(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2010-512781
(P2010-512781A)
(43)公表日　平成22年4月30日(2010.4.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/71	(2006.01)	C07K	14/71		4B063
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4C084
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4C085
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 63 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-542395 (P2009-542395)
(86)(22)出願日　平成19年12月20日 (2007.12.20)
(85)翻訳文提出日　平成21年8月10日 (2009.8.10)
(86)国際出願番号　PCT/IL2007/001589
(87)国際公開番号　WO2008/075363
(87)国際公開日　平成20年6月26日 (2008.6.26)
(31)優先権主張番号　60/875,822
(32)優先日　平成18年12月20日 (2006.12.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　309038764
イッサム　リサーチ　ディベロップメント　カンパニー　オブ　ザ　ヘブリュー　ユニバーシティー　オブ　エルサレム　リミテッド
イスラエル，　９１３９０　エルサレム，　ギヴァット　ラム，　ザ　ヘブリュー　ユニバーシティー　オブ　エルサレム，　ザ　エドモンド　ジェー．　サフラ　キャンパス，　ハイ　テック　パーク

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＶＥＧＦＲの変化体ならびに妊娠関連の医学的状態の診断および処置におけるその使用

(57)【要約】
配列番号４に対して少なくとも７０％の相同性を有するアミノ酸配列を含む、ＶＥＧＦＲ変化体である単離されたポリペプチド、およびこのポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが開示される。単離されたポリヌクレオチドに対して特異的にハイブリダイゼーションすることができる核酸配列を含むポリヌクレオチド、および単離されたポリペプチドに対して特異的に結合する抗原認識ドメインを有する単離された抗体もまた開示される。これらを含む医薬組成物、診断方法および処置方法もまた開示される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
タンパク質ＢＬＡＳＴアルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）によって決定されるとき、少なくとも７０％の相同性を配列番号４に対して有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項２】
ＶＥＧＦと結合することができる、請求項１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項３】
可溶性である、請求項１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項４】
配列番号４に示される通りである、請求項１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項５】
配列番号２に示される通りである、請求項１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項６】
前記アミノ酸配列に結合された異種アミノ酸配列をさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項７】
前記異種アミノ酸配列は、免疫グロブリン、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、絨毛性性腺刺激ホルモン（ＣＧβ）由来のカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）からなる群から選択される、請求項６に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項８】
非タンパク質性成分に結合される、請求項１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項９】
前記非タンパク質性成分は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ポリ（スチレン－ｃｏ－無水マレイン酸）（ＳＭＡ）、およびジビニルエーテル・無水マレイン酸コポリマー（ＤＩＶＥＭＡ）からなる群から選択される、請求項８に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項１０】
請求項１～７のいずれかに記載の単離されたポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記単離されたポリヌクレオチドはゲノムのＦｌｔ１ではない、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１１】
ｍＲＮＡまたはｃＤＮＡである、請求項１０に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１２】
配列番号１または配列番号３に示されるような、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１３】
シス作用する調節エレメントに機能的に結合された請求項１０または１２に記載の核酸配列を含む、核酸構築物。
【請求項１４】
配列番号９に対してではなく、請求項１０に記載の単離されたポリヌクレオチドに対して特異的にハイブリダイゼーションすることができる核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１５】
配列番号１０に対してではなく、請求項１に記載の単離されたポリペプチドに対して特異的に結合する抗原認識ドメインを含む、単離された抗体。
【請求項１６】
請求項１～８のいずれかに記載の単離されたポリペプチドと、医薬的に許容され得るキ

ャリアとを含む、医薬組成物。
【請求項１７】
請求項１０または１２に記載の単離されたポリヌクレオチドと、医薬的に許容され得るキャリアとを含む、医薬組成物。
【請求項１８】
請求項１５に記載の抗体と、医薬的に許容され得るキャリアとを含む、医薬組成物。
【請求項１９】
請求項１４に記載の単離されたポリヌクレオチドと、医薬的に許容され得るキャリアとを含む、医薬組成物。
【請求項２０】
ＶＥＧＦ関連の医学的状態を処置するために特定される医薬品の製造のための、ｓＦｌｔ－１（配列番号９または配列番号１０）ではなく、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）の活性および／または発現を調節することができる作用因の使用。
【請求項２１】
前記ＶＥＧＦ関連の医学的状態には、ＶＥＧＦの低下した活性および／または発現が伴い、前記調節することは、前記ｓＦｌｔ－１４をダウンレギュレーションすることを含む、請求項２０に記載の使用。
【請求項２２】
前記ＶＥＧＦ関連の医学的状態には、ＶＥＧＦの過度な活性および／または発現が伴い、前記調節することは、前記ｓＦｌｔ－１４をアップレギュレーションすることを含む、請求項２０に記載の使用。
【請求項２３】
前記ＶＥＧＦ関連の医学的状態は、子癇前症、妊娠性糖尿病、妊娠性高血圧、胎児成長制限（ＦＧＲ）、胎児アルコール症候群（ＦＡＳ）、ガン、角膜血管新生、および高血圧からなる群から選択される、請求項２０に記載の使用。
【請求項２４】
前記作用因は請求項１５に記載の抗体を含む、請求項２０に記載の使用。
【請求項２５】
前記作用因は請求項１４に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項２０に記載の使用。
【請求項２６】
前記作用因は請求項１～３および５～９のいずれかに記載の単離されたポリペプチドを含む、請求項２０に記載の使用。
【請求項２７】
前記作用因は請求項１０または１２に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項２０に記載の使用。
【請求項２８】
生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４（配列番号２）を検出する方法であって、
（ａ）生物学的サンプルを請求項１５に記載の抗体と接触させ、その結果、ｓＦｌｔ－１４および抗体が複合体を形成するようにすること、および
（ｂ）前記複合体の存在またはレベルを測定し、それにより、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４を検出すること
を含む方法。
【請求項２９】
生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４（配列番号１）を検出する方法であって、
（ａ）生物学的サンプルを請求項１４に記載の単離されたポリヌクレオチドと接触させ、その結果、ハイブリダイゼーション複合体を形成するようにすること、および
（ｂ）前記複合体の存在またはレベルを測定し、それにより、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４を検出すること
を含む方法。

【請求項３０】
前記測定することが、ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、核酸配列に基づく増幅（ＮＡＳＢＡ）、ノーザンブロット、およびインシトゥーハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法によって行われる、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
ｓＦｌｔ－１（配列番号９または配列番号１０）ではなく、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）を認識することができる作用因を使用して、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）の発現レベルを対象の生物学的サンプルにおいて検出することを含む、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態をその必要性のある対象において診断する方法であって、所定の閾値を超える前記ｓＦｌｔ－１４の発現レベルにより、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態が示される方法。
【請求項３２】
ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）の発現レベルを生物学的サンプルにおいて検出することを含む、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態をその必要性のある対象において診断する方法であって、前記生物学的サンプルは妊娠第１３週以降の生物学的サンプルであり、また、所定の閾値を超える前記ｓＦｌｔ－１４の発現レベルにより、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態が示される方法。
【請求項３３】
前記状態は、子癇前症、妊娠性糖尿病、妊娠性高血圧、胎児成長制限（ＦＧＲ）、および胎児アルコール症候群（ＦＡＳ）からなる群から選択される、請求項３１または３２に記載の方法。
【請求項３４】
生物学的サンプルは、尿サンプル、血液サンプル、血清サンプル、胎盤生検物、絨毛膜絨毛サンプル、および羊水サンプルからなる群から選択される、請求項２８、２９、３１、および３２のいずれかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、そのいくつかの実施形態において、ＶＥＧＦ関連の医学的状態を診断および処置するための単離されたポリペプチド、ならびに、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。
【背景技術】
【０００２】
血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）は、内皮特異的な有糸分裂促進因子であり、脈管形成および血管形成の両方を促進させることにおいて重要な役割を果たす。ＶＥＧＦは、胚の脈管形成の期間中における新しい血管の形成において、また、成体の生涯の期間中における血管形成において重要な調節的機能を果たす。
【０００３】
ＶＥＧＦの様々な活性が、主として、２つの高親和性の受容体チロシンキナーゼとのその相互作用を介して、すなわち、ともに血管内皮細胞表面に発現されるｆｍｓ様チロシンキナーゼ－１（Ｆｌｔ－１／ＶＥＧＦＲ－１）およびキナーゼ挿入ドメイン領域（ＫＤＲ／Ｆｌｋ－１／ＶＥＧＦＲ－２）とのその相互作用を介して媒介される。Ｆｌｔ－１の選択的スプライシングは、細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを有さないが、リガンド結合ドメインを保持する、可溶性Ｆｌｔ１（ｓＦｌｔ１）として示される内因的に分泌されるタンパク質の産生をもたらす［Ｈｅ他、Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．（１９９９）、１３：５３７～５４５］。従って、ｓＦｌｔ１は、循環しているＶＥＧＦと結合し、ＶＥＧＦと、その内因性受容体との相互作用を妨げることによって、循環しているＶＥＧＦに拮抗することができる。ｓＦｌｔ１はまた、胎盤増殖因子（ＰｌＧＦ）（これは、主に胎盤において産生されるＶＥＧＦファミリーの別のメンバーであり、同様にまた、ＶＥＧ

Ｆ－Ｂとして知られている別のＶＥＧＦファミリーメンバーである）と結合し、これに拮抗する。

【０００４】

ＶＥＧＦは、腫瘍形成および固形腫瘍の転移を含めて、数多くの病理学的状態における血管形成の重要な媒介因子である。ＶＥＧＦ／ＶＥＧＦ受容体経路の数多くの阻害剤（例えば、ＶＥＧＦについて特異的なモノクローナル抗体）が、抗血管形成機構を介して腫瘍の成長を妨げることが示されている［Ｋｉｍ他、Ｎａｔｕｒｅ（１９９３）、３６２（６４２３）：８４１～４］。

【０００５】

子癇前症は、妊娠の最も一般的で、危険な、予測できない合併症であり、世界中で、母体、胎児および新生児の死亡率の主要な原因の１つである。子癇前症の原因は依然として不明であるが、主たる原因は、母体の内皮機能不全、代謝における変化、および、炎症を引き起こすホルモンまたは化学的作用因を放出することを胎盤に行わせる胎盤への不適切な血液供給であると思われる［Ｄｒｉｆｅ ＪＯ，Ｍａｇｏｗａｎ（編）、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｂｓｔｅｔｒｉｃｓ ａｎｄ Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｙ、第３９章、３６７頁～３７０頁］。結果として、これらは、母親におけるタンパク尿を伴う高血圧症を、損なわれた胎盤血流、胎児成長制限、および、結果としての胎児の酸化的ストレスと一緒に引き起こす。

【０００６】

妊娠期間中、循環ｓＦｌｔ１の主要な供給源は胎盤であり、ほんの少量が他の組織によって（例えば、内皮細胞および単球によって）産生される。近年の研究では、ｓＦｌｔ－１の胎盤発現および血清レベルが、正常な妊娠と比較して、循環している遊離ＶＥＧＦおよび遊離ＰｌＧＦの低下したレベルと併せて、子癇前症の妊娠ではアップレギュレーションされるという発見が裏付けられている［Ｍａｙｎａｒｄ他、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．（２００３）、１１１：６４９～６５８］。ｓＦｌｔ１の増大、及びそれに続く遊離ＰｌＧＦおよび遊離ＶＥＧＦの低下が、臨床的疾患の発症の数週間前に現れることが見出され、また、重篤な子癇前症および早期発症の子癇前症ではより顕著であるようである［Ｌｅｖｉｎｅ他、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．（２００４）、３５０：６７２～６８３］。分娩後、ｓＦｌｔ－１のレベルが正常な妊娠および子癇前症の妊娠の両方において劇的に低下する［Ｍａｙｎａｒｄ他、上掲］。従って、過剰なｓＦｌｔ１は、ＶＥＧＦおよびＰｌＧＦを中和することによって、子癇前症での母体の症候群の病理発生において非常に重要な役割を果たしているかもしれない。

【０００７】

Ｌａｍ他［Ｌａｍ他、Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓｉｏｎ（２００５）、４６（５）：１０７７～８５］は、循環している血管形成タンパク質（例えば、ＰｌＧＦ）または抗血管形成タンパク質（例えば、ｓＦＬｔ－１）を、子癇前症を予測するための診断およびスクリーニングのツールとして妊婦の血液および尿において測定することの可能性を検討している。Ｌａｍ他は、異なるトリメスターにおける様々なｓＦｌｔ－１カットオフ値について、オッズ比、感度および特異性を調べている。Ｌａｍ他は、高いｓＦＬｔ－１レベルと、子癇前症の危険性および存在との間における強い相関を記載する。さらに、Ｌａｍ他は、ｓＦＬｔ－１のレベルが高くなるほど、ｓＦＬｔ－１のレベルにより、子癇前症が予測され得るという結論を得ている。

【０００８】

ＰＣＴ公開番号ＷＯ２００６／０６９３７３は、妊娠における子癇前症および高血圧障害を診断するための方法、組成物およびキットを開示する。より具体的には、ＷＯ２００６／０６９３７３は、子癇前症または子癇前症に対する素因を、妊婦の尿サンプルにおける血管形成因子（具体的には、ＶＥＧＦ、ＰｌＧＦおよびｓＦｌｔ－１）のレベルをモニターすることによって評価することを教示する。ＷＯ２００６／０６９３７３は、ｓＦＬｔ－１のレベルが高くなるほど、ｓＦＬｔ－１のレベルにより、子癇前症が予測され得ることを教示する。さらに、ＷＯ２００６／０６９３７３によれば、子癇前症には、ＰｌＧ

Ｆの尿中濃度における著しい低下およびＶＥＧＦの尿中濃度における著しい増大が伴う。
【０００９】
米国特許出願公開第２００５０１４８０４０号は、妊娠性障害（例えば、妊娠性糖尿病、子癇前症および妊娠性高血圧）を、特異的なバイオマーカーを使用してスクリーニングするための方法および組成物を開示する。教示されるバイオマーカーは、インスリン抵抗性バイオマーカー［例えば、性ホルモン結合性グロブリン（ＳＨＢＧ）］、および、ｓＦｌｔ－１を含む血管形成バイオマーカーである。より具体的には、２つの経路における変化、すなわち、インスリン抵抗性（例えば、ＳＨＢＧの低い血清レベルによって立証されるようなインスリン抵抗性）および血管形成（例えば、低いＰｌＧＦまたは高いｓＦＬｔ１によって立証されるような血管形成）における変化を、これらが組み合わされたとき、妊娠性障害を予測するために使用することができる。
【００１０】
米国特許出願公開第２００５００２５７６２号は、子癇前症および子癇を診断および処置するための方法を開示する。米国特許出願公開第２００５００２５７６２号は、ＶＥＧＦまたはＰｌＧＦのレベルを増大させる化合物（例えば、ニコチン、アデノシン）を使用して、また、ｓＦｌｔ－１のレベルを低下させる化合物（例えば、精製されたｓＦｌｔ－１抗体、ｓＦｌｔ－１の抗原結合フラグメント、小さい干渉ＲＮＡ、または、二本鎖ＲＮＡ）、例えば、ｓＦｌｔ－１と結合し、増殖因子が結合することを阻止する化合物（例えば、化学化合物、ポリペプチド、ペプチド、抗体）などを使用して、子癇前症および子癇を処置または防止することを教示する。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１１】
本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、タンパク質ＢＬＡＳＴアルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）によって決定されるとき、少なくとも７０％の相同性を配列番号４に対して有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが提供される。
【００１２】
本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリペプチドはＶＥＧＦと結合することができる。
【００１３】
本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリペプチドは可溶性である。
【００１４】
本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリペプチドは、配列番号４に示される通りである。
【００１５】
本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリペプチドは、配列番号２に示される通りである。
【００１６】
本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリペプチドはさらに、そのアミノ酸配列に結合された異種アミノ酸配列を含む。
【００１７】
本発明のいくつかの実施形態によれば、異種アミノ酸配列は、免疫グロブリン、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、絨毛性性腺刺激ホルモン（ＣＧβ）由来のカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）からなる群から選択される。
【００１８】
本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリペプチドは非タンパク質性成分に結合される。
【００１９】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非タンパク質性成分は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ポリ（スチレン－ｃｏ－無水マレイン酸）（ＳＭＡ）、およびジビニルエーテル・無水マレイン酸コポリマー（ＤＩＶＥＭＡ）からなる群から選択される。

【００２０】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、単離されたポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド（ただし、単離されたポリヌクレオチドはゲノムのＦｌｔ１ではない）が提供される。

【００２１】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドはｍＲＮＡまたはｃＤＮＡである。

【００２２】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、配列番号１または配列番号３に示されるような単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【００２３】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、シス作用する調節エレメントに機能的に結合された前記核酸配列を含む核酸構築物が提供される。

【００２４】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、配列番号９に対してではなく、前記単離されたポリヌクレオチドに対して特異的にハイブリダイゼーションすることができる核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【００２５】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、配列番号１０に対してではなく、前記単離されたポリペプチドに対して特異的に結合する抗原認識ドメインを含む単離された抗体が提供される。

【００２６】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、前記単離されたポリペプチドと、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【００２７】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、前記単離されたポリヌクレオチドと、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【００２８】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、前記抗体と、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【００２９】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、前記単離されたポリヌクレオチドと、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【００３０】

本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、ＶＥＧＦ関連の医学的状態を処置するために特定される医薬品の製造のための、ｓＦｌｔ－１（配列番号９または配列番号１０）ではなく、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）の活性および／または発現を調節することができる作用因の使用が提供される。

【００３１】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ＶＥＧＦ関連の医学的状態には、ＶＥＧＦの低下した活性および／または発現が伴い、調節することは、ｓＦｌｔ－１４をダウンレギュレーションすることを含む。

【００３２】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ＶＥＧＦ関連の医学的状態には、ＶＥＧＦの過度な活性および／または発現が伴い、調節することは、ｓＦｌｔ－１４をアップレギュレーションすることを含む。

【００３３】
本発明のいくつかの実施形態によれば、ＶＥＧＦ関連の医学的状態は、子癇前症、妊娠性糖尿病、妊娠性高血圧、胎児成長制限（ＦＧＲ）、胎児アルコール症候群（ＦＡＳ）、ガン、角膜血管新生、および高血圧からなる群から選択される。
【００３４】
本発明のいくつかの実施形態によれば、作用因は前記抗体を含む。
【００３５】
本発明のいくつかの実施形態によれば、作用因は前記単離されたポリヌクレオチドを含む。
【００３６】
本発明のいくつかの実施形態によれば、作用因は前記単離されたポリペプチドを含む。
【００３７】
本発明のいくつかの実施形態によれば、作用因は前記単離されたポリヌクレオチドを含む。
【００３８】
本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４（配列番号２）を検出する方法が提供され、この場合、この方法は、（ａ）生物学的サンプルを前記抗体と接触させ、その結果、ｓＦｌｔ－１４および前記抗体が複合体を形成するようにすること、および（ｂ）複合体の存在またはレベルを測定し、それにより、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４を検出することを含む。
【００３９】
本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４（配列番号１）を検出する方法が提供され、この場合、この方法は、（ａ）生物学的サンプルを前記単離されたポリヌクレオチドと接触させ、その結果、ハイブリダイゼーション複合体を形成するようにすること、および（ｂ）複合体の存在またはレベルを測定し、それにより、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４を検出することを含む。
【００４０】
本発明のいくつかの実施形態によれば、測定することが、ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、核酸配列に基づく増幅（ＮＡＳＢＡ）、ノーザンブロットおよびインシトゥーハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法によって行われる。
【００４１】
本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、ｓＦｌｔ－１（配列番号９または配列番号１０）ではなく、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）を認識することができる作用因を使用して、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）の発現レベルを対象の生物学的サンプルにおいて検出することを含む、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態をその必要性のある対象において診断する方法が提供され、ただし、この場合、所定の閾値を超えるｓＦｌｔ－１４の発現レベルにより、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態が示される。
【００４２】
本発明のいくつかの実施形態における１つの局面によれば、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号２）の発現レベルを生物学的サンプルにおいて検出することを含む、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態をその必要性のある対象において診断する方法が提供され、ただし、この場合、生物学的サンプルは妊娠第１３週以降の生物学的サンプルであり、また、所定の閾値を超えるｓＦｌｔ－１４の発現レベルにより、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態が示される。
【００４３】
本発明のいくつかの実施形態によれば、状態は、子癇前症、妊娠性糖尿病、妊娠性高血圧、胎児成長制限（ＦＧＲ）および胎児アルコール症候群（ＦＡＳ）からなる群から選択される。

【００４４】
本発明のいくつかの実施形態によれば、生物学的サンプルは、尿サンプル、血液サンプル、血清サンプル、胎盤生検物、絨毛膜絨毛サンプル、および羊水サンプルからなる群から選択される。
【００４５】
別途定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および／または科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および／または材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。
【００４６】
本明細書では本発明のいくつかの実施形態を単に例示し図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の実施形態を例示考察することだけを目的としていることを強調するものである。この点について、図面について行う説明によって本発明の実施形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。
【図面の簡単な説明】
【００４７】
【図１】図１は、ＦＬＴ－１の完全な膜貫通型受容体（上段）、周知の可溶性のｓＦｌｔ１変化体（中段）、および、本発明の新規なｓＦｌｔ－１４変化体（下段）の概略図である。矢印は翻訳開始点（ＡＴＧ）および停止点（ＳＴＯＰ）を示す。エキソンが、暗い数字付きボックスによって示され、第１３イントロンおよび第１４イントロンが、明るい数字付きボックスによって示される。
【図２Ａ】図２Ａは、新規なｓＦＬｔ－１４イソ型の特有なｃＤＮＡ配列を示す。配列がヒトの子癇前症胎盤から３’ＲＡＣＥによってクローン化された。示された配列は第１４エキソンの開始部の近くから始まり、ポリＡテールとともに終わる。斜字体の文字は、第１４エキソンおよび第１４イントロンに由来するコード領域を表す。停止コドンが太字で表される。下線部の配列は、３’ＵＴＲにおいて重なるＡｌｕ反復である。
【図２Ｂ】図２Ｂは、上記に現れる配列（図２Ａ）によるｂｌａｓｔ検索の後でのＵＣＳＣゲノムブラウザーから取られたウインドウを示す。検索により、上記配列において見出されるスプライシングパターンと類似するスプライシングパターンを有する３つのＥＳＴ（ＡＩ１８８３８２、Ｎ４７９１１およびＡＡ０３５４３７）が突き止められた。
【図３】図３Ａは、そのｍＲＮＡから推定されるようなｓＦｌｔ－１４のアミノ酸配列を示す。元の読み枠が保たれ、ｓＦｌｔ－１および膜貫通型Ｆｌｔの既知の翻訳開始点から始まっていた。（ｓＦｌｔ－１とではなく）全長の膜貫通型受容体と共通して両者により有されるアミノ酸には、下線が付される。（第１４イントロンに由来する）本発明の変化体ｓＦｌｔ－１４においてのみ見出される特有な２８個のアミノ酸が太字で示される。図３Ｂは、ｓＦｌｔ－１と、ｓＦｌｔ－１４とを区別する特異的なポリクローナル抗体を作製するために合成されたペプチドの配列を示す。注目すべきことに、ＣＥＳＳはｓＦｌｔ－１４に特有であるのに対して、ＣＨＦＫは、タンパク質サイズの分析との併用でのみ、これらの選択的にスプライシングされたイソ型を区別することができる。
【図４】図４Ａ～図４Ｂは、全長型膜受容体Ｆｌｔ、ｓＦｌｔ－１（これはまた、ｓＦｌｔ－１３と呼ばれる）、および、新規なｓＦｌｔ－１４の種々の細胞タイプにおける相対的存在量を示す写真である。図４Ａは、内皮細胞（左側カラム）、正常な胎盤（中央カラム）および子癇前症の胎盤（右側カラム）における全長型受容体Ｆｌｔ、ならびに、その２つの選択的スプライシング変化体のｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４の発現を示す。ＲＮＡブロットを、３つすべてに共通する細胞外配列を検出するプローブとハイブリダイゼーションさせた（それぞれが、サイズにかかわらず、等しい強度のバンドをもたらした）。注目すべきことに、内皮細胞は全長型受容体およびｓＦｌｔ１を優先的に産生し、こ

れに対して、胎盤は主にｓＦｌｔ－１４を産生する。しかしながら、ｓＦｌｔ－１４の劇的なアップレギュレーションが子癇前症の胎盤において示される；図４Ｂは、内皮細胞（ＥＣ）の初代培養物、および、ヒトの伏在静脈から単離された血管平滑筋細胞（ＶＳＭＣ）におけるｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４の発現を示す。注目すべきことに、ｓＦｌｔ１およびｓＦｌｔ－１４がＥＣおよびＶＳＭＣによってそれぞれもっぱら発現される。図４Ａ～図４Ｂの下段パネルは、負荷コントロールとして使用された２８Ｓ　ＲＮＡおよび１８Ｓ　ＲＮＡの発現を表す。

【図５】図５Ａ～図５Ｄは、子癇前症胎盤の関連においてｓＦｌｔ－１４のｍＲＮＡ発現およびタンパク質発現を示す写真である。図５Ａ～図５Ｂは、特異的なＣＥＳＳ抗体を使用するｓＦｌｔ－１４タンパク質の免疫組織化学的検出を示す；図５Ｃ～図５Ｄは、ｓＦｌｔ－１４発現細胞を特定する（第１４イントロン由来の）ｓＦｌｔ－１４特異的プローブ）によるインシトゥーハイブリダイゼーションを示す。注目すべきは、子癇前症胎盤の合胞体性結節におけるｓＦｌｔ－１４のｍＲＮＡおよびタンパク質の大量の発現である。

【図６】図６は、ＣＥＳＳ抗体またはＦｌｔ１抗体を用いた正常な満期胎盤におけるｓＦｌｔ－１４タンパク質の免疫沈殿を示すウエスタン免疫ブロット画像である。

【図７】図７は、ｓＦｌｔ－１４の質量分析法による同定を示す（配列番号１６～配列番号１９）。

【図８】図８は、子癇前症被験者の血清サンプルおよび胎盤サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４タンパク質の発現レベルを示すウエスタン免疫ブロット画像である。タンパク質の検出を、特異的なｓＦｌｔ－１４抗体（ＣＥＳＳ、これは配列番号５に対して向けられる）を使用して行った。

【図９】図９Ａ～図９Ｂは、妊娠の経過期間中におけるｓＦｌｔタンパク質の特徴づけを示す。図９Ａは、正常な妊娠の異なる時点の期間中におけるｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４のＲＮＡ発現を例示する；図９Ｂは、正常な妊娠の異なる時点の期間中におけるこれら２つのｓＦｌｔ１イソ型（ｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４）の比率の定量を示す：第９週～第１１週、第１３週および第３９週。

【図１０】図１０Ａ～図１０Ｂは、ＶＥＧＦ受容体としてのｓＦｌｔ－１４を示す。図１０Ａは、細胞画分（ｃ）または培地（ｍ）からの組換えｓＦｌｔ－１４タンパク質および組換えｓＦｌｔ－１タンパク質を示す。ｓＦｌｔ－１４が細胞画分および培地において１１５Ｋｄおよび１３０Ｋｄでそれぞれ突き止められる。ｓＦｌｔ－１が細胞画分および培地において１００Ｋｄおよび１２０Ｋｄでそれぞれ突き止められる；図１０Ｂは、ＶＥＧＦが（ブタ大動脈内皮細胞の成長培地を加えることによる）ＶＥＧＦ－Ｒ２の添加の前にｓＦｌｔ－１またはｓＦｌｔ－１４とプレインキュベーションされたＶＥＧＦ阻害アッセイを示す。ＶＥＧＦ－Ｒ２のリン酸化レベルを添加ｓＦｌｔ－１４／ＶＥＧＦ比率または添加ｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ比率の関数として測定した。注目すべきことに、ＶＥＧＦ－Ｒ２リン酸化のほぼ完全な阻害が１：１のｓＦｌｔ－１４／ＶＥＧＦ比率において既に明白であった。

【図１１】図１１Ａ～図１１Ｂは、ヒトの角膜切片におけるｓＦｌｔ－１４の発現を示す。図１１Ａは、特異的な抗体（配列番号５に対して向けられるＣＥＳＳ）を使用するｓＦｌｔ－１４の免疫組織化学を示す；図１１Ｂは、免疫前血清を使用するコントロールの免疫組織化学を示す。注目すべきことに、ｓＦｌｔ－１４が角膜上皮において容易に認められた。

【発明を実施するための形態】

【００４８】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、ＶＥＧＦ関連の医学的状態を診断および処置するための単離されたポリペプチド、ならびに、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。

【００４９】

本発明の原理および操作は、図面および付随する説明を参照してより良く理解されることができる。

【００５０】
本発明の少なくとも１つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明に示される細部、または、実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、あるいは、様々な方法で実施、または、実行される。また、本明細書中において用いられる表現法および用語法は説明のためであって、限定として見なされるべきでないことを理解しなければならない。
【００５１】
可溶性のＶＥＧＦ受容体ｓＦｌｔ－１は、循環しているＶＥＧＦおよびＰｌＧＦと特異的に結合し、これらに拮抗するので、子癇前症の主原因として以前から予想されており、そのようなものとして、この状態のマーカーとして、また、この状態を処置するための標的として示唆されていた［Ｍａｙｎａｒｄ他、上掲；Ｌｅｖｉｎｅ他、上掲］。これらの知見は、臨床的ツール（例えば、可溶性のＶＥＧＦ受容体および非可溶性のＶＥＧＦ受容体がともに有する配列に向けられた抗体およびオリゴヌクレオチドなど）の使用に基づいていた。
【００５２】
本発明のいくつかの実施形態を実行に移しているとき、本発明者らは新規なＶＥＧＦ受容体変化体を特定している。この変化体は可溶性で、分泌され、特有なアミノ酸配列（配列番号４）を含み、子癇前症の期間中に発現される。ｓＦｌｔ－１４のこの特有な配列（配列番号４または配列番号３）に対して特異的に向けられた抗体またはオリゴヌクレオチドを使用して、本発明者らは、子癇前症において非常に発現されるのは、ｓＦｌｔ－１ではなく、むしろ、ｓＦｌｔ－１４であること（上記）を示すことができた。これらの結果からは、ｓＦｌｔ－１４の臨床的価値が、何ら疑いの余地もなく証明される。
【００５３】
下記の実施例の節において例示されるように、本発明の新規なｓＦｌｔ－１４（配列番号１および配列番号２）は、第１４イントロンの読み過しにより得られる特有な２８個のアミノ酸の配列（配列番号４、実施例１および図１を参照のこと）を含むことによって、全長の膜貫通型受容体Ｆｌｔ１、および、既知のｓＦｌｔ１とは異なる。この新規なｓＦｌｔ－１４受容体は胎盤において発現され、子癇前症の胎盤において非常にアップレギュレーションされる（実施例３および図４Ａを参照のこと）。そのうえ、本明細書中に示される結果は、合胞体性結節内の栄養膜細胞がｓＦｌｔ－１４を産生することを例示する（実施例４および図５Ａ～図５Ｄ）。従って、ｓＦｌｔ－１４は子癇前症またはその素因の有益な指標を提供する。さらに、ｓＦｌｔ－１４は、ＶＥＧＦＲリガンド（例えば、ＶＥＧＦ）に拮抗する際において機能するので、ｓＦｌｔ－１４のレベルを調節すること（例えば、ダウンレギュレーションまたはアップレギュレーションすること）は、ＶＥＧＦ関連の状態（過度な血管形成、例えば、ガンおよび血管新生角膜）の処置における強力なツールとして役立ち得る。
【００５４】
従って、本発明の１つの局面によれば、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８７％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％またはそれ以上の同一性または相同性、例えば、１００％の同一性または相同性を配列番号４に対して有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド（ただし、単離されたポリヌクレオチドはゲノムのＦｌｔ１ではない）が提供される。
【００５５】
本明細書中で使用される表現「単離されたポリヌクレオチド」は、ＲＮＡ配列、相補的ポリヌクレオチド配列（Ｃｄｎａ）および／または複合ポリヌクレオチド配列（例えば、上記の組合せ）の形態で単離および提供される一本鎖または二本鎖の核酸配列を示す。

【００５６】
本明細書中で使用される表現「相補的ポリヌクレオチド配列」は、逆転写酵素または任意の他のＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼを使用するメッセンジャーＲＮＡの逆転写から生じる配列を示す。そのような配列は続いて、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼを使用してインビボまたはインビトロで増幅され得る。
【００５７】
本明細書中で使用される表現「複合ポリヌクレオチド配列」は、少なくとも一部が相補的であり、かつ、少なくとも一部がゲノム性である配列を示す。複合配列は、本発明のポリペプチドをコードするために要求されるいくつかのエキソン配列、ならびに、その間に介在するいくつかのイントロン配列を含むことができる。イントロン配列は、他の遺伝子のものを含めて、任意の供給源のものが可能であり、典型的には、保存されたスプライシングシグナル配列を含む。そのようなイントロン配列はさらに、シス作用する発現調節エレメント（これについては本明細書中下記において詳しくさらに説明される）を含むことができる。
【００５８】
本発明のこの局面の１つの例示的な実施形態によれば、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチドはＶＥＧＦＲリガンドと結合することができる。そのようなリガンドの例には、限定されないが、ＶＥＧＦ（ＶＥＧＦ－Ａ（ＧｅｎｅＢａｎｋアクセション番号ＮＰ＿００１０２０５３７）、ＶＥＧＦ－Ｂ（ＧｅｎｅＢａｎｋアクセション番号ＮＰ＿００３３６８））および胎盤増殖因子（ＰｌＧＦ、ＧｅｎｅＢａｎｋアクセション番号ＮＰ＿００２６２３）が含まれる。
【００５９】
１つの例示的な実施形態によれば、ポリペプチドの結合は、約10^{-9}Ｍ～10^{-12}Ｍの範囲にあることが予想される。
【００６０】
本発明のこの局面の１つの例示的な実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号１に示される通りである。注目すべきことに、本発明のいくつかの実施形態のポリヌクレオチド配列の天然に存在する形態はゲノムＦｌｔ１のスプライス変化体であることが示唆される。ゲノムＦｌｔ１の例が、ヒトのゲノムＦｌｔ１については、ＧｅｎｅＢａｎｋアクセション番号ＮＣ＿０００００１３．９領域：相補体（２７７７３７９０～２７９６７２３２）ＧＩ：５１５１１７２９において、また、チンパンジーのゲノムＦｌｔ１については、ＧｅｎｅＢａｎｋアクセション番号ＮＣ＿００６４８０．２領域：相補体（２７９７５８７９～２８１６８５９６）ＧＩ：１１４７９５０５４において示される（エキソン／イントロン編成を示す図１を参照のこと）。
【００６１】
本明細書中で使用される表現「スプライス変化体」は、ＶＥＧＦ受容体遺伝子から転写されるＲＮＡの代替形態を示す。スプライス変化が、天然には、転写されたＲＮＡ分子の内部の選択的スプライシング部位の使用により生じるか、または、それほど一般的ではないが、別々に転写されたＲＮＡ分子の間において生じ、従って、スプライス変化は、同じ遺伝子から転写されたいくつかの異なるｍＲＮＡをもたらすことがある。スプライス変化体は、イントロンの包含、エキソンの除外、または、両者の組合せに起因する変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする場合がある。スプライス変化体の用語はまた、本明細書中では、遺伝子から転写されたｍＲＮＡのスプライス変化体によってコードされるポリペプチドを示すために示される。
【００６２】
代替実施形態によれば、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、配列番号３に示される通りである。
【００６３】
本明細書中上記に記載される配列のホモログもまた本発明によって想定されることが理解される。従って、本発明のこの局面のポリヌクレオチドは、少なくとも約５０％、少な

くとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８７％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％またはそれ以上の同一性または相同性、例えば、１００％の同一性または相同性を、設定省略時のパラメーターを使用する、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＮソフトウエアを使用して決定されたとき、配列番号１または配列番号３に対して有する核酸配列を有することができる。

【００６４】

従って、本発明は、本明細書中上記で記載される核酸配列、そのフラグメント、それとのハイブリダイゼーションが可能な配列、それとの相同性を有する配列、類似するポリペプチドを異なるコドン使用頻度によりコードする配列、ランダムであろうとも、または、標的化された様式であろうとも、天然に存在するか、または、人為的に導入されたかによらず、変異（例えば、１つまたは複数のヌクレオチドの欠失、挿入または置換など）によって特徴づけられる変化した配列を包含する。

【００６５】

本発明のポリヌクレオチド配列は、以前には特定されていないポリペプチドをコードするので、本発明はまた、本明細書中上記で記載される様々な単離されたポリヌクレオチドおよびそのそれぞれの核酸フラグメントによってコードされる様々な新規なポリペプチドまたはその一部分を包含する。

【００６６】

従って、本発明の別の局面によれば、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８７％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％またはそれ以上の相同性、例えば、１００％の相同性を、タンパク質ＢＬＡＳＴアルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）によって決定されるとき、配列番号４に対して有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが提供される。

【００６７】

１つの例示的な実施形態において、単離されたポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に示される通りである。

【００６８】

本発明はまた、上記で記載されるポリペプチド、および、ランダムであろうとも、または、標的化された様式であろうとも、天然に存在するか、または、人為的に導入されたかによらず、変異（例えば、１つまたは複数のアミノ酸の欠失、挿入または置換など）を有するポリペプチドの様々なフラグメント（例えば、特異的な抗原性決定基ほどに短いフラグメント、例えば、配列番号４などに由来する少なくとも約６個のアミノ酸、少なくとも約８個のアミノ酸、少なくとも約１０個のアミノ酸、少なくとも約２０個のアミノ酸など）を包含する。これらのフラグメントは、本発明の単離されたポリペプチドに対する抗体産生を誘発するために使用することができる。

【００６９】

本明細書中で使用される用語「単離されたポリペプチド」は、単離された、天然のペプチド（分解産物または合成的に合成されたペプチドまたは組換えペプチドのいずれか）、およびペプチド模倣体（典型的には合成的に合成されたペプチド）、ならびにペプチドアナログであるペプトイドおよびセミペプトイドを包含し、これらは、例えば、ペプチドを体内でより安定化させる修飾、またはペプチドの細胞浸透能力を高める修飾を有しうる。そのような修飾には、限定されないが、Ｎ末端修飾、Ｃ末端修飾、ペプチド結合の修飾（CH_2－ＮＨ、CH_2－Ｓ、CH_2－Ｓ＝Ｏ、Ｏ＝Ｃ－ＮＨ、CH_2－Ｏ、CH_2－CH_2、Ｓ＝Ｃ－ＮＨ、ＣＨ＝ＣＨまたはＣＦ＝ＣＨを含むが、これらに限定されない）、骨

格の修飾、および残基の修飾が含まれる。ペプチド模倣体化合物を調製するための方法はこの分野では十分に知られており、例えば、Ｒａｍｓｄｅｎ，Ｃ．Ａ．編（１９９２），Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ，Ｃｈａｐｔｅｒ　１７．２，Ｆ．Ｃｈｏｐｌｉｎ　Ｐｅｒｇａｍｏｎ　Ｐｒｅｓｓに具体的に記載される（これは、全体が本明細書中に示されるように参考として組み込まれる）。この点のさらなる詳細は、本明細書の下記に示される。

【００７０】

ペプチド内のペプチド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）は、例えば、Ｎ－メチル化結合（－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＯ－）、エステル結合（－Ｃ（Ｒ）Ｈ－Ｃ－Ｏ－Ｏ－Ｃ（Ｒ）－Ｎ－）、ケトメチレン結合（－ＣＯ－ＣＨ$_2$－）、α－アザ結合（－ＮＨ－Ｎ（Ｒ）－ＣＯ－）（式中、Ｒは任意のアルキル（例えば、メチル）である）、カルバ結合（－ＣＨ$_2$－ＮＨ－）、ヒドロキシエチレン結合（－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ$_2$－）、チオアミド結合（－ＣＳ－ＮＨ－）、オレフィン二重結合（－ＣＨ＝ＣＨ－）、レトロアミド結合（－ＮＨ－ＣＯ－）、ペプチド誘導体（－Ｎ（Ｒ）－ＣＨ$_2$－ＣＯ－）（式中、Ｒは、炭素原子において自然界で示される「通常」の側鎖である）によって置換することができる。これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合の任意のところに存在することができ、そして同時に数カ所（２カ所～３カ所）においてさえ存在することができる。

【００７１】

天然の芳香族アミノ酸（Ｔｒｐ、ＴｙｒおよびＰｈｅ）は、テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸（ＴＩＣ）、ナフチレンアミン（Ｎｏｌ）、Ｐｈｅの環メチル化誘導体、Ｐｈｅのハロゲン化誘導体、またはｏ－メチル－Ｔｙｒなどの合成された非天然型の酸に置換されることができる。

【００７２】

上述のことに加えて、本発明のポリペプチドはまた、１個以上の修飾されたアミノ酸または１個以上の非アミノ酸モノマー（例えば脂肪酸、複合体炭水化物など）も含むことができる。

【００７３】

用語「アミノ酸」には、２０個の天然に存在するアミノ酸；生体内で多くの場合には翻訳後修飾されたそのようなアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンを含む）；および他の非通常型アミノ酸（２－アミノアジピン酸、ヒドロキシリシン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンを含むが、これらに限定されない）が含まれることが理解される。さらに、用語「アミノ酸」には、Ｄ－アミノ酸およびＬ－アミノ酸の両方が含まれる。

【００７４】

従って、本発明のポリペプチドは、短い長さのもの、典型的には、長さが、５アミノ酸～１０アミノ酸、１０アミノ酸～２０アミノ酸、２０アミノ酸～５０アミノ酸、５０アミノ酸～１００アミノ酸のもの、および、より長いもの、例えば、長さが、１００アミノ酸～２００アミノ酸、２００アミノ酸～３００アミノ酸、３００アミノ酸～４００アミノ酸、４００アミノ酸～５００アミノ酸、５００アミノ酸～６００アミノ酸、６００アミノ酸～７３３アミノ酸のものが可能である。

【００７５】

模倣技術を、天然に存在するポリペプチド（例えば、配列番号２）と比較して、少なくとも１つの改変された特徴を有するために操作され、一方で、目的とする生物学的活性（例えば、ＶＥＧＦ結合および抗体結合など）を維持するペプチドを作製するために使用することができる。

【００７６】

ペプチド模倣体の作製を、当該技術分野では周知の様々な方法を使用して行うことができ、そのような方法には、例えば、ディスプレイ技術が含まれる。

【００７７】

従って、本発明では、複数のディスプレイビヒクル（例えば、ファージ、ウイルスまた

は細菌など）を含み、それぞれが、ｓＦｌｔ－１４の単離されたポリペプチド配列（例えば、配列番号２および配列番号４）に由来する少なくとも５個の連続するアミノ酸、少なくとも７個の連続するアミノ酸、少なくとも１１個の連続するアミノ酸、少なくとも１５個の連続するアミノ酸、少なくとも２０個の連続するアミノ酸、少なくとも２５個の連続するアミノ酸を呈示するディスプレイライブラリーが意図される。

【００７８】

ペプチド模倣体はまた、計算生物学を使用して発見することができる。

【００７９】

本発明の１つの実施形態によれば、単離されたポリペプチドは可溶性である。

【００８０】

本明細書中で使用される用語「可溶性（の）」は、本発明の分子が、実質的な凝集を伴うことなく、生理学的な水溶液（約７のｐＨ）に溶解することができること（例えば、１００μｇ／ｍｌを超える水性媒体での溶解性レベル）を示す。従って、可溶性のｓＦｌｔ－１４は、好ましくは、疎水性の膜貫通ドメインを有しないことが容易に理解される。

【００８１】

可溶性であるので、本発明のポリペプチドは分泌され得る。下記の実施例の節において示されるように、本発明者らは、（ｓＦｌｔ－１ではなく）ｓＦｌｔ－１４が、子癇前症被験者の血清において見出される可溶性の受容体であることを初めて明らかにしている（実施例７および実施例８）。従って、ｓＦｌｔ－１４は子癇前症被験者の循環における主要なＶＥＧＦ受容体である。

【００８２】

本発明のペプチドは好ましくは線状形態で利用される。だが、環化がペプチドの特性を大きく妨害しない場合には、ペプチドの環状形態もまた利用され得ることが理解される。

【００８３】

本発明のペプチドは、ペプチド合成の分野における当業者に既知の任意の技術によって合成されることができる。固相ペプチド合成については、多くの技術の要約が、Ｓｔｅｗａｒｔ，Ｊ．Ｍ．およびＹｏｕｎｇ，Ｊ．Ｄ．（１９６３）「Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ Ｃｏ．（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）に、また、Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，Ｊ．（１９７３）「Ｈｏｒｍｏｎａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」第２巻、４６頁、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）に見出されうる。古典的な溶液合成の概括については、Ｓｃｈｒｏｄｅｒ，Ｇ．およびＬｕｐｋｅ，Ｋ．（１９６５）Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ、第１巻、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）を参照のこと。

【００８４】

一般に、ペプチド合成方法は、１つ以上のアミノ酸または好適に保護されたアミノ酸を成長中のペプチド鎖に逐次付加することを含む。通常、最初のアミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基のいずれかが、好適な保護基によって保護される。保護または誘導体化されたアミノ酸は、その後、好適に保護された相補的な（アミノまたはカルボキシル）基を有する配列内の次のアミノ酸を、アミド連結を形成するために好適な条件のもとで加えることによって、不活性な固体担体に結合されることできるか、または、溶液中で利用されることができる。その後、保護基が、この新しく付加されたアミノ酸残基から除かれ、その後、次のアミノ酸（好適に保護されたアミノ酸）が加えられ、以降、同様に繰り返され；伝統的には、このプロセスはさらに洗浄工程を伴う。所望されるアミノ酸のすべてが適切な配列で連結された後、いずれかの残留する保護基（および何らかの固体担体）が、最終的なペプチド化合物を得るために、逐次的または同時に除かれる。この一般的な手順の簡便な変性によって、２つ以上のアミノ酸を一度に、例えば、保護されたトリペプチドを適切に保護されたジペプチドに（キラル中心をラセミ化させない条件のもとで）カップリングして、脱保護後にペンタペプチドを形成することなどによって、成長中の鎖に付加することが可能である。

【００８５】

ペプチド合成のさらなる記載が米国特許第６４７２５０５号に開示される。本発明のペプチド化合物を調製する好ましい方法は、固相担体を利用する固相ペプチド合成を含む。大規模なペプチド合成がＡｎｄｅｒｓｓｏｎ　Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ、２０００、５５（３）：２２７～５０によって記載される。

【００８６】

大量の本発明のペプチドが要求される場合に、本発明のポリペプチドは、組換え技術を使用して生成されることができる。そのような組換え技術は、Ｂｉｔｔｅｒら（１９８７）、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６～５４４；Ｓｔｕｄｉｅｒら（１９９０）、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：６０～８９；Ｂｒｉｓｓｏｎら（１９８４）、Ｎａｔｕｒｅ、３１０：５１１～５１４；Ｔａｋａｍａｔｓｕら（１９８７）、ＥＭＢＯ　Ｊ．６：３０７～３１１；Ｃｏｒｕｚｚｉら（１９８４）、ＥＭＢＯ　Ｊ．３：１６７１～１６８０；Ｂｒｏｇｌｉら（１９８４）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２４：８３８～８４３；Ｇｕｒｌｅｙら（１９８６）、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：５５９～５６５；ならびに、Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ＆Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ、１９８８、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、第ＶＩＩＩ節、４２１頁～４６３頁によって記載される。

【００８７】

簡単に記載すると、場合により読み枠を一致させて、異種アミノ酸配列（例えば、本明細書中下記においてさらに記載されるように、免疫グロブリン配列）をコードする核酸配列に融合され、また、（本明細書中下記において詳しく説明されるような）調節エレメント（例えば、プロモーターなど）の転写制御下に置かれる本発明の単離されたポリヌクレオチド（例えば、配列番号１、配列番号３）を含む発現構築物（すなわち、発現ベクター）が宿主細胞に導入される。

【００８８】

哺乳動物細胞における発現については、ｐＲＫ５系ベクター［Ｓｃｈａｌｌ他、Ｃｅｌｌ、６１：３６１～３７０（１９９０）］およびＣＤＭ８系ベクター［Ｓｅｅｄ、Ｎａｔｕｒｅ、３２９：８４０（１９８９）］を使用することができる。

【００８９】

発現構築物を宿主細胞に導入する様々な方法が当該技術分野では周知であり、これらの方法には、エレクトロポレーション、リポフェクションおよび化学的形質転換（例えば、リン酸カルシウム）が含まれる。

【００９０】

「形質転換された」細胞は、核酸配列によってコードされるポリペプチドの発現を可能にする好適な条件のもとで培養される。

【００９１】

所定の期間の後、発現されたキメラ分子が細胞または細胞培養物から回収され、精製が組換えポリヌクレオチドの最終的使用に従って行われる。

【００９２】

利用された宿主／ベクター系に依存して、構成的なプロモーターおよび誘導可能なプロモーター、転写エンハンサーエレメントおよび転写ターミネーターなどを含む数多くの好適な転写エレメントおよび翻訳エレメントのいずれかを発現ベクターにおいて使用することができる［例えば、Ｂｉｔｔｅｒ他（１９８７）、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１５３：５１６～５４４を参照のこと］。

【００９３】

（キメラ体をコードする）挿入されたコード配列の転写および翻訳のための必要なエレメントを含有すること以外に、本発明の発現構築物はまた、発現された融合タンパク質の安定性、産生、精製、収率または毒性を最適化するために操作された配列を含むことができる。

【００９４】

様々な原核生物細胞または真核生物細胞を、融合タンパク質をコードする配列を発現させるための宿主－発現システムとして使用することができる。これらには、微生物、例えば、キメラなコード配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ発現ベクター、組換えプラスミドＤＮＡ発現ベクターまたは組換えコスミドＤＮＡ発現ベクターにより形質転換される細菌など；キメラなコード配列を含有する組換え酵母発現ベクターにより形質転換される酵母；キメラなコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）により感染させられるか、または、キメラなコード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミドなど）により形質転換される植物細胞システムが含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物発現システムが、好ましくは、本発明のキメラ体を発現させるために使用される。

【００９５】

分子を発現させるための宿主細胞株の選択は、主として、発現ベクターに依存する。真核生物発現システムが好ましい（例えば、哺乳動物および昆虫）。これは、真核生物発現システムは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化）を可能にするからである。別の考慮事項が、要求されるタンパク質の量である。多くの場合、ミリグラム量を一過性のトランスフェクションによって産生させることができる。例えば、アデノウイルスＥＩＡにより形質転換された２９３ヒト胚性腎臓細胞株を、効率的な発現を可能にするためにリン酸カルシウム法の改変法によってｐＲＫ５系ベクターにより一過性にトランスフェクションすることができる。ＣＤＭ８系ベクターを、ＣＯＳ細胞をＤＥＡＥ－デキストラン法によってトランスフェクションするために使用することができる［Ａｒｕｆｆｏ他、Ｃｅｌｌ、６１：１３０３～１３１３（１９９０）；Ｚｅｔｔｍｅｉｓｓｌ他、ＤＮＡ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．ＵＳ、９：３４７～３５３（１９９０）］。より多くの量のタンパク質が所望されるならば、分子を宿主細胞株の安定的なトランスフェクションの後で発現させることができる。分子のＮ末端における疎水性リーダー配列の存在は、トランスフェクションされた細胞による分子のプロセシングおよび分泌を確実にすることが理解される。

【００９６】

細菌宿主システムまたは酵母宿主システムの使用は、製造費用を削減するために好ましい場合があることが理解される。しかしながら、細菌宿主システムはタンパク質のグリコシル化機構を有しないので、産生後のグリコシル化が必要となる場合がある。

【００９７】

どのような場合でも、形質転換された細胞は、多量の組換えポリペプチドの発現を可能にする効果的な条件のもとで培養される。効果的な培養条件には、タンパク質の産生を可能にする効果的な培地、バイオリアクター、温度、ｐＨおよび酸素条件が含まれるが、これらに限定されない。効果的な培地は、細胞が、本発明の組換えキメラ分子を産生するために培養される任意の培地を示す。そのような培地には、典型的には、資化可能な炭素源、窒素源およびリン酸源、ならびに、適切な塩、ミネラル、金属および他の栄養分（例えば、ビタミンなど）を有する水溶液が含まれる。本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振とうフラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュおよびペトリ皿において培養することができる。培養は、組換え細胞について適切な温度、ｐＨおよび酸素含量で行うことができる。そのような培養条件は当業者の専門的知識の範囲内である。

【００９８】

産生のために使用されるベクターおよび宿主の系に依存して、本発明の得られたタンパク質は組換え細胞の内部に留まり得るか、あるいは、発酵培地中に分泌され得るか、あるいは、２つの細胞膜の間の空間（例えば、大腸菌におけるペリプラズム空間）に分泌され得るか、あるいは、細胞膜またはウイルス膜の外側表面に保持され得る。

【００９９】

培養での所定の時間の後、組換えタンパク質の回収が行われる。

【０１００】

本発明の分子は、好ましくは、「実質的に純粋な」形態で回収される。本明細書中で使

用される「実質的に純粋な」は、本明細書中下記において記載される適用におけるタンパク質の効果的な使用を可能にする純度を示す。

【０１０１】

述べられたように、本発明のこの局面の単離されたポリペプチドはさらに、異種アミノ酸配列を含むことができる。

【０１０２】

本明細書中で使用される表現「異種アミノ酸配列」は、天然に存在するｓＦｌｔ－１４（配列番号２）のアミノ酸配列の一部を形成しないアミノ酸配列を示す。この配列は、好ましくは、溶解性を本発明のこの実施形態の分子に与え、また、好ましくは、血清におけるキメラ分子の半減期を増大させる。

【０１０３】

異種アミノ酸配列は一般には、本発明の単離されたポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に局在化される。

【０１０４】

１つまたは複数の異種アミノ酸配列を本発明のｓＦｌｔ－１４アミノ酸配列にコンジュゲート化することができる。融合タンパク質構築物において一般に使用される異種アミノ酸配列の例には、免疫グロブリン、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、絨毛性性腺刺激ホルモン（ＣＧβ）由来のカルボキシ末端ペプチド（ＣＴＰ）、および、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１０５】

異種配列と、ｓＦｌｔ－１４アミノ酸配列との間における融合（コンジュゲート化）の正確な部位は重要ではなく、最適な部位を、ポリペプチドの機能性（例えば、ＶＥＧＦ結合）が維持される限り、日常的な実験によって求めることができる。リガンド結合を評価する様々な方法が当該技術分野では周知である（例えば、放射能標識されたリガンドを結合アッセイにおいて使用すること、または、ＥＬＩＳＡ）。

【０１０６】

加えて、または、代替として、本明細書中上記で述べられたように、本発明の単離されたポリペプチドを非タンパク質性成分に結合させることができる。

【０１０７】

従って、本発明の実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドが非タンパク質性成分に結合させられることが提供される。

【０１０８】

そのようなコンジュゲート分子は非常に安定であり（おそらくは非タンパク質性成分によってもたらされる立体的障害のために、インビボでのタンパク質分解活性に対して抵抗性であり）、また、本明細書中下記においてさらに記載されるように、安価で、非常に効率である一般的な固相合成法を使用して製造することができる。しかしながら、組換え技術が依然として使用され得ること、従って、組換えペプチド生成物はインビトロ修飾（例えば、ＰＥＧ化）を受けることが理解される。

【０１０９】

本明細書中で使用される表現「非タンパク質性成分」は、上記のｓＦｌｔ－１４アミノ酸配列に結合させられる、ペプチド結合したアミノ酸を含まない分子を示す。１つの実施形態によれば、本発明のこの局面の非タンパク質性成分はポリマーまたはコポリマー（合成または天然）である。本発明の非タンパク質性成分の限定されない例には、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ジビニルエーテル・無水マレイン酸コポリマー（ＤＩＶＥＭＡ；例えば、Ｋａｎｅｄａ　Ｙ他、１９９７、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、２３９：１６０～５を参照のこと）、および、ポリ（スチレン－ｃｏ－無水マレイン酸）（ＳＭＡ；例えば、Ｍｕ　Ｙ他、１９９９、Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ．、２５５：７５～９を参照のこと）が含まれる。

【０１１０】
そのような非タンパク質性成分のコンジュゲート化は本発明のこの局面のポリペプチドに安定性（例えば、プロテアーゼ活性に対する抵抗性）および／または溶解性（例えば、生物学的流体（例えば、血液、消化液など）における溶解性）を与え、一方で、その生物学的活性を保ち、かつ、その半減期を長くする。そのようなコンジュゲート化は、特に、短い半減期および血液からの迅速なクリアランスを示す治療タンパク質の場合には好都合である。コンジュゲート化されたタンパク質の血漿中における増大した半減期は、（その糸球体ろ過を制限する）タンパク質コンジュゲートの増大したサイズ、および、ポリマーの立体的障害に起因する低下したタンパク質分解から生じる。一般には、ペプチドあたり結合されるポリマー鎖が多くなるほど、半減期の延長が大きくなる。しかしながら、様々な対策が、本発明のｓＦｌｔ－１４アミノ酸配列の特異的な活性（例えば、ｓＦｌｔ－１４がＶＥＧＦに結合すること）を低下させないために取られる。非タンパク質成分をアミノ酸配列にコンジュゲート化する様々な方法が、（例えば、Ｖｅｒｏｎｅｓｅ　ＦＭ、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、第２２（５）巻、２００１、４０５頁～４１７頁（１３）、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ；および、Ｈａｒｕｈｉｋｏ　Ｋａｍａｄａ他、２０００、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、６０：６４１６～６４２０に記載されるように）当該技術分野では周知である（これらは参照により全体が本明細書中に組み込まれる）。

【０１１１】
従って、本発明者らは、可溶性で、分泌される新規なＶＥＧＦＲ変化体を発見している。この変化体は子癇前症被験者の血清および胎盤において発現され、そのようなものとして、その検出は、例えば、子癇前症の診断などにおいて臨床的に有益であり得る。

【０１１２】
従って、本発明のさらに別の局面のいくつかの実施形態によれば、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４（例えば、配列番号２）を検出する方法（インビボ検出を含む）が提供される。

【０１１３】
典型的には、この方法は、ｓＦｌｔ－１４のレベル、存在または比率（例えば、他のＦｌｔ－１イソ型（例えば、図９Ｂに示されるようにｓＦｌｔ－１）に関する比率）を求めることによって行われる。

【０１１４】
本発明のこの局面のいくつかの実施形態によれば、この方法は、生物学的サンプルを、ｓＦｌｔ－１４の単離されたポリペプチド（例えば、配列番号２）と特異的に結合し、配列番号１０には結合しない抗原認識ドメインを含む抗体と接触させ、その結果、ｓＦｌｔ－１４および抗体が複合体を形成するようにすること、および、複合体の存在またはレベルを測定し、それにより、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４を検出することを含む。

【０１１５】
本明細書中で使用される「生物学的サンプル」は、ｓＦｌｔ－１４が存在し得る生物学的材料を示し、例えば、細胞、組織（例えば、胎盤、絨毛膜絨毛サンプル、固形腫瘍）、ならびに、流体、例えば、羊水、血液、血清、血漿、リンパ液、胆汁液、尿、唾液、喀痰、滑液、精液、涙液、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄液、腹水、膿および馴化培地などを示す。生物学的サンプルは母体のサンプルまたは胎児のサンプルである。生物学的サンプルはエクスビボまたはインビトロで分析することができるが、生物学的サンプルはまた、被験者の身体から回収されることなく分析することができる。

【０１１６】
（下記の実施例の節において）実施例８および図９Ａ～図９Ｂに示されるように、ｓＦｌｔ－１４が妊娠の第１３週からもっぱら発現される。従って、ｓＦｌｔ－１４のレベルまたは存在の分析がこの週よりも前に行われるとき、特異的な抗体またはオリゴヌクレオチドが好ましくは用いられる。第１３週以降では、様々なＦｌｔ－１変化体の共通配列領

域に向けられた抗体またはオリゴヌクレオチドの使用もまた意図され得る。

【０１１７】

従って、本発明のこの局面のいくつかの実施形態の抗体はアミノ酸配列ＣＥＬＹＴＳＴＳＰＳＳＳＳＳＳ（配列番号５）に対して向けさせることができる。このペプチドは、配列番号１０に示されるように、他のＦｌｔポリペプチドには存在しない（すなわち、膜貫通型ｓＦｌｔ－１および可溶性ｓＦｌｔ－１には存在しない）、ｓＦｌｔ－１４の特有な２８個のアミノ酸の配列（配列番号４）に由来するアミノ酸を含む。代替として、抗体は、アミノ酸配列ＣＨＡＮＧＶＰＥＰＱＩＴＷＦＫ（配列番号６）に対して向けさせることができる。このペプチドは、ｓＦｌｔ－１によってではなく、ｓＦｌｔ－１４および膜貫通型Ｆｌｔ－１によって共通して有されるアミノ酸配列（配列番号１０）に由来するアミノ酸を含む。逆に、抗体は、共通のアミノ酸配列および特有なアミノ酸配列の両方を含む架橋領域に対して向けさせることができる。抗体を向けさせることができる１つの例示的な架橋領域がＨＫＩＱＱＥＰＥＬＹＴＳＴＳ（配列番号１５）である。様々な対策が、Ｆｌｔ－１またはその可溶性形態に対してではなく、ｓＦｌｔ－１４に対して特異的である抗体を選択するために取られる。

【０１１８】

抗体作製のために選ばれる具体的なペプチドは、好ましくは、免疫原性であるように（すなわち、抗体応答を刺激することができるように）選択される。ペプチドの免疫原性を試験するための様々なパラメーターが当該技術分野では周知であり、これらには、異物性（ｆｏｒｅｇｉｎｅｓｓ）、分子サイズ、化学的組成および異種性、ならびに、抗原プロセシングおよび抗原提示に対する感受性が含まれるが、これらに限定されない。様々な配列分析ソフトウエアアプリケーションが当該技術分野では知られており、これらは、免疫原性指標を、例えば、Ｊａｍｅｓｏｎ－Ｗｏｌｆアルゴリズムに従って提供する。例には、Ｓｃｉｐｒｏｔ（ｗｗｗ．ａｓｉａｏｎｌｉｎｅ．ｎｅｔ．ｈｋ／～ｔｗｃｂｉｏ／ＤＯＣＳ／１／ｓｃＰｒｔｅｉｎ．ｈｔｍから入手可能）およびＭａｃｖｅｃｔｏｒ（ｗｗｗ．ａｃｃｅｌｒｙｓ．ｃｏｍ／ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ｍａｃｖｅｃｔｏｒ／から入手可能）、ならびに、広く利用されているＧＣＧパッケージ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１９】

用語「抗体」は、完全な抗体分子、ならびに、標的ポリペプチドの抗原性部分と結合することができるその機能的フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖなど）を示す。これらの機能的な抗体フラグメントは本発明の好ましい実施形態を構成し、下記のように定義される：

（１）Ｆａｂ、これは、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントを含有するフラグメントであり、完全な抗体を酵素パパインで消化して、無傷の軽鎖と、１つの重鎖の一部分とを生じさせることによって作製することができる；

（２）Ｆａｂ’、これは、完全な抗体をペプシンで処理し、続いて、還元して、無傷の軽鎖と、重鎖の一部分とを生じさせることによって得ることができる、抗体分子のフラグメントである；２つのＦａｂ’フラグメントが１分子の抗体分子について得られる；

（３）（Ｆａｂ’）$_2$、これは、完全な抗体を、その後の還元を伴うことなく、酵素ペプシンで処理することによって得ることができる、抗体のフラグメントである；（Ｆａｂ’）$_2$は、２つのジスルフィド結合によってつながれた２つのＦａｂ’フラグメントの二量体である；

（４）Ｆｖ、これは、２つの鎖として発現された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される；および

（５）単鎖抗体（「ＳＣＡ」）、これは、例えば、米国特許第４９４６７７８号に記載されるような遺伝子融合された単鎖分子として、好適なポリペプチドリンカーによって連結された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子である。

【０１２０】

このような抗体フラグメントを作製する方法が当技術分野では周知である（例えば、本

明細書中に参考として組み込まれる、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８を参照のこと）。

【０１２１】

血清免疫グロブリン抗体（ポリクローナル抗血清）またはその反応性部分の精製を、当業者に既知である様々な方法によって達成することができ、そのような方法には、硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウムによる沈殿化、それに続く、生理的食塩水に対する透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫アフィニティークロマトグラフィー、ならびに、ゲルろ過、ゾーン電気泳動などが含まれる（Ｇｏｄｉｎｇ、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ（第２版、１０４頁～１２６頁、１９８６年、Ｏｒｌａｎｄ、Ｆｌａ.、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）を参照のこと）。正常な生理学的条件のもとでは、様々な抗体が、血漿および他の体液、ならびに、特定の細胞の膜において見出され、また、Ｂ細胞として示されるタイプのリンパ球またはその機能的等価体によって産生される。ＩｇＧクラスの抗体は、ジスルフィド結合によって連結された４つのポリペプチド鎖から構成される。無傷のＩｇＧ分子の４つの鎖は、Ｈ鎖と呼ばれる２つの同一の重鎖、および、Ｌ鎖と呼ばれる２つの同一の軽鎖である。さらなるクラスには、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＭおよび関連したタンパク質が含まれる。

【０１２２】

モノクローナル抗体の作製および選抜のための様々な方法が、例えば、総説（例えば、ＴｒａｍｏｎｔａｎｏおよびＳｃｈｌｏｅｄｅｒ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｚｙ、１７８、５５１～５６８、１９８９など）においてまとめられるように、当該技術分野では周知である。本発明のｓＦｌｔ－１４ポリペプチド（またはそのフラグメント）は、抗体をインビトロで作製するために使用することができる。より好ましくは、本発明のｓＦｌｔ－１４ポリペプチドは、抗体をインビボで誘発するために使用される。一般には、好適な宿主動物が本発明のｓＦｌｔ－１４ポリペプチドにより免疫化される。好都合には、使用される動物宿主は同系交配系統のマウスである。動物は典型的には、生理学的に許容され得るビヒクルにおける本発明のｓＦｌｔ－１４ポリペプチドの溶液と、免疫原に対する高まった免疫応答を達成する任意の好適なアジュバントとを含む混合物により免疫化される。例として、最初の免疫化を好都合には、本発明のｓＦｌｔ－１４ポリペプチドの溶液と、フロイント完全アジュバントとの混合物により達成することができ、この場合、混合物は油中水型エマルションの形態で調製される。典型的には、免疫化は、筋肉内に、皮内に、皮下に、腹腔内に、肉趾内に、または、任意の適切な投与経路によって動物に施される。免疫原の免疫化スケジュールは、必要に応じて適合化することができるが、通例的には、より穏和なアジュバント（例えば、フロイント不完全アジュバントなど）を使用する数回のその後の免疫化または二次的な免疫化を伴う。抗体力価およびｓＦｌｔ－１４ポリペプチドに対する結合の特異性を、例として、放射免疫アッセイまたは酵素結合免疫吸着アッセイ（これはＥＬＩＳＡアッセイとして知られている）を含めて、何らかの便利な方法によって免疫化スケジュールの期間中に求めることができる。好適な抗体力価が達成されたとき、免疫化動物からの様々な抗体産生リンパ球が得られ、これらは、当該技術分野で周知のように培養され、選抜され、クローン化される。典型的には、リンパ球を免疫化動物の脾臓から多数得ることができるが、リンパ球はまた、循環、リンパ節または他のリンパ系器官からも回収することができる。リンパ球はその後、当該技術分野では周知のように、ハイブリドーマを得るために、任意の好適なミエローマ細胞株と融合される。代替として、リンパ球はまた、培養で成長するように刺激することができ、その後、これらのリンパ球を、確立されたプロトコルに従って、ウイルス、化学剤または核酸（例えば、ガン遺伝子など）にさらすことを含めて、当該技術分野で周知の方法によって不死化することができる。融合後、ハイブリドーマは、例えば、マルチウエルプレートにおいて、好適な培養条件のもとで培養され、培養上清が、選ばれたハプテンを認識する抗体を含有する培養物を特定するためにスクリーニングされる。本発明のｓＦｌｔ－１４ポ

リペプチドを認識する抗体を分泌するハイブリドーマが、適切な培養条件のもとで、限界希釈によってクローン化され、拡大培養される。モノクローナル抗体が精製され、免疫グロブリンのタイプおよび結合親和性に関して特徴づけされる。

【０１２３】

本発明による抗体フラグメントは、抗体のタンパク質分解的加水分解によって、あるいは、フラグメントをコードするＤＮＡの大腸菌細胞または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養または他のタンパク質発現システム）における発現によって調製することができる。

【０１２４】

抗体フラグメントは、従来の方法による全長抗体のペプシン消化またはパパイン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントを、Ｆ（ａｂ’）$_2$と呼ばれる５Ｓフラグメントを提供するためにペプシンによる抗体の酵素的切断によって製造することができる。このフラグメントはさらに、チオール還元剤、および、場合により、ジスルフィド連結の切断から生じるスルフヒドリル基のための保護基を使用してさらに切断して、３．５Ｓの Ｆａｂ’一価フラグメントを生じさせることができる。あるいは、ペプシンを使用する酵素的切断により、２つの一価のＦａｂ’フラグメントと、１つのＦｃフラグメントとが直接に生じる。これらの方法が、例えば、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇの米国特許第４０３６９４５号および同第４３３１６４７号、ならびに、それらに含まれる参考文献に記載される（これらの特許は本明細書によりその全体が参考として組み込まれる）。Ｐｏｒｔｅｒ，Ｒ．Ｒ．［Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．、７３：１１９～１２６（１９５９）］もまた参照のこと。フラグメントが、無傷の抗体によって認識される抗原に結合する限り、抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽鎖－重鎖フラグメントを形成するための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、あるいは、他の酵素的技術、化学的技術または遺伝学的技術などもまた使用することができる。

【０１２５】

ＦｖフラグメントはＶ$_H$鎖およびＶ$_L$鎖の会合を含む。この会合は、Ｉｎｂａｒ他［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、６９：２６５９～６２（１９７２）］に記載されるように非共有結合性である場合がある。あるいは、可変鎖を分子間ジスルフィド結合によって連結することができ、または、化学試薬（例えば、グルタルアルデヒドなど）によって架橋することができる。好ましくは、Ｆｖフラグメントは、ペプチドリンカーによってつながれたＶ$_H$鎖およびＶ$_L$鎖を含む。このような単鎖の抗原結合タンパク質（ｓｃＦｖ）は、オリゴヌクレオチドによってつながれたＶ$_H$ドメインおよびＶ$_L$ドメインをコードするＤＮＡ配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。そのような構造遺伝子は発現ベクターに挿入され、続いて、発現ベクターが宿主細胞（例えば、大腸菌など）に導入される。組換え宿主細胞により、リンカーペプチドが２つのＶドメインを架橋する単一ポリペプチド鎖が合成される。ｓｃＦｖを製造する方法が、例えば、ＷｈｉｔｌｏｗおよびＦｉｌｐｕｌａ、Ｍｅｔｈｏｄｓ、２：９７～１０５（１９９１）；Ｂｉｒｄ他、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４２：４２３～４２６（１９８８）；Ｐａｃｋ他、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１１：１２７１～７７（１９９３）；およびＬａｄｎｅｒ他、米国特許第４９４６７７８号によって記載される（これらの全ては本明細書によりその全体が参考として組み込まれる）。

【０１２６】

抗体フラグメントの別の形態は、単一の相補性決定領域（ＣＤＲ）をコードするペプチドである。様々なＣＤＲペプチド（「最小認識ユニット」）を、目的とする抗体のＣＤＲをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、可変領域を抗体産生細胞のＲＮＡから合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用して調製される。例えば、ＬａｒｒｉｃｋおよびＦｒｙ［Ｍｅｔｈｏｄｓ、２：１０６～１０（１９９１）］を参照のこと。

【０１２７】

非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小

限の配列を含有する、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（例えば、抗体のＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$または他の抗原結合性の部分配列など）のキメラ分子である。ヒト化抗体には、レシピエント抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）からの残基が、所望する特異性、親和性および能力を有する例えば、マウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲからの残基によって置換されるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が含まれる。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体において、または、移入されたＣＤＲ配列もしくはフレームワーク配列においてそれらのいずれにも見出されない残基を含む場合がある。一般に、ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ領域に対応し、かつ、フレームワーク領域（ＦＲ）のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である少なくとも１つ（典型的には２つ）の可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体はまた、場合により、免疫グロブリンの定常領域（Ｆｃ）の一部分を少なくとも含み、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそのような一部分を少なくとも含む［Ｊｏｎｅｓ他、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２～５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ他、Ｎａｔｕｒｅ、３３２：３２３～３２９（１９８８）；およびＰｒｅｓｔａ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、２：５９３～５９６（１９９２）］。

【０１２８】

非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からヒト化抗体に導入された１つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、インポート残基と呼ばれ、そのようなインポート残基は、典型的には、インポート可変ドメインから選ばれる。ヒト化は本質的には、齧歯類のＣＤＲまたはＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに使用することによって、Ｗｉｎｔｅｒおよび共同研究者らの方法に従って行うことができる［Ｊｏｎｅｓ他、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２～５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ他、Ｎａｔｕｒｅ、３３２：３２３～３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ他、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３９：１５３４～１５３６（１９８８）］。従って、そのようなヒト化抗体は、無傷のヒト可変ドメインの実質的に一部が非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である（米国特許第４８１６５６７号）。実際には、ヒト化抗体は典型的には、一部のＣＤＲ残基と、可能であれば、一部のＦＲ残基とが、齧歯類抗体における類似部位に由来する残基によって置換されるヒト抗体である。

【０１２９】

ヒト抗体はまた、当該技術分野で既知の様々な技術を使用して製造することができ、そのような技術には、ファージ呈示ライブラリー［ＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２７：３８１（１９９１）；Ｍａｒｋｓ他、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２２：５８１（１９９１）］が含まれる。Ｃｏｌｅ他およびＢｏｅｒｎｅｒ他の技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用することができる（Ｃｏｌｅ他、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ、７７頁（１９８５）；およびＢｏｅｒｎｅｒ他、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４７（１）：８６～９５（１９９１））。同様に、ヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリンの遺伝子座をトランスジェニック動物（例えば、内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウス）に導入することによって作製することができる。抗原による攻撃を受けたとき、ヒト抗体の産生が認められ、これは、遺伝子再配置、組み立ておよび抗体レパートリーを含めて、すべての点でヒトにおいて見られ得る抗体産生と非常に類似する。この方法が、例えば、米国特許第５５４５８０７号、同第５５４５８０６号、同第５５６９８２５号、同第５６２５１２６号、同第５６３３４２５号および同第５６６１０１６号において、また、下記の科学的刊行物において記載される：Ｍａｒｋｓ他、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１０；７７９～７８３（１９９２）；Ｌｏｎｂｅｒｇ他、Ｎａｔｕｒｅ、３６８：８５６～８５９（

１９９４）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ、３６８：８１２～１３（１９９４）；Ｆｉｓｈｗｉｌｄ他、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１４、８４５～５１（１９９６）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１４：８２６（１９９６）；ＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ、Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１３、６５～９３（１９９５）。

【０１３０】

従って、抗体を、免疫複合体を形成するように生物学的サンプルと接触させることができる。複合体のレベルおよび存在の検出を、当該技術分野では周知の方法を使用して行うことができる。そのような方法の例には、ウエスタンブロット分析、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）分析、蛍光活性化細胞分取（ＦＡＣＳ）分析および免疫組織化学的分析が含まれるが、これらに限定されない。

【０１３１】

代替として、ｓＦｌｔ－１４の検出がポリヌクレオチドレベルである場合がある。この目的を達成するために、サンプルは、ハイブリダイゼーション複合体を形成するように、ｓＦｌｔ－１（配列番号９）に対してではなく、ｓＦｌｔ－１４（配列番号１または配列番号３）に対して、または、架橋配列（例えば、配列番号８に示されるような架橋配列）に対して特異的に結合する核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチド）と接触させられる。

【０１３２】

十分な時間のインキュベーションの後、複合体の存在またはレベルが測定され、それにより、生物学的サンプルにおけるｓＦｌｔ－１４を検出する。

【０１３３】

例えば、他のＦｌｔ－１ポリヌクレオチド（例えば、膜固定のＦｌｔ－１および可溶性のＦｌｔ－１）、例えば、ｓＦｌｔ－１（配列番号９）などに対してではなく、ｓＦｌｔ－１４ポリヌクレオチドに対して特異的である配列に結合することができるオリゴヌクレオチドを使用することができる。そのような配列が、単離されたポリヌクレオチドの非翻訳領域またはオープンリーディングフレームに存在し得る。

【０１３４】

本明細書中で使用される用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸（ＲＮＡ）またはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはそれらの模倣体の一本鎖または二本鎖のオリゴマーまたはポリマーを示す。この用語は、天然に存在する塩基、糖および共有結合性ヌクレオチド間連結（例えば、バックボーン）から構成されるオリゴヌクレオチド、ならびに、天然に存在するそれぞれの部分と同様に機能する、天然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【０１３５】

本明細書中で使用される表現「特異的にハイブリダイズすることができる」は、ＲＮＡ：ＲＮＡ分子、ＲＮＡ：ＤＮＡ分子、および／またはＤＮＡ：ＤＮＡ分子のような二重鎖分子を形成することを示す。

【０１３６】

本発明の教示に従って設計されるオリゴヌクレオチドは、酵素的合成または固相合成のような、この分野で知られている任意のオリゴヌクレオチド合成方法に従って作製されることができる。固相合成を実行するための設備および試薬が、例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから市販されている。そのような合成のための任意の他の手段もまた用いることができる：オリゴヌクレオチドの実際の合成は十分に当業者の能力の範囲内であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．およびＲｕｓｓｅｌｌ，Ｄ．Ｗ．（２００１）「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｒ．Ｍ．ら編（１９９４，１９８９）「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」第Ｉ巻～第ＩＩＩ巻、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、バルチモア、メリーランド；Ｐｅｒｂａｌ，Ｂ．（１９８８）「Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉ

ｎｇ」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ニューヨーク；およびＧａｉｔ，Ｍ．Ｊ．編（１９８４）「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」に詳しく記載されるような確立された方法論によって成し遂げることができ、固相化学（例えば、シアノエチルホスホルアミダイト）、それに続く脱保護、脱塩および精製（例えば、自動化されたトリチル－オン法またはＨＰＬＣによる精製）を利用して成し遂げることができる。

【０１３７】

本発明のオリゴヌクレオチドは、本明細書において上に記載される配列改変と特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも１７塩基、少なくとも１８塩基、少なくとも１９塩基、少なくとも２０塩基、少なくとも２２塩基、少なくとも２５塩基、少なくとも３０塩基または少なくとも４０塩基のものである。

【０１３８】

生物学的サンプルにおいて目的のＤＮＡまたはＲＮＡの検出を可能にするハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、オリゴヌクレオチドの使用に依存し、そのようなオリゴヌクレオチドは、１０、１５、２０、または３０～１００ヌクレオチド長、好ましくは１０～５０のヌクレオチド長、より好ましくは４０～５０ヌクレオチド長であることができる。

【０１３９】

短い核酸（２００ｂｐより短い長さ、例えば、１７～４０ｂｐ長）のハイブリダイゼーションは、所望のストリンジェンシーにより調節されることができる、以下の例示的なハイブリダイゼーションプロトコルを用いて行うことができる：（ｉ）６×ＳＳＣおよび１％ＳＤＳまたは３Ｍ ＴＭＡＣＩ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ、および０．１％脱脂粉乳のハイブリダイゼーション溶液、T_mを１～１．５℃下回るハイブリダイゼーション温度、３Ｍ ＴＭＡＣＩ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）および０．５％ ＳＤＳのT_mを１～１．５℃下回る温度の最終洗浄溶液；（ｉｉ）６×ＳＳＣおよび０．１％ ＳＤＳまたは３Ｍ ＴＭＡＣＩ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡおよび０．１％脱脂粉乳のハイブリダイゼーション溶液、T_mを２～２．５℃下回るハイブリダイゼーション温度、３Ｍ ＴＭＡＣＩ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）および０．５％ ＳＤＳのT_mを１～１．５℃下回る温度の洗浄溶液、６×ＳＳＣの最終洗浄溶液、および２２℃での最終洗浄；（ｉｉｉ）６×ＳＳＣおよび１％ ＳＤＳまたは３Ｍ ＴＭＡＣＩ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ＳＤＳ，１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ、および０．１％脱脂粉乳のハイブリダイゼーション溶液、ハイブリダイゼーション温度。

【０１４０】

ハイブリッド二本鎖の検出は、多くの方法によって実行されることができる。典型的には、ハイブリダイゼーション二本鎖は、ハイブリダイズしていない核酸から分離され、次いで二本鎖に結合された標識が検出される。そのような標識は、放射能標識、蛍光標識、生物学的標識、酵素タグ、または当該分野において標準的に使用される標識を示す。標識は、生物学的サンプル（標的）に由来するオリゴヌクレオチドプローブまたは核酸のいずれかと結合体化されることができる。

【０１４１】

例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、合成後、ビオチニル化ｄＮＴＰまたはｒＮＴＰを組み込むことによって、または類似の手段（例えば、ビオチンのソラレン誘導体をＲＮＡに光架橋すること）によって、その後の標識されたストレプトアビジン（例えば、フィコエリトリン結合体化ストレプトアビジン）またはその等価物の添加によって標識されることができる。あるいは、蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプローブが使用されるとき、フルオレセイン、リサミン、フィコエリトリン、ローダミン（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｃｅｔｕｓ）、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、Ｆｌ

ｕｏｒＸ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）および他のもの［Ｋｒｉｃｋａら（１９９２）、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆを参照のこと］がオリゴヌクレオチドに結合されることができる。

【０１４２】

伝統的なハイブリダイゼーションアッセイは、ＰＣＲ分析、ＲＴ－ＰＣＲ分析、ＲＮａｓｅ保護分析、インシトゥーハイブリダイゼーション分析、プライマー伸長分析、ノーザンブロット分析、およびドットブロット分析を含む（本明細書の下記の実施例の節を参照のこと）。

【０１４３】

ｓＦｌｔ－１４の検出はまた、抗体またはオリゴヌクレオチドの使用を含まない他の方法によって行われ得ることが理解される。時にはより面倒であるとしても、これらの方法には、分子量に基づく特定、および、質量分析法が含まれるが、これらに限定されない。

【０１４４】

ｓＦｌｔ－１４を検出する上記の方法は、ほとんどの場合、母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態を診断するために所望されることが理解される。

【０１４５】

本明細書中で使用される用語「診断」は、疾患または症状を分類すること、そのような疾患の重篤度を決定すること、疾患の進行をモニターすること、治療療法の有効性をモニターすること、疾患の結果および／または回復の見込みを予測すること（予知する）ことを示す。

【０１４６】

本明細書中で使用される表現「母体または胎児のストレスに関連する妊娠関連の医学的状態」は、ｓＦｌｔ－１４のアップレギュレーションに関連する、胎児の母親における臨床的症状が存在する疾患または症候群を示す。妊娠はどの段階または期であってもよい。そのような医学的状態には、何らかの高血圧性障害；子癇前症、子癇、軽度の子癇前症、慢性的高血圧、ＥＰＨ妊娠中毒症、妊娠性高血圧、混合型子癇前症（慢性的高血圧、慢性腎障害または狼瘡に重なる子癇前症を含む）、ＨＥＬＬＰ症候群（溶血、上昇した肝臓酵素、低い血小板数）または腎障害が含まれ得る。そのような医学的状態にはまた、妊娠性糖尿病、胎児成長制限（ＦＧＲ）および胎児アルコール症候群（ＦＡＳ）が含まれ得る。

【０１４７】

本明細書中で使用される表現「母体または胎児のストレス」は、母親または胎児が、妊娠に関係づけられる合併症を発症する危険性がある何らかの状態を示す。胎児のストレスには、不十分な栄養供給および胎児成長の中断が含まれるが、これらに限定されない。母体のストレスには、高血圧および糖尿病が含まれるが、これらに限定されない。胎児および母体のストレスは胎児の発達および脳機能に影響を及ぼすことがあり、また、早産および緊急出産（例えば、帝王切開）に関連づけられる妊娠結果における著しい役割を果たす。

【０１４８】

本明細書中で使用される表現「その必要性のある対象」は哺乳動物対象を示し、好ましくはヒト対象（例えば、妊婦または胎児）を示す。

【０１４９】

本発明が妊婦に関連して記載されるが、本明細書中に記載される方法はまた、高血圧性障害を妊娠期間中に発症する非妊娠女性に対する危険性を評価するために利用することができる。

【０１５０】

本明細書中上記で述べられたように、本発明者らは、ｓＦｌｔ－１４が子癇前症において著しくアップレギュレーションされることを示している（実施例３および図４Ａ～図４Ｂを参照のこと）。さらに、本発明者らは、この新規なＶＥＧＦＲ変化体（ｓＦｌｔ－１４）が妊娠早期（第９週）から発現され、第２トリメスター（第１３週）から現れる優勢なＶＥＧＦＲであることを示している（実施例８および図９Ａ～図９Ｂを参照のこと）。

従って、本発明者らは、妊娠関連の医学的状態を処置するためにｓＦｌｔ－１４をダウンレギュレーションすることができる作用因の使用を想定する。加えて、本発明者らは、この新規な変化体が、ＶＥＧＦの結合に対してＶＥＧＦＲと競合すること（実施例９および図１０Ｂを参照のこと）、および、そのようなものとして、この新規な変化体の調節がＶＥＧＦ関連の医学的状態の処置のために非常に重要であることを首尾よく示している。

【０１５１】

本明細書中で使用される「ＶＥＧＦ関連の医学的状態」は、発症または進行が、本明細書中上記で記載されるようなＶＥＧＦＲリガンドの低下した活性または発現、あるいは、過度な活性または発現に依存する疾患、障害または状態を示す。

【０１５２】

従って、本発明のいくつかの実施形態によれば、ＶＥＧＦの低下した活性および／または発現が存在するＶＥＧＦ関連の医学的状態を処置する方法が提供される。この方法は、その必要性のある対象に、ｓＦｌｔ－１４をダウンレギュレーションすることができる作用因の治療効果的な量を投与し、それにより、対象におけるＶＥＧＦ関連の医学的状態を処置することを含む。

【０１５３】

ＶＥＧＦの低下した活性および／または発現に関連する医学的状態の例には、子癇前症、妊娠性糖尿病、妊娠性高血圧、胎児成長制限（ＦＧＲ）、胎児アルコール症候群（ＦＡＳ）、および高血圧が含まれるが、これらに限定されない。

【０１５４】

本明細書中で使用される「処置する」は、医学的状態の有害な影響を防止すること、治療すること、逆戻りさせること、弱めること、緩和すること、最小限に抑えること、抑制すること、または、停止させることを示す。

【０１５５】

そのような作用因の例には、上記の抗体およびポリヌクレオチド（例えば、ｓＦｌｔ－１とではなく、ｓＦｌｔ－１４と特異的に結合し、これを阻害することができる抗体およびポリヌクレオチド）が含まれる。

【０１５６】

例えば、本発明のこの局面の作用因は、ｓＦｌｔ－１４ポリペプチドを産生する細胞（例えば、栄養膜）に影響を及ぼすことによってｓＦｌｔ－１４の活性および／または発現を低下させることができる（すなわち、ｓＦｌｔ－１４をダウンレギュレーションすることができる）場合がある。

【０１５７】

従って、本発明の、ｓＦｌｔ－１４をダウンレギュレーションすることができる作用因は、ｓＦｌｔ－１４ポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドに対して（例えば、生理学的条件のもとで細胞内において）特異的にハイブリダイゼーションすることができるオリゴヌクレオチドである。そのようなオリゴヌクレオチドが本明細書中上記で記載されている。

【０１５８】

オリゴヌクレオチドを広範囲の様々な細胞タイプに効率的に送達するために使用することができる様々な送達戦略が当該技術分野では周知である［例えば、Ｌｕｆｔ Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ、７６：７５～６（１９９８）；Ｋｒｏｎｅｎｗｅｔｔ他、Ｂｌｏｏｄ、９１：８５２～６２（１９９８）；Ｒａｊｕｒ他、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ Ｃｈｅｍ、８：９３５～４０（１９９７）；Ｌａｖｉｇｎｅ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ、２３７：５６６～７１（１９９７）；および、Ａｏｋｉ他（１９９７）、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ、２３１：５４０～５（１９９７）を参照のこと］。

【０１５９】

ｓＦｌｔ－１４ポリペプチドの発現をダウンレギュレーションすることができるオリゴヌクレオチド作用因の一例が、小さい干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子である。ＲＮＡ干

渉は２段階のプロセスである。開始段階と呼ばれる最初の段階の期間中において、投入されたｄｓＲＮＡが、おそらくは、（直接に導入されたか、あるいは、発現ベクター、カセットまたはウイルスを介して導入された）ｄｓＲＮＡをＡＴＰ依存的様式で切断するダイサー（ｄｓＲＮＡ特異的リボヌクレアーゼのＲＮａｓｅＩＩＩファミリーのメンバー）の作用によって２１ヌクレオチド～２３ヌクレオチド（ｎｔ）の小さい干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）に消化される。連続する切断事象により、ＲＮＡが、それぞれの鎖が２ヌクレオチドの３’突出端を有する１９ｂｐ～２１ｂｐの二重鎖（ｓｉＲＮＡ）に分解される［ＨｕｔｖａｇｎｅｒおよびＺａｍｏｒｅ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、１２：２２５～２３２（２００２）；および、Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ、Ｎａｔｕｒｅ、４０９：３６３～３６６（２００１）］。

【０１６０】

エフェクター段階において、ｓｉＲＮＡ二重鎖がヌクレアーゼ複合体に結合して、ＲＮＡ誘導によるサイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）を形成する。ｓｉＲＮＡ二重鎖のＡＴＰ依存的な巻き戻しがＲＩＳＣの活性化のために要求される。活性なＲＩＳＣはその後、塩基対形成する相互作用によって相同的な転写物を標的とし、ｍＲＮＡをｓｉＲＮＡの３’末端から１２ヌクレオチドのフラグメントに切断する［ＨｕｔｖａｇｎｅｒおよびＺａｍｏｒｅ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、１２：２２５～２３２（２００２）；Ｈａｍｍｏｎｄ他（２００１）、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎ．、２：１１０～１１９（２００１）；および、Ｓｈａｒｐ、Ｇｅｎｅｓ．Ｄｅｖ．、１５：４８５～９０（２００１）］。切断機構は依然として解明されなければならないが、研究により、それぞれのＲＩＳＣが、１つだけのｓｉＲＮＡと、ＲＮａｓｅとを含有することが示される［ＨｕｔｖａｇｎｅｒおよびＺａｍｏｒｅ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、１２：２２５～２３２（２００２）］。

【０１６１】

ＲＮＡｉの効力が顕著であるために、ＲＮＡｉ経路内での増幅段階が示唆されている。増幅が、より多くのｓｉＲＮＡを生じさせる、投入されたｄｓＲＮＡのコピーによって、または、形成されたｓｉＲＮＡの複製によって生じ得る。代替として、または、加えて、増幅がＲＩＳＣの多数のターンオーバー事象によって行われ得る［Ｈａｍｍｏｎｄ他（２００１）、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎ．、２：１１０～１１９（２００１）；Ｓｈａｒｐ、Ｇｅｎｅｓ．Ｄｅｖ．、１５：４８５～９０（２００１）；ＨｕｔｖａｇｎｅｒおよびＺａｍｏｒｅ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、１２：２２５～２３２（２００２）］。ＲＮＡｉに関するさらなる情報については、下記の総説を参照のこと：Ｔｕｓｃｈｌ ＣｈｅｍＢｉｏｃｈｅｍ．、２：２３９～２４５（２００１）；Ｃｕｌｌｅｎ、Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、３：５９７～５９９（２００２）；および、Ｂｒａｎｔｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔ．、１５７５：１５～２５（２００２）。

【０１６２】

本発明との使用のために好適なＲＮＡｉ分子の合成を下記のように行うことができる：最初に、ｓＦｌｔ－１４ポリヌクレオチド配列標的がＡＡジヌクレオチド配列について下流に向かって走査される。それぞれのＡＡと、その３’側の隣接する１９ヌクレオチドとの存在が、可能性のあるｓｉＲＮＡ標的部位として記録される。

【０１６３】

次いで、可能性のある標的部位が、何らかの配列アラインメントソフトウエアを使用して、例えば、ＮＣＢＩサーバー（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／）から入手可能なＢＬＡＳＴソフトウエアなどを使用して適切なゲノムデータベース（例えば、ヒト、マウス、ラットなど）に対して比較される。他のコード配列に対する有意な相同性を示す推定される標的部位が除かれる。

【０１６４】

資格を有する標的配列が、ｓｉＲＮＡ合成のためのテンプレートとして選択される。好

ましい配列は、低いＧ／Ｃ含有量を含むものである。これらは、Ｇ／Ｃ含有量が５５％を超えるものと比較して、遺伝子サイレンシングを媒介することにおいてより効果的であることが証明されているからである。いくつかの標的部位が、好ましくは、評価のために、標的遺伝子の長さに沿って選択される。選択されたｓｉＲＮＡのより良い評価のために、陰性のコントロールが、好ましくは、組合せで使用される。陰性のコントロールｓｉＲＮＡは、好ましくは、ｓｉＲＮＡと同じヌクレオチド組成を含むが、ゲノムに対する有意な相同性を有していない。従って、ｓｉＲＮＡのスクランブルヌクレオチド配列が好ましくは使用されるが、何らかの他の遺伝子に対する有意な相同性を少しも示さないものとする。

【０１６５】

ｓＦｌｔ－１４の発現をダウンレギュレーションするために使用することができる他の核酸作用因には、そのコードポリヌクレオチドを特異的に切断することができるＤＮＡｚｙｍｅ分子が含まれるが、これに限定されない。ＤＮＡｚｙｍｅは、一本鎖の標的配列および二本鎖の標的配列の両方を切断することができる一本鎖ポリヌクレオチドである（Ｂｒｅａｋｅｒ，Ｒ．Ｐ．およびＪｏｙｃｅ，Ｇ．、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ、１９９５、２：６５５；Ｓａｎｔｏｒｏ，Ｓ．Ｗ．＆Ｊｏｙｃｅ，Ｇ．Ｆ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９９７、９４：４２６２）；そのコードポリヌクレオチドを特異的に切断することができるリボザイム分子。様々なリボザイムが、目的とするタンパク質をコードするｍＲＮＡの切断による遺伝子発現の配列特異的な阻害のためにますます使用されている［Ｗｅｌｃｈ他、Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、９：４８６～９６（１９９８）］。様々なリボザイムを、いずれかの特定の標的ＲＮＡを切断するために設計することができることにより、リボザイムは基礎研究および治療的適用の両方における有益なツールになっている；三重鎖形成オリゴヌクレオチド（ＴＦＯ）。この十年間において、研究により、二本鎖のらせんＤＮＡにおけるポリプリン／ポリピリミジン領域を配列特異的な様式で認識し、これに結合することができるＴＦＯを設計することができることが示されている。従って、本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列を標的とすることができ、それにより、本発明のポリペプチドをダウンレギュレーションすることができる。

【０１６６】

ｓＦｌｔ－１４のダウンレギュレーションはタンパク質レベルでもまた行うことができる。

【０１６７】

従って、本発明のポリペプチドをダウンレギュレーションすることができる作用因の別の一例が、ｓＦｌｔ－１４またはそのホモログと特異的に結合することができ、好ましくは、その活性部位に対して特異的に結合することができ、それにより、その機能を妨げることができる抗体または抗体フラグメントである。そのような抗体を作製する方法が本明細書中上記で記載される。

【０１６８】

用いられる作用因にかかわらず、ｓＦｌｔ－１４の活性および／または発現（ならびに間接的にはＶＥＧＦの活性または発現）に対する作用因の影響を、分子生物学、生化学または細胞生物学での周知の技術を使用して求めることができる。特異的なアッセイが研究者の特定の必要性および専門的知識に従って選択される。

【０１６９】

本明細書中上記で述べられたように、可溶性のＶＥＧＦ受容体がＶＥＧＦと結合し、ＶＥＧＦの活性に拮抗する。実際、本発明者らはさらに、ｓＦｌｔ－１４がＶＥＧＦに拮抗することを示している（実施例９および図１０Ｂ）。

【０１７０】

従って、本発明のいくつかの実施形態によれば、ＶＥＧＦの過度な活性および／または発現が存在するＶＥＧＦ関連の医学的状態を処置する方法が提供される（そのような過度な活性または発現は、多くの場合、過度な血管形成をもたらす）。この方法は、その必要

性のある対象に、ｓＦｌｔ－１４をアップレギュレーションすることができる作用因の治療効果的な量を投与し、それにより、対象におけるＶＥＧＦ関連の医学的状態を処置することを含む。

【０１７１】

ＶＥＧＦの過度な活性および／または発現に関連する医学的状態の例には、ガン、眼の障害（例えば、角膜の血管新生など）、多嚢胞性卵巣疾患および子宮内膜症が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７２】

そのようなものとして、本発明では、ＶＥＧＦ関連の状態（例えば、ガン）の処置のために利用することができる、ＶＥＧＦ活性に拮抗し、それにより、血管形成を低下させるための新規なｓＦｌｔ－１４の使用が想定される。

【０１７３】

本明細書中で使用される用語「血管形成」は、血管の生成または発達を示す。

【０１７４】

本明細書中で使用される用語「ガン」は、転移を含む何らかの腫瘍疾患を示す。ガンの例には、ガン腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病が含まれるが、これらに限定されない。ガン性疾患の具体的な例には、下記のものが含まれるが、それらに限定されない：骨髄性白血病、例えば、慢性骨髄性白血病、成熟化を伴う急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、増大した好塩基球を伴う急性非リンパ性白血病、急性単球性白血病、好酸球増加症を伴う急性骨髄単球性白血病など；悪性リンパ腫、例えば、バーキットリンパ腫、非ホジキンリンパ腫など；リンパ性白血病、例えば、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病など；骨髄増殖性疾患、例えば、固形腫瘍、良性髄膜腫、唾液腺混合腫瘍、結腸腺腫；腺ガン、例えば、小細胞肺ガン、腎臓、子宮、前立腺、膀胱、卵巣、結腸、肉腫、脂肪肉腫、粘液様、滑膜肉腫、横紋筋肉腫（胞巣型）、骨外性粘液様軟骨肉腫、ユーイング腫瘍など；その他、これには、精巣および卵巣の未分化胚細胞腫、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、子宮内膜ガン、悪性メラノーマ、中皮腫、乳房、皮膚、前立腺および卵巣が含まれる。

【０１７５】

本明細書中で使用される表現「血管新生角膜」は、角膜に血管が分布する異常な病理学的状態を示す。

【０１７６】

血管形成が役割を果たす他の医学的状態、疾患および疾患プロセスを、本発明の教示に従って処置することができる。これらには、糖尿病網膜症、血管新生緑内障、リウマチ様関節炎および血管腫が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７７】

ＶＥＧＦ関連の状態（例えば、ガンまたは角膜の血管新生）を処置するために使用することができる、本発明のポリペプチドをアップレギュレーションすることができる作用因は、本発明の単離されたポリペプチドそれ自体またはポリヌクレオチドを含む。

【０１７８】

従って、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書中下記で記載されるいずれかの好適な投与様式を用いて対象に投与することができる（すなわち、インビボ遺伝子治療）。代替として、核酸構築物が、必要に応じて適切な遺伝子送達ビヒクル／方法（トランスフェクション、形質導入、相同的組換えなど）および発現システムにより好適な細胞に導入され、その後、改変された細胞が培養で拡大され、個体に戻される（すなわち、エクスビボ遺伝子治療）。

【０１７９】

そのようなポリヌクレオチド配列は典型的には、組換えポリペプチドの発現を可能にするための発現ベクターに挿入される。本発明の発現ベクターは、このベクターを、真核生物における複製および組み込みのために好適にするさらなる配列、または、原核生物における複製および組み込みのために好適にするさらなる配列、または、好ましくは両者にお

ける複製および組み込みのために好適にするさらなる配列（例えば、シャトルベクター）を含む。典型的なクローニングベクターは、転写開始配列および翻訳開始配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）、ならびに、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含有する。

【０１８０】

本発明のポリヌクレオチドの細胞発現を可能にするために、本発明の核酸構築物はさらに、少なくとも１つのシス作用する調節エレメントを含む。本明細書中で使用される表現「シス作用する調節エレメント」は、トランス作用する調節因子と結合し、その下流側に位置するコード配列の転写を調節するポリヌクレオチド配列（好ましくは、プロモーター）を示す。

【０１８１】

任意の好適なプロモーター配列を本発明の核酸構築物によって使用することができる。

【０１８２】

好ましくは、本発明の核酸構築物によって利用されるプロモーターは、形質転換された特定の細胞集団において活性である。細胞タイプ特異的および／または組織特異的なプロモーターの例には、肝臓特異的であるアルブミンなどのプロモーター［Ｐｉｎｋｅｒｔ他（１９８７）、Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．、１：２６８～２７７］、リンパ系特異的プロモーター［Ｃａｌａｍｅ他（１９８８）、Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、４３：２３５～２７５］、具体的には、Ｔ細胞受容体のプロモーター［Ｗｉｎｏｔｏ他（１９８９）、ＥＭＢＯ　Ｊ．、８：７２９～７３３］および免疫グロブリンのプロモーター［Ｂａｎｅｒｊｉ他（１９８３）、Ｃｅｌｌ、３３７２９～７４０］；ニューロン特異的プロモーター、例えば、ニューロフィラメントプロモーター［Ｂｙｒｎｅ他（１９８９）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６：５４７３～５４７７］、膵臓特異的プロモーター［Ｅｄｌｕｎｃｈ他（１９８５）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３０：９１２～９１６］または乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター（米国特許第４８７３３１６号および欧州特許出願公開第２６４１６６号）など）が含まれる。本発明の核酸構築物はさらに、プロモーター配列に隣接して存在することができるか、または、プロモーター配列から遠位に存在することができ、かつ、プロモーター配列からの転写をアップレギュレーションすることにおいて機能し得るエンハンサーを含むことができる。

【０１８３】

本発明の核酸構築物はさらに、適切な選択マーカーおよび／または複製起点を含むことができる。例えば、利用される核酸構築物はシャトルベクターである場合があり、この場合、シャトルベクターは、大腸菌（この場合、構築物は適切な選択マーカーおよび複製起点を含む）において増殖することができ、かつ、細胞における増殖のための適合性、または、選ばれた遺伝子および組織における組込みのための適合性を有し得る。本発明による構築物は、例えば、プラスミド、バクミド、ファージミド、コスミド、ファージ、ウイルスまたは人工染色体が可能である。

【０１８４】

既に記載されたエレメントに加えて、本発明の発現ベクターは典型的には、クローン化された核酸の発現レベルを増大させるために意図されるか、または、組換えＤＮＡを保有する細胞の特定を容易にするために意図される他の特殊化されたエレメントを含有することができる。例えば、数多くの動物ウイルスが、許容の細胞タイプにおけるウイルスゲノムの染色体外での複製を促進させるＤＮＡ配列を含有する。これらのウイルスレプリコンを有するプラスミドは、適切な因子が、プラスミドにおいて運ばれる遺伝子、または、宿主細胞のゲノムとともに運ばれる遺伝子のいずれかによって提供される限り、エピソームとして複製される。

【０１８５】

ベクターは真核生物のレプリコンを含む場合があり、または含まない場合がある。真核生物のレプリコンが存在するならば、ベクターは、適切な選択マーカーを使用して真核生物細胞において増幅可能である。ベクターが真核生物のレプリコンを含まないならば、エ

ピソームとしての増幅ができない。その代わり、組換えＤＮＡは、操作された細胞のゲノムに融合し、操作された細胞において、プロモーターが、所望される核酸の発現を行わせる。

【０１８６】

哺乳動物発現ベクターの例には、ｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＧＬ３、ｐＺｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＳｅｃＴａｇ２、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＳｉｎＲｅｐ５、ＤＨ２６Ｓ、ＤＨＢＢ、ｐＮＭＴ１、ｐＮＭＴ４１、ｐＮＭＴ８１（これらはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手可能である）、ｐＣＩ（これはＰｒｏｍｅｇａから入手可能である）、ｐＭｂａｃ、ｐＰｂａｃ、ｐＢＫ－ＲＳＶおよびｐＢＫ－ＣＭＶ（これらはＳｔｒａｔｅｇｅｎｅから入手可能である）、ｐＴＲＥＳ（これはＣｌｏｎｔｅｃｈから入手可能である）、ならびに、それらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【０１８７】

真核生物ウイルス（例えば、レトロウイルスなど）に由来する調節エレメントを含有する発現ベクターもまた使用することができる。ＳＶ４０のベクターには、ｐＳＶＴ７およびｐＭＴ２が含まれる。ウシ乳頭腫ウイルスに由来するベクターには、ｐＢＶ－１ＭＴＨＡが含まれ、エプスタイン・バールウイルスに由来するベクターには、ｐＨＥＢＯおよびｐ２Ｏ５が含まれる。他の例示的ベクターには、タンパク質の発現を、真核生物細胞における発現のために効果的であることが示されるＳＶ－４０初期プロモーター、ＳＶ－４０後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーターまたは他のプロモーターの指揮下で可能にするｐＭＳＧ、ｐＡＶ００９／Ａ＋、ｐＭＴＯ１０／Ａ＋、ｐＭＡＮｎｅｏ－５、バキュロウイルスｐＤＳＶＥおよび任意の他のベクターが含まれる。

【０１８８】

組換えウイルスベクターはまた、本発明のポリヌクレオチドを合成するために使用することができる。ウイルスは、多くの場合には宿主の防御機構を回避するように進化してきた非常に特殊化された感染性因子である。典型的には、ウイルスは特定の細胞タイプに感染し、特定の細胞タイプにおいて増殖する。ウイルスベクターの標的化特異性では、その天然の特異性が、所定の細胞タイプを特異的に標的化し、それにより、組換え遺伝子を感染細胞に導入するために利用される。骨髄細胞を、ヒトＴ細胞白血病ウイルスＩ型（ＨＴＬＶ－Ｉ）を使用して標的化することができる。

【０１８９】

現在好ましいインビボ核酸移入技術には、ウイルス構築物または非ウイルス構築物（例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスＩウイルスまたはアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）など）によるトランスフェクション、および、脂質に基づくシステムが含まれる。遺伝子の脂質媒介による移入のための有用な脂質は、例えば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥおよびＤＣ－Ｃｈｏｌなどである［Ｔｏｎｋｉｎｓｏｎ他、Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ、１４（１）：５４～６５（１９９６）］。遺伝子治療において使用される最も好ましい構築物はウイルスであり、最も好ましくは、アデノウイルス、ＡＡＶ、レンチウイルスまたはレトロウイルスである。ウイルス構築物（例えば、レトロウイルス構築物など）は、少なくとも１つの転写プロモーター／エンハンサー、または、遺伝子座を規定する要素、あるいは、遺伝子発現を他の手段（例えば、メッセンジャーの選択的スプライシング、核ＲＮＡ輸出または翻訳後修飾など）によって制御する他の要素を含む。そのようなベクター構築物はまた、ウイルス構築物に既に存在しない限り、パッケージングシグナル、長末端反復（ＬＴＲ）またはその一部、ならびに、使用されたウイルスに対して適切なプラス鎖およびマイナス鎖のプライマー結合部位を含む。加えて、そのような構築物は、典型的には、構築物が置かれている宿主細胞からペプチドを分泌させるためのシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物のシグナル配列、または、本発明のポリペプチド変化体のシグナル配列である。場合により、構築物はまた、ポリアデニル化を導くシグナル、ならびに、１つ以上の制限部位、および、

翻訳終結配列を含むことができる。例として、そのような構築物は典型的には、５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、第２鎖ＤＮＡ合成の起点、および、３’ＬＴＲまたはその一部分を含む。非ウイルスである他のベクターを使用することができる（例えば、カチオン性脂質、ポリリシンおよびデンドリマーなど）。

【０１９０】

様々な方法を、本発明の発現ベクターを細胞に導入するために使用することができる。そのような方法が、Ｓａｍｂｒｏｏｋ他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９、１９９２）；Ａｕｓｕｂｅｌ他、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ、Ｍｄ.（１９８９）；Ｃｈａｎｇ他、Ｓｏｍａｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、Ｍｉｃｈ.（１９９５）；Ｖｅｇａ他、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、Ｍｉｃｈ.（１９９５）；Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｕｓｅｓ、Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ、Ｂｏｓｔｏｎ Ｍａｓｓ.（１９８８）；および、Ｇｉｌｂｏａ他［Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、４（６）：５０４～５１２、１９８６］において一般的に記載され、そのような方法には、例えば、組換えウイルスベクターによる安定的トランスフェクションまたは一過性トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび感染が含まれる。加えて、陽性／陰性の選択方法については米国特許第５４６４７６４号および同第５４８７９９２号を参照のこと。

【０１９１】

ウイルス感染による核酸の導入は、より大きなトランスフェクション効率をウイルスの感染性のために得ることができるので、他の方法（例えば、リポフェクションおよびエレクトロポレーションなど）を上回る利点をいくつか提供する。

【０１９２】

ｓＦｌｔ－１４ポリペプチドの発現および／または機能をアップレギュレーションすることにより、典型的には、低下したＶＥＧＦ活性がもたらされることが理解される。

【０１９３】

上記で記載された本発明の薬剤は、それ自体で、または、それが医薬的に許容され得るキャリアと混合される医薬組成物の一部として個体に与えることができる。

【０１９４】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される有効成分の１つまたは複数と、他の化学的成分（例えば、生理学的に好適なキャリアおよび賦形剤など）との調製物を示す。医薬組成物の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。

【０１９５】

本明細書中において、用語「有効成分（活性成分）」は、生物学的効果を担う単離されたポリペプチド、単離されたポリヌクレオチド、または抗体調製物を示す。

【０１９６】

以降、交換可能に使用されうる表現「生理学的に許容され得るキャリア」および表現「医薬的に許容され得るキャリア」は、生物に対する著しい刺激を生じさせず、投与された化合物の生物学的な活性および性質を阻害しないキャリアまたは希釈剤を示す。アジュバントはこれらの表現に含まれる。医薬的に許容され得るキャリア中に含まれる成分の１つは、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、有機媒体および水性媒体の両方における広範囲の溶解度特性を有している生体適合性ポリマーであることができる（Ｍｕｔｔｅｒ他（１９７９））。

【０１９７】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例には、炭酸カルシウム

、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが含まれる。

【０１９８】

薬物の配合および投与のための様々な技術が「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ.、Ｅａｓｔｏｎ、ＰＡ、最新版）に見出され得る（これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

【０１９９】

好適な投与経路には、例えば、経口送達、直腸送達、経粘膜送達、特に経鼻送達、腸管送達または非経口送達（これには、筋肉内注射、皮下注射および髄内注射、ならびに、クモ膜下注射、直接的な脳室内注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射または眼内注射が含まれる）が含まれ得る。

【０２００】

あるいは、例えば、患者の身体の特定領域に直接的に調製物の注射をすることによって、全身的な方法よりも局所的に調製物を投与しうる。

【０２０１】

本発明の医薬組成物は、この分野で十分に知られている様々なプロセスによって、例えば、混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥の従来のプロセスによって製造することができる。

【０２０２】

本発明に従って使用される医薬組成物は、医薬品として使用され得る調製物への有効成分の加工を容易にする賦形剤および補助剤を含む１つまたは複数の生理学的に許容され得るキャリアを使用して従来の様式で配合することできる。適正な配合は、選ばれた投与経路に依存する。

【０２０３】

注射の場合、本発明の有効成分は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合し得る緩衝液（例えば、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理学的な生理的食塩緩衝液など）において配合することができる。経粘膜投与の場合、浸透されるバリヤーに対して適切な浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤はこの分野では一般に知られている。

【０２０４】

経口投与の場合、化合物は、活性化合物をこの分野で広く知られている医薬的に許容され得るキャリアと組み合わせることによって容易に配合され得る。そのようなキャリアは、本発明の化合物が、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤および懸濁物などとして配合されることを可能にする。経口使用される薬理学的調製物は、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉砕し、錠剤または糖衣錠コアを得るために、所望する場合には好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して、作製することができる。好適な賦形剤には、特に、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を含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、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、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；および／またはポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）などの生理学的に許容され得るポリマーがある。所望する場合には、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウムなど）などの崩壊剤を加えることができる。

【０２０５】

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有し得る。色素または顔料を、活性化

合物の量を明らかにするために、または活性化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに加えることができる。

【０２０６】

経口使用され得る医薬組成物には、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびに、ゼラチンおよび可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトールなど）から作製された軟いシールされたカプセルが含まれる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（例えば、ラクトースなど）、結合剤（例えば、デンプンなど）、滑剤（例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど）および場合により安定化剤との混合で有効成分を含有することができる。軟カプセルでは、有効成分を好適な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィンまたは液状のポリエチレングリコールなど）に溶解または懸濁させることができる。また、安定化剤を加えることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路について好適な投薬形態でなければならない。

【０２０７】

口内投与の場合、組成物は、従来の様式で配合された錠剤またはトローチの形態を取ることができる。

【０２０８】

鼻吸入による投与の場合、本発明による使用のための有効成分は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素）の使用により加圧パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投薬量単位が、計量された量を送達するためのバルブを備えることによって決定され得る。ディスペンサーにおいて使用される、例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジで、化合物および好適な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプンなど）の粉末混合物を含有するカプセルおよびカートリッジを配合することができる。

【０２０９】

本明細書中に記載される調製物は、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口投与のために配合することができる。注射用配合物は、場合により保存剤が添加された、例えば、アンプルまたは多回用量容器における単位投薬形態で提供され得る。組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルにおける懸濁物または溶液剤またはエマルションにすることができ、また、懸濁化剤、安定化剤および／または分散化剤などの配合剤を含有することができる。

【０２１０】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態での活性調製物の水溶液が含まれる。また、有効成分の懸濁物を適切な油性または水性の注射用懸濁物として調製することができる。好適な親油性の溶媒またはビヒクルには、脂肪油（例えば、ゴマ油など）、または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）、トリグリセリドまたはリポソームが含まれる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウム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などを含有することができる。場合により、懸濁物はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために有効成分の溶解性を増大させる好適な安定化剤または薬剤を含有することができる。

【０２１１】

あるいは、有効成分は、好適なビヒクル（例えば、無菌の、パイロジェン非含有水溶液）を使用前に用いて構成される粉末形態にすることができる。

【０２１２】

本発明の調製物はまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来の座薬基剤を使用して、座薬または停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合することができる。

【０２１３】

本発明に関連した使用のために好適な医薬組成物には、有効成分が、その意図された目的を達成するために効果的な量で含有される組成物が含まれる。より具体的には、治療効果的な量は、治療されている対象の病状を予防、緩和あるいは改善するために効果的であ

るか、または、治療されている対象の生存を延ばすために効果的である、有効成分の量を意味する。

【０２１４】

治療効果的な量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

【０２１５】

本発明の方法において使用される任意の調製物について、治療効果的な量または用量は、最初はインビトロでアッセイおよび細胞培養アッセイから推定することができる。例えば、用量は動物モデルにおいて配合することが可能であり、そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。

【０２１６】

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物における、インビトロで標準的な薬学的手法によって、明らかにすることができる。これらのインビトロでの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用に対する投薬量範囲を決定するために使用することができる。投薬量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して変化し得る。正確な配合、投与経路および投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選ぶことができる（Ｆｉｎｇｌ他、（１９７５）「Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」，Ｃｈ．１ｐ．１参照）。

【０２１７】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬は、単回または複数回投与で行うことができ、この場合、処置期間は、数日から数週間まで、または治療が達成されるまで、または疾患状態の軽減が達成されるまで続く。

【０２１８】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている患者、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存する。

【０２１９】

適合し得る医薬用キャリアに配合された本発明の調製物を含む医薬組成物はまた、適切な容器に入れられ、指示される状態の処置のために標識されて調製されることができる。

【０２２０】

本発明の組成物は、所望されるならば、有効成分を含有する１つまたは複数の単位投薬形態物を含有し得るパックまたはディスペンサーデバイス（例えば、ＦＤＡ承認キットなど）で提供され得る。パックは、例えば、金属ホイルまたはプラスチックホイルを含むことができる（例えば、ブリスターパックなど）。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が付随し得る。パックまたはディスペンサーデバイスはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府当局によって定められた形式で、容器に関連した通知によって適応させることがあり、この場合、そのような通知は、組成物の形態、あるいはヒトまたは動物への投与の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物について米国食品医薬品局によって承認されたラベル書きであり得るか、または、承認された製品添付文書であり得る。

【０２２１】

本出願から成熟する特許の存続期間の期間中には、ｓＦｌｔ－１４をコードする多くの関連するポリペプチドおよびポリヌクレオチドが開発されることが予想され、従って、ｓＦｌｔ－１４をコードするポリペプチドおよびポリヌクレオチドの用語の範囲は、すべてのそのような新しい技術を生得的に包含することが意図される。

【０２２２】

本明細書中で使用される用語「約」は、±１０％を示す。

【０２２３】

用語「含む／備える（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ、ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ、ｉｎｃｌｕｄｅｓ、ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、およびそれらの同根語は、「含むが、それらに限定されない（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ

ｔｏ）」ことを意味する。この用語は、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」および「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」を包含する。

【０２２４】

表現「から本質的になる」は、さらなる成分および／または工程が、特許請求される組成物または方法の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にだけ、組成物または方法がさらなる成分および／または工程を含み得ることを意味する。

【０２２５】

本明細書中で使用される場合、単数形態（「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」）は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照物を包含する。例えば、用語「化合物（ａ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ）」または用語「少なくとも１つの化合物」は、その混合物を含めて、複数の化合物を包含し得る。

【０２２６】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、１～６などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲（例えば、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６など）、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値（例えば、１、２、３、４、５および６）を有すると見なさなければならない。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

【０２２７】

数値範囲が本明細書中で示される場合には常に、示された範囲に含まれる任意の言及された数字（分数または整数）を含むことが意味される。第１の示された数字および第２の示された数字「の範囲である／の間の範囲」という表現、および、第１の示された数字「から」第２の示された数「まで及ぶ／までの範囲」という表現は、交換可能に使用され、第１の示された数字と、第２の示された数字と、その間のすべての分数および整数とを含むことが意味される。

【０２２８】

本明細書中で使用される用語「方法（ｍｅｔｈｏｄ）」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術および手順、または、知られている様式、手段、技術および手順から、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術および手順が含まれるが、それらに限定されない。

【０２２９】

用語「処置する（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」は、状態の進行を排除すること、実質的に阻害、遅延、または後退させること、状態の臨床的または審美的な症状を実質的に改善すること、または状態の臨床的または審美的な症状の出現を実質的に予防することを含む。

【０２３０】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴は単一の実施形態に組み合わせて提供することもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施形態の文脈で説明されている本発明の各種の特徴は、別個にまたは適切なサブコンビネーションで、または本発明の他の実施形態において好適に提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であると見なされるべきではない。

【０２３１】

本明細書の上記に詳述され、かつ添付の特許請求の範囲において特許請求される本発明の種々の実施形態および側面は、以下の実施例に実験的裏付けを見出す。

【実施例】
【０２３２】
上記説明とともに、以下の実施例を参照する。これらの実施例は、本発明のいくつかの実施形態を非限定的な様式で例示する。
【０２３３】
本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学および組み換えＤＮＡの技法が広く含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」Ｓａｍｂｒｏｏｋら、（１９８９）；「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」Ｉ～ＩＩＩ巻（１９９４）Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｒ．Ｍ．編；Ａｕｓｕｂｅｌら、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、米国メリーランド州バルチモア（１９８９）；Ｐｅｒｂａｌ「Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、米国ニューヨーク（１９８８）；Ｗａｔｓｏｎら、「Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ」Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｂｏｏｋｓ、米国ニューヨーク；Ｂｉｒｒｅｎら編「Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｓｅｒｉｅｓ」１～４巻、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、米国ニューヨーク（１９９８）；米国特許の第４６６６８２８号、同第４６８３２０２号、同第４８０１５３１号、同第５１９２６５９号および同第５２７２０５７号に記載される方法；「Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ」Ｉ～ＩＩＩ巻、Ｃｅｌｌｉｓ，Ｊ．Ｅ．編（１９９４）；「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」Ｉ～ＩＩＩ巻、Ｃｏｌｉｇａｎ，Ｊ．Ｅ．編（１９９４）；Ｓｔｉｔｅｓら編「Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」（第８版）、Ａｐｐｌｅｔｏｎ ＆ Ｌａｎｇｅ、米国コネティカット州ノーウォーク（１９９４）；ＭｉｓｈｅｌｌとＳｈｉｉｇｉ編「Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」、Ｗ．Ｈ． Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．、米国ニューヨーク（１９８０）；利用可能な免疫アッセイ法は、特許と科学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば：米国特許の第３７９１９３２号、同第３８３９１５３号、同第３８５０７５２号、同第３８５０５７８号、同第３８５３９８７号、同第３８６７５１７号、同第３８７９２６２号、同第３９０１６５４号、同第３９３５０７４号、同第３９８４５３３号、同第３９９６３４５号、同第４０３４０７４号、同第４０９８８７６号、同第４８７９２１９号、同第５０１１７７１号および同第５２８１５２１号；「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」Ｇａｉｔ，Ｍ．Ｊ．編（１９８４）；「Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ」Ｈａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．およびＨｉｇｇｉｎｓ Ｓ．Ｊ．編（１９８５）；「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ」Ｈａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．およびＨｉｇｇｉｎｓ Ｓ．Ｊ．編（１９８４）；「Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ」Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｒ．Ｉ．編（１９８６）；「Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ」ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９８６）；「Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ」Ｐｅｒｂａｌ，Ｂ．（１９８４）および「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ」１～３１７巻、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；「ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、米国カリフォルニア州サンディエゴ（１９９０）；Ｍａｒｓｈａｋら、「Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ」ＣＳＨＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；これらの文献の全ては、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その他の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術

界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【０２３４】

（実施例１）

新規なｓＦｌｔ－１４の配列

材料および実験手順

ＲＮＡ

胎盤組織をＰｏｌｙｔｒｏｎホモジナイザーによりホモジネートし、その後、ＴＲＩ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｓｉｇｍａ）での総ＲＮＡ抽出を製造者のプロトコルに従って行った。細胞を集め、ＲＮＡをＴＲＩ Ｒｅａｇｅｎｔ中で抽出した。

【０２３５】

ＲＡＣＥ

ｃＤＮＡ末端の迅速な増幅を、ＢＤ ＳＭＡＲＴ（商標）ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ増幅キットを使用して行った。子癇前症の胎盤ＲＮＡに基づく３’ＲＡＣＥを、５’プライマーとして使用されるＦＬＴ１の第１４エキソンの開始部から選ばれたプライマー：ＣＣＴＣＣＴＧＣＧＡＡＡＣＣＴＣＡＧＴＧ（配列番号１２）、および、ＲＡＣＥキットと一緒に供給される３’プライマー：ＡＡＧＣＡＧＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＧＣＡＧＡＧＴＡＣ（Ｔ）$_{30}$ＶＮ（配列番号１１）とともに使用した。

【０２３６】

結果

図１～図３に例示されるように、本発明の新規なｓＦｌｔ１は、全長の膜貫通型受容体Ｆｌｔ１、および、既知のｓＦｌｔ１とは、下記の３つの側面で異なる：

１）ｓＦｌｔ－１４は、（明るい着色によって特徴づけられる）図１から明らかなように、（第１３イントロンに由来する）ｓＦｌｔ－１に特有な３１個のアミノ酸を含まない。

２）ｓＦｌｔ－１４は、ｓＦｌｔ－１に存在しないＲＮＡ配列、同様にまた、アミノ酸領域を含有する。アミノ酸配列は、第１４エキソンに由来するアミノ酸（これらはまた、全長の膜貫通型受容体にも存在する；図１を参照のこと）、同様にまた、第１４イントロンに由来する特有なアミノ酸配列（これは明るい着色によって特徴づけられる；図１を参照のこと）を含む。図３Ａに示されるように、この特有な配列は、第１４イントロンに由来する２８個のアミノ酸の領域を含む。

３）図２Ａに示されるように、ｓＦｌｔ－１４はまた、その３’－ＵＴＲ内に含有されるＡｌｕエレメントを含む特有な調節配列、すなわち、全体が第１４イントロンに由来する３’－ＵＴＲを含有する。

【０２３７】

さらに、図２Ａに例示されるように、新規なｓＦｌｔ－１４に特有であるｃＤＮＡ配列は、全長の膜貫通型Ｆｌｔ１または可溶性のｓＦｌｔ－１のいずれかに由来するｃＤＮＡに存在しない配列を含む。データベースによる検索では、この特有な転写物のフラグメントのみが特定されたデータベースに寄託されているＥＳＴ配列がいくつか明らかにされた（図２Ｂ）。しかしながら、Ｆｌｔのこの選択的スプライシングされた配列変化（すなわち、本発明のｓＦｌｔ－１４）は、発表された文献にはこれまで言及されておらず、ましてや、何らかの組織または病理との関連も言及されていなかった。

【０２３８】

（実施例２）

ｓＦｌｔ－１４特異的抗体の作製

材料および実験手順

ｓＦｌｔ－１４特異的ポリクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体を、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈのプロトコルに記載されるように作製した。簡単に記載すると、抗ｓＦｌｔ－１４血清を作製するために、ｓＦｌｔ－１４に由来する２つのペプチドを合成し（ＣＨＦＫ（配列番号６）およびＣＥＳＳ（配列番号５））、ウサギに注射した。それぞれのペプチドについての３回の注射を行った。このと

き、１ヶ月の期間を注射と注射との間で保った。この手順が終了したとき、ウサギの血清をｓＦｌｔ－１４の反応性について評価した。

【０２３９】

結果

２つの短いペプチドを、本発明の新規なｓＦｌｔ－１４を以前に記載されたｓＦｌｔ－１から区別するアミノ酸配列から作製した。図３Ｂに例示されるように、第１４エキソンに由来した、ＣＨＦＫ（配列番号６）と呼ばれる第１のペプチドは、ｓＦｌｔ－１には含まれないが、全長の膜貫通型受容体には存在する。ＣＥＳＳ（配列番号５）と呼ばれる第２のペプチドは、新規なｓＦｌｔ－１４に対してのみ特有な配列に由来した（膜貫通型Ｆｌｔ－１またはｓＦｌｔ－１のいずれにも含まれない）。これら２つのペプチドを、本明細書中上記の実験の説明に記載されるようにポリクローナル抗体を誘発させるために使用した。

【０２４０】

作製されたポリクローナル抗体は、新規なｓＦＬｔ－１４と、以前に記載されたｓＦｌｔ－１とを区別することができる。

【０２４１】

（実施例３）

種々の細胞における膜貫通型Ｆｌｔ－１、ｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４の相対的存在量

材料および実験手順

細胞

細胞を得て、Ｇｌｕｚｍａｎ他［Ｇｌｕｔｚｍａｎ他、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ、（２００７）、３５９：２６３～８］において以前に記載されたように培養した。

【０２４２】

ＲＮＡ

正常な胎盤組織および子癇前症の胎盤組織をＰｏｌｙｔｒｏｎホモジナイザーによりホモジネートし、その後、ＴＲＩ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｓｉｇｍａ）での総ＲＮＡ抽出を製造者のプロトコルに従って行った。細胞を集め、ＲＮＡをＴＲＩ Ｒｅａｇｅｎｔ中で抽出した。

【０２４３】

ノーザンブロッティング

総ＲＮＡ（５μｇ～２０μｇ）をホルムアルデヒド－アガロース（１％）変性ゲルによって分離し、正荷電のナイロンメンブランに毛細管溶出によってブロッティングした。ＲＮＡをＵＶ架橋し（１２００ｊ／ｍ２）、メンブランを０．１％メチレンブルーにより染色して、等しい負荷および転写を保証した。ブロットをｒｅｄｉｐｒｉｍｅキット（Ａｍｅｒｓｈａｍ）によって^{32}Ｐ標識のプローブと一晩ハイブリダイゼーションした。ブロットを６０℃での３０分間の（２ｘＳＳＣ、１％ＳＤＳによる）２回の洗浄に供し、その後、ブロットをＭＳ高感度フィルム（Ｋｏｄａｋ）に感光させた。ＦＬＴ１転写物の異なる領域に由来する３つの異なるプローブを、様々なＦＬＴ１イソ型の検出を可能にするために使用した：１）イソ型のすべてを検出するための細胞外コード領域；２）ｓＦＬＴ－１４を検出するための第１４イントロン領域；および３）ｓＦＬＴ１を検出するための第１３イントロン領域。

【０２４４】

結果

図４に例示されるように、ＨＵＶＥＣ、正常な胎盤および子癇前症の胎盤から得られたＲＮＡがＲＮＡブロットにおいて分離され、これらを、（バンド位置によって区別された）Ｆｌｔ－１、ｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４に共通するプローブとハイブリダイゼーションさせた。

【０２４５】

結果から明白であるように、ＶＥＧＦ受容体を発現する「従来の」細胞として知られている内皮細胞では、優勢な可溶性Ｆｌｔがｓ Ｆｌｔ－１である（これはまた、本明細書中ではｓＦｌｔ－１３と呼ばれる）。際立って対照的に、胎盤では、優勢な可溶性受容体が本発明の新規なｓＦｌｔ－１４である。それぞれのスプライス変化体の正体をさらに、ｓＦｌｔ１およびｓＦｌｔ－１４について特異的なプローブによる再プロービングによって確認した（データは示されず）。

【０２４６】

同様に、内皮細胞と、血管平滑筋細胞との間での比較では、内皮細胞はｓＦｌｔ－１を優勢に発現するのに対して、血管平滑筋細胞は新規なｓＦｌｔ－１４を優勢に発現することが示される（図４Ｂ）。ｓＦｌｔ－１４はまた、栄養膜および樹状細胞に存在する、唯一のＦｌｔイソ型とまではいかないが、優勢なＦｌｔイソ型として明らかにされている（データは示されず）。まとめると、これらの結果は、ｓＦｌｔ－１４は内皮細胞特異的でないと見なすことができ、これに対して、ｓＦｌｔ１は、内皮細胞に存在する変化体であると見なすことができることを示している。

【０２４７】

全長型受容体、または、代わりとして、可溶性受容体（どちらかの変化体）を生じさせる選択的スプライシングは互いに相容れないので、下記のことが生じることに留意することは重要である：ｓＦｌｔ１が（例えば、内皮細胞によって）生じる場合、可溶性Ｆｌｔ１受容体に対する膜貫通Ｆｌｔ１受容体の比率は高い。対照的に、ｓＦｌｔ－１４を生じさせる選択的スプライシング様式では、ｓＦｌｔ１４が膜貫通Ｆｌｔ１受容体を上回って優勢であることが許される。このことは、プロＶＥＧＦシグナル伝達から抗ＶＥＧＦシグナル伝達への正味の移行を生じさせ、発現細胞をＶＥＧＦに対して非応答性にする。

【０２４８】

（実施例４）

子癇前症の胎盤におけるｓＦｌｔ－１４のインシトゥーでのタンパク質検出およびｍＲＮＡ検出

材料および実験手順

インシトゥーハイブリダイゼーション

胎盤のパラフィン包埋切片を、Ｍｏｔｒｏ他［Ｍｏｔｒｏ他、ＰＮＡＳ、１９９０、８７（８）、３０９２～６］によって以前に記載されたように、ｓＦｌｔ－１４の第１４イントロン領域から選ばれたＳ３５リボプローブ（配列番号１３）とハイブリダイゼーションさせた。

【０２４９】

免疫組織化学

１：１００の希釈度でのｓＦｌｔ－１４特異的なウサギポリクローナル抗体をパラフィン包埋の胎盤切片に対して使用した。抗原回復を、２５ｍＭクエン酸塩緩衝液（ｐＨ＝６．０）を使用して行った。抗体は、ｓＦＬＴ－１４タンパク質のＣ末端に由来するペプチドに対して、すなわち、ＣＥＬＹＴＳＴＳＰＳＳＳＳＳＳ（ＣＥＳＳ抗体、配列番号５）に対して向けられた。

【０２５０】

結果

図５Ａ～図５Ｂは、胎盤切片におけるｓＦｌｔ－１４タンパク質の免疫組織化学的検出において例示されるように、ｓＦｌｔ－１４の特有な区域（第１４イントロンのアミノ酸）に対して特異的に向けられたＣＥＳＳ抗体の大きな価値を明らかにする。同様に、図５Ｃ～図５Ｄは、（この特有な第１４イントロン配列に対して相補的である）特有なｍＲＮＡプローブは、特異的なプローブによる胎盤切片のインシトゥーハイブリダイゼーションによって例示されるように、ｓＦｌｔ－１４のｍＲＮＡを特異的に検出するために重要であることを明らかにする。ＣＥＳＳ抗体または上記プローブは全長型受容体Ｆｌｔおよび可溶性受容体Ｆｌｔ－１と交差反応せず、その結果、これらの試薬は新規なｓＦｌｔ－１４について真に限定的であることを強調しなければならない。

【０２５１】
図５Ａ～図５Ｄはまた、これらの結果により、疾患に冒された胎盤におけるどの細胞が可溶性受容体を産生するかが初めて特定されるので、（既知のｓＦｌｔ１を使用して特定されなかった細胞が初めて特定されるので）、病原性プロセスに対する機構的な手がかりをいくつか提供する。これらの知見では、合胞体性結節内の栄養膜細胞が可溶性ｓＦｌｔ－１４を産生することが例示される。これらの結果は、合胞体性結節が、正常な妊娠と比較して、子癇前症でははるかにより多く存在するという事実と一致しており、変性性胎盤の顕著な特徴である。
【０２５２】
（実施例５）
正常な満期胎盤におけるｓＦｌｔ－１４の発現
材料および実験手順
ウエスタンブロッティング
３つの正常な満期胎盤をホモジネートし、２つの群に分けた：群１）は免疫前クリーニング処理に供され、群２）はクリーニング処理に供されなかった。クリーニング処理（これは、サンプルを、検出工程においてＣＥＳＳ血清の無関係な抗体と相互作用するかもしれないタンパク質を除いて清浄化するために使用される）は、２０μｌのウサギ免疫前血清との３時間のインキュベーション、その後、プロテインＡビーズ（Ｐ３３９１、Ｓｉｇｍａ）の添加、一晩のインキュベーションおよび沈殿化を含んでいた。非クリーニング化処理は、ウサギ免疫前血清の添加を除いて同じであった。
【０２５３】
それぞれのサンプル（クリーニングまたは非クリーニング）を２つの異なる免疫沈殿に分けた：ＣＥＳＳ抗体による一方、および、ＦＬＴ１１抗体（Ｖ４２６２、Ｓｉｇｍａ）によるもう一方。沈殿物を６％アクリルアミドゲルに負荷し、電気泳動し、メンブランに転写し、ＣＥＳＳ抗体により検出した。
【０２５４】
結果
図６に明瞭に例示されるように、ｓＦＬＴ１４タンパク質のサイズはおよそ１１０Ｋｄである。ｓＦＬＴ１４タンパク質が、Ｆｌｔ－１の細胞外ドメインを標的とするＦＬＴ１１抗体によって沈殿させられ、新規なｓＦｌｔ－１４のＣ末端を特異的に標的とするＣＥＳＳ抗体によって可視化され、このことから、可溶性Ｆｌｔ１の新規な変化体の存在が確認される。これらの結果はまた、特有なＣＥＳＳエピトープが、Ｆｌｔ１の細胞外結合ドメインを含むスプライス変化体の不可欠な一部であることを証明した。
【０２５５】
（実施例６）
ｓＦＬＴ１４の質量分析法による特定
材料および実験手順
質量分析法
子癇前症の胎盤をタンパク質溶解緩衝液においてホモジネートし、（サンプルを、ＣＥＳＳ血清の無関係な抗体と相互作用するかもしれないタンパク質を除いて清浄化するために）２０μｌのウサギ免疫前血清と３時間インキュベーションした。プロテインＡビーズ（Ｐ３３９１、Ｓｉｇｍａ）を一晩のインキュベーションのために加え、沈殿させた。１５μｌのＣＥＳＳ抗体をクリーニング後のホモジネートに加え、３時間インキュベーションし、その後、プロテインＡビーズを加え、さらに一晩インキュベーションした。ビーズを沈殿させ、洗浄し、サンプル緩衝液とともに煮沸した。サンプルを６％アクリルアミドゲルに負荷し、電気泳動した。ゲルをクーマシーブルーにより染色し、バンドが現れるまで脱染色した。１１０Ｋｄのバンドを質量分析法による分析のために切り出した。バンドをトリプシンによって消化し、ＤＥＣＡ／ＬＣＱでのＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって分析し、ヒト、マウス、ラットのｎｒデータベースに対してＰｅｐ－ＭｉｎｅｒおよびＳｅｑｕｅｓｔソフトウエアによって特定した。

【０２５６】
結果
図７に示されるように、Ｆｌｔ１の明確な特定が、Ｆｌｔ１の細胞外ドメインから選ばれた３つのペプチドによって達成された。これらの結果は、Ｆｌｔ１の細胞外ドメインおよび新規なｓＦｌｔ－１４のＣ末端が同じ連続性であることを証明した。ＤＱＥＡＰＹＬＬＲペプチドの８個のアミノ酸（ＱＥＡＰＹＬＬＲペプチド、配列番号１９）が第１４エキソンによってコードされ、このことは新規なＣ末端における第１４エキソンの包含をさらに強化している。
【０２５７】
（実施例７）
子癇前症の被験者の血清におけるｓＦｌｔ－１４イソ型の存在
材料および実験手順
血清タンパク質の分析
ＰＥ被験者からの２０ｍｌの血清サンプルをＦＬＴ１１被覆ビーズでの捕獲および溶出によって濃縮した。アフィニティー精製されたタンパク質をウエスタンブロッティングによって分析した。それに従って、タンパク質を６％アクリルアミドゲルで分離し、メンブランに電気泳動的に転写し、ｓＦｌｔ－１４特異的なＣＥＳＳ抗体により免疫ブロットした。タンパク質の検出を、ＣＥＳＳ抗体またはａｂ９５４０抗体を使用して行った。
【０２５８】
結果
ＰＥ胎盤が、アップレギュレーションされたレベルのｓＦｌｔ－１４を発現することを例示する新規な結果（本明細書中上記の実施例３および実施例４）に従って、本発明の発明者らは、どのｓＦｌｔイソ型がＰＥ被験者の血清に蓄積するかを調べた。循環している可溶性受容体の特徴を特定するために、本発明の発明者らは子癇前症の血清試料を分析した。これを、ｓＦｌｔイソ型をＦＬＴ１１細胞外抗体によりＰＥ患者の血清からアフィニティー精製することによって行った。精製されたイソ型を、特異的なｓＦｌｔ－１４抗体（ＣＥＳＳ抗体）を使用して胎盤のＣＥＳＳ免疫沈殿物の隣にウエスタンブロットした。図８に例示されるように、同じ２つのバンドがＰＥ被験者の胎盤および血清において検出された。これら２つのタンパク質は以前にはｓＦｌｔ－１４タンパク質として特定されていた（実施例３、本明細書中上記）。さらに、ＰＥ被験者の血清において検出されたｓＦｌｔ－１４タンパク質は、ｓＦｌｔ－１４発現プラスミド（本明細書中下記の実施例１０を参照のこと）によりトランスフェクションされた細胞によって産生され、ｓＦｌｔ－１４特異的な抗体により検出されるｓＦｌｔ－１４タンパク質とサイズにおいて同一である２つのバンドとして可視化された。ａｂ９５４０細胞外標的化抗体を使用する第２の免疫ブロッティングでは、上記の２つとは異なるバンドを与えることができず（データは示されず）、従って、このことから、試験されたＰＥ血清におけるｓＦｌｔ－１の存在が排除された。このことは、ｓＦｌｔ－１４が、ＰＥ被験者の循環における主要なＶＥＧＦ受容体であることを示している。
【０２５９】
（実施例８）
ｓＦＬＴ－１４は、妊娠の第２トリメスターから得られる唯一のｓＦＬＴ１イソ型である
材料および実験手順
ノーザンブロッティング
総ＲＮＡを妊娠の異なる時点（妊娠の第９週～第１１週、第１３週および第３９週）でヒトの胎盤生検物から得た。それぞれのサンプルの１０μｇ～１５μｇのＲＮＡをホルムアルデヒド－アガロース（１％）変性ゲルによって分離し、正荷電のナイロンメンブランに毛細管溶出によってブロットした。ＲＮＡをＵＶ架橋し（１２００ｊ／ｍ２）、メンブランを０．１％メチレンブルーにより染色して、等しい負荷および転写を保証した。ブロットをｒｅｄｉｐｒｉｍｅキット（Ａｍｅｒｓｈａｍ）によって^{32}Ｐ標識のプローブと

一晩ハイブリダイゼーションした。使用されたプローブ（配列番号１４）は両方のイソ型の共有配列を標的とし、従って、それらの相対的な存在量を示すことができた。ブロットを６０℃での３０分間の（２ｘＳＳＣ、１％ＳＤＳによる）２回の洗浄に供し、その後、ブロットをＭＳ高感度フィルム（Ｋｏｄａｋ）に感光させた。

【０２６０】

結果

妊娠の正常な経過の期間中におけるｓＦＬＴ１イソ型のそれぞれの相対的寄与を特徴づけるために、ＲＮＡを妊娠の正常な経過の期間中における異なる時点でヒトの胎盤生検物から得て、両方のイソ型の共有配列を標的とする細胞外プローブをハイブリダイゼーションのために使用した（上記の材料および実験の節を参照のこと）。図９Ａ～図９Ｂに示されるように、妊娠の第９週～第１１週（第１トリメスター）が、ｓＦｌｔ－１イソ型およびｓＦｌｔ－１４イソ型の１：１の比率によって特徴づけられる。しかしながら、妊娠の第１３週（第２トリメスターの始まり）では、ｓＦｌｔ－１４が、胎盤において発現される、唯一のイソ型とまではいかないが、優勢なイソ型になる。さらに、第３９週（第３トリメスター）では、ｓＦｌｔ－１４が依然として唯一のイソ型である。妊娠の第２トリメスター以降からのｓＦＬＴ－１４のもっぱらの発現は、ｓＦＬＴ－１４が子癇前症（通常的には、妊娠の第３トリメスターの期間中に生じる状態）において著しくアップレギュレーションされるという事実に対応する。

【０２６１】

（実施例９）

ｓＦＬＴ－１４は強力なＶＥＧＦ阻害剤である

材料および実験手順

Ｈｅｌａ細胞における組換えｓＦｌｔ１タンパク質および組換えｓｆｌｔ－１４タンパク質の発現

両方の可溶性受容体イソ型（ｓＦｌｔ－１４およびｓＦｌｔ－１）のコード領域全体（それぞれ、配列番号１および配列番号９）を包含するｃＤＮＡをＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ発現ベクターにサブクローン化し、Ｔ７ポリメラーゼを発現するヒトＨｅｌａ細胞にトランスフェクションした。２０時間～２４時間の後、成長培地を採取し、細胞を集めた。分泌されたタンパク質および細胞と会合するタンパク質をＦＬＴ１１抗体（Ｖ４２６２、Ｓｉｇｍａ）により免疫沈殿し、ｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４の両方の細胞外ドメインに対して向けられた抗体（Ａｂ９５４０、Ａｂｃａｍ）による免疫ブロッティングによって分析した。

【０２６２】

ＥＬＩＳＡ

成長培地中へのｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４の分泌の分析を、ＤＶＲ１００（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用する、共通して有される細胞外エピトープに対して向けられたＥＬＩＳＡを使用して行った。

【０２６３】

免疫沈殿およびウエスタンブロッティング

成長培地中へのｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４の分泌をＦＬＴ１１抗体による免疫沈殿によって分析し、ウエスタン免疫ブロッティングをａｂ９５４０抗体により行った。ウエスタンブロッティングをさらに、実施例５に記載されるように行った。

【０２６４】

ＶＥＧＦ阻害アッセイ

高レベルのヒトＶＥＧＦ－Ｒ２を発現するように操作されたブタ大動脈内皮（ＰＡＥ）細胞を、Ｇｅｒａ　Ｎｅｕｆｅｌｄ教授（Ｔｅｃｈｎｉｏｎ、Ｈａｉｆａ、イスラエル）から得た。細胞を１０％ＦＣＳ　ＤＭＥＭ成長培地で成長させた。

【０２６５】

増大する量のｓＦｌｔ－１４またはｓＦｌｔ－１（２０ｎｇ／ｍｌ、４０ｎｇ／ｍｌ、８０ｎｇ／ｍｌ）を、ＰＡＥ細胞の成長培地を加える前に一定量のＶＥＧＦ（２０ｎｇ／

ｍｌ）とプレインキュベーションした。ＶＥＧＦ－Ｒ２のリン酸化レベルを添加ｓＦｌｔ－１４／ＶＥＧＦ比率または添加ｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ比率の関数として測定した。ＶＥＧＦ－Ｒ２のリン酸化の減少を、ホスホ－ＶＥＧＦ－Ｒ２を検出する抗体（Ｃｅｌｌ－ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、Ｃａｔ．＃２４７８）を使用して求め、抗ＶＥＧＦ－Ｒ２抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、Ｃａｔ．ＳＣ－５０４）による免疫ブロッティングによって可視化された総ＶＥＧＦ－Ｒ２タンパク質に対して標準化した。

【０２６６】

結果

ｓＦｌｔ１およびｓＦｌｔ－１４は、質的に異なるタンパク質であるので（ｓＦｌｔ－１４は、ｓＦｌｔ１には存在しない７５個のアミノ酸を含有し、ｓＦｌｔ１は、ｓＦｌｔ－１４には存在しない３１個の高度に保存されたアミノ酸を含有するので）、本発明の発明者らは、ｓＦｌｔ－１４が実際に、ＶＥＧＦと特異的に結合し、ＶＥＧＦに拮抗することができるＶＥＧＦ受容体であることを明らかにすることを望んだ。

【０２６７】

この目的を達成するために、発明者らは、ｓＦｌｔ－１４を発現するヒトＨｅｌａ細胞を作製し、また、比較のために、ｓＦｌｔ１を発現するＨｅｌａ細胞を作製した。（共通して有される細胞外エピトープに対して向けられた）ＥＬＩＳＡ分析は、それぞれの成長培地へのｓＦｌｔ－１およびｓＦｌｔ－１４の分泌が同程度であったことを示している（１００ｎｇ／ｍｌ～２００ｎｇ／ｍｌの濃度が両方について検出された。データは示されず）。さらに、発明者らは、免疫反応性タンパク質の見かけの分子サイズ（それぞれ、１３０Ｋｄおよび１２０Ｋｄ、図１０Ａ）によって明白であるように、免疫沈殿およびウエスタンブロットによって、それぞれの成長培地におけるｓＦｌｔ－１４またはｓＦｌｔ－１のいずれかの互いに相容れない存在を確認した。

【０２６８】

ｓＦｌｔ－１４がＶＥＧＦシグナル伝達を阻害するかを明らかにするために、増大する量のｓＦｌｔ－１４を、高レベルのヒトＶＥＧＦ－Ｒ２を発現するように操作されたブタ大動脈内皮（ＰＡＥ）細胞の成長培地を加える前に一定量のＶＥＧＦ（２０ｎｇ／ｍｌ）とプレインキュベーションした。ＶＥＧＦ－Ｒ２のリン酸化レベルを添加ｓＦｌｔ－１４／ＶＥＧＦ比率の関数として測定した。図１０Ｂに示されるように、ＶＥＧＦ－Ｒ２のリン酸化のほぼ完全な阻害が１：１のｓＦｌｔ－１４／ＶＥＧＦ比率において既に明白であった。逆に、この比率において、ｓＦｌｔ１はＶＥＧＦ－Ｒ２のリン酸化を有意に阻害せず、実際には、より高いｓＦｌｔ－１／ＶＥＧＦ比率においてのみＶＥＧＦ－Ｒ２のリン酸化を阻害しただけであった。まとめると、これらの結果は、結論的には、ｓＦｌｔ－１４がＶＥＧＦシグナル伝達の強力な阻害剤であり、ｓＦｌｔ－１よりも顕著に強力であることを示した。

【０２６９】

（実施例１０）

ｓＦｌｔ－１４がヒトの角膜において発現される

材料および実験手順

免疫組織化学

角膜切片を、病的状態のために取り出されたヒトの角膜から単離した。１：１００の希釈度でのｓＦｌｔ－１４特異的なウサギポリクローナル抗体をパラフィン包埋の角膜切片に対して使用した。抗原回復を、２５ｍＭクエン酸塩緩衝液（ｐＨ＝６．０）を使用して行った。抗体は、ｓＦＬＴ－１４タンパク質のＣ末端に由来するペプチドに対して、すなわち、ＣＥＬＹＴＳＴＳＰＳＳＳＳＳＳ（ＣＥＳＳ抗体、配列番号５）に対して向けられた。

【０２７０】

結果

ｓＦｌｔ－１は、ｓＦｌｔ－１が非常に重要な抗ＶＥＧＦ因子であるならば、角膜において大きな生理学的役割を果たし、これにより、角膜を無血管状態（明瞭な視覚のために

絶対必要である状態）に保つことが広く知られている。哺乳動物では、ｓＦｌｔ－１が角膜上皮によって発現される。本発明の発明者らが、ｓＦｌｔ－１４もまたヒト角膜において発現されるかを調べるために、特異的なｓＦｌｔ－１４抗体をヒトの角膜切片の免疫組織化学のために使用した。図１１Ａ～図１１Ｂから明らかであるように、ｓＦｌｔ－１４が角膜上皮において非常に発現される。ヒト角膜上皮におけるｓＦｌｔ－１４の存在が、ヒト角膜から単離されたいくつかの上皮サンプルのｓＦｌｔ－１４のＰＣＲ分析によってさらに確認された（データは示されず）。

【０２７１】

本発明はその特定の実施形態によって説明してきたが、多くの別法、変更および変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更および変形すべてを包含するものである。

【０２７２】

本明細書中で挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、個々の刊行物、特許および特許出願が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用または確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。節の見出しが使用されている程度まで、それらは必ずしも限定していると解釈されるべきではない。

【配列表フリーテキスト】

【０２７３】

配列番号３は、ｓＦｌｔ－１４の特有の２８アミノ酸ポリペプチド部分をコードする核酸配列である。

配列番号４は、ｓＦｌｔ－１４の特有の２８アミノ酸ポリペプチド部分である。

配列番号５は、特異的なｓＦｌｔ－１４抗体（ＣＥＳＳ）を作成するのに使用される合成ペプチドである。

配列番号６は、非特異的なｓＦｌｔ－１４抗体（ＣＨＦＫ）を作成するのに使用される合成ペプチドである。

配列番号７は、エクソン１４から開始してポリＡテールまでのｓＦｌｔ－１４の部分である。

配列番号８は、ｓＦｌｔ－１４特異的結合領域である。

配列番号１１は、ＲＡＣＥキット３’オリゴヌクレオチドである。

配列番号１３は、イントロン１４特異的プローブである。

配列番号１４は、両方のアイソフォームに特異的なｓＦＬＴプローブである。

配列番号１５は、抗原結合領域である。

配列番号１６は、質量分析で同定されたタンパク質である。

配列番号１７～１９は、質量分析で配列決定されたペプチドである。

【図２Ｂ】

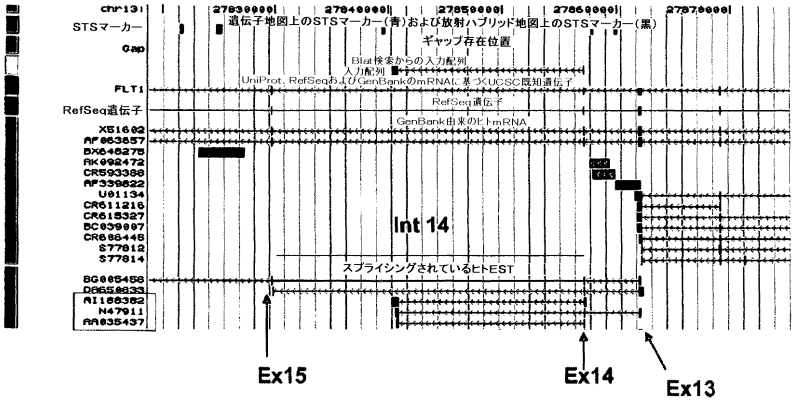


Fig. 2b

【図３】

Met V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S S G S K L K D P E L S L K G T Q H I M Q
A G Q T L H L Q C R G E A A H K W S L P E M V S K E S E R L S I T K S A C G R N G K Q F
C S T L T L N T A Q A N H T G F Y S C K Y L A V P T S K K K E T E S A I Y I F I S D T G R P
F V E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S P N I T V T L K K F P L D T L I P D G
K R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y K T N Y L T H R Q T N
T I I D V Q I S T P R P V K L L R G H T L V L N C T A T T P L N T R V Q M T W S Y P D E K N
K R A S V R R R I D Q S N S H A N I F Y S V L T I D K M Q N K D K G L Y T C R V R S G P S
F K S V N T S V H I Y D K A F I T V K H R K Q Q V L E T V A G K R S Y R L S M K V K A F P
S P E V V W L K D G L P A T E K S A R Y L T R G Y S L I I K D V T E E D A G N Y T I L L S I
K Q S N V F K N L T A T L I V N V K P Q I Y E K A V S S F P D P A L Y P L G S R Q I L T C T
A Y G I P Q P T I K W F W H P C N H N H S E A R C D F C S N N E E S F I L D A D S N M G
N R I E S I T Q R M A I I E G K N K M A S T L V V A D S R I S G I Y I C I A S N K V G T V G R
N I S F Y I T D V P N G F H V N L E K M P T E G E D L K L S C T V N K F L Y R D V T W I L L
R T V N N R T M H Y S I S K Q K M A I T K E H S I T L N L T I M N V S L Q D S G T Y A C R A
R N V Y T G E E I L Q K K E I T I R D Q E A P Y L L R N L S D H T V A I S S S T T L D C H A
N G V P E P Q I T W F K N N H K I Q Q E P E L Y T S T S P S S S S S S P L S S S S S S S S S
S S S S Stop
（配列番号2）

Ex14　Int14

Fig. 3a

抗第14エキソン – CHANGVPEPQITWFK (CHFK、配列番号6)

抗第14イントロン – **CELYTSTSPSSSSSS** (CESS、配列番号5)

Fig. 3b

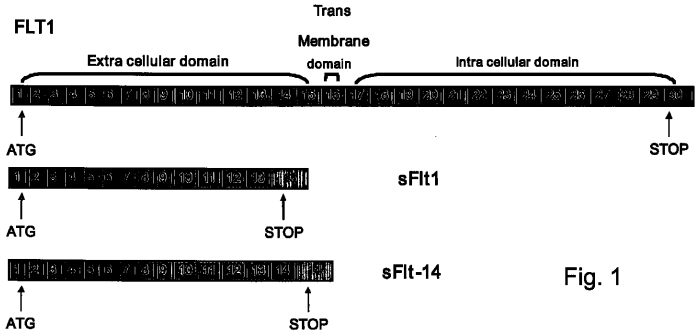


Fig. 1

【図２Ａ】

CCTCCTGCGAAACCTCAGTGATCACACAGTGGCCATCAGCAGTTCCACCACTTTAGACTGTCATGCTAATGGTGTC
CCCGAGCCTCAGATCACTTGGTTTAAAAACAACCACAAAATACAACAAGAGCCTGAACTGTATACATCAACGTCAC
*CATCGTCATCGTCATCATCACCATTGTCATCATCATCATCATCGTCATCATCATCATCATCA***TAG**CTATCATCATTAT
CATCATCATCATCATCATCATCATAGCTACCATTTATTGAAAACTATTATGTGTCAACTTCAAAGAACTTATCCTTTA
GTTGGAGAGCCAAGACAATCATAACAATAACAAATGGCCGGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTT
GGGAGGCCAAGGCAGGTGGATCATTTGAGGTCAGGAGTcCAAGACCAGCCTGACCAAGATGGTGAAATGCTGTC
TCTATTAAAAATACAAAATTAGCCAGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAATGCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGACAG
GAGAATCACTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGGGAGCCGAGATCGTGTACTGCACTCCAGCCTGGGCAACA
AGAGCGAAACTCCGTCTCAAAAAACAAATAAATAAATAAATAAATAAACAGACAAAATTCACTTTTTATTCTATTAAA
CTTAACATACATGCTAAAAAAAAAAAAA　（配列番号7）

Fig. 2a

【図７】

タンパク質＝血管内皮増殖因子受容体[ヒト] [56386330]
1 MVSYWDTGVL LCALLSCLLL TGSSSGSKLK DPELSLKGTQ HIMQAGQTLH
51 LQCRGEAAHK WSLPEMVSKE SERLSITKSA CGRNGKQFCS TLTLNTAQAN
101 HTGFYSCKYL AVPTSKKKET ESAIYIFISD TGRPFVEMYS EIPEIIHMTE
151 GRELVIPCRV TSPNITVTLK KFPLDTLIPD GKRIIWDSRK GFIISNATYK
201 EIGLLTCEAT VNGHLYKTNY LTHRQTNTII DVQISTPRPV KLLRGHTLVL
251 NCTATTPLNT RVQMTWSYPD EKNKRASVRR RIDQSNSHAN IFYSVLTIDK
301 MQNKDKGLYT CRVRSGPSFK SVNTSVHIYD KAFITVKHRK QQVLETVAGK
351 RSYRLSMKVK AFPSPEVWL KDGLPATEKS ARYLTRGYSL IIKDVTEEDA
401 GNYTILLSIK QSNVFKNLTA TLVVNVKPQI YEK**AVSSFPD PALYPLGSRQ**
451 ILTCTAYGIP QPTIKWFWHP CNHNHSEARC DFCSNNEESS ILDADSNMGN
501 RIESITQRMA IIEGKNKMAS TLVVADSRIS GIYICIASNK VGTVGRNISF
551 YITDVPNGFH VNLEKMPTEG EDLKLSCTVN KFLYRDVTWI LLRTVNNRTM
601 HYSISKQKMA ITKEHSITLN LTIMNVSLQD SGTYACRA**RN VYTGEEILQK**
651 KEITIR**DQEA PYLLR**NLSDH TVAISSSTTL DCHANGVPEP QITWFKNNHK
701 IQQEPGIILG PGSSTLFIER VTEEDEGVYH CKATNQKGSV ESSAYLTVQG
751 TSDKSNLELI TLTCTCVAAT LFWLLLTLFI RKMKRSSSEI KTDYLSIIMD
801 PDEVPLDEQC ERLPYDASKW EFARERLKLG KSLGRGAFGK VVQASAFGIK
851 KSPTCRTVAV KMLKEGATAS EYKALMTELK ILTHIGHHLN VVNLLGACTK
901 QGGPLMVIVE YCKYGNLSNY LKSKRDLFFL NKDAALHMEP KKEKMEPGLE
951 QGKKPRLDSV TSSESFASSG FQEDKSLSDV EEEEDSDGFY KEPITMEDLI
1001 SYSFQVARGM EFLSSRKCIH RDLAARNILL SENNVVKICD FGLARDIYKN
1051 PDYVRKGDTR LPLKWMAPES IFDKIYSTKS DVWSYGVLLW EIFSLGGSPY
1101 PGVQMDEDFC SRLREGMRMR APEYSTPEIY QIMLDCWHRD PKERPRFAEL
1151 VEKLGDLLQA NVQQDGKDYI PINAILTGNS GFTYSTPAFS EDFFKESISA
1201 PKFNSGSSDD VRYVNAFKFM SLERIKTFEE LLPNATSMFD DYQGDSSTLL
1251 ASPMLKRFTW TDSKPKASLK IDLRVTSKSK ESGLSDVSRP SFCHSSCGHV
1301 SEGKRRFTYD HAELERKIAC CSPPPDYNSV VLYSTPPI

カバー範囲：3%ペプチド：
434 AVSSFPDPALYPLGSR → 配列番号17
640 NVYTGEEILQK → 配列番号18
657 DQEAPYLLR → 配列番号19

Fig. 7

配列番号16

【図１】

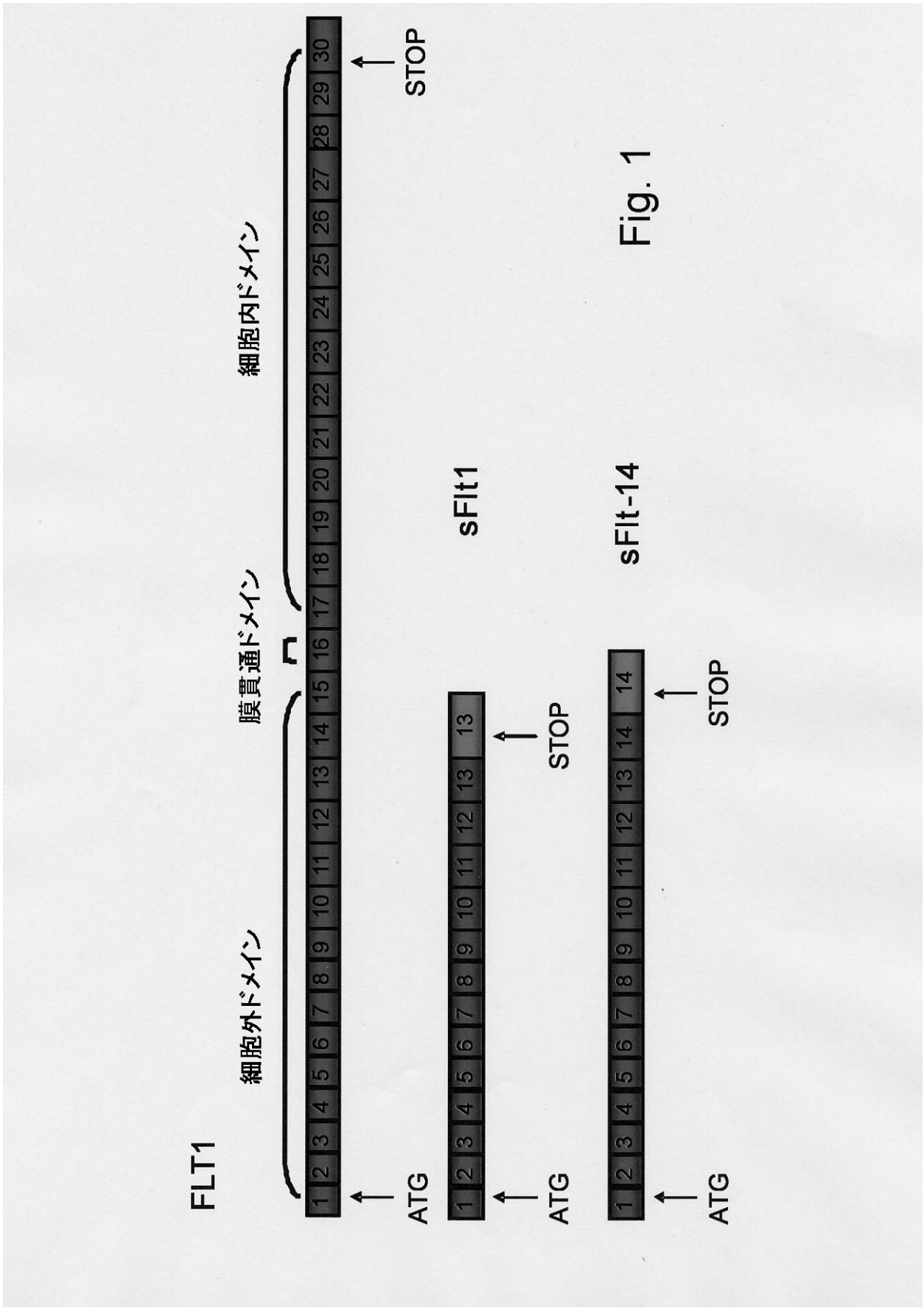

FLT1
細胞外ドメイン
膜貫通ドメイン
細胞内ドメイン
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
ATG
STOP
sFlt1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 13
ATG
STOP
sFlt-14
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 14
ATG
STOP

Fig. 1

【図４】

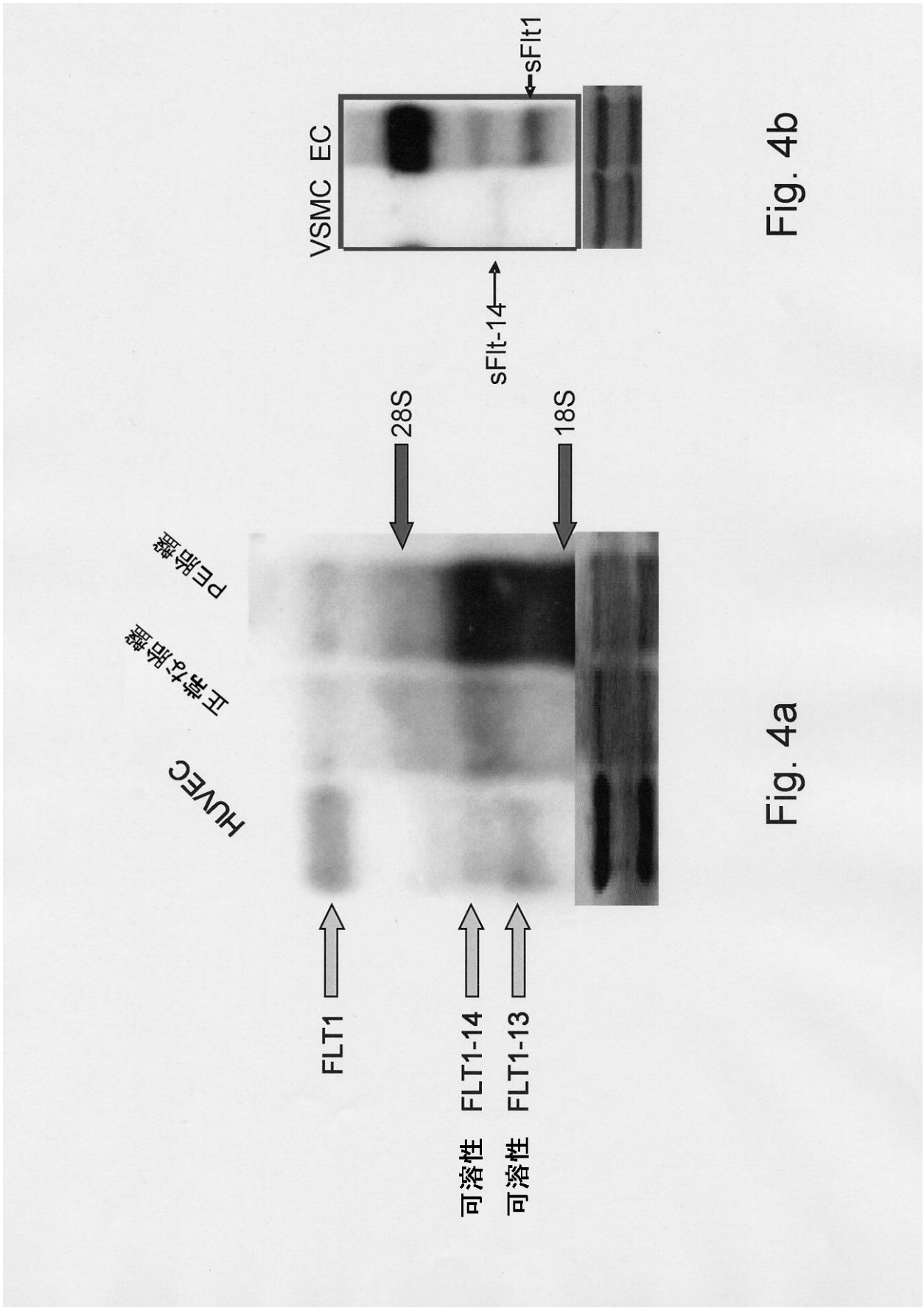


Fig. 4a

Fig. 4b

【図５】

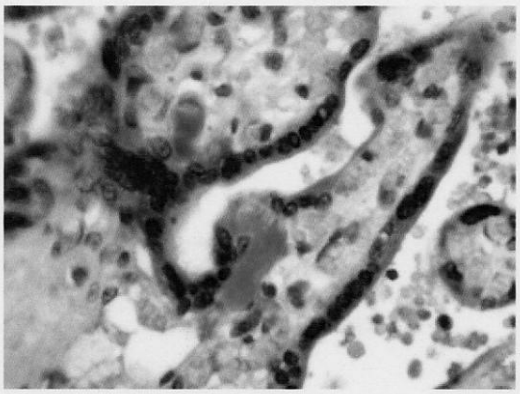


Fig. 5a

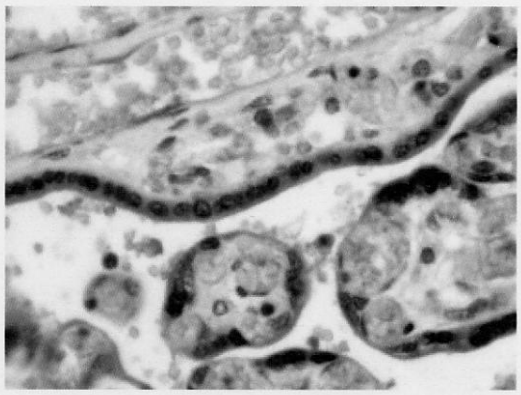


Fig. 5b

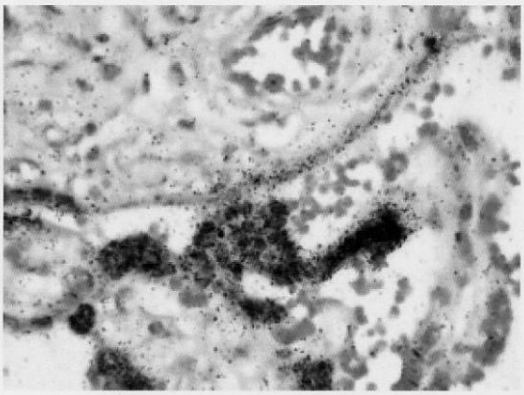


Fig. 5c

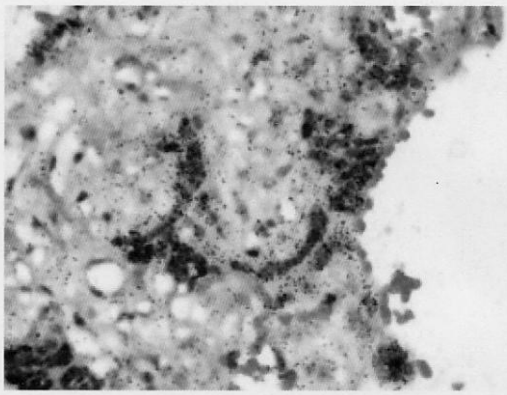


Fig. 5d

【図６】

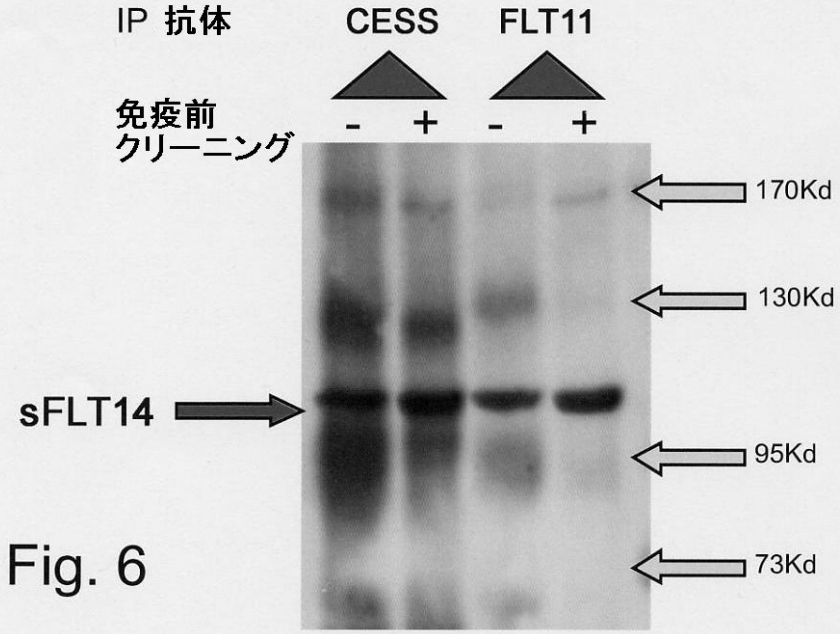
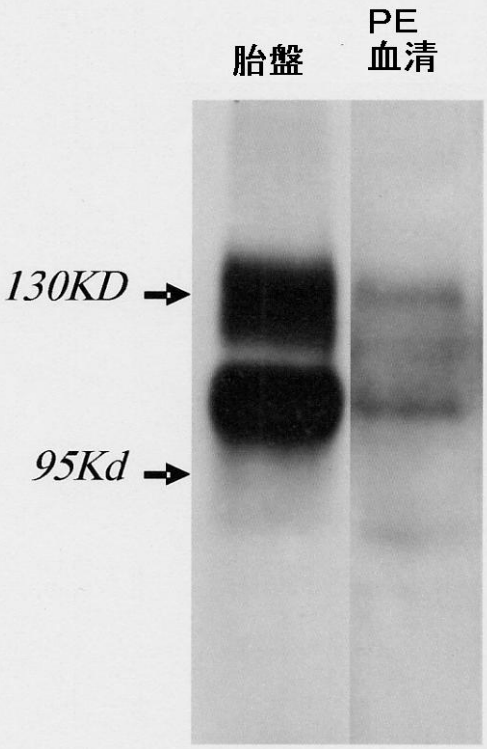


Fig. 6

【図８】



IB: CESS

Fig. 8

【図９】

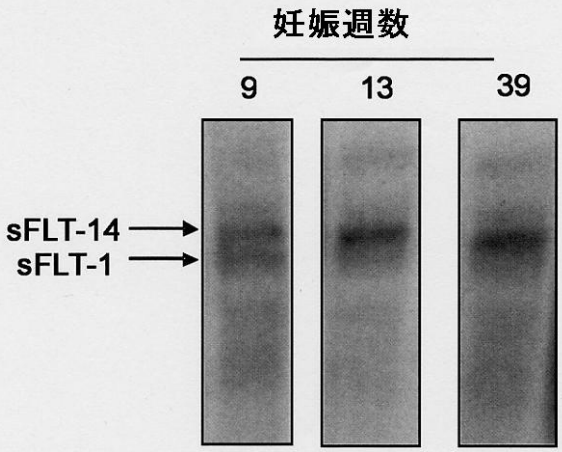


Fig. 9a

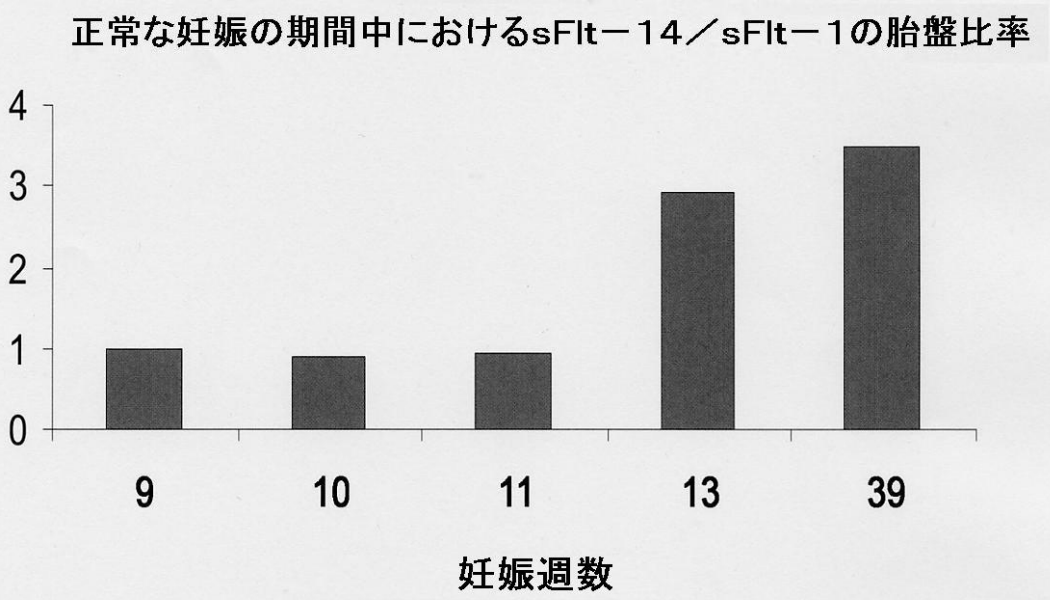
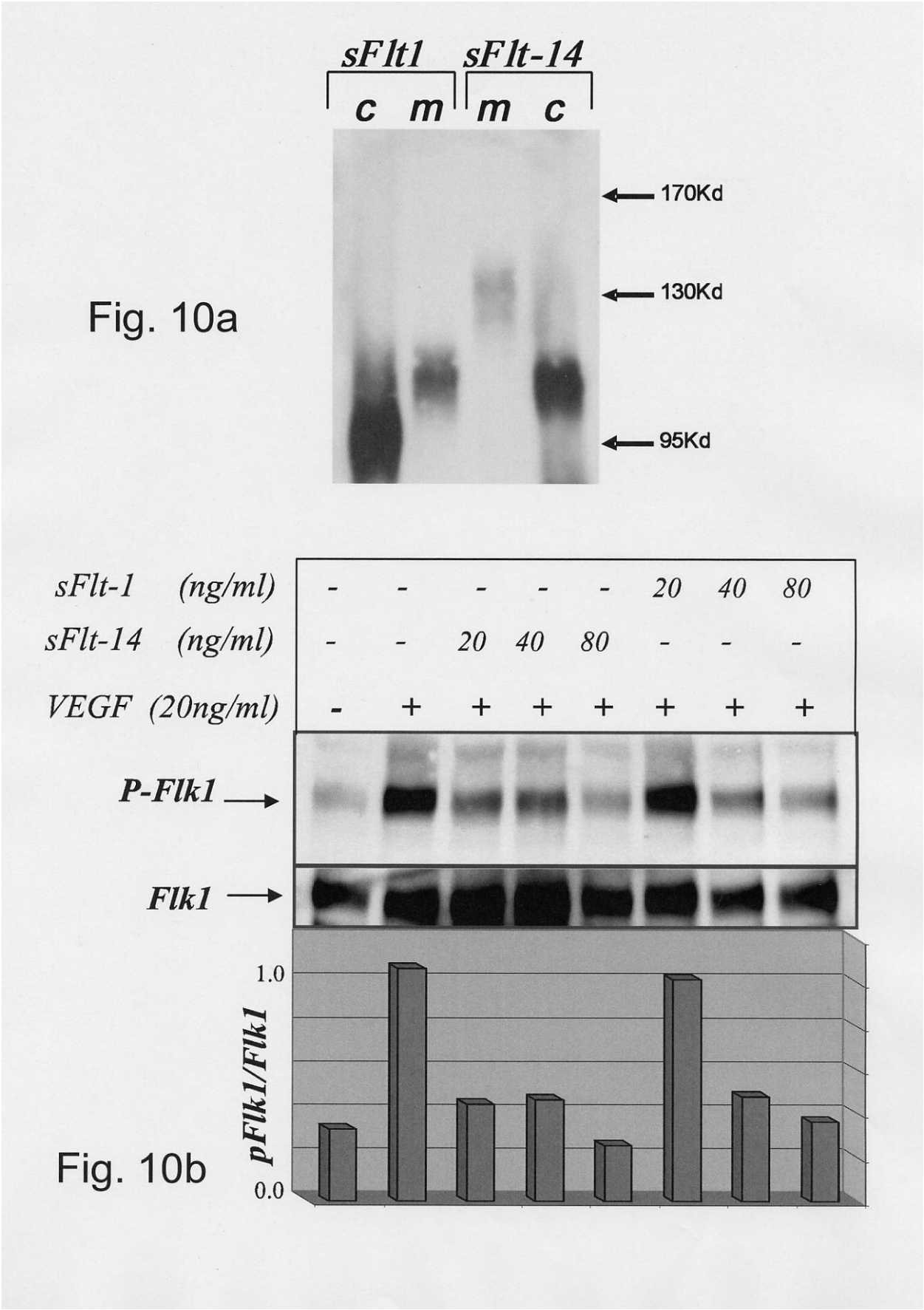


Fig. 9b

【図１０】


sFlt1
sFlt-14
c
m
m
c
170Kd
130Kd
95Kd
Fig. 10a
sFlt-1 (ng/ml) - - - - - 20 40 80
sFlt-14 (ng/ml) - - 20 40 80 - - -
VEGF (20ng/ml) - + + + + + + +
P-Flk1
Flk1
1.0
0.0
pFlk1/Flk1
Fig. 10b

【図１１】

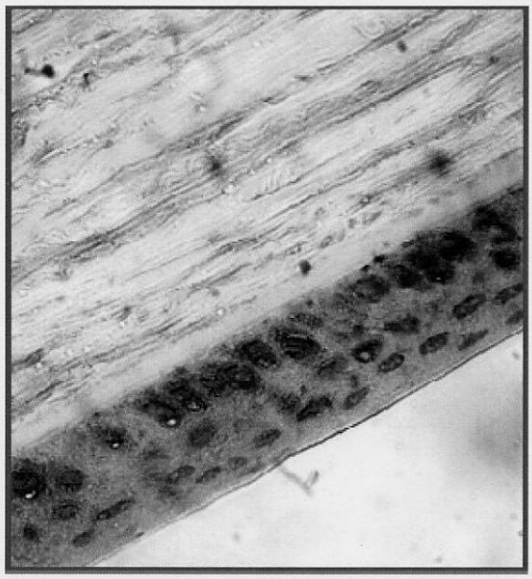


Fig. 11a

CESS 抗体

コントロール

Fig. 11b

【配列表】

2010512781000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2007/001589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/12 C07K14/71 C07K16/28 C12N15/63 C12Q1/68
A61K38/17 G01N33/50

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)
C12N C07K C12Q A61K 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 practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE Geneseq [Online] 26 July 2007 (2007-07-26), "Human VEGFR1 precursor protein HSFLT_P10." XP002476506 retrieved from EBI accession no. GSP:AFR05586 Database accession no. AFR05586 abstract & WO 2007/039903 A (COMPUGEN LTD [IL]; SELLA-TAVOR OSNAT [IL]; POLLOCK SARAH [IL]; COJOCAR) 12 April 2007 (2007-04-12) paragraphs [0232], [0380], [0651] claims 1,5,31,113 sequence 18 ----- -/--	1-6,8, 10-15, 28,29

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 document 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
16 April 2008	28/04/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Tudor, Mark

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2007/001589

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online] 2 November 2006 (2006-11-02), "Human HSFLT_PEA_1_P10 protein fragment." XP002476507 retrieved from EBI accession no. GSP:AEK17175 Database accession no. AEK17175 abstract & WO 2005/072340 A (COMPUGEN LTD [IL]; COMPUGEN INC [US]; AYALON-SOFFER MICHAL [IL]; LEVIN) 11 August 2005 (2005-08-11) page 98, line 18 - page 100, line 19 page 123, line 24 - page 124, line 23 page 127, line 3 - page 129, line 17 example 50 sequence 1545	1-4,6-30
X	DATABASE Geneseq [Online] 6 November 2001 (2001-11-06), "Human polypeptide SEQ ID NO 18685." XP002476508 retrieved from EBI accession no. GSP:AAO04793 Database accession no. AAO04793 abstract & WO 01/64835 A (HYSEQ INC [US]; TANG Y TOM [US]; LIU CHENGHUA [US]; DRMANAC RADOJE T [) 7 September 2001 (2001-09-07) page 10, paragraph 1 page 32, line 33 - page 33, line 25 page 54, paragraph 3 page 67, lines 1-11 claims 1-28 sequence 18685	1-19, 28-30
A	WO 2006/069373 A (UNIV YALE [US]; BUHIMSCHI CATALIN S [US]; BUHIMSCHI IRINA [US]; NORWIT) 29 June 2006 (2006-06-29) claims 1-28,34-41	1-34
A	US 2004/126828 A1 (KARUMANCHI S ANANTH [US] ET AL) 1 July 2004 (2004-07-01) claims 1-32	1-34
A	SHIBUYA MASABUMI ET AL: "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 312, no. 5, March 2006 (2006-03), pages 549-560, XP002476505 ISSN: 0014-4827 page 549 - page 560	1-34

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2007/001589

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VUORELA P ET AL: "Amniotic Fluid-Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Preeclampsia" OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 95, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 353-357, XP002995373 ISSN: 0029-7844 page 353 - page 357	1-34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/IL2007/001589

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 20-23 (partially)

Present claims 20-23 refer to agents capable of regulating an activity and/or expression of sFlt-14 (SEQ ID No: 1 or 2). The claims cover all compositions having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compositions. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the composition by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely wherein said agent is an antibody, polynucleotide or polypeptide.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2007/001589

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 20-23 (partially)
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IL2007/001589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007039903 A	12-04-2007	NONE	
WO 2005072340 A	11-08-2005	NONE	
WO 0164835 A	07-09-2001	AU 3834701 A	12-09-2001
WO 2006069373 A	29-06-2006	EP 1839056 A2	03-10-2007
US 2004126828 A1	01-07-2004	US 2005025762 A1	03-02-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ 9/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/12		
Ａ６１Ｐ 15/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ 9/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
Ａ６１Ｐ 27/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｋ 38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		
Ａ６１Ｋ 31/7105	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ 31/711	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711		
Ａ６１Ｋ 39/395	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
		Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 500388981
ハダシット メディカル リサーチ サーヴィシーズ アンド ディヴェロップメント リミテッド
イスラエル, ９１１２０ イェルサレム, ピー. オー. ボックス １２０００, キリャット ハダシャー （番地なし）
(74)代理人 100103816
弁理士 風早 信昭
(74)代理人 100120927
弁理士 浅野 典子
(72)発明者 ケシェト, エリ
イスラエル, ９０８８５ ドアーナ ハレイ イェフダ, モシャフ アミナダフ ２２１
(72)発明者 セラ, シェイ
イスラエル, ３４９８０ ハイファ, デニア ストリート ３５
(72)発明者 イティン, アフバ
イスラエル, ９６４２９ エルサレム, アブラハム フェレラ ストリート ７／３７
(72)発明者 ヤゲル, シムチャ
イスラエル, ９３２３０ エルサレム, コフシェイ カタモン ストリート ２１

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 CA12 DA02 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18 HA08 HA09 HA12 HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR36 QR42 QR48 QR56 QR62 QR63 QR66 QR77 QR82 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02
4C084 AA02 BA08 BA19 BA23 BA44 CA18 DC50 NA14 ZA331 ZA361 ZA421 ZB261 ZC351 ZC411
4C085 AA13 BB31 CC21 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZA42 ZB26
ZC35 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 CA46 DA30 DA50 DA75
DA86 DA89 EA20 EA50 FA71 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	VEGFR的变异及其在妊娠相关疾病诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	JP2010512781A	公开(公告)日	2010-04-30
申请号	JP2009542395	申请日	2007-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展公司		
申请(专利权)人(译)	耶路撒冷有限公司的Heburyu大学Issamu研究开发公司 Hadashitto医学研究Savishizu＆D公约下降包换有限公司		
[标]发明人	ケシェトエリ セラシェイ イティンアフバ ヤゲルシムチャ		
发明人	ケシェト, エリ セラ, シェイ イティン, アフバ ヤゲル, シムチャ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/71 C07K16/28 C12Q1/68 C12Q1/02 A61P43/00 A61P3/10 A61P9/12 A61P15/00 A61P35/00 A61P9/00 A61P27/02 A61K38/00 A61K31/7105 A61K31/711 A61K39/395 G01N33/53		
CPC分类号	A61P3/10 A61P9/00 A61P9/12 A61P15/00 A61P27/02 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/71 G01N33/689		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/71 C07K16/28 C12Q1/68.A C12Q1/02 A61P43/00.111 A61P3/10 A61P9/12 A61P15/00 A61P35/00 A61P9/00 A61P27/02 A61K37/02 A61K31/7105 A61K31/711 A61K39/395.D G01N33/53.D G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR63 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZB261 4C084/ZC351 4C084/ZC411 4C085/AA13 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA42 4C086/ZB26 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA46 4H045/DA30 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	60/875822 2006-12-20 US		
其他公开文献	JP2010512781A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了包含与SEQ ID NO：4至少70％同源的氨基酸序列的分离的多肽和编码其的分离的多核苷酸。还公开了包含能够与分离的多核苷酸特异性杂交的核酸序列的多核苷酸和包含特异性结合分离的多肽的抗原识别结构域的分离的抗体。还公开了包含其的药物组合物，诊断和治疗方法。

(P2010-5127
(43) 公表日 平成22年4月30日 (2010.4.

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/71	***(2006.01)***	C07K	14/71		4B063
C07K 16/28	***(2006.01)***	C07K	16/28		4C084
C12Q 1/68	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A	4C085
C12Q 1/02	***(2006.01)***	C12Q	1/02		4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 （全 63 頁） 最終頁に

(21) 出願番号 特願2009-542395 (P2009-542395)
(86) (22) 出願日 平成19年12月20日 (2007.12.20)
(85) 翻訳文提出日 平成21年8月10日 (2009.8.10)
(86) 国際出願番号 PCT/IL2007/001589
(87) 国際公開番号 WO2008/075363
(87) 国際公開日 平成20年6月26日 (2008.6.26)
(31) 優先権主張番号 60/875,822
(32) 優先日 平成18年12月20日 (2006.12.20)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 309038764
イッサム リサーチ ディベロップメン
カンパニー オブ ザ ヘブリュー
ニバーシティー オブ エルサレム リ
テッド
イスラエル， ９１３９０ エルサレム
ギヴァット ラム， ザ ヘブリュー
ユニバーシティー オブ エルサレム，
ザ エドモンド ジェー． サフラ キ
ンパス， ハイ テック パーク

最終頁に続く