

(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2017-504029

(P2017-504029A)

(43) 公表日 平成29年2月2日(2017.2.2)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573	(2006.01)	GO 1 N	33/573	A
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2016-548028 (P2016-548028)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成27年1月26日 (2015.1.26)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月30日 (2016.8.30)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/051457		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02015/110624		T
(87) 国際公開日	平成27年7月30日 (2015.7.30)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	14152447.0		グレンツァーヘルストラッセ124
(32) 優先日	平成26年1月24日 (2014.1.24)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 産後HELLP症候群、産後子癇または産後妊娠高血圧腎症の予測

(57) 【要約】

本発明は、雌性対象が産後HELLP症候群、産後妊娠高血圧腎症、または産後子癇を発現するリスクを予測するための方法に向けられている。方法は、前記の対象から出産前に得られた第1試料および前記の対象から出産後に得られた第2試料中のi) sFlt-1およびPLGF、またはii) エンドグリンおよびPLGFのレベルの決定に基づく。さらに、本発明の方法を実施するためのデバイスおよびキットが、本発明に包含される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

雌性対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するための方法であって、以下の工程を含む前記方法：

a) 平穩無事な妊娠をしている雌性対象から出産前に得られた第 1 試料において、以下

i) バイオマーカー s F l t - 1 (可溶性 f s m 様チロシンキナーゼ - 1) のレベルまたはバイオマーカーエンドグリンのレベル、および

i i) バイオマーカー P l G F (胎盤増殖因子) のレベル、
を測定すること、

b) 工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルの第 1 比を計算すること、

c) 前記雌性対象から出産後に得られた第 2 試料において、工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルを測定すること、

d) 工程 c) において測定されたバイオマーカーのレベルの第 2 比を計算すること、および

e) 前記第 2 比を前記第 1 比に対して比較すること。

【請求項 2】

工程 a) および c) において、バイオマーカー s F l t - 1 および P l G F のレベルを測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰が、産後妊娠高血圧腎症、産後子癇および産後 H E L L P 症候群からなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

平穩無事な妊娠をしている雌性対象が、出産前に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を示さず、特に平穩無事な妊娠をしている対象が、出産前に妊娠高血圧腎症、特に重症妊娠高血圧腎症、子癇および / または H E L L P 症候群を患わなかったものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

第 1 試料が、出産前 4 8 時間以内、特に出産前 2 4 時間以内に得られる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

第 2 試料が、出産後 2 4 時間以内、特に出産後 1 6 時間以内に得られる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法であって、第 1 および第 2 比が、s F l t - 1 の P l G F に対する、またはエンドグリンの P l G F に対する比であり、第 1 比と比較した第 2 比の増大、または本質的に変化していない第 2 比が、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある対象を示し、および / または第 1 比と比較した第 2 比の低下が、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのない対象を示す、前記方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法であって、第 1 および第 2 比が、P l G F の s F l t - 1 に対する、または P l G F のエンドグリンに対する比であり、第 1 比と比較した第 2 比の低下または本質的に変化していない第 2 比が、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある対象を示し、および / または第 1 比と比較した第 2 比の増大が、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのない対象を示す、前記方法。

【請求項 9】

対象がヒトである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

試料が血液、血清もしくは血漿試料である、または試料が尿試料である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

出産後 7 日以内、特に 7 2 時間以内、または 4 8 時間以内に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクが予測する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

i) バイオマーカー s F l t - 1 および P l G F、
 i i) s F l t - 1 に特異的に結合する薬剤および P l G F に特異的に結合する薬剤、
 i i i) バイオマーカーエンドグリンおよび P l G F、および / または
 i v) エンドグリンに特異的に結合する薬剤および P l G F に特異的に結合する薬剤、
 の使用であって、

10

平穩無事な妊娠をしている雌性対象から出産前に得られた第 1 試料、および前記雌性対象から出産後に得られた第 2 試料における、雌性対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するための、前記使用。

【請求項 1 3】

さらに s F l t - 1 および P l G F の、またはエンドグリンおよび P l G F の第 1 比および第 2 比の計算、ならびに第 1 比の第 2 比に対する比較を含む、請求項 1 2 に記載の使用。

【請求項 1 4】

薬剤が抗体である、請求項 1 2 または 1 3 に記載の使用。

20

【請求項 1 5】

雌性対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するために適合したデバイスであって、以下を含む前記デバイス：

a) s F l t - 1 および / またはエンドグリンに特異的に結合する薬剤ならびに P l G F に特異的に結合する薬剤を含む分析ユニットであって、出産前に得られた雌性対象の第 1 試料および出産後に得られた前記雌性対象の第 2 試料中の s F l t - 1 および / またはエンドグリンのレベルならびに P l G F のレベルの測定に適合させた前記ユニット；ならびに

b) 以下の工程を実施するためのアルゴリズムを実装されたデータ処理装置を含む評価ユニット；

30

i) 第 1 試料において決定された s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の前記のレベルからの第 1 比および第 2 試料において決定された s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の前記のレベルからの第 2 比を計算すること、

i i) 前記第 1 比および前記第 2 比の値を比較すること、および

i i i) 前記対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測すること。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、平穩無事な妊娠をしている雌性対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するための方法に関する。当該方法は、前記対象から出産前に得られた第 1 試料および前記対象から出産後に得られた第 2 試料中の i) s F l t - 1 および P l G F、または i i) エンドグリンおよび P l G F のレベルの決定に基づく。さらに、本発明の方法を実施するためのデバイスおよびキットが、本発明に包含される。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

妊娠は、様々な形で合併症を伴う可能性があり、それは一方では妊婦の妊娠関連死亡に関連し、他方では新生児の罹病率および死亡率の増大にも関連する。母体死亡は、1 0

50

0,000例の出生当たり14.5例の割合であり、39歳を超える妊婦ではより高頻度であり、出血、血栓性肺塞栓症、感染症、心筋障害、心血管の病気および非心血管の病気、ならびに高血圧性障害により引き起こされる可能性があり、その中で妊娠高血圧腎症が最も高頻度である(Berg 2010, *Obstetrics and Gynecology*: 116: 1302 -1309)。

【0003】

妊娠高血圧腎症は、妊娠全体のおおよそ2~8パーセントで合併し、世界的に母体および胎児の死亡に対する主な寄与因子である(Duley 2009, *Semin Perinatol*: 33: 130-37)。妊娠高血圧腎症は、通常は妊娠の間に起こる。しかし、それは、産後、すなわち出産後にも発現し得る。

【0004】

妊娠高血圧腎症は、一般に、妊娠関連または妊娠誘発性の高血圧症と定義される。それは、高血圧症およびタンパク尿症を特徴とする。詳細は、標準的な医学書および様々な臨床学会のガイドライン中にも見られる；例えば、Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM: The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: 妊娠における高血圧症の研究に関する国際学会(ISSHP)からの声明、*Hypertens Pregnancy* 2001, 20:IX-XIVまたはACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists, no.: 33, January 2002またはDGGG. S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen der Deutschen Gesellschaft fuer Gynaekologie und Geburtshilfe, AWMFオンライン, AWMF登録番号015/018, Klasse S1。

【0005】

妊娠高血圧腎症に加えて、出生後に発現し得るさらなる妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰、例えばHELLP症候群および子癇が存在する。全ての病気は、産後の母親に関する有害な転帰と関係している。

【0006】

HELLP症候群は、致命的産科合併症であり、溶血性貧血、高められた肝機能検査(LFT)、および低い血小板数を含む。HELLP症候群は、通常は妊娠末期の間に始まるが、全ての患者の30%に至る対象が、出産後に、典型的には48時間以内にこの症候群を発現する。この症候群の意外性、突然性、および劇症性の経過は、本質的である。症例の20%において、出産の前または間に妊娠高血圧腎症の証拠がない可能性があり、全ての実験室所見は正常であった。(Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A review. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2009;9(8). <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2393-9-8>; Pop-Trajkovic et al. 2013 *Uppsala Journal of Medical Sciences* 118, 51-53)。

【0007】

子癇は、一般的には、妊娠高血圧腎症の徴候または症状を有する女性における妊娠の間または産後の大発作活動の新規の開始および/または未解明の昏睡として定義される。それは、典型的には、妊娠の20週の間もしくは後に、または出産後および胎盤の排出後の産後期間において起こる。

【0008】

誕生直後に産後HELLP症候群、子癇、または妊娠高血圧腎症を発現するリスクがある女性を同定する高いアンメット・メディカル・ニーズが存在する。

胎盤増殖因子(Placenta growth factor)(PLGF)、可溶性エンドグリンおよび可溶性fsm様チロシンキナーゼ1(soluble fsm-like tyrosine kinase 1)(sFlt-1)は、妊娠の間の妊娠高血圧腎症を診断および予測するためのマーカーとして記載されてきた(例えば、国際公開第2004/008946号、国際公開第2008/034750号; Rana, 2007, *Hypertension* 50:137-142を参照)。sFlt-1およびPLGFの比またはエンドグリンおよびPLGFの比は、出産前の妊婦における妊娠高血圧腎症に関する診断または予後のパラメーターとして報告されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

文献において、血管新生因子および抗血管新生因子は、健康な女性において、ならびに妊娠高血圧腎症の女性において、出産後に急速に低下することが知られている。

Wikstroemらは、妊娠高血圧腎症の女性および対照における出産前後の s F l t - 1 および P l G F の濃度レベルを調べ、全ての群における両方のマーカーに関する急速な低下を見出した(Acta Obstetrica et Gynecologica, 2008; 87: 146-153)。しかし、産後妊娠高血圧腎症の合併症を示す女性は、その研究に含まれなかった。

【 0 0 1 0 】

Reddyらは、s F l t - 1 の濃度レベルは、妊娠高血圧腎症の女性において正常な対照の女性と比較して出産の間に増大する(アクチビンAも増大するが、可溶性エンドグリンは増大しない)ことを見出した(PLoS ONE, 2009, 4(2), e4453)。彼らは、両方の群において、s F l t - 1 のレベルが24時間以内に低下することを見出した。産後合併症を示す女性は、その研究に含まれなかった。

10

【 0 0 1 1 】

国際公開第2013/068475号は、(妊娠の約15週目~約34週目に)妊娠高血圧腎症を発現するリスクのある妊婦を比(s F l t - 1 / P l G F)の2回の測定により短い期間の内に診断するための方法を記載している。女性は、第1比に対する第2比が少なくとも約3倍増大している場合、リスクがある。

【 0 0 1 2 】

国際公開第2014/001244号は、妊婦が妊娠高血圧腎症(子癇および/またはHELLP症候群)を発現するリスクがないかどうかを短い期間(1~2週間)の内に診断するための方法を記載しており;妊娠している対象は、妊娠の約20週目~約40週目である。

20

【 0 0 1 3 】

Prager et al. 2013は、コルチゾン療法下での出産前のHELLP症候群の開始を有する妊婦におけるs F l t - 1 / P l G F の比をモニターした。産後HELLP症候群を示す女性は、その研究には含まれなかった(Prager, R; Eckart, A; Meint, P; Seelbach-Goebel, B: Verhalten der Angiogenesefaktoren (PlGF und sFlt-1) unter praepartaler Dexamethason-Therapie beim HELLP-Syndrom, Z Geburtshilfe Neonatol 2013; 217: Po 01_6 DOI: 10.1055/s-0033-1361384)。

30

【 0 0 1 4 】

産後合併症の早期診断は、報告されているこれらの合併症と関係する罹病率および死亡率が高いため、重要である。例えば、産後妊娠高血圧腎症は、迅速な処置を必要とする。未処置のままであると、産後妊娠高血圧腎症は、結果として発作および他の重篤な合併症をもたらす得る。従って、産後HELLP症候群、産後子癇および産後妊娠高血圧腎症を発現するリスクのある対象を同定するための信頼できるアッセイは、まだ利用可能ではないが、それでもなお非常に望まれている。

【 0 0 1 5 】

本発明の基礎となる技術的問題は、前記の必要性に応じるための手段および方法の提案として理解されることができる。その技術的問題は、特許請求の範囲において、および本明細書において下記で特性付けられる態様により解決される。

40

【 0 0 1 6 】

好都合には、本発明の基礎となる研究の状況において、平穩無事な妊娠をしている雌性対象におけるs F l t - 1 / P l G F またはエンドグリン / P l G F 比は、前記の対象が出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現する、特に産後妊娠高血圧腎症、産後子癇、および/または産後HELLP症候群を発現するリスクを予測するためのバイオマーカーとして役立つことが、見出されている。注目すべきことに、出産後に得られたs F l t - 1 / P l G F またはエンドグリン / P l G F の比の、出産前に得られた試料と比較した場合の増大は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを示しており、一方で、s F l t - 1 / P l G F またはエンドグリン / P l G F の比の低下

50

は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない対象を示していた。

【 0 0 1 7 】

本発明により、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを信頼できる指標に基づいてより確実に評価することが可能になる。さらに、時間がかかり、費用がかかり、扱いにくい診断手段が、本発明の方法を適用する場合、回避されることができ、適切な支持的手段が、開始されることができ、ヘルスケア管理は、本発明の方法から大きく利益を得るであろう。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

10

【 0 0 1 8 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 4 / 0 0 8 9 4 6 号

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 0 8 / 0 3 4 7 5 0 号

【 特許文献 3 】 国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 8 4 7 5 号

【 特許文献 4 】 国際公開第 2 0 1 4 / 0 0 1 2 4 4 号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 9 】

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

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

【 非特許文献 3 】 Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM: The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: 妊娠における高血圧症の研究に関する国際学会 (ISSHP) からの声明、*Hypertens Pregnancy* 2001, 20: IX-XIV 20

【 非特許文献 4 】 ACOG Practice Bulletin, *Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists*, no.: 33, January 2002

【 非特許文献 5 】 DGGG. S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen der Deutschen Gesellschaft fuer Gynaekologie und Geburtshilfe, AWMFオンライン, AWMF登録番号015/018, Klasse S1

【 非特許文献 6 】 Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A review. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2009;9(8). <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2393-9-8> 30

【 非特許文献 7 】 Pop-Trajkovic et al. 2013 *Uppsala Journal of Medical Sciences* 118, 51-53

【 非特許文献 8 】 Rana, 2007, *Hypertension* 50:137-142

【 非特許文献 9 】 *Acta Obstetrica et Gynecologica*, 2008; 87: 146-153

【 非特許文献 1 0 】 *PLoS ONE*, 2009, 4(2), e4453

【 非特許文献 1 1 】 Prager, R; Eckart, A; Meint, P; Seelbach-Goebel, B: Verhalten der Angiogenesefaktoren (PIGF und sFlt-1) unter praepartaler Dexamethason-Therapie beim HELLP-Syndrom, *Z Geburtshilfe Neonatol* 2013; 217: Po01_6 DOI: 10.1055/s-0033-1361384 40

【 発明の概要 】

【 0 0 2 0 】

従って、本発明は、雌性対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現する（従って、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を患う）リスクを予測するための方法に関し、前記の方法は、以下の工程を含む：

a) 平穏無事な妊娠をしている雌性対象から出産前に得られた第1試料において、以下

i) バイオマーカー sFlt-1 (可溶性 f s m 様チロシンキナーゼ - 1) のレベルまたはバイオマーカーエンドグリンのレベル、および

50

i i) バイオマーカー P L G F (胎盤増殖因子) のレベルを測定し、

b) 工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルの第 1 比を計算し、

c) 前記雌性対象から出産後に得られた第 2 試料において、工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルを測定し、

d) 工程 c) において測定されたレベルの第 2 比を計算し、そして

e) 第 2 比を第 1 比に対して比較する。

【 0 0 2 1 】

一態様において、第 2 比を第 1 比に対して比較する工程 e) は、第 2 比の第 1 比に対する比を計算することにより実施される (または逆もまた同様)。

好ましくは、雌性対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクは、工程 (e) において実施される比較工程の結果に基づいて予測される。従って、前記方法は、さらに、雌性対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを、比較工程の結果に基づいて予測する (またはその予測を提供する) さらなる工程を含むことができる。

【 0 0 2 2 】

本発明の方法は、好ましくは、エキソピボまたはインピボの方法である。さらに、それは、上記で明確に言及された工程に加えて工程を含むことができる。例えば、さらなる工程は、試料の前処理または方法により得られた結果の評価に関することができる。その方法は、手作業で実施されることができ、または自動化により支援されることができ、好ましくは、測定工程、計算工程および比較工程は、全体が、または部分的に、自動化により、例えば測定のための適切なロボットおよびセンサー設備、計算工程におけるデータ処理デバイス上のコンピューターに実装された計算アルゴリズム、または比較工程におけるデータ処理デバイス上の比較および / または診断アルゴリズムにより支援されることができ、

【 0 0 2 3 】

本発明によれば、雌性対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現する、従って患うリスクが、予測される。出産後に発現する妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰は、当業者には周知である。本明細書で用いられる際、その用語は、好ましくは、妊娠後に発現する妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を指す。好ましくは、出産後の少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰は、産後 H E L L P 症候群、産後妊娠高血圧腎症、および産後子癇、産後脳出血、産後腎不全、特に産後急性腎不全、産後肺浮腫、特に急性産後肺浮腫、産後脳浮腫、および産後肝破裂、播種性血管内凝固 (D I C) ならびに産後母体死亡からなる群から選択される。より好ましくは、出産後の少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰は、産後 H E L L P 症候群、産後妊娠高血圧腎症、および産後子癇からなる群から選択される。従って、好ましくは、雌性対象が産後 H E L L P 症候群、産後妊娠高血圧腎症、および / または産後子癇を発現するリスクがあるかどうかは予測される。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 4 】

用語 “ 少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰 ” は、1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰または (例えば子癇が通常妊娠高血圧腎症の後に起こるため) 1 種類より多くの、すなわち 2 もしくは 3 種類 (またはさらに多く) の妊娠高血圧腎症に関連する転帰を指す。

【 0 0 2 5 】

本明細書中で用いる用語 “ 妊娠高血圧腎症 ” は、高血圧症およびタンパク尿症を特徴とする医学的状态を指す。妊娠高血圧腎症は、妊婦対象において出産の前後、すなわち出生の前後に起こり得る。本発明の状況において、対象が妊娠の間に妊娠高血圧腎症を患うリスクよりもむしろ、出産後に妊娠高血圧腎症を患うリスクが、予測される。産後妊娠高血圧腎症のほとんどの症例は、出生後 4 8 時間以内に発現する。しかし、産後妊娠高血圧腎

10

20

30

40

50

症は、時々出生後4～6週間に至るまでに発現する。これは、遅発性産後妊娠高血圧腎症として知られている。好ましくは、妊娠誘発性高血圧症は、2回の血圧測定が140 mmHg（収縮期）-90 mmHg（拡張期）以上であることにより対象に存在すると同定され、その際、前記の2回の測定は、少なくとも6時間空けて行なわれたものである。タンパク尿症は、好ましくは、特に24時間の尿試料における300 mg/dL以上のタンパク質により存在すると同定される。また、好ましくは、タンパク尿症は、タンパク質ディップスティック分析により（2+以上の場合に）、または30 mg/dL以上のタンパク質がスポット尿試料中に存在する場合に、またはスポット尿においてタンパク質/クレアチニン比が30 mgタンパク質/mmolクレアチニン以上である場合に同定される。

【0026】

妊娠高血圧腎症は、強直間代発作または昏睡状態の出現を特徴とする致命的障害である子癇にまで進行する可能性がある。重症の妊娠高血圧腎症に関連する症状は、24時間以内に500 ml未満の乏尿（oliguria）、脳障害または視覚障害、肺浮腫またはチアノーゼ、心窩部痛または右上4分の1痛、肝機能障害、血小板減少症である。

【0027】

用語“HELLP症候群”は、当該技術で周知である。HELLP症候群は、致命的な産科合併症であり、通常考えられる妊娠高血圧腎症の合併症である。両方の状態は、通常は妊娠の後期の間、または出産後に起こる。本発明の状況において、雌性対象が出産後にHELLP症候群を患うリスクが予測される。HELLP症候群は、有害な転帰、例えば腎不全、肝被膜下血腫、再発性妊娠高血圧腎症、またはさらには死亡の高いリスクと関係している。“HELLP”は、その症候群の3つの主な特徴：溶血、高められた肝臓酵素、および低い血小板数の略語である。HELLP症候群は、患者間の症状の変動性（しばしば患者は一般的な腹痛以外に症状を有しない）のため、診断するのが困難である可能性があり、早期の診断は、罹病率の低減において重要である。時宜を得た方法で処置されない場合、患者は、肝臓破裂/出血または脳浮腫により、危篤状態になるか、または死ぬ可能性がある。HELLP症候群を有する可能性のある患者において、一組の血液検査：全血球数、凝固パネル、肝臓酵素、電解質、および腎機能試験が実施される。しばしば、フィブリン分解産物（FDP）レベルが決定され、それは高められている可能性がある。乳酸デヒドロゲナーゼは、溶血のマーカーであり、高められている（>600 U/リットル）。タンパク尿症は、存在するが、軽度である可能性がある。

【0028】

妊娠高血圧腎症および随伴症状ならびに事後疾患、例えばHELLP症候群または子癇のさらなる詳細は、医学の標準的な教本または関連する医学会のガイドラインにおいて見付かる。詳細は、例えば、ACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists, no.: 33, January 2002またはHaram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A review. BMC Pregnancy and Childbirth 2009;9(8). <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2393-9-8>またはDGGG. S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen der Deutschen Gesellschaft fuer Gynaekologie und Geburtshilfeにおいて見付けられることができる；上記の引用参照。

【0029】

本明細書で言及される“対象”は、好ましくは哺乳類である。哺乳類は、飼育慣らされた動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒトおよび非ヒト霊長類、例えばサル）、ウサギ、およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）を含むが、それらに限定されない。好ましくは、対象は、ヒトの対象である。本発明における対象は、雌性対象であり得る。雌性対象は、第1試料が得られた時点で妊娠しているであり得る。しかし、第2試料は、出産後に得られるであり得る。用語“対象”および“患者”は、本明細書において互換的に用いることができる。

【0030】

好ましくは、雌性対象は、平穩無事な妊娠をしている対象である。用語“平穩無事な妊

10

20

30

40

50

娠”は、当業者には十分に理解されている。特に、平穩無事な妊娠をしている対象は、妊娠高血圧腎症（特に重症の妊娠高血圧腎症）、子癇、および／またはHELLP症候群を、妊娠の間に（すなわち現在の妊娠の間に）示さなかったと予想される。従って、平穩無事な妊娠をしている対象は、好ましくは、出産前に（特に現在の妊娠の間に）、妊娠高血圧腎症（特に重症の妊娠高血圧腎症）、子癇、および／またはHELLP症候群を患わなかった。特に、その対象は、出産前に、妊娠高血圧腎症（特に重症の妊娠高血圧腎症）、子癇、およびHELLP症候群を患わなかったと予想される。

【0031】

従って、第1試料が得られる時点で、本発明における対象は、好ましくは、出産前に、妊娠高血圧腎症、子癇、および／またはHELLP症候群の臨床診断を示さないである。しかし、本発明における対象は、心窩部痛、頭痛、視覚障害、高血圧症および浮腫からなる群から選択される少なくとも1種類の症状を示す可能性があり、従って、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現する（従ってそれを患う）、特に産後HELLP症候群、産後妊娠高血圧腎症、および／または産後子癇を発現するリスクがあると疑われる可能性がある。一態様において、対象は、出産の少し前に前記の少なくとも1種類の症状を示し、特に、対象は、第1試料が得られる時点で、前記の少なくとも1種類の症状を示す。

10

【0032】

さらに、平穩無事な妊娠をしている対象は、出産前に、すなわち現在の妊娠において、軽度の妊娠高血圧腎症を患っていたことが想定される。この場合、リスクは、出産後に少なくとも1種類の重症の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現することを指す。好ましくは、重症の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰は、産後HELLP症候群、産後子癇および産後の重症の妊娠高血圧腎症から選択される。用語“軽度の妊娠高血圧腎症”および“重症の妊娠高血圧腎症”は、当該技術で周知である。用語“軽度の妊娠高血圧腎症”は、好ましくは、20週間の妊娠の前に正常圧であった女性における、少なくとも6時間空いた2回の機会における終末器官の損傷の証拠を有しない高血圧症（特に血圧が140/90mmHg以上の高血圧症）を指す。用語“重症の妊娠高血圧腎症”は、以下の症状の少なくとも1つを有する妊娠高血圧腎症を指す：少なくとも6時間空いた2回の機会における160mmHg以上の収縮期血圧または110mmHg以上の拡張期血圧、24時間の収集における5gより多い、または少なくとも4時間空けて収集された2つのランダムな尿試料における3+より高いタンパク尿、乏尿（24時間に400mL未満）、持続性の頭痛、心窩部痛、および／または肝機能障害および血小板減少。用語の定義に関して、例えばSibai et al. Lancet. 2005 Feb 26-Mar 4;365(9461):785-99を参照、それはその全開示内容に関して参照により本明細書に援用される。

20

30

【0033】

やはり好ましくは、対象は、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある、特に産後HELLP症候群、産後妊娠高血圧腎症、および／または産後子癇のリスクのある人物であることができる。リスクのある人物は、好ましくは、40歳以上である雌性対象および／または妊娠高血圧腎症の家族歴（例えば、母または姉妹における妊娠高血圧腎症）を有する初回妊娠の雌性対象、前の妊娠における、または前の出産後の妊娠高血圧腎症の前歴を有する雌性対象、初回接触時に35kg/m²以上の肥満指数を有する雌性対象、多胎妊娠または既存の血管疾患、例えば高血圧もしくは糖尿病を有する雌性対象、例えばNICU（国立医療技術評価機構）出産前ケアガイドラインCG62、2008年3月において記載されているような雌性対象である。

40

【0034】

分娩技法は、適切であると考えられるあらゆる技法であることができる。好ましくは、分娩技法は、非誘導性（non-induced）経膈分娩、帝王切開、および薬物誘導性分娩の1つを含む。好ましい態様において、1人の乳児が分娩される。しかし、1人より多くの乳児が分娩されることも想定される。好ましくは、乳児は、分娩後に外観上健康である。

50

【0035】

本発明の方法によれば、雌性対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰、特に産後HELLP症候群、産後妊娠高血圧腎症、および/または産後子癇を発現するリスク、従って、前記対象が前記の有害な転帰を患うリスクが、予測されるであり得る。好ましくは、前記の有害な転帰が出産の直後に発現するかどうかは予測される。前記の有害な転帰、特に産後HELLP症候群、産後妊娠高血圧腎症、および/または産後子癇と関連する用語“出産の直後”は、当業者には十分に理解されている。好ましくは、リスクは、少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を、出産後2週間以内、より好ましくは7日以内、さらにもっと好ましくは72時間以内、または最も好ましくは48時間以内に発現すると予測される。好ましくは、対象は、第2試料が得られる時点では、少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰、特に産後HELLP症候群、産後妊娠高血圧腎症、および/または産後子癇を患っていない。

10

【0036】

本明細書で用いられる用語“リスクを予測すること”は、好ましくは、少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰が出産後に対象において発現するか否かの可能性を評価することを指す。より好ましくは、出産後の特定の時間ウインドウの範囲内で少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現する(従ってそれを患う)リスク/可能性が、予測される。上記で述べられたように、予測ウインドウは、好ましくは、出産後2週間、7日間、72時間、48時間の間隔、またはあらゆる断続する時間範囲である。本発明の特定の好ましい態様において、予測ウインドウは、好ましくは、48時間の間隔である。好ましくは、前記の予測ウインドウは、出産から計算される。やはり好ましくは、前記の予測ウインドウは、第2試料が得られた時点から計算される。

20

【0037】

当業者には理解されるように、そのような予測は、通常は対象の100%に関して正確であることは意図されない。しかし、その用語は、予測が統計的に有意な部分の対象に関して適切で正確な方法でなされることができるとを要求する。ある部分が統計的に有意であるかどうかは、当業者により、様々な周知の統計学的評価ツール、例えば信頼区間の決定、p-値の決定、スチューデントのt-検定、マン-ホイットニー検定等を用いて、さらなる労苦なしに決定されることができ。詳細は、Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983において見付けられる。好ましい信頼区間は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。p-値は、好ましくは0.1、0.05、0.01、0.005、または0.0001である。好ましくは、本発明により予想される可能性は、増大した、通常の、または低下したリスクの予測が、所与のコホートまたは集団の対象の少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%に関して正確であることを可能にする。その用語は、好ましくは、対象が、出産の直後の雌性対象の集団における出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現する平均的なリスクと比較して高められたリスクまたは低減したリスクがあるかどうかを予測することに関する。

30

【0038】

本明細書で用いられる用語“出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測すること”は、本発明の方法により分析されるべき対象が、前記の少なくとも1種類の有害な転帰を発現するリスクがある対象の群中、または少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない対象の群中のどちらかに振り分けられることを意味する。本発明に従って言及される前記の少なくとも1種類の有害な転帰を発現するリスクは、好ましくは、前記の少なくとも1種類の有害な転帰を発現するリスクが(予測ウインドウの範囲内で)高められていることを意味する。好ましくは、前記のリスクは、出産の直後の雌性対象のコホート(すなわちそのような対象の群)における平均的なリスクと比較して、高められている。対象が、本発明に従って言及される前記の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない場合

40

50

、好ましくは、前記の有害な転帰を発現するリスクは、（予測ウインドウの範囲内で）低減している。好ましくは、前記のリスクは、出産の直後の雌性対象のコホートにおける平均的なリスクと比較して低減している。前記の少なくとも1種類の有害な転帰を発現するリスクがある対象は、好ましくは、出産の直後に前記の少なくとも1種類の有害な転帰を発現する80%以上、またはより好ましくは60%以上のリスクを有する。妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない対象は、好ましくは、出産の直後に前記の少なくとも1種類の有害な転帰を発現する20%以下、より好ましくは10%以下、またはより好ましくは5%以下のリスクを有する。

【0039】

本発明によれば、リスクの予測が提供されることができる。本明細書で用いられる用語“予測を提供すること”は、患者の試料における第1および第2比に関して生成された情報またはデータを、対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するために用いることを指す。情報またはデータは、あらゆる形態（書面、口述または電子的形態）であることができる。ある態様において、生成された情報またはデータの使用は、伝達、提示、報告、記憶、発信、移動、供給、送信、分配、またはそれらの組み合わせを含む。ある態様において、伝達、提示、報告、記憶、発信、移動、供給、送信、分配、またはそれらの組み合わせは、コンピューティングデバイス、分析ユニットまたはそれらの組み合わせにより実施される。あるさらなる態様において、伝達、提示、報告、記憶、発信、移動、供給、送信、分配、またはそれらの組み合わせは、実験室または医学の専門家により実施される。

10

20

【0040】

用語“試料”は、体液の試料、分離された細胞の試料、または組織もしくは臓器からの試料を指す。体液の試料は、周知の技法により得られることができ、血液、血漿、血清、尿、リンパ液、痰、腹水、もしくはあらゆる他の体分泌物、またはそれらの派生物を含む。組織または臓器の試料は、あらゆる組織または臓器から、例えば生検により得られることができる。分離された細胞は、体液または組織もしくは臓器から、遠心または細胞選別のような分離技法により得られることができる。例えば、細胞試料、組織試料または臓器試料は、バイオマーカーを発現または産生している細胞、組織または臓器から得られることができる。試料は、凍結されたもの、新鮮なもの、固定されたもの（例えばホルマリン固定されたもの）、遠心分離されたもの、および/または包埋されたもの（例えばパラフィン包埋されたもの）等であることができる。細胞試料は、当然、試料中のマーカーのレベルを評価する前に、様々な周知の採取後の調製および保管技法（例えば核酸および/またはタンパク質抽出、固定、貯蔵、凍結、限外濾過、濃縮、蒸発、遠心分離等）を施されることができる。同様に、生検試料も、採取後の調製および保管技法、例えば固定を施されることができる。

30

【0041】

一態様において、試料は、血液、血漿、または特に血清試料である。好ましくは、試料は、雌性対象由来の静脈血、静脈血清または静脈血漿試料である。やはり好ましくは、試料は尿試料である。

【0042】

本発明によれば、雌性対象からの第1および第2試料において、本明細書で言及されるバイオマーカーのレベルを測定することが予想される。第1試料は、雌性対象から出産前、特に出産の直前に得られたものであり得る。従って、第1試料は、好ましくは、出産前2週間または1週間以内、より好ましくは3日以内、さらにもっと好ましくは48時間以内、または最も好ましくは24時間以内に得られたものである。さらに、第1試料を出産前12時間以内に得ることが想定される。

40

【0043】

“第2試料”は、好ましくは、第1試料における第2比の第1比と比較した変化を反映するために得られる試料として理解される。第2試料は、第1試料の後に得られ得る。特に、第2試料は、出産後に得られ得る。好ましくは、第2試料は、出産後72時間以内ま

50

たは48時間以内、より好ましくは出産後24時間以内、さらにもっと好ましくは出産後16時間以内、最も好ましくは12時間以内に得られたものである。

【0044】

好ましくは、第2試料は、(リスク予測を可能にするために十分に有意な変化を観察するために)第1試料後に早過ぎずに得られる。従って、“第2試料”は、好ましくは第1試料の10時間後より早くなく、より好ましくは8時間後より早くなく、または最も好ましくは6時間後より早くなく得られる。従って、第1および第2試料を得る間に、好ましくは少なくとも10時間、より好ましくは少なくとも8時間、最も好ましくは少なくとも6時間の間隔があるべきである。

【0045】

やはり好ましくは、第1試料は出産の3時間前より早くなく得られ、第2試料は出産の3時間後より早くなく得られることが、想定される。また、第1試料は、出産の5時間前より早くなく得られることができ、第2試料は、出産の5時間後より早くなく得られることができる。

【0046】

出生と関連する用語“出産”は、当業者には十分に理解されている。それは、1以上の新生児の女性の子宮からの娩出による妊娠の期間の集大成である。本明細書で用いられる際、表現“出産”は、好ましくは乳児の誕生を指す。より好ましくは、出産は、胎児が対象の子宮から娩出される時点である。最も好ましくは、出産は、乳児が呼吸を開始する時点である。出産が、胎盤が排出される時点であることも、想定されている。

【0047】

本発明の一態様において、出生の間に母体または胎児の合併症は存在しない。

第1および第2試料は、同じ種類の試料であることは、理解されるべきである。例えば、第1試料が血清試料である場合、第2試料も血清試料である。

【0048】

本明細書で言及されるマーカーのレベルを“測定すること”という用語は、例えば試料中のバイオマーカーのレベルを決定するための、本明細書で他の箇所で記載される適切な検出の方法を用いたバイオマーカーの定量化、例えばバイオマーカーのレベルの決定を指す。

【0049】

一態様において、少なくとも1種類のバイオマーカーのレベルは、試料をそれぞれのマーカーに特異的に結合する検出剤と接触させ、それにより薬剤および前記のマーカーの複合体を形成し、形成された複合体のレベルを検出し、そしてそれにより前記のマーカーのレベルを測定することにより、測定される。

【0050】

本明細書で言及されるバイオマーカーは、当該技術で一般的に知られている方法を用いて検出されることができる。検出の方法は、一般に試料中のバイオマーカーのレベルを定量化するための方法(定量法)を包含する。以下の方法のどれがバイオマーカーの定性的および/または定量的検出に適しているかは、当業者に一般的に知られている。試料は、例えばタンパク質に関してウェスタンおよび免疫アッセイ、例えばELISA、RIA、蛍光ベースの免疫アッセイを用いて好都合にアッセイされることができ、それは商業的に入手可能である。バイオマーカーを検出するためのさらなる適切な方法は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な物理的または化学的特性、例えばその正確な分子量またはNMRスペクトルを測定することを含む。前記の方法は、例えば、バイオセンサー、免疫アッセイと組み合わせられた光学デバイス、バイオチップ、分析デバイス、例えば質量分析計、NMR分析器、またはクロマトグラフィー装置を含む。さらに、方法は、マイクロプレートELISAベースの方法、完全自動化またはロボット免疫アッセイ(例えばElysia(商標)分析器上で利用可能)、CBA(酵素コバルト結合アッセイ、例えばRoche-Hitachi(商標)分析器上で利用可能)、およびラテックス凝集アッセイ(例えばRoche-Hitachi(商標)分析器上で利用可能)を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

本明細書で言及されるバイオマーカータンパク質の検出に関して、そのようなアッセイ形式を用いる広い範囲の免疫アッセイ技法が利用可能であり、例えば、米国特許第 4, 016, 043号、第 4, 424, 279号および第 4, 018, 653号を参照。これらは、非競合型の、ならびに伝統的な競合結合アッセイにおける、単一サイトおよび2サイトまたは“サンドイッチ”アッセイの両方を含む。これらのアッセイは、標識された抗体の標的バイオマーカーへの直接結合も含む。

【 0 0 5 2 】

サンドイッチアッセイは、最も有用であり一般的に用いられる免疫アッセイの中の1つである。

電気化学発光現象を測定するための方法は、周知である。そのような方法は、特別な金属錯体の、酸化により励起状態を達成し、それからそれらが減衰して基底状態になり、電気化学発光を放射する能力を利用する。総説に関して、Richter, M.M., Chem. Rev. 104 (2004) 3003-3036を参照。

【 0 0 5 3 】

バイオマーカーは、磁気共鳴分光法（NMR分光法）、ガスクロマトグラフィー - 質量分析（GC - MS）、液体クロマトグラフィー - 質量分析（LC - MS）、高およびウルトラ - HPLC HPLC、例えば逆相HPLC、例えば二重紫外波長検出を用いるイオン対HPLC、レーザー誘起蛍光検出を用いるキャピラリー電気泳動、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび蛍光検出、薄層クロマトグラフィーを含む、一般的に知られている方法により検出されることもできる。

【 0 0 5 4 】

好ましくは、本明細書で言及されるバイオマーカーのレベルの測定は、以下の工程を含む：（a）その強度がペプチドまたはポリペプチドのレベルを示す細胞応答を引き出すことができる細胞を、前記のペプチドまたはポリペプチドと、十分な期間の間接触させ、（b）細胞応答を測定する。細胞応答を測定するため、試料または処理された試料は、好ましくは細胞培養物に添加され、内部または外部の細胞応答が、測定される。細胞応答は、レポーター遺伝子の測定可能な発現、または物質、例えばペプチド、ポリペプチド、もしくは小分子の分泌を含むことができる。発現または物質は、ペプチドまたはポリペプチドのレベルに相関する強度信号を生成し得る。

【 0 0 5 5 】

やはり好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドのレベルの測定は、試料中のペプチドまたはポリペプチドから得ることができる特異的な強度信号を測定する工程を含む。上記のように、そのような信号は、質量スペクトルにおいて観察されるペプチドまたはポリペプチドに特異的な m/z 変数またはペプチドまたはポリペプチドに特異的なNMRスペクトルにおいて観察される信号強度であり得る。

【 0 0 5 6 】

ペプチドまたはポリペプチドのレベルの測定は、好ましくは以下の工程を含むことができる：（a）ペプチドを特異的な結合剤と接触させ、（b）（場合により）結合していない結合剤を除去し、（c）結合した結合剤、すなわち工程（a）で形成された結合剤の複合体のレベルを測定する。好ましい態様によれば、前記の接触、除去および測定の工程は、本明細書で開示されるシステムの分析ユニットにより実施されることができる。ある態様によれば、前記の工程は、前記のシステムの単一の分析ユニットにより、または互いと作動可能に連絡している1個より多くの分析ユニットにより実施されることができる。例えば、特定の態様によれば、本明細書で開示される前記のシステムは、前記の接触および除去の工程を実施するための第1分析ユニット、ならびに、前記の第1分析ユニットに輸送ユニット（例えばロボットアーム）により作動可能に連結された、前記の測定の工程を実施する第2分析ユニットを含むことができる。

【 0 0 5 7 】

結合した結合剤、すなわち結合剤または結合剤 / ペプチド複合体は、強度信号を生成す

10

20

30

40

50

ることができる。本発明における結合は、共有結合および非共有結合の両方を含む。本発明における結合剤は、本明細書に記載されるペプチドまたはポリペプチドに結合するあらゆる化合物、例えばペプチド、ポリペプチド、核酸、または小分子であることができる。好ましい結合剤は、抗体、核酸、ペプチドもしくはポリペプチド、例えば受容体、またはペプチドもしくはポリペプチドに関する結合パートナー、およびペプチドに関する結合ドメインを含むその断片、ならびにアプタマー、例えば核酸またはペプチドアプタマーを含む。そのような結合剤を調製するための方法は、当該技術で周知である。例えば、適切な抗体またはアプタマーの同定および製造も、商業的な供給業者により提供される。当業者は、より高い親和性または特異性を有するそのような結合剤の誘導体を開発するための方法に精通している。例えば、ランダム変異誘発が、核酸、ペプチドまたはポリペプチド中に導入されることができる。次いで、これらの誘導体は、当該技術で既知のスクリーニング手順、例えばファージディスプレイに従って、結合に関して試験されることができる。本明細書で言及されたような抗体は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方、ならびに抗原またはハプテンに結合することができるその断片、例えばFv、FabおよびF(ab)₂断片を含む。本発明は、単鎖抗体および所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列がヒトアクセプター抗体の配列と組み合わせられているヒト化ハイブリッド抗体も含む。ドナー配列は、通常は少なくともドナーの抗原結合アミノ酸残基を含み得るが、ドナー抗体の他の構造的および/または機能的に関連するアミノ酸残基も含むことができる。そのようなハイブリッドは、当該技術で周知のいくつかの方法により調製されることができる。好ましくは、結合剤（単数または複数）は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する。本発明における特異的結合は、リガンドまたは薬剤が、分析されるべき試料中に存在する別のペプチド、ポリペプチドまたは物質に実質的に結合（それと“交差反応”）するべきでないことを意味する。好ましくは、特異的に結合するペプチドまたはポリペプチドは、あらゆる他の関連するペプチドまたはポリペプチドよりも少なくとも3倍高い、より好ましくは少なくとも10倍高い、さらにもっと好ましくは少なくとも50倍高い親和性で結合するべきである。非特異的結合は、それが、例えばウェスタンブロットにおけるその大きさに従って、または試料中でのその比較的高い存在度により、なお疑いの余地なく識別および測定され得る場合、許容可能であり得る。結合剤の結合は、当該技術で既知のあらゆる方法により測定されることができる。好ましくは、前記の方法は、半定量的または定量的である。ポリペプチドまたはペプチドの決定のためのさらなる適切な技法が、以下に記載される。

【0058】

結合剤の結合は、直接的に、例えばNMRまたは表面プラズモン共鳴により測定されることができる。結合剤の結合の測定は、好ましい態様によれば、本明細書で開示されるシステムの分析ユニットにより実施される。その後、測定された結合のレベルが、本明細書で開示されるシステムのコンピューティングデバイスにより計算されることができる。結合剤が、対象のペプチドまたはポリペプチドの酵素活性の基質の役目も果たす場合、酵素反応産物が測定される得る（例えば、プロテアーゼのレベルは、開裂した基質のレベルを、例えばウェスタンブロットで測定することにより測定され得る）。あるいは、結合剤は、それ自体が酵素特性を示してもよく、“結合剤/ペプチドまたはポリペプチド”複合体またはペプチドもしくはポリペプチドにより結合された結合剤は、それぞれ強度信号の生成による検出を可能にする適切な基質と接触することができる。酵素反応産物の測定に関して、好ましくは基質のレベルは飽和している。基質は、反応前に検出可能な標識で標識されることもできる。好ましくは、試料は、適切な期間基質と接触する。適切な期間は、検出可能な、好ましくは測定可能なレベルの生成物が生成されるのに必要な時間を指す。生成物のレベルを測定する代わりに、所与の（例えば検出可能な）レベルの生成物の出現に必要な時間が、測定されることができる。第3に、結合剤は、結合剤の検出および測定を可能にする標識に、共有結合的にまたは非共有結合的に連結されることができる。標識化は、直接法または間接法により行われることができる。直接標識化は、標識を結合剤に直接（共有結合的にまたは非共有結合的に）連結することを含む。間接標識化は、二次結

合剤を一次結合剤に（共有結合的にまたは非共有結合的に）結合させることを含む。二次結合剤は、一次結合剤に特異的に結合すべきである。前記の二次結合剤は、適切な標識と連結されることができ、および/または二次結合剤に結合する三次結合剤の標的（受容体）であることもできる。二次、三次またはさらに高次の結合剤の使用は、しばしば信号を増大させるために用いられる。適切な二次およびより高次の結合剤は、抗体、二次抗体、および周知のストレプトアビジン - ビオチン系（Vector Laboratories, Inc.）を含むことができる。結合剤または基質は、当該技術で既知であるような1種類以上のタグで“タグ付け”されることができ、次いで、そのようなタグは、より高次の結合剤に関する標的であることができる。適切なタグは、ビオチン、ジゴキシゲニン、His - タグ、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、myc - タグ、インフルエンザウイルス - ヘマグルチニン（HA）、マルトース結合タンパク質等を含む。ペプチドまたはポリペプチドの場合、タグは、好ましくはN末端および/またはC末端にある。適切な標識は、適切な検出法により検出可能なあらゆる標識である。典型的な標識は、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダン（acridan）エステル、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射性標識、磁性標識（例えば、“磁性ビーズ”、常磁性および超常磁性標識を含む）、および蛍光標識を含む。酵素活性標識は、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびその誘導体を含む。検出のための適切な基質は、ジ - アミノ - ベンジジン（DAB）、3,3' - 5,5' - テトラメチルベンジジン、NBT - BCIP（4 - ニトロブルー - テトラゾリウムクロリドおよび5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - ホスフェート、既製のストック溶液としてRoche Diagnosticsから入手可能）、CDP - Star（商標）（Amersham Biosciences）、ECF（商標）（Amersham Biosciences）を含む。適切な酵素 - 基質の組み合わせは、結果として有色反応生成物、蛍光または化学発光を生じることができ、それは、当該技術で既知の方法に従って（例えば、感光性フィルムまたは適切なカメラシステムを用いて）測定されることができ、それは、当該技術で既知の方法に従って（例えば、感光性フィルムまたは適切なカメラシステムを用いて）測定されることができ、酵素反応の測定に関して、上記で示した基準が同様に当てはまる。典型的な蛍光標識は、蛍光タンパク質（例えばGFPおよびその誘導体）、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセイン、およびAlexa色素（例えばAlexa 568）を含む。さらなる蛍光標識が、例えばMolecular Probes（オレゴン）から入手可能である。蛍光標識としての量子ドットの使用も、意図されている。放射性標識は、あらゆる既知の適切な方法、例えば感光性フィルムまたはphosphor imagerにより検出されることができ、

【0059】

ペプチドまたはポリペプチドのレベルは、好ましくは以下のように決定されることができ、（a）上記で明記されたペプチドまたはポリペプチドに関する結合剤を含む固体支持体を、そのペプチドまたはポリペプチドを含む試料と接触させ、そして（c）支持体に結合しているペプチドまたはポリペプチドのレベルを測定する。結合剤は、好ましくは核酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体およびアプタマーからなる群から選択され、好ましくは固体支持体上に固定化された形態で存在する。固体支持体を製造するための材料は、当該技術分野で周知であり、特に、商業的に入手可能なカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンのチップおよび表面、ニトロセルロースのストリップ、膜、シート、duracytes、反応トレーのウェルおよび壁、プラスチックチューブ等を含む。結合剤または薬剤は、多くの異なるキャリアーに結合させることができる。周知のキャリアーの例は、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース類、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド類、アガロース類、および磁鉄鉱を含む。キャリアーの性質は、本発明の目的に関して、可溶性または不溶性のどちらであることもできる。前記の結合剤を固定/固定化するための適切な方法は、周知であり、イオン性、疎水性、共有結合性相互作用等を含むが、それらに限定されない。本発明におけるアレイとして“懸濁アレイ”を用いることも、意図されてい

る(Nolan 2002, Trends Biotechnol.20(1): 9-12)。そのような懸濁アレイ中に、キャリア、例えばマクイロビーズまたはマイクロスフェアが、懸濁状態で存在する。アレイは、おそらく標識された状態で異なる結合剤を担持する異なるマクイロビーズまたはマイクロスフェアからなる。例えば固相化学および光不安定保護基に基づいてそのようなアレイを製造する方法が、一般に知られている(米国特許第5,744,305号)。

【0060】

本発明の一態様において、本明細書で言及されるバイオマーカのレベルは、実施例の節において記載されるアッセイを用いることにより測定される。

本発明の方法の別の態様において、工程 a) における(または工程 a) および c) における)測定は、分析ユニットにより、特に本明細書の他の箇所定義される分析ユニットにより実施されることができる。

【0061】

用語“結合剤”は、それぞれのバイオマーカに対応するものに特異的に結合する結合部分を含む分子を指す。“結合剤”の例は、アプタマー、抗体、抗体断片、ペプチド、ペプチド核酸(PNA)または化合物である。

【0062】

用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、結合対分子が、それらが他の分子に著しく結合しない条件下で互いへの結合を示す結合反応を指す。用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、バイオマーカとしてのタンパク質またはペプチドを指す場合、結合剤が対応するバイオマーカに少なくとも 10^{-7} Mの親和性で結合する結合反応を指す。用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、好ましくは、その標的分子に関する少なくとも 10^{-8} Mの、またはさらにもっと好ましくは少なくとも 10^{-9} Mの親和性を指す。用語“特異的”または“特異的に”は、試料中に存在する他の分子がその標的分子に特異的な結合剤に著しくは結合しないことを示すために用いられている。好ましくは、標的分子以外の分子への結合のレベルは、結果として標的分子に対する親和性の10%以下でしかない、より好ましくは5%以下でしかない結合親和性をもたらす。

【0063】

“結合剤”または“薬剤”の例は、核酸プローブ、核酸プライマー、DNA分子、RNA分子、アプタマー、抗体、抗体断片、ペプチド、ペプチド核酸(PNA)または化合物である。好ましい薬剤は、測定されるべきバイオマーカに特異的に結合する抗体である。本明細書における用語“抗体”は、最も広い意味で用いられており、様々な抗体構造を包含し、それはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、および抗体断片を、それらが所望の抗原結合活性を示す限り含むが、それらに限定されない。好ましくは、抗体は、ポリクローナル抗体である。より好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0064】

一側面において適用されることができる別の結合剤は、試料中の少なくとも1種類のマーカに特異的に結合するアプタマーであることができる。用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、結合剤としての核酸アプタマーに言及する場合、核酸アプタマーが対応する標的分子に低nM~pMの範囲の親和性で結合する結合反応を指す。

【0065】

さらなる側面において、試料は、結合剤および少なくとも1種類のマーカの間で形成された複合体から、形成された複合体のレベルの測定の前に除去される。従って、一側面において、結合剤は、固体支持体上に固定化されることができる。さらなる側面において、試料は、固体支持体上の形成された複合体から、洗浄溶液を適用することにより除去されることができる。形成された複合体は、試料中に存在する少なくとも1種類のマーカのレベルに比例する。適用されるべき結合剤の特異性および/または感度が、特異的に結合されることができる試料中に含まれる少なくとも1種類のマーカの比例の程度を定めることは、理解され得る。どのように決定が実施され得るかに関するさらなる詳細は、本

10

20

30

40

50

明細書の他の箇所にもある。形成された複合体のレベルは、実際に試料中に存在するレベルを反映する少なくとも1種類のマーカーのレベルに変換され得る。そのようなレベルは、一側面において、本質的に試料中に存在するレベルであることができ、または、別の側面において、形成された複合体および元の試料中に存在するレベルの間の関係によるその特定の割合であるレベルでもあり得る。

【0066】

本明細書で用いられる用語“sFlt-1”は、fms様チロシンキナーゼ1の可溶性形態であるポリペプチドを指す。そのポリペプチドは、当該技術で可溶性VEGF受容体1(sVEGFR1)とも呼ばれる(例えばSunderji 2010, Am J Obstet Gynecol 202: 40e1-7を参照)。それは、ヒト臍帯静脈内皮細胞の調整培地中で同定された。内因性sFlt-1受容体は、クロマトグラフィー的および免疫学的に組換えヒトsFlt-1に類似し、[125I]VEGFに比較可能な高い親和性で結合する。ヒトsFlt-1は、インビトロでKDR/Flk-1の細胞外ドメインとVEGF安定化された複合体を形成することが示されている。好ましくは、sFlt-1は、Kendall 1996, Biochem Biophys Res Commun 226(2): 324-328において記載されているようなヒトsFlt-1を指す; アミノ酸配列に関して、例えばヒトsFlt-1に関してGenebank寄託番号P17948、GI:125361、マウスsFlt-1に関してGenebank寄託番号BAA24499.1、GI:2809071も参照。(Genebankは、NCBI(米国)から、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrezの下で入手できる)。その用語は、前記のヒトsFlt-1ポリペプチドのバリエーションも包含する。そのようなバリエーションは、前記のsFlt-1ポリペプチドと少なくとも同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を有する。特に、それらが、本明細書で言及される同じ特異的アッセイにより、例えば前記のsFlt-1ポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイにより検出可能である場合、それらは同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有している。さらに、本発明に従って言及されるバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加により異なるアミノ酸配列を有すると考えられ、ここで、そのバリエーションのアミノ酸配列はなお、好ましくは、それぞれその特定のsFlt-1ポリペプチドのアミノ酸配列と、好ましくはヒトsFlt-1の全長にわたって、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一であることは、理解されるべきである。2つのアミノ酸配列間の同一性の程度は、当該技術で周知のアルゴリズムにより決定されることができる。好ましくは、同一性の程度は、2つの最適に整列された配列を比較ウィンドウにわたって比較することにより決定されるべきであり、ここで、その比較ウィンドウ中のアミノ酸配列の断片は、最適なアラインメントのために、(付加または欠失を含まない)基準配列と比較して付加または欠失(例えば、ギャップまたはオーバーハング)を含むことができる。百分率は、両方の配列中に同一アミノ酸残基が存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得て、その一致した位置の数を比較のウィンドウ中の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることにより計算される。比較のための配列の最適なアラインメントは、下記により実施されることができる: Smith 1981, Add. APL. Math. 2:482により開示された局所的相同性アルゴリズム、Needleman 1970, J. Mol. Biol. 48:443の相同アラインメントアルゴリズム、Pearson 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444の類似性検索法(search for similarity method)、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実施(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、BLAST、FAST、PASTA、およびTFASTA、Genetics Computer Group(GCG)、575 Science Dr., Madison, WI)、または目視検査。比較のための2つの配列が同定されると、好ましくはGAPおよびBESTFITがそれらの最適なアラインメント、従って同一性の程度を決定するために用いられる。好ましくは、ギャップウェイトに関して5.00、ギャップウェイト長に関して0.30のデフォルト値が用いられる。上記で言及さ

10

20

30

40

50

れたバリエーションは、対立遺伝子バリエーション、またはあらゆる他の種特異的なホモログ、パラログ、もしくはオルソログであることができる。上記で言及されたバリエーションは、対立遺伝子バリエーション、またはあらゆる他の種特異的なホモログ、パラログ、もしくはオルソログであることができる。さらに、本明細書で言及されるバリエーションは、特定の s F l t - 1 ポリペプチドまたは前記のタイプのバリエーションの断片またはサブユニットを、これらの断片が上記で言及された本質的な免疫学的および生物学的特性を有する限り、含む。そのような断片は、例えば s F l t - 1 ポリペプチドの分解生成物であることができる。バリエーションは、それらが、本明細書で言及される同じ特異的アッセイにより、例えば前記の s F l t - 1 ポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いる E L I S A アッセイにより検出可能であれば、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有しているとみなされる。好ましいアッセイが、付随する実施例において記載されている。さらに、翻訳後修飾、例えばリン酸化またはミリスチル化により異なるバリエーションが、含まれる。s F l t - 1 は、試料において結合形態もしくは遊離形態で、または総 s F l t - 1 レベルとして検出され得る。

10

20

30

40

50

【0067】

本明細書で用いられる用語“エンドグリン”は、非還元状態で 180 k D a、還元後に 95 k D a、その還元された形態および N - 脱グリコシル化形態で 66 k D a の分子量を有するポリペプチドを指す。好ましくは、用語“エンドグリン”は、可溶性エンドグリンを指す。そのポリペプチドは、二量体を形成することができ、T G F - および T G F - 受容体に結合する。好ましくは、エンドグリンは、ヒト-エンドグリンを指す。より好ましくは、ヒト-エンドグリンは、Gene bank 寄託番号 A A C 6 3 3 8 6 . 1、G I : 3 2 0 1 4 8 9 において示されるアミノ酸配列を有する。2つのエンドグリンイソ型である S - エンドグリンおよび L - エンドグリンが、記載されている。L - エンドグリンは、47 アミノ酸の細胞質側尾部を有する合計 633 アミノ酸からなり、一方で S - エンドグリンは、14 アミノ酸の細胞質側尾部を備えた 600 アミノ酸からなる。好ましくは、本明細書で用いられるエンドグリンは、可溶性エンドグリンである。本明細書で言及される可溶性エンドグリンは、好ましくは欧州特許第 1 8 0 4 8 3 6 B 1 号に記載されている。さらに、本発明に従って言及されるバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加により異なるアミノ酸配列を有すると考えられ、ここで、そのバリエーションのアミノ酸配列はなお、好ましくは、その特定のエンドグリンのアミノ配列と、少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または 99% 同一であることは、理解されるべきである。バリエーションは、対立遺伝子バリエーション、スプライスバリエーションまたはあらゆる他の種特異的なホモログ、パラログもしくはオルソログであることができる。さらに、本明細書で言及されるバリエーションは、特定のエンドグリンまたは前記タイプのバリエーションの断片を、これらの断片が上記で言及された本質的な免疫学的および生物学的特性を有する限り、含む。そのような断片は、例えばエンドグリンの分解生成物であることができる。バリエーションは、それらが、本明細書で言及される同じ特異的アッセイにより、例えば前記のエンドグリンポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いる E L I S A アッセイにより検出可能であれば、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有しているとみなされる。好ましいアッセイが、付随する実施例において記載されている。さらに、翻訳後修飾、例えばリン酸化またはミリスチル化により異なるバリエーションが、含まれる。エンドグリンは、試料において結合形態もしくは遊離形態で、または総エンドグリンレベルとして検出され得る。

【0068】

本明細書で用いられる用語“P l G F (胎盤性増殖因子)”は、好ましくは胎盤由来の増殖因子を指し、それは、149 アミノ酸長を有しヒト血管内皮増殖因子 (V E G F) の血小板由来増殖因子様領域に対して高度に相同性であるポリペプチドである。V E G F と同様に、P l G F は、インビトロおよびインビボで血管新生活性を有する。例えば、トランスフェクションされた C O S - 1 細胞に由来する P l G F の生化学的および機能特性付

けは、それがインビトロで内皮細胞増殖を刺激することができるグリコシル化された二量体型の分泌タンパク質であることを明らかにした(Maqlione 1993, Oncogene 8(4):925-31)。好ましくは、P1GFは、ヒトP1GF、より好ましくはGeneBank寄託番号P49763、GI:17380553において示されているアミノ酸配列を有するヒトP1GFを指す。その用語は、前記の特定のヒトP1GFのバリエーションを包含する。そのようなバリエーションは、少なくともその特定のP1GFポリペプチドと同じ本質的な免疫学的および生物学的特性を有する。バリエーションは、それらが、本明細書で言及される同じ特異的アッセイにより、例えば前記のP1GFポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイにより検出可能であれば、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有するとみなされる。好ましいアッセイが、付随する実施例において記載されている。さらに、本発明に従って言及されるバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加により異なるアミノ酸配列を有すると考えられ、ここで、そのバリエーションのアミノ酸配列はなお、好ましくは、その特定のP1GFポリペプチドのアミノ酸配列と、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一であることは、理解されるべきである。2つのアミノ酸配列間の同一性の程度は、当該技術で周知であり、本明細書の他の箇所で記載されるアルゴリズムにより決定されることができる。上記で言及されたバリエーションは、対立遺伝子バリエーション、またはあらゆる他の種特異的なホモログ、パラログ、もしくはオルソログであることができる。さらに、本明細書で言及されるバリエーションは、特定のP1GFポリペプチドまたは前記のタイプのバリエーションの断片を、これらの断片が上記で言及されたような免疫学的および生物学的特性を有する限り、含む。そのような断片は、例えばP1GFポリペプチドの分解生成物またはスプライスバリエーションであることができる。さらに、翻訳後修飾、例えばリン酸化またはミリスチル化により異なるバリエーションが、含まれる。P1GFは、試料において結合形態もしくは遊離形態で、または総P1GFレベルとして検出され得る。

10

20

【0069】

本明細書において用いられる用語“レベル”は、本明細書で言及されたバイオマーカーの絶対量、前記のバイオマーカーの相対量または濃度、ならびにそれらに相関するかまたはそれらから得られることができるあらゆる値またはパラメーターを包含する。そのような値またはパラメーターは、前記のペプチドから直接測定により得られる全ての特異的な物理的または化学的特性からの強度信号値、例えば質量スペクトルまたはNMRスペクトルにおける強度値を含む。さらに、この記載中の他の箇所で明記される間接測定により得られる全ての値またはパラメーター、例えばペプチドに応答した生物学的読出し系から決定される応答量、または特異的に結合したりガンドから得られる強度信号が、包含される。前記の量またはパラメーターに相関する値は、全ての標準的な数学的操作により得られることもできることは、理解されるべきである。

30

【0070】

本明細書で用いられる用語“比較すること”は、対象からの第1試料中の本明細書で言及されたバイオマーカーのレベルの比(第1比)を、対象からの第2試料中の前記のバイオマーカーのレベルの比(第2比)と比較することを指す。本明細書で用いられる“比較すること”は、通常は対応するパラメーターまたは値の比較を指すことは、理解されるべきであり、例えば、絶対量は、絶対参照量に対して比較され、一方で、濃度は、参照濃度に対して比較され、または試料中のバイオマーカーから得られた強度信号は、参照試料から得られた同じタイプの強度信号に対して比較される。比較は、手作業で実施されることができ、またはコンピューターに支援されることもできる。従って、比較は、(例えば本明細書で開示されるシステムの)コンピューティングデバイスにより実施されることができる。対象からの第1試料中の(第1)比の値および第2試料中の(第2)比の値が、例えば、互いに比較されることができ、前記の比較は、比較のためのアルゴリズムを実行するコンピュータープログラムにより自動的に実施されることができる。前記の評価を実施するコンピュータープログラムは、適切な出力形式で所望の評価を提供することができる

40

50

。コンピューターに支援される比較に関して、第2試料における決定された比の値は、コンピュータープログラムによりデータベース中に記憶されている第1試料における比の値に対して比較されることができる。コンピュータープログラムはさらに、比較の結果を評価することができ、すなわち、自動的に適切な出力形式で所望の評価を提供することができる。コンピューターに支援される比較に関して、第2試料における決定された比の値は、コンピュータープログラムによりデータベース中に記憶されている第1試料における比の値に対して比較されることができる。コンピュータープログラムはさらに、比較の結果を評価することができ、すなわち、自動的に適切な出力形式で所望の評価を提供する。

【0071】

本明細書で言及される用語“第1比を計算すること”または“第2比を計算すること”は、sFlt-1またはエンドグリンのレベルおよびPLGFのレベルの比を、前記のレベルを割ることにより、またはsFlt-1もしくはエンドグリンのレベルをPLGFのレベルに対して関係付ける(puts into a relation)あらゆる他の比較可能な数学的計算を実施することにより、計算することに関する。好ましくは、sFlt-1またはエンドグリンのレベルは、比を計算するために、PLGFのレベルにより割られる(従って、sFlt-1またはエンドグリンのレベルのPLGFのレベルに対する比が計算される)。やはり好ましくは、PLGFのレベルは、比を計算するために、sFlt-1またはエンドグリンのレベルにより割られる(従って、PLGFのレベルのsFlt-1またはエンドグリンのレベルに対する比が計算される)。計算は、前記の第1および前記の第2試料において決定されたそれぞれのレベルに関して別々に実施され、第1および第2比をそれぞれもたらす。計算は、同時に、または別の時点で実施されることができる。

10

20

【0072】

方法は、第2比の第1比に対する比較を含み、好ましくは以下が適用される：

一態様において、第1および第2比は、sFlt-1のPLGFに対する、またはエンドグリンのPLGFに対する比である。好ましくは、第1比と比較した第2比の増大(または本質的に変化していない第2比)は、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある対象を示しており、および/または第1比と比較した第2比の低下は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのない対象を示している。やはり好ましくは、第2比が第1比と比較して増大している場合、または第2比が第1比と本質的に同じである場合、対象は、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがあり、一方で、第2比が第1比と比較して低下している場合、対象は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない。

30

【0073】

別の態様において、第1および第2比は、PLGFのsFlt-1に対する、またはPLGFのエンドグリンに対する比である。好ましくは、第1比と比較した第2比の低下(または本質的に変化していない第2比)は、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある対象を示しており、および/または第1比と比較した第2比の増大は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのない対象を示している。やはり好ましくは、第2比が第1比と比較して低下している場合、または第2比が第1比と本質的に同じである場合、対象は、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがあり、一方で、第2比が第1比と比較して増大している場合、対象は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない。

40

【0074】

用語“本質的に変化していない”は、当該技術で周知であり、診断の領域において経験を積んだ当業者には理解されている。その用語は、第2比の第1比と比較した軽微な変化、例えば3または7%未満の変化を指す。一態様において、その用語は、変化していない比を指す。

50

【 0 0 7 5 】

第 2 比を第 1 比に対して比較する工程 e) が、第 2 比の第 1 比に対する比を計算する (または逆もまた同様) ことにより実施される場合、好ましくは以下が適用される :

第 1 および第 2 比が、s F l t - 1 の P l G F に対する、またはエンドグリンの P l G F に対する比である場合、以下が適用される : 好ましくは、1 以上である比は、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがある対象を示しており、一方で 1 未満である比は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない対象を示している。

【 0 0 7 6 】

第 1 および第 2 比が、P l G F の s F l t - 1 に対する、または P l G F のエンドグリンに対する比である場合、以下が適用される : 好ましくは、1 以下である比は、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがある対象を示しており、一方で 1 より大きい比は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない対象を示している。

10

【 0 0 7 7 】

本発明によれば、用語“増大”および“低下”は、好ましくは、それぞれ統計的に有意な増大および低下を指す。特に、統計的に有意な増大 (または低下) は、リスク予測に関して統計的に有意であると考えられる大きさの増大 (または低下) である。用語“有意な”および“統計的に有意な”は、当業者には既知である。増大または低下が統計的に有意であるかどうかは、当業者により、本明細書で言及されるツールを含む様々な周知の統計評価ツールを用いて、さらなる労苦なしに決定されることができる。

20

【 0 0 7 8 】

出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがある対象を示していることが本発明の過程において分かっている、第 1 試料における s F l t - 1 またはエンドグリンの P l G F に対する第 1 比と比較した第 2 試料における s F l t - 1 またはエンドグリンの P l G F に対する第 2 比の好ましい増大は、好ましくは、少なくとも 3 %、より好ましくは少なくとも 1 0 %、さらにもっと好ましくは少なくとも 2 0 %、最も好ましくは少なくとも 3 0 % の増大である。

【 0 0 7 9 】

出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがない対象を示していることが本発明の過程において分かっている、第 1 試料における s F l t - 1 またはエンドグリンの P l G F に対する第 1 比と比較した第 2 試料における s F l t - 1 またはエンドグリンの P l G F に対する第 2 比の好ましい低下は、少なくとも 1 0 %、より好ましくは少なくとも 2 0 %、さらにもっと好ましくは少なくとも 3 0 %、最も好ましくは少なくとも 4 0 % の低下である。

30

【 0 0 8 0 】

上記および下記でなされた用語の定義および説明は、本明細書および添付の特許請求の範囲において記載される全ての態様に適宜適用されることは、理解されるべきである。

本発明は、さらに、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある対象および出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのない対象を識別するための方法に関し、前記の方法は、以下の工程を含む :

40

a) 平穩無事な妊娠をしている雌性対象から出産前に得られた第 1 試料において、以下 :

i) バイオマーカー s F l t - 1 (可溶性 f s m 様チロシンキナーゼ - 1) のレベルまたはバイオマーカーエンドグリンのレベル、および

i i) バイオマーカー P l G F (胎盤増殖因子) のレベルを測定し、

b) 工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルの第 1 比を計算し、

c) 前記の雌性対象から出産後に得られた第 2 試料において、工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルを測定し、

50

- d) 工程 c) において測定されたレベルの第 2 比を計算し、そして
e) 第 2 比を第 1 比に対して比較する。

【0081】

一態様において、第 2 比を第 1 比に対して比較する工程 e) は、第 2 比の第 1 比に対する比（または逆もまた同様）を計算することにより実施される。

本発明は、さらに、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある対象を同定するための方法に関し、前記の方法は、以下の工程を含む：

- a) 平穩無事な妊娠をしている雌性対象から出産前に得られた第 1 試料において、以下

10

i) バイオマーカー sFlt-1 (可溶性 fms 様チロシンキナーゼ-1) のレベルまたはバイオマーカーエンドグリンのレベル、および

ii) バイオマーカー PlGF (胎盤増殖因子) のレベルを測定し、

- b) 工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルの第 1 比を計算し、

c) 前記の雌性対象から出産後に得られた第 2 試料において、工程 a) において測定されたバイオマーカーのレベルを測定し、

- d) 工程 c) において測定されたレベルの第 2 比を計算し、そして

- e) 第 2 比を第 1 比に対して比較する。

【0082】

20

一態様において、第 2 比を第 1 比に対して比較する工程 e) は、第 2 比の第 1 比に対する比（または逆もまた同様）を計算することにより実施される。

本発明の方法の好ましい態様において、前記の方法は、さらに、対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがあることが予測された場合（または対象が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがあることが同定された場合）、少なくとも 1 種類の適切な支持的手段を推奨および/または開始する工程を含む。

【0083】

上記で論じられたように、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を患っている対象は、特定の医療を必要とする。従って、対象が、出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現する、特に産後妊娠高血圧腎症、産後子癇および/または産後 HELLP 症候群を発現するリスクがあることが同定された場合、そのような評価は、対象に関する適切な支持的手段を予め、すなわち出産後の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰が臨床的に明らかになる前に確立することを助けることができる。好ましくは、前記の少なくとも 1 種類の適切な支持的手段は、以下：（特に産後 HELLP 症候群、産後妊娠高血圧腎症、または産後子癇の臨床症状に関する）密接なモニタリング、集中治療室に入れる許可、コルチコステロイド類の投与、硫酸マグネシウムの投与許可 (admission)、および血圧低下剤の投与、および母体の有害な転帰に応じた他の特定の手段 (Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A review. BMC Pregnancy and Childbirth 2009;9 (8). <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2393-9-8>またはDGGG. S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen der Deutschen Gesellschaft fuer Gynaekologie und Geburtshilfe、上記の引用参照) からなる群から選択される。

30

40

【0084】

従って、本発明はさらに、出産後の雌性対象において少なくとも 1 種類の適切な支持的手段を開始する方法に関し；前記の方法は、本発明の前記の方法の工程、患者が出産後に少なくとも 1 種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがあることを同定するさらなる工程、および上記で概説された少なくとも 1 種類の適切な支持的手段を開始するさらなる工程を含む。

50

【0085】

対象がリスクがない場合、対象は、前記の少なくとも1種類の支持的手段から除外されることができる。

本発明は、さらに、以下：

- ・バイオマーカー s F l t - 1 (またはエンドグリン) および P l G F、または
- ・ s F l t - 1 に (特異的に) 結合する薬剤 (またはエンドグリンに (特異的に) 結合する薬剤) および P l G F に (特異的に) 結合する薬剤

の、平穩無事な妊娠をしている雌性対象から出産前に得られた第1試料における、および前記の雌性対象から出産後に得られた第2試料における、雌性対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するための (インビトロでの) 使用に関する。

10

【0086】

本発明は、さらに、以下：

・バイオマーカー s F l t - 1 (またはエンドグリン) および P l G F、および/または

・ s F l t - 1 に (特異的に) 結合する薬剤 (またはエンドグリンに (特異的に) 結合する薬剤) および P l G F に (特異的に) 結合する薬剤

の、特に平穩無事な妊娠をしている雌性対象から出産前に得られた第1試料において、および前記の雌性対象から出産後に得られた第2試料において雌性対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するための診断薬の製造のための (インビトロでの) 使用に関する。

20

【0087】

好ましくは、バイオマーカーまたは薬剤は、前記の方法で示されたように用いられる。

好ましくは、(本明細書の他の箇所で記載された) s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の第1および第2比は、第1および第2試料に関して計算されると考えられ、比は比較されると考えられ、特にここで、第2比の第1比と比較した増大 (または本質的に変化していない比) は、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのある対象を示しており、および/またはここで、第2比の第1比と比較した低下は、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクのない対象を示している。

30

【0088】

好ましくは、薬剤は、検出剤である。一態様において、薬剤は、抗体、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

好ましい診断アルゴリズムは、本明細書において上記で開示されている。

【0089】

好ましくは、薬剤は、検出剤である。一態様において、薬剤は、抗体、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

本発明は、さらに、雌性対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを、特に前記の方法を実施することにより予測するために適合したデバイスに関し、前記のデバイスは、以下：

40

a) s F l t - 1 および/またはエンドグリンに特異的に結合する薬剤ならびに P l G F に特異的に結合する薬剤を含む分析ユニット、前記のユニットは、出産前に得られた雌性対象の第1試料および出産後に得られた前記の雌性対象の第2試料中の s F l t - 1 および/またはエンドグリンのレベルならびに P l G F のレベルの測定に適合している；ならびに

b) 以下の工程：

i) 第1試料において決定された s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の前記のレベルからの第1比および第2試料において決定された s F l t - 1 またはエンドグリンおよび P l G F の前記のレベルからの第2比を計算し；そして

i i) 前記の第1および前記の第2比の値を比較し、そして場合により

50

i i i) 前記の対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測する；

を実施し、特にそれにより、対象は、第2比の値が第1比の値と比較して増大している（または本質的に変化していない）場合（および/または第2比の第1比に対する比が1以上である場合）、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがあることが予測され、および/またはそれにより、対象は、第2比の値が第1比の値と比較して低下している場合（および/または第2比の第1比に対する比が1未満である場合）、出産後に妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクがないことが予測されるためのアルゴリズムを実装されているデータ処理装置を含む評価ユニット；

を含む。

【0090】

場合により、以下の工程を実施するためのアルゴリズムは、さらに、出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測する工程を実施することができる。

【0091】

本明細書で用いられる用語“デバイス”は、本発明の方法における診断を可能にするように互いに作動的に連結された前記のユニットを含むシステムに関する。分析ユニットに関して用いられることができる好ましい薬剤（すなわち検出剤）は、本明細書の他の箇所で開示されている。分析ユニットは、好ましくは、そのレベルが決定されるべきバイオマーカーを含む試料に接触させるべき固体支持体上に固定化された形態で、前記の検出剤を含む。さらに、分析ユニットは、バイオマーカー（単数または複数）に特異的に結合している検出剤のレベルを測定する検出器も含むことができる。測定されたレベルは、評価ユニットへ伝達されることができる。前記の評価ユニットは、データ処理素子、例えばコンピュータを、比の（またはバイオマーカーのレベルの）計算、場合により前記の計算された比の比較、および比較の結果の評価を、本明細書の他の箇所で詳細に述べられている本発明の方法の工程を実施するコンピュータベースのアルゴリズムの実装により実施するための実装されたアルゴリズムと共に含む。結果は、パラメトリック診断生データの出力として与えられることができる。これらのデータは、通常は臨床医による解釈を必要とすることは、理解されるべきである。しかし、出力が処理された診断生データを含み、その解釈が専門的な臨床医を必要としない、エキスパートシステムデバイスも、想定される。

【0092】

ある態様によれば、分析ユニットは、試料に関する分析物、例えばマーカーの光学検出のために構成されることができる。光学検出のために構成された典型的な分析ユニットは、電磁エネルギーを電気信号に変換するように構成されたデバイスを含み、それは単一素子光学検出器および多重素子光学検出器の両方またはアレイ光学検出器を含む。本開示によれば、光学検出器は、光電磁信号をモニターし、そして電気的な出力信号または応答信号をベースライン信号に対比して提供することができる。それは光路に配置されている試料中の分析物の存在および/または濃度を示す。そのようなデバイスは、例えばアバランシェフォトダイオードを含むフォトダイオード、フォトランジスター、光伝導検出器、リニアセンサーアレイ、CCD検出器、CMOSアレイ検出器を含むCMOS検出器、光電子増倍管、および光電子増倍管アレイも含むことができる。特定の態様によれば、光学検出器、例えばフォトダイオードまたは光電子増倍管は、追加の信号調整または処理エレクトロニクスを含むことができる。例えば、光学検出器は、少なくとも1つの前置増幅器、フィルター回路、または集積回路を含むことができる。適切な前置増幅器は、例えば積分型、トランスインピーダンス型、および電流利得型（カレントミラー）の前置増幅器を含む。

【0093】

加えて、本開示による1以上の分析ユニットは、光を発するための光源を含むことがで

10

20

30

40

50

きる。例えば、分析ユニットの光源は、被検試料に関して分析物濃度を測定するための、または（例えば、蛍光共鳴エネルギー移動による、または酵素の触媒作用による）エネルギー移動を可能にするための、少なくとも1つの発光素子（例えば、発光ダイオード、電源付き線源、例えば白熱電球、エレクトロルミネセントランプ、ガス放電ランプ、高輝度放電ランプ、レーザー）からなることができる。

【0094】

さらに、システムの分析ユニットは、（例えば、試料または試薬を明記された温度または温度範囲で維持するための）1以上のインキュベーションユニットを含むことができる。

【0095】

加えて、本明細書で開示されるシステムの分析ユニットは、反応器もしくはキュベット供給ユニットを含むことができ、またはそれに作動的に接続されていることもできる。典型的な供給ユニットは、試料および/または試薬を反応器へ送達するための液体処理ユニット、例えばピペティングユニットを含む。ピペティングユニットは、再利用可能な洗浄可能な針、例えば鋼鉄の針、または使い捨てピペットチップを含むことができる。分析ユニットは、さらに1以上の混合ユニット、例えば液体を含むキュベットを振盪するための振盪機、またはキュベットもしくは試薬容器中の液体を混合するための混合パドルを含むことができる。

【0096】

上記のことから、本開示のある態様によれば、本明細書で開示および記載された方法のいくつかの工程の一部は、コンピューティングデバイスにより実施されることができる。コンピューティングデバイスは、例えば汎用コンピューターまたはポータブルコンピューティングデバイスであることができる。本明細書で開示される方法の1以上の工程を実施するために、多数のコンピューティングデバイスが、例えばネットワークまたは他のデータ移送方法を通して一緒に使用されることができることも、理解されるべきである。典型的なコンピューティングデバイスは、デスクトップコンピューター、ラップトップコンピューター、パーソナルデータアシスタント（personal data assistants）（“PDA”）、例えばBLACKBERRY（登録商標）ブランドのデバイス、セル方式デバイス、タブレットコンピューター、サーバー等を含む。一般に、コンピューティングデバイスは、複数の指示（例えば、ソフトウェアのプログラム）を実行することができる処理装置を含む。

【0097】

コンピューティングデバイスは、メモリーへのアクセスを有する。メモリーは、コンピューター可読媒体であり、単一記憶デバイスまたは多重記憶デバイスを含むことができ、それらはコンピューティングデバイスと共に局所に配置され、または例えばネットワークを介してコンピューティングデバイスにアクセス可能である（どちらでもよい）。コンピューター可読媒体は、コンピューティングデバイスによりアクセスされることができるあらゆる利用可能な媒体であることができ、揮発性および不揮発性媒体の両方を含む。さらに、コンピューター可読媒体は、リムーバブル媒体および非リムーバブル媒体の一方または両方であることができる。例として、限定ではなく、コンピューター可読媒体は、コンピューター記憶媒体を含むことができる。典型的なコンピューター記憶媒体は、RAM、ROM、EEPROM、フラッシュメモリーもしくはあらゆる他のメモリー技術、CD-ROM、デジタル多用途ディスク（DVD）もしくは他の光ディスク記憶装置、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶装置もしくは他の磁気記憶デバイス、またはコンピューティングデバイスによりアクセスされてコンピューティングデバイスの処理装置により実行されることができる複数の指示を記憶するために用いられることができるあらゆる他の媒体を含むが、それらに限定されない。

【0098】

本開示の態様によれば、ソフトウェアは、コンピューティングデバイスの処理装置により実行された際に本明細書で開示される方法の1以上の工程を実施することができる指示

10

20

30

40

50

を含むことができる。指示のいくつかは、他の機械の動作を制御する信号を生成するように適合していることができ、従ってそれらの制御信号を通してコンピューター自体から遠く離れた資料を変換するように作動することができる。これらの記載および表現は、データ処理の技術分野の当業者により、例えば彼らの作業の内容を最も効率的に他の当業者に伝達するために用いられる手段である。

【0099】

複数の指示は、所望の結果につながる自己矛盾のない一連の段階であると一般に考えられるアルゴリズムを含むこともできる。これらの段階は、物理量の物理的操作を必要とするものである。通常は（必ずしもそうではないが）、これらの量は、記憶される、伝達される、変換される、組み合わせられる、比較される、および他の方法で操作されることができる電氣的または磁氣的なパルスまたは信号の形をとる。それは、時には、主に、これらの信号を、そのような信号が具体化されるかまたは発せられる物理的事項または発現に対する基準としての値、文字、表示データ、番号等として指すための共用化の理由で、好都合であることが分かる。しかし、これらのおよび類似の用語の全てが、適切な物理量と関連付けられるべきであり、ここではこれらの量に適用される好都合なラベルとして用いられるにすぎないことは、留意されるべきである。本開示のある態様によれば、本明細書で開示される1種類以上のマーカの決定されたレベルおよび適切な基準の間の比較を実施するためのアルゴリズムは、指示を実行することにより具体化および実施される。その結果は、パラメトリック診断生データの出力として、または絶対レベルもしくは相対レベルとして与えられることができる。本明細書で開示されるシステムの様々な態様によれば、“診断”は、本明細書で開示されるシステムのコンピューティングデバイスにより、計算された“レベル”の基準または閾値に対する前記の比較に基づいて提供されることができる。例えば、システムのコンピューティングデバイスは、特定の診断を示す単語、記号または数値の形の指標を提供することができる。

10

20

【0100】

コンピューティングデバイスは、出力デバイスへのアクセスも有することができる。代表的な出力デバイスは、例えばファックス機、ディスプレイ、プリンター、およびファイルを含む。本開示のある態様によれば、コンピューティングデバイスは、本明細書で開示される方法の1以上の工程を実施し、その後、方法の結果、指示、比または他の因子に関する出力を、出力デバイスを介して提供することができる。

30

【0101】

さらに、雌性対象が出産後に少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するための前記の方法を実施するために適合したキットであって、以下：i) バイオマーカー sFlt-1 および PLGF のレベルを決定するための検出剤もしくは ii) バイオマーカー エンドグリン および PLGF のレベルを決定するための検出剤、または iii) バイオマーカー sFlt-1、エンドグリン および / または PLGF のレベルを決定するための検出剤、ならびに前記の方法を実施するための指示を含むキットが、本発明に包含される。

【0102】

本明細書において用いられる用語“キット”は、好ましくは別々に、または単一容器内で提供される、前記の構成要素の集合体を指す。容器は、本発明の方法を実施するための指示も含む。これらの指示は、マニュアルの形であることができ、またはコンピューターもしくはデータ処理デバイスに実装された際に本発明の方法において言及された比較を実施してそれに従って診断を確立することができるコンピュータープログラムコードにより提供されることもできる。コンピュータープログラムコードは、データ記憶媒体またはデバイス、例えば光学記憶媒体（例えば、コンパクトディスク）上に、または直接コンピューターもしくはデータ処理デバイス上に提供されることができる。さらに、キットは、本明細書において上記で定義された基準に関する少なくとも1つの標準、すなわち基準レベルに相当する本明細書で言及されたバイオマーカーに関する予め定められたレベルを有する溶液を含み得る。

40

50

【0103】

ある態様において、本明細書で開示されるキットは、開示された方法を実施するための少なくとも1つの構成要素、または構成要素類のパッケージされた組み合わせを含む。“パッケージされた組み合わせ”とは、そのキットが本明細書で開示される1以上の構成要素、例えばプローブ（例えば、抗体）、対照、緩衝剤、試薬（例えば、コンジュゲートおよび/または基質）、指示等の組み合わせを収容している単一のパッケージを提供することを意味する。単一の容器を収容しているキットも、“パッケージされた組み合わせ”の定義内に含まれる。ある態様において、キットは、少なくとも1種類のプローブ、例えば抗体（本明細書で開示されるバイオマーカーのエピトープに関する特異的な親和性を有するもの）を含む。例えば、キットは、蛍光体で標識された抗体、または融合タンパク質のメンバーである抗体を含むことができる。キットにおいて、プローブは、固定化されていることができ、特定の立体構造で固定化されていることもできる。例えば、固定化されたプローブは、標的タンパク質に特異的に結合するために、試料中の標的タンパク質を検出するために、および/または標的タンパク質を試料から分離するために、キット中に提供されることができる。

10

【0104】

ある態様によれば、キットは、固定化されていることができる少なくとも1種類のプローブを、少なくとも1個の容器中に含む。場合により固定化されている複数のプローブを、1個以上の容器中に含むこともできる。例えば、複数のプローブは、単一の容器中または別々の容器中（例えばここで、各容器は単一のプローブを収容している）に存在することができる。

20

【0105】

ある態様において、キットは、1種類以上の固定化されていないプローブ、および固定化されたプローブを含むか、または含まない1以上の固体支持体を含むことができる。あるそのような態様は、1種類以上のプローブを固体支持体に固定化するのに必要な試薬および供給物の一部もしくは全部、または固定化されたプローブの試料内の特定のタンパク質への結合に必要な試薬および供給物の一部もしくは全部を含むことができる。

【0106】

特定の態様において、単一のプローブ（同じプローブの複数コピーを含む）が、単一の固体支持体上に固定化され、単一の容器中で提供されることができる。他の態様において、それぞれが異なる標的タンパク質または単一の標的タンパク質の異なる形態（例えば特異的エピトープ）に特異的な2種類以上のプローブが、単一の容器中で提供される。あるそのような態様において、ある固定化されたプローブが、複数の異なる容器中で（例えば、単回使用形態で）提供されることができ、または複数種類の固定化されたプローブが、複数の異なる容器中で提供されることができる。さらなる態様において、プローブは、複数の異なるタイプの固体支持体上に固定化されることができる。固定化されたプローブ（単数または複数）および容器（単数または複数）のあらゆる組み合わせが、本明細書で開示されるキットに関して意図されており、そのあらゆる組み合わせは、所望の用途に関する適切なキットを達成するように選択されることができる。

30

【0107】

キットの容器は、例えばプローブ（例えば、抗体）、対照、緩衝剤、および試薬（例えば、コンジュゲートおよび/または基質）を含む、本明細書で開示される1以上の構成要素をパッケージおよび/または収容するのに適したあらゆる容器であることができる。適切な材料は、ガラス、プラスチック、厚紙または他の紙製品、木材、金属、およびそのあらゆるアロイを含むが、それらに限定されない。ある態様において、容器は、固定化されたプローブ（単数または複数）を完全に包んでいることができ、または粉塵、油等による汚染、および露光を最小限にするようにプローブを簡単に覆うこともできる。あるさらなる態様において、キットは、単一の容器または複数の容器を含むことができ、複数の容器が存在する場合、各容器は全ての他の容器と同じであることができ、他の容器と異なることもでき、または一部の容器とは異なるが全ての他の容器とは異なることもできる。

40

50

【0108】

本発明は、雌性対象が少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測するためのシステムであって、以下：

a) インピット口で、本明細書の他の箇所で述べられた対象からの第1および第2試料の一部を、i) PLGFに特異的に結合する薬剤、およびsFlt-1に特異的に結合する薬剤またはエンドグリンに特異的に結合する薬剤と接触させるように構成された分析ユニット、

b) 薬剤と接触した対象からの試料の一部からの信号を検出するように構成された分析ユニット、

c) プロセッサを有し、作動可能に前記の分析ユニットと連絡しているコンピューティングデバイス、ならびに

d) プロセッサにより実行可能な複数の指示であって、実行された際に本明細書の他の箇所で述べられた第1および第2比を計算し、第1比を第2比と比較し、それにより雌性対象が少なくとも1種類の妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を発現するリスクを予測する指示を含む、非一時性の(non-transient)機械可読媒体；を含むシステムにも関する。

10

【0109】

上記で参照された全ての参考文献は、それらの全開示内容ならびに上記で明確に参照されたそれらの特定の開示内容に関して、参照により本明細書に援用される。

【実施例】

20

【0110】

以下の実施例は、単に本発明を説明するだけのものとする。それらは、本発明の範囲を限定するものとは決して解釈されるべきではない。

実施例1：PLGF、sFlt-1およびエンドグリンの血清レベルの測定

sFlt-1、PLGFおよびエンドグリンの血清レベルは、商業的に入手可能な免疫アッセイを用いて決定された。特に、以下のアッセイが用いられた。

【0111】

sFlt-1は、Rocheからの分析計Eleclys(商標)またはcobase(商標)シリーズを用いるサンドイッチ免疫アッセイで決定された。そのアッセイは、それぞれのポリペプチドに特異的な2種類のモノクローナル抗体を含む。これらの抗体の第1の抗体は、ビオチン化されており、第2の抗体は、トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)錯体で標識されている。第1インキュベーション工程において、両方の抗体を、試料と共にインキュベートする。決定されるべきペプチドおよび2種類の異なる抗体を含むサンドイッチ複合体が形成される。次のインキュベーション工程において、ストレプトアビジンでコートされたビーズをこの複合体に添加する。ビーズは、そのサンドイッチ複合体に結合する。次いで、この反応混合物を測定セル中に吸引し、そこでビーズは電極の表面上に磁氣的に捕捉される。次いで、電圧の印加が、ルテニウム錯体からの化学発光を誘導し、それが光電子増倍管により測定される。発光量は、電極上のサンドイッチ複合体の量に依存する。そのsFlt-1試験は、Roche Diagnostics GmbH(ドイツ、マンハイム)から商業的に入手可能である。このアッセイに関するさらなる詳細は、パッケージ挿入物中にある。sFlt-1の測定範囲は、10~85,000pg/mlのレベルを含む。

30

40

【0112】

エンドグリンは、R&D Systems, Inc(米国ミネアポリス)から商業的に入手可能であるQuantikine(商標)ヒトエンドグリン/CD105免疫アッセイを用いて測定された。このアッセイは、定量的サンドイッチ酵素免疫アッセイ技法を用いる。エンドグリンに特異的なモノクローナル抗体が、マイクロプレート上に予めコートされている。標準品および試料をピペットでウェルに入れ、存在する全てのエンドグリンは、固定化された抗体により結合される。全ての結合しなかった物質を洗い流した後、酵素に連結されたエンドグリンに特異的なモノクローナル抗体をウェルに添加する。洗浄し

50

て全ての結合しなかった抗体 - 酵素試薬を除去した後、基質溶液をウェルに添加すると、最初の工程で結合したエンドグリンのレベルに比例して発色する。発色を停止し、色の強度を測定する。そのアッセイに関するさらなる詳細は、パッケージ挿入物中にある。エンドグリンの測定範囲は、 $0.001 \text{ ng/L} \sim 10 \text{ ng/mL}$ のレベルを含む。

【0113】

PLGFは、2種類のPLGF特異的抗体を用いて、Elec Sys（商標） - またはcobas e（商標） - シリーズの分析器において実施されるサンドイッチ免疫アッセイで試験された（詳細に関しては上記を参照）。そのPLGF試験は、Roche Diagnostics GmbH（ドイツ、マンハイム）から商業的に入手可能である。そのアッセイに関するさらなる詳細は、パッケージ挿入物中にある。PLGFの測定範囲は、 $3 \sim 10,000 \text{ pg/mL}$ のレベルを含む。

10

【0114】

実施例2：産後HELLP症候群、産後妊娠高血圧腎症または産後子癇を発現した転帰の患者における、ならびに対照における、バイオマーカーsFlt-1およびPLGFの分析。R1は、第1試料における比の結果を表し；R2は、第2試料から得られた比の結果に対応する。

【0115】

産後HELLP症候群 / 産後妊娠高血圧腎症 / 産後子癇を有する女性

1) 産後HELLP症候群を有する女性：

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R1)} = 44$$

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R2)} = 64$$

$$R2 / R1 = 64 / 44 = 1.45 (> 1)$$

2) 産後重症妊娠高血圧腎症および関連する肝臓病態を有する女性

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R1)} = 162$$

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R2)} = 283$$

$$R2 / R1 = 283 / 162 = 1.74 (> 1)$$

20

【0116】

対照

妊娠高血圧腎症を有する女性（出産前の疾患の臨床的開始）：

1) 重症妊娠高血圧腎症を有する女性（妊娠33～36週目における疾患の開始および出産）

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R1)} = 101$$

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R2)} = 19$$

$$R2 / R1 = 19 / 101 = 0.18 (< 1)$$

妊娠高血圧腎症 / 子癇 / HELLP症候群を有しない女性：

1) 高い肝臓酵素を有する女性

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R1)} = 143$$

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R2)} = 73$$

$$R2 / R1 = 73 / 143 = 0.51 (< 1)$$

2) 別の対照の女性

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R1)} = 132$$

$$sFlt-1 / PLGF \text{ 比 (R2)} = 35$$

$$R2 / R1 = 35 / 132 = 0.26 (< 1)$$

40

【0117】

加えて、出産後に得られた試料におけるsFlt-1およびPLGFのレベルを、出産前に得られた試料におけるsFlt-1およびPLGFのレベルに対して比較した。興味深いことに、両方のレベルは、産後妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰を有する対象において、出産後に低下した。観察された低下に基づくと、（対照と比較した）単一のバイオマーカーsFlt-1またはPLGFそれぞれのみのレベルに基づいて試験された患者に関するリスク予測を確立することは、不可能であった。従って、本明細書で開示された

50

比は、産後妊娠高血圧腎症に関連する有害な転帰のリスクを予測するための信頼できるマーカーである。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/051457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANNA-KARIN WIKSTRÖM ET AL: "Early postpartum changes in circulating pro- and anti-angiogenic factors in early-onset and late-onset pre-eclampsia", ACTA OBSTETRICIA ET GYNECOLOGICA SCANDINAVICA, vol. 87, no. 2, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 146-153, XP055104647, ISSN: 0001-6349, DOI: 10.1080/00016340701819262	12, 14, 15
Y	the whole document	1-11, 13
X	WO 2013/068475 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; DENK BARBARA [DE]) 16 May 2013 (2013-05-16) cited in the application	15
Y	p. 3, line 36 - p. 27, line 7, claims 1-15	1-14
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 March 2015		Date of mailing of the international search report 26/03/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer R. von Eggelkraut-G.

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/051457

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/001244 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HUND MARTIN [CH];) 3 January 2014 (2014-01-03) cited in the application	15
Y	p. 4, line 14 - p. 32, line 22 -----	1-14
X	VERLOHREN S ET AL: "An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, MOSBY, ST LOUIS, MO, US, vol. 202, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 161.e1-161.e11, XP026869544, ISSN: 0002-9378 [retrieved on 2009-10-21]	15
Y	the whole document -----	1-14
X	YU CHEN: "Novel Angiogenic Factors for Predicting Preeclampsia: sFlt-1, PlGF, and Soluble Endoglin", THE OPEN CLINICAL CHEMISTRY JOURNAL, vol. 2, 31 December 2008 (2008-12-31), pages 1-6, XP055021538,	15
Y	the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/051457

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013068475 A1	16-05-2013	CA 2850449 A1	16-05-2013
		CN 103917875 A	09-07-2014
		EP 2776839 A1	17-09-2014
		JP 2014532887 A	08-12-2014
		US 2014234879 A1	21-08-2014
		WO 2013068475 A1	16-05-2013

WO 2014001244 A1	03-01-2014	AU 2013283540 A1	13-11-2014
		CA 2871878 A1	03-01-2014
		WO 2014001244 A1	03-01-2014

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

(72)発明者 フント, マルティン

スイス国 6048 ホル, クラインヴィルヘーエ 7

(72)発明者 ディーターレ, トーマス

ドイツ国 79100 フライブルク, マティアス - グリュネヴァルト - シュトラーセ 15ベ
ー

(72)発明者 ラペア, オーラヴ

スイス国 4102 ビンニゲン, ノイバートライン 92