

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4668501号  
(P4668501)

(45) 発行日 平成23年4月13日(2011.4.13)

(24) 登録日 平成23年1月21日(2011.1.21)

(51) Int.Cl.

F I

<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A 6 1 K 45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 9/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00	
<b>A 6 1 P 9/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 9/12	

請求項の数 15 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-538816 (P2001-538816)  
 (86) (22) 出願日 平成12年11月10日(2000.11.10)  
 (65) 公表番号 特表2003-515138 (P2003-515138A)  
 (43) 公表日 平成15年4月22日(2003.4.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2000/004315  
 (87) 国際公開番号 W02001/036979  
 (87) 国際公開日 平成13年5月25日(2001.5.25)  
 審査請求日 平成19年11月12日(2007.11.12)  
 (31) 優先権主張番号 9927125.6  
 (32) 優先日 平成11年11月16日(1999.11.16)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 509103428  
 ペリナタル ダイアグノスティクス リミ  
 テッド  
 Perinatal Diagnosti  
 cs Limited  
 イギリス国 エヌイー35 9ピーディー  
 タインアンドウィア州 ボルドン ボル  
 ドン ビジネス パーク ユニット 10  
 (74) 代理人 100073184  
 弁理士 柳田 征史  
 (74) 代理人 100090468  
 弁理士 佐久間 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎盤ヒトニューロキニンB前駆体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する結合パートナーを含んでなる、妊娠誘発性高血圧、あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断のためのキット。

【請求項2】

生体試料中のニューロキニンBのレベルを測定するための測定法を実施し、さらにその結果を妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の発症と関連付けるための使用説明書をさらに含んでなる請求項1記載のキット。

【請求項3】

生体試料中のニューロキニンBのレベルを測定するための測定法を実施し、さらにその測定結果を妊娠誘発性高血圧ならびに子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する結合パートナーを含んでなる、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の将来の重篤性の評価において使用するためのキット。

【請求項4】

前記結合パートナーが、ニューロキニンB前駆体、またはニューロキニンB、あるいはそれらのエピトープ断片またはエピトープ変異体に特異的な抗体であることを特徴とする請求項1から3何れか1項記載のキット。

10

20

## 【請求項 5】

前記結合パートナーが、配列番号 1 の配列を有するヒトニューロキニン B 前駆体あるいはそのエピトープ変異体またはエピトープ断片に特異的な抗体であることを特徴とする請求項 1 から 4 何れか 1 項記載のキット。

## 【請求項 6】

ラジオイムノアッセイキット、酵素免疫測定法キット、イムノラジオメトリックアッセイキット、ラジオレセプターアッセイキット、または蛍光もしくは発光ベースのキットであることを特徴とする請求項 1 から 5 何れか 1 項記載のキット。

## 【請求項 7】

生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を測定することを含む、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を検査する方法。

10

## 【請求項 8】

生体試料中のヒトニューロキニン B またはその前駆体、あるいはそのエピトープ変異体またはエピトープ断片の濃度を測定することを含む、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧、あるいはヒト被検者での初期における子癇前症または関連する胎児合併症を検査する方法。

## 【請求項 9】

ニューロキニン B およびその前駆体が、それぞれ配列番号 1 および 2 の配列を有することを特徴とする請求項 8 記載の方法。

20

## 【請求項 10】

請求項 1 または 2 記載のキットの使用を含むことを特徴とする、請求項 7 から 9 何れか 1 項記載の方法。

## 【請求項 11】

生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を測定し、さらにその結果を妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けることを含む、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の将来の程度を検査する方法。

## 【請求項 12】

生体試料中のヒトニューロキニン B の濃度を測定することを含むことを特徴とする請求項 11 記載の方法。

30

## 【請求項 13】

請求項 3 から 5 何れか 1 項記載のキットの使用を含むことを特徴とする請求項 11 または 12 記載の方法。

## 【請求項 14】

前記キットが、ニューロキニン B に特異的な抗体を含むことを特徴とする請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

前記キットが、ラジオイムノアッセイキット、酵素免疫測定法キット、イムノラジオメトリックアッセイキット、ラジオレセプターアッセイキット、または蛍光もしくは発光ベースのキットであることを特徴とする請求項 13 または 14 記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

本発明は、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する（もしくはその経過に続く）胎児合併症の兆候を予測する手段としての、胎盤によるヒトニューロキニン B 前駆体の産生の検出、およびニューロキニン B 遺伝子産物あるいはその変異体または断片の検出に関する。また、本出願は、母体血液中に分泌された過剰なニューロキニン B の効果を抑制することによって妊娠誘発性高血圧または子癇前症を予防または治療する方法に関する。妊娠の最も捕らえどころが無くかつ複雑な症状である妊娠誘発性高血圧（PIH）および子癇前症は、定義および管理するのが非常に困難であった。子癇前症は、西側諸国において、今でも最も一般的でかつ生命に関わる妊娠合併症の 1 つである。子癇前症の兆候およ

50

び症状はいつも一連の症状として現れるため、主な原因を解明するのは困難であった。従って、一般的に、母体の高血圧および蛋白尿の特徴を示す症候群として定義されているが、母体の肝臓、凝固、および神経系等に関連する広範囲の合併症を含む(Henriksen, T., (1998) Scand. J. Rheumatol. Suppl. 107 86-91)。子癇前症の臨床的問題は、通常、妊娠後期においてのみ明白になり、妊娠の最初の3ヶ月の間に出現すると考えられている。胎盤組織が母体の子宮に存在する場合にのみ子癇前症が現れることは明らかであろう。実際、子宮が異常胎盤組織のみを有する胞状奇胎の症状が子癇前症と共に表れる(Nugent, C. E., et al (1966) Obstet. Gynecol. 87 829-31)。妊娠の経過の間に子癇前症が診断され、分娩の間に胎盤組織が外科的に除去または追い出されると、症状は最終的に消える。胎盤/子宮脈管系の乏しい発達から母体と胎児との間の免疫不適合まで広範囲にわたる、子癇前症の原因についての多くの示唆が示されている。それら理論はいくつかの物質を示唆するが、それら物質はその症候群の全身的効果を説明するものではない。多くの症状は、高血圧の二次的影響の結果であり、その症候群の直接的原因ではないと思われる。従って、PIHまたは子癇前症の早期検出は、高血圧、ならびに例えば痙攣、血液凝固問題(blot clotting problems)等の子癇前症に関連する他の合併症の特異的治療を含む、予防手段をとることを可能とする大きな利点を有する。

子癇前症を有する妊婦において現れる胎盤損傷および高血圧は、成長遅延および胎児仮死等の胎児合併症の危険性の上昇に関連すると考えられている。極端な場合、それは流産の原因となる。他の研究において、子癇前症は、胎児成長遅延への母体および胎児の順応と仮定されている。胎児成長遅延を有する全ての妊婦が子癇前症を発症するわけではないので、決定的因子は母体の反応である(Walker, J. (2000) The Lancet 356 1260-1265)。その順応の特徴は、子癇前症のみならず、胎児成長遅延および流産にも存在する。例えば、母体血漿量の正常な増加の失敗は、障害のある胎児成長および子癇前症の両方に関連する(Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ (2000) Cochrane Database Syst Rev 2 CD000167)。例えば血栓嗜好症等の子癇前症において観察される問題は、異常な胎盤における血栓性病変の結果であることが示唆されている(Mousa HA, Alfirevicl Z (2000) Hum Reprod 151830-3)。従って、子癇前症と胎児成長遅延および胎児仮死は関連し、子癇前症の診断法および治療が、それら胎児症状の予測、診断および/または治療にも適合し得ることは明らかである。

ニューロキニンB(NKB)はタキキニンと称されるペプチドファミリーに属し、そのファミリーの中で最初に公知となりかつ最も良く知られているのが1931年に発見されたサブスタンスPである(von Euler, U.S. and Gaddum, J.H. (1931) J Physiol 72: 74-87)。タキキニンファミリーの他の2つのメンバーの発見はさらに50年後であり、その一方はサブスタンスKすなわちニューロキニンA(Kimura, S., et al (1983) Proc. Japan Acad 59B 101-104)であり、もう一方はニューロキニンKであり、現在ニューロキニンBとして知られている(Kangawa, K., et al (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 114 533-540)。タキキニンは、平滑筋収縮から、血管拡張、疼痛伝達、神経性炎症、免疫系の活性化までの広範囲な生物学的作用に関連している(Longmore, J., et al., (1997) Canadian J. Physiol. & Pharmacol. 75 612-621)。ニューロキニンBは、腸間膜血管床の血管収縮(D'Orleans-Juste, P. et al (1991). Eur. J. Pharmacol. 204 329-334)および肝門脈の収縮(Mastrangelo, D., et al (1987) Eur J Pharmacol. 134, 321-6)の両方を生じさせる最も強力なニューロキニンであることが分かっている。また、ニューロキニンBは、ファミリーの中でNK<sub>3</sub>受容体で作用する最も強力なメンバーであり、サブスタンスPおよびKは心拍数を下げるが、NK<sub>3</sub>受容体アゴニストはイヌの冠動脈血液供給中に灌流させた場合に心拍数を高める反対の効果を有する(Thompson, G.W. et al (1998) American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology 275 (5), 1683-1689)。動物モデルにおいて、ニューロキニンBのモルモットへの静脈注射が用量依存的な高血圧をもたらすことが示されており、高レベルのニューロキニンBアゴニストが動物に不快感をもたらした(Roccon, A., et al (1996) Brit. J. Pharmacol. 118 1095-1102)。同様の実験が、ラットにおけるニューロキニンBの静脈注入によって血圧

10

20

30

40

50

が上昇することを示している (Page et al., (2000) Nature 405 797-800)。ニューロキニン B は実験動物から採取した任意の末梢組織において正確には認められていない ; 例えば Moussaoui らは、非常に高感度でかつ特異的な測定系を用いて広範囲の末梢組織を調べて、ニューロキニン B の形跡を全く見つけることができなかつた (Neuroscience (1992) 48, 967-978)。

プロセッシングによって他の哺乳類 (ウシ、ブタ、ラット、およびマウス) のニューロキニン B と同一のペプチドを生じさせるヒトニューロキニン B 前駆体が同定された (Incyte Pharmaceuticals Inc., 国際特許出願第 W098/57986 号)。驚くべきことに、そのニューロキニン B 前駆体は、妊娠の間、胎盤組織によって産生され、さらにニューロキニン B および前駆体の断片が母体の血流中に入ることを我々は発見した。

正常な妊娠において、出産間近に実質的レベル (例えば 100 ピコモル程度) のニューロキニン B が母体血流中において認められるが、それ以前にはゼロまたは非常に低レベルであることを我々は見出した。しかしながら、時には、妊娠初期 (例えばたった 9 週間後) に出産間近のレベルが特定されており、さらに妊娠誘発高血圧または子癇前症の場合、非常に高い (ナノモル) 濃度のニューロキニン B が、出産間近の母体の血漿において認められる。従って、ニューロキニン B、ニューロキニン B 前駆体またはその分解産物、あるいはそれらの変異体の初期における上昇した血漿レベルの検出は、高血圧または子癇前症の発症の指標を提供し、さらにそれら症状の将来の重篤性の指標をも提供するであろう。さらには、循環ニューロキニン B レベルの低下 (またはその効果の低下) は、それら症状において認められる母体に対する不都合な効果を改善するであろう。子癇前症と、胎児成長遅延および / または胎児仮死等の胎児合併症との間の関連性の結果として、ニューロキニン B アゴニストまたはアンタゴニストはそれら症状を改善するのに有用であろう。また、ヒトニューロキニン B 前駆体の過剰産生は、妊娠していない個体での特定の高血圧症状の要因となり得る (ニューロキニン B の効果、または前駆体の他の 1 つ以上の分解産物の効果の何れかを介して)。

#### 発明の概要

本発明の第 1 の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧を予測する方法を提供する。

本発明の第 2 の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での子癇前症または関連する胎児合併症を予測する方法を提供する。

本発明の第 3 の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧を診断する方法を提供する。

本発明の第 4 の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での子癇前症または関連する胎児合併症を診断する方法を提供する。

好ましくは、第 1、第 2、第 3、または第 4 の態様の方法は、例えば血液等の生体試料中のニューロキニン B の濃度を評価することを含む。

本発明の第 5 の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価し、さらにその結果を妊娠誘発性高血圧の予測される将来の重篤性と関連付けることによって、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧の将来の程度を予測する方法を提供する。

本発明の第 6 の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価し、さらにその結果を子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けることによって、ヒト被検者における子癇前症または関連する胎児合併症の将来の程度を予測する方法を提供する。好ましくは、第 5 および第 6 の態様の方法は、例えば血液等の生体試料中におけるヒトニューロキニン B の濃度を評価し、さらにその結果をそれぞれ妊娠誘発性高血圧あるいは子

10

20

30

40

50

癩前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けることを含む。  
本発明の第7の態様において、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を投与することによって、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧を予防または治療する方法を提供する。

本発明の第8の態様において、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を投与することによって、ヒト被検者での子癩前症または関連する胎児合併症を予防または治療する方法を提供する。

本発明の第9の態様において、妊娠誘発性高血圧の予測または診断で用いるための診断薬の製造における、ヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用を提供する。

10

本発明の第10の態様において、子癩前症または関連する胎児合併症の予測または診断で用いるための診断薬の製造における、ヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用を提供する。

好ましくは、第9および第10の態様は、ヒトニューロキニンB前駆体のエピトープ変異体またはエピトープ断片の使用を含む。より好ましくは、本方法は、妊娠誘発性高血圧あるいは子癩前症または関連する胎児合併症の予測または診断で用いるための診断薬の製造におけるニューロキニンBの使用を含む。

本発明の第11の態様において、妊娠誘発性高血圧の予防または治療のための薬剤の製造における、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質の使用を提供する。

本発明の第12の態様において、子癩前症または関連する胎児合併症の予防または治療のための薬剤の製造における、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質の使用を提供する。

20

第11および第12の態様の好ましい実施形態において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癩前症または関連する胎児合併症の予防または治療において使用するための、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を含む薬剤組成物を提供する。

本発明の第13の態様において、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、妊娠誘発性高血圧の予測または診断のためのキットを提供する。

本発明の第14の態様において、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、子癩前症または関連する胎児合併症の予測または診断のためのキットを提供する。

30

本発明の第15の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を妊娠誘発性高血圧の予測される将来の発症と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、妊娠誘発性高血圧の予測または診断のためのキットを提供する。

本発明の第16の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を子癩前症または関連する胎児合併症の予測される将来の発症と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、子癩前症または関連する胎児合併症の予測または診断のためのキットを提供する。

40

本発明の第17の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を妊娠誘発性高血圧の予測される将来の重篤性と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、妊娠誘発性高血圧の将来の程度の評価において使用するためのキットを提供する。

本発明の第18の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を子癩前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、子癩前症また

50

は関連する胎児合併症の将来の程度の評価において使用するためのキットを提供する。好ましくは、本発明の第13の態様から第18の態様までのキットは、ニューロキニンB前駆体、ニューロキニンB、あるいはそれらのエピトープ変異体またはエピトープ断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む。さらに好ましくは、本キットは、図1または2のポリペプチド配列、あるいはそのエピトープ変異体またはエピトープ断片に対する結合パートナーを含む。

本発明の第19の態様において、低血圧の場合に血液容量を減らすための薬剤の調製におけるニューロキニンBアゴニストまたはニューロキニンBの使用を提供する。

本発明の第20の態様において、低血圧の場合に血液容量を減らすためのニューロキニンBアゴニストまたはニューロキニンBの使用を提供する。

本発明の第21の態様において、毒素発生物質の含有量を減らすようにヒト被検者の食事を調整することを含む、ヒト被検者での子癇前症を改善する方法を提供する。

本発明の第22の態様において、門脈中の潜在的毒素の濃度を減らすようにヒト被検者の食事パターンを調整することを含む、ヒト被検者での子癇前症を改善する方法を提供する。

。

本発明の第23の態様において、毒素発生物質の量を減らすことによる、ヒト被検者での子癇前症を改善するための食事方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、クローン化ヒトニューロキニンB前駆体のポリペプチド配列を示す(登録番号aa f76980で利用可能)。

図2は、活性ニューロキニンBペプチドのポリペプチド配列を示す。

図3は、ヒトニューロキニンB前駆体の胎盤cDNAのポリヌクレオチド配列を示す：ATGは開始コドンであり；TAGは終止コドンであり；AAATAAAはポリアデニル酸シグナルであり；AAAAAはポリAテイルであり；さらにGGCACAGAGCTGCTCCACAAGGCACCCは、ウシクローンに類似の、完全遺伝子を増幅するために用いられるニューロキニンB前駆体(登録番号08858)の人類cDNAクローン138761(登録番号R63635)に基づくPCRプライマーである。

図4は、27928塩基対プロモーター領域、イントロン、および7つのエキソン(下線)を含む、ニューロキニンBのゲノム配列を示す。

図5は、9週、13週、および妊娠満期に採取したmRNAを用いた、完全ヒトニューロキニンB前駆体の半定量的PCRの結果を示す。733bp完全長のニューロキニンB前駆体cDNAを増幅するため、9週、13週、および妊娠満期(T)に採取したmRNAを用いて逆転写PCRを実施した。-アクチンのためのプライマーを対照(257bp)として用いた。M1は1kbのDNAラダーを示し；M2は100bpのDNAラダーを示す。

図6は、ヒト妊娠血漿およびヒト妊娠満期胎盤における酸化ニューロキニンBおよび還元ニューロキニンBの結果を示す。胎盤抽出物中に、相当量(妊娠初期において $2.1 \text{ pg g}^{-1}$ 、妊娠満期において $2.5 \text{ pg g}^{-1}$ )のペプチドが存在していることが示され、そのクロマトグラフィーの挙動は、合成NKBのものに一致した。抽出の間における胎盤NKBの部分的酸化は、2つのメチオニン残基の一方または両方が酸化された、3つの酸化形態の産生をもたらした(aは血漿、bは胎盤での結果)。得られたメチオニンスルホキシドは疎水性の低下をもたらし、従って、還元形態より先に溶出した。その溶出パターンは、過酸化水素による合成NKBの部分的酸化によってもたらされたパターンに一致した。過酸化水素による完全酸化は、全てのNKBの第1ピーク位置での溶出をもたらした。同様の溶出パターンが、妊娠満期の胎盤試料(b)からのNKB抽出後においても観察された。

図7は、意識のあるラットにおけるニューロキニンBの心血管効果を示す。意識のある抑制されていないメスラットにおける、生理食塩水または漸増用量のNKBの注入の間における血圧および心拍数の変化を示す。0分から $1.8 \text{ nmol h}^{-1} (\text{kg 当たり})$ 、16時間から $1.8 \text{ nmol h}^{-1} (\text{kg 当たり})$ 、さらに20時間から $1.8 \text{ nmol h}^{-1} (\text{kg 当たり})$ の用量でNKBを注入した。値は平均値 $\pm$ s.e.で示す。\*は基線および $t = 20$ 時間での値との有意差を示す(Friedman's test)。

10

20

30

40

50

図8は、ヒトおよびラットの胎盤におけるニューロキニンB mRNAのin situハイブリダイゼーションを示す。aはヒトアンチセンスプローブを用いた妊娠満期(39週)のヒト胎盤、bはヒトセンスプローブを用いた妊娠満期(39週)のヒト胎盤、cはラットアンチセンスプローブを用いた18日目のラット胎盤、dはニューロキニンBを発現するラット胎盤の巨細胞を高倍率で示したものである。倍率は、a = 10倍、b = 10倍、c = 16倍、d = 40倍である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、部分的に、発達中の胎盤による母体血流へのニューロキニンBの早期のおよび/または過剰な放出が妊娠誘発性高血圧および子癇前症の原因となり得ることの発見に基づく。特に、妊娠誘発性高血圧または子癇前症に罹りやすい人が、妊娠の約10週から12週において、母体血流中のニューロキニンレベルの僅かな上昇を有することが前提とされる。例えば10週から12週またはそれ以前のような妊娠初期におけるニューロキニンBの監視は、個体が妊娠後期に妊娠誘発性高血圧または子癇前症に罹りやすいか否か、および例えば胎児成長遅延、胎児仮死、または流産等の子癇前症に関連する胎児合併症に罹りやすいか否かを予測するのに有用である。例えば18週のような妊娠10週から12週より後でのニューロキニンBレベルの測定は、その予測を確認し、さらに妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の診断を行うことを可能とする。さらには、妊娠誘発性高血圧または子癇前症の最初の予測の後のニューロキニンBレベルの上昇レベルが将来の症状の重篤性に相関することが観察された。特に、ニューロキニンBの上昇の程度と将来の症状の重篤性との間に関連性が存在することが示された。それら所見を、将来の症状の重篤性の予測において用いることができる。また、ヒトニューロキニンB前駆体の他のプロセッシング断片もそれら症状の発症に関連するであろう。さらには、ニューロキニンBおよび/またはヒトニューロキニンB前駆体の他の断片の産生が、妊娠していない個体における高血圧の発症に関連するであろう。

本発明において、胎児合併症は、子癇前症に関連する任意の胎児症状を含む。特に、胎児合併症は、胎児成長遅延、胎児仮死、満期前出産、および重症例では流産を含む。

本発明の目的において、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物は、ニューロキニンB前駆体またはニューロキニンBをコードするポリヌクレオチド配列、ならびにニューロキニンB前駆体ポリペプチドを含む。ポリヌクレオチド配列は、例えば図3または4記載の配列のようなゲノム配列またはcDNA配列、およびRNA、好ましくはmRNAを含む。好ましくは、ニューロキニンB前駆体ポリペプチドは、図1記載の配列を有する。ニューロキニンB前駆体遺伝子産物の断片は、前駆体遺伝子産物から派生した断片であり、ニューロキニンBをコードするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を含む。好ましくは、前駆体から派生したニューロキニンBペプチドは図2の配列を有する。エピトープ断片またはエピトープ変異体は、通常、抗体が結合できる部位を構成する少なくとも4残基のアミノ酸配列を含むものである。好ましいエピトープ断片は図1のアミノ酸配列DMHDである。

ニューロキニン前駆体遺伝子産物の変異体も含まれる。好ましくは、変異体は、ニューロキニン前駆体遺伝子産物またはその断片と80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、さらに最も好ましくは99%以上の配列同一性を有し、好ましくは遺伝子産物またはその断片と同じ生物活性を保持する。

当業界で公知の「同一性%」は、配列間の比較によって特定される、2つのポリペプチド配列間または2つのポリヌクレオチド配列間の関連性の指標である。通常、比較される2つの配列を、それら配列間に最大の相関性をもたらすように整列させる。2つの配列の整列を検討し、2つの配列間の正確なアミノ酸またはヌクレオチドの一致をもたらす位置の数を特定し、その整列の全長によって割り、さらに100を乗じて同一性%をもたらす。比較される配列の全長に亘り同一性%を特定して差し支えなく、それは同じかまたは非常に類似する長さの配列で高い相同性を有する場合に特に適しており、あるいはより短い特定の長さに亘り同一性%を特定しても差し支えなく、それは等しくない長さの配列または低い相同性レベルを有する場合により適している。

10

20

30

40

50

2つ以上の配列の同一性の比較方法は、当業界で周知である。従って、例えば、Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J et al, Nucleic Acids Res. 12: 387-395, 1984, Genetics Computer Group, Maidson, Wisconsin, USAから購入可能)において利用可能なプログラム、例えばBESTFITおよびGAPを用いて、2つのポリヌクレオチド間の同一性%および2つのポリペプチド配列間の同一性%を特定することができる。BESTFITはSmithおよびWatermanの「局部的相同性」アルゴリズムを用い(Advances in Applied Mathematics, 2: 482-489, 1981)、2つの配列間で最も類似する単一領域を見つける。BESTFITは、異なる長さの2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列を比較するのにより適しており、より短い配列がより長い配列の一部を表すとみなすプログラムである。一方、Gapは、NeddlemanおよびWunschのアルゴリズム(J. Mol. Biol. 48: 443-354, 1970)に基づいて、「最大類似性」を見つけるように2つの配列を並べる。GAPは、ほぼ同じ長さの配列を比較するのにより適しており、その整列は全長に亘り予測される。好ましくは、各プログラムで用いられるパラメーター「ギャップウェイト(Gap Weight)および「長さウェイト(Length Weight)」は、それぞれ、ポリヌクレオチド配列に関して50と3であり、ポリペプチド配列に関して12と4である。好ましくは、比較される2つの配列が最適に整列された時に同一性%および類似性を特定する。

例えば、プログラムのBLASTファミリー(Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990, Altschul S.F. et al, Nucleic Acids Res., 25: 289-3402, 1997, 米国メリーランド州ベテスダの全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)から利用可能であり、さらにNCBIのホームページ[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)を介してアクセス可能である)、およびFASTA(Pearson W.R. and Lipman D.J., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 85: 2444-2448, 1988, ウィスコンシン配列分析パッケージの一部として利用可能である)のような、配列間の同一性および/または類似性を特定する他のプログラムも当業界で公知である。好ましくは、BLOSUM62アミノ酸置換マトリックス(Henikoff S. and Henikoff J.G., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 89: 10915-10919, 1992)がポリペプチド配列比較において用いられ、その際、比較前にヌクレオチド配列がまずアミノ酸配列に翻訳される。好ましくはBESTFITプログラムを用いて、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して、照会ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の同一性%を特定する。照会および参照配列を最適に整列させ、さらにプログラムのパラメーターを初期値に設定する。

本発明の第1、第2、第3、および第4の態様は、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を予測または診断する方法に関する。それら方法は、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することを含む。それら方法は、好ましくは、試料中のヒトニューロキニンB遺伝子産物(例えばニューロキニンBまたはその前駆体)の濃度の評価結果を、予測値または以前に被検者において認められた値と比較することを含む。好ましくは、例えば予測のため10-12週、あるいは診断のため18週のような、妊娠初期においてそれら方法を実施する。

それら方法は、当業者に利用可能なニューロキニンB遺伝子産物を測定する任意の手段を含む。好ましくは、その方法は本発明のキットを用いる。本発明の方法は、生体試料中のニューロキニンB mRNA、ニューロキニンBまたはその前駆体、あるいはそれらの変異体または断片の存在を特定する工程を少なくとも含む；しかしながら、追加の工程を含んでいて差し支えない。そのような追加の工程として、1つ以上の以下の工程が挙げられる：生体試料を採取する；生体試料を調製する；試料中の、例えばポリペプチドのような標的ニューロキニンB遺伝子産物の濃度を測定する；妊娠していない個体、あるいは同じまたは異なる妊娠段階の妊娠している個体での標的ニューロキニンB遺伝子産物の期待濃度を予測するための標準曲線を作成する；特定生体試料から得られた結果を、適当な期待値または適当な標準曲線と比較して、症状の重篤性を特定する；あるいは症状の重篤性が変化するか否かを特定するために後日に以前のいくつかのまたは全ての工程を繰り返す。キットに基づいて検出する適切な方法は当業者に明らかであり、ラジオイムノアッセイ(

10

20

30

40

50

R I A )、酵素免疫測定法 ( E L I S A )、イムノラジオメトリックアッセイ ( I R M A )、アンチセンス技術、あるいはラジオレセプターアッセイ ( R R A ) を含む。後者の場合、検出システムまたはバイオセンサーシステムにおいて、例えば  $NK_3$  受容体または他のニューロキニン B 結合パートナーを用いることができる。別の検出法として、放射分析法、ならびに例えば蛍光および発光のような非放射性の方法も挙げられる。

好ましい方法はラジオイムノアッセイであり、その方法は、少量の放射能標識ペプチド (例えばニューロキニン B) と、限定量の例えば抗体のような結合パートナー (例えば  $NK_3$  特異的) との相互作用に基づく。標準ペプチドの量の増加による放射能標識ペプチドの置換を、未知の試料による置換と比較する。通常、結合パートナーを沈ませた後遠心する沈殿工程を用いて、結合パートナーに結合した標識を、遊離した標識と分離することによって置換をモニターするが、遊離の標識画分に結合しその後遠心によって除去することができる吸着剤 (例えば活性炭) もある。I R M A は、1 サイト (1 site) であっても 2 サイト (two site) であっても差し支えなく、過剰な例えば放射能標識抗体のような特異的結合パートナーを用いる。2 サイト法では、ペプチド上の別のエピトープに特異的な第 2 の特異的結合パートナー (通常固相に結合している) を用いる。固相上の複合体の除去によって容易に分離することができる。R R A は、限定量の受容体で抗体を置換する点において、R I A に類似する。受容体調製物は、例えば遠心によって結合標識の洗浄および分離を実施できるように、膜調製物の形態であることが多い。イムノメトリックアッセイにおいて、信号部分としての酵素の使用は、通常、特異的抗体に対する酵素の架橋結合によって達成され、マウスモノクローナル抗体が最初の反応において用いられた場合には、例えば酵素に対して架橋結合したブタ抗マウス抗体が使用される。

妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の将来の程度を予測するのに上記の方法を用いても差し支えない。それら方法は、好ましくは、試料中のヒトニューロキニン B 遺伝子産物 (例えばニューロキニン B またはその前駆体) の濃度の評価の結果を、期待値と比較することを含む。例えば 18 週後のような、妊娠 10 週以降は、ヒトニューロキニン B 遺伝子産物の存在 (および濃度) を評価するのに特に有益な時期である。本発明の方法は、体から取り出した試料においてインビトロで実施するのが好ましい。任意の生体試料を本発明の方法において用いて差し支えない。好ましい生体試料として、血液、唾液、または尿が挙げられる。

また、本発明は、ニューロキニン B の生物学的効果を阻害する物質を投与することによる、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を予防または治療する方法を提供する。好ましくは、本発明のキットを用いてそのような方法を実施する。ニューロキニン B の生物学的効果を阻害する物質として、例えば血漿からニューロキニン B を除去することによって；ニューロキニン B が受容体に結合するのを妨げるようにその構造を変化させることによって；ニューロキニン B の受容体への結合をブロックするように受容体に直接結合することによって (それ自体は、ニューロキニン B によって通常生じるそれら受容体での効果を生じることなく)；同じまたは異なる受容体においてニューロキニン B とは逆の効果を及ぼすことによって；あるいは例えばニューロキニン B 遺伝子プロモーターの活性を調節することによっておよび/またはアンチセンス技術を用いることによって遺伝子発現または翻訳を低下させまたは妨げることによって；作用する任意の物質が挙げられる。前駆体の産生またはプロセッシングを阻害してニューロキニンの産生を妨げる物質も含まれる。その背景内で、ニューロキニン B の生物学的効果を阻害する物質は、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の発症に関連するヒトニューロキニン B またはその前駆体の任意の変異体または断片の生物学的効果を阻害する物質を含む。ヒトニューロキニン B の作用の主要部位は  $NK_3$  受容体であり、従って本発明において用いるためのニューロキニン B の生物学的効果を阻害する好ましい物質として  $NK_3$  受容体アンタゴニストが挙げられる。しかしながら、特に妊娠誘発性高血圧または子癇前症の被検者で出産間近に観察される高い循環濃度において、ニューロキニン B は他の受容体 (例えば  $NK_1$  または  $NK_2$  受容体) でも顕著な効果を有し、従って、本発明において用いるためのニューロキニン B の生物学的効果を阻害する物質は、その

10

20

30

40

50

ような他の特異的受容体でのニューロキニンBの効果を阻害する物質、ならびに広範囲のニューロキニンアンタゴニストおよびそれらの組合せも含む。

1991年から、多くの高親和性非ペプチドアンタゴニストが報告されている。Snider R. M. (Science, 251: 435 (1991))およびGarret C. (Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10208 (1991))らは、それぞれ、CP-96,345およびRP67580をNK<sub>1</sub>受容体でのアンタゴニストとして記載しており、一方、Advenier C. (Brit. J. Pharmacol., 105:78 (1992))らはSR 48968に基づくデータを示し、NK<sub>2</sub>受容体に対するその高親和性および選択性を示した。さらに最近、MacLeod (J. Med. Chem., 36: 2044 (1993))らは、新規な一連のトリプトファン誘導体をNK<sub>1</sub>受容体アンタゴニストとして発表した。最近、NK<sub>1</sub>受容体に対して高親和性を有する「ジペプチド」FK888が記載されている (Fujii J., et al., Neuropeptide, 22: 24 (1992))。 10

本発明において使用するための適切なNK<sub>3</sub>受容体アンタゴニストとして、例えば、GaoおよびPeet (Current Medicinal Chemistry, 1999, 6, 375-388)、KhavagaおよびRogers (Int. J. Biochem Cell Biol. 1996, 28, 7, 721-738)、米国特許第5,942,523号、米国特許第5,846,973号、米国特許第5,491,140号、米国特許第5,328,927号、米国特許第5,360,820号、米国特許第5,344,830号、米国特許5,331,089号、米国特許第4,742,156号、米国特許第4,665,157号、欧州特許第591,040 A、国際特許出願第WO94/01402号、国際特許出願第WO94/04494号、国際特許出願第93/011609号、カナダ特許出願第2,154,116号、欧州特許第693,489号、およびカナダ特許出願第2,151,116号に記載されている物質のような、NK<sub>3</sub>受容体においてニューロキニンBの効果をブロックまたは低下させる全ての物質が挙げられる。 20  
適切なアンタゴニストの特定実施例として、受容体選択的リガンド、SR 142801 (Edmonds-Alt, et al., Life Sciences, 56: 27 (1995))、および以下の化学式のデカペプチド： $A^1$ -D-Pro<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Nle<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub> ( $A^1$ およびD<sup>4</sup>はAspまたはD-Aspアミノ酸である)が挙げられる。

ニューロキニンBの生物学的効果を阻害するための好ましい物質として、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーターの活性を調節し、それによってニューロキニンB前駆体遺伝子の転写レベルを変化させる物質が挙げられる。そのような物質の例として、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーター転写因子の競合的または非競合的アンタゴニスト、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーター転写因子の生物学的効果を阻害する物質、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーター阻害剤のアゴニスト、ならびにニューロキニンB前 30  
駆体遺伝子プロモーター活性に結合しかつそれを阻害するポリヌクレオチド配列が挙げられる。そのようなポリヌクレオチドは、好ましくはインピボでプロモーター配列にハイブリダイズしてプロモーター活性を阻害するように、プロモーター配列の全体または一部に十分相補的であることが好ましい。適切なポリヌクレオチド配列は、プロモーターの全体または一部と、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上、および好ましくは99%以上の配列同一性を有する配列である。好ましくは、ポリヌクレオチド配列は、例えば転写因子結合部位のようなプロモーターの調節領域に相補的であろう。

物質がポリヌクレオチド配列である場合、ベクターの形態で投与するのが好ましい。ベクターは、例えば、応答要素を含むプロモーター、コンセンサス部位、メチル化部位、遺伝子 40  
子制御領域、転写後修飾、スプライス変異体、ホメオボックス、誘導因子、DNA結合ドメイン、エンハンサー配列、開始コドン、およびポリA配列のような、ポリヌクレオチド配列の発現の活性化のための1つ以上の調節配列をさらに含んでいて差し支えない。当業者に公知である任意の適切な遺伝子治療技術によってそのような物質を投与して差し支えない。

例えば経口または非経口的経路のような任意の有効な経路によって、薬剤組成物の投与を実施する。非経口輸送の方法として、局所的、動脈内、皮下、脊髄内、静脈内、または鼻腔内投与が挙げられる。羊水穿刺関連技術によって投与しても差し支えない。経口投与に続く皮下注射は好ましい取り込み経路であり；持続性固定技術も用いられるであろう。胎盤NK<sub>B</sub>の効果は末梢受容体におけるものであるため、中枢神経系に対する副作用の無い 50

有効な薬剤は、ペプチド様の分布特性を有することが好ましい。活性材料に加えて、それら薬剤組成物は、賦形剤、および活性化合物の薬剤的に用いることができる調製物への加工を容易にする他の化合物を含む、薬剤的に許容される適当な担体を含んでいて差し支えない。製剤化および投与に関するより詳細な技術は、「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES」(Maack Publishing Co, Easton PA)の最新版に記載されている。

経口投与用の薬剤組成物は、当業界で周知な薬剤的に許容される担体を用いて、経口投与に適した用量に製剤化することができる。そのような担体は、患者による摂取に適した、例えば錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等に、薬剤組成物を製剤化することを可能とする。

固形賦形剤と活性化合物とを混合し、必要に応じて得られた混合物を粉碎し、さらに必要であれば適当量の追加の化合物を添加した後、その顆粒混合物を加工して、錠剤または糖衣錠のコアを得ることによって、経口投与用の薬剤調製物を作成することができる。適当な賦形剤は、炭水化物またはタンパク質の賦形剤である。そのような賦形剤は、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール等の糖に限定されず、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモまたは他の植物からのデンプン；例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース；アラビアゴムおよびトラガカントのようなゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質を含む。必要な場合には、架橋結合ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、あるいは例えばアルギン酸ナトリウム等のそれらの塩のような、崩壊剤または可溶化剤を添加しても差し支えない。

糖衣錠のコアは、例えば濃縮糖溶液のような適切な被覆を用いて提供され、そのような濃縮糖溶液は、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール(carbopol)ゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または有機溶媒混合物を含んでいても差し支えない。製品の識別、または活性化合物の量(例えば用量)の特徴付けのため、染料または色素を錠剤または糖衣錠の被覆に添加しても差し支えない。

経口で用いることができる薬剤調製物として、ゼラチンからなるプッシュフィット(push-fit)カプセル、ならびにゼラチンおよび例えばグリセロールまたはソルビトール等の被覆からなるソフトシールカプセル(soft, sealed capsules)等が挙げられる。プッシュフィットカプセルは、例えばラクトースまたはデンプンのような賦形剤または結合剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような滑剤、さらに必要に応じて安定化剤と、活性材料とを混合して含んでいて差し支えない。ソフトカプセルにおいて、安定化剤と共にまたは安定化剤無しに、例えば脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールのような適切な液体中に、活性化合物を溶解または懸濁させて差し支えない。

非経口投与用の製剤は、活性化合物の水溶液を含む。注射用に、本発明の薬剤組成物を、水溶液、好ましくはハンクス液、リンガー液、または緩衝生理食塩水のような生理適合緩衝液中に製剤化して差し支えない。水溶性注射懸濁液は例えばカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストラン等の懸濁液の粘性を高める物質を含んでいて差し支えない。さらには、活性化合物の懸濁液を適切な油性注射懸濁液として調製しても差し支えない。適切な親油性溶媒または媒体として、例えばゴマ油等の脂肪油、あるいはオレイン酸エチルまたはトリグリセライド等の合成脂肪酸エステル、あるいはリポソーム等が挙げられる。必要に応じて、懸濁液は、化合物の安定性を高めて高濃度溶液の調製を可能とする、適切な安定化剤または物質を含んでいて差し支えない。

局所投与または鼻腔投与のため、浸透すべき特定のバリアに適した浸透剤を製剤化において用いる。そのような浸透剤は当業界で公知である。

本発明の薬剤組成物は、当業界で公知である方法に類似の方法で製造することができる(例えば、従来混合、溶解、顆粒化、糖衣錠形成、すり潰し、乳化、カプセル化、封入、凍結乾燥工程によって)。例えば被覆のような従来手段によって、例えば徐放性または標的化された放出のような適切な放出特性をもたらすように薬剤組成物を修飾しても差し支えない。

10

20

30

40

50

薬剤組成物を塩として提供して差し支えなく、塩化水素に限定されず、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等の多くの酸を用いてそれら塩を形成することができる。塩は、対応する遊離塩基の形態の水溶液または他のプロトン溶媒中に溶解しやすい傾向がある。他の例では、好ましい調製物は、pH4.5から5.5の1 mM - 50 mMヒスチジン、0.1% - 2%スクロース、2% - 7%マンニトール中での凍結乾燥粉末であって差し支えなく、そのような調製物は使用前に緩衝液と混合される。

選択された標的部位にのみ輸送されるように、本発明において用いるための物質（例えばNK<sub>3</sub>受容体アンタゴニスト）を修飾することができる。例えば、内蔵でのタンパク質分解消化に対する安定性、または血液/脳関門を通過する能力を調節することによって、あるいは例えば標的部位に選択的な抗体等のターゲティング成分を含む複合分子を作成することによって修飾することができる。

許容される担体中に製剤化された本発明の化合物を含む薬剤組成物を調製した後、それら組成物を適切な容器中に置き、さらに指示条件での取り扱いのためのラベルを付ける。NK<sub>3</sub>受容体アンタゴニストの投与のため、そのようなラベルは、投与の量、頻度、および方法を含む。

本発明での使用に適した薬剤組成物として、意図した目的を達成するのに有効な量の活性材料が含まれている組成物が挙げられる。従って、治療的有效量とは、治療される疾患の症状を改善するのに十分な量である。実際に投与される量は、治療が施される個体に依存し、さらに好ましくは、顕著な副作用無しに所望の効果を達成するように最適化された量であろう。治療的有效量の決定は、当業者の能力の範囲内である。もちろん、熟練者は、分割量および部分量も本願発明の範囲内であることに気付くであろう。

任意の化合物に関して、まず、細胞培養法または任意の適当な動物モデル（例えば子癇前症に関して霊長類、高血圧に関してラットおよびモルモット、さらに誘発性高血圧および誘発性子癇前症に関する用途のため他の実験小動物）の何れかにおいて治療的有效量を評価することができる。それら測定法は、受容体活性、ならびに下流のプロセッシング活性を考慮すべきである。望ましい投与濃度範囲および投与経路を見つけるためにも動物モデルが用いられる。そのような情報はヒトでの投与のための有用な用量および経路を決定するために用いることができる。

治療的有效量とは、兆候または症状を改善する物質の量を称する。標準的な薬学的方法によって、培養細胞または実験動物においてそのような化合物の治療効果と毒性を決定することができる（例えばED<sub>50</sub>：集団の50%において治療的に有効な量；LD<sub>50</sub>：集団の50%において致死性である量）。治療効果と毒性効果との間の用量比が治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>の比として表すことができる。大きな治療指数を表す薬剤組成物が好ましい。ヒトでの使用のための用量範囲を決めるのに、細胞培養法および動物実験から得られたデータが用いられる。そのような化合物の用量は、好ましくは、殆どまたは全く毒性の無いED<sub>50</sub>を含む循環濃度の範囲内にある。用量は、用いられた剤形、患者の感受性、および投与経路に依存して、その範囲内で変化する。

正確な用量は、治療される患者を考慮して、個々の医者によって選択される。用量および投与は、十分なレベルの活性部分を提供するように、または所望の効果を維持するように調整される。考慮され得る付加的因子として、疾患症状の重篤性が挙げられる。特定薬剤の半減期およびクリアランス率に基づいて、3から4日おき、1週間おき、あるいは2週間おきに、持続性薬剤組成物を投与して差し支えない。特定用量および輸送方法に関するガイダンスが文献において提供されている（参照によってこの中に組み込まれている、米国特許第4,657,760号；第5,206,344号；および第5,225,212号を参照）。

子癇前症を予防または治療する本発明の方法；あるいは子癇前症を予防または治療するための薬剤を調製する本発明の方法；において用いるための、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物は、限定はされないが、食後の段階(post prandial phase)で、その物質の使用が有効であるように製剤化されることが好ましい。その物質は、食後の段階でのみ有効であるというのではなく、例えば24時間に亘り有効であるように選択される。子癇前症は、門脈における高血圧のせいで血液が肝臓（通常毒素を除去する）を通過できな

10

20

30

40

50

いことによる母体血液供給中における毒素の形成に関連すると考えられているため、食後の段階が特に重要な時間である。従って、食事後の高血圧の一時的な除去は、最高濃度の毒素が存在する時に血液が肝臓を通過することを可能とし、従って胎盤で産生されたニューロキニン B によって生じる効果に短期間の低下をもたらすのみであっても、子癇前症の危険性をかなり減らすであろう。そのような時間限定効果は、短期間の活性を有する物質を選択し、さらに適当な製剤および用量スケジュールを用いることによって達成されるであろう。

好ましくは、この中に記載の症状を予防または治療する方法は、例えば妊娠 10 週後に最初の予測または診断を行った後直ぐに開始されるであろう。一連の治療の開始に関する決定はもちろん医師の決定であり、従って早くまたは遅く開始する場合がある。通常、妊娠の間中、または症状が治まるまで、一連の治療を行う。その治療は、出産後 8 週間まで続くかもしれない。例えば成長遅延または仮死のような胎児症状あるいは子癇前症を発症する危険性があるとして特定された個体において（例えば妊娠における以前の流産または合併症のような他の要因を考慮することによって）、妊娠が確認された直後に治療を開始し、妊娠満期まで継続して差し支えない。

本発明の別の態様において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断で使用するための診断薬の製造における、ヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用を提供する。例えばニューロキニン B に特異的な結合パートナーを含む診断薬の製造において、用いられる遺伝子産物は、ニューロキニン B、あるいはその変異体または断片であることが好ましい。好ましくは、その変異体または断片はエピトープである。例えばニューロキニン B 前駆体ゲノム配列の調節配列、またはアンチセンス配列の産生におけるニューロキニン B 前駆体 mRNA のような他の遺伝子産物を用い得ることが考えられる。

用いられるポリペプチドとして、ヒトニューロキニン B またはその前駆体、あるいはそれらの変異体または断片が挙げられる。好ましくは、ポリペプチドは、図 1 または図 2 の配列をそれぞれ含む。好ましくは、その断片または変異体は上述したようにエピトープである。

それらポリペプチドは、単離された実質的に純粋な形態で、または組換えポリペプチドとして作成される。そのような作成方法は当業者に明白であろう。例えば、組換え技術または抽出、ゲル分離、あるいは、より一般的に、ニューロキニン B のサイズのペプチドに関して、例えば液相および固相ペプチド等の化学合成が挙げられる。

本発明の別の態様において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予防または治療のための薬剤の製造における、ニューロキニン B の生物学的効果を阻害する物質の使用を提供する。好ましくは、その物質は上記のようなものである。

本発明の別の態様において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の兆候を予測し、その将来の重篤性を診断または評価するためのキットを提供する。本発明のキットは、例えばニューロキニン B またはその前駆体あるいはそれらの断片または変異体をコードするポリヌクレオチドまたはポリペプチドのようなヒトニューロキニン B 遺伝子産物の、被検者による産生を検出する手段を含む。従って、本キットは、ニューロキニン B またはその前駆体に対する結合パートナー；ニューロキニン B ポリペプチドあるいはその変異体または断片；および/またはニューロキニン B あるいはその変異体または断片をコードする配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列；の 1 つ以上を通常含む。

結合パートナーは、例えば抗体のような、標的を検出（およびそれに結合）できる任意の物質を意味する。本発明のキットにおいて用いるための好ましい結合パートナーは、ニューロキニン B 前駆体あるいはそのエピトープ断片またはエピトープ変異体に特異的な抗体である。ニューロキニン B に対する抗体およびヒトニューロキニン B 前駆体に対する抗体が好ましい。ニューロキニン B に特異的である抗体が最も好ましいが、測定可能な時間、身体に残存するニューロキニン B 前駆体の任意の他の分解産物に特異的な抗体も用いることができる。それら抗体は、ヒトニューロキニン B 前駆体の断片に結合して、ヒトの体に

10

20

30

40

50

よる前駆体の産生を特定することができる。本発明の抗体は、例えば、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体、あるいはそれらの断片であって差し支えない。例えばサブスタンスPすなわちNK Aのような関連ペプチドと交差反応する結合パートナーは、それら関連ペプチドがニューロキニンBと共通配列(F V G L M - N H<sub>2</sub>)を有するため、例えば薬剤としてまたは診断において有用となり得る。

そのような抗体を作成する方法は、当業者に明白であろう。例えば、ポリクロナール抗体の場合、動物を免疫する標準的方法によって、あるいはモノクロナール抗体の場合、KöhlerおよびMilsteinの周知の方法、または米国特許第5,844,080号に記載の方法の使用によって実施できる。キメラ抗体は、遺伝子組換え技術によって作成することができ、定常領域はヒト由来であるが、可変領域は例えばマウス抗体由来であるような抗体である。キメラ抗体の利点は免疫原性を減らすことである。ヒト化抗体は、キメラ抗体の原則に加えて、相補性決定領域および可変領域中の最少数の他のアミノ酸が例えばマウス等の動物由来である。抗体構造の残りの部分はヒトの配列であり、ヒト免疫系によってヒトとして認識される(例えば、Queen et al, PNAS, USA 86(December 1989), 10029-10033を参照)。

本発明のキットのポリヌクレオチドは、好ましくは、ニューロキニンBまたはその前駆体、あるいはそれらの変異体または断片をコードする配列、あるいはそれらの相補体に、ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドである。図3または図4のヌクレオチド配列、あるいはそれらの相補体に、ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列であることが好ましい。ストリンジентな条件は、例えば、65 °Cで6 × SSCである。好ましくは、そのようなポリヌクレオチド配列は、参照配列の相補体と、85%以上、90%以上、95%以上、さらに好ましくは98%以上、さらに最も好ましくは99%以上の配列同一性を有する。そのようなポリヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも10ヌクレオチド長であり、ニューロキニンBまたはその前駆体の発現を検出するのに有用であろう。そのようなポリヌクレオチドはアンチセンス技術または診断的PCRにおいて有用である。本発明のポリヌクレオチドを作成する手段は当業者に明白であり、例えば、合成的に、あるいは適当なcDNAまたはゲノムライブラリー(特に胎盤cDNAライブラリー)を用いることによって作成することができる。

本発明のキットは、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測または診断するための測定法(ニューロキニンBの直接的測定によって、あるいはヒトニューロキニンB前駆体またはその断片の濃度を測定し、その値を用いてニューロキニンBの存在量を予測することによって)の実施に関する使用説明書を含んでいて差し支えない。Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USAから市販されているニューロキニンBラジオイムノアッセイキットRIA 7357の構成要素を本発明で用いることができる。本発明のキットは、好ましくは、生体試料中のニューロキニンB遺伝子産物のレベルと、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の診断、および/またはそのような症状の将来の発症および/または重篤性との間の相関性を示す手段を含む。

さらに、被検者におけるニューロキニンBまたはその前駆体の生物学的効果を阻害する手段を含む、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予防または治療のためのキットを提供する。好ましくは、そのような手段として、上記のような物質が挙げられる。特に、上記のような抗体またはポリヌクレオチド配列は、ニューロキニンBまたはその前駆体の生物学的効果を阻害するためのキットにおいて有用であろう。キットは、好ましくは、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を予防または治療するためのキットの使用に関する使用説明書、および/または用いられる物質の量と症状に対する予測の効果との間の相関性を示す手段を含む。

子癇前症は、毒素および毒素発生物質の含有量を減らすようにヒト被検者の食事を調整することによって改善される。毒素発生物質は、非常に高濃度で血液中を循環した場合にその殆どのが毒性となるアミノ酸に消化され、そのようなアミノ酸として内蔵から吸収されるタンパク質を含む。通常、1日の必要量を越える任意のアミノ酸は、肝臓によって直ぐにアミノ基が取り去られて代謝される。例えば、個体の食事量を実質的に減らす(少量の食事の回数を増やす)ことによって、門脈中に現れる潜在的毒素の濃度が最高になる

10

20

30

40

50

のを防止するように、被検者の食事パターンを調整しても差し支えない。

ニューロキニン B のアゴニストは、血圧の上昇または血液容量の減少が有益と考えられる医薬品として用いても差し支えない。適切なアゴニストは、例えばセンクタイド(senk tide)または[MePhe<sup>7</sup>]NK B のような、NK<sub>3</sub>受容体(または任意の他の受容体)でのニューロキニン B の効果を補足または模倣する任意の作用を含む。

また、本発明は、適当なモデルにおいて、ニューロキニン B の昇圧効果をブロック(または増強)する能力を調べることによって、潜在的有効物質(例えばNK<sub>3</sub>受容体アンタゴニストおよびアゴニスト)をスクリーニングする手段を提供する。適当な物質が同定されると直ぐに、高血圧;妊娠誘発性高血圧または子癇前症;の予防または治療におけるそれら物質の可能性を特定するためにさらに評価され、その結果によって用いられる。そのような工程によって同定された全ての物質(既に公知の物質を除いて)が本発明に含まれる。スクリーニング方法として、Affymetric IncのVilsips<sup>TM</sup>技術のような、ラージアレイ(large array)技術が挙げられる(例えばEPB No. 0476014を参照)。

当業者に明白である方法での、受容体結合実験および細胞シグナル経路実験において、クローン化NK<sub>3</sub>(あるいはNK<sub>1</sub>またはNK<sub>2</sub>)受容体を包含するトランスフェクト細胞を用いることができる。原則的に、内生的に高レベルのニューロキニン受容体を発現する細胞株、あるいはニューロキニン受容体のクローン化cDNA構成物でトランスフェクトした細胞株の何れかを用いて、膜調製物を作成することができる。溶液中またはリン脂質膜中に再構築された精製受容体の膜調製物を用いて、ニューロキニン B の標識アゴニストおよび/またはアンタゴニストとの受容体結合を評価することができる。標準的細胞シグナリングアッセイを用いて、アゴニストおよびアンタゴニストの作用の効果を評価することができる。当業者に明白な方法で(受容体結合、サイクリックAMP測定、プロテインキナーゼC、イノシトール三リン酸濃度等の測定法を含む)、G-タンパク質結合受容体システムを用いる場合に、それら方法は日常的に実施されるであろう。ニューロキニン B 、ニューロキニン B アゴニスト、およびニューロキニン B アンタゴニストの長期および短期の効果を特定するために、慢性的にアゴニストを注入されたモルモットおよびラットを含む動物モデルにおいてそれら実験を実施することも可能である。心拍数、血圧、血液容量、および臓器の重量(例えば子宮、胎盤)の変化等の効果を測定することができる。

## 実施例

### 実施例 1

#### ヒトニューロキニン B 前駆体 cDNA の産生

以下の方法による胎盤 cDNA のクローニングを用いて、図 1 に示すポリペプチド配列を有するヒトニューロキニン B 前駆体を同定した。前駆体におけるニューロキニン B のペプチド配列を下線で示した(C末端のG残基は、図 2 の最終的なプロセッシングを受けたペプチドにおけるC末端のM上のアミドとなる)。ヒトニューロキニン B 前駆体のクローン化胎盤 cDNA が図 3 に示されており、位置 26-28 の ATG 開始コドン、389-391 の TAG 終止コドン、659-663 の AATAA ポリアデニル酸シグナル、ならびに 680 のポリ A テイル開始を有する(下線)。

9 および 13 週の妊娠期間ならびに妊娠満期で妊娠を終えた被検者からヒト胎盤組織を得た。地方研究倫理委員会に従い、その許可を受けて、試料を採取した。基本的に、Chomczynski, P. および Sacchi, N. (1987) Analytical Biochemistry, 162, 156-159 に記載のよう

に RNA を抽出した。RT-PCR を用いて、ヒト妊娠末期全胎盤 RNA から完全長プレプロニューロキニン B 前駆体を増幅した。その増幅は、SMART RACE cDNA 増幅法を用いて行われた(Chenchik, A. et al (1998), In RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis. Eds. Siebert, P. and Larrick, J. BioTechniques Books, MA, 305-319)。基本的に、全 RNA の抽出後、3' アンカー配列を包含する cDNA 合成プライマー(5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N<sub>3</sub>')を用いて逆転写を実施した。ウシ P08858 ニューロキニン B 前駆体に類似の人類 cDNA クローン 138761 由来の 5' 遺伝子特異的プライマー(5' GGCAACAGAGCTGCTCCACAGGCACCAT3

')を用いて、3'伸長を実施した。得られたPCR断片をゲル電気泳動の後ゲル精製し、さらに発現ベクターpGEM-T Easy中にクローン化した。得られたクローンの配列を決定し、BLASTプログラム(Altschul, S.F., et al (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410)を用いて、GeneBankデータベースにおける提出配列と比較した。

### 実施例 2

#### 胎盤におけるNK Bを測定するための半定量的PCR

下記のように半定量的PCRを用いて、9および13週の妊娠期間ならびに妊娠満期に採取した胎盤中のニューロキニンB mRNAの発現を測定した。最初の3ヶ月の胎盤と妊娠満期の胎盤との間に、発現程度の違いが示された。図5に示されるように、発現レベルは妊娠満期に5倍まで上昇した。

ウシP08858ニューロキニンB前駆体に類似の人類cDNAクローン138761由来の5'遺伝子特異的プライマー(5'GGCACAGAGCTGCTCCACAGGCACCCAT3')、ならびに3'SMARTアンカー配列プライマーを用いて、SMART RACE cDNA法によって胎盤cDNAを増幅した。正規化のために-アクチンに特異的なプライマー対を用いた。95で30秒間および68で2分間の21サイクルを用いてPCRを実施した。非特異的産物の形成の可能性を減らすため、2段階でPCR反応が行われるように、高いアニーリング温度を有するプライマーが意図的に選択された。-アクチンRT-PCR産物の再現可能な指数増幅を達成するのに必要とされるサイクルの回数は、15、18、21、24、および30サイクルでそれぞれ制御反応を終わらせることによって特定された。それら実験を用いて、産生される-アクチンPCR産物のレベルを最適化するため、精度、効率、および半定量的増幅を行う必要がある全RNA量をチェックした。PCR産物を電気泳動後、UV照射によって可視化した(図5において、1kb DNAラダー(M1)および100kb DNAラダー(M2)が示されている)。

### 実施例 3

#### 胎盤組織および血漿からのニューロキニンBの抽出

以下に記載の技術を用いた胎盤抽出物の評価は、ニューロキニンBが相当量存在し、そのHPLCでのクロマトグラフィー特性が合成ニューロキニンBのものとは一致することを示した。また、そのメチオニン残基を酸化後、(HPLCで)同程度の疎水性の喪失を示した。酸化は、2酸化形態(1)、1酸化形態(2)、および非酸化形態(3)の3つのピークをもたらすことが認められた(図6を参照)。図6(a)は、RPHPLCによって、ヒト妊娠血漿から分離された酸化および還元ニューロキニンBを示し、図6(b)は、RPHPLCによってヒト妊娠満期胎盤から抽出した濃縮および還元されたニューロキニンの分離を示す。

#### 胎盤からのニューロキニンBの抽出

出産後直ぐに全胎盤の重量を測定し、10mM EDTA含有150mM塩化ナトリウム溶液(pH7.5)で洗浄した。100g以下の組織試料を切り取り、ガラス容器付きのブレンダーを用いて、100mlの生理食塩水/EDTA溶液中においてホモジナイズした。プロテアーゼ阻害剤である、フェニルメチルスルホニルフッ化物、N-エチルマレイミド、およびペプスタチンをメタノール中の原液から添加した。20秒後、800mlのメタノールを添加し、さらに1分間混合を続けた。混合物を200mlポリプロピレン遠心チューブに静かに注ぎ、4、3000xgで30分間遠心した。上清を分離し、4で一晩保存し、さらに生じた沈殿物を遠心で除いた。各抽出物の容積は最初の容積の1/8未満まで減少し、3容積の0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)含有水の添加によって希釈した。最後の遠心工程によって任意の微量の浮遊物質を除去した。抽出物の容積を記録し、Sep-Pak C18 3CCカートリッジ(Waters Chromatography Division, Millipore Corporation, Milford, MA, U.S.A.)を用いた固相抽出用に、20gの胎盤に相当する量を保存した。2mlの以下の溶液を灌流させることによって、使用前にカートリッジを準備する; 1) 0.1% TFAおよび0.1% Polypepゼラチン加水分解物(Sigma-Aldrich, Poole, UK)含有水; 2) 0.1% TFA含有水; 3) 80% v/vアセトニトリル含有水; および4) 0.1% TFA含有水。各抽出物を調製カートリッジに通し、その後、2mlの0.1% TFA含有水、

10

20

30

40

50

2 mlの0.1% TFA含有水中の10%アセトニトリル、および2 mlの0.1% TFA含有水中の20%アセトニトリルで洗浄した。2 mlの0.1% TFA含有水中の30%、40%、および50%アセトニトリルでカラムを溶出した。溶出分画に1 mgのマンニトールおよび100 μgのPolypepを添加後、真空下で乾燥した。妊娠中絶から得た少量の胎盤も上記のように処理したが、胎盤重量に対する緩衝液およびメタノールの比率が同じになるようにしてガラスホモジナイザー中において分離した。

#### 血漿からのニューロキニンBの抽出

5人の若い女性の血液からEDTA中に採取したプール血漿においてニューロキニンB標準を調製した。その標準は、1280、640、320、160、および80 pg/mlニューロキニンBを含む。220 μlの0.21 Mグリシン含有1 M HClの添加によって血漿標準の各2 mlの試料を酸性化した。その後、0.9%生理食塩水によって10 mlに希釈し、さらに3000 × gで20分間遠心し、完全に透明にした。Sep-Pak C18 3CCカートリッジに関して上述したようにして、Sep-Pak C18 3CCカートリッジを準備した。試料添加後、1 mlの0.02 Mグリシン含有0.1 M HCl、続いて1 mlの0.1% TFA含有水でカートリッジを洗浄した。1 mlの0.1% TFA含有水中の10%および20%アセトニトリルでさらに洗浄した後、1 mlの50%の水とアセトニトリルとの混合物中の0.1% TFAで溶出した。溶出分画に1 mgのマンニトールおよび100 μgのPolypepを添加後、真空下で乾燥した。注意しても、不活性循環前駆体が内因性血漿プロテアーゼによって切断されて免疫活性ペプチドを産生する可能性があるため、酸性化工程によって、既にプロセッシングを受けた成熟ペプチドを抽出することを確実にした。

#### 実施例 4

##### 胎盤組織および血漿におけるNK Bの測定

胎盤および血漿抽出物を、Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USAから市販されているニューロキニンBラジオイムノアッセイキットRIK 7357の一部として提供される緩衝液に0.2%のIgepal CA-630非イオン性界面活性剤(Sigma)を添加した液500 μl中に再構築した。抽出標準および非抽出標準から一部試料25 μlを採り、上記の緩衝液75 μlと混合した。200 μg/mlのPolypepを添加したIgepalを含む緩衝液中に標準を調製した。ブランクを除いて全ての測定チューブに抗ニューロキニン抗体溶液(100 μl)を添加し、ラジオイムノアッセイキットの使用説明書の「一般的プロトコル」に記載のように測定を実施した。二重で測定を実施し、抽出標準を参照にして結果を補正した。

様々なヒトボランティアおよびラットにおけるニューロキニンBの血漿および胎盤でのレベルを上記の方法によって測定した。血漿試料の結果を表1に要約する。胎盤試料は妊娠7週 - 15週から採取したものであり、7例全てが同等の相当量のニューロキニンBを有することを示した；しかしながら、妊娠満期に検出された血漿NK Bの濃度は、母体の心血管に影響を及ぼすことが予測されるであろう100ピコモル程度であった。非妊娠ボランティアから採取した血漿試料は全て、7週から15週で人工妊娠中絶を受けた個体から採取した血漿試料の大部分と同様に低いレベルのペプチドを有していた。7週から15週で人工妊娠中絶を受けた個体の群の内4試料は、妊娠満期の試料で認められた濃度と同等の濃度を有していた。このことは、その個体由来の胎盤が妊娠の初期に生理的濃度を越える濃度のニューロキニンBを分泌し始めることを示唆する。高血圧および子癇前症に罹った妊娠後期の患者の試料は全て、ナノモル程度の濃度を有しており、このことはニューロキニンBの上昇がそれら症状の原因となり得ることを示唆する。

【表1】

妊娠(週)	正常血圧妊娠におけるNKB (nmol/l)
6	0
9	0
9	0.97
10	0.535
13	0
13	0
13	0.083
13	0.511
14	0
14	0
14	0.511
17	0.182
17	0.182
18	0
23	0.12
24	0
25	0.17
27	0
28	0
28	0.033
31	0
31	0.031
32	0
33	0
37	0
38	0.07
39	0.138
40	0.05
40	0.2
41	0.118

10

20

30

【表2】

40

妊娠(週)	子癇前症妊娠におけるNKB (nmol/l)
30	3.964
34	6.156
36	3.796
37	2.141
38	2.752
39	2.004
39	6.288
39	0.98

10

【表3】

患者番号	出産間近での 正常血圧妊娠におけるNKB (nmol/l)
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0.084
9	0.118
10	0.143
11	0.22
12	0.226
13	0.228
14	0.398
15	0.521
16	1.317

20

30

## 【図面の簡単な説明】

40

【図1】 図1は、クローン化ヒトニューロキニンB前駆体のポリペプチド配列を示す

【図2】 図2は、活性ニューロキニンBペプチドのポリペプチド配列を示す

【図3】 図3は、ヒトニューロキニンB前駆体の胎盤cDNAのポリヌクレオチド配列を示す

【図4】 図4は、27928塩基対プロモーター領域、イントロン、および7つのエキソン(下線)を含む、ニューロキニンBのゲノム配列を示す

【図5】 図5は、9週、13週、および妊娠満期に採取したmRNAを用いた、完全ヒトニューロキニンB前駆体の半定量的PCRの結果を示す

【図6】 図6は、ヒト妊娠血漿および妊娠満期の胎盤における酸化ニューロキニンおよび還元ニューロキニンBの結果を示す

50

【図7】 図7は、意識のあるラットにおけるニューロキニンBの心血管効果を示す

【図8】 図8は、ヒトの胎盤におけるニューロキニンB mRNAのin situハイブリダイゼーションを示す

【図1】

ヒトニューロキニンB前駆体のアミノ酸配列

MRIMLLFTAILAFSLAQSPGAVCKEPQEEVVPGGGRSKRDPDLVQLLQRLFKSHSSLEGLLKALSQASTDPK  
ESTSPENKRDHDFVGLMKRSVQPPDPTDQNVQENVPVDFGILKYPPEAE

【図2】

ニューロキニンペプチドのアミノ酸配列



【図3】

ヒトニューロキニンB前駆体のクローン化完全長胎盤cDNA

GGCACAGAGC TGCTCCACAG GCACCATGAG GATCATGCTG CTATTACAG 50  
CCATCCTGGC CTTTCAGCCTA GCTCAGAGCT TTGGGGCTGT CTGTAAGGAG 100  
CCACAGGAGG AGGTGGTTC TGCCGGGGCG CGCAGCAAGA GGGATCCAGA 150  
TCTCTACCAG CTGCTCCAGA GACTCTCAA AAGCCACTCA TCTCTGGAGG 200  
GATTGCTCAA AGCCCTGAGC CAGGCTAGCA CAGATCCTAA GGAATCAACA 250  
TCTCCCAGAA AACGTCACAT GCATGACTTC TTGTGGGAC TTATGGGCAA 300  
GAGGAGCGTC CAGCCAGACT CTCTACGGA TGTGAATCAA GAGAAGCTCC 350  
CCAGCTTTGG CATCCTCAAG TATCCCCGA GAGCAGATA GGTACTCCAC 400  
TTCGGACTC CTGGACTGCA TTAGGAAGAC CTCTTCCCT GTCCCAATCC 450  
CCAGGTGCGC ACGCTCCTGT TACCCTTCT CTTCCTGTGT CTTGTAACAT 500  
TCTTGTGCTT TGACTCCTTC TCCATCTTTT CTACCTGACC CTGGTGTGGA 550  
AACTGCATAG TGAATATCCC CAACCCCAT GGGCATTGAC TGTAGAATAC 600  
CCTAGAGTTC CTGTAGTGTC CTACATAAA AATATAATGT CTCTCTCTAT 650  
TCCTCAACAA TAAAGGATTT TTGCATACCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 700  
AAAAAA 706

【図4】

FIG. 4

1 AGGCTACTGT AGGTAACCC CCAGCTTGGT TCTTCAGCTC CACATGGTGG GGTAGGAGA  
51 GGAGGAGGAG GGAGATGGAT GGAACCAATT AGGAACAGCA CTTGGGCTCC TCACAGGAAT  
121 GACGACGTCA TGCATTTGCG ATGTAAACAG CTTCACACTT CTCTCCCTAT CTACCAAAAT  
181 GCTCCCAACC CTGGGTCTCG GCCCATGTTC TTCCGCCACA GAGCCCTGTA ATPACTGGG  
241 TAATGAGAAG CTTTAAATGA GTCCCATTAG CATCTCGTGT AATAAAGAGG CCTTCAGACC  
301 CAGCTGCTGT CCTCACTTTG GGAATGAACG GGGTCCCTGT GTAGCCAGTG ACTTCTGTCA  
361 GTACAGTCTA AGTTCTCGGA TGGGTGGGA GACAAACATT TCAGGACCCC AGCAGCACTT  
421 GAGAGGTCC ATGGTGGATC CATGTTTGTG ACTGTGATAC AAGAACAATT GCTCTGGCTT  
481 CCTTCTCAT TTGTAAARA ACATTTTTTC TCTTTTAG AGACAGAGTC TTAGTTTTTT  
541 GCCCAGGCGC GAGTGTAGCA ATGCATTAAT AGCTCACTCC AGCCTCAACC TCTTGGGCTC  
601 AAGTGATCCT CCTGCTCAG CCTCTGGGAT AGCTGGGGCC ACAGCATGC ACCACCATGC  
661 CTGGCTAATT TTTAAAAATG TTTTGTAGA GATGGGGTCT TACTTGTAT GTTCTCAGA  
721 CTGGTCTGA ACTTCTGGCT TCAGCAATT CTCCCACCTC GGCCTCTAA AGTCTGGGA  
781 GATGGGAT GAGCCACAT GTCCACCTT GTAATACAT TTTTATAG CACTTATAT  
841 ATGTCACACA TTATAAGTC AGGATACAG TGGCAACAA AAGAGACAA ATTTTTCC  
901 ATCATGACAC TTATAATCT GGGTGGAGT GGTGATGAA AGCAGATAAG TAAATACTT  
961 AGCATAGTGG ATGTAATAAG TGCATGAAG GAAAAATGGG AGTAGGATAT ATGGAATTT  
1021 GGGTGTGTA TAATTTAAA TAGGGTATT GGGGATGCT TTGTGCA CAATTGTTTT  
1081 GTGTAARA TGAATAAAG ATAGGTTCT CTCCCAACT CAATATGAG AAGATAGAA  
1141 GCTCCAAAT TTGATGTC CTGGAGAG GGGCCACCC ATTCCTGTG GAGAGTTAA  
1201 CTCTCCCTC ACAGGTCAA GCTTATGCCA GTCCAGTAA AAGATGGGA GACTTGGGT  
1261 GAGCAAAAC TGGATTGAG CTTGTTCTC ACTGATTAAT AGCCATATG ACTGAGCAA  
1321 GTGACTGAA CTTCTGAGCC TGTTTCTCA TCTGAAAAT CAGATATTT CTACTTACA  
1381 TGTCATGAT GATGAAAC AGTGGACTC CTCCATGCCA AAGCACCTG CAACATCA  
1441 AACCTGCAC CCTATTGAA TACTGGGTC ACGATGGCT CTGGCTTGC TTTGATCT  
1501 CCCTGTCTC ATTACGAGC AGCATCTGC TCTGGCTGC GGTCTGATC CTGGTCTGA  
1561 CTCTCCCTC GAGCTCTC CTCTGGTGA GAAATAGCA GATATCTCC CTACTCTGT  
1621 TGTGGTGA ACAAGAGCT TGAAGGTCA GAGAAAGGA TGCCATTAAG AGAGGAGC  
1681 AGATTAGAT GGGGAAATG TAATCTGAG GAGAAAGGA TGCCATTAAG AGAGGAGC  
1741 CAGGGAGT GGTCTATGC TGTAAATCCA ACATTTGGG AGGCTGAGC GGGCAGACA  
1801 TGAGTCAAG AGTGGAGC CAGTCTGAC AACATAGTA AACCCCTCT CTACTAATA  
1861 TCAAAAAA TTAGCCAGT ATGTTGGTGT GACCTGTAA TCCAGCTC TGGGAGCT

1921 GAGGCAGAA AATTGCATGA ACCCGGGAGG CAGAGGTGTC GGTGAGCCGA GATTGAACCA  
 1981 TTGCACCTCA ACCTGGGCGA CAGTGTGAGA CTCTGCTCC AAAAAAANA AAAAAANA  
 2041 AATCAAGGC CGGGAGGGG CGAGGGGGTG CACAGCTATC GAGTCTGTGT CATCCCTGT  
 2101 GAGTTTACT LKGGGGTCT AAAGAGACTY TAGAGAGATG AACCTAAGTC CAGCTGATTC  
 2161 AGGGTTCAAG AAGSATTGAG GTGGAGAGAG CACTCAATGC KCTGTTGGG ASGTGGGGA  
 2221 GGCCGACACT GGAGCTTCTT TTGCCCAAGG AAGSAGGGGG TGTGACATC TTGAGACCA  
 2281 ATGTAATGCG GCACCTCCCT CTGGAGGGGG GAAGAGAGAG GACTGGAGGG GATCGTAAAC  
 2341 TGACCTTCTA ACCTTCAGGG GCTGTAGTCT GGTGTCTGCT GGTGGGGAGG GGCCGCTGCC  
 2401 TGAACTGTT TTGACGAGA ACCTGGGCGA GAGGGTTAAA GGGCAGGGAG CTGGTGGATG  
 2461 AACAGGGTGG GAAAGAGAGC CGAGGGGTCA CATCTACTA GCTGAGTCA GCHTGGGAA  
 2521 TTGGTGTGTG GAGGCGCAAG ACATCTGGCC TCCAAAATCT TTCTGTAAA TCATGACAT  
 2581 GAGAGTAAAT GTTATTAGG AGAAGAAGTA GATAAATTTA TTATATATGT AATATAGAGC  
 2641 ACCTTTAGAA TGAGAACCA AAGATATAGG GGAATATGCC AGTATATAT TTATTTTTTT  
 2701 TGAGGATGGA GTCCTACGCT GTCGTCAGCG CTAGAGTACA GTGGCATGAT CTCGGCTCAC  
 2761 TGCAAGCTCC GCTGCTGGG TCAAGCAAT TTCTCTGCTT CAICCTCTGG AGCAGCTGTG  
 2821 ACTAGAGGCA CGACACACCA TCCCGGCTCA ATTTTGTGA TTTTGTGTA GAGCAGGGT  
 2881 TTCACCATCG TGCCGAGGCT GGTCTGAGAC TCCAGACTTT GGTATCCGCC GCGCTTGCCC  
 2941 TCCAGAGTGG TGCGGATAT AGGCATGAGC CAGCCGCCCC AGCCTGAAT CCGCAATTT  
 3001 ATGTTTATGT TTACAAAGT ATGGACAGCT GTTAGAAT ATGCTGGAG AGAGGGGAT  
 3061 CCTCTATGTT TACAGAGCTG ACCTGGGAAA CCGAGGAGGG CTTGTGGA TTCTCTCTGG  
 3121 CCGCTCATAT TCCCTCTCTT TGCGATGGG GCGAGACCTT CTCTGAGTG GGGATGTT  
 3181 AGGCATTAAG TTAATAAAG TAGTCCAGAT AATTTTTTAT GCGCAGTITT TACATAGACT  
 3241 AATTTTAGGT TTATGGCTC GCTTGGGGGA AAGAGGCTCC TGTTTTTAT AGCTGGCCTT  
 3301 GGGGGAGAT GGGAGCCAG ACAGAGGAGA CAGAGGAGGG TCAGAGAAA ACTCTGCTT  
 3361 CTAGGGTGG TACTGAGGC TTCAATTTAG GGTATGCTCT TGTGAGGCC AGCATCTCTC  
 3421 GGTGTGAAA ATTTTAAAG ATTTTTTAG TCAAGAAAT GAGTGTGTA ATTTGTTTAT  
 3481 AAGCCATGGA ACTAGTCTCT TAGTCCAGAG GATAAATTTA CTCAAAAAT AATAAATA  
 3541 TTGTGCTAAT TTATGGAGC TGATGTGAGC ATGGGCTCCC ACCAAAGCCA GCGCTCTATA  
 3601 TGATATGAGT AATCAATGAT TTAGTAAAGT GCAATTTTTT CTCAAAAAT AATAAATA  
 3661 AATATATGGA AATCAATGAT GATGTTTTCT TATCAGACTA GCTCTGTCTT ATCATTAAT  
 3721 CAGAGAGGGA GAGGGCTGCT GTTCCGCTCT CCGCATGCG CTTGACCTAG TTTTATGAT  
 3781 AATTTTAAAG CAGCTCTGG TCGAGGAGT GGTCTATGCG GATGGTTAGG GATGTTTTAT  
 3841 AATTTACTTT TGGTTTACLA AATATATGGA ATTAACAGC GATTGAGTT AAGATTTTA

3901 TTTTTPATA AATATTTGA TTAAGCATT TTTTAACTG AATTAATAG AGCTTTTTA  
 3961 TATATTTGA AATGGAACA TTACATACAC AGGCACATAT AATATATAG ACATATAC  
 4021 AAGATAGAG CTATAGATTT TATCATTTTT TTTTTTTTT TTTTTTAT GAGACAGGTT  
 4081 CTTCTTTCT CATCTAGGCT GAGTGTAGT GTTSCCATCA CAGCTCACTG CAGCTGTAGC  
 4141 TCCAGAGGT CAGCAATCC TTCAACCTGA CTGCTTCTT GCGCTGCTG GCGCTGCCA  
 4201 CCAAGCTGG CTAATCTGGT TATTTTTGT AGATATGGGG AGTITTACCA TCTGCCAG  
 4261 GCTGGTCTG AACTCTGGG CTCAGAAAT TTTCCPACT TGACCTCCCA AAGTGTGGA  
 4321 ATACAGGCA TGAGGCACTA CCGCAGACCA GATTTTTAT TTGTCAATTT CTAGGTAT  
 4381 TTCCGACTC TGAGCTATC AATTTTTAA TTATCTGTT TAGTCTGTT TATTAACTA  
 4441 GGCAGCTTA AACTGTATC TCTAAGCAAT GCTTTTTGA TAAATATAG TAGAAATGT  
 4501 ATATTTCAA GGCATAGAT TTAGCTTAA ATAAGGTTA AGTATITTA ATTTAAGC  
 4561 ATTTCTTTT CTATCTAAA AGGTTTGGG GGTTTGGGT TAGAGAGGGA GATGCTTTA  
 4621 CAATGGAA TTTTGTGTT GTTTTTGTT TGAGAGGAG TCTTCTCTG TCACCAGAG  
 4681 TCTGCTGG TCGCCAGGC TGAGTGGAG TGAGGAGAG TGAGGAGAG TTAGAGCTGT  
 4741 CTTCCGCGT TCAAGTCAAT CTCGACCTC AACTCTGTA GRTGGGGA TTAGAGCTGT  
 4801 TGCCACAC CCGCAGTAA TTTTGTAT TTAGTAGAG HCGATGTTT ACATGCTGG  
 4861 CAGGGTGT CTGAGACTC CAGCTCAGT GATCCGCTG CTTGGCCCT CAAAGTCT  
 4921 GGTATACAG CAGTACGCA CTCGACCTG CTTTCTGTA GTTTTTAA GATCTGAT  
 4981 CATTAGAGT CTTTCTTGA TTTTTTAAA ATGTGTTAT GAGATGGCA AAGAGGAGG  
 5041 AGCAATAGG TGAGTAAA TTTTTTAAA GATAGTTAT TAGAAGAGA AGTGAATAGA  
 5101 GATCAAAAC ACATTTTAAA AAAAAATTT TAGCTACTG AACAAATTT TTAATAATG  
 5161 GATTTAAGA GAAACACAG AAGGCTTTA AATATACAC ATAGCTGAA TATACCTT  
 5221 TAATTAAGT GACTCTTAC CATGGAGCT TTAACAAA ATTTTAAA ATTTGCTCT  
 5281 CTTCTCTT AAACCTTTT GTAGAGTGG GTTTGGGAG GTTTCCAGG CTGTTGCTA  
 5341 AGCTGGGCA ACTCTGGG TAAGTATC TCGCTCTCT GCGCTCCAA GCTATAGGT  
 5401 TACAGGTT AGCCACTGC ACTCACTTA ATCTCTCTT GCGCTCTG GGTATGTT  
 5461 AATGCTGAT ATTTTAAAG TCAATAAAT ATTAAGCCA AAGAGCTGA TTTTGAATA  
 5521 GAGAGAAAC CTAAGCCAG GTGGAAAT TAAATTTAA CTGTAAAT GAGAGCTCT  
 5581 CCAATGTTA TTTTGTATG AATCCAAAGT GGCATTTGA ATGTATGTA CTAATATG  
 5641 GTTTTGGC TTAATTTA TCAAGAAAT TGTATGTA TTTTAAAT TTAGAATTT  
 5701 TCTTTTTAT TTGATATC AATCTTTTG AACATAGA TTTTAAAG CTTTATTTAT  
 5761 TAGCTAAG GATTTATCT TTGGCCTAG ACAATAGA TTTTAAAG CTTTATTTAT  
 5821 TCAATAGCA ACTAATCCA AAGTTTTCT TAGTCAAG AAGCAGAG CCGAGGAGG  
 5881 ATGAGACT GTAGACAAA ACTCCCTAG GAGCTGAA TTTTAAA GATGCTGTT  
 5941 GCGCCCAA TCTTTCAA CTGGCTGTA TGTACTGTA AATACACT CTTTGGAT  
 6001 GTSAGACCA AGCGGAATA TCCCTCTG TCTACTGTA AATACACT CTTTGGAT  
 6061 AAGGGAGCA CTTCCACT GTTTTTAT CAGGACTGG CAGCAAGT TACTAAGA  
 6121 GAAGTACGA TAACCAGAC CAGGAACTG ACCGTTTC AGGGCCACT CAACAGTGG

FIG. 4CONTD

FIG. 4CONTD

6181 GTTCCAGGCC TGTTCATACC TAGGTATACC CTCTATGTA CAGACACCA AAGACAGA  
 6241 CAARAACGAA GAAACACGGC AAGCAATATC TGAAGGAAA AAGGACAAA  
 6301 CAACACAAA AGCTATTTCT GAAGGAGATC GGGTAAACT ATGATACTT ATCCACAAA  
 6361 GTACTAARA AATATACGA CTCACATATC CAAGTATAGT CACACACAAA ACTGTCTCTC  
 6421 TCAATRACT TCAATTTGTA AAGGAABAG GAACAAATGA TTTTACTGT CCACATACCT  
 6481 AGCTACCA GAGAGGGA ACTTGAALA CTGGAGTCTT GGCAGGAAT TCTCACTCTC  
 6541 CTGCTGCTT CCGCAGTCTT TATATTTCT TCTCTGGC TTCCGAAA CACAAATAGC  
 6601 TTGTTGGTCT TTATTTGTA TGCCAAATCT TGCTTTGGC CCGTAAAGT TTAAGTGA  
 6661 ATACCTGCA TGAACAGAT TAAAGGAGA AAGGGATAC AATTTTATA AATAGGAAA  
 6721 GAGCCTTTA GATAGAGCC TGAAGCTAT AGGGAAATG TCTATTTTT ATGTTAAGT  
 6781 TTAACAAAT ATGACAGCT GTTGAAGAT TGTGAAAT GCTCTCTCT TGGATTTCT  
 6841 TTAACAGCT GAGTGGGGA ACCAGGAG GCGCTCTCT TGGATTTCT TTAGGCTCT  
 6901 CTAATCTCT CTTCTGCTG TGGGGAGGA CCGCTCTCT AATGAGGTT TTAGGCTCT  
 6961 AGTCAATAA GATAGCTAG ATTTTTTCT TTTTTTTTT TTTTTTGGC TGGAGTCTCT  
 7021 CTGTACAGC GCTGAGTGC ASTGGCTGA CTTGGCTCA CTGAACCTC GCGCCCTGG  
 7081 CTGACAGCA TTCTCTCCG TTAGCCTCTT GAGTACCTGG GATTACAGG GTGTGCCAC  
 7141 AGCCCAACT AATTTTTTA TTTTATAGC AGCAGGGT TTCACTTGT GGTGAGGCT  
 7201 GTCTAAAT CTGACACTT TGAATCACT CCGCTGCTCT CCGACAGTC TAGGTTACA  
 7261 GCGCTAGGCC ACTGTGCC CTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTATGGA ATGATTTAT  
 7321 GCGCTTTTA ACTAGCTGT TTTTAAATA GATTTATGCT TTAGGGTGG AGCCCTTAA  
 7381 TAAAAAGGG GAGAGAACCA TAGGTTTAG GGCCTATAT TTAATGGT AAGCAGGCA  
 7441 TAGCTGAAG GCGATATC GACCCCTCT ATCAAGAT CTCAATTTA TATTAATCC  
 7501 TAGCCGCC CAAAGAGGGA AATGCTATG GAGGAGGCT AGTCCCATTT AGCCACTCT  
 7561 CCGACTTAA AATGCTCT CCGAGGCTGG CAGCAGCCCT AGTCCCATTT AGCCACTCT  
 7621 GTGCTTAGC TTTTTTTTT TTTTTTTTT GAGGTGAGT CTGCTCTGT TGCCAGGCT  
 7681 GAGTGCAT GCGCTGATC CGGCTCATG CATCTCTCT CTCGAGGTT CAGGACTTC  
 7741 TCTGCTCA GCTCCAGG TGGCTGAT TACAGGACC AGCCACTAT CTGACTAAT  
 7801 TTTTGTAT TTATAGGAG ATGGGTTTC CCGCTGCTCT CCGACAGTC TAGGTTACA  
 7861 TGACCCAGG CCAAAAAGG GGTGAGTCC CCAAAATGC TGGATTTACA CCGTCACTC  
 7921 ACCAATGCT GCGTCTAG CTAATTTA ATGGAGTCT CATCTCAAT GGTGAGTCT  
 7981 TCAATGCT TTAGGCTCC CAGACATGT TTTAAAAT TAAATGAC GAAGAATTA  
 8041 GACCCCTGT AATGATTA TACTTTGTT TGAATATCT TCAATATCA TCTTAAAC  
 8101 TATGTTTAT ATGTTTAT TATATAGC TAGTATATG TTAGTTTTT TAAATATAC  
 8161 AATGATTT ATTTTGGCA TCCCAAAA CCAAGAGT TAGTATATG ATGTTAGG  
 8221 AAGAGAGG TTAGACTCT AAGAAATCT GCGCTGCTCT CCGAAACT CACAGACAA  
 8281 GTAGGAGAC CCAAAAAGG GGTGAGTCT ATCTTTCTG AATTTTTTT TTTTTTAA  
 8341 TGAGTCTGT CTCTGACAC AGGCTGAT CAGTGGTCC AATCTGCTC CAGCTCCCG  
 8401 ATGACTAG ATTCAGCA CCGCCACCA TGACAGCTA ATTTTTGAT TTTATAGTA  
 8461 CAGCGCTT CCGCATGTT GCGAGATGG TCTCGGCTC TTGACTCGT GATCCGCGC

8521 CTTCCGCTT CCAAGTCTT GGGATACAA GCGTAGGCA CTGACTCG CCGTCAAT  
 8581 AATTTTTTT GCAATTTTT ACATAGATA ATTTTAGAT TTAGGCTGG CTTGGGGGA  
 8641 AAGGGTCTT GGTTTTTTA CCGTCTCTT GGGGAGAT GAGCCAGGT ACAAGAGCA  
 8701 AAGAGAGGT CAGAGAAA CTTCTGCTT TGAGGCGCT ATGAGGCT TCAITTTTGA  
 8761 GTATGCTCT CTAAGGCA GAGGTGTA ACTGTACCA AACCATAC ACAGCCAGC  
 8821 TGGGTCTG TAGAAGAG CTCTCACTC GGGTCTCT GGTATGTT TGTCTGGC  
 8881 GTGGCTGAT TGTCTGATC CTCTCCCTC CTACGCTCC CCGCCCTCC CTGAGCAC  
 8941 CTTGGGATG GTGACTCTA CCGCTCCCT CAGCCTCC TAGACCTCC CAGAGCTCT  
 9001 ATAGGGAGC TGGAGCTAG TACTGAGC CTCTCTAT CCGTCCACT CGTITCTT  
 9061 CTTGAGCA GACAGGCA CAGCAGTGT TAGAGAGAG AGGAGCCTT CTAAGCAGT  
 9121 TCTGTATCT TCGAGGCA CCGCCCTCC GCGCAGAGC TCGTCAAG TAGCAGT  
 9181 GGGAAATGC TGGATGACC AGAGCTGGA CAGGGGCTT GTATCTCT GACTGCTCT  
 9241 CTTCTCTT TCTTCTCT TGTATGTT CAGGAGCTA TAAATGTA ACCAGAGC  
 9301 TCTGTTGTT AGACAGGCT CTAATAAT CACACCCCA CAGAGCTCT CCGAGCTGG  
 9361 CAGCTGTT CCGCAGTGT TCTGATTT CAGTGTGCT ATGCTGCTT CTAAGCTAA  
 9421 TCTGATGCT TCGAGGCA CCGCCCTCC GCGCAGAGC TCGTCAAG TAGCAGT  
 9481 AAGTTTCT TCTGTACC CAGGCTGAG TCAATAGG CAGTCTCT TACTGCAAC  
 9541 CTTCCCTCC CAGGTTAAG TATTTTCT CCGTACTG CTTGAGCTG GATTACAGC  
 9601 ATGCCGACC ATGCCAGCT AATTTTTTA TTTTATGTA AAGCAGAT TCAACTCT  
 9661 GCGCAGGCT GTCTGACT CTAAGCTCA ATGCGCCCG CAGTCTGCG CCGCAAGT  
 9721 CTAAGATCA CAGTGTAG CCGCTGCT CAGCCTTT CTTTGTAG AAGAACTT  
 9781 CTTCTCTCC CAGGCTGGA ATGAGCAAT CATAGCTCG GCTCACTCA ACTCCAT  
 9841 CCGGCTCA AGCATCTT CAGCCTGCG CTTCCAGTA GGTAGGCA CAGGCTAG  
 9901 CCGACGCC TGCTAATTT TTAATATTT TGAATAAGT GTGTTTCA CCGGCTGCG  
 9961 AGGCTGCTT CAACCTCT AGCTCAGT ATTCAGCTG TTTGGCTCC CAAAGTCTA  
 10021 GHTATAGG TGGAGGCA TCGCCCGG CTAGGCTCA ATCTTTTGA CATCTACT  
 10081 GATTAAGT CTTACATCG AATACCTTA TACTTTTGA TACTTTTGA AGTATGCT  
 10141 TTTTCTCT CCAATTTGT AGTAAAGG CAGGCTCA GAGAGTTA ATACTGCT  
 10201 GGGGTTCCA CAGCTTAG TGTAAAGT GGGTACAA CATTTGAT CTTGAGCTT  
 10261 TACCCACT CTAGACTCG CCGTCACTA TAGAGCTGT GGCARCTT GCGCTTAGC  
 10321 AGCTCTGG GAGAGGCG TCGTAGGA AAGGAGAG TTTCTACT TGAACAAAC  
 10381 AATAAAGA AAGAGGCT CAGGCTCG AATATATG GACAAAGG GHTTGA  
 10441 GATGCTAG CATGTTGT GAATTTAA TAAATATAT CAGACTAG CAGGAGCT  
 10501 CCACTCTGG AGCCCTTAC AGGCCAGAT CCAAAAGC CCAACAGC TACTGGA  
 10561 GTGAGACT CAATGACT GGAATGCT TCAAGTAA AAGATATC TAGTATCT  
 10621 GCTCTCTT ATTTAATTT TTTAAGTT TATCTAGTA AACTTTTTT ATAAAATC  
 10681 CAGCAATG GAGTGGCA AATCATCT ATTTTATA TCTGAGGA TCTGAGCA  
 10741 TAAACAAA GGTGCTAG TCTCTATG GATTAACAC CTGGCCAG CAGGCTACT

FIG. 4CONTD

FIG. 4CONTD

10801 CACTCTGTA ATCTAGACG TTTGGGGAG TGAGGOGGGA ATATTGCTGT AGCCACAGAA
10861 TTTGTGACCA GCTCGGGGAA CATAGTGA GA CTRGACTCT ACARAAAAAA TTTAAAAAT
10921 AGGTGGGAGT GGTGGGCTAT ACCTATGATG CAGACTACTT GGAAGGCTGA GTGGGGAGGA
10991 TGTGTTGAGC CCGAGGGGG GCGAGGGCTG CAGTGGCTGT TGTGTGTGGC ACTGCATCTC
11041 AGCTGGGGAG AGCAGGAAA ACCCTGCTCT ABAABAAAGS GBAABAAACA AATATTAAAG
11101 ATCTTGTGTC TAGATTGGGG CAGACTAARG AGTCAGTGGC CATGATGAAA GCTTGAATGG
11161 ATCTGGGAAA AGAABAAATA AAGCTTCAAA GGACATGTTT AGAAGTTTAT AAAGGACATG
11221 TAGAGAAATC TGAGAGTGA TGCTGTGGG ATGAGTATG TGAATTTCT TAGGTGTGGT
11291 GATGGAGTGA TMTTGTGA AGAAGATGTT CCAATGCTAT GGAGAGGATC GCTGACATTT
11341 TAGGGTAAAB TGTATGATA TCTTAACTT ACTTTGAGT GATGAGGATG CAAGGATTTG
11401 TGAATATGTC TATATGATG TATTTATATG CAGACATA7G TGTGTGTGTC AGACACACAA
11461 GATAGTCAAA GGTGTTAACA TTATCAATGT GGACTATTAG ATGAGGAACA TACAGTATAC
11521 AGATGTTTAT TGTATCTTTT TPAACITTTT CPTAAGTAA AAAAACAATTT CAAAATATA
11581 AGCTATATG AATTTTAAA ACATCATTTT AGCTATPTCT TCTGTAPAAA TCTCCAAATG
11641 GGTTCCTATT TGTCTCTTA CCGAGGCTTA CAGAGCCAT CATGCTGTC CCGAGCTAC
11701 TCTCTGATCC TCTCTCTCC TGCTCAAGTG ATTCGGGCA CCTTTTCTT TCTCTTTT
11761 TTAGACAGTC TTGCTGTGC ACCCAAGCTG GAGTGCAGTG GTGCGATCT GCTCACTGC
11821 AACCTCCACC TCCCGGTC AAGCAATCT CCTGTCCAA CCTCTAGAT AGCTGGATTT
11881 AGGCGATCC GCGCCATGC CCAAGTAAIT AGCTGATCT TCTGTAPAAA TCTCCAAATG
11941 GAMPPTGTC CACTATATC CTGCTCGAG GCTACTTCT TGTGATCAA GCGATGCCA
12001 TATCTGACA TGACACTATA TATTTATTTT CTTCTATAG TGTGCTCTT CTGACCTTA
12061 CAGTAAATG TGTCTCAAT GAAAATGAG ACTTTGTTCA CTTTATGTC CAGTAACTA
12121 GAGACTGCTC AGCAGTAA TGAACACTA ATAAATGTT ACTAGTAAA AAAATATGA
12181 GACTGGGAT CTTCTCTAT AGGACTATC TGTCTGAAA AGGAGACTGT TTTCACTGA
12241 AHTAAATGA GTCAAGAGC GAGTGTAGC AATTTGCTAT GGGCTTCAA AGAAGAGGA
12301 GGCATCCGG GCTGTGGGA ATCAGGGAGS GATTTATGAT GTTCTCGAG GTTGGAGAG
12361 TTAGTCAAG AGAGACTGA GASTAAGCC ACACATGAT CATGATGSG TGGGTAGGG
12421 GCAATGGAAA GATCTCTGT CCGTGTGTT GCCACGGAA TCGAGGGGTC CTCCGACTG
12481 AGSCTGGCT CTRAGTATG AGGAGAAA CACAGGAG AGAAGACTT CCAAGTAAAC
12541 CCTGGAGAG CAGAGGAG AGGAGGAG AGCTGGATCT TTGGACAGG TCTGGGCAA
12601 ATTCTAAGC ACCTCCGCT TAACTGGGT TAGCGCTGT TAGGACTGT ACTTACTCT
12661 ATTCAGCAT GAGACACTG TGTCTAGCC CTCTTTGT TTTGGAGGG TCTGATCC
12721 TCAGCTGAG AGGAGATGG GGGCTGAAA GCTCTGGGC TTTCTATTG CTCTCGAAT
12781 TCAATTTGCT TTTCTCTT TGTCTCTT TGTCTCTT TGTCTTGRA TGAAGGCTGA
12841 CATGTTGGA CTGACTGAT TTGAGGAGS GGGAAATTT GTACTAGCC AACAGCTGAC
12901 AGAGAGAGC CAGGCTGTC GTGACAGCA GGAATAGAAA GCTACGAGG GCTAGAGGG
12961 CAABAATTGG AACACAGCT TCAATAGS TCTCTTAGC TGAAGTATG TGTGAGGG
13021 TCTTTGGTGG GAACATAGC TTTCTCTCT CAGTCTCTT ATTCATGCT TTTACTCCG
13081 GCTCAAGCC TGACCTTCT CTAAGAAA ATCCAAAGS TGACTCTCT TACTCTCTC

FIG. 4CONTD

13141 AGCTCCACC CTGCTCTCT ACTGTGGTT AACTTCTCC TTTGAAGTG CAGGATCTGG
13201 GTCCAGATT GCCTGTGAGS AAGTGTCTT TATCACTCA CCCCACATC CCGTGGTCC
13261 AACTAGATA CAGAAATTC TACTGGGCT GAGACATAT TTCCACTCA CAGACTCTT
13321 AGCAGAGCA TGCCAGGCG CCGCTCAGA GTCCCTGAC ACAGCAATC AGGACTGCA
13381 CAGCTCTTC TACGATGGA AGCCAAATG ACCCCAGCT CCGCTCTCT CTTTGTGT
13441 TTTTTTCCC TCCCCCTGAT TTTCTCTTT TGCTTCCCT TCTATTTTT TTTCCATTA
13501 AAAAATTTG GTAABATTA CATACATAC AATCAACAT TTTAAGCTG TTTAAGCTCT
13561 TAGTCAATG GCATGAGCA CATTATGTT GTCTGACG CATCACTGC ATCCACTCT
13621 ATAGCTGTT TGCATGAC CAACCTGAA CTTCTGACC ATTAAGCAT AAGCCCTAT
13681 TCTCCATCT CCTAGGCCC TGTACTTGA TACTACTIT TGTGTTTCA TGAATTCAC
13741 TTTTCAAGT CCTCAATA AGTGGAACT ATATTGTC TTTGTGTGT GCTTATTT
13801 ACTTAGATA AAGTAAATG TTTTATTAT CAGGAAATG TTTAAGCTG CTTGTCTGG
13861 ACTAAGCTT CCGCTGAGG CTGAGCATAG AGCCCTCTG GTCTTTTAT TGTAGTGT
13921 CACTTCTCT CCTAGCTCT CTTGATPTC TCTGTAPAAA TCTCCAAATG
13981 GCTCTCTCC TGAAGTGTCT AGTGTGTC GTTTTCTCT AGTCTCTCT CTTCTCTAT
14041 GCTCTGATG CAATATTTCT CACTCCCTC CCGAGCTCT GCTCTCTCT CTTGATTT
14101 AGCTCTCTG CACTCTCTT CACATGCAA GAGTGTCCG GATCACTGT CCCCAGCA
14161 GGTAGAGAT CTGAGGAAA AGCTGTGTC CAGTAACTG TCAAGGCA AGAAGGCTC
14221 ATHTCCCGAG AGGTGGGGC CTCCAGACC CTGCACAGC TGCACAGCA AGTCCACTG
14281 CTAAACTTG AGGTGCTTT ABAATCACT GGCAGGATG GTCAGGATG GGTCTGTGT
14341 CTTCTGACA CTTCTGATC CAGAGCTGT TGGGGTAGS ACCAAATTT GCTTTCTTA
14401 CACTCCOCA GGTGGTCTG ATGCTTGTG CTTGAGCTG GCTCTGGA CACGACAGA
14461 GATACCTGG ATGTTGGGG AGGGCCGGG AGGACTAGA TGGAGCTT GGGGTTGGG
14521 AAGAGGCTC TGCGCTTGT CCGCTGAC ACCTCCATG TTTTCTCAT GTCCTCTCT
14581 CATTCTGTG TGACTACTT GGGTGAAG GACACCCAA GTCGAGAG TGAAGAGGG
14641 GGGAGGGGG GCTTGTGTG ATGCGAGGS CCGTCAAGA GCTCACTCT GCAATGGA
14701 AGTAAAGGC CTGAGGCTG AACTCTCCC GAGCACTG CAGGACTG GAGGACTG
14761 TGGAGAGGC ATGCGAGCT GTTCTGGCC CTGCAAGT GAGTGGGG CAATTAATC
14821 TGCTTTCTT CACTTGGC TGTCCCTCC ATGACTCTT CTTGACTCT TGAAGTGTG
14881 CAGGGCTCT GTGTTCTA CAGACACAA GAGTCCAG GCCAAATTT TCAATGGCT
14941 AGCAATGTC GCTGGGCTT CAGTCCAG CTTGAGGAT GAGTCTTGA TATCACTCT
15001 GAGTGAAGA TCAAGCTGT GGTGGGGG CTTGAGCTG GGGTCTTGA TATCACTCT
15061 AGGGTGGG CAGGCTGAG GTAGTGGGA CAGACCTT GCTCTGCTT CTTGACTCT
15121 CTTGAGGTC CTTGAGAG AAAAATGAA TCCCTTTCT TGAAGTGTG TGAAGTGTG
15181 AGATGCTAT GGTGGGCTC AAGGGGACT TCTCTGCT GAGGAGAT AGATGTAAC
15241 TGCTACAAA AATGACCG GTGTGCTGG ATGCCACGA GAGCAGCTT CAGTACCC
15301 TGACTGAGA TGAAGTCTG GATGAGGAG TGGGGGGG CTTAGGATG ATGCGAGG
15361 TGAATGCTT CTTGACAG ATCAAGAGC GAGCACTGA GGGGCTG GGGGCTG

FIG. 4CONTD

15421 TGGAGGTTT TGTAGGCCC CCAACCAGT TCTCTGGGG CTCAGTCTT CTGACTCCA
15481 TGATGGGGG GCGCATGGS AATGCTGG GGGGATGGA GGGGATGGC ACTAGACTG
15541 GTTTTCTTT CCGTCTCAG GTTCTGAGT AGGTTCAAGS ABAACAGTGT GCGTGTCAAG
15601 GTCTCCAGG CCGCTGCAAG TTGAGACTAC AGCAAGCTAC GGTACAAA AAAGGGAGT
15661 CATCTCTGG AGTGAATCT CAGATGAGA GGGGGACCA TGCAGAGT GCAATGCTT
15721 CTTCTGAGC CAGCACTAT CCGCTCTGC CTTCTGTGT GGGAGATCT CTTACTCTC
15781 TGATGTTGG CAGTGGGTC GGGAATAA TACCTTGA GAGGACCTT GTCCAAACC
15841 CTTCTTGT TCTCTCCA AAGTACTG CTCAACCOC CAGCTCTCT CAGACTAAT
15901 AAACATGTC TGTGGAAG GTTCACTGC GTTGGGAGS TCTTGTCCC CCGTACTTT
15961 TCACTGAGT GACTTAGAC CCGTCCGCC GGTGGGAGT TCTCTTCAA GTCCTTGA
16021 GCGACTAAT GAGTATAA GAGGAGAAA GAGGAAAT TGTCTGGG CTTCTGAGC
16081 GCGTAGCTC GATGGGGT TTAGAGAAA GTGCGTGG TGGAGGCTT CCGGGGGAG
16141 TTAAGGATG GCTCAAGTC CAGGTGGCC AGTGAAGTA TCAATTAAT GTGCTCGTG
16201 AGAAGAGAG TGAGCTGCC TGTGTTGGA GAAC TGGGG TCTTGGCC ATTTAGCTG
16261 ABAAGAGCC CAGGCTGCA GGGCTTGT ATGCTGGGT GCTGGGAT CAGGGGCTC
16321 CTGACTTGS GAGGCCCTC ACCCTTCTA CTTCCACCA CAGGAGGG CTTCTGACA
16381 CAGGCTCCC GACACCCC TCCCTTCTA CCGCTGAG CAGGCTGAG TCTGACAC
16441 GTTACTTGC TGTCTCTT CCGACAGTC GGGCTGAG CAGGTGGAC TCTGACTAC
16501 TCACTGATG AGGCTCCCTC ATAGAGCC TCCAATCTT GFAACTGG CPTTCTCT
16561 CTTCTCTT TATTTCTT GCGTATGT CATATCTTT TTTCTGCT TCTCCAGT
16621 TCAACATC CMTTCCC TPTTCTGT AGCTTACT ATATCATA TGTAAATTT
16681 TGAABATG TTAATATT TCCACTCT CCGTACTC TATTTCTCA TGAATCTGT
16741 CTTGCTGTC TTTCTCTC CTTCTGCT GCGCTACT TGGGAGCA AGCTGCTAT
16801 GTAGTCAAG TAAATTTAT ATCTGGTC TGTGAAGCT TAGAGGCTC ATTTGTTT
16861 TTGCTGTC GCTGCTCT CTTCTTCTA AGTCTTCTC CTGCTTCC TCTCCAGT
16921 TCTTCTCT AACTCTAT GCTTGGGCT TGGGCTCT CTTCACTA CTTCTCTCT
16981 CAGGAGCTC AGGGCGGCT ATGAGCTG CAGGAGAAA CTGATACT TCTCTCTG
17041 CCGTAGATT AATCTGCT CTAGACAAA CCGAGTCT TCTGACAC CTTCTTTGA
17101 GGTAGATG AACTTGGGA ATCACTCT TCAAGCGGG TGAGGGGCTA GAGCTGCTC
17161 TGTGTTGGG GAGGTTGCT CTTTCAA TGGGCTAG CAGGCTGT GCGACCTC
17221 TCCGCCCC AAGCTCCC CCGACTGT ATTTTGA ATGAGGGA CAGAGGCTA
17281 TCTGGCAG AGTGGGGTG AGCTCTCT CCACTGCC CCGCTTCCA TCACTCTC
17341 TGCTCCAGG GCGAAATG TGTACTTT CCAATGAG TGTCTGTA TTTCAAGG
17401 CAATTTGAG AACTGATCA GCTCCGCT CCACTCTC ATTTCCCTC ACAGGCTGA
17461 AGGACTGTC AGCTCCCTG CTTGGGAGT ATGGAGAGS GGAAGGCTA GGGCTTAC
17521 CCGTCTCT ACTGTCGA TGTGATG GACTGAT TCAAGGAGS CAGAGGCTC
17581 CCGCTCTCT TTTACTCT GCACTCTT TCCACTCT CTTCTGTC TGTCTCTCT
17641 TTTCTGGG CTTAGSAGT TGTGTTTCA TCCCTGAAA CAATAGGA CTAATTTCC
17701 CCACTGTGT TCAAGGTTT GATTTGGCT CATCACTG GAGGAGCTG GATCTCTCT

FIG. 4CONTD

17761 ACCAGTCTC CCGTCCGAG CCGTGGCTT TCTCTGGG CCGTCTCT TCAAGCTGT
17821 CAGGCTCTG AGAGTGGG TGTGTTAGC CTTGAGGAG CACAAGCT CCGTACTTC
17881 CTAACCCCA TGAGGAGCA CTTAGCTAC TCAAGCTA ACGCACTT ACGTACTTC
17941 TCTGGCTTA GTCCATTTT CTTCTCAG CTTGAGGCT CTTGAGGCT TGTCTCTGT
18001 GGTGTTCTC CAGTCTCT CTTGCTGAG GACTGGGAG GAGTAAAT GCTGTCTCT
18061 TCCACTTGT CTTGGGAT TCCCGCAG GTCACATG ACCTGACTT GCGTCTCCC
18121 TCCAGTAG CCGCTGGA TTTTGGGA GTCACAGT GTCAGCTG TGTGATGT
18181 TCAAGCCTT TGTGTGAT AAGTGAAG GTCTGCTC ACCTGCCC CTTGATGAT
18241 TGTGACTA CCGTCTCA CACAGACAA CTTGACAC CTTTCTCTT CCGTACTCT
18301 AACCATCAT AGCAGCAG AGGGAGTT GAGGGGGAG ACCTGCTAG GACCGTGGC
18361 TGAAGTCT CCGTCTCT AGGCAAGCA CATATCTGA GATGAGCTT AATTAAGG
18421 TGGTGTTC ABAABAAA CTTGGGACT CTTGAGGCT GTCAGCTG TCACTGTA
18481 TTTCTATG ATTTGAGC ABAATGAG CAGGCTGT CAGGCTCT AATCTCTC
18541 TCTCTATC CCGTCCAC ATAGCTAG ATTAGCTT TGAAGCTT TGAAGCTT
18601 GAGTCAAG GGTGATCAC TCTCTGCT ATCCCTGT TCCCGCCC CCGCGCCG
18661 CTTCCCCC GATCTTGC TCTTCCCT CTTCTTAG CTTCTTAG TCAAGGAG
18721 TATTTATG TGTACTTG TGTACTTG CTTGAGCT GCTTCTGT TCAAGGAG
18781 GATGGTGG TGTGGGGG AGGGGGTG ATGAGAGT TGAAGACT AAGCTCTG
18841 TCTCAGCT TGGCTTAC ACCTCCCT CTTAGACAC CAATCCCT GAGCTGCC
18901 AGTGGGCT TCACTGTA GATTTGGG GTTAGGAG GAGGAGAG GAGATGAT
18961 GACCAATA GAGACAGC CTGGCTCT CAGAGGAT CAGAGGAT CCGTACTG
19021 TCAACAGC TCCACTCT CTTGAGCT GCTTCTGT TCAAGGAG TTTTATG
19081 CCAATGCT TCCCGCAC AGCCCTGA TTAGCTGT AATGAGAG TTTTATG
19141 TCCATTAG ATCTGTTA ABAAGAGG CTTAGAGAG AGTGTGCT CTAAGCTT
19201 GATGAGAG GGTCTGTG TACGAGTA CTTCTGAC TACAGTAA GTTCTGGAT
19261 GGTGGGAG ACAAGATT CAGGACCA CAGGACTG AGGAGTCA TGTGATCC
19321 ATGTTTTG CTGATCA ABAAGCTG CTTGCTGT CTTGCTGT TGTAAATA
19381 CATTTTTT TCTTTTGA GAGAGACT TACTTGTG CCGAGGCT AGTATGA
19441 TGAATATA CTTACTG CCGTCACT CCGGAGCT AGTATCTT TGAAGCTT
19501 CTTGAGTA GGTGGGCA CAGGATCA CCGAGCTT TGGTAAIT TTAABATG
19561 TTTTTPAG ATGGGCTT ACTTGTAT TGTCTAGT TATGGGAG ATCCACTG
19621 CAGCAATC TCGAGCT CCGTCTGA GGTCTGGA TATGGGAG ATCCACTG
19681 TCCAGCTG TAAATCAT TTTATGAG ACCTATTT TCAAGGAG TATTAATG
19741 GGTATAGT AGCAACAAA ACAGACAAA ATTTTGGA TCAAGACT TATATCTG
19801 GGTGGAGT GTATAGAA GAAATATG ABAATCTA CAGATGGA TATTAATG
19861 TCAAGAGG AAAATGGA GTGAGTATA TGAATTTG TGAATTTG TGAATGGA
19921 AGGCTGTC GAGATGCT TGTGCTAG ATTTTGTG TGTAAATG TGAATGGA
19981 TCGGCTCT TCCCAACT AAAATGGA AGATGAGT GCGCAAT TCAAGCTCT

FIG. 4CONTD

20041 TTGGAGAGGG GGGCCACCCA TTCCGCTGCG GACAGTTCAC TGTTCCCTCA CAGGTCAARA...

22381 TAGTCTGAG AATAGGCCAG TCTAGTTRAA TAGTATFAG TTGTGTCTAA ITTTAGGGAG...

FIG. 4CONTD

FIG. 4CONTD

24661 CTTTTGGCCA TTGACAAFTA GAATTTTTAA TGGGGTATT AATTCANRA GCRACITFAT...

27001 TTATATATA TGACTAGTA TAGCTTAGT TTTTAAATA ATACAAATA ATTTATTTTT...

FIG. 4CONTD

FIG. 4CONTD

29281 CCAACCCCTT CTTCTCTCT TTTTCTCCCT TGCCCGCCCT TATCCCTCTG TTAGTCCAGG
29341 TAGGAAACCA ACACACAGAA AAAAACACGA TTGAGCCCTG ATTCCACAGC TTCTTACTCT CAGTAGAGGT
29401 AAAAARATA GGAATTTCTA GGGTAGGGT ACAGAGGGGG GATAGGGAGG ATGCTTTTTT
29441 AAGTTTTTCG AAAGACGA ATTCATCGG TACAAATGCT TTPAAGATA TTGCGGGTGG
29521 GACITATTAC AATTCATG TGTAAGATT AACTGCCCTT TGACTCCAAA TCTGTTCACG
29581 ATCTTATTAT AGGAGTGGG CAGAGTATTC AACAAATTTG GAAATGTTGG TGCCCTGACCA
29641 CCACATCTGG GCCCAGGGA GTTATCACCA GCGGACGCTT GCAGGTGGCA GCACTTGTGC
29701 CATATCCAAA AGSCCAGAC CTTTAAAAAA AAAAACACCC AGGGAGTGG CAGATATGGG
29761 CTGACACGCT TTGGAGCA CAATTTCCA GCCCAGATA GTTAGAGTAT CTGAGTCTTT
29821 CTGAGACAAA TCTTTTCAA GACCTGGCC AATGAGATST CCTCTGTCCG CTTCTTTGTT
29881 AATGATATGAG AGGATATGCC ATCCACTCCG TTCTCTTGA GAGCTGTGTA GGATGAGGGA
29941 AATTGGGGCA GCGAGAGGAT AGTACATAGG TTGTCCTAGG CAACCTGGGT GTATGTGTGG
30001 GGGGTGTGTT CTGTGTAAT GCATCTGTGT GTGTGCACA CAGCCGAAGG ATGCTTGGGT
30061 TTTGAAAGA GAGGCTCCG TGAGACTGA GTTTGAGAT GAAATATCTC AGCCATGTCT
30121 ATTGTATTG TCTCTCTGCA GTPSCAATTA ACCTGTCTGT TGTGTGTGG CACCCACCTT
30181 GCTGTACGCA AGTTCTAAA AAAAATAAAA AATACACAGG GACAATCAAG AGCCCGTCTT
30241 GGGCACACAG TCTAGACTT GGGATTCAGT TTGAGAGAGA AGAAGACGTT CCTTCTGAGC
30301 ATGTTGCTTT CTTGGAATTC TGAGCTTAGG GCCAAAGGG AGAGGAGAGG AAAACTAGAG
30361 GCGARAGCT ATGAGGATA GAGARAGGG TTGTGGAAGA CAGGGAGAGA AACATCATG
30421 GACATGTCGG AGAGTGGGG AATCACAGCT GAGAGTGTGT CCTCCCATC CACACATGCA
30481 TGTGATCAC CTGGGGGGCT GCTTAAATGT CAGATTTCTG CTGAGAGGAT CTGGGGTAGS
30541 AACAAAGGCT TCAAGACTT GGGATTCAGT TTGAGTGGCT GTTGTCTGTG TGTGTCACAG
30601 TGCATCTCTG GAGCACTAC TTTCTGTCCA GTGTGAACA GAGGAAACT TGAAGAATAT
30661 AGGCTCTGG ATTCAGATA GCTCTAGGAA GAGCGTGT TTCTTGGGAA AAGGATGAT
30721 GGAATCCGGT GGGAGCTCC TGCTCAACC CTCTTTGATC CTTCCATGCA GGGATCCAGA
30781 TCTGTACGAG CTGCTCAGA GACTCTTCAA AAGCCATCA TTTCTGGAGG GATTCCTCAA
30841 AGCCCTGAGC CAGCTCAGA CAGTAGAGG GCGGCCCTAG GGGAGAGGG AATGAGGGG
30901 AGGATTTCTG AGATAGAGG CTTGGAGGAT CCTTTCAGAT GGGAGAGAGA TGGGGATAG
30961 AACTCATGG TAATACACA CATCTATG ATCACACACA GCGTAGAGT GCGTAGAGT
31021 CCCCATTGAC ACATCTCTCT TGGTTCATG AAGACTTCTT CATCTACTTC AGCCAGGTA
31081 AGTATGATC CTTCTCTCC CTTCCATCTT CTTCGCACTT GCCCAAGCTT CTGAGGGCCA
31141 TTGGGCCGAG GGGCCATT TTCCAGCCCT GTGACACGAT GTACAAACAA TATGCCAGTC
31201 CCCCCTGCT AGCAACCTT TCCGAAAGG GAGAGGCCAT CCAGAACTAG GAGGAGCTG
31261 GGTATCTGG ATGATGATA CATCTATG ATCACACACA GCGTAGAGT GCGTAGAGT
31321 TTTCTCTGG CATGCTCTG TCCCTCTG CTGCTGTG CTTGGAARAC AAGGGGATCT
31381 GAGAGAGGAA AAGGTGAGCA GAGAGAGGT GTTTGGGGCA GCGACTTCT AACTGTGAGG
31441 AGTCACTGTT TGACAGAAA AAGGACAGA GACCAAAAC CCACTCTCAG AGCTTTGTAC
31501 CCATGCTGG GAGATGCTT CACTTTGCA TCACTACTG TGACAATGT GGGCTTTTTT
31561 TCGAGTGC ATGATGACT TCTTTTGGG AATTGTTGG AGAGGAGCG TCGGCCAGG

FIG. 4CONT'D

31621 TAGGAGTGT TGGAGTACA GTGGAAGGC TTAGGGTACT GGCAGGATG GACAGAGTC
31681 ACCTGCTCA TATTGTAC CAGAGGAAA GACAGGACCT TTCTTACTCT CAGTAGAGGT
31741 TCTCGGCC CTTCTTCCA ATCAGCTTGG ATCCACAGAA AGCTCTCCC TGGGACAGAA
31801 GGGACAGCA CTTTATAG TAGTCTCTF TGCACCTGG GGGAGGATA GGGAGACTT
31861 CTTCCACCC CAGCTCCCA ACTCTGCTT TGAACACTCC CCTGTATGG CAGCCTTTG
31921 CTGTTGATC AGGOTGATG TCACTTACG AAAGATCCCT CTCTACTTCA CTGTCGCTT
31981 TACCCTAGC TCTCTTCCG ATGTAATCA AGAGACCTC CCGAGCTTG GCATCCCTCA
32041 GATCCCGCC AGGCGAGAT AGGTRAGGA TTGTTTCTA GAGAGGGAG AGGGACTGG
32101 GAGGGGCT GTGGGGTGT CCACTGTGC ATTTCTCCC ATGCTAGAG TATTAGAGT
32161 CTRAGATTG CCTCAAAA CACTGDRAT CCGACAGCA CTGTGGCA AAGCAGAGA
32221 CACTAGAGG CAGCTGTGT TGCACATC CCCCCTCTT CATCTCTTC CTCTGATCA
32281 TGGAGGGCA TGACTATTG AGCAGAGTG AGTGTGGGA GATGAGGGA GAGGGGCTC
32341 GCAATGGGA ATTCTTGTG TTGACTTC ATTTCTTGT AATCTATGA AAGAGTGG
32401 GAAATATTA TCTGATAT ACAATACCA CACCAATTC ACAGGACAG ATTGCTCTC
32461 GGGAGGCT GAGCTTTCA AATCACTAG AATCTGGT TCGGGGCC TCGGGAGG
32521 CATCACAGG GATGATCAG GAAATAGCA AAGAACTCT GAAATCTAT GGGGATAGC
32581 AGAAACCAT ATCTGATCT CTCTTATGA TATGAATA GACATATGG CTCATCTGA
32641 ATCTGGATC TGCCACTTA TCTGTATCT TTGCGCAAG GACATATCC TCCGTCTCT
32701 CAGTTTCTC ATCTGAAA TGAAGATG AATGATAT CACAGGTTG TGGTTTGG
32761 GATGATAT AGTAAAGT TCGAGACAG TCCCGGGTG ACAGGCTST GTGCCAATTT
32821 TATGATAAT CTCCAGTTT GGGAGGTTT GGGAGTTTC GGGAGTTTC CTGACTGCG
32881 TTTGCTGGA CCCCAGGCT GAGTGGGCTG ACNAAITCT CACTGGATG GCGATGTA
32941 GAGTCCCCA GGAAGTGT TAGTAAAC ACNAAITCT CCGCTTACA CTGCTTCCC
33001 ACACACAGA AGACAGCT CACCAATGG TTTCTTTCA CTAGTCTCA AAGAAITGG
33061 GTGAGGGAG TGAAGAGG AGGGAGAGG AATGGGAGG CTCTATACA TGGAGGCTT
33121 CTTCTTTTC TGTGTGTG CTGTTAGCC ATCTACTCT GTCTAAGCT GACACCCCA
33181 AGCCCAAGG AGCTGTGCT TGAATGCT CACTGGAT GAAITCTGG GACAGAGC
33241 TGACTCTGG CCCCATTG GTGTTGGTG AGAGGGACA AAGAGCTAA ATACTGTAA
33301 CTTGCTGAT ACATGATG TACTGTACA TTTGCTTCA CTAGTCTCA AAGAAITGG
33361 CTGCGAGGG CAGATATT ATACAGAGC CTATATCTG ATGACTAT CTGCTCAGC
33421 GTTATGAT GGCATTAAG ATAAATAC TGCATTTT CTATGATAT TTATACABT
33481 GCGAAABAA AGTGCATTT GAAATGTC TTTATGCT TTTTGTGA TCGAGCTCT
33541 TTAGAGGGA CCAATATG CAGCTTCT AATCTTACA TTGAGGAGC ATCCCAACC
33601 TTTAGATG CAGCAGAT AGGACATAG GTTCTGGGA GTCGGGAT AAGATTAAG
33661 TGAGTGGAT CACACAGC CATTGTCTA TCTGATTTA TCTATGAA ACTGATTA
33721 ATCTGGGG CTGTCTCT TCTGGAGGT TCTCTGGAG AGGAGAGC GGTATAGGA
33781 GGGGAGCT TCTGTGAG GCACTTGG CAGGGTGT TGTSTGTC GCTATGGG
33841 TGCTAGAT GGCATGAT TGGTCTAC ATCTTGTCT CACTGAGG CACTTGGCA

FIG. 4CONT'D

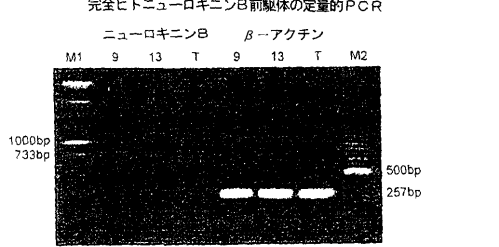
33901 TGCACAGG TGTATGATG ATGTAATA TGCCACTGG GAGTGTGCA GTACTGGGG
33961 CTAGGAGAT TCCATCTCA GGGCCAAAG CTGAGAGGCA GCGTAGAGT CAGACTCTT
34021 TCTTCTCTC CTCACAGAG CCTCTCCCTT TCTCTCTG TGCCACAGCA GPTTTCAGT
34081 GGGACTTTT TACAGATAT AAGATGAT TCAAGTGT TTTTGTGT TGTTTGTT
34141 TTTGCTCTA GATCTCCTC TCGGCTCC TGACCTGCT TGGAGAGC TCTTCCCTG
34201 TCCCAATCC CAGTCTCTC TGGTTCATG ACCCTTCTC TCTGCTCT TGGAACTT
34261 TCTGTGCTT GACTCTCTT CCACTTTTC TACTGACC TGTGTGAA ACTGTATG
34321 GAAATCCCC ACCCCCAAT GGCATGACT GTAGATACC CTAGGTTCC TGTACTGCC
34381 TACATTAATA ATATAATG TCTCTCAT CCTCAAGAT AAAGATTT TGCATAGAA
34441 TGTATGTTG TGTGTGTTA CTTGTTTGT TGGTGGGTT TCTGTTCT TGACTCTCC
34501 AACTCATGG TAATACACA CATCTATG ATCACACACA GCGTAGAGT GCGTAGAGT
34561 ACTTTACATA TCTTTTGA TATAATAT ATCACACACA TCTATTTA AATGTAATA
34621 ACGATGATA TCAGATTTT TTAGATTA AATAAATAC ACCAATTTG AAGATGTTT
34681 CTAACACACA AAGATTTTA CAGACCAAT TTAGATAAG AAAAACAAG CCGGCCCGG
34741 TGCTCTGCG CTGATATCC AGCACTTGG GAGCCGAGG CCGTGGATC AGGAGTCTG
34801 GAGTCTGGA CCGCTGAC CAGATGTTG AAGAGGAGT TCCACTTCT TGGGGGCT AGCCAGAA
34861 TAGCACAGCA TGGTGGCCA TGCTGTGAT AAACCCCTT TCTATAAA ATACAARAT
34921 ATGCTTTGA CCGAGAGG AGGGGTGCA GAGGCCAG ATCACCCAC TCACTTCCG
34981 CCGGCCAC AAGAGAAA AACTCCGCTT CAARACAAA CAACAAACA AAAAAACA
35041 TAAAAAAGA AAAAAAAGA GAAAAAAT ATCTGATG ACTGTATTA CTAGGATGG
35101 TCTGGAGAT ATCTATCT GATCTGACC CTACTTAT AGAGAGGAG GTGGGATCA
35161 AGGCTCTGG GAGGCTCCG CAATCTGAG AACTGATTA GCGATATA CATTTTTT
35221 GTCTCCAA CTGTAGCCTG GTTCTGTGA CAGTCTCTG GATGATGA CATTTTTT
35281 CACAGGAT ACAGTTAGC AGGGCTGTG ACAAGCAAC AGAACTGT CCGCTAGGA
35341 TGGGATGAG CAGGGAGT TACTACAG GCCAAAGAG AGAGGAGC ATATCTCAC
35401 CTTTACTGG TCTCTTAT TTTTATAG GAAACACT TATCTCCAC TCTTCTCAA
35461 ATGCTCTGG GAGGCTCCG CAATCTGAG AACTGATTA GCGATATA CATTTTTT
35521 TCAATGAT ATGATGATG ATGATGCT TTTACTCT TATGATTA TATGATTA CATTTTCC
35581 GGCATCTAA GGGGGTCTT GATCCCTAT GAGACAGCA GTGAAATCT CAGCTCTCT
35641 ATCTTAGCT GTTACAGGG CTTTGTAT GCGCTGAT TGCATGATA AACATCAC
35701 ACATAGAT CCAAGGAG TTTAGAGCA GGGCCACAGA GCGAGAGG ACTTCTGCA
35761 GCTTTTGA TGTATGAA ATCTATCT CTTAGAGCT CACTGGGGC CACTTTGGA
35821 TGACAGCT ATAGTGGGG CCGGGAGAG GGGGATG TCCCTATG ATACTTATG
35881 TCACTTTT AGCCAGAGT CAAAGAAAG CCCCACCA GACCCTAGC CTTTTTCCA
35941 GTAGCTAT TCTTGAAT TCAAAATA TCTATCTA GGGCTTAAA CTGGGGAC
36001 TTTTGAAG TCTAGGGCT TTTCTGGT CATGAAAG ACAAGAGT GTCTGTCTA
36061 GACTGTGG GCTTGGCT TATGGCTGA GATGAGCA TTGCTTGA AGTAGRACA
36121 TTAATGGG AAGATGCT CTGTGTGG ACTGAGAA ATTCAGTAC TGGGACTCC
36181 AAAAAAAT GAGACAAAT GTTAGATG ATTTCTGTG TTGACTTGA AATATGTTG

FIG. 4CONT'D

36241 AAGGATCT GACCTCCCT TCTGCTGT AAAACASTG ATGCTAAG AGATCTGTC
36301 CAGAGACT TGATATAT CCGGCCCT TCTTCTCAT TAACTTGT ATATGTTGT
36361 TATGAGCT ATATGATG TACTTAAA AAGCTTAA AAGCTTAA TATGTTGT
36421 ACCCTGGCT TTTGATG TGTTTTAT GTGAAGTTA TTGGGTCAA CCTCCAGAG
36481 ATGCTGGGG CAGTGTGTA GAAAGACT ATAGCCGAG CCGCTTCAA CCGCCAGC
36541 CTTCTGCT CAGATGATG GTGAGGCTT GAGCCTCTG GCTGTGAT ATTCACCTT
36601 AGGGAGCT TGTGATCT GAGACTCTG ATAGCTGGG TGCCACTGA AACTTGTGT
36661 CAGCTCTAA GTAGCCTTT CACTAGTGG ATAGAGGA TATGATTA TATGATTA CATTTTCC
36721 AGAAGACT TATGCTGTT TTTTATCT CTGCTTACA AATGATCAT GTTGGCAGC
36781 ATTTGATTA GTCTTCTT TCAATATG CTGCCACAG TTAATGAGT TGTGAAAG
36841 AGGACACATA ATCTCCAAA TCTATCAGA GAATGAGCA TTTCTGAT GCGAACTGG
36901 CTTAGATCT TGTGACTG ATGCTGCT CTTCTTCT CACTTATCA TCAAGAAAT
36961 ACTGATCT ACCAAGGCT TCTCTGAG GAGGATG GAACTGAG GCTCTGGAG CTTAAGACT
37021 CAGTACTG GATGGAGT GAGAGGAT GAACTGAG GCTCTGGAG CTTAAGACT
37081 TCTTGTGAC TGAGGAGGG AGGCCGAT CAGCAAGCT TCAATGCT TGTGTTGGT
37141 TGGTGGGG AGCAATGTA GTTGGTTTC GTTATGAC AATTCTGG GCGAACTT
37201 TGAABACT ATCTCCAAA AAGTGGGGA GAGAGGTA TCGTCTTA CAGAGGTT
37261 GGGAGGAG CTTTGGAA GCTTGGAG GAGGATG TACTGATA TCGGCTGCT
37321 TTTCTGATT GCGCACCTAG ATGAGAGG GAGACGACT CACTATAGC AAGGCTCAG
37381 TATGAGGCT TTAGCCCTA AGTGGCTCT CATTCTCA AGAGGCTTA ATGATTAAG
37441 CACTTCTT CCGAGAGAT GTGTRAGG TCACTGTGA CTTGGGGGG TCGCAAGC
37501 CAGAGTCC TGCTCTAG AGCCACAG CTTAGTGG CTAATGAG GAGATATA GTATCAAC
37561 AATCTTCAA CATTCTTA ATCTCCAA GAGATGTC TGAGGAGAG CTTTGGAAC
37621 TGTGAGCTA GACAGAGGA GTTGAAGGA GTTGTGATG G

FIG. 4CONT'D

【 図 5 】 完全ヒトニューロキニンB前駆体の定量的PCR



【 図 6 】 ニューロキニンBの高圧液体クロマトグラフィー (HPLC)

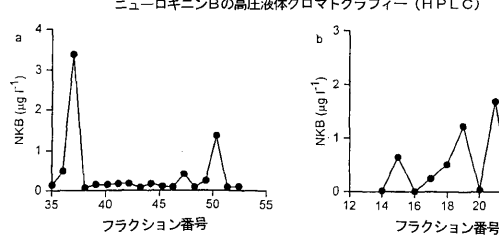


FIG. 4CONT'D



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 K 7/08	(2006.01)	C 0 7 K 7/08	

(72)発明者 ペイジ, ナイジェル  
イギリス国 アールジー-6 6エイジェイ リーディング ピーオー ボックス 228 ホワイト  
トナイツ ユニヴァーシティー オブ リーディング スクール オブ アニマル マイクロバイ  
アル サイエンスーズ

(72)発明者 ローリー, フィリップ  
イギリス国 アールジー-6 6エイジェイ リーディング ピーオー ボックス 228 ホワイト  
トナイツ ユニヴァーシティー オブ リーディング スクール オブ アニマル アンド マイ  
クロバイアル サイエンスーズ

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開平02-115767(JP, A)  
特表平09-510292(JP, A)  
国際公開第98/010791(WO, A1)  
特開平11-137273(JP, A)  
国際公開第98/057986(WO, A1)  
特開平08-048669(JP, A)  
国際公開第97/044035(WO, A1)  
福岡大学薬学紀要, 1996年, No.20, Page.9-19

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53  
A61K 38/00  
A61K 45/00  
A61P 9/00  
A61P 9/12  
A61P 15/00  
C12N 15/09  
C12Q 1/68  
C07K 7/08  
CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	胎盘人神经激肽B前体		
公开(公告)号	<a href="#">JP4668501B2</a>	公开(公告)日	2011-04-13
申请号	JP2001538816	申请日	2000-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	雷丁大学		
申请(专利权)人(译)	雷丁盐湖城大学		
当前申请(专利权)人(译)	Perinataru诊断有限公司		
[标]发明人	ページナイジェル ローリーフィリップ		
发明人	ページ,ナイジェル ローリー,フィリップ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/12 A61P15/00 A61K38/00 C12Q1/68 C07K7/08 A61K38/04 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	A61K38/046 A61P15/00 G01N33/689 G01N33/74 G01N2410/00 G01N2800/368		
FI分类号	G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P9/00 A61P9/12 A61P15/00 A61K37/02 C12Q1/68.A C07K7/08		
代理人(译)	佐久间刚		
审查员(译)	三木隆		
优先权	1999027125 1999-11-16 GB		
其他公开文献	JP2003515138A JP2003515138A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了通过测量神经激肽B，其前体和其片段的产生来诊断妊娠诱发的高血压或先兆子痫的方法，以及用于该方法的试剂盒。还提供了制备合适药物的条件和方法的处理，以及抗体和有用的抗原物质。

妊娠(週)	正常血圧妊娠におけるNKB (pmoI/l)
6	0
9	0
9	0.97
10	0.535
13	0
13	0
13	0.083
13	0.511
14	0
14	0
14	0.511
17	0.182
17	0.182
18	0
23	0.12
24	0
25	0.17
27	0
28	0
28	0.033
31	0
31	0.031
32	0
33	0
37	0
38	0.07
39	0.138
40	0.05
40	0.2
41	0.118