

[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 200710152761.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61B 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年6月11日

[11] 公开号 CN 101196516A

[22] 申请日 2007.9.20

[21] 申请号 200710152761.9

[30] 优先权

[32] 2006.9.20 [33] EP [31] 06019669.8

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 G·赫斯 A·霍施 D·兹杜尼克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 黄可峻

权利要求书3页 说明书24页 附图2页

[54] 发明名称

利钠肽和胎盘生长因子/可溶性 VEGF 受体区分与心脏病或孕妇的胎盘相关的心机能障碍

[57] 摘要

本发明涉及用于诊断孕妇是否患心机能障碍的方法,包括步骤:a)测定样品中利钠肽水平,b)测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平,其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍,或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在心脏病相关的心机能障碍。本发明还涉及阵列、免疫学速测法、相应的试剂盒的应用以及用于判定支持患心机能障碍孕妇可行治疗的方法。

1. 利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体在制备用于诊断孕妇是否患心机能障碍的药剂中的应用,

其中所述的诊断包括步骤:

a) 测定样品中利钠肽水平

b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平

其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍,

或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其中以平行方式进行利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的测定。

3. 根据权利要求 1 和 2 任一项的用途, 其中利钠肽是 BNP-型肽或其变体。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的用途, 其中利钠肽是 NT-前 BNP 或其变体。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的用途, 其中利钠肽是 ANP-型肽或其变体。

6. 根据权利要求 1-5 任一项的用途, 其中样品是血样, 优选血浆或血清和/或尿样。

7. 根据权利要求 1-6 任一项的用途, 其中在妊娠中期或晚期进行测定。

8. 根据权利要求 1-7 任一项的用途, 其中增加的 NT-前 BNP 水平相应于 125 pg/ml 至 300 pg/ml 的 NT-前 BNP 的血浆水平, 高增加的 NT-前 BNP 水平相应于 300 pg/ml 至多于 500 pg/ml 的 NT-前 BNP 的血浆水平。

9. 根据权利要求 1-8 任一项的用途, 其中未增加的 NT-前 BNP 水平相应于小于 125 pg/ml 的血浆水平。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的用途, 其中测定至少一个额外的样品的利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平。

11. 根据权利要求 1-10 任一项的用途, 其中测定额外的至少一种先兆子痫生物标记, 所述的先兆子痫生物标记优选选自 α 2-巨球蛋白、CD40

配体、硬骨鱼紧张肽 II(Urotensin II)等。

12. 一种试剂盒, 其包含(a) 用于测定孕妇样品中利钠肽水平的试剂或装置, 和(b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平的试剂或装置, 其中所述的试剂盒用于体外诊断心脏病, 特别是用于区分根据权利要求 1-11 任一项的与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍。

13. 根据权利要求 12 的试剂盒, 特征在于所述试剂盒包括用于对所测定的患心机能障碍孕妇的利钠肽、PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平数据进行解释, 将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开的包装说明书。

14. 特异性结合利钠肽, 特别是 NT-前 BNP 或其变体的配体以及 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的配体在制造用于诊断心脏病的诊断试剂盒, 特别是用于在患心机能障碍孕妇中区分与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍的诊断试剂盒中的应用。

15. 一种阵列, 其用于体外诊断心脏病, 特别是通过测定利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体, 用于将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开, 所述阵列含有与利钠肽、特别是 NT-前 BNP 或其变体特异性结合的配体以及 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的配体, 所述配体(a) 用于测定孕妇样品中利钠肽水平, 和(b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平。

16. 利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的特异抗体在制备下述免疫学速测法中使用的试剂中的应用, 特征在于所述的免疫学速测法中使用的特异于利钠肽、和/或 sFlt-1 或其变体的抗体, (a) 用于测定孕妇样品中利钠肽或其变体的水平, 和(b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平,

所述的免疫学速测法用于体外诊断心脏病, 特别是通过测定利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体, 将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开。

17. 利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体在制备用于判定支持患心机能障碍孕妇可行治疗的方法中所使用的药剂中的应用,

其中所述孕妇存在与心脏病相关的心机能障碍症状, 包括步骤:

a) 测定样品中利钠肽水平,

- b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平,
- c) 其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍,
或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍,
- d) 任选地通过心脏病专家启动孕妇检查,
- e) 如果依据步骤 c) 的评估指示存在与心脏病相关的心机能障碍, 则建议启动治疗。

利钠肽和胎盘生长因子/可溶性 VEGF 受体区分与心脏病或孕妇的胎盘相关的心机能障碍

发明领域

本发明涉及生物标记在诊断孕妇心机能障碍中的应用，特别是，用其将胎盘相关的心机能障碍和与心脏病相关的心机能障碍区分开。

发明背景

先兆子痫是一种最常见的妊娠病症，影响着约 5% 的妊娠。其是母体死亡和发病、围产期死亡、早产和子宫内生长受限的主要原因。先兆子痫是一种高血压、水肿和蛋白尿综合征，症状出现在妊娠第 20 周后，一般可通过常规监测妇女血压和尿得到检测。当孕妇发展为高血压(间隔至少 6 小时测定的两次独立读数为 140/90 或更高)并在 24 小时尿样中存在 300 mg 蛋白质(蛋白尿)时，就诊断为先兆子痫。先兆子痫还更常见于已存在高血压、糖尿病或肾病的妇女中，具有先兆子痫家族史的妇女中，以及多胎妊娠(双胞胎、三胞胎或更多胞胎)的妇女中。

有关键性的发现支持免疫适应不良以及其后的血管生成生长因子浓度降低和引起母体炎症应答的母体循环中胎盘碎屑的增加所驱动的全面胎座式的因果模型或病原模型。目前，基于流行病学和临床危险因子来鉴定有患病危险的妇女，但先兆子痫的诊断标准仍不清楚。

妊娠包括新血管的同步形成，即一种称为血管生成的过程。一些生长因子和特异性受体如血管内皮生长因子(VEGF)、胎盘生长因子(PIGF)和可溶性 Flts-1(sFlts-1)在该过程中起重要作用。先兆子痫与这些能在孕妇血样中被测定的分子的异常表达有关。

VEGF 是一种内皮细胞特异性促分裂原、血管生成诱导物以及血管渗透性的调节物。已显示 VEGF 对于肾小球毛细血管修复是重要的。VEGF 结合跨膜酪氨酸激酶受体、获得自许多不同组织的在内皮细胞中差异表达的 fms-样酪氨酸激酶(Flt-1) 的同型二聚体。滋养层细胞高表达 Flt-1 促成胎盘发育。PIGF 为细胞滋养层和合胞体滋养层所表达并能诱导内皮细胞增殖、迁移和活化。PIGF 作为同型二聚体结合 Flt-1 受体。PIGF 和 VEGF 都有助于促有丝分裂活性和血管生成，所述的促有丝分裂

活性和血管生成对于发育中的胎盘是很关键的。sFlt-1, 一种 Flt-1 受体的剪接变体, 其缺少该受体的跨膜和胞质结构域, 以高亲和力结合 VEGF, 但不刺激内皮细胞的有丝分裂发生。其在胎盘组织和人脐静脉内皮细胞中表达。据认为 sFlt-1 下调 VEGF 信号传导途径。

一些研究表明发展为先兆子痫的妇女在一生中也处于心血管并发症的危险之中。先兆子痫的许多危险因子和病理生理异常类似于冠状动脉疾病。有迹象提示胰岛素抗性是一种共性因子。与胰岛素耐受性有关的微血管机能障碍能易于引起冠心病和先兆子痫。

除胎盘诱导形成的心机能障碍之外, 对于孕妇心机能障碍的病因也要考虑原发性心机能障碍。原发性心机能障碍的主要病因是先天性和后天性心脏病以及心肌疾病(myocardic diaseases)。

一种通过测定样品中 sFlt-1、VEGF 或 PLGF 多肽水平的监测孕妇先兆子痫的方法披露于 US 2004/0126828 A1。该文作者陈述了取自先兆子痫妇女血样中的 sFlt-1 水平升高。sFlt-1 以高亲和力结合 VEGF 和 PIGF 并阻断这些生长因子的促有丝分裂和血管生成活性。该文作者认为先兆子痫患者中的循环 sFlt-1 可对抗血管舒张, 因此促成高血压。

此外, US 2005/0025762 A1 披露了通过使用降低 sFlt-1 水平的化合物以及抑制 VEGF 或 PLGF 与 sFlt-1 结合的化合物治疗先兆子痫和子痫的方法。然而, 仅通过测定这些血管生成生长因子, 孕妇心机能障碍似乎仍然无法得到检测。

DE102004051847 披露了一种通过测定 PIGF 和 sFlt-1 水平诊断动脉粥样硬化的方法, 其包括确定 PIGF 和 sFlt-1 之间相互关系的方法。心肌梗塞患者中降低的 PIGF 水平与增加的进一步血管事件的危险有关。然而, 该文作者预言其请求保护的方法仅涉及具有动脉粥样硬化病因的血管疾病, 先兆子痫或子痫被排除在其请求保护的方法之外。

此外, 业已尝试确定脑钠肽 (BNP) 是否能在患先兆子痫的孕妇中用作生物化学标记。Resnik 等(American Journal of Obstetrics and Gynecology (2005) 193, 450 - 4)发现与正常妊娠相比, 在重症先兆子痫中 BNP 水平升高。该作者推测心室应激和/或亚临床心机能障碍与先兆子痫有关。然而, Resnik 没有描述孕妇的心机能障碍是否由先兆子痫所引起, 也没有描述该症状是否归因于其他已存在的的心脏事件。

然而, 由于没有检测到诸如胎盘功能不足等其他病因, 只确定利钠

肽无法证明孕妇心机能障碍病因。因此，就目前的技术发展水平而言，没有可以用来区分孕妇心机能障碍是由胎盘相关的心机能障碍所引起，还是由原发性心脏病所引起的诊断方法。

因此，本发明的一个目的是提供用于诊断孕妇心机能障碍的改良方法和手段（means），特别是用来将胎盘相关的心机能障碍和原发性心脏病区分开的方法和手段。

发明概述

本发明涉及一种用于诊断孕妇是否患心机能障碍的方法，包括步骤：a) 测定样品中利钠肽水平，b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平，其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍，或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在心脏病相关的心机能障碍。

此外，本发明包含一种阵列，其用于体外诊断心脏病，特别是通过测定利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体，用于将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开，所述阵列含有与利钠肽、特别是 NT-前 BNP（NT-proBNP）或其变体特异性结合的配体以及 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的配体，所述配体 (a) 用于测定孕妇样品中利钠肽水平，和 (b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平。

另外，本发明涉及一种用于判定支持患心机能障碍孕妇的可行治疗的方法，其中所述孕妇存在与心脏病相关的心机能障碍症状，该方法包括步骤：a) 测定样品中利钠肽水平，b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平，c) 其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍，或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍，d) 任选地通过心脏病专家启动孕妇检查，e) 如果依据步骤 c) 的评估显示存在与心脏病相关的心机能障碍，建议启动治疗。

附图简述

图 1 显示了 NT-前 BNP 浓度参考值的方框图（box plot）。N 代表

患者数目。第一栏显示了 508 位表面上健康的 18 - 44.9 岁女性血液供者的 NT-前 BNP 浓度。将该参考值与 55 位孕妇的 NT-前 BNP 浓度进行比较, 这 55 位孕妇分为处于妊娠中期 (2.trimester) 的 9 位孕妇和处于妊娠晚期 (3.trimester) 的 46 位孕妇。在这些组之间 NT-前 BNP 度表面上没有显著差异。此外, 指示了中值和第 75、第 95 和第 5 以及第 25 百分位数 (percentile)。

图 2 显示了 46 位孕妇中所测的 sFlt-1 浓度和 PIGF 浓度参考值的方框图。这些 46 位孕妇的 NT-前 BNP 浓度小于 125 pg/ml, 该组分为处于妊娠中期的 14 位孕妇和处于妊娠晚期的 32 位孕妇。由妊娠中期到妊娠晚期 PIGF 和 sFlt-1 浓度仅仅稍有减少。此外, 方框图显示了 sFlt-1/PIGF 比。由妊娠中期到妊娠晚期该 sFlt-1/PIGF 的浓度比增加。

此外, 指示了中值和第 75、第 95 和第 5 以及第 25 百分位数。

发明详述

在第一个实施方案中, 本发明的目的通过下述的用于诊断患心机能障碍孕妇的方法实现, 所述方法包括步骤:

- a) 测定样品中利钠肽水平
- b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平

其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍,

或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍。

本发明的方法还可以在患心机能障碍的孕妇中, 将胎盘相关的心机能障碍和与心脏病相关的心机能障碍区分开。

类似地, 本发明还涉及所测定的利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 水平的组合信息在存在心机能障碍症状的孕妇中诊断心机能障碍, 特别是与心脏病相关的心机能障碍和/或胎盘相关的心机能障碍中的应用。这样的应用可类似地适用于本申请说明书和实施例所披露的所有其他特征和优选的实施方案。

该方法还可包括从孕妇取样, 如体液或组织样品步骤。在本发明中, 可优选地通过非医学人员(即没有接受过医生职业所需的教育)进行体液或组织样品取样。特别是适用于样品是血液的情况。

根据本发明，组织样品指获得自死亡或活的人或动物体的任何种类的组织。可利用任何本领域技术人员已知的方法获得组织样品，例如利用活组织检查或刮除术。

根据本发明，体液可包括血液、血清、血浆、淋巴液、脑浆(cerebral liquor)、唾液、玻璃体液和尿。具体来说，体液包括血液、血清、血浆和尿。可利用任何本领域已知的方法获得体液样品。

本发明还提供了在诊断患心机能障碍的孕妇中的改善的安全性。如上所述，在本发明中已发现增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍，其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍。

在本发明中已发现单独测定利钠肽，特别是 NT-前 BNP，无法区分心机能障碍是否与心脏病相关或与胎盘相关的心机能障碍相关。联合测定利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体可有助于避免误诊，特别是在抢救时。

本发明利用了某些“生物标记”(或简称“标记”)，特别是生物化学或分子标记。术语“生物标记”、“生物化学标记”和“分子标记”是本领域技术人员已知的。具体来说，生物化学或分子标记是在存在或不存在某些病症、疾病或并发症中差异表达的(即上调或下调的)基因表达产物。一般而言，分子标记定义为核酸(例如 mRNA)，而生物化学标记则是蛋白或肽。适合的生物标记的水平可指示病症或疾病的存在与否，并因此可用于诊断。

本发明特别利用了胎盘生长因子(PIGF)、sFlt-1 及其变体和利钠肽，特别是 NT-前 ANP 和 NT-前 BNP，作为生物标记，特别是作为生物化学标记。

NT-前 ANP 和 NT-前 BNP 属于利钠肽组(参见如 Bonow, R.O. (1996). *New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation* 93: 1946-1950)。如早已提及的，NT-前 ANP 和 NT-前 BNP 是通过前体分子——前肽原蛋白水解切割产生的，该前肽原经蛋白水解切割产生活性激素(ANP 或 BNP)以及相应的 N-末端片段(分别为 NT-前 ANP 和 NT-前 BNP)。

该前肽原(在前 BNP 原情况下，134 个氨基酸)包含短信号肽，其经

酶切割释放前肽(在前 BNP 情况下, 108 个氨基酸)。该前肽被进一步切割为 N-末端前肽(NT-前肽, 在 NT-前 BNP 情况下 76 个氨基酸)和活性激素(在 BNP 情况下 32 个氨基酸, 在 ANP 情况下 28 个氨基酸)。

不同的切割产物显示各自不同的特性。BNP 主要在心室中产生(但不排他)并随管壁张力的增加而释放。与此相反, ANP 只在心房中产生并释放。ANP 和 BNP 是活性激素并且与其各自的无活性对应体——NT-前 ANP 和 NT-前 BNP 相比具有更短的半衰期。BNP 在血液中代谢, 而 NT-前 BNP 则在血液中作为完整分子循环并通过肾原样地排出。NT-前 BNP 的体内半衰期为 120 分钟, 长于 BNP (其为 20 分钟) (Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. J Endocrinol. 2000; 167: 239-46.)。

根据本发明。术语“利钠肽”包括 ANP 和/或 BNP 或其片段, 和/或 NT-前 BNP 和/或 NT-前 ANP 或其变体。因此, 术语“利钠肽”包括由 ANP、BNP 或其片段、NT-前 BNP、NT-前 ANP 或其变体组成的组。此外, “利钠肽”包括 NT-前 BNP 或其变体。

因此, 本发明一个优选的实施方案是对利钠肽, 优选 ANP 和/或 BNP 或其片段, 更优选 NT-前 BNP 和/或 NT-前 ANP 或其变体, 最优选 NT-前 BNP 或其变体的测定。

胎盘生长因子(PIGF, 也称为 PGF)是本领域技术人员众所周知的。其是一种与血管通透因子(VPF 或 VEGF)相关的蛋白。该蛋白长 149 个氨基酸并与 VPF 的血小板衍生生长因子样区享有 53%同一性。PIGF 似乎与发育、成人某些时期以及肿瘤发生期间的血管发生有关。

在妊娠早期, 子宫中自然杀伤细胞作为致密浸润液积聚在细胞滋养层细胞周围。因为在妊娠约 20 周时人胎盘就完全形成, 因此从妊娠中期起, 这些杀伤细胞逐渐消失, 其与细胞滋养层侵入相一致。子宫自然杀伤细胞产生了一些与血管生成以及血管稳定性有关的细胞因子, 包括 PIGF、VEGF(血管内皮生长因子)和血管生成素 2 (angiopoietin 2)。在健康的妊娠中, 血管内滋养层与蜕膜的白细胞尤其是自然杀伤细胞之间适当的相互作用, 导致 PIGF 和 VEGF 大量释放。在先兆子痫期间, 胎盘衍生的 sFlt-1(可溶性 fms-样酪氨酸激酶, 也称为可溶性 VEGF 受体), 一种 PIGF 和 VEGF 拮抗物上调, 导致在产后降低的 sFlt-1 全身的量增

加。先兆子痫中增加的循环 sFlt-1 与游离的 PIGF 和 VEGF 降低的循环浓度有关，导致内皮机能障碍。sFlt-1 增加的量值与疾病严重程度相关。

在正常的妊娠期间，中值 NT-前 BNP 水平并不升高，且在整个妊娠期间保持稳定。孕妇正常的 NT-前 BNP 值相应于小于 125 pg/ml 的 NT-前 BNP 血浆水平，特别是小于 76 pg/ml，更特别是小于 50 pg/ml。

先兆子痫孕妇 NT-前 BNP 水平的升高与疾病的严重程度相关。

根据本发明，增加的 NT-前 BNP 水平相应于 125 pg/ml 至 300 pg/ml 的 NT-前 BNP 血浆水平，指示与原发性心脏病或胎盘相关的心机能障碍相关的心机能障碍的高增加的 NT-前 BNP 水平相应于 300 pg/ml 至多于 500 pg/ml 的 NT-前 BNP 血浆水平。

根据本发明，术语“未减少的 PIGf 水平和/或未增加的 sFlt-1 水平和/或 sFlt-1/PIGF 比”指健康对照集体的对照样品水平。该对照集体包括未患先兆子痫或原发性心脏病的健康孕妇的样品。

根据本发明，“减少的 PIGf 水平和/或增加的 sFlt-1 水平或改变的 sFlt-1/PIGF 比水平”指所述值如果与健康对照集体不同，优选偏离第 90 百分位数，更优选偏离第 95 百分位数，以及最优选偏离第 99 百分位数。

如在本发明中所见的，利钠肽的单独测定，特别是 NT-前 BNP 的单独测定，并不能区分与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍。根据本发明，利钠肽、胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的联合测定可以区分与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍。

在正常妊娠期间，妊娠中晚期的 PIGF 水平和 sFlt-1 水平没有减少或仅稍微减少。这些数据示于本发明的图 2 中。

在妊娠中晚期测定的升高的利钠肽水平和减少的 PIGF 水平和/或增加的 sFlt-1 水平指示存在患有先兆子痫的胎盘相关的心机能障碍。这些数据由本发明表 1 显示 9 位孕妇中的 8 位具有小于 100 pg/ml 的 PIGF 水平所证实。此外，相应于 NT-前 BNP 的血浆水平，这些 8 位孕妇具有 125 至 1000 pg/ml 的增加的 NT-前 BNP 水平。

在妊娠中晚期测定的升高的利钠肽水平和未减少的 PIGF 水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在患有原发性心脏病的与心脏病相关的心机能障碍。这些数据由本发明表 1 的患者 92316544 显示增加的 NT-前 BNP 水平但 PIGF 和 sFlt-1 水平正常所证实。

术语“变体”涉及与利钠肽基本上相似的肽，特别是与 NT-前 ANP、

NT-前 BNP、PIGF 和 sFlt-1 基本上相似的肽。术语“基本上相似的 (substantially similar)”为本领域技术人员所熟知。具体来说, 变体可以是与人群中最普遍的肽同种型的氨基酸序列相比显示氨基酸交换的同种型或等位变体。更优选地, 这样的基本上相似的肽具有与最普遍的肽同种型至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 的序列相似性。基本上相似的还是降解产物, 如仍可通过诊断方法或通过直接针对相应的全长肽的配体所识别的蛋白水解降解产物。

术语“变体”还涉及翻译后修饰的肽, 例如糖基化肽。“变体”还是一种在样品收集后已被修饰的肽, 例如通过共价或非共价将标记特别是放射性或荧光标记连接至肽的修饰。测定在样品收集后修饰的肽的水平被理解为测定最初未被修饰的肽的水平。

具体的 NT-前 ANP 和 NT-前 BNP 变体的例子以及它们的测定方法是已知的 (Ala-Kopsala, M., Magga, J., Peuhkurinen, K. 等 (2004): Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A-type and B-type natriuretic peptide. *Clinical Chemistry*, vol. 50(9), 1576-1588)。

术语“诊断”是本领域技术人员已知的。诊断被理解为开始意识到任何医学病症, 特别是心脏病。诊断还涉及“鉴别诊断”, 即区分具有相同或相似症状的不同病症。具体来说, 鉴别诊断包括区分与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍。

更优选地, 通过受训医师解释根据本发明的工具和方法所得到的诊断信息。更优选地, 还通过受训医师作出任何关于个体受试者进一步治疗的决定。如果认为合适, 医师还应决定有关的进一步诊断方法。

根据本发明, 术语“孕妇”优选涉及妊娠个体。所述个体可具有未知的心血管病史。更优选地, 根据本发明, 术语“孕妇”涉及显示可由与心脏病相关的心机能障碍引起或涉及胎盘相关的心机能障碍的心机能障碍症状的妊娠个体。

本发明主要涉及孕妇心机能障碍的诊断。术语“心机能障碍”是本领域技术人员已知的。其涉及任何类型的心机能障碍, 更具体来说是涉及影响泵送能力的心机能障碍, 更具体来说是涉及急性和慢性心脏事件。

患心脏病的患者可以是患稳定型心绞痛(SAP)的个体和具有急性冠状动脉综合征(ACS)的个体。ACS 患者可显示不稳定型心绞痛(UAP)或这

些个体业已患有心肌梗塞(MI)。MI可以是ST-升高的MI或非-ST-升高的MI。MI发生后继之以左心室功能紊乱(LVD)。最终，LVD患者经历了充血性心力衰竭(CHF)，死亡率大致在15%。根据本发明，心脏病还包括冠心病、心脏瓣膜缺陷(如二尖瓣缺陷)、扩张性心肌病、肥大性心肌病和心节律缺陷(心律失常)。

患有与心脏病相关的心机能障碍的孕妇显示增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的sFlt-1或其变体的水平。

术语“与心脏病相关的心机能障碍”可涉及心脏供给周缘组织充足的氧合血而无需适应的能力。心机能障碍可以是有症状或无症状的，且可与舒张期或收缩期机能障碍或两者有关。

患有与胎盘相关的心机能障碍相关的孕妇显示增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的sFlt-1或其变体的水平。术语“胎盘相关的心机能障碍”涉及一种其最初来源于胎盘机能障碍和相关异常且非心脏原发的心机能障碍。

有症状的心脏病可引起“心机能不全”。术语“心机能不全”为本领域技术人员所熟悉。更优选地，心机能不全涉及心脏不能充分地循环血液，特别是在增加的氧合需求情况下，例如在体育锻炼期间。心机能不全包括不稳定地充分射血(前进不能)和不能充分地开始血液静脉回流至心脏(向后衰竭)。

心机能不全可根据依照纽约心脏协会(New York Heart Association)(NYHA)建立的心血管疾病功能分类系统分类。I类患者没有明显的心血管疾病症状。身体活动并不受限，普通的身体活动不会引起过度疲劳、心悸或呼吸困难(呼吸急促)。II类患者身体活动轻微受限。他们在休息时是舒适的，但普通的身体活动会引起疲劳、心悸或呼吸困难。III类患者显示明显受限的身体活动。他们在休息时是舒适的，但很少的普通活动就会引起疲劳、心悸或呼吸困难。IV类患者不能进行任何身体活动而无不适。他们在休息时显示心机能不全的症状。如果进行任何身体活动，则不适增加。

另一个心机能不全的指标是“左心室射血分数”(LVEF)，其还被称为“射血分数”。具有健康心脏的人通常具有没有减少的LVEF，其通常高于50%。大多数带有有症状的收缩期心机能障碍的人具有40%或更低的LVEF。

术语“心脏代偿失调”为本领域技术人员所熟悉。“心脏代偿失调”通常指最严重级别的心机能不全。在心脏代偿失调期间，心脏不能充分地循环血液，在所达到的程度上身体应激反应不能补偿泵送能力不足。心脏代偿失调的症状是本领域技术人员已知的。特别地，显示“心脏代偿失调”症状的患者显示依据 NYHA II、III、IV 类或更坏的症状。更特别地，患者显示依据 NYHA III、IV 类或更坏的症状。还特别地，患者显示依据 NYHA IV 类或更坏的症状。最特别地，患者需要临床支持以稳定或维持循环。

术语“未增加的”和“增加的”以及“减少的”水平指与指示不存在心机能障碍的已知水平相比，特别是与指示不存在与心脏病相关的或与胎盘相关的心机能障碍相关的心机能障碍的已知水平相比，在孕妇中测定的生物标记水平。

本领域技术人员能确定已知水平(或如比率)。例如，已知水平可确定为在一群没有患心脏病的个体中所测定水平的中值或平均值。在更多的个体或患者中定值水平，如在分组研究中，能有助于改进已知水平或比率。类似地，还有可能限定和/或改进指示与心脏病相关的心机能障碍或胎盘相关的心机能障碍存在的参考水平。

已知水平还可以是一种“参考值”。本领域技术人员熟悉生物标记参考值(或“正常值”)的概念。具体来说，术语参考值可涉及一个或多个对照样品中水平的实际值，或其可涉及来自于一个或多个对照样品中实际水平的值。更优选地，分析至少 2 个，更优选至少 5 个，更优选至少 50 个，更优选至少 100 个，最优选至少 500 个受试者的样品以确定参考值。

在大多数简单的情况下，参考值与对照样品中测定的水平相同，或与多个对照样品中测定的平均水平相同。然而，还可通过多于一个的对照样品计算参考值。例如，参考值可以是代表对照状态(如健康的，具体病症或具体疾病状态)的对照样品中水平的算术平均值。更优选地，参考值涉及可见于大多数可比较的对照样品(代表相同或相似的疾病状态)的数值范围，如平均值 \pm 一倍或多倍标准差。类似地，还可通过其他统计参数或方法计算参考值，例如见于大多数对照样品的规定的水平百分位数，如 90%、95%、97.5%或 99%百分位数。可依据所需灵敏度、特异性或统计显著性(一般而言，灵敏度越高，特异性越低，反之亦然)确定具体参考值的选择。可依据已知的以及本领域技术人员认为适当的统

计学方法进行计算。

术语“对照”和“对照样品”是本领域技术人员已知的。更优选地，“对照”涉及进行以提供标准的试验或测试，针对其可定植试验结果(如在患者中所测定的水平)。在本发明中，标准优选涉及与特定健康或疾病状态有关的目的生物标记的水平。因此，“对照”优选是一种用于提供上述标准的样品。如对照样品可以来自于一个或多位健康的受试者，或来自于一位或多位代表特定疾病状态的患者。

在本发明中，代表特定疾病状态的患者具体包括患有与心脏病相关的心机能障碍或胎盘相关的心机能障碍的孕妇。所有该组患者的测定在妊娠中期和/或晚期进行。包含未患有先兆子痫的健康孕妇对照样品的测定也在妊娠中期和/或晚期进行。因此，本发明的一个实施方案是所有的测定在妊娠中期和/或晚期进行。

如下还给出已知水平或比率的例子。有可能进一步地改进这样的水平或比率。在说明书中给出的具体已知的水平或比率可作为诊断指导。如本领域所已知和众所接受的，优选医师通过个体分析如取决于个体受试者的体重、年龄、一般健康状况和既往病史，对个体受试者进行实际诊断。

如已提及的，孕妇心机能障碍的潜在病因可能涉及存在胎盘相关的心机能障碍，如患先兆子痫的孕妇。此外，孕妇可患与心脏病相关的心机能障碍，如在妊娠开始前其心功能已受损的孕妇。

因此，根据本发明的方法可优选地处理两组在妊娠期间显示心机能障碍症状的患者：

孕妇患：

- (1) 原发性心脏病，
- (2) 由先兆子痫引起的胎盘相关的心机能障碍。

在本发明中，发现存在原发性心脏病症状的孕妇(上述患者组 1)显示增加的利钠肽水平，特别是增加的 NT-前 BNP 水平，但 PIGF 水平未减少以及 sFlt-1 水平未增加。

此外，在本发明中，发现存在与胎盘相关的心机能障碍相关的心机能障碍症状的患者(上述患者组 2)显示增加的 NT-前 BNP 水平，但 PIGF 水平减少以及 sFlt-1 水平增加。

根据本发明，术语“未增加的 NT-前 BNP 水平”优选相应于小于 125

pg/ml 的 NT-前 BNP 的血浆水平，特别是小于 76 pg/ml，更特别是小于 50 pg/ml。

先兆子痫孕妇升高的 NT-前 BNP 水平与疾病的严重程度相关。

根据本发明，增加的 NT-前 BNP 水平相应于 125 pg/ml 至 300 pg/ml 的 NT-前 BNP 的血浆水平，高增加的 NT-前 BNP 水平相应于 300 pg/ml 至多于 500 pg/ml 的 NT-前 BNP 的血浆水平。

显然来自利钠肽和 PIGF 和/或 sFlt-1 的组合信息还可以是不同的表示。

一般而言，所测定的显示心脏病症状的孕妇样品中 NT-前 BNP 与 PIGF 的比越高，则越有可能该患者患由先兆子痫引起的胎盘相关的心机能障碍。

此外，本领域技术人员能确定除血浆之外样品的相应水平。

如从例子中所看到的，在至少一个额外的时间点测定 PIGF、sFlt-1 和利钠肽的水平，特别是 NT-前 ANP 和 NT-前 BNP 的水平，可提供额外的诊断信息。例如，测定 NT-前 BNP 可有助于避免低估心脏病的程度。因此，在一个优选的实施方案中，测定至少一个额外的样品的 PIGF、sFlt-1 和利钠肽的水平，特别是 NT-前 ANP 和 NT-前 BNP 的水平，优选在第一次测定后短时间间隔内取样。适合的时间可以是，例如在第一次取样后 2-12 小时内，优选 4-12 小时内。

在另一个优选的实施方案中，测定心脏病的额外的诊断参数，特别是选自：(a) 左心室射血分数(LVEF)，(b) 超声心动图 (c) 既往病史(医疗史)，特别是关于心绞痛的，(d) 心电图，(e) 甲状腺或肾功能参数，(f) 血压，特别是动脉高压，(g) 钡闪烁图，(h) 血管造影术，(i) 导管插入的额外的诊断参数。

可在测定 PIGF、sFlt-1 和利钠肽之前、之后或与之平行测定这些额外的诊断参数。额外的诊断参数可建立对心机能障碍存在的怀疑，或它们可用于进一步评估所测定特定水平或比率的诊断关联性。

可平行或依次进行 PIGF、sFlt-1 和利钠肽的测定。更优选地，测定以平行方式进行。在上下文中术语“平行”涉及使用同时取样的样品，优选在小于 2 小时间隔内取样，更优选在小于 1 小时间隔内取样。最优选地，在上下文中“平行”涉及使用相同的样品。更优选地，还在同时进行样品中肽的量或浓度的测定。

在另一个优选的实施方案中，额外地测定至少一种先兆子痫生物标记。先兆子痫生物标记是本领域技术人员已知的。这样的标记指示孕妇中存在先兆子痫。在先兆子痫中，许多在健康妊娠期间的母体循环中所见的胎盘因子增加了。这些包括一些炎性细胞因子、促肾上腺皮质激素释放激素、自由基物质和激活蛋白 A，包含刺激母体炎症应答的因子。

先兆子痫生物标记的例子包括如 α 2-巨球蛋白、CD40 配体、硬骨鱼紧张肽 II(Urotensin II)等的因子。

可通过测定蛋白(肽或多肽)或相应的转录物的浓度，测定生化或分子标记的水平。在上下文中，术语“测定”优选涉及定量或半定量测定水平。

可通过测定肽或多肽的量或浓度测定水平。更优选地，在给定样品中水平作为浓度来测定。对本发明来说，可以不需要测定绝对水平。测定与适当的对照水平相比的相对水平可能就足够了。还可通过测定目的肽或多肽的衍生物或特异性片段，例如包含于核酸或蛋白消化物中的特异性片段进行测定。

可依据任何已知方法并为本领域技术人员所适当考虑，进行核酸，特别是 mRNA 的测定。

用于 RNA 测定的例子包括 RNA 印迹杂交、RNA 酶保护测定、原位杂交和适体，如葡聚糖凝胶(Sephadex)结合的 RNA 配体(Srisawat, C., Goldstein I.J.,和 Engelke, D.R. (2001). Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures. *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 2 e4)。

此外，RNA 可反转录为 cDNA。因此，测定 DNA 的方法还可用于测定 RNA，如 DNA 杂交、聚合酶链式反应 (PCR)、连接酶链反应(LCR) (参见如 Cao, W. (2004) Recent developments in ligase-mediated amplification and detection. *Trends in Biotechnology*, vol. 22 (1), p. 38-44)、RT-PCR、实时 RT-PCR、定量 RT-PCR 和微阵列杂交(参见如 Frey, B., Brehm, U.,和 Kübler, G., 等. (2002). Gene expression arrays: highly sensitive detection of expression patterns with improved tools for target amplification. *Biochemica*, vol. 2, p. 27-29)。

还可在溶液中进行 DNA 和 RNA 测定，如使用分子信标、肽核酸 (PNA)或锁定核酸 (LNA) (参见如 Demidov, V.V. (2003). PNA and LNA

throw light on DNA. *Trends in Biotechnology*, vol. 21(1), p. 4-6).

可依据任何已知用于目的肽或多肽测定的方法进行蛋白或蛋白片段测定。本领域技术人员能选择适当的方法。

本领域技术人员熟悉测定肽或多肽水平的不同方法。术语“水平”涉及样品中肽或多肽的量或浓度。

可直接或间接进行测定。间接测定包括测定细胞响应、结合的配体、标记或酶反应产物。

可依据任何本领域已知方法进行测定，例如细胞测定法、酶测定法或基于配体结合的测定法。代表性的方法描述如下。

在一个实施方案中，测定目的肽或多肽水平的方法包括步骤：(a) 将肽或多肽与适合的底物接触足够的一段时间，(b) 测定产物的量。

在另一个实施方案中，测定目的肽或多肽水平的方法包括步骤：(a) 将肽或多肽与特异性结合配体接触，(b) (任选地)除去未结合的配体，(c) 测定结合配体的量。

在另一个实施方案中，测定目的肽或多肽水平的方法包括步骤：(a) (任选地)打断样品的肽或多肽，(b) (任选地)依据一种或多种生物化学或生物物理性质(如依据与固体表面的结合或在层析步骤中运行时间)分离肽或多肽或其片段，(c) 测定一种或多种肽、多肽或片段的量，(d) 通过质谱法测定一种或多种步骤(c)的肽、多肽或片段的身份。如 Richard D. Smith (2002). *Trends in mass spectrometry instrumentation for proteomics*. *Trends in Biotechnology*, Vol. 20, No. 12 (Suppl.), pp. S3-S7)给出了质谱法的综述。

其他用于测定的代表性方法包括测定与目的肽或多肽特异性结合的配体的量。根据本发明，结合包括共价和非共价结合。

根据本发明，配体可以是任何肽、多肽、核酸或其他结合目的肽或多肽的物质。众所周知，如果肽或多肽获得或纯化自人或动物体，则可得到修饰如糖基化。根据本发明，适合的配体可结合肽或通过相同的位点也结合多肽。

更优选地，配体应特异性结合待测的肽或多肽。根据本发明，“特异性结合”意思是配体基本上不应与存在于所研究的样品中另外的肽、多肽或物质结合(“交叉反应”)。更优选地与任何其他有关的肽或多肽相比，特异性结合的蛋白或同种型的结合应具有至少3倍更高的，更优选

至少 10 倍更高的以及还优选至少 50 倍更高的亲和力。

非特异性结合可以是容忍的，特别是如果所研究的肽或多肽仍能被明确地区分并测定时，如通过依据其大小(如通过电泳)分离，或通过样品中其相应的高丰度。

可通过任何本领域已知方法测定配体的结合。更优选地，该方法是半定量的或定量的。适合的方法描述如下。

首先，可例如通过 NMR 或表面等离子共振直接测定配体的结合。

其次，如果配体还作为目的肽或多肽的酶活性底物，则可测定酶反应产物(例如可通过如蛋白质印迹测定被切割的底物的量测定蛋白酶的量)。对于酶反应产物的测定，优选底物的量是饱和的。在反应前，底物还可用可检测的标记来标记。更优选地，将样品与底物接触足够的一段时间。足够的一段时间指对于可检测的，优选可测定的待产生的产物的量所必需的时间。除测定产物的量之外，可测定出现给定(如可检测的)的产物的量所必需的时间。

再次，配体可共价或非共价偶联标记供配体检测和测定之用。可通过直接或间接的方法进行标记。直接标记包括将标记直接(共价或非共价地)偶联至配体。间接标记包括将第二配体与第一配体结合(共价或非共价)。第二配体应特异性结合第一配体。所述第二配体可以偶联有适合的标记和/或与第二配体结合的第三配体的靶(受体)。第二、第三或甚至更高级的配体的使用常用于增加信号。适合的第二或更高级的配体可包括抗体、第二抗体和众所周知的链霉抗生物素-生物素体系(Vector Laboratories, Inc.)

配体或底物还可“标记”有一个或多个本领域已知的标记。然后，这样的标记可靶向更高级的配体。适合的标记包括生物素、洋地黄毒苷、组氨酸标签、谷胱甘肽-S-转移酶、FLAG、GFP、myc 标签、甲型流感病毒血凝素(HA)、麦芽糖结合蛋白等。在肽或多肽情况下，标记优选位于 N-末端和/或 C-末端。

适合的标记是任何通过适当的检测方法可检测的标记。代表性的标记包括金颗粒、乳胶微粒、吡啶酯、鲁米诺、钆、酶活性标记、放射性标记、磁性标记(“如磁珠”，包括顺磁性和超顺磁性标记)以及荧光标记。

酶活性标记包括如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、

荧光素酶及其衍生物。适合用于检测的底物包括二氨基联苯胺(DAB)、3,3'-5,5'-四甲基联苯胺、NBT-BCIP (4-硝基四唑蓝氯化物和 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸酯, 作为现成的储液可获得自 Roche Diagnostics)、CDP-Star™ (Amersham Biosciences)、ECF™ (Amersham Biosciences)。适合的酶底物组合可产生能依据本领域已知方法(如使用感光胶片或适合的照相机系统)测定的显色反应产物、荧光或化学发光。至于酶反应测定, 类似地应用上述给出的标准。

代表性的荧光标记包括荧光蛋白(例如 GFP 及其衍生物)、Cy3、Cy5、得克萨斯红、荧光素和 Alexa 染料(如 Alexa 568)。更多的荧光标记可获得自如 Molecular Probes (Oregon)。也考虑到了利用量子闪光 (quantum dots) 作为荧光标记。

代表性的放射性标记包括 35S、125I、32P、33P 等。可通过任何已知和适当的方法检测放射性标记, 如感光胶片或荧光成像仪。

根据本发明, 适合的测定法还包括沉淀反应(特别是免疫沉淀反应)、电化学发光(电致化学发光)、RIA(放射免疫测定)、ELISA(酶联免疫吸附测定)、夹心酶免疫检验、电化学发光夹心免疫测定(ECLIA)、解离放大镧系荧光免疫分析(DELFIA)、闪烁逼近分析(SPA)、比浊法、散射测浑法、胶乳放大比浊法或散射测浑法、固相免疫检验以及诸如 SELDI-TOF、MALDI-TOF 或毛细管电泳-质谱(CE-MS)的质谱测定法。更多的本领域已知方法(例如凝胶电泳法、2D 凝胶电泳法、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)、蛋白质印迹法)可单独使用或与上述标记或其他检测方法联合使用。

此外, 适合的方法包括基于 ELISA 的微板法、全自动或机器人免疫测定法(可获得的例如 Elecsys™ 或 Cobas™ 分析仪)、CBA (酶 Cobalt 结合测定, 可获得的例如 Roche-Hitachi™ 分析仪)以及胶乳凝集测定(可获得的例如 Roche-Hitachi™ 分析仪)。

优选的配体包括抗体、核酸、肽或多肽以及适体, 如核酸或肽适体。对于这样的配体的方法是本领域众所周知的。例如, 还通过商业供应厂商提供适合的抗体或适体的鉴定和产生。本领域技术人员熟悉开发具有更高亲和力或特异性的这样的配体的衍生物的方法。例如, 可将随机突变导入核酸、肽或多肽中。然后, 依据本领域已知的筛选方法如噬菌体展示, 可测试这些衍生物的结合。

如本文所使用的，术语“抗体”包括多克隆和单克隆抗体及其片段，例如能结合抗原或半抗原的 Fv、Fab 和 F(ab)₂ 片段。

在另一个优选的实施方案中，配体，优选选自核酸、肽、多肽的配体，更优选选自核酸、抗体或适体的配体存在在阵列上。

所述阵列含有至少一种额外的配体，其可直接针对目的肽、多肽或核酸。所述额外的配体还可直接针对在本发明中不特别考虑的肽、多肽或核酸。更优选地，在阵列上含有本发明中至少 3 种、优选至少 5 种、更优选至少 8 种目的肽或多肽的配体。

可通过任何已知的读出或检测方法检测阵列上配体的结合，如包含光学的(如荧光的)、电化学的或磁信号或表面等离子共振的方法。

在另一个优选的实施方案中，本发明涉及利用特异性结合利钠肽，特别是 NT-前 BNP 或其变体的配体以及 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的配体制造用于诊断心脏病的诊断试剂盒 (kit)，特别是用于在患心机能障碍孕妇中区分与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍的诊断试剂盒。此外，特异性结合先兆子痫生物标记的配体可用于制造这样的试剂盒。

根据本发明，术语“阵列”指其上以一维、二维或三维排列方式附着或结合的至少两种化合物的固相或凝胶样载体。这样的阵列 (包括“基因芯片”、“蛋白质芯片”、抗体阵列等)通常是本领域技术人员已知的，且通常在玻璃载玻片，特别是包被的载玻片上形成，诸如聚阳离子、硝酸纤维素或生物素包被的载玻片、盖玻片和膜，例如，基于硝酸纤维素或尼龙的膜。阵列可包括结合的配体或至少两种各自表达至少一种配体的细胞。

根据本发明，还考虑使用“悬浮阵列(suspension arrays)”作为阵列 (Nolan JP, Sklar LA. (2002). Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20(1):9-12)。在这样的悬浮阵列中，载体如微珠或微球以悬浮形式存在。该阵列由携带不同配体的、可能标记的不同的微珠或微球组成。

在另一个优选的实施方案中，本发明涉及一种阵列，其用于体外诊断心脏病，特别是通过测定利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体用于将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开，所述阵列含有特异性结合利钠肽，特别是 NT-前 BNP 或其变体的配体以及

PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的配体, 所述配体 (a) 用于测定孕妇样品中利钠肽的水平, 和 (b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平。

本发明进一步涉及一种生产上述阵列的方法, 其中除其他配体之外, 至少一种配体结合至载体。

生产这样的阵列的方法, 例如基于固相化学和对光不稳定的保护基的方法是通常已知的(US 5,744,305)。还可将这样的阵列与材料文库接触并测试相互作用, 例如测试结合或构象改变。因此, 包含上述肽或多肽的阵列可用于鉴定与所述肽或多肽特异性结合的配体。

可测定组织、细胞和体液样品中的肽和多肽(蛋白), 即优选在体外测定。更优选地, 测定体液样品中的目的肽或多肽。

某些样品, 例如尿样品, 只含有降解产物, 特别是目的肽或多肽的片段。然而, 如上所述, 只要片段特异于目的肽或多肽, 则水平的测定还是有可能的。

如必要的话, 在测定前可对样品进行进一步的处理。例如, 可依据本领域已知方法从样品中纯化核酸、肽或多肽, 包括过滤、离心或抽提法例如氯仿/苯酚抽提。

此外, 考虑使用所谓的床边检验(point-of-care)或芯片实验室(lab-on-a-chip)装置获得样品并测定目的肽或多肽。这样的装置可设计类似于在血糖测定中所使用的装置。因此, 患者能获得样品并测定目的肽或多肽, 而无需受训医师或护士的立即援助。

在另一个优选的实施方案中, 本发明涉及一种试剂盒, 包含(a) 用于测定孕妇样品中利钠肽水平的试剂(means)或装置, 和(b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平的试剂或装置, 用于体外诊断心脏病, 特别是用于将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开。

更优选地, 依据(a)试剂是一种特异性结合利钠肽的配体, 和/或依据(b)试剂是一种特异性结合 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的配体。此外, 试剂盒可包含用于测定患者样品中先兆子痫生物标记水平的试剂或装置, 特别是特异性结合配体。

在另一个优选的实施方案中, 本发明涉及利用这样的试剂盒体外诊断心脏病, 特别是用于区分出现心机能障碍症状的孕妇中与心脏病相关

的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍。

在另一个优选的实施方案中，包括用于对所测定的患心机能障碍孕妇的利钠肽、PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平数据进行解释的试剂盒包装说明书，用于将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开。

本发明再一个优选的实施方案是一种用于体外诊断心脏病，特别是通过测定利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体用于将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开免疫学速测法，特征在于利用特异于利钠肽、和/或 sFlt-1 或其变体的抗体(a) 用于测定孕妇样品中利钠肽或其变体的水平，和(b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平。

根据本发明，“免疫学速测法”是一种用于早已知道针对诸多不同参数的免疫学可检测物质的速测法，例如来自 WO 97/06439, EP 0 291 194, US 5,591,645, US 4,861,711, US 5,141,850, US 6,506,612, US 5,458,852, US 5,073,484。在这些情况下，免疫学检测试剂(基本上标记和未标记的抗体或抗原)通常以载体上干燥形式提供，使得载体上或载体中的样品液体(特别是诸如的血液、血清、血浆、尿、唾液等的体液)得以流动。就载体来说，优选毛细活性的，例如装备有毛细管道的膜或塑料载体。在专家中，它们通常称为免疫层析测试条或测试装置。

因为 Elecsys® NT-前 BNP 测试只能在中心实验室中进行，因此在日常工作时间外其难以快速测定 NT-前 BNP。由此如果能获得可在日常工作时间外的急诊室中直接进行的快测法，那么对于急诊室就特别有利。然而，该快测法应当确保与中心实验室参照法(Elecsys® NT-前 BNP)相同的参考范围和分界，以便能实现好的结果可比性，而不受实际上进行的测试类型的限制。

可通过使用来自 R&D Systems 的人 PIGF 免疫测定“Quantikine”(产品目录号 DPG00)进行细胞培养物上清液、血清、血浆和尿中人胎盘生长因子(PIGF)浓度的定量测定。可通过使用来自 R&D Systems 的人可溶性 VEGF R1/Flt-1 免疫测定“Quantikine”(产品目录号 DVR100B) 进行人可溶性血管内皮生长因子受体 1 (sVEGF R1)浓度的定量测定。该快测法应用于 PIGF 和 VEGF R1/Flt-1，然而，要确保与上面引用的参照法相同的参考范围和分界，以便能实现好的结果可比性，而与实际上进行的

测试类型无关。

本发明还涉及一种用于判定支持患心机能障碍孕妇可行治疗的方法。一旦患者得到诊断，即可有用于进一步治疗的结果。如果根据本发明的方法指示患者存在心脏病，则可启动或调整治疗。可每隔一定时间监测孕妇中利钠肽的水平 and/或比率，特别是 NT-前 BNP 和 NT-前 ANP、PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平 and/或比率。此外，可依据熟练的心脏病专家已知的方法，通过进一步的诊断深入研究受试者，例如在本说明书早先所描述的，如心电图描记术或超声波心动描记术。治疗可包括任何通常与改善或恢复心脏功能有关的手段。

在孕妇中与心脏病相关的心机能障碍的治疗可与胎盘相关的心机能障碍的治疗不同。如果根据本发明的方法指示存在与心脏病相关的心机能障碍，则治疗可集中于施用 ACE-抑制剂、利尿剂、 β -阻断剂、地高辛等。

如果根据本发明的方法指示孕妇中存在胎盘相关的心机能障碍，则治疗可相反地集中于在采取或没有采取心脏治疗的早期递送阿司匹林、类固醇。

更具体来说，在又一个实施方案中，本发明涉及一种用于判定支持患心机能障碍孕妇可行治疗的方法，其中孕妇存在与心脏病相关的心机能障碍症状，包括步骤：a) 测定样品中利钠肽水平，b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平，c) 其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍，或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍，d) 任选地通过心脏病专家启动孕妇检查，e) 如果依据步骤 c) 的评估指示存在与心脏病相关的心机能障碍，建议启动治疗。

更优选地，如果该方法指示孕妇存在与心脏病相关的心机能障碍，建议通过心脏病专家启动检查和/或启动治疗。该方法涉及在该说明书中早先所提到的所有的疾病和病症。

本发明还涉及利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体在制备用于诊断孕妇是否患心机能障碍的药剂中的应用，

其中所述的诊断包括步骤：

a) 测定样品中利钠肽水平

b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平

其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍,

或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍。

本发明还涉及利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的特异抗体在制备下述免疫学速测法中使用的试剂中的应用, 特征在于所述的免疫学速测法中使用的特异于利钠肽、和/或 sFlt-1 或其变体的抗体, (a) 用于测定孕妇样品中利钠肽或其变体的水平, 和(b) 用于测定孕妇样品中 PIGF 和/或 sFlt-1 或其变体的水平, 所述的免疫学速测法用于体外诊断心脏病, 特别是通过测定利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体, 将与心脏病相关的心机能障碍和胎盘相关的心机能障碍区分开。

本发明还涉及利钠肽和胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体在制备用于判定支持患心机能障碍孕妇可行治疗的方法中所使用的药剂中的应用,

其中所述孕妇存在与心脏病相关的心机能障碍症状, 包括步骤:

a) 测定样品中利钠肽水平,

b) 测定样品中胎盘生长因子和/或 sFlt-1 或其变体的水平,

c) 其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍,

或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的 sFlt-1 或其变体的水平指示存在与心脏病相关的心机能障碍,

d) 任选地通过心脏病专家启动孕妇检查,

e) 如果依据步骤 c) 的评估指示存在与心脏病相关的心机能障碍, 则建议启动治疗。

实施例

已对同龄组 (cohort) 的 55 位孕妇进行存在胎盘相关的心机能障碍或存在与心脏病相关的心机能障碍的临床研究。测定了分类为妊娠中期 (N=9) 和晚期 (N=46) 的孕妇 (N=55) 的 sFlt-1、PIGF 和 NT-前 BNP 参考值。具有升高的 NT-前 BNP 值 (> 125 pg/ml) 的孕妇的 sFlt-1 和 PIGF 值示于表 1。

已通过 Elecsys NT-前 BNPTM 测定(Roche Diagnostics) 分析了孕妇血样的 NT-前 BNP 浓度。已通过使用来自 R&D Systems 的人可溶性 VEGF R1/Flt-1 免疫测定“Quantikine” (产品目录号 DVR100B)分析了 sFlt-1 的浓度。通过使用来自 R&D Systems 的人 PIGF 免疫测定“Quantikine” (产品目录号 DPG00)分析人胎盘生长因子(PIGF)浓度的定量测定。

表 1: 具有升高的 NT-前 BNP 值(> 125 pg/ml)的孕妇中 sFlt-1 和 PIGF 值

孕妇编号	妊娠周数	三月期	sFlt-1 [pg/ml]	PIGF [pg/ml]	NT- 前 BNP [pg/ml]
92316544	24	2	2645.7	324.31	181.85
6	26 -33	3	1062.1	96.80	336.94
17	26 -33	3	7551.6	93.01	125.12
1	34 - 36	3	8653.8	73.97	655.69
16	34 - 36	3	3285.1	21.61	184.57
2	26 -33	3	341.6	15.31	415.13
2	26 -33	3	165.9	11.99	940.15
5	26 -33	3	164.7	11.27	324.75
16	26 -33	3	127.3	10.69	940.52

表 1 概述了具有升高的 NT-前 BNP 值的孕妇的 sFlt-1 和 PIGF 水平。表 1 所示的 55 位孕妇中的 9 位具有大于 125 pg/ml 的升高的 NT-前 BNP 水平。此外，这些 9 位孕妇中的 8 位(患者 6, 17, 1, 16, 2, 2, 5, 16)具有减少的 PIGF 水平，指示存在患先兆子痫的胎盘相关的心机能障碍。先兆子痫孕妇的 NT-前 BNP 水平的升高与疾病的严重程度相关。

9 位孕妇中的 1 位，患者 92316544 显示增加的 NT-前 BNP 水平，但 PIGF 水平正常，指示存在患原发性心脏机能障碍的与心脏病相关的心机能障碍。

表 2: 在表面上健康的女性血液供者(18-44.9 岁)中 NT-前 BNP 的参考值

	18-44.9 岁		
年龄中位数		33	
	总计	男性	女性
N	1323	815	508
百分位数			
0	20.00	20.00	20.00
2.5	20.00	20.00	20.00
5	20.00	20.00	20.00
10	20.00	20.00	20.00
25	20.00	20.00	21.67
50	20.43	20.00	37.06
75	39.35	25.67	61.97
90	70.20	41.69	98.80
95	97.32	62.89	116.40
97.5	115.00	85.75	129.70
100	534.40	534.40	196.30

表 2 包含年龄在 18 - 44.9 岁的 1323 位表面上健康的血液供者同龄组的 NT-前 BNP 的参考值。血液供者的年龄中位数为 33。已对 508 位妇女的血样的 NT-前 BNP 浓度进行分析。指示勒 0、2.5、5、10、25、50、75、90、95、97.5 和 100 百分位数。

图 1 显示了 NT-前 BNP 浓度参考值的方框图。N 代表患者数目。第一栏显示了 508 位表面上健康的 18 - 44.9 岁女性血液供者的 NT-前 BNP 浓度。将该参考值与 55 位孕妇的 NT-前 BNP 浓度进行比较, 这 55 位孕妇分为处于妊娠中期的 9 位孕妇和处于妊娠晚期的 46 位孕妇。在这些组之间 NT-前 BNP 浓度表面上没有显著差异。此外, 指示了中值和第 75、第 95 和第 5 以及第 25 百分位数。

图 2 显示了 46 位孕妇中所测的 sFlt-1 浓度和 PIGF 浓度参考值的方

框图。这些 46 位孕妇的 NT-前 BNP 浓度小于 125 pg/ml，该组分为处于妊娠中期的 14 位孕妇和处于妊娠晚期的 32 位孕妇。由妊娠中期到妊娠晚期 PIGF 和 sFlt-1 浓度仅仅稍有减少。此外，方框图显示了 sFlt-1/PIGF 比。由妊娠中期到妊娠晚期该 sFlt-1/PIGF 的浓度比增加。

此外，指示了中值和第 75、第 95 和第 5 以及第 25 百分位数。

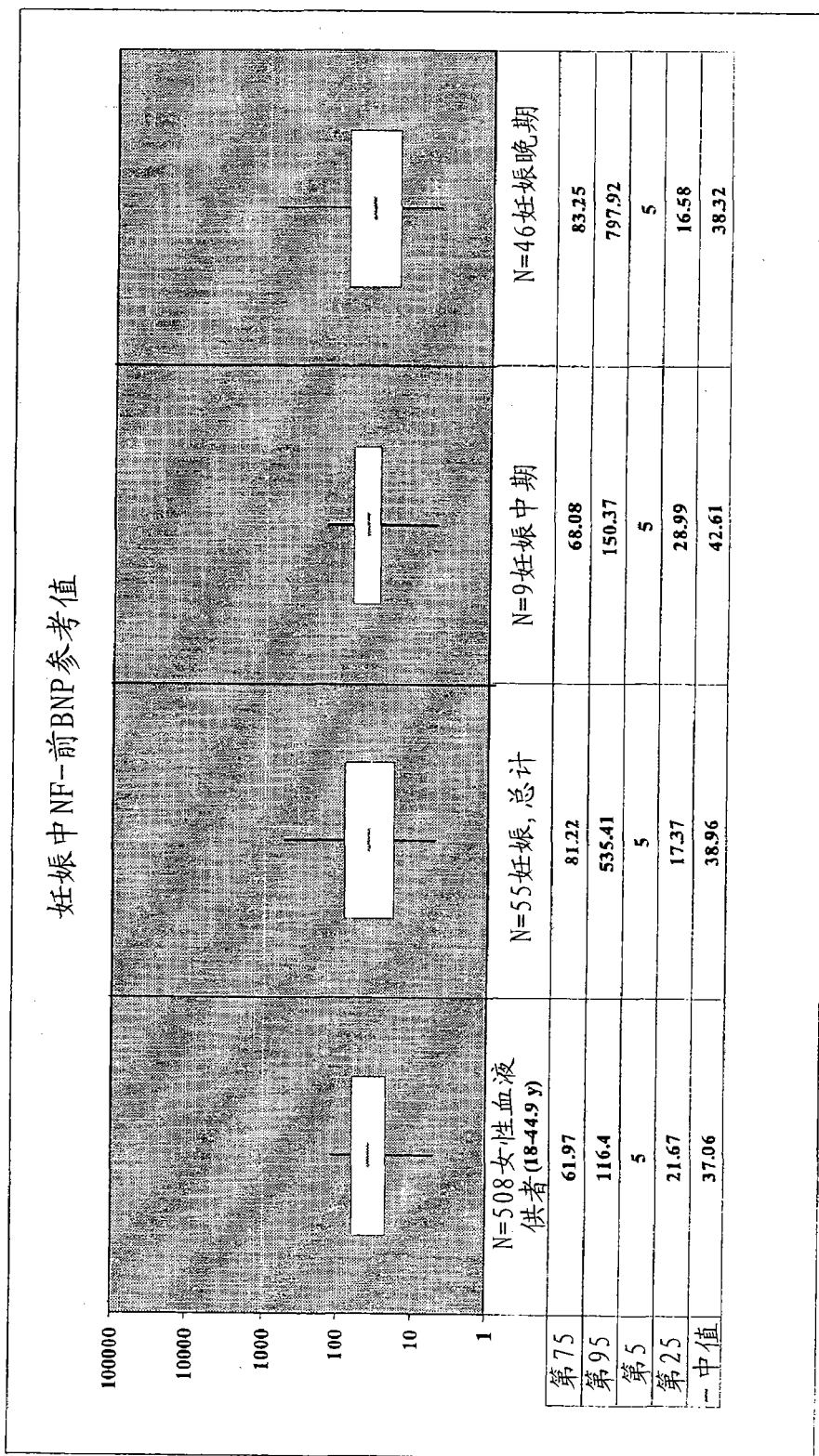


图 1

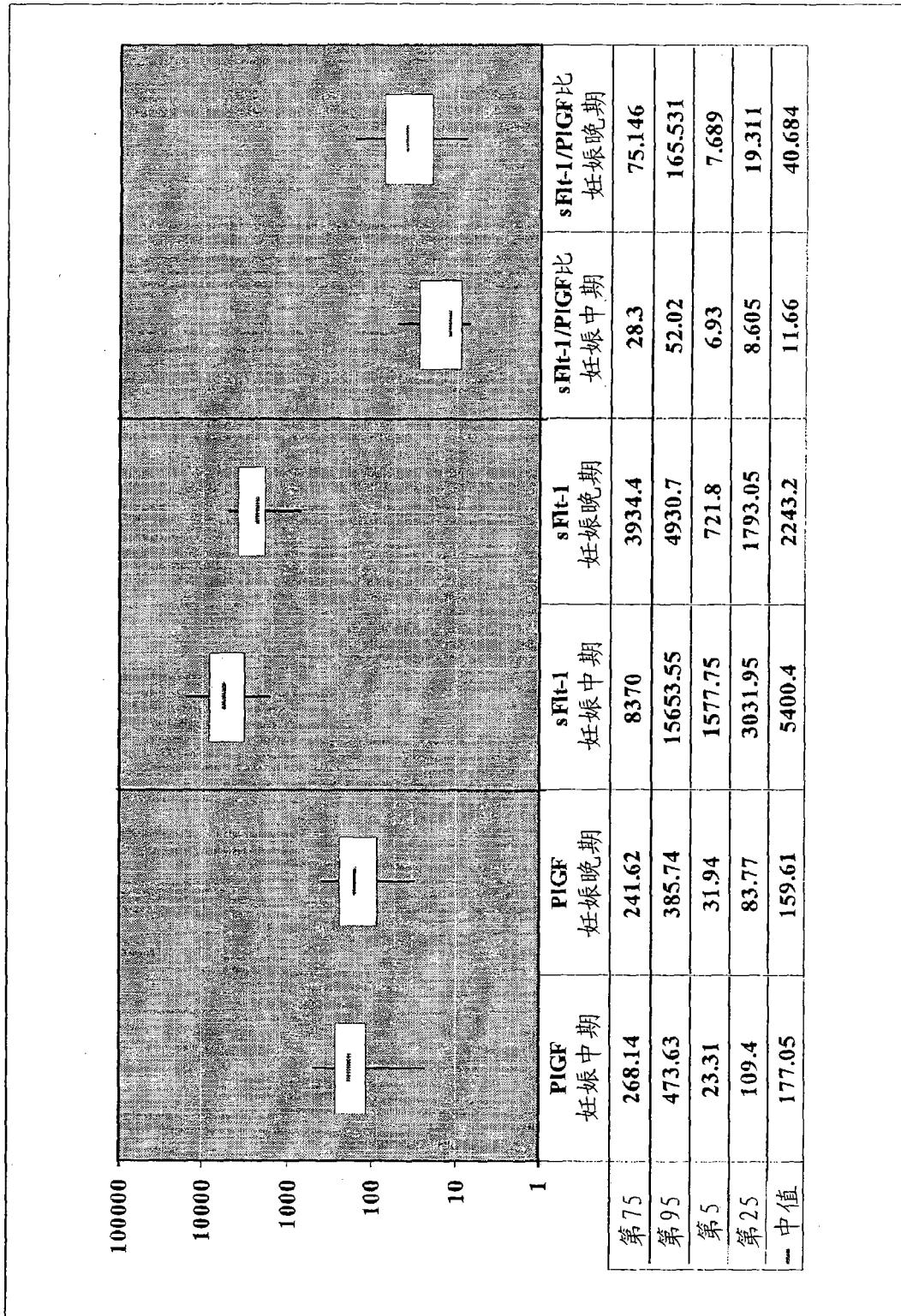


图 2

专利名称(译)	利钠肽和胎盘生长因子/可溶性VEGF受体区分与心脏病或孕妇的胎盘相关的心机能障碍		
公开(公告)号	CN101196516A	公开(公告)日	2008-06-11
申请号	CN200710152761.9	申请日	2007-09-20
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	G赫斯 A霍施 D兹杜尼克		
发明人	G·赫斯 A·霍施 D·兹杜尼克		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 A61B19/00		
CPC分类号	G01N2800/32 G01N33/6893 G01N2800/368		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	2006019669 2006-09-20 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断孕妇是否患心机能障碍的方法，包括步骤：a)测定样品中利钠肽水平，b)测定样品中胎盘生长因子和/或sFlt - 1或其变体的水平，其中增加的利钠肽水平和减少的胎盘生长因子水平和/或增加的sFlt - 1或其变体的水平指示存在胎盘相关的心机能障碍，或其中增加的利钠肽水平和未减少的胎盘生长因子水平和/或未增加的sFlt - 1或其变体的水平指示存在心脏病相关的心机能障碍。本发明还涉及阵列、免疫学速测法、相应的试剂盒的应用以及用于判定支持患心机能障碍孕妇可行治疗的方法。

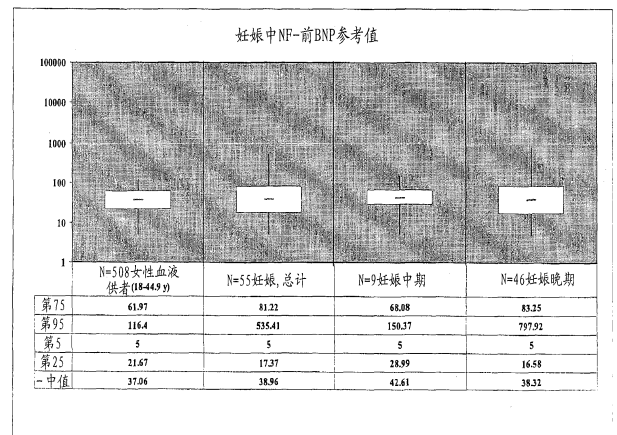


图 1