



(43) 申请公布日 2015.04.01

权利要求书2页 说明书37页 附图35页

```

graph TD
    subgraph Discovery [发现]
        A[7种脂组学研究  
PE: n=111  
对照物: n=152] --> B[多重  
数据挖掘]
        B --> C[候选物:  
A2M, ADAM12, CCL2, CTSB, CTSF,  
EGFLAM, HMOX1, IGFBP7,  
KRT33A, KRT40, CIGF, PPBP, sPlt-1]
    end

    subgraph Validation [验证]
        C --> D[在PE中的血管/HB降解代谢:  
FGA, FT, HB, 血红素, HP, HMOX3, IL18N]
        D --> E[商业 ELISA或化学测定  
试剂盒]
        E --> F[验证的  
A2M  
APO-A1  
APO-C3  
APO-E  
ADAM12  
FGF  
EGFLAM  
血红素  
HB  
HPX  
CIGF  
CTSF  
RBPA]
        F --> G[遗传算法优化]
        G --> H[早期(3个小组和2个小组)  
晚期(2个小组)  
年龄]
        H --> I[PE分类小组]
    end

    F --> J[sPlt1  
PIGF]
    J --> I
    
```

1. 一种提供受试者的先兆子痫标志物水平表现的方法,所述方法包括:

在来自受试者的血样中评价先兆子痫标志物小组以测定所述血样中每一先兆子痫标志物的水平;以及

基于所述小组中每一先兆子痫标志物的水平来计算所述先兆子痫标志物水平表现。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述一种或多种先兆子痫标志物选自由血红素结合蛋白 (HPX)、铁蛋白 (FT)、组织蛋白酶 B (CTSB)、组织蛋白酶 C (CTSC)、ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADAM12)、结合珠蛋白 (HP)、 α -2-巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白 E (ApoE)、载脂蛋白 C-III (ApoC3)、载脂蛋白 A-I (ApoA1)、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、血红蛋白 (HB)、纤维蛋白原 α (FGA)、皮卡丘素 (EGFLAM) 和血红素组成的组。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素和 / 或组织蛋白酶 C。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包括提供所述先兆子痫标志物水平表现的报告。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述先兆子痫标志物表现是先兆子痫评分。

7. 一个先兆子痫标志物小组,其包含选自由血红素结合蛋白 (HPX)、铁蛋白 (FT)、组织蛋白酶 B (CTSB)、组织蛋白酶 C (CTSC)、ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADAM12)、结合珠蛋白 (HP)、 α -2-巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白 E (ApoE)、载脂蛋白 C-III (ApoC3)、载脂蛋白 A-I (ApoA1)、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、血红蛋白 (HB)、纤维蛋白原 α (FGA)、皮卡丘素 (EGFLAM) 和血红素组成的组的一种或多种先兆子痫标志物。

8. 根据权利要求 7 所述的小组,其中所述小组包含皮卡丘素和 / 或组织蛋白酶 C。

9. 根据权利要求 7 所述的小组,其中所述小组包含皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。

10. 一种对受试者提供先兆子痫诊断的方法,所述方法包括:

对于从受试者获得的样本获得先兆子痫标志物水平表现,以及

基于所述先兆子痫标志物水平表现对所述受试者提供先兆子痫诊断。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述先兆子痫标志物水平表现是基于包含一种或多种标志物的先兆子痫标志物小组中的先兆子痫标志物水平,所述标志物选自由血红素结合蛋白 (HPX)、铁蛋白 (FT)、组织蛋白酶 B (CTSB)、组织蛋白酶 C (CTSC)、ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADAM12)、结合珠蛋白 (HP)、 α -2-巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白 E (ApoE)、载脂蛋白 C-III (ApoC3)、载脂蛋白 A-I (ApoA1)、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、血红蛋白 (HB)、纤维蛋白原 α (FGA)、皮卡丘素 (EGFLAM) 和血红素组成的组。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素和 / 或组织蛋白酶 C。

13. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。

14. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述受试者具有先兆子痫症状。

15. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述受试者无先兆子痫症状。

16. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述受试者具有与先兆子痫相关的风险因素。
17. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述样本是在妊娠的第 20 周以上采集的。
18. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述样本是在妊娠的第 34 周以上采集的。
19. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述方法进一步包括比较所述先兆子痫标志物水平表现与先兆子痫表型测定要素,以及基于所述比较对所述受试者提供先兆子痫诊断。
20. 一种进行先兆子痫诊断的试剂盒,所述试剂盒包含:
 - (a) 用于针对包含一种或多种标志物的先兆子痫标志物小组测量样本中的所述标志物量的一种或多种检测要素,所述标志物选自由以下组成的组:血红素结合蛋白 (HPX)、铁蛋白 (FT)、组织蛋白酶 B (CTSB)、组织蛋白酶 C (CTSC)、ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADAM12)、结合珠蛋白 (HP)、 α -2-巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白 E (ApoE)、载脂蛋白 C-III (ApoC3)、载脂蛋白 A-I (ApoA1)、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、血红蛋白 (HB)、纤维蛋白原 α (FGA) 和皮卡丘素 (EGFLAM) 和血红素;以及
 - (b) 先兆子痫表型测定要素。
21. 根据权利要求 20 所述的试剂盒,其中所述先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素和/或组织蛋白酶 C。
22. 根据权利要求 20 所述的试剂盒,其中所述先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。

用于提供先兆子痫评估的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据美国法典第 35 章第 119 条 (e) 款, 本申请要求 2012 年 5 月 8 日提交的美国临时专利申请序号 61/644, 254 和 2012 年 11 月 30 日提交的美国临时专利申请序号 61/731, 640 的申请日期的优先权, 所述临时专利申请的公开内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及提供先兆子痫评估。

[0004] 发明背景

[0005] 先兆子痫是一种对母亲和婴儿具有不良作用的严重的妊娠多系统并发症。在美国和全世界范围内, 这种病症的发病率大约是所有妊娠数的 5-8%, 并且该病症是造成美国孕产妇死亡总数中的 18% 的原因。先兆子痫的病因和发病机制仍然不明朗, 并且诊断依赖于在疾病过程后期出现的非特异性实验室和临床征象和症状, 这有时使得难以作出诊断和临床管理决定。更早期和更可靠的疾病诊断、预后和监测将导致更加及时和个性化地进行先兆子痫治疗并显著提高我们对于先兆子痫发病机制的理解。本发明解决了这些问题。

发明内容

[0006] 提供先兆子痫标志物、先兆子痫标志物小组, 以及用于获得样本的先兆子痫标志物水平表现的方法。这些组合物和方法可用于多种应用, 包括例如诊断先兆子痫、预后先兆子痫、监测患有先兆子痫的受试者, 以及确定先兆子痫的治疗。另外, 提供可用于实施主题方法的其系统、装置和试剂盒。

[0007] 在本发明的一些方面, 提供先兆子痫标志物小组, 所述小组包含一种或多种先兆子痫标志物, 其选自由以下组成的组: 血红素结合蛋白 (HPX)、铁蛋白 (FT)、组织蛋白酶 B (CTSB)、组织蛋白酶 C (CTSC)、ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADAM12)、结合珠蛋白 (HP)、 α -2-巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白 E (ApoE)、载脂蛋白 C-III (ApoC3)、载脂蛋白 A-I (ApoA1)、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、血红蛋白 (HB)、纤维蛋白原 α (FGA)、皮卡丘素 (EGFLAM) 和血红素。在一些实施方案中, 小组包含皮卡丘素和 / 或组织蛋白酶 C。在一些实施方案中, 小组包含皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。

[0008] 在本发明的一些方面, 提供用于提供受试者的先兆子痫标志物水平表现的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括评价来自受试者的血样中的先兆子痫标志物小组以测定血样中的每一先兆子痫标志物的水平; 以及基于所述小组中的每一先兆子痫标志物的水平来计算先兆子痫标志物水平表现。在一些实施方案中, 小组包含一种或多种先兆子痫标志物, 其选自由以下组成的组: 血红素结合蛋白 (HPX)、铁蛋白 (FT)、组织蛋白酶 B (CTSB)、组织蛋白酶 C (CTSC)、ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADAM12)、结合珠蛋白 (HP)、 α -2-巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白 E (ApoE)、载脂蛋白 C-III (ApoC3)、载脂蛋白 A-I (ApoA1)、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、血红蛋白 (HB)、纤维蛋白原 α (FGA)、皮卡丘素 (EGFLAM) 和血红素。在一些实施

方案中,小组包含皮卡丘素和 / 或组织蛋白酶 C。在一些实施方案中,小组包含皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。在一些实施方案中,所述方法进一步包括提供先兆子痫标志物水平表现的报告。在某些实施方案中,先兆子痫标志物表现是先兆子痫评分。

[0009] 在本发明的一些方面,提供用于提供受试者的先兆子痫评估的方法。在一些实施方案中,先兆子痫评估是对于先兆子痫的诊断。在一些实施方案中,所述方法包括针对来自例如如上文或本文别处所述的受试者的样本获得先兆子痫标志物水平表现,以及基于所述先兆子痫标志物水平表现提供对于受试者的先兆子痫诊断。在一些实施方案中,所述方法进一步包括比较先兆子痫标志物水平表现与先兆子痫表型测定要素,以及基于所述比较提供对于受试者的先兆子痫诊断。在一些实施方案中,受试者具有先兆子痫症状。在其它实施方案中,受试者无先兆子痫症状。在一些实施方案中,受试者具有一种或多种与先兆子痫相关的风险因素。在其它实施方案中,受试者不具有与先兆子痫相关的风险因素。在一些实施方案中,在妊娠 20 周以上时采集样本。在某些实施方案中,在妊娠 34 周以上时采集样本。

[0010] 在本发明的一些方面,提供用于对样本进行先兆子痫评估的试剂盒。在一些实施方案中,先兆子痫评估是先兆子痫诊断。在一些实施方案中,试剂盒包含用于针对先兆子痫标志物小组测量样本中的标志物量的一种或多种检测要素,所述先兆子痫标志物包含一种或多种选自由以下组成的组的标志物:血红素结合蛋白 (HPX)、铁蛋白 (FT)、组织蛋白酶 B (CTSB)、组织蛋白酶 C (CTSC)、ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADAM12)、结合珠蛋白 (HP)、 α -2-巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白 E (ApoE)、载脂蛋白 C-III (ApoC3)、载脂蛋白 A-I (ApoA1)、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)、血红蛋白 (HB)、纤维蛋白原 α (FGA)、皮卡丘素 (EGFLAM) 和血红素;以及先兆子痫表型测定要素。在一些实施方案中,一种或多种检测要素检测样本中的标志物多肽的水平。在一些实施方案中,先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素和 / 或组织蛋白酶 C。在一些实施方案中,先兆子痫标志物小组包含皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。

附图说明

[0011] 根据结合附图阅读的下列详细描述将最好地理解本发明。本专利或申请文件含有至少一个以颜色实行的附图。在请求并支付必要的费用后,将由当局提供具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本。需要强调的是,根据通常做法,附图的各种特征并不是按比例。相反,为清晰起见,各种特征的尺寸被任意地放大或缩小。附图中包括下列图。

[0012] 图 1. PE 生物标志物的基于多组学的发现和验证的研究概要。没有通过后续验证的候选分析物以灰色显示。

[0013] 图 2. PE 生物标志物 (PE 对对照物) 的表达比较分析。森林图 (Forest plot) 概述了胎盘 mRNA 表达荟萃分析的结果,以及在不同的早期和晚期孕周龄的孕产妇血清分析物丰度定量。线图表示 95% 置信区间。

[0014] 图 3. 早期或晚期发作生物标志物小组评分被绘制为孕周龄的函数。* 不同的小组评分被缩放到相同的评分尺度以使得它们可以直接比较。对于 PE 或对照物数据点,将 loess 曲线拟合以表示生物标志物评分作为孕龄的函数的总体趋势。

[0015] 图 4. PE 和对照受试者的不同的生物标志物小组的 loess 拟合线作为孕周龄的函数的复合叠加图。

[0016] 图 5. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 sFlt-1 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0017] 图 6. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 PIGF 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0018] 图 7. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 HPX 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0019] 图 8. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 FT 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0020] 图 9. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 ADAM12 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0021] 图 10. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 HP 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0022] 图 11. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 A2M 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0023] 图 12. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 APO-E 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0024] 图 13. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 APO-CIII 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0025] 图 14. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 APO-AI 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0026] 图 15. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 RBP4 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0027] 图 16. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 HB 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0028] 图 17. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 FGA 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0029] 图 18. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下皮卡丘素的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0030] 图 19. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 CTSB 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0031] 图 20. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下 CTSC 的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0032] 图 21. 在 PE 和对照组中在不同的孕周龄下血红蛋白的生物标志物分布的箱线图显示和散点图。水平箱边界和中线表示样本四分位数。

[0033] 图 22 提供与目前的预后标准物 (“sFlt-1/PIGF”) 相比, 当与 s-Flt-1 (可溶性 VEGF-R1) 组合测量时通过预测先兆子痫的先兆子痫血清学生物标志物的 ELISA 或生物化学方法 (对于血红蛋白) 进行验证的概要。早期 (正常 N = 16 ; PE N = 16) 预测是由在 34

周妊娠时或之前采集的样本进行的。晚期（正常 $N = 16$;PE $N = 16$ ）预测是由在 34 周妊娠之后采集的样本进行的。分析具有不同分析物比率组合的 ROC 曲线以计算曲线下面积 (AUC) 值。

[0034] 图 23 提供与目前的预后标准物 (“sFlt-1/PIGF”) 相比, 当与 s-Flt-1 组合测量时通过预测先兆子痫的先兆子痫血清学生物标志物的 ELISA 或生物化学方法 (对于血红蛋白) 进行验证的概要。早期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠时或之前采集的样本进行的。晚期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠之后采集的样本进行的。分析具有不同分析物比率组合的 ROC 曲线以计算曲线下面积 (AUC) 值。

[0035] 图 24 提供与目前的预后标准物 (“s-Flt-1/PIGF”) 相比, 当与 HPX 组合测量时通过预测先兆子痫的先兆子痫血清学生物标志物的 ELISA 或生物化学方法 (对于血红蛋白) 进行验证的概要。早期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠时或之前采集的样本进行的。晚期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠之后采集的样本进行的。分析具有不同分析物比率组合的 ROC 曲线以计算曲线下面积 (AUC) 值。

[0036] 图 25 提供与目前的预后标准物 (“s-Flt-1/PIGF”) 相比, 当与 CTSC 组合测量时通过预测先兆子痫的先兆子痫血清学生物标志物的 ELISA 或生物化学方法 (对于血红蛋白) 进行验证的概要。早期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠时或之前采集的样本进行的。晚期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠之后采集的样本进行的。分析具有不同分析物比率组合的 ROC 曲线以计算曲线下面积 (AUC) 值。

[0037] 图 26 提供与目前的预后标准物 (“s-Flt-1/PIGF”) 相比, 当与 ADAM12 组合测量时通过预测先兆子痫的先兆子痫血清学生物标志物的 ELISA 或生物化学方法 (对于血红蛋白) 进行验证的概要。早期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠时或之前采集的样本进行的。晚期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠之后采集的样本进行的。分析具有不同分析物比率组合的 ROC 曲线以计算曲线下面积 (AUC) 值。

[0038] 图 27 显示与由 sFlt-1/PIGF 组成的小组相比, 通过使用包含血红蛋白结合蛋白、铁蛋白、组织蛋白酶 C、ADAM 金属肽酶结构域 12、角蛋白 33A、结合珠蛋白、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白 E、载脂蛋白 C-III、载脂蛋白 A-I、视黄醇结合蛋白 4、血红蛋白、纤维蛋白原、皮卡丘素、sFlt-1 和 PIGF 的生物标志物小组 (“小组”) 实现的先兆子痫预后准确性改进。早期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠时或之前采集的样本进行的。晚期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠之后采集的样本进行的。分析生物标志物小组的 ROC 曲线以计算曲线下面积 (AUC) 值。

[0039] 图 28 显示与由 sFlt-1/PIGF 组成的小组相比, 通过使用包含血红蛋白结合蛋白、铁蛋白、组织蛋白酶 C、ADAM 金属肽酶结构域 12、角蛋白 33A、结合珠蛋白、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白 E、载脂蛋白 C-III、载脂蛋白 A-I、视黄醇结合蛋白 4、血红蛋白、纤维蛋白原和皮卡丘素的生物标志物小组 (“小组”) (即未测量到 sFlt-1 或 PIGF) 实现的先兆子痫预后准确性。早期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠时或之前采集的样本进行的。晚期 (正常 $N = 16$;PE $N = 16$) 预测是由在 34 周妊娠之后采集的样本进行的。分析生物标志物小组的 ROC 曲线以计算曲线下面积 (AUC) 值。

[0040] 图 29 显示生物标志物组合的不同小组。+ : 在相应小组中选择生物标志物 ; - : 在小组中未选择生物标志物。

[0041] 图 30 显示具有不同组合的生物标志物的 ROC 曲线 AUC 值。“生物标志物”栏示出每一小组的 sFlt-1、PIGF 和 Stanford 验证的生物标志物的选择。“SU 生物标志物数目”栏分别示出早期 PE 发作、晚期 PE 发作和总体概要的 Stanford 验证的生物标志物的数目。“ROC 曲线 AUC 值”栏示出早期 PE 发作、晚期 PE 发作和总体概要的 ROC 曲线分析的 AUC 值。

[0042] 图 31 显示图 29 和图 30 中的每一生物标志物小组的灵敏性和特异性分析。上部小组：具有给定特异性水平的不同小组的灵敏性。下部小组：具有给定灵敏性水平的不同小组的特异性。

[0043] 图 32 描绘图 27 中小组 1 和小组 2 的散点图和 ROC 曲线。上部小组：对数组合的生物标志物值对孕龄（周）。下部小组：ROC 曲线。

[0044] 图 33 描绘图 29 中小组 3 和小组 4 的散点图和 ROC 曲线。上部小组：对数组合的生物标志物值对孕龄（周）。下部小组：ROC 曲线。

[0045] 图 34 描绘图 29 中小组 5 和小组 6 的散点图和 ROC 曲线。上部小组：对数组合的生物标志物值对孕龄（周）。下部小组：ROC 曲线。

[0046] 图 35 描绘图 29 中小组 7 的散点图和 ROC 曲线。上部小组：对数组合的生物标志物值对孕龄（周）。下部小组：ROC 曲线。

[0047] 图 36 描绘在有差别的 PE 和对照受试者中通过 ROC 分析测量的 PE 血清蛋白生物标志物小组 0、1 和 2 的表现。

具体实施方式

[0048] 提供先兆子痫标志物、先兆子痫标志物小组，以及用于获得样本的先兆子痫标志物水平表现的方法。这些组合物和方法可用于多种应用，包括例如诊断先兆子痫、预后先兆子痫、监测患有先兆子痫的受试者，以及确定先兆子痫的治疗。另外，提供可用于实施主题方法的其系统、装置和试剂盒。在阅读了如下文更充分描述的组合物和方法的细节后，本发明的这些和其它目的、优点和特征对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0049] 在描述本发明的方法和组合物之前，应理解本发明不限于所述的特定方法或组合物，因而当然可改变。还应理解，本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的，而不欲具限制性，因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0050] 在提供数值范围时，应理解，除非上下文另有明确说明，否则还特定公开介于所述范围的上限和下限之间的每一中间值（到下限的单位的十分位）。介于所述范围中的任何所述值或中间值与所述范围中的任何其它所述值或中间值之间的每一较小范围涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在范围中或排除在范围外，并且其中任一界限、无一界限或两个界限包括在较小范围内的每一范围也涵盖在本发明内，受制于所述范围中任何明确排除的界限。在所述范围包括一个或两个界限时，排除那些所包括界限的任一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0051] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然与本文所述类似或等效的任何方法和材料可以用于实施或测试本发明，但现在描述一些潜在和优选的方法和材料。本文所提及的所有公开案通过引用的方式并入本文中以结合所引用的公开案来公开和描述方法和 / 或材料。应理解，在存在冲突的程度上，本公开取代所并入的公开案的任何公开内容。

[0052] 本领域技术人员在阅读本公开内容后将显而易见,本文所描述和说明的每一单独的实施方案具有分立成分和特征,在不偏离本发明的范围或精神的情况下,其可容易地与任何其它若干个实施方案的特征分离或组合。可以所述事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行任何所述方法。

[0053] 必须注意到,如本文和所附权利要求书中所用,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一(个)”和“所述”包括复数个提及物。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括多个这种细胞并且对“肽”的提及包括对一种或多种肽和本领域技术人员已知的其等效物例如多肽等的提及。

[0054] 本文所讨论的公开案仅为在本申请的申请日期之前的其公开内容而提供。其中任何内容都不能被理解为承认本发明无权通过现有发明而先于此类公开案。此外,所提供公开案的日期可能不同于实际的公开日期,其可能需要独立地确定。

[0055] 如上文所概述,本发明的方面包括可用于在受试者中提供先兆子痫评估、例如诊断、预后、监测和/或治疗先兆子痫的方法、组合物、系统和试剂盒。“先兆子痫”或“子痫前期”意指妊娠的多系统并发症,其可能伴随着以下一种或多种:高血压、蛋白尿、手和面部/眼睛肿胀(水肿)、体重突然增加、肝酶高于正常值以及血小板减少。先兆子痫通常发生在妊娠晚期,但在严重的情况下,这种病症发生在妊娠中期,例如,在妊娠约22周后。如果没有得到解决,则先兆子痫可引起子痫,即与预先存在的大脑状态无关的抽搐。“诊断”先兆子痫或“提供先兆子痫诊断”一般意指提供先兆子痫确定,例如确定受试者(例如具有先兆子痫的临床症状的受试者、无先兆子痫症状但具有与先兆子痫相关的风险因素的受试者、无先兆子痫症状并且不具有与先兆子痫相关的风险因素的受试者)是否目前受到先兆子痫影响;将受试者的先兆子痫分类成疾病或病症的亚型;确定先兆子痫的严重程度等。“预后”先兆子痫或“提供先兆子痫预后”一般意指提供先兆子痫预测,例如预测受试者患上先兆子痫的易感性或风险;预测疾病进展过程和/或疾病结果,例如先兆子痫的预期发作、先兆子痫的预期持续时间、先兆子痫是否将发展成子痫的预期等;预测受试者对于先兆子痫治疗的反应性,例如,阳性反应、阴性反应、完全无反应等。“监测”先兆子痫一般意指监测受试者的状况,例如传达先兆子痫诊断、传达先兆子痫预后、提供关于先兆子痫治疗的作用或功效的信息等。“治疗”先兆子痫意指在哺乳动物中规定或提供先兆子痫的任何治疗,并且包括:(a)在可能倾向于患上先兆子痫但尚未诊断患有先兆子痫的受试者中预防先兆子痫的发生;(b)抑制先兆子痫,即抑止其发展;或(c)减轻先兆子痫,即造成先兆子痫的消退。

[0056] 在描述本发明时,将首先描述可用于提供先兆子痫评估的组合物,接着描述使用其的方法、系统和试剂盒。

[0057] 先兆子痫标志物和小组

[0058] 在本发明的一些方面,提供先兆子痫标志物和先兆子痫标志物小组。“先兆子痫标志物”意指其在样本中的表现与先兆子痫表型相关的分子实体。例如,相比于健康个体,在来自将患上先兆子痫或已经患上先兆子痫的个体的样本中,先兆子痫标志物可有差别地表现,即以不同水平表现。在一些情况下,升高水平的标志物与先兆子痫表型相关。例如,在与先兆子痫表型相关的样本中,相比于在不与先兆子痫表型相关的样本中,前述样本中标志物的浓度可为1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、7.5倍、10倍以上。在其它情况下,降低水平的标志物与先兆子痫表型相关。例如,在与先兆子痫表型相关的样本中,相比于在不

与先兆子痫表型相关的样本中,前述样本中标志物的浓度可为小于 10%、20%、30%、40%、50%以上。

[0059] 先兆子痫标志物可包括与先兆子痫相关的蛋白质及其相应的基因序列,即 mRNA、DNA 等。“基因”或“重组基因”意指包含编码蛋白质的开放阅读框的核酸。编码序列的边界由 5' (氨基) 端的起始密码子和 3' (羧基) 端的翻译终止密码子确定。转录终止序列可位于编码序列的 3'。另外,基因可任选地包括其天然启动子 (即,在非重组细胞、即天然存在的细胞中与基因的外显子和内含子可操作地连接的启动子) 和相关的调节序列,并且可能或可能不具有 AUG 起始位点的上游序列,并且可能或可能不包括非翻译前导序列、信号序列、下游非翻译序列、转录起始和终止序列、多腺苷酸化信号、翻译起始和终止序列、核糖体结合位点等。

[0060] 如本公开的实施例中所显示,本发明人已经鉴定了多种与先兆子痫相关的分子实体并且可单独或组合 (即以小组形式) 用于提供先兆子痫评估,例如诊断先兆子痫、预后先兆子痫、监测患有先兆子痫的受试者、确定罹患先兆子痫的受试者的治疗等。这些包括 (但不限于) 血红素结合蛋白 (HPX, GenBank 登录号 NM_000613.2); 铁蛋白 (FT, GenBank 登录号 NM_000146.3 (多肽轻链)、NM_002032.2 (多肽重链)); 组织蛋白酶 B (CTSB, Genbank 登录号 NM_001908.3 (变异体 1)、NM_147780.2 (变异体 2)、NM_147781.2 (变异体 3)、NM_147782.2 (变异体 4) 和 NM_147783.2 (变异体 5)); 组织蛋白酶 C (CTSC, Genbank 登录号 NM_001114173.1 (同种型 a)、NM_148170.3 (同种型 b)、NM_001114173.1 (同种型 c)); ADAM 金属肽酶结构域 12 (ADA M12, Genbank 登录号 NM_003474.4 (同种型 1)、NM_021641.3 (同种型 2); 角蛋白 33A (KRT33A, Genbank 登录号 NM_004138.2); 结合珠蛋白 (HP, GenBank 登录号 NM_005143.3 (同种型 1)、NM_001126102.1 (同种型 2)); α -2-巨球蛋白 (A2M, GenBank 登录号 NM_000014.4); 载脂蛋白 E (ApoE, GenBank 登录号 NM_000041.2); 载脂蛋白 C-III (ApoC3, GenBank 登录号 NM_000040.1); 载脂蛋白 A-I (ApoA1, GenBank 登录号 NM_000039.1); 视黄醇结合蛋白 4、血浆 (RBP4, GenBank 登录号 NM_006744.3); 血红蛋白 (GenBank 登录号 NM_000517.4 (α 2)、NM_000518.4 (β)、NM_000559.2 (γ A)、NM_000184.2 (γ G)); 纤维蛋白原 α (GenBank 登录号 NM_021871.2 (α 链)); 皮卡丘素 (EGFLAM, GenBank 登录号 NM_152403.3 (同种型 1)、NM_182798.2 (同种型 2)、NM_182801.2 (同种型 4) 和 NM_001205301.1 (同种型 5)) 以及辅因子/辅基血红素。特别感兴趣的是先兆子痫标志物 ADAM12、CTSC 和皮卡丘素。

[0061] 如上文所提及,本文还提供先兆子痫小组。先兆子痫标志物的“小组”意指两种或更多种先兆子痫标志物,例如 3 种以上、4 种以上、或 5 种以上标志物、在一些情况下 6 种以上、7 种以上、或 8 种以上标志物、有时 9 种以上、或 10 种以上标志物、例如 12、15、17 或 20 种标志物,当组合考虑时,其水平可用于提供先兆子痫评估,例如进行先兆子痫诊断、预后、监测和/或治疗。特别感兴趣的是包含先兆子痫标志物 ADAM12、CTSC 或皮卡丘素的小组。例如,在一些实施方案中,先兆子痫小组可包含皮卡丘素以及血红素结合蛋白、Apo A1、ApoC3、RBP4 和/或结合珠蛋白中的一种或多种,例如其可包含皮卡丘素和血红素结合蛋白;皮卡丘素和 ApoA1;皮卡丘素和 ApoC3;皮卡丘素和 RBP4;皮卡丘素和结合珠蛋白;皮卡丘素、血红素结合蛋白和 ApoA1;皮卡丘素、血红素结合蛋白和 ApoC3;皮卡丘素、血红素结合蛋白和 RBP4;皮卡丘素、血红素结合蛋白和结合珠蛋白;皮卡丘素、ApoA1 和 ApoC3;皮卡

丘素、ApoA1 和 RBP4 ; 皮卡丘素、ApoA1 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、ApoC3 和 RBP4 ; 皮卡丘素、ApoC3 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、RBP4 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1 和 ApoC3 ; 皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1 和 RBP4 ; 皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoC3 和 RBP4 ; 皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoC3 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、血红素结合蛋白、RBP4 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、ApoA1、ApoC3、RBP4 ; 皮卡丘素、ApoA1、ApoC3 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、ApoA1、RBP4 和结合珠蛋白 ; 皮卡丘素、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白 ; 或皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白。

[0062] 在一些情况下,本领域中已知的其它先兆子痫标志物可包括于主题先兆子痫小组中,例如可溶性血管内皮生长因子/血管通透性因子受体(VEGF-R1,也称为FMS样酪氨酸激酶1或sFlt-1;Genbank登录号NM_001159920.1(同种型2)、NM_001160030.1(同种型3)和NM_001160031.1(同种型4));以及胎盘生长因子(PIGF,Genbank登录号NM_002632.5(同种型1)和NM_001207012.1(同种型2))(Verlöhren等人,(2010)American Journal of Obstetrics and Gynecology 161:e1-e11)。因此,例如,先兆子痫小组可包含ADAM12以及PIGF、结合珠蛋白、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、血红蛋白、ApoC3、纤维蛋白原和/或皮卡丘素中的一种或多种。作为另一个实例,先兆子痫小组可包含CTSC以及PIGF、结合珠蛋白、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、血红蛋白、ApoC3、纤维蛋白原、皮卡丘素和/或血红素中的一种或多种。所感兴趣的先兆子痫小组的其它实例包括HPX、PIGF、结合珠蛋白、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、血红蛋白、ApoC3、纤维蛋白原、皮卡丘素和/或血红素;sFlt-1、结合珠蛋白、ApoE、ApoA1、A2M、RBP4、血红蛋白、ApoC3、纤维蛋白原、皮卡丘素和/或血红素;sFlt-1和A2M;sFlt-1和RBP4;sFlt-1和血红蛋白;sFlt-1和纤维蛋白原;sFlt-1和皮卡丘素;sFlt-1和HPX;HPX和皮卡丘素;sFlt-1、PIGF和HPX;sFlt-1、PIGF、HPX、CTSC、ADAM12、ApoE、ApoA1、RBP4、HB和皮卡丘素;sFlt-1、HPX、ApoE、ApoA1和皮卡丘素;PIGF和皮卡丘素;PIGF、HPX、CTSC、Adam12、HP、ApoE、RBP4、HB、纤维蛋白原和皮卡丘素;和HPX、ApoA1、皮卡丘素;HPX、CTSC、Adam12、HP、HB、纤维蛋白原和皮卡丘素。

[0063] 本领域普通技术人员可使用例如本领域中已知或本文工作实施例中的所述的任何适宜统计学方法容易地鉴定可用作主题方法中的先兆子痫小组的先兆子痫标志物的其它组合。例如,可通过组合用于先兆子痫分类分析的遗传算法(GA)与所有配对(AP)支持向量机(SVM)方法来选择分析物的小组。例如通过迭代GA/SVM自动确定预测特征,从而产生非冗余先兆子痫相关的分析物与最佳的分类性能的非常紧凑的集合。虽然不同的分类器集合通常将仅具有适度的重叠基因特征,但它们在上下文和本文的工作实施例中所提供先兆子痫评估时将具有类似的准确性水平。

[0064] 方法

[0065] 在本发明的一些方面,提供用于获得受试者的先兆子痫标志物水平表现的方法。先兆子痫标志物水平表现意指一种或多种受试者先兆子痫标志物(例如先兆子痫标志物小组)在来自受试者的生物样本中的水平表现。术语“生物样本”涵盖从有机体获得的多种样本类型并且可用于诊断、预后或监测测定法中。所述术语涵盖生物源或源自其的细胞和其后代的血液和其它液体样本。所述术语涵盖在其采购后已经以任何方式操作(例如通过用试剂处理、增溶或富集某些组分)的样本。所述术语涵盖临床样本,并且还包括细胞上

清液、细胞溶解物、血清、血浆、生物流体和组织样本。用于本发明的方法中的临床样本可从多种来源获得,特别是血样。

[0066] 特别感兴趣的样本来源包括血样或其制剂,例如,全血、或血清或血浆,和尿液。介于约 $2\mu\text{l}$ 至约 $2,000\mu\text{l}$ 的血液、血清或尿液的样本体积通常足以测定先兆子痫基因产物的水平。样本体积一般将在约 $10\mu\text{l}$ 至约 $1,750\mu\text{l}$ 、约 $20\mu\text{l}$ 至约 $1,500\mu\text{l}$ 、约 $40\mu\text{l}$ 至约 $1,250\mu\text{l}$ 、约 $60\mu\text{l}$ 至约 $1,000\mu\text{l}$ 、约 $100\mu\text{l}$ 至约 $900\mu\text{l}$ 、约 $200\mu\text{l}$ 至约 $800\mu\text{l}$ 、约 $400\mu\text{l}$ 至约 $600\mu\text{l}$ 的范围内。在许多实施方案中,人类样本的合适的初始源是血样。因此,在受试者测定法中使用的样本一般是血液源样本。血液源样本可源自全血或其中一部分,例如血清、血浆等,其中在一些实施方案中样本是源自血液,使其凝结,并且分离血清并收集以用于测定法。

[0067] 在一些实施方案中,样本是血清或血清源样本。可使用用于产生流体血清样本的任何适宜方法。在许多实施方案中,方法使用以下步骤:通过皮肤穿刺(例如,手指棒、静脉穿刺)将静脉血吸引至凝血或血清分离管中,使血液凝结,以及将血清离心以远离凝结的血液。然后采集血清并储存直至测定。一旦获得患者源样本后,测定样本以确定先兆子痫标志物的水平。

[0068] 通常在妊娠的中期或晚期从个体获得受试者样本。“妊娠”意指哺乳动物中的妊娠持续时间,即从受精发育直至分娩再加上两周(即从未次月经的第一天起)的时间间隔。孕中期或孕晚期意指妊娠的第二或第三部分,每一段长度为3个月。因此,例如,“孕早期”意指从未次月经的第一天至妊娠的第13周;“孕中期”意指从妊娠的第14周至第27周;以及“孕晚期”意指从妊娠的第28周至分娩,即38-42周。换句话说,受试者样本可在妊娠的大约第14周至第42周、妊娠的大约第18周至第42周、妊娠的大约第20周至第42周、妊娠的大约第24周至第42周、妊娠的大约第30周至第42周、妊娠的大约第34周至第42周、妊娠的大约第38周至第42周获得。因此,在一些实施方案中,受试者样本可在妊娠早期、例如在妊娠第14周以上、例如在妊娠第14、15、16、17、18、19、20、21、22或23周以上、更通常在妊娠第24、25、26、27、28、29、30、31、32、33周或第34周以上获得。在其它实施方案中,受试者样本可在妊娠晚期、例如在妊娠第34周后、例如在妊娠第35、36、37、38、39、40周或第41周获得。

[0069] 在获得样本后,其可以直接使用,冷冻或保持在适当的培养基中持续较短时间。通常样本将来自人类患者,但可使用动物模型,例如马、牛、猪、犬、猫、啮齿动物例如小鼠、大鼠、仓鼠、灵长类动物等。可在主题方法中评价在先兆子痫患者中显示本文公开的一种或多种先兆子痫标志物的有差别表现的任何适宜的组织样本。通常,合适的样本源将源自已释放有所感兴趣的分子实体即RNA转录物或蛋白质的流体。

[0070] 可以多种方式处理受试者样本以增强一种或多种先兆子痫标志物的检测。例如,在样本为血液时,可在测定之前从样本中移出红血球(例如,通过离心)。这种处理可用于降低使用亲和试剂检测先兆子痫标志物水平的非特异性本底水平。还可通过使用本领域中众所周知的程序(例如酸沉淀、醇沉淀、盐沉淀、疏水性沉淀、过滤(使用能够保留大于30kD的分子的过滤器,例如Centrim 30™)、亲和纯化)浓缩样本来增强先兆子痫标志物的检测。在一些实施方案中,测试和对照样本的pH将被调节至并维持在接近中性的pH(即pH 6.5-8.0)。这样的pH调节将防止复合物形成,从而提供样本中的标志物水平的更精确

定量。在样本为尿液的实施方案中,调节样本的 pH 并且浓缩样本以增强标志物的检测。

[0071] 在实施主题方法时,评价来自个体的生物样本中的先兆子痫标志物水平。可通过任何适宜的方法评价受试者样本中的一种或多种先兆子痫标志物的水平。例如,可通过测量一种或多种先兆子痫基因的一种或多种核酸转录物例如 mRNA 的水平 / 量来检测先兆子痫基因表达水平。可通过测量一种或多种蛋白质 / 多肽的水平 / 量来检测蛋白质标志物。术语“评价”、“测定”、“测量”、“评估”和“确定”可互换使用以指代任何形式的测量,包括测定是否存在要素,以及包括定量和定性测定。评价可能是相对或绝对的。

[0072] 例如,可通过检测样本中一种或多种蛋白质 / 多肽或其片段的量或水平来评价至少一种先兆子痫标志物的水平以得出蛋白质水平表现。如本申请中使用的术语“蛋白质”和“多肽”是可互换的。“多肽”是指氨基酸聚合物(氨基酸序列)并且不是指具体长度的分子。因此肽和寡肽包括在多肽的定义中。这种术语还指代或包括翻译后修饰多肽,例如,糖基化多肽、乙酰化多肽、磷酸化多肽等。定义中包括例如含有氨基酸的一种或多种类似物的多肽、具有被取代的键以及本领域中已知的天然存在和非天然存在的其它修饰的多肽。

[0073] 当检测蛋白质水平时,可使用任何适宜用于评价蛋白质水平的方案,其中测定所测定样本中的一种或多种蛋白质的水平。例如,一种用于测定蛋白质水平的代表性和适宜类型的方案为 ELISA。在 ELISA 和基于 ELISA 的测定法中,可将对所感兴趣的蛋白质具有特异性的一种或多种抗体固定至所选固体表面、优选展现蛋白质亲和力的表面诸如聚苯乙烯微量滴定板的孔上。在洗涤以除去不完全吸附的材料后,用已知关于测试样本如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或乳粉溶液为抗原中性的非特异性“阻断”蛋白涂布测定板孔。这允许阻断固定化表面上的非特异性吸附位点,从而降低由抗原在表面上的非特异性结合造成的本底。在洗涤以除去未结合的阻断蛋白后,使固定化表面与待测试的样本在有益于免疫复合物(抗原 / 抗体)形成的条件下接触。这些条件包括在磷酸盐缓冲盐水(PBS) / Tween 或 PBS/Triton-X 100(其还倾向于辅助降低非特异性本底)中用稀释剂诸如 BSA 或牛 γ 球蛋白(BGG) 稀释样本,以及在大约 25°C -27°C 的温度下将样本温育约 2-4 小时(但可使用其它温度)。在温育后,洗涤抗血清接触表面以除去非免疫复合物。示例性洗涤程序包括用诸如 PBS/Tween、PBS/Triton-X100 或硼酸盐缓冲液等溶液洗涤。然后可通过使结合的免疫复合物接触不同于第一抗体的对标靶具有特异性的二级抗体以及检测二级抗体的结合来测定免疫复合物形成的发生和量。在某些实施方案中,二级抗体将具有相关联的酶,例如脲酶、过氧化物酶或碱性磷酸酶,其在与适当的发色底物一起温育后将产生有色沉淀物。例如,可使用脲酶或过氧化物酶结合的抗人类 IgG,持续一段时间并且在有利于发展免疫复合物形成的条件下(例如,在室温下在含有 PBS 的溶液如 PBS/Tween 中温育 2 小时)。在用二级抗体进行这样的温育以及洗涤以除去未结合的物质后,例如通过在脲酶标记或 2,2'-连氨基-2,2'-(3-乙基-苯并噻唑啉)-6-磺酸(ABTS) 和 H_2O_2 的情况下,在过氧化物酶标记的情况下,与发色底物诸如尿素和溴甲酚紫一起温育来定量标记的量。然后通过例如使用可见光谱分光光度计测量颜色生成的程度来实现定量。

[0074] 可通过首先使样本结合至测定板来改变前述格式。然后,将初级抗体与测定板一起温育,接着使用对初级抗体具有特异性的被标记的二级抗体来检测结合的初级抗体。

[0075] 固定化有一种或多种抗体的固体底物可由多种材料制成并且制成多种形状,例如微量滴定板、微珠、浸渍片、树脂粒子等。底物可经过选择以最大化信噪比,以最小化本底结

合,以及为了易于分离和成本。可以最适于所用底物的方式,例如,通过从储槽中除去珠粒或浸渍片,排空或稀释储槽如微量滴定板孔,或用洗涤溶液或溶剂冲洗珠粒、粒子、色谱柱或过滤器来实现洗涤。

[0076] 或者,可使用用于在样本中测量一种或多种蛋白质的水平的并非基于 ELISA 的方法。代表性实例包括(但不限于)质谱法、蛋白质组学阵列、xMAP™微球技术、流式细胞术、western 印迹和免疫组织化学。

[0077] 作为另一个实例,可通过在患者样本中检测由所感兴趣的基因编码的一种或多种 RNA 转录物或其片段的量或水平来评价至少一种先兆子痫标志物的水平来得出核酸标志物表现。可使用任何适宜的方案来检测样本中核酸的水平。尽管已知多种检测核酸的不同方法,例如在差别基因表达分析的领域中使用的方法,一种用于产生标志物表现的代表性和适宜类型的方案为基于阵列的基因表达概况分析方案。这些应用是杂交测定法,其中使用在待产生的标志物表现中测定/概况分析的各基因的显示为“探针”核酸的核酸。在这些测定法中,首先从被测定的初始核酸样本制备目标核酸的样本,其中制剂可包括用标记、例如信号产生系统的成员来标记目标核酸。在目标核酸样本制备后,使样本与阵列在杂交条件下接触,由此在与连接至阵列表面的探针序列互补的目标核酸之间形成复合物。然后定性或定量地检测杂交复合物的存在。

[0078] 可实施以产生在主题方法中使用的标志物表现的特定杂交技术包括以下文献中所述的技术:美国专利号:5,143,854;5,288,644;5,324,633;5,432,049;5,470,710;5,492,806;5,503,980;5,510,270;5,525,464;5,547,839;5,580,732;5,661,028;5,800,992;其公开内容以引用的方式并入本文中;以及 WO 95/21265;WO 96/31622;WO 97/10365;WO 97/27317;EP 373 203;和 EP 785 280。在这些方法中,使包括各表型决定基因(其表达被测定)的探针的“探针”核酸阵列与如上文所述的目标核酸接触。在杂交条件、例如严格的杂交条件下进行接触,并且然后除去未结合的核酸。如本文所用的术语“严格的测定条件”是指相容以产生具有充分互补性的核酸结合对(例如,表面结合和溶液相核酸)以在测定法中提供所需特异性水平,而不太相容以形成具有不充分互补性的结合成员之间的结合对以提供所需特异性的条件。严格的测定条件是杂交与洗涤条件的总和或组合(全体)。

[0079] 杂交核酸的所得模式提供关于已探测的各基因的表达的信息,其中表达信息是关于基因是否表达并且通常在什么水平的方面,其中表达数据、即标志物表现(例如,呈转录体形式),可为定性的和定量的。

[0080] 或者,可使用用于定量样本中的一种或多种核酸水平的并非基于阵列的方法,包括基于扩增方案的方法,例如,基于聚合酶链反应(PCR)的测定法,包括定量 PCR、反转录 PCR(RT-PCR)、实时 PCR 等。

[0081] 分子和细胞生物化学中的一般方法可见于诸如以下标准教科书中:Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版(Sambrook 等人,Harbor Laboratory Press 2001);Short Protocols in Molecular Biology,第4版(Ausubel 等人编,John Wiley&Sons 1999);Protein Methods(Bollag 等人,John Wiley&Sons 1996);Nonviral Vectors for Gene Therapy(Wagner 等人编,Academic Press 1999);Viral Vectors(Kaplift 和 Loewy 编,Academic Press 1995);Immunology Methods Manual(I.

Lefkovits 编, Academic Press 1997); 以及 Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle 和 Griffiths, John Wiley & Sons 1998), 其公开内容以引用的方式并入本文中。在本公开中提及的用于基因操作的试剂、克隆载体和试剂盒可获自诸如 BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich 和 ClonTech 等商业供应商。

[0082] 所得数据提供关于样本中已探测的每一标志物的水平的信息, 其中信息是关于是否存在标志物以及通常处于什么水平的方面, 并且其中数据可为定性的和定量的。因此, 当检测是定性的时, 方法提供在所测定的样本中是否存在目标标志物 (例如, 核酸或蛋白质) 的阅读或评价 (例如, 评估)。在其它实施方案中, 方法提供在所测定的样本中是否存在目标标志物的定量检测, 即, 在所测定的样本中目标分析物 (例如, 核酸或蛋白质) 的实际量或相对丰度的评价或评估。在这些实施方案中, 定量检测可为绝对的, 或者如果方法为检测样本中两种或更多种不同分析物 (例如, 目标核酸或蛋白质) 的方法, 则为相对的。因此, 术语“定量”当在定量样本中的目标分析物 (例如, 核酸或蛋白质) 的情形下使用时可以指绝对定量或相对定量。可通过包括已知浓度的一种或多种对照分析物以及参考目标分析物与已知对照分析物的所检测水平 (例如, 通过生成标准曲线) 来实现绝对定量。或者, 可通过比较两种或更多种不同的目标分析物之间的检测水平或量以提供两种或更多种不同的分析物各自的相对定量 (例如, 相对于彼此) 来实现相对定量。

[0083] 一旦已确定了一种或多种先兆子痫标志物的水平后, 可以多种方式中的任一种来分析测量结果以获得先兆子痫标志物水平表现。

[0084] 例如, 可个别地分析一种或多种先兆子痫标志物的测量结果来产生先兆子痫概况。如本文所用, “先兆子痫概况”是患者样本中一种或多种先兆子痫标志物的归一化水平, 例如, 患者样本中血清学蛋白质浓度的归一化水平。概况可由本领域中已知的多种方法中的任一种产生。例如, 各标志物的水平可相对于所选管家基因 (例如 ABL1、GAPDH 或 PGK1) 的表达或相对于整个小组内的信号等进行 $\log_2$ 转化和归一化。本领域普通技术人员将容易知晓其它计算先兆子痫概况的方法。

[0085] 作为另一个实例, 可共同分析先兆子痫标志物小组的测量结果以得出单一先兆子痫评分。“先兆子痫评分”意指表示先兆子痫小组中的每一先兆子痫标志物的加权水平的单一度量值。因此, 在一些实施方案中, 主题方法包括检测样本中先兆子痫小组的标志物水平, 以及基于先兆子痫标志物的加权水平计算先兆子痫评分。可通过多种方法和本领域中已知用于计算生物标志物评分的算法中的任一种来计算患者样本的先兆子痫评分。例如, 已通过例如将每一归一化标志物水平乘以加权因子来加权的加权标志物水平 (例如 $\log_2$ 转化和归一化标志物水平) 可被合计并且在一些情况下平均化以得出代表所分析的先兆子痫标志物小组的单一值。

[0086] 在一些情况下, 小组中每一标志物的加权因子或简单地说“权重”可反映样本中分析物水平的变化。例如, 每一先兆子痫标志物的分析物水平可被 $\log_2$ 转化和加权为 -1 (对于先兆子痫中水平增加的那些标志物) 或 -1 (对于先兆子痫中水平降低的那些标志物), 并且增加标志物总和之间与降低的标志物相比的比率经测定得出先兆子痫特征。在其它情况下, 权重可反映在进行诊断、预后或监测评估时每一标志物对于标志物小组的特异性、灵敏性和 / 或准确性的重要性。可通过任何适宜的统计学机器学习方法来确定这些权重, 可使用例如获得样本的数据集的主成分分析 (PCA)、线性回归、支持向量机 (SVM) 和 / 或随机森

林。在一些情况下,通过获得患者样本的数据集来定义每一标志物的权重。在其它情况下,可基于参考数据集或“训练数据集”来定义每一标志物的权重。

[0087] 例如,如本文实施例中所公开,在包含标志物皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白的先兆子痫小组中,皮卡丘素水平是最显著的,血红素结合蛋白、ApoA1 和 ApoC3 的水平是适度重要的,并且 RBP4 和结合珠蛋白的水平不太显著。因此,可用于得出先兆子痫评分的算法的一个实例将是以下算法:将皮卡丘素水平视为最强,例如赋予皮卡丘素测量结果以约 12-16、例如约 15 的权重;将血红素结合蛋白、ApoA1 和 ApoC3 水平视为更适中,例如赋予这些基因的测量结果以约 4-8、例如约 6 的权重;将 RBP4 视为较少,例如赋予 RBP4 测量结果以约 2 的权重;以及将结合珠蛋白视为最少,例如赋予结合珠蛋白测量结果以约 1 以下的权重。

[0088] 这些分析方法可容易由本领域普通技术人员通过使用基于计算机的系统、例如使用如本领域中已知的任何硬件、软件和数据存储介质,以及使用任何适于这种分析的算法来执行。例如,可通过“云计算”、基于智能电话或基于客户端-服务器的平台等来应用数据挖掘算法。

[0089] 在某些实施方案中,评价仅一种标志物的表达(例如多肽水平)来产生标志物水平表现。在其它实施方案中,评价两种或更多种(即小组)标志物、例如 3 种以上、4 种以上、5 种以上、6 种以上、7 种以上、8 种以上、10 种以上、或 15 种以上标志物的水平。因此,在主题方法中,评价样本中至少一种标志物的表达。在某些实施方案中,所进行的评价可视为对蛋白质组的评价,如所述术语在本领域中所使用。

[0090] 在一些情况下,测定或获得受试者的先兆子痫标志物表现(例如先兆子痫概况或先兆子痫评分)的主题方法进一步包括以报告形式提供先兆子痫标志物表现。因此,在一些情况下,主题方法可进一步包括产生或输出提供样本中的先兆子痫标志物评价结果的报告的步骤,所述报告可以电子介质(例如,计算机监视器上的电子显示)形式或以有形介质(例如,印刷在纸或其它有形介质上的报告)形式提供。可提供例如如本领域中所知或如下文更详细描述的任何形式的报告。

[0091] 效用

[0092] 如此获得的先兆子痫标志物水平表现有许多用途。例如,标志物水平表现可用于诊断先兆子痫;也就是说,提供关于受试者是否受先兆子痫侵袭、先兆子痫类型、先兆子痫的严重程度等的测定。在一些情况下,受试者可存在先兆子痫的临床症状,例如血压升高(例如 140/90mm/Hg 或更高)、蛋白尿、体重突然增加(1-2 天内或一周超过 2 磅)、水潴留(水肿)、肝酶升高和/或血小板减少(降低的血小板计数小于 100,000)。在其它情况下,受试者可能无先兆子痫症状,但具有与先兆子痫相关的风险因素,例如医学病状如妊娠期糖尿病、I 型糖尿病、肥胖症、慢性高血压、肾病、血栓形成倾向;非洲裔美国人或菲律宾裔;年龄超过 35 岁或小于 20 岁;先兆子痫家族史;未产妇;以前妊娠时有先兆子痫;和/或压力。在其它情况下,受试者可能无先兆子痫症状并且不具有与先兆子痫相关的风险因素。

[0093] 作为另一个实例,可使用先兆子痫标志物水平表现来预后先兆子痫;也就是说,提供先兆子痫预后。例如,可使用先兆子痫标志物水平表现来预测受试者患上先兆子痫的易感性或风险。“预测个体是否将患上先兆子痫”意指测定个体在接下来的一周内、在接下来的 2 周内、在接下来的 3 周内、在接下来的 5 周内、在接下来的 2 个月内、在接下来的 3 个月

内、例如在妊娠期其余部分内将患上先兆子痫的可能性。可使用先兆子痫标志物水平表现来预测疾病进展过程和 / 或疾病结果,例如先兆子痫的预期发作、先兆子痫的预期持续时间、关于先兆子痫是否将发展成子痫的预期等。可使用先兆子痫标志物水平表现来预测受试者对于先兆子痫治疗的反应性,例如,阳性反应、阴性反应、完全无反应。

[0094] 作为另一个实例,可使用先兆子痫标志物水平表现来监测先兆子痫。“监测”先兆子痫一般意指监测受试者的状况,例如传达先兆子痫诊断、传达先兆子痫预后、提供关于先兆子痫治疗的作用或功效的信息等。

[0095] 作为另一个实例,可使用先兆子痫标志物水平表现来确定受试者的治疗。术语“治疗 (treatment)”、“治疗 (treating)”等在本文一般用于指获得所需的药理学和 / 或生理学作用。所述作用可以是预防性的,即完全或部分预防疾病或其症状;和 / 或可以是治疗性的,即部分或完全治愈疾病和 / 或可归因于疾病的不良反应。如本文所用的“治疗”涵盖哺乳动物中的疾病的任何治疗,并且包括:(a) 在可能倾向于患上疾病但尚未诊断患有疾病的受试者中预防疾病的发生;(b) 抑制疾病,即抑止其发展;或(c) 减轻疾病,即造成疾病的消退。可在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂。特别感兴趣的是正在进行中的疾病的治疗,其中治疗稳定化或降低患者的不良临床症状。可能在疾病的症状期之前施用受试者疗法,并且在一些情况下在疾病的症状期之后施用受试者疗法。术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文可互换使用并且是指需要对其进行诊断、处理或治疗的任何哺乳动物受试者,特别是人类。先兆子痫治疗是本领域中众所周知的,并且可包括卧床休息、多饮水、低盐饮食、利用药物控制血压、皮质类固醇、诱导妊娠等。

[0096] 在一些实施方案中,提供先兆子痫评估(例如诊断先兆子痫、预后先兆子痫、监测先兆子痫、治疗先兆子痫等)的主题方法可包含比较所得先兆子痫标志物水平表现与先兆子痫表型测定要素以鉴定与表型测定要素的相似性或差异,其中然后使用所鉴定的相似性或差异来提供先兆子痫评估,例如诊断先兆子痫、预后先兆子痫、监测先兆子痫、确定先兆子痫治疗等。“表型测定要素”意指代表表型(在这种情况下,先兆子痫表型)并且可用于确定受试者的表型、例如受试者是否健康或受先兆子痫侵袭、受试者是否具有可能发展成子痫的先兆子痫、受试者是否具有对治疗有反应的先兆子痫等的要素,例如组织样本、标志物概况、数值(例如评分)、数值范围等。

[0097] 例如,先兆子痫表型测定要素可为来自患有先兆子痫或未患有先兆子痫的个体的样本,其可例如用作给定受试者的标志物水平表现的实验测定中的参考物 / 对照物。作为另一个实例,先兆子痫表型测定要素可为标志物水平表现,例如标志物概况或评分,其代表先兆子痫状态并且可用作用于解释给定受试者的标志物水平表现的参考物 / 对照物。表型测定要素可为阳性参考物 / 对照物,例如,来自具有先兆子痫、或将患上先兆子痫、或具有可由已知治疗管理的先兆子痫、或具有已经过测定仅对婴儿娩出有反应的先兆子痫的孕妇的样本或其标志物水平表现。或者,表型测定要素可为阴性参考物 / 对照物,例如,来自尚未患上先兆子痫的孕妇、或未怀孕妇女的样本或其标志物水平表现。表型测定要素优选为相同类型的样本,或者如果是标志物水平表现,则其获自与用于产生所监测个体的标志物水平表现的样本相同类型的样本。例如,如果正在评价个体的血清,则表型测定要素将优选为血清。

[0098] 在某些实施方案中,将所得标志物水平表现与单一表型测定要素进行比较以获得

关于被测试先兆子痫的个体的信息。在其它实施方案中,将所得标志物水平表现与两种或更多种表型测定要素进行比较。例如,可将所得标志物水平表现与阴性参考物和阳性参考物进行比较以获得关于个体是否将患上先兆子痫的确认信息。作为另一个实例,可将所得标志物水平表现与代表对治疗有反应的先兆子痫的参考物和代表对治疗无反应的先兆子痫的参考物进行比较以获得关于患者是否将对治疗有反应的信息。

[0099] 可使用任何适宜方法来进行所得标志物水平表现与一种或多种表型测定要素的比较,其中多种方法是本领域技术人员已知的。例如,ELISA 领域的技术人员将知道可通过例如归一化成标准曲线,比较归一化值等来比较 ELISA 数据。比较步骤产生关于所得标志物水平概况与对照 / 参考概况如何相似或不相似的信息,使用所述相似性 / 不相似性信息来例如预测先兆子痫的发作、诊断先兆子痫、监测先兆子痫患者等。类似地,阵列领域的技术人员将会知道可通过例如比较表达概况的数字影像、通过比较表达数据的数据库等来比较阵列概况。描述了比较表达概况的方法的专利包括(但不限于)美国专利号 6,308,170 和 6,228,575,其公开内容以引用的方式并入本文中。上文还描述了比较标志物水平概况的方法。相似性可能是基于相对标志物水平、绝对标志物水平或两者的组合。在某些实施方案中,使用被设计以接收从受试者、例如从用户获得的标志物水平表现的输入、确定与一种或多种参考概况或参考评分的相似性以及例如向用户(例如,实验室技术人员、医师、妊娠个体等)返回先兆子痫预后的在上面存储有程序的计算机来进行相似性测定。下文描述本发明的计算机实施方面的进一步描述。在某些实施方案中,可基于标志物水平表现(例如先兆子痫评分)与多种表型测定要素(例如多种先兆子痫评分)的目测比较来进行相似性测定,以确定与受试者最相似的参考先兆子痫评分。根据与所得标志物水平概况进行比较的表型测定要素的类型和性质,上述比较步骤得到关于所测定的细胞 / 体液的多种不同类型的信息。因此,上述比较步骤可得到先兆子痫发作的阳性 / 阴性预测、先兆子痫的阳性 / 阴性诊断、先兆子痫的表征、关于先兆子痫对于治疗的反应性的信息等。

[0100] 在其它实施方案中,即在不与表型测定要素进行比较的情况下,直接使用标志物水平表现来进行先兆子痫预后、先兆子痫诊断或监测先兆子痫。例如,如果患者血清中的 ADAM12 浓度为约 950pg/ml 以上;如果患者血清中的组织蛋白酶 C 浓度为约 16ng/ml 以上;或患者血清中的皮卡丘素浓度为约 500ng/ml 以下,则可预测患者患上先兆子痫。对于其它实施例,参见下文实施例的表 1 和表 2。

[0101] 在一些实施方案中,提供先兆子痫评估、例如诊断先兆子痫、预后先兆子痫、监测先兆子痫等的主题方法可包含结合主题标志物水平表现使用的其它评估。例如,主题方法可进一步包括测量一种或多种与先兆子痫相关的临床参数 / 因子,例如血压、尿蛋白、体重变化、水潴留(水肿)、肝酶水平和血小板计数。例如,可评估受试者的一种或多种临床症状,例如在妊娠大约第 14 周以上、例如妊娠第 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 周以上的高血压、蛋白尿等,其中将临床评估(即与先兆子痫相关的一种或多种症状的检测)的阳性结果与标志物水平表现组合使用以提供先兆子痫诊断、先兆子痫预后、监测先兆子痫等。在一些情况下,可在获得先兆子痫标志物水平表现之前测量临床参数,例如,向技术人员传达关于是否应获得先兆子痫标志物水平表现,例如以作出或证实先兆子痫诊断。在一些情况下,可在获得先兆子痫标志物水平表现后测量临床参数,例如以监测先兆子痫。

[0102] 作为另一个实例,提供先兆子痫评估的主题方法可进一步包括评估与患上先兆子痫的风险相关的一种或多种因素。先兆子痫风险因素的非限制性实例包括例如医学病状如妊娠期糖尿病、I 型糖尿病、肥胖症、慢性高血压、肾病、血栓形成倾向;非洲裔美国人或菲律宾裔;年龄超过 35 岁或小于 20 岁;先兆子痫家族史;未产妇;以前妊娠时有先兆子痫;和压力。例如,当首次证实妊娠时或其后,可评估受试者的一种或多种风险因素,例如医学病状、家族史等,其中将风险评估(即与先兆子痫相关的一种或多种风险因素的测定)的阳性结果与标志物水平表现组合使用以提供先兆子痫诊断、先兆子痫预后、监测先兆子痫等。

[0103] 可针对多种不同类型的受试者使用主题方法。在许多实施方案中,受试者属于哺乳动物纲,包括食肉目(例如狗和猫)、啮齿目(例如,小鼠、豚鼠和大鼠)、兔形目(例如兔)和灵长目(例如,人类、黑猩猩和猴)。在某些实施方案中,动物或宿主,即受试者(在本文中也称为患者),为人类。

[0104] 在一些实施方案中,提供先兆子痫评估的主题方法包括提供诊断、预后或监测结果。在一些实施方案中,通过提供(即产生)包括技术人员的评估、例如技术人员关于患者目前是否受到先兆子痫侵袭、受试者的先兆子痫类型、阶段或严重程度等的确定(“先兆子痫诊断”);技术人员对于患者患上先兆子痫的易感性、疾病进展过程、患者对于治疗的反应性等的预测(即技术人员的“先兆子痫预后”);或技术人员对于先兆子痫的监测结果的书面报告来提供本公开的先兆子痫评估。因此,主题方法可进一步包括产生或输出提供技术人员的评估结果的报告的步骤,所述报告可以电子介质(例如计算机监视器上的电子显示)形式或以有形介质(例如,印刷在纸或其它有形介质上的报告)形式提供。可提供例如如本领域中所知或如下文更详细描述的任何形式的报告。

[0105] 报告

[0106] 如本文所述的“报告”是电子或有形文件,其包括提供关于受试者评估和其结果的所感兴趣的信息的报告要素。在一些实施方案中,受试者报告至少包括先兆子痫标志物表现,例如如上文更详细讨论的先兆子痫概况或先兆子痫评分。在一些实施方案中,受试者报告至少包括技术人员的先兆子痫评估,例如先兆子痫诊断、先兆子痫预后、先兆子痫监测分析、治疗建议等。受试者报告可以完全或部分地以电子形式产生。受试者报告可以进一步包括以下一种或多种:1) 关于测试设施的信息;2) 服务供应商信息;3) 患者数据;4) 样本数据;5) 评估报告,其可包括各种信息,包括:a) 所使用的参考值,和 b) 测试数据,其中测试数据可包括例如蛋白质水平测定;6) 其它特征。

[0107] 报告可包括关于测试设施的信息,所述信息与进行样本采集和/或数据生成的医院、诊所或实验室有关。样本采集可包括从受试者获得流体样本,例如血液、唾液、尿液等;组织样本,例如组织切片等。数据生成可包括测量先兆子痫患者对健康个体(即不具有和/或未患上先兆子痫的个体)中的标志物浓度。这种信息可包括与例如测试设施的名称和位置、进行测定法和/或录入输入数据的实验室技术人员的身份、进行和/或分析测定法的日期和时间、储存样本和/或结果数据的位置、测定法中使用的试剂(例如试剂盒等)的批号等相关的一种或多种细节。一般可使用由用户提供的信息来提供具有这种信息的报告字段(report field)。

[0108] 报告可包括关于服务供应商的信息,其可位于用户所处的医疗设施外部,或在医疗设施内。这种信息的实例可包括服务供应商的名称和位置、审阅者的名称,以及必要时或

需要时进行样本采集和 / 或数据生成的个体的名称。具有这种信息的报告字段一般可使用由用户输入的数据来提供,其可选自预脚本化选择 (例如,使用下拉菜单)。报告中的其它服务供应商信息可包括关于结果和 / 或关于解释性报告的技术信息的联络信息。

[0109] 报告可包括患者数据部分,包括患者病史 (其可包括例如年龄、种族、血清型、先前先兆子痫发作,和妊娠的任何其它特征),以及管理患者数据如鉴定患者的信息 (例如,名称、患者出生日期 (DOB)、性别、邮件和 / 或住址、病历号 (MRN)、医疗设施中的房间和 / 或床号、保险信息等)、命令监测评估的患者的医师或其他健康专业人员的名称,以及不同于主诊医师的负责患者护理的职员医师 (例如初级保健医师) 的名称。

[0110] 报告可包括样本数据部分,其可提供关于在监测评估中分析的生物样本的信息,例如从患者获得的生物样本源 (例如血液、唾液或组织类型等)、样本如何处理 (例如储存温度、准备方案) 以及采集日期和时间。具有这种信息的报告字段一般可使用由用户输入的数据来提供,其中一些可以预脚本化选择形式 (例如,使用下拉菜单) 提供。报告可包括结果部分。例如,报告可包括报告蛋白质水平测定测定法结果 (例如,“血清中的 1.5 纳摩尔 / 升 ADAM12”) 或计算的先兆子痫评分的部分。

[0111] 报告可包括评估报告部分,其可包括在如本文所述的数据处理后所生成的信息。解释性报告可包括受试者将患上先兆子痫的可能性的预测。解释性报告可包括先兆子痫诊断。解释性报告可包括先兆子痫的表征。报告的评估部分还可任选地包括建议。例如,在结果指示可能为先兆子痫时,建议可包括如本领域中所建议的改变饮食、施用血压药物等建议。

[0112] 还将容易理解,报告可包括其它要素或修改要素。例如,在呈电子形式时,报告可含有指向提供关于报告的所选要素的更详细信息的内部或外部数据库的超链接。例如,报告的患者数据要素可包括指向电子患者记录的超链接,或用于访问这种患者记录的网站,所述患者记录保持在保密数据库中。在医院内系统或诊所内情形中可能对后一种实施方案感兴趣。当呈电子格式时,报告被记录在例如计算机存储器、压缩驱动器、CD、DVD 等中的合适的物理介质如计算机可读介质上。

[0113] 应容易理解,报告可包括所有或一些上述要素,其条件是报告一般至少包括足以提供由用户所请求的分析 (例如计算的先兆子痫标志物水平表现;先兆子痫的预测、诊断或表征) 的要素。

[0114] 试剂、系统和试剂盒

[0115] 还提供了用于实施一种或多种上述方法的其试剂、系统和试剂盒。其主题试剂、系统和试剂盒可极大地改变。所感兴趣的试剂包括经过特别设计以用于产生来自样本的先兆子痫标志物的上述标志物水平表现的试剂,例如,一种或多种检测要素,例如用于检测蛋白质的抗体或肽、用于检测核酸的寡核苷酸等。在一些情况下,检测要素包含用于检测单一先兆子痫标志物的表达的试剂,例如,检测要素可为包含一种或多种检测要素 (例如一种或多种抗体、一种或多种寡核苷酸、一个或多个 PCR 引物集等) 的浸渍片、板、阵列或混合液,其可用于同时检测一种或多种先兆子痫标志物的表达。

[0116] 特别定制以产生标志物水平表现 (例如先兆子痫标志物水平表现) 的一类试剂是例如以 ELISA 格式、以 xMAP™ 微球格式、在蛋白质组阵列上、在用于通过流式细胞术、通过 western 印迹、通过斑点印迹或通过免疫组织化学进行分析的悬浮液中特异性结合至蛋白

质标志物的抗体的集合。本领域中充分理解使用其的方法。这些抗体可以溶液形式提供。或者,其可提供预结合至固体基质、例如多孔盘的孔或 xMAP 微球的表面。

[0117] 另一类型的这种试剂是其中表现所感兴趣的基因的探针核酸的阵列。本领域中已知多种不同的阵列格式,具有多种不同的探针结构、底物组成和连接技术(例如,斑点印迹阵列、微阵列等)。所感兴趣的代表性阵列结构包括以下文献中所述的阵列结构:美国专利 No.: 5,143,854;5,288,644;5,324,633;5,432,049;5,470,710;5,492,806;5,503,980;5,510,270;5,525,464;5,547,839;5,580,732;5,661,028;5,800,992;其公开内容以引用的方式并入本文中;以及 WO 95/21265;WO 96/31622;WO 97/10365;WO 97/27317;EP 373 203;和 EP 785 280。

[0118] 特别定制以产生基因(例如先兆子痫基因)的标志物水平表现的另一类试剂是经过设计以选择性扩增这些基因(例如,使用基于 PCR 的技术,例如,实时 RT-PCR)的基因特异性引物的集合。基因特异性引物及其使用方法描述于美国专利号 5,994,076 中,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0119] 特别感兴趣的是探针阵列、引物集合或抗体集合,其包括对至少 1 种选自由以下组成的组的基因/蛋白质具特异性的探针、引物或抗体(也称为试剂):血红素结合蛋白、铁蛋白、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 C、ADAM 金属肽酶结构域 12、角蛋白 33A、结合珠蛋白、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白 E、载脂蛋白 C-III、载脂蛋白 A-I、视黄醇结合蛋白 4、血红蛋白、纤维蛋白原和皮卡丘素,或对辅因子/辅基血红素、在一些情况下对多种这些基因/多肽、例如至少 2、3、4、5、6、7、8 种以上的基因/多肽具特异性的生物化学底物。在某些实施方案中,探针、引物或抗体的集合包括对组织蛋白酶 C 和皮卡丘素中的一种或多种具特异性的试剂。在某些实施方案中,探针、引物或抗体的集合包括对皮卡丘素以及血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和/或结合珠蛋白中的一种或多种具特异性的试剂。在某些实施方案中,探针、引物或抗体的集合包括对皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4 和结合珠蛋白具特异性的试剂。在某些实施方案中,探针、引物或抗体的集合包括对血红素结合蛋白、铁蛋白、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 C、ADAM 金属肽酶结构域 12、角蛋白 33A、结合珠蛋白、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白 E、载脂蛋白 C-III、载脂蛋白 A-I、视黄醇结合蛋白 4、血红蛋白、纤维蛋白原和皮卡丘素具特异性的试剂以及对血红素具特异性的生物化学底物。主题探针、引物或抗体集合或试剂可包括仅对上文列出的基因/蛋白质/辅因子具特异性的试剂,或其可包括对上文未列出的其它基因/蛋白质/辅因子具特异性的试剂,例如对此项领域中已知表达模式与先兆子痫相关的基因/蛋白质/辅因子(例如 sFLT-1 (VEGF-R1) 和 PIGF) 具特异性的探针、引物或抗体。

[0120] 在一些情况下,可提供系统。如本文所用,术语“系统”是指例如通过从相同或不同来源购买试剂集合而汇编的试剂集合。在一些情况下,可提供试剂盒。如本文所用,术语“试剂盒”是指一起提供(例如销售)的试剂集合。例如,样本核酸或蛋白质的基于核酸或抗体的检测分别可与将允许用于个性化先兆子痫护理的这些生物标志物的多重测定的电化学生物传感器平台偶合。

[0121] 主题发明的系统和试剂盒可包括上述阵列、基因特异性引物集合或蛋白质特异性抗体集合。系统和试剂盒可进一步包括在各种方法中使用的一种或多种其它试剂,例如用于产生目标核酸、dNTP 和/或 rNTP 的引物,其可为预混合或分离的;一种或多种独特标记

的 dNTP 和 / 或 rNTP, 例如生物素标记或 Cy3 或 Cy5 标记的 dNTP ; 具有不同散射光谱的金或银粒子, 或其它合成后标记试剂, 例如荧光染料的化学活性衍生物 ; 酶, 例如逆转录酶、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶等 ; 各种缓冲介质, 例如杂交和洗涤缓冲液 ; 预制探针阵列、标记探针纯化试剂和组分, 如旋转柱等 ; 信号生成和检测试剂, 例如标记的二级抗体、链霉亲和素 - 碱性磷酸酶结合物、化学荧光或化学发光底物等。

[0122] 主题系统和试剂盒还可包括一种或多种先兆子痫表型测定要素, 所述要素在许多实施方案中是可例如通过合适的实验或计算方式使用以基于例如已利用上述标志物测定要素测定的“输入”标志物水平概况进行先兆子痫预后的参考或对照样本或标志物表现。代表性先兆子痫表型测定要素包括来自已知具有或不具有先兆子痫的个体的样本、标志物水平表现 (例如, 如上文所述的参考或对照概况或评分等) 的数据库。

[0123] 除了上述组分之外, 主题试剂盒将进一步包括用于实施主题方法的说明书。这些说明书可以多种形式存在于主题试剂盒中, 其中一种或多种可存在于试剂盒中。这些说明书可存在的一种形式是在合适的介质或基材 (例如, 上面印刷有信息的一片或多片纸) 上、在试剂盒的包装中、在包装插页中的印刷信息等。另一种方式将是计算机可读介质, 例如软盘、CD 等, 其上面已记录有信息。可存在的另一种方式是可通过因特网使用以访问远程网站上的信息的网站地址。任何适宜的方式可存在于试剂盒中。

[0124] 下列实施例是通过说明的方式而非限制的方式提供。

[0125] 实施例

[0126] 阐述以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何作出和使用本发明的完整公开内容和描述, 并且不欲限制本发明人视为其发明的范围, 而且它们不欲表示下文的实验是所进行的全部或唯一的实验。已作出努力来确保关于所用数字 (例如量、温度等) 的精确性, 但应说明一些实验误差和偏差。除非另外说明, 否则份数以重量份, 分子量是重均分子量, 温度是以摄氏度计, 并且压力是大气压或接近大气压。

[0127] 实施例 1

[0128] 作为孕产妇发病率和死亡率的首要原因, 先兆子痫 (PE) 是一种侵袭所有妊娠数的 5% -8% 的妊娠相关血管病症 (Berg 等人, Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States:1993-1997 和 2001-2005. Obstetrics and gynecology 2009 ;113:1075-81 ; Mackay 等人, Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. Obstetrics and gynecology 2001 ;97:533-8)。通常造成胎儿生长受限和早产以及胎儿死亡率和发病率的 PE 可通过胎盘和胎儿的娩出来补救 (Powe 等人, Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. Circulation 2011 ;123:2856-69)。对 PE 的病因未完全理解。目前对 PE 的诊断是基于高血压和蛋白尿的征象 (Gynecologists AC00A ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. 第 33 号, 2002 年 1 月. Obstetrics and gynecology 2002 ;99:159-67), 但缺乏灵敏性和特异性并带有不利于孕产妇和胎儿结果的不良预后 (Zhang 等人, Prediction of adverse outcomes by common definitions of hypertension in pregnancy. Obstetrics and gynecology 2001 ;97:261-7)。因此, 需要鉴定可提供明确诊断的 PE 生物标志物, 其有机会更好地监测

病状进程,并且因此改善结果和经济效益。

[0129] 虽然病理生理学在很大程度上仍然难以捉摸,但 PE 是一种妊娠多系统病症,其中胎盘起到举足轻重的作用。研究人员已使用基因学、基因组学和蛋白质组学方法来比较 PE 和对照胎盘组织。病例对照样本的转录概况分析已鉴定了疾病特异性表达模式、规范途径和基因-基因网络 (Lapaire 等人, Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates. *Fetal diagnosis and therapy* 2012 ;31:147-53 ;N ishizawa 等人, Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placenta tissue derived from early and late onset severe pre eclampsia. *Placenta* 2007 ;28:487-97 ;Loset 等人, transcriptional profile of the decidua in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 2011 ;204:84e1-27 ;Johansson 等人, Partial correlation network analyses to detect altered gene interactions in human disease: using preeclampsia as a model. *Human genetics* 2011 ;129:25-34 ;Sitras 等人, Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta* 2009 ;30:424-33 ;Tsai 等人, Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signaling pathways. *Placenta* 2011 ;32:175-82 ;Winn 等人, Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. *Endocrinology* 2009 ;150:452-62)。基于蛋白组学的生物标志物研究 (Kolla 等人, Quantitative proteomic (iTRAQ) analysis of 1st trimester maternal plasma samples in pregnancies at risk for preeclampsia. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012 ;2012:305964 ;Mary 等人, Dynamic proteome in enigmatic preeclampsia: an account of molecular mechanisms and biomarker discovery. *Proteomics Clinical applications* 2012 ;6:79-90 ;Carty 等人, Urinary proteomics for prediction of preeclampsia. *Hypertension* 2011 ;57:561-9) 也已经揭示了用于未来测试的候选生物标志物。胎盘血管生成和抗血管生成因子的不平衡、可溶性 fms 样酪氨酸激酶 (sFlt-1) 升高和胎盘生长因子 (PIGF) 水平降低都暗示在 PE 的发病机制中 (Shibata 等人, Soluble fms-like tyrosine kinase is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005 ;90:4895-903 ;Maynard 等人, Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* 2003 ;111:649-58 ;Wolf 等人, Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology* 2005 ;193:16-22 ;Rajakumar 等人, Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant

women. *Placenta* 2005 ;26:563-73 ;Taylor 等人 ,Altered tumor vessel maturation and proliferation i n placenta growth factor-producing tumors:potential relationship to p ost-therapy tumor angiogenesis and recurrence. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003 ;105:158-64 ;Tidewell 等人 ,Low maternal serum levels of placenta growth factor as an a ntecedent of clinical preeclampsia. *American journal of obstetrics an d gynecology* 2001 ;184:1267-72 ;Torry 等人 ,Preeclampsia is associa ted with reduced serum levels of placenta growth factor. *American journal of obstetrics and gynecology* 1998 ;179:1539-44), 并且 sFlt-1/PIGF 比率已经被提出作为可用于 PE 的诊断和管理的指标 (Stepan 等人, [use of angiogenic factors(sflt-1/plgf ratio)to confirm the diagnosis of preeclampsia in clinical routine:First experience]. *Zeitschrift fur Geburtshilfe und Neonatologie*. 2010 ;214:234-238 ;Verlohren 等人 ,An automated method for the determination of the sflt-1/pigf ra tio in the assessment of preeclampsia. *Am. J. Obst. And Gyn.* 2010 ;202:161e161-161e111)。然而,在常规临床实践中未广泛应用的灵敏性和特异性分子 PE 测试目前可用。

[0130] 鉴于这些考虑,存在强有力的理由并且需要发现 PE 的诊断和预后生物标志物。我们使用了一种全面的无偏见的多组学方法,其整合了来自微阵列多重荟萃分析的结果与通过二维 (2D) 凝胶分析进行的蛋白质组学鉴定。我们在荟萃分析中应用的参数方法 (Morgan 等人, Comparison of multiplex meta analysis techniques for understanding the acute rejection of solid organ transplants. *BMC bioinformatics* 2010 ;11 增刊 9:S6 ;Chen 等人, Differentially expressed RNA from public microarray data identifies serum protein biomarkers for cross-organ transplant rejection and other conditions. *PLoS computational biology* 2010 ;6) 使得我们可鉴定整个实验中的一致性和显著差异基因表达以开发用于下游实验验证的生物标志物。通常使用血清蛋白来诊断疾病,但灵敏性和特异性生物标志物难以发现,并且可能是由于其低血清学丰度,其可容易被高丰度蛋白质屏蔽。我们的血清蛋白标志物发现方法 (Ling 等人, Plasmaprofiles in active systemic juvenile idiopathic arthritis:Biomarkers and biological implications. *Proteomics* 2010) 组合了基于抗体的血清丰富蛋白消耗和 2D 凝胶比较概况分析来发现 PE 与对照血清之间的差异蛋白质凝胶点以用于后续蛋白质质谱鉴定。我们假设将存在允许 PE 诊断的差异血清学特征。为了验证发现研究结果,我们用可用的 ELISA 测定法 (一种更高通量方法) 测试所有候选物。为了构建和优化具有最少数目的蛋白质分析物的灵敏性和特异性生物标志物小组,使用遗传算法。对于来自比较转录组学和蛋白质组学的生物标志物及其相关途径的仔细研究产生关于其在 PE 病理生理学中的作用的新的假说。

[0131] 所呈现的结果验证了我们的假说,即可构建灵敏性和特异性血清学生物标志物小组来诊断 PE。据我们所知,这表示首次使用基于多组学的生物标志物方法来揭示在 PE 辨别中优于 sFlt-1、PIGF 和 sFlt-1/PIGF 比率的新颖 PE 生物标志物的研究。我们相信这些 PE 生物标志物的功能重要性及其相关途径将提供对疾病发病机制的新见解并且产生有效的新颖治疗剂。

[0132] 材料和方法

[0133] 研究设计。总体样本分配、PE 生物标志物发现、验证和预测小组构建步骤示于图 1 中。我们的研究以两个阶段进行：(1) 发现阶段，其包括计算机模拟 (in silico) 表达分析 ($n = 111$ PE 和 $n = 152$ 对照胎盘样本) 和蛋白质组学 2D 凝胶概况分析 (汇集 $n = 5$ PE 以及汇集 $n = 5$ 对照血清蛋白质组)；和 (2) 验证阶段，其由独立 PE ($n = 32$) 和对照 ($n = 32$) 组的分析组成。所有血清样本都购自 ProMedDX Inc. (Norton, MA 02766, <http://www.promeddx.com>)。在获得知情同意后采集所有血清样本，并且包括详细的病例报告表。这项研究排除以下患者：目前吸烟者、具有药物滥用史者、用于体外受精协助者、具有慢性高血压和妊娠并发的子宫内生长受限者。将病例组 (PE) 和对照组 (正常妊娠) 关于孕周龄、种族和奇偶校验进行匹配。

[0134] 比较 PE 和对照胎盘的表达的多重荟萃分析。如下文表 1 中所示，将七种 PE 胎盘表达研究 (Nishizawa 等人, Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placenta tissue derived from early and late onset severe preeclampsia. Placenta 2007;28:487-97; Sitras 等人, Differential placental gene expression in severe preeclampsia. Placenta 2009;30:424-33; Tsai 等人, Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signalling pathways. Placenta 2011;32:175-82; Winn 等人, Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. Endocrinology 2009;150:452-62; Founds 等人, Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. Placenta 2009;30:15-24; Nishizawa 等人, Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe preeclampsia and unexplained fetal growth restriction. Reproductive biology and endocrinology 2011;9:107) 组合并用我们先前所开发的方法进行多重荟萃分析 (Morgan 等人, Comparison of multiplex meta analysis techniques for understanding the acute rejection of solid organ transplants. BMC bioinformatics 2010;11Suppl 9:S6; Chen 等人, Differentially expressed RNA from public microarray data identifies serum protein biomarkers for cross-organ transplant rejection and other conditions. PLoS computational biology 2010;6)。对于所测试的 22,394 种基因中的每一种，计算所有研究中的荟萃倍数变化。如果它们是在 5 个以上研究中测量并且荟萃作用 p 值小于 4.5×10^{-5} ，则选择显著基因。然后通过血清、血浆或尿液中具有已知可检测丰度的一系列 3,638 种蛋白质过滤基因集 (Dudley 和 Butte. Disease signatures are robust across tissues and experiments. Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing 2009:27-38)。

[0135] 表 1. 用于基于多重荟萃分析的 PE 标志物发现的表达数据集。

[0136]

数据集	标题	组织	病例	对照物
Nishizawa 等人, Placenta 2007	Differentially Expressed Genes in Placental Tissue of Severe Preeclampsia	胎盘	10	4
Tsai 等人, Placenta 2011	Transcriptional Profiling of Human Placentas from Pregnancies Complicated by Preeclampsia	胎盘	23	37
Nishizawa 等人, 2011	Gene expression profiling for placentas from pre-eclamptic, unexplained FGR and normal pregnancies	胎盘	8	8
Winn 等人, Endocrinology 2009	Severe Preeclampsia-Related Changes in Gene Expression at the Maternal-Fetal Interface	胎盘	12	11
Sitras 等人, Placenta 2009	Placental gene expression in severe preeclampsia	胎盘	17	26
Founds 等人, Placenta 2009	Chorionic villus sampling (CVS) microarray in preeclampsia	CVS	4	8
Roten 等人, MolHumRep 2011	Transcription profiling of human decidua basalis to identify pre-eclampsia susceptibility genes	基蜕膜	37	58
		总计	111	152

[0137] 比较汇集的 PE 与对照患者血清样本的 2D 凝胶分析。为了使样本富集较低丰度血清蛋白,使用 Agilent 多亲和力去除系统 (Agilent, Santa Clara, CA) 使血清样本中不含前十四种血清丰富蛋白 (白蛋白、IgG、抗胰蛋白酶、IgA、转铁蛋白、结合珠蛋白、纤维蛋白原、 α 2- 巨球蛋白、 α 1- 酸性糖蛋白、IgM、载脂蛋白 A-I、载脂蛋白 A-II、补体 C-III 和转甲状腺素蛋白)。特别地,消耗能够使剩余蛋白质的负载增加 15 倍 (Ling 等人, Plasma profiles in active systemic juvenile idiopathic arthritis: Biomarkers and biological implications. Proteomics 2010)。如先前 (Ling 等人, 同上) 所述进行其它样本处理、2D 凝胶电泳、比较分析和通过质谱法进行的差异凝胶点蛋白质鉴定。

[0138] 验证 PE 标志物候选物的 ELISA 测定法。所有测定法都是 ELISA 测定法,并使用商业试剂盒遵循供应商的说明书进行。进行所有测定法以测量以下所选分析物的血清水平: α 2- 巨球蛋白 (A2M), Abnova Inc. (Taipei, Taiwan); 去整合素和含金属蛋白酶结构域的蛋白 12 (ADAM12), Mybiosource (SD, US); 亲脂素 (ADRP), Biotang Inc. (MA, US); 载脂蛋白 (APO) A-I, Abcam Inc. (MA, US); 载脂蛋白 (APO) C-III, Abnova Inc. (Taipei, Taiwan); 载脂蛋白 (APO) -E, Abcam Inc. (MA, US); 组织蛋白酶 B (CTSB), Abcam. (MA, US); 组织蛋白酶 C (CTSC), USCN Life Science (Wuhan, China); 趋化因子 (C-C 基序) 配体 2 (CCL2), Abnova (Taipei, Taiwan); 结合珠蛋白 (HP), Abcam Inc. (MA, US); 血红素结合蛋白 (HPX), Abcam Inc. (MA, US); PIGF, R&D system Inc. (MN, US); 血红素氧合酶 1 (HMOX1), Biotang Inc. (MA, US); 胰岛素样生长因子结合蛋白 7 (IGFBP7), USCN Life Science (Wuhan, China); 总铁, Abnova Inc. (Taipei, Taiwan); 血红蛋白 (HB), Bethyl laboratory (TX, US); 血红素氧合酶 1 (HMOX1), Biotang Inc. (MA, US); 角蛋白 33A (KRT33A), USCN Life Science (Wuhan, China); 角蛋白 40 (KRT40), USCN Life Science (Wuhan, China); 激肽原

1 (KNG1), Abcam Inc. (MA, US); 皮卡丘素 (EGFLAM), EIAab Science (Wuhan, China); 促血小板碱性蛋白 (PPBP), Abnova Inc. (Taipei, Taiwan); 视黄醇结合蛋白 4 (RBP4), Abcam Inc. (MA, US); 和可溶性 fms 样酪氨酸激酶 (sFlt-1, R&D system Inc. (MN, US))。

[0139] 统计分析。使用“流行病学计算器”(R epicalc 套装)分析患者人口统计数据。进行 Student t 检验以计算连续变量的 p 值,并且将 Fisher 精确检验用于分类变量的比较分析。将利用 R rmeta 套装的森林图绘制用于表示胎盘表达荟萃分析并以图形方式概述血清蛋白 ELISA 结果。病例 (PE) 和对照样本未配对;因此应谨慎解读初始血清蛋白森林图分析。使用 Bootstrapping 方法创建来自病例和对照组的“配对”样本以用于 ELISA 结果的后续森林图分析。因此,血清蛋白森林图分析提供每一分析物辨别 PE 和正常的妊娠对照受试者的能力的总体作用评估。使用 Studentt 检验(双尾)和 Mann-Whitney U 检验(双尾)、和局部 FDR(Efron 等人, Empirical bayes analysis of microarray experiment. J Am Stat Assoc 2001;96:1151-60)进行假设检验以校正多重假设检验问题。使用遗传算法(R genalg 套装)进行生物标志物特征选择和小组优化。通过 ROC 曲线分析评价每一生物标志物小组分析的预测性能(Zweig 等人, Receiver-operating characteristic(ROC)plots:a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clinical chemistry1993;39:561-77;Sing 等人, ROCR:visualizing classifier performance in R. Bioinformatics 2005;21:3940-1)。将生物标志物小组评分定义为母体循环中相应的上调蛋白质生物标志物与下调蛋白质生物标志物的几何平均值之间的比率。

[0140] 结果

[0141] 揭示 PE 标志物候选物的基于多组学的发现。如图 1 中所示,将先前胎盘表达研究组合用于多重荟萃分析以发现诊断来自正常对照物的 PE 的生物标志物候选物。这种努力鉴定 A2M、ADAM12、CCL2、CTSB、CTSC、EGFLAM、HOMX1、IGFBP7、KRT33A、KRT40、PIGF、PPBP 和 sFlt-1 作为 PE 的差别胎盘生物标志物。并行地进行 2D 凝胶分析以比较血清学 PE 与对照汇集蛋白质组,揭示稍后测序的高差异蛋白质点。2D 凝胶概况分析导致 A2M、ADFP、APO A-I、APO C-III、APO-E、KNG1、HP、HPX 和 RBP4 标志物候选物的鉴定。

[0142] 对于组合的 PE 生物标志物列表的仔细研究发现, A2M、HMOX-1 和 HPX 可参与血红素/血红蛋白分解代谢途径。细胞外血红素可造成不良的器官、组织和细胞损伤,并且对于与 HPX 和 HP 复合的细胞外血红素和血红蛋白(HB)的内吞作用,分别存在受体途径(Hvidberg 等人, Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. Blood 2005;106:2572-9)。血红素最终将卟啉环打破形成胆红素、一氧化碳和铁,而铁结合至铁蛋白(FT)。A2M 是急性期蛋白并且提出血红素是在炎症期间控制肝 A2M 表达的新型调控要素(Lyoumi 等人, Heme and acute inflammation role in vivo of heme in the hepatic expression of positive acute-phase reactants in rats. European journal of biochemistry/FEBS 1999;261:190-6)。对于任何已知蛋白的血红素具有最高亲和力的 HPX 充当清除剂以从循环中除去游离血红素,因为游离血红素由于其催化活性而可造成氧化应激(Delanghe 等人, Hemopexin:a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. Clinica chimica acta;international journal of clinical chemistry2001;312:13-23;Tolosano 等人, Heme scavenging and the other

facets of hemopexin. Antioxidants & redox signaling 2010 ;12:305-20)。发现血浆 HPX 是 PE 患者中对血管紧张素 II 的血管反应性的潜在调节剂 (Bakker 等人, Hemopexin as a Potential Regulator of Vascular Responsiveness to Angiotensin II. Reprod Sci 2012)。纤维蛋白原 (FGA) 在最近被提出作为血红素相关的一氧化碳感应分子 (Nielsen 等人, Fibrinogen is a heme-associated, carbon monoxide sensing molecule: a preliminary report. Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis 2011 ;22:443-7)。先兆子痫涉及一种急性期反应以及系统性氧化应激。在 PE 中发现无细胞血红蛋白、氧化标志物和抗氧化血红素清除剂的水平增加 (Olsson 等人, Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger alpha(1)-microglobulin in preeclampsia. Free radical biology & medicine 2010 ;48:284-91)。已显示 HMOX-1 的诱导可下调缺氧诱导的活性氧物质和 sFlt-1 (Olsson 等人, 同上), 以及实验上胎盘缺血的许多病理学因素 (George 等人, Induction of heme oxygenase 1 attenuates placental ischemia-induced hypertension. Hypertension 2011 ;57:941-8)。这表明, PE 胎盘缺血和所产生的功能失调的血红素 / 血红蛋白分解代谢是 PE 病理生理学的一部分。

[0143] 样本特征。用于血清学蛋白质生物标志物验证的 PE 和对照受试者可分成早期妊娠组 (PE, n = 15 ; 对照物, n = 16) 和晚期妊娠组 (PE, n = 17 ; 对照物, n = 16)。如下文表 2 和表 3 中所概述, 观察到年龄 (p 值, 早期 0.89、晚期 0.857、总体 0.6)、登记时的孕龄 (p 值, 早期 0.851、晚期 0.895、总体 0.824)、种族 (p 值, 早期 0.57、晚期 0.123、总体 0.289) 或受试者的并行医学病状和其它临床特征 (p 值, 总体 0.35) 无显著差异。

[0144] PE 患者被诊断患有特征为高血压和蛋白尿的先兆子痫。如表 4 中所示, 32 名 PE 患者全部具有高血压和蛋白尿 ; 其中 43.8% 具有头痛 ; 其中 21.9% 具有水肿 ; 以及其中 25.0% 具有其它额外症状。其它特征, 包括身体质量指数 (BMI, 在妊娠前)、血压 (BP)、蛋白质 / 肌酐比 (PCR) 和妊娠史, 也示于表 5 中。

[0145] 表 2. 种族、年龄和孕周龄。

[0146]

特征	早期			晚期			总体
	对照物 n = 15 (48.4%)	PE n = 16 (51.6%)	p 值	对照物 n = 17 (51.5%)	PE n = 16 (48.5%)	p 值	p 值
种族			0.57			0.123	0.289
非洲裔美国人	5 (33.3%)	5 (31.2%)		2 (11.8%)	4 (25%)		
亚洲人	2 (13.3%)	0 (0)		0 (0%)	0 (0)		
西班牙人	8 (53.3%)	10 (62.5%)		11 (64.7%)	12 (75%)		

[0147]

其他	0 (0%)	1 (6.2%)		4 (23.5%)	0 (0%)		
年龄(岁)							
平均值 (SD)	24.3 (4.5)	24.1 (6.1)	0.89	27.9 (9.0)	26.6 (7.7)	0.857	0.6
孕周							
平均值 (SD)	30.3 (3.2)	30.1 (2.9)	0.851	37.1 (1.4)	37.2 (1.6)	0.895	0.824

[0148] 表 3. 并行医学病状和临床特征

[0149]

特征	对照物 n = 32 (50%)	PE n = 32 (50%)	p 值
并行医学病状/临床特征			0.35
贫血	0 (0)	2 (6.2%)	
哮喘、其它：衣原体(2009)	1 (3.1%)	0 (0)	
哮喘、其它：B 群链球菌载体、孕产妇缺铁性贫血、血小板减少	1 (3.1%)	0 (0)	
克罗恩氏病	0 (0)	1 (3.1%)	
II 型糖尿病	2 (6.2%)	1 (3.1%)	
II 型糖尿病、病态肥胖症、其它：抑郁症病史	1 (3.1%)	0 (0)	
II 型糖尿病、其它：左乳房肿块	1 (3.1%)	0 (0)	
糖尿病(妊娠期)	1 (3.1%)	3 (9.4%)	
糖尿病(妊娠期)、肥胖症	1 (3.1%)	0 (0)	
脂肪肝	1 (3.1%)	0 (0)	
甲状腺功能亢进	1 (3.1%)	0 (0)	
偏头痛、泌尿道感染(UTI)	1 (3.1%)	0 (0)	
无	19 (59.4%)	24 (75%)	
其它：临界妊娠期糖尿病	1 (3.1%)	0 (0)	
其它：丙肝抗体=反应性	0 (0)	1 (3.1%)	
其它：出生时心脏手术史、边缘索插入	1 (3.1%)	0 (0)	

[0150] 表 4. PE 患者所呈现的征象和症状

[0151]

所呈现的征象和症状	数目 (百分比)
高血压	32 (100%)
蛋白尿	32 (100%)
头痛	14 (43.8%)
水肿	7 (21.9%)
其它	8 (25.0%)

[0152] 表 5. PE 患者的临床信息

[0153]

特征	统计学
BMI (在妊娠前) (kg/m ²)	29. 1 (23. 0, 33. 9)
收缩压	146. 0 (134. 0, 157. 5)
舒张压	85. 5 (77. 0, 94. 5)
蛋白质 / 肌酐比 (PCR) 检测结果 (mg/g)	803. 5 (449. 5, 1492. 0)
先兆子痫的先前病史	
是	3 (9. 4%)
否	28 (87. 5%)
多胎妊娠	
是	3 (9. 4%)
否	29 (90. 6%)
流产次数 (诱导或自发)	0 (0, 1)
足月妊娠次数	0 (0, 1. 25)
未足月妊娠次数	0 (0, 0)
抽烟史	
从不	32 (100%)
妊娠总数	2 (1, 4)
这次妊娠利用体外受精 (IVF)	
无	32 (100%)

[0154] 使用 PE 和对照孕产妇血清样本进行生物标志物验证。为了鉴定 PE 血清学蛋白质小组是否能够开发直接的实际临床工具, 基于可用的 ELISA 测定法, 使用 PE (n = 32) 和孕龄匹配的对照样本 (n = 32) 用可用的血清测定法验证来自表达荟萃分析和 2D 凝胶概况分析的生物标志物候选物。用图 5-21 中的线 - 框图 (whisker box) 和散点图进行详细说明, 通过 ELISA 测定法 (Mann-Whitney 检验 p 值 < 0. 05) 验证总共 11 种蛋白质。PE 和对照样本中孕产妇血清丰度的每一验证生物标志物的中位值、平均值和标准偏差概述于表 6 中。

[0155] 表 6. 验证 PE 生物标志物的孕产妇血清水平。
[0156]

分析物	PE 趋势	单位	早期						晚期		
			正常			PE			正常		
			中位值 (IRQ)	平均值 (SD)	中位值 (IRQ)	平均值(SD)	中位值 (IRQ)	平均值(SD)	中位值 (IRQ)	平均值 (SD)	中位值 (IRQ)
PIGF	↓	pg/ml	413.775 (224.915, 685.23)	529.3831 (432.0385)	97.517 (51.5845, 190.7)	115.5138 (82.96284)	222.279 (163.592, 289.860)	238.1095 (111.4536)	184.488 (113.236, 223.832)	202.6929 (132.7476)	
sFlt-1	↑	pg/ml	1697.860 (1128.18, 4273.93)	3034.023 (2576.736)	19841.33 (15728.35, 21608.61)	18646.25 (3582.492)	5610.460 (4191.8, 6735.835)	5531.241 (1811.915)	14216.20 (12347.56, 19749.3)	14414.28 (5575.346)	
HPX	↑	µg/ml	1071.2 (692.4, 1301.0)	984.05 (388.333)	1382.8 (1173.6, 1787.0)	1580.72 (546.4721)	954.4 (538.0, 1131.6)	894.15 (331.4866)	1482.0 (1013.6, 1654.4)	1347.624 (585.2598)	
FT	↑	ng/ml	60.1820 (45.2425, 77.196)	70.83125 (42.72209)	92.604 (61.286, 131.1405)	118.9008 (100.8934)	73.296 (60.568, 82.6475)	76.26706 (29.61479)	78.743 (59.956, 126.565)	101.1071 (77.08354)	
ADAM12	↑	pg/ml	511.312 (437.654, 642.321)	584.0489 (275.761)	774.993 (637.229, 1150.178)	920.1977 (416.3522)	666.4185 (594.874, 791.842)	703.6862 (217.2496)	883.889 (626.676, 1367.639)	1345.369 (1472.54)	
ApoCIII	↑	ng/ml	341.347 (249.478, 422.359)	364.7076 (153.4417)	419.171 (357.329, 575.544)	486.2566 (187.4748)	291.58 (240.72, 345.74)	321.8587 (126.7332)	453.789 (308.93, 725.843)	585.7512 (413.1066)	
HP	↓	µg/ml	1624.092 (1215.95,	1718.014 (764.1215)	1181.584 (684.6,	1482.707 (1284.595)	1806.74 (1190.09,	1750.72 (684.0882)	985.616 (592.04,	1510.514 (1514.988)	

[0157]

				2274.07)		1794.1)		2163.1)		1880.785)	
A2M	↓	↓	μg/ml	5796.424 (3501.2, 7737.565)	5729.148 (3064.134)	3365.067 (2648.269, 5958.964)	4259.341 (2175.836)	8141.38 (5300.6, 10234.086)	7754.764 (3265.09)	3435.427 (2343.675, 6752.9)	4340.768 (2882.513)
ApoE	↓	↓	μg/ml	290.6 (104.2, 519.0)	364.425 (301.4971)	138.8 (63.0, 210.4)	215.8933 (257.5736)	398.0 (125.0, 478.4)	377.9 (236.3411)	147.2 (60.4, 190.0)	150.0235 (107.6536)
ApoA1	↓	↓	ng/ml	7980.084 (5775.72, 11076.6)	8337.892 (3158.728)	4945.356 (3892.8, 5824.573)	4708.506 (1707.14)	6253.298 (5624.062, 7881.77)	6748.614 (2287.602)	4724.142 (3138.58, 7075.28)	5483.643 (3794.902)
RBP4	↑	↓	ng/ml	38255.0 (29018.5, 40955.5)	35180.38 (7031.125)	38899.0 (33460.5, 39895.0)	36931.67 (7307.52)	41616.5 (38830.5, 44429.5)	49253.5 (38081.63)	33179 (29558, 37386)	33897.47 (8499.767)
皮卡丘素	↓	↓	ng/ml	601.751 (563.772, 792.09)	659.1049 (152.046)	293.261 (267.39, 367.83)	327.7657 (117.4519)	536.551 (459.173, 626.57)	536.551 (952.295)	317.657 (266.816, 409.67)	317.657 (623.497)
HB	↓	↓	ng/ml	10348.769 (8865.08, 11407.7)	10047.15 (2067.523)	9477.79 (8039.066, 10572.16)	9290.402 (2319.195)	10739.081 (8743, 11415.2)	10427.59 (1828.554)	9396.6 (7735.557, 11153.9)	9556.862 (2697.67)
FGA	↓	↓	μg/ml	287.9755 (263.725, 318.32)	294.3416 (38.95516)	262.177 (244.575, 284.35)	262.0381 (27.15886)	292.8455 (282.528, 322.95)	300.2975 (33.7449)	257.37 (236.425, 287.503)	261.2202 (35.3109)
CTSB	↓	↑	ng/ml	123.26 (81.67, 169.64)	142.581 (91.086)	96.44 (76.94, 145.35)	109.19 (40.752)	109.21 (87.32, 121.48)	108.371 (36.376)	152.20 (104.88, 190.06)	165.385 (75.224)
CTSC	↓	↑	ng/ml	12.891 (11.372,13. 874)	13.966 (4.1775)	12.519 (9.9765,16. 6975)	14.6674 (6.0903)	13.649 (12.107, 17.017)	15.335 (5.0667)	18.179 (12.781,22. 402)	20.029 (9.484)

[0158]

血红素	↓	↓	ng/ml	36.35769 (28.18, 65.419)	47.69588 (28.23451)	29.1868 (18.619, 53.09)	38.9996 (27.22612)	51.58 (30.57, 65.29)	59.19132 (42.67749)	31.7 (20.38, 44.79)	47.28054 (60.14049)
-----	---	---	-------	--------------------------------	------------------------	-------------------------------	-----------------------	----------------------------	------------------------	---------------------------	------------------------

[0159] 森林图（图 2）概述了在整个胎盘表达荟萃分析以及早期和晚期妊娠孕产妇血清分析中的所有 11 种验证 PE 标志物的 PE/ 对照物比率。从蛋白质组学和表达荟萃分析得到

的生物标志物一致共有 PE 与对照样本之间的上调或下调的相同趋势。

[0160] PE 生物标志物小组构建。使用来自 ELISA 测定法的数据,我们构建了具有测定法的各种子集的不同小组。我们试图鉴定最佳特征数的生物标志物小组,从而平衡对于小的
小组规模、分类准确性、种类分离良好性(PE 对对照物)和足够的灵敏性和特异性的需
要。为了开发用于 PE 诊断的基于多重抗体的测定法,我们使用遗传算法方法针对早期和
晚期孕龄 PE 来构建来自 9 种验证的 PE 蛋白质生物标志物的生物标志物小组,从而在评估
PE 时与 sFlt-1/PIGF 比率进行比较。所述算法指导小组构建过程,从而产生早期和晚期
孕龄生物标志物小组,其具有 PE 与对照受试者之间的完全分离(下文表 7,以及图 22-28
中)。这些所选的生物标志物小组是非冗余的,指示非包容性关系。先前通过多中心试验
验证(Verlohren 等人,An automated method for the determination of the sFlt-1/
PIGF ratio in the assessment of preeclampsia.American journal of obstetrics
and gynecology 2010 ;202:161e1-61e11) 进行的 sFlt-1/PIGF 比率的 PE 评估效用(小
组 0 :早期发作,接受者操作特征曲线 ROC 曲线下面积 1.00,p 值 4.35×10^{-4} ;晚期发作,ROC
AUC0.86, p 值 2.94×10^{-4} ;图 35) 在这项研究中得到证实并且被用作我们新得到的生物标
志物小组的基准。表 7 的小组 2(早期发作,ROC AUC1.00, p 值 1.43×10^{-4}) 具有三种蛋白
质,HPX、APO A-I 和皮卡丘素。小组 5(晚期发作,ROC AUC 1.00, p 值 3.65×10^{-5}) 具有六
种蛋白质,HPX、HP、APO C-III、APO A-I、RBP4 和皮卡丘素。

[0161] 表 7. 整合验证的 PE 生物标志物的孕产妇血清水平的生物标志物小组。小组 0 为
基准小组 sFlt-1/PIGF 比率。用 * 标记的生物标志物在 PE 中上调。(+) ,包括于小组中;
(-) ,不包括。

[0162]

	PE发作: 早期				PE发作: 晚期		
小组	0	1	2	3	0	4	5

[0163]

sFlt-1*	+	-	-	-	+	-	-
PIGF	+	-	-	-	+	-	-
HPX	-	-	+	+	-	+	+
FT	-	-	-	-	-	-	-
ADAM12*	-	-	-	+	-	+	-
HP	-	-	-	-	-	+	+
A2M	-	-	-	-	-	-	-
APO-E	-	-	-	-	-	-	-
APO-CIII*	-	-	-	-	-	+	+
APO-AI	-	+	+	-	-	+	+
RBP4	-	-	-	-	-	-	+
HB	-	-	-	+	-	+	-
FGA	-	+	-	-	-	-	-
CTSC*	-	-	-	-	-	-	-
CTSB*	-	-	-	-	-	-	-
皮卡丘素*	-	+	+	+	-	+	+
小组规模	2	3	3	4	2	7	6
ROC AUC	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	1.00	1.00
p值	4.35E-04	3.18E-04	1.43E-04	4.17E-04	2.94E-04	1.69E-04	3.65E-04

[0164] 为了证实生物标志物小组作为根据疾病发作的 PE 疾病活性的分类器的功效,将生物标志物小组评分绘制为孕龄时间的函数(细节示于图 3 中,复合概述于图 4 中)。根据散点图分析,我们的早期发作 PE 生物标志物小组的性能与 sFlt-1/PIGF 比率类似。对于孕龄 >34 周的样本,生物标志物小组的性能优于在大约第 36 周具有若干诊断误差的 sFlt-1/PIGF 比率。在早期和晚期孕周龄生物标志物小组中,HPX、APO A-I 和皮卡丘素存在于两种小组中,表明其在 PE 的诊断和或许病理生理学中的关键作用。

[0165] PE 生物标志物的途径分析。我们使用 Ingenuity 途径分析软件(IPA7.6 版, Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA) 分析了以复合物形式在 PE 中显著差异表达的验证的生物标志物。除了在我们的多组学发现努力期间揭示的血红素 / 血红蛋白降解途径,我们的途径分析导致鉴定了下列统计学显著性规范途径,其可在 PE 病理生理学中起到重要作用:肝 X 受体 (LXR) / 类视黄醇 X 受体 (RXR) 活化, p 值 5.13×10^{-9} ; 动脉粥样硬化信号传导, p 值 5.01×10^{-7} ; 巨噬细胞中的 IL-12 信号传导和产生, p 值 8.51×10^{-7} ; 急性期反应信号传导, p 值 1.91×10^{-6} ; 巨噬细胞中一氧化氮和活性氧物质的产生, p 值 2.82×10^{-6} ; 网格蛋白介导的内吞作用信号传导, p 值 2.88×10^{-6} ; 法尼醇 X 受体 (FXR) / RXR 活化, p 值 2.04×10^{-5} ; 肝纤维化 / 肝星状细胞活化, p 值 2.88×10^{-3} ; 磷脂酰乙醇胺生物合成 II, p 值 1.05×10^{-2} ; 凝血系统, p 值 2.04×10^{-2} ; 生长激素信号传导, p 值 4.27×10^{-2} ; 神经元中的 reelin 信号传导, p 值 4.57×10^{-2} ; 以及 VEGF 家族配体 - 受体相互作用, p 值 4.79×10^{-2} 。

[0166] 讨论

[0167] 我们已经应用多组学方法来开发验证的 PE 生物标志物,整合了来自胎盘 mRNA 表达荟萃分析和消耗血清学蛋白质组 2D 凝胶比较概况分析的发现。用商业上可用的 ELISA 测定法比较 PE 与对照血清,我们已经验证了 11 种蛋白质标志物,包括 sFlt-1 和 PIGF,并且发现我们鉴定的 PE 生物标志物在预测 PE 时优于 sFlt-1/PIGF 比率。组合胎盘组织中的转录组学方法与血清中的蛋白质组学方法的概念是新颖的。它组合了在更接近于病理生理学

病灶的组织中进行研究的优点与在更适于临床使用的血清中进行研究的优点。使已经从发现阶段发现 / 预测的蛋白质进入基于 ELISA 的验证阶段使得这项研究的结果可翻译到临床实践中。

[0168] 当比较来自表达荟萃分析和 2D 凝胶血清蛋白质组学的发现时,仅 A2M 出现在两种分析中。这可能是由于下列原因:(1)如先前所表征的蛋白质和 mRNA 的不一致表达(Griffin 等人,Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*.MCP 2002;1:323-33;Ideker 等人,Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network.Science 2001;292:929-34;Baliga 等人,Coordinate regulation of energy transduction modules in *Halobacterium* sp.analyzed by a global systems approach.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99:14913-8;Chen 等人,Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas.Molecular&cellular proteomics:MCP 2002;1:304-13);(2)缺乏将胎盘表达翻译成循环蛋白质水平丰度;(3)2D 凝胶技术检测限为 0.5-5ng。优化的 2D 凝胶技术具有约 5 个数量级的动态范围的蛋白质浓度(Gibson 等人,Comparative analysis of synovial fluid and plasma proteomes in juvenile arthritis—proteomic patterns of joint inflammation in early stage disease.J Proteomics 2009;72:656-76),而血清学蛋白质浓度在约 10 个数量级内改变,其中最高浓度达到 mg/ml (Anderson, N. The human plasma proteome:history,character,and diagnostic prospects.Mol Cell Proteomics 2002;1:845-67)。即使在消耗步骤,通过 2D 凝胶进行的蛋白质检测也仅限于血清学浓度 >10ug/mL 的蛋白质,这明确影响了我们检测的蛋白质生物标志物的组成。另外,潜在的信息性低分子量蛋白质可结合至白蛋白并且因此在消耗步骤除去(Tirumalai 等人,Characterization of the low molecular weight human serum proteome.Mol Cell Proteomics 2003;2:1096-103),其可为潜在缺点。因此,应用基于 2D 凝胶血清蛋白质组学的方法,将不会发现具有 pg/mL 浓度的候选物,例如 sFlt-1 和 PlGF。因此,应用基于 2D 凝胶血清蛋白质组学的方法,将不会发现具有 pg/mL 浓度的候选物,例如 sFlt-1 和 PlGF。关于疾病组织公开可用的全基因组基因表达数据可有效地挖掘以提供显著的协同作用以补充我们的 2D 血清蛋白质组学努力来揭开具有低血清丰度 (pg/mL) 的差异 PE 生物标志物候选物。值得注意的是,我们的生产性 PE 发现努力支持以下观点:在鉴定宽泛动态范围(从 pg/mL 变为 ug/mL)的血清学蛋白质表达的候选物时,用于生物标志物分析的多组学方法是全面、互补和有效的。

[0169] 根据初始表达荟萃分析和 2D 凝胶发现的生物标志物候选物,我们假设 PE 胎盘缺血和所产生的功能失调的血红素 / 血红蛋白分解代谢是 PE 病理生理学的一部分。七种假设产生的候选物中五种 (FGA、FT、HB、血红素和 HP) 分离 PE 和对照血清的验证,结合其它验证的生物标志物 (HP、HPX 和 HB),为血红素 / 血红蛋白分解代谢途径在 PE 病理生理学中的作用提供令人信服的证据。仔细研究血红素 / 血红蛋白分解代谢途径可能不仅支持胎盘缺血为 PE 发展中的关键因素,而且可导致用于 PE 治疗剂的新颖目标的鉴定(Cudmore 等人,Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1.Circulation 2007;115:1789-97)。

[0170] 对于蛋白质标志物的其它途径分析证实有越来越多的证据暗示脂质稳态、IL-12 和凝血规范途径在 PE 病理生理学中的作用。LXR/RXR 活化途径被鉴定为最显著的途径。这支持最近的研究结果 (Weedon-Fekjaer 等人, Expression of liver X receptors in pregnancies complicated by preeclampsia. Placenta 2010 ;31:818-24), 即 PE 与高脂血症相关以及脂质稳态调节剂在 PE 病理生理学中是重要的。IL-12 (Bachmayer 等人, Aberrant uterine natural killer(NK)-cell expression and altered placental and serum levels of the NK-cell promoting cytokine interleukin-12 in pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol 2006 ;56:292-301; Daniel 等人, Plasma interleukin-12 is elevated in patients with preeclampsia. Am J Reprod Immunol 1998 ;39:376-80; Sakai 等, The ratio of interleukin(IL)-18 to IL-12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients. Journal of reproductive immunology 2004 ;61:133-43) 在具有较小胎盘活性和较大血清丰度的 PE 患者中的先前证据反映为符合我们的 PE 生物标志物小组模式途径分析。

[0171] 利用自动化测定法并显示 sFlt-1 和 PIGF 对于 PE 评估的效用的先前多中心病例-对照研究 (Verlooven 等人, An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. American journal of obstetrics and gynecology 2010 ;202:161e1-61e11) 报道了 sFlt-1 (PE :12,981 $\pm$ 965, 对照物 :2641 $\pm$ 100.5pg/mL) 和 PIGF (PE :76.06 $\pm$ 10.71, 对照物 :341.5 $\pm$ 13.57pg/mL) 的血清丰度。尽管具有更大的变化,但可能是由于不同的样本组或测定平台,改变趋势反映在我们的结果中, sFlt-1 (PE :16,398.02 $\pm$ 5142.32, 对照物 :4,282.63 $\pm$ 2,532.90pg/mL) 和 PIGF (PE :161.83 $\pm$ 118.98, 对照物 :383.75 $\pm$ 343.84pg/mL) 符合它们的报告。如图 5-21 中所示以及表 8 (下文) 中所概述,与分别在正常和 PE 组中的早期和晚期孕龄样本之间蛋白质丰度显著不同 (p 值 <0.05) 的 sFlt-1 和 PIGF 相反,除 RBP4、ADAM12 和皮卡丘素之外,我们的生物标志物 (表 8) 在早期和晚期妊娠血清之间无显著 (p 值 >0.05) 差异。此处结果指示, sFlt-1 和 PIGF 在作为妊娠期函数的胎盘发育期间得到调节,并且 PE 与对照物之间的差别表达可能是由于在 PE 期间的胎盘适应。在 PE 或对照物血清中,在这项研究中发现的 PE 生物标志物在早期和晚期妊娠之间无显著差异。因此,它们在 PE 中的差异表达可能直接测量 PE 和疾病发展的发病机制或反映在发病的相当早期阶段存在的特征,例如蛋白尿和高血压,其未必与其病理生理学有关。

[0172] 表 8. 生物标志物在早期和晚期孕龄时间点的丰度的比较。* 倍数是由早期和晚期孕龄样本的所测定生物标志物丰度的中位值比率来计算的。**p 值 :Mann-Whitney U 检验

[0173]

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

[0174] 我们的基于遗传算法的生物标志物小组构建产生用于 PE 评估的最终早期和晚期孕龄生物标志物小组。与 PE 评估中的基准 sFlt-1/PIGF 比率相比,我们的生物标志物小组显然在后期孕周时表现更优异。尽管用于 PE 诊断的 sFlt-1 和 PIGF 不平衡已经得到证实,但有越来越多的证据支持以下观念:正常的 sFlt-1 和 PIGF 表达实际上表征健康的妊娠 (Daponte 等人, Soluble fms-like tyrosine kinase-1(sflt-1)and serum placental growth factor(plgf)as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2011;96:E1444-1451)。因此, sFlt-1 和 PIGF 可能真的是失败妊娠(例如宫外孕、自然流产)的一般标志物,而非特定针对 PE。我们的多组学方法发现多种生物标志物的小组,其反映 PE 病理生理学的多方面问题,并且具有提供 PE 患者的明确诊断、鉴定处于风险中的患者以及用于监测疾病进程的可能性。

[0175] 实施例 2

[0176] 在先兆子痫患者的血清中测定实施例 1 和 2 中所述的其它先兆子痫标志物小组的蛋白质水平以测定这些其它小组诊断早期发作先兆子痫(例如在妊娠第 34-35 周之前的先兆子痫发作)或晚期发作先兆子痫(即在妊娠第 34-35 周时或稍后的先兆子痫发作)的准确性。特别感兴趣的小组如下(参见图 29):

[0177] • 小组 1 :sFlt1、PIGF

[0178] • 小组 2- 早期 :sFlt1、PIGF、HPX

[0179] • 小组 2- 晚期 :sFlt1、PIGF、HPX、CTSC、ADAM12、ApoE、ApoA1、RBP4、HB、皮卡丘素

[0180] • 小组 3 :sFlt1

[0181] • 小组 4- 早期 :sFlt1、HPX

[0182] • 小组 4- 晚期 :sFlt1、HPX、ApoE、ApoA1、皮卡丘素

[0183] • 小组 5 :PIGF

[0184] • 小组 6- 早期 :PIGF、皮卡丘素

[0185] • 小组 6- 晚期 :PIGF、HPX、CTSC、Adam12、HP、ApoE、RBP4、HB、纤维蛋白原、皮卡丘素

[0186] • 小组 7- 早期 :HPX、ApoA1、皮卡丘素

[0187] • 小组 7- 晚期 :HPX、CTSC、Adam12、HP、HB、纤维蛋白原、皮卡丘素。

[0188] 小组 1、3 和 5 包含形成用于诊断先兆子痫的目前标准的标志物。小组 2- 早期和小组 2- 晚期包含小组 1 和本文公开的其它先兆子痫标志物。小组 4- 早期和小组 4- 晚期包含小组 3 和本文公开的其它先兆子痫标志物。小组 6- 早期和小组 6- 晚期包含小组 5 和本文公开的其它先兆子痫标志物。小组 7- 早期和小组 7- 晚期不包含本文公开的其它先兆子痫标志物。

[0189] 如图 30-35 中所示,包括本文公开的先兆子痫标志物的所有小组 (“Stanford 生物标志物”、小组 2、4 和 7) 比在指定时间诊断先兆子痫的目前标准更准确地进行 (即早期 :在妊娠第 34-35 周之前的先兆子痫发作 ;晚期 :在妊娠第 34-35 周时或稍后的先兆子痫发作)。实际上,包括本文公开的先兆子痫标志物的许多小组 (小组 2 早期、小组 2 晚期、小组 4 早期、小组 4 晚期、小组 6 早期、小组 7 早期和小组 7 晚期) 在其指定时间诊断先兆子痫时提供 100% 准确性 ($AUC = 1$)。

[0190] 实施例 3

[0191] 统计学评估先兆子痫标志物小组 (皮卡丘素、血红素结合蛋白、ApoA1、ApoC3、RBP4、结合珠蛋白) 的蛋白质水平以基于这个小组测定如何衡量每一多肽对于样本的先兆子痫评分的贡献。

[0192] 使用随机森林算法,结合珠蛋白水平被测定为最不显著 ;RBP4 水平被测定为结合珠蛋白的显著性的大约 2 倍 ;血红素结合蛋白、ApoA1 和 ApoC3 水平被测定为结合珠蛋白的显著性的大约 6 倍以及 RBP4 的显著性的大约 3 倍 ;并且皮卡丘素水平被测定为最显著,即结合珠蛋白的显著性的大约 15 倍, RBP4 的显著性的大约 7.5 倍,以及血红素结合蛋白、ApoA1 和 ApoC3 的显著性的大约 2.5 倍 (参见下文表 9)。

[0193] 表 9.

[0194]

蛋白质	重要性
皮卡丘素	14.81
血红素结合蛋白	6.15
ApoA1	5.97
ApoC3	5.89

RBP4	2.07
结合珠蛋白	0.89

[0195] 因此,为了使用皮卡丘素 / 血红素结合蛋白 / ApoA1/ApoC3/RBP4/ 结合珠蛋白小组得出先兆子痫评分,可赋予皮卡丘素水平约 12-16、例如约 15 的权重 ;可赋予血红素结合蛋白、ApoA1 和 ApoC3 水平约 4-8、例如约 6 的权重 ;可赋予 RBP4 水平约 2 的权重 ;以及可赋予结合珠蛋白水平 1 以下的权重。

[0196] 前述仅说明本发明的原理。应理解,本领域技术人员将能够设计出各种配置,尽管在本文未明确描述或显示,但体现出本发明的原理并包括在其精神和范围内。此外,本文叙述的所有实施例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和由本发明人促进增进技术的概念,并且应理解为不限于这些特定叙述的实施例和条件。此外,本文叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实施例的所有陈述意欲涵盖其结构性和功能性等效物。另外,这些等效物意欲包括目前已知的等效物和未来开发的等效物,即,不考虑结构而执行相同功能而开发的任何要素。因此,本发明的范围不欲限于本文所示和描述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求书体现。

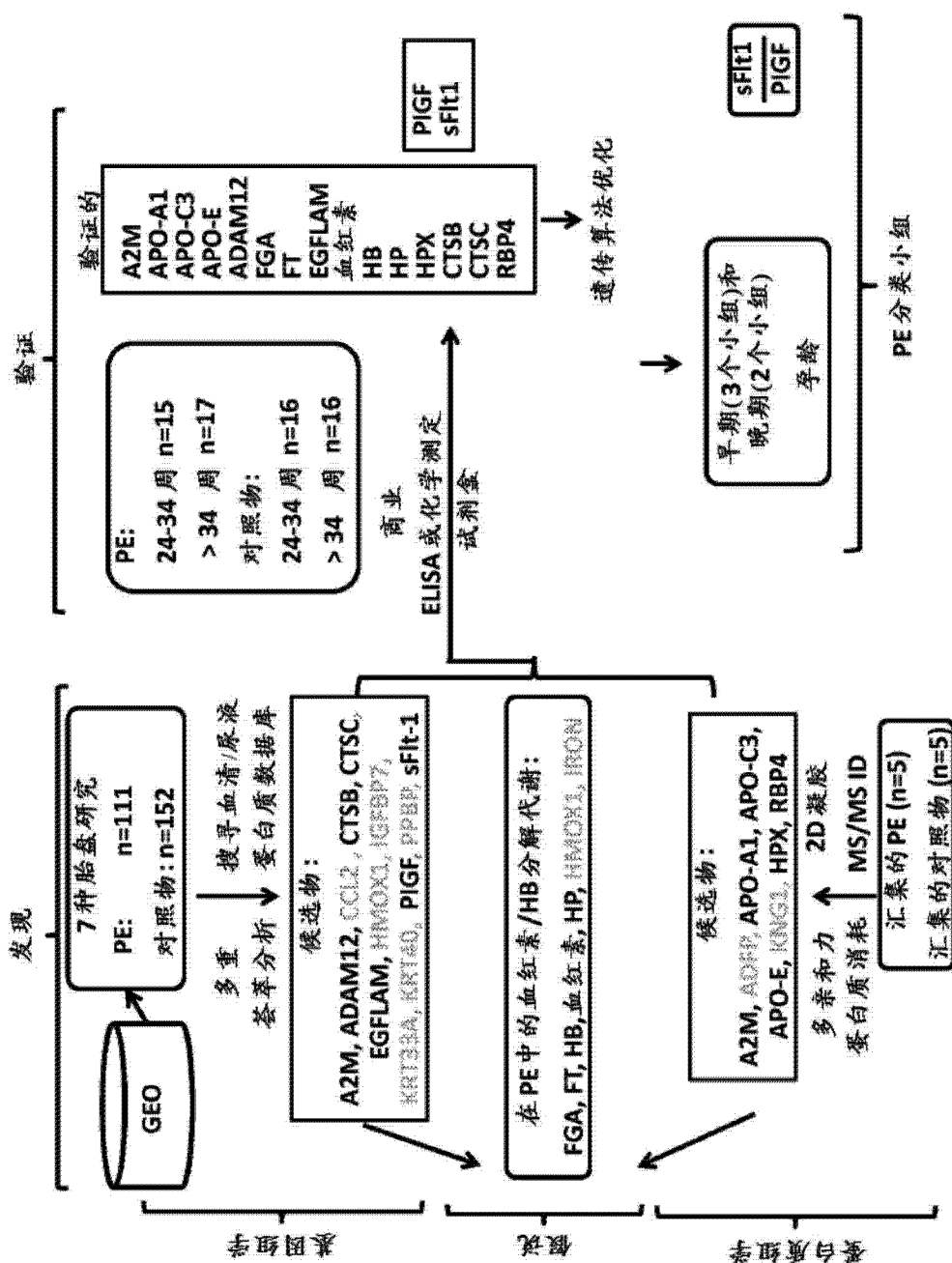


图 1

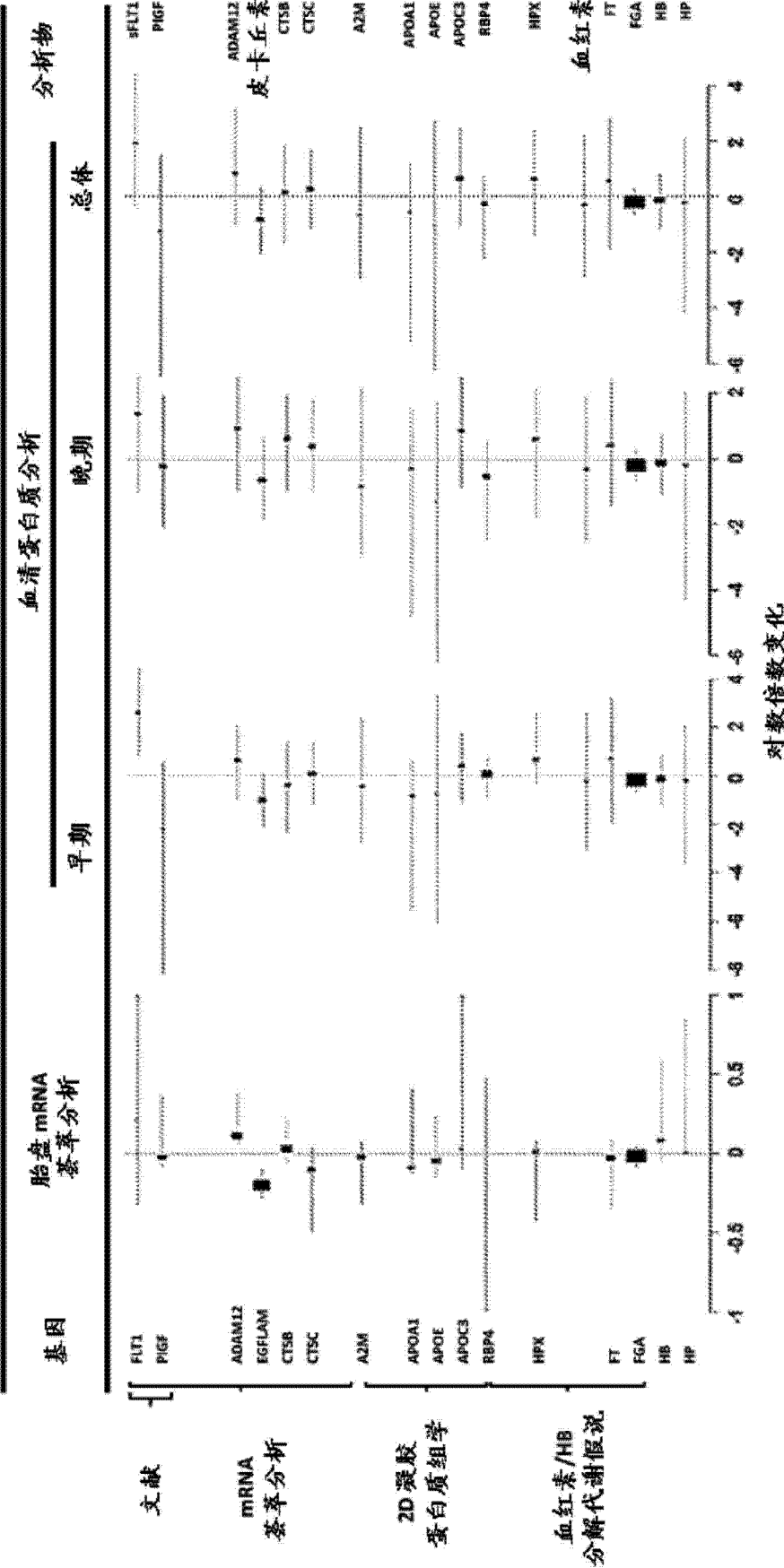


图 2

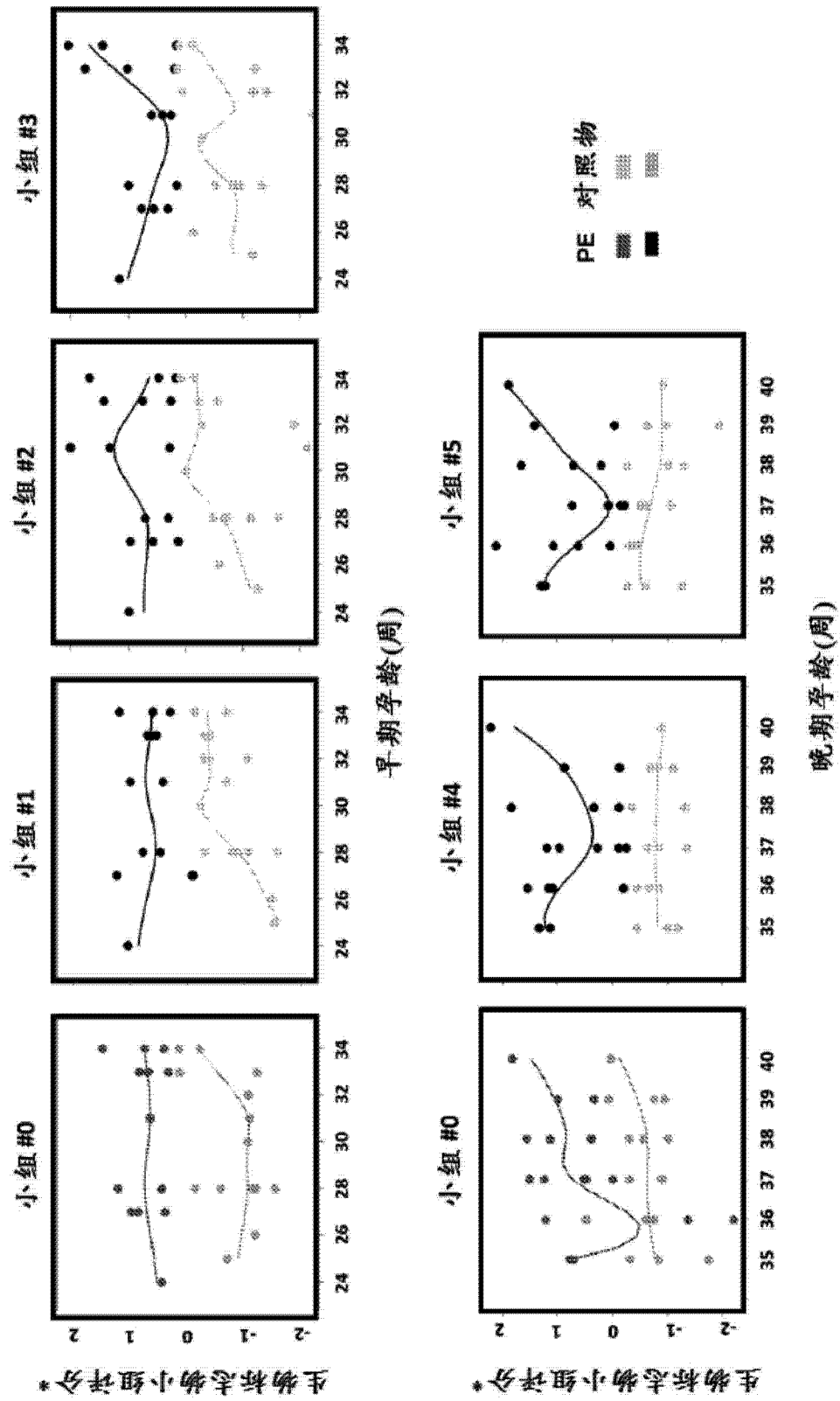


图 3

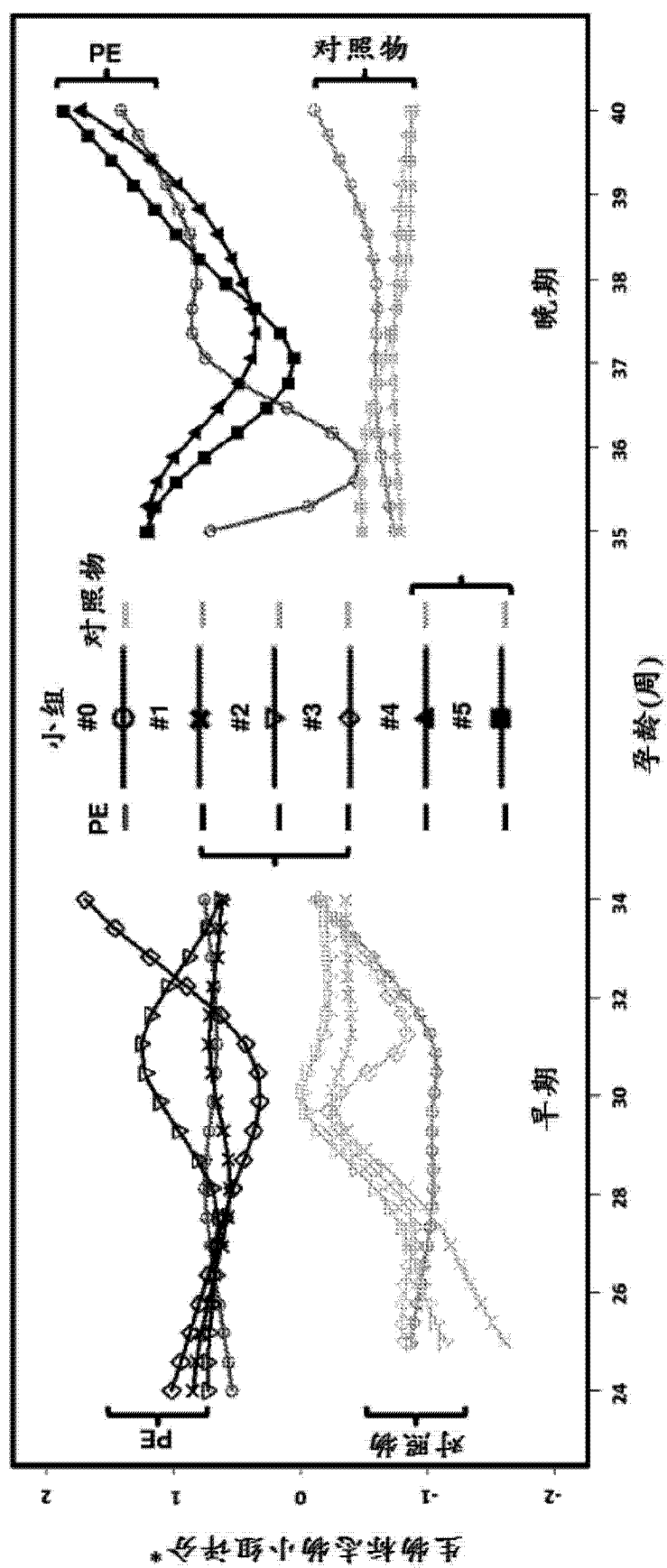


图 4

sFit-1 验证

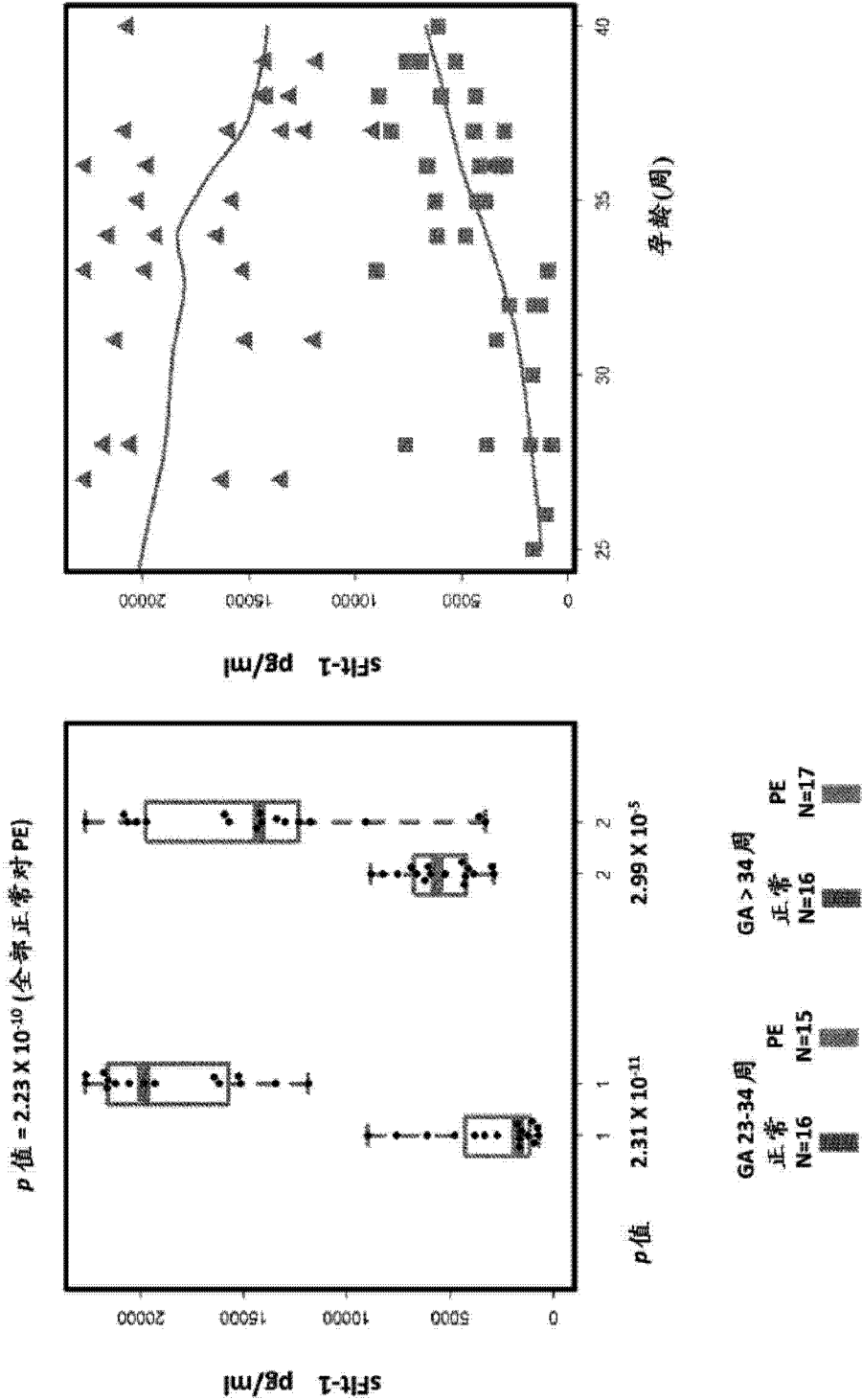


图 5

PIGF 验证

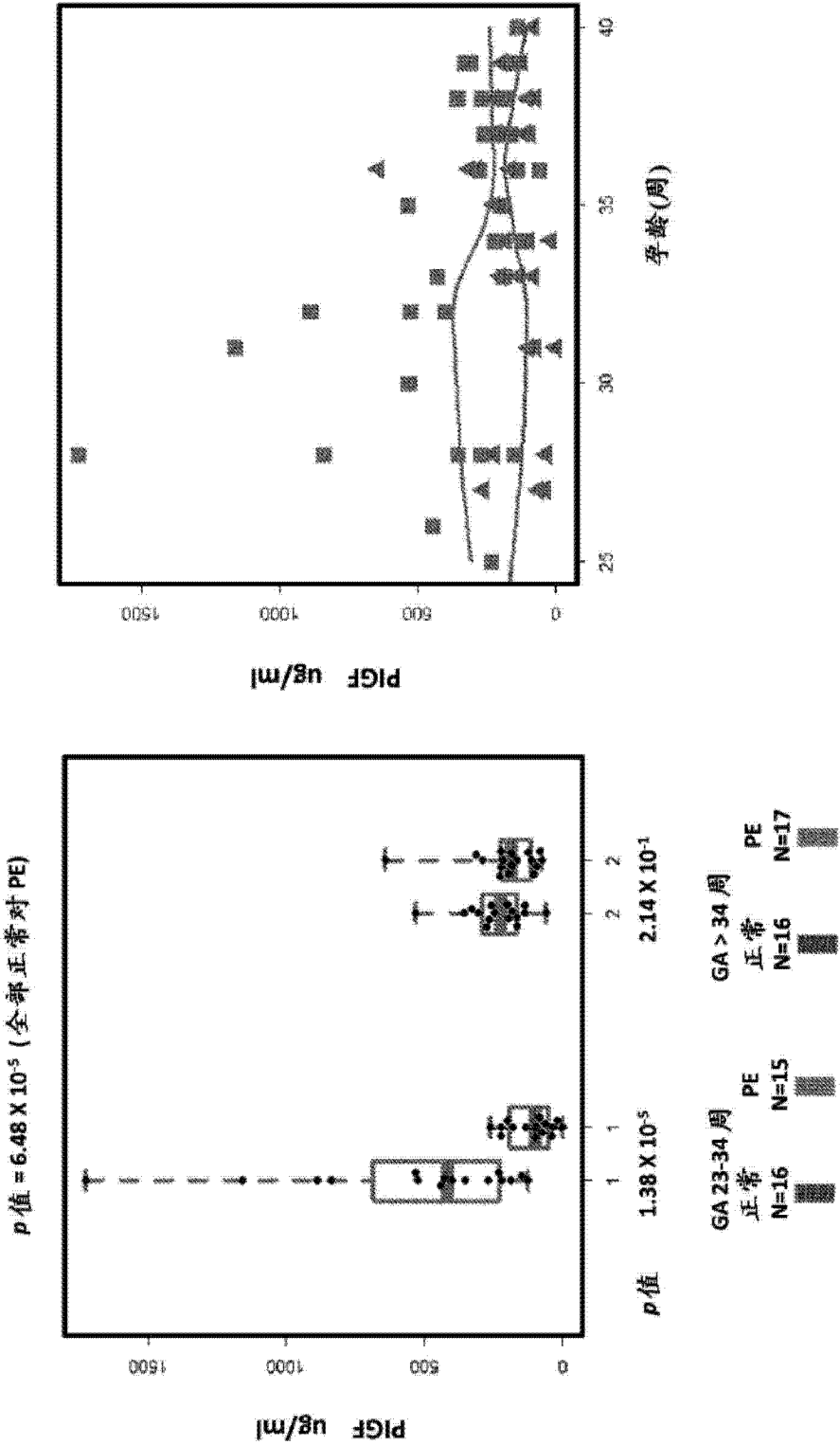


图 6

HPX 验证

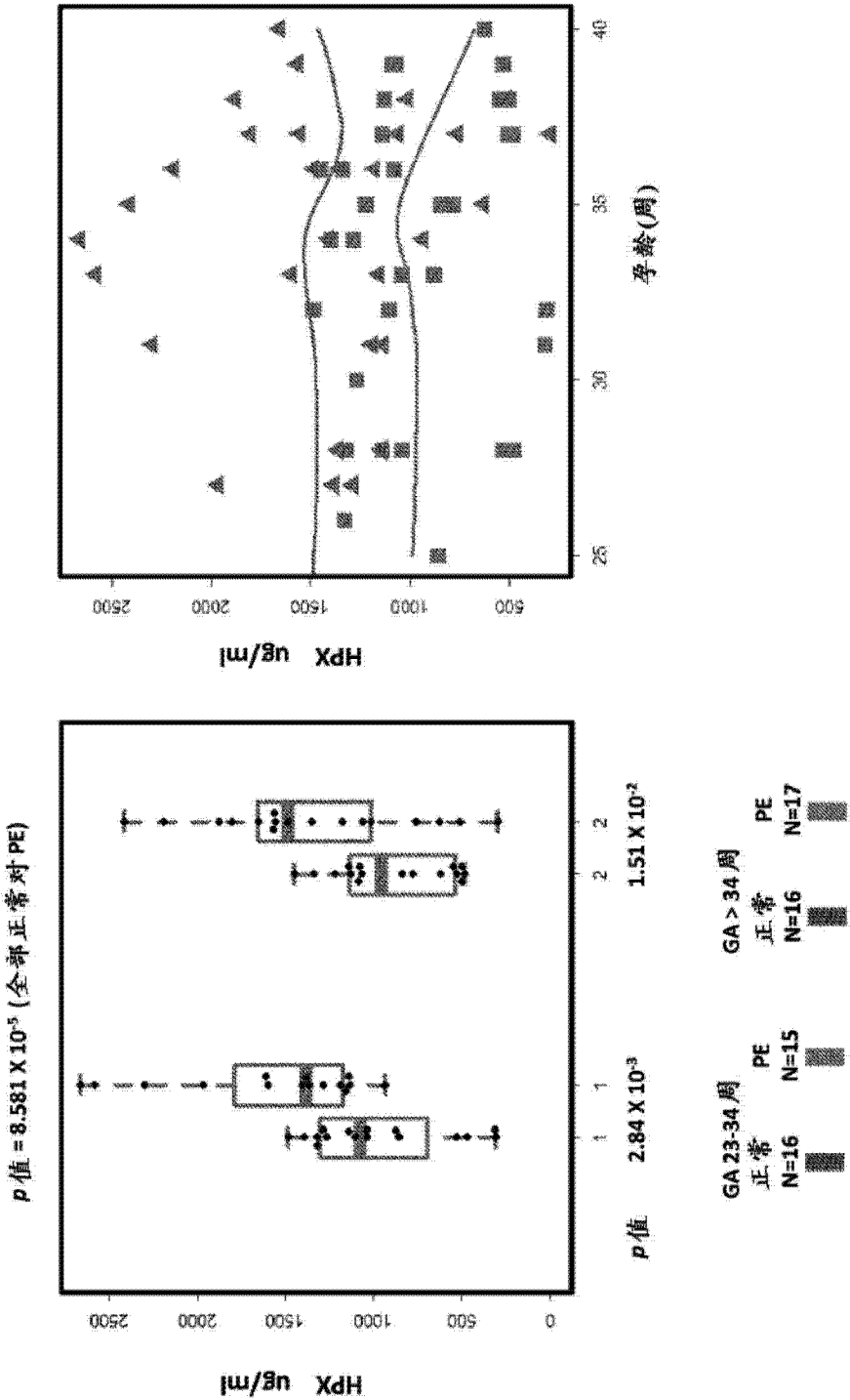


图 7

FT 验证

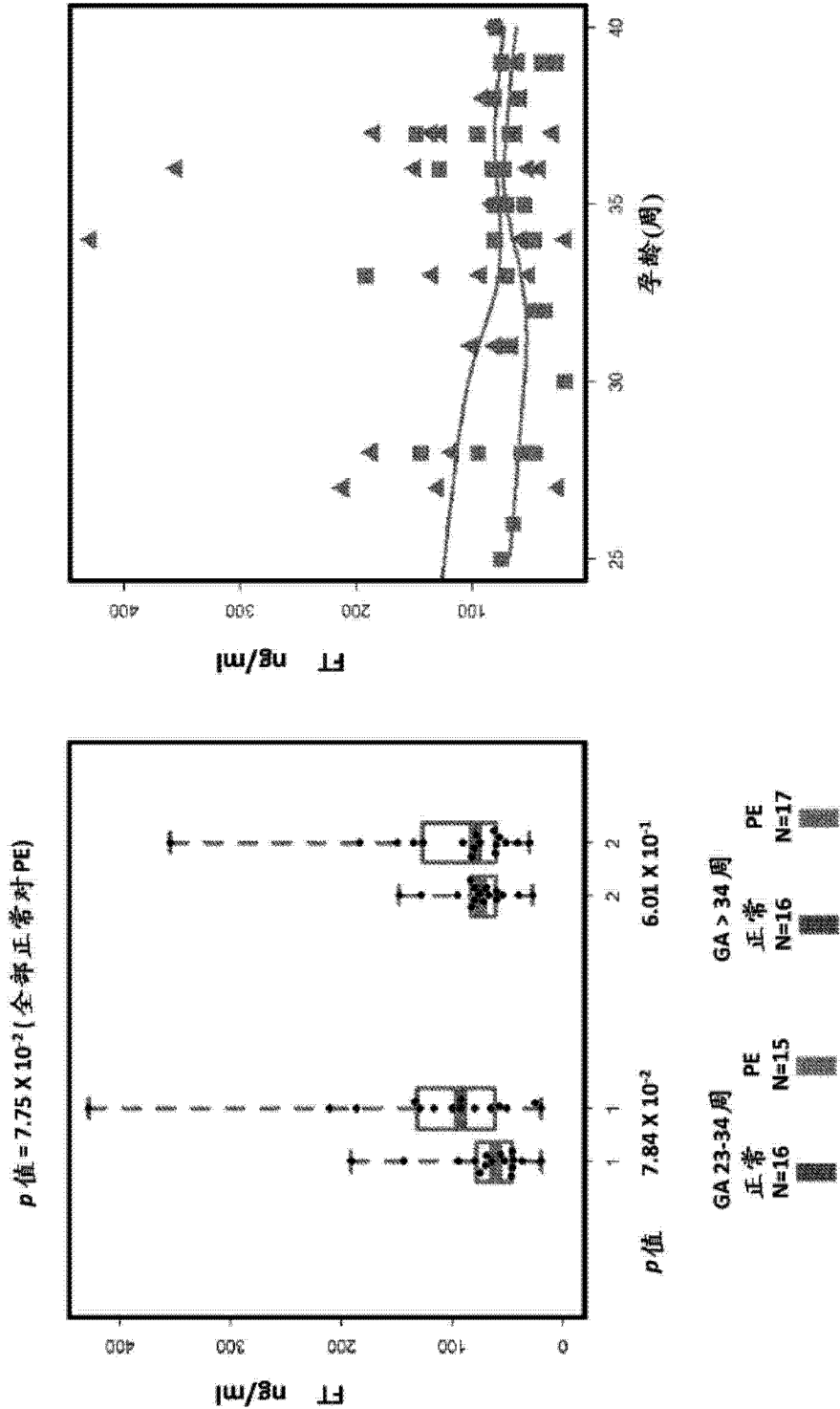


图 8

ADAM12 验证

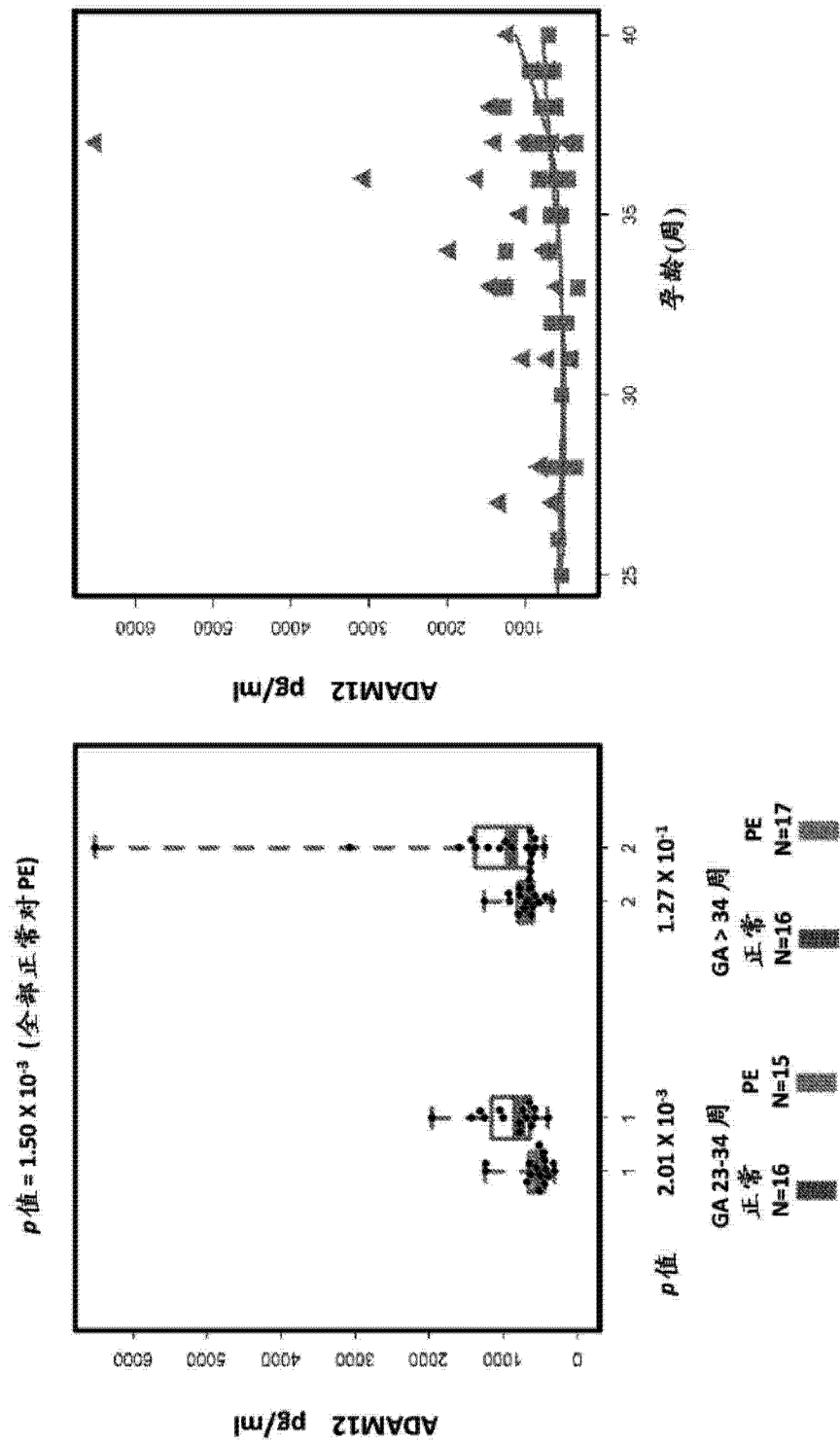


图 6

HP 验证

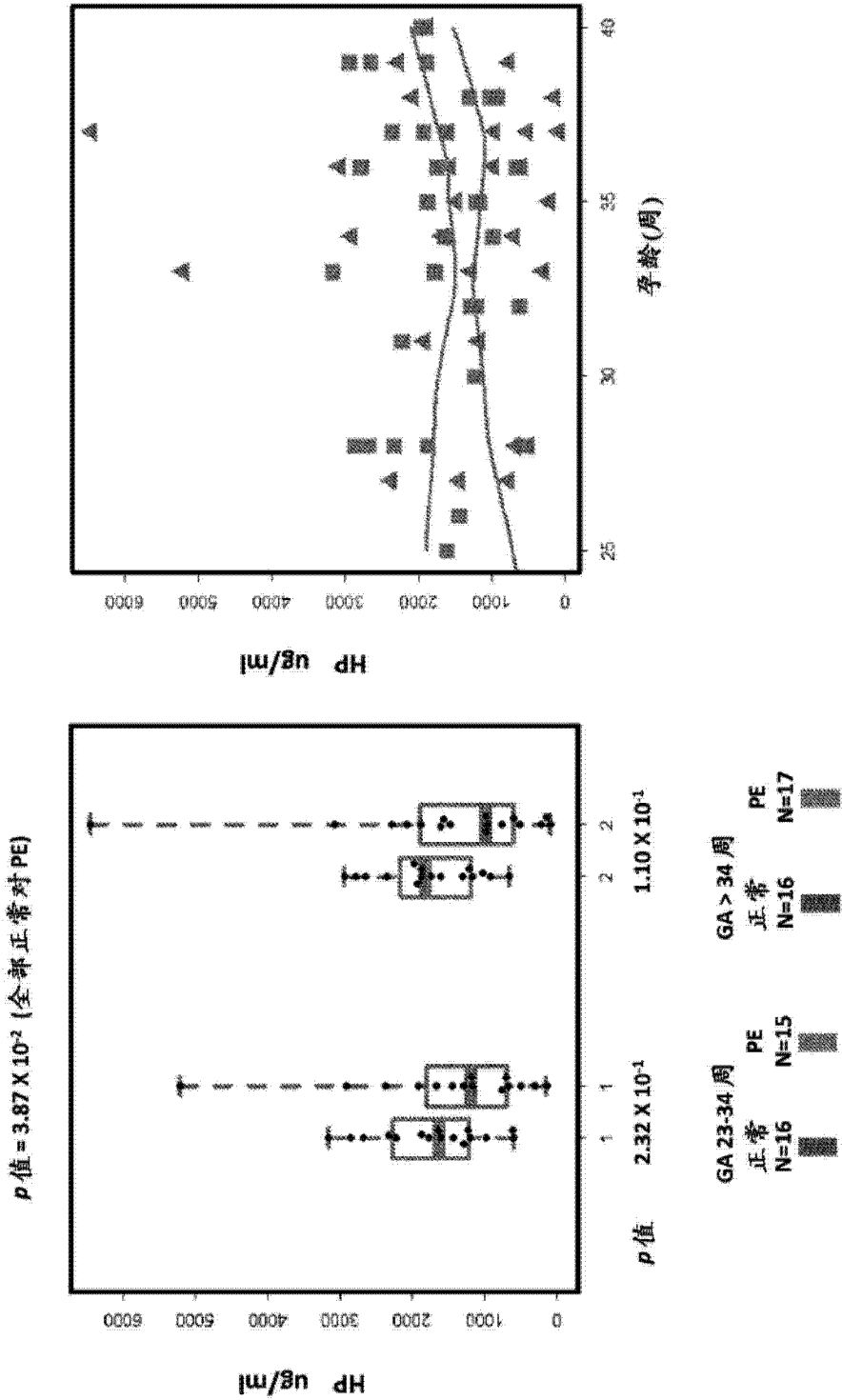


图 10

A2M 验证

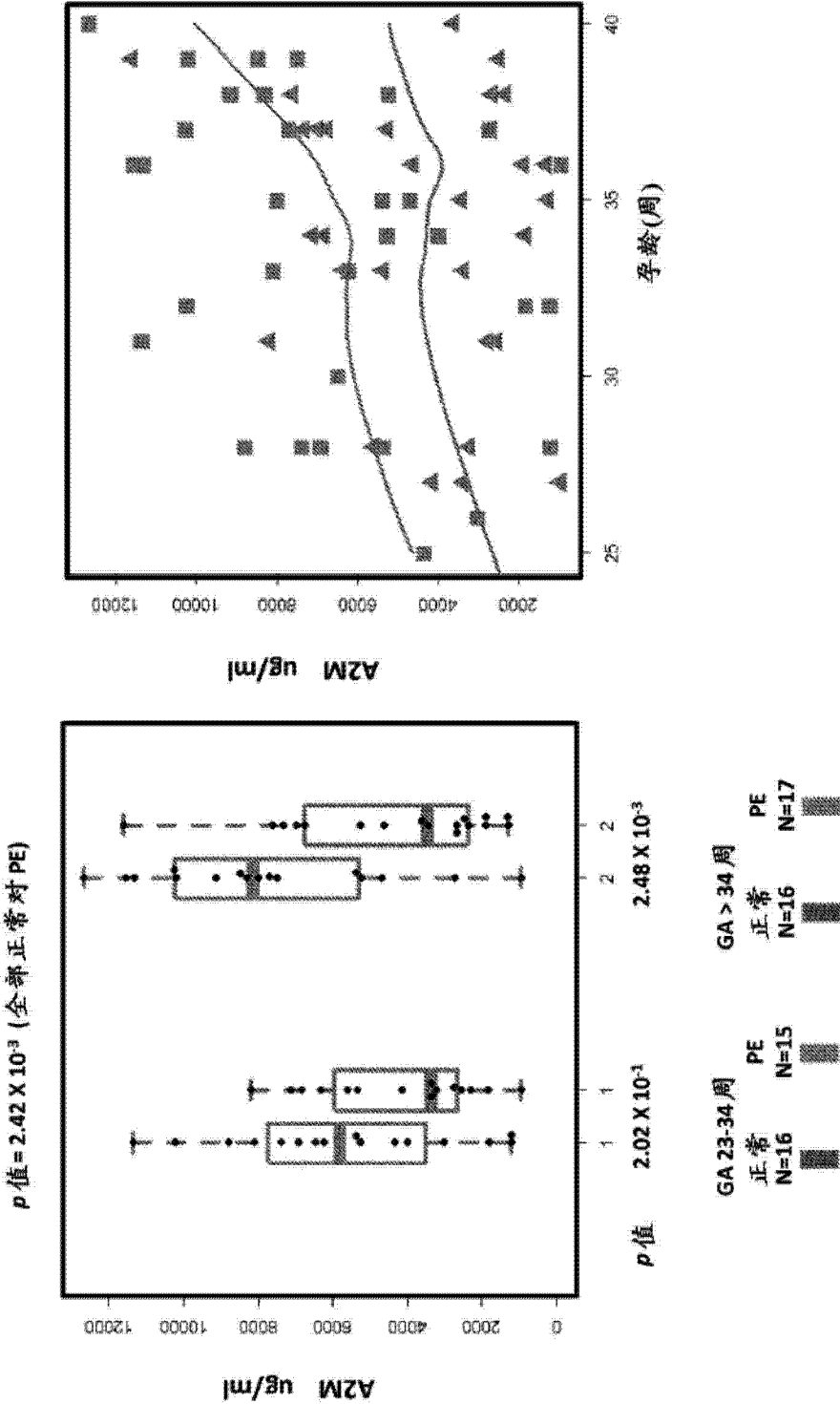


图 11

APO-E 验证

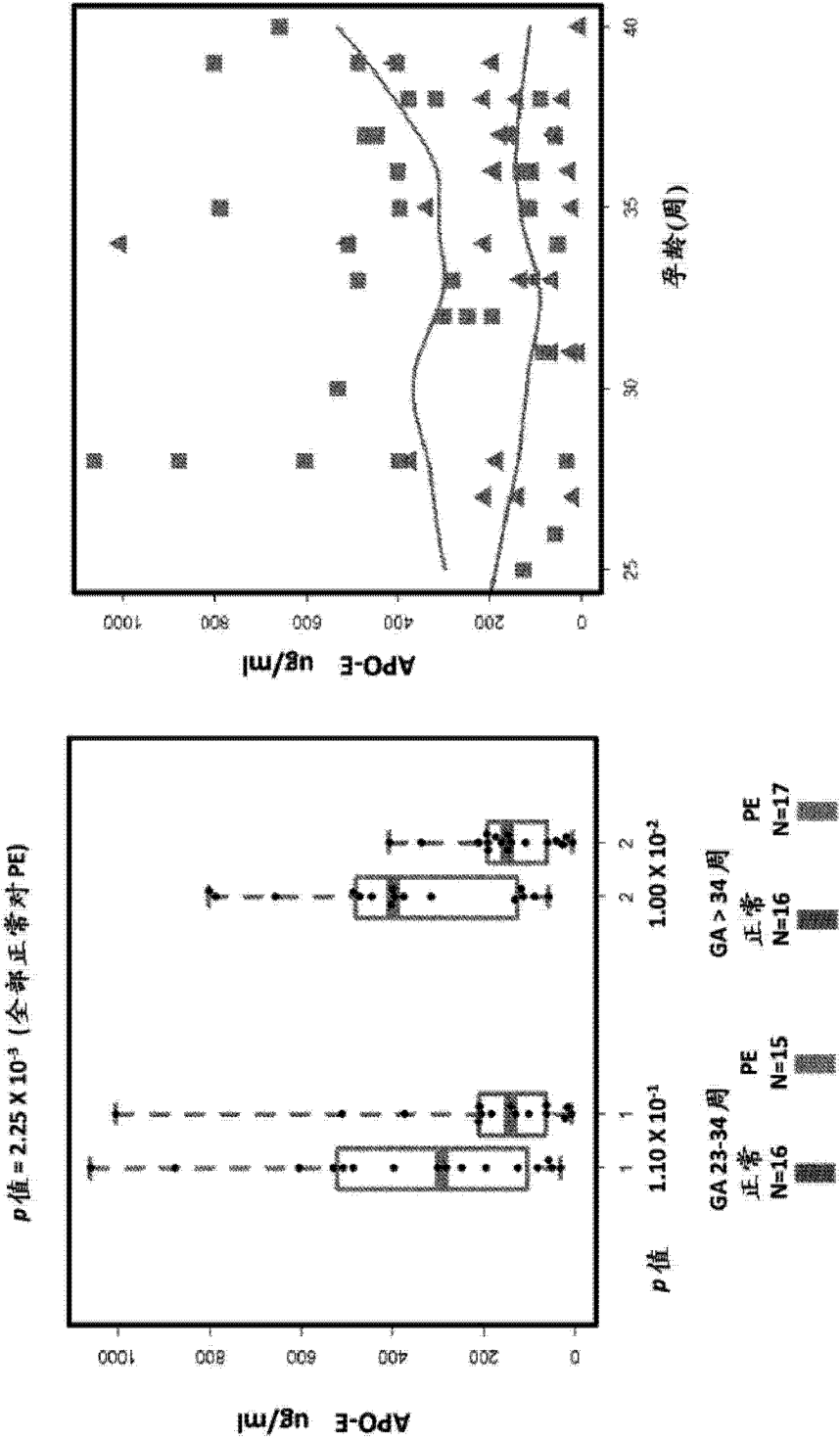


图 12

APO-CIII 验证

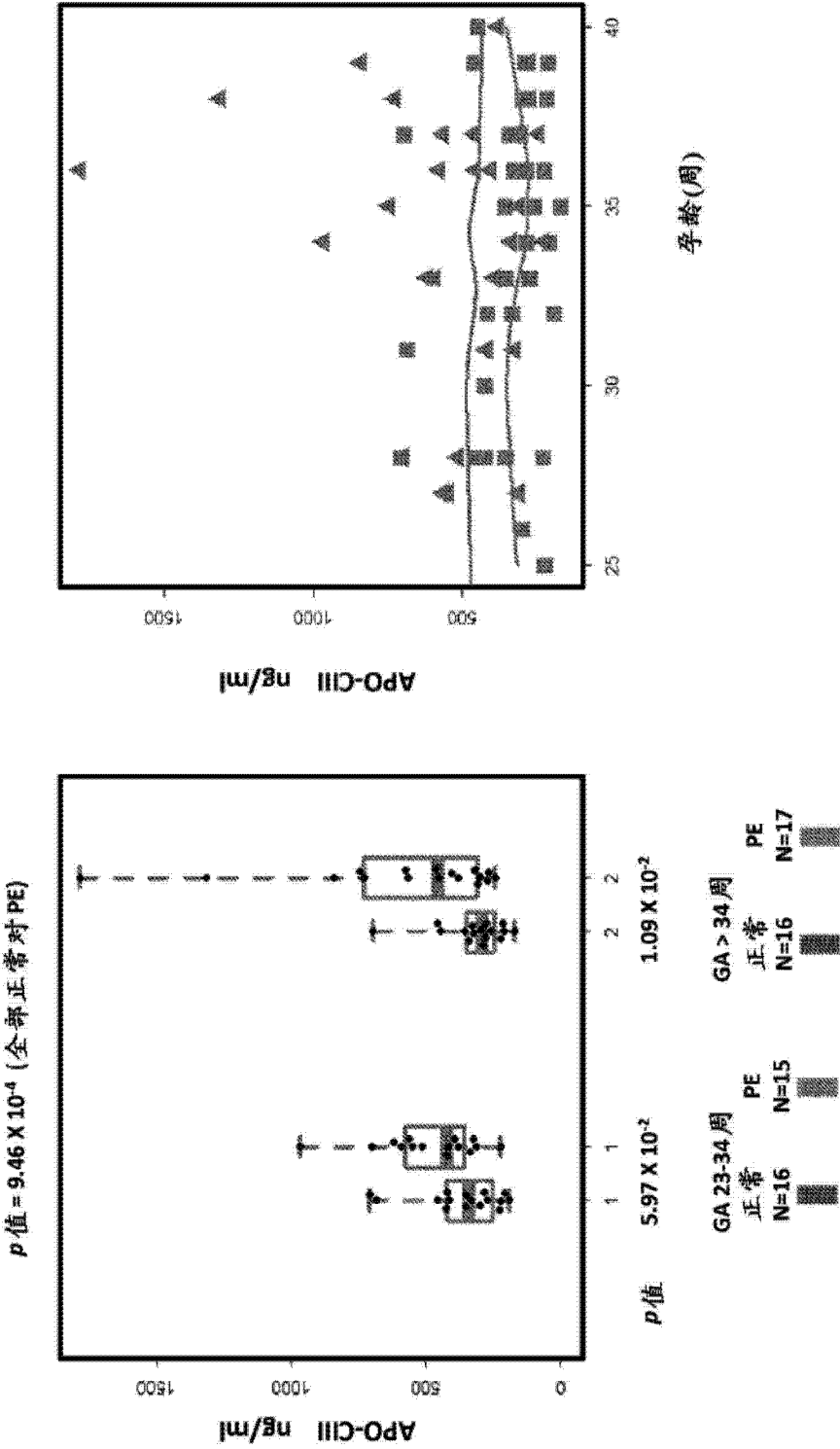


图 13

APO-AI 验证

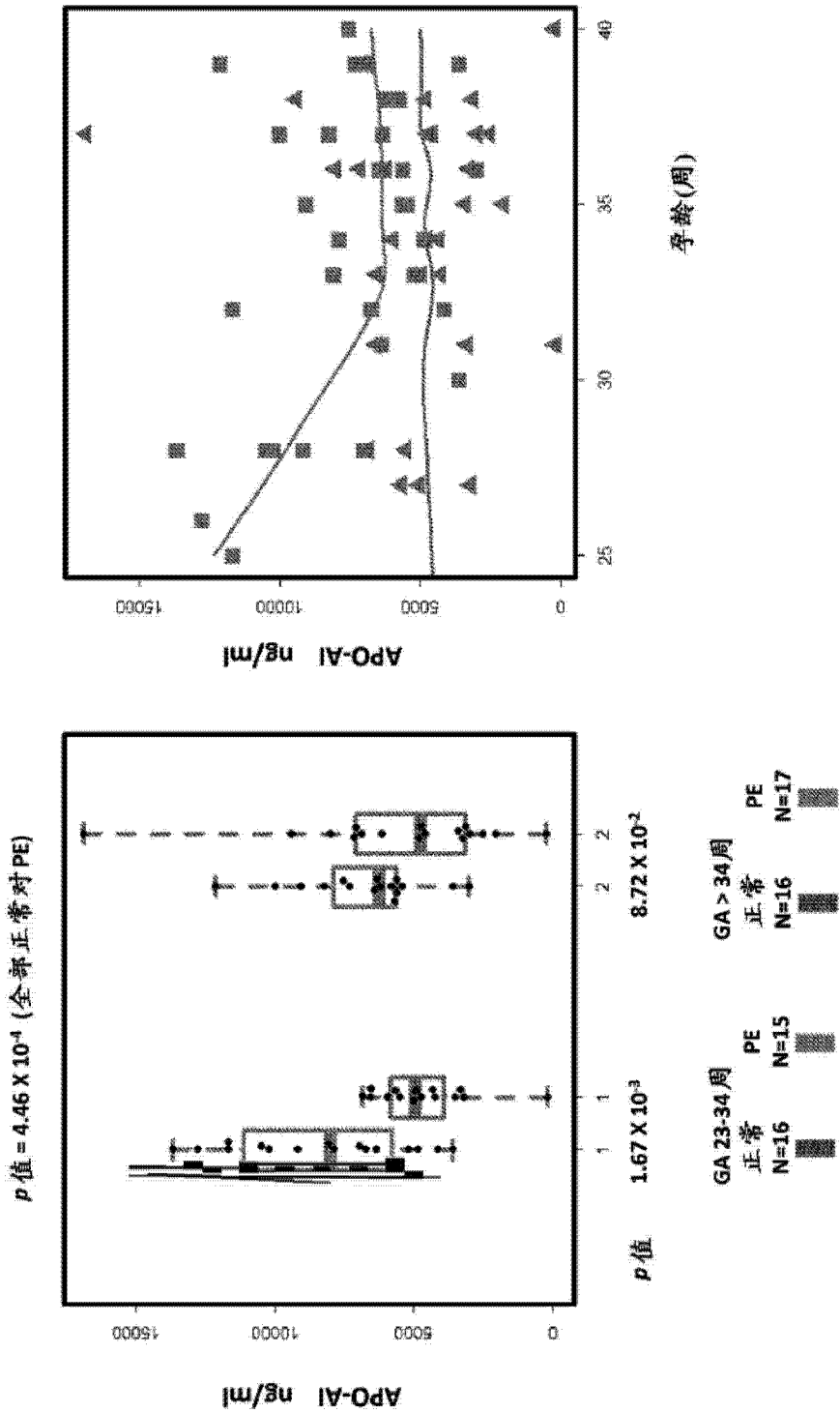


图 14

RBP4 验证

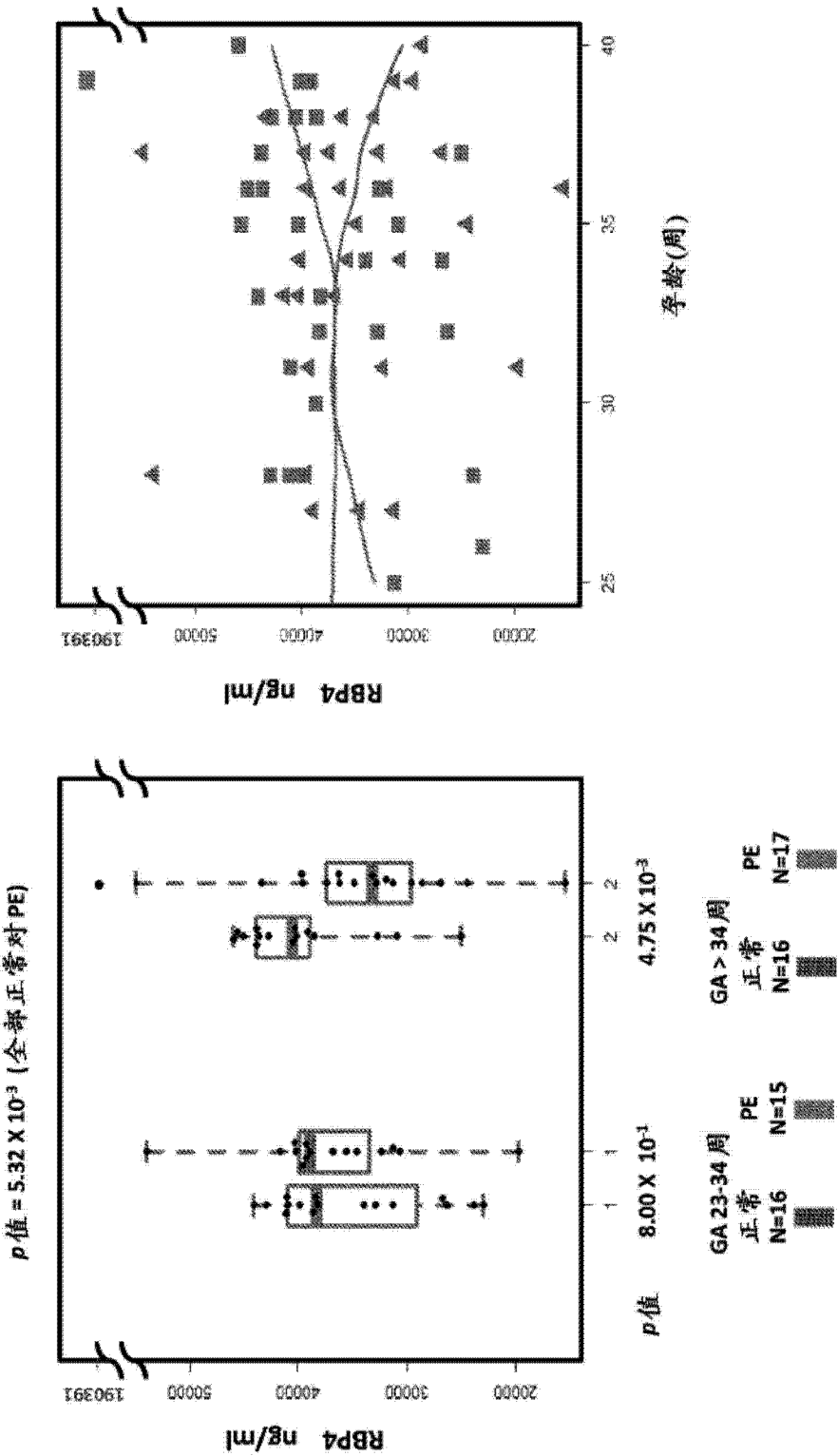


图 15

HB 验证

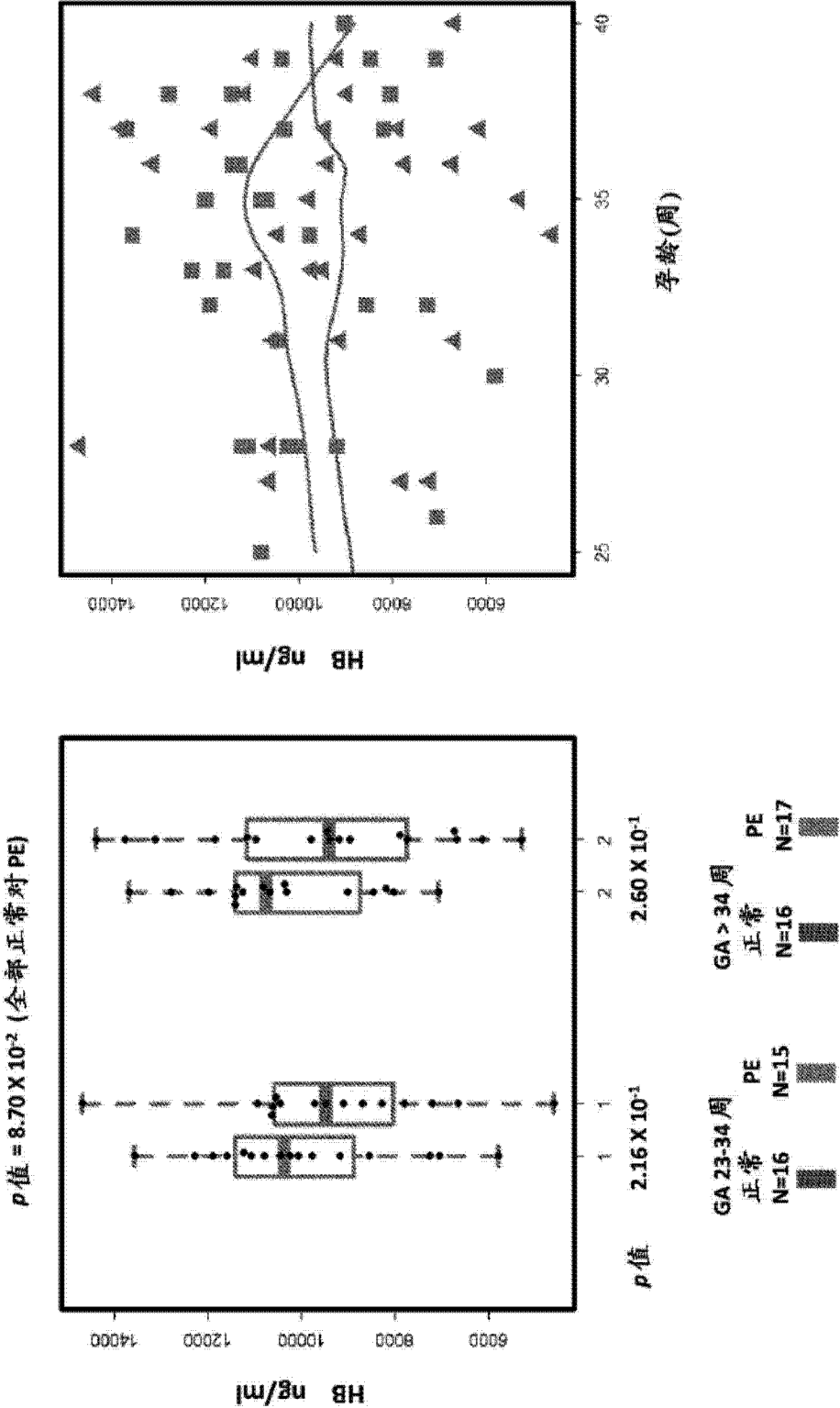


图 16

FGA 验证

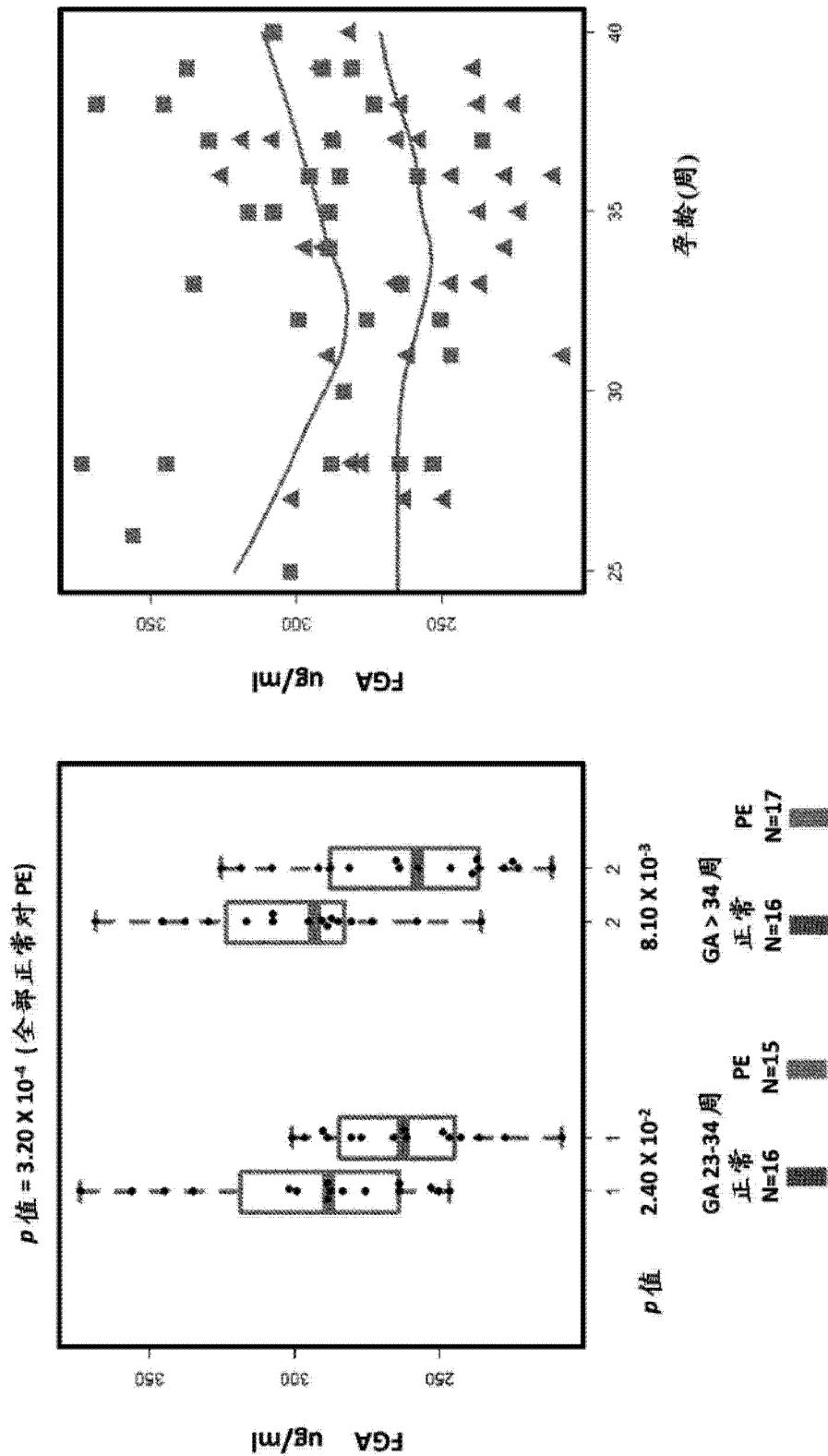


图 17

皮卡丘素验证

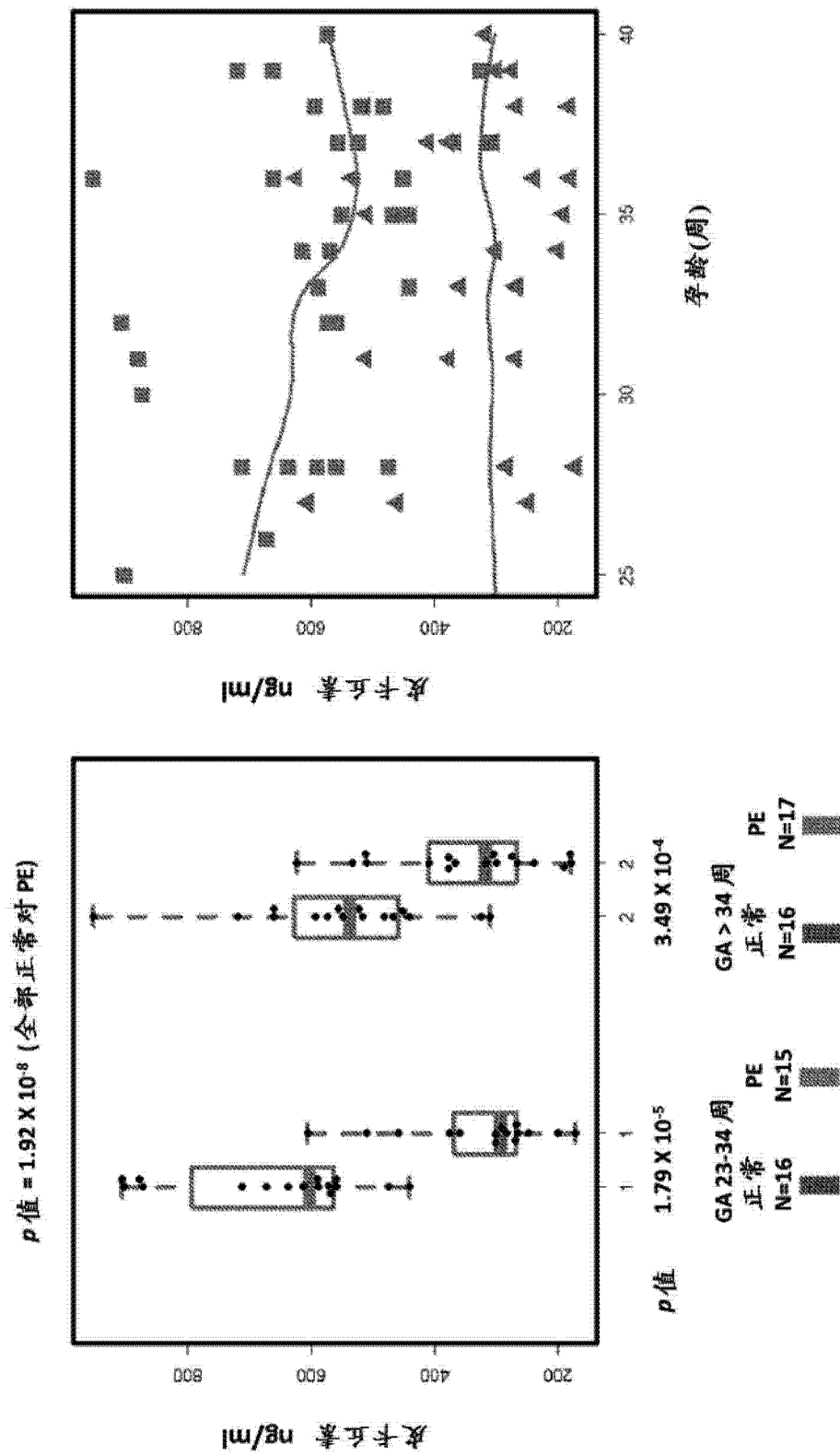


图 18

CTSB 验证

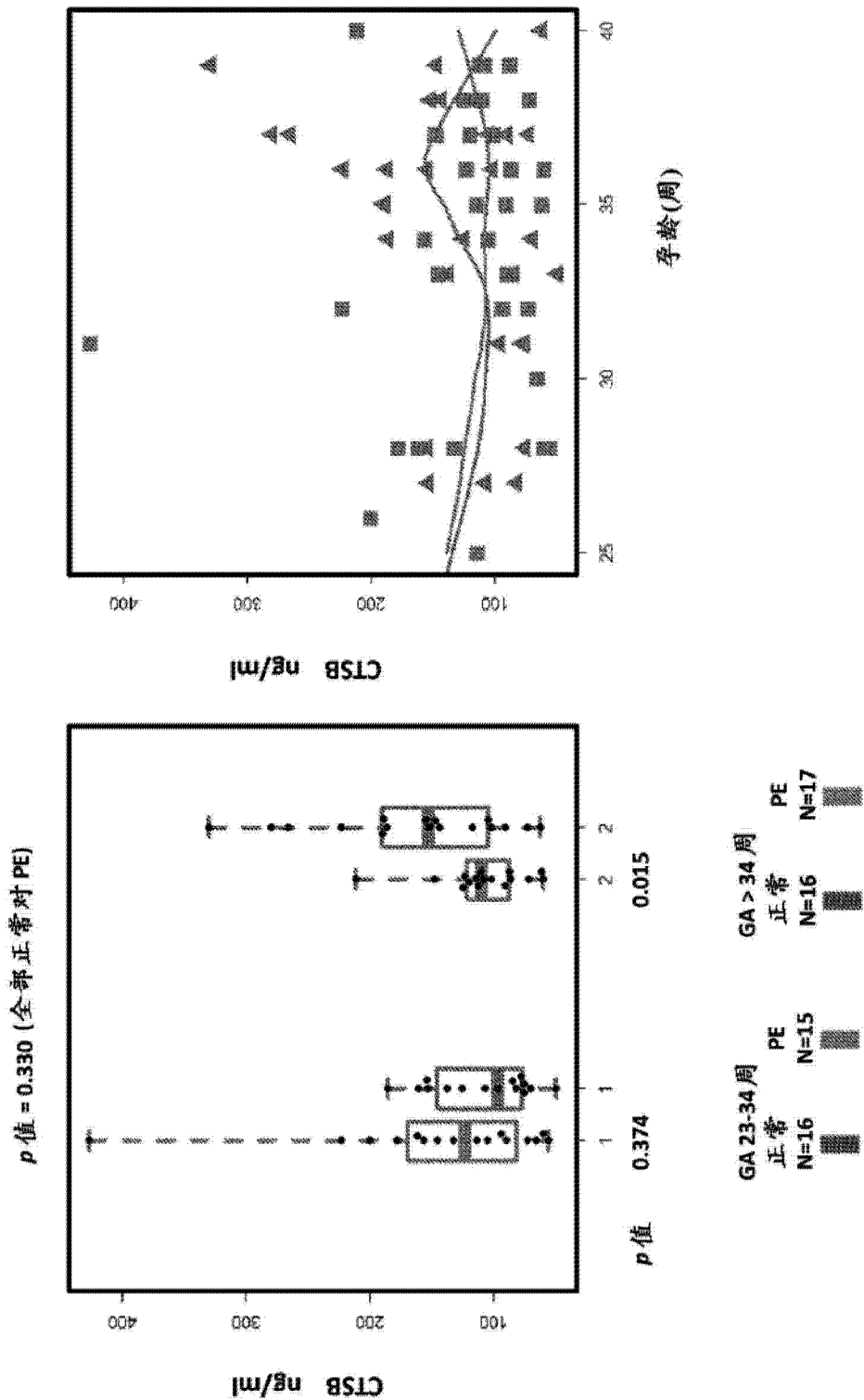


图 19

CTSC 验证

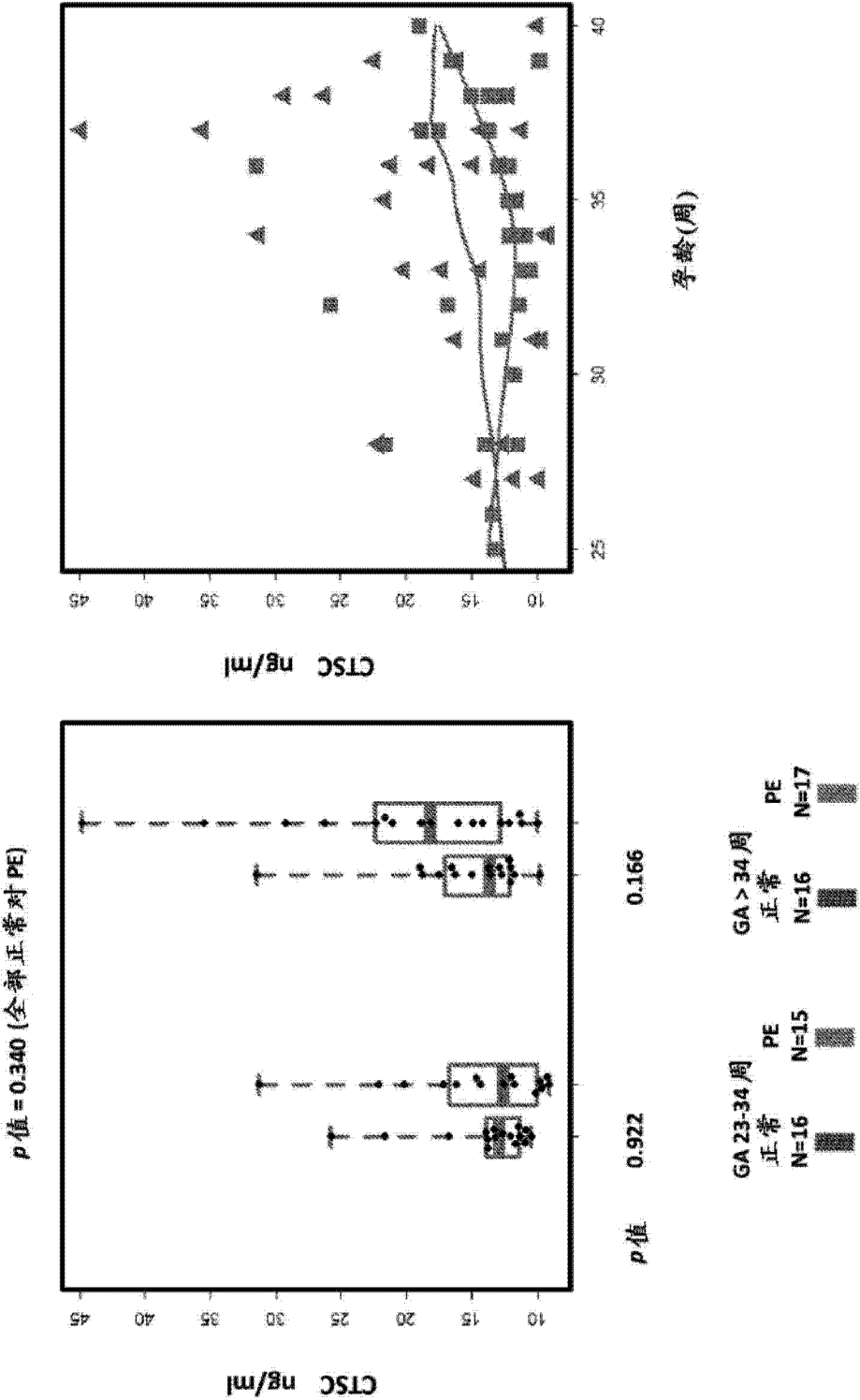


图 20

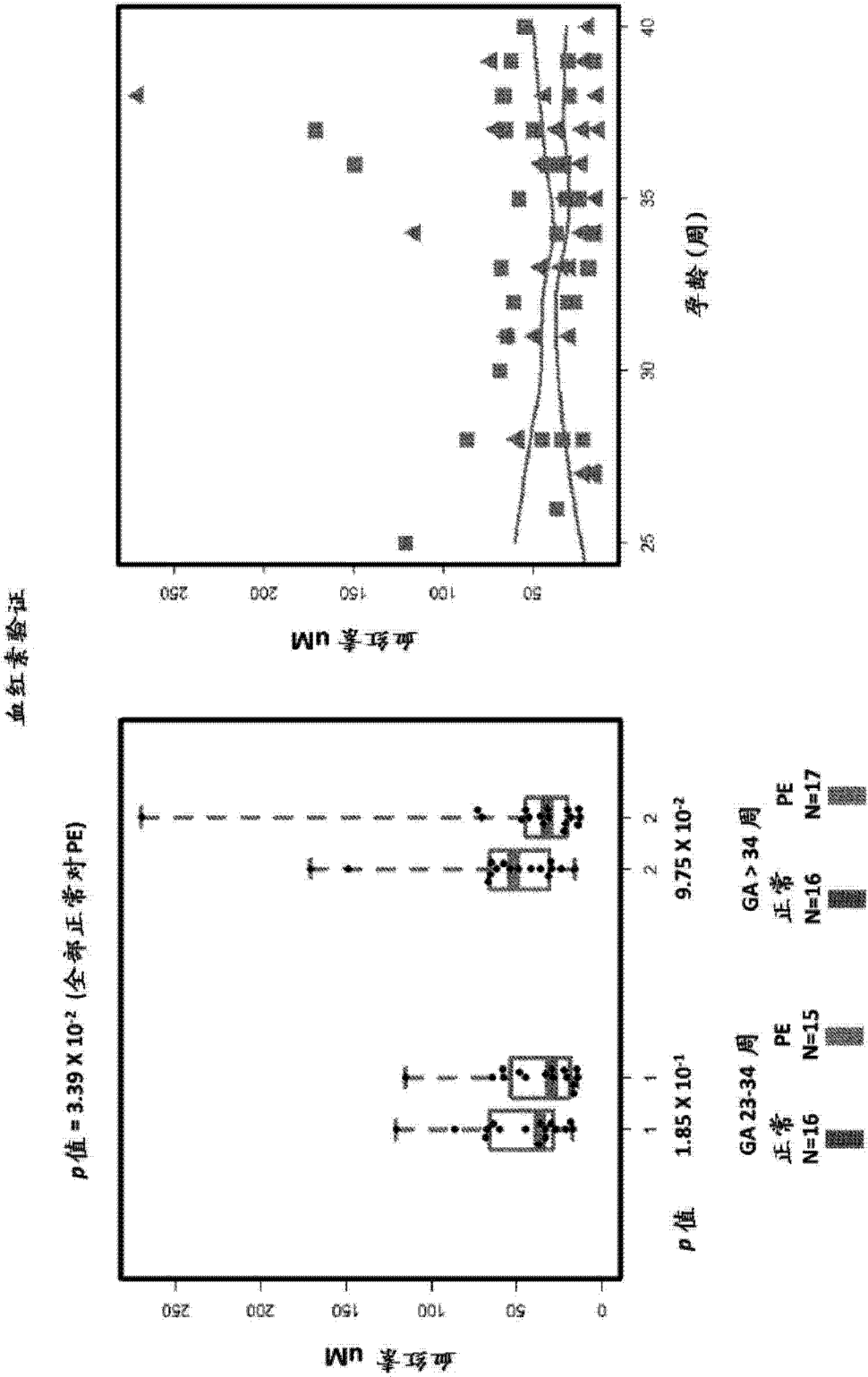


图 21

生物标志物	早期ROC AUC	晚期ROC AUC	总体 ROC AUC
sFlt-1 /PlGF **	0.992	0.894	0.951
sFlt-1/A2M	0.996	0.934	0.969
sFlt-1/RBP4	1.000	0.941	0.976
sFlt-1/血红蛋白	1.000	0.930	0.971
sFlt-1/纤维蛋白原	1.000	0.930	0.974
sFlt-1/皮卡丘素	1.000	0.910	0.964
HPX/皮卡丘素	0.895	0.977	0.930

图 22

生物标志物	早期ROC AUC	晚期ROC AUC	总体ROC AUC
sFlt-1/PlGF **	0.992	0.894	0.951
sFlt-1/血红素	0.960	0.883	0.924
sFlt-1/结合珠蛋白	0.965	0.844	0.910
sFlt-1/APOE	0.977	0.883	0.934
sFlt-1/APO A1	0.984	0.941	0.963
sFlt-1/A2M	0.996	0.934	0.969
sFlt-1/RBP4	1.000	0.941	0.976
sFlt-1/血红蛋白	1.000	0.930	0.971
sFlt-1/ApoC3	0.910	0.812	0.865
sFlt-1/纤维蛋白原	1.000	0.930	0.974
sFlt-1/皮卡丘素	1.000	0.910	0.964

图 23

生物标志物	早期 ROC AUC	晚期 ROC AUC	总体 ROC AUC
sFlt-1/PlGF	0.992	0.894	0.951
HPX/PlGF	0.859	0.820	0.841
HPX/血红蛋白	0.766	0.777	0.772
HPX/结合珠蛋白	0.832	0.762	0.798
HPX/APOE	0.813	0.801	0.805
HPX/APO A1	0.816	0.863	0.826
HPX/A2M	0.777	0.879	0.824
HPX/RBP4	0.727	0.797	0.773
HPX/血红蛋白	0.684	0.887	0.799
HPX/ApoC3	0.508	0.605	0.557
HPX/纤维蛋白原	0.734	0.648	0.694
HPX/皮卡丘素	0.895	0.977	0.930

图 24

生物标志物	早期 ROC AUC	晚期 ROC AUC	总体 ROC AUC
sFlt-1/PlGF	0.992	0.894	0.951
CTSC/PlGF	0.898	0.730	0.814
CTSC/血红蛋白	0.672	0.715	0.689
CTSC/结合珠蛋白	0.734	0.645	0.679
CTSC/APOE	0.777	0.738	0.725
CTSC/APO A1	0.797	0.742	0.771
CTSC/A2M	0.719	0.742	0.725
CTSC/RBP4	0.613	0.660	0.630
CTSC/血红蛋白	0.613	0.715	0.664
CTSC/ApoC3	0.645	0.688	0.663
CTSC/纤维蛋白原	0.629	0.695	0.660
CTSC/皮卡丘素	0.816	0.883	0.848

图 25

生物标志物	早期ROC AUC	晚期ROC AUC	总体ROC AUC
sFlt-1/PlGF	0.992	0.894	0.951
Adam12/PlGF	0.848	0.844	0.834
Adam12/结合球蛋白	0.832	0.695	0.750
Adam12/APOE	0.801	0.832	0.803
Adam12/APO A1	0.773	0.871	0.816
Adam12/A2M	0.762	0.836	0.808
Adam12/RBP4	0.684	0.824	0.759
Adam12/血红蛋白	0.703	0.848	0.771
Adam12/ApoC3	0.523	0.555	0.516
Adam12/纤维蛋白原	0.793	0.863	0.827
Adam12/皮卡丘素	0.836	0.883	0.869

图 26

包括 sFit-1 和 PIGF 的小组

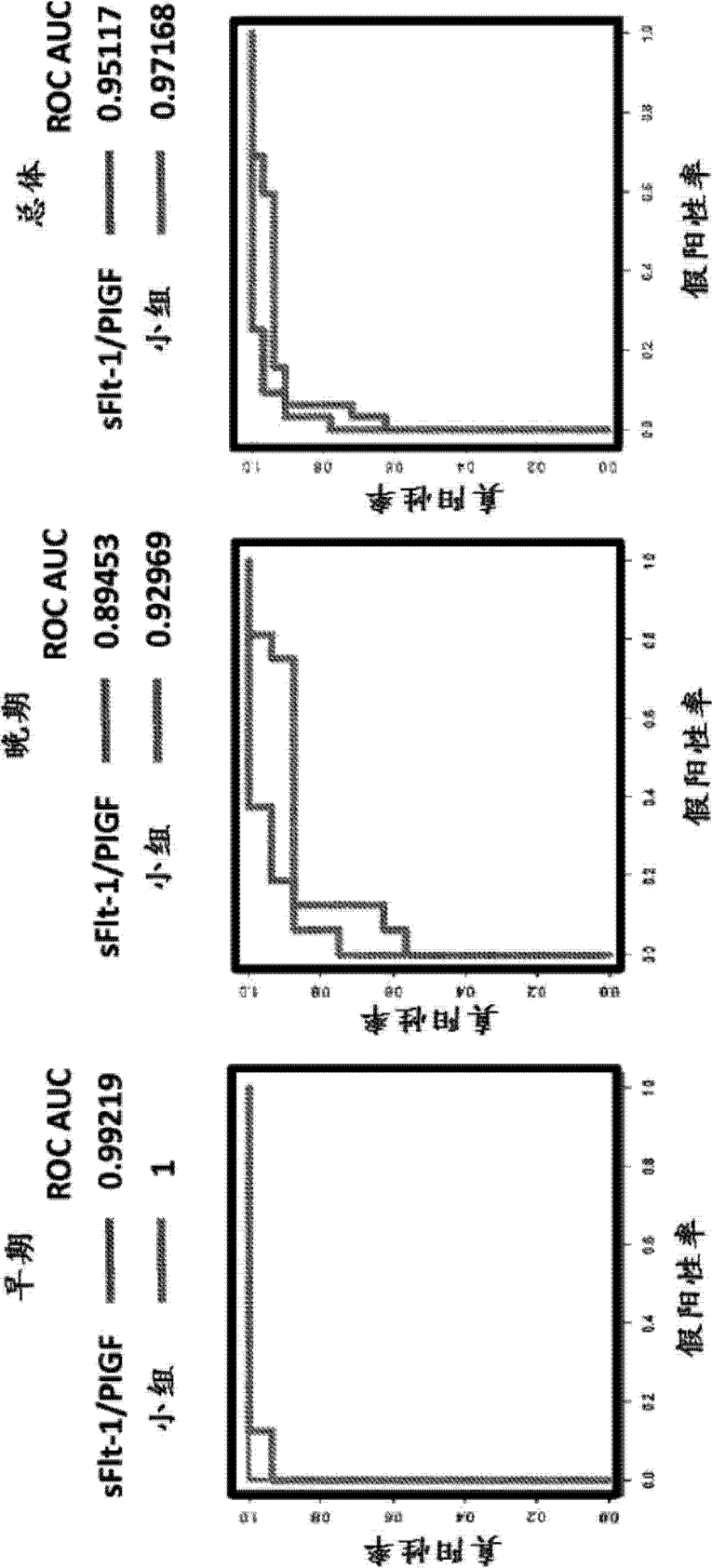


图 27

不包括 sFIt-1 和 PIGF 的小组

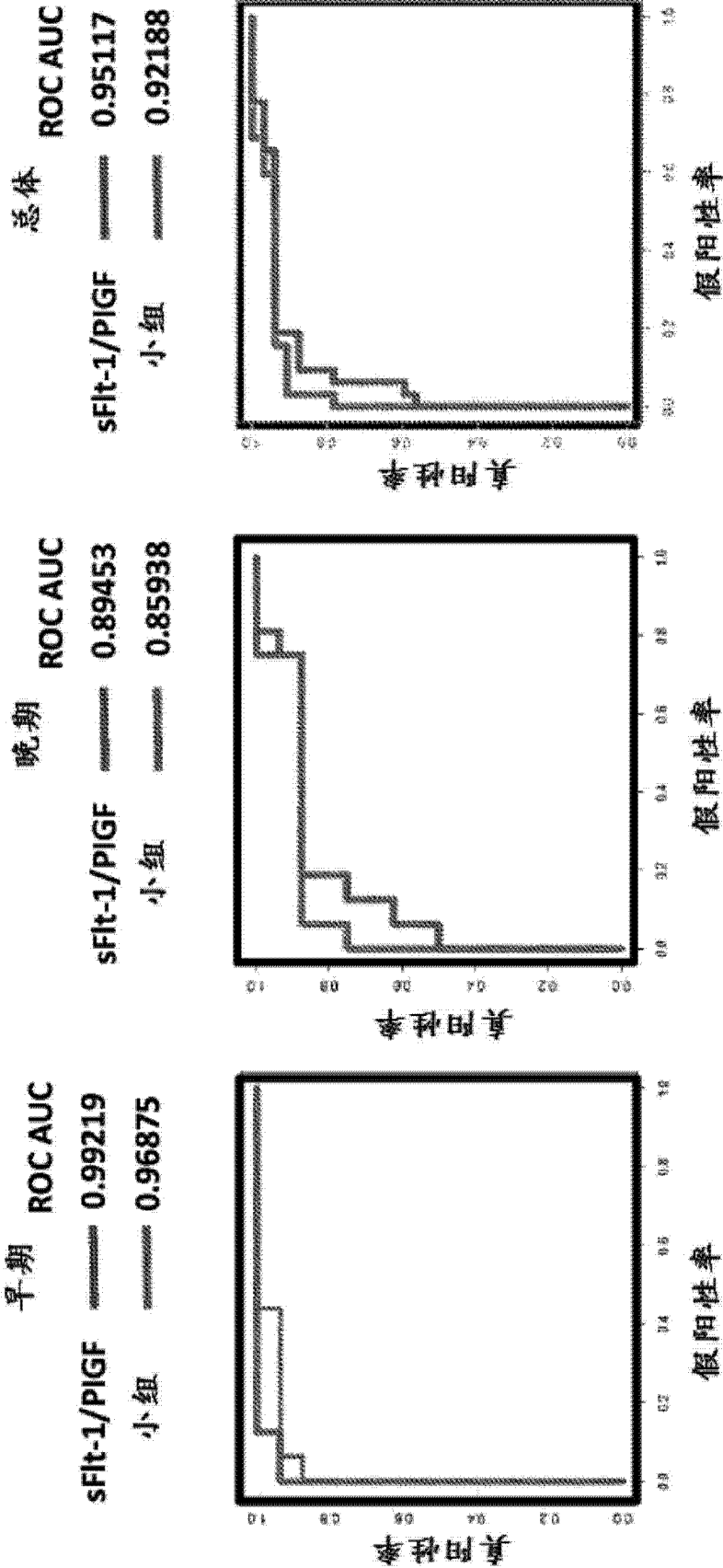


图 28

生物标志物组合的不同小组

生物标志物	小组 1	早期	晚期	小组 2	早期	晚期	小组 3	早期	晚期	小组 4	早期	晚期	小组 5	早期	晚期	小组 6	早期	晚期	小组 7	早期	晚期
sFlt-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PlGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HPX	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
铁蛋白	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTSC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adam12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ApoE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ApoC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ApoA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RBP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
纤维蛋白原	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
皮卡丘素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ 所选择的生物标志物
- 未选择的生物标志物

图 29

具有生物标志物的不同组合的 ROC 曲线AUC 值

生物标志物			SU 生物标志物的数目			ROC 曲线 AUC 值	
小组	sFlt-1	PlGF	Stanford 生物标志物	早期	晚期	总体	总体 阶段
1	+	+	-	0	0	0	0.8602941 0.9511719
2	+	+	+	1	8	8	1 1
3	+	-	-	0	0	0	0.8970588 0.9619141
4	+	-	+	1	4	4	1 1
5	-	+	-	0	0	0	0.9208333 0.6286765 0.7910156
6	-	+	+	1	9	9	0.9852941 0.9814453
7	-	-	+	3	7	8	1 1 1
+ 所选择的生物标志物							
- 未选择的生物标志物							

图 30

具有给定特异性水平的灵敏性

特异性水平	小组 1	小组 2	小组 3	小组 4	小组 5	小组 6	小组 7
100%	78.13%	100%	93.75%	100%	12.50%	75.00%	100%
95%	90.63%	100%	93.75%	100%	43.75%	90.63%	100%
90%	90.63%	100%	93.75%	100%	50.00%	90.63%	100%
85%	90.63%	100%	93.75%	100%	50.00%	93.75%	100%
80%	93.75%	100%	93.75%	100%	50.00%	100%	100%

具有给定灵敏性水平的特异性

灵敏性水平	小组 1	小组 2	小组 3	小组 4	小组 5	小组 6	小组 7
100%	31.25%	100%	37.50%	100%	12.50%	84.37%	100%
95%	40.62%	100%	40.62%	100%	40.62%	84.37%	100%
90%	96.87%	100%	100%	100%	53.12%	96.87%	100%
85%	96.87%	100%	100%	100%	62.50%	96.87%	100%
80%	96.87%	100%	100%	100%	62.50%	96.87%	100%

图 31

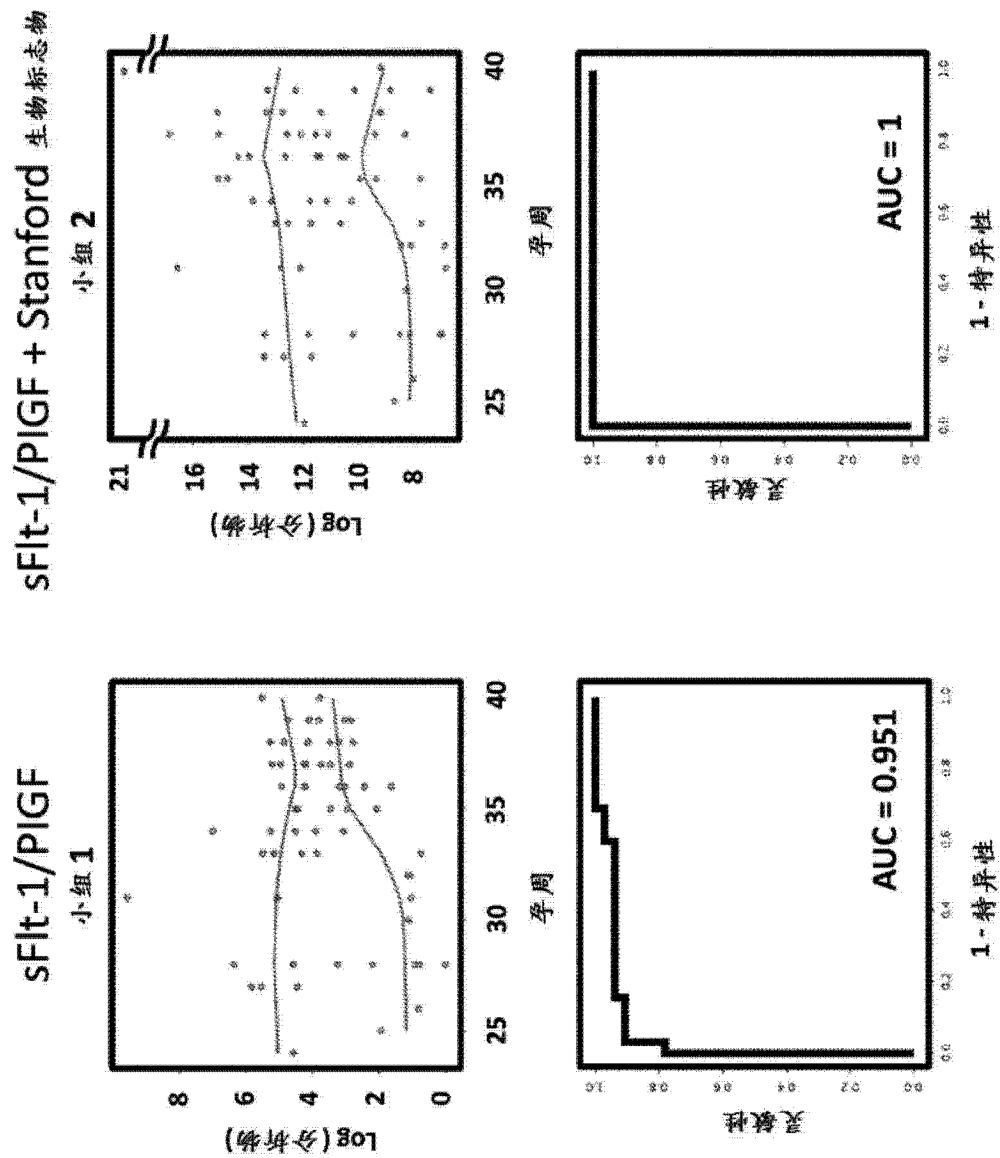


图 32

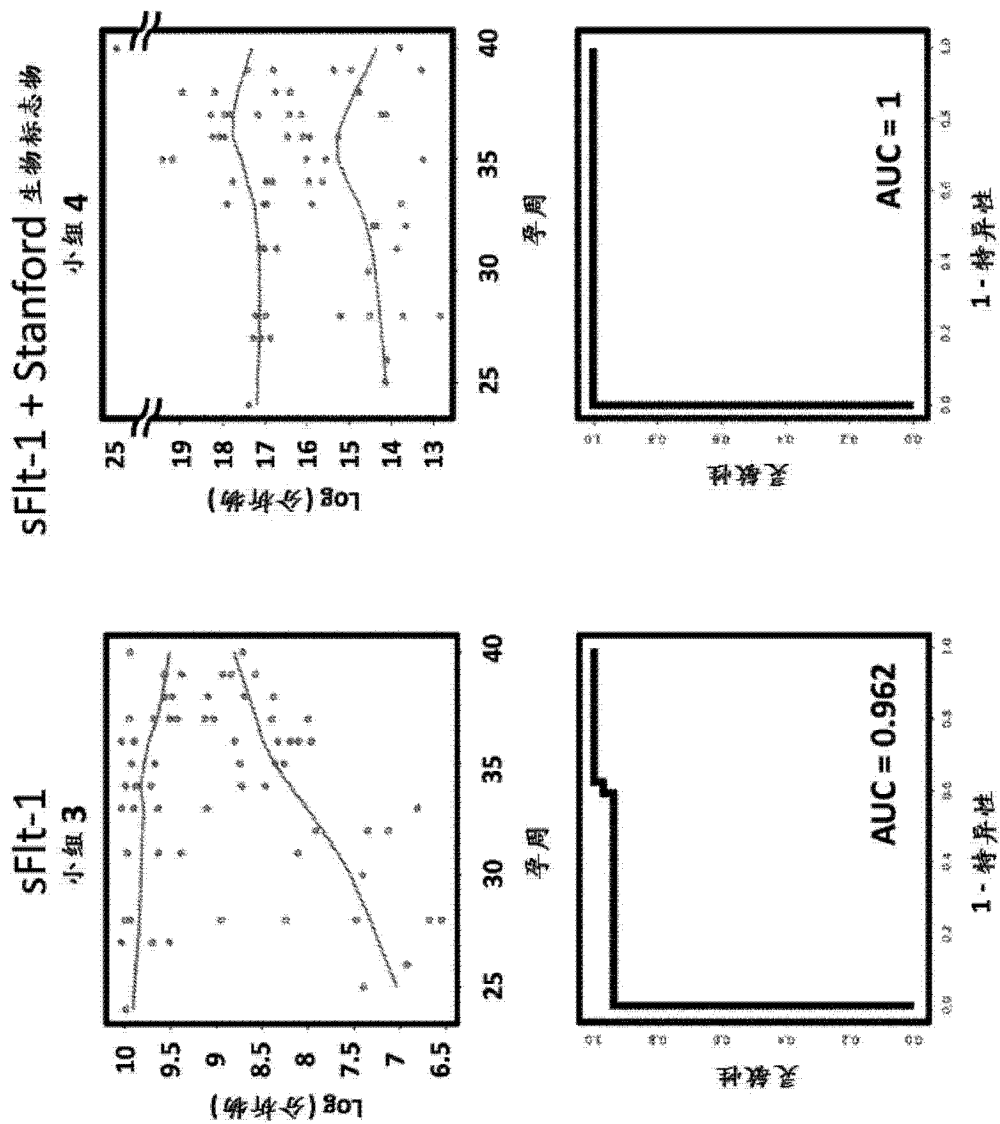


图 33

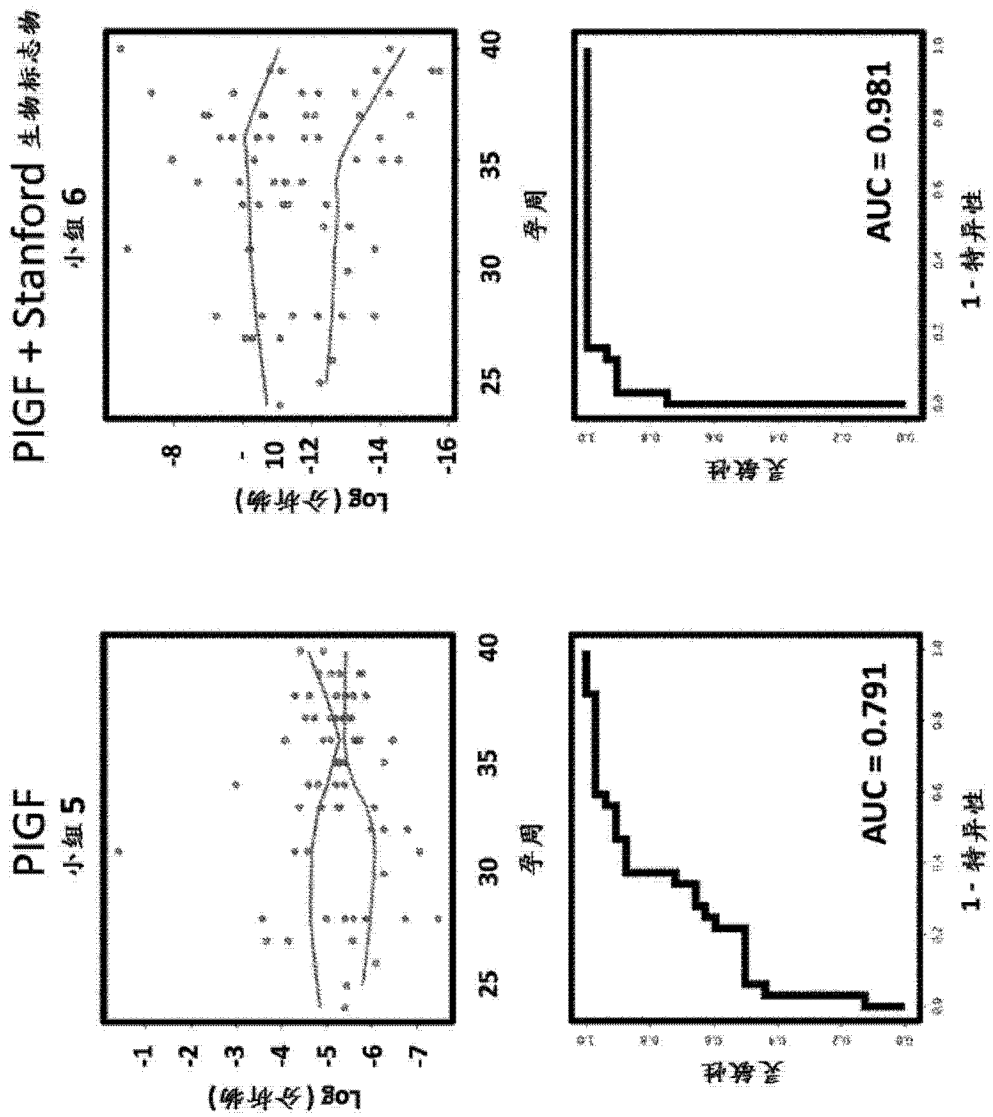


图 34

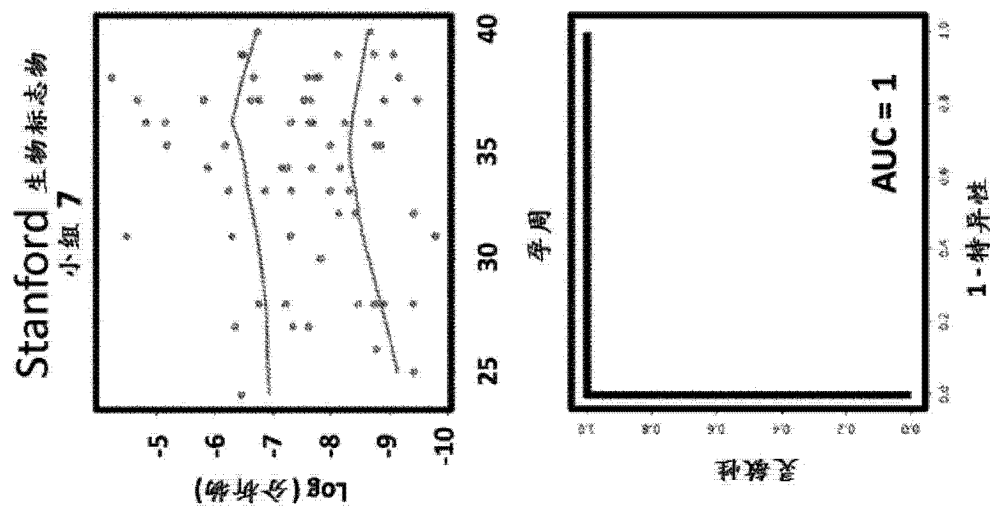


图 35

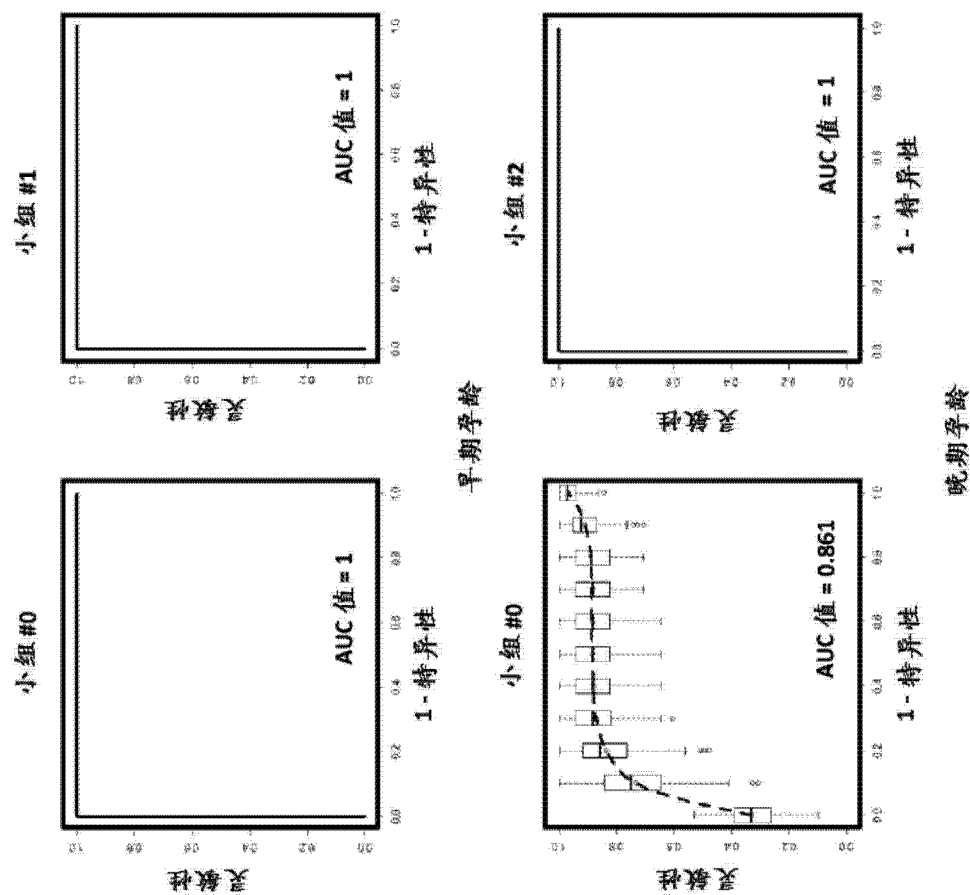


图 36