子の両方またはアレイ状の光学検出器が含まれる。本明細書の開示によれば、光学検出器は、光路に配置された試料中の被検体の存在および/または濃度の指標となる光電磁信号をモニターし、そして電気的な出力信号または応答信号をベースライン信号に対比して提供することができる。そのようなデバイスには、たとえば下記のものも含めることができる：アバランシェフォトダイオード(avalanche photodiode)を含むフォトダイオード、フォトトランジスター、光伝導検出器、リニアセンサーアレイ、CCD検出器、CMOSアレイ検出器を含むCMOS検出器、光電子増倍管、および光電子増倍管アレイ。特定の態様によれば、光学検出器、たとえばフォトダイオードまたは光電子増倍管は、信号の調整または処理用の追加エレクトロニクスを含むことができる。たとえば、光学検出器は少なくとも1つの前置増幅器、フィルター回路、または集積回路を含むことができる。適切な前置増幅器には、たとえば積分型、トランスインピーダンス型、および電流利得型(current gain) (カレントミラー(current mirror))の前置増幅器が含まれる。

【0063】

さらに、本明細書の開示による1以上の分析ユニットは、光を発するための光源を含むことができる。たとえば、分析ユニットの光源は、被検試料について被検体濃度を測定するための、またはエネルギー移動(たとえば、蛍光共鳴エネルギー移動による、または酵素の触媒作用による)を可能にするための、少なくとも1つの発光素子(たとえば、発光ダイオード、電源付き輻射線源、たとえば白熱電球、エレクトロルミネセントランプ、気体放電ランプ、高輝度放電ランプ、レーザー)からなることができる。

【0064】

さらに、このシステムの分析ユニットは、1以上の保温ユニット(たとえば、試料または試薬を、特定した温度または温度範囲に保持するためのもの)を含むことができる。ある態様において、分析ユニットは、試料に反復温度サイクルを施してその試料について増幅生成物の量の変化をモニターするためのサーモサイクラー(リアルタイムサーモサイクラーを含む)を含むことができる。

【0065】

さらに、本明細書に開示するシステムの分析ユニットは、反応器またはキュベットへの供給ユニットを含むことができ、あるいはそれに操作可能な状態で接続していてもよい。代表的な供給ユニットには、試料および/または試薬を反応器へ送達するための液体操作ユニット、たとえばピペティングユニットが含まれる。ピペティングユニットは、再利用可能な可洗ニードル、たとえばスチールニードル、または使い捨てピペットチップを含むことができる。分析ユニットは、さらに1以上の混合ユニット、たとえば液体を入れたキュベットを振とうするためのシェーカー、またはキュベットもしくは試薬容器内の

液体を混合するための混合パドルを含むことができる。

【0066】

本発明はまた、本発明の方法を実施するために適合させたキットであって、sFlt-1、エンドグリンおよびPLGFからなる群から選択される血管形成バイオマーカの量を決定するための少なくとも1種類の検出剤、ならびにその方法を実施するための指示を含むキットに関する。

【0067】

本明細書中で用いる用語“キット”は、前記構成要素の集合体であって、好ましくは個別に、または単一容器内で提供されるものを表わす。容器は本発明の方法を実施するための指示も含む。これらの指示は、マニュアルの形であってもよく、あるいはコンピューターまたはデータ処理デバイスに実装した際に本発明の方法において述べた計算および比較を実施してそれに従って診断を確立することができるコンピュータープログラムコードにより提供されてもよい。コンピュータープログラムコードは、データ記憶媒体またはデバイス、たとえば光学記憶媒体（たとえば、コンパクトディスク）上に、または直接にコンピューターまたはデータ処理デバイス上に提供することができる。さらにキットは、好ましくは、本明細書の他のいずれかの箇所に詳細に記載するバイオマーカの標準量を検量の目的で含むことができる。

10

【0068】

本発明のキットの好ましい態様において、キットは、妊娠対象の試料中のsFlt-1および/またはエンドグリンの量を決定するための検出剤、およびPLGFの量を決定するための検出剤を含む。

20

【0069】

ある態様において、本明細書に開示するキットは、開示された方法を実施するための少なくとも1つの構成要素、または構成要素類のパッケージされた組合わせを含む。“パッケージされた組合わせ”とは、そのキットが本明細書に開示する1以上の構成要素、たとえばプローブ（たとえば、抗体）、対照、緩衝液、試薬（たとえば、コンジュゲートおよび/または基質）、指示などの組合わせを収容した単一のパッケージを備えていることを意味する。単一の容器を収容したキットも“パッケージされた組合わせ”の定義に含まれる。ある態様において、キットは少なくとも1種類のプローブ、たとえば抗体（本明細書に開示するバイオマーカのエピトープに対して特異的な親和性をもつもの）を含む。たとえば、キットは、蛍光体で標識した抗体、または融合タンパク質のメンバーである抗体を含むことができる。キットにおいて、プローブは固定化されていてもよく、特定のコンホメーションで固定化されていてもよい。たとえば、固定化されたプローブは、ターゲットタンパク質を特異的に結合するために、試料中のターゲットタンパク質を検出するために、および/またはターゲットタンパク質を試料から分離するために、キットに備えることができる。

30

【0070】

ある態様によれば、キットは、固定化されていてもよい少なくとも1種類のプローブを少なくとも1つの容器内に含む。キットは、任意に固定化されていてもよい複数のプローブを1以上の容器内に含むこともできる。たとえば、複数のプローブは、たとえば単一の容器内または別個の容器内（その際、各容器は単一のプローブを収容している）に存在してもよい。

40

【0071】

ある態様において、キットは1種類以上の固定化されていないプローブおよび1以上の固体支持体（固定化されたプローブを含むもの、または含まないもの）を含むことができる。そのようなある態様は、1種類以上のプローブを固体支持体に固定化するのに必要な試薬および補充用品の一部または全部、あるいは固定化されたプローブを試料中の特定のタンパク質に結合させるのに必要な試薬および補充用品の一部または全部を含むことができる。

【0072】

50

特定の態様において、単一プローブ（同一プローブの複数コピーを含む）を単一の固体支持体に固定化し、単一容器に入れて提供することができる。他の態様において、2種類以上のプローブであって、それぞれが異なるターゲットタンパク質または異なる形態の単一のターゲットタンパク質（たとえば、特異的エピトープ）に対して特異的なプローブを、単一容器に入れて提供する。そのようなある態様において、固定化されたあるプローブを複数の異なる容器内に入れて提供することができ（たとえば、1回用形態）、あるいは複数種類の固定化されたプローブを複数の異なる容器に入れて提供することができる。さらなる態様において、プローブ類を複数の異なるタイプの固体支持体に固定化することができる。固定化されたプローブ（単数または複数）と容器（単数または複数）のいずれかの組み合わせが本明細書に開示するキットについて考慮され、そのいずれかの組み合わせは目的とする用途に適したキットを達成するように選択できる。

10

【0073】

キットの容器は、たとえばプローブ（たとえば、抗体）、対照、緩衝液、試薬（たとえば、コンジュゲートおよび/または基質）を含めた本明細書に開示する1以上の構成要素をパッケージおよび/または収容するのに適したいかなる容器であってもよい。適切な材料にはガラス、プラスチック、厚紙その他の紙製品、木材、金属、およびそのいずれかのアロイが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、容器は固定化されたプローブ（単数または複数）を完全に包み込んでよく、あるいは粉塵、油などによる汚染、および露光を最小限に抑えるためにプローブを覆うだけでもよい。あるさらなる態様において、キットは単一の容器または複数の容器を含むことができ、複数の容器が存在する

20

【0074】

本発明のある観点において、短い時間ウインドウ以内の妊娠高血圧腎症を除外するための補助を確立する方法が考慮され、その方法は下記を含む：

a) 妊娠対象の試料中の本明細書に述べる少なくとも1種類の血管形成バイオマーカの量を決定し、その決定は下記を含む：(i) 試料を、少なくとも1種類の血管形成バイオマーカに特異的に結合する検出剤と、検出剤および試料由来のバイオマーカの複合体を形成させるのに十分な時間接触させる、(ii) 形成された複合体の量を測定し、その際、形成された複合体の量は試料中に存在する少なくとも1種類のマーカの量に比例する、ならびに(iii) 形成された複合体の量を、試料中に存在する少なくとも1種類のバイオマーカの量を反映する少なくとも1種類のバイオマーカの量に変換する；

30

b) その量を基準と比較する；そして

c) 段階b)で行なった比較の結果に基づいて、短い時間ウインドウ以内の妊娠高血圧腎症を除外するための補助を確立する。

【0075】

適切な検出剤は、ある観点において、本発明の方法により調査する対象の試料中の少なくとも1種類の血管形成バイオマーカに特異的に結合する抗体であってもよい。適用できる他の検出剤は、ある観点において、試料中の少なくとも1種類の血管形成バイオマーカに特異的に結合するアプタマーであってもよい。さらなる観点において、検出剤と少なくとも1種類の血管形成バイオマーカの間に形成された複合体から、形成された複合体の量を測定する前に、試料を分離する。したがって、ある観点において、検出剤を固体支持体に固定化することができる。さらなる観点において、洗浄溶液を適用することにより、固体支持体上に形成された複合体から試料を分離することができる。形成された複合体は、試料中に存在する少なくとも1種類の血管形成バイオマーカの量に比例するはずである。適用する検出剤の特異度および/または感度が試料中に含まれる特異的に結合できる少なくとも1種類の血管形成バイオマーカの比例度を規定することは理解されるであろう。決定をどのようにして実施できるかについてのさらなる詳細も、本明細書中の他のいずれかの箇所にある。形成された複合体の量を、試料中に実際に存在する量を反映する少なくとも1種類の血管形成バイオマーカの量に変換すべきである。そのような

40

50

量は、ある観点において、本質的にその試料中に存在する量であってもよく、あるいは他の観点において、形成された複合体と元の試料中に存在する量とは関係があるため、その一定割合の量であってもよい。

【0076】

前記方法のさらにある観点において、段階 a) は分析ユニット、ある観点において本明細書の他のいずれかの箇所に定める分析ユニットにより実施できる。他の観点において、段階 a) ~ c) のいずれかまたは全部を本明細書の他のいずれかの箇所に定める分析ユニットにより実施できる。

【0077】

本発明方法のある観点において、段階 a) で測定した量を基準と比較する。ある観点において、基準は本明細書の他のいずれかの箇所に定める基準である。さらにある観点において、基準は複合体の測定量と元の試料中に存在する量の比例関係を考慮に入れる。したがって、本発明方法のある観点において適用される基準は、用いた検出剤の限界を反映するように適合させた人為的基準である。他の観点において、決定量の値と基準を実際に比較する前に、たとえば決定量について正規化および/または補正の計算段階を採用することにより比較を行なう際にも、その関係を考慮に入れることができる。この場合も、決定量についての正規化および/または補正の計算段階は、用いた検出剤の限界が適正に反映されるように比較段階を適合させる。ある観点において、比較は自動的に、たとえばコンピュータシステムなどにより支援して実施される。

10

【0078】

診断のための補助は、段階 b) で実施する比較に基づいて、対象を短い時間ウィンドウ以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたない対象グループに確定的に割り当てることにより、あるいは対象をそのグループから不確定的に排除することにより確立される。既に本明細書の他のいずれかの箇所で考察したように、調査対象の割り当ては調査症例の100%において正確でなければならないわけではない。調査対象が割り当てられる対象グループは、それらが統計学的考慮、すなわち本発明をそれに基づいて操作すべき特定の前選択した尤度に基づいて確立されるという点で、人為的グループである。こうして本方法は診断の補助を確立することができ、これはある観点において、他の手法によって診断をさらに強化することが要求される可能性がある。本発明のある観点において、本明細書に記載および開示するように、診断のための補助は自動的に、たとえばコンピューティングデバイスなどにより支援して確立される。

20

30

【0079】

本発明方法のある観点において、その方法はさらに、段階 c) で確立された診断補助の結果に従って、本明細書の他のいずれかの箇所に述べるように対象を処置/処方/推奨または管理する段階を含む。

【0080】

前記方法のある観点において、段階 b) および/または c) は本明細書の他のいずれかの箇所に述べる1以上の評価ユニットにより実施される。

本明細書に引用するすべての参考文献を、それらの開示内容全体および本明細書中で具体的に言及した開示内容に関して本明細書に援用する。

40

【実施例】

【0081】

以下の実施例は本発明を説明するものにすぎない。それらが本発明の範囲を限定すると決して解釈すべきではない。

実施例1: sFlt-1、エンドグリンおよびPLGFの血中レベルの決定

市販のイムノアッセイを用いてsFlt-1、PLGFおよびエンドグリンの血中レベルを決定した。特に下記のアッセイを用いた。

【0082】

sFlt-1は、Rocheからの分析計Elexsys(商標)-またはcobase(商標)-シリーズを用いるサンドイッチイムノアッセイで決定された。このアッセ

50

イは、各ポリペプチドに対して特異的な2種類のモノクローナル抗体を含む。これらの抗体のうち第1はビオチニル化されており、第2のものはトリス(2, 2'-ビピリジル)ルテニウム(II)錯体で標識されている。最初のインキュベーション段階で両抗体を試料と共にインキュベートする。決定すべきペプチドおよび2種類の異なる抗体を含むサンドイッチ複合体が形成される。次のインキュベーション段階において、ストレプトアビジンでコートしたビーズをこの複合体に添加する。ビーズはこのサンドイッチ複合体に結合する。この反応混合物を次いで測定セル内へ吸引し、そこでビーズは電極の表面に磁気捕獲される。次いで電圧を印加するとルテニウム錯体からの化学発光が誘導され、これを光電子増倍管により測定する。発光量は電極上のサンドイッチ複合体の量に依存する。このsFlt-1試験は、Roche Diagnostics GmbH(ドイツ、マンハイム)から市販されている。このアッセイについてのさらなる詳細はパッケージ挿入物中にある。sFlt-1の測定範囲には、10~85,000pg/mlの量が含まれる。

10

【0083】

エンドグリンは、R&D Systems, Inc(米国ミネアポリス)から市販されているQuantikine(商標)ヒト-エンドグリン/CD105イムノアッセイを用いて測定された。このアッセイは定量サンドイッチ酵素イムノアッセイ法を用いる。エンドグリンに対して特異的なモノクローナル抗体がマイクロプレート上にプレコートされていた。標準品および試料をピペットでウェルに入れると、存在するエンドグリンはいずれも固定化抗体により結合される。結合しなかった物質をいずれも洗浄除去した後、エンドグリンに対して特異的な酵素結合-モノクローナル抗体をウェルに添加する。結合しなかった抗体-酵素試薬をいずれも洗浄除去した後、基質溶液をウェルに添加すると、最初の段階で結合したエンドグリンに比例して発色する。発色を停止し、色の強度を測定する。このアッセイについてのさらなる詳細はパッケージ挿入物中にある。エンドグリンの測定範囲には、0.001ng/L~10ng/mlの量が含まれる。

20

【0084】

PLGFは、2種類のPLGF特異的抗体を用いて、ElecSys(商標)-またはcobas(商標)-シリーズの分析器で実施するサンドイッチイムノアッセイで試験された(詳細については前記を参照)。このPLGF試験は、Roche Diagnostics GmbH(ドイツ、マンハイム)から市販されている。このアッセイについてのさらなる詳細はパッケージ挿入物中にある。PLGFの測定範囲には、3~10,000pg/mlの量が含まれる。

30

【0085】

実施例2: 1週間以内の転帰としての妊娠高血圧腎症の分析

ROC曲線を作成するために用いた表中で、目標NPVについてのカットオフ値を選択し、このカットオフにおける感度、特異度およびPPVを推定することができる。これらすべての割合について、現サンプルサイズに基づく信頼区間が得られる。

【0086】

妊娠後24±0週目~40±0週目の患者について、初回来院時に得た試料において決定したsFlt-1/PLGF比のカットオフ45は、妊娠高血圧腎症を予測するためのNPV 100%(下側95%信頼限界(lower 95% confidence limit)96.58%)を与えた;感度推定率100%(LCL95 66.37%)および特異度推定率80.92%(LCL95 73.13%)。PPV推定率は26.47%(LCL95 12.88%)である。34対106の対象がこのカットオフで検査陽性/陰性であり、34中9はPEを発症すると予想されるが、106中にはなかった。

40

【0087】

妊娠後24±0週目~40±0週目の患者について、複数回来院時に得た試料において決定したsFlt-1/PLGF比のカットオフ45は、npv 99.4%(下側95%信頼限界97.96%)を与えた;感度推定率86.7%(LCL95 63.66%)および特異度推定率80.60%(LCL95 76.56%)。PPV推定率は13.40%(LCL95 7.33%)である。97対351の来院において対象はこの力

50

ットオフで陽性/陰性と検査され、94中13の来院はPEに先立っていたが、351中では2であった。

【0088】

結果を次表にまとめる。

表1：AUC、LCL95およびUCL95値

【0089】

【表1】

応答	バイオマーカー	auc	LCL95	ucl95
PE within 1 week	ratio_sFlt_1_PIGF	0,9211	0,8703	0,9719
PE within 1 week	ratio_endogl_PIGF	0,9118	0,8448	0,9788
PE within 1 week	tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,933	0,8889	0,9771
PE within 1 week	tst_res_PIGF_pg_ml	0,8482	0,7608	0,9356
PE within 1 week	endogl_ng_ml	0,9254	0,8615	0,9892
PE within 1 week - all visits	ratio_sFlt_1_PIGF	0,9108	0,8689	0,9528
PE within 1 week - all visits	ratio_endogl_PIGF	0,8949	0,8493	0,9405
PE within 1 week - all visits	tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,9087	0,849	0,9684
PE within 1 week - all visits	tst_res_PIGF_pg_ml	0,8618	0,8112	0,9124
PE within 1 week - all visits	endogl_ng_ml	0,8928	0,8419	0,9437
PE within 2 weeks	ratio_sFlt_1_PIGF	0,9262	0,8788	0,9735
PE within 2 weeks	ratio_endogl_PIGF	0,9108	0,8487	0,9729
PE within 2 weeks	tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,9438	0,9041	0,9836
PE within 2 weeks	tst_res_PIGF_pg_ml	0,8485	0,7681	0,9288
PE within 2 weeks	endogl_ng_ml	0,9238	0,865	0,9827
PE within 2 weeks - all visits	ratio_sFlt_1_PIGF	0,8978	0,8566	0,939
PE within 2 weeks - all visits	ratio_endogl_PIGF	0,873	0,8305	0,9155
PE within 2 weeks - all visits	tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,8897	0,8356	0,9437
PE within 2 weeks - all visits	tst_res_PIGF_pg_ml	0,8568	0,8116	0,9021
PE within 2 weeks - all visits	endogl_ng_ml	0,8615	0,8161	0,9069
PE within 4 weeks	ratio_sFlt_1_PIGF	0,89	0,8355	0,9445
PE within 4 weeks	ratio_endogl_PIGF	0,8608	0,7977	0,9239
PE within 4 weeks	tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,9034	0,8447	0,9621
PE within 4 weeks	tst_res_PIGF_pg_ml	0,8331	0,7663	0,8999
PE within 4 weeks	endogl_ng_ml	0,8651	0,801	0,9293
PE within 4 weeks - all visits	ratio_sFlt_1_PIGF	0,8655	0,8261	0,9049
PE within 4 weeks - all visits	ratio_endogl_PIGF	0,8369	0,797	0,8768
PE within 4 weeks - all visits	tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,861	0,8168	0,9053
PE within 4 weeks - all visits	tst_res_PIGF_pg_ml	0,8262	0,7806	0,8717
PE within 4 weeks - all visits	endogl_ng_ml	0,8233	0,7801	0,8666

10

20

30

40

【0090】

PE within 1 week : 1週間以内にPE

PE within 2 weeks : 2週間以内にPE

PE within 4 weeks : 4週間以内にPE

all visits : すべての来院

ratio_sFlt_1_PIGF : sFlt-1/PIGF比

ratio_endogl_PIGF : エンドグリン/PIGF比

tst_res_sFlt_1_pg_ml : 検査結果sFlt-1 pg/ml

tst_res_PIGF_pg_ml : 検査結果PIGF pg/ml

endogl_ng_ml : エンドグリン ng/ml

50

実施例 3 : 妊婦における短い時間ウインドウ以内の PE / HELLP の予測に関するバイオマーカー比、sFlt-1 / PlGF 比およびエンドグリン / PlGF 比と、ドップラー超音波診断結果との診断性能の比較

患者が来院後 1 週間 / 4 週間以内に PE / HELLP 症候群を発症するかどうかの分類子としての mPI-UtA、sFlt-1 / PlGF 比およびエンドグリン / PlGF 比の比較 (カットオフ値を使用)。この場合の集団は、ドップラー超音波診断結果を入手できる妊婦である。

【0091】

表 2 : 分類子としての mPI-UtA、sFlt-1 / PlGF 比およびエンドグリン / PlGF 比の比較

10

【0092】

【表 2】

エンドポイント	下記であれば陽性結果:	割合	[%]	95% CI	Abs. [N]
来院後 1 週間以内の PE/HELLP の診断	mPI-UtA > 95. パーセンタイル	Sensitivity	75.0	19.4 - 99.4	3 / 4
		Specificity	53.3	42.5 - 63.9	48 / 90
	sFlt-1/PlGF 比 ≥ 46	Sensitivity	100.0	39.8 - 100.0	4 / 4
		Specificity	80.0	70.2 - 87.7	72 / 90
	エンドグリン/PlGF 比 ≥ 0.2	Sensitivity	75.0	19.4 - 99.4	3 / 4
		Specificity	76.7	66.6 - 84.9	69 / 90
来院後 4 週間以内の PE/HELLP の診断	mPI-UtA > 95. パーセンタイル	Sensitivity	55.6	21.2 - 86.3	5 / 9
		Specificity	51.9	40.4 - 63.3	41 / 79
	sFlt-1/PlGF 比 ≥ 46	Sensitivity	77.8	40.0 - 97.2	7 / 9
		Specificity	82.3	72.1 - 90.0	65 / 79
	エンドグリン/PlGF 比 ≥ 0.2	Sensitivity	55.6	21.2 - 86.3	5 / 9
		Specificity	78.5	67.8 - 86.9	62 / 79

20

Sensitivity : 感度

Specificity : 特異度

30

【0093】

両比とも両方の予測タスクに関してドップラー超音波診断結果より優れていると思われる。sFlt-1 / PlGF 比はエンドグリン / PlGF 比より良好な性能をもつと思われる (選択したカットオフで)。

【0094】

患者が来院後 1 週間 / 4 週間以内に PE / HELLP 症候群を発症するかどうかの分類子としての sFlt-1 / PlGF 比およびエンドグリン / PlGF 比 (カットオフ値を使用)。この場合の集団はすべて、異常なドップラー超音波診断結果を伴う妊婦である。

40

【0095】

表 3 : 分類子としての sFlt-1 / PlGF 比およびエンドグリン / PlGF 比の比較

【0096】

【表 3】

エンドポイント	下記であれば陽性結果:	割合	[%]	95 % CI	Abs. [N]
来院後 1 週間以内の PE/HELLP の診断	sFlt-1/PIGF ratio \geq 46	Sensitivity	100.0	29.2 - 100.0	3 / 3
		Specificity	81.0	65.9 - 91.4	34 / 42
	Endoglin/PIGF ratio \geq 0.2	Sensitivity	100.0	29.2 - 100.0	3 / 3
		Specificity	76.2	60.5 - 87.9	32 / 42
来院後 4 週間以内の PE/HELLP の診断	sFlt-1/PIGF ratio \geq 46	Sensitivity	80.0	28.4 - 99.5	4 / 5
		Specificity	81.6	65.7 - 92.3	31 / 38
	Endoglin/PIGF ratio \geq 0.2	Sensitivity	60.0	14.7 - 94.7	3 / 5
		Specificity	76.3	59.8 - 88.6	29 / 38

Sensitivity : 感度
Specificity : 特異度

【 0 0 9 7 】

sFlt-1/PIGF比は、特に4週目の予測タスクにおいてエンドグリン/PIGF比より優れていると思われる。

表 4 : 図 4 A に示した数値に関する ROC 関連統計

【 0 0 9 8 】

【表 4】

ROC モデル	ROC 関連統計						
	Mann-Whitney				Somers' D (Gini)	ガンマ	タウ-a
	面積	標準誤差	95% Wald 信頼限界				
ratio_sFlt_1_PIGF	0.9211	0.0259	0.8703	0.9719	0.8422	0.8422	0.1021
ratio_endogl_PIGF	0.9118	0.0342	0.8448	0.9788	0.8236	0.8236	0.0998
tst_res_sFlt_1_pg_ml	0.9330	0.0225	0.8889	0.9771	0.8660	0.8660	0.1049
tst_res_PIGF_pg_ml	0.8482	0.0446	0.7608	0.9356	0.6964	0.6964	0.0844
endogl_ng_ml	0.9254	0.0326	0.8615	0.9892	0.8507	0.8507	0.1031

【 0 0 9 9 】

ratio_sFlt_1_PIGF : sFlt-1/PIGF比

ratio_endogl_PIGF : エンドグリン/PIGF比

tst_res_sFlt_1_pg_ml : 検査結果sFlt-1 pg/ml

tst_res_PIGF_pg_ml : 検査結果PIGF pg/ml

endogl_ng_ml : エンドグリン ng/ml

表 5 : 図 5 A に示した数値に関する ROC 関連統計

【 0 1 0 0 】

【表 5】

ROC モデル	ROC 関連統計						
	Mann-Whitney				Somers' D (Gini)	ガンマ	タウ-a
	面積	標準誤差	95% Wald 信頼限界				
ratio_sFlt_1_PIGF	0.9262	0.0241	0.8788	0.9735	0.8523	0.8523	0.1139
ratio_endogl_PIGF	0.9108	0.0317	0.8487	0.9729	0.8215	0.8215	0.1098
tst_res_sFlt_1_pg_ml	0.9438	0.0203	0.9041	0.9836	0.8877	0.8877	0.1186
tst_res_PIGF_pg_ml	0.8485	0.0410	0.7681	0.9288	0.6969	0.6969	0.0931
endogl_ng_ml	0.9238	0.0300	0.8650	0.9827	0.8477	0.8477	0.1133

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

ratio_sFlt_1_PIGF : sFlt-1/PIGF比
 ratio_endogl_PIGF : エンドグリン/PIGF比
 tst_res_sFlt_1_pg_ml : 検査結果sFlt-1 pg/ml
 tst_res_PIGF_pg_ml : 検査結果PIGF pg/ml
 endogl_ng_ml : エンドグリン ng/ml

実施例 4 : 1 週間以内の転帰としての妊娠高血圧腎症の分析 , 大規模コホート (n = 2 6 9)

R O C 曲線を作成するために用いた表中で、目標 N P V についてのカットオフ値を選択し、このカットオフにおける感度、特異度および P P V を推定することができる。これらすべての割合について、現サンプルサイズに基づく信頼区間が得られる。

10

【 0 1 0 2 】

妊娠後 2 4 ± 0 週目 ~ 4 0 ± 0 週目の患者について、初回来院時に得た試料において決定した s F l t - 1 / P l G F 比のカットオフ 3 8 は、妊娠高血圧腎症を予測するための N P V 9 8 . 9 % (両側 9 5 % 信頼区間 (two-sided 95% confidence interval) (L C L 9 5) 9 7 . 3 %) を与えた ; 感度推定率 8 8 . 2 % (L C L 9 5 : 7 2 . 6 %) および特異度推定率 7 9 . 8 % (L C L 9 5 : 7 5 . 9 %) 。 P P V 推定率は 2 4 . 4 % (L C L 9 5 : 1 7 . 1 %) である。1 2 3 対 3 7 2 の対象がこのカットオフで検査陽性 / 陰性であり、1 2 3 の検査陽性中 3 0 、および 3 7 2 の検査陰性中 4 が P E を発症すると予想される。これらの結果を同様に次表にまとめる。

20

【 0 1 0 3 】

表 5 : A U C 、 L C L 9 5 および U C L 9 5 値 , 大規模コホート

【 0 1 0 4 】

【表 6】

応答	バイオマーカー	AUC	LCL95	UCL95
PE within 1 week after visit 1	sFlt_1	0.9026	0.8417	0.9634
PE within 1 week after visit 1	PIGF	0.8343	0.7697	0.8989
PE within 1 week after visit 1	Endoglin	0.8702	0.811	0.9293
PE within 1 week after visit 1	ratio_sFlt_1_PIGF	0.897	0.8349	0.9591
PE within 1 week after visit 1	ratio_Endogl_PIGF	0.8693	0.8122	0.9264
PE within 2 weeks after visit 1	sFlt_1	0.8435	0.777	0.9101
PE within 2 weeks after visit 1	PIGF	0.8036	0.739	0.8682
PE within 2 weeks after visit 1	Endoglin	0.849	0.7888	0.9093
PE within 2 weeks after visit 1	ratio_sFlt_1_PIGF	0.848	0.7817	0.9142
PE within 2 weeks after visit 1	ratio_Endogl_PIGF	0.8445	0.784	0.9049
PE within 4 weeks after visit 1	sFlt_1	0.8513	0.7967	0.9058
PE within 4 weeks after visit 1	PIGF	0.8204	0.7699	0.8709
PE within 4 weeks after visit 1	Endoglin	0.8476	0.7986	0.8966
PE within 4 weeks after visit 1	ratio_sFlt_1_PIGF	0.8598	0.8077	0.912
PE within 4 weeks after visit 1	ratio_Endogl_PIGF	0.8512	0.8037	0.8987

30

40

【 0 1 0 5 】

PE within 1 week after visit 1 : 来院1の後、1週間以内にPE
 PE within 2 weeks after visit 1 : 来院1の後、2週間以内にPE
 PE within 4 weeks after visit 1 : 来院1の後、4週間以内にPE
 Endoglin : エンドグリン
 ratio_sFlt_1_PIGF : sFlt-1/PIGF比
 ratio_Endogl_PIGF : エンドグリン/PIGF比

50

【 図 1 A 】

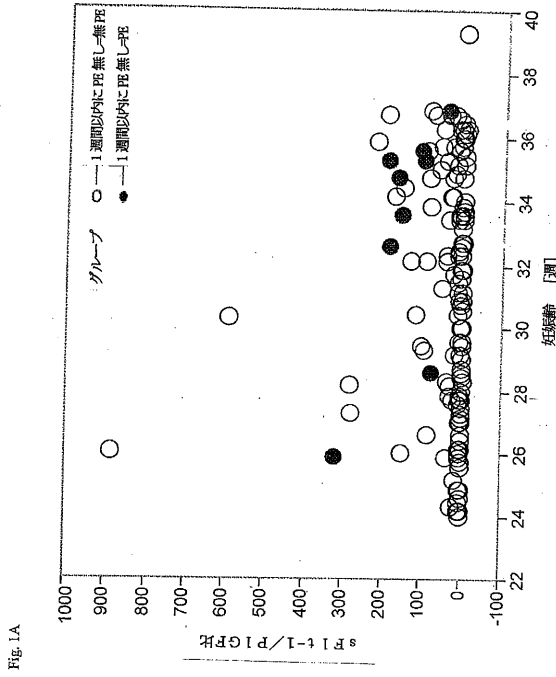


Fig. 1A

【 図 1 B 】

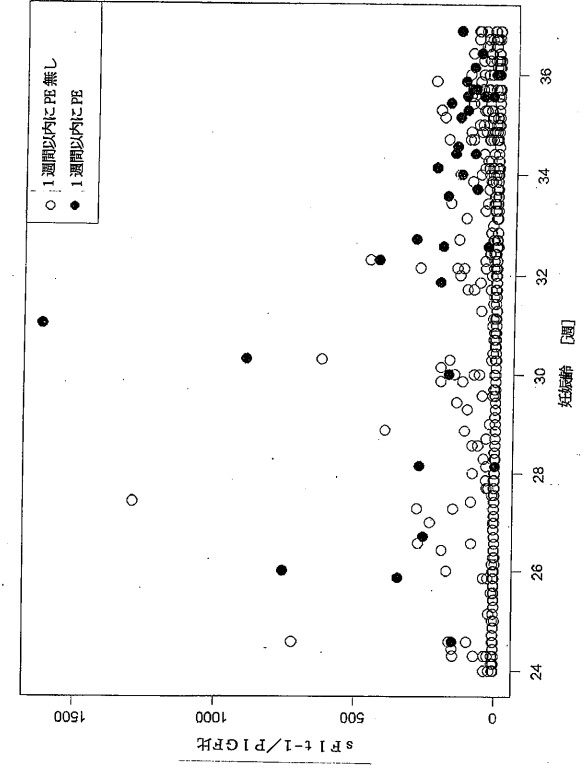


Fig. 1B

【 図 2 A 】

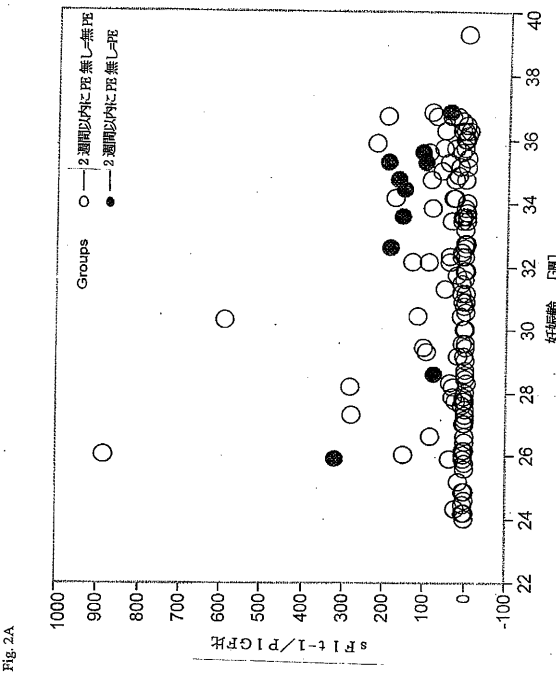


Fig. 2A

【 図 2 B 】

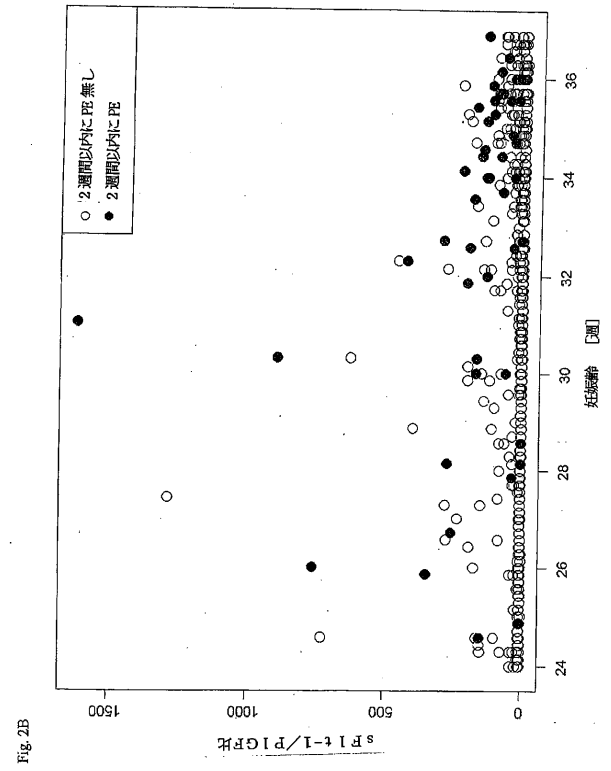
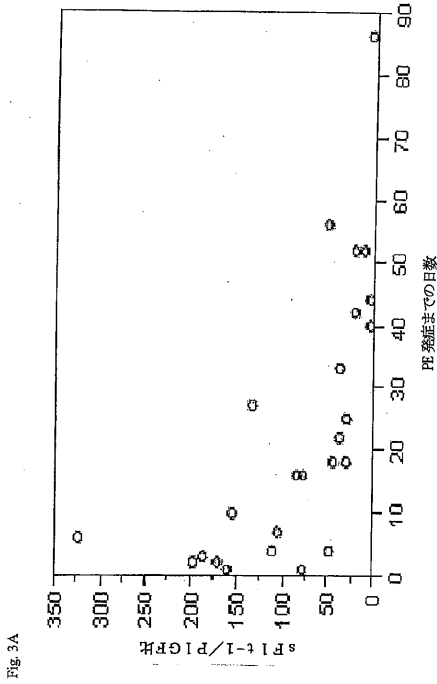
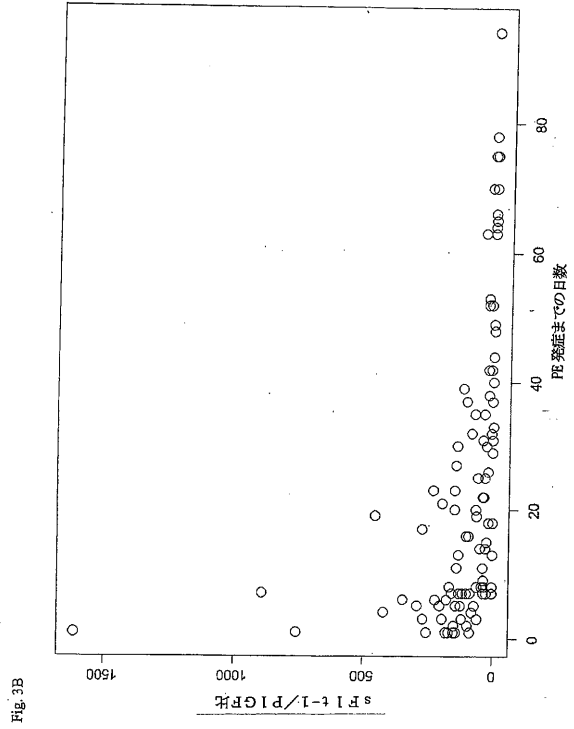


Fig. 2B

【 図 3 A 】

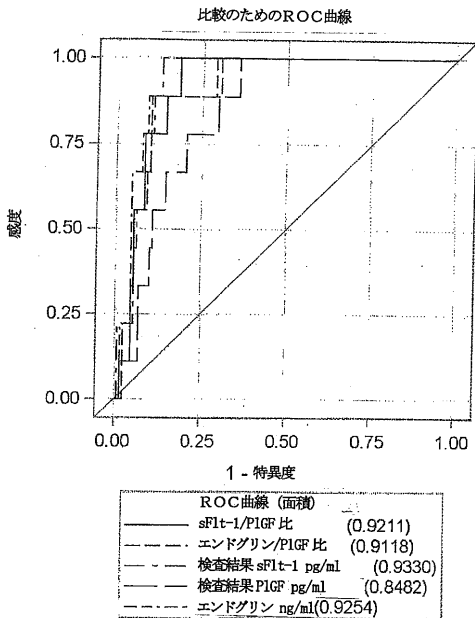


【 図 3 B 】



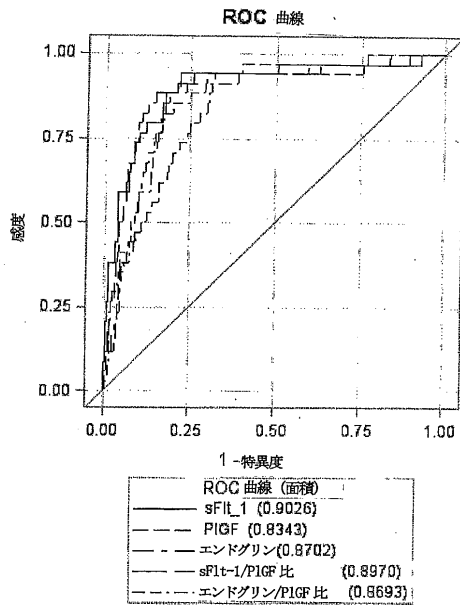
【 図 4 A 】

Fig. 4A



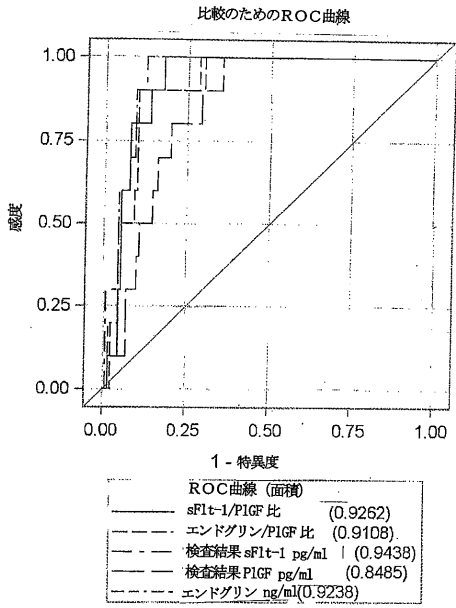
【 図 4 B 】

Fig. 4B



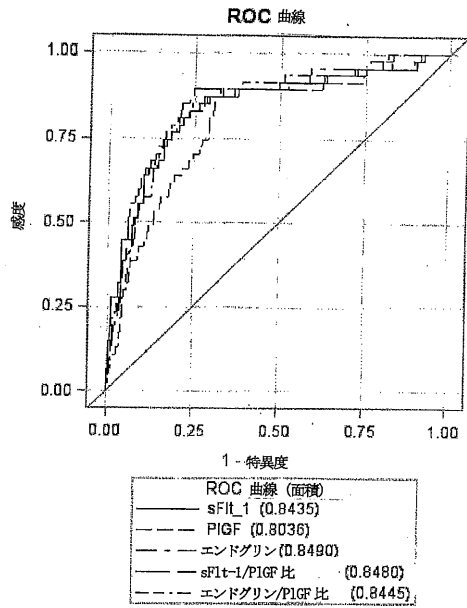
【 図 5 A 】

Fig. 5A



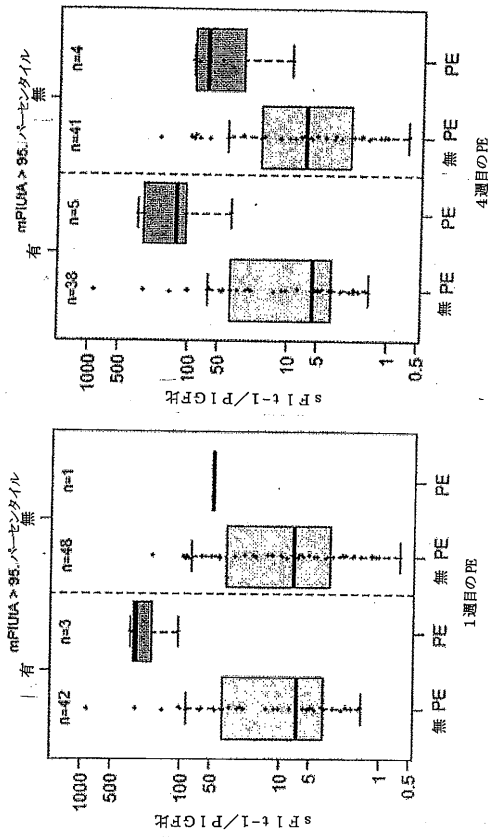
【 図 5 B 】

Fig. 5B



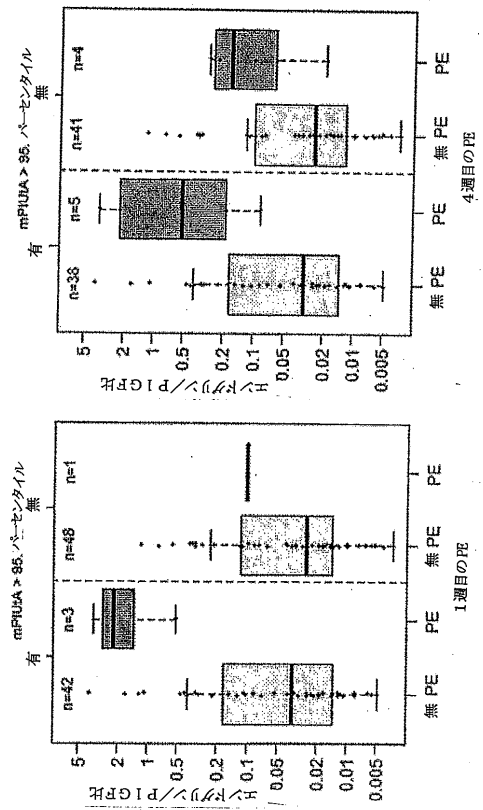
【 図 6 A 】

Fig. 6A



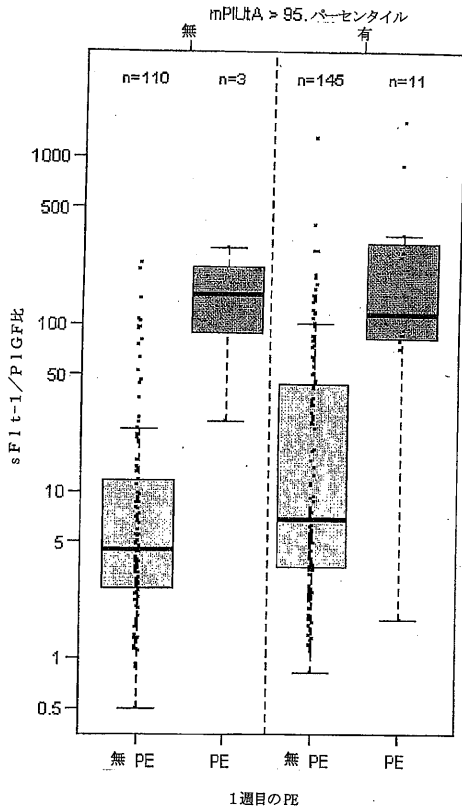
【 図 6 B 】

Fig. 6B



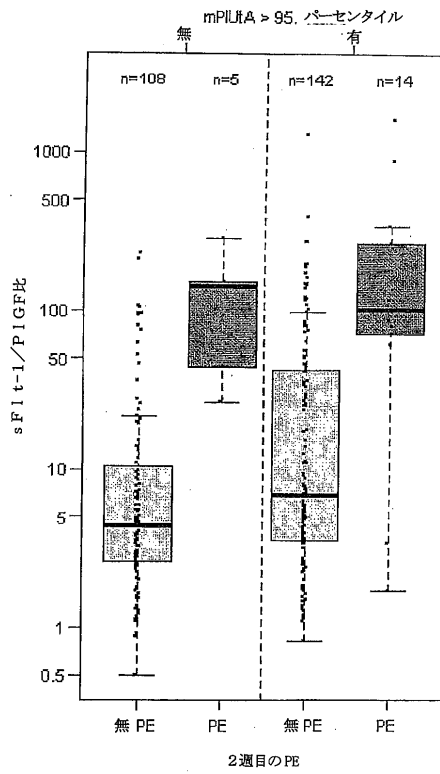
【 図 7 A 】

Fig. 7A



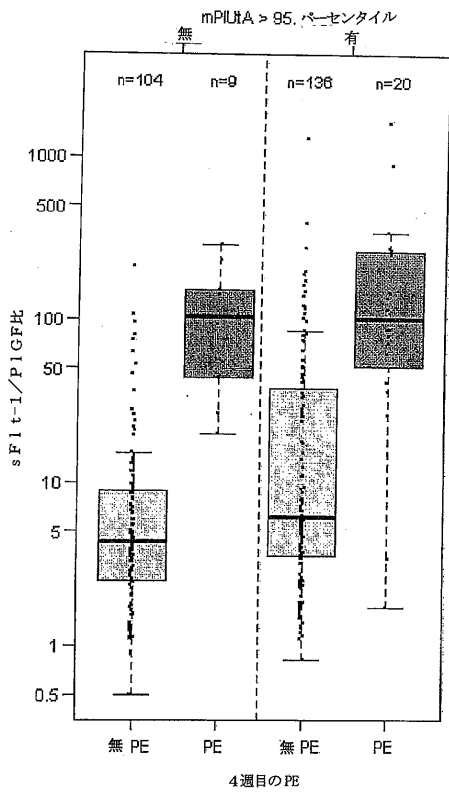
【 図 7 B 】

Fig. 7B



【 図 7 C 】

Fig. 7C



【 図 8 】

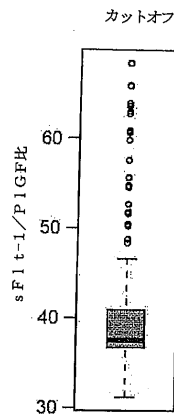


Fig. 8

【手続補正書】

【提出日】平成27年1月13日(2015.1.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

妊娠対象が短い時間ウインドウ以内に妊娠高血圧腎症のリスクをもたないかどうかを診断するための、下記を含む方法：

a) その対象の試料中の s F l t - 1、エンドグリンおよび P l G F からなる群から選択される少なくとも1種類の血管形成バイオマーカの量を決定する；そして

b) その量を基準と比較し、それにより、s F l t - 1 およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、また P l G F の場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約98%の陰性的中率で診断を行なうことができる。

【請求項2】

その方法が、段階 a) において対象の試料中の s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の量を決定し、段階 b) においてその比の値を基準値と比較し、それにより、その比の値が基準値と比較して等しいかまたは低ければ対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

その方法が、段階 b) の前に、段階 a) において決定した s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の量から比を計算するさらなる段階を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

基準値が約46以下、好ましくは約33である、請求項2または3に記載の方法。

【請求項5】

基準値が約38以下、好ましくは約38である、請求項2～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

短期間が約1週間から約2週間までの期間である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

妊娠対象が妊娠の約20週目～約40週目である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

試料が血液、血漿、血清または尿の試料である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

その方法がさらに、診断に基づいて患者管理措置を推奨することを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

患者管理措置は、(i) 対象が妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断されなければ下記の措置の群から選択され：緊密なモニタリング、入院、降圧薬の投与、および生活様式推奨事項、(ii) 対象が妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断されれば外来通院モニタリングである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するための、妊娠対象の試料中の少なくとも1種類のバイオマーカ s F l t - 1、エンド

グリンおよび P L G F、またはそれに特異的に結合する少なくとも 1 種類のその検出剤の使用。

【請求項 1 2】

対象が、異常なドップラー超音波診断結果に基づいて妊娠高血圧腎症、子癩および/または H E L L P 症候群を発症するリスクをもつと同定されている、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法または請求項 1 1 に記載の使用。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 0 または 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法を実施することにより妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するために適合させた、下記のものを含むデバイス：

a) s F l t - 1、エンドグリンおよび P L G F からなる群から選択される少なくとも 1 種類の血管形成バイオマーカーに特異的に結合する少なくとも 1 種類の検出剤を含む分析ユニットであって、妊娠対象の試料中の s F l t - 1、エンドグリンおよび/または P L G F の量を決定するために適合させたユニット；ならびに

b) 下記のためのアルゴリズムを実装したデータプロセッサを含む評価ユニット：前記の量を基準と比較し、それにより、s F l t - 1 およびエンドグリンの場合はその量が基準と比較して等しいかまたは少なければ、また P L G F の場合は等しいかまたは多ければ、対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断し、その際、基準は少なくとも約 9 8 % の陰性的中率で診断を行なうことができる。

【請求項 1 4】

分析ユニットが、対象の試料中のバイオマーカー s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P L G F の量を決定するための検出剤を含み、評価ユニットに実装されたアルゴリズムが s F l t - 1 またはエンドグリンと P L G F の量の比の値を基準値と比較し、それにより、その比の値が基準値と比較して等しいかまたは低ければ対象は短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないと診断する、請求項 1 3 に記載のデバイス。

【請求項 1 5】

評価ユニットに実装されたアルゴリズムが、さらに s F l t - 1 またはエンドグリンと P L G F の量の比を計算する、請求項 1 3 または 1 4 に記載のデバイス。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 0 または 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するために適合させたキットであって、s F l t - 1、エンドグリンおよび P L G F からなる群から選択される血管形成バイオマーカーの量を決定するための少なくとも 1 種類の検出剤、ならびにその方法を実施するための指示を含むキット。

【請求項 1 7】

キットが妊娠対象の試料中の s F l t - 1 および/またはエンドグリンの量を決定するための検出剤ならびに P L G F の量を決定するための検出剤を含む、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

妊娠対象が短期間以内に妊娠高血圧腎症を発症するリスクをもたないかどうかを診断するための診断剤もしくは薬剤または組成物を調製するための、妊娠対象の試料中の少なくとも 1 種類のバイオマーカー s F l t - 1、エンドグリンおよび P L G F、またはそれに特異的に結合する少なくとも 1 種類の検出剤の使用。

【請求項 1 9】

患者管理措置を推奨するための診断剤もしくは薬剤または組成物を調製するための、妊娠対象の試料中の少なくとも 1 種類のバイオマーカー s F l t - 1、エンドグリンおよび P L G F、またはそれに特異的に結合する少なくとも 1 種類の検出剤の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/063115

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/128357 A2 (PRNOTA N V [BE]; KAS KOEN [BE]) 20 October 2011 (2011-10-20) claims 1-21	1-17
X	----- GRILL S ET AL: "Potential markers of preeclampsia - A review", REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 7, no. 70, 14 July 2009 (2009-07-14), pages 1-14, XP002599715, ISSN: 1477-7827, DOI: 10.1186/1477-7827-7-70 abstract; table 1 ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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		Date of mailing of the international search report
18 July 2013		31/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stachowiak, Olaf

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/063115

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>VERLOHREN S ET AL: "An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, MOSBY, ST LOUIS, MO, US, vol. 202, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 161.e1-161.e11, XP026869544, ISSN: 0002-9378 [retrieved on 2009-10-21] pages e3-e4; figure 1</p> <p>-----</p>	1-17
X	<p>LIM JI HYAE ET AL: "Effective prediction of preeclampsia by a combined ratio of angiogenesis-related factors.", June 2008 (2008-06), OBSTETRICS AND GYNECOLOGY JUN 2008, VOL. 111, NR. 6, PAGE(S) 1403 - 1409, XP002688316, ISSN: 0029-7844 page 1404, left-hand column, paragraph 3 - page 1405, left-hand column, paragraph 2; tables 3,4</p> <p>-----</p>	1-17
X	<p>VERLOHREN S ET AL: "Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia", CLINICAL SCIENCE 2012 PORTLAND PRESS LTD GBR, vol. 122, no. 2, 20 September 2011 (2011-09-20), pages 43-52, XP002688317, ISSN: 0143-5221 page 47, right-hand column, paragraph 2 - page 48, right-hand column, paragraph 1; table 1</p> <p>-----</p>	1-17
X	<p>DE VIVO ANTONIO ET AL: "Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia", ACTA OBSTETRICIA ET GYNECOLOGICA SCANDINAVICA : AOGS / PUBL. BY THE SCANDINAVIAN ASSOCIATION OF OBSTETRICIANS AND GYNAECOLOGISTS, SCANDINAVIAN ASSOCIATION OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, UK, vol. 87, no. 8, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 837-842, XP008149744, ISSN: 1600-0412, DOI: :10.1080/00016340802253759 [retrieved on 2010-12-31] abstract page 839, right-hand column, paragraph 1 - page 840, left-hand column, paragraph 2; tables 2-4</p> <p>-----</p>	1-17

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/063115

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011128357 A2	20-10-2011	AU 2011240039 A1	11-10-2012
		CA 2793487 A1	20-10-2011
		CN 103038645 A	10-04-2013
		EP 2558868 A2	20-02-2013
		US 2013045889 A1	21-02-2013
		WO 2011128357 A2	20-10-2011

フロントページの続き

(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, RU, TJ, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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, PA, 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

(72)発明者 フント, マルティン

スイス国 6048 ホル, クラインヴィルヘーエ 7

(72)発明者 シェドル, マリア

ドイツ国 82065 パイエルブルン, アン・デア・ツィーゲライ 1アー

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 JA01

专利名称(译)	应用sFlt-1 / PIGF比率或内皮糖蛋白/ PIGF比率以在特定时间段内排除妊娠期高血压肾病的发作的方法和 方法		
公开(公告)号	JP2015525870A	公开(公告)日	2015-09-07
申请号	JP2015519020	申请日	2013-06-24
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	フントマルティン シエドルマリア		
发明人	フント,マルティン シエドル,マリア		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/689 G01N2333/475 G01N2333/515 G01N2333/71 G01N2333/912 G01N2800/368 G16H50/30 G16H50/70		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/48.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/JA01		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	2012173886 2012-06-27 EP 2012183508 2012-09-07 EP		
其他公开文献	JP5937756B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于产前诊断先兆子痫的诊断测定领域。具体而言，本发明涉及一种用于诊断怀孕受试者是否在短时间内不具有先兆子痫风险的方法，包括a) 确定选自sFlt-1，Endoglin和sflt-1的至少一种血管生成生物标志物的量。所述受试者的样品中的P1GF，和b) 将该量与参照物进行比较，由此在短时间内没有发生先兆子痫风险的受试者被诊断出如果该量与参照案例相比相同或减少在P1GF的情况下，sFlt-1和Endoglin的结合相同或增加，其中所述参考允许使诊断具有至少约98%的阴性预测值。进一步设想用于实施所述方法的装置和试剂盒。

(21) 出願番号	特願2015-519020 (P2015-519020)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年6月24日 (2013.6.24)		
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月13日 (2015.1.13)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/063115		
(87) 国際公開番号	W02014/001244		
(87) 国際公開日	平成26年1月3日 (2014.1.3)		
(31) 優先権主張番号	12173886.8		
(32) 優先日	平成24年6月27日 (2012.6.27)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	12183508.6	(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
(32) 優先日	平成24年9月7日 (2012.9.7)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		