(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110785664 A
(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201880042548.9

(22)申请日 2018.04.30

(30)优先权数据
10201703502T 2017.04.28 SG

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SG2018/050208 2018.04.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/199849 EN 2018.11.01

(71)申请人 新加坡保健服务集团有限公司
地址 新加坡新加坡
申请人 南洋理工大学

(72)发明人 T·C·陈 C·W·古 N·S·陈 Z·W·陈

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
代理人 康健 王思琪

(51)Int.Cl.
G01N 33/74(2006.01)
G01N 33/493(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图9页

(54)发明名称

流产中的特征性代谢物

(57)摘要

本文公开了鉴定受试者的流产风险的方法，该方法包括检测并测量获自所述受试者的样品中至少一种代谢物的浓度。具体地，血清或尿液样品中四氢可的松浓度的增加以及丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱或3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸浓度的降低与早期妊娠中的自然流产相关。本文还公开了用于确定受试者的流产风险的试剂盒。

CN 110785664 A

1.一种鉴定流产风险的方法,所述方法包括检测并测量获自受试者的样品中至少一种代谢物的浓度,其中与对照组相比,所述代谢物的不存在或存在鉴定出增加的流产风险,其中所述代谢物选自由以下组成的组:四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

2.一种鉴定流产风险的方法,所述方法包括:

测量获自受试者的样品中至少一种代谢物的浓度;和

将所述至少一种代谢物的浓度与对照组中相应代谢物的浓度进行比较;

其中所述代谢物选自由以下组成的组:四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸及其组合。

3.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中与对照组相比,浓度测量值的增加或降低或者代谢物的不存在或存在鉴定了增加的流产风险。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述对照组由经历足月分娩的受试者组成。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括测量至少两种、至少三种、至少四种代谢物、至少五种代谢物或六种代谢物。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述代谢物为四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸的降低指示增加的流产风险。

8.根据权利要求7所述的方法,其中3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.30的倍数变化的降低(-0.30)。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中四氢可的松的增加指示增加的流产风险。

10.根据权利要求9所述的方法,其中四氢可的松与对照相比的增加是与对照相比浓度的至少0.40的倍数变化的增加。

11.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中丙酰基肉碱的降低指示增加的流产风险。

12.根据权利要求11所述的方法,其中丙酰基肉碱与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.41的倍数变化的降低(-0.41)。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中异戊酰基肉碱的降低指示增加的流产风险。

14.根据权利要求13所述的方法,其中异戊酰基肉碱与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.32的倍数变化的降低(-0.32)。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中3-甲基戊二酰基肉碱的降低指示增加的流产风险。

16.根据权利要求15所述的方法,其中3-甲基戊二酰基肉碱与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.59的倍数变化的降低(-0.59)。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中己酰基肉碱的增加指示增加的流产

风险。

18.根据权利要求17所述的方法，其中己酰基肉碱与对照相比的增加是与对照相比浓度的至少0.38的倍数变化的增加。

19.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述流产选自由以下组成的组：自然流产、妊娠早期流产、妊娠中期流产、枯萎卵和稽留流产。

20.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述代谢物使用选自由以下组成的组的方法来检测：色谱法、基于抗体的测定、质谱法、光谱法、免疫沉淀及其组合。

21.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述样品是血清或尿液样品。

22.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中如果所述受试者被鉴定处于流产风险，则向所述受试者施用地屈孕酮。

23.一种试剂盒，所述试剂盒用于根据如权利要求1至21中所述的方法鉴定流产风险。

24.根据权利要求23所述的试剂盒，其中所述试剂盒是选自由以下组成的组的试剂盒：ELISA试剂盒、测试条试剂盒和微芯片测试试剂盒。

25.根据权利要求23所述的试剂盒，其中所述试剂盒包含用于如权利要求1至21任一项中所述的各代谢物的一种代谢物标准品。

流产中的特征性代谢物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年4月28日提交的新加坡临时申请第10201703502T号的优先权权益,其内容通过引用整体并入本文用于所有目的。

发明领域

[0003] 本发明一般性地涉及分子生物学领域。特别地,本发明涉及生物标志物用于检测流产和鉴定处于流产风险的女性的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 先兆流产(threatened miscarriage)是最常见的妇科急症,其发生在约20%的妊娠女性中。这些女性中的约四分之一继续发展为自然流产,然而流产的病因仍然难以捉摸。为了鉴定可能的生物标志物和新颖的治疗靶,已经进行了许多研究以阐明导致流产的途径。

[0006] 迄今为止,尚未进行关于与自然流产相关的尿液代谢物的研究。由于现有的产前护理不能够以足够的准确度准确地鉴定处于高自然流产风险的女性,因此需要进一步了解潜在原因,以更好地预测并最终预防自然流产。因此,对一种检测和确定妊娠女性中的流产风险的方法存在未被满足的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个方面,本发明涉及鉴定流产风险的方法,该方法包括检测并测量获自受试者的样品中至少一种代谢物的浓度,其中与对照组相比,代谢物的不存在或存在鉴定出增加的流产风险,其中代谢物选自由以下组成的组:四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0009] 在另一方面,本发明涉及鉴定流产风险的方法,该方法包括测量获自受试者的样品中至少一种代谢物的浓度;以及将至少一种代谢物的浓度与对照组中相应代谢物的浓度进行比较;其中代谢物选自由以下组成的组:四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0010] 在另一方面,本发明涉及试剂盒,所述试剂盒用于根据如本文所描述的方法鉴定自然流产风险。

[0011] 附图简述

[0012] 当结合非限制性实例和附图考虑时,参考详细描述,本发明将被更好地理解,在附图中:

[0013] 图1示出了用于在该实例中的尿液代谢物分析的示例性工作流程的图。将来自两个组(cohort)的样品随机注射到系统中以通过超高效液相色谱法(UPLC)进行分离,然后通过质谱法(MS)进行分析。

[0014] 图2示出了用于鉴定病例组和对照组之间的代谢物的设置的示意图。将质量控制(QC)样品散布在80个样品之间,以确保柱的分辨率不受损害。

[0015] 图3示出了散点图,其描绘了当在预处理后应用于代谢组学数据时的主成分分析

(PCA)结果。通过在PCA评分图上对质量控制(QC)样品进行紧密聚类,对PCA评分图中QC样品的聚类以及运行顺序QC的漂移进行目视检查,评估数据完整性。对于(A)正离子模式和(B)负离子模式,发现QC样品被良好聚类在评分图的中心附近。然而,病例样品和对照样品没有表现出任何显著的分离。数据集的质量首先使用主成分分析(PCA)来评估。

[0016] 图4示出了散点图,其描绘了对尿液代谢组学数据进行的多变量分析的结果。(A)ESI+测量的评分图。发现来自病例受试者和对照受试者的尿液样品沿预测成分轴良好分离,其中解释方差R2Y＝0.67,且可预测性Q2Y＝0.22。(B)ESI-实验的评分图,其中R2Y＝0.70,且Q2Y＝0.19。

[0017] 图5示出了示意性途径,其示出肉碱和酰基肉碱的相互转化以及它们从胞质溶胶(cytosol)到线粒体中的转运。CPTI:肉碱棕榈酰转移酶-1;CPTII:肉碱棕榈酰转移酶-2;CACT:肉碱-酰基肉碱转位酶。

[0018] 图6示出了所鉴定的每种代谢物的MS/MS谱。将来自样品的MS/MS谱与来自商购标准品的MS/MS谱进行比较,以确认特征的身份。3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸、四氢可的松、丙酰基肉碱和异戊酰基肉碱与标准品匹配,从而确认了它们的身份。另一方面,3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱具有另外的特征,并且可能是所提出的代谢物的结构异构体。

[0019] 图7示出了本公开内容中使用的超疏水性SERS芯片的示意图(a;上部),以及其分析物浓缩效果(a;底部)。(b)示出了在所描述的芯片上测量的3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸(孕烷)样品的SERS谱。(c)基于610cm^{-1}峰,不同3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸浓度的SERS强度变化的标准校准曲线。

[0020] 详细描述

[0021] 迄今为止,已鉴定出多种母体血清生物标志物、医学和社会心理因素作为可能对胎儿健康产生影响的因素。另外,近期的研究表明了激素和内分泌-免疫相互作用在维持早期妊娠中的重要性。黄体期缺陷(luteal phase deficiency)已显示促成流产,且血清孕酮(progesterone)作为预后标志物的测量和补充孕酮的处方已被提出作为可能的诊断和治疗方法。然而,黄体期缺陷仅占流产的35%。

[0022] 已被证明在维持早期妊娠中是重要的一种激素是孕酮,其促进母体对胎儿半同种异体移植物(semi-allograft)的免疫耐受、维持蜕膜化并控制子宫收缩。孕酮触发淋巴细胞和蜕膜细胞表达孕酮诱导的阻断因子(PIBF)。PIBF已显示在体内发挥抗流产(anti-abortive)作用,并且是孕酮依赖性免疫调节中的关键介导物。孕酮和PIBF二者都有助于早期妊娠的成功,并且若干较早的研究已报告了具有较低水平的血清孕酮和PIBF的女性的流产风险显著更高。还显示了具有高于(>)35nmol/L血清孕酮的女性具有相对低的流产风险,其中相应的阴性预测值为92%。然而,仅约35%的具有复发性妊娠丢失的女性是由于导致孕酮水平不足的黄体期缺陷。因此,可能存在其他途径促成自然流产,并且阐明这些途径可导致新的生物标志物和自然流产的靶向治疗的开发。

[0023] 除血清生物标志物之外,代谢谱分析(profiling)也被用于评估异位妊娠的风险。超高效液相色谱质谱法(UPLC-MS)已被用于查看大鼠中的血浆代谢物,并鉴定出与小于胎龄儿综合征(small-for-gestational age syndrome)相关的辨识性代谢物。其他研究也能够鉴定出具有先兆子痫的妊娠女性与继续发展为健康分娩的妊娠女性之间的显著代谢差

异。值得注意的是，使用患者的尿液样品，若干代谢物已被鉴定出与产前紊乱例如妊娠期糖尿病和早产相关。

[0024] 尿液β-人绒毛膜促性腺激素(bHCG)在诊断妊娠方面相对于血清bHCG的相对成功，证明了尿液代谢物作为妊娠结局的非侵入性诊断标志物或预后标志物的效用。然而，与bHCG不同，孕酮主要在肝中代谢，并且其代谢物在尿液中排泄。

[0025] 因此，在一个实例中，本文公开的方法中使用的样品是体液样品。在另一个实例中，样品是血清或尿液样品。在另一个实例中，样品是血清样品。在另一个实例中，样品是尿液样品。

[0026] 进行了对80位患者的病例对照研究，其中一半患者继续发展为健康分娩，而另一半患者则自然流产。从辨识性代谢物谱中提出了一组与自然流产相关的尿液代谢物，以及可能导致女性面临先兆流产并进展为自然流产的可能机制。

[0027] 为了了解流产除了自然流产之外的其他原因，并确定流产的生物标志物或代谢物，分析了具有先兆流产的女性中尿液代谢物的变化。为了这个目的，进行了一项八十(80)例在妊娠6至10周之间面临先兆流产的患者的病例对照研究。40例自然流产患者和40例持续妊娠患者在妊娠16周的尿液代谢组学分析表明，脂肪酸的胎盘线粒体β-氧化受损是自然流产的可能原因。结果突出了尿液代谢物作为用于面临先兆流产的女性的风险分层的非侵入性筛查工具的用途。

[0028] 如本文所使用的，术语“自然流产(spontaneous miscarriage)”是指在妊娠24周之前子宫内妊娠的非诱发性自然丢失。如本文所使用的，术语“先兆流产(threatened miscarriage)”是指在妊娠24周之前伴有阴道出血、具有或没有腹部疼痛的持续妊娠。

[0029] 招募了在妊娠6至10周之间面临先兆流产的八十(80)名患者。四十(40)名患者在妊娠16周之前自然流产(病例)且40名患者具有超过16周的持续妊娠(对照)。具有持续妊娠的女性的平均血清孕酮水平(66.5±24.2nmol/L)显著高于自然流产女性的平均血清孕酮水平(32.0±21.0nmol/L)(P<0.0001)(表1)。值得注意的是，除了胎龄，两组之间的母体特征不存在显著差异。

[0030]

母体特征	在妊娠 16 周持续妊娠组(N = 40)	在妊娠 16 周自然流产组(N = 40)	P 值
血清生物标志物			
孕酮，平均值±SD (nmol/L)	66.5 ± 24.2	32.0 ± 21.0	<0.0001
人口统计特征			
年龄，平均值±SD（年）	30.8 ± 3.9	31.8 ± 5.6	n.s.
健康、生产和生活方式因素			
招募时的胎龄(GA)，平均值（周）	7.6 ± 1.7	6.7 ± 1.2	<0.05
之前的流产(%)	35	25	-
BMI，平均值±SD(kg/m^2)	22.5 ± 4.4	24.0 ± 4.5	n.s.
医学合并症			
高血压(%)	0	0	-
妊娠期间吸烟(%)	10	5	n.s.
妊娠期间酒精(%)	0	0	-

[0031] 表1.在妊娠16周持续妊娠或自然流产的女性的母体特征和血清孕酮水平。

[0032] 尿液代谢物分析

[0033] 超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS)被用于分析对照组和病例组样品(例如尿液样品)中存在的代谢物。简而言之,首先使每个样品通过UPLC柱以分离各种代谢物,然后通过质谱法进行分析(图1)。本研究中的UPLC-MS分析采用了质量控制(QC)策略,该策略先前已被描述用于监控仪器稳定性和分析物可再现性的目的(图2)。

[0034] 接下来,对原始UPLC-MS数据应用峰对齐、峰挑选、峰去卷积、中值归一化和对数变换。在电喷雾正离子模式(ESI+)和电喷雾负离子模式(ESI-)中分别发现了总计1,291和1,153个保留时间-精确质量对(即特征)。样品分析的稳定性和可再现性使用主成分分析(PCA)评分图进行可视化,如图3所示出的。发现质量控制样品在评分图中紧密聚类,并且其主成分分析评分不存在漂移。在去除在所有质量控制样品中均不存在的特征之后,计算所有特征的变异系数(CV)值或相对标准偏差(RSD)值。在正离子模式和负离子模式下,89%的特征的变异系数均小于10%。

[0035] 最后,测试了稀释的质量控制样品中特征的线性。当将接受阈值设置为确定系数(R^2)值大于0.9(R^2>0.9)时,正离子和负电离中77%和87%的特征被保留用于下游分析。在这些步骤之后,从正离子获得了总计791个特征,且从负离子获得总计1004个特征。

[0036] 为了获得能够定义病例和对照受试者的尿液代谢谱的变化的特征列表,使用OPLS-DA模型分析了两种离子模式中获得的数据(图4)。在分析之前,将数据标准化。用针对年龄和BMI调整的5倍交叉验证,进行OPLS-DA建模。对于ESI+,获得的解释方差(R2Y)为0.67,以及可预测性(Q2Y)为0.22。对于ESI-,R2Y=0.70,且Q2Y=0.19。最后,基于模型系数的绝对值和5%错误发现率(FDR)校准后的单因素方差分析(ANOVA)的p值选择代谢物。

[0037] 使这些入围的特征进一步经受LC MS/MS,并将获得的谱用于与开源数据库进行比较以对其进行鉴定。鉴定出总计六种代谢物,它们属于三个不同家族,它们的水平在继续发展至健康分娩的女性与具有自然流产的女性之间存在显著差异(表2)。

[0038] 因此,在一个实例中,本文公开的方法包括检测六种代谢物的不存在或存在。

[0039] 总之,本文提供的结果表明,较低的孕酮水平、较高的应激和脂肪酸代谢缺乏是组中自然流产背后的原因。

[0040]

名称	家族	作用	平均相对丰度(整段妊期)	平均相对丰度(流产)	FC	p值	与GA的相关性(p值)
3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸	孕酮	免疫耐受	410901	286680	-0.30	<0.001	0.01
四氢可的松	皮质醇	应激轴(stress axis)	5376	7527	0.40	0.0027	n.s.
丙酰基肉碱	肉碱	脂肪酸代谢	8841	5187	-0.41	<0.0001	n.s.
异戊酰基肉碱	肉碱	脂肪酸代谢	3989	2709	-0.32	<0.001	n.s.
3-甲基戊二酰基肉碱	肉碱	脂肪酸代谢	2579	1069	-0.59	<0.001	n.s.
己酰基肉碱	肉碱	脂肪酸代谢	1653	2286	0.38	0.0016	n.s.

[0041] 表2.其水平在继续发展为健康分娩的女性和自然流产女性之间存在显著差异的

位居前列的特征击中。倍数变化表示平均相对丰度的差异，其中负值表示与健康分娩的女性相比，流产女性的水平较低。FC-倍数变化；GA-胎龄。

[0042] 早期，发现除了孕酮水平以外，两个组之间的胎龄也显著不同。然后，应用协方差分析来确定六种代谢物的水平是否与胎龄差异相关(表2)。发现，只有3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸与胎龄相关。这是由于孕酮水平随胎龄而变化的事实，并因此，孕酮代谢物，3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸的水平与胎龄相关。在针对胎龄差异进行调整之后，两个组中的3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸水平仍然显著不同(表2)。其余五种代谢物显示不受胎龄的影响，并因此未对其水平进行调整。值得注意的是，两个组之间的所有五种代谢物均存在显著差异(表2)。

[0043] 因此，在一个实例中，方法如本文所公开的，其中与对照组相比，浓度测量值的增加或降低或代谢物的不存在或存在鉴定了增加的流产风险。

[0044] 与具有健康分娩的女性相比，发现两种代谢物的水平在具有自然流产的女性中更高。这两种代谢物是四氢可的松，其是应激诱导的激素；和己酰基肉碱，其是属于肉碱家族并参与脂肪酸代谢的代谢物。

[0045] 因此，在一个实例中，本文公开的方法包括检测至少两种代谢物的不存在或存在。在另一个实例中，本文公开的方法包括检测两种代谢物的不存在或存在。在又另一个实例中，代谢物浓度的增加或代谢物浓度的倍数变化指示增加的流产风险。

[0046] 另一方面，发现四种代谢物的水平在具有自然流产的女性中较低。其中之一是3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸，其是孕二醇的葡糖苷酸缀合物且是孕酮的无活性代谢产物。因此，较低的3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸尿液水平反映了母体内较低的孕酮水平，如在母体特征中确实观察到的(表1)。

[0047] 因此，在一个实例中，本文公开的方法包括检测至少四种代谢物的不存在或存在。在另一个实例中，本文公开的方法包括检测四种代谢物的不存在或存在。在又另一个实例中，代谢物浓度的增加或降低或者代谢物浓度的倍数变化指示增加的流产风险。

[0048] 还鉴定了其他三种肉碱产物。这些肉碱产物是丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱，它们的水平在流产的母体中较低。

[0049] 因此，在一个实例中，本文公开的方法包括检测至少三种代谢物的不存在或存在。在另一个实例中，本文公开的方法包括检测三种代谢物的不存在或存在。在又另一个实例中，代谢物浓度的降低或者代谢物浓度的倍数变化指示增加的流产风险。

[0050] 因此，在一个实例中，公开了鉴定流产风险的方法，该方法包括检测并测量获自受试者的样品中至少一种代谢物的浓度。在另一个实例中，与对照组相比，一种或更多种代谢物的不存在或存在鉴定出增加的流产风险。在又另一个实例中，与对照组相比，一种或更多种代谢物浓度的增加或降低鉴定出增加的流产风险。

[0051] 在另一个实例中，公开了鉴定流产风险的方法，该方法包括测量获自受试者的样品中至少一种代谢物的浓度；以及将至少一种代谢物的浓度与对照组中相应代谢物的浓度进行比较。

[0052] 在一个实例中，公开了鉴定流产风险的方法，该方法包括检测并测量获自受试者的样品中至少一种代谢物的浓度，其中与对照组相比，代谢物的不存在或存在鉴定出增加的流产风险，其中代谢物选自由以下组成的组：四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-

甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0053] 如本文公开的,浓度水平的变化可以以若干数学上准确的方式进行描绘和描述。例如,代谢物水平的变化可以显示为不具有值的变化,从而说明与标准值或对照值的偏差。变化可以以绝对数表示(例如,mg/ml的浓度),或可以以相对数表示,例如表示为与对照相比的变化百分比或与对照相比的倍数变化。

[0054] 如本文所使用的,术语“增加”和“降低”是指受试者或获自受试者的样品中所选代谢物与对照受试者或获自其的样品中相同代谢物相比的浓度相对变化。因此,增加指示正规模的变化,而降低指示负规模的变化。如本文所使用的,术语“变化”还指例如与对照样品中的相同代谢物相比,代谢物浓度之间的差异。然而,术语“变化”不对所观察到的差异进行任何评估。

[0055] 如本文所公开的代谢物的增加或降低可以被公开为倍数变化。术语“倍数变化”则指描述了量变化了多少(例如浓度从初始值到最终值的变化)的量度。在一个实例中,倍数变化可以是当将代谢物与对照进行比较时所述代谢物浓度的量度。例如,初始值为30且最终值为60对应了倍数变化为1(或等同地,变化至2倍),或以常见的术语表示,1倍增加。倍数变化被计算为最终值和初始值之差与原始值的比率。因此,如果初始值为A且最终值为B,则倍数变化为(B-A)/A或等同地为B/A-1。作为另一个实例,从80至20的变化将是-0.75的倍数变化,而从20至80的变化将是3的倍数变化(意味着是原始值的3至4倍的变化)。

[0056] 如本文所公开的浓度变化也可以以百分比来描述。为了这个目的,可以将值从20至10的变化表示为值的50%变化,而可以将值从20至40的变化表示为值的100%变化。百分比变化可以作为正值或负值提供,其中负百分比表示值相对于起始值的降低。因此,正百分比表示值相对于起始值的增加。

[0057] 在一个实例中,值的变化可以是但不限于在-10至10之间、在0.01至10之间、在1至10之间、在0.01至1之间、在0.1至0.2之间、在0.2至0.3之间、在0.3至0.4之间、在0.4至0.5之间、在0.5至0.6之间、在0.6至0.7之间、在0.7至0.8之间、在0.8至0.9之间、在0.9至1之间、在1至5之间、在1至2之间、在1至2.5之间、在2至3.5之间、在0.15至0.25之间、在0.25至0.35之间、在0.35至0.45之间、在0.45至0.55之间、在0.55至0.65之间、在0.65至0.75之间、在0.75至0.85之间、在0.85至0.95之间、在0.95至1之间、约0.01、约0.02、约0.03、约0.04、约0.05、约0.06、约0.07、约0.08、约0.09、约0.1、约0.11、约0.12、约0.13、约0.14、约0.15、约0.16、约0.17、约0.18、约0.19、约0.20、约0.21、约0.22、约0.23、约0.24、约0.25、约0.26、约0.27、约0.28、约0.29、约0.30、约0.31、约0.32、约0.33、约0.34、约0.35、约0.36、约0.37、约0.38、约0.39、约0.40、约0.41、约0.42、约0.43、约0.44、约0.45、约0.46、约0.47、约0.48、约0.49、约0.50、约0.51、约0.52、约0.53、约0.54、约0.55、约0.56、约0.57、约0.58、约0.59、约0.60、约0.61、约0.62、约0.63、约0.64、约0.65、约0.66、约0.67、约0.68、约0.69、约0.70、约0.71、约0.72、约0.73、约0.74、约0.75、约0.76、约0.77、约0.78、约0.79、约0.80、约0.81、约0.82、约0.83、约0.84、约0.85、约0.86、约0.87、约0.88、约0.89、约0.90、约0.91、约0.92、约0.93、约0.94、约0.95、约0.96、约0.97、约0.98、约0.99、约1、约1.5、约1.75、在-0.01至-10之间、在-1至-10之间、在-0.01至-1之间、在-0.1至-0.2之间、在-0.2至-0.3之间、在-0.3至-0.4之间、在-0.4至-0.5之间、在-0.5至-0.6之间、在-0.6至-0.70之间、在-0.7至-0.8之间、在-0.8至-0.9之间、在-0.9至-1之间、在-1至-5之间、在-1至-2之间、在-1至-2.5之间、

在-2至-3.5之间、在-0.15至-0.25之间、在-0.25至-0.35之间、在-0.35至-0.45之间、在-0.45至-0.55之间、在-0.55至-0.65之间、在-0.65至-0.75之间、在-0.75至-0.85之间、在-0.85至-0.95之间、在-0.95至-1之间、约-0.01、约-0.02、约-0.03、约-0.04、约-0.05、约-0.06、约-0.07、约-0.08、约-0.09、约-0.1、约-0.11、约-0.12、约-0.13、约-0.14、约-0.15、约-0.16、约-0.17、约-0.18、约-0.19、约-0.20、约-0.21、约-0.22、约-0.23、约-0.24、约-0.25、约-0.26、约-0.27、约-0.28、约-0.29、约-0.30、约-0.31、约-0.32、约-0.33、约-0.34、约-0.35、约-0.36、约-0.37、约-0.38、约-0.39、约-0.40、约-0.41、约-0.42、约-0.43、约-0.44、约-0.45、约-0.46、约-0.47、约-0.48、约-0.49、约-0.50、约-0.51、约-0.52、约-0.53、约-0.54、约-0.55、约-0.56、约-0.57、约-0.58、约-0.59、约-0.60、约-0.61、约-0.62、约-0.63、约0.64、约-0.65、约-0.66、约-0.67、约-0.68、约-0.69、约-0.70、约-0.71、约-0.72、约-0.73、约-0.74、约-0.75、约-0.76、约-0.77、约-0.78、约-0.79、约-0.80、约-0.81、约-0.82、约-0.83、约-0.84、约-0.85、约-0.86、约-0.87、约-0.88、约-0.89、约-0.90、约-0.91、约-0.92、约-0.93、约-0.94、约-0.95、约-0.96、约-0.97、约-0.98、约-0.99、约-1、约-1.5或约-1.75的倍数变化。

[0058] 在一个实例中，值的变化可以是但不限于在1％至100％之间、在1％至50％之间在50％至100％之间、在25％至75％之间、在75％至100％之间、在30％至60％之间、约1％、约2％、约3％、约4％、约5％、约6％、约7％、约8％、约9％、约10％、约11％、约12％、约13％、约14％、约15％、约16％、约17％、约18％、约19％、约20％、约21％、约22％、约23％、约24％、约25％、约26％、约27％、约28％、约29％、约30％、约31％、约32％、约33％、约34％、约35％、约36％、约37％、约38％、约39％、约40％、约41％、约42％、约43％、约44％、约45％、约46％、约47％、约48％、约49％、约50％、约51％、约52％、约53％、约54％、约55％、约56％、约57％、约58％、约59％、约60％、约61％、约62％、约63％、约64％、约65％、约66％、约67％、约68％、约69％、约70％、约71％、约72％、约73％、约74％、约75％、约76％、约77％、约78％、约79％、约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％的变化。

[0059] 这些代谢物的身份则通过将它们的MS/MS谱与商购的标准品的MS/MS谱进行比较来确认(图6)。市售可得的3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸、四氢可的松、丙酰基肉碱和异戊酰基肉碱的MS/MS谱中的关键特征与尿液样品中观察到的那些特征相匹配，从而证实了它们的身份。然而，当与市售标准品进行比较时，观察到尿液样品中3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱的另外的特征，表明这些是样品中鉴定出的代谢物的可能的结构异构体。

[0060] 本文概述的这项研究将具有和没有自然流产的妊娠女性之间的尿液代谢物进行比较。这些发现促成具有健康妊娠的女性和具有自然流产的女性的代谢谱的汇集，据此使人们更好地了解尿液代谢物衍生物的相互作用，从而促进对自然流产背后的病理生理学的了解。显示了本文公开的代谢物可以被用作用于流产风险和可能性的预测和诊断工具。通过对尿液代谢物谱进行筛选和比较，发现六种尿液代谢物在具有和没有自然流产的妊娠女性之间存在显著差异。

[0061] 孕酮代谢物

[0062] 发现3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸(一种孕酮衍生的类固醇-葡糖苷酸)在具有自然流产的女性中显著更低。这与以前的研究一致，所述以前的研究发现相同的尿液

代谢物在异位妊娠中显著降低。

[0063] 葡萄苷酸化是用于类固醇降解的代谢途径，并且是将类固醇转化为亲水性分子以促进排泄的重要步骤。由于类固醇-葡糖苷酸是类固醇的代谢物，因此它们在尿液中的水平反映了血流中的类固醇水平。低的3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸水平反映了具有自然流产的女性中低的孕酮水平。孕酮促进子宫静止，并已显示对于继续妊娠和减少子宫收缩至关重要。临床研究还表明，流产女性具有显著更低的血清孕酮。

[0064] 孕酮不仅支持子宫内膜发育，它还通过产生更多的一氧化氮来增强血流和氧输送。孕酮受体拮抗剂米非司酮的施用也已显示会引起流产，进一步巩固了孕酮在维持妊娠方面的关键作用。

[0065] 孕酮触发了孕酮诱导的阻断因子(PIBF)的表达。胎儿在母体中的存在会触发免疫应答，因为它也包含来自父亲一方的细胞。因此，成功的妊娠将需要抑制母体针对胎儿的免疫应答。孕酮诱导的阻断因子(PIBF)已显示将促炎Th1反应的细胞因子产生调节为抗炎Th2反应的细胞因子产生。此外，PIBF直接调节蜕膜淋巴细胞的细胞毒性作用，保护胎儿免受这些免疫细胞的损害。已经显示较低的PIBF水平会导致病理性妊娠，例如早产或先兆子痫。因此，孕酮在妊娠中的不可缺少性与流产女性尿液中低的孕酮代谢物的发现良好吻合。

[0066] 因此，尿液3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸(一种排泄到尿液中的孕酮的下游代谢产物)已显示出是一种能够指示发生流产风险的代谢物。

[0067] 因此，在一个实例中，代谢物之一是3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。在另一个实例中，代谢物是尿液或血清3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。在又另一个实例中，代谢物是3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。在另一个实例中，3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸的浓度变化指示增加的流产风险。在又另一个实例中，3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸的浓度降低指示增加的流产风险。在另一个实例中，3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.30(或-0.31)的倍数变化的降低。

[0068] 四氢可的松

[0069] 基于本文公开的实验中进行的分析，与继续发展为健康分娩的女性相比，具有自然流产的女性的尿液四氢可的松的水平高约40％。

[0070] 四氢可的松是可的松的尿液代谢物，其来源于可的松通过5β-还原酶的还原。可的松本身是通过酶11β-羟基类固醇脱氢酶类型2从皮质醇转化而来的。皮质醇与盐皮质激素和糖皮质激素受体结合，以在若干重要的细胞过程中调节内稳态(homeostasis)例如能量内稳态、代谢、触发针对应激的充分反应并限制炎症。

[0071] 另一方面，可的松也与盐皮质激素和糖皮质激素受体结合，尽管亲和力较低。因此，在存在高水平的皮质醇的情况下，产生可的松以调节这些受体的活化。当应激水平高时，皮质醇水平增加。

[0072] 在妊娠绵羊中的研究表明，较高水平的皮质醇导致子宫血流和母体葡萄糖浓度的改变。这转而导致子宫胎盘的代谢变化，并从而影响胎儿的营养，导致胎儿胎盘的生长受损和差的胎儿生存力。皮质醇水平的增加还显示降低胎儿经由脐带对葡萄糖的摄取，这是由于妊娠绵羊的母体子宫中的子宫胎盘组织摄取了较多葡萄糖。母羊取而代之的是增加乳酸盐/酯的产生并将胎儿代谢转换为有氧糖酵解代谢，这是早期胚胎的代谢策略。这种代谢策

略可能对胎儿健康有害，如在妊娠母羊中皮质醇水平增加的研究中所观察到的。在人类中，较高的皮质醇水平也与妊娠丢失相关，指示最终流产的女性中较高的胎儿应激。

[0073] 除了对胎儿代谢的直接影响外，皮质醇还影响孕酮水平。皮质醇刺激负责从孕烯醇酮生物合成雌二醇的胎盘酶，导致雌激素分泌增加，以及随后的孕酮产生的降低。这可能解释了在流产女性中观察到的孕酮水平的降低。此外，较高的雌激素水平诱导前列腺素F2α从胎盘释放，导致子宫肌层对催产素的反应增强，并刺激收缩。这可能会导致不利的妊娠状况。

[0074] 因此，在一个实例中，代谢物之一是四氢可的松。在另一个实例中，代谢物是尿液四氢可的松或血清四氢可的松。在又另一个实例中，代谢物是四氢可的松。在另一个实例中，四氢可的松的浓度变化指示增加的流产风险。在又另一个实例中，四氢可的松的浓度增加指示增加的流产风险。在另一个实例中，四氢可的松与对照相比的增加是与对照相比浓度的至少0.40的倍数变化的增加。

[0075] 肉碱家族

[0076] 肉碱的生物合成主要发生在肝和肾中，由氨基酸赖氨酸和甲硫氨酸生物合成。肉碱在脂肪酸代谢中起重要作用。它们是将具有长链酰基基团的脂肪酸转运到线粒体中的专性辅因子。这些脂肪酸然后经由脂肪酸氧化进行分解以产生能量。在本研究中，观察到当与继续发展为健康分娩的女性相比时，流产女性中存在更高水平的己酰基肉碱(C6)。尿液中酰基肉碱形式的肉碱水平的增加是继发性肉碱缺乏特征性的，且最有可能是由有机酸的积累引起的。继发性肉碱缺乏可能是由于脂肪酸氧化代谢缺乏或与其相关。

[0077] 己酰基肉碱通过肉碱棕榈酰转移酶-1(CPT1)从长链酰基辅酶A(酰基-CoA)转化而来，该酶将CoA部分交换为肉碱。然后，使用肉碱-酰基肉碱转位酶(CACT)将来自胞质溶胶的酰基肉碱与来自线粒体的肉碱进行交换。在酰基肉碱被成功转运至线粒体中之后，酰基肉碱被肉碱棕榈酰转移酶-2(CPT2)催化转化回为酰基-CoA和肉碱。随后，酰基-CoA可以继续参与β-氧化和柠檬酸循环(图5)。

[0078] 由于肉碱-酰基肉碱转位酶的缺陷，酰基肉碱的积累已与脂肪酸氧化缺乏相关联，并且酰基肉碱直接反映脂肪酸的氧化速率。先前具有流产但分娩了具有致死性CACT缺乏的婴儿的母亲的临床报告表明，母体CACT缺乏的杂合性与胎儿相同CACT缺乏的纯合性可能会促成胎儿和胎盘两者中的代谢受损和有毒的代谢物形成。因此，脂肪酸氧化被认为在妊娠维持中起主要作用。

[0079] 因此，在一个实例中，代谢物之一是己酰基肉碱。在另一个实例中，代谢物是尿液己酰基肉碱或血清己酰基肉碱。在又另一个实例中，代谢物是己酰基肉碱。在另一个实例中，己酰基肉碱的浓度变化指示增加的流产风险。在又另一个实例中，己酰基肉碱的浓度增加指示增加的流产风险。在另一个实例中，己酰基肉碱与对照相比的增加是与对照相比浓度的至少0.38的倍数变化的增加。

[0080] 还发现，与继续发展为健康分娩的女性相比，流产女性中丙酰基肉碱(C3)水平低约40％。这意味着流产女性中的肉碱水平较低，并因此脂肪酸代谢水平较低。

[0081] 因此，在一个实例中，代谢物之一是丙酰基肉碱。在另一个实例中，代谢物是尿液丙酰基肉碱或血清丙酰基肉碱。在又另一个实例中，代谢物是丙酰基肉碱。在另一个实例中，丙酰基肉碱的浓度变化指示增加的流产风险。在又另一个实例中，丙酰基肉碱的浓度降

低指示增加的流产风险。在另一个实例中，丙酰基肉碱与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.41(或-0.41)的倍数变化的降低。

[0082] 先前的研究表明，参与β-氧化的酶在妊娠早期在胎盘中表现出增加的活性，并且在接近分娩时活性较低，这表明脂肪酸氧化对胎盘能量供应的重要性。由于胎儿在发育过程中会从胎盘中吸收大量能量，因此较低的肉碱水平意味着用于胎儿生长、存活和代谢过程的可用能量较少，导致不利的妊娠状况。这得到了先前的研究的支持，所述先前的研究表明，脂肪酸氧化在胎盘的能量产生中起主要作用。

[0083] 另外，脂肪酸的线粒体β-氧化的受损可引起空腹诱导的低血糖和心血管衰竭(cardiovascular collapse)。在小鼠中，负责脂肪酸β-氧化的最后三个步骤的催化的线粒体三功能蛋白(MTP)的缺乏会导致胎儿发育迟缓、低血糖和新生儿猝死，这进一步说明了未受妨碍的β氧化对确保胎儿存活的重要性。

[0084] 在小鼠中的研究进一步揭示了滋养层细胞中存在β-氧化酶，并且OCTN2转运蛋白的缺陷导致胎儿和胎盘两者中肉碱积累的减少，不利地影响了对胎儿和胎盘发育重要的脂肪酸代谢。肉碱还被认为在预防有机酸血症(包括丙酸血症和异戊酸血症)中存在的酰基化合物(其中任一种对细胞都有毒性)的过度积累方面起重要作用。

[0085] 流产女性中较低的异戊酰基肉碱水平也可表明较低的异戊酰基-CoA，亮氨酸的代谢物，和相应地较低的亮氨酸水平。亮氨酸是一种必需氨基酸，其对于蛋白合成是重要的，且亮氨酸转氨速率的显著降低有助于母体蛋白和氮的累积。因此，较低水平的亮氨酸可不利地影响胎儿发育，并促成最终流产。

[0086] 因此，在一个实例中，代谢物之一是异戊酰基肉碱。在另一个实例中，代谢物是尿液异戊酰基肉碱或血清异戊酰基肉碱。在又另一个实例中，代谢物是异戊酰基肉碱。在另一个实例中，异戊酰基肉碱的浓度变化指示增加的流产风险。在又另一个实例中，异戊酰基肉碱的浓度降低指示增加的流产风险。在另一个实例中，异戊酰基肉碱与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.32(或-0.32)的倍数变化的降低。

[0087] 3-甲基戊二酰基肉碱(3-羟基-3-甲基-戊二酰基-辅酶A(HMG-CoA)的尿液代谢物)水平降低，表明流产女性中HMG-CoA水平较低。

[0088] HMG-CoA在HMG-CoA还原酶的催化下被转化为甲羟戊酸(mevalonate)。甲羟戊酸是许多生物学上重要分子(包括胆固醇和类固醇激素)的前体分子。HMG-CoA水平降低被认为是较低孕酮水平的直接原因，因为由胆固醇合成的孕烯醇酮是孕酮的重要前体。此外，孕烯醇酮通过糖皮质激素途径产生皮质醇(以孕酮为代价)的可能的分流也可促成流产女性中升高的皮质醇水平和降低的孕酮水平。

[0089] 因此，在一个实例中，代谢物之一是3-甲基戊二酰基肉碱。在另一个实例中，代谢物是尿液3-甲基戊二酰基肉碱或血清3-甲基戊二酰基肉碱。在又另一个实例中，代谢物是3-甲基戊二酰基肉碱。在另一个实例中，3-甲基戊二酰基肉碱的浓度变化指示增加的流产风险。在又另一个实例中，3-甲基戊二酰基肉碱的浓度降低指示增加的流产风险。在另一个实例中，3-甲基戊二酰基肉碱与对照相比的降低是与对照相比浓度的至少0.59(或-0.59)的倍数变化的降低。

[0090] 总之，肉碱代谢物水平的这些变化表明了氨基酸氧化和/或脂肪酸氧化过程中的缺陷，并且可以由途径中涉及的若干参与者中的任何一个或更多个引起。这降低了母体胎

盘的能量输出，并直接对胎儿产生负面影响。另外，由于胎儿代谢需求未得到满足，可能会诱发胎儿应激，导致四氢可的松水平升高，并最终导致胎儿流产。

[0091] 因此，在一个实例中，方法包括测量至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或六种代谢物。在另一个实例中，方法包括测量如本文所描述的一种、两种、三种、四种、五种或六种代谢物。

[0092] 在另一个实例中，本文公开的方法中使用的一种或更多种代谢物选自由以下组成的组：四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱、3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸及其组合。

[0093] 在另一个实例中，在如本文公开的方法中使用了两种代谢物，其中两种代谢物选自由以下组成的组：四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。在又另一个实例中，两种代谢物选自由以下组成的组：四氢可的松和丙酰基肉碱；四氢可的松和异戊酰基肉碱；四氢可的松和3-甲基戊二酰基肉碱；四氢可的松和己酰基肉碱；四氢可的松和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；丙酰基肉碱和异戊酰基肉碱；丙酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱；丙酰基肉碱和己酰基肉碱；丙酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；异戊酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱；异戊酰基肉碱和己酰基肉碱；异戊酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱；3-甲基戊二酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；以及己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0094] 在一个实例中，在如本文公开的方法中使用了三种代谢物，其中三种代谢物选自由以下组成的组：四氢可的松、丙酰基肉碱和异戊酰基肉碱；四氢可的松、丙酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱；四氢可的松、丙酰基肉碱和己酰基肉碱；四氢可的松、丙酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；四氢可的松、异戊酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱；四氢可的松、异戊酰基肉碱和己酰基肉碱；四氢可的松、异戊酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；四氢可的松、3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱；四氢可的松、3-甲基戊二酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；四氢可的松、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱；丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和己酰基肉碱；丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；丙酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱；丙酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；丙酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱；异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；异戊酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；以及3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0095] 在一个实例中，在如本文公开的方法中使用了四种代谢物，其中四种代谢物选自由以下组成的组：四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱；四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和己酰基肉碱；四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；四氢可的松、丙酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱；四氢可的松、丙酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；四氢可的松、丙酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸；四

氢可的松、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱;四氢可的松、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;四氢可的松、异戊酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;四氢可的松、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3甲基戊二酰基肉碱和己酰基肉碱;丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3甲基戊二酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;丙酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;以及异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0096] 在一个实例中,在如本文公开的方法中使用了五种代谢物,其中五种代谢物选自由以下组成的组:四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱;四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱和3-甲基戊二酰基肉碱、3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;四氢可的松、丙酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;四氢可的松、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸;以及丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0097] 在一个实例中,在如本文公开的方法中使用了六种代谢物,其中六种代谢物为四氢可的松、丙酰基肉碱、异戊酰基肉碱、3-甲基戊二酰基肉碱、己酰基肉碱和3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸。

[0098] 如本文所公开的,在一些实例中,如本文所公开的方法涉及对照组或获自对照受试者的样品。如本文所使用的,术语“对照”当与样品、参照物或参照物组结合使用时,是指已经经历足月分娩的受试者、已经经历足月分娩的受试者的组或获自已经经历足月分娩的受试者的一个或更多个样品。

[0099] 代谢物、所述代谢物的水平或所述代谢物的浓度的检测可以使用选自由以下组成组的方法来检测和/或测量:色谱法、基于抗体的测定、定量测定、半定量测定、定性测定、质谱法、光谱法、多重测定、免疫沉淀、电泳、核磁共振(NMR)、NMR波谱法、质子核磁共振(^{1}H-NMR)及其组合。基于使用本文提及的任何检测方法所需的潜在的基本原理,本领域技术人员将能够确定本文公开的每种检测方法所需的合适条件和过程。例如,如果人们要使用基于抗体的测定,诸如例如酶联免疫吸附测定(ELISA)来检测本文公开的代谢物,则应理解能够满足ELISA依赖性标准的抗体(例如,灵敏度、与荧光或比色剂的偶联)将被使用。例如,当使用色谱法时,本领域技术人员将意识到针对讨论中的一种或更多种分析物选择合适的固定相和流动相。

[0100] 色谱或分离方法的实例为但不限于薄层色谱法(TLC)、柱色谱法、气相色谱法、液相色谱法、亲和色谱法、尺寸排阻色谱法、二维色谱法、快速蛋白液相色谱法,等等。此类色谱方法的组合为但不限于液相色谱法/质谱法(LC/MS)、气相色谱法/质谱法(GC/MS)等等。

[0101] 半定量方法的实例为但不限于抗体缀合的方法。抗体缀合的方法的实例为但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、直接ELISA、夹心ELISA、免疫沉淀(IP)方法、抗体缀合的检测方法、抗原亲和色谱法、免疫组织化学和免疫荧光。

[0102] 定量方法的实例为但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、液相色谱法、液相色谱法/质谱法和表面等离振子共振(SPR)。

[0103] 定性方法的实例为但不限于液相色谱法、免疫组织化学、免疫荧光、薄层色谱法(TLC)、柱色谱法、气相色谱法、亲和色谱法、尺寸排阻色谱法、二维色谱法、快速蛋白液相色谱法,等等。

[0104] 基于质谱的方法的实例为但不限于具有飞行时间质量分析仪的基质辅助激光解吸/电离源(MALDI-TOF)、毛细管电泳-质谱法等。

[0105] 基于光谱学/波谱学的测定的实例为但不限于表面增强拉曼光谱法(SERS)、核磁共振(NMR)、NMR波谱法、质子核磁共振(^{1}H-NMR)和拉曼光谱法。

[0106] 在所使用的方法是表面增强拉曼光谱法(SERS)的情况下,将样品代谢物产生的光谱与例如使用标准校准曲线产生的参考光谱进行比较。这些可以使用本文公开的代谢物的市售可得的形式来建立。在一个实例中,建立了纯代谢物的标准校准曲线。这些代谢物可包括但不限于3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸(孕烷)和四氢可的松,并且通过测量不同浓度的每种代谢物的SERS反应来完成。然后,可以基于SERS强度的变化得出关于存在的生物标志物量的定量信息。作为概念验证,将在超疏水性SERS芯片上使用3α,20α-二羟基-5β-孕烷-3-葡糖苷酸的初步数据显示在图7a中。获得了显示在1nM浓度的检测限值的强SERS信号(图7b),以及跨越1μM至1nM的浓度的线性范围(图7c)。该数据清楚地表明本文所使用的超疏水性SERS芯片可以检测目标代谢物。

[0107] 基于免疫沉淀的方法的实例为但不限于个体蛋白免疫沉淀(IP)、加标签的蛋白及其组合。

[0108] 本文还公开了试剂盒,所述试剂盒用于根据如本文公开的方法鉴定和/或确定流产风险。这样的试剂盒的实例为但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、测试条试剂盒、试纸试剂盒(dip stick kit)和微芯片测试试剂盒。在一个实例中,如本文公开的试剂盒包含用于如本文所描述的各代谢物的一种代谢物标准品。这样的代谢物标准品可以是例如加同位素标签的代谢物。

[0109] 目前,不存在用于处于流产风险的受试者的分类。应理解,流产的病因之一是黄体期缺陷。因此,向受试者补充对黄体期缺陷具有影响的化合物,例如但不限于孕激素或其衍生物,被认为可降低此类受试者的流产风险。例如,孕激素导致受试者中T淋巴细胞依赖性免疫应答从Th1转变为Th2,从而减轻了妊娠受试者中胎儿同种异体移植排斥的风险。

[0110] 因此,在一个实例中,在被鉴定为处于流产风险之后,受试者将被施用地屈孕酮(也称为达芙通、异妊二烯二酮、去氢孕酮、didrogesteron、6-去氢逆孕酮或9β,10α-孕甾-4,6-二烯-3,20-二酮)或孕酮(也称为孕甾-4-烯-3,20-二酮、prometrium、utrogestan、endometrin或crinone)。

[0111] 本领域技术人员将理解,这样的药物施用可以取决于多种因素例如受试者的体重、生理状况、所需治疗的紧迫性和总体医学状况而变化。因此,在一个实例中,可以需要每天一次、两次或三次向受试者施用治疗。在另一个实例中,可以在被确定处于流产风险后立即向受试者施用药物。在另一个实例中,可以在被确定处于流产风险后1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时或24小时内施用药物。在另一个实例中,药物将在白天施用。在另一个实例中,药物将在晚上施用。

[0112] 在另一个实例中，每天三次向受试者施用药物。在另一个实例中，每天三次持续至少一周向受试者施用药物。在另一个实例中，每天三次持续完整两周向受试者施用药物。在另一个实例中，每天三次持续至少两周向受试者施用药物。在另一个实例中，每天一次持续两周在晚上向受试者施用药物。

[0113] 在另一个实例中，立即向受试者施用地屈孕酮一次，然后每天三次持续2周施用。在另一个实例中，立即向受试者口服施用地屈孕酮一次，然后每天三次持续2周施用。

[0114] 在另一个实例中，每天一次持续2周在晚上向受试者施用孕酮。在另一个实例中，每天一次持续2周在晚上向受试者阴道施用孕酮。在另一个实例中，每天一次持续2周在晚上向受试者口服施用孕酮。

[0115] 在一个实例中，用在5mg至250mg之间、在8mg至12mg之间、在10mg至20mg之间、在30mg至50mg之间、在45mg至85mg之间、在75mg至100mg之间、在80mg至120mg之间、在150mg至200mg之间、在180mg至250mg之间、在75mg至100mg之间、在18mg至26mg、在38mg至42mg之间、约5mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、35mg、40mg、45mg、约50mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约105mg、约110mg、约115mg、约120mg、约125mg、约130mg、约135mg、约140mg、约145mg、约150mg、约155mg、约160mg、约165mg、约170mg、约175mg、约180mg、约185mg、约190mg、约195mg、约196mg、约197mg、约198mg、约199mg、约200mg、约201mg、约202mg、约203mg、约204mg、约205mg、约225mg或约250mg的药物或化合物治疗受试者。该量可以是每次施用的量，或作为经过特定时间段的治疗总量。在另一个实例中，向受试者施用10mg的药物。在另一个实例中，向受试者施用40mg的药物。在另一个实例中，向受试者施用200mg的药物。

[0116] 在一个实例中，向受试者施用40mg的药物，随后每天三次持续两周向受试者施用10mg的药物。在另一个实例中，立即或在24小时内向受试者施用40mg的药物，随后每天三次持续两周向受试者施用10mg的药物。在又一个实例中，立即或在24小时内向受试者施用40mg的地屈孕酮，随后每天三次持续两周向受试者施用10mg的地屈孕酮。在另一个实例中，每天一次持续2周在晚上向受试者阴道施用200mg孕酮。在另一个实例中，每天一次持续2周在晚上向受试者口服施用200mg孕酮。

[0117] 在一个实例中，药物可以被口服、阴道、皮下或静脉施用。

[0118] 本文示例性地描述的本发明可以在不存在本文未具体公开的任何一个或更多个要素、一个或更多个限制的情况下被适当地实施。因此，例如，术语“包括/包含/含有(comprising)”、“包括/包含/含有(including)”、“包括/包含/含有(containing)”等应被广泛地理解，而非限制性的。另外，本文采用的术语和表述被用作描述性而非限制性的术语，并且在这些术语和表述的使用方面，不预期排除所示出的和所描述的特征的任何等同物或其部分，相反，应认识到在所要求保护的发明的范围内，各种修改形式是可能的。因此，应理解，尽管已经通过优选的实施方案和任选的特征具体公开了本发明，但是本领域技术人员可以采用本文公开的其中体现的本发明的修改形式和变化形式，并且这些修改形式和变化形式被认为是在本发明的范围内。

[0119] 如本申请中所使用的，单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数引用，除非上下文另有清楚规定。例如，术语“遗传标志物”包括多于一个遗传标志物，包括其混合物和组合。

[0120] 如本文所使用的，在制剂的成分的浓度的上下文中，术语“约”通常是指所述值的+/-5％、更通常地所述值的+/-4％、更通常地所述值的+/-3％、更通常地所述值的+/-2％、甚至更通常地所述值的+/-1％、且甚至更通常地所述值的+/-0.5％。

[0121] 词“基本上”不排除“完全地”，例如，“基本上不含”Y的组合物可以完全地不含Y。必要时，可以将“基本上”一词从本发明的定义中省略。

[0122] 遍及本公开内容，某些实施方案可以以范围的形式公开。应理解的是，以范围形式的描述仅为了方便和简洁，并且不应被解释为对所公开范围(range)的范围(scope)的刻板限制。因此，范围的描述应被认为明确公开了所有可能的子范围及该范围内的个体数值。例如，诸如从1至6的范围的描述应被认为明确公开了子范围，诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等，及该范围内的个体数值，例如1、2、3、4、5和6。不管范围的宽度如何，这都适用。

[0123] 某些实施方案在本文中也可以被广泛地和一般性地描述。落入上位公开内容(generic disclosure)中的每个较窄类别和下位群组也构成本公开内容的一部分。这包括实施方案的上位描述(generic description)，带有从该上位概念中去除任何主题的附带条件或否定限制，而无论被去除的材料是否在本文中具体记载。

[0124] 本文宽泛地和一般性地描述了本发明。落入上位公开内容(generic disclosure)中的每个较窄类别和下位群组也构成本发明的一部分。这包括本发明的上位描述(generic description)，带有从该上位概念中去除任何主题的附带条件或否定限制，而无论被去除的材料是否在本文中具体记载。

[0125] 其他实施方案在所附权利要求和非限制性实施例中。此外，在根据马库什群组描述本发明的特征或方面的情况下，本领域技术人员应当认识到，也因此按照马库什群组的任何单个成员或成员子群的形式描述了本发明。

[0126] 实验部分

[0127] 患者招募

[0128] 对80名年龄为21岁及以上的妊娠女性进行了病例对照研究。招募了从2013年9月至2015年6月出现在新加坡KK女性和儿童医院(KK Women's and Children's Hospital；KKH)的24小时女性诊所的患者。纳入标准为(i)妊娠6至10周之间的单个宫内妊娠患者(通过超声检查确认并注明日期)和(ii)每次阴道出血表现出与妊娠相关的患者。先前发生过阴道出血的女性、或在当前妊娠中针对先前每次阴道出血接受过孕酮治疗的女性、或被诊断具有不可避免的流产、稽留流产、枯萎卵的女性或计划终止妊娠的女性被排除。

[0129] 呈现时，采集母体血液样品以测量血清孕酮水平。将血液收集在血液采集管(plain tube)中，并在收集后的2小时内以3000g离心10分钟。血清孕酮水平是在KKH临床实验室中使用商业ARCHITECT孕酮试剂盒(Abbott,Ireland)进行测量的。呈现时，收集尿液样品以进行代谢物分析。分析的协变量是母体人口统计特征、健康、生产和生活方式因素，这些因素由调查人员用英语或普通话进行的调查问卷收集的。

[0130] 结果测量和随访

[0131] 所测量的主要结果是自然流产，其被定义为在妊娠第16周之前不可避免或不完全流产后自我报告的子宫排空，或具有空子宫的完全流产。在妊娠第16周，与所有参与者进行了联系，以验证她们的妊娠状态。40例患者经历自然流产，而40例患者持续妊娠。

[0132] 使用UPLC-MS进行尿液代谢物谱分析

[0133] 尿液代谢物谱分析的方法改编自先前公布的方案，并在配备有以正(ESI+)或负(ESI-)离子模式运行的电喷雾源的ACQUITY UPLC/Xevo G2-XS QTof(Waters,Manchester,UK)上进行。源温度设置为120℃，锥气流为50L/h，且去溶剂化气温度为450℃，去溶剂化气流量为1000L/h。毛细管电压在正离子模式下设置为2kV，且在负离子模式下设置为1.8kV。锥电压设置为30V。使用Waters的ACQUITY UPLC系统将3μl样品注射到保持在40℃的100mm x 2.1mm,1.7μm HSS T3柱(Waters)中。用1-15％B,1-3分钟;15-50％B,3-6分钟;50-95％B,6-9分钟的线性梯度进行洗脱，并且最终地，梯度保持在95％持续1.1分钟。在正离子模式和负离子模式下，流动相A为具有0.1％甲酸的水，且流动相B为具有0.1％甲酸的乙腈。柱流速为0.5ml/min。对于正离子和负离子模式，收集50到1,200m/z的谱数据，其中12分钟的分析中扫描时间为0.15秒。浓度为200ng/ml的亮氨酸脑啡肽被用作锁定物质，流速为5μl/min。在正离子和负离子模式下，其分别具有556.2771和554.2615的m/z。使用Waters的MassLynx软件控制系统和数据采集。在这项研究中，UPLC-MS分析采用了先前描述的QC策略。首先，运行10次QC样品以调节柱，然后再开始运行实际样品。接下来，在每注射5个样品后以及在分析运行开始和结束时，注射QC样品。在样品分析过程中，注射了总计17个QC样品，以用于监测仪器稳定性和分析物的可再现性的目的。样品分析后，注射了重构溶剂混合物中的一系列稀释的QC样品(1:9、1:4、1:2、1:1)。最后，在分析开始和结束时注射空白样品。

[0134] 数据预处理

[0135] 使用Progenesis QI v2.0(Nonlinear Dynamics,Newcastle,UK)进行MS数据(RAW格式)的预处理，包括使用保留时间的自动对齐、峰挑选和去卷积。将样品进行中值归一化并进行对数转换。溶剂前沿附近的具有保留时间少于0.55分钟和色谱峰宽度少于0.03分钟的特征不被包括用于进一步分析。强度小于3,000的特征也被丢弃。产生了数据矩阵以便在Python和MATLAB(Mathworks,Natick,MA)中进行下游分析和处理，所述数据矩阵包含经分析的样品与检测到的特征及其对应的原始和归一化的丰度值。使用质量控制(QC)样品，按照以前出版物中概述的步骤去除了不可靠的特征。仅当特征存在于所有质量控制(QC)样品中且显示变异系数(COV)小于10％时，才接受该特征。最后，稀释质量控制(QC)样品中未表现出良好线性的特征的原始丰度(如通过R^2<0.9且p值≥0.05所定义的)也被排除在下游分析之外。

[0136] 多变量数据分析

[0137] 在MATLAB和Python中进行了主成分分析(PCA)，以可视化聚类并鉴定异常值。使用R中实现的“ropls”包，进行正交投影到潜在结构(orthogonal projection to latent structure;OPLS)分析，以最大程度地分离病例和对照样品，同时最小化与分离无关的可变性。测量值在OPLS分析之前进行了标准化，并针对年龄和体质指数(BMI)进行了调整。正交成分的最佳数目使用5倍交叉验证确定。计算R2Y参数以提供模型解释的可变性的指示，并计算交叉验证的Q2Y参数以指示交叉验证数据集中的模型性能。统计建模后，选择了错误发现率(FDR)调整的p值≤0.05的位居前列的特征，用于进一步的下游鉴定。

[0138] 统计分析

[0139] 将T-检验用于流产和足月分娩组之间母体特征和代谢物水平差异的统计比较。将协方差分析用于确定代谢物水平是否与孕龄相关联。

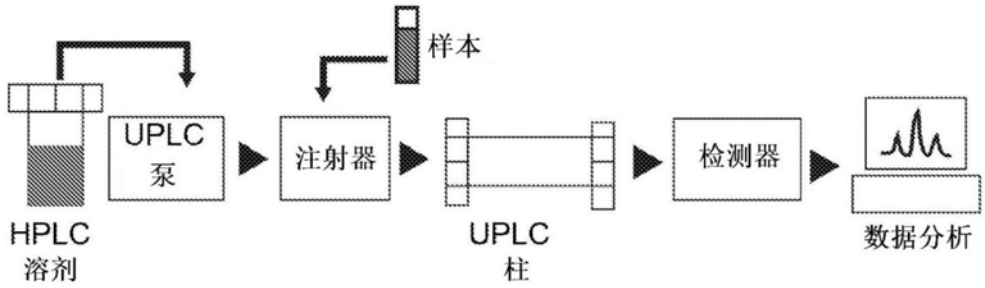
样本
UPLC
泵
注射器
检测器
HPLC
溶剂
UPLC
柱
数据分析

图1

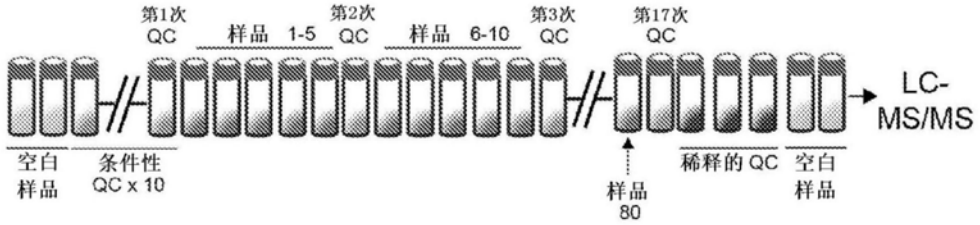
第1次
QC
样品 1-5
第2次
QC
样品 6-10
第3次
QC
第17次
QC
LC-
MS/MS
空白
样品
条件性
QC x 10
样品
80
稀释的 QC
空白
样品

图2

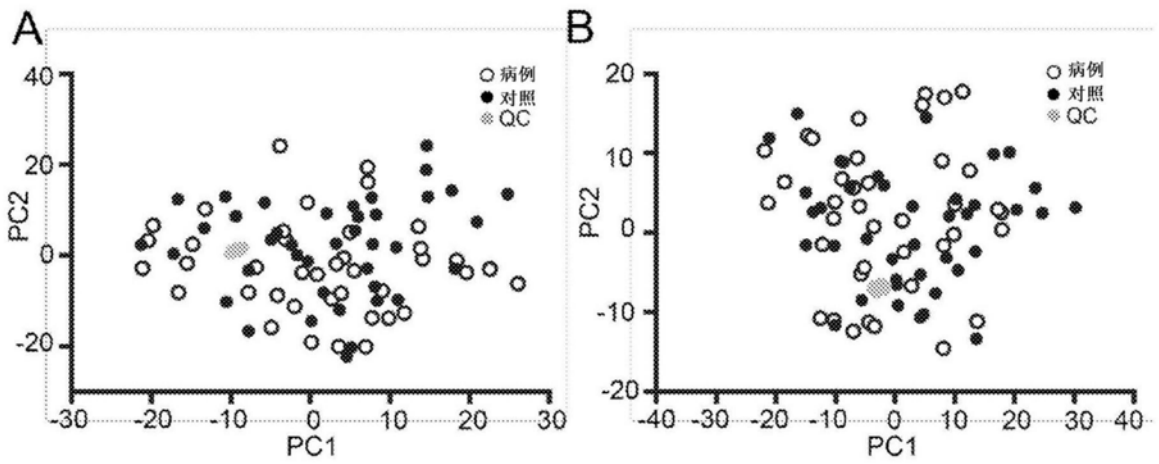
A
B
病例
对照
QC
PC1
PC2

图3

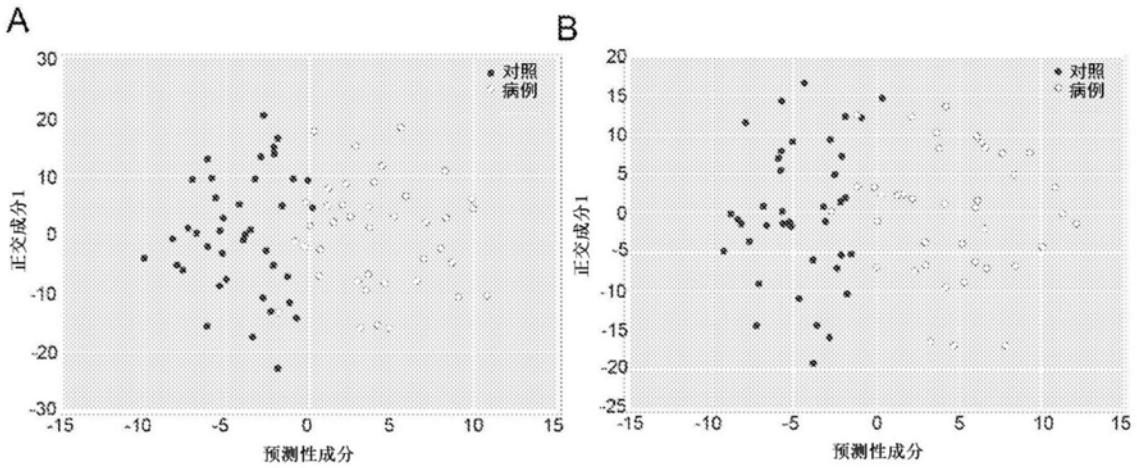
A
B
对照
病例
正交成分1
预测性成分

图4

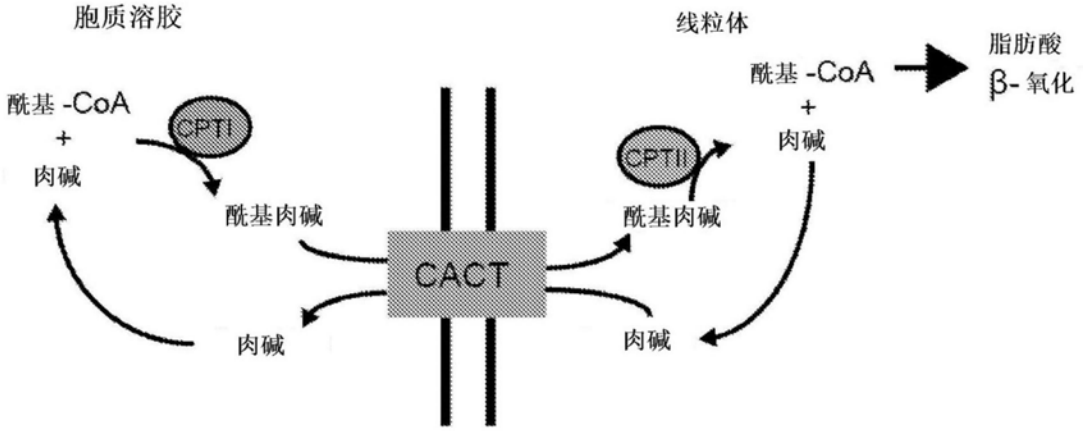
胞质溶胶
线粒体
酰基 -CoA
+
肉碱
CPTI
酰基肉碱
CACT
肉碱
CPTII
酰基肉碱
酰基 -CoA
+
肉碱
脂肪酸
β- 氧化
肉碱

图5

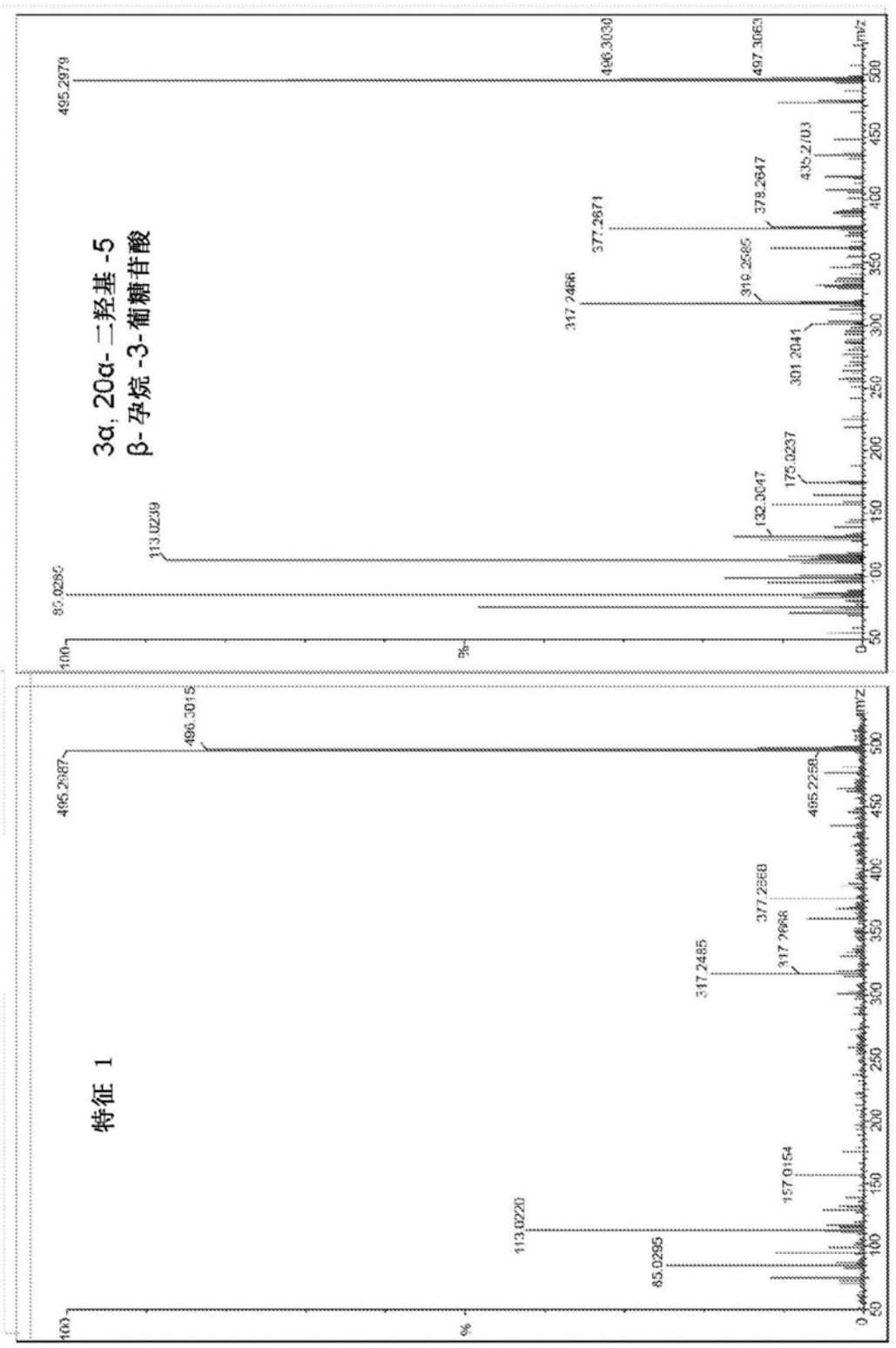

图6

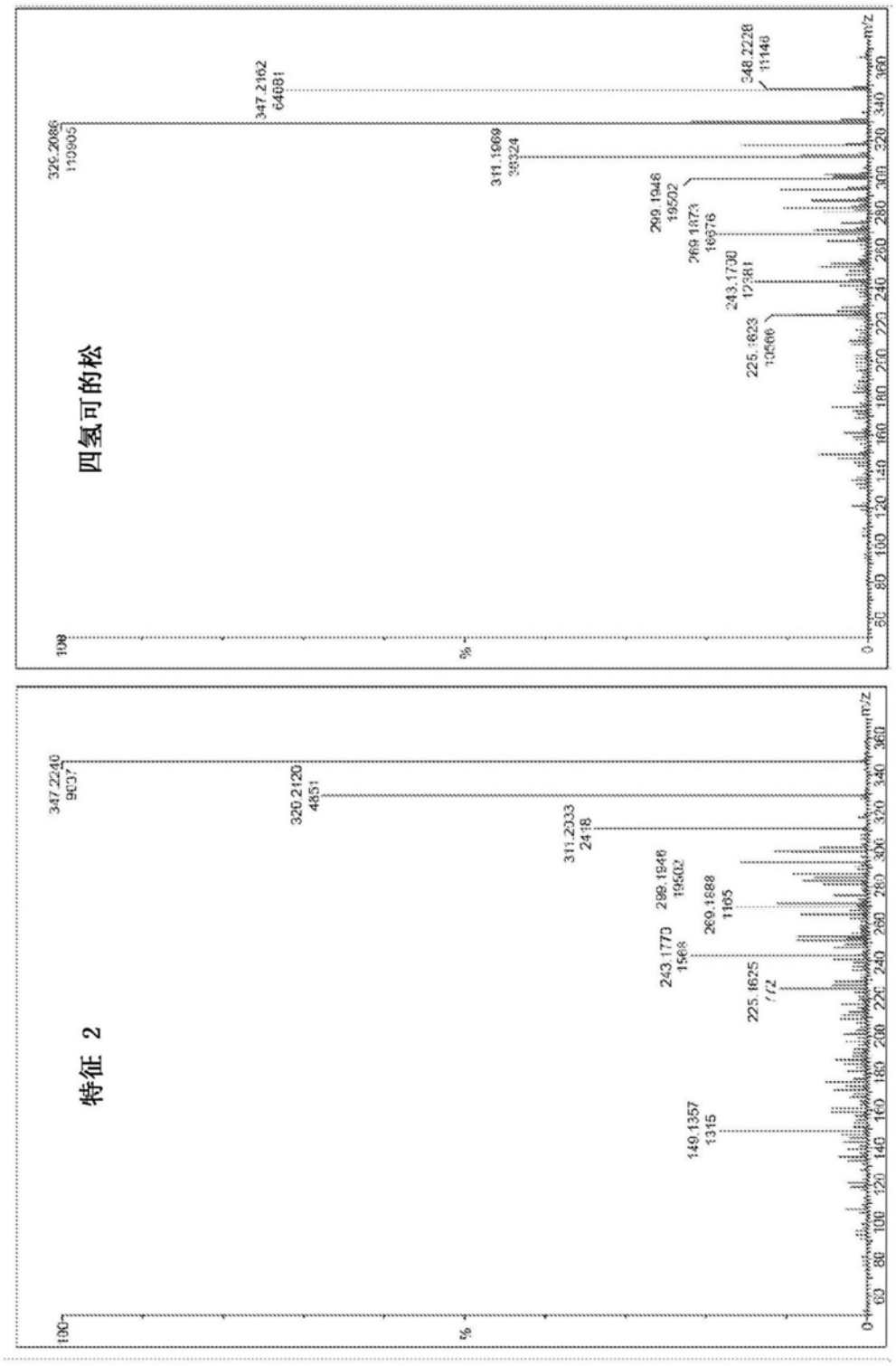
四氢可的松
326.2086
110905
347.2162
64681
311.1969
28324
348.2228
11148
269.1946
19502
269.1673
16976
243.1730
12581
225.1623
10566
特征 2
347.2240
9037
326.2120
4851
311.2033
2418
289.1946
1950
269.1688
1165
243.1773
1568
225.1625
1172
149.1357
1315
100
%
0
m/z

图6续

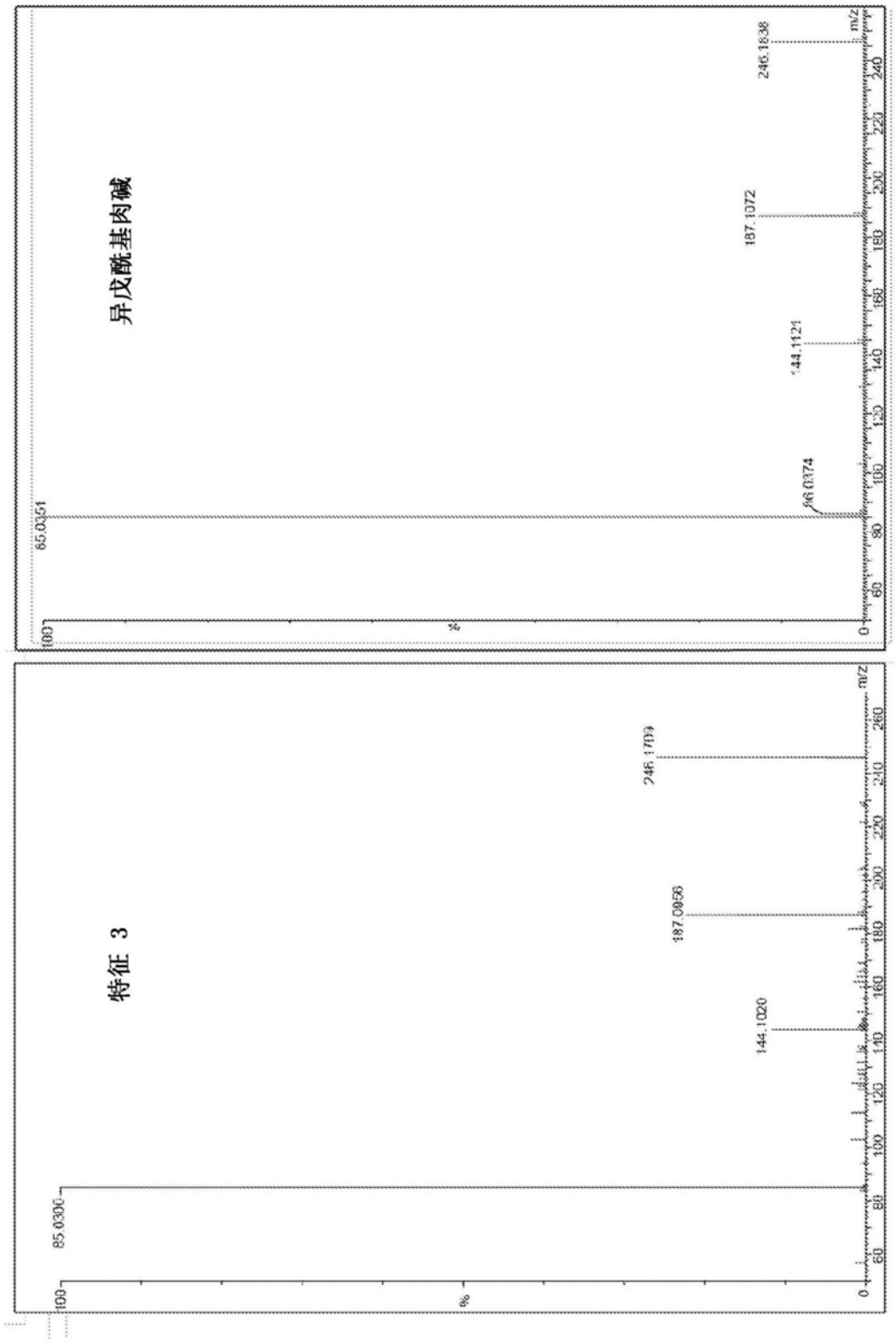
异戊酰基肉碱
85.0351
144.1121
187.1072
246.1838
m/z
特征 3
85.0306
144.1020
187.0856
246.1719
m/z

图6续

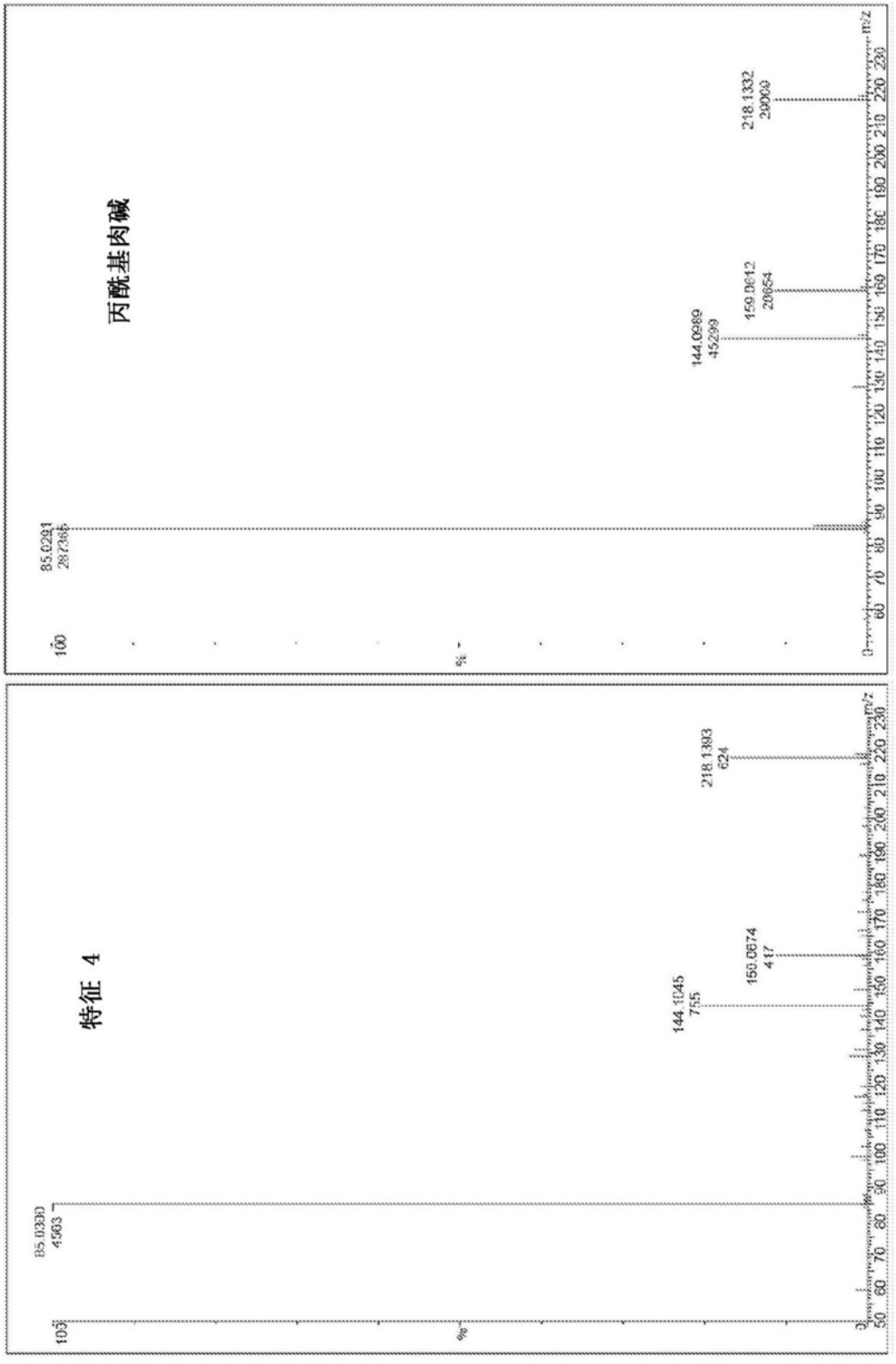
丙酰基肉碱
85.6291
28736
144.0989
45299
159.0842
20654
218.1332
29969
特征 4
85.0330
4563
144.1045
755
150.0674
417
218.1383
624

图6续

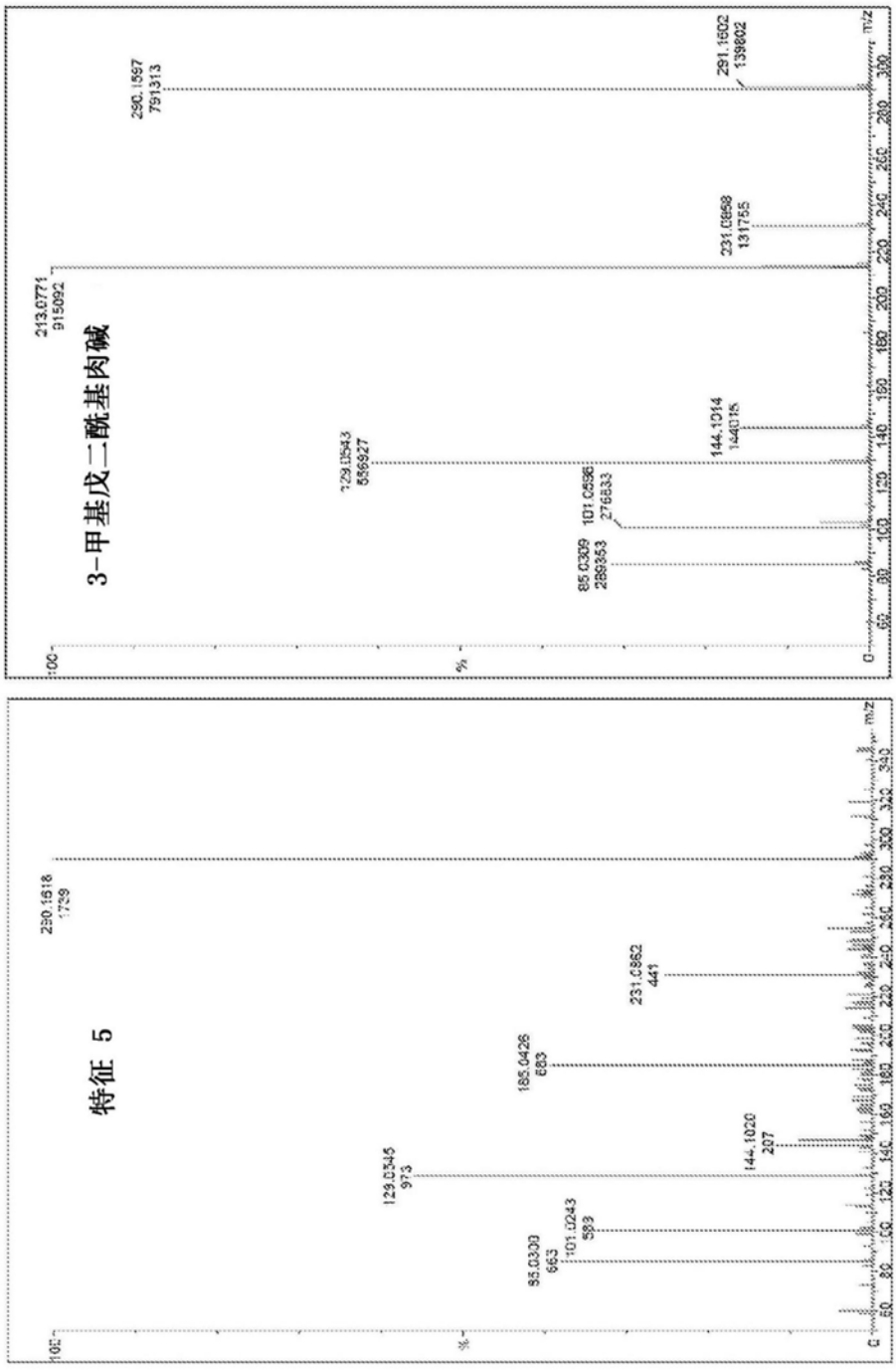
3-甲基戊二酰基肉碱
213.0771
915092
290.1597
791313
291.1602
139602
231.0858
131755
144.1014
144115
129.0543
556927
101.0596
276833
85.0309
286353
特征 5
230.1618
1729
231.0862
441
185.0426
683
144.1020
207
129.0545
973
101.0243
583
85.0309
663
%
m/z

图6续

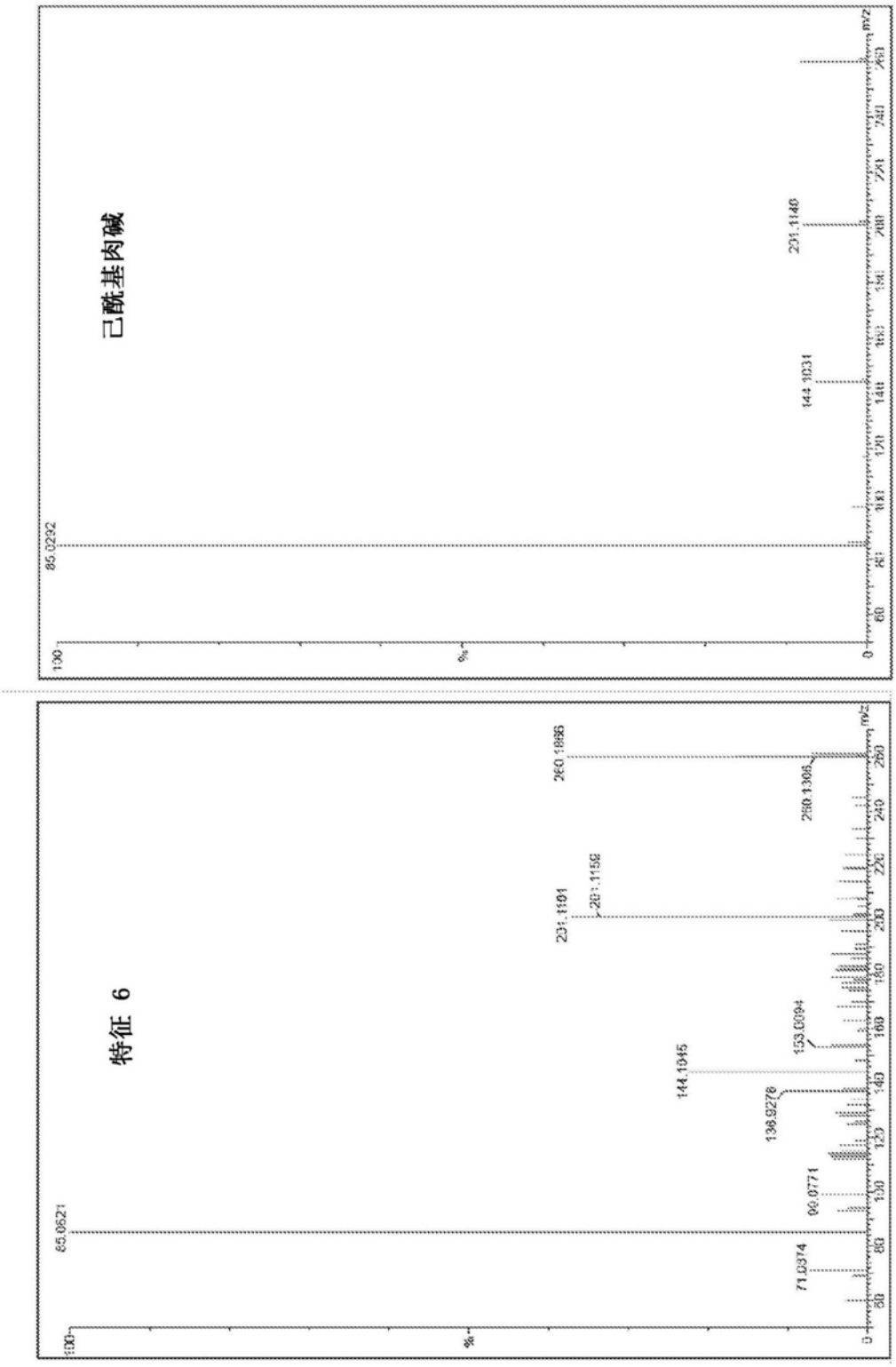
己酰基肉碱
85.0292
144.1031
231.1148
特征 6
85.0621
71.0374
90.0771
136.0278
144.1045
153.0094
231.1191
261.1158
260.1866
280.1308

图6续

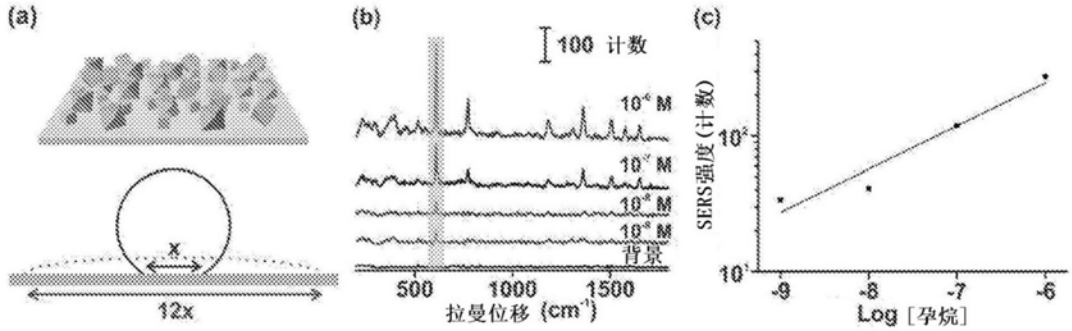
(a)
x
12x
(b)
100 计数
10^{-6} M
10^{-7} M
10^{-8} M
10^{-9} M
背景
500
1000
1500
拉曼位移 (cm^{-1})
(c)
SERS强度(计数)
10^3
10^2
10^1
-9
-8
-7
-6
Log [孕烷]

图7