



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101918839 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 200980101754.3

(22) 申请日 2009.01.07

(30) 优先权数据

61/019351 2008.01.07 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/030340 2009.01.07

(87) PCT申请的公布数据

W02009/089286 EN 2009.07.16

(71) 申请人 奥索临床诊断有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 G·巴什里安斯 D·拜尔恩

S·格鲁尔瓦 S·杰克逊

H·莱恩-布朗 B·桑卡兰

E·斯卡利斯 K·杨 J·郑

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 权陆军 李连涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/00(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 28 页 附图 2 页

(54) 发明名称

sFlt-1: 血管生成因子络合物的测定

(57) 摘要

本发明提供了用于测定包含第一分子实体和第二分子实体的络合物的存在或量的方法,所述络合物优选地为 sFlt-1:PlGF 络合物。对所述络合物的存在或量的测定结果可用于预测、检测、监测或指导治疗例如下列疾病的方法中:血管疾病、血管相关疾病、心脏疾病、心脏相关疾病、肿瘤、肿瘤相关疾病、先兆子痫和先兆子痫相关疾病。测定 sFlt-1:血管生成因子络合物对于在妊娠早期以及临床评估可能无法提供有效信息的疾病阶段预测和检测先兆子痫尤为有用。

1. 一种测定 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量的方法,所述方法包括:
 - a) 用结合于 PlGF 的捕获剂来捕获所述络合物,并用结合于 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂来检测所述络合物;或
 - b) 用结合于 sFlt-1 的捕获剂来捕获所述络合物,并用结合于 PlGF 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂来检测所述络合物;或
 - c) 用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂来捕获所述络合物,并用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的检测剂来检测所述络合物,其中捕获剂和检测剂能够同时结合于所述络合物;或
 - d) 用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂来捕获所述络合物,并用结合于 PlGF 和 sFlt-1 中的一者或两者的检测剂来检测所述络合物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中 PlGF 为 PlGF-1、PlGF-2 或 PlGF-3。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述捕获剂被固定在支承物上或能够被固定在支承物上。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述支承物为试管的表面、微孔、微量滴定孔、膜、珠、微粒或片。
5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中捕获剂连接于生物素。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中连接于生物素的捕获剂通过结合于亲和素、链霉亲和素或其他生物素结合剂而被固定。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中捕获剂和检测剂中的一者或两者为多克隆抗体。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中捕获剂和检测剂中的一者或两者为单克隆抗体。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中捕获剂和检测剂中的一者或两者为单克隆和多克隆抗体的组合。
10. 用于指导治疗或预测、检测或监测个体中的血管、血管相关、肿瘤、肿瘤相关、心脏、心脏相关、先兆子痫或先兆子痫相关疾病的方法,所述方法包括:
 - a) 测定采自个体的样本中 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量;和
 - b) i) 将所述 sFlt-1:PlGF 测定结果与一个或多个基准值进行比较;或
ii) 用一个或多个数学运算或一个或多个算法将所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果,并将所述 sFlt-1:PlGF 络合物转换结果与一个或多个基准值进行比较;从而指导治疗或预测、检测或监测所述疾病。
11. 根据权利要求 10 所述的方法,还包括:
 - a) 测定所述样品中一种或多种分子实体的存在或量;和
 - b) i) 将所述分子实体测定结果和所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与所述一个或多个基准值进行比较;或
ii) 用一个或多个数学运算或一个或多个算法将所述分子实体测定结果和所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果,并将所述分子实体转换结果和所述 sFlt-1:PlGF 转换结果与所述一个或多个基准值进行比较。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,还包括:
 - a) 测定所述个体的一个或多个生理属性的值;和
 - b) i) 将所述生理属性测定值和所述分子实体测定结果以及所述 sFlt-1:PlGF 络合物

测定结果与所述一个或多个基准值进行比较 ;或

ii) 用一个或多个数学运算或一个或多个算法将所述生理属性测定值和所述分子实体测定结果以及所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果,并将所述生理属性的值转换结果和所述分子实体转换结果以及所述 sFlt-1:PlGF 转换结果与所述一个或多个基准值进行比较。

13. 根据权利要求 10 所述的方法,还包括 :

a) 测定所述个体的一个或多个生理属性的值 ;和

b) i) 将所述生理属性测定值和所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与所述一个或多个基准值进行比较 ;或

ii) 用一个或多个数学运算或一个或多个算法将所述生理属性测定值和所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果,并将所述生理属性转换结果和所述 sFlt-1:PlGF 转换结果与所述一个或多个基准值进行比较。

14. 根据权利要求 10 所述的方法,其中 PlGF 为 PlGF-1、PlGF-2 或 PlGF-3。

15. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述疾病为先兆子痫或先兆子痫相关疾病,并且指导治疗、预测、检测或监测在妊娠期前 15 周内或妊娠期前 20 周内或妊娠期前 30 周或更多周内进行。

16. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述一个或多个分子实体选自游离 PlGF、游离 sFlt-1、游离 VEGF、sFlt-1:VEGF 络合物、内皮糖蛋白、可溶性内皮糖蛋白、肌酸酐、c-反应蛋白、肝酶、尿蛋白、胎盘蛋白 13、人绒毛膜促性腺激素、 α -胎蛋白和血管紧张素 II-I 型受体的自身抗体。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中 VEGF 为 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF_{165b}、VEGF₁₆₇、VEGF₁₈₃、VEGF₁₈₆、VEGF₁₈₉ 或 VEGF₂₀₆。

18. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述一个或多个数学运算包括计算所述分子实体测定值与所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定值的比率或所述 sFlt-1:PlGF 络合物测定值与所述分子实体测定值的比率。

19. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述一个或多个生理属性选自胎龄、种族、年龄、性别、血压和身体质量指数。

20. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述一个或多个生理属性选自胎龄、种族、年龄、性别、血压和身体质量指数。

21. 用于测定 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量的组合物,包含 :

a) 结合于 PlGF 的捕获剂和结合于 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂 ;或

b) 结合于 sFlt-1 的捕获剂和结合于 PlGF 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂 ;或

c) 结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂和结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的检测剂,其中捕获剂和检测剂能够同时结合于所述络合物 ;或

d) 结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂和结合于 PlGF 和 sFlt-1 中的一者或两者的检测剂。

22. 根据权利要求 21 所述的组合物,其中 PlGF 为 PlGF-1、PlGF-2 或 PlGF-3。

23. 根据权利要求 21 所述的组合物,其中捕获剂和检测剂中的一者或两者为多克隆抗体。
24. 根据权利要求 21 所述的组合物,其中捕获剂和检测剂中的一者或两者为单克隆抗体。
25. 根据权利要求 21 所述的组合物,其中捕获剂和检测剂中的一者或两者为单克隆和多克隆抗体的组合。
26. 包含纯化形式的 sFlt-1:PlGF 络合物的组合物。
27. 根据权利要求 26 所述的组合物,其中 PlGF 为 PlGF-1、PlGF-2 或 PlGF-3。
28. 根据权利要求 26 所述的组合物,其中所述 sFlt-1:PlGF 络合物的 sFlt-1 和 PlGF 中的一者或两者为天然的。
29. 根据权利要求 26 所述的组合物,其中所述 sFlt-1:PlGF 络合物的 sFlt-1 和 PlGF 中的一者或两者为重组的。
30. 根据权利要求 26 所述的组合物,其中所述纯化形式的 sFlt-1:PlGF 络合物利用下列方法获得:尺寸排阻色谱法、疏水色谱法、离子交换色谱法、离心法、分子筛分法、金属离子交换色谱法、亲和色谱法、电泳法或配体交换色谱法。
31. 根据权利要求 26 所述的组合物,其中 sFlt-1 和 PlGF 彼此共价结合。
32. 根据权利要求 26 所述的组合物,所述组合物用于校准或验证测定 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量的检测分析法的性能。

sFlt-1 :血管生成因子络合物的测定

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于 2008 年 1 月 7 日提交的美国临时申请 No. 61/019, 351 的优先权。

[0003] 关于联邦资助研发项目的声明

[0004] 不适用。

技术领域

[0005] 本发明涉及免疫分析和体外诊断,更具体地讲涉及先兆子痫中包括的 sFlt-1 :血管生成因子络合物的测定。

[0006] 发明背景

[0007] 先兆子痫是一种高血压、浮肿和蛋白尿综合征,在孕妇中的患病率为 5 至 10%,并会导致高母儿发病率和死亡率。先兆子痫每年在全世界造成 200,000 例孕产妇死亡。先兆子痫的临床症状通常出现在怀孕 20 周后,通常在妇女血压常规评估和尿样中蛋白存在的检测过程中发现。然而,这类临床评估对该综合征的早期诊断是无效的。当临床评估不能提供有效信息时,如果能够评估先兆子痫发展的可能性,和 / 或能够在妊娠早期诊断先兆子痫,和 / 或能够在发病阶段诊断先兆子痫,则可以进行早期干预,并降低孕妇和发育中的胎儿出现并发症的风险和死亡率。

[0008] 目前对于先兆子痫还没有已知的治疗方法。先兆子痫的严重程度可以为轻度至危及生命。妊娠并发症包括肾衰竭、HELLP 综合征(溶血、肝酶升高和血小板减少)、肝衰竭、癫痫合并脑水肿,少数情况下还会导致死亡。潜在的胎儿并发症包括低出生体重、早产和死亡。轻度先兆子痫可通过卧床休息和频繁监测进行治疗。对于中度至重症病例,建议住院治疗,并开具降血压药物或抗癫痫药物以预防癫痫。如果病情危及母婴生命,应终止妊娠并提前分娩。

[0009] 最近有人对与先兆子痫相关的分子机制进行了综述(Mutter and Karumanchi, *Microvascular Research* 75 :1-8, 2008 (Mutter 和 Karumanchi, 微血管研究,第 75 卷第 1-8 页,2008 年))。如 Mutter 和 Karumanchi 所指出,据信内皮功能障碍会促成先兆子痫的临床综合征(Roberts and Cooper, *Lancet* 357 :53-56, 2001 (Roberts 和 Cooper, 柳叶刀,第 357 卷第 53-56 页,2001 年))。该疾病的许多症状可能是因内皮功能异常(包括动脉对外源和内源刺激的高反应性、与肾小球通透性增加相关的蛋白尿、脑水肿和中枢神经系统渗透性增加、以及导致 HELLP 综合征的血管血栓)引起的(Roberts, *Semin Reprod Endocrinol* 16 :5-15, 1998 ;Roberts and Cooper, *Lancet* 357 :53-56, 2001 (Roberts 和 Cooper, 柳叶刀,第 357 卷第 53-56 页,2001 年))。因此,人们一直在积极探寻引起或促成内皮功能障碍的循环因子。

[0010] 胎儿和胎盘的正常发育由若干生长因子介导。其中一个生长因子是血管内皮生长因子(VEGF)。VEGF 是内皮细胞特异性有丝分裂原、血管生成诱导因子和血管通透性介导因子。还已发现,VEGF 对肾小球毛细血管的修复发挥着重要作用。VEGF 作为同源二聚

体与两种同源跨膜酪氨酸激酶受体 -fms 样酪氨酸激酶受体 (Flt-1) (也称为血管内皮生长因子受体 1 或 VEGF-R1) 和激酶结构域受体 (Flk/KDR) (也称为血管内皮生长因子受体 2 或 VEGF-R2) 中的一种结合,这两种受体在来自许多不同组织的内皮细胞中差异表达。Flt-1(但不是 Flk/KDR) 由有助于胎盘形成的滋养层细胞高表达。胎盘生长因子 (PlGF) 是 VEGF 家族的成员,它也与胎盘发育有关。PlGF 由细胞滋养细胞和合体滋养细胞表达,并能够诱导内皮细胞增殖、迁移和活化。PlGF 作为同源二聚体与 Flt-1 受体(但不是 Flk/KDR 受体)结合。PlGF 和 VEGF 均有助于对胎盘发育至关重要的促有丝分裂活性和血管生成。

[0011] 人们已在人脐静脉内皮细胞的培养基中鉴定出一种可溶形式的 Flt-1 受体 (sFlt-1),并随后证实了在胎盘组织中的体内表达。sFlt-1 是无跨膜域和胞质域的 Flt-1 受体的剪接变体 (He 等人, *Mol Endocrinol* 13 :537-545,1999 ;Kendall 和 Thomas, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 :10705-10709,1993)。

[0012] Beth Israel Deaconess Medical Center 和 Harvard Medical School 的研究人员最近的工作表明,先兆子痫患者的胎盘瘦素产量和母体血清 sFlt-1 水平增加 (Ahmad 和 Ahmed, *Circ Res* 95 :884-891,2004 ;Chaiworapongsa 等人, *Am J Obstet Gynecol* 190 :1541-1547,2004 ;Koga 等人, *J Clin Endocrinol Metab* 88 :2348-2351,2003 ;Maynard 等人, *J Clin Invest* 111 :649-658,2003 ;Shibata 等人, *J Clin Endocrinol Metab* 90 :4895-4903,2005)。sFlt-1 能够与 VEGF 和 PlGF 结合。当在血清中处于游离状态时,sFlt-1 可能会减弱这些生长因子分别与其同源受体 Flt-1 和 Flk/KDR 的结合 (Kendall 等人, *Biochem Biophys Res Commun* 226 :324-328,1996)。已经知道,除了 VEGF 和 PlGF 之外,胎盘可以产生多种其他血管生成因子,其中包括血管生成素 (Ang-1 和 Ang-2) 及其受体 Tie-2 (Dunk 等人, *Am J Pathol* 156 :2185-2199,2000 ;Geva 等人, *J Clin Endocrinol Metab* 87 :4213-4224,2002 ;Goldman-Wohl 等人, *Mol Hum Reprod* 6 :81-87,2000)。据发现,在患有先兆子痫的妇女血清中 sFlt-1 水平增加,VEGF 和 PlGF 水平降低。

[0013] 最近人们关注到了另一种因子内皮糖蛋白 (endoglin) (Eng),这是一种转化生长因子 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 的辅助受体,是一种在先兆子痫患者胎盘中大量表达的蛋白。内皮糖蛋白的胞外域可能会释放并在血清中发现,此时称其为可溶性内皮糖蛋白 (sEng)。与 sFlt-1 类似,sEng 在发病前 2 至 3 个月在母体血清中增加 (Levine 等人, *N Engl J Med* 355 :992-1005,2006)。

[0014] 通过识别先兆子痫发作前出现的循环血管生成因子失衡或其临床表现,可用于设计筛选和 / 或诊断试验,从而识别存在先兆子痫风险的患者。这样的试验可以帮助临床医生在病程早期进行密切的随访和治疗干预,因而具有宝贵的意义。使用采自先兆子痫患者的血清进行的多项回顾性研究表明,血清中的 sFlt-1 浓度在发现任何临床表现之前 5 至 6 周一样高 (Chaiworapongsa 等人, *J Matern Fetal Neonatal Med* 17 :3-18,2005 ;Hertig 等人, *Clin Chem* 50 :1702-1703,2004 ;Levine 等人, *N Engl J Med* 350 :672-683,2004 ;McKeeman 等人, *Am J Obstet Gynecol* 191 :1240-1246,2004)。此外,游离的 VEGF 和 PlGF 较低 (Hertig 等人, *Clin Chem* 50 :1702-1703,2004 ;Levine 等人, *N Engl J Med* 350 :672-683,2004)。最近有关血清中 sFlt-1 的增加或 PlGF 的减少是否可以准确预测先兆子痫发作的系统性综述文献得出结论,妊娠末三个月的 sFlt-1 增加和 PlGF 减少与先兆子痫相关,但现有数据还不足以建议以此作为筛选试验的内容 (Widmer 等人, *Obstet Gynecol*

109:168-180,2007)。

[0015] 仍然需要更高效和 / 或更有效的方法来预测妇女发生先兆子痫的风险或确定其是否已患有先兆子痫。在妊娠早期和 / 或在临床评估可能无法提供有效信息的疾病阶段, 预测和 / 或检测先兆子痫将是尤其有利的。

发明内容

[0016] 在一个方面, 本发明涉及一种测定 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量的方法。该方法包括:

[0017] a) 利用结合于 PlGF 的捕获剂来捕获该络合物, 并用结合于 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂来检测该络合物; 或

[0018] b) 利用结合于 sFlt-1 的捕获剂来捕获该络合物, 并用结合于 PlGF 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂来检测该络合物; 或

[0019] c) 利用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂来捕获该络合物, 并用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的检测剂来检测该络合物, 其中捕获剂和检测剂能够同时结合于该络合物; 或

[0020] d) 利用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂来捕获该络合物, 并用与 PlGF 和 sFlt-1 中的一者或两者结合的检测剂来检测该络合物。

[0021] 在另一方面, 本发明涉及一种方法, 该方法用于指导治疗或预测、检测或监测个体中的血管、血管相关、肿瘤、肿瘤相关、心脏、心脏相关、先兆子痫或先兆子痫相关的疾病。该方法包括:

[0022] a) 测定采自个体的样本中 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量; 和

[0023] b) i) 将 sFlt-1:PlGF 测定结果与一个或多个基准值进行比较; 或 ii) 用一个或多个数学运算或一个或多个算法将 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果, 并将 sFlt-1:PlGF 络合物转换结果与一个或多个基准值进行比较;

[0024] 从而指导治疗或预测、检测或监测该疾病。

[0025] 在一个实施例中, 该方法还可以包括:

[0026] a) 测定样本中一种或多种分子实体的存在或量; 和

[0027] b) i) 将分子实体测定结果和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与一个或多个基准值进行比较; 或

[0028] ii) 利用一个或多个数学运算或一个或多个算法将分子实体测定结果和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果, 并将分子实体转换结果和 sFlt-1:PlGF 转换结果与一个或多个基准值进行比较。

[0029] 在另一个实施例中, 该方法还可以包括:

[0030] a) 测定个体的一个或多个生理属性的值; 和

[0031] b) i) 将生理属性测定值和分子实体测定结果以及 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与一个或多个基准值进行比较; 或

[0032] ii) 利用一个或多个数学运算或一个或多个算法将生理属性测定值和分子实体测定结果以及 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果, 并将生理属性的值转换结果和分子实体转换结果以及 sFlt-1:PlGF 转换结果与一个或多个基准值进行比较。

- [0033] 在一个附加的实施例中,该方法可以包括:
- [0034] a) 测定个体的一个或多个生理属性的值;和
- [0035] b) i) 将生理属性测定值和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与一个或多个基准值进行比较;或
- [0036] ii) 利用一个或多个数学运算或一个或多个算法将生理属性测定值和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果,
- [0037] 并将生理属性转换结果和 sFlt-1:PlGF 转换结果与一个或多个基准值进行比较。
- [0038] 本发明的另一个方面涉及一种用于测定 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量的组合物。该组合物包含:
- [0039] a) 结合于 PlGF 的捕获剂和结合于 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂;或
- [0040] b) 结合于 sFlt-1 的捕获剂和结合于 PlGF 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂;或
- [0041] c) 结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂和结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的检测剂,其中捕获剂和检测剂能够同时结合于该络合物;或
- [0042] d) 结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂和结合于 PlGF 和 sFlt-1 中的一者或两者的检测剂。
- [0043] 另外,本发明涉及包含纯化形式的 sFlt-1:PlGF 络合物的组合物。

附图说明

- [0044] 图 1 示出了通过 PlGF 捕获和 sFlt-1 检测的方式测定 sFlt-1:PlGF 络合物的分析结构图;
- [0045] 图 2 示出了 sFlt-1:PlGF-1 络合物分析的
- [0046] 剂量反应曲线;
- [0047] 图 3 示出了根据 sFlt-1:PlGF-1 络合物分析的正常人 (0) 和先兆子痫患者 (1) 样本结果的点图;
- [0048] 图 4 示出了正常人 (0) 和先兆子痫患者 (1) 样本中的 sFlt-1:PlGF 络合物与游离 PlGF 的计算比率的点图。

具体实施方式

[0049] 如本文所用, sFlt-1 是指可溶形式的 fms 样酪氨酸激酶受体 (Flt-1)。Flt-1 也称为血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR-1)。sFlt-1 (也称为 sVEGFR-1) 是无跨膜域和胞质域的 Flt-1 的剪接变体。含有跨膜域和胞质域氨基酸的 Flt-1 的氨基酸序列由基因库登录号 P17948 (1338 个氨基酸) 提供。可溶形式的 Flt-1 缺失了第 688-1338 位氨基酸, 并且第 657-687 位氨基酸也有所不同, 从而形成 687 个氨基酸的 sFlt-1 的氨基酸序列。sFlt-1 异构体在基因库登录号 P17948 中有所描述。

[0050] 如本文所用, PlGF 是指胎盘生长因子。PlGF 具有 4 种现已识别的异构体, 其中包括 PlGF-1、PlGF-2、PlGF-3 和 PlGF-4, 这些异构体因选择性剪接而产生。PlGF 氨基酸序列的一个例子由基因库登录号 P49763 (221 个氨基酸) 提供。PlGF-1 异构体缺失了第 132-203

位氨基酸,从而形成 149 个氨基酸的 PlGF-1 的氨基酸序列。PlGF-1 异构体在基因库登录号 P49763 中有所描述。

[0051] sFlt-1 结合于 PlGF, 本文将所得物称为 sFlt-1:PlGF 络合物。

[0052] 考虑到这些术语, 在一个方面, 本发明涉及一种测定 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量的方法。该方法包括:

[0053] a) 利用结合于 PlGF 的捕获剂来捕获该络合物, 并用结合于 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂来检测该络合物;或

[0054] b) 利用结合于 sFlt-1 的捕获剂来捕获该络合物, 并用结合于 PlGF 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的一者或两者的检测剂来检测该络合物;或

[0055] c) 利用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂来捕获该络合物, 并用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的检测剂来检测该络合物, 其中捕获剂和检测剂能够同时结合于该络合物;或

[0056] d) 利用结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的捕获剂来捕获该络合物, 并用结合于 PlGF 和 sFlt-1 中的一者或两者的检测剂来检测该络合物。

[0057] 在另一方面, 本发明涉及一种方法, 该方法用于指导治疗或预测、检测或监测个体中的血管、血管相关、肿瘤、肿瘤相关、心脏、心脏相关、先兆子痫或先兆子痫相关的疾病。该方法包括:

[0058] a) 测定采自个体的样本中 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量;和

[0059] b) i) 将 sFlt-1:PlGF 测定结果与一个或多个基准值进行比较;或

[0060] ii) 利用一个或多个数学运算或一个或多个算法将 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果, 并将 sFlt-1:PlGF 络合物转换结果与一个或多个基准值进行比较;

[0061] 从而指导治疗或预测、检测或监测疾病。

[0062] 在一个实施例中, 该方法还可以包括:

[0063] a) 测定样本中一种或多种分子实体的存在或量;和

[0064] b) i) 将分子实体测定结果和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与一个或多个基准值进行比较;或

[0065] ii) 利用一个或多个数学运算或一个或多个算法将分子实体测定结果和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果, 并将分子实体转换结果和 sFlt-1:PlGF 络合物转换结果与一个或多个基准值进行比较。

[0066] 在另一个实施例中, 该方法还可以包括:

[0067] a) 测定个体的一个或多个生理属性的值;和

[0068] b) i) 将生理属性测定值和分子实体测定结果以及 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与一个或多个基准值进行比较;或

[0069] ii) 利用一个或多个数学运算或一个或多个算法将生理属性测定值和分子实体测定结果以及 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果, 并将生理属性的值转换结果和分子实体转换结果以及 sFlt-1:PlGF 络合物转换结果与一个或多个基准值进行比较。

[0070] 在一个附加的实施例中, 该方法可以包括:

[0071] a) 测定个体的一个或多个生理属性的值 ;和

[0072] b) i) 将生理属性测定值和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果与一个或多个基准值进行比较 ;或

[0073] ii) 利用一个或多个数学运算或一个或多个算法将生理属性测定值和 sFlt-1:PlGF 络合物测定结果转化为一个或多个转换结果,并将生理属性转换结果和 sFlt-1:PlGF 络合物转换结果与一个或多个基准值进行比较。

[0074] 将本发明的概念延伸到所示优选实施例之外,本发明可以涉及能够彼此结合以形成分子络合物的第一分子实体和第二分子实体,其中在优选实施例中,sFlt-1 为第一分子实体的例子,PlGF 为第二分子实体的例子。sFlt-1:PlGF 络合物是一例分子络合物。下文将结合涉及血管生成受体 sFlt-1 及血管生成因子 PlGF 和 VEGF 的某些优选实施例详细描述本发明。这些分子实体在先兆子痫和先兆子痫相关疾病方面尤其受关注。

[0075] 免疫分析 - 适用于本发明的一般讨论

[0076] 某些分析涉及特异性结合于待测物质(测定其存在或量)的试剂,它们通常被称为结合分析。免疫分析通常被认为是使用抗体或抗体片段作为捕获剂和检测剂的结合分析法。虽然本发明是结合捕获和检测抗体进行描述的,但也可以设想除抗体之外的结合剂。诸如捕获抗体和检测抗体之类的结合剂特异性地结合于络合物形成中涉及的第一分子实体或第二分子实体,或者特异性地结合于包含第一分子实体和第二分子实体的络合物。

[0077] 免疫分析可分为竞争性或非竞争性(夹心结构)免疫分析。在竞争性免疫分析中,将标记形式的待测物质设置为与得自样本的(非标记)天然物质竞争。标记形式与天然物质竞争,以结合于固定量的捕获抗体 ;捕获抗体能够结合于标记物质和(非标记)天然物质,然而不是同时进行。根据被结合于捕获抗体的标记形式的物质或游离的(即未被结合于捕获抗体)标记形式的物质发出的可测信号测定得自样本的物质的未知浓度。

[0078] 在非竞争(夹心结构)免疫分析中,让待测物质接触捕获抗体和检测抗体,这些抗体通常在不同的表位结合于待测物质,或者在任何情况下能够同时结合于待测物质。可存在结合于待测物质的不同表位的多种类型的捕获抗体和 / 或结合于待测物质的不同表位的多种类型的检测抗体。检测抗体被标记,而捕获抗体通常被固定在或能够固定在固体支承物上。常规标记包括放射性标记、酶、发色团、荧光团、稳定的自由基和酶辅因子、抑制剂以及别构剂。

[0079] 免疫分析方法可采用任何适当的形式进行。它们可以在溶液中进行,在可溶组分与不可溶组分分离的试验装置中进行,或者在干式分析元件中进行。此类免疫分析形式包括(例如)酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫测定、点印迹(也称为狭缝印迹)等。免疫分析可以为异相或均相的。在异相免疫分析中,通常通过一个或多个洗涤步骤将结合的组分与游离的非结合的组分分离。在均相免疫分析中,不需要分离结合组分与游离组分。

[0080] 与免疫分析和免疫分析方法相关的出版物为数众多(“Practical Immunoassay”, Butt ed, Marcel Dekker, 1984(实用免疫分析, Butt 编著, Marcel Dekker, 1984年); “Immunochemistry of Solid Phase-Immunoassay”, Butler, CRC Press, 1991(固相免疫分析的免疫化学, Butler, CRC Press, 1991年); “Immunoassay”, Law ed, Taylor & Francis, 1996(免疫分析, Law 编著, Taylor & Francis, 1996年); “Immunoassay”, Eleftherios et al., Academic Press, 1996(免疫分析, Eleftherios 等人, Academic Press, 1996年);

“Principles and Practice of Immunoassay”, Second Edition, Price and Newman eds, Macmillan, 1997 (免疫分析原理与实践, 第二版, Price 和 Newman 编著, Macmillan, 1997 年); “Immunoassays in the Clinical Laboratory”, Nakamura et al. eds, Alan R Liss, Inc, 1979 (临床实验室免疫分析, Nakamura 等人编著, Alan R Liss, Inc, 1979 年); “Quantitative Enzyme Immunoassay”, Engvall et al. eds, Blackwell Scientific Publications, 1978 (定量酶免疫分析, Engvall 等人编著, Blackwell Scientific Publications, 1978 年); Sommer et al., Clin Chem 32:1770-1774, 1986 (Sommer 等人, 临床化学, 1986 年第 32 期第 1770-1774 页); “A Primer for Multilayer Immunoassay”, Berke, American Chemical Society Conference Proceeding, p303-312, Plenum Press, 1988 (多层免疫分析引物, Berke, American Chemical Society Conference Proceeding, 第 303-312 页, Plenum Press, 1988 年); US 4, 200, 690; US 4, 207, 307; US 4, 407, 943; US 4, 550, 075; US 4, 551, 426; US 4, 560, 648; US 5, 312, 744; US 5, 314, 830; US 5, 424, 220; US 5, 415, 998; US 5, 501, 949; US 5, 518, 887; US 5, 663, 054; US 5, 789, 261; US 5, 935, 780; US 5, 958, 339; US 6, 087, 188; US 6, 096, 563; US 6, 121, 006; US 6, 143, 575; US 6, 395, 503; US 6, 878, 515; US 6, 838, 250; US 4, 372, 745; US 4, 670, 381; US 4, 483, 921; US 4, 517, 288; US 4, 822, 747; US 4, 824, 778; US 4, 829, 012; US 4, 839, 299; US 4, 847, 194; US 4, 847, 195; US 4, 853, 335; US 4, 855, 226; US 4, 857, 453; US 4, 857, 454; US 4, 859, 610; US 4, 863, 876; US 4, 868, 106; US 4, 868, 130; US 4, 879, 219; US 5, 776, 933。

[0081] 有关于式免疫分析元件的详细信息可见于下列出版物及其中引用的参考文献: US 3, 867, 258、US 3, 992, 158、US 4, 042, 435、US 4, 050, 898、US 4, 066, 403、US 4, 153, 668、US 4, 258, 001、US 4, 292, 272、US 4, 430, 436。

[0082] 支承物可以为任何不溶的材料或可通过后续反应制成不溶的。可根据吸引和使捕获剂固定的内在能力选择支承物。作为另外一种选择, 可以在支承物上固定能够吸引和使捕获剂固定的交联剂。交联剂可以(例如)包括与捕获剂本身或捕获剂缀合的带电物质电荷相反的带电物质。通常, 交联剂可以为被固定到(连接到)支承物上的任何结合伴侣(优选地为特异性的), 并能够通过结合反应使捕获剂固定。交联剂能够使捕获剂在执行分析前或执行分析中间接地结合于支承物。支承物可以为(例如)塑料、衍生塑料、磁性或非磁性金属、玻璃或硅制成的(包括例如)试管、微孔、微量滴定孔、膜、板、珠、微粒、片和本领域普通技术人员已知的其他构型。支承物可以为在水性组合中不溶或基本上不溶的多孔或无孔材料。支承物能够以多种不同的形式和构型存在: 容器、管、微量滴定板、球、微粒、杆、带、滤纸、色谱纸、膜等。

[0083] 本发明的方法可适用于采用微粒技术的系统(包括自动和半自动系统), 其中固体支承物包括 US 5, 006, 309 和 US 5, 089, 424 中所述的微粒。

[0084] 在优选的形式中, 捕获剂连接到生物素并通过生物素结合于亲和素、链霉亲和素或其他生物素结合剂而被固定到微孔的内表面上。

[0085] 有许多专利公布涉及将分子结合于支承物。例如: US 4, 624, 930、US 5, 061, 640、US 4, 945, 042、US 4, 885, 255、US 5, 362, 624、US 5, 277, 589、US 5, 268, 306、US 5, 376, 557、US 5, 858, 803、US 5, 126, 241、US 5, 362, 655、US 5, 437, 981、US 5, 792, 606、US 5, 863, 740、US 5, 935, 780、US 6, 391, 571。

[0086] 在异相免疫分析中,可通过以下方法实现游离组分与结合组分的分离:让合适的液体洗涤溶液经过支承物;过滤离开支承物的可溶性游离组分;免疫沉淀游离组分,用诸如聚乙二醇或硫酸铵之类的物质进行沉淀;磁分离或结合于不同的支承物;等等。

[0087] 检测剂可以为直接可检测或间接可检测。它可以具有能够直接或间接发射信号的标签。合适的标签是本领域已知的,并包括(例如)辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光标记、可检测的示踪剂等等。标签可以为能够直接引发可检测信号(通常为光学信号:吸光度、反射率、发光和荧光)的化学实体。信号可源于放射性。它可以为伏安测量或电导测量的信号等。本身能够产生可测信号的可直接检测的标签可包括能够发出荧光或磷光的有机物和无机物,例如但不限于荧光素及其衍生物、N-(3-fluoranthyl)-马来酰亚胺、放射性核素(例如碳 14、氚、磷 32);偶氮-氧代(azo-oxo)、偶氮-双偶氮、吡嗪、噁嗪、噻嗪、喹啉、吲达胺、吡喃酮和吡啶酮染料。通常,标签可以为化学元素、化合物或蛋白。

[0088] 可间接检测的标签通常需要有用来产生可测信号的一种或多种附加物质存在。此类标记包括需要有底物、辅因子或金属存在的酶。例如,辣根过氧化物酶是一种需要电子供体和氧化剂来产生信号的标签;例如,需要鲁米诺和过氧化氢来产生化学发光,或需要三芳基咪唑和过氧化氢来产生染料。

[0089] 与一些优选实施例有关的捕获剂和/或检测剂是能够特异性结合于 sFlt-1、VEGF、PlGF 或包含 sFlt-1 和血管生成因子的络合物的试剂。一般而言,鉴于第一分子实体和第二分子实体能够结合而形成包含这两种分子实体的络合物,因此除非另外指明,否则写明结合或特异性结合于第一分子实体的捕获剂或检测剂能够结合于游离的第一分子实体并结合于当其被结合于络合物中的第二分子实体时的第一分子实体。类似地,除非另外指明,否则写明结合或特异性结合于第二分子实体的捕获剂或检测剂能够结合于游离的第二分子实体并结合于当其被结合于络合物中的第一分子实体时的第二分子实体。写明结合于络合物或特异性结合于络合物的捕获剂或检测剂不结合或基本上不结合于游离的第一分子实体或游离的第二分子实体。

[0090] 捕获剂和检测剂包括抗体或其片段、以及包含得自不同生物来源(例如人/小鼠、小鼠/山羊、人/山羊)的抗体片段的嵌合抗体。它们包括非抗体蛋白和肽,例如血管生成因子、血管生成受体和非蛋白结合剂。单克隆抗体或多克隆抗体或单克隆与多克隆抗体的组合代表了优选的捕获剂和检测剂。

[0091] 术语“样本”或“生物样本”包括来自活生物体或早先活的生物体的任何量的物质。此类生物包括但不限于人、小鼠、猴、大鼠、兔、马和其他动物。样本包括但不限于血液、血清、尿液、泪液、细胞、器官、组织、骨骼、骨髓、淋巴、淋巴结、滑膜组织、软骨细胞、滑膜巨噬细胞、内皮细胞和皮肤。

[0092] 分子络合物 - 适用于本发明的捕获和检测

[0093] 下面将根据对包含分子实体 F 和分子实体 P 的分子络合物 FP 的测定,象征性地描述多个免疫分析实施例。

[0094] 在一种免疫分析的实施例中,FP 可用对 F 具特异性的被固定的或可被固定的捕获剂来捕获。捕获剂能够结合于游离的 F 和络合物 FP 中的 F。“游离的”F 是指不结合于 P 但可被结合于其他分子实体的 F。检测用优选地由辣根过氧化物酶标记的检测剂进行,该检测剂特异性地结合于 P,并能够结合于游离的 P 和络合物 FP 中的 P。类似地,“游离的”P 是指

不被结合于F但可以结合于其他分子实体的P。在另一免疫分析实施例中,检测用优选地由辣根过氧化物酶标记的检测剂进行,该检测剂特异性地结合于络合物FP,而不结合或基本上不结合于游离的F或游离的P。

[0095] 在一个类似的免疫分析实施例中,可使用对P具特异性的被固定的或可被固定的捕获剂来捕获FP。捕获剂能够结合于游离的P和络合物FP中的P。检测用对F具特异性的检测剂进行,该检测剂能够结合于游离的F和络合物FP中的F。或者,可以用对络合物FP具特异性的检测剂进行检测,该检测剂不结合或基本上不结合于游离的F或游离的P。

[0096] 在另一免疫分析实施例中,可采用结合于络合物FP的被固定的或可被固定的捕获剂来捕获络合物FP,该捕获剂不结合或基本上不结合于游离的F或游离的P。采用对络合物FP也具特异性的检测剂进行检测,该检测剂不结合或基本上不结合于游离的F或游离的P。在该实施例中,捕获剂和检测剂结合于络合物FP的不同位点,或者在任何情况下能够同时结合于络合物FP。作为另外一种选择,可以采用对F具特异性的检测剂进行检测,该检测剂能够结合于游离的F或络合物FP中的F。或者,可以用对P具特异性的检测剂进行检测,该检测剂能够结合于游离的P或络合物FP中的P。或者,可以用对F具特异性的检测剂(能够结合于游离的F或络合物FP中的F)和对P具特异性的检测剂(能够结合于游离的P或络合物FP中的P)进行检测。

[0097] 在上述免疫分析实施例中,当期望或需要分离时,可以对非结合组分和结合组分进行分离。例如,当用对F具特异性的且能够结合于游离的F和络合物FP(从而捕获并使游离的F和络合物FP固定)的被固定的捕获剂来捕获FP,并且在捕获后用对P具特异性的且能够结合于游离的P和络合物FP的检测剂来检测FP时,将进行非结合组分与结合组分的分离(通常通过洗涤过程)。因此,结合的游离F和结合的FP被从非结合的游离F、非结合的FP和游离的P(P未被捕获,因而未结合)分离。然后引入检测剂,以便在无游离P(已在洗涤过程中除去)干扰的情况下结合于被捕获和被固定的络合物FP。

[0098] 可用于捕获和检测sFlt-1:PlGF络合物的抗体的例子包括但不限于:小鼠单克隆抗sFlt-1抗体RD-1-49560(R&D Systems)、3661-M16(R&D Systems)和4449-M24(R&D Systems);小鼠单克隆抗sFlt-1抗体RD-7-49566(R&D Systems)、小鼠单克隆抗sFlt-1抗体M14(Ortho-ClinicalDiagnostics)、小鼠单克隆抗PlGF抗体37203(R&D Systems)、大鼠单克隆抗PlGF抗体358932(R&D Systems)、大鼠单克隆抗PlGF抗体358905(R&D Systems)、单克隆抗体358932(R&D Systems)和261(OrthoClinical Diagnostics)。

[0099] 根据本发明,还提供了用于免疫分析实施例(即用于测定sFlt-1:PlGF络合物的存在或量)的组合物。该组合物包含:

[0100] a) 结合于PlGF的捕获剂和结合于sFlt-1和sFlt-1:PlGF络合物中的一者或两者的检测剂;或

[0101] b) 结合于sFlt-1的捕获剂和结合于PlGF和sFlt-1:PlGF络合物中的一者或两者的检测剂;或

[0102] c) 结合于sFlt-1:PlGF络合物的捕获剂和结合于sFlt-1:PlGF络合物的检测剂,其中捕获剂和检测剂能同时结合于该络合物;或

[0103] d) 结合于sFlt-1:PlGF络合物的捕获剂和结合于PlGF和sFlt-1中的一者或两者的检测剂。

[0104] 如本发明的方法中那样,捕获剂和检测剂中的一者或两者可以为多克隆抗体,或者捕获剂和检测剂中的一者或两者可以为单克隆抗体,或者捕获剂和检测剂中的一者或两者可以为单克隆抗体和多克隆抗体的组合。

[0105] 适用于本发明的分析校正和性能验证

[0106] 免疫分析需要校正和 / 或验证是否以规定的精度与准确度检测到目标被分析物。就测定络合物 FP 的免疫分析而言,可使用包含纯化形式的分子络合物 FP 的组合物进行这种校正和验证。在本发明的上下文中,术语“纯化”是指络合物 FP 已与游离的 F 和游离的 P 分离。络合物 FP 与游离的 F 和游离的 P 的分离可使用一种或多种熟知的方法进行,例如:依靠各组分对特异性结合伴侣的亲合力(例如,F 结合于(优选地固定的)P、P 结合于(优选地固定的)F)或各组分与其他结合伴侣的结合(例如,F 结合于(优选地固定的)抗 F 抗体、P 结合于(优选地固定的)抗 P 抗体、或 FP 结合于(优选地固定的)抗 FP 抗体)或各组分与其他类型的特异性结合伴侣的结合的方法(亲和色谱法);或者,通过离子交换色谱法、金属离子交换色谱法、配体交换色谱法或疏水色谱法;或者,依靠络合物及其分子实体组分之间的质量和 / 或大小差异和 / 或净电荷差异的方法。这类方法包括尺寸排阻色谱法、离心法、分子筛分法(例如膜过滤)和电泳法等等。

[0107] 如果络合物在分离和随后引入储存组合物(通常为液体制剂)的过程中稳定(其中稳定意味着在这些过程中不易分离而形成大量游离的 F 和游离的 P),则将包含该络合物的组合物置于适当的条件下以更长时间地保持稳定性。例如,当组合物为液态时,可以将其储存在小于或等于约 4°C 的低温下;或者将液体组合物在低于 0°C 的温度下冷冻并保持固态;或者可以将其冻干并在适当的温度(甚至可以大于约 20°C)下保持冻干状态。从贮存库取出后(必要时在解冻或复水之后),组合物应当在用于分析校正或验证的条件下在可接受的时间段内稳定。

[0108] 可以制备络合物的改性形式,其中 F 和 P 彼此共价结合(例如,sFlt-1 共价结合于 PlGF)。在解离而形成游离的 F 和游离的 P 方面,此共价改性形式的 FP 将是稳定的。优选地,改性的共价络合物 FP 和非共价络合物 FP 相对于捕获剂和检测剂具有基本上相同或相似的结合特性。如果改性的、共价形式的 FP 和未改性的、非共价形式或天然形式的络合物 FP 相对于捕获剂和检测剂不具有基本上相同或足够相似的结合特性,则可以如分析技术中所公知的,应用合适的数学校正来补偿结合特性的差异。在本发明的上下文中,应当理解 FP 的“形式”这一术语应涵盖完整的、非共价的、从合适来源(例如人血清、胎盘组织或体液等)纯化 / 分离的天然 FP、由天然 F 和天然 P 或天然 F 和重组 P 或重组 F 和重组 P 制备的非共价 FP 以及由天然 F 和天然 P 或天然 F 和重组 P 或重组 F 和重组 P 制备的改性的、共价结合的 FP(F 和 P 彼此共价结合)。

[0109] 根据本发明的这个方面,还提供了包含纯化形式的 sFlt-1:PlGF 络合物的组合物。sFlt-1:PlGF 络合物的 sFlt-1 和 PlGF 中的一者或两者可以为天然的,或者 sFlt-1:PlGF 络合物的 sFlt-1 和 PlGF 中的一者或两者可以为重组的。

[0110] 预测、检测 / 诊断、监测适用于本发明的疾病

[0111] 常规的做法是:通过测定采自个体的生物样本中单种物质(标记物 / 生物标记物)的存在或量,确定个体是否患有特定疾病(检测 / 诊断),是否可能患病(预测),以及确定疾病的进展(监测)或个体是否对治疗做出响应(监测)。

[0112] 例如,为了确诊是否患有糖尿病或监测对诊断为患有糖尿病的个体的疗效,常常测定个体尿液或血清样本中葡萄糖(定性分析)的存在或葡萄糖的量(定量分析)。在定性和定量分析中将形成与样本中的葡萄糖量成比例的光学信号,通常为比色信号。在一类比色测定中,可通过定性的方式在视觉上确定形成的染料的数量或色强度(染料密度)。作为另外一种选择,利用合适的仪器测量染料密度并为其赋值可以更准确和精确地测定染料的数量和色强度。通常将视觉测定的由个体生物样本产生的染料密度与参考染料密度标度或染料密度范围进行比较,其中参考染料密度标度或染料密度范围包含与非糖尿病和糖尿病患者相关的染料密度标度或范围。通常将定量的染料密度与具有类似关联性的参考数值或参考数值范围进行比较。

[0113] 相对于特定疾病的基准值或参考范围通常从诊断为未患该特定疾病的人群(正常人群)和诊断为患有该特定疾病的人群中获得。基准值或参考范围可以包括与疾病的不同阶段相关的数值或测量值。可以将得自样本的结果与这些基准值或参考范围进行比较,从而检测/诊断或监测疾病。就单独或结合生理属性(下文讨论)的多个生物标记物而言,基准值和基准值范围也可以与不同形式、起源、原因等的疾病(其形式、起源、原因等响应不同的治疗)相关联。可以将得自样本的结果与这些基准值或参考范围进行比较,从而可被告知或指导对个体的治疗方法。

[0114] 除非另外指明,否则术语“基准值”、“基准值范围”等旨在涵盖定量或数值基准群体测量和定性或视觉基准群体测量,例如染料密度标度、色彩或色调标度等。

[0115] 使用单个生物标记物检测和监测疾病的常规做法已经并将继续作为临床医生及其服务的患者的有用工具。通常,已知不止一种的生物标记物与某一疾病相关。例如,糖基化血红蛋白也与糖尿病相关。在采自诊断患有糖尿病的个体的样本中,测定葡萄糖和糖基化血红蛋白的量可以提供关于个体疾病状态或除测定之外的疗效的更多信息。通过测定多个生物标记物不仅可以改善对疾病的诊断和监测,而且还可以让临床医生确定个体患病的可能性或概率或是否处于临床评估不能提供信息的疾病阶段。对多个生物标记物的测定还可用于指导治疗,让临床医生能够辨别不同形式或阶段的疾病,从而可以采用适当的治疗措施对个体进行治疗。对多个生物标记物的测定可与个体的一个或多个生理属性结合使用,以进一步改善预测效果、诊断效果并有助于选择适当的疗法。

[0116] 此类附加的多个生物标记物在本文中称为是一个或多个分子实体。就 sFlt-1:PlGF 络合物检测而言,此类分子实体包括但不限于内皮糖蛋白、可溶性内皮糖蛋白、肌酸酐、c-反应蛋白、尿蛋白、胎盘蛋白 13、人绒毛膜促性腺激素或 α -胎蛋白和肝酶,例如天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶和 γ -谷氨酰转移酶。如本文所用,VEGF 可以包括 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF_{165b}、VEGF₁₆₇、VEGF₁₈₃、VEGF₁₈₆、VEGF₁₈₉ 或 VEGF₂₀₆。

[0117] 在本发明的优选实施例中,检测 sFlt-1:PlGF 络合物,疾病为先兆子痫或先兆子痫相关疾病,指导治疗、预测、检测或监测均在妊娠期的前 15 周或妊娠期的前 20 周或妊娠期的前 30 周或更多周进行。

[0118] 可使用数学运算和算法将两个或更多个生物标记物的量转化为一个或多个转换结果。此类数学运算可以包括:计算分子实体测定值与 sFlt-1:PlGF 络合物测定值的比率或 sFlt-1:PlGF 络合物测定值与分子实体测定值的比率。转换结果可以比直接的基于浓度

的结果提供更多的信息。将与个体的一个或多个生理属性结合的一种或多种生物标记物的测定值转化为一个或多个转换结果的数学运算或算法也可用于改善对治疗的指导、对疾病的预测、检测/诊断和监测。生理属性包括但不限于：胎龄、种族、性别、年龄、血压和身体质量指数。它们可以单独地或以任何组合与一个或多个生物标记物一起使用。

[0119] 介绍数学运算和算法及其在临床诊断中的应用的专利和非专利出版物有很多。例如,美国专利申请公开 No 2006/381104、美国专利申请公开 No 2003/700672、美国专利申请公开 No 2003/410572、美国专利申请公开 No 2003/634145、美国专利申请公开 No 2005/323460、PCT 国际专利公开 No WO 2007/044860、美国专利申请公开 No 2002/330696、美国专利申请公开 No 2002/331127、美国专利申请公开 No 1997/912133、美国专利 No6, 306, 087、美国专利 No 6, 248, 063 和美国专利 No 5, 769, 074。

[0120] 实例 I

[0121] sFlt-1:PlGF 络合物的检测分析

[0122] 在本实例中,描述了用于测定样本中 sFlt-1:PlGF 络合物的量的免疫测定法,并示出了 sFlt-1:PlGF 络合物作为先兆子痫的诊断指标的效用。

[0123] 利用图 1 所示的免疫分析形式捕获和检测 sFlt-1:PlGF 络合物。利用生物素化大鼠的抗 PlGF 抗体捕获样本中的 sFlt-1:PlGF 络合物。通过将生物素结合于包被在反应器表面上的链霉亲和素,以固定抗 PlGF 抗体捕获的 sFlt-1:PlGF 络合物。游离的 sFlt-1 和 sFlt-1:VEGF 络合物未被生物素化抗 PlGF 捕获剂来捕获,将在洗涤过程中与其他未结合的物质一起除去。通过使用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 sFlt-1 抗体通过发光来检测络合物。由结合的 HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体产生的发光信号与样本中存在的 sFlt-1:PlGF 的浓度成正比。由生物素化抗 PlGF 捕获剂来捕获的任何游离的 PlGF 都不与 HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体形成夹心结构,并且也不被测量。

[0124] 免疫分析中使用的材料包括:

[0125] 1. 生物素试剂:pH 缓冲含水组合中浓度为 2.25 μ g/mL 的生物素化抗 PlGF 抗体。能够结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的生物素化抗 PlGF 抗体包括但不限于 Ortho-Clinical Diagnostic 的小鼠单克隆抗体 OCD-261 和得自 R&D Systems (Minneapolis, Minnesota) 的大鼠单克隆抗体 358905 及 358932。

[0126] 2. 酶联物:pH 缓冲含水组合中浓度为 1.125 μ g/mL 的 HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体。不影响将 VEGF 或 PlGF 结合于 sFlt-1 的 HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体包括但不限于: Ortho-Clinical Diagnostic 的克隆号为 3661-M16 和 4449-M24 的小鼠单克隆抗体以及 R&D Systems 的单克隆抗体 49560。

[0127] 3. 通过将纯化的 sFlt-1:PlGF 络合物加到马血清中制备校准液(其中,如上所述,“纯化的 sFlt-1:PlGF 络合物”表示该络合物已与游离的 sFlt-1 和游离的 PlGF 分离)。将得自 R&D Systems(目录号:264-PG)的 10 倍摩尔过量的重组人 PlGF 在 20°C 下温育 20min,然后在 2-8°C 下用得自 Scios (Scios Inc., Mountain View, California) 的全长 sFlt-1 (687 个氨基酸)在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中过夜温育。采用尺寸排阻色谱法将 sFlt-1:PlGF 络合物在通过含 0.25M 乙醇胺的磷酸盐缓冲液 (pH8.5) 平衡的 Superdex 200 柱上与游离的 PlGF 分离。将包含络合物的馏分合并,并使用离心浓缩装置浓缩。然后将浓缩的合并络合物透析到 pH7.4 的 PBS 中。

[0128] 在马血清 (GIBCO, 目录号 26050) 中稀释纯化的 sFlt-1:PlGF 络合物得到不同的浓度, 以提供校准液 CR1 至 CR10, 这一系列校准液的 sFlt-1:PlGF 络合物浓度范围在 0.0 和 25,000pg/mL 之间。

[0129] 4. 反应器为链霉亲和素包被的微孔 (SAC 孔)。

[0130] 免疫分析方案

[0131] 免疫分析方案如下:

[0132] 将样本 (80 μ L) 与 80 μ L 生物素试剂在 SAC 孔中结合, 并将混合物在 37°C 下温育 21 分钟。温育之后使用 VITROS ECi 通用洗涤试剂进行洗涤。洗涤步骤之后, 将酶联物 (160 μ L) 加入 SAC 孔, 并在 37°C 下温育 21 分钟。温育之后使用 VITROS ECi 通用洗涤试剂进行二次洗涤。然后加入包含发光试剂的 VITROS ECi 信号试剂并温育 5 分钟。温育之后采集发光信号。

[0133] 评估 sFlt-1:PlGF 络合物测定的分析和临床效果。结果如表 1-6 和图 2-4 所示。在表 1 中示出了使用校准液 (包含 sFlt-1:PlGF 络合物) 获得的信号响应, 以分析仪光单位 (ALU) 表示。表 1 的数据以剂量反应曲线在图 2 中示出。使用包含不同浓度的游离 sFlt-1 或游离 PlGF (而非 sFlt-1:PlGF 络合物) 的样本来代替检测分析中包含 sFlt-1:PlGF 络合物的样本, 进行交叉反应性研究, 从而提供证明检测分析中只检测到 sFlt-1:PlGF 络合物 (而非游离 sFlt-1 或游离 PlGF) 的证据。研究结果在表 2 和表 3 中给出, 从表中数据可以看出, 游离的 sFlt-1 和游离的 PlGF 并未表现出明显的响应。

[0134] 使用上述检测分析法, 对得自诊断为患有先兆子痫或未患先兆子痫 (正常) 的妊娠期中三个月或末三个月孕妇的血清样本进行 sFlt-1:PlGF 络合物的分析。结果汇总于表 4 中。图 3 示出了结果的点图, 从图中可以看出, 存在于正常群体血清样本中的 sFlt-1:PlGF 络合物浓度通常低于并明显有别于来自诊断为患有先兆子痫的群体的血清样本中的浓度。对数据进行接受者操作特性 (ROC) 分析。ROC 曲线下面积 (表 5) 为 0.783, 这证明 sFlt-1:PlGF 络合物是检测 / 诊断先兆子痫的可用生物标记物。

[0135] 对于每个样本, 计算了样本中 sFlt-1:PlGF 络合物的含量与样本中游离 PlGF 的含量的比率, 并与使用游离 PlGF 分析测定的游离 PlGF 的量进行比较。结果在表 4 中给出。每个样本的比率 (sFlt-1:PlGF 络合物 / 游离 PlGF) 与临床诊断的关系点图在图 4 中示出。正常群体样本的计算比率通常低于并明显有别于先兆子痫群体样本的计算比率。ROC 曲线下面积 (表 6) 为 0.889, 这证明 sFlt-1:PlGF 络合物 / 游离 PlGF 的比率也是先兆子痫的可用标记物。

[0136] 实例 II

[0137] 使用抗 sFlt-1 捕获剂进行的 sFlt-1:PlGF 络合物 ELISA 检测

[0138] 本实例中描述了 ELISA 方法在测定 sFlt-1:PlGF 络合物时的用途。在该检测分析法中, 使用抗 sFlt-1 抗体捕获游离的 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物, 并使用标记的抗 PlGF 抗体检测 sFlt-1:PlGF 络合物。

[0139] 板包被

[0140] 将 Costar 96 孔微量滴定高结合力板用含 1 μ g/mL 抗 sFlt-1 抗体 49560 (R&D Systems) 的 10mM 磷酸盐与 2mM EDTA 的溶液 (pH7.0) 包被, 每孔 100 μ L, 然后在 25°C 下温育 18 小时。用含 0.05% TWEEN-20 的 PBS 将孔洗涤一次, 然后加入 290 μ L/ 孔的封闭缓冲

液 (1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液溶液, pH 7.0), 接着在 25°C 下温育 1 小时。吸出孔内的液体并在低湿度恒温箱中干燥 4 小时, 然后密封在气密袋中待用。

[0141] ELISA 方法

[0142] 将一系列包含恒定量的重组 sFlt-1 (纯化的重组 sFlt-1, Scios; 在昆虫细胞中表达; 对应于 687 个氨基酸的全长可溶 fms 样酪氨酸激酶 1) 和变化量的重组 PlGF (149 个氨基酸; PlGF-1; 在大肠杆菌中表达; R&D Systems, 目录号: 264-PG/CF) 的样本一起在样本稀释液 (含 0.05% TWEEN-20 的酪蛋白 PBS 缓冲系统封闭液, Pierce) 中温育, 以形成 sFlt-1:PlGF 络合物。将 100 μ L 的各预温育样本加入微量滴定孔。将 100 μ L 的样本稀释液加入至少一个孔中, 以作为对照。将孔在 37°C 下振荡温育 15 分钟。用洗涤缓冲液 (含 0.05% TWEEN-20 的 PBS) 将板洗涤 6 次, 除去未结合的物质。如表 7 所示, 加入 100 μ L/孔的特异性 HRP 标记的抗体 (含 0.05% TWEEN-20 的 1 μ g/mL 酪蛋白 PBS 缓冲系统封闭液), 分别测量抗 sFlt-1 抗体包被板中的总 sFlt-1、游离 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物。加入各检测抗体后, 将板在 37°C 下振荡温育 15 分钟。将板用洗涤缓冲液洗涤 6 次。向每个孔内加入 100 μ L 的邻苯二胺 (OPD) 底物试剂, 并在 25°C 下于黑暗中温育 30 分钟。向每个孔内加入 25 μ L 终止液, 获取 492nm 波长上的吸光度。(HRP 底物、OPD 试剂和终止液得自 Ortho-ClinicalDiagnostics, Inc. (Raritan, New Jersey, USA))。

[0143] ELISA 结果 - 总 sFlt-1

[0144] 表 8 给出了每个样本在 492nm 下获得的吸光度。HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体 M14 (Ortho-Clinical Diagnostics) 既与游离的 sFlt-1 结合也与 sFlt-1:PlGF 络合物结合, 因而检测到游离的 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物中的 sFlt-1。如表 8 所示, 总 sFlt-1 (游离的 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物的观察到的信号总和) 的信号响应为恒定的, 与 PlGF 浓度无关。

[0145] ELISA 结果 - 游离的 sFlt-1

[0146] HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体 49566 (R&D Systems) 结合于游离的 sFlt-1, 但不结合于 sFlt-1:PlGF 络合物, 因而只检测到游离的 sFlt-1。当 PlGF 浓度从 0 增至 2000pg/mL 时, 观察到的信号响应降低 (表 8)。这是意料之中的: 因为当 PlGF 浓度增加时, 将形成更多的 sFlt-1:PlGF 络合物, 而游离的 sFlt-1 的浓度则降低。

[0147] ELISA 结果 - sFlt-1:PlGF 络合物

[0148] HRP 标记的抗 PlGF 抗体 358905 (R&D Systems) 结合于 PlGF, 因而只检测到在 sFlt-1:PlGF 络合物中结合的 sFlt-1。表 8 示出了当 PlGF 浓度从 0 增至 2000pg/mL 时信号响应增加。

[0149] 表 8 提供的这些结果表明, 通过利用抗 sFlt-1 抗体捕获包含 sFlt-1 的分子种类的 ELISA 形式, 可以测量总 sFlt-1、游离的 sFlt-1 和 sFlt-1:PlGF 络合物。

[0150] 通过上述方法捕获 sFlt-1 和检测 PlGF, 可以测定样本中 sFlt-1:PlGF 络合物的存在或量, 并且可以利用如此获得的测量结果 (单独地或结合附加的化学和 / 或物理生物标记物) 作为先兆子痫的诊断指标。

[0151] 使用抗 PlGF 捕获剂进行 sFlt-1:PlGF 络合物的 ELISA 检测

[0152] 在另一 ELISA 方法中, 用抗 PlGF 抗体捕获游离的 PlGF 和 sFlt-1:PlGF 络合物。用标记的抗 sFlt-1 抗体检测 sFlt-1:PlGF 络合物。

[0153] 板的包被

[0154] 将 Costar 96 孔微量滴定高结合力板用含 $0.8 \mu\text{g/mL}$ 抗 P1GF 抗体 358932 (R&D Systems) 的 10mM 磷酸盐与 2mM EDTA 的溶液 ($\text{pH}7.0$) 包被, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 然后在 25°C 下温育 18 小时。用含 0.05% TWEEN-20 的 PBS 将孔洗涤一次, 然后加入 $290 \mu\text{L}$ 孔的封闭缓冲液 (1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液溶液, $\text{pH} 7.0$), 接着在 25°C 下温育 1 小时。吸出孔内的液体并在低湿度恒温箱中干燥 4 小时, 然后密封在气密袋中待用。

[0155] ELISA 方法

[0156] 将表 9 中所示的一系列包含恒定量的重组 P1GF (序列标识号 :2 ;在大肠杆菌中表达 ;R&D Systems, 目录号 :264-PG/CF) 和变化量的重组 sFlt-1 (687 个氨基酸的全长可溶 fms 样酪氨酸激酶 ;在昆虫细胞中表达 ;Scios, Inc.) 的样本一起在样本稀释液 (含 0.05% TWEEN-20 的酪蛋白 PBS 缓冲系统封闭液, Pierce) 中温育, 以形成 sFlt-1:P1GF 络合物 ;将混合物加入包被孔中, 并将板在 37°C 下振荡温育 15 分钟。用温和的含去垢剂缓冲液洗涤滴定板, 以除去未结合的物质。按表 7 所示, 加入 $100 \mu\text{L}$ 孔的特异性 HRP 标记抗体 (含 0.05% TWEEN-20 的 $1 \mu\text{g/mL}$ 酪蛋白 PBS 缓冲系统封闭液, Pierce), 分别测量抗 P1GF 抗体包被板中的总 P1GF、游离 P1GF 和 sFlt-1:P1GF 络合物。加入每种检测抗体后, 将板在 37°C 下振荡温育 15 分钟。将板用洗涤缓冲液洗涤 6 次。加入 $100 \mu\text{L}$ 孔的 OPD HRP 底物试剂并在 25°C 下于黑暗中温育 30 分钟之后, 进行比色反应。加入 $25 \mu\text{L}$ 孔的终止液并获取 492nm 波长上的吸光度。(HRP 底物、邻苯二胺试剂和终止液得自 Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Raritan, New Jersey, USA))。

[0157] ELISA 结果 - 总 P1GF

[0158] 表 9 列出了各特异性反应后每个样本在 492nm 波长上的吸光度。HRP 标记的抗 P1GF 抗体 358905 (R&D Systems) 既结合于游离的 P1GF 也结合于 sFlt-1:P1GF 络合物, 因而检测到游离 P1GF 和 sFlt-1:P1GF 络合物中的 P1GF。表 9 中的总 P1GF 响应列示出了 P1GF 浓度为 2000pg/mL 的样本的响应保持恒定, 而不论 sFlt-1 浓度为多少。

[0159] ELISA 结果 - 游离的 P1GF

[0160] HRP 标记的抗 P1GF 抗体 37203 (R&D Systems) 结合于游离的 P1GF, 但不结合于 sFlt-1:P1GF 络合物, 因而只检测到游离的 P1GF。表 9 显示, 当 sFlt-1 浓度从 0 增至 2000pg/mL 时, 信号响应降低。当游离的 P1GF 结合于 sFlt-1 时, 游离 P1GF 分子的浓度应降低, 而 sFlt-1:P1GF 络合物的浓度应增加。

[0161] ELISA 结果 - sFlt-1:P1GF 络合物

[0162] HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体 M14 (Ortho-Clinical Diagnostics) 结合于 sFlt-1 并结合于 sFlt-1:P1GF 络合物, 因而只有作为 sFlt-1:P1GF 络合物捕获的 P1GF 被检测到。表 9 显示当 sFlt-1 浓度从 0 增至 2000pg/mL 时信号响应增加。

[0163] 表 9 中所列的结果表明, 通过用抗 P1GF 抗体捕获所有 P1GF 种类并独立地检测每项指标的 ELISA 形式, 可以测量总 P1GF、游离 P1GF 和 sFlt-1:P1GF 络合物。当将浓度渐增的 sFlt-1 加入浓度恒定的 P1GF 中时, 游离 P1GF 的响应降低, 而 sFlt-1:P1GF 络合物的响应增加, 这可以通过 492nm 波长上的吸光度变化来反映。

[0164] 通过上述方法捕获 P1GF 和检测 sFlt-1, 可以测定样本中是否存在 sFlt-1:P1GF 络合物及其量, 并且可以利用如此获得的测量结果 (单独地或结合附加的化学和 / 或物理生

物标记物) 作为先兆子痫的诊断指标。

[0165] 实例 III

[0166] sFlt-1:PlGF 络合物、总 sFlt-1、游离 PlGF

[0167] 胎龄:第 27-37 周

[0168] 总 sFlt-1 和游离 PlGF 的检测分析

[0169] 总 sFlt-1 和游离 PlGF 的检测分析使用目录号分别为 DVR100B 和 DPG00 的 R&D Systems Quantikine® 试剂盒进行。按照这些产品的 R&D Systems 包装说明书中介绍的方案进行检测分析。

[0170] sFlt-1:PlGF 络合物检测分析

[0171] 如实例 I 中那样,利用图 1 所示的免疫分析形式捕获和检测 sFlt-1:PlGF 络合物。

[0172] 免疫分析中使用的材料包括:

[0173] 1. 生物素试剂:pH 缓冲含水组合物中浓度为 6.0ug/mL 的生物素化抗 PlGF 抗体 (Ortho Clinical Diagnostics 小鼠单克隆抗体 OCD-261)。能够结合于 sFlt-1:PlGF 络合物的其他生物素化抗 PlGF 抗体得自 R&D Systems (Minneapolis, Minnesota)。

[0174] 2. 酶联物:pH 缓冲含水组合物中浓度为 4.5 μg/mL 的 HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体。不影响将 VEGF 或 PlGF 结合于 sFlt-1 的 HRP 标记的抗 sFlt-1 抗体包括但不限于: Ortho-Clinical Diagnostic 的克隆号为 3661-M16 和 4449-M24 的小鼠单克隆抗体以及 R&D Systems 的单克隆抗体 49560。

[0175] 3. 将纯化的 sFlt-1:PlGF 络合物加入到马血清中制备校准液(其中,如上所述,“纯化的 sFlt-1:PlGF 络合物”表示该络合物已与游离的 sFlt-1 和游离的 PlGF 分离)。将得自 R&D systems 的 10 倍摩尔过量的重组人 PlGF(目录号:264-PG) 在 20°C 下温育 20min,然后在 2-8°C 下用全长 sFlt-1(687 个氨基酸)(Scios Inc., Mountain View, California USA) 在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中过夜温育。采用尺寸排阻色谱法将 sFlt-1:PlGF 络合物在通过含 0.25M 乙醇胺的磷酸盐缓冲液(pH8.5)平衡的 Superdex 200 柱上与游离的 PlGF 分离。将包含络合物的馏分合并,并使用离心浓缩装置浓缩。然后将浓缩的合并络合物透析到 pH 7.4 的 PBS 中。

[0176] 在马血清(GIBCO, 目录号 26050)中以不同的浓度稀释纯化的 sFlt-1:PlGF 络合物,以提供校准液 CR1 至 CR10,这一系列校准液的 sFlt-1:PlGF 络合物浓度范围在 0.0 和 25,000pg/mL 之间。

[0177] 4. 反应器为用链霉亲和素包被的微孔(SAC 孔)。

[0178] 免疫分析方案

[0179] 免疫分析方案如下:

[0180] 将样本(80 μL)与 35 μL 生物素试剂和 35 μL 酶联物在 SAC 孔中结合,并将混合物在 37°C 下温育 21 分钟。温育后使用 VITROS Eci 通用洗涤试剂进行洗涤。在洗涤步骤后加入 VITROS Eci 信号试剂并温育 5 分钟。温育后采集发光信号。

[0181] 按照 R&D Systems 的 ELISA 检测分析方案双份地分析每个患者样本的 PlGF-1 和 sFlt-1。使用如上所述的 sFlt-1:PlGF-1 络合物分析程序对每个患者样本进行 sFlt-1:PlGF-1 络合物的单个分析。每个患者样本的 R&D Systems 双份分析结果的平均值和 sFlt-1:PlGF-1 络合物分析结果在表 10 的上部给出。采集样本时的胎龄在表 10 的第 2

列给出。按照美国妇产科学会 (ACOG) 指南在接近采集样本时确定的诊断结果见第 3 列。ROC 曲线下面积测定结果在表 10 的底部给出, 具体为 :PIGF-1 分析 (0.8796)、sFlt-1 分析 (0.7994)、sFlt-1:PIGF 络合物分析 (0.7654)、sFlt-1/PIGF 比率 (0.8519) 和 sFlt-1:PIGF 络合物 /PIGF 比率 (0.8642)。这些数据表明, 对于 27 至 37.4 周的胎龄, sFlt-1:PIGF 络合物分析单独地或作为与游离 PIGF 分析的比率, 在其临床效果方面与测量总 sFlt-1 的分析的效果相当。

[0182] 实例 IV

[0183] sFlt-1:PIGF 络合物、sFlt-1、PIGF

[0184] 胎龄 :第 13-21 周

[0185] 如本实例所证明的那样, 相比妊娠早期总 sFlt-1 或总 sFlt-1 与游离 PIGF 的比率, 对 sFlt-1 :血管生成因子络合物的存在或其量的评估对于先兆子痫的诊断和预测显示出优越的临床效用。类似地, 与游离 PIGF、总 sFlt-1 或总 sFlt-1 与游离 PIGF 的比率相比, sFlt-1:PIGF 络合物与游离 PIGF 的比率对于先兆子痫的诊断和预测具有更优越的临床效用。

[0186] 像实例 III 中一样, 按照 R&D Systems ELISA 检测分析方案对每个患者样本双份地进行游离 PIGF 和总 sFlt-1 的测定, 并使用络合物分析程序对每个患者样本进行 sFlt-1:PIGF 络合物的单个分析。结果在表 11 中示出。采集样本时的胎龄在表 11 的第 2 列给出。按照 ACOG 指南进行诊断, 并在 ICD-9 编码标号的基础上给出轻度和重度先兆子痫的赋值。这些数据在表 11 的第 3 和 4 列中列出。采集之后, 将血样存档以备日后分析 ; 在第 21 周与产后之间进行诊断。

[0187] 测定 ROC 曲线下面积, 结果在表 12 中给出。最上面的数据图 (轻度或重度 PE) 中给出的结果基于妊娠期第 13-21 周采集的 94 个患者样本。轻度和重度先兆子痫的诊断结果在 ROC 分析中组合为先兆子痫阳性。ROC 曲线下面积的计算结果如下 :游离 PIGF 分析 (0.5745)、总 sFlt-1 分析 (0.5029)、sFlt-1:PIGF 络合物分析 (0.6331)、总 sFlt-1/ 游离 PIGF 比率 (0.5396) 和 sFlt-1:PIGF 络合物 / 游离 PIGF 比率 (0.6392)。这些结果表明, 总 sFlt-1、游离 PIGF 和总 sFlt-1/ 游离 PIGF 比率不适用于在妊娠早期预测或检测先兆子痫。然而, sFlt-1:PIGF 络合物和 sFlt-1:PIGF 络合物 / 游离 PIGF 的比率结果表明, 它们能够在临床上辨别随后发展到轻度或重度先兆子痫的受试者与未发展下去的受试者。

[0188] 中间数据图 (重度 PE, 轻度 PE = 正常) 给出的结果基于相同的 94 个患者样本 ; 然而, 在 ROC 分析过程中, 轻度先兆子痫的诊断结果重新划分为正常。ROC 曲线下面积如下 :游离 PIGF 分析 (0.7142)、总 sFlt-1 分析 (0.5622)、sFlt-1:PIGF 络合物分析 (0.6942)、总 sFlt-1/ 游离 PIGF 比率 (0.6771) 和 sFlt-1:PIGF 络合物 / 游离 PIGF 比率 (0.7445)。这些结果表明, 与总 sFlt-1 相比, 在预测先兆子痫发作方面 sFlt-1:PIGF 络合物单独地或与游离 PIGF 结合作为比率形式具有更优越的临床能力。

[0189] 最下面的数据图中提供的 ROC 分析结果仅基于妊娠期第 16-21 周采集的那些患者样本, 这些患者被诊断为正常 (分析中将轻度先兆子痫划为正常), 或者被诊断为患有重度先兆子痫。ROC 曲线下面积如下 :游离 PIGF 分析 (0.7394)、总 sFlt-1 分析 (0.5455)、sFlt-1:PIGF 络合物分析 (0.7636)、总 sFlt-1/ 游离 PIGF 比率 (0.6848) 和 sFlt-1:PIGF 络合物 / 游离 PIGF 比率 (0.8707)。结果表明, 与总 sFlt-1 相比, 在预测先兆子痫发作方面

sFlt-1:PIGF 络合物单独地或作为比率具有更优越的效果。

[0190] 虽然已经示出了本发明的具体实施例,但是本发明并不局限于此,因为本领域的技术人员可以对这些实施例进行修改,尤其是按照上述教导进行修改。在不脱离本发明精神的情况下,可以在本发明的上述公开范围内进行合理的变型和修改。

[0191] 本发明引用的所有文档(包括已公布的专利申请、授权专利和非专利出版物)的主题和这些文档中引用的所有参考文献的主题均以引用方式并入本文中。

[0192] 表 1

[0193] 剂量 - 反应结果

| | sFlt-1: PIGF 络合物校准液 ID | sFlt-1:PIGF 络合物浓度 (pg/mL) | 信号 (ALU) |
|--------|------------------------|---------------------------|----------|
| [0194] | CR1 | 0 | 14.7 |
| | CR2 | 75.0 | 20.8 |
| | CR3 | 188 | 37.3 |
| | CR4 | 375 | 76.3 |
| [0195] | CR5 | 750 | 165 |
| | CR6 | 1500 | 365 |
| | CR7 | 3125 | 869 |
| | CR8 | 6250 | 1723 |
| | CR9 | 12500 | 3628 |
| | CR10 | 25000 | 7292 |

[0196] 表 2

[0197] 游离 sFlt-1 的交叉反应性

[0198]

| sFlt-1 浓度 (pg/mL) | 样本 ID | 信号 (ALU) | 预测浓度 (pg/mL) | %交叉反应性 |
|-------------------|-------|----------|--------------|--------|
| 0 | S R1B | 15.36 | 29.33 | 不适用 |
| 0 | S R1H | 11.02 | 6.181 | 不适用 |
| 100 | S R2 | 12.24 | 13.52 | 13.5 |
| 500 | S R3 | 6.96 | 0.00 | 0.0 |
| 1000 | S R4 | 11.57 | 9.614 | 1.0 |
| 2000 | S R5 | 16.30 | 33.56 | 1.7 |
| 10000 | S R6 | 22.29 | 57.23 | 0.6 |
| 20000 | S R7 | 13.19 | 18.68 | 0.1 |
| 40000 | S R8 | 17.78 | 39.84 | 0.1 |
| 80000 | S R9 | 33.82 | 95.54 | 0.1 |
| 160000 | S R10 | 60.84 | 174.5 | 0.1 |

[0199] 表 3

[0200] 游离 P1GF 的交叉反应性

[0201]

| PIGF 浓度 (pg/mL) | 样品 ID | 信号 (ALU) | 预测浓度 (pg/mL) | %交叉反应性 |
|--------------------|----------|-------------|-----------------|--------|
| 0 | P R1S | 14.97 | 27.5 | 不适用 |
| 0 | P R1B | 18.60 | 43.2 | 不适用 |
| 56 | P R2 | 11.56 | 9.57 | 17.1 |
| 112 | P R3 | 12.49 | 14.9 | 13.3 |
| 446 | P R4 | 10.24 | 1.04 | 0.2 |
| 1115 | P R5 | 10.57 | 3.28 | 0.3 |
| 2231 | P R6 | 10.45 | 2.48 | 0.1 |
| 11154 | P R7 | 11.46 | 8.91 | 0.1 |
| 22307 | P R8 | 21.67 | 54.9 | 0.2 |

[0202] 表 4

[0203] 患者结果 :sFlt-1:PIGF 络合物、游离 P1GF 和 sFlt-1:PIGF 络合物 / 游离 P1GF 比
率

[0204]

| 样本 ID | 采集时的胎龄 (周) | 诊断 | 分类 (1=先兆子痫, 0=正常) | sFlt-1: PIGF 络合物浓度 (pg/mL) | 游离 PIGF 浓度 (pg/mL) | sFlt-1: PIGF 络合物/游离 PIGF 比率 |
|-------|------------|----------------|-------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|
| N47 | 23 3/4 | 先兆子痫 | 1 | 316 | 23.3 | 13.6 |
| N49 | 35 | 先兆子痫 | 1 | 3553 | 72.4 | 49.1 |
| N50 | 30 6/7 | 先兆子痫 | 1 | 1421 | 6.16 | 230.7 |
| N51 | 21 1/2 | 先兆子痫, 伴有 HELLP | 1 | 717 | 5 | 143.3 |
| N52 | 33 4/7 | 先兆子痫 | 1 | 79 | 4.02 | 19.6 |
| N53 | 25 3/7 | 先兆子痫, 伴有 HELLP | 1 | 432 | 5 | 86.4 |
| N54 | 29 | 先兆子痫, 伴有 HELLP | 1 | 1093 | 5 | 218.6 |
| N55 | 26 5/7 | 先兆子痫 | 1 | 2437 | 27.2 | 89.6 |
| N56 | 33 5/7 | 先兆子痫 | 1 | 2031 | 158 | 12.9 |
| N58 | 38 4/7 | 正常 | 0 | 6 | 74.5 | 0.1 |
| N59 | 22 | 正常 | 0 | 170 | 129 | 1.3 |
| N60 | 38 6/7 | 正常 | 0 | 1122 | 508 | 2.2 |
| N61 | 36 2/7 | 正常 | 0 | 42 | 40.5 | 1.0 |
| N62 | 29 3/7 | 妊娠高血压+先兆子痫 | 1 | 5629 | 45.9 | 122.6 |
| N63 | 30 | IUGR +妊娠高血压 | 0 | 1332 | 6.25 | 213.1 |
| N64 | 36 | 正常 | 0 | 629 | 32.1 | 19.6 |
| N65 | 32 5/7 | 正常 | 0 | 281 | 36.5 | 7.7 |
| N67 | 39 | 正常 | 0 | 5 | 5 | 1.0 |
| N68 | 37 5/7 | 正常 | 0 | 446 | 320 | 1.4 |

[0205] 表 5

[0206] ROC 分析

[0207] W = 曲线下面积, SE = 标准误差,

[0208] p = 概率

[0209]

| SF1t-1: PIGF 络合物分析 | |
|--------------------|--------|
| W: | 0.8000 |
| SE: | 0.1017 |
| p: | 0.0016 |

- [0210] 表 6
- [0211] ROC 分析
- [0212] W = 曲线下面积, SE = 标准误差,
- [0213] p = 概率

| | |
|--------|------------------------|
| | sFlt-1:PIGF/游离 PIGF 比率 |
| [0214] | W: 0.889 |
| | SE: 0.0886 |
| | p: <0.0001 |

- [0215] 表 7
- [0216]

| 所测被分析物 | 总 sFlt-1 | 游离 sFlt-1 | sFlt-1:PIGF 络合物 | 总 PIGF | 游离 PIGF | SFlt-1:PIGF 络合物 |
|--------------------|---|------------------------------------|------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------|
| 包被在 ELISA 孔上 | sFlt-1 特异性单克隆抗体 (49560, R&D Systems) 结合于游离 sFlt-1 和 sFlt-1:PIGF 络合物 | | | PIGF 特异性单克隆抗体 (358932, R&D Systems) 结合于游离 PIGF 和 sFlt-1:PIGF 络合物 | | |
| 样品 | 含 2000pg/mL sFlt-1 和 0-2000pg/mL PIGF 的预温育样本 | | | 含 2000pg/mL PIGF 和 0-2000pg/mL sFlt-1 的预温育样本 | | |
| HRP 检测抗体 (1 μg/mL) | M14 Ortho-clinical diagnostics | 49566 R&D 系统 | 358905 R&D 系统 | 358905 R&D 系统 | 37203 R&D 系统 | M14 Ortho-clinical diagnostics |
| 检测抗体特性 | 结合于游离 sFlt-1 和 sFlt-1:PIGF 络合物 | 结合于游离 sFlt-1 但不结合于 sFlt-1:PIGF 络合物 | 结合于游离 PIGF 和 sFlt-1:PIGF 络合物 | 结合于游离 PIGF 和 sFlt-1:PIGF 络合物 | 结合于游离 PIGF 但不结合于 sFlt-1:PIGF 络合物 | 结合于游离 sFlt-1 和 sFlt-1:PIGF 络合物 |

- [0217]
- [0218] 表 8

| 包被有 1 μ g/mL 抗 sFlt-1 单克隆抗体 49560 (R&D Systems) 的板 | | 492nm 波长上的吸光度 | | |
|--|--------------|---------------|-----------|------------------|
| sFlt (pg/mL) | PlGF (pg/mL) | 总 sFlt-1 | 游离 sFlt-1 | sFlt-1: PlGF 络合物 |
| 0 | 0 | 0.104 | 0.095 | 0.006 |
| 2000 | 2000 | 2.163 | 1.077 | 0.734 |
| 2000 | 200 | 2.144 | 1.215 | 0.176 |
| 2000 | 20 | 2.198 | 1.601 | 0.096 |
| 2000 | 2 | 2.246 | 1.895 | 0.070 |
| 2000 | 0 | 2.290 | 1.976 | 0.014 |

[0220] 表 9

[0221]

| 包被有 0.8 μ g/mL 抗 PlGF 大鼠单克隆抗体 358932 (R&D Systems) 的板 | | 492nm 波长上的吸光度 | | |
|---|----------------|---------------|---------|----------------|
| PlGF (pg/mL) | sFlt-1 (pg/mL) | 总 PlGF | 游离 PlGF | sFlt: PlGF 络合物 |
| 0 | 0 | 0.001 | 0.004 | 0.022 |
| 2000 | 2000 | 3.000 | 1.908 | 1.185 |
| 2000 | 200 | 3.000 | 2.087 | 0.164 |
| 2000 | 20 | 3.000 | 2.146 | 0.017 |
| 2000 | 2 | 3.000 | 2.289 | 0.008 |
| 2000 | 0 | 3.000 | 3.000 | 0.002 |

[0222] 表 10

[0223] sFlt-1:PlGF 络合物、sFlt-1、游离 PlGF 和比率

[0224] 胎龄:第 27-37 周

[0225]

| 受试者 ID | 采集时的胎龄 (周) | 先兆子痫 (1 = 是, 0 = 否) | RDS ELISA 游离 P1GF | RDS ELISA 总 sFlt-1 | sFlt-1:P1GF 络合物 | RDS ELISA 总 sFlt-1/RDS ELISA 游离 P1GF 比率 | sFlt-1:P1GF 络合物 /RDS ELISA 游离 P1GF 比率 |
|--------|------------|---------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---|---------------------------------------|
| 1 | 34.3 | 1 | 247 | 3127 | 652 | 12.7 | 2.6 |
| 7 | 34.9 | 0 | 938 | 1854 | 189 | 2.0 | 0.2 |
| 2 | 29.7 | 1 | 41.3 | 68920 | 1430 | 1667.7 | 34.6 |
| 9 | 30.1 | 0 | 469 | 900 | 92.3 | 1.9 | 0.2 |
| 3 | 37.0 | 1 | 66.8 | 16079 | 1300 | 240.5 | 19.4 |
| 8 | 36.1 | 0 | 144 | 36830 | 5960 | 255.5 | 41.3 |
| 6 | 30.1 | 1 | 77.8 | 46935 | 2430 | 603.5 | 31.2 |
| 14 | 31.1 | 0 | 870 | 1714 | 193 | 2.0 | 0.2 |
| 11 | 27.0 | 1 | 39.3 | 6906 | 559 | 175.8 | 14.2 |
| 15 | 27.1 | 0 | 256 | 2602 | 195 | 10.2 | 0.8 |
| 10 | 34.6 | 1 | 351 | 1716 | 219 | 4.9 | 0.6 |
| 12 | 34.6 | 0 | 60.5 | 8462 | 855 | 139.9 | 14.1 |
| 13 | 37.0 | 1 | 212 | 9699 | 1870 | 45.7 | 8.8 |
| 38 | 37.4 | 0 | 311 | 4376 | 794 | 14.1 | 2.6 |
| 17 | 37.4 | 1 | 33.0 | 8303 | 357 | 251.9 | 10.8 |
| 19 | 37.4 | 0 | 184 | 4165 | 499 | 22.6 | 2.7 |
| 21 | 37.0 | 1 | 58.7 | 13435 | 1250 | 228.8 | 21.3 |
| 39 | 37.4 | 0 | 263 | 1487 | 380 | 5.7 | 1.4 |
| 22 | 29.0 | 1 | 85.3 | 15223 | 2000 | 178.4 | 23.4 |
| 34 | 28.6 | 0 | 1443 | 3290 | 478 | 2.3 | 0.3 |
| 23 | 36.4 | 1 | 131 | 6256 | 1270 | 47.7 | 9.7 |
| 24 | 36.6 | 0 | 1622 | 7180 | 826 | 4.4 | 0.5 |
| 27 | 29.7 | 1 | 37.2 | 14040 | 998 | 377.9 | 26.9 |
| 35 | 29.9 | 0 | 883 | 1790 | 332 | 2.0 | 0.4 |
| 28 | 30.3 | 1 | 100 | 13350 | 1880 | 133.2 | 18.8 |
| 5 | 30.0 | 0 | 627 | 5214 | 391 | 8.3 | 0.6 |
| 29 | 31.3 | 0 | 1789 | 2422 | 433 | 1.4 | 0.2 |
| 30 | 31.3 | 1 | 51.5 | 34730 | 1630 | 674.3 | 31.6 |
| 31 | 31.3 | 1 | 43.6 | 4745 | 259 | 108.9 | 5.9 |
| 33 | 31.4 | 0 | 1084 | 3080 | 602 | 2.8 | 0.6 |
| 16 | 33.4 | 1 | 1460 | 2106 | 492 | 1.4 | 0.3 |
| 18 | 32.6 | 0 | 1324 | 1687 | 260 | 1.3 | 0.2 |
| 26 | 31.1 | 1 | 379 | 1530 | 374 | 4.0 | 1.0 |
| 41 | 32.1 | 0 | 548 | 1454 | 229 | 2.7 | 0.4 |
| 36 | 30.6 | 1 | 29.9 | 27790 | 934 | 930.3 | 31.3 |
| 4 | 30.0 | 0 | 900 | 2016 | 506 | 2.2 | 0.6 |

[0226]

| | | | | | |
|------|--------|----------|--------|----------|----------|
| W : | 0.8796 | 0.7994 | 0.7654 | 0.8519 | 0.8642 |
| SE : | 0.0604 | 0.0769 | 0.0826 | 0.0669 | 0.0669 |
| p : | 0.0001 | < 0.0001 | 0.0007 | < 0.0001 | < 0.0001 |

[0227]

| | | | | | |
|---|-----|----|----|----|----|
| n | 136 | 36 | 36 | 36 | 36 |
|---|-----|----|----|----|----|

[0228] 表 11

[0229] sFlt-1:PIGF-1 络合物、sFlt-1、游离 PIGF 和比率

[0230] 胎龄:第 13-21 周

[0231] (接下三页)

[0232]

| 标本号 | 采集时的胎龄(周) | 轻度或重度 PE (ICD9 编码 642.01、642.41、2652.43、 642.71、642.91、642.51) | 分娩时患重度 PE (ICD9 编码 642.51) | 浓度 (pg/mL) | | | RDS ELISA 总 sFlt-1/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 | sFlt-1:PIGF 络合物/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 |
|---------|-----------|--|-------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---|--------------------------------------|
| | | | | RDS ELISA 游离 PIGF | RDS ELISA 总 sFlt-1 | sFlt-1:PIGF 络合物 | | |
| URMC618 | 12.57 | 1 | 1 | 45.3 | 1742 | 3.4 | 38.5 | 0.1 |
| URMC619 | 12.86 | 0 | 0 | 210 | 2155 | 81.6 | 10.3 | 0.4 |
| URMC594 | 14.14 | 0 | 0 | 40.5 | 1421 | 59.2 | 35.1 | 1.5 |
| URMC592 | 14.29 | 1 | 1 | 44.9 | 2402 | 142 | 53.6 | 3.2 |
| URMC606 | 14.29 | 0 | 0 | 97.5 | 1910 | 72.2 | 19.6 | 0.7 |
| URMC624 | 14.29 | 1 | 1 | 42.2 | 3208 | 256 | 76.1 | 6.1 |
| URMC664 | 14.29 | 0 | 0 | 161 | 2066 | 51.5 | 12.8 | 0.3 |
| URMC625 | 14.43 | 0 | 0 | 56.2 | 3169 | 61.1 | 56.4 | 1.1 |
| URMC663 | 14.57 | 1 | 0 | 44.1 | 1712 | 53.4 | 38.8 | 1.2 |
| URMC604 | 14.86 | 1 | 0 | 127 | 1179 | 7.7 | 9.3 | 0.1 |
| URMC527 | 15.00 | 1 | 0 | 75.4 | 2234 | 68.3 | 29.6 | 0.9 |
| URMC529 | 15.00 | 0 | 0 | 35.9 | 1378 | 100 | 38.4 | 2.8 |
| URMC545 | 15.00 | 1 | 0 | 59.5 | 2053 | 46.1 | 34.5 | 0.8 |
| URMC621 | 15.00 | 1 | 0 | 145 | 4200 | 186 | 29.0 | 1.3 |
| URMC547 | 15.14 | 0 | 0 | 75.3 | 3440 | 123 | 45.7 | 1.6 |
| URMC587 | 15.14 | 0 | 0 | 53.1 | 1367 | 70.7 | 25.7 | 1.3 |

[0233]

| 标本号 | 采集时的胎龄 (周) | 轻度或重度 PE (ICD9 编码 642.01、642.41、2652.43、 642.71、642.91、642.51) | 分娩时患重度 PE (ICD9 编码 642.51) | 浓度 (pg/mL) | | | RDS ELISA 总 sFit-1/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 | sFit-1:PIGF 络合物/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 |
|---------|------------|--|-------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---|--------------------------------------|
| | | | | RDS ELISA 游离 PIGF | RDS ELISA 总 sFit-1 | sFit-1:PIGF 络合物 | | |
| URMC623 | 15.14 | 0 | 0 | 39.4 | 1768 | 31.5 | 44.9 | 0.8 |
| URMC645 | 15.29 | 1 | 0 | 38.4 | 1860 | 41.8 | 48.5 | 1.1 |
| URMC647 | 15.29 | 0 | 0 | 53.4 | 2805 | 109 | 52.5 | 2.0 |
| URMC651 | 15.29 | 1 | 0 | 112 | 2853 | 103 | 25.5 | 0.9 |
| URMC586 | 15.43 | 1 | 0 | 20.7 | 5201 | 119 | 251.6 | 5.8 |
| URMC653 | 15.43 | 0 | 0 | 92.2 | 1431 | 41.1 | 15.5 | 0.4 |
| URMC601 | 15.57 | 1 | 0 | 53.1 | 1192 | 43.2 | 22.5 | 0.8 |
| URMC613 | 15.57 | 1 | 1 | 101 | 1499 | 25.3 | 14.9 | 0.3 |
| URMC668 | 15.57 | 0 | 0 | 108 | 2091 | 188 | 19.4 | 1.7 |
| URMC570 | 15.71 | 0 | 0 | 39.9 | 939 | -1.23 | 23.5 | 0.0 |
| URMC603 | 15.71 | 0 | 0 | 59.1 | 2281 | 35.3 | 38.6 | 0.6 |
| URMC614 | 15.71 | 0 | 0 | 206 | 1302 | 59.3 | 6.3 | 0.3 |
| URMC568 | 15.86 | 1 | 0 | 160 | 1526 | 119 | 9.5 | 0.7 |
| URMC666 | 15.86 | 1 | 0 | 76.9 | 1915 | 92.4 | 24.9 | 1.2 |
| URMC638 | 16.00 | 0 | 0 | 96.0 | 5102 | 95.2 | 53.1 | 1.0 |
| URMC515 | 16.14 | 1 | 0 | 94.2 | 2754 | 166 | 29.2 | 1.8 |
| URMC517 | 16.14 | 0 | 0 | 99.8 | 2649 | 55.2 | 26.5 | 0.6 |
| URMC577 | 16.14 | 1 | 0 | 225 | 2297 | 173 | 10.2 | 0.8 |
| URMC579 | 16.14 | 0 | 0 | 101 | 3007 | 67.9 | 29.8 | 0.7 |
| URMC633 | 16.14 | 1 | 0 | 92.2 | 2860 | 104 | 31.0 | 1.1 |
| URMC692 | 16.14 | 1 | 0 | 26.8 | 1303 | 44.3 | 48.5 | 1.7 |
| URMC533 | 16.29 | 1 | 0 | 143 | 1458 | 110 | 10.2 | 0.8 |
| URMC534 | 16.29 | 0 | 0 | 105 | 3248 | 95.8 | 30.9 | 0.9 |
| URMC574 | 16.29 | 1 | 0 | 157 | 4192 | 78.7 | 26.7 | 0.5 |
| URMC590 | 16.29 | 0 | 0 | 120 | 1381 | 106 | 11.5 | 0.9 |
| URMC634 | 16.29 | 0 | 0 | 266 | 1941 | 91.9 | 7.3 | 0.3 |
| URMC684 | 16.29 | 1 | 0 | 118 | 1475 | 63.1 | 12.5 | 0.5 |
| URMC685 | 16.29 | 0 | 0 | 89.0 | 931 | 16.2 | 10.5 | 0.2 |
| URMC636 | 16.43 | 1 | 0 | 184 | 1961 | 73.8 | 10.7 | 0.4 |
| URMC648 | 16.43 | 1 | 0 | 121 | 1786 | 76.3 | 14.7 | 0.6 |

[0234]

| 标本号 | 采集时的胎龄 (周) | 轻度或重度 PE (ICD9 编码 642.01、642.41、2652.43、 642.71、642.91、642.51) | 分娩时患重度 PE (ICD9 编码 642.51) | 浓度 (pg/mL) | | | RDS ELISA 总 sF1t-1/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 | sF1t-1:PIGF 络合物/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 |
|---------|------------|--|-------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---|--------------------------------------|
| | | | | RDS ELISA 游离 PIGF | RDS ELISA 总 sF1t-1 | sF1t-1:PIGF 络合物 | | |
| URMC650 | 16.43 | 0 | 0 | 69.7 | 1749 | 35.6 | 25.1 | 0.5 |
| URMC536 | 16.57 | 1 | 0 | 129 | 2358 | 130 | 18.3 | 1.0 |
| URMC571 | 16.57 | 1 | 0 | 58.9 | 2575 | 643 | 43.7 | 10.9 |
| URMC573 | 16.57 | 0 | 0 | 68.3 | 3304 | 68.3 | 48.4 | 1.0 |
| URMC589 | 16.57 | 1 | 1 | 15.1 | 2293 | 322 | 151.9 | 21.3 |
| URMC669 | 16.57 | 1 | 1 | 47.8 | 2373 | 105 | 49.6 | 2.2 |
| URMC676 | 16.57 | 0 | 0 | 63.7 | 2353 | 88.1 | 36.9 | 1.4 |
| URMC509 | 16.71 | 1 | 0 | 93.8 | 429 | 24.3 | 4.6 | 0.3 |
| URMC538 | 16.71 | 0 | 0 | 113 | 2999 | 118 | 26.6 | 1.0 |
| URMC671 | 16.71 | 0 | 0 | 77.9 | 754 | -0.422 | 9.7 | 0.0 |
| URMC511 | 16.86 | 0 | 0 | 192 | 3341 | 136 | 17.4 | 0.7 |
| URMC512 | 16.86 | 1 | 0 | 53.5 | 754 | -1.44 | 14.1 | 0.0 |
| URMC513 | 16.86 | 0 | 0 | 170 | 1152 | 68.9 | 6.8 | 0.4 |
| URMC542 | 16.86 | 1 | 0 | 155 | 13220 | 258 | 85.1 | 1.7 |
| URMC543 | 16.86 | 0 | 0 | 86.5 | 2299 | 84.1 | 26.6 | 1.0 |
| URMC576 | 16.86 | 0 | 0 | 169 | 4417 | 140 | 26.2 | 0.8 |
| URMC597 | 17.00 | 0 | 0 | 138 | 1960 | 99.9 | 14.2 | 0.7 |
| URMC610 | 17.00 | 1 | 1 | 121 | 2389 | 339 | 19.8 | 2.8 |
| URMC612 | 17.00 | 0 | 0 | 70.9 | 1920 | 52.8 | 27.1 | 0.7 |
| URMC595 | 17.29 | 1 | 0 | 62.9 | 2355 | 100 | 37.4 | 1.6 |
| URMC657 | 17.29 | 1 | 0 | 114 | 1212 | 92.1 | 10.7 | 0.8 |
| URMC691 | 17.29 | 0 | 0 | 113 | 2191 | 104 | 19.4 | 0.9 |
| URMC643 | 17.43 | 0 | 0 | 222 | 5476 | 86 | 24.7 | 0.4 |
| URMC672 | 17.43 | 1 | 0 | 247 | 3125 | 123 | 12.7 | 0.5 |
| URMC521 | 17.57 | 1 | 1 | 46.4 | 346 | 12.7 | 7.4 | 0.3 |
| URMC560 | 17.57 | 0 | 0 | 211 | 1754 | 70.9 | 8.3 | 0.3 |
| URMC642 | 17.57 | 1 | 1 | 153 | 2390 | 183 | 15.6 | 1.2 |
| URMC522 | 17.71 | 0 | 0 | 247 | 3507 | 116 | 14.2 | 0.5 |
| URMC551 | 17.71 | 1 | 1 | 251 | 4549 | 448 | 18.2 | 1.8 |
| URMC659 | 17.86 | 0 | 0 | 97.4 | 1457 | 74.3 | 15.0 | 0.8 |

[0235]

| 标本号 | 采集时的胎龄 (周) | 轻度或重度 PE (ICD9 编码 642.01、642.41、2652.43、 642.71、642.91、642.51) | 分娩时患重度 PE (ICD9 编码 642.51) | 浓度 (pg/mL) | | | RDS ELISA 总 sFit-1/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 | sFit-1:PIGF 络合物/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 |
|---------|------------|--|-------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---|--------------------------------------|
| | | | | RDS ELISA 游离 PIGF | RDS ELISA 总 sFit-1 | sFit-1:PIGF 络合物 | | |
| URMC539 | 18.00 | 1 | 0 | 129 | 697 | 33.9 | 5.4 | 0.3 |
| URMC541 | 18.00 | 0 | 0 | 115 | 1317 | 127 | 11.5 | 1.1 |
| URMC530 | 18.29 | 1 | 1 | 89.2 | 1222 | 142 | 13.7 | 1.6 |
| URMC678 | 18.29 | 1 | 0 | 254 | 1893 | 224 | 7.4 | 0.9 |
| URMC630 | 18.43 | 1 | 0 | 204 | 2461 | 116 | 12.0 | 0.6 |
| URMC679 | 18.43 | 0 | 0 | 445 | 2478 | 206 | 5.6 | 0.5 |
| URMC531 | 18.57 | 0 | 0 | 148 | 3006 | 19.1 | 20.3 | 0.1 |
| URMC564 | 18.71 | 1 | 1 | 64.9 | 1969 | 80.3 | 30.4 | 1.2 |
| URMC565 | 18.71 | 0 | 0 | 71.6 | 2653 | 23.4 | 37.0 | 0.3 |
| URMC640 | 18.71 | 0 | 0 | 161 | 1411 | 42.8 | 8.8 | 0.3 |
| URMC632 | 18.86 | 0 | 0 | 166 | 2573 | 79.2 | 15.5 | 0.5 |
| URMC639 | 18.86 | 1 | 0 | 67.8 | 435 | -4.36 | 6.4 | -0.1 |
| URMC616 | 19.00 | 0 | 0 | 329 | 1538 | 51.2 | 4.7 | 0.2 |
| URMC518 | 19.29 | 1 | 0 | 280 | 4100 | 212 | 14.6 | 0.8 |
| URMC615 | 19.57 | 1 | 1 | 33.8 | 11565 | 391 | 342.6 | 11.6 |
| URMC519 | 19.71 | 0 | 0 | 217 | 878 | 102 | 4.1 | 0.5 |
| URMC505 | 20.43 | 0 | 0 | 279 | 856 | 71.9 | 3.1 | 0.3 |
| URMC503 | 21.14 | 1 | 0 | 483 | 1762 | 156 | 3.6 | 0.3 |

[0236] 表 12

[0237] ROC 分析

[0238]

| RDS ELISA 游离 PIGF | RDS ELISA 总 sFit-1 | sFit-1:PIGF 络合物 | RDS ELISA 总 sFit-1/RDS ELISA 游离 PIGF 比率 | sFit-1:PIGF 络 合物 /RDS ELISA 游离 PIGF 比率 |
|----------------------|-----------------------|--------------------|---|--|
|----------------------|-----------------------|--------------------|---|--|

[0239] 轻度或重度 PE 与无 PE (采集时的胎龄 :13-21 周)

[0240]

| | | | | | |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|
| W : | 0.5745 | 0.5029 | 0.6331 | 0.5396 | 0.6392 |
| SE : | 0.0594 | 0.0602 | 0.0591 | 0.0599 | 0.0578 |
| P : | 0.1050 | 0.4805 | 0.0122 | 0.2543 | 0.0080 |

[0241]

| | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|
| n : | 94 | 94 | 94 | 94 | 94 |
|-----|----|----|----|----|----|

[0242] 重度 PE (轻度 PE = 正常, 采集时的胎龄 :13-21 周)

[0243]

| | | | | | |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|
| W : | 0.7142 | 0.5622 | 0.6942 | 0.6771 | 0.7445 |
| SE : | 0.0819 | 0.0854 | 0.1029 | 0.0838 | 0.1004 |
| P : | 0.0045 | 0.2333 | 0.0296 | 0.0173 | 0.0075 |

[0244]

| | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|
| n : | 94 | 94 | 94 | 94 | 94 |
|-----|----|----|----|----|----|

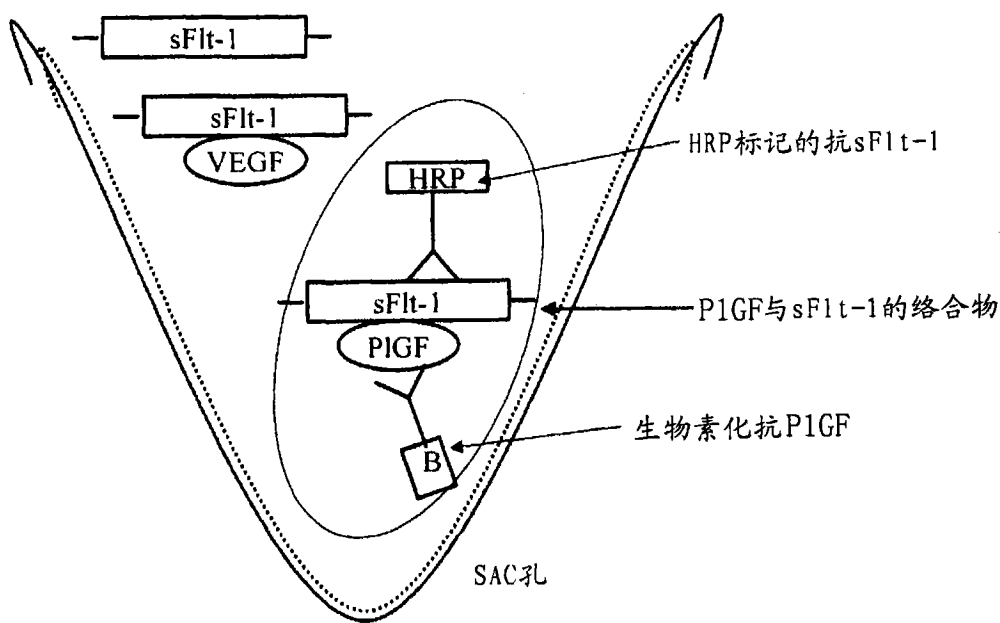
[0245] 重度 PD (轻度 PE = 正常, 采集时的胎龄 :16-21 周)

[0246]

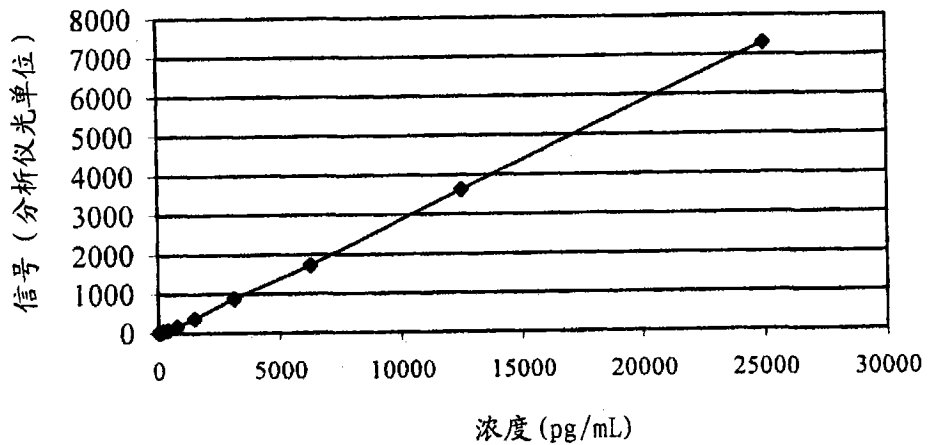
| | | | | | |
|------|--------|--------|--------|--------|----------|
| W : | 0.7394 | 0.5455 | 0.7636 | 0.6848 | 0.8707 |
| SE : | 0.1041 | 0.1073 | 0.1044 | 0.0963 | 0.0847 |
| P : | 0.0108 | 0.3360 | 0.0058 | 0.0274 | < 0.0001 |

[0247]

| | | | | | |
|-----|-----|----|----|----|----|
| n : | 164 | 64 | 64 | 64 | 64 |
|-----|-----|----|----|----|----|



sFlt-1:PlGF 络合物分析剂量反应曲线



sFlt-1: P1GF络合物
sFlt-1: P1GF络合物与分类

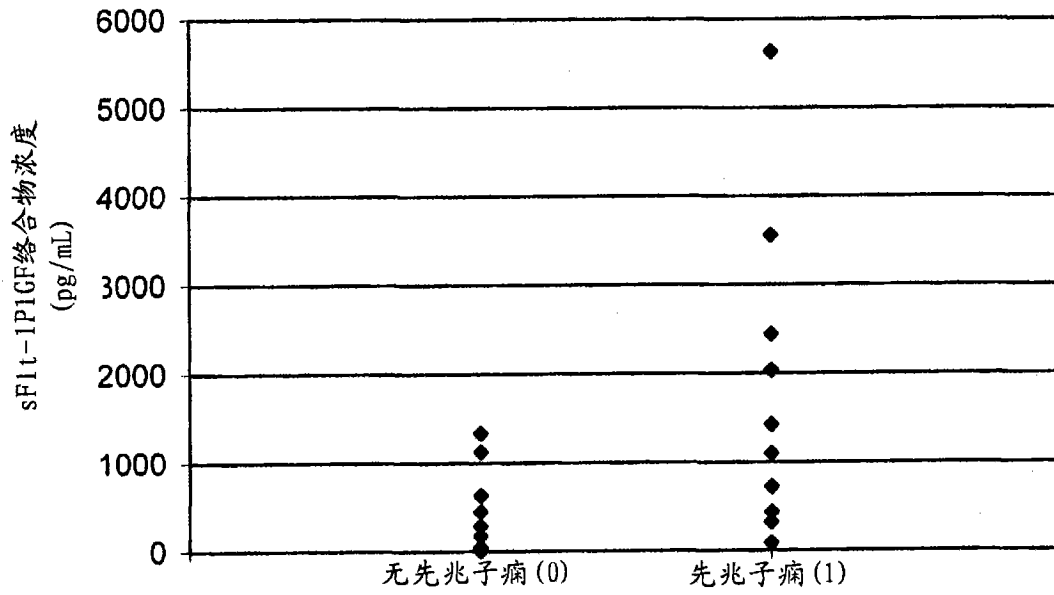


图 3

sFlt-1: P1GF络合物
sFlt-1: P1GF络合物 / 游离P1GF与分类

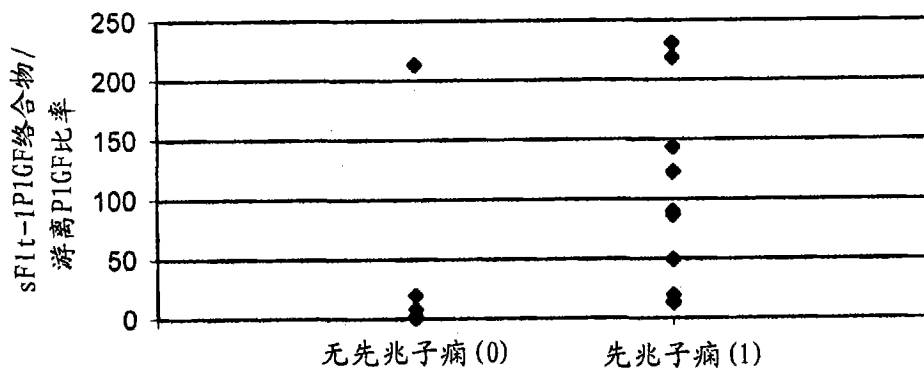


图 4

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | sFlt-1:血管生成因子络合物的测定 | | |
| 公开(公告)号 | CN101918839A | 公开(公告)日 | 2010-12-15 |
| 申请号 | CN200980101754.3 | 申请日 | 2009-01-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 奥索临床诊断有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 奥索临床诊断有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 奥索临床诊断有限公司 | | |
| [标]发明人 | G巴什里安斯 D拜尔恩 S格鲁尔瓦 S杰克逊 H莱恩 布朗 B桑卡兰 E斯卡利斯 K杨 J郑 | | |
| 发明人 | G·巴什里安斯 D·拜尔恩 S·格鲁尔瓦 S·杰克逊 H·莱恩-布朗 B·桑卡兰 E·斯卡利斯 K·杨 J·郑 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/00 | | |
| CPC分类号 | G01N2800/56 G01N2800/368 G01N33/6872 G01N33/566 G01N2333/71 G01N2333/475 G01N33/689 G01N33/543 G01N2333/515 G01N2333/91205 G01N2800/50 | | |
| 代理人(译) | 李连涛 | | |
| 优先权 | 61/019351 2008-01-07 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供了用于测定包含第一分子实体和第二分子实体的络合物的存在或量的方法，所述络合物优选地为sFlt-1:PIGF络合物。对所述络合物的存在或量的测定结果可用于预测、检测、监测或指导治疗例如下列疾病的方法中：血管疾病、血管相关疾病、心脏疾病、心脏相关疾病、肿瘤、肿瘤相关疾病、先兆子痫和先兆子痫相关疾病。测定sFlt-1：血管生成因子络合物对于在妊娠早期以及临床评估可能无法提供有效信息的疾病阶段预测和检测先兆子痫尤为有用。

| sFlt-1: PlGF 络合物校准液 ID | sFlt-1: PlGF 络合物浓度 (pg/mL) | 信号 (ALU) |
|------------------------|----------------------------|----------|
| CR1 | 0 | 14.7 |
| CR2 | 75.0 | 20.8 |
| CR3 | 188 | 37.3 |
| CR4 | 375 | 76.3 |