

(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2016-515534

(P2016-515534A)

(43) 公表日 平成28年5月30日 (2016. 5. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 4
G 0 1 N 33/53 (2006. 01)	G 0 1 N 33/53 J	4 C 0 8 5
G 0 1 N 33/552 (2006. 01)	G 0 1 N 33/552	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/12 (2006. 01)	A 6 1 P 9/12	4 C 2 0 6
A 6 1 P 15/06 (2006. 01)	A 6 1 P 15/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-503430 (P2016-503430)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月17日 (2014. 3. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月16日 (2015. 11. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/030623
 (87) 国際公開番号 W02014/145797
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014. 9. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/799, 438
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515260058
 ヴェロ バイオ, エルエルシー
 アメリカ合衆国, ノース カロライナ州
 27560, モリスビル, エアリアル セ
 ンター パークウェイ 9001, スー
 ト 110
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

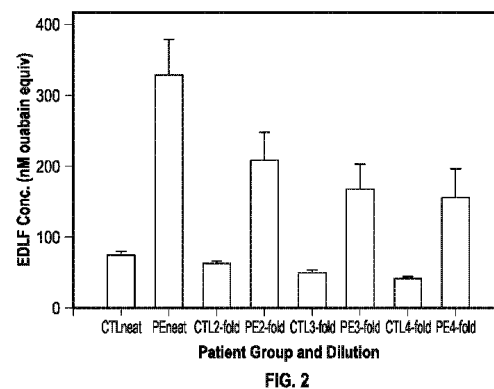
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子癇症及び子癇前症を治療するための方法

(57) 【要約】

患者においてEDLFを検出することによって、子癇症または子癇前症を有する患者を検出するための方法。抗ジゴキシン抗体療法に対して応答性であり得る患者をスクリーニングするための方法も説明される。EDLFを検出するためのシステムは、ナノワイヤバイオセンサーを含む。

【選択図】 図 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

子癇症または子癇前症を治療するためにジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を投与する方法であって、

- (a) ジゴキシニン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、
- (b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、
- (c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも 1 つの症状を呈する妊娠ヒト患者を治療するためにジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を投与する方法であって、

- (a) ジゴキシニン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、
- (b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、
- (c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

20

【請求項 3】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも 1 つの症状を呈する妊娠ヒト患者を治療する方法であって、

- (a) ジゴキシニン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、
- (b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、
- (c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

30

【請求項 4】

患者の新生児における脳室内出血 (I V H) を予防するために、ジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与する方法であって、

- (a) ジゴキシニン免疫抗体アッセイを、前記患者で行うことと、
- (b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、
- (c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 5】

脳室内出血を治療するためにジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を投与する方法であって、

- (a) ジゴキシニン免疫抗体アッセイを、早期分娩 (妊娠 40 週より前) の結果として胎児が I V H を発症し得る妊娠ヒト患者で行うことと、
- (b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、
- (c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシニン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

40

【請求項 6】

患者の新生児における脳室内出血 (I V H) を予防するために、抗ジゴキシニン抗体またはその抗原結合フラグメント、任意にジゴキシニン免疫 F a b を投与する方法であって、

- (a) ジゴキシニン免疫抗体アッセイを、早期分娩 (妊娠 40 週より前) の結果として胎

50

児が I V H を発症し得る妊娠ヒト患者で行うことと、

(b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと

、
(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、前記抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 7】

早産と関連付けられる胎児合併症を治療するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法であって、

(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを、胎児が早期分娩（妊娠 40 週より前）され得る妊娠ヒト患者で行うことと、

(b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、

(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、前記抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 8】

早産と関連付けられる前記胎児合併症が、I V H または N E C を含む、請求項 7 に記載の前記方法。

【請求項 9】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも 1 つの症状を呈する妊娠ヒト患者において妊娠を延長させる方法であって、

(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと

(b) アッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、

(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 10】

子癇症または子癇前症の危険性がある患者を治療するための方法であって、

(a) 子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料を得ることと、

(b) 前記試料を抗 E D L F 抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、

(c) 抗 E D L F 抗体または抗体フラグメントー E D L F 複合体の存在を検出することと、ただし、前記 E D L F の存在が、子癇症または子癇前症を示す、

(d) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 11】

胎児及び／または新生児に I V H の危険性がある患者を治療するための方法であって、

(a) 患者から試料を得ることと、

(b) 前記試料を抗 E D L F 抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、

(c) 抗 E D L F 抗体または抗体フラグメントー E D L F 複合体の存在を検出することと、ただし、前記 E D L F の存在が、子癇症または子癇前症を示す、

(d) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫 F a b (D I F) を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 12】

子癇症または子癇前症の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法であって、

(a) 子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料を得ることと、

(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、

(c) E D L F レベルを決定することと、

(d) 前記 E D L F レベルが 100 nm E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にジゴキシン免疫 F a b を前記患者に投与することと、

10

20

30

40

50

を含む、前記方法。

【請求項 13】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法であって、

(a) 妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延を患う患者から試料を得ることと、

(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、

(c) 前記患者が E D L F 陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にジゴキシン免疫 F a b を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

10

【請求項 14】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法であって、

(a) 妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料を得ることと、

(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、

(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にジゴキシン免疫 F a b を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 15】

20

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法であって、

(a) 妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料を得ることと、

(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、

(c) E D L F レベルを決定することと、

(d) 前記 E D L F レベルが 1 0 0 n m E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 16】

脳室内出血を治療するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法であって、

30

(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを、脳室内出血を患う患者で行うことと、

(b) ラジオイムノアッセイに基づいて、前記患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、

(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、前記抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 17】

脳室内出血を治療するための方法であって、

(a) 胎児に脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、

(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、

40

(c) E D L F レベルを決定することと、

(d) 前記 E D L F レベルが 1 0 0 n m E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 18】

脳室内出血の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法であって、

(a) 脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、

(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、

(c) E D L F レベルを決定することと、

(d) 前記 E D L F レベルが 1 0 0 n m E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体ま

50

たはその抗体フラグメント、任意にジゴキシン免疫 F a b を前記患者に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 19】

脳室内出血の危険性がある患者を治療するための方法であって、

(a) 脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、

(b) 前記試料を抗 E D L F 抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、

(c) 抗 E D L F 抗体または抗体フラグメントー E D L F 複合体の存在を検出することと、ただし、前記 E D L F の存在が、脳室内出血を示す、を含む、前記方法。

【請求項 20】

前記フラグメントが、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、C D R、パルトープ、または前記抗原を結合することができる抗体の部分である、請求項 6、7、12、13、および 15～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 21】

前記抗体が、キメラ化、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二官能性、または共特異性 (c o - s p e c i f i c) である、請求項 6、7、12、13、および 15～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗体またはフラグメントが、標識に結合している、請求項 6、7、12、13、および 15～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記標識が、化学発光標識、常磁性標識、M R I 造影剤、蛍光標識、生物発光標識、または放射活性標識である、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記常磁性標識が、アルミニウム、マンガネーゼ、白金、酸素、ランタン、ルテチウム、スカンジウム、イットリウム、またはガリウムである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗体が、固体支持体に結合している、請求項 6、7、12、13、および 15～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記固相支持体が、ビーズ、試験管、シート、培養皿、ナノワイヤ、または試験片である、請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記固体支持体が、アレイである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記試料が、血液、血清、血漿、または胎盤試料である、請求項 10～15 および 17～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記抗体アッセイが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、E L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫組織化学アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びタンパク質 A イムノアッセイからなる群から選択されるアッセイを含む、請求項 1～7、9、および 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 30】

前記 E D L F レベルが、100 n M E D L F を超える、請求項 12、15、17、および 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

投与されるジゴキシン抗体の投薬量が、少なくとも 0.006 m g ジゴキシン結合能 / K g 未満である、請求項 10～15 および 17～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

50

前記投薬量が、6時間以下の期間にわたって投与される、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

その後の投薬量のジゴキシン免疫Fabの投与をさらに含む、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の前記方法。

【請求項34】

治療上有効な量のコルチコステロイドを投与することをさらに含む、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

その後の投薬量のジゴキシン免疫Fabの投与をさらに含む、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項36】

治療上有効な量の降圧薬を投与することをさらに含む、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

降圧薬が、ラベタロール、アルテノロール、ニフェジピン、1-メチルドーパ、またはヒドララジンである、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

治療上有効な量の硫酸マグネシウムまたはフェニトインを投与することをさらに含む、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項39】

前記ジゴキシン免疫Fabが、ヒツジジゴキシン免疫Fabである、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

用量が、約10.0mg以下である、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

用量が、約5.0mg以下である、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

用量が、約0.01～1.0mgの範囲内である、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項43】

用量が、約0.01mg～0.5mgの範囲内である、請求項10～15および17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項44】

固定化された抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシンFab抗体フラグメントを含む、シリコンナノワイヤバイオセンサー。

【請求項45】

前記フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、パラトープ、または前記抗原を結合することができる抗体の部分、任意にジゴキシン免疫Fabである、請求項44に記載のバイオセンサー。 40

【請求項46】

前記抗体が、キメラ化、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二官能性、または共特異性である、請求項45に記載のバイオセンサー。

【請求項47】

前記バイオセンサーが、生物試料中、少なくとも約100nMのジゴキシンの感受性を有する、請求項46に記載のバイオセンサー。

【請求項48】

生物試料を請求項44に記載のバイオセンサーと接触させることと、EDLFの存在に 50

ついてアッセイすることと、を含む、EDLFを検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本国際特許出願は、2013年3月15日出願の米国仮特許出願第61/799,438号に対する優先権を主張し、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

技術分野

本発明は、妊娠女性における内因性ジグタリス様因子(EDLF)レベルの測定、及び有効量の抗ジゴキシン抗体またはその結合フラグメントの投与を含む、子癇症及び子癇前症の診断及び治療に関する。本発明は、妊娠中の胎児合併症、すなわち脳室内出血と関連付けられる状態の治療及び／または予防も伴う。本発明は、EDLFレベルの測定ならびに患者がEDLF陽性であるかどうかの表示を提供する、EDLFの検出及び測定のための技法をさらに含む。任意のそのような状態を治療するために有効量の抗ジゴキシン抗体またはその結合フラグメントを投与するための技法がさらに提供される。

【背景技術】

【0003】

背景技術

子癇前症(PE)は、妊娠女性の間の主な死亡原因である。妊娠の後半における高血圧及びタンパク尿は、依然としてこの障害を診断するために使用されているが、全身性浮腫、高尿酸血症、血小板減少症、神経学的変化、及び／または肝酵素の上昇も起こる可能性があり、その疾患のより深刻な形態の前兆となり得る。Roberts Semin Perinatal. 2000; 24(1): 24-28、Roberts, et al. Am J Obstet Gynecol. 1989; 161(5): 1200-1204。PEは、初回妊娠において、及び肥満女性においてより頻繁に起こる。Zavalza-Gomez Arch Gynecol Obstet. 2011; 283: 415-422。追加として、PEは、子宮内胎児発育遅延(IUGR)につながる場合が多く、早産の主な原因である。Ness & Sibai Am J Obstet Gynecol. 2006; 195: 40-49。

【0004】

確立されたPEにおいて多くの異常が報告されているが、これらの異常のそれぞれとPEの原因または中間病態生理との関連は依然として未知である。臨床的に確立された疾患に先行し得る、頻繁に見られる1つの異常は、母体血管内皮に対する全身性損傷である。これらの変化は、PEを発症することになる妊娠において数週間前に現れる。Roberts, et al. Am J Obstet Gynecol. 1989; 161(5): 1200-1204。そのような傷害は、炎症性サイトカイン、活性酸素種、細胞表面接着分子、及び元の損傷に続発する血管緊張の局所作用調節因子を含む、内皮機能不全のマーカーの放出を伴う。LaMarca, et al. Current Hypertension Reports. 2007; 9(6): 480-485。PEの原因は完全に知られているわけではないため、PEが起こるかどうか、またはいつ起こるかを試験するための直接的な方法も、PEを予防または治療するための有効な治療もない。深刻な場合、たとえそれが妊娠の早期に起こるとしても、唯一の有効な治療は、母親を守るために胎児を分娩することである。

【0005】

PEにつながる最早の生理学的事象について、PEが早期胎盤機能不全を合併する妊娠として始まることを示唆する証拠がある。Sankaralingam, et al. Expert Rev in Mol Med. 2006; 8: 1-20。PEは、少なくとも部分的に、血液を、その酸素及び栄養素とともに胎児-胎盤系に供給する母体らせん

10

20

30

40

50

動脈の不完全な適応に起因するというのが現在の考えである。これは、かん流下で低酸素症、白血球及び血小板の活性化を含む、活性酸素種及び炎症性メディエータの局所放出を伴う胎盤損傷をもたらし、循環サイトカイン値、例えば、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターフェロン γ 、及びインターロイキン-6を増加させると考えられている。Granger, et al. *Microcirculation*. 2002; 9 (3): 147-160、Soleymanlou, et al. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90 (7): 4299-4308。これらは順に、胎盤、胎児、及び母体内皮機能に対するより全身性の作用につながることがあり、より広い母体、及び恐らく胎児の酸化ストレスの証拠とともに、より増大した炎症反応を引き起こし、臨床疾患を有する母親における内皮損傷を潜在的に説明する。

10

【0006】

PEを有する女性において見出される追加の異常は、[Na⁺, K⁺] ATPase (ナトリウムポンプ、SPとも呼ばれる) の天然阻害剤であると思われる内因性「ジギタリス様」因子 (EDLF) の循環レベルの上昇である。Graves & Williams *J Clin Endocrinol Metab*. 1984; 59: 1070-4、Valdes, et al. *Prog Clin Biol Res*. 1985; 192: 229-32、Graves *Hypertens*. 1987; 10 (S Pt 2): 1-84-6、Graves, et al. *Am J Hypertens*. 1995; 8: 5-11。追加として、これらの因子は、ジゴキシン、ウアバイン、及び他の強心配糖体抗体と交差反応することが示され、EDLFがジゴキシン、ウアバイン、ブファリン、プロスシラリジンA、及び／またはマリノブファゲニンと構造的に関連する化合物であることを強く示唆している。Hamlyn, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 6259-6263、Goto & Yamada *Clin Exp Hypertens*. 1998; 20: 551-56。しかしながら、PEにおける循環因子の正確な構造は不明である。ジゴキシン等の既知の強心剤と生物学的及び免疫学的特性を共有するEDLFは、動物及びヒトの多くの組織及び体液において見出された。増加したEDLFのレベルは、本態性、何らかの二次的及び実験的高血圧の病因における原因因子であり得る。Glatte, et al. *Am J Hypertens*. 1994; 7: 1016-25、Krep, et al. *Am J Hypertens*. 1995; 8: 921-7、Krep, et al. *Am J Hypertens*. 1995; 9: 39-46。

20

30

【0007】

Digibind及びDigifabは、それぞれヒツジにおいて育成されたポリクローナル抗ジゴキシン抗体に由来する市販のFabフラグメントである。Digibind及びDigifab (ジゴキシンABと称される) は、ジゴキシンを結合し、[Na⁺, K⁺] ATPaseに結合するためにジゴキシンを使用不可能にすることによって、ジゴキシン過剰摂取及び付随する毒性の治療に使用される。Smith, et al. (1982) *N Engl J Med*. 307: 1357-62。ジゴキシンAB-ジゴキシン複合体は、血液中に蓄積し、腎臓によって排出される。正味の影響は、体内のジゴキシンのその受容体への結合から平衡を転換することであり、その作用を減弱させる。高EDLFレベルを有する高血圧の実験的モデルにおいて、Digoxin ABは、血圧を低下させることが実証され、抗体がEDLFと交差反応し、不活性化する証拠を提供する。これは、はるかに大規模なインビトロ文献によって支持される。Krep, et al. (1995) *Am J Hypertens*. 8: 921-7、Krep, et al. (1995) *Am J Hypertens*. 9: 39-46。

40

【0008】

以前の研究は、EDLFが構造的に、イソプレノイド／ステロイド経路、複数のステップを含む非常に複雑な経路によって合成される不飽和ラクトン環を有するステロイド配糖体ジゴキシンまたは類似体であると報告した。この研究の場合、内因性ジゴキシン合成経路の重要中間体が関心対象であった。ステロイド合成の以前の研究は、ケトコナゾールが

50

、いくつかのサイトクローム P 4 5 0 依存性酵素を阻害することによって、生殖腺及び副腎ステロイド産生を遮断するサイトクローム P 4 5 0 依存性酵素の一般的な阻害剤であることを実証した。Loose, et al. (1983) J. Clin. Invest. 71:1495-1499、Miossec, et al. (1997) Ann Endocrinol (Paris) 58:494-502。メチルステロールのコレステロールへの変換を遮断することによって、ヒトのコレステロール合成も阻害する。Kraemer, et al. (1986) J Pharmacol Exp Ther. 238 905-911。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

現在、子癇症及び子癇前症の治療は、子癇症、子癇前症、または抗ジゴキシン抗体もしくはその結合フラグメント療法に応答し得るそれらの症状を有する女性を特定する診断方法の欠如に悩まされている。したがって、当該技術分野において、子癇症、子癇前症、またはそれらの症状を有する女性の診断方法及び抗ジゴキシン抗体またはその結合フラグメント併用療法、すなわち、どの子癇前症及び／または子癇症の女性が Digoxin AB による治療から恩恵を受けるかを予測する治療的診断試験の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の概要

20

一実施形態において、子癇症または子癇前症を治療するためにジゴキシン免疫 Fab (DIF) を投与する方法は、(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b) アッセイに基づいて、患者が EDLF 陽性であるかどうかを決定することと、(c) 患者が EDLF 陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫 Fab (DIF) を患者に投与することと、を含み得る。

【0011】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者を治療するためにジゴキシン免疫 Fab (DIF) を投与する方法は、(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b) アッセイに基づいて、患者が EDLF 陽性であるかどうかを決定することと、(c) 患者が EDLF 陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫 Fab (DIF) を患者に投与することと、を含み得る。

30

【0012】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者を治療する方法は、(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b) アッセイに基づいて、患者が EDLF 陽性であるかどうかを決定することと、(c) 患者が EDLF 陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫 Fab (DIF) を患者に投与することと、を含み得る。

【0013】

一実施形態において、患者の新生児における脳室内出血 (IVH) を予防するために、ジゴキシン免疫 Fab (DIF) を患者に投与する方法は、(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを患者で行うことと、(b) アッセイに基づいて、患者が EDLF 陽性であるかどうかを決定することと、(c) 患者が EDLF 陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫 Fab (DIF) を患者に投与することと、を含み得る。

40

【0014】

一実施形態において、脳室内出血を治療するためにジゴキシン免疫 Fab (DIF) を投与する方法は、(a) ジゴキシン免疫抗体アッセイを、早期分娩される (妊娠40週より前) 結果として胎児が IVH を発症し得る妊娠ヒト患者で行うことと、(b) アッセイに基づいて、患者が EDLF 陽性であるかどうかを決定することと、(c) 患者が EDLF

50

F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0015】

一実施形態において、患者の新生児における脳室内出血 (I V H)を予防するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体アッセイを、早期分娩される(妊娠40週より前)結果として胎児がI V Hを発症し得る妊娠ヒト患者で行うことと、(b)アッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

【0016】

一実施形態において、早産と関連付けられる胎児合併症を治療するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体アッセイを、胎児が早期分娩され得る(妊娠40週より前)妊娠ヒト患者で行うことと、(b)アッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

【0017】

別の実施形態において、早産と関連付けられる胎児合併症は、I V HまたはN E Cを含み得る。

【0018】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者において妊娠を延長させる方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b)アッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0019】

一実施形態において、子癇症または子癇前症の危険性がある患者を治療するための方法は、(a)子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料を得ることと、(b)該試料を抗E D L F抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、(c)抗E D L F抗体または抗体フラグメント-E D L F複合体の存在を検出することと、(d)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0020】

一実施形態において、胎児及び／または新生児にI V Hの危険性がある患者を治療するための方法は、(a)患者から試料を得ることと、(b)該試料を抗E D L F抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、(c)抗E D L F抗体または抗体フラグメント-E D L F複合体の存在を検出することと、(d)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0021】

一実施形態において、子癇症または子癇前症の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a)子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料を得ることと、(b)E D L Fの存在についてアッセイすることと、(c)E D L Fレベルを決定することと、(d)該E D L Fレベルが100nm E D L Fを超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与すること。

【0022】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a

10

20

30

40

50

）妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延を患う患者から試料を得ることと、（b）EDLFの存在についてアッセイすることと、（c）患者がEDLF陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

【0023】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、（a）妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料を得ることと、（b）EDLFの存在についてアッセイすることと、（c）患者がEDLF陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

10

【0024】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、（a）妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料を得ることと、（b）EDLFの存在についてアッセイすることと、（c）EDLFレベルを決定することと、（d）該EDLFレベルが100nm EDLFを超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与することと、を含み得る。

【0025】

一実施形態において、脳室内出血を治療するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法は、（a）ジゴキシン免疫抗体アッセイを、脳室内出血を患う患者で行うことと、（b）アッセイに基づいて、患者がEDLF陽性であるかどうかを決定することと、（c）患者がEDLF陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

20

【0026】

一実施形態において、脳室内出血を治療するための方法は、（a）胎児に脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、（b）EDLFの存在についてアッセイすることと、（c）EDLFレベルを決定することと、（d）該EDLFレベルが100nm EDLFを超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与することと、を含み得る。

30

【0027】

一実施形態において、脳室内出血の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、（a）脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、（b）EDLFの存在についてアッセイすることと、（c）EDLFレベルを決定することと、（d）該EDLFレベルが100nm EDLFを超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与することと、を含み得る。

【0028】

一実施形態において、脳室内出血の危険性がある患者を治療するための方法は、（a）脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、（b）該試料を抗EDLF抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、（c）抗EDLF抗体または抗体フラグメント-EDLF複合体の存在を検出することと、該EDLFの存在が脳室内出血を示す、検出することと、を含み得る。

40

【0029】

一実施形態において、子癇症または子癇前症を治療するためにジゴキシン免疫Fab（DIF）を投与する方法は、（a）ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、（b）アッセイに基づいて、患者がEDLF陽性であるかどうかを決定することと、（c）患者がEDLF陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫Fab（DIF）を患者に投与することと、を含み得る。

【0030】

50

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者を治療するためにジゴキシン免疫F a b (D I F)を投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b)アッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0031】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者を治療する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

10

【0032】

一実施形態において、患者の新生児における脳室内出血(I V H)を予防するために、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0033】

一実施形態において、脳室内出血を治療するためにジゴキシン免疫F a b (D I F)を投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、早期分娩される(妊娠40週より前)結果として胎児がI V Hを発症し得る妊娠ヒト患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

20

【0034】

一実施形態において、患者の新生児における脳室内出血(I V H)を予防するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、早期分娩される(妊娠40週より前)結果として胎児がI V Hを発症し得る妊娠ヒト患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。別の実施形態において、胎児は、妊娠40週より前に分娩され得る。

30

【0035】

一実施形態において、早産と関連付けられる胎児合併症を治療するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、胎児が早期分娩され得る(妊娠40週より前)妊娠ヒト患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

40

【0036】

一実施形態において、子癇症または子癇前症を治療するためにジゴキシン免疫F a b (D I F)を投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体アッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0037】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者を治療するためにジゴキシン免疫F a b (D

50

I F)を投与する方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0038】

別の実施形態において、早産と関連付けられる胎児合併症は、I V HまたはN E Cを含み得る。

【0039】

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者において妊娠を延長させる方法は、(a)ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、(b)イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、(c)患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b (D I F)を患者に投与することと、を含み得る。

【0040】

別の実施形態において、フラグメントは、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、C D R、パラトープ、または抗原を結合することができる抗体の部分であり得る。

【0041】

別の実施形態において、抗ジゴキシン抗体は、キメラ化、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二官能性、または共特異性(c o - s p e c i f i c)であり得る。

【0042】

別の実施形態において、抗ジゴキシン抗体または抗原結合フラグメントは、標識に結合され得る。別の実施形態において、標識は、化学発光標識、常磁性標識、M R I造影剤、蛍光標識、生物発光標識、または放射活性標識であり得る。別の実施形態において、常磁性標識は、アルミニウム、マンガネーゼ、白金、酸素、ランタン、ルテチウム、スカンジウム、イットリウム、またはガリウムであり得る。

【0043】

別の実施形態において、抗ジゴキシン抗体は、固体支持体に結合され得る。別の実施形態において、固相支持体は、ビーズ、試験管、シート、培養皿、ナノワイヤ、または試験片であり得る。さらなる実施形態において、固体支持体は、配列であり得る。

【0044】

一実施形態において、シリコンナノワイヤバイオセンサーは、固定化された抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシンF a b抗体フラグメントを含み得る。さらなる実施形態において、フラグメントは、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、C D R、パラトープ、または抗原を結合することができる抗体の部分であり得る。別の実施形態において、抗体は、キメラ化、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二官能性、または共特異性であり得る。別の実施形態において、バイオセンサーは、生物試料中に少なくとも約100nMのジゴキシンの感受性を有し得る。

【0045】

一実施形態において、E D L Fを検出する方法は、生物試料を、固定化された抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシンF a b抗体フラグメントを含むナノワイヤバイオセンサーと接触させることと、E D L Fの存在についてアッセイすることと、を含み得る。

【0046】

一実施形態において、子癇症または子癇前症の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a)子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料、任意に血液試料を得ることと、(b)該生物試料をナノワイヤバイオセンサーと接触させることを含む、E D L Fの存在についてアッセイすることと、(c)E D L Fレベルを決定することとあって、約100nMを超えるE D L Fレベルが、子癇症または子癇前症の抗ジゴキシン療法に対する応答性を示す、決定することと、を含み得る。

【0047】

10

20

30

40

50

一実施形態において、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、（a）妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料、任意に血液試料を得ることと、（b）該生物試料をナノワイヤバイオセンサーと接触させることを含む、EDLFの存在についてアッセイすることと、（c）EDLFレベルを決定することであって、100 nMを超えるEDLFレベルが、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性を示す、決定することと、を含み得る。

【0048】

一実施形態において、子癇症または子癇前症について患者をスクリーニングするための方法は、（a）子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料、任意に血液試料を得ることと、（b）該生物試料をナノワイヤバイオセンサーと接触させることを含む、EDLFの存在についてアッセイすることと、（c）EDLFレベルを決定することであって、100 nMを超えるEDLFレベルが、子癇症または子癇前症を示す、決定することと、を含み得る。

【0049】

別の実施形態において、試料は、血液、血清、血漿、または胎盤試料であり得る。

【0050】

別の実施形態において、抗ジゴキシン抗体アッセイは、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫組織化学アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Aイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、またはそれらの組合せであり得る。

【0051】

別の実施形態において、EDLFレベルは、100 nM EDLFを超え得る。

【0052】

別の実施形態において、投与されるジゴキシン抗体の投薬量は、少なくとも0.006 mgジゴキシン結合能/Kg未満であり得る。別の実施形態において、投薬量は、6時間以下の期間にわたって投与され得る。

【0053】

一実施形態において、方法は、抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシン免疫Fabの投与をさらに含み得る。別の実施形態において、方法は、その後の投薬量での抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシン免疫Fabの投与をさらに含み得る。別の実施形態において、方法は、治療上有効な量のコルチコステロイドを投与することをさらに含み得る。別の実施形態において、方法は、その後の投薬量での抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシン免疫Fabの投与をさらに含み得る。

【0054】

別の実施形態において、方法は、治療上有効な量の降圧薬を投与することをさらに含み得る。別の実施形態において、降圧薬は、ラベタロール、アルテノロール、ニフェジピン、1-メチルドーパ、ヒドララジン、メチルドーパ（Aldomet）、ラベタロール（NormodyneまたはTrandate）、クロニジン（Catapres）、またはそれらの組合せであり得る。

【0055】

別の実施形態において、方法は、治療上有効な量の硫酸マグネシウムまたはフェニトインを投与することをさらに含み得る。別の実施形態において、ジゴキシン免疫Fabは、ヒツジジゴキシン免疫Fabであり得る。別の実施形態において、用量は、約10.0 mg以下であり得る。別の実施形態において、用量は、約5.0 mg以下であり得る。別の実施形態において、用量は、約0.01~1.0 mgの範囲内であり得る。別の実施形態において、用量は、約0.01 mg~0.5 mgの範囲内であり得る。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0056】

【図1】正常ヒト胎盤から取られた馴化培地を、RIAによってEDLFについてアッセイし（y軸）、ヒト赤血球中でSPを阻害するその能力についてもアッセイした（x軸）。アッセイされたいくつかの培養培地について、2つのアッセイ間に良好な相関があった（ $R=0.69$ 、 $p=0.019$ ）。

【図2】子癇前症の女性（ $n=8$ 、PE）対合併症のない妊娠女性（ $n=8$ 、CTL）からのタンパク質を含まない胎盤ホモジネート中のEDLF濃度の、ラジオイムノアッセイによる比較を描く。未希釈ホモジネートの場合（未希釈、 $p=0.0002$ ）、または連続希釈の場合（1：2希釈 $p=0.002$ 、1：3希釈 $p=0.002$ 、1：4希釈 $p=0.02$ ）、差は統計的に有意であった。

【図3A】ケトコナゾールが胎盤EDLF産生に及ぼす影響を描く。ヒト胎盤を、胎児組織及び母体組織に解剖した。緩衝培養培地中で48時間、勾配濃度のケトコナゾールの非存在下または存在下で、これらをインキュベートした。培養培地を回収し、RIAを使用して、組織から放出されたEDLFの量を測定した。胎児側データ（パネルA）は、カトコナゾール濃度が高くなるにつれて、EDLF産生の有意かつ段階的な減少を示した（ $n=5$ 、 $p<0.001$ 、ANOVA、EDLF値は対照に対して2 μ M以上の全濃度で有意に低かった、ダネットの検定）。母体側データ（パネルB）は、ケトコナゾールにตอบสนองして放出されたEDLFの変化がほとんどないことを示す（ $n=5$ 、 $p<0.51$ 、ANOVA）。

【図3B】ケトコナゾールが胎盤EDLF産生に及ぼす影響を描く。ヒト胎盤を、胎児組織及び母体組織に解剖した。緩衝培養培地中で48時間、勾配濃度のケトコナゾールの非存在下または存在下で、これらをインキュベートした。培養培地を回収し、RIAを使用して、組織から放出されたEDLFの量を測定した。胎児側データ（パネルA）は、カトコナゾール濃度が高くなるにつれて、EDLF産生の有意かつ段階的な減少を示した（ $n=5$ 、 $p<0.001$ 、ANOVA、EDLF値は対照に対して2 μ M以上の全濃度で有意に低かった、ダネットの検定）。母体側データ（パネルB）は、ケトコナゾールにตอบสนองして放出されたEDLFの変化がほとんどないことを示す（ $n=5$ 、 $p<0.51$ 、ANOVA）。

【図4】17-OH-プロゲステロンがヒト胎盤EDLF産生に及ぼす影響を描く。新たに回収したヒト胎盤を解剖し、緩衝培養培地中で48時間、勾配濃度の17-ヒドロキシプロゲステロンの非存在下または存在下でインキュベートした。培養培地を回収し、RIAを使用して、組織から放出されたEDLFの量を測定した。データは、17-ヒドロキシプロゲステロン濃度が高くなるにつれて、EDLF産生の段階的増加を示す（ $n=6$ 、 $p=0.003$ ）。

【図5A】17-OH-プロゲステロンがヒト胎盤EDLF産生に及ぼす影響を描く。新たに回収したヒト胎盤を解剖し、緩衝培養培地中で48時間、勾配濃度の17-ヒドロキシプロゲステロンの非存在下または存在下でインキュベートした。培養培地を回収し、RIAを使用して、組織から放出されたEDLFの量を測定した。データは、17-ヒドロキシプロゲステロン濃度が高くなるにつれて、EDLF産生の段階的増加を示す（ $n=6$ 、 $p=0.003$ ）。

【図5B】17-OH-プロゲステロンがヒト胎盤EDLF産生に及ぼす影響を描く。新たに回収したヒト胎盤を解剖し、緩衝培養培地中で48時間、勾配濃度の17-ヒドロキシプロゲステロンの非存在下または存在下でインキュベートした。培養培地を回収し、RIAを使用して、組織から放出されたEDLFの量を測定した。データは、17-ヒドロキシプロゲステロン濃度が高くなるにつれて、EDLF産生の段階的増加を示す（ $n=6$ 、 $p=0.003$ ）。

【図6】プレグネノロンがヒト胎盤EDLF産生に及ぼす影響を描く。新たに培養したヒト胎盤を、2 μ Mプレグネノロンに様々な期間曝露した。プレグネノロンに曝露された胎盤は、EDLF放出の顕著かつ段階的な低減を示した（ANOVA、 $p<0.001$ 、全ての後次値は、6時間の値と比較して低減した、 $p<0.05$ 、ダネットの検定）。

10

20

30

40

50

【図 7 A】低酸素症がヒト胎盤 E D L F 産生に及ぼす影響を描く。新たに回収したヒト胎盤を解剖し、緩衝培養培地中、正常酸素及び低酸素条件下で 24 時間（パネル A）または 48 時間（パネル B）インキュベートした。培養培地を回収し、R I A を使用して、組織から放出された E D L F の量を測定した。データは、24 時間（ $n = 6$ 、 $p = 0.027$ 、ウィルコクソン）及び 48 時間（ $n = 6$ 、 $p = 0.027$ 、ウィルコクソン）の両方で、低い O_2 圧に反応して放出される E D L F の増加を示した。

【図 7 B】低酸素症がヒト胎盤 E D L F 産生に及ぼす影響を描く。新たに回収したヒト胎盤を解剖し、緩衝培養培地中、正常酸素及び低酸素条件下で 24 時間（パネル A）または 48 時間（パネル B）インキュベートした。培養培地を回収し、R I A を使用して、組織から放出された E D L F の量を測定した。データは、24 時間（ $n = 6$ 、 $p = 0.027$ 、ウィルコクソン）及び 48 時間（ $n = 6$ 、 $p = 0.027$ 、ウィルコクソン）の両方で、低い O_2 圧に反応して放出される E D L F の増加を示した。

【図 8】 H_2O_2 がヒト胎盤 E D L F 産生に及ぼす影響を描く。新たに回収したヒト胎盤を、5 nM の過酸化水素の非存在下または存在下で 48 時間培養した。培養培地を回収し、R I A を使用して、放出された E D L F を測定した。データは、5 nM H_2O_2 に反応して放出された E D L F レベルの増加を示す（ $n = 5$ 、 $p = 0.009$ ）。

【図 9】 $TNF\alpha$ がヒト胎盤 E D L F 産生に及ぼす影響を描く。新たに回収したヒト胎盤を、勾配濃度の $TNF\alpha$ の非存在下または存在下で 48 時間インキュベートした。培養培地を回収し、R I A によって、組織から放出された E D L F を測定した。データは、 $TNF\alpha$ 濃度が高くなるにつれて、E D L F 産生の段階的増加を示す（ $n = 6$ 、 $p < 0.001$ ）。

【図 10】低酸素症が胎盤 R O S 放出に及ぼす影響を描く。ヒト胎盤を、培養培地中、正常酸素及び低酸素条件下で 48 時間インキュベートした。培養培地を回収し、E L I S A を使用して、組織から放出された脂質ヒドロペルオキシド（L P O）の量を測定した。データは、低い O_2 圧に反応して放出された L P O 量の増加を示す（ $n = 6$ 、 $p = 0.01$ ）。

【図 11】 H_2O_2 が胎盤 R O S 放出に及ぼす影響を描く。ヒト胎盤を解剖し、緩衝培地中で 48 時間、勾配濃度の過酸化水素の非存在下または存在下でインキュベートした。培養培地を回収し、E L I S A によって、組織から放出された脂質ヒドロペルオキシド（L P O）の量を測定した。データは、 H_2O_2 濃度が高くなるにつれて、L P O レベルの段階的増加を示した（ $n = 5$ 、 $p = 0.017$ 、A N O V A）。

【図 12】低酸素症が胎盤 $TNF\alpha$ 放出に及ぼす影響を描く。ヒト胎盤を、培養培地中、正常酸素及び低酸素条件下で 48 時間インキュベートした。培養培地を回収し、E L I S A によって、組織から放出された $TNF\alpha$ の量を測定した。データは、低い O_2 圧に反応して放出された $TNF\alpha$ 量の増加を示す（ $n = 6$ 、 $p = 0.03$ 、ウィルコクソン）。

【図 13】 H_2O_2 が胎盤 $TNF\alpha$ 放出に及ぼす影響を描く。ヒト胎盤を緩衝培地中で 48 時間、勾配濃度の過酸化水素の非存在下または存在下でインキュベートした。培養培地を回収し、E L I S A によって使用して、組織から放出された $TNF\alpha$ の量を測定した。変化はなかった（ $n = 5$ 、 $p = 0.91$ ）。

【図 14】 $Digibind$ R I A の標準曲線を描く。ウアバイン濃度（ーログ [ウアバイン] として示される）を増加させることは、 $Digibind$ からの $[^3H]$ -ウアバインの段階的な移動を引き起こした。y 軸は、x 軸上に示されるウアバイン濃度の関数として、固定インキュベーション時間後に測定された放射能のカウントを表示する。

【図 15】モノクローナル抗体 R I A の標準曲線を描く。ウアバイン濃度（ーログ [ウアバイン] として示される）を増加させることは、 $Digibind$ からの $[^3H]$ -ウアバインの段階的な移動を引き起こした。y 軸は、x 軸上に示されるウアバイン濃度の関数として、固定インキュベーション時間後に測定された放射能のカウントを表示する。

【図 16】ジゴキシン免疫 F a b（D I F）治療が E D L F 陽性対象における内因性ジギタリス様因子（E D L F）の除去によるナトリウムポンプ活性の回復に及ぼす影響を描く。E D L F 陽性対象及び陰性対象（15）の両方を含めた元の D E E P 研究に対し、各時

10

20

30

40

50

点で、ジゴキシン免疫F a b (D I F) 治療された女性からの血漿中、より大きくかつより有意なR B C S P活性の増加／E D L Fの低減があった ($t = 12$ 時間: $+7.5\%$ 、 $p = 0.04$; $t = 24$ 時間: $+12.9\%$ 、 $p = 0.0016$; $t = 48$ 時間: $+13.4\%$ 、 $p = 0.047$ 、及び繰り越された最後の観察、すなわち、入手可能な最後の観察: S P活性の $+12.1\%$ 増加、 $p = 0.010$)。プラセボを受けた対象は、変化を示さなかった。

【図17A】ジゴキシン免疫F a b (D I F) 治療対プラセボ (P L B O) が、E D L F陽性対象において入手可能な24～48時間の最後の観察におけるC r C lの変化に及ぼす影響を描く (E D L F+対象: プラセボ-53.2mL/分のC r C l変化対ジゴキシン免疫F a b (D I F)-4.5mL/分のC r C l変化、 $p = 0.005$)。

10

【図17B】循環E D L Fレベルに従って、プラセボを受けるP E女性におけるC r C lの変化を描く。対象がE D L Fを有していないか、低E D L F (1～29%のS P阻害)を有するか、または高E D L F (30%以上のS P阻害)を有するかに応じて対象を層別化した ($p = 0.032$)。

【図18A】F A B、ヤギF A B (対照)、及びB S A (対照) 上のD i G iの存在に対するQ M D x N Wシステムの応答を描く。このシステムの正規化応答は、N W導電率プロファイルの変動を開始する主な原因である。斜交平行カラムは、ベースライン値からの正の偏差を示す。

【図18B】未修飾表面の原子間力顕微鏡表面プロファイル及び対応するF A B修飾表面を描く。

20

【発明を実施するための形態】

【0057】

発明を実施するための形態

本明細書に記載される発明が完全に理解され得るために、以下の詳細な説明が記載される。本発明の様々な実施形態が詳細に説明され、提供される実施例によってさらに説明され得る。実施形態の追加の実行可能な変型は、容易に想定することができる。

【0058】

定義

別途定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を表す。

30

【0059】

本明細書の説明において、及び下記特許請求の範囲にわたって用いられる場合、文脈が別途明確に指示しない限り、「a」、「an」、及び「the」の意味は、複数の指示対象を含む。

【0060】

「約」は、本明細書で用いられる場合、当業者によって理解され、それが用いられる文脈に基づいてある程度異なるであろう。

【0061】

「抗体」は、本明細書で用いられる場合、エピトープに適合し、それを認識する特定形状を有する任意のポリペプチド鎖含有分子構造を広く指し、1つ以上の非共有結合相互作用は、分子構造とエピトープとの間の複合体を安定化する。典型的な抗体分子は、免疫グロブリンであり、全ての源、例えば、ヒト、齧歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ニワトリからのあらゆる種類の免疫グロブリン、I g G、I g M、I g A、I g E、I g Dが「抗体」であると考えられる。抗体には、キメラ抗体、ヒト抗体及び他の非ヒト哺乳類抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体 (s c F v s)、ラクダ抗体、ナノ抗体、I g N A R (サメ由来の一本鎖抗体)、小モジュラー免疫薬 (S M I P)、及び抗体フラグメント (例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂) が含まれるがこれらに限定されない。多くの抗体コード配列が説明され、他は当該技術分野において周知の方法によって挙げられ得る。S t r e l t s o v, e t a l. (2005) P r o t e i n S c i. 14 (11): 2901-9、G r e e n b e r g, e t a l. (1995) N a t u r e 3

40

50

74 (6518) : 168-173、Nuttall, et al. (2001) Mol Immunol. 38 (4) : 313-26、Hamers-Casterman, et al. (1993) Nature 363 (6428) : 446-8、Gill, et al. (2006) Curr Opin Biotechnol. 17 (6) : 653-8を参照されたい。

【0062】

「診断的」は、本明細書で用いられる場合、病態の存在または性質を特定することを広く指す。診断的方法は、それらの感度及び特異性において異なる。診断的アッセイの「感度」は、検査で陽性を示す罹患した個体のパーセンテージである（「真の陽性」のパーセント）。アッセイによって検出されない罹患した個体は、「偽の陰性」である。罹患していない、かつアッセイにおいて検査で陰性を示す対象は、「真の陰性」と呼ばれる。診断的アッセイの「特異性」は、1-偽の陽性率であり、「偽の陽性」率は、検査で陽性を示す疾患のない者の割合として定義される。特定の診断的方法は、状態の確定診断を提供しないことがあるが、この方法が診断を補助する陽性表示を提供することをもって足りる。

10

【0063】

「診断する」は、本明細書で用いられる場合、疾患または症状を分類することと、疾患の重症度を決定することと、疾患の進行を監視することと、疾患の転帰及び／または回復の見通しを予測することと、を広く指す。「検出する」という用語も、前述のいずれかを任意に包含し得る。本発明に従う疾患の診断は、いくつかの実施形態において、対象から得られた生物試料中の本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを決定することによって影響されることがあり、決定されるレベルは、疾患に対する素因、または疾患の存在もしくは非存在と相関し得る。「対象から得られた生物試料」は、対象から物理的に除去されていない試料も任意に含み得ることに留意すべきである。

20

【0064】

「有効量」は、本明細書で用いられる場合、疾患を治療するために患者に投与される場合、疾患のそのような治療をもたらすのに十分な化合物、抗体、抗原、または細胞の量を広く指す。有効量は、予防に有効な量、及び／または防止に有効な量であり得る。有効量は、兆候／症状の発生を低減するために有効な量、防止するために有効な量、兆候／症状の発生の重症度を低減するため、兆候／症状の発生を排除するため、兆候／症状の発生の発達を遅延させるため、兆候／症状の発生の発達を防止するため、及び／または兆候／症状の発生の予防をもたらすために有効な量であり得る。「有効量」は、疾患及びその重症度、ならびに治療される患者の年齢、体重、病歴、感受性、及び既存状態に応じて異なり得る。「有効量」という用語は、本発明の目的で「治療上有効な量」と同義である。

30

【0065】

「イムノアッセイ」は、本明細書で用いられる場合、抗体を使用して特異的に抗原に結合させるアッセイを広く指す。イムノアッセイは、抗原を単離、標的、及び／または定量する特定の抗体の特異的結合特性の使用を特徴とし得る。

【0066】

「単離された」は、本明細書で用いられる場合、それが天然に存在するその元の環境から除去され、したがってその天然環境からヒトの手によって改変された材料を広く指す。単離された材料は、例えば、ベクター系に含まれる外因性核酸、宿主細胞内に含有される外因性核酸、またはその元の環境から除去され、したがってヒトの手によって改変された任意の材料（例えば、「単離された抗体」）であり得る。

40

【0067】

「標識」または「検出可能な部分」は、本明細書で用いられる場合、顕微鏡的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、または他の物理的手段によって検出可能な組成物を広く指す。

【0068】

「哺乳動物」は、本明細書で用いられる場合、皮膚の体毛被覆、及び雌において、子を育てるための乳汁産生乳腺を特徴とする、ヒトを含む哺乳類クラスの任意かつ全ての温血

50

脊椎動物を広く指す。哺乳動物の例には、アルパカ、アルマジロ、カピバラ、ネコ、ラクダ、チンパンジー、チンチラ、ウシ、イヌ、ヤギ、ゴリラ、ハムスター、ウマ、ヒト、キツネザル、ラマ、マウス、非ヒト霊長類、ブタ、ラット、ヒツジ、トガリネズミ、リス、及びバクが含まれるがこれらに限定されない。哺乳動物には、ウシ科、イヌ科、ウマ科、ネコ科、ネズミ科、ヒツジ科、ブタ科、霊長類、及び齧歯類が含まれるがこれらに限定されない。哺乳動物には、ワシントンＤＣにあるスミソニアン自然史博物館によって維持される世界の哺乳類に列挙される任意かつ全てのものも含まれる。

【００６９】

「患者」は、本明細書で用いられる場合、疾患状態を軽減するか、または疾患状態の発生もしくは再発を防止するかのいずれかのために治療を必要とする任意の動物を広く指す。また「患者」は、本明細書で用いられる場合、危険因子、病歴、感受性、症状、兆候を有し、疾患が以前に診断されたか、疾患の危険性があるか、または疾患の患者集団の一員である、任意の動物を広く指す。患者は、ヒト等の臨床患者、または随伴動物、家畜動物、畜産動物、珍しい動物、または動物園動物であり得る。「対象」という用語は、「患者」という用語と交換可能に用いられ得る。

10

【００７０】

「対象」は、本明細書で用いられる場合、本発明に従って治療されるのに適した者を広く指し、限定されないが鳥類及び哺乳類対象を含み、好ましくは哺乳類である。本発明の哺乳動物には、イヌ科、ネコ科、ウシ科、ヤギ科、ウマ科、ヒツジ科、ブタ科、齧歯類（例えば、ラット及びマウス）、ウサギ科、霊長類、ヒトが含まれるがこれらに限定されない。本発明に従って治療されることを必要とする任意の哺乳類対象が適している。両性別及び任意の発達段階（すなわち、新生児、幼児、若年、青年、成人）のヒト対象を、本発明に従って治療することができる。本発明は、獣医目的で、ならびに薬物スクリーニング及び薬物開発の目的で、動物対象、特にマウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、及びウマ等の哺乳類対象で実行されてもよい。「対象」は、「患者」と交換可能に使用される。

20

【００７１】

疾患の「症状」は、本明細書で用いられる場合、患者によって経験され、疾患を示す任意の病的現象または構造、機能、もしくは感覚の正常からの離脱を広く指す。

【００７２】

「治療法」、「治療的」、「治療する」、または「治療」は、本明細書で用いられる場合、疾患を治療すること、疾患もしくはその臨床症状の発達を停止もしくは低減すること、及び／または疾患を緩和し、疾患もしくはその臨床症状の退行を引き起こすことを広く指す。治療法は、疾患、疾患の兆候、及び／または症状の予防、治療、修復、低減、軽減、及び／または緩和の提供を包含する。治療法は、進行中の疾患兆候及び／または症状（例えば、子癇症、子癇前症、及び／もしくは脳室内出血）を有する患者における兆候及び／または症状の軽減を包含する。治療法は、「予防」も包含する。「低減された」という用語は、治療の目的で、兆候及び／または症状の臨床的に有意な低減を広く指す。治療法は、再発または反復性兆候及び／または症状（例えば、子癇症、子癇前症、及び／もしくは脳室内出血）を治療することを含む。治療法は、兆候及び／または症状をいつでも除外すること、ならびに既存の兆候及び／または症状を低減すること、及び既存の兆候及び／または症状を排除することを包含するがこれらに限定されない。治療法は、慢性疾患（「維持」）及び急性疾患を治療することを含む。例えば、治療は、兆候及び／または症状（例えば、子癇症、子癇前症、及び／もしくは脳室内出血）の再発または反復を治療または予防することを含む。

40

【００７３】

E D L F 及び子癇症／子癇前症

高レベルの免疫学的に検出された E D L F は、正常な妊娠及び P E を合併する妊娠の両方で見出されるが、P E の E D L F レベルは、正常な妊娠よりも実質的に高い。

【００７４】

50

内因性ジギタリス様因子 (EDLF) は、高血圧原性であり、妊娠の合併症である子癇前症 (PE) を有する女性の血清及び胎盤中で増加するように思われる。抗ジゴキシン抗体 Fab フラグメント (GlaxoSmithKline から Digibind 及び Digifab として市販) は、EDLF のインビトロ効果及び PE のインビボ特徴を減弱させる。ラジオイムノアッセイ (Digoxin AB RIA) における Digibind または Digifab は、EDLF を測定することができ、このアッセイによって測定された EDLF の量は、EDLF の生体機能アッセイと比較できる。ヒト胎盤は、EDLF の源であり、EDLF を合成し、培養されたヒト胎盤組織の媒質中に放出する。ケトコナゾール、ステロイド合成阻害剤、及び 17-OH プロゲステロンは、それぞれ EDLF 放出を阻害するか、または増加させることが示され、合成経路の重複を証明する。胎盤低酸素症等の PE の異常、活性酸素種の増加、及び炎症性サイトカインの増加は、胎盤 EDLF 放出を増加させることを実証した。PE を媒介すると考えられる因子に応答する EDLF の調節性分泌は、本研究の顕著な進歩を表す。低酸素症、酸化ストレス、及びサイトカインは、全て PE において増加することが示され、本発明者らは、これらの因子が EDLF 産生を調節することを示す。発明者らは、驚くべきことに、ケトコナゾール及び 17 α -ヒドロキシプロゲステロンが EDLF 産生を改変し、したがってそれを使用して EDLF 合成経路を調節できることを発見した。したがって、Digoxin AB は、PE の症状、特に高血圧を改善することができ、PE の治療法で使用され得る。これは、重症の PE 女性における Digibind の臨床試験で最近検査され、正の結果を示した。Adair, et al. (2010) Amer J Perinatol. 27:655-662. 10 20

【0075】

ヒト胎盤における EDLF の合成経路及び調節を決定する。

歴史的に、胎盤は、子癇前症 (PE) の発達に必要な関与因子であると考えられている。胎盤/胎児の除去は、PE の全特徴の急速な回復をもたらす。

【0076】

EDLF は、PE のいくつかの特徴を媒介し得るが、胎盤は、EDLF の源として重視されていなかった。最近の研究は、特に子癇前症の妊娠からの胎盤中の例外的に高いレベルの EDLF を報告した。Hopocate-Sitake, et al. (2011) Reproductive Sci 18:190-199。胎盤は、EDLF を合成し、放出することができる。胎盤組織は、高レベルの 1 つ以上の EDLF を有することが示された。Hopocate-Sitake, et al. (2011) Reproductive Sci 18:190-199。胎盤組織は、EDLF を産生し、放出する。ケトコナゾール、ステロイド合成遮断剤は、胎盤 EDLF 産生を用量依存的に著しく低減したが、ステロイド合成の基質として作用し得る 17-OH プロゲステロンは、EDLF の合成及び放出を増加させた。プロゲステロン自体は、EDLF 産生に対してほとんど、または全く影響を及ぼさないように思われた。これら 2 つのステロイドに対する胎盤応答の差は、胎盤中の 17-ヒドロキシラーゼの非存在と関係し得、プロゲステロンを、中間体としてさえも 17-OH 基を必要とする産生物にさらに処理する胎盤の能力を制限する。Ugelle, et al. (1999) J Steroid Biochem Mol Biol. 71:203-211 を参照されたい。EDLF は、胎盤中で産生され、ステロイド合成に関与する酵素を必要とする。 30 40

【0077】

PE 妊娠において異常レベルで存在することが実証されたいくつかの循環または局所作用する調節化合物。これらのいくつかは、より高レベルの炎症性サイトカイン、低酸素、活性酸素種の増加、及び血管新生促進因子の増加/抗血管新生因子の減少である。腫瘍壊死因子- α (炎症性サイトカイン) は、低濃度の H₂O₂、活性酸素種と同様に、正常なヒト胎盤からの EDLF 放出の著しい増加を引き起こした。低酸素は、EDLF 出力を穏やかに増加させるように思われた。

【0078】

初期の研究は、インターロイキン-6（第2の炎症性サイトカイン）、プレグネノロン（早期ステロイド経路中間体）、胎盤成長因子、血管内皮成長因子（いずれも血管新生促進因子）、及びsFLT-1（抗血管新生の可溶性受容体）を用いて実験を行った。これらの全てはPEにおいて増加し、EDLFがPEにおいて増加した理由を説明する。

【0079】

ヒト胎盤からEDLFを単離し、その化学構造を特徴付ける。

内因性ジギタリス様因子（EDLF）は、体内で産生され、血中で循環する化合物である。EDLFは、高血圧性疾患及び腎機能に關与する。これらの化合物は、最も一般的な形態の高血圧において直接的な役割を有する。Haddy, et al. (1995) "Endogenous digitalis-like factors in hypertension." In Brenner and Laragh (Eds) Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Raven Press, New York, pages 1055-1067, Graves, et al. (1987) Ann Rev Med 38:433-444。EDLFは、子癇前症（PE）において積極的な役割を果たし、これまでの研究は、EDLFが、多くのPE女性において高血圧を媒介し得ることを示唆する。Graves, et al. (1984) J Clin Endocrinol Metab 59:1070-4, Graves (1987) Hypertension 10 (Suppl 2): I-84-6, Graves (2007) Frontiers in Bioscience 12:2438-2446, Goodlin (1988) N Eng J Med 318:518-519, Adair, et al. (1997) Am J Hypertens 10:11A, Adair, et al. (1996) Am J Nephrol 16:529-531、及びAdair, et al. (2009) J Perinatol 29:284-9。

【0080】

EDLFを、Digibindを抗体結合剤として使用し、親和性クロマトグラフィーによってヒト胎盤標本から単離した。限外ろ過技法に加えてEDLFのこの抗体親和性単離は、比較的短い時間に生物学的標本からのEDLFの精製を可能にする。発明者らは、驚くべきことに、合併症のない妊娠であってもヒト胎盤が豊富なEDLFを有することを発見した。EDLFのホモジネートからの抗体分離後に、単離されたEDLFをさらに分離し、HPLCクロマトグラフィー技法によって精製することができ、高度に精製された材料につながる。EDLF構造は、様々な化学分析及び質量分析（MS）によって分析した。

【0081】

ウアバインは、1つのEDLFを表し得るか、または少なくともEDLFに化学的に類似し得る。ウアバインを良好にイオン化し、MSによって分析して、特徴的な溶出時間及び質量スペクトルを提供した。加えて、無傷の分子の良好なフラグメント化は、タンデムMS-MS技法を使用して実現し、構造情報が得られ得ることを確認した。

【0082】

胎盤ホモジネート中に高レベルのEDLFが見出された。EDLFの胎盤産生は、過酸化水素または腫瘍壊死因子 α によって増加した。

【0083】

Digibindを使用してEDLFに選択的に結合させることより、相当量（例えば、約80%）の阻害剤を組織ホモジネートから除去した。限外ろ過を使用して、精製中のある特定の段階でEDLFを放出することにより、最も望ましくない不純物を排除した。次にHPLC分離法を使用して、1つ以上のEDLFをさらに単離し、精製した。EDLFアッセイを使用して、EDLFが分離カラム中から溶出したことを決定した。次に個々のEDLFを回収し、備蓄して、質量分光分析に提出することができる。キャピラリー液体クロマトグラフィーは、いくつかの質量分析計の1つに結合され得る。

【0084】

抗体

抗体は、分子量約23,000ダルトンの2つの同一の軽いポリペプチド鎖（「軽鎖」）及び分子量53,000～70,000の2つの同一の重い鎖（「重鎖」）からなり得る。Edelman (1971) Ann. NY. Acad. Sci. 190:5を参照されたい。「Y」構成のジスルフィド結合によって4つの鎖を接合し、軽鎖は、「Y」構成の口部から始まり重鎖を囲む。「Y」構成の「分枝」部分は、F_{a b}領域と指定され、「Y」構成の幹部分は、F_c領域と指定される。アミノ酸配列の配向は、「Y」構成の上部のN末端から各鎖の底部のC末端に向かう。N末端は、それを誘発した抗原に対して特異性を有する可変領域を有し、約100アミノ酸長であり、軽鎖と重鎖との間及び抗体間でわずかな変化がある。

10

【0085】

可変領域は、各鎖内で、鎖の残りの長さを延長し、特定クラスの抗体内で抗体の特異性によって変化しない定常領域（すなわち、それを誘発する抗原）に結合される。免疫グロブリン分子のクラス（例えば、γ、μ、α、δ、及びε重鎖定常領域に対応するIgG、IgM、IgA、IgD、及びIgE）を決定する定常領域には5つの既知の主要クラスがある。本明細書に記載される抗体及び抗体フラグメントは、ヒト、ヒト化、マウス、ヒツジ、ウシ、またはブタであり得る。本明細書に記載される抗体フラグメントは、Fabフラグメントであり得る。

【0086】

定常領域またはクラスは、補体の活性化(Kabat (1976) Structural Concepts in Immunology and Immunochimistry [2nd Ed.] pages 413~436、Holt, Rinehart, Winston) 及び他の細胞応答(Andrews, et al. (1980) Clinical Immunobiology 1-18、Kohl, et al. (1983) Immunology 48:187)を含む、抗体の後次エフェクター機能を決定するが、可変領域は、それが反応する抗原を決定する。軽鎖は、κ（カッパ）またはλ（ラムダ）のいずれかとして分類される。各重鎖クラスは、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖のいずれかで調製され得る。軽鎖及び重鎖は、互いに共有結合され、免疫グロブリンがハイブリドーマまたはB細胞のいずれかによって生成される場合、2つの重鎖の「尾」部分は、共有ジスルフィド結合によって互いに結合される。

20

30

【0087】

そのような条件下での抗体に対する特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性のために選択される抗体を必要とし得る。例えば、ラット、マウス、またはヒト等の特定種からの精液塩基性タンパク質に対して育成されたポリクローナル抗体を選択し、精液塩基性タンパク質と特異的に反応性であり、精液塩基性タンパク質の多型変異体及び対立遺伝子を除いて、他のタンパク質とは反応性でないそれらのポリクローナル抗体のみを得ることができる。この選択は、他の種からの精液塩基性タンパク質分子と交差反応する抗体を控除することによって実現され得る。多様なイムノアッセイフォーマットを使用して、特定タンパク質と特異的に免疫反応性の抗体を選択することができる。例えば、固相ELISAイムノアッセイを日常的に使用して、タンパク質と特異的に免疫反応性の抗体を選択する。例えば、特異的免疫反応性を決定するために使用できるイムノアッセイフォーマット及び条件の説明については、Harlow & Lane (1998) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratoryを参照されたい。典型的に、特異的または選択的反応は、少なくとも2倍のバックグラウンド信号またはノイズであり、より典型的には約10～100倍超のバックグラウンドである。

40

【0088】

抗体フラグメント

全体免疫グロブリン（またはそれらの組換え対応物）に加えて、エピトープ結合部位を含む免疫グロブリンフラグメント（例えば、Fab'、F(ab')₂、または他のフラ

50

グメント)が合成され得る。「フラグメント」または最小免疫グロブリンは、組換え免疫グロブリン技法を用いて設計され得る。例えば、本発明で使用するための「Fv」免疫グロブリンは、融合された可変軽鎖領域及び可変重鎖領域を合成することによって産生され得る。抗体の複合、例えば、2つの異なるFv特異性を備えるダイアボディも関心対象である。免疫グロブリンの抗原結合フラグメントには、SMIP(小分子免疫薬剤)、ラクダ抗体、ナノ抗体、及びIgNARが含まれるがこれらに限定されない。

【0089】

抗ジゴキシンFab(DIF)は、ジゴキシンジカルボキシメトキシルアミン(DDMA)、ジゴキシン誘導体を選択的に結合するFab抗体フラグメントであり得る。抗ジゴキシンFab(DIF)は、ジゴキシン免疫Fab、Digibind、Digifab、またはそれらの組合せであり得る。抗ジゴキシン抗体は、ジゴキシンを選択的に結合する抗体であり得る。Antman, et al. Circulation 1990; 81:1744、Sinclair, et al. Br J Clin Pharmacol. 1989, 28(3):352-356。

10

【0090】

抗EDLF抗体及びその抗体フラグメントは、本明細書に記載される方法で使用される。抗EDLF抗体及びそのフラグメントは、例えば、WO1994/012210に記載されている。

【0091】

薬学的組成物

20

「薬学的組成物」は、哺乳動物への投与に適した化学的または生物学的組成物を指す。そのような組成物は、口腔、上皮、硬膜外、吸入、動脈内、心臓内、脳室内、皮内、筋内、鼻腔内、眼球内、腹腔内、髄腔内、くも膜下、静脈内、経口、非経口、浣腸または坐薬を介して直腸的、皮下、真皮下、舌下、経皮、及び経粘膜を含むがこれらに限定されない多数の経路の1つ以上を介した投与のために特異的に配合され得る。加えて、投与は、注入、粉末、液体、ゲル、ドロップ、または他の投与手段によって起こり得る。

【0092】

「薬学的賦形剤」または「薬学的に許容される賦形剤」は、活性治療薬が配合される担体、通常は液体である。本発明の一実施形態において、活性治療薬は、本明細書に記載されるヒト化抗体、またはその1つ以上のフラグメントである。賦形剤は、一般に、配合物に対していかなる薬理活性も提供しないが、化学的及び/または生物学的安定性、ならびに放出特徴を提供し得る。例示的な配合物は、例えば、Grennaro(2005)[Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.]において見出され得る。

30

【0093】

薬学的組成物は、典型的に、製造及び保管の条件下で無菌及び安定でなければならない。本発明は、薬学的組成物が凍結乾燥形態で存在することを企図する。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リボソーム、または高い薬物濃度に適した他の秩序構造として配合され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール)を含有する溶媒または分散媒質、及びその適切な混合物であり得る。本発明は、薬学的組成物中の安定剤の包含をさらに企図する。

40

【0094】

本発明の抗ジゴキシン抗体及びそのフラグメントは、様々な投薬形態の薬学的組成物に配合され得る。本発明の薬学的組成物を調製するために、少なくとも1つの抗ジゴキシン抗体、またはその結合フラグメントが、医薬製剤の技術分野における当業者に周知の技法に従って、活性成分として適切な担体及び添加剤と密に混合され得る。Grennaro(2005)[Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.]を参照されたい。例えば、本明細書に記載される抗体は、リン酸緩衝生理食塩水pH7.2中に配合され、5.0mg/

50

m Lの無色透明の液体溶液として供給され得る。

【0095】

同様に、液体調製物のための組成物には、水、アルコール、油、グリコール、保存剤、香味剤、着色剤、及び懸濁剤を含むがこれらに限定されない適切な担体及び添加剤とともに、溶液、エマルジョン、分散液、懸濁液、シロップ、及びエリキシルが含まれる。非経口投与のための典型的な調製物は、無菌水またはポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、レシチン、ラッカセイ油、もしくはゴマ油を含むがこれらに限定されない非経口的に許容される油等の担体とともに活性成分を含み、可溶性または保存を補助するための他の添加剤が含まれてもよい。溶液の場合、粉末に凍結乾燥された後、使用前に速やかに再構成され得る。分散液及び懸濁液の場合、適切な担体及び添加剤には、水性ゴム、セルロース、ケイ酸塩、または油が含まれる。

10

【0096】

列挙される実施形態のそれぞれについて、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントは、多様な投薬形態によって投与され得る。当業者に既知の任意の生物学的に許容される投薬形態、及びその組合せが企図される。そのような投薬形態の例には、無制限に、再構成可能な粉末、エリキシル、液体、溶液、懸濁液、エマルジョン、粉末、顆粒、粒子、微粒子、分散性顆粒、カシェー、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ、粒子吸入剤、インプラント、デポーインプラント、注入剤（皮下、筋内、静脈内、及び皮内を含む）、点滴、及びそれらの組合せが含まれる。

20

【0097】

多くの場合、等張剤、例えば、砂糖、ポリアルコール（マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウム等）を組成物中に含むことが好ましい。注入可能な組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされ得る。さらに、本明細書に記載される組成物は、持続放出配合物中、例えば、徐放性ポリマーを含む組成物中に配合され得る。抗ジゴキシン抗体、またはその抗原結合フラグメントは、インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出製剤等の急速放出に対して化合物を保護する担体で調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、及びポリ乳酸ポリグリコールコポリマー（PLG）等の生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。そのような配合物の調製のための多くの方法は、当業者に既知である。

30

【0098】

当業者は、例えば、本明細書の開示及びGoodman, et al. (2011) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [12th Ed.], Howland, et al. (2005) Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology [2nd Ed.], 及びGolan, (2008) Principles of Pharmacology: The Pathophysiological Basis of Drug Therapy [2nd Ed.]の教示によって導かれる、日常実験を通して投与の有効な投薬量及び頻度を決定することができるであろう。Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.]も参照されたい。

40

【0099】

投与経路

本明細書に記載される組成物は、次の経路、口腔、上皮、硬膜外、点滴、吸入、動脈内、心臓内、脳室内、皮内、筋内、鼻腔内、眼球内、腹腔内、髄腔内、くも膜下、静脈内、経口、非経口、肺、浣腸または坐薬を介して直腸的、皮下、真皮下、舌下、経皮、及び経粘膜のいずれかで投与され得る。好ましい投与経路は、静脈内注入または点滴である。投与は局所であり得、組成物は、疾患の部位（複数可）に直接、その近くに、局所的に、その付近、その部位、その周辺、またはそれに近接して投与され、組成物は、患者に付与さ

50

れ、広範囲にわたって体内を通過し、それによって疾患の部位（複数可）に到達する。局所投与（例えば、注入）は、疾患を包含する、及び／もしくは疾患に影響される細胞、組織、器官、及び／もしくは器官系、ならびに／または疾患の兆候及び／もしくは症状が活性であるか、または起こる可能性がある場所（例えば、胎盤）への投与によって実現され得る。投与は、局所効果を有する局所性であり得る、組成物は、その作用が所望される場所（例えば、胎盤）に直接適用される。

【0100】

列挙される実施形態のそれぞれについて、抗ジゴキシン抗体または抗原結合フラグメントは、当該技術分野において既知の通り、多様な投薬形態によって投与され得る。当業者に既知の任意の生物学的に許容される投薬形態、及びその組合せが企図される。そのような投薬形態の例には、無制限に、チュアブル錠、即溶錠、発泡錠、再構成可能な粉末、エリキシル、液体、溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、多層錠剤、二層錠剤、カプセル、硬ゼラチンカプセル、カプレット、トローチ、チュアブルトローチ、ビーズ、粉末、ガム、顆粒、粒子、微粒子、分散性顆粒、カシェー、ドルシェ、坐薬、クリーム、局所剤、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ、粒子吸入剤、インプラント、デポーインプラント、摂取剤、注入剤（皮下、筋内、静脈内、及び皮内を含む）、点滴、及びそれらの組合せが含まれる。

【0101】

混合物によって含まれ得る他の化合物は、例えば、医学的不活性成分（例えば、固体及び液体希釈剤）、例えば、錠剤またはカプセルのためのラクトース、デキストロースサッカロース、セルロース、デンプン、またはリン酸カルシウム、軟カプセルのためのオリーブ油またはオレイン酸エチル、及び懸濁液もしくはエマルションのための水もしくは植物油；シリカ、タルク、ステアリン酸、マグネシウム、またはステアリン酸カルシウム、及び／またはポリエチレングリコール等の潤滑剤；コロイド粘土等のゲル化剤；トラガカントゴムまたはアルギン酸ナトリウム等の増粘剤；デンプン、アラビアゴム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはポリビニルピロリドン等の結合剤；デンプン、アルギン酸、アルギン酸塩、またはデンプングリコール酸ナトリウム等の崩壊剤；発泡混合剤；染料；甘味料；レシチン、ポリソルベート、または硫酸ラウリル等の湿潤剤；及びそのような配合物に対する既知の添加剤である、保湿剤、保存剤、緩衝剤、及び抗酸化剤等の他の治療上許容される副成分である。

【0102】

経口投与のための液体分散剤は、シロップ、エマルション、溶液、または懸濁液であり得る。シロップは、担体として、例えば、サッカロース、またはグリセロール及び／もしくはマンニトール及び／もしくはソルビトールを有するサッカロースを含有し得る。懸濁液及びエマルションは、担体、例えば、天然ゴム、アガー、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはポリビニルアルコールを含有し得る。

【0103】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明の有効量の抗ジゴキシン抗体及びその抗体フラグメントを含む薬剤投薬量単位を含む1つ以上の容器を含むキットを提供する。キットは、指示、案内、ラベル、マーケティング情報、警告、または情報パンフレットを含み得る。

【0104】

投薬量

本発明の任意の実施形態に従う治療組成物中のEDLF、抗体、及びその抗原結合フラグメントの量は、個体の疾患状態、年齢、性別、体重、患者病歴、危険因子、疾患の素因、投与経路、既存の治療計画（例えば、他の薬剤との考えられる相互作用）、及び体重等の因子によって異なり得る。投薬計画は、最適な治療応答を提供するように調整され得る。例えば、単回ボラスが投与され得るか、いくつかの分割用量が時間をかけて投与され得るか、または危急の治療状況によって示されるように、用量が比例的に低減もしくは増

10

20

30

40

50

加され得る。

【0105】

投与の容易性及び投薬量の均一性のために、投薬量単位形態の非経口組成物を配合することが特に有益である。投薬量単位形態は、本明細書で用いられる場合、治療される哺乳類対象のための単一投薬量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な薬学的担体と関連して所望の治療効果を生み出すように計算された既定量の抗体及びそのフラグメントを含有する。本発明の投薬量単位形態の仕様は、個体における感受性の治療のために、抗体及びそのフラグメントの固有の特徴、及び実現される特定の治療効果、ならびに抗体及びそのフラグメント等の化合技術に内在する制限によって決められ、直接依存する。本発明の抗体及びそのフラグメントまたはその適切な薬学的組成物が有効である哺乳動物（例えば、ヒト）の状態の治療するための治療用途において、本発明の抗体及びそのフラグメントは、有効量で投与され得る。本発明に適した投薬量は、組成物、薬学的組成物、または本明細書に記載される任意の他の組成物であり得る。

10

【0106】

投薬量は、単回用量、2倍用量、3倍用量、4倍用量、及び／または5倍用量として投与され得る。投薬量は、単独で、同時に、及び連続的に投与され得る。

【0107】

投薬形態は、当業者に既知の任意の放出形態であり得る。本発明の組成物は、活性成分の即時放出、または活性成分の持続放出もしくは制御放出を提供するように配合され得る。持続放出もしくは制御放出調製剤において、活性成分の放出は、長時間にわたって（例えば、4～24時間）血中レベルが治療範囲内であるが、毒性レベルより下に維持される速度で起こり得る。好ましい投薬形態には、即時放出、長期放出、拍動放出、可変放出、制御放出、時限放出、持続放出、遅延放出、長時間作用型、及びそれらの組合せが含まれ、当該技術分野において既知である。

20

【0108】

組成物の薬理活性は、当該技術分野において既知の標準薬理学的モデルを使用して監視され得ることを理解されたい。さらに、EDLF、抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物は、部位特異的送達に適したポリマーマトリックスもしくは膜に組み込まれ得るか、またはカプセル化され得、あるいは部位特異的送達を生じさせることができる特定の標的薬剤で官能化され得ることを理解されたい。これらの技法ならびに他の薬物送達技法は、当該技術分野において周知である。特定の状況に対する最適投薬量の決定は、当業者の能力の範囲内である。例えば、Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.] を参照されたい。

30

【0109】

治療方法

本発明は、子癇症または子癇前症を有するか、または子癇症または子癇前症の危険性がある患者が、高レベルのEDLFを有するかどうかを決定することと、EDLF陽性である場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にFabフラグメントを投与することと、を含む、子癇症または子癇前症の治療を提供する。

40

【0110】

また、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者は、EDLFレベルについて試験することができ、EDLF陽性である場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にFabフラグメントを患者に投与する。

【0111】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者は、試料、任意に血液、血清、または胎盤試料を得ることによってEDLFについて試験することができ、免疫アッセイに基づいて、ジゴキシン-免疫抗体免疫アッセイで試料をアッセイして、患者がEDLF陽性であるかどうかを決定し、

50

患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にF a bフラグメントを患者に投与する。

【0112】

また、イムノアッセイに基づいて、ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを患者で行って、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定し、患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にF a bフラグメントを患者に投与することによって患者の新生児における脳室内出血（I V H）を防止することができる。

【0113】

脳室内出血は、治療を必要とする患者において治療することができ、ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、早期分娩される（妊娠40週より前）結果として胎児がI V Hを発症し得る妊娠ヒト患者で行い、イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体F a bフラグメントを患者に投与することと、を含む。

10

【0114】

患者の新生児における脳室内出血（I V H）を防止するために、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与することができ、ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、早期分娩される（妊娠40週より前）結果として胎児がI V Hを発症し得る妊娠ヒト患者で行い、イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にF a bフラグメントを患者に投与することと、を含む。

20

【0115】

早産と関連付けられる胎児合併症を治療するための方法は、ジゴキシン免疫抗体イムノアッセイを、胎児が早期分娩され得る（妊娠40週より前）妊娠ヒト患者で行い、イムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、患者がE D L F陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント、任意にF a bフラグメントを患者に投与することと、を含む。

【0116】

早産と関連付けられる胎児合併症は、I V HまたはN E Cを含み得る。

【0117】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の少なくとも1つの症状を呈する妊娠ヒト患者において妊娠を延長させる方法は、（a）ジゴキシン免疫抗体ラジオイムノアッセイを、子癇症または子癇前症を患う患者で行うことと、（b）ラジオイムノアッセイに基づいて、患者がE D L F陽性であるかどうかを決定することと、（c）患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b（D I F）を患者に投与することと、を含み得る。

30

【0118】

子癇症または子癇前症の危険性がある患者を治療するための方法は、（a）子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料を得ることと、（b）該試料を抗E D L F抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、（c）抗E D L F抗体または抗体フラグメント-E D L F複合体の存在を検出することと、（d）患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b（D I F）を患者に投与することと、を含み得る。

40

【0119】

胎児及び／または新生児にI V Hの危険性がある患者を治療するための方法は、（a）患者から試料を得ることと、（b）該試料を抗E D L F抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、（c）抗E D L F抗体または抗体フラグメント-E D L F複合体の存在を検出することと、（d）患者がE D L F陽性であると決定される場合、ジゴキシン免疫F a b（D I F）を患者に投与することと、を含み得る。

50

【0120】

子癇症または子癇前症の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 患者から試料を得ることと、(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、(c) E D L F レベルを決定することと、(d) 該 E D L F レベルが 1 0 0 n m E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与することと、を含み得る。

【0121】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延を患う患者から試料を得ることと、(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

10

【0122】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料を得ることと、(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

20

【0123】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料を得ることと、(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、(c) E D L F レベルを決定することと、(d) 該 E D L F レベルが 1 0 0 n m E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与することと、を含み得る。

【0124】

脳室内出血を治療するために抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを投与する方法は、(a) ジゴキシン免疫抗体ラジオイムノアッセイを、脳室内出血を患う患者で行うことと、(b) ラジオイムノアッセイに基づいて、患者が E D L F 陽性であるかどうかを決定することと、(c) 患者が E D L F 陽性であると決定される場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗原結合フラグメントを患者に投与することと、を含み得る。

30

【0125】

脳室内出血を治療するための方法は、(a) 胎児に脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、(c) E D L F レベルを決定することと、(d) 該 E D L F レベルが 1 0 0 n m E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与することと、を含み得る。

【0126】

脳室内出血の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、(b) E D L F の存在についてアッセイすることと、(c) E D L F レベルを決定することと、(d) 該 E D L F レベルが 1 0 0 n m E D L F を超える場合、抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントを該患者に投与することと。

40

【0127】

脳室内出血の危険性がある患者を治療するための方法は、(a) 脳室内出血の危険性がある患者から試料を得ることと、(b) 該試料を抗 E D L F 抗体またはその抗体フラグメントと接触させることと、(c) 抗 E D L F 抗体または抗体フラグメント-E D L F 複合体の存在を検出することとであって、該 E D L F の存在が脳室内出血を示す、検出すること

50

と、を含み得る。

【0128】

抗体フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、パラトープ、または抗原を結合することができる抗体の部分であり得る。

【0129】

抗体は、キメラ化、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二官能性、または共特異性であり得る。

【0130】

抗体またはフラグメントは、標識に結合され得る。別の実施形態において、標識は、化学発光標識、常磁性標識、MRI造影剤、蛍光標識、生物発光標識、または放射活性標識であり得る。別の実施形態において、常磁性標識は、アルミニウム、マンガネーゼ、白金、酸素、ランタン、ルテチウム、スカンジウム、イットリウム、またはガリウムであり得る。

10

【0131】

抗体は、固体支持体に結合され得る。固相支持体は、ビーズ、試験管、シート、培養皿、ナノワイヤ、または試験片であり得る。固体支持体は、アレイであり得る。ナノワイヤは、配列され得る。The Hemmila, et al. "Integration of microfluidic sample delivery system on silicon nanowire-based biosensor." Microsysteme. Techol., 2014。抗ジゴキシン抗体は、ナノワイヤバイオセンサー上に固定され得る。

20

【0132】

シリコンナノワイヤバイオセンサーは、固定化された抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシンFab抗体フラグメントを含み得る。フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、パラトープ、または抗原を結合することができる抗体の部分であり得る。抗体は、キメラ化、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二官能性、または共特異性であり得る。バイオセンサーは、生物試料中に少なくとも約100nMのジゴキシンの感受性を有し得る。

【0133】

EDLFを検出する方法は、生物試料を、固定化された抗ジゴキシン抗体、任意に抗ジゴキシンFab抗体フラグメントを含むナノワイヤバイオセンサーと接触させることと、EDLFの存在についてアッセイすることと、を含み得る。

30

【0134】

子癇症または子癇前症の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 子癇症または子癇前症の危険性がある患者から試料、任意に血液試料を得ることと、(b) 該生物試料をナノワイヤバイオセンサーと接触させることを含む、EDLFの存在についてアッセイすることと、(c) EDLFレベルを決定することとであって、約100nMを超えるEDLFレベルが、子癇症または子癇前症の抗ジゴキシン療法に対する応答性を示す、決定することと、を含み得る。

【0135】

妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の危険性がある患者から試料、任意に血液試料を得ることと、(b) 該生物試料をナノワイヤバイオセンサーと接触させることを含む、EDLFの存在についてアッセイすることと、(c) EDLFレベルを決定することとであって、100nMを超えるEDLFレベルが、妊娠性高血圧、子癇前症、子癇症、または子宮内胎児発育遅延の抗ジゴキシン療法に対する応答性を示す、決定することと、を含み得る。

40

【0136】

子癇症または子癇前症について患者をスクリーニングするための方法は、(a) 子癇症

50

または子癇前症の危険性がある患者から試料、任意に血液試料を得ることと、(b) 該生物試料をナノワイヤバイオセンサーと接触させることを含む、EDLFの存在についてアッセイすることと、(c) EDLFレベルを決定することであって、100 nMを超えるEDLFレベルが、子癇症または子癇前症を示す、決定することと、を含み得る。

【0137】

試料は、血液、血清、血漿、または胎盤試料であり得る。

【0138】

抗体イムノアッセイは、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫組織化学アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びタンパク質Aイムノアッセイからなる群から選択されるアッセイであり得る。

【0139】

EDLFレベルは、100 nM EDLFを超え得る。EDLFレベルは、約100、200、300、400、または500 nM EDLFであり得る。EDLFレベルは、約100、200、300、400、または500 nM EDLFを超え得る。

【0140】

投与されるジゴキシン抗体の投薬量は、少なくとも0.006 mgジゴキシン結合能/Kg未満であり得る。投与されるジゴキシン抗体の投薬量は、少なくとも0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、または0.010 mgジゴキシン結合能/Kg未満であり得る。投薬量は、6時間以下の期間にわたって投与され得る。投薬量は、約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、または6時間以下の期間にわたって投与され得る。

【0141】

抗体フラグメントは、0.9% (w/v) 塩化ナトリウム、または脱イオン水中で静脈内投与され得る。抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメントは、ヒト化またはキメラ化され得る。

【0142】

本明細書に記載される治療の方法は、その後の投薬量でのジゴキシン免疫Fabの投与をさらに含み得る。本明細書に記載される治療の方法は、治療上有効な量のコルチコステロイドを投与することをさらに含み得る。本明細書に記載される治療の方法は、その後の投薬量でのジゴキシン免疫Fabの投与をさらに含み得る。

【0143】

本明細書に記載される治療の方法は、治療上有効な量の降圧薬を投与することをさらに含み得る。降圧薬は、ラベタロール、アルテノロール、ニフェジピン、1-メチルドーパ、またはヒドララジンであり得る。

【0144】

本明細書に記載される治療の方法は、治療上有効な量の硫酸マグネシウムまたはフェニトインを投与することをさらに含み得る。ジゴキシン免疫Fabは、ヒツジジゴキシン免疫Fabであり得る。用量は、約10.0 mg以下であり得る。用量は、約5.0 mg以下であり得る。用量は、約0.01~1.0 mgの範囲内であり得る。用量は、約0.01 mg~0.5 mgの範囲内であり得る。用量は、約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 mgであり得る。

【0145】

診断方法

抗EDLF及びその抗体フラグメントは、EDLFの存在または非存在を検出するための診断的方法で使用され得る。抗EDLF抗体及びその抗原結合フラグメントは、(a) 試験試料を、EDLFに結合する抗体またはそのフラグメントと接触させることと、(b)

10

20

30

40

50

）抗体－エピトープ複合体についてアッセイすることであって、該エピトープの存在が癌を示す、アッセイすることと、を含む方法で使用され得る。さらに、抗EDLF抗体及は、（a）EDLFに結合する標識モノクローナル抗体またはそのフラグメントを該患者に投与することと、（b）EDLFの存在を検出することであって、該エピトープの存在が癌を示す、検出することと、を含む、患者におけるEDLFの存在を検出するための方法で使用され得る。抗体－エピトープ複合体は、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫組織化学アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びタンパク質Aイムノアッセイによって検出され得る。試料は、組織検体、リンパ、尿、脳髄液、羊水、炎症性滲出液、血液、または血清である試料であり得る。

10

【0146】

その抗EDLF抗体は、EDLFの存在または非存在を検出するための診断的方法で使用され得、抗原の存在は、子癇症、子癇前症、及び／または脳室内出血を示す。診断の方法は、子癇症、子癇前症、及び／もしくは脳室内出血の危険性がある患者、または症状のない患者に用いることができる。

【0147】

EDLFに選択的に結合する抗体は、組換えであり得る。EDLFに選択的に結合する抗体のフラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、パラトープ、または抗原を結合することができる抗体の部分であり得る。EDLFに選択的に結合する抗体のフラグメントは、キメラ化、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二官能性、または共特異性であり得る。EDLFに選択的に結合する抗体は、限定されないが、化学発光標識、常磁性標識（例えば、アルミニウム、マンガネーゼ、白金、酸素、ランタナム、スカンジウム、イットリウム、またはガリウム）、MRI造影剤、蛍光標識、生物発光標識、または放射活性標識を含む標識に結合される。

20

【0148】

追加として、その抗EDLF抗体は、配列等の固体支持体（例えば、ビーズ、試験管、シート、培養皿、または試験片）に結合され得る。

【0149】

方法は、ポジトロン放出断層撮影（PET）、CCD低光監視システム、x線、CT走査、シンチグラフィ、光共鳴撮像、単光子放射型コンピュータ断層撮影（SPECT）、磁気共鳴撮像（MRI）、超音波、常磁性撮像、及び内視鏡光干渉断層撮影によって、EDLFを撮像することを含み得る。

30

【0150】

EDLFは、子癇症、子癇前症、及び／または脳室内出血のバイオマーカーとして使用され得る。対象の血清等の生物試料中のEDLFの検出は、抗EDLF抗体またはそのフラグメントによって行われ得る。例えば、生物試料（例えば、血清または胎盤試料）を対象から得た後、EDLFを（例えば、ELISAまたはPCRによって）測定し、正常対象からの対応する試料と比較する。測定方法には、核酸検出の任意の方法、例えば、アンチセンスEDLF DNAまたはcRNAオリゴヌクレオチドプローブを使用する原位置ハイブリダイゼーション、超高スループット配列決定、ナノストリング技術、マイクロアレイ、ローリングサークル増幅、近接媒介ライゲーション、PCR、qRT-PCR、ChIP、ChIP-qPCR、またはEDLF結合抗体が含まれる。比較的高レベルのEDLFは、子癇症、子癇前症、及び／または脳室内出血の存在及び／または重症度を示す。

40

【0151】

その抗EDLF抗体は、診断的方法のためのSQUID（超伝導量子干渉計）技法で使用され得る。SQUID技法は、酸化鉄のナノ粒子を抗体に結合することを含み、次にそれらを患者に注入する。例えば、Hao, et al. (2010) Journal of Physics 43:474004を参照されたい。SQUID方法において、次

50

に患者は、超伝導量子干渉計（SQUID）内で、高感度磁気コイルで囲まれる。磁場が生成され、金属ナノ粒子の全てが一方向に整列する。磁場が破壊される場合、ナノ粒子は、弛緩してそれらの元の状態に戻るにつれて電磁信号を発する。信号の強度を測定することによって、いくつかの金属粒子、したがってどれだけのEDLFが存在し得るか、及び患者のどこにEDLFが位置するかを知ることができる。例えば、Shao, et al. (2010) Beilstein Journal of Nanotechnology 1:142-154を参照されたい。

【0152】

試料及び試料の調達

本明細書に記載される方法で使用される試料は、対象（患者）から採取することができ、血液、血清、血漿、胎盤、またはそれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない。診断的アッセイに供する前に、試料を適切な希釈剤で任意に希釈することができる。

【0153】

多くの周知の組織または液体回収方法を用いて、対象における関心対象のマーカーのDNA、RNA、及び／またはポリペプチドのレベルを決定するために、対象から生物試料を回収することができる。組織または流体回収方法の例には、細針生検、針生検、コア細針生検、及び外科的生検（例えば、脳生検）、ならびに洗浄が含まれるがこれらに限定されない。用いられる手順にかかわらず、一旦検体／試料が得られると、マーカーのレベルを決定することができ、したがって診断を行うことができる。

【0154】

EDLFの検出

本発明は、生物試料中の本発明のEDLFを検出するための方法を提供し、生物試料を、本発明に従うEDLFを特異的に認識する抗体と接触させることと、該相互作用を検出することと、を含み、相互作用の存在は、生物試料中のEDLFの存在と相関する。

【0155】

本明細書に記載されるEDLFは、疾患及び／またはそれを示す状態を診断するためのマーカーの非限定例である。本発明の各マーカーは、子癇症、子癇前症、及び／または脳室内出血の予後、予測、スクリーニング、早期診断、進行の決定、治療法選択、及び治療監視を含むがこれらに限定されない様々な用途のために、単独または組合せで用いられ得る。

【0156】

アッセイ

EDLF、抗体、及びEDLFに結合する抗原結合フラグメントをアッセイで使用して、試料中のマーカーを定性的または定量的に検出し、分析することができる。例えば、EDLF、抗体、及びEDLFに結合する抗原結合フラグメントを、ナノワイヤバイオセンサーアッセイで使用して、試料中のマーカーを定性的または定量的に検出し、分析することができる。例えば、抗EDLF抗体が生物試料中でEDLFに結合する場合、抗EDLF抗体は、その導電率を変化させるナノワイヤに付加され得る。さらに、抗ジゴキシン抗体が生物試料中でジゴキシンに結合する場合、抗ジゴキシン抗体は、その導電率を変化させるナノワイヤに付加され得る。ナノワイヤは、配列で並べられ得る。ナノワイヤは、チップに結合され得る。例えば、ジゴキシンを検出するための方法は、生物試料、任意に血液試料を得ることと、生物試料、任意に血液試料を、抗ジゴキシン抗体を含むナノワイヤを含むチップと接触させることと、導電率を測定することとであって、導電率の変化がジゴキシンの存在を示す、測定することと、を含み得る。この方法は、導電率の変化に基づいて、試料中に存在するジゴキシンの量を測定することをさらに含み得る。

【0157】

例えば、EDLF、抗体、及びEDLFに結合する抗原結合フラグメントを、免疫アッセイで使用して、試料中のマーカーを定性的または定量的に検出し、分析することができる。この方法は、EDLFに特異的に結合する抗体を提供することと、試料を抗体と接触させることと、試料中のマーカーに結合された抗体の複合体の存在を検出することと、

を含む。

【0158】

E D L F は、多数の十分に認識された免疫学的結合アッセイのいずれかを使用して検出及び／または定量化され得る。有用なアッセイには、例えば、酵素免疫アッセイ（E I A）、例えば酵素免疫吸着測定法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、ウェスタンブロットアッセイ、またはスロットブロットアッセイが含まれる。例えば、米国特許第 4, 3 6 6, 2 4 1 号、同第 4, 3 7 6, 1 1 0 号、同第 4, 5 1 7, 2 8 8 号、及び同第 4, 8 3 7, 1 6 8 号を参照されたい。一般に、対象から得られた試料は、E D L F に特異的に結合する抗体と接触させることができる。

【0159】

任意に、抗体を固体支持体に固定して、抗体を試料と接触させる前に、複合体の洗浄及び後次単離を促進することができる。固体支持体の例には、例えば、マイクロタイタープレート、ナノワイヤ、スティック、ビーズ、またはマイクロビーズの形態のガラスまたはプラスチックが含まれるがこれらに限定されない。抗体は、固体支持体に結合され得る。

【0160】

試料を抗体でインキュベートした後、混合物を洗浄すると、形成された抗体－マーカー複合体が検出され得る。これは、洗浄した混合物を検出試薬でインキュベートすることによって実現され得る。代替として、試料中のマーカーは、例えば、第 2 の標識抗体を使用して、結合されたマーカー特異的抗体を検出する間接的アッセイを使用して、及び／または例えば、マーカーの別個のエピトープに結合するモノクローナル抗体が混合物と同時にインキュベートされる、競合もしくは阻害アッセイにおいて検出され得る。

【0161】

アッセイ全体で、インキュベーション及び／または洗浄ステップは、各試薬の複合後に必要とされ得る。インキュベーションステップは、約 5 秒～数時間、好ましくは約 5 分～約 2 4 時間で異なり得る。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイフォーマット、マーカー、溶液量、濃度に依存する。通常、アッセイは、周囲温度で実行されるが、それらはある温度の範囲にわたって行われ得る（例えば、1 0 °C ～ 4 0 °C）。

【0162】

イムノアッセイを使用して、対象からの試料中のマーカーの試験量を決定することができる。第 1 に、試料中のマーカーの試験量は、上記のイムノアッセイ方法を使用して検出され得る。マーカーが試料中に存在する場合、上記の適切なインキュベーション条件下でマーカーに特異的に結合する抗体との抗体－マーカー複合体を形成する。抗体－マーカー複合体の量は、標準と比較することによって任意に決定され得る。上記の通り、マーカーの試験量は、測定単位が対照量及び／または信号と比較できる限り、絶対単位で測定される必要はない。いくつかのイムノアッセイは、当該技術分野において既知であり、E D L F 及び本明細書に記載される該抗原に特異的な抗体は、限定されないが、ラジオイムノアッセイ（R I A）、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、磁気イムノアッセイ、イムノブロット、ウェスタンブロット、免疫沈降アッセイ、免疫組織化学分析、及び蛍光活性化細胞分類（F A C S）を含む、そのようなイムノアッセイで使用され得る。Wild, (2008) [Ed.] The Immunoassay Handbook [3rd Ed.] Elsevier を参照されたい。

【0163】

放射性撮像方法

E D L F、抗体、及び E D L F に結合する抗原結合フラグメントは、子癇症、子癇前症、及び／または脳室内出血を診断するために、放射性撮像方法で使用され得る。これらの方法には、ポジトロン放出断層撮影（P E T）、単光子放射型コンピュータ断層撮影（S P E C T）が含まれるがこれらに限定されない。これらの技法の両方は、非侵襲性であり、例えば、子癇症、子癇前症、及び／または脳室内出血を検出する等、様々な組織事象及び／または機能を検出及び／または測定するために使用できる。S P E C T は、任意に 2 つの標識と同時に使用され得る。米国特許第 6, 6 9 6, 6 8 6 号を参照されたい。

【0164】

本明細書で述べられる全ての刊行物（例えば、非特許文献）、特許、特許出願公開、及び特許出願は、本発明が属する技術分野の当業者の技術レベルを示す。全てのそのような刊行物（例えば、非特許文献）、特許、特許出願公開、及び特許出願は、それぞれ個々の公開、特許、特許出願公開、または特許出願が、参照により特異的かつ個々に組み込まれることが示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0165】

本明細書に記載されるものと同様または同等の方法及び材料は、本発明または本発明の試験で使用され得るが、適切な方法及び材料が本明細書に記載される。材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、限定することを意図するものではない。

10

【0166】

ここで一般に説明される本発明は、単に本発明のある特定の態様及び実施形態の説明の目的で含まれ、本発明を限定するものではない次の実施例を参照することによって、より容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0167】

実施例

実施例 1

胎盤ホモジネートの調製。

これらの初期研究のために、分娩直後に胎盤を正常な妊娠及び子癇前症的妊娠の両方から入手し、完全厚切片（約 2 cm × 2 cm × 2 cm）を除去し、液体窒素中で急速冷凍して、後の処理及びアッセイまで -80 °C で保管した。手術用メスを使用して胎盤小片を薄片に削り、組織薄片を、15 個のステンレス鋼球とともに Sartorius Mikro 除膜器ステンレス鋼シリンダーに入れた。内容物を含むシリンダー全体を液体窒素中に 4 ~ 5 分間沈めた。シリンダーの内容物を完全に冷凍した後、シリンダーを Sartorius ボールミルに入れ、2000 rpm で 10 分間振とうした。内容物が微粉末になるまで、浸水及び振とうのプロセスを繰り返した。胎盤ホモジネートを、シリンダーから 50 mL 円錐管に移し、脱イオン化 H₂O を添加することによって容量を最大 5 mL にした。タンパク質を除去するために、2 容量のメタノール（10 mL）をホモジネートに徐々に添加しながら、混合物を連続して 5 分間渦動させた。次に胎盤試料混合物を 10 分間 4000 rpm で遠心分離し、沈殿したタンパク質を除去した。上清を新たな円錐管に移し、真空で終夜乾燥させて残留メタノールを除去した。次に、脱イオン化 H₂O を使用して、容量を元の容量の 5 mL に戻した。胎盤ホモジネートを、さらなる処理及びアッセイのために -80 °C で保管した。

20

30

【0168】

胎盤外植片培養物及び馴化培地の回収

これらの研究のために、分娩直後に合併症のない妊娠から胎盤を入手し、4 ~ 5 個の小組織片（約 5 mm × 5 mm × 5 mm）を内部胎児側から切除した。組織片を滅菌したはさみで小片に切断した。目に見える血栓及び血管はどれも滅菌したピンセットで除去した。残りの絨毛を PBS で繰り返し洗浄し、絨毛間腔から血液を除去した。次に約 5 mg / ウェルの絨毛組織を、滅菌した紙タオルで軽く押さえて水気を切り、1 ウェル当たり 100 U / mL ペニシリン、100 µg / mL ストレプトマイシン、及び 0.25 µg / mL アンフォテリシン B（Sigma, St. Louis, MO, USA）を含有する 5 mL の無血清 DMEM（Gibson, Grand Island, NY, USA）を含む 6 ウェル細胞培養プレート中、37 °C で 48 時間、95 % 空気及び 5 % CO₂ で満たされたインキュベーター内でインキュベートした。

40

【0169】

ケトコナゾール（Sigma, St. Louis, MO, USA、1 µM、2 µM、5 µM、10 µM、20 µM）、17 α-ヒドロキシプロゲステロン（Sigma, St. Louis, MO, USA、200 nM、500 nM、1 µM、2 µM）、またはプレグ

50

ネノロン (Steraloids Inc., Newport, RI, USA, 2 μ M)、ヒト腫瘍壊死因子 α (TNF- α , Sigma, St. Louis, MO, USA, 1 nM、2 nM、5 nM、10 nM、20 nM) または過酸化水素 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA, 1 nM、5 nM、10 nM、20 nM) を、インキュベーションの開始時に個々に組織培養物に添加した。経時変化実験 (6 時間、12 時間、24 時間、36 時間、及び 48 時間) を行い、可能性のある基質 17 α -ヒドロキシプロゲステロンの影響を研究した。低 O_2 培養実験のために、培養プレート (2% 酸素、5% 二酸化炭素、93% 窒素 (Airgas Acugrav (登録商標), Salt Lake City, UT, USA) を含有するガスを毎日流した可搬式空気室 (Billups-Rothernberg, Del Mar, CA, USA) に最大 48 時間入れた。空気室を、37 $^{\circ}$ C を維持するために、標準インキュベーター内に収容した。インキュベーションの最後に、培養培地の試料を 15 mL 円錐管内に回収し、4000 RPM で 2 分間遠心分離することによって、残留絨毛を全て除去した。上清を馴化培地として最後の処理及びアッセイまで -80 $^{\circ}$ C で保管した。

10

【0170】

ジゴキシン免疫抗体ラジオイムノアッセイ (RIA)

均質化及び組織培養プロセスの後、ホモジネート及び馴化培地試料を回収し、ラジオイムノアッセイによってアッセイした。Digibind (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC, USA) を、一次抗体抗 EDLF/ウアバインとして使用し、ウサギ抗ヒツジ免疫グロブリン (IgG) Fab フラグメント抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) を、二次抗体として使用した。Digifab (Protherics/BTG, London, England) もまた、アッセイで一次抗体として使用され得、Digifab 及び Digibind の生物学的同等性に起因して同様の結果を生成することが予想される。Digibind 及び Digifab は、ヒツジにおいて産生され、ヒトにおいてジゴキシンの過剰摂取に対抗するために治療的に使用される抗ジゴキシン抗血清の Fab フラグメントを表す。トリチウム化ウアバイン (30.0 Ci/mmol, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) をトレーサーとして使用した。勾配濃度の冷ウアバイン溶液を標準として使用した。100 μ L 分量の標本または標準ウアバイン溶液 (50 nM、0.1 μ M、0.2 μ M、0.5 μ M、1 μ M、3 μ M)、プラス 50 μ L の 2.22 $\times 10^{-8}$ M トリチウム化ウアバイン溶液、300 μ L の 1.8 μ g/mL Digibind 溶液、60 μ L の 2.12 $\times 10^{-7}$ M 2 $^{\circ}$ Ab 溶液、及び 10 μ L の 10 mM pH 7.4 トリス緩衝液を複合し、十分に混合した後、室温で終夜インキュベートして、抗原-抗体結合を許した。馴化培地のアッセイの場合、試料が DMEM 培地を含有するため、100 μ L の DMEM を各標準の反応溶液に添加し、100 μ L の脱イオン化 H₂O を標本の反応溶液に添加して、それらを同じ容量にした。いくつかの馴化培地/ホモジネート標本または較正溶液中の標準冷ウアバイン中の EDLF は、Digibind の標識ウアバインと競合し、次に二次 (2 $^{\circ}$) 抗体を添加して、一次 (1 $^{\circ}$) 抗体-抗原複合体に結合し、その溶解性を減少させた。終夜のインキュベーション後、563 μ L の 16% ポリエチレングリコール (PEG) -6000 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) を各反応溶液に添加し、抗体-抗原複合体を沈殿させた。13,200 rpm で 30 分間の遠心分離後、上清を破棄し、ペレットを 500 μ L の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に再懸濁した。次に、4 mL の Ecoscint TM、シンチレーション流体 (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) を再懸濁した溶液に添加し、混合物をシンチレーションカウンターによって測定して、EDLF 濃度を決定した。全ての個別標本を 2 回アッセイした。

20

30

40

【0171】

プロゲステロン実験

Digoxin AB RIA の結果が EDLF レベルを表したことを保証するために、

50

主な胎盤ステロールであるプロゲステロンの効果をアッセイで試験した。勾配濃度の20 μL 容量のプロゲステロン溶液（最終濃度 $1.00 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 $1.00 \times 10^{-8}\text{M}$ 、及び $1.00 \times 10^{-7}\text{M}$ ）、100 μL の脱イオン化 H_2O 、100 μL の馴化培地試料、50 μL のトリチル化ウアバイン溶液、300 μL のDigibind溶液、60 μL の2°Ab溶液、及び10 μL の10mM pH7.4トリス緩衝液を複合し、十分に混合した。プロゲステロン溶液の代わりに20 μL の脱イオン化 H_2O を含有する反応溶液を、負の対照として使用した。混合溶液をインキュベートし、沈殿させて、Digoxin AB RIA手順に記載の通り分析した。

【0172】

脂質ヒドロペルオキシド及びTNF α 決定アッセイ

10

過酸化水素で、または低 O_2 条件下で培養された胎盤外植片からの馴化培地を回収し、脂質ヒドロペルオキシド（LPO）アッセイキット（Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA）及びヒトTNF- α Quantikine ELISAキット（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）によって製造者の方法に従ってアッセイし、脂質酸化のレベルを決定した。

【0173】

ルビジウム（ Rb^+ ）取込みの黒鉛炉原子吸光分析（GFAA）

これは、EDLFの機能的バイオアッセイを表す。培養された胎盤組織から放出されたEDLFを含有する馴化培地を、上記の通りDigoxin AB RIAによってアッセイし、見掛けEDLF濃度を決定した。同時に、同じ試料を、細胞 Rb^+ の取込みによって、黒鉛炉原子吸光装置（GFAA、モデル4100Z、Perkin Elmer, Waltham, MA, USA）を使用してアッセイし、新鮮なヒト赤血球（RBC）への $[\text{Na}^+, \text{K}^+]$ ATPase依存性 Rb^+ 輸送を測定した。ウアバインをこのアッセイで使用し、 $[\text{Na}^+, \text{K}^+]$ ATPase活性の完全阻害を実現した。妊娠していない健康な志願者から血液を採取し、EDTAを含有する管に入れ、室温で1時間放置し、4000 rpm、4℃で10分間遠心分離して血漿を除去した。残りのRBCを2容量（10 mL）のRbCl緩衝液（NaCl 135 mmol/L、RbCl 6.73 mmol/L、 NaH_2PO_4 8.10 mmol/L、 Na_2HPO_4 1.27 mmol/L、及び MgCl_2 1.0 mmol/L、pH7.45を含有し、 K^+ を省く）で3回洗浄し、4000 rpm、4℃で10分間遠心分離することによって細胞再開集する前に、5分間渦動させた。洗浄後、10%ヘマトクリット（Hct）RBC溶液を調製し、800 μL のこの10% Hct RBC溶液、100 μL の馴化培地試料または対照（ $1.00 \times 10^{-3}\text{M}$ 最終濃度のウアバイン）を、100 μL のDigibind溶液（ $1.00 \times 10^{-6}\text{M}$ 最終濃度）の有無にかかわらず、エッペンドルフ管内で混合し、37℃、220 rpmで、45分間インキュベーター内で揺らして、 Rb^+ イオンの細胞への取込みを許した。インキュベーション後、各バイオアッセイ溶液を4000 rpmで10分間遠心分離し、RBCをRbCl緩衝液から単離した。次に1 mLの氷冷洗浄緩衝液（塩化コリン149 mmol/L、 MgCl_2 1.0 mmol/L、MOPS 5.8 mmol/L、トリス2.12 mmol/L、pH7.40を含有する）を添加することによってRBCを洗浄し、再度遠心分離して残余細胞外 Rb^+ を除去した。この洗浄プロセスを3回繰り返した。脱イオン化 H_2O の添加によって細胞を溶解し、遠心分離して細胞ゴースト除去し（4000 rpm）、-80℃で終夜保管した。次にGFAA装置の標準走査によって Rb^+ の細胞への取込みを測定し、EDLFが $[\text{Na}^+, \text{K}^+]$ ATPase媒介性イオン輸送を阻害する能力を決定した。GFAAステップの前に、10 μL のRBCから単離されたシトソルを、脱イオン化 H_2O で500 μL に希釈し、 Rb^+ イオン定量化のために、そこから10 μL をGFAAのオートサンプラーが注入した。全ての試料を3回アッセイした。

【0174】

統計分析

結果は、平均+1 SEMとして報告される。Digoxin AB RIAによって測定

50

されたEDLFと、GFAA Rb⁺イオン取込みアッセイによって測定されたEDLFとの比較を、ピアソンの積率相関係数分析によって行った。時間または濃度が胎盤組織からのEDLF放出に及ぼす影響を、ダネットの対比較を用いてANOVAによって分析した。2つの群が関与する比較は、両側スチューデントt検定によって行った。p値<0.05を有意と見なした。

【0175】

結果

SP阻害剤またはEDLFは、胎盤ホモジネート中に存在し、PEを有する女性からの胎盤においてより多い量が観察された。胎盤はEDLFを産生する。胎盤外植片がEDLFを放出できるかどうかを決定し、次に任意のそのような材料を、それがSPを阻害する能力及び複雑なEDLFに対するジゴキシン抗体Fabフラグメント(DigoxinAB)と相互作用する能力の両方によって認識され得るかどうかについて試験した。これを実現するために、第1の作業は、EDLFに結合することが示されたジゴキシン抗体Fabフラグメント、Digibindを使用するイムノアッセイを開発することであった。

【0176】

Digibindを用いるEDLF特異的イムノアッセイ

DEEP試験と呼ばれる臨床試験は、増加した血清EDLFレベルを有する子癇前症女性が、プラセボ治療と比較して、Digibindによる臨床効果を経験したことを見出した。Graves, et al. (2007) Frontiers in Bioscience 12:2438-2446。さらに、最近の研究では、Digibindによって結合され、不活性化されたPEを有する女性からの血清及び胎盤の両方に存在するEDLFも指摘している。Menezes, et al. (2003) Amer J Hypertens 16:1062-1065。Digibindは、PEに見出される活性EDLFを認識し、結合し得るため、Digibindを一次抗体として使用するラジオイムノアッセイ(RIA)を使用してPEを検出することができる。このアッセイは、観察可能な血清EDLFを有し、結果的にDigoxinAB(抗ジゴキシン抗体)治療に対して好ましく応答するはずである女性を特定するプローブとして、すなわち、どの女性がDigoxinABによる治療から恩恵を受けるかを予測するための治療診断的試験として機能し得る。トリチル化ウアバインをトレーサーとして使用し、勾配濃度の非放射性標識ウアバインを標準として使用し、標準曲線を発達させた。

【0177】

上記DigoxinAB RIAを使用して、PEを有する妊娠女性の血清中のEDLFを測定した。一部の女性は、他より実質的に高い濃度のEDLFを有していた。このアッセイは、胎盤ホモジネート中のEDLFの測定にも良好に適用された。

【0178】

この新規のDigoxinAB RIAを使用して、DigoxinAB RIA、及び赤血球Rb取込みのSP阻害の両方によってアッセイされた11個の馴化培地標本は、これら2つのアッセイ間に有意な相関があったことを実証した(図1、R=0.69、p=0.019)。

【0179】

データは、PEを有する女性からのタンパク質欠失胎盤ホモジネートが、PE血清中で見出されるより高い、時にははるかに高いEDLFレベルを有するように思われた。この観察は、胎盤がEDLFの源であり得ることを示唆した。PE血清で見出されたように、一部の妊娠女性は、他より実質的に高いEDLFの胎盤濃度を有していた。さらに、PEを有する女性からの胎盤ホモジネート中のEDLF濃度と、合併症のない妊娠女性からのものとの比較は、PE胎盤が、組織EDLFレベルを増加させたことを示し、正常モノジネートとPEホモジネートとの間のこの差は、標本を連続希釈しても依然として有意であった(図2、未希釈血清、PE32.88±14.63対CTL7.44±1.15×10⁻⁸M ウアバイン当量、p=0.0002; 1:2希釈、PE20.76±11.29対CTL6.28±0.85×10⁻⁸M ウアバイン当量、p=0.002; 1:3

希釈、PE 16.96 ± 9.12 対 CTL 5.04 ± 0.50 × 10⁻⁸ M ウアバイン当量、p = 0.002、1:4 希釈、PE 15.61 ± 11.47 対 CTL 4.17 ± 0.54 × 10⁻⁸ M ウアバイン対照、p = 0.02)。この研究及び2つのアッセイの以前の比較は、胎盤がEDLF源であること、及びDigibindを抗体として用いるDigoxinAB RIAが、胎盤中のEDLFを適切に測定し、適正感度を有することの証拠を提供する。

【0180】

最後に、新たに外植された正常ヒト胎盤の培養培地中に分泌されたEDLFも評価することができた。正常胎盤培養物からの媒質中のEDLF濃度は、PE血清中に見出されるものの範囲内であった。

10

【0181】

胎盤中のEDLF合成及び合成経路

胎盤をPEにおけるEDLF源として特定することに加えて、その組織産生に関するさらなる理解を提供することも関心対象であり、どの経路がその産生に関与し得るかの表示を含む。EDLFはステロイドであり、結果としてその合成経路は、ステロイド合成経路とステップを共有し得る。これらの経路の既知の基質があり、関与する酵素のいくつかを遮断することができるいくつかの薬剤もある。

【0182】

EDLFがステロイド合成経路におけるステップを必要としたかどうかを決定するために、ステロイド合成を遮断する薬剤であるケトコナゾールを使用する実験を行った。Aguananne, et al. (2011) Am J Perinatol 28:509-514、Graves, et al. (1993) J Cardiovasc Pharmacol 22(S2):S54-S57。この薬物が外植胎盤組織に適用された場合、用量依存的にEDLF産生及び培養培地中への放出の顕著な低減を引き起こした。正常ヒト胎盤の胎児組織において、ケトコナゾールに応答するEDLF産生の有意な減少があったが(図3A、それぞれ漸増濃度のケトコナゾールを用いる、(1.0 µM) 7.99 ± 13.21、(2.0 µM) 5.58 ± 8.91、(5.0 µM) 1.60 ± 1.62、(10.0 µM) 1.47 ± 1.64、(20.0 µM) 1.25 ± 1.43 対対照レベル 17.78 ± 33.21 × 10⁻⁸ M RIA ウアバイン当量；分数変化のANOVA、p < 0.001)、母体組織は、これらの条件下で実質的に少ない産生を示し、ほとんど変化がないか、またはむしろ未治療の組織と比較して48時間のケトコナゾール治療によりEDLF産生のわずかな増加を示した(図3B、それぞれ漸増濃度のケトコナゾールを用いる、(1.0 µM) 1.90 ± 2.05、(2.0 µM) 1.79 ± 1.96、(5.0 µM) 1.83 ± 2.03、(10.0 µM) 1.73 ± 1.82、(20.0 µM) 2.46 ± 2.60 対対照 1.23 ± 1.41 × 10⁻⁸ M RIA ウアバイン当量；分数変化のANOVA、p = 0.51)。基底胎児EDLFレベルは、基底母体レベルより高かった(p = 0.03)。これらの結果は、ケトコナゾールがEDLF産生及び放出に対して顕著な阻害効果を有することを確認する。

20

30

【0183】

EDLF産生がステロイド合成に使用される酵素を必要とするかどうかを評価する試みにおいて、発明者らは、ステロイド合成の前駆体または中間体として機能し得る、したがってEDLF合成及び放出を増加させ得る作用因子を試験した。2つの可能性のあるステロイド前駆体を試験し、療法の合成経路に共通するステップを特定した。勾配濃度の17α-ヒドロキシプロゲステロン(17P)を胎盤組織培養物に適用した。胎盤は17-加水分解酵素を欠失することが報告されているため、この特定のステロイドを選択した。図4は、48時間の17P治療が、高レベルのEDLFを培養培地中に用量依存的に放出したことを示す(それぞれ漸増濃度の17Pを用いる、(0.20 µM) 3.60 ± 1.06、(0.50 µM) 3.76 ± 0.84、(1.0 µM) 4.40 ± 1.12、(2.0 µM) 4.91 ± 1.52 対対照 2.28 ± 0.41 × 10⁻⁸ M ウアバイン当量；ANOVA、p = 0.003、濃度1.0及び2.0 µMが対照より有意に多い、ダネッ

40

50

トの検定)。EDLF合成におけるその役割をさらに特徴付けるために、最適濃度(2.0 μ M)の17Pを使用して時間依存的実験も行った。17Pの非存在下の対照標本は、媒質中のEDLFが、より長いインキュベーション時間で増加したことを示した(図5A、 $n=5$ 、6時間8.76 $\pm$ 2.56、12時間23.70 $\pm$ 6.92、24時間39.32 $\pm$ 14.76; 36時間67.59 $\pm$ 26.89、48時間81.38 $\pm$ 18.77 $\times 10^{-8}$ M ウアバイン当量、ANOVA、 $p<0.001$)。さらに、培養培地への17Pの添加は、培養物中のEDLFの蓄積を時間依存的に増強し、対照と比較して各時点で有意に多くのEDLFを産生した(図5B、 $n=5$ 、6時間12.60 $\pm$ 3.81、12時間28.30 $\pm$ 6.30、24時間55.39 $\pm$ 33.62、36時間95.00 $\pm$ 40.44、48時間132.43 $\pm$ 74.37 $\times 10^{-8}$ M ウアバイン当量、傾向の場合 $p<0.001$ ANOVA、17PのAUC対17PなしのAUCの効果比較の場合 $p=0.03$)これらの結果は、17Pが胎盤EDLF合成を調節することを立証する。

【0184】

多くのステロイドの早期前駆体であるプレグネノロンを用いる実験を行った。これらの実験は、2 μ Mプレグネノロンへの6時間の曝露後に胎盤EDLF産生の顕著な低減を示した。馴化培地中のEDLF濃度は、 $n=5$ 、6時間325.6 $\pm$ 61.0 $\times 10^{-8}$ M; 12時間136.1 $\pm$ 27.7 $\times 10^{-8}$ M; 24時間148.4 $\pm$ 15.1 $\times 10^{-8}$ M; 36時間113.6 $\pm$ 14.4 $\times 10^{-8}$ M; 48時間48.5 $\pm$ 7.4 $\times 10^{-8}$ M; $p<0.001$ ANOVAであり、全ての他の値は、6時間値と比較して著しく低減した、 $p<0.05$ 、ダネットの検定。図6を参照されたい。この特定薬剤の場合、より早い時点も評価した。プレグネノロン治療前、次に2 μ Mプレグネノロンへの曝露から3時間及び6時間後に馴化培地を回収した。馴化培地中の量は、これら3つの時点にわたって明らかに変化しなかったが、結果は変動的であった。全体として、わずかなが重要でないEDLFの減少があった($n=5$)。プレグネノロン前81.3 $\pm$ 13.7 $\times 10^{-8}$ M、3時間77.4 $\pm$ 25.0 $\times 10^{-8}$ M、6時間76.8 $\pm$ 35.0 $\times 10^{-8}$ M ウアバイン当量、 $p>0.05$ 。

【0185】

胎盤からのEDLF放出の調節

PEは、多くの異常を伴う。それらの中で、胎盤低酸素症、活性酸素種の産生増加、及びより高い局所及び循環レベルの炎症性サイトカインが機序的に重要であると考えられる。

【0186】

以前の研究は、低酸素症がPEの発達に寄与することを示唆したため、21% O_2 下で培養された組織と比較して低い O_2 条件下で胎盤組織を培養し、次に培地中のEDLFレベルを測定し、治療を対照と比較した。図7A及び7Bは、低酸素症が、24時間及び48時間インキュベーション後ともに、EDLF産生及び培養培地中への放出を最小限刺激したことを示す(24時間: 2% O_2 7.00 $\pm$ 1.62対21% O_2 5.94 $\pm$ 1.09 $\times 10^{-8}$ M ウアバイン当量、 $p=0.028$ ウィルコクソン検定; 48時間: 2% O_2 3.45 $\pm$ 0.66対21% O_2 2.92 $\pm$ 0.59 $\times 10^{-8}$ M ウアバイン当量、 $p=0.028$ 、ウィルコクソン)。変化は、統計的に有意であるか、または統計的p値カットオフであった。

【0187】

酸化ストレスがPE中で増加することが示されたため、活性酸素種である過酸化水素を使用し、培養物中の胎盤組織を治療し、媒質をアッセイして媒質へのEDLF放出に対する効果を明らかにした。勾配濃度の H_2O_2 で治療された6個の個々の胎盤から得た標本を分析することによって、5 nMの H_2O_2 は、最大EDLF産生及び放出を誘導する量であることを見出した。この濃度は、未治療の胎盤からの馴化培地と比較して、2倍近くの放出EDLF量をもたらした(図8、4.87 $\pm$ 1.57対2.82 $\pm$ 0.60 $\times 10^{-8}$ M ウアバイン当量、 $p=0.009$)。より高い濃度(10 nM、20 nM)のH

2O_2 で治療された培養胎盤の培地において、EDLF レベルは、 $5\text{ nM H}_2\text{O}_2$ で治療されたものに等しいか、またはわずかに低かった。これらの観察は、 H_2O_2 が EDLF 産生に及ぼす影響が、恐らく組織損傷または EDLF の損傷にも起因して、より高い濃度で平坦化し、さらなる影響または悪影響も有しない。

【0188】

TNF α を使用する実験を行い、胎盤 EDLF 産生に及ぼすその影響を試験した。アッセイデータは、48 時間の TNF α 治療後、培養培地中に放出された EDLF のレベルが著しく増加し、この影響が TNF α 濃度に依存していたことを示した (図 9) : $n = 6$ 、
(1.0 nM) 2.41 ± 0.80 、(2.0 nM) 2.75 ± 0.98 、(5.0 nM) 2.76 ± 0.80 、(10.0 nM) 3.51 ± 0.69 (20.0 nM) 4.47 ± 0.99 対 TNF α なしの対照 $1.96 \pm 0.64 \times 10^{-8}\text{ M}$ ウアビン当量 ; $p < 0.001$ 、2 つのより高い濃度は、対照より著しく高い、 $p < 0.05$ 、ダネットの検定)。これらの結果は、TNF α がいくつかの他の変化を媒介する TNF α に加えて、EDLF 放出の増加をもたらすことを立証する。

【0189】

低酸素症及び酸化ストレスが脂質過酸化及びヒト胎盤からの TNF α 放出に及ぼす影響

本明細書で論じられるように、潜在的に低 O_2 圧、及び確実に低い濃度の H_2O_2 は、高い EDLF レベルを誘導した。PE 中の胎盤細胞膜修飾に対するこれらの因子の役割をさらに評価するために、脂質ヒドロペルオキシドイムノアッセイを使用して、低 O_2 または H_2O_2 で治療した胎盤培養培地中の脂質過酸化を定量した。図 10 は、低酸素圧対正常酸素レベルが脂質ペルオキシドに及ぼす影響をまとめている ($n = 6$ 、正常 O_2 5.85 ± 3.11 対低 O_2 $10.30 \pm 5.72\text{ }\mu\text{M}$; $p = 0.01$)。図 11 は、胎盤が段階的濃度の H_2O_2 (図 11、 $n = 5$ 、それぞれ (1.0 nM) 6.62 ± 3.31 、(5.0 nM) 9.17 ± 3.18 、(10.0 nM) 11.43 ± 3.67 、(20.0 nM) 13.13 ± 5.04 対対照 $5.05 \pm 2.69\text{ }\mu\text{M}$ 脂質ペルオキシド ; ANOVA、 $p = 0.017$ 、最高の 2 つの濃度は対照とは著しく異なる、 $p < 0.05$ 、ダネットの検定)。しかしながら、2% O_2 及び $5\text{ nM H}_2\text{O}_2$ の脂質過酸化のレベルは、非常に類似しており、レベルは低 O_2 に対してわずかに高いだけである。

【0190】

胎盤 TNF α 産生に対する低酸素症及び酸化ストレスの相互作用

TNF α イムノアッセイを使用して、48 時間の低 O_2 (2%) または 48 時間の $5\text{ nM H}_2\text{O}_2$ のいずれかに応答するヒト胎盤の培養培地中の TNF α 濃度を測定した。図 12 は、48 時間の低 O_2 治療が、正常 21% 酸素条件下でインキュベートされた培地より多くの TNF α 放出を誘導したことを示すが ($n = 6$ 、 126.80 ± 249.61 対 $19.01 \pm 10.16\text{ pg/mL}$; $p = 0.03$ 、ウィルコクソン検定)、図 13 に示されるように、段階的に増加する濃度の H_2O_2 を添加することによる TNF α 放出の著しい増加はなかった、 $n = 5$ 、(1.0 nM) 18.61 ± 13.60 、(5.0 nM) 14.95 ± 6.39 、(10.0 nM) 15.83 ± 6.63 、(20.0 nM) 13.50 ± 3.43 対対照 $15.13 \pm 3.98\text{ pg/mL}$; $p = 0.90$)。

【0191】

考察

EDLF は、本態性及び実験的高血圧における潜在的な高血圧原性因子であり、PE の状況において増加することも見出された。EDLF は末梢血管抵抗を増加させる一方、潜在的に心拍出量を維持する。EDLF の胎盤源は、分娩後の母体循環からの EDLF の速やかな消失、及び出産後の母体高血圧の速やかな回復を説明する。本明細書に提示されるデータは、ヒト胎盤が EDLF の豊富な源であるだけでなく、それが EDLF を合成し、馴化培地中に EDLF を放出することを実証する。これらの分泌された EDLF の存在は、抗体アッセイ及びナトリウムポンプ阻害を測定する機能アッセイの両方によって実証された。Digoxin AB RIA は、PE を経験する女性が、Digibind または Digifab で有効に治療され得るかどうかを決定するために有用なアッセイである。

【0192】

Digoxin AB RIA 及び GFAA の両方を提供する研究は、ケトコナゾールが胎盤中の EDLF 産生の阻害剤であるが、 17α -ヒドロキシプロゲステロンが直接または間接的に EDLF 合成を調節することを立証した。これらの影響は用量依存性であった。

【0193】

プレグネノロンを用いる実験は、ステロイド合成経路が胎盤中の EDLF の産生に関与することも立証する。外植された胎盤組織に対するプレグネノロンの適用は、EDLF 産生を低減する。したがって、EDLF は、ヒト胎盤によって合成され、分泌される。

【0194】

24 時間及び 48 時間の低酸素 ($2\% \text{ O}_2$) 治療は、組織培養物中の胎盤からの EDLF 産生及び放出の軽度の増加を誘導すると思われた。

【0195】

臨床証拠は、胎盤中の酸化ストレスのマーカーが PE において上昇することを示す。 H_2O_2 が EDLF 産生に及ぼす影響を試験し、低濃度の H_2O_2 が、培養物中に置かれた健常なヒト胎盤組織からの EDLF 産生及び放出を刺激し得ることを見出した。 H_2O_2 に応答する変化は、低 O_2 で観察されたものよりはるかに顕著であった。ROS 所見は、上記の低酸素所見と一致し、さらに PE と関連付けられるこれらの異常が、それらが始まる複雑な経路の 1 つ以上を通して EDLF 合成及び放出を規制し得ることをさらに実証する。

【0196】

内皮機能不全は、PE の主な病態生理学的特徴である。改変された内皮機能は、特に PE における増大した炎症応答を伴い、 $\text{TNF}\alpha$ の循環サイトカインレベルの増加を含む。 $\text{TNF}\alpha$ は、ヒト胎盤 EDLF の産生及び放出を用量依存的に刺激する。したがって、 $\text{TNF}\alpha$ の低減 (例えば、抗 $\text{TNF}\alpha$ 、抗 $\text{TNF}\alpha$ 受容体または $\text{TNF}\alpha$ の産生を阻害するか、もしくは有効性を低減する他の薬物もしくは生物学的薬剤) は、PE の状況において EDLF の胎盤産生を低減し、それによって EDLF により直接または間接的に引き起こされる PE の症状を低減する。したがって、抗 EDLF 抗体は、EDLF の存在を検出し、EDLF のレベルを定量するためにイムノアッセイで使用され得る。さらに、高レベルの EDLF は、子癇症及び子癇前症、ならびに抗ジゴキシン抗体またはその抗体フラグメント療法に対する応答を示す。

【0197】

実施例 2

治療診断的アッセイの要約

妊娠が子癇前症 (PE) を合併し、高レベルのそのような EDLF を有する妊娠女性の特定は、それらの同じ因子に結合し、それらの効果を低減する抗 Fab フラグメント療法の適切な使用を可能にする。

【0198】

背景

数十年間にわたり多くの研究が、内因性ジギタリス様因子 (EDLF) と呼ばれることもあるナトリウムポンプの内因性阻害剤に関する大量の研究を提供してきた。Goto, et al. Pharmacol Rev 1992; 44: 377-99、Haddy FJ, Buckalew VM Jr. Endogenous digitalis-like factors in hypertension. In Brenner BM and Laragh JH (eds) Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Raven Press, New York, 1995; pp 1055-106、Graves SW, Williams GH. Ann Rev Med 1987; 38: 433-44、Graves SW. Curr Opin Nephrol Hypertens 1994; 3: 107-111。増加レベルのこれらの因子は、多くの高血圧障

10

20

30

40

50

害に關与している。これらのEDLFが増加する理由は不明であるが、ヒト本態性高血圧、多くの二次形態のヒト高血圧において、高血圧の多くの実験動物モデルにおいて、及び妊娠の高血圧障害である子癇前症において、血清中でそれらが増加することを支持する圧倒的なデータがある。Graves & Williams J Clin Endocrinol Metab 1984; 59:1070-4、Graves Hypertension 1987; 10 (S Pt 2): I-84-6、Graves Frontiers in Bioscience 2007; 12:2438-2446。証拠は、これらの因子がジゴキシン及び他の心臓作用ステロールと構造的に類似し、同様の活性を示すことを支持する。

【0199】

10

これらの因子は、高血圧を実験的に引き起こし得る。血管系におけるナトリウムポンプ(SP)の障害は、血管収縮の増加及び結果として生じる血圧の増加につながる。これらの影響は、ジゴキシン毒性を治療するために使用される2つの抗ジゴキシン抗体Fabを含むジゴキシンの配向されるいくつかの抗体によって予防または逆転され得る。Smith, et al. N Engl J Med 1982; 307:1357-62、Krep, et al. Am J Hypertens 1995; 9:39-46。

【0200】

DEEP研究

DEEP試験は、ジゴキシン免疫Fab(DIF) Digibindの多施設二重盲検登録臨床試験であった。その理論的根拠は、子癇前症の女性が、PEの特徴を媒介するより高レベルのEDLFを有することであった。Graves SW. The sodium pump in hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens 1994; 3:107-111、Graves SW, Williams GH. An endogenous ouabain-like factor associated with hypertensive pregnancies. J Clin Endocrinol Metab 1984; 59:1070-4、Graves SW. The possible role of digitalis-like factors in pregnancy-induced hypertension. Hypertension 1987; 10 (S Pt 2): I-84-6。

20

30

【0201】

ジゴキシン免疫Fab(DIF)治療は、EDLFに結合してそれらの作用を遮断し、それによってPEの特徴を逆転させる。Goodlin RC: Antidigoxin antibodies in eclampsia. N Eng J Med 1988; 318:518-519、Adair, et al. Am J Hypertens 1997; 10:11A、Adair, et al. Am J Nephrol 1996; 16:529-531。具体的に、ジゴキシン免疫Fab(DIF)の子癇前症レシピエントは、プラセボを受ける子癇前症より著しく良好な腎機能を示した。さらに、ジゴキシン免疫Fab(DIF)治療は、予測通り、循環EDLFレベルを低下させた。

【0202】

40

DEEP研究において、これらの重症子癇前症女性は、合併症のない妊娠中の妊娠女性と比較して、著しく高いレベルのSP障害(EDLFの尺度)を示した。しかしながら、全てのPE女性がそれらの循環中に存在する好ましいレベルのEDLFを有していたわけではないことも観察された。DEEP対象の約20%が、ごくわずかなレベルのEDLFを有していた。そのような女性において、ジゴキシン免疫Fab(DIF)治療は、効果がないと予想される。

【0203】

EDLF陰性であり、ジゴキシン免疫Fab(DIF)を受けた女性は、母体または胎児パラメータの変化を示さなかった。EDLF陽性の女性がジゴキシン免疫Fab(DIF)を受けた場合、循環EDLFの低減及び腎機能の改善を示し続けたが、より少ない数

50

にもかかわらず、さらにより顕著な差異、及びより大きな統計的有意性を伴った。加えて、多くの追加のパラメータは、改善された差異及びより良好な統計的差異を示した。例えば、EDLF陽性、ジゴキシン免疫Fab(DIF)治療したPE女性において、胎児脳室内出血及び母体肺水腫の割合の顕著で統計的に有意な低減が見出された。ジゴキシン免疫Fab(DIF)治療は、分娩を24時間遅延させ、そのような女性における降圧薬の使用は少なかったが、これらの差異は統計的に有意でなかった。

【0204】

EDLF陽性PE女性は、ジゴキシン免疫Fab(DIF)治療による利益を示す可能性があるが、EDLF陰性PE女性は、不要で高価な治療を受け得る。この分類は、EDLF陽性を測定する抗体ベースの血液アッセイによって実現され得る。そのような「治療診断的」アッセイの開発は、それから恩恵を受けるであろう個々のPE女性のみに対するジゴキシン免疫Fab(DIF)治療の論理的適用を可能にする。

10

【0205】

治療診断の開発

発明者らは、妊娠女性からの血清に適用され得るEDLFを測定するラジオイムノアッセイ(RIA)を開発した。これは、Digibindを使用して実現され、このようなジゴキシン抗体Fabは、治療薬として、プローブとして使用された。トリチル化ウアバインをトレーサーとして使用し、勾配濃度の非放射性標識ウアバインを使用して標準曲線を発達させた。この競合結合アッセイの典型的な標準曲線は、図14に示されている。このアッセイを使用して、PE女性からの血清中のEDLFを測定することが可能である。また、ナトリウムポンプに媒介される Rb^{+} 取込みの障害を測定するバイオアッセイと、Digibindを抗体として用いるRIAとの間には相関がある。

20

【0206】

モノクローナル抗体(Mab)の調査を、免疫原としてのジゴキシンに対して行い、EDLFに結合するもの見出し、3つのMabは、EDLFとの使用可能な相互作用を示し、治療診断的アッセイで使用され得る。標準曲線の例は、図15に提供される。

【0207】

実施例3

内因性ジギタリス様因子(EDLF)は、子癇前症の女性において上昇し、予定日の遠い子癇前症女性における抗ジゴキシン抗体Fab(DIF)の使用は、母体血圧を低減し、腎機能を維持する。ここでの目的は、母体血清中の陽性EDLFと関連付けられる重症子癇前症の女性におけるジゴキシン免疫Fab(DIF)治療が、母体の周産期転帰を改善するかどうかを決定することであった。

30

【0208】

研究デザイン

これは、妊娠23 5/7~34週の間待機的に管理された(19名はプラセボを受け、17名はジゴキシン免疫Fab(DIF)を受けた)陽性EDLF状態を有する重症子癇前症女性におけるジゴキシン免疫Fab(DIF)のランダム化プラセボ対照二重盲検から計画された二次分析である。一次転帰変数は、腎機能の変化(クレアチニンクリアランス、CrCl)及び降圧薬の使用であった。二次転帰は、母体及び周産期転帰であった。

40

【0209】

結果

ジゴキシン免疫Fab(DIF)を受けたEDLF陽性の女性は、プラセボと比較してベースラインからのCrClの弱い減少を有した(-4.5 ± 12.9 対 -53.2 ± 12.6 mL/分、 $p=0.005$)。彼女らは、より少ない降圧薬の使用に向かう傾向も有していた(41%対63%、 $p=0.12$)。追加として、ジゴキシン免疫Fab(DIF)治療された女性は、より低率の肺水腫(1/17対6/19、 $p=0.035$)、より低率の全新生児脳室内出血(IVH、ジゴキシン免疫Fab(DIF): 0/17対プラセボ: 5/19、 $p=0.015$)、及び出生時体重 <1250 gの乳児におけるI

50

VH（ジゴキシン免疫Fab（DIF）：0／14対プラセボ：5／11、 $p=0.012$ ）を有していた。

【0210】

結論

EDLF陽性の予定日の遠い重症子癇前症女性において、ジゴキシン免疫Fab（DIF）の使用は、母体及び新生児転帰の改善と関連付けられる。これらの所見は、重症子癇前症及び陽性EDLF状態を有する予定日の遠い女性の管理におけるジゴキシン免疫Fab（DIF）の利益を評価する大規模な多施設試験の必要性を示唆する。

【0211】

報告された子癇前症の発生率は、全妊娠の3～5%の範囲である。この発生率は、母体肥満、妊娠性糖尿病、慢性高血圧、妊娠時の高母体年齢、及び多胎妊娠等の子癇前症（PE）のいくつかの危険因子の罹患率の上昇のために増加することが予想される。Barton & Sibai *Obstet Gynecol* 2008；112：359－372。

【0212】

妊娠<34週の重症PEを合併する妊娠は、高い母体及び周産期合併症の割合と関連付けられ、これらの合併症の割合は、発症時の在胎月齢、ならびに使用される管理の種類（即時分娩対待機的管理）に依存する。Sibai & Barton *Am J Obstet Gynecol* 2007；196：514.e1－514.e9。<34週の重症PE女性の管理は、母体と胎児の安全の保持、及び生存し、長期または集中新生児ケアを必要としない新生児の分娩を目的とする。最近の研究は、妊娠24週～34週の重症PE女性の選択群において待機的管理が可能であること、及びそのような管理が新生児転帰を改善するが、HELLP症候群等の母体合併症、肺水腫、腎機能の低下、及び子癇の割合の増加にも関連することを示唆した。Sibai & Barton *Am J Obstet Gynecol* 2007；196：514.e1－514.e9。

【0213】

内因性ジギタリス様因子（EDLF）は、ナトリウムポンプ（SP）の循環阻害剤のファミリーを表す。そのようなSP阻害は、直接血管収縮を引き起こし、本態的及び実験的高血圧における血圧の上昇に関連している。Krep, et al. *Am J Hypertens* 1995；9：39－46、Soszynski et al. *Am J Hypertens* 1997；10：1342－48、Krep, et al. *Am J Hypertens* 1995；8：921－7、Glatte et al. *Am J Hypertens* 1994；7：1016－25。EDLFは、PE女性の循環においても上昇する。Graves & Williams *J Clin Endocrinol Metab* 1984；59：1070－4、Gusdon et al. *Am J Obstet Gynecol* 1984；15：83－85、Seely et al. *J Clin Endocrinol Metab* 1992；74：150－6、Lopatin et al. *J Hypertens* 1999；17：1179－1187。Hopocate-Sitake et al. *Reproductive Sci* 2011；18：190－199。特定の市販抗ジゴキシン抗体Fabのインビトロ添加は、EDLFがSPに及ぼす阻害作用を低減した。Krep, et al. *Am J Hypertens* 1995；9：39－46。

【0214】

この同じFabは、EDLFによって媒介されると考えられる高血圧の動物モデルにおいて、降圧作用を有することも示された。Krep, et al. *Am J Hypertens* 1995；8：921－7。以前に、ジゴキシン免疫Fab（DIF）のPE女性への投与は、母体血圧を低減し、腎機能を維持または改善した。Goodlin R C. *N Engl J Med* 1988；318：518－9、Adair, et al. *Am J Nephrol* 1996；6（6）：529－31、Adair, et al. *J Perinatolog* 2009；29：284－289。実際に、これ

10

20

30

40

50

らのデータは、重症子癇前症女性におけるジゴキシン免疫Fab (DIF) のランダム化二重盲検プラセボ対照試験 (DEEP試験) につながった。Adair, et al. Amer J Perinatol 2010; 27: 655-662。この研究は、試験に登録された全女性において、腎機能に対するジゴキシン免疫Fab (DIF) 治療からの利益を実証した。しかしながら、この試験は、妊娠延長または母体転帰の改善に関する利益を見出さなかった。DEEP試験の一次分析は、女性のEDLF状態を考慮に入れていなかった。ジゴキシン免疫Fab (DIF) が、EDLF陽性の女性においてのみ効果的であることは可能であり、可能性もある。

【0215】

DEEP試験に登録された51対象において循環EDLFが後次にベースラインで測定された場合、約20%が検出可能な循環EDLFを有していなかった。提案された作用機序 (すなわち、EDLFに結合し、不活性化する) を考慮すると、ジゴキシン免疫Fab (DIF) 投与は、循環EDLFを有していなかった女性において影響を及ぼさないはずであり、それらを包括解析に含めることは、ジゴキシン免疫Fab (DIF) が測定可能なEDLFを有する子癇前症女性に及ぼす明らかな影響を排除し得る。

【0216】

ジゴキシン免疫Fab (DIF) の効果をEDLF陽性の女性において評価したDEEP試験から計画された二次分析。この研究の目的は、母体血清中の陽性EDLF活性と関連付けられる重症PE女性におけるジゴキシン免疫Fab (DIF) 治療が、母体及び周産期転帰を改善するかどうか、及びその効果が登録時の循環EDLFレベルに依存するかどうかを決定することであった。

【0217】

材料及び方法

元の研究デザイン及びEDLFのナトリウムポンプ阻害アッセイ

DEEP研究の詳細な説明は、以前に公開されている。Adair CD, Buckalew VM, Graves SW, Lam GK, Johnson DD, Saade G, Lewis DF, Robinson C, Danoff TM, Chauhan N, Hopoate-Sitake M, on behalf of the DEEP Study Group. Digoxin Immune Fab Treatment for Severe Preeclampsia. Amer J Perinatol 2010; 27: 655-662。つまり、全参加者は、重症PEの米国産科婦人科学会基準を満たした妊婦であった。Adair, et al. Amer J Perinatol 2010; 27: 655-662。各研究施設においてIRB承認が得られており、全対象は参加前に告知による署名同意書を提供した。他の適格基準には、23週と5日~34週の妊娠、及び主治医により判断される72時間以内の胎児の予定分娩が含まれた。Adair, et al. Amer J Perinatol 2010; 27: 655-662。元の研究の意図は、2つの主要エンドポイント、腎機能の尺度としてのクレアチニークリアランスの変化及び高血圧の改善または悪化の尺度としての降圧薬の使用に関するジゴキシン免疫Fab (DIF) (Digibind, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC) の有効性を試験することであった。女性をジゴキシン免疫Fab (DIF) またはプラセボにランダム化し、最大計8用量を6時間毎に静脈内付与した。ジゴキシン免疫Fab (DIF) を、研究に含まれた51名の女性のうち24名に投与した。患者、医師、及び研究室職員は、治療群に対して知らされず、EDLF状態を含む全ての臨床パラメータは、研究について知らされる前に編集された。降圧薬の使用及び分娩のタイミングを含む研究患者におけるPEの治療は、主治医によって判断される臨床状態によって決定された。

【0218】

元の研究の一部として、血漿中のEDLFは、正常な妊娠していない候補者から新たに得られた赤血球のSPを阻害する血漿の能力によって測定された。阻害剤の存在下及び非存在下での人工培地から赤血球へのRb⁺イオンのSP媒介性取込みを測定するこのアッ

10

20

30

40

50

セイは、以前に説明され、他の研究において検証されている。Zhen, et al. J Nutritional Biochem 2005; 16: 291-296。

【0219】

EDLFが存在する場合、より少ないRb⁺がRBCのシトソルに取り込まれる。EDLF活性は、ベースライン（薬物前またはプラセボ）、ならびに12時間24時間、及び48時間に3回決定した（t = 0、12、24、48時間）。ベースラインでのRb⁺取込みアッセイの結果を使用し、患者がEDLF陰性であるか、またはEDLF陽性であるかに分類した。元の試験に登録された51名の女性の中で、EDLFの試料を入手することができ、46対象において評価したとこと、10名（22%）が陰性であり、36名（78%）が陽性であった。この二次分析は、EDLF陽性であった36名の女性に注目する（内19名がプラセボを受け、17名がジゴキシン免疫Fab（DIF）を受けた）。10

【0220】

一次転帰変数は、一次分析と同じ、すなわち、腎機能の変化（CrCl）及び降圧薬の使用であった。降圧薬の使用は、1）治療段階中の降圧薬の最初の使用、または2）研究への登録時に既に降圧薬を服用している対象における治療段階中の降圧薬の増加、または3）持続的な重症高血圧によって必要とされる送達として定義された。

【0221】

二次転帰は、母体（例えば、肺水腫、HELLP症候群、かすみ目）、胎児（例えば、持続的に不安定な胎児状態、胎児心臓透写異常（頻脈、徐脈、脈間変動性の減少、または変動性徐脈もしくは晩発性徐脈等の異常パターン）、及び新生児合併症（例えば、新生児出生時体重、呼吸困難症候群、及び脳室内出血（IVH））の臨床及び研究室マーカーであった。20

【0222】

統計分析

分析は、受託試験機関（Covance Inc）によって盲検的に行われた。

【0223】

モデルのスクリーニング値、治療群、妊娠年齢、及び研究施設によるANCOVAによって、またはモデルの治療、妊娠年齢、及び施設によるロジスティック回帰分析によって理連続データを分析した。カテゴリーデータは、バーナード直接確率検定によって分析した。Mehta, et al. Amer Statistician 1993; 47: 91-98. Chan Statistics Med. 1998; 17: 1403-1413. p値<0.05を統計的に有意と見なした。CrClの変化は、治療時間からスクリーニング値を引いた差（mL/分）として計算された。30

【0224】

結果

表1は、EDLF陽性PE女性の2つの治療群間の登録時の人口統計学的特徴を比較する。分析された変数のいずれかにおいて、ジゴキシン免疫Fab（DIF）を受けた女性またはプラセボを受けた女性と有意差はなかった。

【0225】

ジゴキシン免疫Fab（DIF）が循環EDLF活性に及ぼす影響。40

EDLF陽性女性のジゴキシン免疫Fab（DIF）治療は、EDLF陽性及び陰性対象の両方を含んでいた初期DEEP分析と比較したとき、治療前EDLFレベルと比較して、循環EDLFレベルのより大きくより統計的に有意な低減を実証した（図1）。Adair, et al. Amer J Perinatol 2010; 27: 655-662. 全対象分析において（すなわち、EDLF陽性及び陰性対象の両方を含む）、12～24時間の差のみが有意であった（+11.0% SP活性の回復、p = 0.03）。

【0226】

ジゴキシン免疫Fab（DIF）が一次転帰尺度に及ぼす影響。

図2Aは、CrClの変化に関して、ジゴキシン免疫Fab（DIF）治療の効果をプラセボと比較する。ジゴキシン免疫Fab（DIF）を受けているEDLF陽性の重症P 50

E女性は、プラセボと比較して、ベースラインから著しく小さいCrClの低下を有していた。さらに、対照群における腎機能の低下は、EDLFレベルに明らかに関連していた（30%超のSP阻害を有する女性、 $p=0.032$ 、図2B）。全対象分析と比較して、降圧薬の使用に対する治療とプラセボとの間の差異はより大きかったが、これらの差異は統計的有意性に至らなかった（EDLF陽性：41%ジゴキシン免疫Fab（DIF）対63%プラセボ、 $p=0.12$ 、全対象：46%ジゴキシン免疫Fab（DIF）対52%プラセボ、 $p=0.4$ ）。

【0227】

ジゴキシン免疫Fab（DIF）が二次転帰に及ぼす影響

表2は、研究登録からの潜伏期間、分娩時の妊娠年齢、出生時体重、胎児心拍数（FHR）図の変化、異常のあるFHR試験の割合、新生児呼吸困難症候群、新生児IVH、及び死亡を2つの研究間で比較する。ジゴキシン免疫Fab（DIF）治療したEDLF陽性のPE女性は、プラセボ治療した女性より26時間長い分娩潜伏期間を有したが、この差は統計的に有意ではなかった（ $p=0.17$ ）。出生時体重に無関係の乳児のIVHの割合ならびに1250グラム未満の出生時体重のIVHの割合は、ジゴキシン免疫Fab（DIF）を受ける女性の新生児において有意に低かった（全乳児の場合、 $p=0.015$ 及び<1250グラムの乳児の場合、 $p=0.012$ ）。

【0228】

表3は、2つの研究群間の母体合併症を比較する。母体肺水腫の割合は、プラセボを受ける女性と比較して、ジゴキシン免疫Fab（DIF）を受ける女性において著しく低かった（ $p=0.035$ ）。特記事項として、本研究のEDLF陰性対象は、治療群にかかわらず、肺水腫を経験しなかった。

【0229】

PEにおける増加レベルのEDLFに対する証拠は十分にある。Graves SW. Sodium regulation, sodium pump function and sodium pump inhibitors in uncomplicated pregnancy and preeclampsia. (Review) Frontiers in Bioscience 2007; 12: 2438-2446。重症PEの治療におけるジゴキシン免疫Fab（DIF）の細菌の臨床試験は、疾患の母体特徴に関連するEDLFについて追加の支持を提供した。Adair, et al. Amer J Perinatol 2010; 27: 655-662。しかしながら、全てのPE女性が検出可能なレベルのEDLFを有するとは思われず、したがってジゴキシン免疫Fab（DIF）治療から利益を受ける可能性は非常に低いであろう。独立したグループは、最近、彼らの研究における子癇前症女性の82%が、正常血圧の妊娠女性において見出されるレベルを超える尿中EDLFレベル（候補EDLFであるマリノブファゲンに対する抗体アッセイによって測定された）を有していたことを報告した。Agunanne, et al. Am J Perinatol 2011; 28: 509-514。このEDLF陽性のレベルは、本研究において観察された78%と十分に一致する。EDLF陽性であった対象に注目するこの分析の主な所見は、1) ジゴキシン免疫Fab（DIF）に応答する治療前レベルと比較した循環EDLFの低減は、元の全患者研究において観察された変化よりも程度が大きく、より有意であった。Adair, et al. Amer J Perinatol 2010; 27: 655-662。2) EDLF陽性対象においてジゴキシン免疫Fab（DIF）がクレアチニークリアランスに及ぼす影響は、プラセボを受けるEDLF陽性対象と比較して、各治療時点で優れていた。3) 二次母体尺度の中で、EDLF状態が考慮された場合、ジゴキシン免疫Fab（DIF）治療されたPE女性が、プラセボと比較して肺水腫の発症が著しく少なく、4) EDLF陽性女性におけるジゴキシン免疫Fab（DIF）治療は、全乳児において著しく少ないIVH症例と関連付けられた。全てのIVHが出生時体重<1250グラムの新生児において発生したことに留意されたい。

【0230】

10

20

30

40

50

血漿 E D L F レベルが高いほど、未治療の女性における腎機能の低下が激しいという追加の示唆は、潜在的に新規の所見である。以前に、低下した腎機能が循環 E D L F レベルの増加をもたらすことが推定され、これは真であり得るが、E D L F は、腎機能が低減され得る手段として考慮されないことも真である。Agunanne et al. Am J Perinatol 2011; 28: 509-514。

【0231】

E D L F は、肺水腫と関連していなかった。しかしながら、高い循環 E D L F は、脳水腫と関連付けられている。Lusic, et al. Acta Neurochir 1999; 141: 691-697、Wijdicks, et al. Brit Med J 1987; 294: 729-733、Rap, et al. Acta Neurochir Suppl 1994; 60: 98-100。追加として、P E の動物モデルにおいて、ラットにマリノブファゲニン、ナトリウムポンプ阻害剤、及び E D L F 候補を投与し、アルブミンに透過性の腸間膜後毛細管細静脈を発達させた。Uddin, et al. Am J Nephrol 2009; 30: 26-33。S P 阻害は、房水産生を低減する方法としても研究されている。Dismuke, et al. Brit J Ophthalmol 2009; 93: 104-109。S P によるイオンの圧送は、膜間の水分子の移動を伴い、これがイオンと密接に関連する。ポンプの各サイクルで輸送される各 $2K^+$ イオンに対して 3 つの Na^+ イオンが細胞から出ると仮定すると、S P 活性の低減は、細胞膜の内面の水の蓄積と関連付けられる可能性があり、潜在的に組織内の水貯留を生じさせる。

【0232】

C r C l 及び肺水腫以外の母体尺度は、ジゴキシン免疫 F a b (D I F) 治療による統計的に有意な改善を実証しなかったが、いくつかの母体異常の発生は、E D L F 陽性、ジゴキシン免疫 F a b (D I F) 治療群の半分以上低減され、集合的にジゴキシン免疫 F a b (D I F) がこれらの女性の一部において陽性結果をもたらし得ることを示唆する。

【0233】

E D L F 陽性女性におけるジゴキシン免疫 F a b (D I F) 治療は、一般に、また具体的に、I V H リスクの高い低出生時体重の乳児において著しく少ない I V H 症例と関連付けられた。E D L F は、以前に I V H と関連付けられていなかった。それ故に、I V H におけるその潜在的役割及びジゴキシン免疫 F a b (D I F) が乳児を I V H から保護する可能性は、本研究では直接取り上げなかった。高い E D L F レベルは、脳室内出血のある動物において見出されるが、明らかに、E D L F が I V H を引き起こす、またはそれに貢献する能力のより詳細な評価が必要である。Menezes et al., Amer J Hypertens 2003; 16: 1062-1065。したがって、E D L F は、I V H につながる過程において役割を有し得る。

【0234】

E D L F レベルは、より重症の疾患に対する応答であり得るが、E D L F 陽性女性のみにおけるジゴキシン免疫 F a b (D I F) に応答する利益の発見は、P E 及びその合併症においていくつかの病因的役割を果たす可能性を高める。これらが単なるランダムアーチファクトである場合に予測されるように、ジゴキシン免疫 F a b (D I F) 治療された E D L F 陽性 P E 女性において、胎児または新生児パラメータが著しく悪化しないと述べることもできる。

【0235】

E D L F がどのように胎児／新生児作用をもたらし得るかについて、出生直後の胎盤、臍帯血、及び胎児循環における循環 E D L F 活性の存在に対する十分な証拠があるが、特定の相互作用は定義されていない。Hopocate-Sitake et al. Reproductive Sci 2011; 18: 190-199、Morris, et al. Clin Sci 1987; 73: 291-297、Valdes, et al. J Pediatrics 1983; 102: 947-950

【0236】

要約すると、この二次分析の発見は、E D L Fが、P Eの母体観点において少なくとも貢献的役割を果たし、ジゴキシニン免疫F a b（D I F）治療が、E D L F陽性であるという条件で、重症子癇前症女性において多くの母体合併症を軽減するようであるという強力な証拠を提供する。P E女性のE D L F陽性サブセットにおけるこれらの分析は、E D L Fが母体肺水腫において役割を有する可能性を高める。誰が治療から利益を受けるかを決定するためのE D L Fの迅速測定、すなわち、治療診断の開発は、P E女性のジゴキシニン免疫F a b（D I F）治療に関するいかなる将来の研究においても有用な評価ツールとなると思われる。

【0237】

これらの発見は、新生児I V Hの発生におけるE D L Fの可能性のある役割について、及び抗ジゴキシニンF a bによる治療がこの重大な致命的新生児合併症の発生率を低下させ得るかどうかという興味深い疑問を提起する。したがって、E D L Fのイムノアッセイを使用して、新生児I V Hの危険性がある胎児を妊娠している患者における高レベルのE D L Fを検出することができ、抗ジゴキシニン抗体またはその抗体フラグメントを投与して、新生児I V Hを治療または予防することができる。

【0238】

【表1】

表1. E D L F陽性亜群の人口構成

パラメータ	プラセボ n = 19	ジゴキシニン 免疫F a b (D I F) n = 17
母体年齢 (歳)	25 ± 5.1	26 ± 6.5
出産歴中央値 (平均)	1 (1.2)	1 (0.9)
人種 (アフリカ系アメリカ人の%)	7 (37)	6 (35)
BMI (kg/m ²)	33 ± 6.4	35 ± 7.5
MAP (mm Hg)	111 ± 2.5	110 ± 1.9
スクリーニング時の妊娠期間 (日数)	202 ± 4.3	197 ± 4.7

分析した変数のいずれにおいても群間で有意差はない。

【0239】

【表 2】

表 2. 受けた治療による胎児／新生児転帰

パラメータ	プラセボ n = 19	ジゴキシン免疫 Fab (DIF) n = 17	p 値	
潜伏期間 (時間)	71	97	0.17	
分娩時の妊娠期間 (日数)	205 ± 4.3	201 ± 4.4	0.53	
出生時体重 (gm)	1129.9 ± 92.8	974.2 ± 89.0	0.24	10
不安定な胎児の状態 # (%)	8 (42)	4 (24)	0.136	
胎児心拍数の異常 # (%)	9 (47)	4 (24)	0.097	
呼吸窮迫症候群 # (%)	14 (74%)	13 (76%)	0.46	
IVH # (%)	5 (26)	0	0.015	
段階 3 及び 4 # (%)	3 (16)	0	0.053	20
< 1250 gm の乳児 # (%)	5 / 11 (42)	0 / 14	0.012	
新生児死 # (%)	1 (5.3)	0	0.27	

【0240】

【表 3】

表 3. 受けた治療による母体転帰

パラメータ	プラセボ n = 19	ジゴキシン免疫 Fab (DIF) n = 17	p 値	
48 時間の治療を完了した数	7	10	0.116	30
かすみ目 # (%)	7 (37)	3 (18)	0.136	
降圧薬の使用 # (%)	12 (63)	7 (41)	0.117	
HELLP 症候群 # (%)	1 (5)	1 (6)	0.512	
肺水腫 # (%)	6 (32)	1 (6)	0.035	40

【0241】

実施例 4

EDLF を検出するためのナノワイヤ FET バイオセンサー

シリコンナノワイヤバイオセンサー (SNB) システムは、内因性ジギタリス様因子 (EDLF) の検出に使用され得る。DigifAB (ジゴキシン免疫 Fab) 分子をナノワイヤの表面に固定し、EDLF バイオセンサーを作る。このバイオセンサーは、EDLF が混入していない対照緩衝液と比較して、混入緩衝液中の EDLF の結合を検出することができた。この SNB は、混入血清試料 (100 nM ~ 10 μM) からの EDLF の良好かつ特異的な検出に使用できる。QuantumDx ナノワイヤセンサー技術を使用して、非混入ヤギー Fab 及び BSA 対照試料に対して、4 % 平均を超える EDLF の存在

下、約 163% の正規化平均信号変化が観察された。EDLF に対する観察可能な応答は、FAB 修飾表面の 88% において、4 時間のインキュベーション期間後に明らかであった。

【0242】

方法

簡素化実験アプローチを使用し、EDLF の存在に対するセンサーアレイの電気応答を検証した。初期デバイス状態の特徴付けを用いて、制御された環境条件下で生物学的に関連するタンパク質モデルを使用する実験との直接比較において、溶媒和 EDLF（この例ではジゴキシン）の存在下での測定可能な変化を定義した。多重化アッセイは、様々な濃度のジゴキシン（100 nM～10 μM）に対する電気感知システムの応答を実証する。

【0243】

プラズマアッシャーを使用して、ナノワイヤを洗浄し、活性化した。ナノワイヤの酸化物表面を、APTES（エタノール中の 1% 溶液）を使用して化学的に修飾し、ナノワイヤの表面上に露出した NH₂ 頭基を産生する。適切なタンパク質（DigifAB、抗ヒト IgG、GatFAB（hFAB）、BSA、1 mM）の液滴（10 μL）及び結合剤（DMAP、EDC、10 μM）をチップ表面の上に蒸着した。各例における反応混合物を、湿潤環境において室温で終夜インキュベートした。続いてチップを過剰 10×PBS 緩衝液で洗浄し（3 回行った）、脱イオン水で再度洗浄した（3 回）。窒素流を使用して過剰な水分を表面から除去し、次にチップを真空オーブン内に入れて乾燥させた（20 分、50℃）。乾燥後、2 つのプロブ Agilent B1500 プロブステーションを使用して、-5 V～+5 V を通すことによってナノワイヤのコンダクタンスを測定した。初期コンダクタンス研究の完了時、緩衝液中に混入されたジゴキシン（0.5×SSC 及び 20 mM MgCl₂ 緩衝液中 1 μM）を、チップのナノワイヤ領域の上に蒸着させ、室温で 4 時間、湿潤環境内で再度インキュベートした。次にチップを、20 mM MgCl₂ を含有する過剰 0.5×SSC 緩衝液で十分に洗浄し（3 回）、H₂O を脱イオン化し、N₂ で乾燥させた後、真空オーブンに挿入して 50℃ で 20 分間さらに乾燥させた。乾燥後、2 つのプロブ Agilent B1500 プロブステーションを使用し、-5 V～+5 V を通すことによってナノワイヤのコンダクタンスを再度測定した。

【0244】

結果

固定化 DigifAB を捕捉分子として使用し、検出実験を QMDx SNB システム上で行った。ナノワイヤ系の電気プロファイル、DigifAB、抗ヒト IgG-FAB（hFAB-DigifAB と同様サイズの対照タンパク質）、及び BSA 修飾ナノワイヤ表面上のジゴキシン導入前及び後（制御条件下）に独立して監視した。

【0245】

典型的に、hFAB 及び BSA 上のジゴキシンに対する測定されたナノワイヤ応答は、100% の例において感知システムの導電性プロファイルの減少を実証した。逆に、ジゴキシンが FAB に導入された場合、システムの応答は反対であり、63% の例において（最小）ナノワイヤシステムの導電性プロファイルの増加をもたらした。図 18A を参照されたい。原データに適用される場合、基本の正規化及び信号処理は、ナノワイヤシステム全体で 100% 陽性応答率を確実にもたらす。

【0246】

【表 4】

表 4：正規化平均値及び最大／最小値

	正規化平均	最大	最小
D i G i F a b	-0.65	8.86	-0.92
BSA	-0.96	-0.90	-0.99
hFAB	-0.96	-0.90	-1.00

【0247】

生物試料中の検出を試験するために、ジゴキシンを血清に混入して実験を繰り返した。

結果は、今回は複雑な試料マトリックスにおいてEDLFを検出するSNBの能力を再度実証した。ジゴキシシン（及び他のEDLF）に対するDiGiFABの特異性は、適切な化学を認識する技術の能力及び特異性における信頼度を示唆する。FAB飽和表面の例は、図18Cにおいて実証され、ケイ素表面上のDiGiFABの良好な固定化を示している。

【0248】

したがって、このシステムは、システムがEDLFを検出することを可能にする。EDLF混入血清試料による結果は、SNBが生物試料からEDLFを検出できることを支持する。したがって、このシステムは、血中のEDLFを検出するためのシステム及び方法に適用され得、いずれもEDLFを濃縮し、常磁性ビーズ上に固定された捕捉分子を使用して、それらを血清試料から単離する。これは、EDLFを検出するための方法におけるこのシステムの使用を可能にし得る。

【0249】

当業者であれば、単なる日常実験を使用して、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの同等物を認識するか、または確認することができるであろう。そのような同等物は、次の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

参考文献

Roberts JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatal*. 2000; 24 (1): 24-28.

Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 161 (5): 1200-1204.

Zavalza-Gomez AB, Obesity and oxidative stress: a direct link to preeclampsia? *Arch Gynecol Obstet*. 2011; 283: 415-422.

Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 195: 40-49

LaMarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS, Murphy SR, Granger JP. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Current Hypertension Reports*. 2007; 9 (6): 480-485.

Sankaralingam S, Arenas IA, Lalu MM, Davidge ST. Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction *Expert Rev in Mol Med*. 2006; 8: 1-20

Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation*. 2002; 9 (3): 147-160.

Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90 (7): 4299-4308.

Graves SW, Williams GH. An endogenous ouab

10

20

30

40

50

- ain-like factor associated with hypertensive pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59:1070-4.
- Valdes R Jr, Graves SW, Knight AB, Craig HR. Endogenous digoxin-immunoactivity is elevated in hypertensive pregnancy. *Prog Clin Biol Res*. 1985;192:229-32.
- Graves SW. The possible role of digitalis-like factors in pregnancy-induced hypertension. *Hypertens*. 1987;10(S Pt 2):I-84-6
- Graves SW, Lincoln K, Cook SL, Seely EW. Digitalis-like factor and digoxin-like immunoreactive factor in diabetic women with preeclampsia, transient hypertension of pregnancy, and normotensive pregnancy. *Am J Hypertens*. 1995;8:5-11.
- Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:6259-6263.
- Goto, A. and Yamada K. Purification of endogenous digitalis-like factors from normal human urine. *Clin Exp Hypertens*. 1998;20:551-56.
- Glatte KA, Graves SW, Hollenberg NK, Soszynski PA, Tao QF, Frem GJ, Williams GH, Lazarus JM. Sustained volume expansion and [Na, K] ATPase inhibition in chronic renal failure. *Am J Hypertens*. 1994;7:1016-25.
- Krep HH, Price DA, Soszynski P, Tao Q-F, Graves SW, Hollenberg NK. Volume sensitive hypertension and the digoxin-like factor: reversal by an Fab directed against digoxin in DOCA:salt hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1995;8:921-7.
- Krep HH, Graves SW, Price DA, Lazarus M, Ensign A, Soszynski PA, Hollenberg NK. Reversal of sodium pump inhibitor induced vascular smooth muscle contraction with Digibind: stoichiometry and its implications. *Am J Hypertens*. 1995;9:39-46.
- Smith TW, Butler VP Jr, Haber E, Fozzard H, Marcus FI, Bremner WF, Schulman IC, Phillips A. Treatment of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments: experience in 26 cases. *N Engl J Med*. 1982;307:1357-62.

- Adair CD, Buckalew VM, Graves SW, Lam GK, Johnson DD, Saade G, Lewis DF, Robinson C, Danoff TM, Chauhan N, Hopoate-Sitake M, Porter KB, Humphrey RG, Trofatter KF, Amon E, Ward S, Kennedy L, Mason L, Johnston JA. Digoxin immune Fab treatment for severe preeclampsia. *Amer J Perinatol*. 2010;27:655-662.
- Loose DS, Kan PB, Hirst MA, Marcus RA and Feldman D. Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P-450 dependent enzymes. *J. Clin. Invest*. 1983;71:1495-1499. 10
- Miossec P, Archambeaud-Mouveroux F and Teissier MP. Inhibition of steroidogenesis by ketoconazole. Therapeutic uses. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1997;58:494-502.
- Kraemer FB, Spilman SD. Effect of ketoconazole on cholesterol synthesis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986;238:905-911.
- Kempen HJ, Van son K, Cohen LH, Griffioen M. Effect of ketoconazole on cholesterol synthesis and on HMG-CoA reductase and LDL-receptor activities in Hep G2 cells. *Biochem Pharmacol*. 1987;36:1245-1249. 20
- Shibata Y, Takahashi H, Chiba M, Ishii Y. A novel approach to the prediction of drug-drug interactions in humans based on the serum incubation method. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23:328-339.
- Levy MJ, Smotrich DB, Widra EA, Sagoskin AW, Murray DL, Hall JL. The predictive value of serum progesterone and 17-OH progesterone levels on in vitro fertilization outcome. *Amer Fertility Soc*. 1995;12:161-166. 30
- Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y. Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta*. 2005;26:210-217. 40
- Hopoate-Sitake ML, Adair CD, Mason LA, Torres C, Kipikasa J, Graves SW. Digibind reverses inhibition of cellular Rb^{+} uptake caused by endogenous sodium pump inhibitors present in serum and placenta of women with preeclampsia. *Reproductive Sci*. 2011;18:190-199.
- Diamandis EP, Papanastasiou-Diamandi A, Soldin SJ. Digoxin immunoreactivity in cord and maternal serum and placental extrac 50

- ts. Partial characterization of immunoreactive substances by high-performance liquid chromatography and inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase. *Clin Biochem.* 1985;18:48-55.
- Morris JF, Poston L, Wolfe CD, Hilton PJ. A comparison of endogenous digoxin-like immunoactivity and sodium transport inhibitory activity in umbilical arterial and venous serum. *Clin Sci (Lond)*. 1988;75:577-579. 10
- Hilton PJ, White RW, Lord GA, Garner GV, Gordon DB, Hilton MJ, Forni LG, McKinnon W, Ismail RMD, Keenan M, Jones K, Morden WE. An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta. *Lancet* 1996;348:303-305.
- Gao S, Chen Z, Xu Y. The source of endogenous digitalis-like substance in normal pregnancy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1998;33:539-541.
- Fedorova OV, Tapilskaya NI, Bzhelyansky AM, Frolova EV, Nikitina ER, Reznik VA, Kashkin VA, Bagrov AY. Interaction of Digibind with endogenous cardiotonic steroids from preeclamptic placentae. *J Hypertens*. 2010;28:361-366. 20
- Ugele B, Simon S. Uptake of dehydroepiandrosterone-3sulfate by isolated trophoblasts from human term placenta, JEG-3, BeWo, Jar, BHK cells and BHK cells transfected with human steryl sulfatase-cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;71:203-211. 30
- Fang S, Shoko H, Yukako O, Sakiko H, Kyoko T, Yasuko Y, Sadako T and Shosuke K. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thiocetamide in rat liver. *BBA-Molec Basis Disease*. 2000;1500:181-185.
- Rabe T, Brandstetter K, Kellermann J, Runnebaum B. Partial characterization of placental 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (EC1.1.1.145), delta 4-5 isomerase (EC 5.3.3.1) in human term placenta. *J Steroid Biochem*. 1982;17:427-433. 40
- Powell WA, Challis JR. Influence of 20 alpha-dihydroprogesterone on progesterone output by human chorion explants. *Gynecol Obstet Invest*. 1986;22:73-78.
- Goto A, Yamada K, Yagi N, Yoshioka M, Sugimoto T. Physiology and pharmacology of endo 50

genous digitalis-like factors. *Pharmacol Rev* 1992;44:377-99.

Haddy FJ, Buckalew VM Jr. Endogenous digitalis-like factors in hypertension. In Brenner BM and Laragh JH (eds) *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Raven Press, New York, 1995; pp 1055-1067.

Graves SW, Williams GH. Endogenous digitalis-like natriuretic factors. *Ann Rev Med* 1987;38:433-444.

Graves SW. The sodium pump in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994;3:107-111.

Graves SW, Williams GH. An endogenous ouabain-like factor associated with hypertensive pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:1070-4.

Graves SW. The possible role of digitalis-like factors in pregnancy-induced hypertension. *Hypertension* 1987;10 (S Pt 2):I-84-6.

Graves SW. Sodium regulation, sodium pump function and sodium pump inhibitors in uncomplicated pregnancy and preeclampsia. *Frontiers in Bioscience* 2007;12:2438-2446.

Smith, et al. Treatment of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments: experience in 26 cases. *N Engl J Med* 1982;307:1357-62.

Krep HH, Graves SW, Price DA, Lazarus M, Ensign A, Soszynski PA, Hollenberg NK. Reversal of sodium pump inhibitor induced vascular smooth muscle contraction with Digibind: stoichiometry and its implications. *Am J Hypertens* 1995;9:39-46.

Goodlin RC: Antidigoxin antibodies in eclampsia. *N Eng J Med* 1988;318:518-519.

Adair DA, Hinshaw G, Russell J, Rose J, Veille J-C, Buckalew V. Effects of Fab digoxin-specific antibodies on mean arterial pressure in severe preeclampsia. *Am J Hypertens* 1997;10:11A

Adair CD, Buckalew VM, Taylor K, Ernest JM, Frye AH, Evans C, Veille J-C. Elevated endoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: treatment with digoxin-binding immunoglobulin. *Am J Nephrol* 1996;16:529-531

10

20

30

40

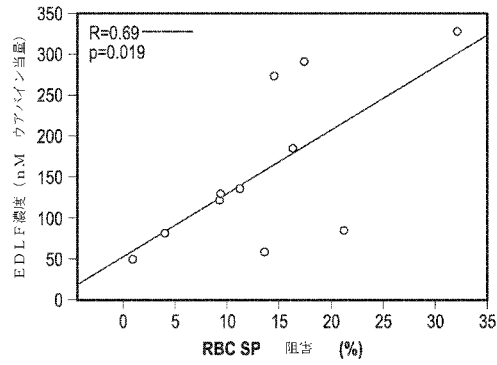
50

- Adair CD, Luper A, Rose JC, Russell G, Veille JC, Buckalew VM. The hemodynamic effects of intravenous digoxin-binding Fab immunoglobulin in severe preeclampsia: a double-blind, randomized, clinical trial. *J Perinatol* 2009;29:284-9.
- Barton JR, Sibai BM. Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2008;112:359-372.
- Sibai BM, Barton JR. Expectant management of severe preeclampsia remote from term: patient selection, treatment, and delivery indications. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:514.e1-514.e9. 10
- Krep HH, Graves SW, Price DA, Lazarus M, Ensign A, Soszynski PA, Hollenberg NK. Reversal of sodium pump inhibitor induced vascular smooth muscle contraction with Digibind: stoichiometry and its implications. *Am J Hypertens* 1995;9:39-46. 20
- Soszynski PA, Ensign A, Graves SW, Hollenberg NK. Specificity of the vascular smooth muscle contractile response to a labile digitalis-like factor in peritoneal dialysate: The influence of potassium. *Am J Hypertens* 1997;10:1342-48.
- Krep H, Price DA, Soszynski P, Tao Q-F, Graves SW, Hollenberg NK. Volume sensitive hypertension and the digoxin-like factor: reversal by an Fab directed against digoxin in DOCA:salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1995;8:921-7. 30
- Glatte KA, Graves SW, Hollenberg NK, Soszynski PA, Tao QF, Frem GJ, Williams GH, Lazarus JM. Sustained volume expansion and [Na, K] ATPase inhibition in chronic renal failure. *Am J Hypertens* 1994;7:1016-25.
- Graves SW, Williams GH. An endogenous ouabain-like factor associated with hypertensive pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:1070-4. 40
- Gusdon JP, Buckalew VM Jr, Hennessey JF. A digoxin-like immunoreactive substance in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1984;15:83-85.
- Seely EW, Williams GH, Graves SW. Markers of sodium and volume homeostasis in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:150-6.
- Lopatin DA, Ailamazian EK, Dmitrieva RI, Sh 50

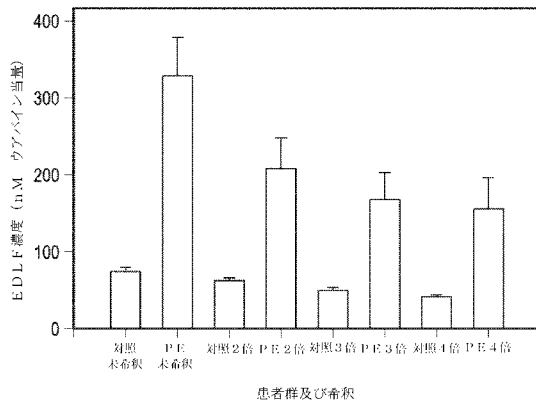
- pen VM, Fedorova OV, Doris PA, Bagrov AY. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. *J Hypertens* 1999;17:1179-1187.
- Hopoate-Sitake ML, Adair CD, Mason LA, Torres C, Kipikasa J, Graves SW. Digibind reverses inhibition of cellular Rb^{+} uptake caused by endogenous sodium pump inhibitors present in serum and placenta of women with preeclampsia. *Reproductive Sci* 2011;18:190-199. 10
- Goodlin RC. Antidigoxin antibodies in eclampsia. *N Engl J Med* 1988;318:518-9.
- Adair CD, Buckalew VM, Taylor K et al. Elevated endoxin-like factor complicating a second trimester pregnancy: treatment with digoxin-binding immunoglobulin. *Am J Nephrol* 1996;6(6):529-31.
- Adair CD, Luper A, Rose JC, Russell G, Veille J-C, Buckalew VM. The hemodynamic effects of intravenous digoxin-binding fab immunoglobulin in severe preeclampsia: a double-blind randomized, clinical trial. *J Perinatolog* 2009;29:284-289. 20
- Adair CD, Buckalew VM, Graves SW, Lam GK, Johnson DD, Saade G, Lewis DF, Robinson C, Danoff TM, Chauhan N, Hopoate-Sitake M, on behalf of the DEEP Study Group. Digoxin Immune Fab Treatment for Severe Preeclampsia. *Amer J Perinatol* 2010;27:655-662. 30
- Zhen Y, Franz KB, Graves SW. A novel assay of cell rubidium uptake using graphite furnace atomic absorption: Application to rats on a magnesium deficient diet. *J Nutritional Biochem* 2005;16:291-296.
- Mehta CR, Hilton JF. Exact power of conditional and unconditional tests: going beyond the 2x2 contingency table. *Amer Statistician* 1993;47:91-98.
- Chan I. Exact tests of equivalence and efficacy with a non-zero lower bound for comparative studies. *Statistics Med*. 1998;17:1403-1413. 40
- Graves SW. Sodium regulation, sodium pump function and sodium pump inhibitors in uncomplicated pregnancy and preeclampsia. (Review) *Frontiers in Bioscience* 2007;12:2438-2446.
- Agunanne E, Horvat D, Harrison R, Uddin MN, Jones R, Kuehl TJ, Ghanem DA, Berghman LR, L 50

- ai X, Li J, Romo D, Puschett JB. Marinobufagenin levels in preeclamptic patients: A preliminary report. *Am J Perinatol* 2011;28:509-514.
- Graves SW, Glatte K, Lazarus MJ, Hollenberg NK. Volume expansion in renal failure patients: a paradigm for a clinically relevant [Na, K] ATPase inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(S2):S54-57.
- Lusic I, Ljutic D, Maskovic J, Jankovic S. Plasma and cerebrospinal fluid endogenous digoxin-like immunoreactivity in patients with aneurismal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir* 1999;141:691-697.
- Wijndicks EFM, Vermeulen M, Van Brummelen P, Den Boer NC, Van Gijn J. Digoxin-like immunoreactive substance in patients with aneurismal subarachnoid hemorrhage. *Brit Med J* 1987;294:729-733.
- Rap ZM, Schoner W, Czernicki Z, Hildebrandt G, Mueller HW, Hoffmann O. The endogenous ouabain-like sodium pump inhibitor in cold injury-induced brain edema. *Acta Neurochir Suppl* 1994;60:98-100.
- Uddin MN, McLean LB, Hunter FA, Horvat D, Severson J, Tharakan B, Childs EW, Puschett JB. Vascular leak in a rat model of preeclampsia. *Am J Nephrol* 2009;30:26-33.
- Dismuke WM, Mbadugha CC, Faison D, Ellis DZ. Ouabain-induced changes in aqueous humor outflow facility and trabecular meshwork cytoskeleton. *Brit J Ophthalmol* 2009;93:104-109.
- Menezes JC, Dichtchekian V. Digoxin antibody prevents cerebral hemorrhage-induced hypertension. *Amer J Hypertens* 2003;16:1062-1065.
- Morris JF, McEachern MD, Poston L, Smith SE, Mulvany MJ, Hilton PJ. Evidence for an inhibitor of leucocyte sodium transport in the serum of neonates. *Clin Sci* 1987;73:291-297.
- Valdes R Jr, Graves SW, Brown BA, Landt M. Endogenous substances in newborn infants causing false-positive digoxin measurements. *J Pediatrics* 1983;102:947-950.

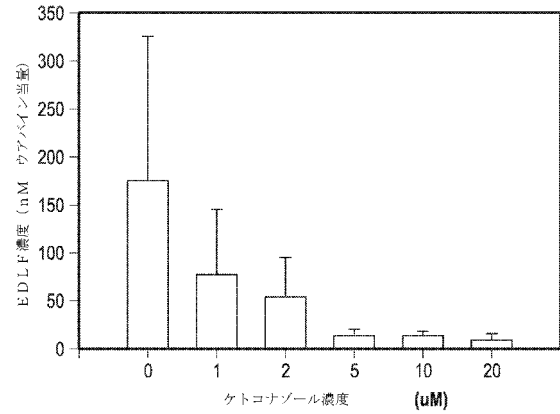
【図 1】



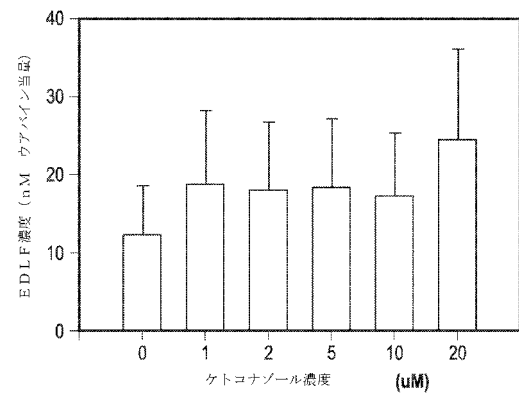
【図 2】



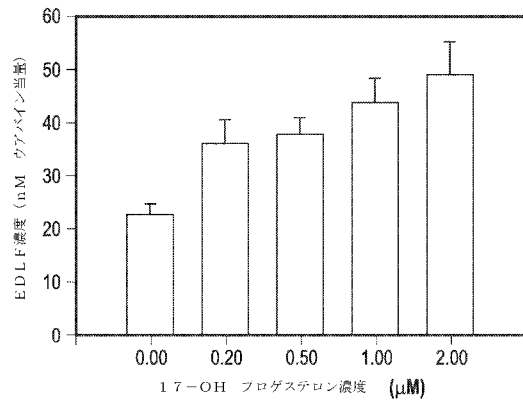
【図 3 A】



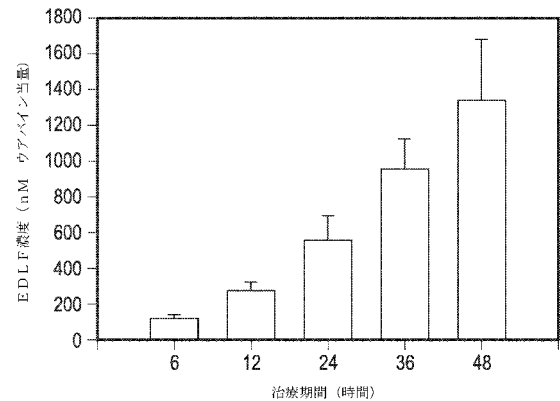
【図 3 B】



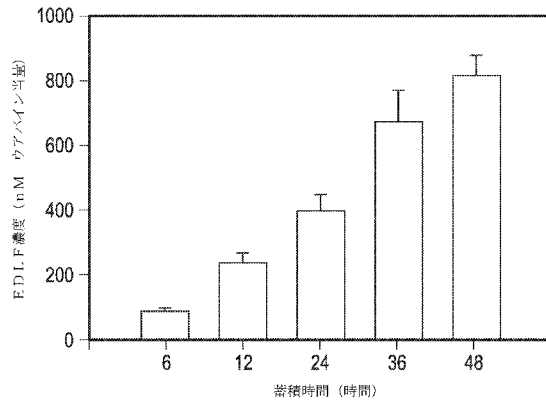
【図 4】



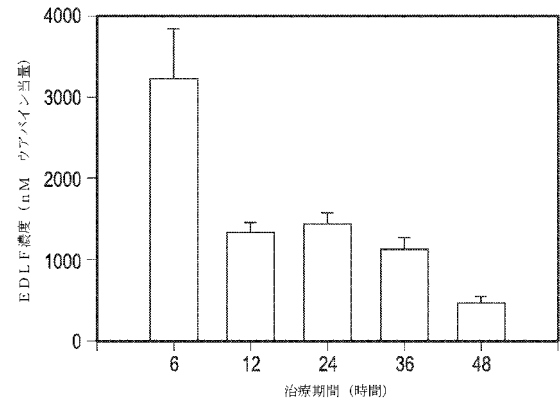
【図 5 B】



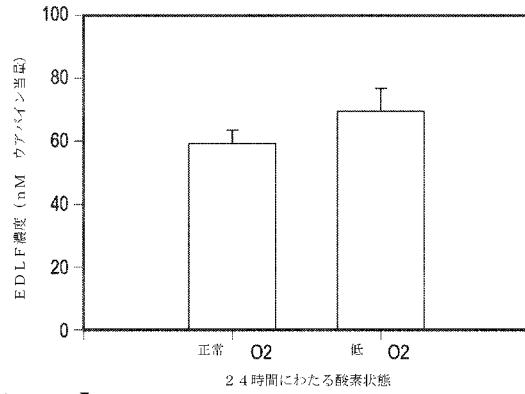
【図 5 A】



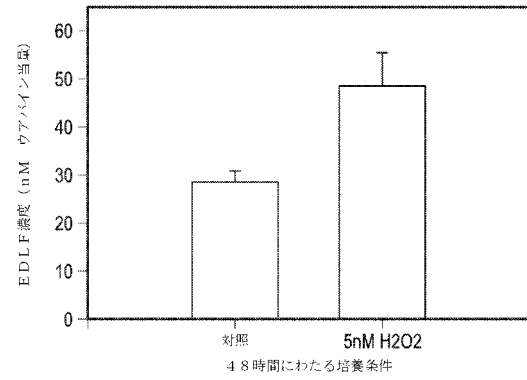
【図 6】



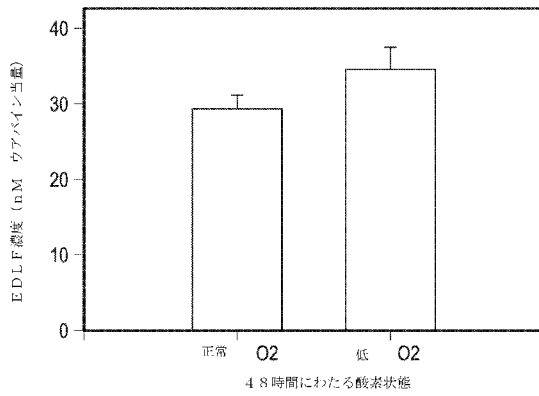
【図 7 A】



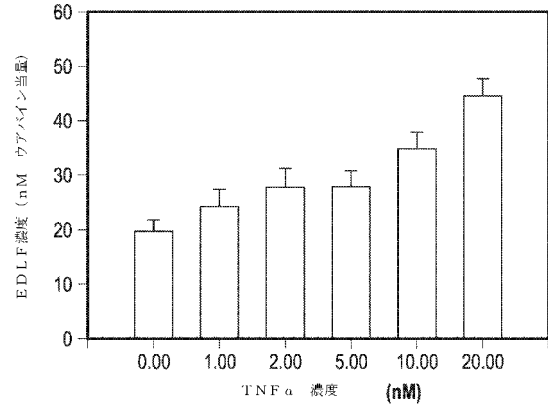
【図 8】



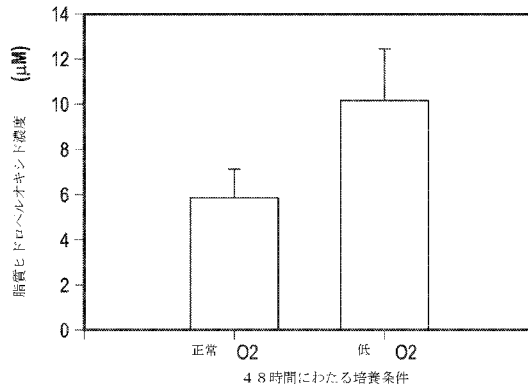
【図 7 B】



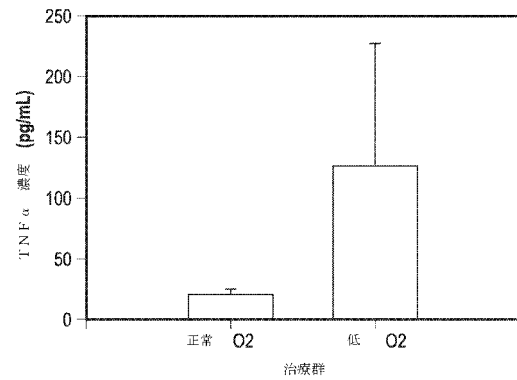
【図 9】



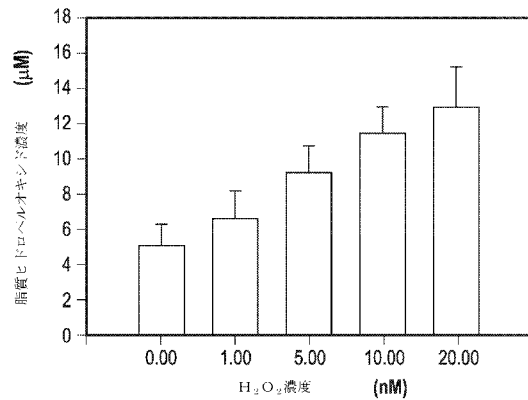
【図 10】



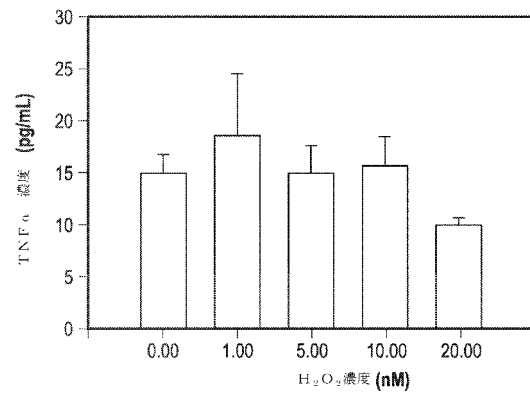
【図 12】



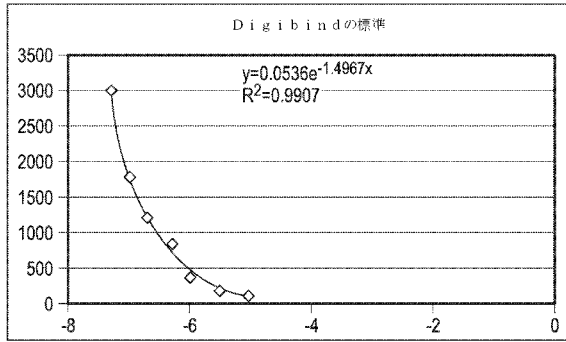
【図 11】



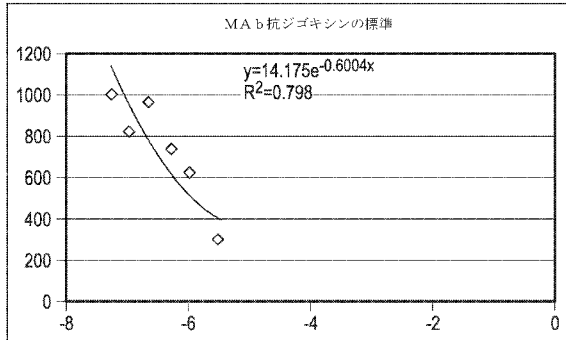
【図 13】



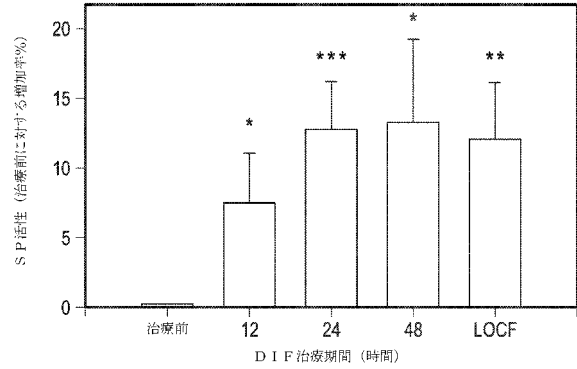
【図 1 4】



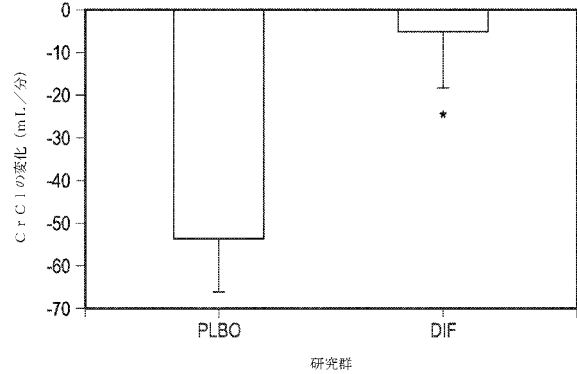
【図 1 5】



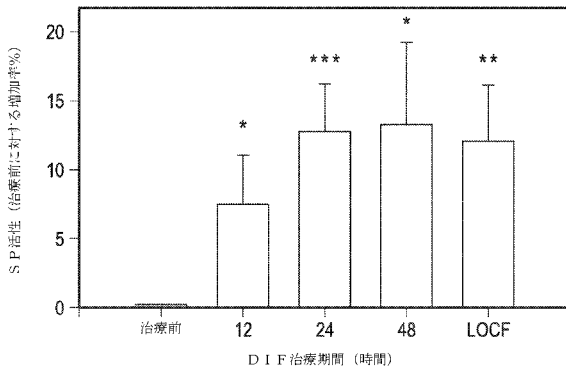
【図 1 6】



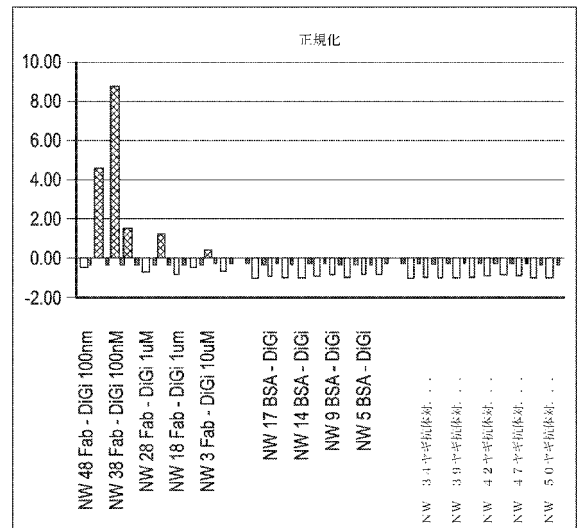
【図 1 7 A】



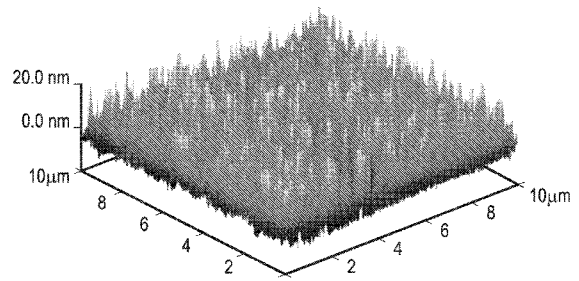
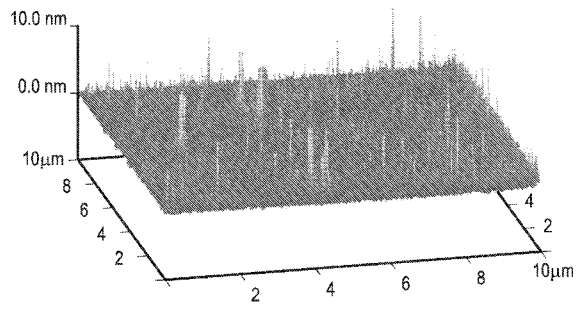
【図 1 7 B】



【図 1 8 A】



【図 18 B】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT PCT/US2014/030623 07.11.2014

International application No.

PCT/US 14/30623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61P 9/12, A61K 39/395, G01N 33/53 (2014.01) CPC - A61K 39/395, A61K 39/39583, G01N 33/53 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) - A61P 9/12, A61K 39/395, G01N 33/53 (2014.01) CPC - A61K 39/395, A61K 39/39583, G01N 33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 39/395, A61K 39/39583, G01N 33/53 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web Search terms: eclampsia or preeclampsia, digoxin, treat, therapy, digoxin Immune Fab, endogenous digitalis-like factors or endogenous digoxin-like factors or EDLF, gestational hypertension, intrauterine growth restriction, immunoassay, antibody, Fab											
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 2010/0297129 A1 (ADAIR) 25 November 2010 (25.11.2010) para [0021]-[0022], [0048], [0147], [0170], [0177], [0178], [0182]-[0183], [0186], [0191], [0217]</td> <td>1-3, 10, 28/10, (31-43)/10 29/(1-3)</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BECKMAN COULTER, Emit 2000 Digoxin Assay, September 2010 [online]. [Retrieved on 18 July 2014]. Retrieved from the Internet <URL: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/4H072/%25%25/EN_DIGOXIN.pdf> p 1, col 2, para 1</td> <td>29/(1-3)</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US 2010/0297129 A1 (ADAIR) 25 November 2010 (25.11.2010) para [0021]-[0022], [0048], [0147], [0170], [0177], [0178], [0182]-[0183], [0186], [0191], [0217]	1-3, 10, 28/10, (31-43)/10 29/(1-3)	Y	BECKMAN COULTER, Emit 2000 Digoxin Assay, September 2010 [online]. [Retrieved on 18 July 2014]. Retrieved from the Internet <URL: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/4H072/%25%25/EN_DIGOXIN.pdf > p 1, col 2, para 1	29/(1-3)
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X — Y	US 2010/0297129 A1 (ADAIR) 25 November 2010 (25.11.2010) para [0021]-[0022], [0048], [0147], [0170], [0177], [0178], [0182]-[0183], [0186], [0191], [0217]	1-3, 10, 28/10, (31-43)/10 29/(1-3)									
Y	BECKMAN COULTER, Emit 2000 Digoxin Assay, September 2010 [online]. [Retrieved on 18 July 2014]. Retrieved from the Internet <URL: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/4H072/%25%25/EN_DIGOXIN.pdf > p 1, col 2, para 1	29/(1-3)									
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐											
* 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 13 October 2014 (13.10.2014)		Date of mailing of the international search report 07 NOV 2014									
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: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2014/030623 07.11.2014

International application No.

PCT/US 14/30623

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, 10, 28-29 (in part), and 31-43 (in part), drawn to methods of treating eclampsia, preeclampsia, gestational hypertension, or intrauterine growth restriction

Group II: Claims 4-8, 11, 16-17, 19, and 20-43 (in part), drawn to methods of treating or preventing intraventricular hemorrhage

Group III: Claim 9 and 29 (in part), drawn to a method of extending pregnancy

—please see continuation on extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 10, 28-29 (in part), 31-43 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2014/030623 07.11.2014

International application No.

PCT/US 14/30623

Continuation of:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group IV: Claim 12-15, 18, 20-28 (in part), and 30-43 (in part), drawn to methods of screening patients for responsiveness to anti-digoxin therapy

Group V: Claims 44-48, drawn to a silicon nanowire biosensor comprising an immobilized anti-digoxin antibody, optionally an anti-digoxin Fab antibody fragment.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires treatment of eclampsia, preeclampsia, gestational hypertension, or intrauterine growth restriction, not required by Groups II-V.

Group II requires treatment or prevention of intraventricular hemorrhage, not required by Groups I and III-V.

Group III requires the extension of pregnancy, not required by Groups I-II and IV-V.

Group IV requires screening patients for responsiveness to anti-digoxin therapy, not required by Groups I-III and V.

Group V requires a silicon nanowire biosensor comprising an immobilized antibody, not required by Groups I-IV.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I-V is an anti-digoxin antibody, specifically a digoxin immune Fab. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2010/0297129 A1 to (Adair). Adair discloses a digoxin immune Fab (para [0043] - "an antibody that reacts immunologically with or otherwise binds digoxin"; para [0145] - "Digoxin immune Fab"). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

The feature shared by Groups I-IV is anti-digoxin therapy for eclampsia, preeclampsia, gestational hypertension, intrauterine growth restriction, intraventricular hemorrhage. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by Adair, which teaches anti-digoxin therapy (para [0042] - "pharmaceutical composition having a high dose of digoxin binding capacity") for eclampsia (para [0042]), preeclampsia (para [0042]), gestational hypertension (para [0042]), intrauterine growth restriction (para [0042]), and intraventricular hemorrhage (para [0044]). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

The feature shared by Groups I-IV are the method steps of: obtaining a sample from a patient, conducting a digoxin-immune antibody assay, determining whether the patient is EDLF positive based on the assay, and administering digoxin immune Fab (DIF) to patient if the patient is determined to be EDLF positive. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is obvious in view of Adair. Obtaining a patient sample and using a digoxin-immune antibody assay to determine a patient's EDLF status would have been obvious in view of Adair's disclosure that endogenous digoxin-like factors (EDLF) (para [0021]-[0022] - "endogenous factors have generally been referred to as endogenous "digoxin-like," "digitalis-like") can be detected in maternal or neonatal serum and umbilical cord blood (para [0021]) by anti-digoxin antibodies in immunoassays for digoxin (para [0021]). Further, use of the results of the assay to determine whether to administer digoxin Immune Fab (DIF) to the patient would have been obvious in view of Adair's disclosure that EDLF has shown to be present at higher levels in women with preeclampsia than in women without preeclampsia (para [0021]), and that a patient can be evaluated for risk factors of preeclampsia and administering a therapeutically effective composition of high dose digoxin antibody if the patient is determined to have a risk factor (para [0178]). Adair also teaches that the therapeutic high dose digoxin antibody can be digoxin immune Fab (DIF) (para [0170] - "Preferably, the digoxin antibody is digoxin Immune Fab"; para [0147] - "Each vial of DIGIFAB7, will bind approximately 0.5 mg digoxin and contains 40 mg of digoxin immune Fab"). Thus the method of evaluating EDLF to determine whether to administer digoxin immune Fab (DIF) to patient would have been obvious in view of Adair. As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

The feature shared by Groups I, II, and III is a gravid human patient, and Groups I and III is a gravid human patient exhibiting at least one symptom of gestational hypertension, preeclampsia, eclampsia, or intrauterine growth restriction. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by Adair, which discloses a gravid human patient exhibiting at least one symptom of preeclampsia (para [0209] - "A 19 year old 74 Kg gravida 1, para 0 female at 29 weeks gestational age ... The patient was experiencing headache, blurred vision, epigastric pain, and shortness of breath ... The patient was admitted for surveillance and work-up of preeclampsia"). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-V therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 K 31/166 (2006.01)	A 6 1 K 31/166	
A 6 1 K 31/4422 (2006.01)	A 6 1 K 31/4422	
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	
A 6 1 K 31/502 (2006.01)	A 6 1 K 31/502	
A 6 1 K 33/06 (2006.01)	A 6 1 K 33/06	
A 6 1 K 31/4166 (2006.01)	A 6 1 K 31/4166	

(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, 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, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 アデル, チャールズ
アメリカ合衆国, テネシー州 37377, シグナル マウンテン, マウンテン オーチャード
パス 22

Fターム(参考) 4C084 AA19 NA05 ZA421 ZA422 ZA811
4C085 AA13 AA21 AA34 BB41 CC04
4C086 AA01 AA02 BC25 BC38 BC41 DA08 HA04 HA17 MA02 MA04
NA05 ZA42
4C206 AA01 AA02 FA56 GA02 GA22 MA02 MA04 MA14 MA21 NA05