

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680056330.6

[51] Int. Cl.

*C07K 2/00 (2006.01)*

*C07K 16/18 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*G01N 33/577 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年12月30日

[11] 公开号 CN 101616927A

[22] 申请日 2006.9.15

[21] 申请号 200680056330.6

[86] 国际申请 PCT/AU2006/001357 2006.9.15

[87] 国际公布 WO2007/030889 英 2007.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2009.5.8

[71] 申请人 迪爱麦有限公司

地址 中国香港中环云咸街73号云山大厦16楼

[72] 发明人 V·沃罗泰利亚克

[74] 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书2页 说明书26页 附图6页

[54] 发明名称

诊断先兆子痫的方法

[57] 摘要

本发明涉及先兆子痫发生的标记。特别是本发明提供了先兆子痫发生的标记，该标记由在还原条件下用15-30%的梯度SDS-PAGE测定的一个约26.6Kd的多肽构成。

1、一个先兆子痫发生的标记，该标记由在还原条件下用 15-30% 梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 的多肽构成。

2、根据权利要求 1 所述的标记，其中所述标记在妊娠人类来源的孕妇样品中存在。

3、一种检测来源于妊娠人类的孕妇样品的先兆子痫发生的标记的方法，该方法包括，与来源于未患先兆子痫的人类样品中的约 26 Kd 多肽比较时，在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定孕妇样品中约 26.6 Kd 多肽的存在。

4、一种在妊娠人类中诊断和/或预测先兆子痫（PE）的方法，该方法包括，与来源于未患先兆子痫的人类样品中的约 26 Kd 多肽比较时，在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定孕妇样品中约 26.6 Kd 多肽的存在。

5、一种检测妊娠人类中先兆子痫的诊断试剂盒，包括作为阳性对照的在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 多肽，该多肽已从患有先兆子痫的妊娠人类中分离出来。

6、一种可以选择性结合在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 多肽的抗体，该多肽已从患有先兆子痫的妊娠人类中分离出来。

7、一种妊娠人类中的先兆子痫的发生或进一步发展的抑制剂，其中所述抑制剂可以从患有先兆子痫或有发生先兆子痫风险的妊娠人类的血清中减少或去除存在的，在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测得的约 26.6 Kd 多肽。

8、一种根据权利要求 7 所述的抑制剂，其中所述抑制剂可以降低

26.6 Kd 多肽的表达水平。

9、一种在哺乳动物中先兆子痫的检测方法，包括步骤：1) 获得自哺乳动物受试者来源的孕妇样品；2) 用患有先兆子痫妇女的血清中发现的 26.6 Kd 多肽标记的抗体和样品接触，形成抗体和 26.6 Kd 多肽标记的复合物；3) 检测抗体-标记复合物。

10、一种监测先兆子痫的治疗效果的方法，包括步骤：1) 对患有先兆子痫的哺乳动物受试者提供治疗；2) 从受试者获得至少一个治疗后孕妇样品；并且 3) 在治疗后样品中检测先兆子痫的 26.6 Kd 多肽标记的存在或缺失。

11、一种检测来源于受试者的孕妇样品中先兆子痫 26.6 Kd 多肽标记存在的试剂盒，包括：1) 获得一定量的孕妇样品的装置；2) 可附着到能够和先兆子痫的 26.6 Kd 多肽标记形成复合物的俘获性抗体的基质；并且 3) 检测先兆子痫的 26.6 Kd 多肽标记和俘获性抗体的复合物的分析法。

12、一种检测哺乳动物受试者的先兆子痫状况的竞争酶联免疫吸附法 (ELISA) 的试剂盒，其包含用于检测受试者孕妇样品中多肽标记存在的先兆子痫 26.6 Kd 多肽标记的特异的第一抗体。

## 诊断先兆子痫的方法

### 技术领域

本发明涉及先兆子痫发生的标记。本发明还涉及诊断和治疗先兆子痫的方法。

### 背景技术

先兆子痫或称妊娠诱发高血压 (PIH) 是在产科文献中报道几率约为全部妊娠中 7-10% 的最常见的医学上的妊娠病症 (Roberts 等 (1993) In: Fetal Medical Review. Ed. Dunlop, Edward Arnold Publishers, London)。先兆子痫的定义/诊断包括升高的血压、尿蛋白和水肿。先兆子痫分为轻度或严重, 其中一种或多种的下列标准可以表明严重的先兆子痫, 包括:

- 1、 当在间隔六小时对静止的病人测量时两次或多次 160 收缩期或 110 舒张期的血压、
- 2、 蛋白尿为 5g/24h、
- 3、 尿产量为 400mL/24h、
- 4、 大脑/视觉障碍、
- 5、 心口痛、
- 6、 肺水肿、
- 7、 受损的肝功能、和
- 8、 血小板减少。

它还被称为先兆子痫毒血症并且其更严重的形式惊厥是和广泛的抽搐或癫痫发作相关。这个几率根据使用的诊断标准和研究的人群在 2-35% 的范围内 (Sibai, (1991), Clin Obstet Gynecol, 34:27-34)。先兆子痫的几率在未经产妇、在有 PIH 家族史的妇女、在有 PIH 的妇女、在糖尿病妇女及在妊娠中有增大的滋养层肿块的妇女中显著增加 (Zhou et al., (1992), J. Clin Invest, 91:950-960)。

PIH 是世界上孕产妇死亡的主要原因之一, 并且是在美国、英国和

威尔士胎儿和新生儿发病率和死亡率的重要原因 (Kaunitz 等 (1985), *Obstet Gynecol*, 65:605-612; Department Of Health: Report on confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom. 1985-1987, HMSO. London; 1991)。分析由世界卫生组织 (WHO) 收集的大量、主要以医院为基础的数据显示 PIH 是多个发展中国家如亚洲、非洲、拉丁美洲和加勒比海的 10-15%孕产妇死亡的原因。

研究表明如果治疗在妊娠的早期开始, PIH 在一些病例中可以被阻止 (Uzan 等(1992), *J Gynecol Obstet Reprod*, 21:315- 318)。但是介入治疗安全的不确定性, 如低剂量阿司匹林, 仍然对未经选择的人群是使用的障碍 (Massé 等(1993), *Am J Obstet Gynecol*, 169:501- 508; Roberts (1994), *J Nurse Midwifery*, 39 (2) :70-90) 并且因此直到血压已经开始升高治疗通常还没有开始。早期鉴别有高危性 PIH 发生的妇女仍然不可靠。家族和医学史不能鉴别大多数继发 PIH 的个体并且直到现在或单独使用或组合使用的候选临床或实验室检测也显示了不良的预测价值 (Roberts supra)。

因此 Dionne 和同事在 1994 年陈述“用在预测先兆子痫的筛查测试中具有显著良好的预测价值的新标记的研制将在防止这种妊娠并发症上具有重要的影响 (*Clin Biochem*, 27 (2) : 99-103)。

### 诊断已确定的 PIH

产科医生和妇科医生美国学院 (ACOG) 所建议的诊断已确定的妊娠诱导的高血压的临床标准是: 收缩压>140mm Hg; 舒张压>90mm Hg; 收缩压的增加>30mm Hg; 当上述的任何一个标准在间隔六小时或更长至少出现两次时, 舒张压的增加>15mm Hg。出现外周水肿或蛋白尿(定义为在间隔至少六小时两次或更多的随机尿样中>300 mg/24h 或 >1g/L) 也需要诊断。在叠加了已有的慢性高血压、血管和肾病的有 PIH 的妇女中诊断尤其艰难 (Pasé & Christianson (1976), *Am J Obstet Gynecol*, 125:740-745; Sidal (1988), *Am J Obstet Gynecol*, 159:1-5; Sandoval et al., (1994), *Ginecol Obstet Mex*, 61:283-289)。浮肿和异常体重增加被用于 PIH 的诊断。但是浮肿在约 80%的妊娠中出现, 并且一般的水肿和过度的体重增加在正常的妊娠中常见 (Dexter & Weiss

(1941) , Boston. Little Brown:22; Fadigan et al. , (1994), Am Fam Physician, 49:849-856) 。

蛋白尿的出现通常用随机尿样的浸渍片检测。但是在随机尿样中的蛋白浓度有很大变化并且受几种因素如污染（假阳性结果）、锻炼（增加排泄）、低比重（假阴性）和高比重（假阳性）的影响（Gleicler et al., (1986), Am J Obstet Gynecol, 155:1011-1016; McEwan (1987), Jn: Hypertension in pregnancy. Sharp & Symonds (eds) , Perinatology Press; 63-67) 。关于诊断需要的蛋白排泄程度和尿蛋白浸渍片的可靠性依旧有相当大的争论（Meyer et al., (1994), Am J Obstet Gynecol, 170:137-141) 。

#### 鉴别具有发生 PIH 高危个体的临床标准

目前没有可靠的方法预测哪些妇女将发生先兆子痫。但是有比发生此病一般的危险性更高的妊娠妇女群体。她们包括未经产妇（primigravidae）、青少年或超过 35 岁的妇女、有多胎妊娠的妇女、有妊娠糖尿病的妇女、有慢性高血压历史或证据的妇女和前妊娠有高血压的妇女。除未经产妇，这组妇女有 25%的几率发生先兆子痫，但是只占 10%的病例。未经产妇占 60%的病例，但是这些妇女只有 1/6 的几率发生先兆子痫。其余的 20%病例根本没有危险系数。

仰卧加压测试在十二个报告中被研究（Sidal supra），预测先兆子痫的灵敏度在 8-93%范围并且特异性在 54-91%范围。假阳性几率高达 90%。血管紧张素 II 灌输测试（Chesley (1975), J Reprod Med, 15:173-178）虽然有高的变化性、有假阳性测试的高发生率，具有 90-95%的灵敏度。此外该测试复杂而昂贵，不合适临床使用。

但是该测试在高血压发病的数周前给出异常结果的事实表明该状况的起始病理学变化在发生明显的高血压前的数周已经出现。

因此仍然有研制和建立能预测哪些妇女将发生先兆子痫的测试的需要。

#### 发明内容

本发明者发现和未患有 PIH 的妇女相比出现妊娠诱导的高血压（PIH）的妊娠妇女的血清中存在新的 26.6 Kd 的多肽。研究表明有 26.6

Kd 多肽出现的妇女比没有这个多肽的妇女具有发生先兆子痫的更高风险。

发明者进一步确证该多肽可以作为发生先兆子痫的标记。进一步研究结果还表明该多肽是先兆子痫的标记及对抗先兆子痫发生的治疗试剂的潜在靶子。

因此本发明的第一方面提供了发生先兆子痫的标记，该标记由在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 的多肽构成。

在第二方面，本发明提供了从妊娠人类的孕妇样品中检测先兆子痫发生的标记的方法，该方法包括当比较从未患先兆子痫的人类样品中发现的约 26 Kd 的多肽时，在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定孕妇样品中约 26.6 Kd 多肽的存在。

本发明的第三方面提供了诊断和/或预测妊娠人类中先兆子痫 (PE) 的方法，该方法包括与从未患先兆子痫的人类样品中的约 26 Kd 的多肽相比，在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定在孕妇样品中约 26.6 Kd 的多肽存在的方法。

本发明的第四方面提供了在妊娠人类中检测先兆子痫 (PE) 的诊断试剂盒，该试剂盒含有在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 的作为阳性对照的多肽，该多肽已经从患先兆子痫的妊娠人类中分离出来。

在第五方面，本发明提供了可以选择性结合到在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 的多肽的抗体，该多肽已经从患先兆子痫的妊娠人类中分离出来。

在第六方面，本发明提供了在妊娠人类中先兆子痫的发生 (development) 和发展 (progression) 的抑制剂，其中所述抑制剂可以减少或去除来源于患先兆子痫或有发生先兆子痫风险的妊娠人类血清中存在的在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 的多肽。优选地，该抑制剂能减少 26.6 Kd 多肽的表达水平。

在第七方面，本发明提供了对在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd 的从患先兆子痫的妊娠人类血清中分离的多肽特异的抗体。

在第八方面，本发明提供了在哺乳动物中检测先兆子痫的方法，包括步骤：1) 从哺乳动物受试者获得孕妇样品；2) 以从患先兆子痫的妇女血清中发现的 26.6 Kd 的多肽标记的抗体接触样品，形成抗体和 26.6 Kd 的多肽标记的复合物；并且 3) 检测抗体-标记复合物。

在第九方面，本发明提供了监测治疗先兆子痫有效性的方法，包括步骤：1) 对患先兆子痫的哺乳动物受试者提供治疗；2) 从受试者获得至少一个治疗后孕妇样品；并 3) 检测治疗后样品中先兆子痫的 26.6 Kd 多肽标记的出现或缺失。

在第十方面，本发明提供了检测从受试者获得的孕妇样品中的先兆子痫的 26.6 Kd 多肽标记出现的试剂盒，包括：1) 获得一定量的孕妇样品的方法；2) 可以附着能和先兆子痫的 26.6 Kd 多肽标记形成复合物的捕获性抗体的介质；并 3) 检测先兆子痫的 26.6 Kd 多肽标记和捕获性抗体的复合物的分析方法。

在第十一方面，本发明提供了检测哺乳动物受试者的先兆子痫状况的竞争性酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒，包括用于检测受试者的孕妇样品中先兆子痫的 26.6 Kd 多肽的出现，对该多肽标记特异的第一抗体。

## 附图说明

图 1 显示用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分辨和用银染观看的半纯化的 PIH (P) 和正常妊娠 (N) 血清蛋白。对 PIH 特异的分析物被显示 (箭头)。分子量从已知大小的标准蛋白 (S) [Biorad] 计算得来，它们是：(A) 磷酸化酶 B 110kD；牛血清白蛋白, 84 kD；(C) 卵白蛋白, 47 kD；(D) 碳酸酐酶 (牛红细胞), 33 kD；(E) 大豆胰蛋白酶抑制剂, 24 kD；(F) 溶菌酶, 16 kD (从上到下)。

图 2 显示用 SDS-PAGE 分辨的和用考马斯染色观看的半纯化 PIH (P) 和正常孕妇 (N) 血清蛋白。对 PIH 特异的分析物被显示 (箭头)。分子量从已知大小的标准蛋白 (S) [Biorad] 计算得来，它们是：(A) 磷酸化酶 B 110kD；牛血清白蛋白, 84 kD；(C) 卵白蛋白, 47 kD；(D) 碳酸酐酶 (牛红细胞), 33 kD；(E) 大豆胰蛋白酶抑制剂, 24 kD；(F) 溶菌酶, 16 kD (从上到下)。

图 3 显示用 SDS-PAGE 分辨的和用银染观看的半纯化 PIH (P) 和正常孕妇 (N) 血清蛋白。对 PIH 特异的分析物被显示 (箭头)。分子量从已知大小的标准蛋白 (S) [Biorad] 计算得来, 它们是: (A) 磷酸化酶 B 110kD; 牛血清白蛋白, 84 kD; (C) 卵白蛋白, 47 kD; (D) 碳酸酐酶 (牛红细胞), 33 kD; (E) 大豆胰蛋白酶抑制剂, 24 kD; (F) 溶菌酶, 16 kD (从上到下)。

图 4 显示用 SDS-PAGE 分辨的和用考马斯蓝染色观看的半纯化 PIH (P) 和正常孕妇 (N) 和妊娠诱导的高血压妇女 (H) 的血清蛋白。对 PIH 特异的分析物被显示 (箭头)。分子量从已知大小的标准蛋白 (S) [Biorad] 计算得来, 它们是: (A) 磷酸化酶 B 110kD; 牛血清白蛋白, 84 kD; (C) 卵白蛋白, 47 kD; (D) 碳酸酐酶 (牛红细胞), 33 kD; (E) 大豆胰蛋白酶抑制剂, 24 kD; (F) 溶菌酶, 16 kD (从上到下)。

图 5 显示在图 3 中放大的胶, 用于强调含有感兴趣的分析物的胶上区域。样品是用 SDS-PAGE 分辨的和用考马斯蓝染色观看的半纯化 PIH (P) 和正常孕妇 (N) 和妊娠诱导的高血压妇女 (H) 的血清蛋白。对 PIH 特异的分析物被显示 (箭头)。分子量从已知大小的标准蛋白 (S) [Biorad] 计算得来, 它们是: (E) 大豆胰蛋白酶抑制剂, 24 kD; (F) 溶菌酶, 16 kD (从上到下)。

图 6 显示用 SDS-PAGE 分辨的和用考马斯蓝染色观看的半纯化 PIH (P) 和正常孕妇 (N) 和妊娠诱导的高血压妇女的血清蛋白 (H)。对 PIH 特异的分析物被显示 (箭头)。分子量从已知大小的标准蛋白 (S) [Biorad] 计算得来, 它们是: (A) 磷酸化酶 B 106 kD; 牛血清白蛋白, 80 kD; (C) 卵白蛋白, 49.5 kD; (D) 碳酸酐酶 (牛红细胞), 32.5 kD; (E) 大豆胰蛋白酶抑制剂, 27.5 kD; (F) 溶菌酶, 18.5 kD (从上到下)。

## 发明详述

在详细描述本发明之前, 需要知道的是本发明并非仅限于特定的实施例中的细胞培养技术、血清、培养基或方法, 它们是可以变化的。

还要知道本文使用的术语目的在于只是描述本发明的特定具体实施方式，而非是用于对权利要求限制。

本文引用的所有公开案、专利案和专利申请案，无论是上文或下文的，都据此一并作为参考。但是本文上述公开案引用的目的在于描述和披露公开案中报道的规程和试剂，所述的规程和试剂可能用于本发明。这里也并非欲将本发明视为在先发明而早于这些公开。

除另外指明，本发明的实践将使用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、重组 DNA 和免疫学常规技术，它们在已有技术范围内。这样的技术在文献中有描述。见，例如分子克隆：实验室手册，第二版，由 Sambrook、Fritsch 和 Maniatis 编辑 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989)；DNA 克隆，I 和 II 册 (D. N. Glover ed., 1985)；寡核苷酸合成 (M. J. Gait ed., 1984)；Mullis 等 U.S. Pat. No. 4,683,195；核酸杂交 (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984)；转录和翻译 (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984)；酶学方法 (Academic Press, Inc., N.Y.)；酶学方法，第 154 和 155 卷 (Wu et al. eds.)，细胞和分子生物学中的免疫化学方法 (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)；实验免疫学手册，I-IV 卷 (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986)。

当用在这里和在附加权利要求书中使用时必须要注明的是单数形式 “a,” “an,” 和 “the” 包括复数参考，除非上下文明确表示不是这样。因此，例如，“一个诊断样品”的参考包括这样的样品的复数，并且“一个抗体”的参考是一个或多个抗体的参考等等。除非另外定义，所有用在这里的技术和科学术语具有通常被本发明所属于的已知技术方法所理解的同样意思。

虽然任何相似或等同于这里描述的材料和方法可以用于实践和检测本发明，首选的材料和方法在现在被描述。

本发明包含以下方面：制备发生先兆子痫的标记的本发明的 26.6 Kd 多肽；制备编码上述多肽或带有和表达上述多核苷酸的重组载体；带有上述载体的转化体；产生上述转化体的方法；对抗本发明 26.6 Kd 多肽的抗体；检测多肽的方法；检测编码上述 26.6 Kd 多肽的 mRNA 或多核苷酸；检测先兆子痫的方法；检测先兆子痫的诊断试剂盒；鉴

别能从妊娠妇女血清中减少或去除本发明的 26.6 Kd 多肽出现的治疗方法及在下文解释的治疗先兆子痫的方法。

在后面的描述中，如果没有说明，将理解为如基因重组技术、在动物细胞、昆虫细胞、酵母和大肠杆菌中产生重组多肽、分子生物学方法、分离和纯化表达的多肽的方法，分析和免疫学方法的技术在这个领域中熟知并且任何这样的技术都可能被采用。

在其广泛的方面，本发明提供了先兆子痫的标记。用在这里的术语“标记”是指发生先兆子痫的标记（也作为先兆子痫标记提到）。标记可以是任何标记，如这里描述的出现在妊娠哺乳动物血清中，优选人类和倾向于发生先兆子痫的哺乳动物的 26.6 Kd 多肽。有效的先兆子痫标记是典型的这里描述的 26.6 Kd 多肽；但是标记也可以是编码 26.6 Kd 多肽的 mRNA 或编码同样多肽的基因组 DNA 分子。像其他地方讨论的，26.6 Kd 多肽可以从孕妇样品中分离，其中多肽是在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的约 26.6 Kd。

在具体实施例中，先兆子痫标记必要的包括在还原条件下用 15-30%梯度 SDS-PAGE 测定的 26.6 Kd 多肽。

用在这里的术语“孕妇样品”是指从妊娠的雌性哺乳动物中提取的任何样品。优选的是，哺乳动物是妊娠的人类女性。可以用本发明的方法分析的孕妇的样品可以经药签，分流器等获得或分离。

本领域技术人员会理解这里公开的技术可以用在任何种类的孕妇样品上。首选的孕妇样品是骨髓、血浆、脊髓液、淋巴液、呼吸、肠和生殖泌尿道的皮肤的表面切片，眼泪、唾液、奶、血、全血、血清、血细胞、肿瘤和器官。更优选的孕妇样品是血清。

一旦被提取，孕妇样品可以直接分析或可以在测试前用例如浓缩或调节 pH 来处理。在优选的具体实施方案中，孕妇样品是从怀疑患有先兆子痫或有发生先兆子痫高风险的病人血中获得的血清。血清开始是用亲和蓝胶处理以去除主要的干扰化合物（例如白蛋白）。然后进行孕妇样品中先兆子痫标记的检测或定量。

本发明的标记的“检测或定量”通过任何适当的方法包括免疫分析或分子生物学分析来完成。当标记是先兆子痫多肽时，上面的方法包括，例如，免疫分析如酶联免疫分析法（ELISA），放射免疫分析

(RIA)，荧光抗体技术，SDS-PAGE，Western 印记法或免疫结构染色法。

当先兆子痫标记是多核苷酸如 mRNA 时，分析包括分子生物学分析，例如，Northern 印记法，点印记法或聚合酶链式反应 (PCR)。mRNA 可以用先兆子痫的标记的多核苷酸或其片段作为探针或引物来检测或定量。

在具体实施方案中，“检测或定量”是根据 Laemmli, Nature, 227: 680-685, 1970 用 5 到 20%的聚丙烯酰胺凝胶的 SDS-PAGE 完成。首选的是，梯度胶是有 4%积层胶的 15-23%或 15-25%的聚丙烯酰胺梯度胶。一旦 SDS-PAGE 胶跑到了所需时间，它们用商品化的染料如溶于 50% 甲醇-10%乙酸的 0.25%考马斯亮蓝 R250 (CBB) 染色而显示多肽条带。本发明的 26.6 Kd 多肽的出现或缺失可以容易地用对比已知的标准评估它的大小来实现。

另外，在另一个具体实施方案中，本发明的 26.6 Kd 多肽的“检测或定量”是通过 Western 印记法或 ELISA。像已有技术所理解的，这些技术都需要使用本发明的 26.6 Kd 先兆子痫多肽的抗体。通过针对先兆子痫多肽或其片段的抗体，先兆子痫可以检测或定量。

结合本发明的 26.6 Kd 多肽标记的单克隆和多克隆抗体都在本发明的方法和试剂盒中 useful。抗体可以用已知技术方法制备。

为制备多克隆抗体，典型的全长 26.6 Kd 多肽或其一部分或包含 26.6 Kd 多肽一部分的多肽作为哺乳动物的抗原。多肽本身和载体，例如，结合了牛血清白蛋白 (BSA) 的载体、匙孔凝血素 (KLH) 或牛甲状腺球蛋白 (BTG) 可以作为抗原。为了增加对抗原的免疫反应，例如，可以给与完全弗罗因德佐剂 (CFA) 和不完全弗罗因德佐剂 (IFA)。小鼠、兔子、山羊或仓鼠可以作为免疫的哺乳动物。产生多克隆抗体的已知技术方法可以在 Lane 等 *Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition (1989)* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 中找到。简短的，在第一次免疫后，哺乳动物在间隔 1 到 2 周用 3 至 10 次合适的抗原免疫。

首选的抗原剂量是每个动物每次 50-100  $\mu\text{g}$ 。当肽被使用时，共价结合到合适的载体上的肽首选作为抗原。作为抗原的肽可以通过遗传

工程或肽合成仪合成。免疫的三到七天后，收集血液并且，对抗原的血清反应可以通过 ELISA 测量，见例如，Igaku-Shoin Ltd. (1976), *Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press)。然后从被免疫的哺乳动物定期收集血液直到被免疫的哺乳动物显示足够的抗体滴度，然后从血清中制备多克隆抗体。

多克隆抗体的分离和纯化可以通过色谱法如离心分离、硫酸铵盐析、caprylic 酸沉淀（见例如，*Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、DEAE-琼脂糖柱、阴离子交换柱、蛋白 A 柱或 G-柱或胶过滤柱。

一旦用于产生多克隆抗体的哺乳动物达到了合适的滴度，它们也可以被用作制备针对本发明的 26.6 Kd 多肽的单克隆抗体。在这个过程中，脾和淋巴结从哺乳动物中提取出来并通过来源于脾和淋巴结的产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合而产生杂交瘤。至于骨髓瘤细胞，可以用从小鼠和大鼠中建立的细胞。细胞融合可以根据已知方法，如，见 Kohler and Milstein (1975) (*Nature*, 256, 495-497) 来完成。

26.6 Kd 多肽，其部分或包括 26.6 Kd 多肽或其部分的多肽被注射到大鼠中。三到七天后大鼠显示出足够的抗体滴度，大鼠用抗原最后一次免疫，它的脾作为产生抗体的细胞被提取出来。将脾在 MEM 培养基 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) 中切成片，离解的细胞 1,200 rpm 离心 5 分钟沉淀。脾细胞通过用 Tris-氯化铵缓冲液 (pH7.65) 处理沉淀 1 到 2 分钟去除红细胞而被分离。脾细胞用 MEM 培养基洗 3 次并用作产生抗体的细胞。

为了建立细胞系，骨髓瘤细胞从小鼠或大鼠中被分离出来。合适的骨髓瘤细胞可以从以下品系中分离：BALB/c (8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠)、P3-X63Ag8-U1 (称为 P3-U1) (*Current Topics Microbiological Immunology*, 81, 1 (1978)、SP2/0-Ag14 (称为 SP-2) (*Nature*, 276, 269 (1978))、P3-X63-Ag8653 (称为 653) (*Journal of Immunology*, 123, 1548 (1979)) 或 P3-X63-Ag8 (称为 X63) (*Nature*, 256, 495 (1975))。这些品系的细胞在 8-氮杂鸟嘌呤培养基中次代培养（正常培养基包括 15  $\mu\text{g/ml}$  8-氮杂鸟嘌呤 (RPMI1640 培养基包括 1.5 mM

谷氨酰胺,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-巯基乙醇, 10  $\mu\text{g/ml}$  庆大霉素和 CSL 生产的 10% FCS) 并在正常培养基上在细胞融合前培养 3 到 4 天。 $2 \times 10^7$  或更多的细胞为细胞融合而制造出来。

杂交瘤细胞和骨髓瘤细胞然后混合并用 MEM 培养基或 PBS 洗(每升: 1.83 g 磷酸氢二钠, 0.21 g 磷酸二氢钾, 7.65 g NaCl, pH 7.2), 并以产生抗体的细胞数量比骨髓瘤细胞大 5 到 10 倍混合。在 1,200 rpm 离心分离 5 分钟后, 获得沉淀。

沉淀的细胞在 0.2 到 1 ml 聚乙烯乙二醇溶液中悬浮(2 g 聚乙烯乙二醇-1000 (PEG-1000)、2 ml MEM 培养基、0.7 ml 二甲基亚砷(DMSO)), 每  $10^8$  抗体产生细胞在  $37^\circ\text{C}$  搅拌加到上述细胞中。然后每 1 到 2 分钟加入数次 1 到 2 ml 的 MEM 培养基。溶液和 MEM 培养基总共为 50 ml。在 900 rpm 离心分离 5 分钟后, 获得沉淀。100 ml 的 HAT 培养基(含  $10^{-4}$  M 次黄嘌呤,  $1.5 \times 10^{-5}$  M 胸苷和  $4 \times 10^{-7}$  M 氨基嘌呤的正常培养基)加入沉淀并且缓慢重悬沉淀。悬浮物每孔 100  $\mu\text{l}$  倒入 96 孔培养板并在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  存在下培养 7 到 14 天。

通过在 *Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 中描述的方法, 挑选出对 26.6 Kd 多肽特异反应的抗体产生杂交瘤。

上述用抗体检测先兆子痫多肽或其部分的方法可以包括直接或非直接结合的酶、荧光底物、放射性同位素或乳胶。该分析方法, 例如, 可以是检测酶活性, 如赖根过氧化物酶或碱性磷酸酶的 ELISA 或化学发光方法、检测荧光标签如发光或 GFP (绿色荧光蛋白) 的 FITC 方法, 检测放射性同位素标签如  $^{125}\text{I}$  的 RIA 方法或检测结合乳胶的乳胶凝集方法。分析还可以是, 例如, Western 印记法或免疫结构染色。此外, 26.6 Kd 多肽或其部分多肽可以用上述分析来定量。

在免疫分析中的抗体可以固定到固相载体上, 并且被捕获的多肽可以用有报告基团的第二抗体或用试剂检测。抗体可以附着的本领域技术人员熟知的任何物质可以用作固相载体。这些物质包括, 例如, 微滴度板、膜如硝酸纤维素膜、小珠、盘、玻璃玻璃纤维、塑料材料如橡胶、聚苯乙烯或聚氯乙烯。也可以使用磁珠或光纤传感器(U.S. Pat. No. 5,359,681)。

在描述中，“固相”表示用物理方法如吸附或通过抗体和载体上功能基团的共价键的化学结合而固定。抗体和载体上的功能基团可以直接或通过交联剂结合。物理方法的固定可以用适当稀释的抗体和载体，首选的是微滴度板或膜，在适当的缓冲液和适当的时间内接触而实现。接触的时间根据温度不同，但通常是在1小时和1天之间。大约10 ng到1 μg，更好的是加入约100到200 ng抗体并固定在塑料如聚苯乙烯和聚氯乙烯制成的微滴度板的每个孔中。化学方法的固定可以用载体和抗体的功能基团的反应，例如，载体与和羧基和氨基两者以及载体反应的两个功能试剂的反应来实现。例如，抗体可以通过使用苯醌或载体上的醛基和结合伙伴上的氨或活性氢间的缩合，用共价键固定在有合适的聚合物层的载体上。

载体固定的抗体用适当的封闭试剂例如牛血清白蛋白或Tween 20 (Sigma-Aldrich) 处理，通过本专业技术人员熟知的方法，以抑制其他多肽的物理吸附。载体固定的抗体同样品和本发明的多肽反应，并且抗体被合并。孕妇样品可以用适当的稀释剂例如磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 适当稀释。孕妇样品和抗体的反应时间应该足够检测从怀疑有先兆子痫的个体获得的孕妇样品中本发明的多肽的出现，最好的是，与结合和非结合多肽为平衡的水平相比，至少获得95%结合水平的的时间。

达到平衡的时间可以容易地用测量结合水平的的时间来决定。非结合多肽的物质用适当的缓冲液，例如PBS (含0.1% Tween 20)，清洗固相载体而去除。标记的第二抗体和固体载体反应。这些标记最好是酶，如辣根过氧化物酶、基质、补充元素、抑制剂、色素、放射性同位素、显色物质或荧光物质。

抗体和标记间的结合可以用已知方法来完成。第二抗体反应足够的时间而结合包括固定的抗体和本发明的多肽的复合物。适当的时间可以容易地用测量结合水平的的时间来决定。非结合第二抗体可以用适当的缓冲液，例如PBS (含0.1% Tween 20) 清洗固体载体而去除。

检测第二抗体标记的方法根据所用标记的种类。例如，当所用标记是放射性同位素时，可以用闪烁计数器或放射自显影检测。当所用标记是色素，显色物质或荧光物质时，可以用分光光度计检测。当酶

用作标记时，加入酶的底物，反应固定的时间，产物可以用分光光度计检测。标记和第二抗体通过卵白素-生物素方法直接或间接结合。当它们非直接结合时，卵白素-生物素的一部分结合到第二抗体上，另一个结合到标记上。26.6 Kd 多肽可以用流动式试验或试验纸试来检测。

在流动式试验中，孕妇样品加到固定了抗体的硝酸纤维素膜上，当样品经过膜时，多肽结合到固定的抗体上而形成免疫复合物。当含第二抗体的溶液经过膜时，多肽结合到免疫复合物上。在试纸试验中，一旦孕妇样品加入，孕妇样品经过含标记的抗体的区域，多肽结合到标记的抗体上而形成免疫复合物。

当孕妇样品经过含固相抗体的区域，多肽结合到免疫复合物上。有固定的抗体的区域中被检测到的第二抗体的量显示了先兆子痫的出现或缺失。

本发明多肽的“检测或定量”的另一种是编码先兆子痫多肽的多核苷酸的“检测或定量”。编码本发明的先兆子痫标记的多核苷酸可以被用作先兆子痫的标记。编码本发明 26.6 Kd 多肽的多核苷酸序列可以用标准的分子生物学技术检测和测量。

检测编码 26.6 Kd 多肽的多核苷酸出现的方法是用探针或引物，包括和多肽的编码序列具有相同序列的核苷酸或和具有和多肽或其衍生物的编码序列互补的序列的寡核苷酸。其衍生物包括，例如，其中寡核苷酸中的磷酸二酯键转化成磷硫酰键或 N3'-P5' phosphoramidite 键的寡核苷酸、其中核糖和磷酸二酯键被转化成肽键的寡核苷酸、其中寡核苷酸中的尿嘧啶用 C-5 丙酰尿嘧啶或 C-5 噻唑尿嘧啶替换的寡核苷酸、其中寡核苷酸中的胞嘧啶用 C-5 丙酰胞嘧啶或用吩恶嗪修饰的胞嘧啶替换的寡核苷酸或其中 DNA 中的核糖用 2'-O-丙基核糖、2'-甲氧乙氧核糖替换的寡核苷酸等。所有上述多核苷酸可以作为，例如，基因标记，PCR 引物或杂交探针而有用。本发明涉及部分或全部编码本发明先兆子痫标记的多核苷酸。

可能的是 26.6 Kd 多肽的编码序列可以被分离，测序和/或在体外表达。为实现这一目的，包括编码本发明的 26.6 Kd 多肽的多核苷酸的 cDNA 文库，从人类脑、心、骨骼肌、脾、肾、肝、小肠、胎盘、来自这些组织的人类正常细胞或人类脐静脉上皮细胞中制备。制作 cDNA

的有用方法在 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Current Protocols in Molecular Biology* (1994) (Wiley-Interscience) 中有描述。还有可从商家获得的试剂盒, 例如 cDNA 合成和质粒克隆用 Superscript 质粒系统 (Invitrogen) 或 ZAP-cDNA 合成试剂盒 (STRATAGENE)。一旦获得含编码本发明的 26.6 Kd 多肽的 DNA 的 cDNA, 它可被插入合适的表达载体。表达载体然后可以被引入适当的宿主并且得到转化体。

表达载体是任何其中 cDNA 被插入并在动物细胞中表达的载体。适合的载体包括, 例如 pcDNA1.1、pcDNA1.1/Amp、pCDM8、pREP (Invitrogen)、pHM6、pHB6 (Roche Diagnostics)、pKK223-3、pGEX (Amersham Pharmacia Bioteque)、pET-3、pET-11、pBluescriptII SK(+), pBluescriptII SK(-) (STRATAGENE)、pUC19、pTrxFus (Invitrogen)、pUC118、pSTV28 (TaKaRa)、pMAL-c2X (New England BioLabs)、pAGE107 (Cytotechnology, 3 (2), 133-140 (1990).; JP1991-22979)、pAGE103 (The Journal of Biochemistry, 101 (5), 1307-1310 (1987))、pAMo、pAMoA (The Journal of Biological Chemistry, 268 (30), 22782-22787 (1993))、pAMoPRSA (JP1993-336963) 或 pAS3-3 (JP1990-227075)。

含编码 26.6 Kd 多肽的 cDNA 的表达载体, 通过任何已知技术方法被引入任选的动物细胞。当宿主是动物细胞, 以下非限制性方法可以被使用: 电穿孔法 (Cytotechnology, (1990), 3, 133-140, calcium phosphate method or lipofection (PNAS, USA, (1987), 84, 7413))。适当的细胞包括 Namalwa (伯基特淋巴瘤, ATCC: CRL-1432), HCT-15 (人类大肠癌细胞, ATCC: CCL-225), COS-1 (非洲绿猴肾原细胞, ATCC: CRL-1650), COS-7 (非洲绿猴肾原细胞, ATCC: CRL-1651) 和 CHO-K1 (中国仓鼠卵巢细胞, ATCC: CCL-61)。

本发明的转化体用熟知和常用的方法培养。它可以用适合转化宿主的培养基和液体培养基完成。有用培养基的例子是 MEM 培养基 (Science, 130, 432 (1959))、D-MEM 培养基 (Virology, 8, 396 (1959))、PRMI 1640 培养基 (The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)), YT 培养基或 BEM 培养基可以使用。当转化体用动物细

胞作为宿主制备时，培养基通常添加胎牛血清（FCS）。培养基也可以选择性的包括促进转录活性的物质而增强表达载体的启动子转录活性。例如 isopropyl-1-thio-[beta]-D-galactopyranosin (IPTG) 可以被使用。培养基也可以包括其他营养素如葡萄糖、氨基酸、蛋白胨、维生素、激素或血清，更好的是 FCS、氯化钙或氯化镁。

本发明获得编码多肽 cDNA 的其他种方法包括化学合成多肽序列或从抽提的 mRNA 产生 cDNA。例如，根据本发明的 26.6 Kd 多肽的氨基酸序列可以确定多核苷酸序列。化学合成 DNA 然后用 DNA 合成仪通过硫代亚磷酸酯法（Shimazu Corporation）或用 392 型 DNA 合成仪通过 phosphoramidite 法（Perkin Elmer, Inc.）来完成。cDNA 可以通过表达以 26.6 Kd 多肽的 DNA 为模板的互补 mRNA 的细胞中的 mRNA 来制备。

当编码 26.6 Kd 多肽的 cDNA 被分离出来，DNA 可以在体外表达。例如编码 26.6 Kd 多肽的多核苷酸可以通过在合适的表达载体中亚克隆 DNA 片段或启动子下游的全长 DNA 而在宿主细胞中表达。表达载体然后转化到真核细胞，酵母，动物细胞，植物或昆虫细胞中。适合的表达载体包括 pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (Roche Diagnostics)、BluescriptII SK(+)、pBluescriptII SK(-) (STRATAGENE)、pSTV28、pUC118、pUC19 (TaKaRa)、pKK233-2 (Pharmacia)、pSE280、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen)、pGEMEX-1 (Promega)、pQE-8 (QIAGEN)、pGEX (Pharmacia)、pETsystem (Novagen)、pMAL-c2 (New England BioLabs)、pKYP10 (JP1982-110600)、pKYP200 (Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984).)、pLSA1 (Agricultural Biological Chemistry, 53, 277 (1989).)、pGEL1 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 82, 4306(1985).)、pEG400 (Journal of Bacteriology, 172, 2392(1990).)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM BP-6798)、pPA1 (JP1987-233798 ) 或 pTerm2 (JP1990-22979, U.S. Pat. No. 4,686,191, U.S. Pat. No. 4,939,094, U.S. Pat. No. 5,160,735)。

可以使用任何可以在如大肠杆菌的宿主细胞中表达的启动子。例如它可以是从大肠杆菌或噬菌体来源的启动子，如 trp 启动子 (Ptrp)、

lac 启动子 (Plac)、PL 启动子、PR 启动子或 PSE 启动子、SPO1 启动子、SPO2 启动子或 penP 启动子。

宿主细胞包括大肠杆菌属、灵杆菌属、芽胞杆菌属、短杆菌属、棒状杆菌属、微杆菌属或假单胞菌属的原核细胞。例如可以使用大肠杆菌品系 XL1-Blue、XL2-Blue、DH1、MC1000、KY3276、W1485、JM109、HB101、No. 49、W3110、NY49、BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS、HMS174 (DE3) 或 HMS174 (DE3) pLysS。可以用作宿主的酵母细胞包括酵母菌属的啤酒酵母、裂殖酵母属的非洲酒酵母、克鲁维酵母属的乳酵母、毛孢子菌属的芽霉菌糖酵母、许旺酵母属的 *S. alluvius species* 或毕赤酵母属的巴斯德毕赤酵母。

任何引导表达载体进入宿主的方法都可以使用。例如电穿孔法、原生质球或醋酸锂法。

当动物细胞被用作宿主时，可以使用以下表达载体：pcDNA1/Amp、pcDNA1、pCDM8、pREP4 (Invitrogen)、pAGE 107 (Cytotechnology, 3, 133 (1990).)、pAGE 103 (The Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987).)、pAMo、pAMoA (pAMoPRSA) (The Journal of Biological Chemistry, 268, 22782-22787 (1993).) 或 pAS3-3 (JP1990-22705)。任何可以在宿主中表达的启动子可以作为启动子。例如人巨细胞病毒 (hCMV) IE (即刻早期) 基因的启动子、SV40 的早期启动子、莫罗尼鼠白血病病毒的长末端重复启动子、逆转录病毒的启动子、HSP 启动子、SR [alpha] 启动子或金属硫蛋白启动子。人类 CMV IE 基因的增强子可以和启动子一起使用。作为宿主的动物细胞是，例如，HEK293 (人胎儿肾原细胞 ATCC: CRL-1573)、淋巴瘤细胞 (伯基特淋巴瘤细胞 ATCC:CRL-1432)、海拉癌细胞 (宫颈癌细胞 ATCC:CCL-2)、HBT5637 (白血病细胞 JP1987-299)、BALL-1 (白血病细胞) 或已建立的人源细胞 HCT-15 (大肠癌细胞)、Sp2/0-Ag14 (小鼠骨髓瘤细胞 ATCC:CRL-1581) 或已建立的鼠源细胞 NSO (小鼠骨髓瘤细胞)、COS-1 (非洲绿猴肾原细胞 (SV40 转化细胞)、ATCC:CRL-1650) 或已建立的猴源细胞 COS-7 (非洲绿猴肾原细胞 (SV40 转化细胞) ATCC:CRL-1651)、CHO-K1 (中国仓鼠卵巢细胞 ATCC:CCL-61) 或已建立的仓鼠来源的细胞 BHK-21 (C-13) (西西

里岛仓鼠肾细胞 ATCC:CCL-10)、PC12(肾上腺嗜铬细胞瘤 ATCC:CRL-1721)或已建立的大鼠来源的细胞 YB2/0(大鼠骨髓瘤细胞 ATCC: CRL-1662)。

昆虫细胞也可以作为宿主。当昆虫细胞用作宿主时,表达载体是,例如,pVL1392、pVL1393或pBlueBacIII(Invitrogen)并且用于感染的病毒是,例如,感染甘蓝夜蛾家族昆虫的Vaculovirus、苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)载体质粒与杆状病毒DNA(Bac-N-Blue)。转化昆虫细胞的方法是,例如,在杆状病毒表达载体:实验室手册(1992)(W. H. Freeman and Company)、分子克隆:实验室手册第二版(1989)(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、分子生物学中的当前规程(1994)(Wiley-InterScience)或生物技术6,47(1988)中有描述。含有用于感染昆虫细胞的靶基因和杆状病毒DNA的转移载体被加到培养物中,表达由重组体产生的靶基因的病毒感染要表达多肽的昆虫细胞。

作为宿主的昆虫是,例如,草地夜蛾(甘蓝夜蛾)或粉纹夜蛾来源的已建立细胞。例如,草地夜蛾来源的细胞包括Sf9(ATCC:CRL-1711,卵巢细胞)或Sf21(卵巢细胞)和粉纹夜蛾来源的细胞系,例如,High Five或BTI-TN-5B1-4(卵细胞,Invitrogen)。

一旦产生和培养了转化体,本发明的26.6 Kd多肽可以被分离和纯化。分离/纯化26.6 Kd多肽的有用方法是由Sandler(Methods in Enzymology, 83, 458)描述的方法。当26.6 Kd多肽作为可溶的多肽产生和积累,培养液可以从细胞中通过例如,离心分离出来。

如果26.6 Kd多肽存在于宿主细胞中,细胞被提取并用适合的缓冲液如STE溶液清洗并用超声波、弗氏细胞压碎器、Manton Gaulin匀浆器或Dynomill破成碎片。获得的物质然后用离心或过滤分离。

从原始材料中分离和纯化靶蛋白的方法可以用各种已有的分离/纯化方法完成。已知方法包括,例如溶剂提取法、硫酸铵盐析法、透析法、有机溶剂沉淀法、超滤法、凝胶过滤法、各种色谱如二乙胺乙基(DEAE)琼脂糖色谱、阴离子色谱或用赖氨酸的离子交换色谱如DIAION HPA-75(Mitsubishi Chemical Corporation),用赖氨酸的阳离

子色谱如 S-Sepharose FF (Pharmacia)、疏水色谱或亲和色谱如丁基琼脂糖凝胶或各种电泳如 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳或电聚焦电泳。

亲和色谱可以用抗 26.6 Kd 多肽抗体来实现。当 26.6 Kd 多肽以不溶多肽形式产生和积累时，细胞用上述方法分离并用适合的方法破成碎片。然后含有多肽的部分被收集。收集的样品用增溶剂，如表面活性剂，如十二烷基硫酸钠 (SDS) 或 Sodium N-Dodecanoyl salcosinate (salcosyl) 溶解。在溶剂溶液被稀释或透析到增溶剂没有或几乎没有的浓度后，多肽构建到正常的立体结构，纯化样品用上述分离/纯化方法获得。

本发明还提供了对分析从怀疑患有先兆子痫的哺乳动物受试者中取得的在孕妇样品中出现的先兆子痫标记存在的方法和试剂盒。早期检测先兆子痫可以减少治疗时间和减少发生临床显著合并症的风险。

用和广泛使用的尿妊娠试验试剂盒有相似原理，用于快速检测先兆子痫标记的简单的定点护理试剂盒可以让临床医生快速检测先兆子痫，并快速制定证实的和有效的治疗和预防方法。试剂盒的使用表明对有发生先兆子痫风险的所有病人的标准护理。

本发明的方法和试剂盒还提供了检测或监测包括状况改变的先兆子痫的方法。因此本发明还提供给临床医生监测先兆子痫在治疗后进展（恶化、改善或无改变）的方法。通常，临床医生会建立在选择的间隔内收集和分析病人一定量的孕妇样品的规程。通常样品在规定的时间内间歇获得。间歇采样之间的一段时间可以根据受试者的状况而定，可以从每 24 小时一个样品到持续采样，更通常的是每 4 小时到 30 分钟一个样品。

用这里描述的方法和技术，本发明孕妇样品中的 26.6 Kd 多肽标记的定性水平可以分析和估计，样品中出现的 26.6 Kd 多肽标记的定量水平可以分析和测量。临床医生会根据病人的状况选择定性方法，定量方法，或这两种方法。通常，收集的样品量小于 1 毫升，更常见的是小于 10  $\mu$ l。通常的样品可以从约 1  $\mu$ l 到约 1ml。

一旦先兆子痫的指征被检测到，该状况的介入和治疗已经开始，临床医生可以用本发明的方法和试剂盒监测治疗或介入的进展。通常会提取治疗后一个或更多的后续孕妇样品并分析在治疗先兆子痫继续

时 26.6 Kd 多肽标记的出现。治疗继续直到检测不到治疗后后续孕妇样品中 26.6 Kd 多肽标记的出现。因为治疗和介入改善了病况，26.6 Kd 多肽标记的表达和它在样品中的存在，将相应的减少。改善的程度用样品中检测到的 26.6 Kd 多肽标记的相应减少的水平来表示。

本方法中使用的试剂盒通常包括附着俘获性抗体的基质，因而孕妇样品和基质接触而向样品中 26.6 Kd 的多肽标记暴露俘获性抗体。试剂盒包括具有包含基质的表面的工具，如药铲或样品棒的获取方法。获取方法还包括接受孕妇样品的容器，其中容器有含有基质的血清接触表面。在另一个具体实施方案中，检测 26.6 Kd 多肽标记和抗体复合物的分析包括 ELISA，可以用作孕妇样品中的 26.6 Kd 多肽量的定量。在另一个具体实施方案中，获取方法可以包括容纳基质的盒子的器具。

用于检测 26.6 Kd 多肽标记的本发明的方法和试剂盒可以通过改造已知技术方法和试剂盒用于快速检测生物学样品中的其他蛋白和配基。适合本发明的方法和试剂盒的例子在 1997 年 8 月 12 日 May 等人的美国专利 5,656,503、O'Conner 等人 2002 年 12 月 31 日的美国专利 6,500,627、Smith-Lewis 1989 年 9 月 26 日美国专利 4,870,007、Ahlem 等人 1993 年 12 月 28 日美国专利 5,273,743 和 Valkers 等人 1986 年 12 月 30 日美国专利 4,632,901 中有描述，所有这样的文献在这里并入本文。

检测本发明的多肽标记的快速一步法可以减少检测发生先兆子痫的时间。通常的方法可以包括以下步骤：怀疑易发生先兆子痫的人类孕妇样品的获得；混合部分样品和特异结合 26.6 Kd 多肽标记的检测抗体，以用于起始检测抗体和样品中 26.6 Kd 多肽标记的结合；将样品和检测抗体的混合物与固定的特异结合 26.6 Kd 多肽标记的俘获性抗体接触，该俘获性抗体不与检测抗体交叉反应，以用于结合检测抗体到 26.6 Kd 多肽标记上，结合 26.6 Kd 多肽标记到俘获性抗体上，而形成可检测的复合物；从复合物中去除非结合检测抗体和任何非结合样品；并检测复合物的检测抗体。检测抗体可以用已知技术方法标记检测标记，如放射性标记、酶、生物染料、磁珠或生物素。

在实施例中，本发明提供了一个鉴定可以抑制妊娠人类中先兆子痫的发生或发展的化合物。仅通过参考下列非限制的具体实施例，本

发明现在将被进一步描述。但应该理解的是，以下的具体实施例是用作说明的，不应以任何方式作为这里描述的本发明的普遍性的限制。特别是当本发明具体涉及用血清作为孕妇样品时，不应该排除使用其他样品如尿。

### 具体实施例 1 最初发现

最初发现是在有妊娠诱导的高血压或 PIH 的妊娠妇女的血液（血浆或血清）含有在不发生 PIH 的正常妊娠妇女，正常非妊娠妇女和男性的血液中缺失的新的分析物。

以下过程被使用。从 PIH 病人或其他对照组（正常妊娠和非妊娠妇女和男性）获得的血开始，用亲和蓝胶处理去除主要的干扰化合物（如白蛋白）。用 SDS-PAGE 电泳鉴别这个独特的分析物。胶在窄的线性梯度范围中制备，因为非 PIH 病人的和 PIH 病人的多肽条带的结构差别是 4-6 个氨基酸。通过凝胶渗透色谱法，分析物显示可能是含有四个亚基的四聚体，和在非 PIH 病人血中的约 26 Kd 亚基分子量相比，每个是约为 26.6 Kd 的分子量。

### 具体实施例 2 临床研究

有临床妊娠诱导高血压史的病人中获得的血液样品从常规实验室获得并保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 。接着胎盘送组织学检查。我们选择进一步研究，被诊断为 PIH 的病人的血浆样品后来用胎盘的組織学检查确定。证实 PIH 的临床诊断的阳性组织学发现是，在所述的妊娠期胎盘的加速成熟，大量绒毛状梗死的出现和绒毛间、绒毛膜下或边缘出血，底蜕膜坏死和/或出血和妊娠血脈管系统的变薄或缺少。在每个病例中，组织病理学发现和 PIH 的临床印象是一致的。

分析物在 65 个被研究的有 PIH 的妇女血清中发现。它在 160 个正常妊娠的妇女的血中缺失。对 30 个不同的 PIH、37 个正常妊娠、7 个正常非妊娠妇女和 6 个男性的研究结果在图 1-6 中显示。兴趣分析物在有 PIH 的妇女血浆或血清中出现并在所有其他正常非 PIH 组的水浆或血清中缺失。这显示分析物不是激活涉及凝血或相关级联蛋白的结果。

在常规试验完成后病人的血在第二次就诊时（29-34 周妊娠）获得并用梯度 SDS-PAGE 检查他们的蛋白式样用于临床试验。其中未显示高或增加的血压和在当时没有异常血化学物的四个病人显示了在电泳

研究中患有 PIH 的病人的明显条带。后面检查这四个病人的历史显示所有四个人都在 36-39 周发生了高血压。在三个作了胎盘组织学检查的病人中，发现和 PIH 一致。

### 具体实施例 3 鉴定的分析物性质

在有 PIH 的妇女的血中发现的分析物的亚基分子量用梯度 SDS-PAGE 测定为约 26.6 Kd。术语约是指 SDS-PAGE 伴随的不准确性；但是 26.6 Kd 多肽的大小是和非 PIH 受试者的血清中发现的 26 Kd 多肽相比。其它分析物中氨基酸组成的内在结构差别可以从图 2 和 4、5 中看到；用考马斯蓝染色，和当使用银染同等的染色相比，分析物有相对于非 PIH 的条带低水平的染色（图 1、3 和 5）。

### 具体实施例 4 半纯化源自正常妊娠妇女和患有 PIH 的妊娠妇女的血液的电泳比较

有妊娠诱导高血压临床史的病人的肝素锂血样从常规实验室获得并且血浆在 -20°C 储存。随后胎盘送组织学检查。我们选择进一步研究，被诊断为 PIH 的病人的血浆样品后来用胎盘的组学检查确定。证实 PIH 的临床诊断的阳性组织学发现是在所述的妊娠期胎盘的加速成熟，有/无绒毛间、绒毛膜下和/或边缘出血的大量绒毛状梗死的出现，有妊娠血管系统的变薄或缺少的底蜕膜坏死和/或出血。在每个病例中，组织病理学发现和 PIH 的临床印象是一致的。

在使用前，亲和蓝胶（AGB [BIORAD]）在 20 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.1 中用 1.4M NaCl 清洗。然后胶在 PBS 中洗三遍（NaCl: 8.0g/L [BDH]; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1.15g/L [BDH]; KCl: 0.2g/L [BDH]; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O: 0.2g/L [BDH]）。每次清洗后，胶在 4500 rpm 离心 10 min, 弃去上清。在第三次离心后，胶在 PBS 中重悬到其原始体积（50 ml）。

病人血清（从疾病特异和阴性（对照）组来的所有血清；每组 12-20 病人）（50-250 μL）用准确的 1:5 比例分别用 AGB 处理并彻底混合 30 min 去除血中常见的白蛋白和其他蛋白。然后在 10,000 rpm 离心 10 min 保留上清。所有上清置于用 concavalin-A 作亲和配体的亲和基质上（1 ml）；基质用含有以下物质: 0.5M NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> 和 0.1 mM MnCl<sub>2</sub> 的 pH7.4 的 0.02M Tris 缓冲液平衡。所有样品用 0.5mL/min 的流速并

且收集洗的部分用于进一步处理。结合的部分用 50 mM 甲基-D-糖苷作为单一峰洗脱并用作进一步研究。

上清 (50  $\mu$ l) 和 0.2ml 的电泳样品缓冲液混合 (20% 甘油 (v/v)、2% (w/v) SDS、5% (v/v) 2-巯基乙醇、0.00125% (w/v) 溴酚蓝和 12.5% (v/v) 0.5M Tris-HCl, pH 6.8), 在 100°C 煮 10 min, 加 10  $\mu$ L 到梯度胶中; 使用有 4% 积层胶的 15-23% 和 15-25% 聚丙烯酰胺梯度胶。内部自制的分子量标准也在相同的胶上跑。胶用电泳缓冲液 (125 mM Tris, 0.96 M 甘氨酸, pH 8.0, 含 0.5% (w/v) SDS) 平衡。

电泳在 BIORAD Protean II 系统上完成。蛋白在 40 ma 恒流电泳约 5 h 或直到染料前沿接近胶的底部。蛋白用银染 [BIORAD] 或考马斯蓝 [SIGMA] 观看。

图 1-5 显示有妊娠诱导的高血压 (n=25), 正常妊娠妇女 (n=28) 正常非妊娠妇女 (n=7), 正常男性 (n=6) 血清得到的电泳蛋白式样。PIH 中的兴趣蛋白条带对正常样品中发现的条带有不同的迁移, PIH 条带的更细分离显示这条带可以分成两条带。这些造成一致性的和有 PIH 的妇女中获得的血的特征性的分步结合式样。从标准曲线得到的亚基分子量约分别是对 PIH 的 26.6 kd 和对对照迁移条带的 25.8-26 Kd; 这可以从图 1-5 中看到。这一差别可能是由于在正常妊娠妇女中缺失 4-6 个氨基酸或由于蛋白质的碳水化合物组成的变化。有 PIH 的病人还显示比正常血清更扩散的迁移式样, 很难确定 PIH 条带是否是一、二或多条蛋白条带的结果, 接着也是一或多蛋白的结果。

当电泳比较正常病人的血清和血浆时, 相似的条带式样的变化还在 PIH 病人的血清和血浆样品中观察到。这揭示 PIH 式样的迁移变化不是涉及凝血或相关级联的蛋白激活的结果。

在常规试验完成后病人的血在第二次就诊时 (29-34 周妊娠) 获得并用梯度 SDS-PAGE 检查他们的蛋白式样用于临床试验。其中未显示高或增加的血压和在当时没有异常血化学物的四个病人显示了在电泳研究中患有 PIH 的病人的明显条带。后面检查这四个病人的历史显示所有四个人都在 36-39 周发生了高血压。在三个作了胎盘组织学检查的病人中, 发现结果和 PIH 一致。

表 1

从不同妊娠时间收集的 PIH (P) 和正常妇女 (N) 血清在  $\beta$ -巯基乙醇存在时用 SDS-PAGE 检测分析物的存在。蛋白式样用银染 (图 1) 和考马斯蓝染色 (图 2) 观看。

胶的泳带号	样品号	妊娠周数 (K)	描述
1		-	标准
2		-	标准
3	1	24	N
4	2	28	N
5	3	23	P
6	4	26	P
7	5	32	N
8	6	30	N
9	7	24	P
10	8	33	P
11	9	34	N
12	10	26	N
13	11	25	P
14	12	27	P
15	13	22	N
16	14	27	N
17	15	29	P
18	16	35	P
19		-	标准
20	17	36	N

表 2

从不同妊娠时间进一步收集的 PIH (P) 和正常妇女 (N) 血清在  $\beta$ -巯基乙醇存在时用 SDS-PAGE 检测分析物的存在。蛋白式样如图 3 显示用银染观看。

胶的泳带号	样品号	妊娠周数 (K)	描述
1		-	-
2		-	标准
3	18	28	N
4	19	27	N
5	20	26	P
6	21	26	P
7	22	27	N
8	23	30	N
9	24	25	P
10	25	33	P
11	26	34	N
12	27	36	N
13	28	29	P
14	29	30	P
15	30	32	N
16	31	26	N
17	32	34	P
18	33	28	P
19		-	标准
20	34	32	N

表 3

从不同妊娠时间进一步收集的 PIH (P)、正常妇女 (N) 和有妊娠诱导的高血压 (H) 妇女的血清在  $\beta$ -巯基乙醇存在时用 SDS-PAGE 检测分析物的存在。蛋白式样如图 4 显示，用考马斯染蓝染色观看。

胶的泳带号	样品号	妊娠周数 (K)	描述
1		-	标准
2	35	22	N
3	36	24	N
4	37	24	N
5	38	28	P
6	39	29	P
7	40	28	N
8	41	30	N
9	42	32	N
10	43	33	P
11	44	34	P
12	45	29	P
13	46	33	N
14	47	38	N
15	48	40	N
16	49	36	N
17 <sup>Ω</sup>	50	24	H
18 <sup>φ</sup>	51	23	H
19 <sup>δ</sup>	52	26	H
20		-	标准

表 3 注释:

Ω: 50 号病人有高血压, 没有蛋白尿。

φ: 51 号病人有高血压, 没有蛋白尿。

δ: 52 号病人有高血压和蛋白尿。

表 4

进一步收集的 PIH (P)、正常非妊娠妇女 (W) 和正常男性 (M) 的血清在 β-巯基乙醇存在时用 SDS-PAGE 检测分析物的存在。蛋白式样如图 6 显示, 用考马斯染蓝染色观看。

胶的泳带号	样品号	妊娠周数 (K)	描述
1		-	标准
2		-	标准
3	53	-	W
4	54	-	W
5	55	27	P
6	56	29	P
7	57	-	W
8	58	-	W
9	59	-	W
10	60	-	W
11	61	33	P
12	62	28	P
13	63	-	M
14	64	-	M
15	65	-	M
16	66	-	M
17	67	-	M
18	68	-	M
19	69	-	W
20		-	标准

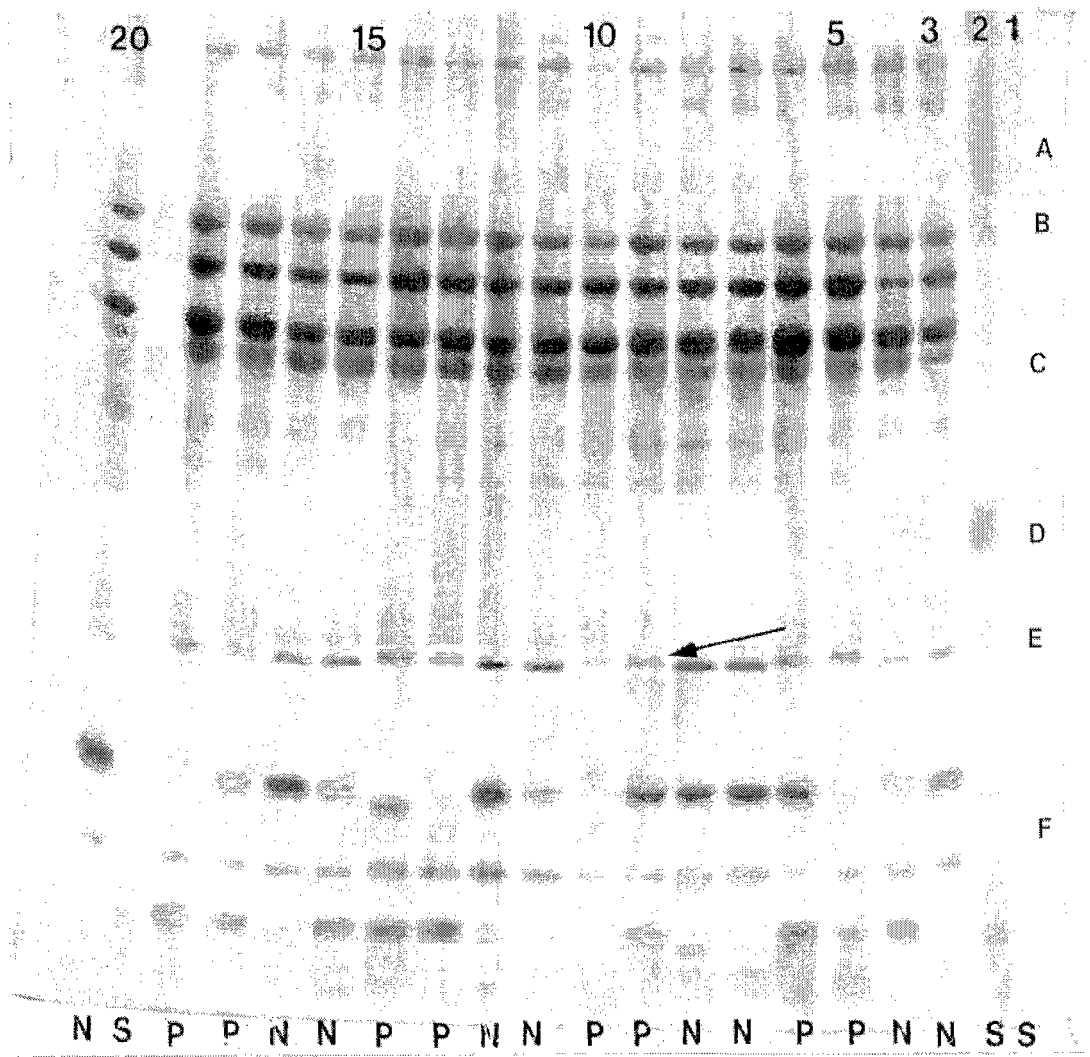


图 1

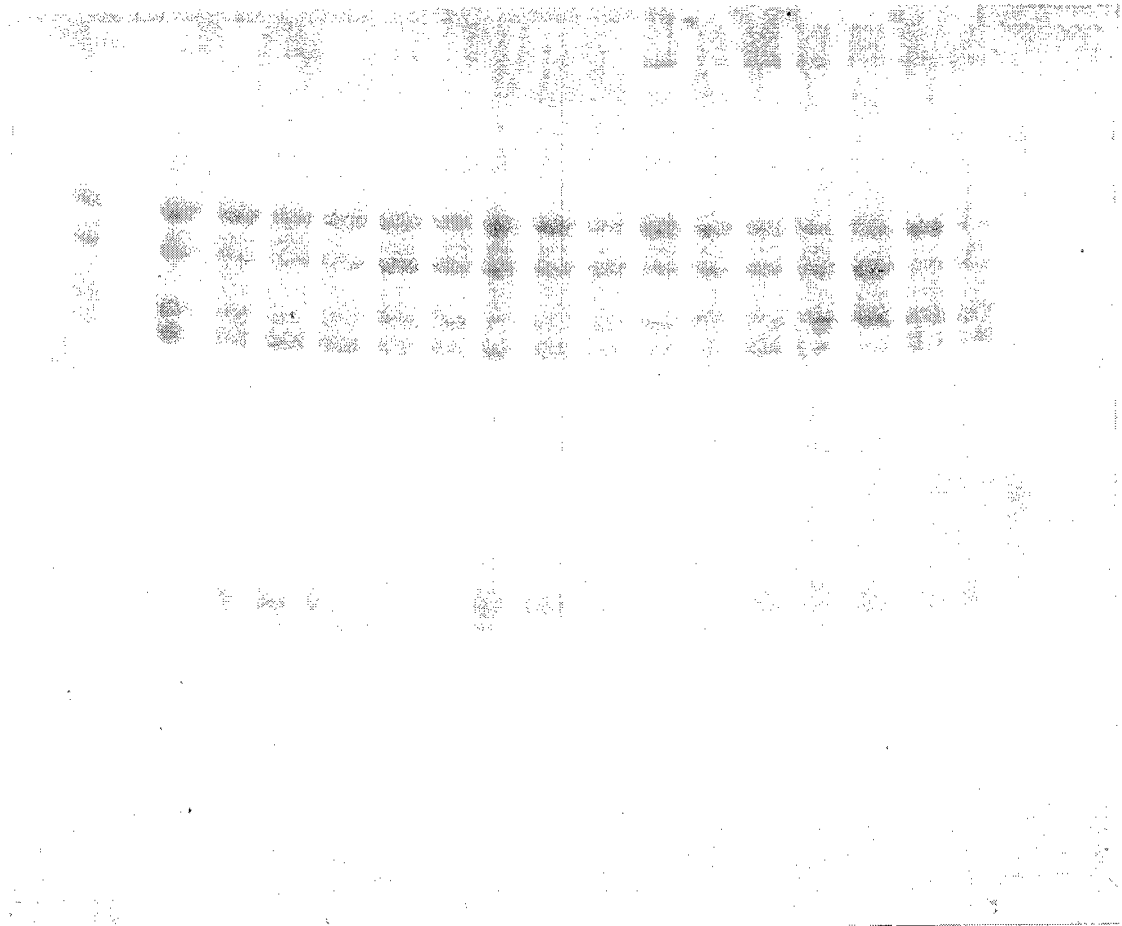


图 2

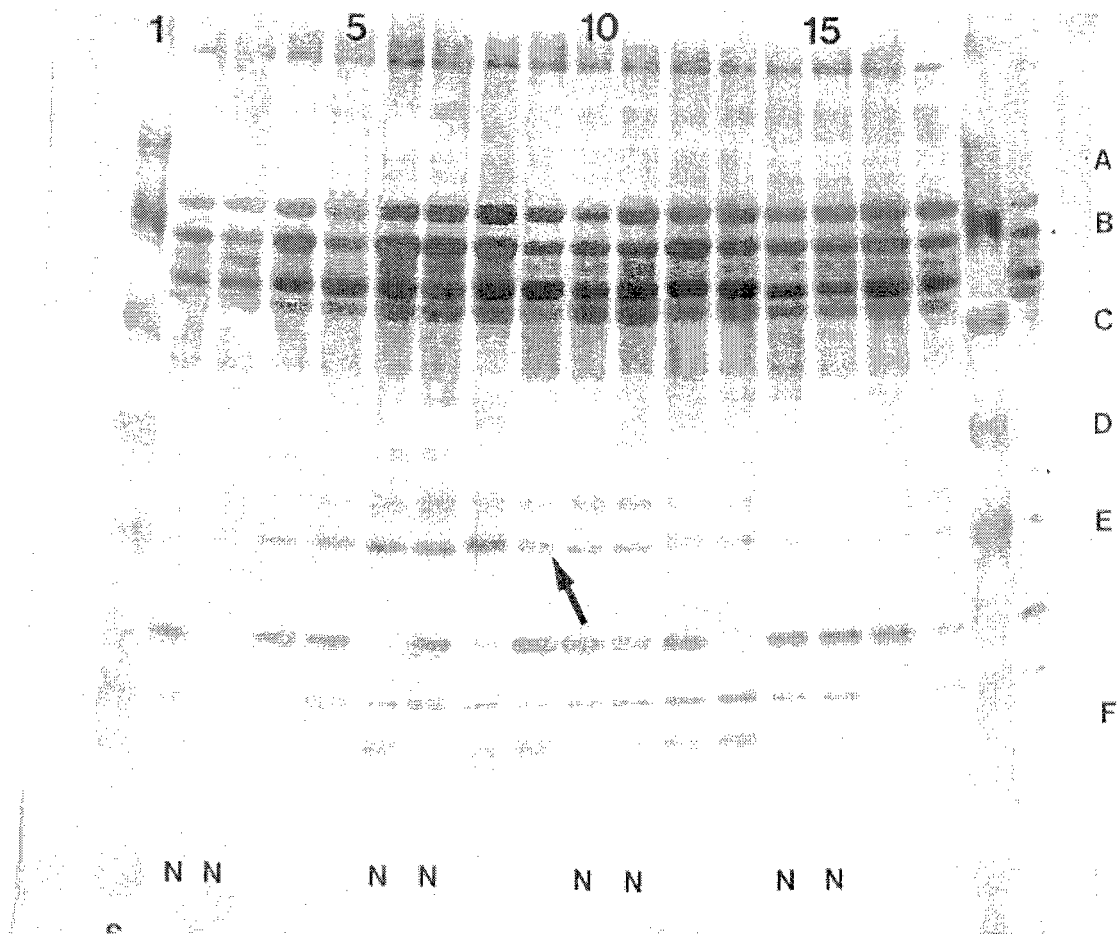


图 3

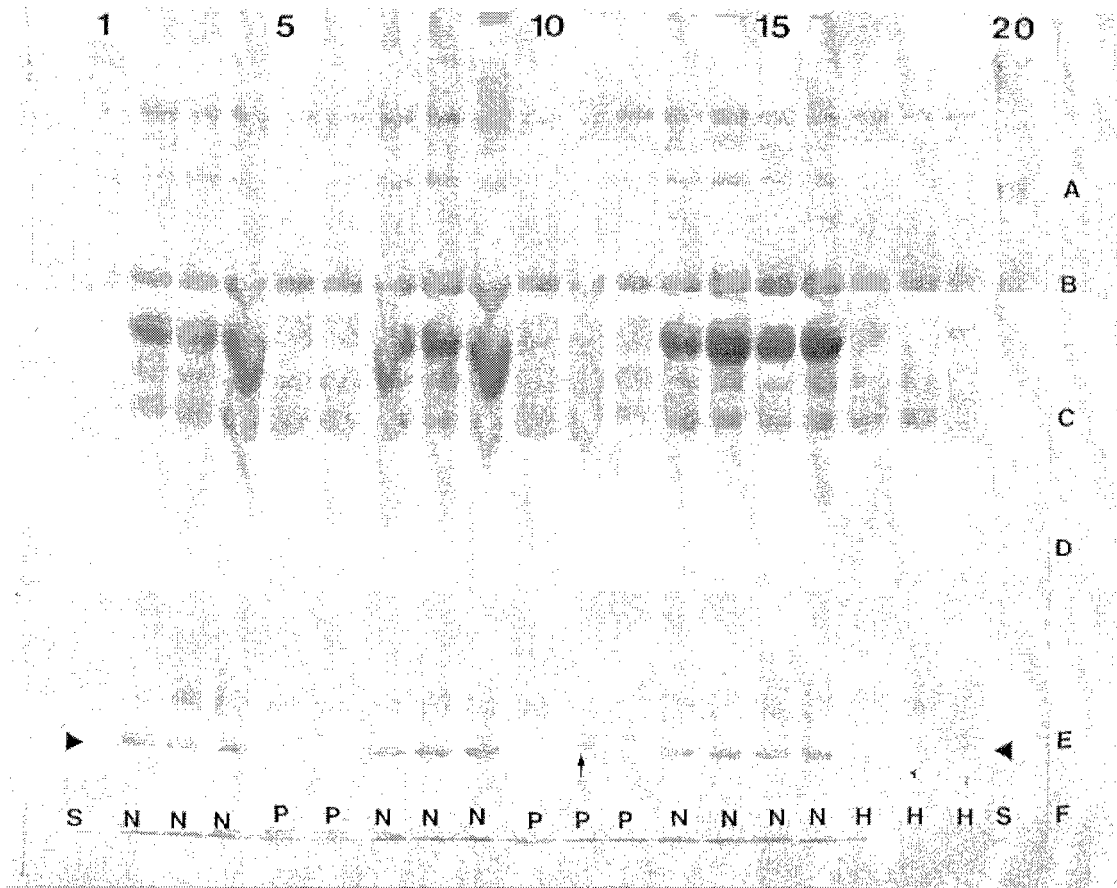


图 4

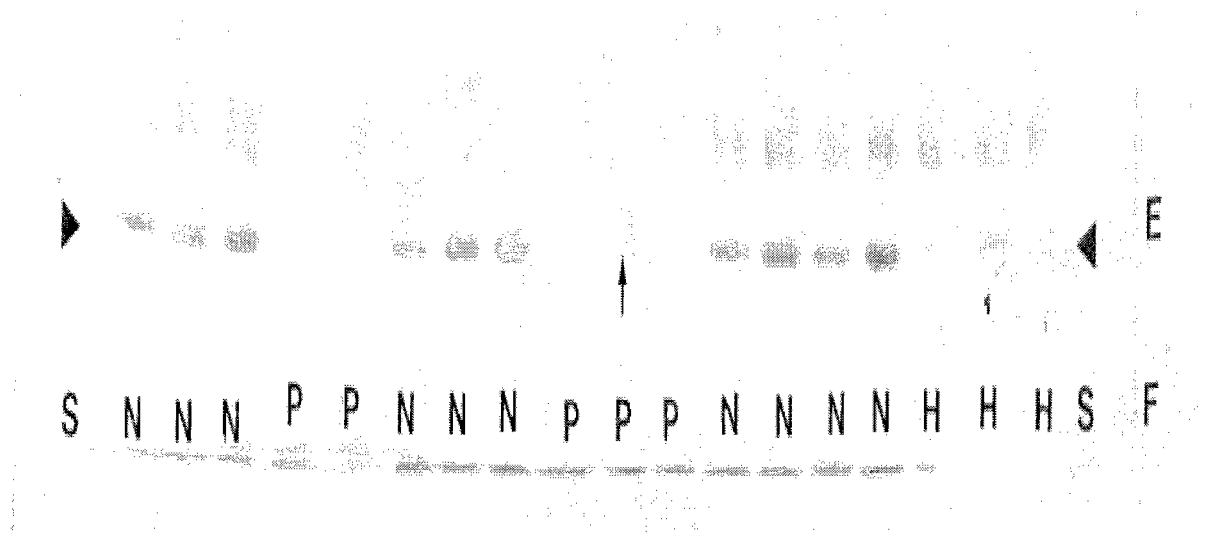


图 5

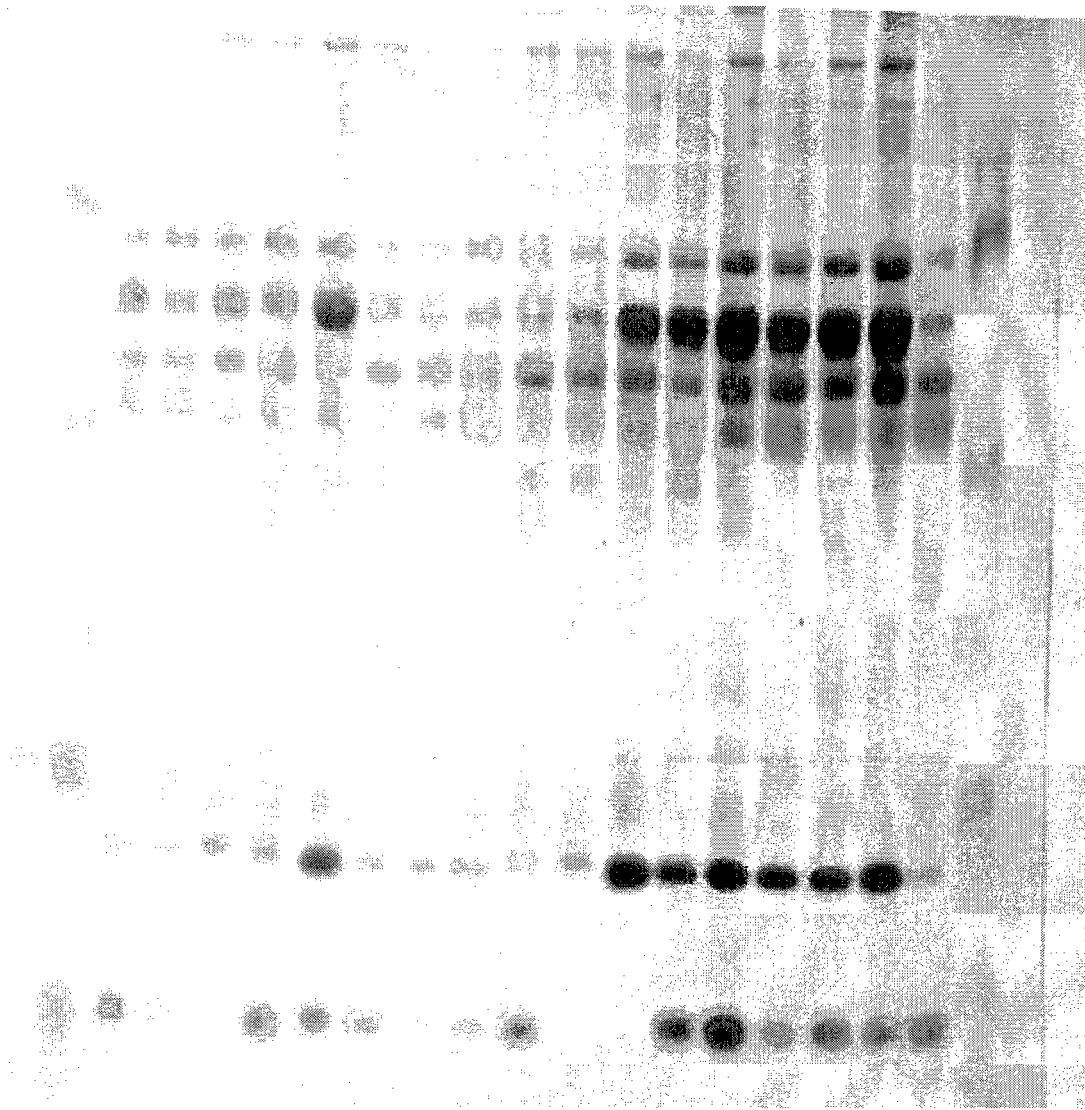


图 6

专利名称(译)	诊断先兆子痫的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101616927A</a>	公开(公告)日	2009-12-30
申请号	CN200680056330.6	申请日	2006-09-15
[标]发明人	V·沃罗泰利亚克		
发明人	V·沃罗泰利亚克		
IPC分类号	C07K2/00 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/4715 G01N2800/52 G01N33/689		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/717684 2005-09-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及先兆子痫发生的标记。特别是本发明提供了先兆子痫发生的标记，该标记由在还原条件下用15 - 30%的梯度SDS - PAGE测定的一个约26.6Kd的多肽构成。

