

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/073191

発行日 平成27年4月2日 (2015.4.2)

(43) 国際公開日 **平成25年5月23日 (2013.5.23)**

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------|-------------|
| GO 1 N 33/86 (2006.01) | GO 1 N 33/86 | 2 G O 4 5 |
| GO 1 N 33/68 (2006.01) | GO 1 N 33/68 | 4 B O 2 4 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 D | 4 C O 8 4 |
| GO 1 N 33/536 (2006.01) | GO 1 N 33/536 C | 4 H O 4 5 |
| CO 7 K 14/81 (2006.01) | CO 7 K 14/81 | |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|--|
| 出願番号 | 特願2013-544140 (P2013-544140) | (71) 出願人 | 504300181 国立大学法人浜松医科大学 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 |
| (21) 国際出願番号 | PCT/JP2012/007348 | (74) 代理人 | 230104019 弁護士 大野 聖二 |
| (22) 国際出願日 | 平成24年11月15日 (2012.11.15) | (74) 代理人 | 100105991 弁理士 田中 玲子 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2011-249523 (P2011-249523) | (74) 代理人 | 100119183 弁理士 松任谷 優子 |
| (32) 優先日 | 平成23年11月15日 (2011.11.15) | (74) 代理人 | 100114465 弁理士 北野 健 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) | (74) 代理人 | 100156915 弁理士 伊藤 奈月 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスミノゲンアクチベーター-1による流産、早産治療薬

(57) 【要約】

本発明は、血漿中のプラスミノゲンアクチベーター活性または濃度を測定することを特徴とする、早産または流産の発症危険度を診断する方法に関する。詳しくは、プラスミノゲンアクチベーター活性または濃度が正常妊婦のものよりも低いときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断することを特徴とする、早産または流産の発症危険度を診断する方法、早産または流産の発症危険度診断用キット、およびプラスミノゲンアクチベーター-1を含む早産または流産を予防するための医薬組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検者より単離された血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性または濃度を測定することを特徴とする、早産または流産の発症危険度を診断する方法。

【請求項 2】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性を、ユーグロブリン溶解時間を指標として測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ユーグロブリン溶解時間が 500 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ユーグロブリン溶解時間が 350 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

血漿にカルシウムを添加してユーグロブリン溶解時間を測定する工程、および、カルシウムを添加しない場合のユーグロブリン溶解時間とカルシウムを添加した場合のユーグロブリン溶解時間との比率を求める工程をさらに含み、当該比率に基づいて早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を用いた免疫学的な測定方法によって測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を E L I S A 法によって測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を A l p h a L I S A 法によって測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

- トロンピン、およびカルシウムイオンまたはカオリンを含む水溶液を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

【請求項 11】

プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

【請求項 12】

早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、請求項 10 または 11 に記載のキット。

【請求項 13】

プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 を含む、早産または流産を予防するための医薬組成物。

【請求項 14】

早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性または濃度を測定す

10

20

30

40

50

ることを特徴とする、早産または流産の発症危険度を診断する方法に関する。詳しくは、プラスミノゲンアクチベーター活性または濃度が正常妊婦のものよりも低いときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断することを特徴とする、早産または流産の発症危険度を診断する方法、早産または流産の発症危険度診断用キット、およびプラスミノゲンアクチベーター - 1 を含む早産または流産を予防するための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

早産および流産の主たる原因として、絨毛膜下血腫が知られている。現在、絨毛膜下血腫に対しては、超音波断層法による画像診断が行われているが、血液学的診断法や治療法は確立されていない。したがって、いったん絨毛膜下血腫が発生し進行すると、早産および流産は回避することができなかった。

10

【0003】

プラスミノゲンアクチベーター - 1 (Plasminogen activator inhibitor - 1 (PAI - 1)) は、セリンプロテアーゼインヒビター (serine protease inhibitor (SERPIN)) スーパーファミリーの一つであり、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターおよび組織型プラスミノゲンアクチベーターの主要な生理的な制御因子である。PAI - 1 のレベルの上昇が動脈血栓 (非特許文献 1) やガン患者の予後不良 (非特許文献 2) 等いくつかの病態に関連することが多くの研究によって示されているが、PAI - 1 欠損の症例数が少ないことから、PAI - 1 欠損に関する知見は未だに限られている。本発明者らは、近年、ヒトにおいて遺伝的に同定された完全な PAI - 1 欠損のケースについて報告した (非特許文献 3)。係る患者は大出血する傾向を示したが、これはこれまでの報告において PAI - 1 欠損患者にも見られた傾向である (非特許文献 4)。

20

【0004】

出血の素因となり得る遺伝子の変化は、妊娠中の合併症に関連する。そのような関連の最も顕著な実例は、先天性の無フィブリノゲン血症や先天性の凝固因子 X I I I (FXIII) 欠損であり、これらは治療しないままであると、性器出血や妊娠 6 ~ 8 週での自然流産を引き起こす (非特許文献 5 および 6)。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Semin Thromb Hemost 2009; 35: 468-77

【非特許文献 2】Immunol Lett 2008; 118: 116-24

【非特許文献 3】J Thromb Haemost 2011; 9: 1200-6

【非特許文献 4】N Engl J Med 1992; 327: 1729-33

【非特許文献 5】Curr Drug Targets 2005; 6: 535-9

【非特許文献 6】Obstet Gynecol Surv 2007; 62: 255-60

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0006】

本発明の目的は、絨毛膜下血腫の簡便かつ精度の高い新たな診断方法および絨毛膜下血腫を治療する方法を提供し、それらの方法により絨毛膜下血腫に起因する早産および流産の発症危険度を早期診断することにより、早産および流産を予防することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、PAI - 1 欠損症の患者は、妊娠すると絨毛膜下血腫を発症して流産すること、および係る患者に PAI - 1 を含む新鮮凍結血漿を投与すると絨毛膜下血腫の進行を阻止し、妊娠維持が可能であることを見出した (Thrombosis Research 129:4, e161-e163)。さらに、本発明者らはこれら知見に基づき、PAI 活性に基づいて絨毛膜下

50

血腫に起因する流産の発症危険性を判定できることを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は、以下の [1] ~ [1 4] を提供する。

[1] 被検者より単離された血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性または濃度を測定することを特徴とする、早産または流産の発症危険度を診断する方法。

[2] 血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性を、ユーグロブリン溶解時間を指標として測定する、[1] に記載の方法。

[3] ユーグロブリン溶解時間が 5 0 0 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、[2] に記載の方法。

[4] ユーグロブリン溶解時間が 3 5 0 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、[2] または [3] に記載の方法。

[5] 血漿にカルシウムを添加してユーグロブリン溶解時間を測定する工程、および、カルシウムを添加しない場合のユーグロブリン溶解時間とカルシウムを添加した場合のユーグロブリン溶解時間との比率を求める工程をさらに含み、当該比率に基づいて早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、[2] ~ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] 血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を用いた免疫学的な測定方法によって測定する、[1] に記載の方法。

[7] 血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を E L I S A 法によって測定する、[6] に記載の方法。

[8] 血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を A l p h a L I S A 法によって測定する、[6] に記載の方法。

[9] 早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、[1] ~ [8] のいずれかに記載の方法。

[1 0] - トロンピン、およびカルシウムイオンまたはカオリンを含む水溶液を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

[1 1] プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

[1 2] 早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、[1 0] または [1 1] に記載のキット。

[1 3] プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 を含む、早産または流産を予防するための医薬組成物。

[1 4] 早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、[1 3] に記載の医薬組成物。

【 発明の効果 】

【 0 0 0 9 】

本発明を用いると、従来、超音波断層法による画像診断でしか診断できなかった絨毛膜下血腫および早産または流産の発症危険度を、血液学的かつ定量的に診断することが可能となる。そのため、早産または流産の発症危険度を早期に診断することおよび診断の精度を向上させることができる。また、本発明により、絨毛膜下血腫が発生した場合であっても妊娠を維持し、流産を防ぐことができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 0 】

【 図 1 】 図 1 は、P A I - 1 欠損症の患者の 3 回の妊娠経過中に観察された性器出血 (G . B .) (g)、投与した新鮮凍結血漿 (F F P) (U : 1 U = 2 0 0 m L の血液から分離された血漿)、および血漿 D - ダイマー濃度 ($\mu g / m L$) を示す。黒い矢印は流産した日を示し、白い矢印は緊急帝王切開を行ったときを示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 1 】

1 . 定義

10

20

30

40

50

「プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 (Plasminogen activator inhibitor - 1 (PAI - 1))」は、セリンプロテアーゼインヒビター (serine protease inhibitor (SERPIN)) スーパーファミリーの一つであり、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (urokinase type plasminogen activator (uPA)) および組織型プラスミノゲンアクチベータ (tissue type plasminogen activator (tPA)) の主要な生理的な制御因子である。

【0012】

「プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 2 (Plasminogen activator inhibitor - 2 (PAI - 2))」は、SERPINスーパーファミリーの一つであり、uPAおよびtPAの生理的な制御因子である。PAI - 2は胎盤由来であり、非妊娠時にはほとんど発現されていない。

10

【0013】

本発明において、「プラスミノゲンアクチベータインヒビター活性」、「PAI活性」および「PAIの活性」とは、PAI - 1およびPAI - 2が有する、プラスミノゲンアクチベータを不活化して線維素溶解系 (線溶系) を抑制する活性のことをいい、PAI - 1およびPAI - 2が有する線溶抑制活性の総和を意味する。妊娠中は胎盤よりPAI - 2も分泌されるが、線溶抑制活性は妊婦でもPAI - 1活性が主たるものであることから、本発明において測定されるPAI活性は、主にPAI - 1に起因する活性を示す。なお、プラスミノゲンアクチベータインヒビター活性が高いほど、線溶系が強く抑制される。

20

【0014】

「絨毛膜下血腫」とは、妊娠初期から中期にかけてしばしば見られる、胎盤と脱落膜との間に現れる血腫で、胎盤の辺縁に沿って形成されるのが特徴である。妊娠初期に見られる絨毛膜下血腫のほとんどは自然退縮するが、妊娠中期まで持続する場合もある。絨毛膜下血腫が持続した場合、子宮収縮抑制不能、性器出血の増加、子宮内感染等により、胎盤機能不全や流産の確率が高くなる。

【0015】

本発明において、「早産」とは妊娠22週以降37週未満での出産をいい、「流産」とは妊娠22週未満における妊娠喪失をいう。また、本明細書においては、早産および流産を指して、「流産」とも記載する。

30

【0016】

本発明において、「早産または流産の発症危険度」または「流産の発症危険度」とは、被検者が流産するか否かを判断するための、検査判定基準をいう。流産の発症危険度が高いほど流産する可能性が高いと判断され、低いほど流産する可能性が低いまたは正常な妊娠であると判断される。

【0017】

2. 早産または流産の発症危険度を判定する方法

本発明は、血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性または濃度を測定することを特徴とする、早産または流産の発症危険度を判定する方法に関する。

【0018】

40

(1) 血漿の単離

本発明において測定される試料は、被検者より通常採取した血液から、血漿を調製して用いる。採血は、本分野において周知の方法を用いることができ、当業者であれば適宜選択できるが、凝固系因子の保存が良好な、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いる方法が好ましい。本発明は、末梢血を試料として用いることができる。血漿を調製する方法としては、遠心等、本分野において周知の方法を用いることができる。取得した血漿は、測定するまで凍結保存してもよい。

【0019】

(2) プラスミノゲンアクチベータインヒビター活性または濃度の測定

本発明において、プラスミノゲンアクチベータインヒビター活性を測定する方法として

50

、当業者に周知の方法である、ユーグロブリンクロット溶解時間 (e u g l o b u l i n c l o t l y s i s t i m e (E C L T)) の測定方法を使用することができる。ここで、ユーグロブリンクロット溶解時間とは、血漿ユーグロブリン分画中で作製されたクロットが自然溶解するまでの時間を測定したものであり、主に P A I - 1 と t P A とのバランスにより決まる血漿の有する線溶活性を包括的に表すものとされている。ただし妊娠中は胎盤よりプラスミノゲンアクチベータインヒビター - 2 も分泌されるので、妊婦の E C L T で得られた結果は厳密にはプラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 の活性とプラスミノゲンアクチベータインヒビター - 2 の活性の総和である。しかし線溶抑制活性は妊婦でもプラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 活性が主たるものであることから、本発明において E C L T を用いて測定される P A I 活性は、主に P A I - 1 に起因する活性を示す。

10

【 0 0 2 0 】

ユーグロブリンクロット溶解時間の測定方法は、アンチプラスミンを除いて、フィブリンの溶解時間を測定する方法であり、当業者であれば適宜実施することができる。具体的には、血漿を酢酸緩衝液で希釈して静置した後、遠心して沈渣を採取し、その沈渣をトリス緩衝液で混和してユーグロブリン分画を得る。そして - トロンビンおよびカルシウムイオンあるいはカオリンを含む溶液にユーグロブリン分画のサンプルを添加し、沈渣の溶解時間を測定する。本発明においては、この溶解時間を P A I 活性の指標とする。ユーグロブリンクロット溶解時間が短いほど P A I 活性が低い、すなわち、線溶活性が高いことを示す。

20

【 0 0 2 1 】

本発明の一態様においては、カルシウムイオンを添加せずに測定したユーグロブリンクロット溶解時間 (R e g u l a r E C L T) と、カルシウムイオンを添加して測定したユーグロブリンクロット溶解時間 (C a 添加 E C L T) との比率を求め、当該比率を P A I 活性の指標とすることもできる。なお、カルシウムイオンを添加しない場合のユーグロブリン溶解時間は、上記と同様に調製したユーグロブリン分画のサンプルを、 - トロンビンを含む溶液に添加し、沈渣の溶解時間を測定することにより求められる。

【 0 0 2 2 】

プラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を測定する方法として、当業者に周知の方法である、抗 P A I - 1 抗体を用いた免疫学的な測定方法を使用することができる。具体的には、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素免疫測定法 (E I A)、酵素結合免疫測定法 (E L I S A 法)、蛍光免疫測定法 (F I A)、放射免疫測定法 (R I A)、および A l p h a L I S A 法 (登録商標、 P e r k i n E l m e r) などを使用することができる。

30

【 0 0 2 3 】

A l p h a l i s a 法は、ドナービーズに結合した分子がアクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用して2つのビーズが近接した状態の時にのみ検出される発光シグナルを利用したアッセイ方法である。具体的には、抗原の存在下でこれら2つのビーズは緊密に接近し、レーザーによるドナービーズの励起が一重項酸素分子の放出を惹起し、これがアクセプタービーズ内のチオキシン誘導体と反応して化学発光反応が開始され、この反応から生じた発光エネルギーが同じビーズ内にある蛍光物質に転移されることで光が放出される。よって、本発明において、抗 P A I - 1 抗体を結合したドナービーズおよびアクセプタービーズを使用して A l p h a L I S A 法を行うと、P A I - 1 濃度を定量することができる。また、本発明において、抗 P A I - 1 抗体および u P A をドナービーズまたはアクセプタービーズにそれぞれ結合させて、抗 P A I - 1 抗体を結合したドナービーズおよび u P A を結合したアクセプタービーズ、または u P A を結合したドナービーズおよび抗 P A I - 1 抗体を結合したアクセプタービーズを調製し、係るビーズを用いて A l p h a L I S A 法を実施することができる。この場合、サンプル中の活性をもった P A I - 1 のみかのドナービーズおよびアクセプタービーズと結合するので、結果として P A I - 1 活性を測定することが可能である。

40

50

【0024】

プラスミノゲンアクチベーター活性または濃度の測定は、上記の方法に限定されず、当該活性または濃度を測定できる当業者に周知の方法を使用することができる。また、それらの測定方法を複数利用してもよい。

【0025】

(3) 流早産の発症危険度の判定

本発明者らは、PAI-1欠損症の患者は、妊娠すると絨毛膜下血腫を発症して流産すること、および係る患者にPAI-1を含む新鮮凍結血漿を投与すると絨毛膜下血腫の進行を阻止し、妊娠維持が可能であることを見出した。また、係る患者においては、PAI-1欠損により血液の線溶系が異常亢進し卵膜と子宮の接着性が低下し絨毛膜下血腫が発生することを明らかにした。さらに、本発明者らはこれら知見に基づき、PAI活性または濃度に基づいて絨毛膜下血腫の診断ができること、および絨毛膜下血腫に起因する流早産の発症危険性を判定できることを見出した。

10

【0026】

これらの知見に基づき、本発明では、上述の方法により測定したプラスミノゲンアクチベーター活性または濃度が正常妊婦の標準値-標準誤差よりも低い場合に、絨毛膜下血腫発症のおそれがあり、被検者の流早産の発症危険度が高いと判断する。

【0027】

具体的には、ユーグロブリンクロット溶解時間を指標として用いる場合には、PAI活性が正常妊婦血漿よりも低い場合、例えばユーグロブリンクロット溶解時間が約500分以下、約400分以下、約350分以下、または約200分以下であるときに、被検者の流早産の発症危険度が高いと判断する。カルシウムイオンを添加せずに測定したユーグロブリンクロット溶解時間(Regular ECLT)と、カルシウムイオンを添加して測定したユーグロブリンクロット溶解時間(Ca添加ECLT)との比率(R Regular ECLT / Ca添加ECLT)を指標として用いる場合には、例えば、約5.0以下、約4.0以下、約3.0以下、または約1.5以下であるときに、被検者の流早産の発症危険度が高いと判断する。

20

【0028】

また、プラスミノゲンアクチベーター濃度を指標として用いる場合には、プラスミノゲンアクチベーター濃度が正常妊婦血漿よりも低い場合、例えば、正常妊婦の0.75倍未満、0.5倍未満、0.25倍未満、または0.1倍未満であるときに、被検者の流早産の発症危険度が高いと判断する。ELISA法に従ってPAI-1濃度を測定する場合、PAI-1濃度が例えば約4ng/ml以下、約3ng/ml以下、約2ng/ml以下、約1.6ng/ml以下、または約1ng/ml以下であるときに、被検者の流早産の発症危険度が高いと判断する。AlphaLISA法に従ってPAI-1濃度を測定する場合、PAI-1濃度が例えば約60ng/ml以下、約40ng/ml以下、約20ng/ml以下、または約10ng/ml以下であるときに、被検者の流早産の発症危険度が高いと判断する。

30

【0029】

本発明においては、1つの測定方法によって得られたPAI-1活性または濃度に基づいて被検者の流早産の発症危険度を判定してもよく、複数の測定方法によって得られたPAI-1活性または濃度に基づいて被検者の流早産の発症危険度を判定してもよい。

40

【0030】

3. 流早産の発症危険度判定用キット

本発明に係るキットは、上記2.欄で説明した流早産の発症危険度を判定する方法を実施するためのものであればよく、これに含まれる具体的な構成、材料、機器などは、特に限定されるものではない。

【0031】

本発明の一態様において、本発明のキットは、 α -トロロンピン、および塩化カルシウム等のカルシウムイオンを含む水溶液またはカオリンを含む。さらに、本発明のキットは、

50

酢酸緩衝液、トリス緩衝液、およびリン酸緩衝液等の緩衝液を含んでもよい。また、本発明のキットは、クエン酸ナトリウム緩衝液入りの採血管も含んでもよい。

【0032】

本発明の別の態様において、本発明のキットは、抗プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に対する抗体（一次抗体）を含む。抗体は、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 を認識できる抗体であればよく、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。また、場合によっては、抗体フラグメント、例えば Fab、Fab'、F(ab')₂ などを用いることもできる。さらに、本発明のキットは、固相担体、標準物質、および二次抗体を含んでもよい。また、本発明のキットは、さらに、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 の標準、希釈液、緩衝液、ならびに、抗原抗体複合体の検出反応のための基質および停止溶液を含むこともできる。

10

【0033】

固相担体としては、例えば、ガラス、プラスチック、天然もしくは修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、マグネタイト、または当業者によく知られているその他適した材料からなるものが挙げられ、該固相担体の形状としては、例えば、プレート、ウェル、スライド、ビーズ、粒子、チューブ、ファイバー、メンブレンの形としてもよい。また、標準物質としては、免疫学的方法において使用可能な物質であれば使用することができ、例えば、酵素、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。抗体は、固相担体に固定されていてもよい。

【0034】

本発明のキットは、さらに、二次抗体として、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に対する抗体に結合する抗体、または一次抗体とは異なるエピトープを認識するプラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に対する抗体を含んでもよい。二次抗体は、酵素、放射性同位体、蛍光色素、アビジン、ビオチンなどで標識されていてもよい。

20

【0035】

4. プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 を含む、流産を予防するための医薬組成物

本発明の医薬組成物は、主成分として、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 (PAI - 1) を含む。また、本発明の医薬組成物は、PAI - 1 と同等以上の活性を有する変異型プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 (変異型 PAI - 1) を主成分としてもよい。ここで、「同等の活性」とは、PAI - 1 が有する、プラスミノゲンアクチベータを不活化して線溶系を抑制する活性の強さが、実質的に同一であることを指し、「変異型プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1」とは、野生型 PAI - 1 のアミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加又は挿入を有するものを指す。上記「1個若しくは数個」とは、10以下の整数個、例えば1～10個程度、好ましくは1～5個程度である。

30

【0036】

また、本発明の医薬組成物は、早産および/または流産を予防するという効果を損なわない限り、薬学的に許容可能な担体、または剤型によって当該技術分野において一般的に使用される添加剤をさらに含んでもよい。添加剤として、例えば、着色剤、保存剤、風味剤、香り改善剤、呈味改善剤、甘味剤、または安定剤、その他薬学的に許容される添加剤を含有することができる。

40

【0037】

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て参照として本明細書に組み込まれる。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2011-249523号(2011年11月15日出願)の明細書および図面に記載の内容は全て参照として本明細書に組み込まれる。

【0038】

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

50

【実施例】

【0039】

1. PAI-1欠損症の患者における妊娠経過

(1) 1回目の妊娠

患者は、頻回の大量出血の発作を経験している47歳の女性である。最初の妊娠は26歳である。妊娠経過は順調で、胎児の成長は16週まで正常であった。妊娠16週の終わりに、少量の性器出血が観察され、患者は入院した。患者のプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、および血漿フィブリノゲン濃度は通常の範囲内であった（それぞれ13.0秒、34.9秒、および165mg/dL）。しかし、血漿D-ダイマー濃度が少し上昇していた（ $2.4\mu\text{g/mL}$ 、通常の範囲は $<0.5\mu\text{g/mL}$ ）。なお、D-ダイマーは、プラスミンによるフィブリン分解産物であり、D-ダイマーのモニタリングは、臨床病態において用いられる線溶動態解析法の一つである。新鮮凍結血漿（fresh frozen plasma (FFP)）を週に2回投与して、性器出血をコントロールし、妊娠を維持した。血漿D-ダイマー濃度は、妊娠18週の終わりに突然上昇し、妊娠19週に大量の性器出血が観察された。胎盤後方および周辺にエコーフリースペース（echo-free space）は観察されなかったが、胎児の心拍は停止し、患者の子宮頸部が完全に開いているのが発見された。血漿D-ダイマー濃度は減少し、性器出血は、胎児（220g）の除去から1週間後に止まった。流産した胎児は男児で、外見は正常だった。

10

【0040】

(2) 2回目の妊娠

2回目の妊娠は27歳の時である。妊娠7週に妊娠を確認後すぐに、患者は本発明者らの病院に入院した。妊娠8週に少量の性器出血が観察されたが、この妊娠は11週まで順調だった。妊娠11週の終わりから、持続的ではあるが少量の性器出血が観察されたため、週に2~3回のFFP投与を開始した。性器出血は妊娠20週で止まったが、FFPの投与を継続して妊娠を安定化した。妊娠28週で血漿D-ダイマー濃度が少し上昇したので、FFPの投与頻度を週に2~3回から一日おきに変更した。しかし、血漿D-ダイマー濃度は上昇を続け、妊娠32週で $128\mu\text{g/mL}$ に達し、超音波検査により、胎盤剥離を伴うコントロールできない子宮収縮が起きていると診断した。よって、緊急帝王切開を行い、患者は1736gの女児を出産した。手術前後の失血量は4500mLであり、これは42U FFPの投与によってコントロールした。

20

30

【0041】

(3) 3回目の妊娠

3回目の妊娠は29歳の時である。以前の妊娠において成功した管理に基づいて、患者は妊娠8週で入院し、継続的なFFPの投与を開始した。FFPは妊娠16週まで週2回投与し、妊娠19週まで徐々に増やした。妊娠20週の後、FFPの投与を毎日行った。今回の妊娠は、妊娠24週まで安定していたが、血漿D-ダイマー濃度は妊娠25週から継続的に上昇し、妊娠27週で $57.9\mu\text{g/mL}$ に達し、胎盤剥離を伴うコントロールできない子宮収縮が起きていると診断した。そこで再度緊急帝王切開を行い、患者は978gの女児を出産した。手術前後の失血量は1037mLだった。これら二人の娘は健康で、症状はなかった。

40

【0042】

(4) 小括

これらの結果から、PAI-1はヒトの妊娠維持のために重要な役割を果たすことが示された。したがって、PAI-1が低濃度であることは、ヒトにおける自然流産および/または早産のリスクファクターとなり得ると考えられる。

【0043】

2. PAI活性の測定

A. ユーグロブリンクロット溶解時間の測定方法

(1) PAI活性の測定法

50

クエン酸採血した患者血液を3000gで10分遠心して上清を採取し、これを血漿サンプルとした。この血漿を10mM、pH4.5の酢酸緩衝液で20倍に希釈し、4で1時間静置した。その後4、1500gで10分遠心し、沈渣を採取し、その沈渣を0.1M、pH7.4のトリス緩衝液で混和した。これをユーグロブリン分画とする。

【0044】

- トロンビン12.5U/ml(最終濃度)にユーグロブリン分画のサンプル150μlを添加した。その沈渣の溶解時間を測定した(Regular ECLT)。- トロンビン2.5U/ml(最終濃度)、カルシウムイオン10mM(最終濃度)の溶液にユーグロブリン分画のサンプル150μlを添加した。そしてその沈渣の溶解時間を測定した(Ca添加ECLT)。なお、カルシウムイオンの代替としてカオリン(カルシウムと同じ濃度)を添加しても可能である。

10

【0045】

(2) PAI活性(ユーグロブリン溶解時間)

絨毛膜下血腫により切迫早産または切迫流産をした患者および正常妊婦について、上記(1)の方法に従ってPAI活性(Ca添加ECLT)を測定した。結果を表1にまとめる。上記患者血液は、いずれも妊娠初期(~15週)の患者から採血したものである。

【0046】

【表1】

| 患者 | PAI活性 |
|-------------------|-------|
| 絨毛膜下血腫により切迫早産した患者 | 94分 |
| 絨毛膜下血腫により切迫流産した患者 | 181分 |
| 正常妊婦 症例1 | 426分 |
| 正常妊婦 症例2 | 418分 |
| 正常妊婦 症例3 | 462分 |

20

【0047】

さらに、絨毛膜下血腫の患者7名(うち、早産歴および/または流産歴のある患者は4名)、正常妊婦5名について、上記(1)と同じ方法に従ってPAI-1活性(ユーグロブリン溶解時間)を測定した結果を表2にまとめる。表2の測定値は、それぞれユーグロブリン溶解時間(Regular ECLT)と、カルシウムを添加した場合のユーグロブリン溶解時間(Ca添加ECLT)、ECLT比率(Regular ECLT/Ca添加ECLT)である。患者血液は、いずれも妊娠初期(~15週)の患者から採血したものである。

30

【0048】

【表 2】

| | 絨毛膜下血腫による | | 絨毛膜下血腫 の有無 | Regular ECLT[min] | Ca添加 ECLT[min] | ECLT比 |
|------------|-----------|-----|---------------|----------------------|-------------------|-------|
| | 流産歴 | 早産歴 | | | | |
| 症例1 | ○ | ○ | | 125 | 130 | 0.96 |
| 症例2 | ○ | ○ | | 155 | 145 | 1.07 |
| 症例3 | ○ | | ○ | 1090 | 240 | 4.54 |
| 症例4 | | ○ | ○ | 960 | 375 | 2.56 |
| 症例5 | | | ○ | 350 | 170 | 2.06 |
| 症例6 | | | ○ | 1200 | 525 | 2.29 |
| 症例7 | | | ○ | 500 | 290 | 1.72 |
| 妊婦A(妊娠10週) | | | | 1200 | 315 | 3.81 |
| 妊婦B(妊娠28週) | | | | >1200 | 215 | |
| 妊婦C(妊娠36週) | | | | >1200 | 470 | |
| 妊婦D(妊娠36週) | | | | >1200 | 910 | |
| 妊婦E(妊娠36週) | | | | >1200 | 625 | |

10

【0049】

(3) 測定結果について

以上の結果より、絨毛膜下血腫による流産・早産の既往または検体採取時に絨毛膜下血腫と診断されている症例(症例1~7)では、正常妊娠経過の症例と比較してユーグロブリン溶解時間が短い傾向がうかがわれた。

20

妊婦は一般に、凝固系が亢進し線溶系が抑制されており、これが妊娠維持と分娩時の止血に寄与していることがよく知られている。また、線溶系の抑制傾向は妊娠週の増加にともない強くなることも知られており、正常妊娠症例のRegular ECLTの値が非常に大きいこと(>1200を示すこと)および妊娠週の増加に伴いCa添加ECLTが大きくなることは、この線溶抑制を反映したものと考えられる。

【0050】

対して症例1~7ではユーグロブリン溶解時間は比較的短く、線溶抑制効果が正常妊娠症例ほどみられていない。Ca添加ECLTが短いことから、PAI-1の活性が低く線溶抑制が働いていないことが推測される。

30

【0051】

これより、ユーグロブリン溶解時間が500分以下の患者は、PAI-1活性が低く、絨毛膜下血腫を発症している可能性が高く、早産・流産の発症危険度があると考えられる。また、ユーグロブリン溶解時間が350分以下の患者については早産・流産の発症危険度が高いと考えられる。

【0052】

また、ユーグロブリン溶解時間とカルシウム添加時の短縮された溶解時間の比率(Regular ECLT/Ca添加ECLT)が4.0以下の患者は、PAI-1活性が低く、絨毛膜下血腫を発症している可能性が高く、早産・流産の発症危険度があると考えられる。上記比率が1.5以下の患者については早産・流産の発症危険度が高いと考えられる。

40

【0053】

B. ELISA法

(1) PAI活性の測定法

クエン酸採血した患者血液を3000gで10分遠心して上清を採取し、これを血漿サンプルとした。R&D Systems社のhuman Serpin E1/PAI-1 DuoSet Kitを使用し、下記の通りPAI-1濃度(抗原値)を測定した。

【0054】

捕獲抗体(マウス由来抗ヒトSerpin E1抗体)をリン酸緩衝生理食塩水で4μg/mLに希釈し、この捕獲抗体でマイクロプレートの各ウェルをコーティングした。キット添付のリコンビナントhuman Serpin E1を1%ウシ血清アルブミン含

50

有リン酸緩衝生理食塩水（以下、R.D.）で希釈し20 ng/mL ~ 0.3125 ng/mLに希釈し、PAI-1標準溶液とした。この標準溶液と患者血漿サンプルを捕獲抗体でコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに100 μLずつ滴下し、室温で2時間静置した後、洗浄バッファーで3回洗浄した。キット添付のビオチン化ヤギ由来抗ヒトSerpin E1抗体をR.D.で希釈し、加熱処理後正常ヤギ血清を2%添加し、400 ng/mLの検出抗体溶液を調整した。この検出抗体溶液を各ウェルに100 μLずつ滴下し、室温で2時間静置した後、洗浄バッファーで3回洗浄した。ストレプトアビジン（Streptavidin）つきHRP溶液を各ウェルに100 μLずつ滴下し、遮光して室温で20分間静置した後、洗浄バッファーで3回洗浄した。その後、20分間プレートを発色させ、反応停止液を添加した。マイクロプレートリーダーを用い、540 nmの波長でフィルターし450 nmの波長で吸光度を測定した。PAI-1標準溶液の既知濃度と吸光度からPAI-1濃度標準曲線を作成し、血漿サンプルのPAI-1濃度を算出した。

10

【0055】

(2) PAI活性 (PAI-1濃度)

絨毛膜下血腫により早産または流産をした患者および正常妊婦について、上記(1)の方法に従ってPAI-1濃度(抗原値)を測定した結果を表3にまとめる。上記患者血液は、いずれも妊娠初期(~15週)の患者から採血したものである。なお、症例1はPAI-1欠損症の患者である。

20

【0056】

【表3】

20

| | 絨毛膜下血腫による | | 絨毛膜下血腫の有無 | PAI-1濃度 [ng/mL] |
|--------------|-----------|-----|-----------|-----------------|
| | 流産歴 | 早産歴 | | |
| 症例1 | ○ | ○ | | 0.00 |
| 症例2 | ○ | ○ | | 1.53 |
| 症例3 | ○ | | ○ | 0.23 |
| 症例4 | | ○ | ○ | 1.12 |
| 症例5 | | | ○ | 1.82 |
| 症例6 | | | ○ | 0.60 |
| 症例7 | | | ○ | 1.52 |
| 正常妊婦F(妊娠10週) | | | | 5.15 |
| 正常妊婦G(妊娠20週) | | | | 4.73 |
| 非妊婦A | | | | 1.51 |
| 非妊婦B | | | | 0.90 |

30

40

【0057】

(3) 測定結果について

以上の結果より、絨毛膜下血腫による流産・早産の既往または検体採取時に絨毛膜下血腫と診断されている症例(症例1~7)では、正常妊娠経過の症例と比較してELISA法により測定されたPAI-1濃度が低い傾向がうかがわれた。

【0058】

これより、ELISA法を用いてPAI-1濃度(抗原値)を測定する場合、PAI-1濃度が4 ng/mL以下の患者は、PAI-1活性が低く、絨毛膜下血腫を発症している可能性が高く、早産・流産の発症危険度があると考えられる。また、PAI-1濃度(抗原値)が1.6 ng/mL以下の患者については早産・流産の発症危険度が非常に高い

50

と考えられる。

【0059】

C . A l p h a L I S A 法

(1) P A I 活性の測定法

A l p h a L I S A は、ビオチン化抗 P A I - 1 抗体が結合したストレプトアビジンドナービーズと抗 P A I - 1 抗体が化学結合した A l p h a L I S A アクセプタービーズを用いた濃度測定法である。P A I - 1 が両者のビーズに結合すると、2 種のビーズが近接し、励起光 6 8 0 n m を照射するとドナービーズ中の光感受性物質が周囲の酸素を一重項励起状態にし、近接したアクセプタービーズ内で化学反応を起こし、波長 6 1 5 n m の発光が検出される。発光シグナルはサンプル中の P A I - 1 量に比例するため、標準曲線を用いた解析により P A I - 1 濃度の定量が可能となる。

10

【0060】

クエン酸採血した患者血液を 3 0 0 0 g で 1 0 分遠心して上清を採取し、これを血漿サンプルとした。この血漿を P e r k i n E l m e r 社の A l p h a L I S A H u m a n P l a s m i n o g e n A c t i v a t o r I n h i b i t o r - 1 (P A I - 1) K i t を用いて、下記通り P A I - 1 濃度を測定した。

【0061】

キット添付の A l p h a L I S A h u m a n P A I - 1 をウシ胎児血清で希釈し 1 0 0 0 n g / m L ~ 0 . 0 0 3 n g / m L の P A I - 1 標準溶液を調整した。また、患者血漿サンプルをウシ胎児血清で 2 倍希釈した。マイクロプレートに 5 μ L の P A I - 1 標準溶液と希釈済血漿サンプルを滴下した。さらに 1 0 μ L の A l p h a L I S A A n t i - P A I - 1 A c c e p t o r b e a d s (最終濃度 1 0 μ g / m L) を滴下し 2 3 で 3 0 分間静置した。その後、1 0 μ L の B i o t y n y l a t e d A n t i b o d y A n t i - P A I - 1 (最終濃度 1 n M) を滴下し 6 0 分間静置した。最後に 2 5 μ L の S t r e p t a v i c i n - c o a t e d D o n o r b e a d s (最終濃度 4 0 μ g / m L) を滴下し、遮光したうえ 2 3 で 3 0 分間静置した後、6 8 0 n m の励起光を照射し検出された 6 1 5 n m の発光シグナルを得た。P A I - 1 標準溶液からの発光シグナルをもとに P A I - 1 濃度の標準曲線を作成し、血漿サンプルの P A I - 1 濃度を算出した。

20

【0062】

(2) P A I 活性 (P A I - 1 濃度)

絨毛膜下血腫により早産または流産をした患者 (2 名) および正常妊婦 (2 名) 、非妊婦 (2 名) について、上記 (1) の方法に従って P A I - 1 濃度 (抗原値) を測定した結果を表 4 にまとめる。上記患者血液は、いずれも妊娠初期 (~ 2 0 週) の患者から採血したものである。なお、症例 1 は P A I - 1 欠損症の患者である。

30

【0063】

【表 4】

| | 絨毛膜下血腫による | | 絨毛膜下血腫の有無 | PAI-1濃度 [ng/mL] |
|----------------|-----------|-----|-----------|-----------------|
| | 流産歴 | 早産歴 | | |
| 症例 1 | ○ | ○ | | 0.06 |
| 症例 4 | | ○ | ○ | 23.57 |
| 正常妊婦 H (妊娠15週) | | | | 129.24 |
| 正常妊婦 I (妊娠20週) | | | | 94.44 |
| 非妊婦 C | | | | 22.30 |
| 非妊婦 D | | | | 18.28 |

40

50

【0064】

(3) 測定結果について

以上の結果より、非妊婦と比較して妊婦ではPAI-1濃度が高く、絨毛膜下血腫による流産・早産例ではPAI-1濃度が明らかに低いことがわかる。これより、AlphaLISA法を用いてPAI-1濃度(抗原値)を測定する場合、PAI-1濃度が60ng/Lg以下の患者は、PAI-1活性が低く、絨毛膜下血腫を発症している可能性が高く、早産・流産の発症危険度があると考えられる。また、PAI-1濃度(抗原値)が20ng/Lg以下の患者については早産・流産の発症危険度が非常に高いと考えられる。

【0065】

(4) AlphaLISA法の改変

AlphaLISAでのPAI-1濃度測定法を改変し、ビオチン化抗PAI-1抗体の代わりにビオチン化uPAを用いることで、サンプル中の活性をもったPAI-1のみがドナービーズ・アクセプタービーズの2種のビーズと結合し、結果としてPAI-1活性を測定することが可能である。この方法を用いることで、PAI-1活性をより高感度に測定することが可能となり、これまで記した他の測定法同様、絨毛膜下血腫に起因する流産・早産の早期発見に有用であると考えられる。

【0066】

D. 小括

以上より、ユーグロブリン溶解時間を測定する方法、PAI-1抗原値を測定する方法のいずれの結果においてもPAI活性と絨毛膜下血腫による流早産とは相関があり、正常妊婦よりもPAI活性が低い場合に線溶系が亢進し、絨毛膜下血腫に起因する流早産が起こりやすいことがわかる。

【0067】

今回の結果では、ELISA法とAlphaLISA法との間でPAI-1濃度の測定値に誤差を認める。これは測定法の違いにより良好な感度を得られる範囲(測定可能域)が異なること、測定時の標準曲線が異なること、免疫学的手法における使用抗体が同一でないことなどの理由が考えられる。今回、ELISA法による測定で利用したR&D Systems社のhuman Serpin E1/PAI-1 DuoSet KitのPAI-1濃度の測定領域は2ng/ml以上であり、今回の症例サンプルの測定結果はいずれもその領域から外れたものとなっている。

しかしながらいずれの測定法においてもPAI-1活性と絨毛膜下血腫による流早産に相関がある点については矛盾なく示されているので、PAI活性または濃度の測定は絨毛膜下血腫による流早産の予知には有用な検査であると考えられる。

【0068】

実施例においては、本発明の早産または流産の発症危険度を判定する方法として、ユーグロブリンクロット溶解時間、Caを添加しない場合とCaを添加した場合のユーグロブリンクロット溶解時間の比、ELISA法により測定したPAI-1濃度、およびAlphaLISA法により測定したPAI-1濃度に基づいてPAI-1活性を評価し、早産または流産の発症危険度を判定する方法を例示したが、妊婦のPAI-1活性または濃度を測定できる方法であればよく、上記方法に限定されるものではない。

また、早産または流産の発症危険度を判定する方法は、上記した1つの測定方法で得られたPAI-1活性に基づいて判定を行うものであっても、複数の測定方法で得られたPAI-1活性に基づいて判定するものであってもよい。

【産業上の利用可能性】

【0069】

本発明を用いると、従来、超音波断層法による画像診断でしか診断できなかった絨毛膜下血腫を、血液学的に診断することが可能となるため、早期に診断することおよび診断の精度を向上させることができる。また、本発明を用いると、絨毛膜下血腫が発生した場合であっても、妊娠を維持し、流早産を防ぐことができる。

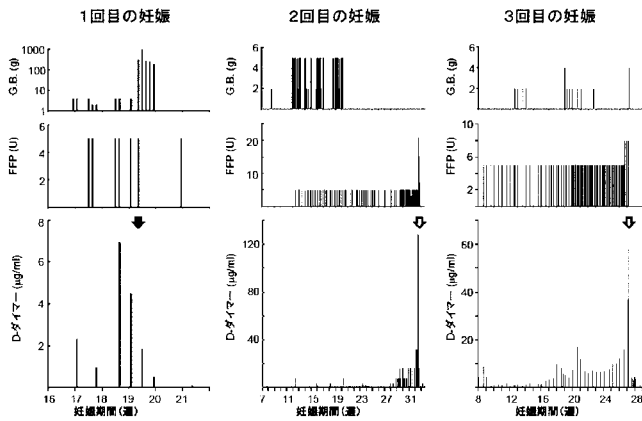
10

20

30

40

【 図 1 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成25年2月28日(2013.2.28)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

被検者より単離された血漿中のプラスミノゲンアクチベーター活性または濃度を測定する手順と、
前記活性または前記濃度が所定値よりも低い場合に早産または流産を起こす危険性が高いと判断する手順と、
を含む、早産または流産の発症危険度を診断する方法。

【 請求項 2 】

血漿中のプラスミノゲンアクチベーター活性を、ユーグロブリン溶解時間を指標として測定する、請求項 1 に記載の方法。

【 請求項 3 】

ユーグロブリン溶解時間が 500 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、請求項 2 に記載の方法。

【 請求項 4 】

ユーグロブリン溶解時間が 350 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【 請求項 5 】

血漿にカルシウムを添加してユーグロブリン溶解時間を測定する工程、および、カルシ

ウムを添加しない場合のユーグロブリン溶解時間とカルシウムを添加した場合のユーグロブリン溶解時間との比率を求める工程をさらに含み、当該比率に基づいて早産または流産を起こす危険性が高いと判断する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を用いた免疫学的な測定方法によって測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を E L I S A 法によって測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を A l p h a L I S A 法によって測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

- トロンピン、およびカルシウムイオンまたはカオリンを含む水溶液を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

【請求項 11】

プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

【請求項 12】

早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、請求項 10 または 11 に記載のキット。

【請求項 13】

プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 を含む、早産または流産を予防するための医薬組成物。

【請求項 14】

早産または流産が、絨毛膜下血腫に起因する早産または流産である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【手続補正書】

【提出日】平成26年5月20日(2014.5.20)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検者より単離された血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性または濃度を測定する手順と、前記活性または前記濃度が所定値よりも低い場合に早産または流産を起こす危険性が高いと決定する手順と、を含む、早産または流産の発症危険度を判定する方法。

【請求項 2】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性を、ユーグロブリン溶解時間を指標として測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ユーグロブリン溶解時間が 500 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が

高いと決定する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ユーグロブリン溶解時間が 350 分以下であるときに早産または流産を起こす危険性が高いと決定する、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

血漿にカルシウムを添加してユーグロブリン溶解時間を測定する工程、および、カルシウムを添加しない場合のユーグロブリン溶解時間とカルシウムを添加した場合のユーグロブリン溶解時間との比率を求める工程をさらに含み、当該比率に基づいて早産または流産を起こす危険性が高いと決定する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を、プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を用いた免疫学的な測定方法によって測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を E L I S A 法によって測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター濃度を A l p h a L I S A 法によって測定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

早産または流産が、絨毛膜下血腫または胎盤剥離に起因する早産または流産である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

- トロンピン、およびカルシウムイオンまたはカオリンを含む水溶液を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

【請求項 11】

プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 に結合する抗体を含む、早産または流産の発症危険度診断用キット。

【請求項 12】

早産または流産が、絨毛膜下血腫または胎盤剥離に起因する早産または流産である、請求項 10 または 11 に記載のキット。

【請求項 13】

プラスミノゲンアクチベータインヒビター - 1 を含む、早産または流産を予防するための医薬組成物。

【請求項 14】

早産または流産が、絨毛膜下血腫または胎盤剥離に起因する早産または流産である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

抗 P A I - 1 抗体を結合したドナービーズおよび u P A を結合したアクセプタービーズ、または u P A を結合したドナービーズおよび抗 P A I - 1 抗体を結合したアクセプタービーズを用いて A l p h a L I S A 法を実施する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

u P A を結合したドナービーズおよび抗 P A I - 1 抗体を結合したアクセプタービーズを用いて A l p h a L I S A 法を実施する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

被検者より単離された血漿中のプラスミノゲンアクチベータインヒビター活性または濃度を測定する方法であって、抗 P A I - 1 抗体を結合したドナービーズおよび u P A を結合したアクセプタービーズ、または u P A を結合したドナービーズおよび抗 P A I - 1 抗体を結合したアクセプタービーズを用いて A l p h a L I S A 法を実施する、該方法。

【請求項 18】

u P A を結合したドナービーズおよび抗 P A I - 1 抗体を結合したアクセプタービーズを用いて A l p h a L I S A 法を実施する、請求項 1 7 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

(3) 測定結果について

以上の結果より、非妊婦と比較して妊婦では P A I - 1 濃度が高く、絨毛膜下血腫による流産・早産例では P A I - 1 濃度が明らかに低いことがわかる。これより、A l p h a L I S A 法を用いて P A I - 1 濃度（抗原値）を測定する場合、P A I - 1 濃度が 60 ng / mL 以下の患者は、P A I - 1 活性が低く、絨毛膜下血腫を発症している可能性が高く、早産・流産の発症危険度があると考えられる。また、P A I - 1 濃度（抗原値）が 20 ng / mL 以下の患者については早産・流産の発症危険度が非常に高いと考えられる。

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2012/007348 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/86(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P15/06(2006.01)i, C07K14/81(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i 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) G01N33/86, A61K45/00, A61P15/06, C07K14/81, C12N15/09, G01N33/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | JP 2010-510793 A (Diagnostica Stago), 08 April 2010 (08.04.2010), claim 20; paragraph [0033] & US 2011/0306058 A1 & EP 2089536 A | 10 |
| X | JP 2010-508306 A (Alcon Research, Ltd.), 18 March 2010 (18.03.2010), claim 6 & US 2008/0107644 A1 & EP 2077829 A | 11-14 |
| A | Mark Phillippe, Expression of Coagulation- Related Protein Genes During LPS-Induced Preterm Delivery in the Pregnant Mouse, Reproductive Sciences, 2011.06.21, Vol.18/No.11, 1071-1079 | 3,4,10-14 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 27 December, 2012 (27.12.12) | | Date of mailing of the international search report 15 January, 2013 (15.01.13) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/007348

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | Palomba, Plasminogen activator inhibitor 1 and miscarriage after metformin treatment and laparoscopic ovarian drilling in patients with polycystic ovary syndrome, Fertility and Sterility, 2005.09, Vol.84/No.3, 761-765 | 3,4,10-14 |
| A | Tetsumei URANO, "Fibrinolytic System", JAPANESE COLLEGE of ANGIOLOGY, 03 October 2011 (03.10.2011), vol.51, no.3, 293 to 299 | 3,4,10-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/007348

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.: 1, 2, 5-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. 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 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

International application No.

PCT/JP2012/007348

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claims 1, 2 and 5 to 9 pertain to "a method for forecasting the onset risk of early delivery or abortion" that is a diagnostic method to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1 of the Regulations under the PCT, to search.

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 0 7 3 4 8 | | | | | | | | | |
|---|---|--|---------------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/86(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P15/06(2006.01)i, C07K14/81(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i | | | | | | | | | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/86, A61K45/00, A61P15/06, C07K14/81, C12N15/09, G01N33/68 | | | | | | | | | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2012年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2012年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2012年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2012年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2012年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2012年 | | | | | | | | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN) | | | | | | | | | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | | | | | | | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 | | | | | | | | | |
| X | JP 2010-510793 A (ディアグノスティカ スタガー) 2010.04.08, 【請求項20】【0033】 & US 2011/0306058 A1 & EP 2089536 A | 10 | | | | | | | | | |
| X | JP 2010-508306 A (アルコン リサーチ, リミテッド) 2010.03.18, 【請求項6】 & US 2008/0107644 A1 & EP 2077829 A | 11-14 | | | | | | | | | |
| A | Mark Phillippe, Expression of Coagulation-Related Protein Genes During LPS-Induced Preterm Delivery in the Pregnant Mouse, Reproductive Sciences, 2011.06.21, Vol.18/No.11, 1071-1079 | 3, 4, 10-14 | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | | | | | | | | | |
| * 引用文献のカテゴリー | | の日の後に公表された文献 | | | | | | | | | |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの | | | | | | | | | |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 27.12.2012 | | 国際調査報告の発送日 15.01.2013 | | | | | | | | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 将志 | 2 J 4 6 3 6 | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 内線 3252 | | | | | | | | | |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/007348

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| A | Palomba, Plasminogen activator inhibitor 1 and miscarriage after metformin treatment and laparoscopic ovarian drilling in patients with polycystic ovary syndrome, Fertility and Sterility, 2005.09, Vol.84/No.3, 761-765 | 3, 4, 10-14 |
| A | 浦野哲盟, 線溶機序, JAPANESE COLLEGE of ANGIOLOGY, 2011.10.03, Vol.51/No.3, 293-299 | 3, 4, 10-14 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 0 7 3 4 8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1,2,5-9 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項1,2,5-9は「早産または流産の発症危険度を診断する方法」という人間を診断する方法であり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | | | F I | | | テーマコード(参考) |
|--------------------------------|--|--|---------|-------|--|------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | | | C 1 2 N | 15/00 | | A |
| A 6 1 K 38/55 (2006.01) | | | A 6 1 K | 37/64 | | |
| A 6 1 P 15/06 (2006.01) | | | A 6 1 P | 15/06 | | |

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

- (72) 発明者 金山 尚裕
静岡県浜松市東区半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 国立大学法人浜松医科大学内
- (72) 発明者 梅村 和夫
静岡県浜松市東区半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 国立大学法人浜松医科大学内
- (72) 発明者 岩城 孝行
静岡県浜松市東区半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 国立大学法人浜松医科大学内
- (72) 発明者 浦野 哲盟
静岡県浜松市東区半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 国立大学法人浜松医科大学内
- (72) 発明者 伊熊 ことみ
静岡県浜松市東区半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 国立大学法人浜松医科大学内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA36
4B024 AA01 BA19 CA01 CA11
4C084 AA02 BA44 DC32 NA14 ZA812
4H045 BA10 CA40 DA56 EA20

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 纤溶酶原激活物抑制剂-1，早产儿流产的流产 | | |
| 公开(公告)号 | JPWO2013073191A1 | 公开(公告)日 | 2015-04-02 |
| 申请号 | JP2013544140 | 申请日 | 2012-11-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国立大学法人浜松医科大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 国立大学法人浜松医科大学 | | |
| [标]发明人 | 金山尚裕 梅村和夫 岩城孝行 浦野哲盟 伊熊ことみ | | |
| 发明人 | 金山 尚裕 梅村 和夫 岩城 孝行 浦野 哲盟 伊熊 ことみ | | |
| IPC分类号 | G01N33/86 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/536 C07K14/81 C12N15/09 A61K38/55 A61P15/06 | | |
| CPC分类号 | A61K38/57 C07K14/8132 G01N33/689 G01N2333/8132 G01N2800/368 A61P15/06 G01N33/54306 | | |
| FI分类号 | G01N33/86 G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/536.C C07K14/81 C12N15/00.A A61K37/64 A61P15/06 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/BA19 4B024/CA01 4B024/CA11 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZA812 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA56 4H045/EA20 | | |
| 代理人(译) | 田中玲子 松任谷裕子 北野 健 | | |
| 优先权 | 2011249523 2011-11-15 JP | | |
| 其他公开文献 | JP5924625B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)
 诊断早产或流产风险的方法技术领域本发明涉及诊断早产或流产风险的方法，该方法包括测量血浆中纤溶酶原激活剂抑制剂的活性或浓度。具体地，一种诊断早产或流产风险的方法，其特征在于，当纤溶酶原激活物抑制剂的活性或浓度低于正常孕妇早产时，确定早产或流产的风险较高。或者，本发明涉及一种用于诊断流产风险的试剂盒和一种用于预防早产或流产的包含纤溶酶原激活物抑制剂-1的药物组合物。

| | | |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| (19) 日本国特許庁(JP) | 再公表特許(A1) | (11) 国際公開番号 WO2013/073191 |
| 発行日 平成27年4月2日(2015.4.2) | (43) 国際公開日 平成25年5月23日(2013.5.23) | |
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード(参考) |
| GO 1 N 33/86 (2006.01) | GO 1 N 33/86 | 2 G 0 4 5 |
| GO 1 N 33/68 (2006.01) | GO 1 N 33/68 | 4 B 0 2 4 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | 4 C 0 8 4 |
| GO 1 N 33/536 (2006.01) | GO 1 N 33/536 | D 4 H 0 4 5 |
| CO 7 K 14/81 (2006.01) | CO 7 K 14/81 | |
| | 審査請求 有 予備審査請求 有 (全26頁) 最終頁に続く | |
| 出願番号 特願2013-544140(P2013-544140) | (71) 出願人 504300181 | |
| (21) 国際出願番号 PCI/JP2012/007348 | 国立大学法人浜松医科大学 | |
| (22) 国際出願日 平成24年11月15日(2012.11.15) | 静岡県浜松市東区半田山一丁目2-0番1号 | |
| (31) 優先権主張番号 特願2011-249523(P2011-249523) | (74) 代理人 弁理士 大野 聖二 | |
| (32) 優先日 平成23年11月15日(2011.11.15) | 弁理士 100105981 | |
| (33) 優先権主張国 日本国(JP) | (74) 代理人 弁理士 田中 玲子 | |
| | 弁理士 100119183 | |
| | (74) 代理人 弁理士 松任谷 優子 | |
| | 弁理士 100114465 | |
| | (74) 代理人 弁理士 北野 健 | |
| | 弁理士 100156915 | |
| | (74) 代理人 弁理士 伊藤 奈月 | |
| | 弁理士 100156915 | |
| | 最終頁に続く | |
| (54) 【発明の名称】 プラスミノゲンアクチベーター-1による流産、早産治療薬 | | |