

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-519564

(P2015-519564A)

(43) 公表日 平成27年7月9日(2015.7.9)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G O 1 N 33/68	(2006.01)	G O 1 N 33/68		2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁)

(21) 出願番号 特願2015-511614 (P2015-511614)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月7日 (2013.5.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年1月6日 (2015.1.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/039918
 (87) 国際公開番号 W02013/169751
 (87) 国際公開日 平成25年11月14日 (2013.11.14)
 (31) 優先権主張番号 61/644, 254
 (32) 優先日 平成24年5月8日 (2012.5.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/731, 640
 (32) 優先日 平成24年11月30日 (2012.11.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512312727
 ザ ボード オブ トラストィーズ オブ
 ザ レランド スタンフォード ジュニ
 ア ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 94306-1106
 カリフォルニア州 パロ・アルト エル・
 カミノ・リアル 1705
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人
 (72) 発明者 ビュート, アトゥール ジェイ.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
 025, メンロ パーク, モントレー ア
 ベニュー 2020

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子癇前症評価を提供するための方法および組成物

(57) 【要約】

子癇前症マーカー、子癇前症マーカーパネル、および試料の子癇前症マーカーレベル表示を得るための方法が提供される。これらの組成物および方法は、例えば、子癇前症の診断、子癇前症の予後診断、子癇前症を有する対象の監視、および子癇前症に対する処置の決定を含む、多くの用途における使用が見出される。さらに、主題の方法の実践における使用が見出される系、デバイスおよびそのキットが提供される。

【選択図】 図 1

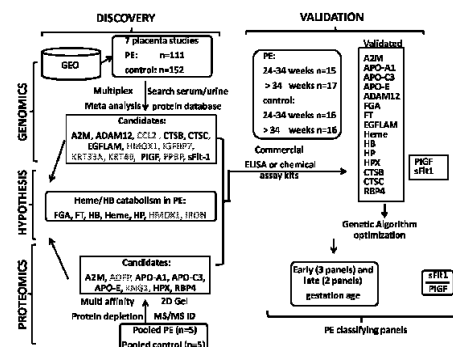


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の子癰前症マーカーレベル表示を提供する方法であって、

対象からの血液試料中の子癰前症マーカーのパネルを評定し、前記血液試料中の各子癰前症マーカーのレベルを決定することと、

前記パネル中の各子癰前症マーカーの前記レベルに基づいて、前記子癰前症マーカーレベル表示を計算することを含む方法。

【請求項 2】

1 つ以上の前記子癰前症マーカーは、ヘモペキシン (H P X)、フェリチン (F T)、カテプシン B (C T S B)、カテプシン C (C T S C)、A D A Mメタロペプチダーゼドメイン 1 2 (A D A M 1 2)、ハプトグロビン (H P)、アルファ - 2 - マクログロブリン (A 2 M)、アポリポタンパク質 E (A p o E)、アポリポタンパク質 C - I I I (A p o C 3)、アポリポタンパク質 A - I (A p o A 1)、レチノール結合タンパク質 4 (R B P 4)、ヘモグロビン (H B)、フィブリノゲンアルファ (F G A)、ピカチュリン (E G F L A M) およびヘムからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

子癰前症マーカーの前記パネルは、ピカチュリンおよび / またはカテプシン C を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

子癰前症マーカーの前記パネルは、ピカチュリン、ヘモペキシン、A p o A 1、A p o C 3、R B P 4 およびハプトグロビンを含む、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記子癰前症マーカーレベル表示の報告を提供することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記子癰前症マーカー表示は、子癰前症スコアである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

ヘモペキシン (H P X)、フェリチン (F T)、カテプシン B (C T S B)、カテプシン C (C T S C)、A D A Mメタロペプチダーゼドメイン 1 2 (A D A M 1 2)、ハプトグロビン (H P)、アルファ - 2 - マクログロブリン (A 2 M)、アポリポタンパク質 E (A p o E)、アポリポタンパク質 C - I I I (A p o C 3)、アポリポタンパク質 A - I (A p o A 1)、レチノール結合タンパク質 4 (R B P 4)、ヘモグロビン (H B)、フィブリノゲンアルファ (F G A)、ピカチュリン (E G F L A M) およびヘムからなる群から選択される 1 つ以上の子癰前症マーカーを含む、子癰前症マーカーのパネル。

30

【請求項 8】

前記パネルは、ピカチュリンおよび / またはカテプシン C を含む、請求項 7 に記載のパネル。

【請求項 9】

前記パネルは、ピカチュリン、ヘモペキシン、A p o A 1、A p o C 3、R B P 4、およびハプトグロビンを含む、請求項 7 に記載のパネル。

40

【請求項 10】

対象の子癰前症診断を提供するための方法であって、

対象からの試料の子癰前症マーカーレベル表示を得ることと、

前記子癰前症マーカーレベル表示に基づいて、前記対象の子癰前症診断を提供することを含む方法。

【請求項 11】

前記子癰前症マーカーレベル表示は、ヘモペキシン (H P X)、フェリチン (F T)、カテプシン B (C T S B)、カテプシン C (C T S C)、A D A Mメタロペプチダーゼドメイン 1 2 (A D A M 1 2)、ハプトグロビン (H P)、アルファ - 2 - マクログロブリン (A 2 M)、アポリポタンパク質 E (A p o E)、アポリポタンパク質 C - I I I (A

50

p o C 3)、アポリポタンパク質 A - I (A p o A 1)、レチノール結合タンパク質 4 (R B P 4)、ヘモグロビン (H B)、フィブリノゲンアルファ (F G A)、ピカチュリン (E G F L A M)、およびヘムからなる群から選択される 1 つ以上のマーカーを含む子癇前症マーカーのパネル中の子癇前症マーカーの前記レベルに基づく、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

子癇前症マーカーの前記パネルは、ピカチュリンおよび / またはカテプシン C を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

子癇前症マーカーの前記パネルは、ピカチュリン、ヘモペキシン、A p o A 1、A p o C 3、R B P 4 およびハプトグロビンを含む、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 14】

前記対象は、子癇前症の症状を有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記対象は、子癇前症に対して無症状性である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記対象は、子癇前症に関連したリスク因子を有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試料は、妊娠 20 週目以降において回収される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

前記試料は、妊娠 34 週目以降において回収される、請求項 10 に記載の方法。

20

【請求項 19】

前記子癇前症マーカーレベル表示を、子癇前症表現型決定要素と比較することと、その比較に基づいて前記対象の子癇前症診断を提供することとをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 20】

子癇前症診断を作成するためのキットであって、

(a) ヘモペキシン (H P X)、フェリチン (F T)、カテプシン B (C T S B)、カテプシン C (C T S C)、A D A M メタロペプチダーゼドメイン 12 (A D A M 12)、ハプトグロビン (H P)、アルファ - 2 - マクログロブリン (A 2 M)、アポリポタンパク質 E (A p o E)、アポリポタンパク質 C - I I I (A p o C 3)、アポリポタンパク質 A - I (A p o A 1)、レチノール結合タンパク質 4 (R B P 4)、ヘモグロビン (H B)、フィブリノゲンアルファ (F G A)、およびピカチュリン (E G F L A M) ならびにヘムからなる群から選択される 1 つ以上のマーカーを含む子癇前症マーカーのパネルに対する、試料中のマーカーの量を測定するための 1 つ以上の検出要素と、

30

(b) 子癇前症表現型決定要素とを備えるキット。

【請求項 21】

子癇前症マーカーの前記パネルは、ピカチュリンおよび / またはカテプシン C を含む、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

40

子癇前症マーカーの前記パネルは、ピカチュリン、ヘモペキシン、A p o A 1、A p o C 3、R B P 4 およびハプトグロビンを含む、請求項 20 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

35 U . S . C . § 119 (e) に従い、本出願は、2012 年 5 月 8 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 644,254 号、および 2012 年 11 月 30 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 731,640 号の出願日に対する優先権を主張し、それらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

50

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明は、子癇前症評価の提供に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

子癇前症は、母親および子供に悪影響を有する、重篤な妊娠の多重合併症である。この障害の発生率は、米国および世界中において、全ての妊娠の約 5 ~ 8 % であり、この障害は、米国における全ての妊産婦死亡の 1 8 % を占める。子癇前症の原因および病因は未だに不明確であり、診断は、疾患プロセスの後期に生じる非特異的な実験的および臨床的兆候および症状に依存し、時折診断および臨床管理における決断を困難なものとする。より早期の、より信頼性のある疾患診断、予後診断および監視が、より時宜を得た、個人に合わせた子癇前症処置をもたらし、子癇前症の病因に関する我々の理解を大幅に前進させることだろう。本発明は、これらの問題に対応する。

10

【 発明の概要 】

【 0 0 0 4 】

子癇前症マーカー、子癇前症マーカーパネル、および試料の子癇前症マーカーレベル表示を得るための方法が提供される。これらの組成物および方法は、例えば、子癇前症の診断、子癇前症の予後診断、子癇前症を有する対象の監視、および子癇前症に対する処置の決定を含む、多くの用途における使用が見出される。さらに、主題の方法の実践における使用が見出される系、デバイスおよびそのキットが提供される。

20

【 0 0 0 5 】

本発明のいくつかの態様において、子癇前症マーカーのパネルが提供され、パネルは、ヘモベキシン (H P X)、フェリチン (F T)、カテプシン B (C T S B)、カテプシン C (C T S C)、A D A M メタロペプチダーゼドメイン 1 2 (A D A M 1 2)、ハプトグロビン (H P)、アルファ - 2 - マクログロブリン (A 2 M)、アポリポタンパク質 E (A p o E)、アポリポタンパク質 C - I I I (A p o C 3)、アポリポタンパク質 A - I (A p o A 1)、レチノール結合タンパク質 4 (R B P 4)、ヘモグロビン (H B)、フィブリノゲンアルファ (F G A)、ピカチュリン (E G F L A M) およびヘムからなる群から選択される 1 つ以上の子癇前症マーカーを含む。いくつかの実施形態において、パネルは、ピカチュリンおよび / またはカテプシン C を含む。いくつかの実施形態において、パネルは、ピカチュリン、ヘモベキシン、A p o A 1、A p o C 3、R B P 4、およびハプトグロビンを含む。

30

【 0 0 0 6 】

本発明のいくつかの態様において、対象の子癇前症マーカーレベル表示を提供するための方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、対象からの血液試料中の子癇前症マーカーのパネルを評定し、血液試料中の各子癇前症マーカーのレベルを決定することと、パネル中の各子癇前症マーカーのレベルに基づいて、子癇前症マーカーレベル表示を計算することとを含む。いくつかの実施形態において、パネルは、ヘモベキシン (H P X)、フェリチン (F T)、カテプシン B (C T S B)、カテプシン C (C T S C)、A D A M メタロペプチダーゼドメイン 1 2 (A D A M 1 2)、ハプトグロビン (H P)、アルファ - 2 - マクログロブリン (A 2 M)、アポリポタンパク質 E (A p o E)、アポリポタンパク質 C - I I I (A p o C 3)、アポリポタンパク質 A - I (A p o A 1)、レチノール結合タンパク質 4 (R B P 4)、ヘモグロビン (H B)、フィブリノゲンアルファ (F G A)、ピカチュリン (E G F L A M) およびヘムからなる群から選択される、1 つ以上の子癇前症マーカーを含む。いくつかの実施形態において、パネルは、ピカチュリンおよび / またはカテプシン C を含む。いくつかの実施形態において、パネルは、ピカチュリン、ヘモベキシン、A p o A 1、A p o C 3、R B P 4、およびハプトグロビンを含む。いくつかの実施形態において、方法は、子癇前症マーカーレベル表示の報告を提供することをさらに含む。ある特定の実施形態において、子癇前症マーカー表示は、子癇前症スコアである。

40

50

【0007】

本発明のいくつかの態様において、対象の子癇前症評価を提供するための方法が提供される。いくつかの実施形態において、子癇前症評価は、子癇前症の診断である。いくつかの実施形態において、方法は、例えば上述のように、または本明細書のいずれかに記載のように、対象からの試料の子癇前症マーカーレベル表示を得ることと、子癇前症マーカーレベル表示に基づいて、対象の子癇前症診断を提供することを含む。いくつかの実施形態において、方法は、子癇前症マーカーレベル表示を、子癇前症表現型決定要素と比較することと、その比較に基づいて対象の子癇前症診断を提供することとをさらに含む。いくつかの実施形態において、対象は、子癇前症の症状を有する。他の実施形態において、対象は、子癇前症に対して無症状性である。いくつかの実施形態において、対象は、子癇前症に関連した1つ以上のリスク因子を有する。他の実施形態において、対象は、子癇前症に関連したリスク因子を有さない。いくつかの実施形態において、試料は、妊娠20週目以降において回収される。ある特定の実施形態において、試料は、妊娠34週目以降において回収される。

10

【0008】

本発明のいくつかの態様において、試料の子癇前症評価を作成するためのキットが提供される。いくつかの実施形態において、子癇前症評価は、子癇前症診断である。いくつかの実施形態において、キットは、ヘモペキシン(HPX)、フェリチン(FT)、カテプシンB(CTSB)、カテプシンC(CTSC)、ADAMメタロペプチダーゼドメイン12(ADAM12)、ハプトグロビン(HP)、アルファ-2-マクログロブリン(A2M)、アポリポタンパク質E(ApoE)、アポリポタンパク質C-III(ApoC3)、アポリポタンパク質A-I(ApoA1)、レチノール結合タンパク質4(RBP4)、ヘモグロビン(HB)、フィブリノゲンアルファ(FGA)、ピカチュリン(EGFLAM)およびヘムからなる群から選択される1つ以上のマーカーを含む子癇前症マーカーのパネルに対する、試料中のマーカーの量を測定するための1つ以上の検出要素と、子癇前症表現型決定要素とを備える。いくつかの実施形態において、1つ以上の検出要素は、試料中のマーカーポリペプチドのレベルを検出する。いくつかの実施形態において、子癇前症マーカーのパネルは、ピカチュリンおよび/またはカテプシンCを含む。いくつかの実施形態において、子癇前症マーカーのパネルは、ピカチュリン、ヘモペキシン、ApoA1、ApoC3、RBP4およびハプトグロビンを含む。

20

30

【0009】

本発明は、付属の図面と併せて読めば、以下の発明を実施するための形態から最も良く理解される。特許または出願書類は、少なくとも1つのカラー図面を含む。カラー図面を含む本特許または特許出願公開の複写は、要請および必要な料金の支払により特許庁より提供される。習慣により、図面の様々な特徴は実寸ではないことが強調される。逆に、様々な特徴の寸法は、明確化のために任意に拡大または縮小される。図面には、以下の図が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】PEバイオマーカーのマルチ「オミックス」ベースの発見および検証の研究概略である。後の検証に不合格となった候補検体は、灰色で示されている。

40

【図2】PEバイオマーカーの発現比較解析である(PE対対照)。フォレストプロットは、胎盤mRNA発現メタ解析、ならびに異なる早期および後期妊娠期間週における母体血清検体存在量定量化の結果を要約している。ラインプロットは、95%信頼区間を表す。

【図3】早期または後期発生バイオマーカーパネルスコアが、妊娠週の関数としてプロットされた。*異なるパネルスコアは、直接比較できるように、同じスコア化基準に合わせた。PEまたは対照データ点のいずれかにおいて、レス曲線は、妊娠期間の関数としてバイオマーカースコア化の全体的傾向を表すように適合された。

【図4】妊娠期間週の関数としての、PEおよび対照対象の両方に対する異なるバイオマ

50

ーカーパネルのレス適合化直線の複合化された重ね合わせである。

【図5】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、sFlt-1のバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図6】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、PIGFのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図7】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、HPXのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図8】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、FTのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図9】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、ADAM12のバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図10】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、HPのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図11】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、A2Mのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図12】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、APO-Eのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図13】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、APO-CIIIのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図14】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、APO-AIのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図15】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、RBP4のバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図16】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、HBのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図17】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、FGAのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図18】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、ピカチュリンのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図19】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、CTSBのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図20】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、CTSCのバイオマーカー分布の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図21】PEおよび対照群における異なる妊娠期間週での、ヘムのバイオマーカー分布

10

20

30

40

50

の箱ひげ図表示および散布図である。水平方向の箱の境界および中央線は、試料の四分位点を示す。

【図22】現在の予後の標準（「sFlt-1 / PlGF」）と比較した、s-Flt-1（可溶性VEGF-R1）と組み合わせて測定された場合に子癇前症を予測する子癇前症血清学的バイオマーカーの、ELISAまたは生化学的方法（ヘムに対する）による検証の概要を示す図である。早期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以前において回収された試料から行われた。後期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以降に回収された試料から行われた。異なる検体比の組み合わせのROC曲線を解析して、曲線下面積（AUC）値を算出した。

【図23】現在の予後の標準（「sFlt-1 / PlGF」）と比較した、s-Flt-1と組み合わせて測定された場合に子癇前症を予測する子癇前症血清学的バイオマーカーの、ELISAまたは生化学的方法（ヘムに対する）による検証の概要を示す図である。早期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以前において回収された試料から行われた。後期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以降に回収された試料から行われた。異なる検体比の組み合わせのROC曲線を解析して、曲線下面積（AUC）値を算出した。

【図24】現在の予後の標準（「s-Flt-1 / PlGF」）と比較した、HPXと組み合わせて測定された場合に子癇前症を予測する子癇前症血清学的バイオマーカーの、ELISAまたは生化学的方法（ヘムに対する）による検証の概要を示す図である。早期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以前において回収された試料から行われた。後期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以降に回収された試料から行われた。異なる検体比の組み合わせのROC曲線を解析して、曲線下面積（AUC）値を算出した。

【図25】現在の予後の標準（「s-Flt-1 / PlGF」）と比較した、CTSCと組み合わせて測定された場合に子癇前症を予測する子癇前症血清学的バイオマーカーの、ELISAまたは生化学的方法（ヘムに対する）による検証の概要を示す図である。早期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以前において回収された試料から行われた。後期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以降に回収された試料から行われた。異なる検体比の組み合わせのROC曲線を解析して、曲線下面積（AUC）値を算出した。

【図26】現在の予後の標準（「s-Flt-1 / PlGF」）と比較した、ADAM12と組み合わせて測定された場合に子癇前症を予測する子癇前症血清学的バイオマーカーの、ELISAによる検証の概要を示す図である。早期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以前において回収された試料から行われた。後期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以降に回収された試料から行われた。異なる検体比の組み合わせのROC曲線を解析して、曲線下面積（AUC）値を算出した。

【図27】sFlt-1 / PlGFからなるパネルと比較した、ヘモペキシン、フェリチン、カテプシンC、ADAMメタロペプチダーゼドメイン12、ケラチン33A、ハプトグロビン、アルファ-2-マクログロブリン、アポリポタンパク質E、アポリポタンパク質C-I-II、アポリポタンパク質A-I、レチノール結合タンパク質4、ヘモグロビン、フィブリノゲン、ピカチュリン、sFlt-1およびPlGF（「パネル」）を含むバイオマーカーパネルを使用して達成される、子癇前症の予後診断の改善された精度を示す図である。早期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以前に回収された試料から行われた。後期（正常N = 16；PE N = 16）の予測は、妊娠34週目以降に回収された試料から行われた。バイオマーカーパネルのROC曲線を解析して、曲線下面積（AUC）値を算出した。

【図28】sFlt-1 / PlGFからなるパネルと比較した、ヘモペキシン、フェリチン、カテプシンC、ADAMメタロペプチダーゼドメイン12、ケラチン33A、ハプトグロビン、アルファ-2-マクログロブリン、アポリポタンパク質E、アポリポタンパク質C-I-II、アポリポタンパク質A-I、レチノール結合タンパク質4、ヘモグロビン

10

20

30

40

50

、フィブリノゲン、およびピカチュリン（「パネル」）を含む（すなわち s F l t - 1 または P I G F は測定されない）バイオマーカーパネルを使用して達成される、子癇前症の予後診断の精度を示す図である。早期（正常 N = 16 ; P E N = 16）の予測は、妊娠 34 週目以前に回収された試料から行われた。後期（正常 N = 16 ; P E N = 16）の予測は、妊娠 34 週目以降に回収された試料から行われた。バイオマーカーパネルの R O C 曲線を解析して、曲線下面積（A U C）値を算出した。

【図 29】異なるバイオマーカーの組み合わせのパネルを示す図である。+ : バイオマーカーが対応するパネルに選択されている ; - : バイオマーカーがパネルに選択されていない。

【図 30】異なるバイオマーカーの組み合わせによる R O C 曲線 A U C 値を示す図である。「バイオマーカー」の列は、各パネルにおける s F l t - 1、P I G F および S t a n f o r d 検証済バイオマーカーの選択を示す。「S U バイオマーカーの数」の列は、早期 P E 発生、後期 P E 発生および全体的概要それぞれに対する S t a n f o r d 検証済バイオマーカーの数を示す。「R O C 曲線 A U C 値」の列は、早期 P E 発生、後期 P E 発生および全体的概要に対する R O C 曲線解析の A U C 値を示す。

【図 31】図 29 および 30 における各バイオマーカーパネルの感度および特異性解析を示す図である。上パネル：所与の特異性レベルでの異なるパネルの感度。下パネル：所与の感度レベルでの異なるパネルの特異性。

【図 32】図 27 におけるパネル 1 およびパネル 2 の散布図および R O C 曲線を示す図である。上パネル：対数を組み合わせたバイオマーカー値対妊娠期間（週）。下パネル：R O C 曲線。

【図 33】図 29 におけるパネル 3 およびパネル 4 の散布図および R O C 曲線を示す図である。上パネル：対数を組み合わせたバイオマーカー値対妊娠期間（週）。下パネル：R O C 曲線。

【図 34】図 29 におけるパネル 5 およびパネル 6 の散布図および R O C 曲線を示す図である。上パネル：対数を組み合わせたバイオマーカー値対妊娠期間（週）。下パネル：R O C 曲線。

【図 35】図 29 におけるパネル 7 の散布図および R O C 曲線を示す図である。上パネル：対数を組み合わせたバイオマーカー値対妊娠期間（週）。下パネル：R O C 曲線。

【図 36】P E および対照対象の区別における、P E 血清蛋白質バイオマーカーパネル 0、1、および 2 の、R O C 解析により測定される性能を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の詳細な説明

子癇前症マーカー、子癇前症マーカーパネル、および試料の子癇前症マーカーレベル表示を得るための方法が提供される。これらの組成物および方法は、例えば、子癇前症の診断、子癇前症の予後診断、子癇前症を有する対象の監視、および子癇前症に対する処置の決定を含む、多くの用途における使用が見出される。さらに、主題の方法の実践における使用が見出される系、デバイスおよびそのキットが提供される。本発明のこれらの、および他の目的、利点、および特徴は、以下でより十分に説明される組成物および方法の詳細を読めば、当業者に明らかとなる。

【0012】

本方法および組成物を説明する前に、本発明は、記載される特定の方法または組成物に限定されず、したがって、当然ながら変動し得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定するよう意図されないことも理解されたい。

【0013】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限値および下限値の間の各介在値（文脈が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の 10 分の 1 まで）もまた、具体的に開示される

10

20

30

40

50

ことが理解される。表示範囲内の任意の表示値または介在値と、その表示範囲内の任意の他の表示値もしくは介在値との間のより小さい範囲は、それぞれが本発明に包含される。これらのより小さい範囲の上限値および下限値は、その範囲内に独立して含まれても、または除外されてもよく、いずれかもしくは両方の限界値がより小さい範囲内に含まれる、またはいずれも含まれない各範囲もまた、表示範囲内の任意の具体的に除外された限界値に従って本発明に包含される。表示範囲がそれらの上限値および下限値のうちの1つまたは両方を含む場合、それらの包含される上限値および下限値のいずれかまたは両方を除外する範囲も本発明に包含される。

【0014】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の方法および材料と同様もしくは同等の任意の方法および材料を本発明の実践または試験において使用することができるが、いくつかの可能性のある好ましい方法および材料をこれから説明する。本明細書で言及されるすべての出版物は、それらの出版物が引用される方法および/または材料を開示および説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、矛盾が生じる場合、組み込まれた出版物のいずれの開示にも優先されることが理解される。

【0015】

本開示を読めば当業者に明らかなように、本明細書において説明および例示される個々の実施形態のそれぞれは、本発明の範囲または精神から逸脱せずに、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴から容易に分離する、またはそれと組み合わせることができる、個別の成分および特徴を有する。列挙された方法はいずれも、列挙された事象の順番で、または理論的に可能な任意の他の順番で行うことができる。

【0016】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数指示対象を含むことに留意すべきである。したがって、例えば「1つの細胞」への言及は、そのような細胞の複数を含み、「そのペプチド」への言及は、当業者に知られている1つ以上のペプチドおよびその均等物、例えばポリペプチドへの言及を含む、等である。

【0017】

本明細書で論じられる出版物は、本出願の出願日前にそれらを開示するためだけに提供される。本明細書におけるいずれの内容も、本発明が先行発明によりそのような出版物に先行する資格がないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、提供される出版物の日付は、実際の出版日とは異なる場合があり、別々に確認する必要がある。

【0018】

上で要約されるように、主題の発明の態様は、対象における子癇前症の評価の提供、例えば、子癇前症の診断、予後診断、監視、および/または処置における使用が見出される方法、組成物、系およびキットを含む。「子癇前症 (pre-eclampsia)」または「子癇前症 (pre-eclampsia)」は、高血圧、タンパク尿、手および顔/目の腫脹 (浮腫)、体重の急増、正常より高い肝酵素、および血小板減少症のうちの1つ以上を伴い得る、妊娠の多重合併症である。子癇前症は、典型的には、妊娠の第3の3ヵ月間に生じるが、重篤な場合には、障害は、第2の3ヵ月間、例えば、妊娠約22週間後に生じる。対処されない場合、子癇前症は、子癇、すなわち既存の脳状態とは無関係の発作をもたらす得る。子癇前症を「診断すること」、または「子癇前症の診断を提供すること」は、一般に、子癇前症の決定、例えば、対象 (例えば、子癇前症の臨床症状を有する対象、子癇前症に対し無症状性であるが、子癇前症に関連したリスク因子を有する対象、子癇前症に対し無症状性であり、子癇前症に関連したリスク因子を有さない対象) が現在子癇前症に罹患しているかどうかに関する決定、対象の子癇前症の疾患または障害の亜型への分類、子癇前症の重篤度の決定等を提供することを意味する。子癇前症を「予後診断すること」、または「子癇前症の予後診断を提供すること」は、一般に、子癇前症の予測

10

20

30

40

50

、例えば、対象の子癇前症発症の感受性またはリスクの予測、疾患の進行の過程および／または疾患の転帰の予測、例えば子癇前症の推定される発生、子癇前症の推定される期間、子癇前症が子癇に発展するかどうかに関する推定等、子癇前症の処置に対する対象の反応性、例えば陽性反応、陰性反応、全くの無反応等の推定を提供することを意味する。子癇前症を「監視すること」は、一般に、例えば、子癇前症の診断を伝える、子癇前症の予後診断を伝える、子癇前症の処置の効果または有効性に関する情報を提供する等のために、対象の状態を監視することを意味する。子癇前症を「処置すること」は、哺乳動物における子癇前症の任意の処置を処方または提供することを意味し、(a)子癇前症に罹患しやすい可能性があるがまだそれを有すると診断されていない対象において、子癇前症が発生するのを予防すること、(b)子癇前症を阻害すること、すなわちその発現を停止すること、または(c)子癇前症を緩和すること、すなわち子癇前症の退行をもたらすことを含む。

10

【0019】

主題の発明の説明において、子癇前症の評価を提供するのに有用な組成物が最初に説明され、続いてその使用のための方法、系およびキットが説明される。

【0020】

子癇前症マーカーおよびパネル

本発明のいくつかの態様において、子癇前症マーカーおよび子癇前症マーカーのパネルが提供される。「子癇前症マーカー」は、試料におけるその表示が子癇前症表現型に関連している分子の実体を意味する。例えば、子癇前症マーカーは、異なるように表示されてもよく、すなわち、健常個人と比較して、子癇前症を発症する、または発症した個人からの試料において、異なるレベルで表示されてもよい。いくつかの場合において、上昇したマーカーのレベルは、子癇前症表現型に関連している。例えば、試料中のマーカーの濃度は、子癇前症表現型に関連した試料において、子癇前症表現型に関連しない試料中よりも、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、7.5倍、10倍、またはそれ以上であってもよい。他の場合において、低下したマーカーのレベルは、子癇前症表現型に関連している。例えば、試料中のマーカーの濃度は、子癇前症表現型に関連した試料において、子癇前症表現型に関連しない試料中よりも、10%低い、20%低い、30%低い、40%低い、50%低い、またはそれ以上低くてもよい。

20

【0021】

子癇前症マーカーは、子癇前症に関連したタンパク質およびその対応する遺伝子配列、すなわちmRNA、DNA等を含んでもよい。「遺伝子」または「組み換え遺伝子」は、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を意味する。コード化配列の境界は、5' (アミノ) 末端における開始コドンおよび3' (カルボキシ) 末端における停止翻訳コドンにより決定される。転写終結配列は、コード化配列に対し3'に位置し得る。さらに、遺伝子は、その天然プロモーター(すなわち、遺伝子のエクソンおよびイントロンが非組み換え細胞、すなわち自然発生的な細胞内に作用可能に連結するプロモーター)ならびに関連した調節配列を任意選択的に含んでもよく、AUG開始部位の上流側の配列を有してもよく、または有さなくてもよく、また非翻訳リーダー配列、シグナル配列、下流側の非翻訳配列、転写開始および停止配列、ポリアデニル化シグナル、翻訳開始および停止配列、リボソーム結合部位等を含んでもよく、または含まなくてもよい。

30

40

【0022】

本開示の実施例において示されるように、本発明者らは、子癇前症に関連し、また単独で、または組み合わせとして(すなわちパネルとして)、子癇前症の評価の提供、例えば子癇前症の診断、子癇前症の予後診断、子癇前症に罹患した対象の監視、子癇前症に罹患した対象に対する処置の決定等における使用が見出される、いくつかの分子の実体を特定した。これらは、ヘモペキシン(HPX、GenBank Accession No. NM_000613.2); フェリチン(FT、GenBank Accession Nos. NM_000146.3 (軽鎖ポリペプチド)、NM_002032.2 (重鎖ポリペプチド)); カテプシンB(CTSB、Genbank Accession No

50

s . NM__001908 . 3 (変異体1)、NM__147780 . 2 (変異体2)、NM__147781 . 2 (変異体3)、NM__147782 . 2 (変異体4)、およびNM__147783 . 2 (変異体5) ; カテプシンC (CTSC、Genbank Accession Nos . NM__001114173 . 1 (アイソフォームa)、NM__148170 . 3 (アイソフォームb)、NM__001114173 . 1 (アイソフォームc) ; ADAMメタロペプチダーゼドメイン12 (ADAM12、Genbank Accession Nos . NM__003474 . 4 (アイソフォーム1)、NM__021641 . 3 (アイソフォーム2) ; ケラチン33A (KRT33A、Genbank Accession No . NM__004138 . 2) ; ハプトグロビン (HP、GenBank Accession Nos . NM__005143 . 3 (アイソフォーム1)、NM__001126102 . 1 (アイソフォーム2) ; アルファ - 2 - マクログロブリン (A2M、GenBank Accession No . NM__000014 . 4) ; アポリポタンパク質E (ApoE、GenBank Accession No . NM__000041 . 2) ; アポリポタンパク質C - III (ApoC3、GenBank Accession No . NM__000040 . 1) ; アポリポタンパク質A - I (ApoA1、GenBank Accession No . NM__000039 . 1) ; レチノール結合タンパク質4、血漿 (RBP4、GenBank Accession No . NM__006744 . 3) ; ヘモグロビン (GenBank Accession Nos . NM__000517 . 4 (アルファ2)、NM__000518 . 4 (ベータ)、NM__000559 . 2 (ガンマA)、NM__000184 . 2 (ガンマG) ; フィブリノゲンアルファ (GenBank Accession No . NM__021871 . 2 (アルファ鎖) ; ピカチュリン (EGFLAM、GenBank Accession Nos . NM__152403 . 3 (アイソフォーム1)、NM__182798 . 2 (アイソフォーム2)、NM__182801 . 2 (アイソフォーム4)、およびNM__001205301 . 1 (アイソフォーム5)、ならびに補因子 / 補欠分子族ヘムを含む。特に興味深いのは、子癇前症マーカーADAM12、CTSC、およびピカチュリンである。

【0023】

上述のように、本明細書において、子癇前症パネルもまた提供される。子癇前症マーカーの「パネル」は、2つ以上の子癇前症マーカー、例えば3つ以上、4つ以上、または5つ以上のマーカー、いくつかの場合においては6つ以上、7つ以上、または8つ以上のマーカー、時折9つ以上、または10個以上のマーカー、例えば12個、15個、17個または20個のマーカーを意味し、それらのレベルは、組み合わせて考慮した場合、子癇前症の評価の提供、例えば子癇前症診断、予後診断、監視および / または処置の実行における使用が見出される。特に興味深いのは、子癇前症マーカーADAM12、CTSC、またはピカチュリンを含むパネルである。例えば、いくつかの実施形態において、子癇前症パネルは、ピカチュリンと、ヘモベキシン、ApoA1、ApoC3、RBP4、および / またはハプトグロビンのうちの1つ以上とを含んでもよく、例えば、ピカチュリンおよびヘモベキシン ; ピカチュリンおよびApoA1 ; ピカチュリンおよびApoC3 ; ピカチュリンおよびRBP4 ; ピカチュリンおよびハプトグロビン ; ピカチュリン、ヘモベキシン、およびApoA1 ; ピカチュリン、ヘモベキシン、およびApoC3 ; ピカチュリン、ヘモベキシン、およびRBP4 ; ピカチュリン、ヘモベキシン、およびハプトグロビン ; ピカチュリン、ApoA1、およびApoC3 ; ピカチュリン、ApoA1、およびRBP4 ; ピカチュリン、ApoA1、およびハプトグロビン ; ピカチュリン、ApoC3、およびRBP4 ; ピカチュリン、ApoC3、およびハプトグロビン ; ピカチュリン、RBP4、およびハプトグロビン ; ピカチュリン、ヘモベキシン、ApoA1およびApoC3 ; ピカチュリン、ヘモベキシン、ApoA1およびRBP4 ; ピカチュリン、ヘモベキシン、ApoC3、およびRBP4 ; ピカチュリン、ヘモベキシン、ApoC3、およびハプトグロビン ; ピカチュリン、ヘモベキシン、RBP4、およびハプトグロビン ; ピカチュリン、ApoA1、ApoC3、RBP4 ; ピカチュリン、ApoA1、ApoC3およびハプト

グロビン；ピカチュリン、ApoA1、RBP4、およびハプトグロビン；ピカチュリン、ApoC3、RBP4およびハプトグロビン；またはピカチュリン、ヘモペキシン、ApoA1、ApoC3、RBP4、およびハプトグロビンを含んでもよい。

【0024】

いくつかの場合において、当該技術分野において知られている他の子癇前症マーカー、例えば、可溶性血管内皮成長因子／血管透過性因子受容体（VEGF-R1、FMS様チロシンキナーゼ1またはsFlt-1としても知られる；Genbank Accession Nos. NM_001159920.1（アイソフォーム2）、NM_001160030.1（アイソフォーム3）、およびNM_001160031.1（アイソフォーム4）；ならびに胎盤成長因子（PIGF、Genbank Accession Nos. NM_002632.5（アイソフォーム1）およびNM_001207012.1（アイソフォーム2）（Verlohreen et al. (2010) Amer Journal of Obstetrics and Gynecology 161:e1-e11）が、主題の子癇前症パネルに含まれてもよい。したがって、例えば、子癇前症パネルは、ADAM12と、PIGF、ハプトグロビン、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、ヘモグロビン、ApoC3、フィブリノゲン、および／またはピカチュリンのうちの1つ以上とを含んでもよい。別の例として、子癇前症パネルは、CTSCと、PIGF、ハプトグロビン、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、ヘモグロビン、ApoC3、フィブリノゲン、ピカチュリン、および／またはヘムのうちの1つ以上とを含んでもよい。興味深い子癇前症パネルの他の例は、HPX、PIGF、ハプトグロビン、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、ヘモグロビン、ApoC3、フィブリノゲン、ピカチュリン、および／またはヘム；sFlt-1、ハプトグロビン、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、ヘモグロビン、ApoC3、フィブリノゲン、ピカチュリン、および／またはヘム；sFlt-1およびA2M；sFlt-1およびRBP4；sFlt-1およびヘモグロビン；sFlt-1およびフィブリノゲン；sFlt-1およびピカチュリン；sFlt-1およびHPX；HPXおよびピカチュリン；sFlt-1、PIGF、およびHPX；sFlt-1、PIGF、HPX、CTSC、ADAM12、ApoE、ApoA1、RBP4、HB、およびピカチュリン；sFlt-1、HPX、ApoE、ApoA1、およびピカチュリン；PIGFおよびピカチュリン；PIGF、HPX、CTSC、Adam12、HP、ApoE、RBP4、HB、フィブリノゲン、およびピカチュリン；ならびにHPX、ApoA1、ピカチュリン；HPX、CTSC、Adam12、HP、HB、フィブリノゲン、およびピカチュリンを含む。

【0025】

主題の方法における子癇前症パネルとしての使用が見出される子癇前症マーカーの他の組み合わせは、例えば当該技術分野において知られている、または本明細書の実施例において説明されているような、任意の便利な統計的方法を使用して、当業者により容易に特定され得る。例えば、検体のパネルは、子癇前症分類解析のための遺伝的アルゴリズム（GA）および全対（AP）サポートベクターマシン（SVM）法を組み合わせることにより選択され得る。予測的特徴は、例えば、反復GA/SVMにより自動的に決定され、最適な分類性能を有する非冗長的な子癇前症関連検体の非常にコンパクトなセットをもたらす。異なる分類子セットは、典型的には、少量の重複遺伝子の特徴のみを内包するが、それらは、子癇前症の評価の提供において、上述および本明細書の実施例において説明されるレベルと同様のレベルの正確性を有する。

【0026】

方法

本発明のいくつかの態様において、対象の子癇前症マーカーレベル表示を得るための方法が提供される。子癇前症マーカーレベル表示は、対象からの生体試料における、主題の子癇前症マーカー（複数可）の1つ以上、例えば子癇前症マーカーのパネルのレベルの表示を意味する。「生体試料」という用語は、生物から得られた様々な試料の種類を包含し、診断、予後診断または監視分析において使用され得る。この用語は、生体起源の血液お

10

20

30

40

50

よび他の液体試料、またはそれから得られた細胞もしくはその子孫を包含する。この用語は、入手後に任意の手法で、例えば試薬による処理、可溶化、またはある特定の成分の濃縮により操作された試料を包含する。この用語は、臨床試料を包含し、また、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生体液、および組織試料も含む。本発明の方法における使用のための臨床試料は、様々な源、具体的には血液試料から得ることができる。

【0027】

特に興味深い試料源は、血液試料またはその調製物、例えば全血、または血清もしくは血漿、および尿を含む。典型的には、約 $2 \mu\text{l}$ から約 $2,000 \mu\text{l}$ の間の血液、血清または尿の試料体積が、子癇前症遺伝子産物のレベルの決定に十分である。一般に、試料体積は、約 $10 \mu\text{l}$ から約 $1,750 \mu\text{l}$ 、約 $20 \mu\text{l}$ から約 $1,500 \mu\text{l}$ 、約 $40 \mu\text{l}$ から約 $1,250 \mu\text{l}$ 、約 $60 \mu\text{l}$ から約 $1,000 \mu\text{l}$ 、約 $100 \mu\text{l}$ から約 $900 \mu\text{l}$ 、約 $200 \mu\text{l}$ から約 $800 \mu\text{l}$ 、約 $400 \mu\text{l}$ から約 $600 \mu\text{l}$ の範囲である。多くの実施形態において、ヒト試料の好適な最初の源は、血液試料である。したがって、主題の分析において使用される試料は、一般に血液由来試料である。血液由来試料は、全血またはその分画、例えば血清、血漿等から得られてもよく、いくつかの実施形態において、試料は、血液から得られ、凝固され、血清が分離され、回収されて分析に使用される。

【0028】

いくつかの実施形態において、試料は、血清または血清由来試料である。液体血清試料を生成するための任意の便利な方法が使用され得る。多くの実施形態において、方法は、皮膚穿刺（例えば指腹での採血、静脈穿刺）により凝固または血清分離管内に静脈血を採取すること、血液を凝固させること、および凝固した血液から血清を遠心分離することを使用する。次いで、血清が回収され、分析まで保存される。患者由来試料が得られたら、子癇前症マーカー（複数可）のレベルを決定するために試料が分析される。

【0029】

主題の試料は、典型的には、妊娠の第2または第3の3ヵ月間に個人から得られる。「妊娠」は、哺乳動物における妊娠の期間、すなわち、受精から出産までの発育の時間間隔、プラス2週間、すなわち最後の月経期間の最初の日までを意味する。第2または第3の3ヵ月は、妊娠の第2または第3の部分の意味し、各区間は3ヶ月の長さである。したがって、例えば、「第1の3ヶ月間」は、最後の月経期間の最初の日から妊娠13週目までを意味し、「第2の3ヶ月間」は、妊娠14週目から27週目までを意味し、「第3の3ヵ月間」は、28週目から出産まで、すなわち妊娠38週間から42週間までを意味する。換言すれば、主題の試料は、妊娠約14週目から42週目、妊娠約18週目から42週目、妊娠約20週目から42週目、妊娠約24週目から42週目、妊娠約30週目から42週目、妊娠約34週目から42週目、妊娠約38週目から42週目に得られてもよい。したがって、いくつかの実施形態において、主題の試料は、妊娠早期、例えば妊娠14週目以降、例えば妊娠14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23週目以降、より頻繁には妊娠24、25、26、27、28、29、30、31、32、33週目、または34週目以降に得られてもよい。他の実施形態において、主題の試料は、妊娠後期、例えば妊娠34週間後、例えば妊娠35、36、37、38、39、40週目、または41週目に得られてもよい。

【0030】

試料が得られたら、直接使用されてもよく、短期間凍結または適切な培養培地中で維持されてもよい。典型的には、試料は、ヒト患者からのものであるが、動物モデル、例えばウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、げっ歯類、例えばマウス、ラット、ハムスター、霊長類等も使用が見出される。子癇前症に罹患した患者における、本明細書において開示される1つ以上の子癇前症マーカーの異なる表示を示す任意の便利な組織試料が、主題の方法において評定され得る。典型的には、好適な試料源は、関心のある分子の実体、すなわちRNA転写物またはタンパク質が放出されている液体から得られる。

【0031】

主題の試料は、1つ以上の子癇前症マーカーの検出を向上させるように様々な手法で処

10

20

30

40

50

理されてもよい。例えば、試料が血液である場合、分析の前に赤血球が（例えば遠心分離により）試料から除去されてもよい。そのような処理は、親和性試薬を使用した子癇前症マーカーのレベルの検出の非特異的なバックグラウンドレベルを低減するのに役立つ。また、子癇前症マーカーの検出は、当該技術分野において周知の手順（例えば、酸性沈殿、アルコール沈殿、塩沈殿、疎水性沈殿、濾過（30 kDを超える分子を保持することができるフィルタ、例えばCentrim 30（商標）を使用して）、親和性沈殿）を使用して試料を濃縮することにより向上され得る。いくつかの実施形態において、試験および対照試料のpHは、中性に近いpH（すなわちpH 6.5～8.0）に調節および維持される。そのようなpH調節は、複合体形成を防止し、それにより、試料中のマーカーのレベルのより正確な定量が提供される。試料が尿である実施形態において、試料のpHが調節され、マーカーの検出を向上させるために濃縮される。

10

【0032】

主題の方法の実践において、個人からの生体試料中の子癇前症マーカー（複数可）のレベル（複数可）が評定される。主題の試料中の1つ以上の子癇前症マーカーのレベルは、任意の便利な方法により評定され得る。例えば、子癇前症遺伝子発現レベルは、1つ以上の子癇前症遺伝子の1つ以上の核酸転写物、例えばmRNAのレベル/量を測定することにより検出され得る。タンパク質マーカーは、1つ以上のタンパク質/ポリペプチドのレベル/量を測定することにより検出され得る。「評定」、「分析」、「測定」、「評価」、および「決定」という用語は、任意の形態の測定を指すように同義的に使用され、要素が存在するか否かの決定を含み、定量的および定性的決定の両方を含む。評定は、相対的または絶対的であってもよい。

20

【0033】

例えば、少なくとも1つの子癇前症マーカーのレベルは、試料において、タンパク質レベル表示を導く1つ以上のタンパク質/ポリペプチドまたはその断片の量またはレベルを検出することにより評定され得る。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本出願において使用される場合、同義的である。「ポリペプチド」は、アミノ酸（アミノ酸配列）のポリマーを指し、特定の長さの分子を指すものではない。したがって、ペプチドおよびオリゴペプチドが、ポリペプチドの定義に含まれる。この用語はまた、翻訳後修飾ポリペプチド、例えばグリコシル化ポリペプチド、アセチル化ポリペプチド、リン酸化ポリペプチド等を指す、または含む。この定義に含まれるのは、例えば、アミノ酸の1つ以上の類似体を含むポリペプチド、置換連結を有するポリペプチド、および、当該技術分野において知られている、自然発生的および非自然発生的両方の他の修飾である。

30

【0034】

タンパク質レベルが検出される場合、分析される試料中の1つ以上のタンパク質のレベルが決定される、タンパク質レベルを評定するための任意の便利なプロトコルが使用されてもよい。例えば、タンパク質レベルを分析するための1つの代表的で便利な種類のプロトコルは、ELISAである。ELISAおよびELISAベース分析において、関心のあるタンパク質に特異的な1つ以上の抗体は、選択された固体表面上、好ましくはポリスチレンマイクロタイタープレートのウェル等のタンパク質親和性を示す表面上に固定化されてもよい。不完全に吸着した材料を除去するために洗浄した後、分析プレートウェルは、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインまたは粉乳の溶液等の、試験試料に対して抗原的に中性であることが知られている非特異的「遮断」タンパク質でコーティングされる。これは、固定化表面上の非特異的吸着部位の遮断を可能にし、それにより表面上の抗原の非特異的結合によりもたらされるバックグラウンドが低減される。未結合遮断タンパク質を除去するために洗浄した後、免疫複合体（抗原/抗体）形成をもたらす条件下で、固定化表面を試験される試料と接触させる。そのような条件は、非特異的バックグラウンドの低減を補助する傾向も有する、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）/TweenまたはPBS/Triton-X100中のBSAまたはウシガンマグロブリン（BGG）等の希釈剤で試料を希釈すること、および、試料を約25～27のオーダーの温度（但し他の温度が使用されてもよい）で約2～4時間インキュベートすることを含む。インキュベ-

40

50

ション後、非免疫複合化材料を除去するために、抗血清接触表面が洗浄される。例示的な洗浄手順は、PBS / Tween、PBS / Triton - X 100、またはホウ酸塩緩衝液等の溶液での洗浄を含む。次いで、第1の抗体とは異なる、標的に対する特異性を有する第2の抗体に結合免疫複合体を供し、第2の抗体の結合を検出することにより、免疫複合体形成の発生および量が決定され得る。ある特定の実施形態において、第2の抗体は、適切な発色基質を用いたインキュベーション後に発色沈殿物を生成する、関連した酵素、例えばウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、またはアルカリホスファターゼを有する。例えば、ある期間、および免疫複合体形成の発達に有利な条件下（例えば、PBS / Tween等のPBS含有溶液中での室温で2時間のインキュベーション）で、ウレアーゼまたはペルオキシダーゼ共役抗ヒトIgGが使用されてもよい。第2の抗体を用いたそのようなインキュベーション、および未結合材料を除去するための洗浄後、例えば、ウレアーゼ標識の場合には尿素およびプロモクレゾールパープル等の発色基質を用いた、またはペルオキシダーゼ標識の場合には2, 2' - アジノ - ジ - (3 - エチル - ベンゾチアゾリン) - 6 - スルホン酸 (ABTS) およびH₂O₂を用いたインキュベーションにより、標識の量が定量される。次いで、例えば可視スペクトル分光光度計を使用して発色の程度を測定することにより、定量が達成される。

10

【0035】

前述の形式は、まず試料を分析プレートに結合させることにより変更されてもよい。次いで、一次抗体を分析プレートと共にインキュベートし、続いて、一次抗体に対する特異性を有する標識化二次抗体を使用して、結合した一次抗体を検出する。

20

【0036】

抗体（複数可）が固定化される固体基板は、様々な材料から様々な形状で、例えば、マイクロタイタープレート、マイクロビーズ、ディップスティック、樹脂粒子等として作製することができる。基板は、信号対雑音比を最大化するように、バックグラウンドの結合を最小限化するように、ならびに分離の容易性およびコストに合わせて選択され得る。洗浄は、使用されている基板に対し最も適切な様式で、例えば、貯蔵部からビーズもしくはディップスティックを取り出すことにより、マイクロタイタープレートウェル等の貯蔵部を空にする、もしくは希釈することにより、またはビーズ、粒子、クロマトグラフィーカラムもしくはフィルタを、洗浄液もしくは溶媒で濯ぐことにより達成され得る。

30

【0037】

代替的に、試料中の1つ以上のタンパク質のレベルを測定するための非ELISAベース方法が使用されてもよい。代表例は、これらに限定されないが、質量分析法、プロテオームアレイ、xMAP（商標）マイクロスフェア技術、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット法、および免疫組織化学を含む。

【0038】

別の例として、少なくとも1つの子癇前症マーカーのレベルは、患者試料において、核酸マーカー表示を導く関心のある遺伝子によりコードされた1つ以上のRNA転写物またはその断片の量またはレベルを検出することにより評定され得る。試料中の核酸のレベルは、任意の便利なプロトコルを使用して検出され得る。差次的遺伝子発現解析の分野において使用されているもの等の、核酸を検出する様々な異なる様式が知られているが、マーカー表示を生成するための1つの代表的および便利な種類のプロトコルは、アレイベース遺伝子発現プロファイリングプロトコルである。そのような応用は、生成されるマーカー表示において分析/プロファイルされる遺伝子のそれぞれの「プローブ」核酸を表示する核酸が使用される、ハイブリダイゼーション分析である。これらの分析において、標的核酸の試料がまず分析されている最初の核酸試料から調製され、調製は、標識、例えばシグナル生成系のメンバーによる標的核酸の標識化を含み得る。標的核酸試料調製の後、ハイブリダイゼーション条件下で試料をアレイと接触させ、それにより、アレイ表面に付着したプローブ配列に相補的な標的核酸の間に、複合体が形成される。次いで、ハイブリダイズした複合体の存在が、定性的または定量的に検出される。

40

【0039】

50

主題の方法において使用されるマーカー表示を生成するために実践され得る特定のハイブリダイゼーション技術は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,143,854号、同第5,288,644号、同第5,324,633号、同第5,432,049号、同第5,470,710号、同第5,492,806号、同第5,503,980号、同第5,510,270号、同第5,525,464号、同第5,547,839号、同第5,580,732号、同第5,661,028号、同第5,800,992号、ならびに国際公開第WO95/21265号、同第WO96/31622号、同第WO97/10365号、同第WO97/27317号、欧州特許第EP373203号、および同第EP785280号に記載の技術を含む。これらの方法において、発現が分析されている表現型決定遺伝子のそれぞれに対するプローブを含む「プローブ」核酸のアレイを、上述のように標的核酸と接触させる。接触は、ハイブリダイゼーション条件下、例えばストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で行われ、次いで未結合核酸が除去される。「ストリンジェントな分析条件」という用語は、本明細書において使用される場合、分析において所望のレベルの特異性を提供するのに十分な相補性を有する核酸、例えば表面結合および溶液相核酸の結合対の生成に適合するが、一方で、所望の特異性を提供するのに不十分な相補性を有する結合メンバー間の結合対の形成への適合性がより低い条件を指す。ストリンジェントな分析条件は、ハイブリダイゼーション条件および洗浄条件の両方の総和または組み合わせ（合計）である。

10

【0040】

ハイブリダイズした核酸の結果的なパターンは、精査された遺伝子のそれぞれに対する発現に関する情報を提供し、発現情報は、遺伝子が発現されるか否か、および典型的にはどのレベルで発現されるかに関連し、発現データ、すなわちマーカー表示（例えば、トランスクリプトソームの形態の）は、定性的および定量的の両方であってもよい。

20

【0041】

代替的に、増幅プロトコルに基づくもの、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）ベース分析（定量的PCR、逆転写PCR（RT-PCR）リアルタイムPCR等を含む）を含む、試料中の1つ以上の核酸のレベルを定量化するための非アレイベース方法が使用されてもよい。

【0042】

分子および細胞生化学における一般方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); および Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998) 等の標準的教科書に見出すことができ、それらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本開示において言及される遺伝子操作のための試薬、クローニングベクター、およびキットは、BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich、および Clontech 等の販売業者から入手可能である。

30

40

【0043】

結果的なデータは、試料中の精査されたマーカーのそれぞれのレベルに関する情報を提供し、情報は、マーカーが発現されるか否か、および典型的にはどのレベルで発現される

50

かに関連し、データは、定性的および定量的の両方であってもよい。したがって、検出が定性的である場合、方法は、見解または評価、例えば分析されている試料中に標的マーカー、例えば核酸またはタンパク質が存在するか否かの評価を提供する。さらに他の実施形態において、方法は、分析されている試料中に標的マーカーが存在するか否かの定量的検出、すなわち、分析されている試料中の標的検体、例えば核酸またはタンパク質の実際の量または相対的存在度の評価または評価を提供する。そのような実施形態において、定量的検出は、絶対的であってもよく、または、方法が試料中の2つ以上の異なる検体、例えば標的核酸またはタンパク質を検出する方法である場合は、相対的であってもよい。したがって、「定量化」という用語は、試料中の標的検体、例えば核酸（複数可）またはタンパク質（複数可）の定量化の文脈において使用される場合、絶対的または相対的定量化を示し得る。絶対的定量化は、既知の濃度（複数可）の1つ以上の対照検体の含有、および、標的検体の検出されたレベルに関して既知の対照検体を参照すること（例えば標準曲線の生成により）によって達成され得る。代替的に、相対的定量化は、2つ以上の異なる標的検体の間での検出されたレベルまたは量を比較して、例えば互いに対する2つ以上の異なる検体のそれぞれの相対的定量化を提供することにより達成され得る。

10

【0044】

1つ以上の子癇前症マーカーのレベルが決定されたら、測定値（複数可）をいくつかの手法のいずれかで解析して、子癇前症マーカーレベル表示を得ることができる。

【0045】

例えば、1つ以上の子癇前症マーカーの測定値を個々に解析して、子癇前症プロファイルを作成することができる。本明細書において使用される場合、「子癇前症プロファイル」は、患者試料中の1つ以上の子癇前症マーカーの正規化されたレベル、例えば、患者試料中の血清学的タンパク質濃度の正規化されたレベルである。プロファイルは、当該技術分野において知られたいくつかの方法のいずれかにより生成され得る。例えば、各マーカーのレベルは、 \log_2 変換されて、選択されたハウスキーピング遺伝子、例えばABL1、GAPDH、もしくはPGK1の発現に対して、またはパネル全体にわたるシグナル等に対して正規化されてもよい。子癇前症プロファイルを計算する他の方法は、当業者に容易に知られる。

20

【0046】

別の例として、子癇前症マーカーのパネルの測定値が総合的に解析されて、単一の子癇前症スコアが導かれてもよい。「子癇前症スコア」は、子癇前症パネルにおける子癇前症マーカーのそれぞれの加重レベルを表す単一の基準値を意味する。したがって、いくつかの実施形態において、主題の方法は、試料中の子癇前症パネルのマーカーのレベルを検出することと、子癇前症マーカーの加重レベルに基づき子癇前症スコアを計算することとを含む。患者試料に対する子癇前症スコアは、バイオマーカースコアを計算するための当該技術分野において知られたいくつかの方法およびアルゴリズムのいずれかにより計算することができる。例えば、各正規化マーカーレベルを加重因子に対し乗算すること等により加重された加重マーカーレベル、例えば \log_2 変換され正規化されたマーカーレベルが合計され、またいくつかの場合においては平均化されて、解析された子癇前症マーカーのパネルの単一代表値が導かれてもよい。

30

40

【0047】

いくつかの場合において、パネルにおける各マーカーに対する加重因子、または単に「重み」は、試料中の検体レベルの変化の反映であってもよい。例えば、各子癇前症マーカーの検体レベルは、 \log_2 変換され、1として（子癇前症においてレベルが増加したマーカーに対して）または-1（子癇前症においてレベルが減少したマーカーに対して）として加重されてもよく、減少したマーカーと比較した増加したマーカーの合計の比は、子癇前症の特徴が導かれるように決定される。他の場合において、重みは、診断、予後診断、または監視評価を行う上での、マーカーパネルの特異性、感度および/または正確性に対する各マーカーの重要性を反映するものであってもよい。そのような重みは、任意の便利な統計機械学習法により決定されてもよく、例えば、試料が得られるデータセットの主

50

成分解析 (PCA)、線形回帰、サポートベクターマシン (SVM)、および / またはランダムフォレストが使用されてもよい。いくつかの場合において、各マーカーに対する重みは、患者試料が得られるデータセットにより定義される。他の場合において、各マーカーに対する重みは、参照データセットまたは「訓練データセット」に基づいて定義されてもよい。

【0048】

例えば、本明細書の実施例において開示されるように、マーカーであるピカチュリン、ヘモペキシン、ApoA1、ApoC3、RBP4 およびハプトグロビンを含む子癇前症パネルにおいて、ピカチュリンレベルが最も有意であり、ヘモペキシン、ApoA1 および ApoC3 のレベルは中程度に重要であり、RBP4 およびハプトグロビンのレベルはより有意でない。したがって、子癇前症スコアを導くために使用され得るアルゴリズムの一例は、ピカチュリンレベルを最も重く考慮し、例えばピカチュリン測定値に約 12 ~ 16、例えば約 15 の重みを割り当て；ヘモペキシン、ApoA1、および ApoC3 レベルをより控え目に考慮し、例えばこれらの遺伝子の測定値に約 4 ~ 8、例えば約 6 の重みを割り当て；RBP4 をさらにより控え目に考慮し、例えば RBP4 測定値に約 2 の重みを割り当て、ハプトグロビンを最も低く考慮し、例えばハプトグロビン測定値に約 1 以下の重みを割り当てるアルゴリズムである。

10

【0049】

これらの解析方法は、コンピュータベースシステムを使用することによって、例えば当該技術分野において知られた任意のハードウェア、ソフトウェアおよびデータ記憶媒体を使用することによって、およびそのような解析に便利な任意のアルゴリズムを使用することによって、当業者により容易に実行され得る。例えば、データマイニングアルゴリズムは、「クラウドコンピューティング」、スマートフォンベースまたはクライアント - サーバーベースのプラットフォーム等により適用され得る。

20

【0050】

ある特定の実施形態において、1つのマーカーのみの発現、例えばポリペプチドレベルが評定されて、マーカーレベル表示が生成される。さらに他の実施形態において、2つ以上、すなわちパネルのマーカー、例えば3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、10個以上、または15個以上のマーカーのレベルが評定される。したがって、表題の方法において、試料中の少なくとも1つのマーカーの発現が評定される。ある特定の実施形態において、行われる評定は、当該技術分野においてその用語が使用されるように、プロテオームの評定としてみなされ得る。

30

【0051】

いくつかの場合において、対照の子癇前症マーカー表示 (例えば子癇前症プロファイルまたは子癇前症スコア) を決定する、または得る主題の方法は、子癇前症マーカー表示を報告として提供することをさらに含む。したがって、いくつかの場合において、主題の方法は、試料における子癇前症マーカーの評定の結果を提供する報告を生成または出力するステップをさらに含んでもよく、その報告は、電子媒体 (例えばコンピュータモニタ上の電子的表示) の形態で、または、有形的媒体 (例えば、紙に印刷された報告または他の有形的媒体) の形態で提供され得る。例えば当該技術分野において知られた、または以下でより詳細に説明される、任意の形態の報告が提供され得る。

40

【0052】

実用性

そのようにして得られた子癇前症マーカーレベル表示は、多くの用途が見出される。例えば、マーカーレベル表示は、子癇前症を診断する、すなわち、対象が子癇前症に罹患しているかどうか、子癇前症の種類、子癇前症の重篤度等に関する決定を提供するために使用されてもよい。いくつかの場合において、対象は、子癇前症の臨床症状、例えば血圧の上昇 (例えば 140 / 90 mm / Hg 以上)、タンパク尿、体重の急増 (1 ~ 2 日間にわたり、もしくは 1 週間に 2 ポンド超)、水分貯留 (浮腫)、肝酵素の増加、および / または血小板減少症 (100,000 未満の血小板数の低下) を示す可能性がある。他の場合

50

において、対象は、子癇前症に対して無症状性であってもよいが、子癇前症に関連したリスク因子、例えば、妊娠性糖尿病、I型糖尿病、肥満、慢性高血圧、腎疾患、血栓性素因；アフリカ系アメリカ人もしくはフィリピン人の遺伝的特徴；35歳を超える、もしくは20歳未満の年齢；子癇前症の家族歴；未経産；以前の妊娠における子癇前症；および／またはストレス等の医学的状態を有する。さらに他の場合において、対象は、子癇前症に対して無症状性であり、子癇前症に関連したリスク因子を有さなくてもよい。

【0053】

別の例として、子癇前症マーカーレベル表示は、子癇前症を予後診断する、すなわち子癇前症の予後診断を提供するために使用されてもよい。例えば、子癇前症マーカーレベル表示は、患者の子癇前症の発症の感受性またはリスクを予測するために使用されてもよい。10
。「個人が子癇前症を発症するかどうかを予測すること」は、翌週、次の2週間、次の3週間、次の5週間、次の2ヶ月、次の3ヶ月、例えば妊娠の残りの期間で個人が子癇前症を発症する可能性を決定することを意味する。子癇前症マーカーレベル表示は、疾患の進行の過程および／または疾患の転帰、例えば子癇前症の推定される発生、子癇前症の推定される期間、子癇前症が子癇に発展するかどうかに関する推定等を予測するために使用されてもよい。子癇前症マーカーレベル表示は、子癇前症の処置に対する対象の反応性、例えば陽性反応、陰性反応、全くの無反応等を予測するために使用されてもよい。

【0054】

別の例として、子癇前症マーカーレベル表示は、子癇前症を監視するために使用されてもよい。子癇前症を「監視すること」は、一般に、例えば、子癇前症の診断を伝える、子癇前症の予後診断を伝える、子癇前症の処置の効果または有効性に関する情報を提供する等のために、対象の状態を監視することを意味する。20

【0055】

別の例として、子癇前症マーカーレベル表示は、対象の処置を決定するために使用されてもよい。「処置」、「処置する」等の用語は、本明細書において、一般に所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを意味するように使用される。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、かつ／または疾患および／もしくはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒という観点において治療的であり得る。「処置」は、本明細書において使用される場合、哺乳動物における疾患の任意の処置を包含し、(a)その疾患にかかりやすい可能性があるが、まだそれを有すると診断されていない対象における疾患の発生を予防すること、(b)その疾患を阻害すること、すなわち、その発現を阻止すること、または(c)その疾患を軽減すること、すなわち、その疾患の退行を引き起こすことを含む。治療薬剤は、疾患または損傷の発生の前、その間、またはその後に投与され得る。処置が患者の望ましくない臨床症状を安定化または低減する場合は、進行中の疾患の処置が特に興味深い。主題の治療法は、疾患の症状段階の前に施されてもよく、いくつかの場合においては、疾患の症状段階の後に施されてもよい。「個人」、「対象」、「宿主」、および「患者」という用語は、本明細書において同義的に使用され、診断、処置、または治療が望ましい任意の哺乳動物対象、特にヒトを指す。子癇前症の処置は当該技術分野において周知であり、ベッド休養、余分な水分の摂取、減塩食、血圧を制御するための医薬、コルチコステロイド、妊娠誘導等を含み得る。30 40

【0056】

いくつかの実施形態において、子癇前症評価を提供する、例えば子癇前症を診断する、子癇前症を予後診断する、子癇前症を監視する、子癇前症を処置する等の主題の方法は、得られた子癇前症マーカーレベル表示を子癇前症表現型決定要素と比較して、表現型決定要素との類似性または差異を特定することを含んでもよく、特定される類似性または差異は、次いで子癇前症評価を提供する、例えば子癇前症を診断する、子癇前症を予後診断する、子癇前症を監視する、子癇前症の処置を決定するため等に使用される。「表現型決定要素」は、表現型(この場合、子癇前症表現型)を代表する要素、例えば組織試料、マーカープロファイル、値(例えばスコア)、値の範囲等を意味し、例えば、対象が健康であ50

る、または子癇前症に罹患しているかどうか、対象が子癇に進行する可能性のある子癇前症を有しているか、対象が治療に反応する子癇前症を有しているか等、対象の表現型を決定するために使用され得る。

【 0 0 5 7 】

例えば、子癇前症表現型決定要素は、例えば、所与の対象に対するマーカーレベル表示の実験的決定における参照 / 対照として使用され得る、子癇前症を有する、または有さない個人からの試料であってもよい。別の例として、子癇前症表現型決定要素は、子癇前症状態の代表であり、所与の対象のマーカーレベル表示を解釈するための参照 / 対照として使用され得る、マーカーレベル表示、例えばマーカープロファイルまたはスコアであってもよい。表現型決定要素は、陽性参照 / 対照、例えば、子癇前症を有する、または子癇前症を発症する、または既知の処置により管理され得る子癇前症を有する、または子供の出産に対してのみ反応性であることが特定されている子癇前症を有する妊娠女性からの試料またはそのマーカーレベル表示であってもよい。代替的に、表現型決定要素は、陰性参照 / 対照、例えば、子癇前症を発症していない妊娠女性、または妊娠していない女性からの試料またはそのマーカーレベル表示であってもよい。表現型決定要素は、好ましくは、同じ種類の試料であり、またはマーカーレベル表示の場合、監視されている個人のマーカーレベル表示を生成するために使用された試料と同じ種類の試料から得られる。例えば、個人の血清が評定されている場合、表現型決定要素は、好ましくは血清である。

10

【 0 0 5 8 】

ある特定の実施形態において、得られたマーカーレベル表示は、子癇前症に関して試験されている個人に関する情報を得るために、単一の表現型決定要素と比較される。他の実施形態において、得られたマーカーレベル表示は、2つ以上の表現型決定要素と比較される。例えば、得られたマーカーレベル表示は、個人が子癇前症を発症するかどうかに関する確認された情報を得るために、陰性参照および陽性参照と比較されてもよい。別の例として、得られたマーカーレベル表示は、患者が処置に対し反応性であるか否かに関する情報を得るために、処置に対し反応性である子癇前症の代表である参照、および処置に対し応答性でない子癇前症の代表である参照と比較されてもよい。

20

【 0 0 5 9 】

得られたマーカーレベル表示の、1つ以上表現型決定要素との比較は、任意の便利な方法を使用して行われてもよく、様々な方法が当業者に知られている。例えば、ELISA技術における当業者は、ELISAデータが、例えば標準曲線への正規化、正規化された値の比較等により比較されてもよいことを認識する。比較ステップは、得られたマーカーレベルプロファイルがどれ程対照 / 参照プロファイル（複数可）と類似しているか、または相違しているかに関する情報をもたらし、この類似性 / 相違性情報は、例えば、子癇前症の発生を予測する、子癇前症を診断する、子癇前症患者を監視する等のために使用される。同様に、アレイ技術における当業者は、アレイプロファイルが、例えば発現プロファイルのデジタル画像を比較する、発現データのデータベースを比較する等により比較され得ることを認識する。発現プロファイルを比較する手法を説明している特許は、これらに限定されないが、米国特許第6,308,170号および同第6,228,575号を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。マーカーレベルプロファイルを比較する方法もまた上述されている。類似性は、相対マーカーレベル、絶対マーカーレベル、またはその両方の組み合わせに基づいてもよい。ある特定の実施形態において、類似性の決定は、対象から得られたマーカーレベル表示の入力をユーザ等から受信し、1つ以上の参照プロファイルまたは参照スコアに対する類似性を決定し、また子癇前症の予後診断をユーザ等（例えば検査技師、医師、妊娠した個人等）に返すように設計されたプログラムが保存されたコンピュータを使用して行われる。本発明のコンピュータにより実現される態様のさらなる説明は、以下に記載される。ある特定の実施形態において、類似性の決定は、マーカーレベル表示、例えば子癇前症スコアを、一連の表現型決定要素、例えば一連の子癇前症スコアと視覚的に比較し、対象の子癇前症スコアと最も類似する参照子癇前症スコアを決定することに基づいてもよい。得られたマーカーレベルプロファイルが比較さ

30

40

50

れる表現型決定要素の種類および性質に依存して、上記比較ステップは、分析される細胞／体液に関する様々な異なる種類の情報をもたらす。したがって、上記比較ステップは、子癇前症の発生の陽性／陰性の予測、子癇前症の陽性／陰性の診断、子癇前症の特性決定、処置に対する子癇前症の反応性に関する情報等をもたらし得る。

【0060】

他の実施形態において、マーカーレベル表示は、子癇前症の予後診断、子癇前症の診断、または子癇前症の監視を行うために、直接的に、すなわち表現型決定要素との比較なしに使用され得る。例えば、患者は、患者の血清中のADAM12の濃度が約950 pg / ml以上である場合、患者の血清中のカテプシンCの濃度が約16 ng / ml以上である場合、または患者の血清中のピカチュリンの濃度が約500 ng / ml以下である場合、子癇前症を発症すると予測され得る。他の例に関しては、以下の実施例の表1および2を参照されたい。

10

【0061】

いくつかの実施形態において、子癇前症評価を提供する、例えば子癇前症を診断する、子癇前症を予後診断する、子癇前症を監視する等の主題の方法は、主題のマーカーレベル表示と併せて使用される追加的な評価（複数を含む）を含んでもよい。例えば、主題の方法は、子癇前症に関連した1つ以上の臨床パラメータ／因子、例えば、血圧、尿タンパク質、体重変化、水分貯留（浮腫）、肝酵素レベル、および血小板数を測定することをさらに含んでもよい。例えば、対象は、妊娠約14週目以降において、例えば妊娠15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34週目以降において、1つ以上の臨床症状、例えば高血圧、タンパク尿等について評価されてもよく、臨床評価の陽性結果（すなわち、子癇前症に関連した1つ以上の症状の検出）は、子癇前症の診断、子癇前症の予後診断、子癇前症の監視等を提供するためにマーカーレベル表示と組み合わせて使用される。いくつかの場合において、臨床パラメータは、例えば子癇前症マーカーレベル表示が得られるべきかどうかに関して当業者に知らせるために、例えば子癇前症の診断を行う、または確認するために、子癇前症マーカーレベル表示を得る前に測定されてもよい。いくつかの場合において、臨床パラメータは、例えば子癇前症を監視するために、子癇前症マーカーレベル表示を得た後に測定されてもよい。

20

【0062】

別の例として、子癇前症評価を提供する主題の方法は、子癇前症を発症するリスクに関連する1つ以上の因子を評価することをさらに含んでもよい。子癇前症リスク因子の限定されない例は、例えば、妊娠性糖尿病、I型糖尿病、肥満、慢性高血圧、腎疾患、血栓性素因；アフリカ系アメリカ人もしくはフィリピン人の遺伝的特徴；35歳を超える、もしくは20歳未満の年齢；子癇前症の家族歴；未経産；以前の妊娠における子癇前症；およびストレス等の医学的状态を含む。例えば、対象は、妊娠が最初に確認された時、またはそれ以降に、1つ以上のリスク因子、例えば医学的状态、家族歴等について評価されてもよく、リスク評価（すなわち子癇前症に関連した1つ以上のリスク因子の決定）の陽性結果は、子癇前症の診断、子癇前症の予後診断、子癇前症の監視等を提供するために、マーカーレベル表示と組み合わされて使用される。

30

40

【0063】

主題の方法は、様々な異なる種類の対象に対して使用され得る。多くの実施形態において、対象は、肉食動物目（例えばイヌおよびネコ）、げっ歯目（例えばマウス、モルモットおよびラット）、ウサギ目（例えばウサギ）ならびに霊長目（例えばヒト、チンパンジー、およびサル）を含む、哺乳動物クラス内である。ある特定の実施形態において、動物または宿主、すなわち対象（本明細書において患者とも呼ばれる）は、ヒトである。

【0064】

いくつかの実施形態において、子癇前症評価を提供する主題の方法は、診断、予後診断、または監視の結果を提供することを含む。いくつかの実施形態において、本開示の子癇前症評価は、当業者の評価、例えば、患者が現在子癇前症に罹患しているか否か、対象の

50

子癇前症の種類、段階もしくは重篤度等の当業者による決定（「子癇前症の診断」）、子癇前症の発症に対する患者の感受性、疾患の進行の過程、処置に対する患者の反応性等の当業者による予測（すなわち、当業者による「子癇前症の予後診断」）、または当業者による子癇前症の監視の結果を含む、書面での報告を提供する、すなわち生成することにより提供される。したがって、主題の方法は、当業者の評価の結果を提供する報告を生成または出力するステップをさらに含んでもよく、その報告は、電子媒体（例えばコンピュータモニタ上の電子的表示）の形態で、または、有形的媒体（例えば、紙に印刷された報告または他の有形的媒体）の形態で提供され得る。例えば当該技術分野において知られた、または以下でより詳細に説明される、任意の形態の報告が提供され得る。

【0065】

報告

「報告」は、本明細書において使用される場合、対象の評価およびその結果に関連する関心のある情報を提供する報告要素を含む、電子的または有形的文書である。いくつかの実施形態において、主題の報告は、少なくとも子癇前症マーカー表示、例えば、上でより詳細に説明されたように、子癇前症プロファイルまたは子癇前症スコアを含む。いくつかの実施形態において、主題の報告は、少なくとも当業者による子癇前症評価、例えば子癇前症の診断、子癇前症の予後診断、子癇前症監視の解析、処置の推奨等を含む。主題の報告は、完全に、または部分的に電子的に生成されてもよい。主題の報告は、1) 試験施設に関する情報；2) サービスプロバイダ情報；3) 患者データ；4) 試料データ；5) a) 使用される参照値およびb) 試験データ（試験データは、例えばタンパク質レベル決定を含み得る）を含む様々な情報を含み得る評価報告；6) 他の特徴、のうちの1つ以上をさらに含んでもよい。

【0066】

報告は、試験施設に関する情報を含んでもよく、この情報は、試料収集および/またはデータ生成が行われた病院、診療所、または研究室に関連する。試料収集は、対象からの液体試料、例えば血液、唾液、尿など；組織試料、例えば組織生検試料等を含み得る。データ生成は、子癇前症患者対健常個人、すなわち子癇前症を有さない、および/または発症しない個人におけるマーカー濃度の測定を含み得る。この情報は、例えば、試験施設の名称および場所、分析を行った、および/または入力データを入力した検査技師の識別情報、分析が行われた、および/または解析された日付および時間、試料および/または結果データが保存された場所、分析において使用された試薬（例えばキット等）のロット番号等に関する1つ以上の詳細を含み得る。この情報に関する報告欄は、一般に、使用者により提供された情報を使用して投入され得る。

【0067】

報告は、使用者が位置する医療施設外に、または医療施設内に位置し得るサービスプロバイダに関する情報を含んでもよい。そのような情報の例は、サービスプロバイダの名称および場所、検閲者の名前、ならびに必要な場合または望ましい場合には試料収集および/またはデータ生成を行った個人の名前を含み得る。この情報に関する報告欄は、一般に、事前に用意された選択肢の中から（例えばドロップダウンメニューを使用して）選択され得る使用者により入力されたデータを使用して投入され得る。報告における他のサービスプロバイダ情報は、結果について、および/または解釈的報告についての技術情報に関する問い合わせ先情報を含んでもよい。

【0068】

報告は、患者の病歴（例えば、年齢、人種、血清型、以前の子癇前症の発現、および妊娠の任意の他の特徴を含み得る）、ならびに管理上の患者データ、例えば患者を識別するための情報（例えば、名前、患者の生年月日（DOB）、性別、郵送先および/または住所、診療記録番号（MRN）、医療施設における部屋および/またはベッド番号）、保険情報等）、監視評価を命じた患者の主治医または他の医療従事者の名前、および命じた主治医とは異なる場合、患者の医療に責任のある担当医師（例えばかかりつけの医師）の名前を含む、患者データセクションを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

報告は、監視評価において解析された生体試料に関する情報、例えば患者から得られた生体試料の源（例えば、血液、唾液、または組織の種類等）、試料をどのように扱ったか（例えば、保存温度、調製プロトコル）および回収された日付および時間を提供し得る、試料データセクションを含んでもよい。この情報に関する報告欄は、一般に、使用者により入力されたデータを使用して投入され、そのいくつかは、事前に用意された選択肢として提供され得る（例えばドロップダウンメニューを使用して）。報告は、結果セクションを含んでもよい。例えば、報告は、タンパク質レベル決定分析（例えば「血清中 1 . 5 n m o l / リットルの A D A M 1 2 」）の結果、または計算された子癇前症スコアを報告するセクションを含んでもよい。

10

【 0 0 7 0 】

報告は、本明細書に記載のようにデータの処理後に生成された情報を含み得る、評価報告セクションを含んでもよい。解釈的報告は、対象が子癇前症を発症する可能性の予測を含んでもよい。解釈的報告は、子癇前症の診断を含んでもよい。解釈的報告は、子癇前症の特性決定を含んでもよい。また、報告の評価部分は、任意選択で推奨（複数可）を含んでもよい。例えば、結果が子癇前症が生じ得ることを示す場合、推奨は、当該技術分野において推奨されるように、食生活が変更される、血圧の薬が投与される等の推奨を含んでもよい。

【 0 0 7 1 】

また、報告は、追加的な要素または修正された要素を含んでもよいことが、容易に理解される。例えば、電子的である場合、報告は、報告の選択された要素に関するより詳細な情報を提供する、内部または外部データベースを指し示すハイパーリンクを含有してもよい。例えば、報告の患者データ要素は、電子的患者記録、またはそのような患者記録にアクセスするためのサイトへのハイパーリンクを含んでもよく、この患者記録は、部外秘のデータベースに維持される。この後者の実施形態は、院内システムまたは診療所内の環境において興味深い。電子的形態の場合、報告は、好適な物理媒体、例えばコンピュータ可読媒体、例えばコンピュータメモリ、ジップドライブ、C D、D V D 等に記録される。

20

【 0 0 7 2 】

報告は、上記要素の全てまたは一部を含んでもよいが、但し、報告は、一般に、使用者により要求される解析（例えば、計算された子癇前症マーカーレベル表示；子癇前症の予測、診断または特性決定）を提供するのに十分な要素を少なくとも含むことが、容易に理解される。

30

【 0 0 7 3 】

試薬、系およびキット

上述の方法の 1 つ以上を実践するための試薬、系およびそのキットもまた提供される。主題の試薬、系およびそのキットは、大きく変動し得る。興味深い試薬は、試料からの子癇前症マーカーの上述のマーカーレベル表示の生成における使用のために特別設計された試薬、例えば 1 つ以上の検出要素、例えば、タンパク質の検出のための抗体またはペプチド、核酸の検出のためのオリゴヌクレオチド等を含む。いくつかの場合において、検出要素は、単一の子癇前症マーカーの発現を検出するための試薬を含み、例えば、検出要素は、1 つ以上の検出要素を含むディップスティック、プレート、アレイ、またはカクテル、例えば、1 つ以上の子癇前症マーカーの発現を同時に検出するために使用され得る、1 つ以上の抗体、1 つ以上のオリゴヌクレオチド、P C R プライマーの 1 つ以上のセット等であってもよい。

40

【 0 0 7 4 】

マーカーレベル表示、例えば子癇前症マーカーレベル表示を生成するために特別に作製される試薬の 1 つの種類は、例えば E L I S A 形式、x M A P（商標）ミクロスフェア形式、プロテオームアレイ、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット法、ドットブロット法、または免疫組織化学による解析のための懸濁液としての、タンパク質マーカーに特異的に結合する抗体の集合である。これらの抗体を使用するための方法は、当該技術分野

50

において周知である。これらの抗体は、溶液として提供されてもよい。代替的に、それらは、固体マトリックスに、例えばマルチウェルディッシュのウェルまたはxMAPマイクロスフェアの表面に事前に結合した状態で提供されてもよい。

【0075】

そのような試薬の別の種類は、関心のある遺伝子が提示されたプローブ核酸のアレイである。様々な異なるアレイ形式が、広範な異なるプローブ構造、基質組成および結合技術（例えば、ドットプロットアレイ、マイクロアレイ等）と共に当該技術分野において知られている。興味深い代表的なアレイ構造は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,143,854号、同第5,288,644号、同第5,324,633号、同第5,432,049号、同第5,470,710号、同第5,492,806号、同第5,503,980号、同第5,510,270号、同第5,525,464号、同第5,547,839号、同第5,580,732号、同第5,661,028号、同第5,800,992号、ならびに国際公開第WO95/21265号、同第WO96/31622号、同第WO97/10365号、同第WO97/27317号、欧州特許第EP373203号、および同第EP785280号に記載のものを含む。

10

【0076】

遺伝子、例えば子癇前症遺伝子のマーカーレベル表示を生成するために特別に調製される試薬の別の種類は、（例えば、PCRベース技術、例えばリアルタイムRT-PCRを使用して）そのような遺伝子を選択的に増幅するように設計される遺伝子特異的プライマーの集合である。遺伝子特異的プライマーおよびそれを使用するための方法は、米国特許第5,994,076号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0077】

特に興味深いのは、ヘモペキシン、フェリチン、カテプシンB、カテプシンC、ADAMメタロペプチダーゼドメイン12、ケラチン33A、ハプトグロビン、アルファ-2-マクログロブリン、アポリポタンパク質E、アポリポタンパク質C-III、アポリポタンパク質A-I、レチノール結合タンパク質4、ヘモグロビン、フィブリノゲン、およびピカチュリンからなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子/タンパク質に特異的なプローブ、プライマーもしくは抗体（試薬とも呼ばれる）、または補因子/補欠分子族へムに特異的な、いくつかの場合においては複数のこれらの遺伝子/ポリペプチド、例えば少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つもしくはそれ以上の遺伝子/ポリペプチドに特異的な生化学的基質を含む、プローブのアレイ、プライマーの集合、または抗体の集合である。ある特定の実施形態において、プローブ、プライマーまたは抗体の集合は、カテプシンCおよびピカチュリンの1つ以上に特異的な試薬を含む。ある特定の実施形態において、プローブ、プライマー、または抗体の集合は、ピカチュリンと、ヘモペキシン、ApoA1、ApoC3、RBP4、および/またはハプトグロビンの1つ以上に特異的な試薬を含む。ある特定の実施形態において、プローブ、プライマー、または抗体の集合は、ピカチュリン、ヘモペキシン、ApoA1、ApoC3、RBP4、およびハプトグロビンに特異的な試薬を含む。ある特定の実施形態において、プローブ、プライマー、または抗体の集合は、ヘモペキシン、フェリチン、カテプシンB、カテプシンC、ADAMメタロペプチダーゼドメイン12、ケラチン33A、ハプトグロビン、アルファ-2-マクログロブリン、アポリポタンパク質E、アポリポタンパク質C-III、アポリポタンパク質A-I、レチノール結合タンパク質4、ヘモグロビン、フィブリノゲン、およびピカチュリンに特異的な試薬、ならびにへムに特異的な生化学的基質を含む。主題のプローブ、プライマー、もしくは抗体の集合もしくは試薬は、上に列挙された遺伝子/タンパク質/補因子のみに特異的な試薬を含んでもよく、または、それらは、上に列挙されていない追加的な遺伝子/タンパク質/補因子に特異的な試薬、例えば、その発現パターンが当該技術分野において子癇前症と関連していることが知られている遺伝子/タンパク質/補因子、例えばsFLT-1（VEGF-R1）およびPIGFに特異的なプローブ、プライマー、もしくは抗体を含んでもよい。

30

40

50

【0078】

いくつかの場合において、系が提供され得る。本明細書において使用される場合、「系」という用語は、試薬の集合を指すが、例えば、同じまたは異なる供給元から試薬の集合を購入することにより蓄積される。いくつかの場合において、キットが提供され得る。本明細書において使用される場合、「キット」という用語は、一緒に提供される、例えば販売される試薬の集合を指す。例えば、試料核酸またはタンパク質の、それぞれ核酸または抗体ベースの検出は、個人に合わせた子癇前症医療のために、これらのバイオマーカーの多重決定を可能にする電気化学的バイオセンサプラットフォームと結合されてもよい。

【0079】

主題の発明の系およびキットは、上述のアレイ、遺伝子特異的なプライマーの集合、またはタンパク質特異的な抗体の集合を含んでもよい。系およびキットは、様々な方法において使用されている1つ以上の追加的試薬、例えば、標的核酸を生成するためのプライマー、事前に混合される、または分離していてもよいdNTPおよび/またはrNTP、1つ以上の一意に標識化されたdNTPおよび/またはrNTP、例えばビオチン化またはCy3もしくはCy5タグ化dNTP、異なる散乱スペクトルを有する金もしくは銀粒子、または他の合成後標識化試薬、例えば蛍光染料の化学活性誘導体、酵素、例えば逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ等、様々な緩衝媒体、例えばハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液、事前に作製されたプローブアレイ、標識化プローブ精製試薬およびコンポーネント、例えばスピンカラム等、シグナル生成および検出試薬、例えば標識化二次抗体、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート、化学蛍光または化学発光基質等をさらに含んでもよい。

【0080】

主題の系およびキットはまた、例えば上述のマーカー決定要素を用いて決定された「入力」マーカーレベルプロファイルに基づいて子癇前症の予後診断を行うために、1つ以上の子癇前症表現型決定要素を含んでもよく、この要素は、多くの実施形態において、例えば好適な実験的またはコンピュータ手段により使用され得る参照または対照試料またはマーカー表示である。代表的な子癇前症表現型決定要素は、子癇前症を有する、または有さないことが知られている個人からの試料、マーカーレベル表示のデータベース、例えば上述のような参照または対照プロファイルまたはスコア等を含む。

【0081】

上記コンポーネントに加えて、主題のキットは、主題の方法を実践するための説明をさらに含む。これらの説明は、様々な形態で主題のキット内に存在してもよく、その1つ以上がキット内に存在してもよい。これらの説明が存在し得る1つの形態は、好適な媒体または基板上、例えば情報が印刷された1枚または数枚の紙、キットの包装、添付文書等に印刷された情報として存在してもよい。さらに別の手段は、情報が記録されたコンピュータ可読媒体、例えば、ディスク、CD等である。存在し得るさらに別の手段は、インターネットを介して離れたサイトにおける情報にアクセスするために使用され得るウェブサイトアドレスである。任意の便利な手段がキット内に存在し得る。

【0082】

以下の実施例は、限定を目的としてではなく、例示を目的として提供される。

【実施例】

【0083】

以下の実施例は、当業者に本発明をどのように作製および使用するかの完全なる開示および説明を提供するように提示され、本発明者が自身の発明とみなすものの範囲を限定するようには意図されておらず、以下の実験が全てまたは唯一の実行される実験であるとするようには意図されていない。使用される数値（例えば、量、温度等）に対する正確さを確保する努力がなされているが、いくつかの実験によるエラーおよび偏差が計上されるはずである。別途示されない限り、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は、摂氏温度であり、圧力は、大気圧であるか、またはそれに近い。

【0084】

実施例 1

母体罹患率および死亡率の主な原因として、子癇前症 (PE) は、全妊娠者の 5% ~ 8% が罹患する妊娠関連血管障害である (Berg et al. Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993 - 1997 and 2001 - 2005. *Obstetrics and gynecology* 2009; 113: 1075 - 81; Mackay et al. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstetrics and gynecology* 2001; 97: 533 - 8)。しばしば胎児発育遅延および早期産、ならびに胎児罹患率および死亡率の原因となる PE は、胎盤と共に胎児を出産することにより改善され得る (Powe et al. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation* 2011; 123: 2856 - 69)。PE の病因学は、完全には理解されていない。現在の PE の診断は、高血圧およびタンパク尿の兆候に基づいている (Gynecologists ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstetrics and gynecology* 2002; 99: 159 - 67) が、感度および特異性に欠いており、母体および胎児の有害な転帰の不良な予後を伴う (Zhang et al. Prediction of adverse outcomes by common definitions of hypertension in pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 2001; 97: 261 - 7)。したがって、状態の進行のより良好な監視の機会、したがって改善された転帰および経済的利点を伴う断定的な診断を提供することができる PE バイオマーカーを特定することが必要である。

【0085】

病態生理学は困難な点が多いが、PE は、胎盤が重要な役割を担う妊娠の多重障害である。研究者は、遺伝子、ゲノムおよびプロテオーム的手法を使用して、PE および対照胎盤組織を比較した。症例 - 対照試料の転写プロファイルにより、疾患特異的発現パターン、標準経路および遺伝子間ネットワークが特定された (Lapaire et al. Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates. *Fetal diagnosis and therapy* 2012; 31: 147 - 53; Nishizawa et al. Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placenta tissue derived from early and late onset severe preeclampsia. *Placenta* 2007; 28: 487 - 97; Loset et al. transcriptional profile of the decidua in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 2011; 204: 84 e1 - 27; Johansson et al. Partial correlation network analyses to detect altered gene interactions in human disease: using preeclampsia as a model. *Human genetics* 2011; 129: 25 - 34; Sitras et al. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta* 2009; 30: 424 - 33; Tsa

i et al. Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signaling pathways. *Placenta* 2011; 32: 175-82; Winn et al. Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. *Endocrinology* 2009; 150: 452-62)。また、プロテオームベースバイオマーカー研究(Kolla et al. Quantitative proteomic (iTRAQ) analysis of 1st trimester maternal plasma samples in pregnancies at risk for preeclampsia. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012; 2012: 305964; Mary et al. Dynamic proteome in enigmatic preeclampsia: an account of molecular mechanisms and biomarker discovery. *Proteomics Clinical applications* 2012; 6: 79-90; Carty et al. Urinary proteomics for prediction of preeclampsia. *Hypertension* 2011; 57: 561-9)では、将来の試験のための候補バイオマーカーが明らかとなった。胎盤血管新生因子および抗血管新生因子の不均衡、上昇した可溶性fms様チロシンキナーゼ(sFlt-1)および減少した胎盤成長因子(PIGF)レベルが、PEの病因において示唆されており(Shibata et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005; 90: 4895-903; Maynard et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* 2003; 111: 649-58; Wolf et al. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology* 2005; 193: 16-22; Rajakumar et al. Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta* 2005; 26: 563-73; Taylor et al. Altered tumor vessel maturation and proliferation in placenta growth factor-producing t

umors: potential relationship to post-therapeutic tumor angiogenesis and recurrence. International journal of cancer Journal international du cancer 2003; 105: 158-64; Tidewell et al. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. American journal of obstetrics and gynecology 2001; 184: 1267-72; Torry et al. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. American journal of obstetrics and gynecology 1998; 179: 1539-44)、sFlt-1/PlGF比が、PEの診断および管理における有用な指標として提案されている(Stepan et al. [use of angiogenic factors (sflt-1/plgfratio) to confirm the diagnosis of preeclampsia in clinical routine: First experience]. Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie. 2010; 214: 234-238; Verlohren et al. An automated method for the determination of the sflt-1/plgfratio in the assessment of preeclampsia. Am. J. Obst. And Gyn. 2010; 202: 161 e161-161 e111)。しかしながら、日常的臨床診療における、広く適用可能な高感度および特異的分子PE試験は、現在利用可能ではない。

【0086】

これらの考慮点に照らして、PEの診断および予後診断バイオマーカーを発見する強力な理論的根拠および必要性がある。我々は、マイクロアレイ多重メタ解析、および2次元(2D)ゲル解析によるプロテオーム同定からの結果を統合した、総合的な不偏マルチ「オミックス」手法を使用した。メタ解析において我々が適用したパラメトリック法(Morgan et al. Comparison of multiplex meta-analysis techniques for understanding the acute rejection of solid organ transplants. BMC bioinformatics 2010; 11 Suppl 9: S6; Chen et al. Differentially expressed RNA from public microarray data identifies serum protein biomarkers for cross-organ transplant rejection and other conditions. PLoS computational biology 2010; 6)により、我々は、実験を通して一貫した有意な差次的遺伝子発現を特定し、下流の実験検証のためのバイオマーカーを開発することができた。血清タンパク質は、通例的に疾患の診断に使用されるが、高感度および特異的バイオマーカーは、発見が困難であり、高い存在度のタンパク質によって容易に隠される可能性があるその低い血清学的存在度に起因し得る。我々の血清タンパク質マーカー発見法(Ling et al. Plasma profiles in active systemic juvenile idiopathic arthritis: Biomarkers and biological implications. Proteomics 2010)は、抗体ベース血清高存在度タンパク質欠失および2Dゲル比較プロファイリングを組み合わせ、その後のタンパク質量分析同定のためにPE血清と対照血清との間の差次的タンパク質ゲルスポットを発見する。我々は、PE診断を可能にする差次的な血清学的特徴が存在すると仮定した。我々の発見に関する所見を検証するために、我々は、より高い処理量の方法で

ある利用可能な E L I S A 分析により、全ての候補を試験した。最も少ない数のタンパク質検体を用いて高感度および特異的バイオマーカーパネルを構築および最適化するために、遺伝的アルゴリズムを使用した。比較トランスクリプトミクスおよびプロテオミクスからのバイオマーカー、ならびにそれらの関連経路の綿密な検査により、P E 病態生理学におけるそれらの役割に関する新たな仮説が得られた。

【 0 0 8 7 】

示された結果により、高感度および特異的血清学的バイオマーカーパネルが P E を診断するために構築され得るという我々の仮説が検証された。我々の知る限り、これは、P E 識別における s F l t - 1、P I G F、および s F l t - 1 / P I G F 比よりも優れた新規な P E バイオマーカーを明らかにするための、マルチ「オミックス」ベースバイオマーカー手法を使用した最初の研究である。我々は、これらの P E バイオマーカーおよびそれらの関連経路の機能的な重要性が、疾患の病因に対する新たな洞察を提供し、効果的な新規治療法をもたらすと考えている。

【 0 0 8 8 】

材料および方法

研究デザイン。 全体的な試料の配分、P E バイオマーカーの発見、検証、および予測パネル構築ステップを、図 1 に示す。我々の研究は、(1) コンピュータによる発現解析 (n = 1 1 1 P E および n = 1 5 2 対照胎盤試料) およびプロテオーム 2 D ゲルプロファイリング (プールされた n = 5 P E およびプールされた n = 5 対照血清プロテオーム) の両方を含む発見段階 ; ならびに (2) 独立した P E (n = 3 2) および対照 (n = 3 2) コホートの解析を含む検証段階の 2 つの段階で行われた。全ての血清試料は、P r o M e d D X I n c . (N o r t o n , M A 0 2 7 6 6 [http : / / w w w . p r o m e d d x . c o m](http://www.promeddx.com)) から購入した。全ての血清試料は、インフォームドコンセントが得られた後に回収され、詳細な症例報告書を含んでいた。現在喫煙者である者、薬物乱用の経歴を有する者、体外受精補助を使用した者、慢性高血圧を有する者、および子宮内胎児発育遅延を併発した妊娠者は、この研究から外した。症例 (P E) および対照 (正常妊娠) コホートは、妊娠期間、民族および出産経歴に関して一致させた。

【 0 0 8 9 】

P E および対照胎盤を比較する発現の多重メタ解析。 以下の表 1 に示されるように、7 つの P E 胎盤発現研究 (N i s h i z a w a e t a l . M i c r o a r r a y a n a l y s i s o f d i f f e r e n t i a l l y e x p r e s s e d f e t a l g e n e s i n P l a c e n t a t i s s u e d e r i v e d f r o m e a r l y a n d l a t e o n s e t s e v e r e p r e e c l a m p s i a . P l a c e n t a 2 0 0 7 ; 2 8 : 4 8 7 - 9 7 ; S i t r a s e t a l . p l a c e n t a l p l a c e n t a l g e n e e x p r e s s i o n i n s e v e r e p r e e c l a m p s i a . P l a c e n t a 2 0 0 9 ; 3 0 : 4 2 4 - 3 3 ; T s a i e t a l . T r a n s c r i p t i o n a l p r o f i l i n g o f h u m a n p l a c e n t a s f r o m p r e g n a n c i e s c o m p l i c a t e d b y p r e e c l a m p s i a r e v e a l s d i s r e g u l a t i o n o f s i a l i c a c i d a c e t y l e s t e r a s e a n d i m m u n e s i g n a l l i n g p a t h w a y s . P l a c e n t a 2 0 1 1 ; 3 2 : 1 7 5 - 8 2 ; W i n n e t a l . S e v e r e p r e e c l a m p s i a - r e l a t e d c h a n g e s i n g e n e e x p r e s s i o n a t t h e m a t e r n a l - f e t a l i n t e r f a c e i n c l u d e s i a l i c a c i d - b i n d i n g i m m u n o g l o b u l i n - l i k e l e c t i n - 6 a n d p a p p a l y s i n - 2 . E n d o c r i n o l o g y 2 0 0 9 ; 1 5 0 : 4 5 2 - 6 2 ; F o u n d s e t a l . A l t e r e d g l o b a l g e n e e x p r e s s i o n i n f i r s t t r i m e s t e r p l a c e n t a s o f w o m e n d e s t i n e d t o d e v e l o p p r e e c l a m p s i a . P l a c e n t a 2 0 0 9 ; 3 0 : 1 5 - 2 4 ; N i s h i z a w a

et al. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe preeclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reproductive biology and endocrinology* 2011; 9: 107) を組み合わせ、以前に我々が開発した方法を用いて、多重メタ解析に供した (Morgan et al. Comparison of multiplex meta analysis techniques for understanding the acute rejection of solid organ transplants. *BMC bioinformatics* 2010; 11 Suppl 9: S6; Chen et al. Differentially expressed RNA from public microarray data identifies serum protein biomarkers for cross-organ transplant rejection and other conditions. *PLoS computational biology* 2010; 6)。試験した 22,394 の遺伝子のそれぞれに対して、全ての研究にわたるメタ倍数変化を計算した。5 つ以上の研究において測定され、メタ効果 p 値が 4.5×10^{-5} 未満である場合、有意な遺伝子として選択した。次いで、血清、血漿、または尿中の既知の検出可能な存在度を有する 3,638 のタンパク質のリストにより遺伝子セットをフィルタリングした (Dudley and Butte. Disease signatures are robust across tissues and experiments. *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing* 2009: 27-38)。

【表 1】

表 1 PE マーカー発見に基づく多重メタ解析に使用された発現データセット。

データセット	表題	組織	症例	対照
Nishizawa et al Placenta 2007	Differentially Expressed Genes in Placental Tissue of Severe Preeclampsia	胎盤	10	4
Tsai et al Placenta 2011	Transcriptional Profiling of Human Placentas from Pregnancies Complicated by Preeclampsia	胎盤	23	37
Nishizawa et al 2011	Gene expression profiling for placentas from pre-eclamptic, unexplained FGR and normal pregnancies	胎盤	8	8
Winn et al Endocrinology 2009	Severe Preeclampsia-Related Changes in Gene Expression at the Maternal-Fetal Interface	胎盤	12	11
Sitras et al Placenta 2009	Placental gene expression in severe preeclampsia	胎盤	17	26
Found et al Placenta 2009	Chorionic villus sampling (CVS) microarray in preeclampsia	CVS	4	8
Roten et al MolHumRep 2011	Transcription profiling of human decidua basalis to identify pre-eclampsia susceptibility genes	基底脱着膜	37	58
		合計	111	152

【0090】

プールされた PE および対照患者血清試料を比較した 2D ゲル解析。より低い存在度の血清タンパク質の試料を濃縮するために、Agilent Multiple Affinity Removal System (Agilent, Santa Clara, CA) を使用して、血清試料を、血清に多く存在する上位 14 のタンパク質 (アルブミン、IgG、抗トリプシン、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノゲン、アルファ 2 - マクログロブリン、アルファ 1 - 酸性糖タンパク質、IgM、アポリポタンパク質 A - I、アポリポタンパク質 A - II、補体 C - III およびトランスサイレチン) を欠失させた。具体的には、欠失により、残りのタンパク質の充填を 1.5 倍増加さ

せることができた (Ling et al. Plasma profiles in active systemic juvenile idiopathic arthritis: Biomarkers and biological implications. Proteomics 2010)。さらなる試料処理、2Dゲル電気泳動、比較解析、および質量分析による差次的ゲルスポットタンパク質同定を、以前に説明されたように行った (Ling et al, 同書)。

【0091】

PEマーカー候補を検証するELISA分析。分析は全てELISA分析であり、業者の説明に従い市販のキットを使用して行われた。分析は全て、以下の選択された検体の血清レベルを測定するために行われた：アルファ-2-マクログロビン (A2M)、Abnova Inc. (Taipei, Taiwan)；ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼドメイン含有タンパク質12 (ADAM12)、Mybiosource (SD, US)；アディポフィリン (ADRP)、Biotang Inc. (MA, US)；アポリポタンパク質 (APO) A-I、Abcam Inc. (MA, US)；アポリポタンパク質 (APO) C-III、Abnova Inc. (Taipei, Taiwan)；アポリポタンパク質 (APO) -E、Abcam Inc. (MA, US)；カテプシンB (CTSB)、Abcam. (MA, US)；カテプシンC (CTSC)、USCN Life Science (Wuhan, China)；ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド2 (CCL2)、Abnova (Taipei, Taiwan)；ハプトグロビン (HP)、Abcam Inc. (MA, US)；ヘモペキシン (HPX)、Abcam Inc. (MA, US)；PIGF、R&D system Inc. (MN, US)；ヘムオキシゲナーゼ1 (HMOX1)、Biotang Inc. (MA, US)；インスリン様成長因子結合タンパク質7 (IGFBP7)、USCN Life Science (Wuhan, China)；全鉄、Abnova Inc. (Taipei, Taiwan)；ヘモグロビン (HB)、Bethyl laboratory (TX, US)；ヘムオキシゲナーゼ1 (HMOX1)、Biotang Inc. (MA, US)；ケラチン33A (KRT33A)、USCN Life Science (Wuhan, China)；ケラチン40 (KRT40)、USCN Life Science (Wuhan, China)；キニノゲン1 (KNG1)、Abcam Inc. (MA, US)；ピカチュリン (EGFLAM)、EIAab Science (Wuhan, China)；血小板前駆体塩基性タンパク質 (PPBP)、Abnova Inc. (Taipei, Taiwan)；レチノール結合タンパク質4 (RBP4)、Abcam Inc. (MA, US)；および可溶性fms様チロシンキナーゼ (sFlt-1、R&D system Inc. (MN, US))。

【0092】

統計解析。患者人口統計データは、「疫学的計算機」(R e p i c a l cパッケージ)を使用して解析した。スチューデントのt検定を行って連続型変数に対するp値を計算し、カテゴリー変数の比較解析にはフィッシャーの正確確率検定を使用した。R m e t aパッケージによるフォレストプロットを使用して、胎盤発現メタ解析とすると共に、血清タンパク質ELISAの結果をグラフを用いて要約した。症例 (PE) および対照試料は対にされておらず、したがって、最初の血清蛋白質フォレストプロット解析は、慎重に解釈されるべきである。ELISAの結果の後のフォレストプロット解析のために、ブートストラップ法を使用して症例および対照群からの「対」試料を作成した。したがって、血清タンパク質フォレストプロット解析は、PEおよび正常妊娠対照対象の識別における各検体の能力の全体的な効果の推定を提供する。スチューデントのt検定 (両側) およびマン-ホイットニーU検定 (両側)、ならびに局所FDR (Efron et al. Empirical bayes analysis of microarray experiment. J Am Stat Assoc 2001; 96: 1151-60) を使用して仮説検定を行い、複数仮説検定問題を補正した。遺伝的アルゴリズム (R g e n a l gパッケージ) を使用して、バイオマーカー特徴選択およびパネル最適化

を行った。各バイオマーカーパネル解析の予測性能は、ROC曲線解析により評価した (Zweig et al. Receiver - oPErating character istic (ROC) plots : a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clinical chem istry 1993 ; 39 : 561 - 77 ; Sing et al. ROC R : vis ualizing classifier performance in R. Bio informatics 2005 ; 21 : 3940 - 1)。バイオマーカーパネルスコアは、母体循環系におけるそれぞれ上方および下方調整されたタンパク質バイオマーカーの幾何平均間の比として定義した。

【0093】

結果

PEマーカー候補を明らかにするマルチ「オミックス」ベースの発見。 図1に示されるように、正常対照からPEを診断するバイオマーカー候補を発見するために、以前の胎盤発現研究を組み合わせで多重メタ解析とした。この取り組みにより、A2M、ADAM12、CCL2、CTSB、CTSC、EGFLAM、HOMX1、IGFBP7、KRT33A、KRT40、PIGF、PPBP、およびsFlt-1がPEの差次的胎盤バイオマーカーとして同定された。並行して、血清学的PEおよび対照プールプロテオームを比較し、後に配列決定される極めて識別力のあるタンパク質スポットを明らかにするために、2Dゲル解析を行った。2Dゲルプロファイリングは、A2M、ADFP、APOA-I、APOC-IIII、APO-E、KNG1、HP、HPX、およびRBP4

【0094】

組み合わされたPEバイオマーカーリストの綿密な検査により、A2M、HMOX-1およびHPXがヘム/ヘモグロビン異化経路に関与し得ることが判明した。細胞外ヘムは、望ましくない器官、組織および細胞傷害を引き起こす可能性があり、それぞれHPXおよびHPと複合化した細胞外ヘムおよびヘモグロビン(HB)のエンドサイトーシスの受容体経路が存在する (Hvidberg et al. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. Blood 2005 ; 106 : 2572 - 9)。ヘムは、最終的にポルフィリン環をビリルビン、一酸化炭素および鉄に分解し、一方で鉄はフェリチン(FT)に結合する。A2Mは、急性期タンパク質であり、ヘムは、炎症の間の肝A2M発現の制御における新たな調整要素であることが提案された (Lyoumi et al. Heme and acute inflammation role in vivo of heme in the hepatic expression of positive acute-phase reactants in rats. European journal of biochemistry / FEBS 1999 ; 261 : 190 - 6)。遊離ヘムは、その触媒活性により酸化ストレスを引き起こし得るため、任意の既知のタンパク質のヘムに対し最も高い親和性を有するHPXは、循環から遊離ヘムを除去するためのスカベンジャーとして機能する (Delanghe et al. Hemopexin : a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. Clinica chimica acta ; international journal of clinical chemistry 2001 ; 312 : 13 - 23 ; Tolosano et al. Heme scavenging and the other facets of hemopexin. Antioxidants & redox signaling 2010 ; 12 : 305 - 20)。血漿HPXは、PE患者のアンジオテンシンIIに対する血管反応性の潜在的調整因子として見出された (Bakker et al. Hemopexin as a Potential Regulator of Vascular Responsiveness to Angiotensin II. Reprod Sci 2012)。フィブリノゲン(F

G A) は、最近、ヘムに関連した一酸化炭素感知分子であることが提案された (N i e l s e n e t a l . F i b r i n o g e n i s a h e m e - a s s o c i a t e d , c a r b o n m o n o x i d e s e n s i n g m o l e c u l e : a p r e l i m i n a r y r e p o r t . B l o o d c o a g u l a t i o n & f i b r i n o l y s i s : a n i n t e r n a t i o n a l j o u r n a l i n h a e m o s t a s i s a n d t h r o m b o s i s 2 0 1 1 ; 2 2 : 4 4 3 - 7) 。子癇前症には、急性期反応および全身酸化ストレスが関与する。無細胞ヘモグロビン、酸化マーカー、および抗酸化ヘムスカベンジャーのレベルの増加が、PEにおいて見られた (O l s s o n e t a l . I n c r e a s e d l e v e l s o f c e l l - f r e e h e m o g l o b i n , o x i d a t i o n m a r k e r s , a n d t h e a n t i o x i d a t i v e h e m e s c a v e n g e r a l p h a (1) - m i c r o g l o b u l i n i n p r e e c l a m p s i a . F r e e r a d i c a l b i o l o g y & m e d i c i n e 2 0 1 0 ; 4 8 : 2 8 4 - 9 1) 。H M O X - 1 の誘導は、低酸素誘導反応性酸素種および s F l t - 1 (O l s s o n e t a l , 同書) 、ならびに胎盤虚血の病理学的因子の多く (G e o r g e e t a l . I n d u c t i o n o f h e m e o x y g e n a s e 1 a t t e n u a t e s p l a c e n t a l i s c h e m i a - i n d u c e d h y p e r t e n s i o n . H y p e r t e n s i o n 2 0 1 1 ; 5 7 : 9 4 1 - 8) を下方調整することが実験的に示されている。これは、PE胎盤虚血および結果的な機能障害性ヘム/ヘモグロビン異化が、PE病態生理学の一端を担うことを示唆している。

10

20

【0095】

試料特性。 血清学的タンパク質バイオマーカー検証に使用されたPEおよび対照対象は、早期 (PE、n = 1 5 ; 対照、n = 1 6) および後期 (PE、n = 1 7 ; 対照、n = 1 6) 妊娠群に分けることができる。以下の表2および表3に要約されるように、年齢 (p 値、早期 0 . 8 9 、後期 0 . 8 5 7 、全体 0 . 6) 、登録時の妊娠期間 (p 値、早期 0 . 8 5 1 、後期 0 . 8 9 5 、全体 0 . 8 2 4) 、民族 (p 値、早期 0 . 5 7 、後期 0 . 1 2 3 、全体 0 . 2 8 9) 、または対象の併発病状および他の臨床的特徴 (p 値、全体 0 . 3 5) において、有意な差は観察されなかった。

【0096】

PE患者は、高血圧およびタンパク尿の両方を特徴とする子癇前症と診断された。表4に示されるように、32名のPE患者の全員が高血圧およびタンパク尿の両方を有し；その43.8%が頭痛を有し；その21.9%が浮腫を有し；その25.0%が他の追加的症状を有していた。ボディ・マス・インデックス (B M I 、妊娠前) 、血圧 (B P) 、タンパク質/クレアチニン比 (P C R) 、および妊娠暦を含む他の特徴もまた、表5に示される。

30

【表 2】

表 2 民族、年齢および妊娠週。

	早期			後期			全体
特徴	対照 n = 15 (48.4%)	PE n = 16 (51.6%)	p 値	対照 n = 17 (51.5%)	PE n = 16 (48.5%)	p 値	p 値
民族			0.57			0.123	0.289
アフリカ系アメリカ人	5 (33.3%)	5 (31.2%)		2 (11.8%)	4 (25%)		
アジア人	2 (13.3%)	0 (0)		0 (0%)	0 (0)		
ヒスパニック	8 (53.3%)	10 (62.5%)		11 (64.7%)	12 (75%)		
その他	0 (0%)	1 (6.2%)		4 (23.5%)	0 (0%)		
年齢 (歳)							
平均 (SD)	24.3 (4.5)	24.1 (6.1)	0.89	27.9 (9.0)	26.6 (7.7)	0.857	0.6
妊娠週							
平均 (SD)	30.3 (3.2)	30.1 (2.9)	0.851	37.1 (1.4)	37.2 (1.6)	0.895	0.824

10

【表 3】

表 3 併発病状および臨床的特徴

特徴	対照 n = 32 (50%)	PE n = 32 (50%)	<i>p</i> 値
併発病状／臨床的特徴			0.35
貧血	0 (0)	2 (6.2%)	
喘息、その他:クラミジア (2009)	1 (3.1%)	0 (0)	
喘息、その他:B 群連鎖球菌キャリア、母体欠乏性貧血、血小板減少症	1 (3.1%)	0 (0)	
クローン病	0 (0)	1 (3.1%)	
糖尿病 - II 型	2 (6.2%)	1 (3.1%)	
糖尿病 - II 型、病的肥満、その他:鬱病の病歴	1 (3.1%)	0 (0)	
糖尿病 - II 型、その他:左側の乳房のしこり	1 (3.1%)	0 (0)	
糖尿病 (妊娠性)	1 (3.1%)	3 (9.4%)	
糖尿病 (妊娠性)、肥満	1 (3.1%)	0 (0)	
脂肪肝	1 (3.1%)	0 (0)	
甲状腺機能亢進症	1 (3.1%)	0 (0)	
偏頭痛、尿路感染 (UTI)	1 (3.1%)	0 (0)	
なし	19 (59.4%)	24 (75%)	
その他:境界型妊娠性糖尿病	1 (3.1%)	0 (0)	
その他:C 型肝炎抗体 = 反応性	0 (0)	1 (3.1%)	
その他:出産時の心臓手術歴、軽微な臍帯卵膜付着	1 (3.1%)	0 (0)	

20

30

【表 4】

表 4 PE 患者の主兆候および症状

主兆候および症状	数 (パーセント)
高血圧	32 (100%)
タンパク尿	32 (100%)
頭痛	14 (43.8%)
浮腫	7 (21.9%)
その他	8 (25.0%)

40

50

【表 5】

表 5 P E 患者の臨床情報

特徴	統計
BMI (妊娠前) (kg/m ²)	29.1 (23.0, 33.9)
収縮期血圧	146.0 (134.0, 157.5)
拡張期血圧	85.5 (77.0, 94.5)
タンパク質/クレアチニン比 (PCR) 試験結果 (mg/g)	803.5 (449.5, 1492.0)
子癇前症の既往歴	
あり	3 (9.4%)
なし	28 (87.5%)
多胎妊娠	
あり	3 (9.4%)
なし	29 (90.6%)
流産の回数 (人工または自然)	0 (0,1)
満期妊娠の回数	0 (0,1.25)
早産の回数	0 (0,0)
喫煙歴	
なし	32 (100%)
全妊娠回数	2 (1,4)
今回の妊娠に使用された体外受精 (IVF)	
なし	32 (100%)

10

20

【 0 0 9 7 】

P E および対照母体血清試料を使用したバイオマーカー検証。 利用可能な E L I S A 分析に基づいて、P E 血清学的タンパク質パネルが迅速な実用的臨床ツールの開発を可能にし得るかどうかを特定するために、発現メタ解析および 2 D ゲルプロファイリングからのバイオマーカー候補を、P E (n = 3 2) および妊娠期間を一致させた対照試料 (n = 3 2) を使用した利用可能な血清分析により検証した。図 5 ~ 2 1 の箱ひげ図および散布図で詳細に示されるように、全部で 1 1 のタンパク質を E L I S A 分析により検証した (マン - ホイットニー検定 p 値 < 0 . 0 5) 。 P E および対照試料におけるそれぞれの検証されたバイオマーカーの母体血清存在度の中央値、平均値および標準偏差を、表 6 に要約する。

30

【表 6】

表 6 検証された P E、バイオマーカーの母体血清レベル。

検体	PE 傾向	単位	早期				後期			
			正常		PE		正常		PE	
			中央値(IRQ)	平均値(SD)	中央値(IRQ)	平均値(SD)	中央値(IRQ)	平均値(SD)	中央値(IRQ)	平均値(SD)
PIGF	↓	pg/ml	413.775 (224.915, 685.23)	529.3831 (432.0385)	97.517 (51.5845, 190.7)	115.5138 (82.96284)	222.279 (163.592, 289.860)	238.1095 (111.4536)	184.488 (113.236, 223.832)	202.6929 (132.7476)
sFlt-1	↑	pg/ml	1697.860 (1128.18, 4273.93)	3034.023 (2578.738)	19841.33 (15728.35, 21608.61)	18646.25 (3582.492)	5610.460 (4191.8, 6735.835)	5531.241 (1811.915)	14216.20 (12347.56, 19749.3)	14414.28 (5575.346)
HPX	↑	μg/ml	1071.2 (692.4, 1301.0)	984.05 (388.333)	1382.8 (1173.6, 1787.0)	1580.72 (546.4721)	954.4 (538.0, 1131.6)	894.15 (331.4866)	1482.0 (1013.6, 1654.4)	1347.624 (585.2598)
FT	↑	ng/ml	60.1820 (45.2425, 77.196)	70.83125 (42.72209)	92.604 (61.286, 131.1405)	118.9008 (100.8934)	73.296 (60.568, 82.6475)	76.26706 (29.61479)	78.743 (59.956, 126.565)	101.1071 (77.08354)
ADAM12	↑	pg/ml	511.312 (437.654, 642.321)	584.0489 (275.761)	774.993 (637.229, 1150.178)	920.1977 (416.3522)	666.4185 (594.874, 791.842)	703.6862 (217.2496)	883.889 (626.676, 1367.639)	1345.369 (1472.54)
ApoCIII	↑	ng/ml	341.347 (249.478, 422.359)	364.7076 (153.4417)	419.171 (357.329, 575.544)	486.2566 (187.4748)	291.58 (240.72, 345.74)	321.8587 (126.7332)	453.789 (308.93, 725.843)	585.7512 (413.1066)
HP	↓	μg/ml	1624.092 (1215.95, 2274.07)	1718.014 (764.1215)	1181.584 (684.6, 1794.1)	1482.707 (1284.595)	1806.74 (1190.09, 2163.1)	1750.72 (684.0882)	985.616 (592.04, 1880.785)	1510.514 (1514.988)

10

20

30

40

A2M	↓	↓	5796.424 (3501.2, 7737.565)	5729.148 (3064.134)	3365.067 (2648.269, 5958.964)	4259.341 (2175.836)	8141.38 (5300.6, 10234.086)	7754.764 (3265.09)	3435.427 (2343.675, 6752.9)	4340.768 (2862.513)
ApoE	↓	↓	290.6 (104.2, 519.0)	364.425 (301.4971)	138.8 (63.0, 210.4)	215.8933 (257.5736)	398.0 (125.0, 478.4)	377.9 (236.3411)	147.2 (60.4, 190.0)	150.0235 (107.6536)
ApoA1	↓	↓	7980.084 (5775.72, 11076.6)	8337.692 (3158.728)	4945.356 (3892.8, 5824.573)	4708.506 (1707.14)	6253.298 (5624.062, 7881.77)	6748.614 (2287.602)	4724.142 (3138.58, 7075.28)	5483.643 (3794.902)
RBP4	↑	↓	38255.0 (29018.5, 40955.5)	35180.38 (7031.125)	38899.0 (33460.5, 39895.0)	36931.67 (7307.52)	41616.5 (38830.5, 44429.5)	49253.5 (38081.63)	33179 (29558, 37386)	33897.47 (8499.767)
ヒカヂュ リン	↓	↓	601.751 (563.772, 792.09)	659.1049 (152.046)	293.261 (267.39, 367.83)	327.7657 (117.4519)	536.551 (459.173, 626.57)	536.551 (952.295)	317.657 (266.816, 409.67)	317.657 (623.497)
HB	↓	↓	10348.769 (8865.08, 11407.7)	10047.15 (2067.523)	9477.79 (8039.066, 10572.16)	9290.402 (2319.195)	10739.081 (8743, 11415.2)	10427.59 (1828.554)	9396.6 (7735.557, 11153.9)	9556.862 (2697.67)
FGA	↓	↓	287.9755 (263.725, 318.32)	294.3416 (38.95516)	262.177 (244.575, 284.35)	262.0381 (27.15886)	292.8455 (282.528, 322.95)	300.2975 (33.7449)	257.37 (236.425, 287.503)	261.2202 (35.3109)
CTSB	↓	↑	123.26 (81.67, 169.64)	142.581 (91.086)	96.44 (76.94, 145.35)	109.19 (40.752)	109.21 (87.32, 121.48)	108.371 (36.376)	152.20 (104.88, 190.06)	165.385 (75.224)
CTSC	↓	↑	12.891 (11.372, 13.874)	13.966 (4.1775)	12.519 (9.9765, 16.6975)	14.6674 (6.0903)	13.649 (12.107, 17.017)	15.335 (5.0667)	18.179 (12.781, 22.402)	20.029 (9.484)
へム	↓	↓	36.35769 (28.18, 65.419)	47.69588 (28.23451)	29.1868 (18.619, 53.09)	38.9996 (27.22612)	51.58 (30.57, 65.29)	59.19132 (42.67749)	31.7 (20.38, 44.79)	47.28054 (60.14049)

10

20

30

40

【 0 0 9 8 】

フォレストプロット（図2）は、胎盤発現メタ解析ならびに早期および後期妊娠母体血

50

清解析にわたる、11全ての検証されたPEマーカーのPE対対照比を要約している。プロテオームおよび発現メタ解析から得られたバイオマーカーは、PE試料と対照試料との間の上方または下方調整の同じ傾向を共有していた。

【0099】

PEバイオマーカーパネル構築。ELISA分析からのデータを使用して、分析の様々なサブセットを有する異なるパネルを構築した。我々は、最適な特徴の数のバイオマーカーパネルを特定し、小さいパネルサイズの必要性、分類の正確性、クラス分離の良好度（PE対対照）、ならびに十分な感度および特異性のバランスをとろうと努めた。PE診断のための多重化抗体ベース分析を開発する目的において、我々は、遺伝的アルゴリズム法を使用して、早期および後期妊娠期間PEのための9つの検証されたPEタンパク質バイオマーカーからバイオマーカーパネルを構築し、PEの評価においてsFlt-1/PIGF比と比較した。アルゴリズムはパネル構築プロセスをガイドし、早期および後期妊娠期間バイオマーカーパネルをもたらししたが、これは、PE対象と対照対象との間の完全な分離を有していた（以下の表7および図22～28）。これらの選択されたバイオマーカーパネルは、非冗長的であり、非包含関係を示している。以前の多施設治験検証（Verlohrens et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. American journal of obstetrics and gynecology 2010; 202: 161 e1-61 e11）による、sFlt-1/PIGF比のPE評価の実用性（パネル0：早期発生、受信者操作特性曲線ROCの曲線下面積1.00、p値 4.35×10^{-4} ；後期発生、ROC AUC 0.86、p値 2.94×10^{-4} ；図35）が、この研究により確認され、我々の新たに得られたバイオマーカーパネルの基準として使用された。表7のパネル2（早期発生、ROC AUC 1.00、p値 1.43×10^{-4} ）は、3つのタンパク質、HPX、APO A-I、およびピカチュリンを有する。パネル5（後期発生、ROC AUC 1.00、p値 3.65×10^{-5} ）は、6つのタンパク質、HPX、HP、APO C-III、APO A-I、RBP4、およびピカチュリンを有する。

10

20

【表 7】

表 7 検証された P E バイオマーカーの母体血清レベルを統合したバイオマーカーパネル。
パネル 0 は、基準パネル s F l t - 1 / P I G F 比である。* でマークされたバイオマーカー
は、P E において上方調整されている。(+)、パネルに含まれる；(-)、含まれない。

パネル	P E 発生:早期				P E 発生:後期		
	0	1	2	3	0	4	5
sFlt-1*	+	-	-	-	+	-	-
PIGF	+	-	-	-	+	-	-
HPX	-	-	+	+	-	+	+
FT	-	-	-	-	-	-	-
ADAM12*	-	-	-	+	-	+	-
HP	-	-	-	-	-	+	+
A2M	-	-	-	-	-	-	-
APO-E	-	-	-	-	-	-	-
APO-CIII*	-	-	-	-	-	+	+
APO-AI	-	+	+	-	-	+	+
RBP4	-	-	-	-	-	-	+
HB	-	-	-	+	-	+	-
FGA	-	+	-	-	-	-	-
CTSC*	-	-	-	-	-	-	-
CTSB*	-	-	-	-	-	-	-
ピカチュ リン*	-	+	+	+	-	+	+
パネルサ イズ	2	3	3	4	2	7	6
ROC AUC	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	1.00	1.00
p 値	4.35E-04	3.18E-04	1.43E-04	4.17E-04	2.94E-04	1.69E-04	3.65E-04

【 0 1 0 0 】

疾患発生に従う P E 疾患活性の分類子としてのバイオマーカーパネルの有効性を実証するために、バイオマーカーパネルスコアを妊娠期間の時間の関数としてプロットした（図 3 に詳細が示されており、図 4 に複合的概要が示されている）。散布図解析によると、我々の早期発生 P E バイオマーカーパネルの性能は、s F l t - 1 / P I G F 比に匹敵した。妊娠期間 > 3 4 週間の試料では、我々のバイオマーカーパネルの性能は、3 6 週目あたりでいくつかの診断誤差を有する s F l t - 1 / P I G F 比よりも良好であった。早期および後期妊娠期間バイオマーカーパネルのうち、H P X、A P O A - I、およびピカチュリンは両方のパネルに存在し、これは P E の診断、およびおそらくは病態生理学におけるそれらの重要な役割を示唆している。

【 0 1 0 1 】

P E バイオマーカーの経路解析。我々は、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェア（IPA バージョン 7.6、Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA）を使用して、P E において有意に差次的に発現した検証されたバイオマーカーを複合物として解析した。我々のマルチ「オミックス」発見の取り組みの間に明確化されたヘム / ヘモグロビン分解経路に加えて、我々の経路解析は、P E 病態生理学において重要な役割を担い得る以下の統計的に有意な標準経路の特定をもたらした：肝臓 X 受容体（L X R）/ レチノイド X 受容体（R X R）活性化、p 値 5.13×10^{-9} ；アテローム性動脈硬化シグナル伝達、p 値 5.01×10^{-7} ；I L - 1 2 シグナル伝達およびマクロファージ内での産生、p 値 8.51×10^{-7} ；急性期反応シグナル伝達、p 値 1.91×10^{-6} ；マクロファージ内での酸化窒素および反応性酸素種の産生、p 値 2.82×10^{-6} ；クラスリン媒介エンドサイトーシスシグナル伝達、p 値 2.88×10^{-6} ；ファルネソイド X 受容体（F X R）/ R X R 活性化、p 値 2.04×10^{-5} ；肝線維症 / 肝星細胞活性化、p 値 2.88×10^{-3}

；ホスファチジルエタノールアミン生合成 I I、 p 値 1.05×10^{-2} ；凝固系、 p 値 2.04×10^{-2} ；成長ホルモンシグナル伝達、 p 値 4.27×10^{-2} ；ニューロンにおけるリーリンシグナル伝達、 p 値 4.57×10^{-2} ；および V E G F ファミリーリガンド - 受容体相互作用、 p 値 4.79×10^{-2} 。

【0102】

考察

我々は、検証された P E バイオマーカーを開発するためにマルチ「オミックス」手法を適用し、胎盤 m R N A 発現メタ解析および欠失血清学的プロテオーム 2 D ゲル比較プロファイリングからの発見を統合した。商業的に利用可能な E L I S A 分析により P E 血清および対照血清を比較して、我々は、s F l t - 1 および P I G F を含む 11 のタンパク質マーカーを検証し、我々の同定した P E バイオマーカーが P E の予測において s F l t - 1 / P I G F 比よりも優れていることを見出した。胎盤組織におけるトランスクリプトミクス手法を血清におけるプロテオーム手法と組み合わせる概念は、新規的である。これによって、病態生理学の焦点により近い組織における研究の利点が、臨床的用途により適切な血清における研究の利点と組み合わせられる。発見段階から発見 / 予測されたタンパク質を、E L I S A ベース検証段階に移行させることにより、本研究の所見を臨床診療に適用することができる。

【0103】

発現メタ解析および 2 D ゲル血清プロテオミクスからの発見を比較すると、A 2 M のみが両方の解析において現れた。これは、以下の理由に起因し得る：(1) 以前に特性決定されたような、タンパク質および m R N A の発現の不一致 (G r i f f i n e t a l . C o m p l e m e n t a r y p r o f i l i n g o f g e n e e x p r e s s i o n a t t h e t r a n s c r i p t o m e a n d p r o t e o m e l e v e l s i n S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e . M C P 2002 ; 1 : 323 - 33 ; I d e k e r e t a l . I n t e g r a t e d g e n o m i c a n d p r o t e o m i c a n a l y s e s o f a s y s t e m a t i c a l l y p e r t u r b e d m e t a b o l i c n e t w o r k . S c i e n c e 2001 ; 292 : 929 - 34 ; B a l i g a e t a l . C o o r d i n a t e r e g u l a t i o n o f e n e r g y t r a n s d u c t i o n m o d u l e s i n H a l o b a c t e r i u m s p . a n a l y z e d b y a g l o b a l s y s t e m s a p p r o a c h . P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s o f t h e U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a 2002 ; 99 : 14913 - 8 ; C h e n e t a l . D i s c o r d a n t p r o t e i n a n d m R N A e x p r e s s i o n i n l u n g a d e n o c a r c i n o m a s . M o l e c u l a r & c e l l u l a r p r o t e o m i c s : M C p 2002 ; 1 : 304 - 13) ；(2) 胎盤発現の循環タンパク質レベル存在度への転換の欠如；(3) 0.5 ~ 5 n g の 2 D ゲル技術検出限界。最適化 2 D ゲル技術は、タンパク質濃度において約 5 桁のダイナミックレンジを有し (G i b s o n e t a l . C o m p a r a t i v e a n a l y s i s o f s y n o v i a l f l u i d a n d p l a s m a p r o t e o m e s i n j u v e n i l e a r t h r i t i s - - p r o t e o m i c p a t t e r n s o f j o i n t i n f l a m m a t i o n i n e a r l y s t a g e d i s e a s e . J p r o t e o m i c s 2009 ; 72 : 656 - 76)、一方血清学的タンパク質濃度は、約 10 桁にわたり変動し、最高濃度は m g / m l に達する (A n d e r s o n , N . T h e h u m a n p l a s m a p r o t e o m e : h i s t o r y , c h a r a c t e r , a n d d i a g n o s t i c p r o s p e c t s . M o l C e l l p r o t e o m i c s 2002 ; 1 : 845 - 67)。欠失ステップを用いても、我々の 2 D ゲルによるタンパク質検出は、血清学的濃度が $> 10 \mu g / m l$ であるタンパク質に限られ、我々が検出したタンパク質バイオマーカーの組成に明らかに影響する。さらに、情報を提供し得る低分子量タンパク質は、アルブミンに結合す

る可能性があり、したがって欠失ステップにおいて除去される可能性があり (Tirumalai et al. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell proteomics* 2003; 2: 1096 - 103)、これは潜在的な不利益となり得る。したがって、pg/mL濃度を有する候補、例えばsFlt-1およびPIGFは、2Dゲル血清プロテオミクスへの適用が見出されない。したがって、pg/mL濃度を有する候補、例えばsFlt-1およびPIGFは、2Dゲル血清プロテオミクスへの適用が見出されない。疾患組織に関する公的に利用可能なゲノム規模遺伝子発現データを効果的に取り出して、我々の2D血清プロテオミクスへの取り組みを補完するための大きな相乗効果を提供し、低い血清存在度 (pg/mL) の差次的PEバイオマーカー候補を明らかにすることができる。特に、我々の生産的なPE発見の取り組みは、バイオマーカー解析のためのマルチ「オミックス」手法が、pg/mLからug/mLまで変動する血清学的タンパク質発現の広範なダイナミックレンジの候補を特定する上で、総合的、相補的および効果的であるという考えを支持している。

【0104】

最初の発現メタ解析および2Dゲルで発見されたバイオマーカー候補から、我々は、PE胎盤虚血および結果的な機能障害性ヘム/ヘモグロビン異化経路が、PE病態生理学の一端を担うと仮定した。PEおよび対照血清を区別する、仮定により生成された7つの候補のうちの5つ (FGA、FT、HB、ヘムおよびHP) の、他の検証されたバイオマーカー (HP、HPXおよびHB) と併せた検証は、PE病態生理学におけるヘム/ヘモグロビン異化経路の役割の有力な証拠を提供する。ヘム/ヘモグロビン代謝経路の綿密な検査は、PE発症における中心的因子としての胎盤虚血を支持し得るだけでなく、PE治療のための新規な標的の特定をもたらし得る (Cudmore et al. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation* 2007; 115: 1789 - 97)。

【0105】

タンパク質マーカーの追加的な経路解析は、PE病態生理学における脂質ホメオスタシス、IL-12、および凝固標準経路の役割を示唆するさらなる証拠を裏付ける。LXR/RXR活性化経路が、最も有意な経路として特定された。これは、PEが脂質異常症に関連し、脂質ホメオスタシスの調節因子がPE病態生理学において重要であるという最近の所見 (Weedpon - Fekjaer et al. Expression of liver X receptors in pregnancies complicated by preeclampsia. *Placenta* 2010; 31: 818 - 24) を支持している。胎盤においてより低い活性を有し、血清においてより高い存在度を有するPE患者におけるIL-12の以前の証拠 (Bachmayer et al. Aberrant uterine natural killer (NK) - cell expression and altered placental and serum levels of the NK - cell promoting cytokine interleukin - 12 in pre - eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56: 292 - 301; Daniel et al. Plasma interleukin - 12 is elevated in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 376 - 80; Sakai et al. The ratio of interleukin (IL) - 18 to IL - 12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre - eclamptic patients. *Journal of reproductive immunology*

gy 2004; 61: 133 - 43) は、我々の PE バイオマーカーパネルパターン経路解析と一致するように反映された。

【0106】

sFlt-1 および PlGF の PE 評価への実用性を実証している、自動化分析による以前の多施設症例 - 対照研究 (Verlohrehn et al. An automated method for the determination of the sFlt-1 / PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. American journal of obstetrics and gynecology 2010; 202: 161 e1 - 61 e11) は、sFlt-1 (PE: $12,981 \pm 965$ 対対照: 2641 ± 100.5 pg/mL) および PlGF (PE: 76.06 ± 10.71 対対照: 341.5 ± 13.57 pg/mL) の血清存在度を報告した。おそらくは異なる試料コホートまたは分析プラットフォームに起因してより大きな変動性があるものの、我々の結果、sFlt-1 (PE: $16,398.02 \pm 5142.32$ 対対照: $4,282.63 \pm 2,532.90$ pg/mL) および PlGF (PE: 161.83 ± 118.98 対対照: 383.75 ± 343.84 pg/mL) において反映された変化の傾向は、それらの報告と一致した。図 5 ~ 21 に示され、表 8 (下記) に要約されるように、正常および PE 群それぞれにおいて早期妊娠期間試料と後期妊娠期間試料との間でタンパク質存在度が有意に異なる (p 値 < 0.05) sFlt-1 および PlGF とは対照的に、我々のバイオマーカー (表 8) は、RBP4、ADAM12 およびピカチュリンを除いて、早期妊娠血清と後期妊娠血清との間で有意に異ならなかった (p 値 > 0.05)。ここでの我々の結果は、sFlt-1 および PlGF が、胎盤発育の間、妊娠期間の関数として調整され、PE と対照との間の差次的発現は、PE の間の胎盤順応に起因し得ることを示している。本研究において見出された PE バイオマーカーは、PE 血清においても対象血清においても、早期妊娠と後期妊娠との間で有意に異ならなかった。したがって、PE におけるそれらの差次的発現は、PE および疾患発症の病因を直接的に測定することができ、または、その病態生理学に関連するとは限らない、病因の極めて進行した段階で存在する特徴、例えばタンパク尿および高血圧を反映し得る。

10

20

【表 8】

表 8 早期および後期妊娠期間の時点における、バイオマーカーの存在度の比較。＊倍数は、早期および後期妊娠期間試料の分析されたバイオマーカー存在度の中央値の比により計算された。＊＊p 値：マンローホイットニーU検定

検体	対照		PE	
	倍数*	p 値**	倍数*	p 値**
PIGF	0.449787	0.020445	1.754707	0.021946
sFlt-1	1.823071	0.002984	0.773039	0.017316
HPX	0.908643	0.509422	0.852538	0.433073
FT	1.076743	0.235105	0.850348	0.550803
ADAM12	1.204841	0.034792	1.462044	0.776988
APO-CIII	0.882512	0.445036	1.204613	1
HP	1.019037	0.780443	1.018754	0.940656
A2M	1.353563	0.079568	1.019117	0.852335
APO-E	1.036976	0.668931	0.694897	0.820737
APO-AI	0.80941	0.146736	1.164625	0.911083
RBP4	1.400028	0.028797	0.917843	0.176456
HB	1.037866	0.589581	1.028681	0.852335
FGA	1.020235	0.5095	0.996879	0.794372
ピカチュリン	0.832876	0.047833	1.070773	0.501947
CTSC	1.058762	0.2351	1.452113	0.05324
CTSB	0.886013	0.3608	1.578183	0.02849
ヘム	0.867821	0.365668	0.736443	0.909777

【0107】

我々の遺伝的アルゴリズムベースのバイオマーカーパネル構築は、PE 評価のための最終的な早期および後期妊娠期間バイオマーカーパネルを導いた。PE 評価における基準 sFlt-1 / PIGF 比と比較して、我々のバイオマーカーパネルは、より後期の妊娠週において明らかにより高性能である。PE 診断に使用される sFlt-1 および PIGF 不均衡が示されたが、正常な sFlt-1 および PIGF の発現が実際に健康な妊娠を特徴付けるとする考えを支持する数多くの証拠がある (Daponte et al. Soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sflt-1) and serum placental growth factor (plgf) as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2011; 96: E1444-1451)。したがって、sFlt-1 および PIGF は、実際には、PE に特異的というよりも、妊娠の失敗、例えば子宮外妊娠、稽留流産の汎用的マーカーとなり得る。我々のマルチ「オミックス」手法は、PE 病態生理学の多面的な態様を反映し、PE 患者の断定的な診断を提供してリスクのある患者を特定する、また疾患の進行を監視するために使用される可能性を有する複数のバイオマーカーのパネルを発見した。

【0108】

実施例 2

実施例 1 および 2 に記載の子癇前症マーカーの追加的なパネルのタンパク質レベルを、子癇前症患者の血清において分析し、これらの追加的なパネルの早期発生子癇前症（例えば、妊娠 34 ~ 35 週間の前の子癇前症の発生）または後期発生子癇前症（すなわち、妊娠 34 ~ 35 週間以降の子癇前症の発生）の診断における正確性を決定した。特に興味深いパネルは、以下の通りであった（図 29 を参照されたい）：

- ・ パネル 1 : s F l t 1、P I G F
- ・ パネル 2 - 早期 : s F l t 1、P I G F、H P X
- ・ パネル 2 - 後期 : s F l t 1、P I G F、H P X、C T S C、A D A M 1 2、A p o E、A p o A 1、R B P 4、H B、ピカチュリン
- ・ パネル 3 : s F l t 1
- ・ パネル 4 - 早期 : s F l t 1、H P X
- ・ パネル 4 - 後期 : s F l t 1、H P X、A p o E、A p o A 1、ピカチュリン
- ・ パネル 5 : P I G F
- ・ パネル 6 - 早期 : P I G F、ピカチュリン
- ・ パネル 6 - 後期 : P I G F、H P X、C T S C、A d a m 1 2、H P、A p o E、R B P 4、H B、フィブリノゲン、ピカチュリン
- ・ パネル 7 - 早期 : H P X、A p o A 1、ピカチュリン
- ・ パネル 7 - 後期 : H P X、C T S C、A d a m 1 2、H P、H B、フィブリノゲン、ピカチュリン。

10

パネル 1、3、および 5 は、子癇前症を診断するための現在の標準からのマーカーを含む。パネル 2 - 早期およびパネル 2 - 後期は、パネル 1 および本明細書において開示される追加的な子癇前症マーカーを含む。パネル 4 - 早期およびパネル 4 - 後期は、パネル 3 および本明細書において開示される追加的な子癇前症マーカーを含む。パネル 6 - 早期およびパネル 6 - 後期は、パネル 5 および本明細書において開示される追加的な子癇前症マーカーを含む。パネル 7 - 早期およびパネル 7 - 後期は、本明細書において開示される追加的な子癇前症マーカーを含まない。

20

【0109】

図 30 ~ 35 に示されるように、本明細書において開示される子癇前症マーカーを含むパネルは全て（「S t a n f o r d バイオマーカー」、パネル 2、4 および 7）は、指定時点（すなわち、早期：妊娠 34 ~ 35 週間の前の子癇前症の発生；後期：妊娠 34 ~ 35 週間以降の子癇前症の発生）において、子癇前症を診断するための現在の標準よりも正確に機能した。確かに、本明細書において開示される子癇前症マーカーを含むパネルの多く（パネル 2 早期、パネル 2 後期、パネル 4 早期、パネル 4 後期、パネル 6 早期、パネル 7 早期およびパネル 7 後期）は、その指定された時間における子癇前症の診断において 100% の正確性を提供する（A U C = 1）。

30

【0110】

実施例 3

子癇前症マーカー（ピカチュリン、ヘモベキシン、A p o A 1、A p o C 3、R B P 4、ハプトグロビン）のパネルのタンパク質レベルを統計的に評価して、このパネルに基づき、試料の子癇前症スコアに対する各ポリペプチドの寄与をどのように加重するかを決定した。

40

【0111】

ランダムフォレストアルゴリズムを使用して、ハプトグロビンレベルは、最も有意でないと決定され；R B P 4 レベルは、ハプトグロビンよりも約 2 倍有意であると決定され；ヘモベキシン、A p o A 1 および A p o C 3 レベルは、ハプトグロビンよりも約 6 倍有意であり、R B P 4 よりも約 3 倍有意であると決定され；ピカチュリンレベルは、最も有意である、すなわちハプトグロビンよりも約 15 倍有意であり、R B P 4 よりも約 7.5 倍有意であり、ヘモベキシン、A p o A 1 および A p o C 3 よりも約 2.5 倍有意であると決定された（以下の表 9 を参照されたい）。

【表 9】

表9

タンパク質	重要度
ピカチュリン	14.81
ヘモペキシニン	6.15
ApoA1	5.97
ApoC3	5.89
RBP4	2.07
ハプトグロビン	0.89

10

【0112】

したがって、ピカチュリン / ヘモペキシニン / A p o A 1 / A p o C 3 / R B P 4 / ハプトグロビンパネルを使用して子癇前症スコアを導くために、ピカチュリンレベルには約 12 ~ 16、例えば約 15 の重みが割り当てられてもよく；ヘモペキシニン、A p o A 1、および A p o C 3 レベルには約 4 ~ 8、例えば約 6 の重みが割り当てられてもよく；R B P 4 レベルには約 2 の重みが割り当てられてもよく；またハプトグロビンレベルには 1 以下の重みが割り当てられてもよい。

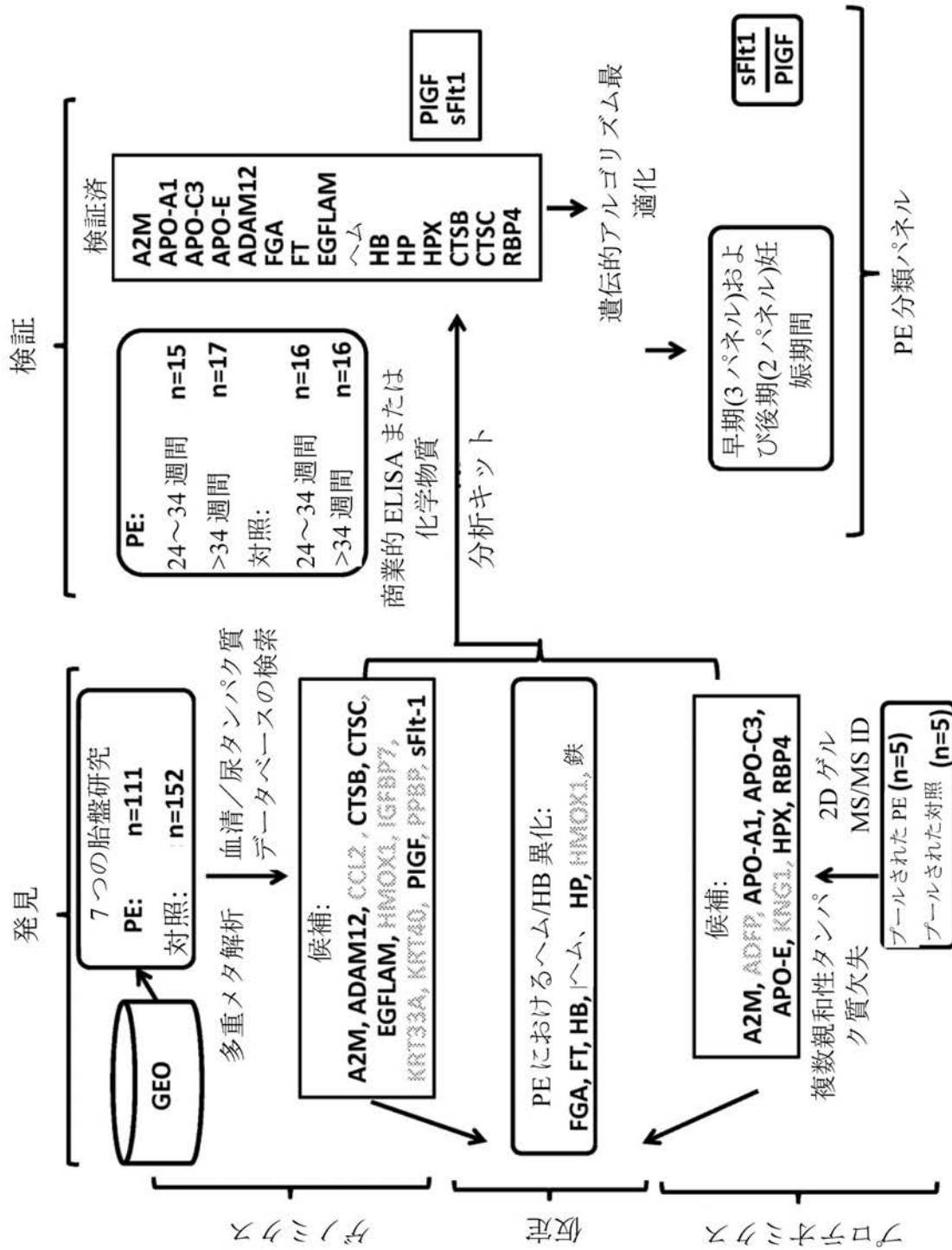
20

【0113】

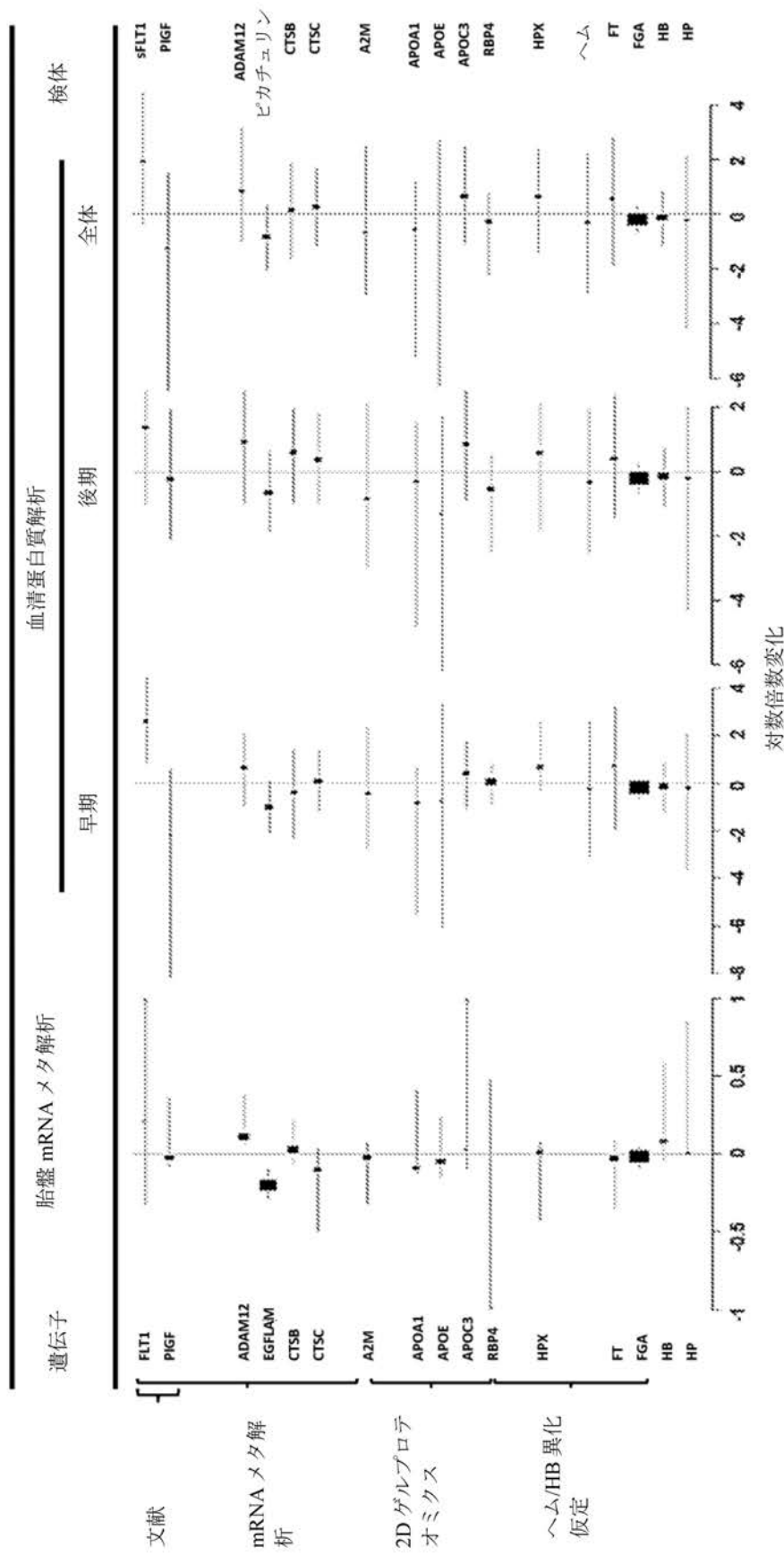
上記は、単に本発明の原理を例示するものである。当業者は、本明細書に明示的に説明または示されていないが、本発明の原理を具現化し、本発明の精神および範囲内に含まれる様々な構成を考案することができることが理解される。さらに、本明細書において列挙される全ての例および条件的な言語は、読者が本発明の原理、および当該技術を発展させるための本発明者らにより寄与された概念を理解する上で役立つことを主に意図し、そのように具体的に列挙された例および条件に限定されないように解釈されるべきである。さらに、本発明の原理、態様および実施形態ならびにその具体例を列挙する本明細書における全ての記述は、その構造的および機能的均等物の両方を包含することを意図する。加えて、そのような均等物は、現在知られている均等物および将来開発される均等物、すなわち構造とは無関係に同じ機能を実行する開発された任意の要素の両方を含むことが意図される。したがって、本発明の範囲は、本明細書において示され説明される例示的实施形態に限定されるように意図されない。むしろ、本発明の範囲および精神は、添付の特許請求の範囲により具体化される。

30

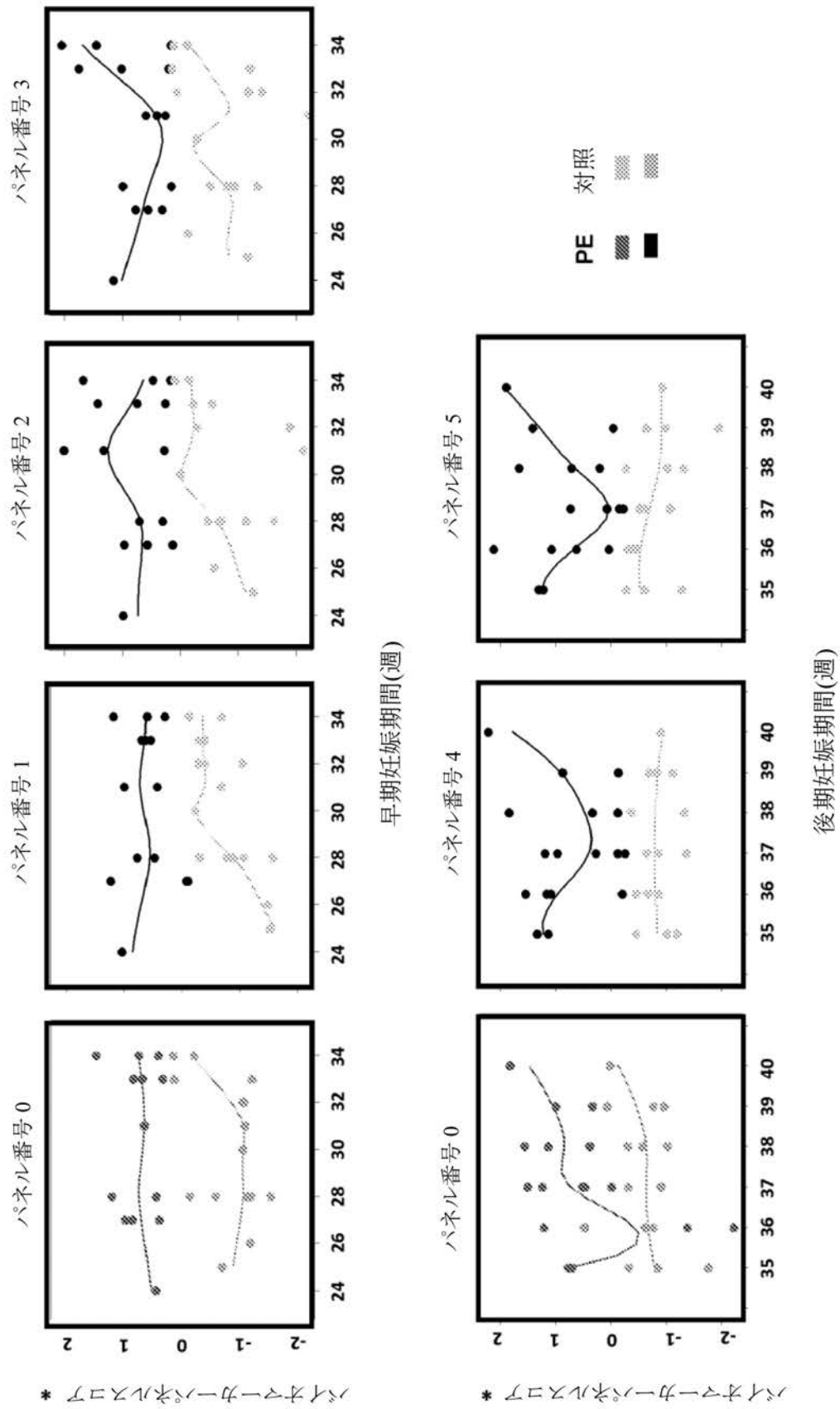
【図 1】



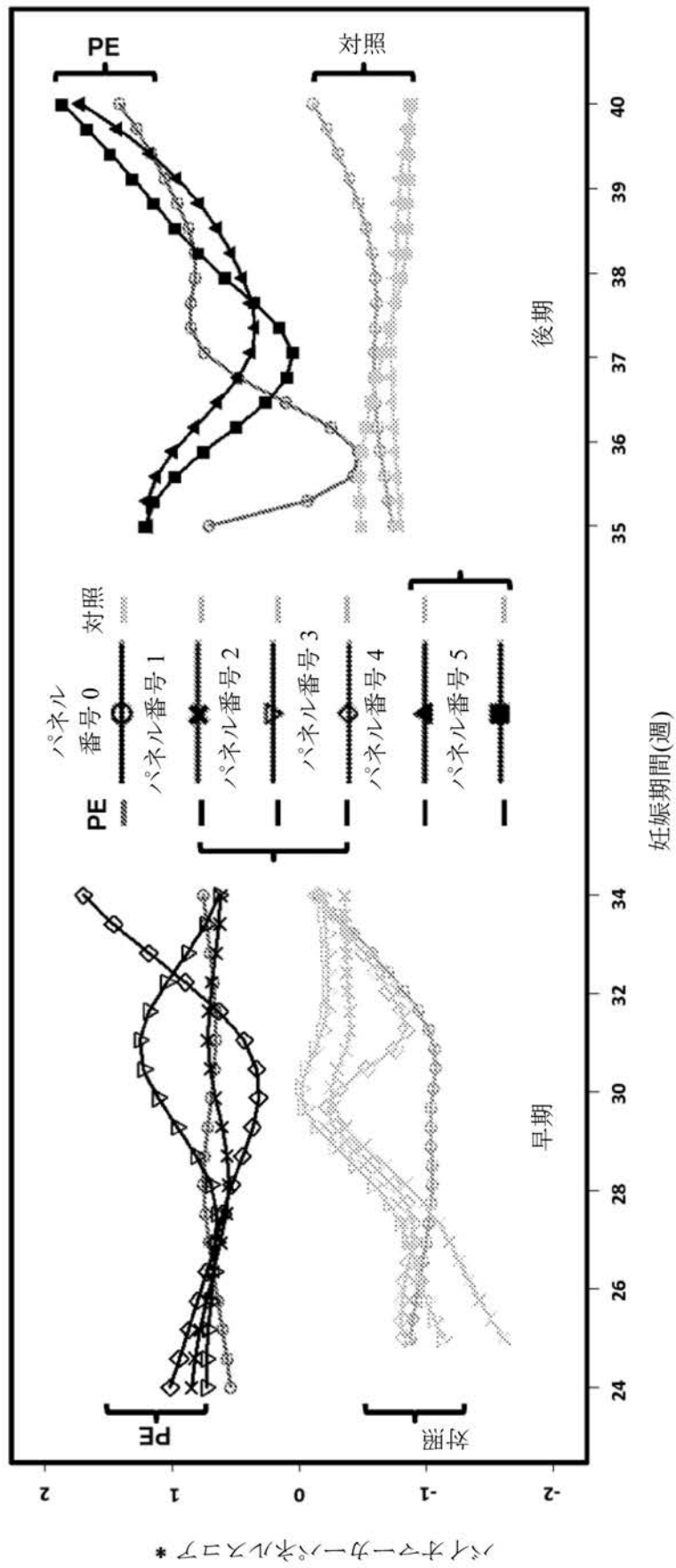
【図2】



【図 3】

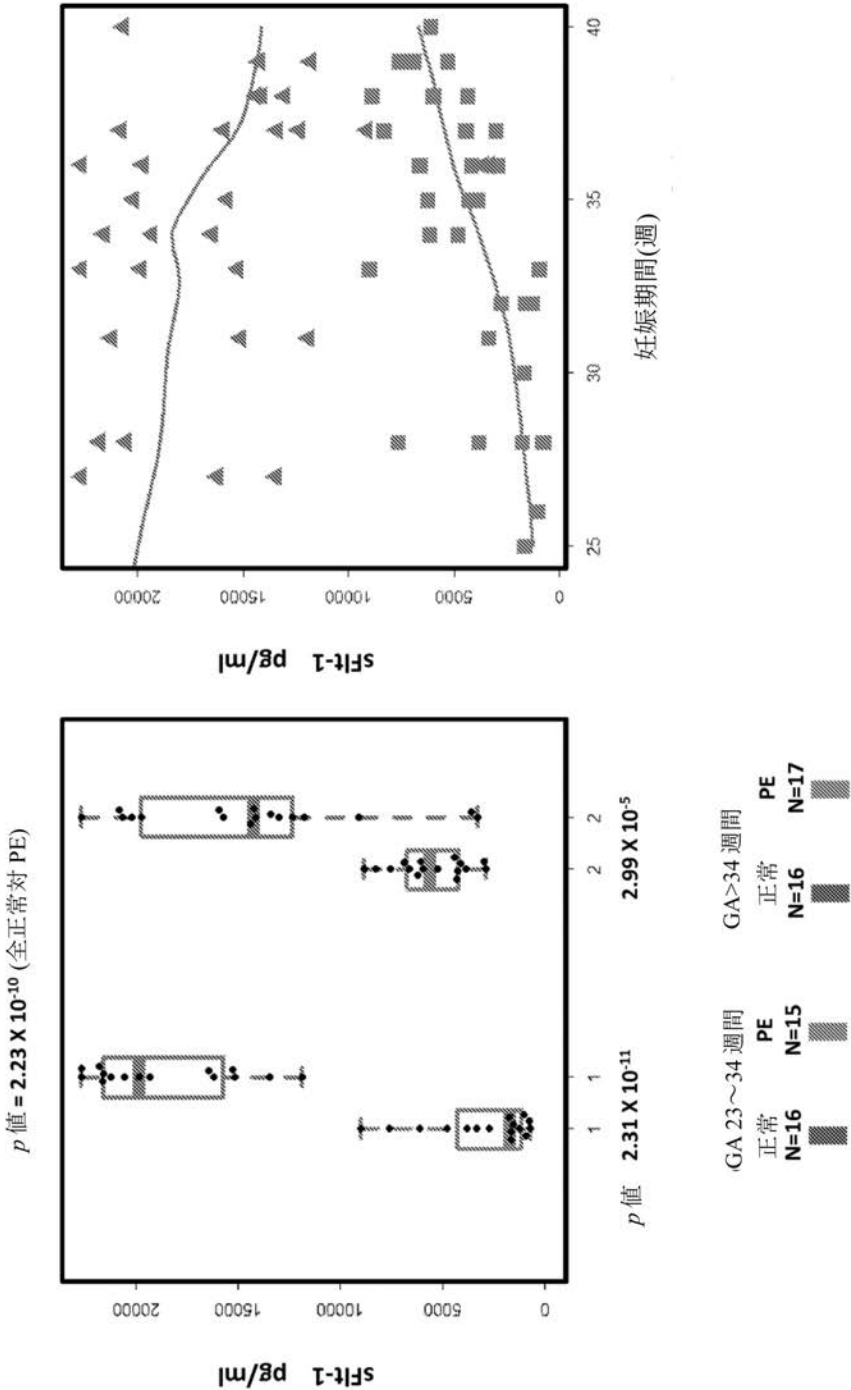


【図4】



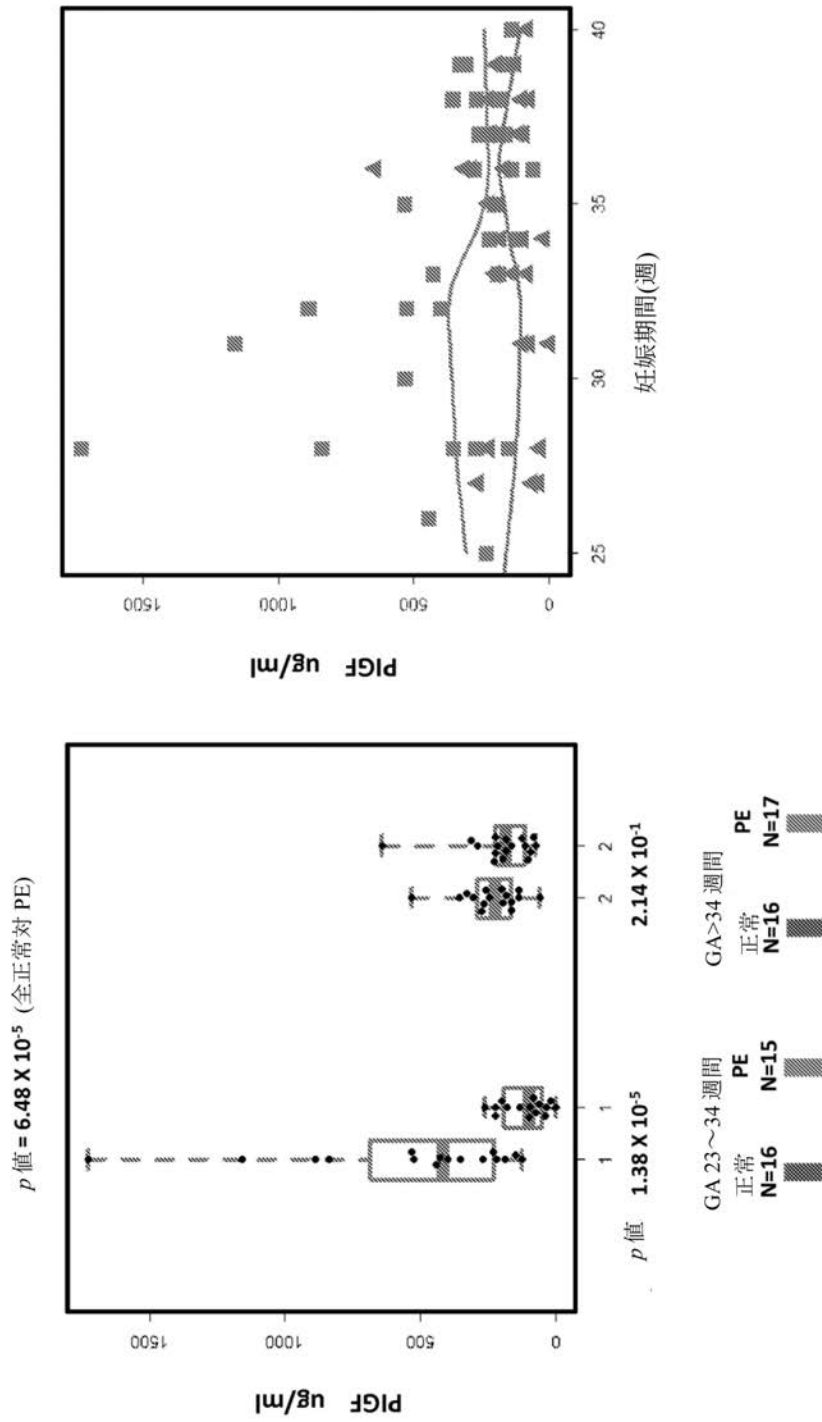
【 図 5 】

sFlt-1 検証



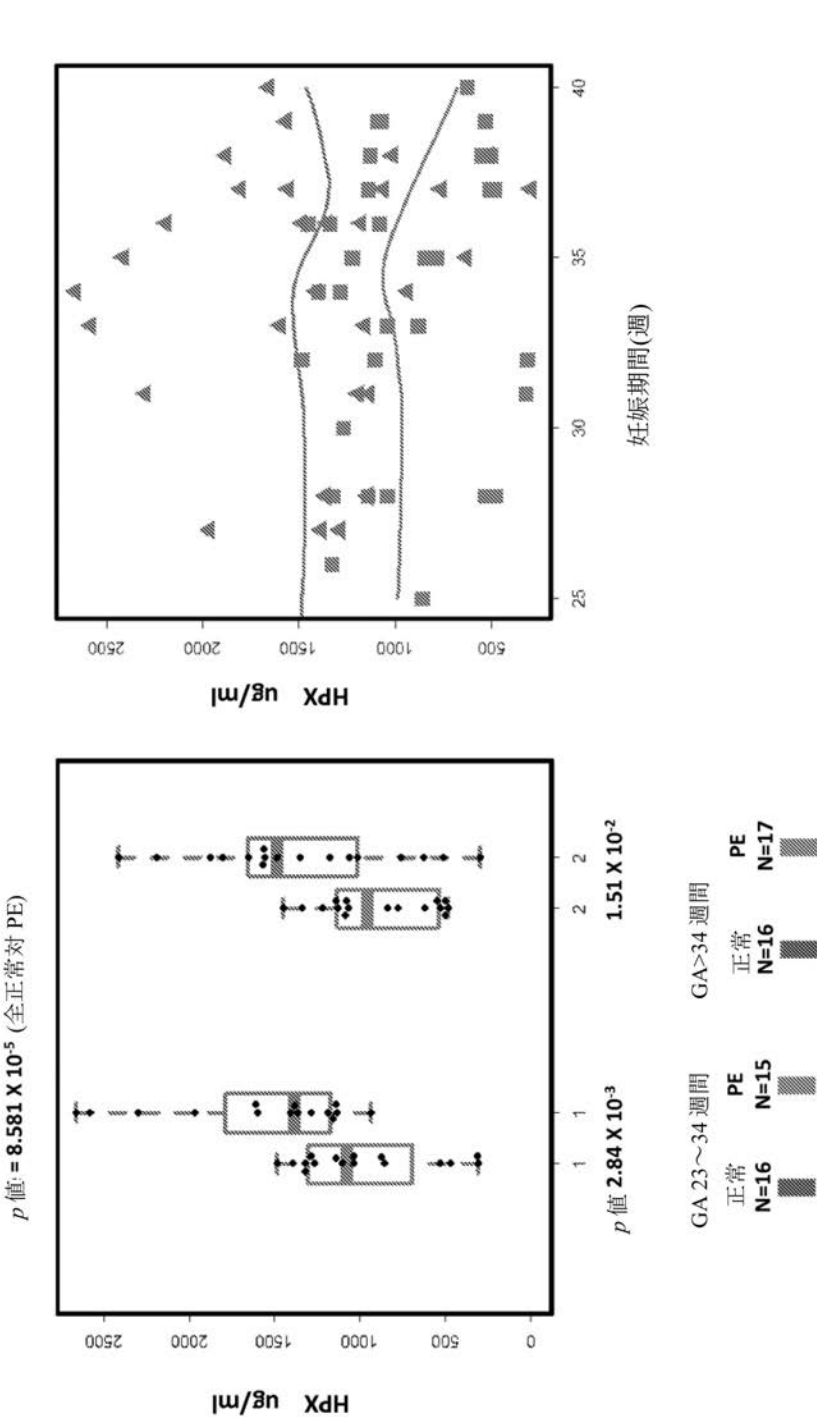
【図 6】

PIGF 検証



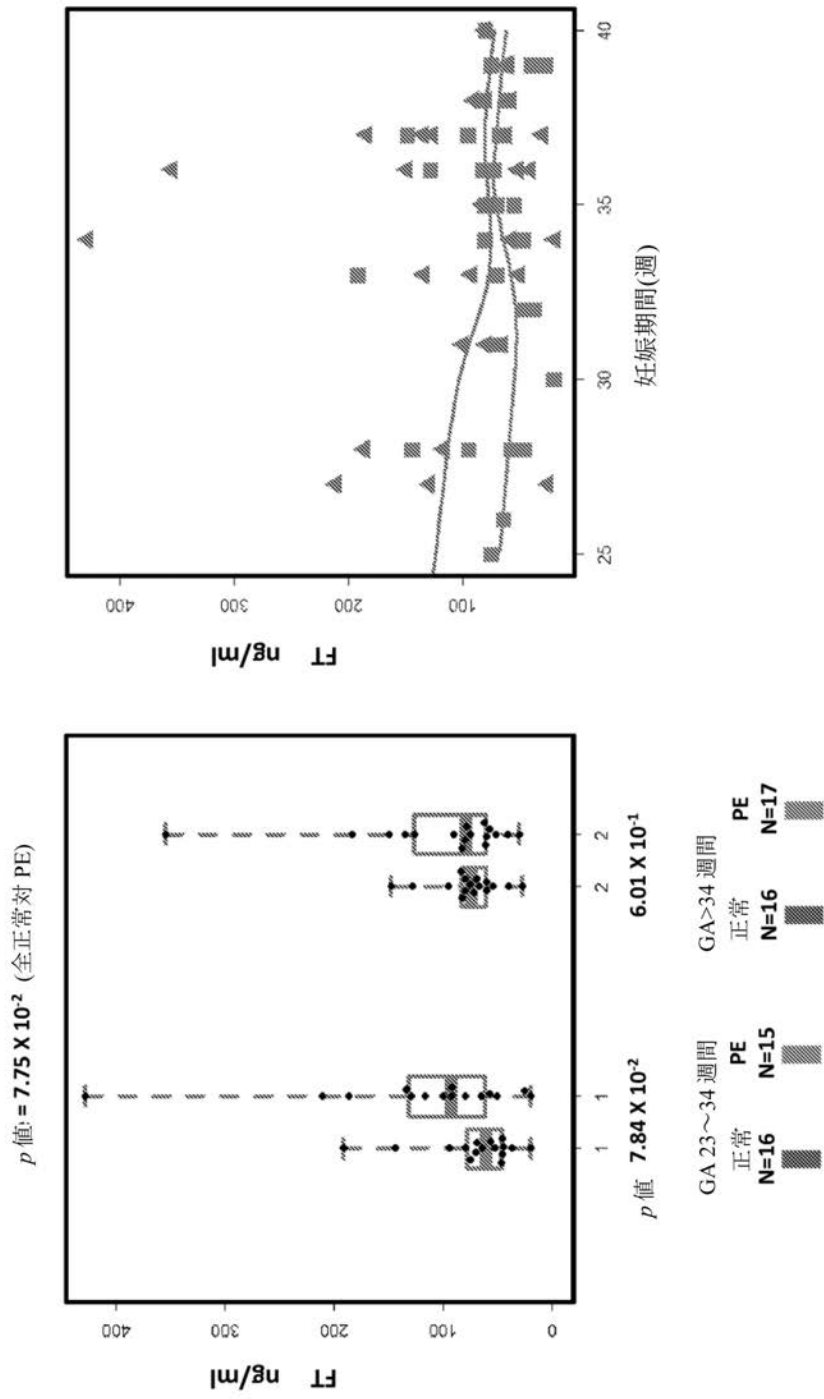
【図 7】

HPX 検証

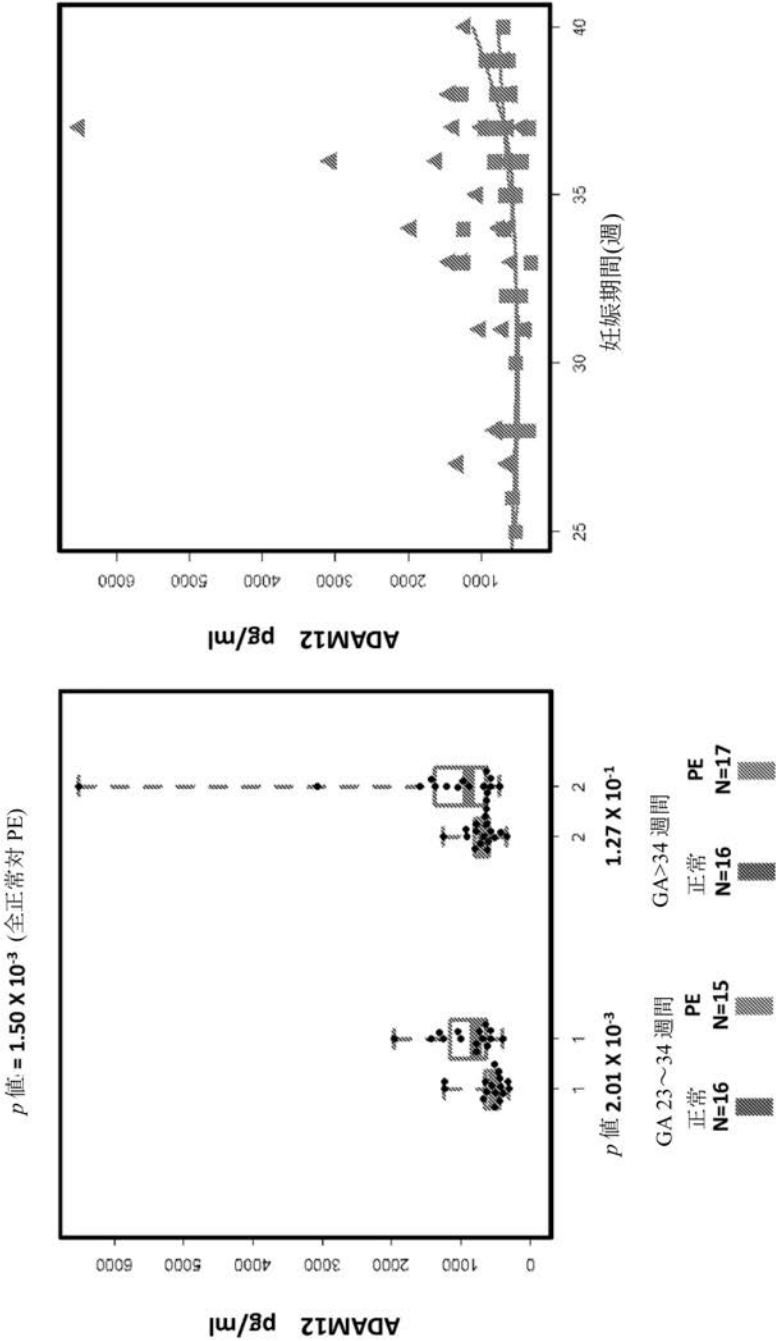


【 図 8 】

FT 検証

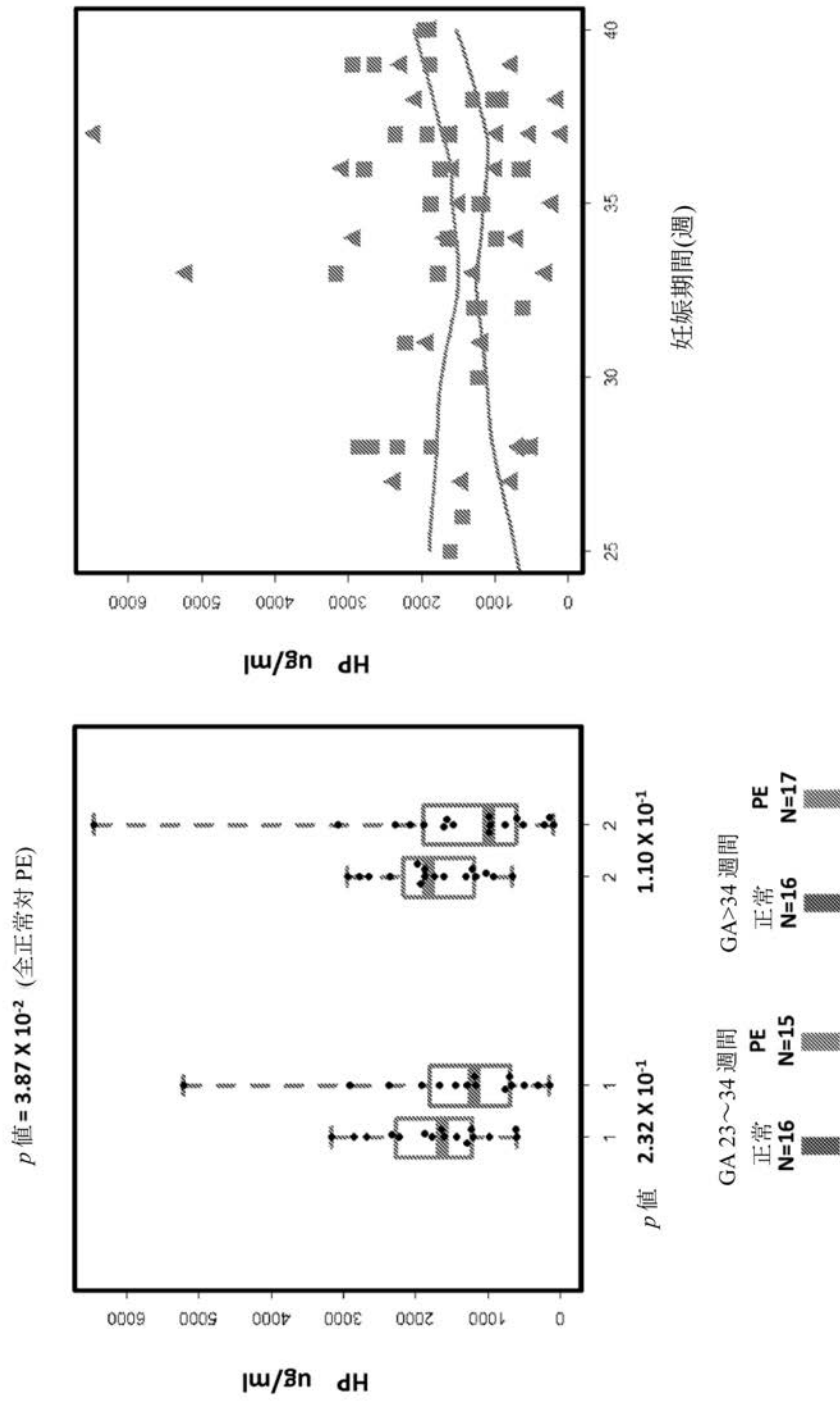


ADAM12 検証



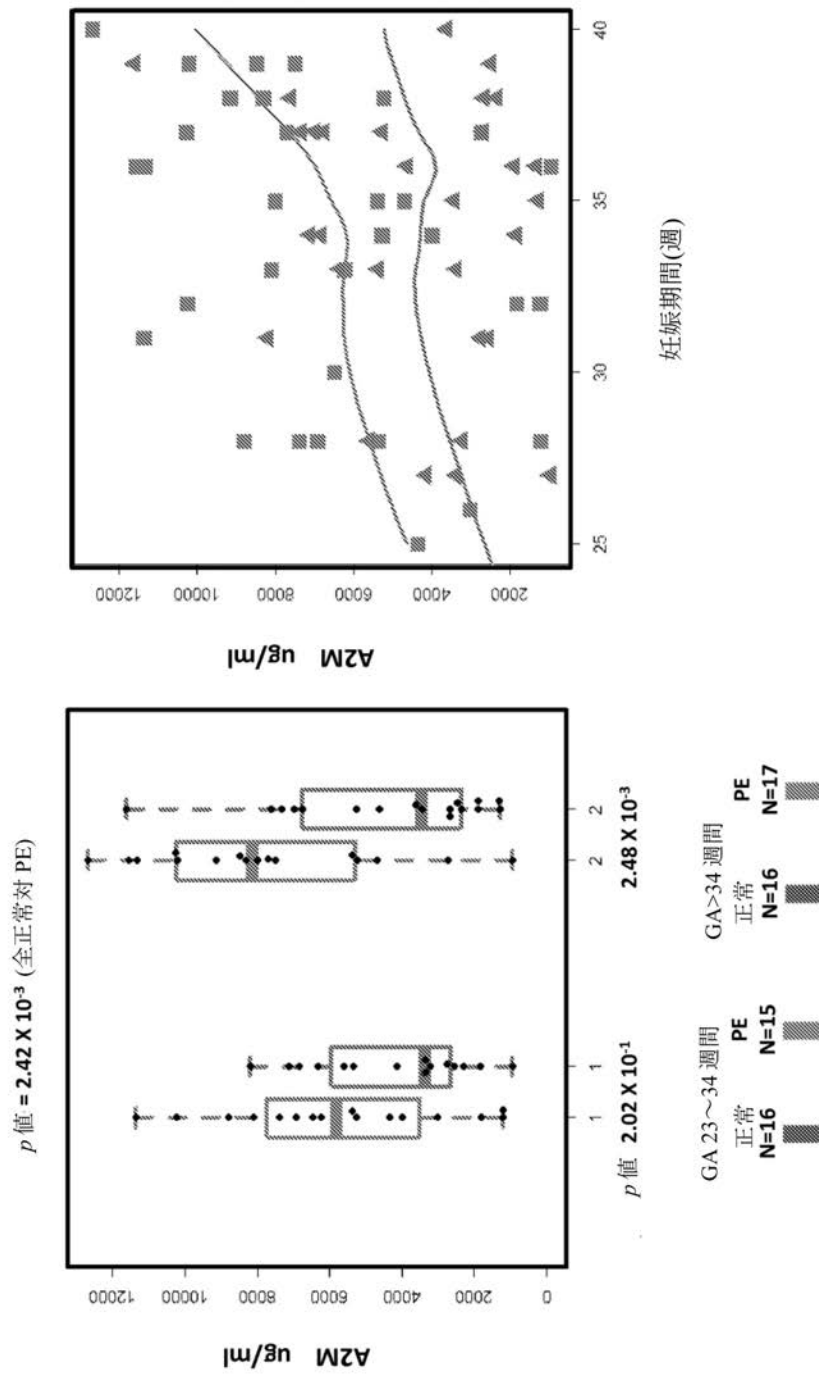
【図 10】

HP 検証



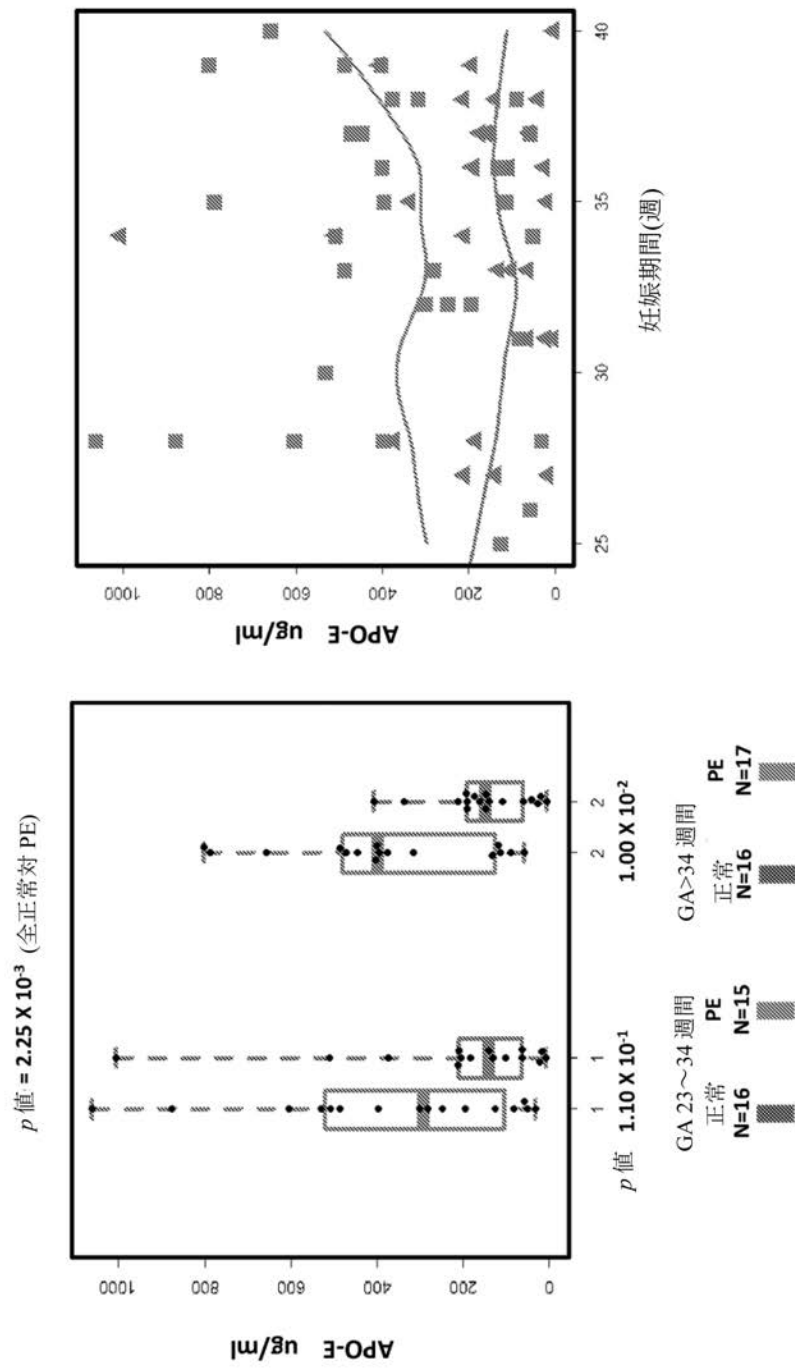
【図 1 1 1】

A2M 検証



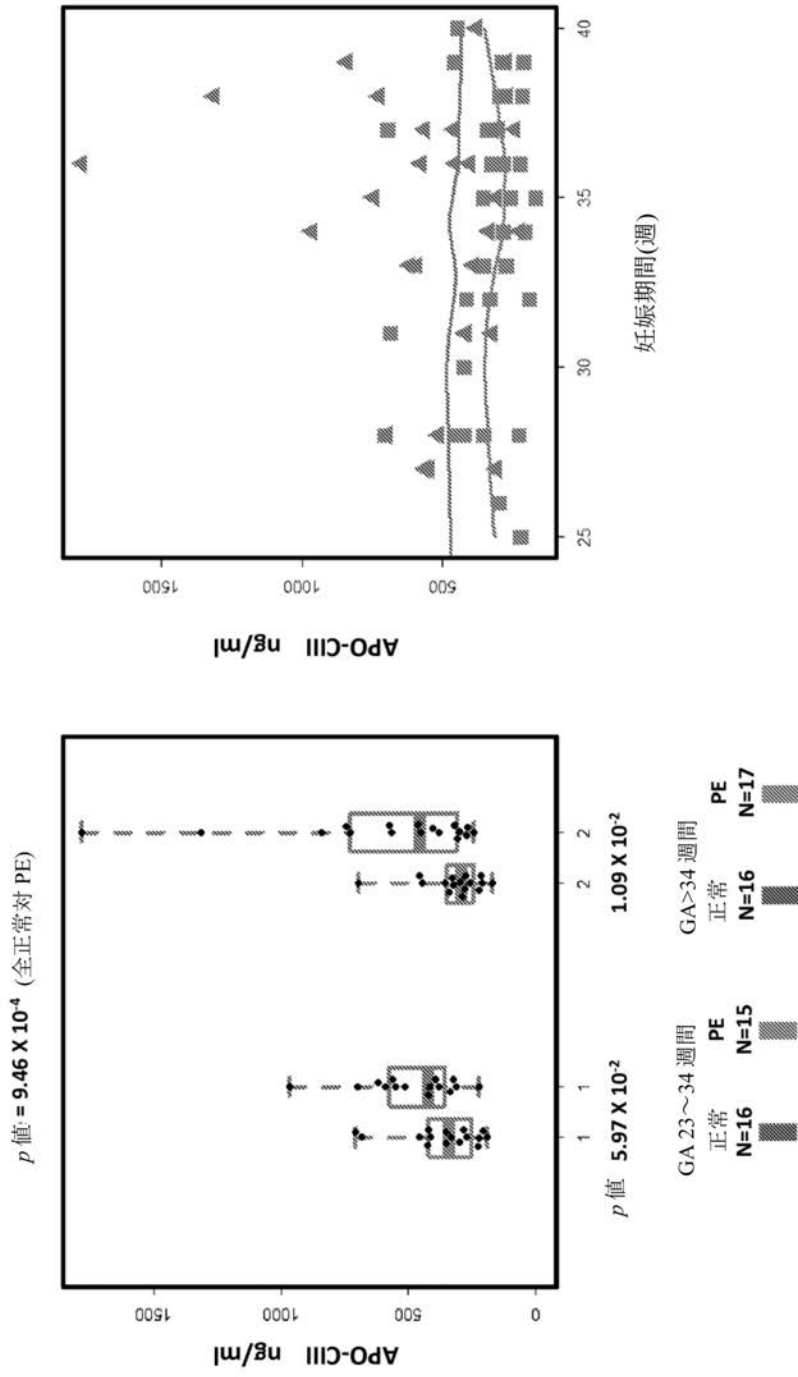
【図 12】

APO-E 検証



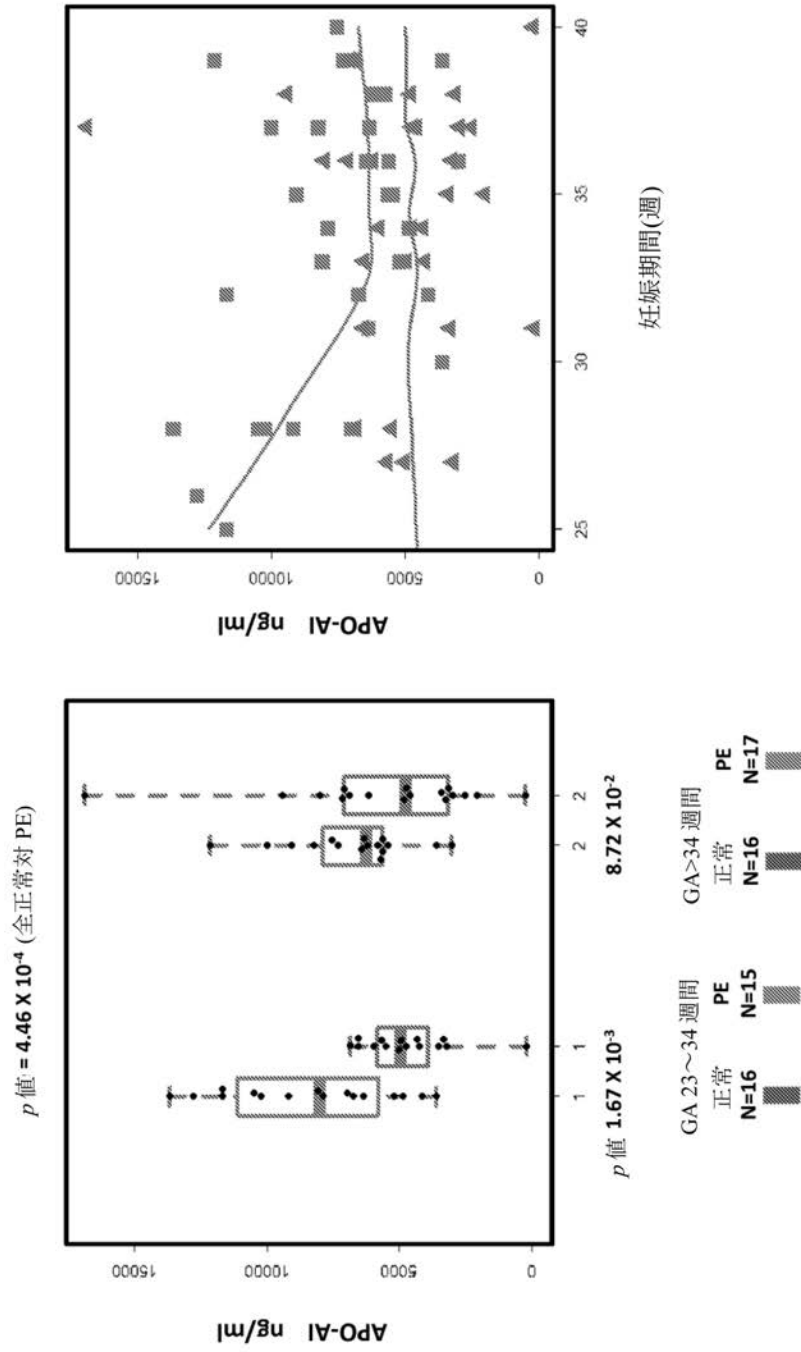
【図 13】

APO-CIII 検証



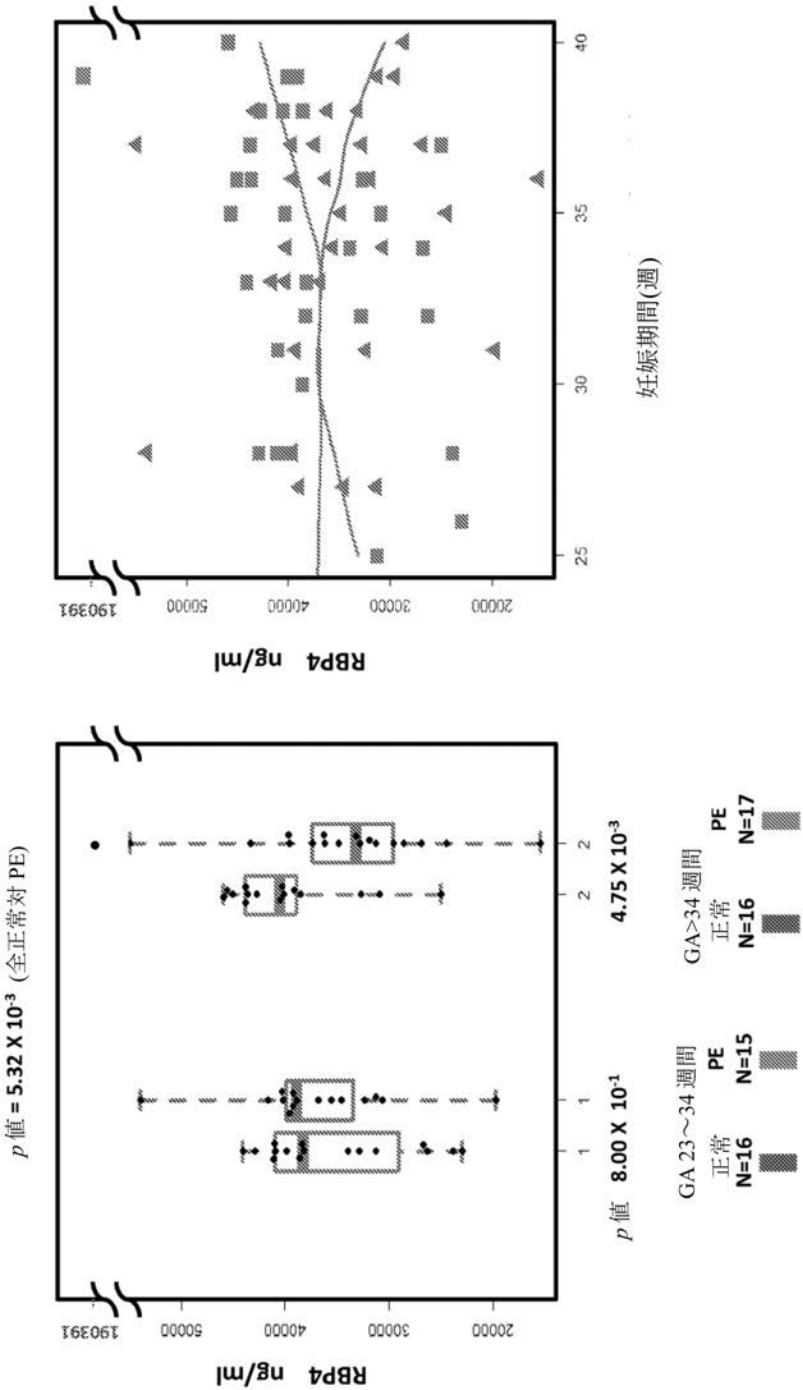
【図 14】

APO-AI 検証



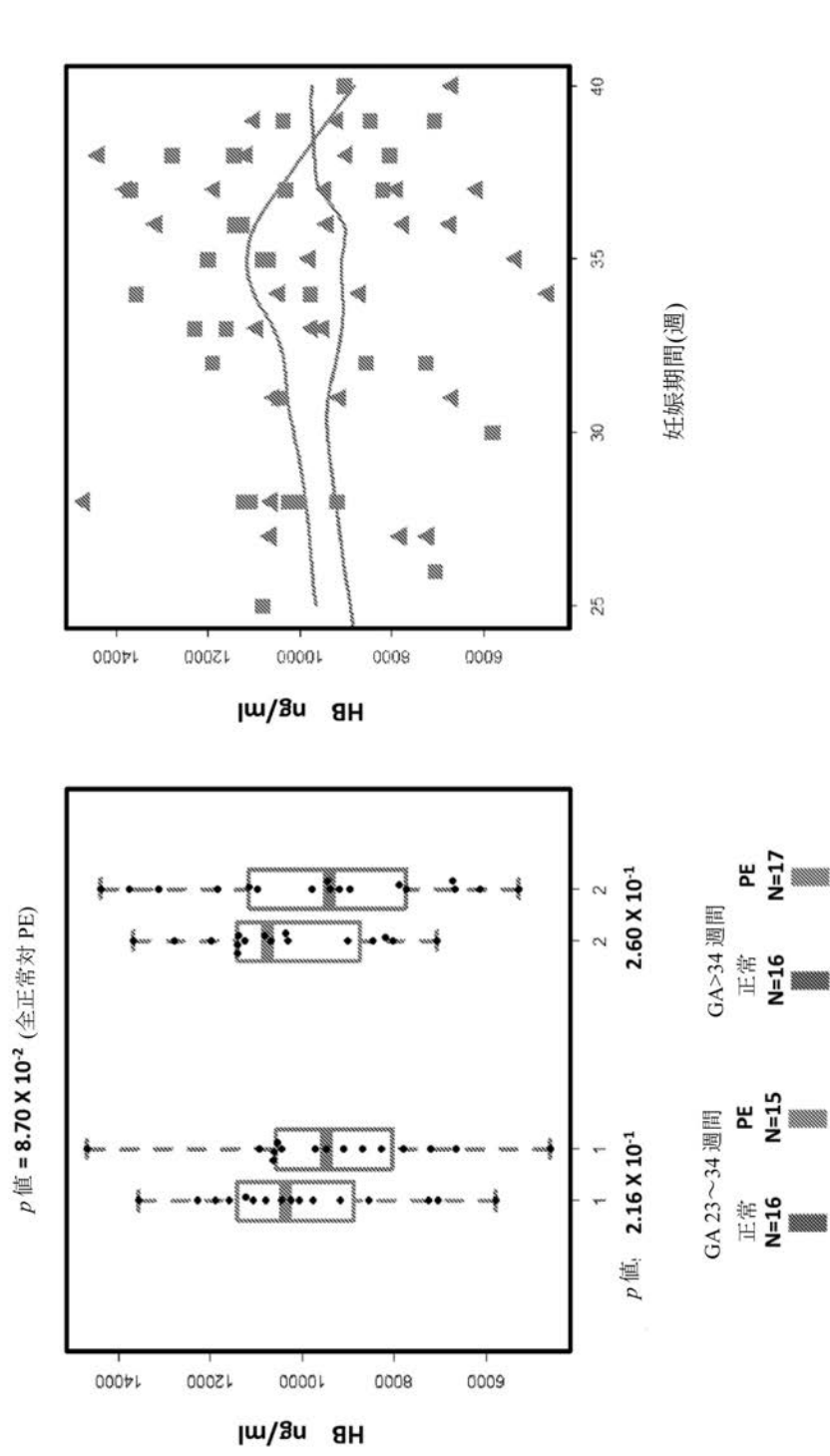
【図 15】

RBP4 検証



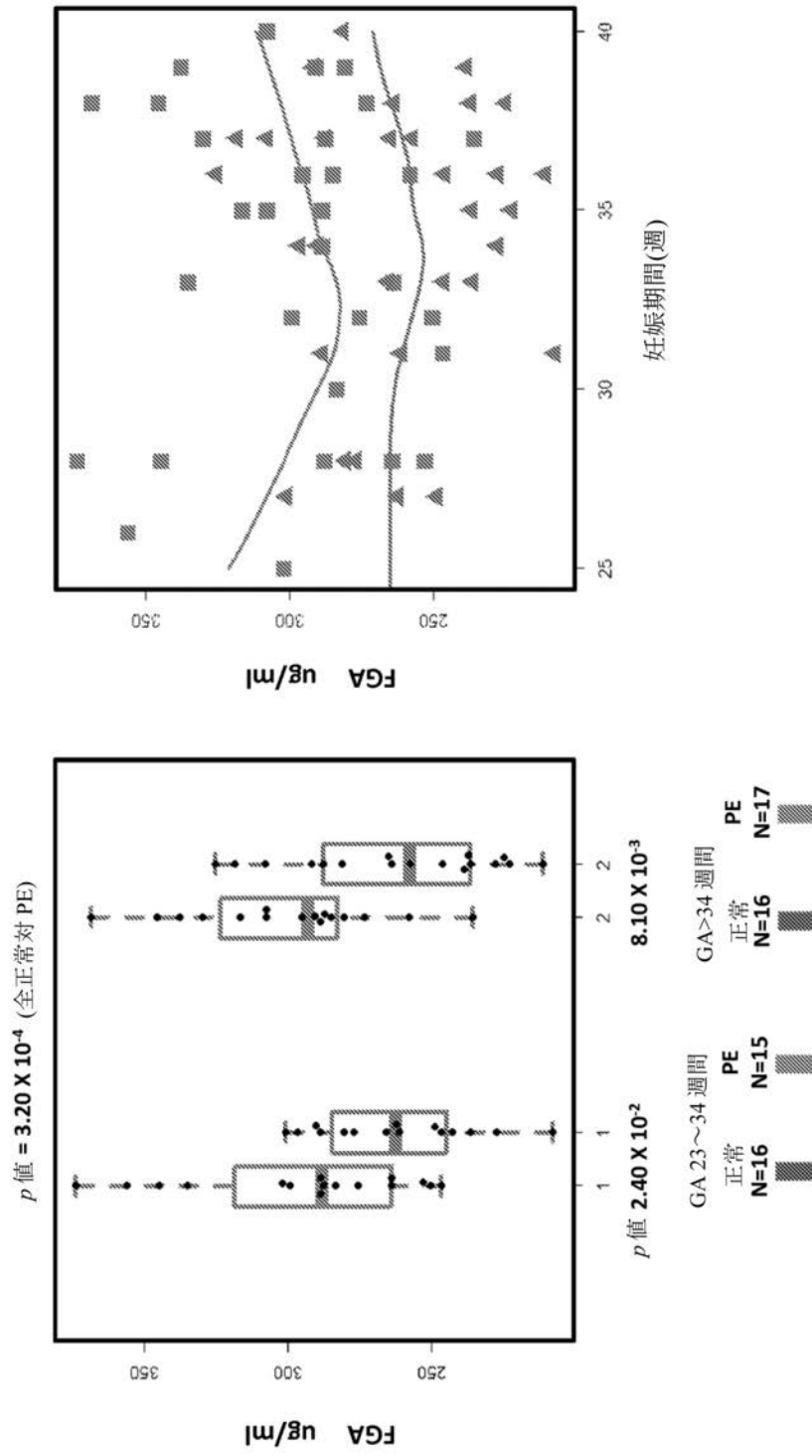
【図 16】

HB 検証



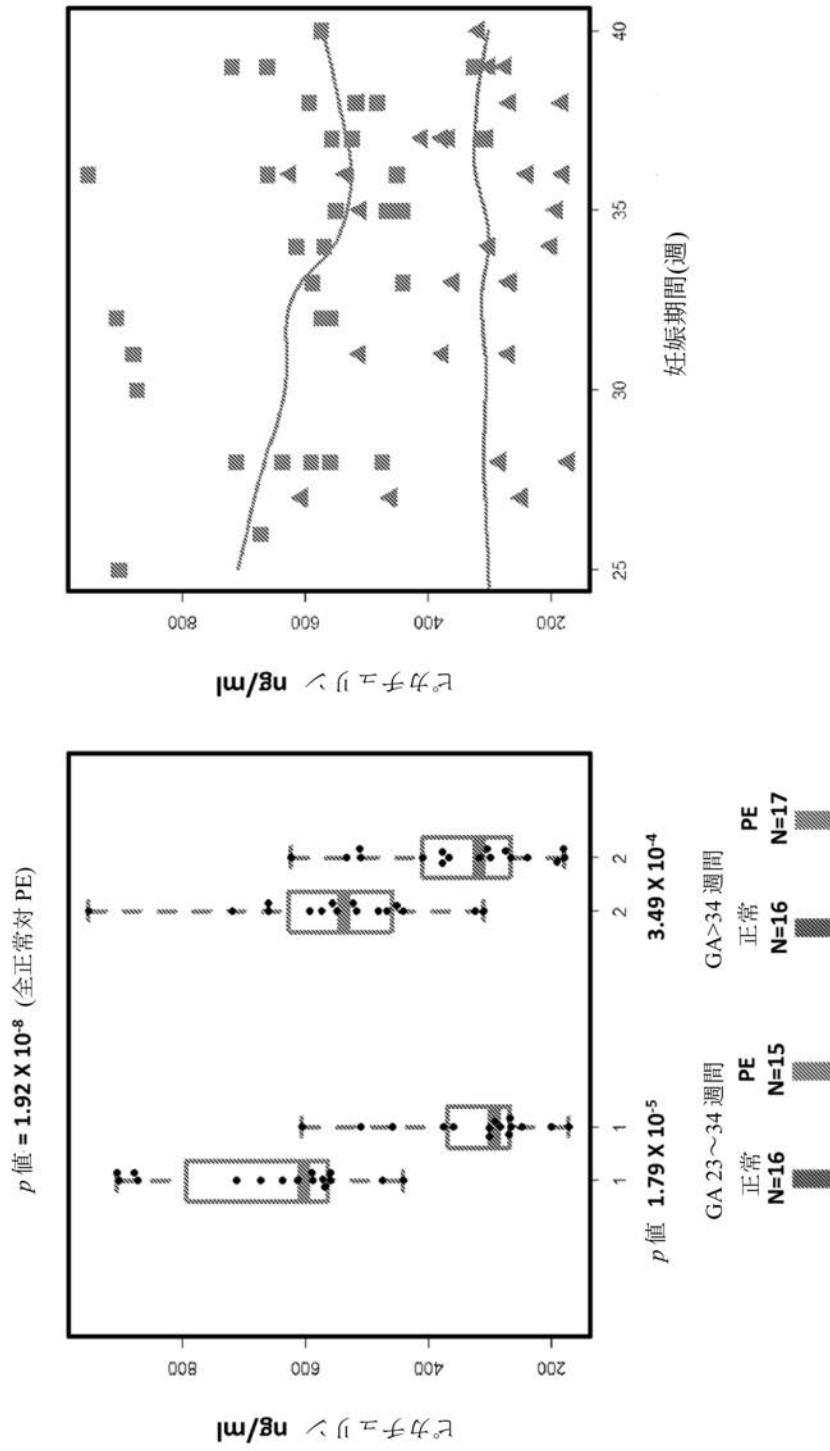
【図 17】

FGA 検証



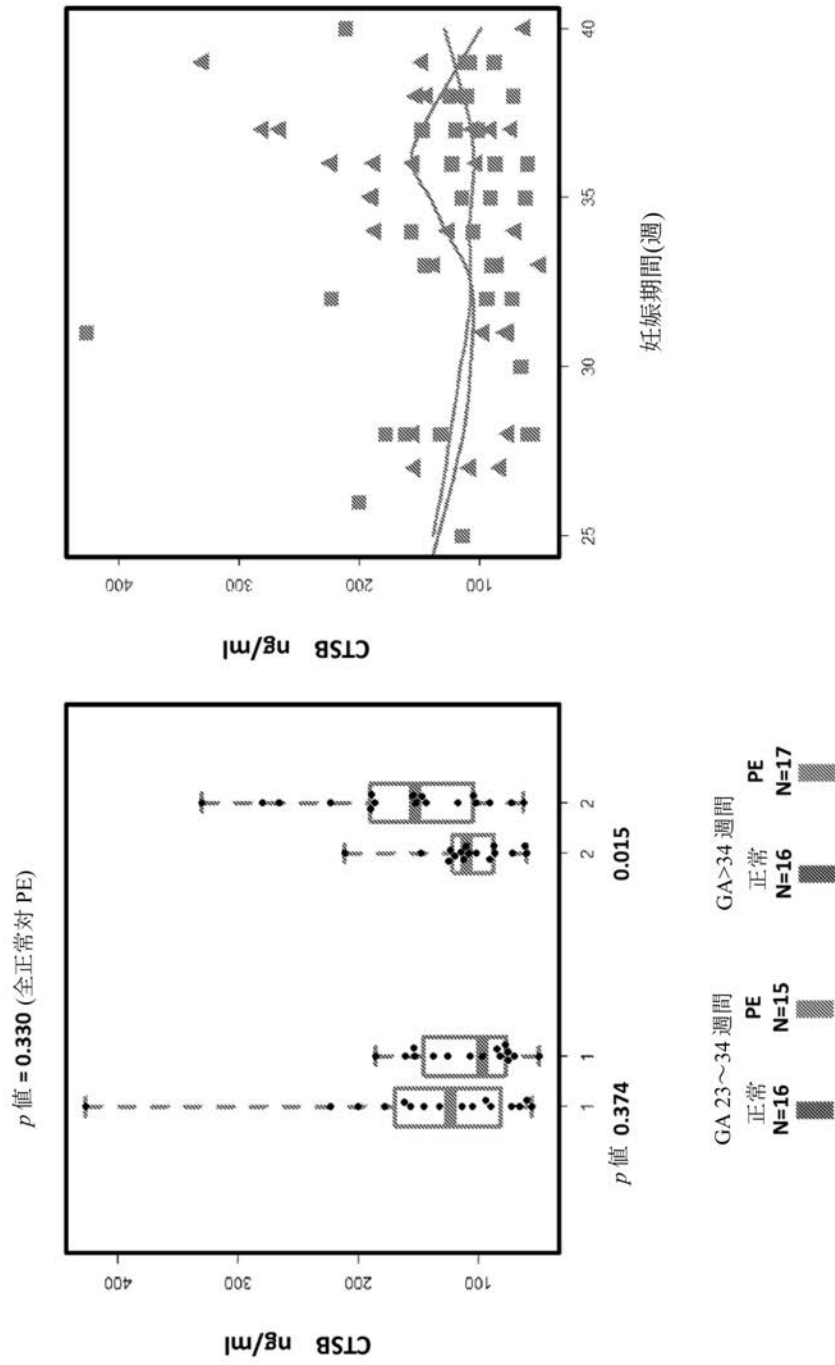
【図 18】

ピカチュリン検証



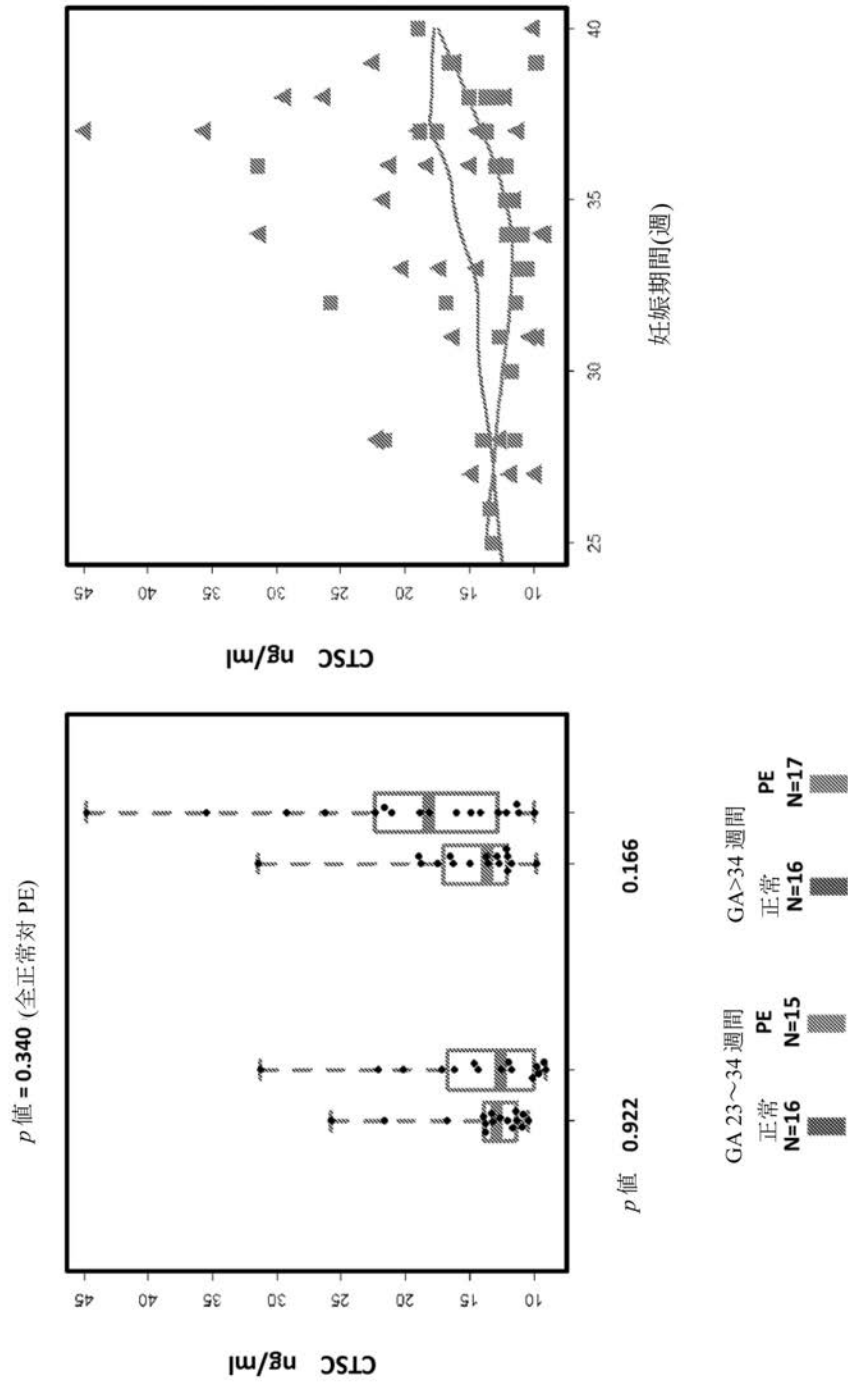
【図 19】

CTSB 検証



【図 20】

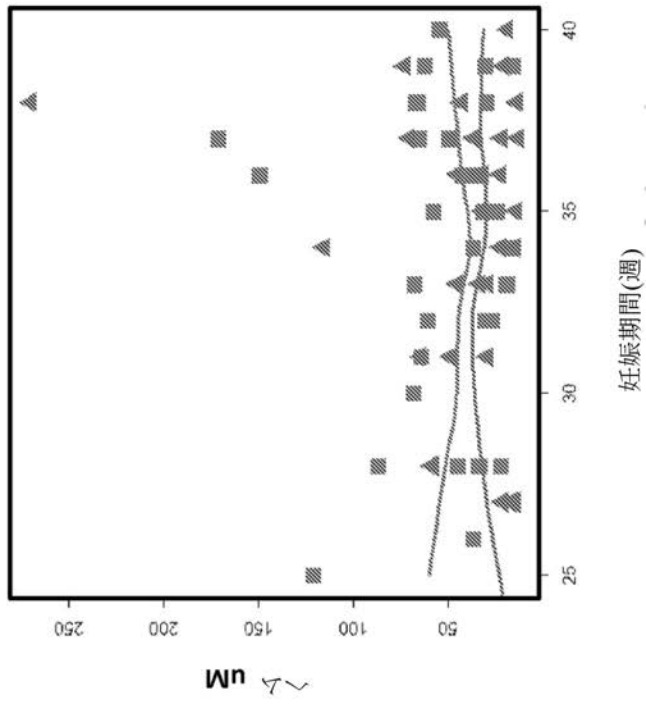
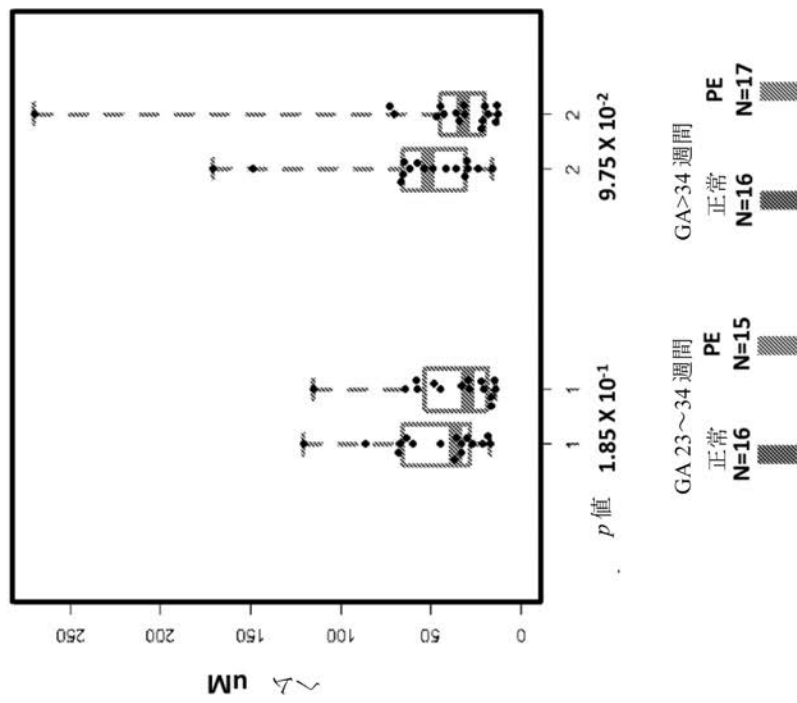
CTSC 検証



【図 2 1】

〜検証

p 値 = 3.39×10^{-2} (全正常対 PE)



【図 2 2】

バイオマーカー	早期 ROC AUC	後期 ROC AUC	全体的 ROC AUC
sFlt-1 /PIGF **	0.992	0.894	0.951
sFlt-1/A2M	0.996	0.934	0.969
sFlt-1/RBP4	1.000	0.941	0.976
sFlt-1/ヘモグロビン	1.000	0.930	0.971
sFlt-1/フィブリノゲン	1.000	0.930	0.974
sFlt-1/ピカチュリン	1.000	0.910	0.964
HPX/ピカチュリン	0.895	0.977	0.930

【図 2 3】

バイオマーカー	早期 ROC AUC	後期 ROC AUC	全体的 ROC AUC
sFlt-1/PIGF **	0.992	0.894	0.951
sFlt-1/ヘム	0.960	0.883	0.924
sFlt-1/ハプトグロビン	0.965	0.844	0.910
sFlt-1/APOE	0.977	0.883	0.934
sFlt-1/APO A1	0.984	0.941	0.963
sFlt-1/A2M	0.996	0.934	0.969
sFlt-1/RBP4	1.000	0.941	0.976
sFlt-1/ヘモグロビン	1.000	0.930	0.971
sFlt-1/ApoC3	0.910	0.812	0.865
sFlt-1/フィブリノゲン	1.000	0.930	0.974
sFlt-1/ピカチュリン	1.000	0.910	0.964

【図 2 4】

バイオマーカー	早期 ROC AUC	後期 ROC AUC	全体的 ROC AUC
sFlt-1/PIGF	0.992	0.894	0.951
HPX/PIGF	0.859	0.820	0.841
HPX/ヘム	0.766	0.777	0.772
HPX/ハプトグロビン	0.832	0.762	0.798
HPX/APOE	0.813	0.801	0.805
HPX/APO A1	0.816	0.863	0.826
HPX/A2M	0.777	0.879	0.824
HPX/RBP4	0.727	0.797	0.773
HPX/ヘモグロビン	0.684	0.887	0.799
HPX/ApoC3	0.508	0.605	0.557
HPX/フィブリノゲン	0.734	0.648	0.694
HPX/ピカチュリン	0.895	0.977	0.930

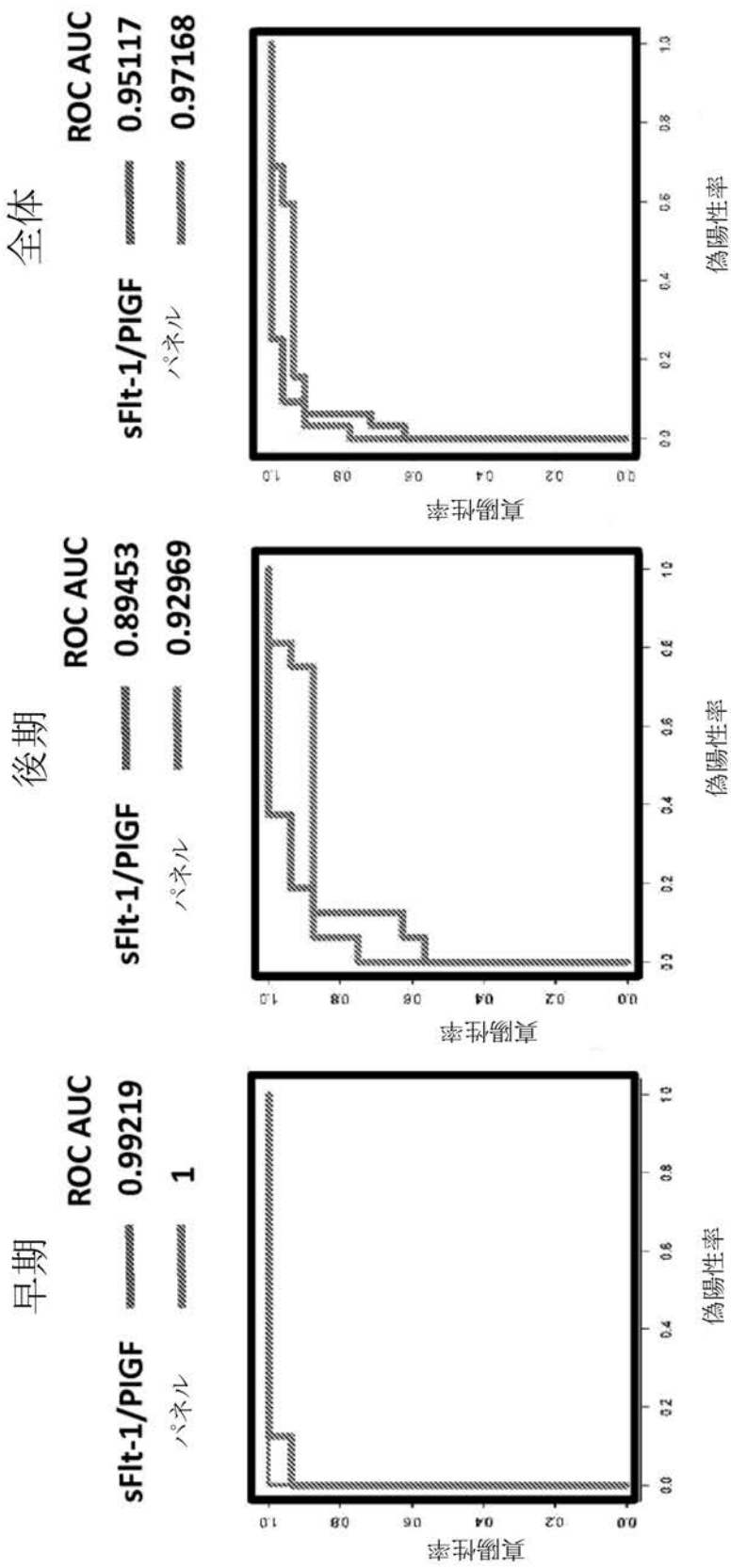
【図 2 5】

バイオマーカー	早期 ROC AUC	後期 ROC AUC	全体的 ROC AUC
sFlt-1/PIGF	0.992	0.894	0.951
CTSC/PIGF	0.898	0.730	0.814
CTSC/ヘム	0.672	0.715	0.689
CTSC/ハプトグロビン	0.734	0.645	0.679
CTSC/APOE	0.777	0.738	0.725
CTSC/APO A1	0.797	0.742	0.771
CTSC/A2M	0.719	0.742	0.725
CTSC/RBP4	0.613	0.660	0.630
CTSC/ヘモグロビン	0.613	0.715	0.664
CTSC/ApoC3	0.645	0.688	0.663
CTSC/フィブリノゲン	0.629	0.695	0.660
CTSC/ピカチュリン	0.816	0.883	0.848

【図 26】

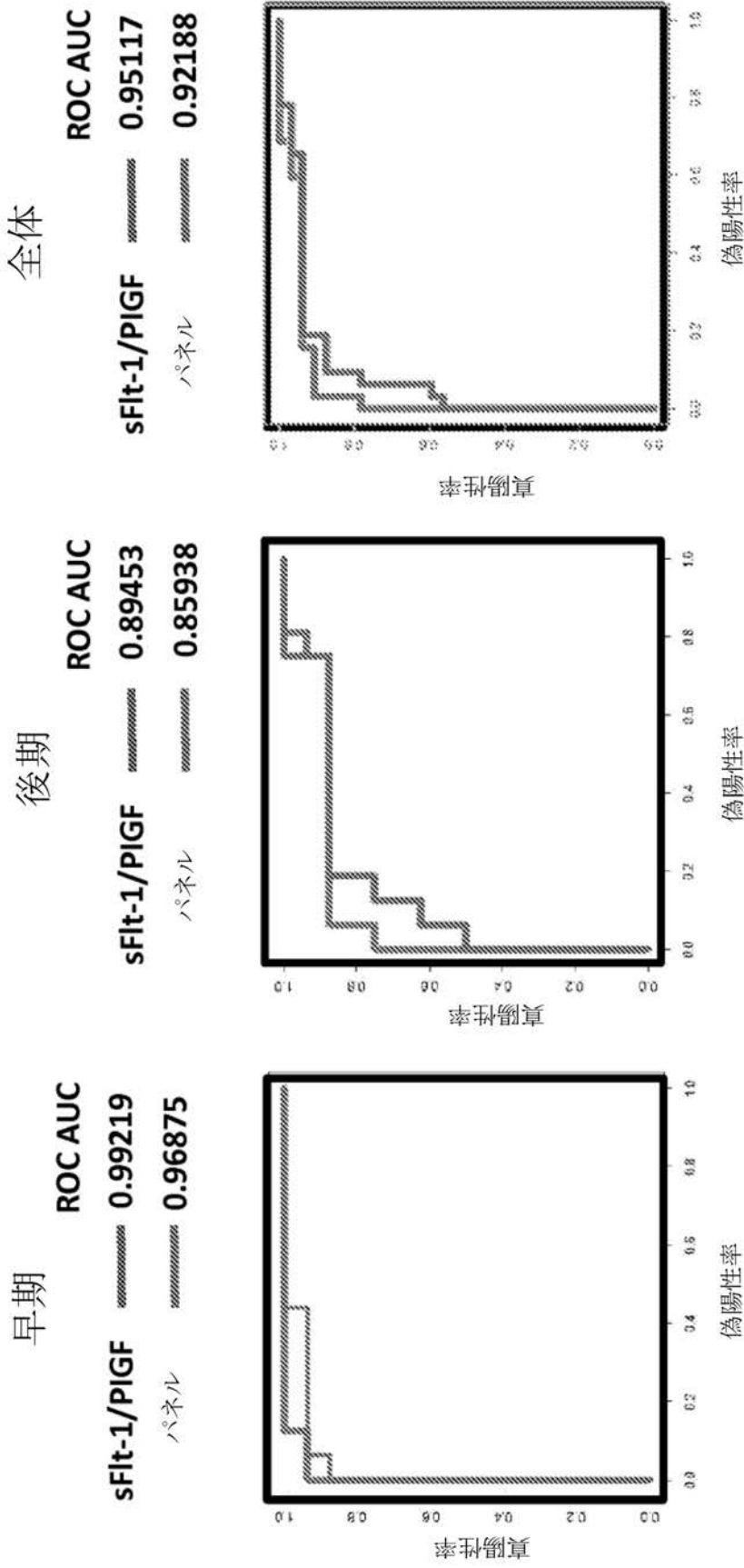
バイオマーカー	早期 ROC AUC	後期 ROC AUC	全体的 ROC AUC
sFlt-1/PlGF	0.992	0.894	0.951
Adam12/PlGF	0.848	0.844	0.834
Adam12/ハプトグロビン	0.832	0.695	0.750
Adam12/APOE	0.801	0.832	0.803
Adam12/APO A1	0.773	0.871	0.816
Adam12/A2M	0.762	0.836	0.808
Adam12/RBP4	0.684	0.824	0.759
Adam12/ヘモグロビン	0.703	0.848	0.771
Adam12/ApoC3	0.523	0.555	0.516
Adam12/フィブリノゲン	0.793	0.863	0.827
Adam12/ピカチュリン	0.836	0.883	0.869

sFlt-1 および PIGF を含むパネル



【図 28】

sFlt-1 および PIGF を除くパネル



【図 29】

異なるバイオマーカーの組み合わせのパネル

バイオマーカー	パネル 1	早期	パネル 2	後期	パネル 3	早期	パネル 4	後期	パネル 5	早期	パネル 6	後期	パネル 7	早期	後期
sFlt-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PIGF	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
HPX	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
フェリチン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTSC	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Adam12	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
HP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
A2M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ApoE	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
ApoC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ApoA1	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
RBP4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
HB	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
フィブリノゲン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
ピカチュリン	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

+ 選択されたバイオマーカー
 - 選択されていないバイオマーカー

異なるバイオマーカーの組み合わせによる ROC 曲線 AUC 値

バイオマーカー			SU バイオマーカーの数			ROC 曲線 AUC 値		
パネル	sFlt-1	PIGF	Stanford バイオマーカー	早期	後期	全体	早期	後期
1	+	+	-	0	0	0	1	0.8602941
2	+	+	+	1	8	8	1	1
3	+	-	-	0	0	0	1	0.8970588
4	+	-	+	1	4	4	1	1
5	-	+	-	0	0	0	0.9208333	0.6286765
6	-	+	+	1	9	9	1	0.9852941
7	-	-	+	3	7	8	1	1

- + 選択されたバイオマーカー
- 選択されていないバイオマーカー

所与の特異性レベルでの感度

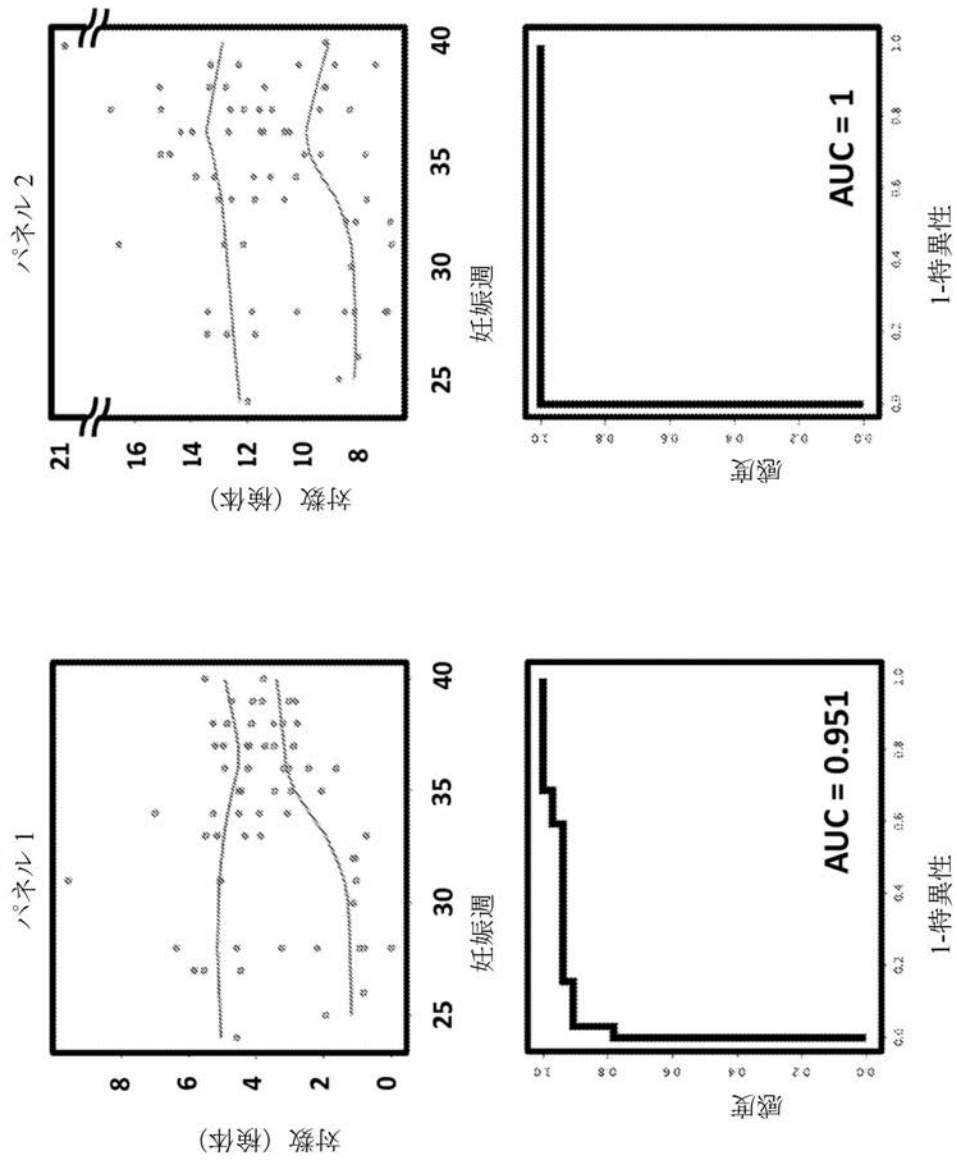
特異性レベル	パネル 1	パネル 2	パネル 3	パネル 4	パネル 5	パネル 6	パネル 7
100%	78.13%	100%	93.75%	100%	12.50%	75.00%	100%
95%	90.63%	100%	93.75%	100%	43.75%	90.63%	100%
90%	90.63%	100%	93.75%	100%	50.00%	90.63%	100%
85%	90.63%	100%	93.75%	100%	50.00%	93.75%	100%
80%	93.75%	100%	93.75%	100%	50.00%	100%	100%

所与の感度レベルでの特異性

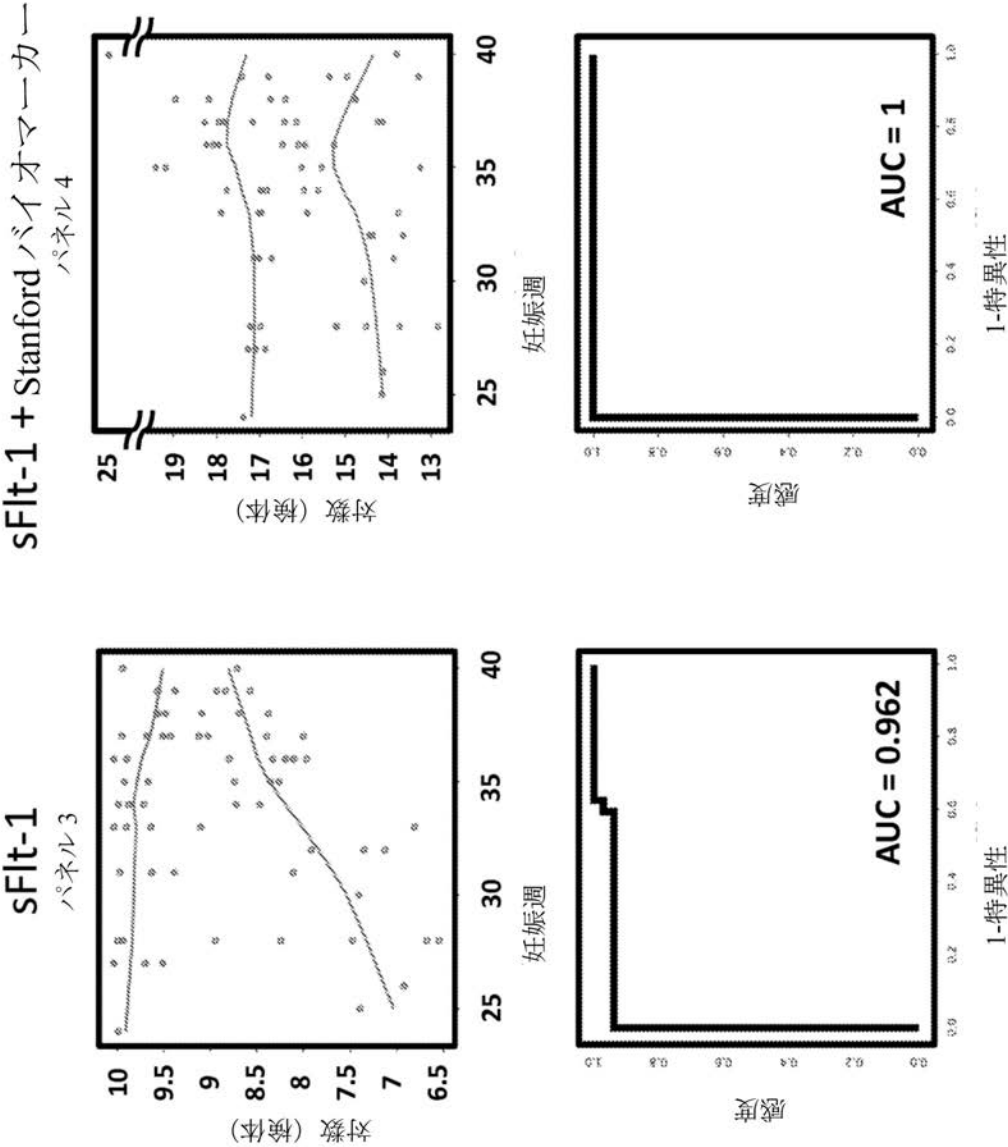
感度レベル	パネル 1	パネル 2	パネル 3	パネル 4	パネル 5	パネル 6	パネル 7
100%	31.25%	100%	37.50%	100%	12.50%	84.37%	100%
95%	40.62%	100%	40.62%	100%	40.62%	84.37%	100%
90%	96.87%	100%	100%	100%	53.12%	96.87%	100%
85%	96.87%	100%	100%	100%	62.50%	96.87%	100%
80%	96.87%	100%	100%	100%	62.50%	96.87%	100%

【図 3 2】

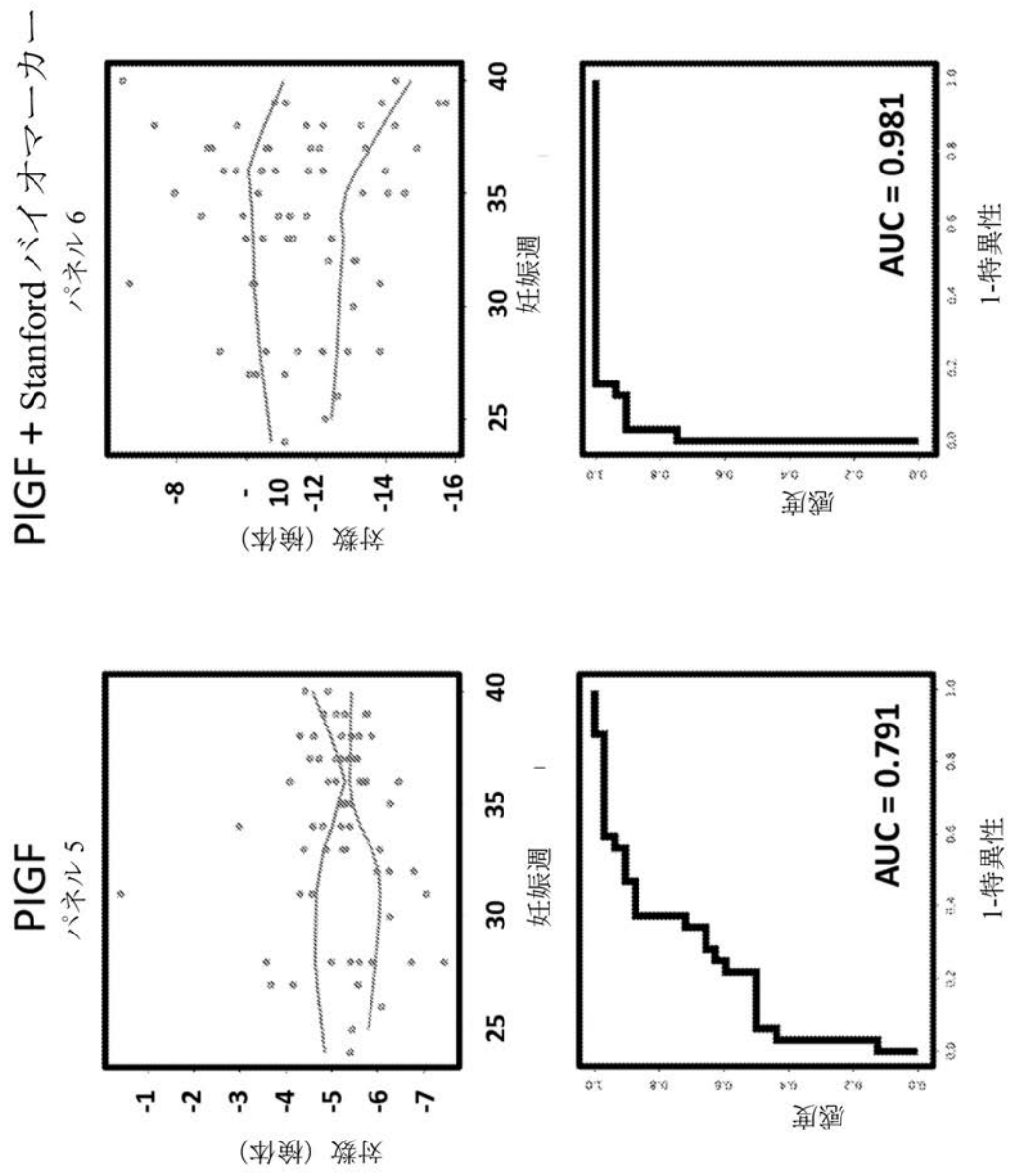
sFlt-1/PIGF + Stanford バイオマーカー



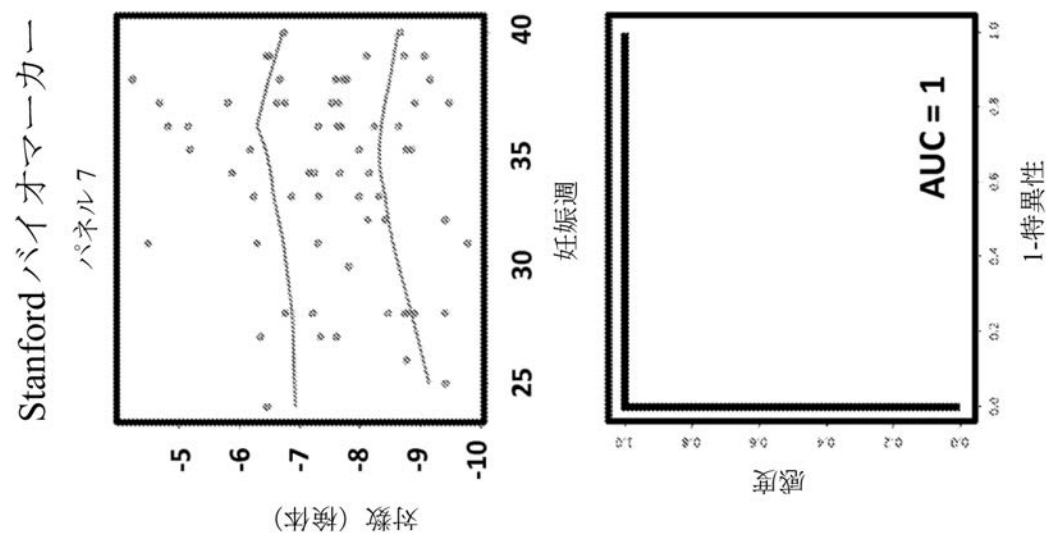
【図 3 3】



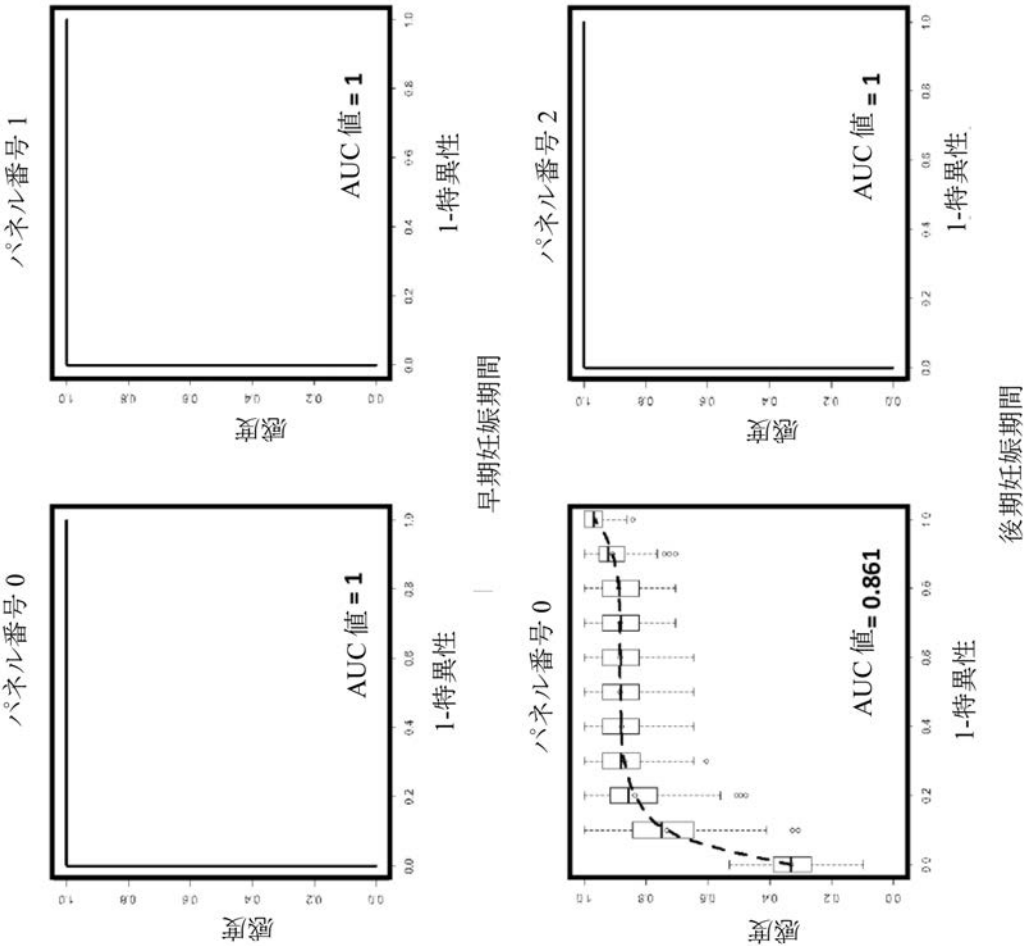
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/039918																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2013.01) USPC - 435/6.1 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) IPC(8) - C12Q 1/68; C40B 40/10; G01N 33/50, 33/566 (2013.01) USPC - 435/4, 6.1, 7.93, 26; 436/501; 506/7, 15; 514/9.8; 530/351 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 38/1709; G01N 33/689, 2800/50, 2800/60, 2800/70 (2013.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, Google, Pubmed																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X -- Y</td> <td>US 2010/0267034 A1 (LO et al) 21 October 2010 (21.10.2010) entire document</td> <td>1, 2, 5-7, 10, 11, 14, 16-20 ----- 3, 4, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SCHUTZER et al. 'Distinct Cerebrospinal Fluid Proteomes Differentiate Post-Treatment Lyme Disease from Chronic Fatigue Syndrome,' PLoS One, 23 February 2011 (23.02.2011), Vol. 6, Iss. 2, Pgs. 1-8. entire document</td> <td>3, 4, 8, 9, 12, 13, 21, 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2011/127219 A1 (KUSLICH et al) 13 October 2011 (13.10.2011) entire document This document can be viewed by entering the doc number at the following url: http://worldwide.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP</td> <td>4, 9, 13, 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2008/0233583 A1 (FISHER et al) 25 September 2008 (25.09.2008) entire document</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>US 2012/0142559 A1 (TUYTTEN et al) 07 June 2012 (07.06.2012) entire document</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X -- Y	US 2010/0267034 A1 (LO et al) 21 October 2010 (21.10.2010) entire document	1, 2, 5-7, 10, 11, 14, 16-20 ----- 3, 4, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 22	Y	SCHUTZER et al. 'Distinct Cerebrospinal Fluid Proteomes Differentiate Post-Treatment Lyme Disease from Chronic Fatigue Syndrome,' PLoS One, 23 February 2011 (23.02.2011), Vol. 6, Iss. 2, Pgs. 1-8. entire document	3, 4, 8, 9, 12, 13, 21, 22	Y	WO 2011/127219 A1 (KUSLICH et al) 13 October 2011 (13.10.2011) entire document This document can be viewed by entering the doc number at the following url: http://worldwide.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP	4, 9, 13, 22	Y	US 2008/0233583 A1 (FISHER et al) 25 September 2008 (25.09.2008) entire document	15	P, X	US 2012/0142559 A1 (TUYTTEN et al) 07 June 2012 (07.06.2012) entire document	1-22
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X -- Y	US 2010/0267034 A1 (LO et al) 21 October 2010 (21.10.2010) entire document	1, 2, 5-7, 10, 11, 14, 16-20 ----- 3, 4, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 22																		
Y	SCHUTZER et al. 'Distinct Cerebrospinal Fluid Proteomes Differentiate Post-Treatment Lyme Disease from Chronic Fatigue Syndrome,' PLoS One, 23 February 2011 (23.02.2011), Vol. 6, Iss. 2, Pgs. 1-8. entire document	3, 4, 8, 9, 12, 13, 21, 22																		
Y	WO 2011/127219 A1 (KUSLICH et al) 13 October 2011 (13.10.2011) entire document This document can be viewed by entering the doc number at the following url: http://worldwide.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP	4, 9, 13, 22																		
Y	US 2008/0233583 A1 (FISHER et al) 25 September 2008 (25.09.2008) entire document	15																		
P, X	US 2012/0142559 A1 (TUYTTEN et al) 07 June 2012 (07.06.2012) entire document	1-22																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 11 September 2013		Date of mailing of the international search report 08 OCT 2013																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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 リン, ブルース シュエフォン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 1, パロ アルト, ウェイバリー ストリート 1
4 0 0

(72)発明者 ミラー, リンダ リュー
アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 1 9 1 0 6, フィラデルフィア, ウェスト ワシントン ス
クエア 2 0 0

(72)発明者 モーガン, アレクサンダー エー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 4, パロ アルト, サウス カリフォルニア アベ
ニュー 8 5 5, ゲノム テクノロジー センター

(72)発明者 チェン, ゴンシン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 5, スタンフォード, シーシーエスアール, キャン
パス ドライブ 2 6 9

(72)発明者 ジー, ジュン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 5, パロ アルト, マタデロ アベニュー 2 6 9

(72)発明者 ヤン, ティン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 5 1 3 1, サンノゼ, フミア コート 1 7 1 1

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB01 DA14 DA36 FB03 JA01
4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA12
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR08
QR32 QR35 QR42 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS32 QS36
QX01 QX02