



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105308455 B

(45)授权公告日 2019.04.09

(21)申请号 201480013907.X

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105308455 A

(43)申请公布日 2016.02.03

(30)优先权数据
61/785,934 2013.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/029741 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/153232 EN 2014.09.25

(73)专利权人 伊穆科GTI诊治股份有限公司
地址 美国佐治亚

(72)发明人 S·罗德 I·阿布杜拉赫
M·M·萨尔瓦

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件
US 2005255114 A1,2005.11.17,说明书第
9、139、276段,Table3,SEQ ID NO:1592,SEQ ID
NO:921, SEQ ID NO:1551.

US 2010144055 A1,2010.06.10,全文.

审查员 周洋

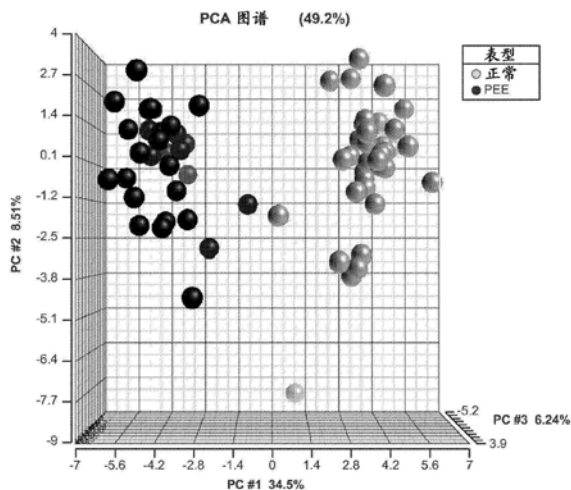
权利要求书3页 说明书28页 附图23页

(54)发明名称

用于诊断先兆子痫的方法和组合物

(57)摘要

本文提供了使用结合剂来检测来自妊娠妇女的生物样品中的PEE蛋白和/或PEE自身抗体的存在的方法、组合物和试剂盒。这样的方法和组合物可以用于预测先兆子痫的发作、监控先兆子痫的进展、监控先兆子痫的消退、评价先兆子痫治疗的功效、鉴别应当对先兆子痫进行治疗的患者亚群或鉴别应当对监控先兆子痫症状进行监控的患者亚群。



1. 结合剂组合物在制备通过以下方法用于检测妊娠妇女产生先兆子痫的风险的试剂中的用途,该方法包括:

a. 将来自所述妇女的生物样品与结合剂组合物接触,所述结合剂组合物包含与三种先兆子痫即PEE蛋白特异性结合的抗体,所述三种PEE蛋白由GSN、THBS1和PRG2组成;和

b. 检测所述结合剂组合物与所述样品中存在的所述三种PEE蛋白的结合;

其中所述结合剂组合物以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_d 结合PEE蛋白,并且其中与所述结合剂组合物与来自相同三个月的健康妊娠妇女的生物样品中的PEE蛋白的结合相比,所述结合剂组合物与样品中的PEE蛋白的结合改变,由此结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少80%的准确度,

其中所述生物样品为血清。

2. 权利要求1的用途,其中妇女在其妊娠的末三个月。

3. 权利要求1的用途,其中妇女在其妊娠的中间三个月。

4. 权利要求1的用途,其中妇女在其妊娠的头三个月。

5. 权利要求1的用途,其中结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少90%的准确度。

6. 权利要求1的用途,其中结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少95%的准确度。

7. 权利要求1的用途,其中抗体包括荧光标记。

8. 权利要求1的用途,其中结合通过免疫测定来进行。

9. 权利要求8的用途,其中免疫测定是酶联免疫吸附测定。

10. 权利要求8的用途,其中免疫测定包括珠子。

11. 权利要求8的用途,其中免疫测定包括磁性颗粒。

12. 权利要求8的用途,其中免疫测定不包括磁性颗粒。

13. 权利要求1的用途,其中该方法进一步用于预测先兆子痫的发作、监控先兆子痫的进展、监控先兆子痫的消退、评价先兆子痫治疗的功效、鉴别应当针对先兆子痫进行治疗的患者亚群或鉴别应当监控先兆子痫症状的患者亚群。

14. 结合剂组合物在制备通过以下方法用于检测妊娠妇女产生先兆子痫的风险的试剂中的用途,该方法包括

a. 将来自所述妇女的生物样品与结合剂组合物接触,其中所述生物样品为血清,并且其中所述结合剂组合物与所述样品中存在的PEE自身抗体结合,

其中所述结合剂组合物结合CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2的PEE自身抗体;或者

其中所述结合剂组合物结合CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白的PEE自身抗体;和

b. 检测所述结合剂组合物与所述样品中存在的所述PEE自身抗体的结合;

其中所述结合剂组合物以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_d 结合PEE自身抗体,并且其中与所述结合剂组合物与来自相同三个月的健康妊娠妇女的生物样品中的PEE自身抗体的结合相比,所述结合剂组合物与样品中的PEE自身抗体的结合改变,由此结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少80%的准确度。

15. 权利要求14的用途,其中所述结合剂组合物包括蛋白质。

16. 权利要求15的用途,其中所述结合剂组合物包括蛋白质,所述蛋白质包括标记。

17. 权利要求16的用途,其中标记是荧光标记。

18. 权利要求14的用途,其中与所述结合剂组合物与来自健康妊娠妇女的生物样品中

的自身抗体的结合相比,所述结合剂组合物与样品中的PEE自身抗体的结合提高。

19. 权利要求14的用途,其中与所述结合剂组合物与来自健康妊娠妇女的生物样品中的自身抗体的结合相比,所述结合剂组合物与样品中的PEE自身抗体的结合降低。

20. 权利要求14的用途,其中所述结合剂组合物结合CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2的PEE自身抗体。

21. 权利要求14的用途,其中所述结合剂组合物结合CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白的PEE自身抗体。

22. 权利要求14的用途,其中妇女在其妊娠的末三个月。

23. 权利要求14的用途,其中妇女在其妊娠的中间三个月。

24. 权利要求14的用途,其中妇女在其妊娠的头三个月。

25. 权利要求14的用途,其中结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少90%的准确度。

26. 权利要求14的用途,其中结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少95%的准确度。

27. 权利要求14的用途,其中结合通过免疫测定来进行。

28. 权利要求27的用途,其中免疫测定是酶联免疫吸附测定。

29. 权利要求27的用途,其中免疫测定包括珠子。

30. 权利要求27的用途,其中免疫测定包括磁性颗粒。

31. 权利要求27的用途,其中免疫测定不包括磁性颗粒。

32. 权利要求28的用途,其中该方法进一步用于预测先兆子痫的发作、监控先兆子痫的进展、监控先兆子痫的消退、评价先兆子痫治疗的功效、鉴别应当针对先兆子痫进行治疗的患者亚群或鉴别应当监控先兆子痫症状的患者亚群。

33. 结合剂组合物在制备通过以下方法用于检测妊娠妇女产生先兆子痫的风险的试剂中的用途,该方法包括:

a. 将来自所述妇女的生物样品与结合剂组合物接触,所述结合剂组合物包含与三种先兆子痫即PEE蛋白特异性结合的抗体,所述三种PEE蛋白由GSN、THBS1和PRG2组成;和

b. 检测所述结合剂组合物与所述样品中存在的所述三种PEE蛋白和至少一种PEE自身抗体的结合;

其中所述结合剂组合物以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_a 结合所述三种PEE蛋白的每一种,其中所述结合剂组合物以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_a 结合所述至少一种PEE自身抗体,并且其中与所述结合剂组合物与来自相同三个月的健康妊娠妇女的生物样品中的所述三种PEE蛋白和至少一种PEE自身抗体的结合相比,所述结合剂组合物与样品中的所述三种PEE蛋白和所述至少一种PEE自身抗体的结合改变,由此结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少80%的准确度,其中所述生物样品为血清。

34. 权利要求33的用途,其中自身抗体选自表4或表5。

35. 权利要求33的用途,其中与所述结合剂组合物与来自健康妊娠妇女的生物样品中的PEE自身抗体的结合相比,所述结合剂组合物与样品中的PEE自身抗体的结合提高,其中所述生物样品为血清。

36. 权利要求33的用途,其中与所述结合剂组合物与来自健康妊娠妇女的生物样品中

的PEE自身抗体的结合相比,所述结合剂组合物与样品中的PEE自身抗体的结合降低,其中所述生物样品为血清。

37. 权利要求33的用途,其中所述结合剂组合物结合超过一种的PEE自身抗体。

38. 权利要求37的用途,其中所述结合剂组合物结合CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2的PEE自身抗体。

39. 权利要求37的用途,其中所述结合剂组合物结合CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白的PEE自身抗体。

40. 权利要求33的用途,其中妇女在其妊娠的末三个月。

41. 权利要求33的用途,其中妇女在其妊娠的中间三个月。

42. 权利要求33的用途,其中妇女在其妊娠的头三个月。

43. 权利要求33的用途,其中结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少90%的准确度。

44. 权利要求33的用途,其中结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少95%的准确度。

45. 权利要求33的用途,其中所述结合剂组合物包含标记抗体和标记蛋白。

46. 权利要求33的用途,其中标记是荧光标记。

47. 权利要求33的用途,其中结合通过免疫测定来进行。

48. 权利要求33的用途,其中免疫测定是酶联免疫吸附测定。

49. 权利要求47的用途,其中免疫测定包括珠子。

50. 权利要求47的用途,其中免疫测定包括磁性颗粒。

51. 权利要求47的用途,其中免疫测定不包括磁性颗粒。

52. 权利要求33的用途,其中该方法进一步用于预测先兆子痫的发作、监控先兆子痫的进展、监控先兆子痫的消退或评价先兆子痫治疗的功效。

53. 包含一个或多个固体表面的组合物,所述固体表面由特异性结合GSN、THBS1和PRG2的抗体组成。

54. 诊断测定试剂盒,其包括:

a. 用于检测来自妊娠妇女的生物样品中的GSN、THBS1和PRG2的试剂;

b. 包含一个或多个固体表面的组合物,所述固体表面由特异性结合GSN、THBS1和PRG2的抗体组成;和

c. 测定的使用说明。

用于诊断先兆子痫的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2013年3月14日提交的美国临时专利申请系列No. 61/785,934的优先权权益,其完整内容按引用并入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 先兆子痫(PEE)是妊娠过程中发生的障碍,并且会导致母体和胎儿的发病和死亡。这种病症在美国(U.S.)和国外的妊娠母体中是普遍的。PEE影响全世界所有出生的5-15%。在全世界,每年1千3百万早产中的20%是由PEE引起的。每年只在美国,每年总的500,000例早产中的100,000例是PEE的结果。在全世界,在每年出生的3千万子宫内生长迟缓婴儿中,15%(450万)与PEE相关。每年全世界大约50万婴儿,和美国10,500婴儿死于母体PEE。美国每年还有大约2200个来自PEE的出生。此外,组合这些数字是因为全世界很少报道PEE。

[0005] PEE涉及妊娠诱发的高血压,其中在患者尿液中常常观察到蛋白质。目前,通过通常只在妊娠第20周后出现的孕妇血压升高,结合尿液中过量蛋白质的出现来诊断PEE。目前通过没有高血压、肾病、糖尿病或其他重大疾病病史的妇女后半段妊娠中出现的血压升高(>140/90mm Hg)和尿液中的蛋白质(>300mg/24小时)来限定PEE。PEE还可包括许多其他异常。

[0006] 没有精确的方式来诊断是否存在病症,并且因此对超过20周妊娠的呈现那些特殊症状的妇女,常常考虑PEE的可能性。已经证明了PEE特别难以诊断,因为其症状酷似许多其他疾病并且包括如头痛、腹痛、视力障碍、意识模糊、焦虑、呼吸短促、恶心和呕吐这样的症状。如果未得到确诊,或诊断太晚,则对母体及其婴儿都存在严重影响。此外,PEE可以从中度快速进展到重度。疾病的严重征兆包括高血压、脑损伤的风险、损伤的肾和肝功能、凝血问题、肺水肿乃至癫痫。一些妇女呈现出预先存在的高血压,其常常难以与PEE的发作区分,因此进一步增加了诊断的复杂性。迄今为止,没有有效的方式在症状发作之前诊断这种潜在的致命病症。

[0007] PEE能够导致母体并发症,如惊厥和HELLP症状(溶血、升高的肝酶和降低的血小板)。PEE能够导致胎儿并发症,如早熟、子宫内生长限制;酸中毒,未来生活的挑战,如学习障碍、脑瘫、癫痫、失明和耳聋,或甚至能够导致胎儿死亡。

[0008] PEE发作的早期检测、诊断和/或预测将防止或延迟PEE许多不利的母体和胎儿结果。现在仅仅认识到先兆子痫妇女中存在早期分子异常,但仍然需要准确和/或灵敏的诊断需要治疗的妇女的方式。因此,对用于将可能经历PEE的母体的早期检测的准确测试存在未能满足的需求。本文中所述的发明解决了这个需求并且还提供了额外的益处。

[0009] 在整个说明书中,引用了各种参考文献、出版物、专利和/或专利申请。将这些参考文献、出版物、专利和/或专利申请全部按引用并入本文中,用于所有用途。

[0010] 发明简述

[0011] 本文中所述的发明尤其涉及用于鉴别产生先兆子痫(PEE)的风险、预测PEE的发作、监控PEE的进展、监控PEE的消退、鉴别应当对PEE进行治疗或继续对PEE进行治疗的患者亚群、评价妊娠妇女中PEE治疗的功效和/或鉴别应当对PEE症状进行监控的患者亚群的方法。

法、组合物和试剂盒。

[0012] 在一个方面中,本发明提供了用于检测妊娠妇女中产生先兆子痫的风险的方法,该方法包括将来自该妇女的生物样品与结合剂接触和检测结合剂与样品中存在的至少三种PEE蛋白的结合,其中结合剂以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_d 结合PEE蛋白,并且其中与结合剂与来自相同三个月的健康妊娠妇女的生物样品中的PEE蛋白的结合相比,结合剂与样品中的PEE蛋白的结合提高,由此结合的提高表明产生先兆子痫的风险达至少80%的准确度。在一些实施方案中,结合的提高表明产生先兆子痫的风险达至少90%的准确度。在其他实施方案中,结合的提高表明产生先兆子痫的风险达至少95%的准确度。在一个实施方案中,将该方法用于预测先兆子痫的发作、监控先兆子痫的进展、监控先兆子痫的消退、评价先兆子痫的治疗功效、鉴别应当针对PEE进行治疗的患者亚群或鉴别应当监控PEE症状的患者亚群。在一个实施方案中,至少三种PEE蛋白选自表1中所列的PEE蛋白。在另一个实施方案中,至少三种PEE蛋白选自表2中所列的PEE蛋白。在另一个实施方案中,至少三种PEE蛋白选自表3中的PEE蛋白的组合。在另一个实施方案中,结合剂进一步结合选自表1或表2的再另一种PEE蛋白。在某些实施方案中,结合剂结合不超过48种PEE蛋白。在某些实施方案中,妇女在其妊娠的末三个月。在某些实施方案中,妇女在其妊娠的中间三个月。在某些实施方案中,妇女在其妊娠的头三个月。在一些实施方案中,生物样品是非胎儿母体样品。在一些实施方案中,生物样品是尿液、血液或胎盘组织。在一些实施方案中,结合剂包括PEE蛋白GSN、THBS1和PRG2的单独抗体的混合物。在其他实施方案中,结合剂进一步结合样品中存在的自身抗体。在一些这样的实施方案中,结合剂进一步结合选自表4或表5的自身抗体。在一个特定的实施方案中,结合剂结合CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2的PEE自身抗体。在另一个特定的实施方案中,结合剂结合CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白(Junction Plakoglobin)的PEE自身抗体。在本文中提供的方法的一个实施方案中,结合通过免疫测定来进行。在另一个实施方案中,免疫测定是酶联免疫吸附测定。在另一个实施方案中,免疫测定包括珠子。在另一个实施方案中,免疫测定包括磁性颗粒。在另一个实施方案中,免疫测定不包括磁性颗粒。在另一个实施方案中,结合剂是包括蛋白结合位点的核蛋白。

[0013] 在另一个方面中,本发明提供了用于检测妊娠妇女中产生先兆子痫的风险的方法,该方法包括将来自该妇女的生物样品与结合剂接触,和检测结合剂与样品中存在的PEE自身抗体的结合,其中结合剂以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_d 结合PEE自身抗体,并且其中与结合剂与来自相同三个月的健康妊娠妇女的生物样品中的PEE自身抗体的结合相比,结合剂与样品中的PEE自身抗体的结合改变,由此结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少80%的准确度。在一个实施方案中,结合的提高表明产生先兆子痫的风险达至少90%的准确度。在另一个实施方案中,结合的提高表明产生先兆子痫的风险达至少95%的准确度。在一个实施方案中,PEE自身抗体选自表4或表5。在另一个实施方案中,结合剂包括蛋白质。在另一个实施方案中,结合剂包括蛋白质阵列。在另一个实施方案中,与结合剂与来自健康妊娠妇女的生物样品中的自身抗体的结合相比,结合剂与样品中的PEE自身抗体的结合提高。在另一个实施方案中,与结合剂与来自健康妊娠妇女的生物样品中的自身抗体的结合相比,结合剂与样品中的PEE自身抗体的结合降低。在另一个实施方案中,结合剂结合CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2的PEE自身抗体。在另一个实施方案中,结合剂结合CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白的PEE自身抗体。在另一个实施方案中,结合剂进一步结合选自表1或表2的PEE蛋白。在

另一个实施方案中,结合剂进一步结合选自GSN、THBS1或PRG2的PEE蛋白。在另一个实施方案中,结合剂结合不超过48种PEE蛋白。在一个实施方案中,结合剂包括蛋白质。在另一个实施方案中,结合剂包括蛋白质,所述蛋白质包括标记。在某些实施方案中,标记可以是荧光标记。在一个实施方案中,妇女在其妊娠的末三个月。在一个实施方案,妇女在其妊娠的中间三个月。在一个实施方案中,妇女在其妊娠的头三个月。在另一个实施方案中,生物样品是非胎儿母体样品。在另一个实施方案中,生物样品是尿液、血液或胎盘组织。在另一个实施方案中,结合通过免疫测定来进行。在另一个实施方案中,免疫测定是酶联免疫吸附测定。在另一个实施方案中,免疫测定包括珠子。在另一个实施方案中,免疫测定包括磁性颗粒。在另一个实施方案中,免疫测定不包括磁性颗粒。在一个实施方案中,结合剂包括抗体。在另一个实施方案中,结合剂包括核蛋白。在另一个实施方案中,结合剂包括肽。在另一个实施方案中,结合剂包括荧光标记。在另一个实施方案中,结合剂包括标记的抗体。

[0014] 在再另一个方面中,本发明提供了用于检测妊娠妇女中产生先兆子痫的风险的方法,该方法包括将来自妇女的生物样品与结合剂接触,检测结合剂与样品中存在的至少一种PEE蛋白和至少一种PEE自身抗体的结合,其中结合剂以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_d 结合至少一种PEE蛋白,其中结合剂以 10^{-12} M至 10^{-5} M的 K_d 结合至少一种PEE自身抗体,并且其中与结合剂与来自相同三个月的健康妊娠妇女的生物样品中的至少一种PEE蛋白和至少一种PEE自身抗体的结合相比,结合剂与样品中的至少一种蛋白质和至少一种PEE自身抗体的结合改变,由此结合的改变表明产生先兆子痫的风险达至少80%的准确度。在一个实施方案中,结合的提高表明产生先兆子痫的风险达至少90%的准确度。在另一个实施方案中,结合的提高表明产生先兆子痫的风险达至少95%的准确度。在一个实施方案中,该方法进一步用于预测先兆子痫的发作、监控先兆子痫的进展、监控先兆子痫的消退或评价先兆子痫的治疗功效。在一个实施方案中,PEE自身抗体选自表4或表5。在一个实施方案中,与结合剂与来自健康妊娠妇女的生物样品中的自身抗体的结合相比,结合剂与样品中的PEE自身抗体的结合提高。在另一个实施方案中,与结合剂与来自健康妊娠妇女的生物样品中的自身抗体的结合相比,结合剂与样品中的PEE自身抗体的结合降低。在一个实施方案中,PEE蛋白选自表1或表2。在另一个实施方案中,结合剂进一步结合选自GSN、THBS1或PRG2的蛋白质。在一个实施方案中,结合剂结合超过一种的PEE蛋白。在一个特定的实施方案中,结合剂结合PEE蛋白GSN、THBS1和PRG20在一个实施方案中,结合剂结合不超过48种PEE蛋白。在一个实施方案中,结合剂结合不超过一种PEE自身抗体。在一个特定的实施方案中,结合剂结合CSNK1D、CUEDC1和ZNRANB2的PEE自身抗体。在另一个实施方案中,结合剂结合CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白的PEE自身抗体。在一个实施方案中,结合剂包括标记的抗体和标记的蛋白质。在某些实施方案中,标记是荧光标记。在一个实施方案中,妇女在其妊娠的末三个月。在一个实施方案,妇女在其妊娠的中间三个月。在另一个实施方案中,妇女在其妊娠的头三个月。在一个实施方案中,生物样品是非胎儿母体样品。在一个实施方案中,生物样品是尿液、血液或胎盘组织。在一个实施方案中,结合通过免疫测定来进行。在另一个实施方案中,免疫测定是酶联免疫吸附测定。在另一个实施方案中,免疫测定包括珠子。在另一个实施方案中,免疫测定包括磁性颗粒。在另一个实施方案中,免疫测定不包括磁性颗粒。

[0015] 在另一个方面中,本发明提供了包含一个或多个固体表面的组合物,所述表面包含针对GSN、THBS1和PRG2的结合剂。

[0016] 在另一个方面中,本发明提供了包含一个或多个固体表面的组合物,所述表面包含针对CSNK1D、CUEDC1或ZRANB2自身抗原的结合剂。

[0017] 在另一个方面中,本发明提供了包含一个或多个固体表面的组合物,所述表面包含针对CSNK1D、SULT4A1或连接桥粒斑珠蛋白的结合剂。

[0018] 在另一个方面中,本发明提供了诊断测定试剂盒,其包括:(a)用于检测来自妊娠妇女的生物样品中的GSN、THBS1和PRG2的试剂;(b)包含一个或多个固体表面的组合物,所述表面含有一种或多种针对GSN、THBS1和PRG2的结合剂;(c)测定的使用说明。

[0019] 在另一个方面中,本发明提供了诊断测定试剂盒,其包含:(a)用于检测来自妊娠妇女的生物样品中的自身抗体的试剂;(b)包含一个或多个固体表面的组合物,所述表面含有一种或多种针对PEE自身抗体的结合剂;(c)测定的使用说明。在一个实施方案中,试剂盒的组合物包含能够结合CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2/PEE自身抗体的固体表面。在另一个实施方案中,试剂盒的组合物包含能够结合CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白/PEE自身抗体的固体表面。

[0020] 附图简述

[0021] 图1是当与来自正常健康妊娠妇女的血清相比时,区分PEE中的血清蛋白的48种PEE蛋白的主成分分析的图示(按照ANOVA, $p < 0.001$)。轴表示通过针对研究中每位患者的48种PEE蛋白的光谱计数的相应特征值的平方根分级的协方差矩阵的特征向量($n = 35$ 正常妊娠, $n = 25$ 患有PEE的妊娠)。还可以参见表1。

[0022] 图2显示了针对PEE高预测性的8种蛋白质的分散图。这8种PEE蛋白是图1中的48种PEE蛋白的子集:THBS1、PRG2、GSN、ITIH4、HPX、TF、APCS和F5。显示的是针对来自健康和PEE样品的每种蛋白质的平均光谱计数值加SEM。这8种蛋白质中的三种的随机组合产生0.95或更高的平均AUC。还可以参见表2。

[0023] 图3是用于生物标志物模式分析的蛋白质表达图解,以鉴别在三个月中显示出可比较模式的蛋白质组。鉴别的蛋白质模式对应于表1和2中标记为“生物标志物模式分析”的那栏。

[0024] 图4显示了针对表1中48种PEE蛋白集的针对每位患者的单独光谱计数的分散图;显示的是针对每位患者的平均光谱计数加SEM。

[0025] 图5是按照75种PEE自身抗体的ANOVA的主成分分析的图示,具有 $qFDR < 0.05$ 的假发现率调整的 p -值以及正常和1.5PEE之间的最小倍数变化差异,发现在来自健康妊娠妇女和患有PEE的妊娠妇女的血样样品中得到差异测量。还可以参见表4。

[0026] 图6显示了针对来自75种PEE自身抗体集的10种PEE自身抗体的子集的针对每位患者的单独平均荧光强度(MFI)计数(图5和表5)的分散图,其在取自患有和未患先兆子痫的妊娠妇女的血清中显著不同($qFDR < 0.05$; 倍数变化 > 1.5)。显示的是来自25位健康妊娠妇女(正常)和20位患有PEE的妊娠妇女的血清样品中的每种自身抗体的平均MFI计数加SEM。每张图左侧的浅灰色垂直条表示头三个月(三角形)或末三个月(长方形)的正常妊娠妇女。每张图右侧的深灰色垂直条表示末三个月(长方形)的PEE妇女。选择可以在头三个月的正常妊娠中测量的生物标志物,头三个月中具有最小重叠并且具有PEE超越正常妊娠的显著($qFDR < 0.05$)提高或降低,具有倍数变化 > 1.5 。

[0027] 图7显示了针对来自75种PEE自身抗体集的最显著的10种自身抗体的针对每位患

者的单独平均荧光强度 (MFI) 计数的分散图,其在取自患有和未患先兆子痫的妊娠妇女的血清中是显著不同的 ($qFDR < 0.05$; 倍数变化 > 1.5); 显示的是在来自 25 位健康妊娠妇女和 20 位患有 PEE 的妊娠妇女的血清样品中的每种自身抗体的平均 MFI 计数加 SEM。

[0028] 发明详述

[0029] 本文中描述的发明尤其提供了用于鉴别产生先兆子痫 (PEE) 的风险、预测 PEE 的发作、监控 PEE 的进展、监控 PEE 的消退、鉴别应当针对 PEE 进行治疗或继续对 PEE 进行治疗的患者亚群、评价妊娠妇女中 PEE 治疗的功效和/或鉴别应当监控 PEE 症状的患者亚群的方法、组合物和试剂盒。如以下进一步详述的,已经鉴别出特定的肽、蛋白质和自身抗体标志物,其可以用于准确地鉴别在早期至中期妊娠期间之后可能产生 PEE 的妊娠妇女。这样的标志物可以允许 PEE 和呈现相似症状的其他病症之间的诊断区分。处于较高 PEE 风险下的受试者的早期鉴别对于帮助挽救婴儿和母体的生命以及改善其健康具有相当大的价值。

[0030] 定义

[0031] 为了解释这个说明书的目的,以下定义将是适用的,并且只要适当,以单数使用的术语也将包括复数,反之亦然。

[0032] 如本文中使用的,“先兆子痫”或“PEE”是指妊娠妇女产生高血压(相对于其妊娠前的血压)和/或妊娠过程中尿液中的蛋白质时的病症。在许多病例中,在妊娠第 20 周(中间三个月后期或末三个月)后发生高血压和/或尿液中的蛋白质。先兆子痫的症状可以包括,但不限于,高血压(血压升高、尿液中过量蛋白质(蛋白尿)、头痛、视力变化(包括暂时性失明、视力模糊或光敏感)、腹痛(如上腹痛,例如,右侧肋骨下)、恶心、呕吐、头晕、减少的排尿量、突然的体重增加、视力障碍(例如,对光的过度敏感、视力模糊、看到闪光点或光环)、意识模糊、焦虑和/或呼吸短促。在一些病例中,严重的 PEE 体征包括,但不限于:高血压、脑损伤的风险、损伤的肾和肝功能、凝血问题、肺水肿和/或癫痫。其他 PEE 症状描述于本文中并且是本领域技术人员(包括主治医生)已知的。

[0033] 处于产生 PEE “风险中”的个体在本文中所述的治疗方法之前,可以具有或不具有可检测的疾病或疾病症状,并且可以已经显示或尚未显示出可检测的疾病或疾病症状。“处于风险中”表示个体具有如本文中所述的本领域已知的一个或多个风险因素,其是与 PEE 的产生相关的可测量参数。具有这些风险因素中的一个或多个的受试者比不具有这些风险因素中的一个或多个的受试者具有更高的产生 PEE 的可能性。例如,在一些实施方案中,处于产生 PEE “风险中”的受试者显示出表 1 或表 2 中所示的一种或多种 PEE 蛋白的表达水平的变化。

[0034] “个体”可以是“患者”。“患者”是指在主治医生护理下的“个体”。在一个实施方案中,患者是妇女。在另一个实施方案中,患者是尚未诊断出患有 PEE 的妇女。在再另一个实施方案中,患者是已经诊断出患有 PEE 但尚未有任何解决 PEE 治疗的妇女。

[0035] 如本文中使用的,“患者亚群”及其语法变化,是指特征在于具有将该患者亚群从其属于的更宽疾病类别中的其他患者中区分出来的一个或多个不同的可测量和/或可鉴别特征的患者子集。这样的特征包括具有本文中描述为处于产生 PEE 风险中的特征性的 PEE 蛋白和/或自身抗体谱,任选地结合本文中所述的本领域技术人员(包括主治医生)已知的任一种症状。

[0036] 如本文中使用的,术语“生物样品”是指获自或源自个体的组合物,所述个体含有

例如基于物理、生化、化学和/或生理特征而待表征和/或鉴别的细胞和/或其他分子实体。在一些实施方案中,生物样品是来自母体的血液、血清、生物流体或组织。在其他实施方案中,生物样品含有来自婴儿的一些材料。

[0037] 如本文中使用的“预测(predicting)”和“预测(prediction)”不是表示将以100%确定性发生的事件。而是用来表示事件将更有可能发生。“预测(predict)”或“进行预测(make a prediction)”所采取的行动可以包括测定事件将更有可能发生的可能性。本文中所述的多个因素的评估可以用于进行这样的确定或预测。

[0038] “相关(correlate)”或“相关(correlating)”表示以任何方式将第一个分析或实验方案的性能和/或结果与第二个分析或实验方案的性能和/或结果进行比较。例如,可以在进行第二个实验方案中所使用第一个分析或实验方案的结果和/或使用第一个分析或实验方案的结果来确定是否应当进行第二个分析或实验方案。关于对来自个体的生物样品进行的PEE蛋白分析或PEE自身抗体分析的实施方案,可以使用结果来确定是否应当对该个体执行特定的治疗方案。

[0039] 术语“诊断”在本文中用来表示医学或病理状况的鉴别或分类。例如,“诊断”可以指PEE的鉴别,“诊断”还可以指PEE严重程度的分类。可以根据本领域技术人员(例如,产科医生)将使用的任一种实验方案来进行PEE的诊断,例如,“Pre-eclampsia: Etiology and Clinical Practice (先兆子痫: 病因学和临床实践)”(F. Lyall编辑和M. Belfort编辑),剑桥大学出版社(2007)和/或“Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy (妊娠中的Chesley's高血压障碍)”,第3版(M. Lindheimer, J. Roberts, F. G. Cunningham编辑),Elsevier(2009)。

[0040] 本文中使用的术语“帮助诊断”来表示帮助进行关于PEE特定类型的症状或病症的存在、程度或其他性质的临床决定的方法。例如,帮助PEE诊断的方法可以包括测量来自个体的生物样品中的一种或多种PEE蛋白和/或PEE自身抗体的含量或检测来自个体的生物样品中的一种或多种PEE蛋白和/或PEE自身抗体的存在或不存在。

[0041] 本文中使用的术语“预后”来表示产生PEE的可能性的预测(包括PEE的复发)。通过选择针对任何特定患者的最合适治疗形式,本发明的预测方法可用于在临床上进行治疗决定。本发明的预测方法在预测患者是否可能产生PEE、具有PEE复发和/或PEE症状恶化和/或在诊断患者是否可能产生PEE、具有PEE复发和/或PEE症状恶化中是有价值的工具。

[0042] “治疗”是指尝试改变个体自然过程的临床干预并且可以在临床诊断或预后过程之前、之中或之后进行。理想的治疗作用包括防止PEE或其病症或症状的出现或复发,减轻PEE的病症或症状,减少PEE的任何直接或间接病理结果,降低PEE进展的速率或严重程度,和/或改善或减轻PEE。在一些实施方案中,本发明的方法和组合物用于鉴别为处于产生PEE风险中的患者亚群。在一些情况中,本发明的方法和组合物用于尝试延缓PEE的发展。

[0043] 应当明白本文中所述的各个方面和实施方案包括“由各个方面和实施方案组成”和/或“基本上由各个方面和实施方案组成”。

[0044] 如本文中使用的,术语“肽”用来表示包括两个或多个通过一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的 α 氨基连接的氨基酸的天然或合成分子。本发明的肽不受长度的限制,并且因此“肽”可以是较长多肽和/或蛋白质的一部分,或可以指较长多肽/蛋白质本身。术语肽可以与蛋白质和/或多肽互换使用。

[0045] 如本文中使用的,术语“检测”是指不可检测、低、正常或高血清浓度的一种或多种生物标志物(如,例如,蛋白质、肽和其他生物分子)的定量测量。

[0046] 如本文中使用的,术语“定量(quantify)”和“定量(quantification)”可以互换使用,并且是指测定样品中物质(例如,生物标志物)的含量或丰度的过程,不管是相对的还是绝对的。

[0047] 关于本文中的数值或参数的“约”包括(和描述)涉及该数值或参数本身的实施方案。例如,关于“约X”的描述包括“X”的描述。术语“约”通过提供给定的数值可以比终点“高一点”或“低一点”而没有影响所需结果,用来给数字范围终点提供灵活性。浓度、含量和其他数字数据在本文中可以以范围形式来表述或呈现。应当明白使用这样的范围形式只是为了方便和简洁,并且因此应当灵活地理解,不仅包括作为该范围限制明确记述的数值,还包括该范围内涵盖的所有单独的数值或亚范围,如同明确记述每个数值和亚范围一样。

[0048] 如说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非文中另外清楚地指明。

[0049] “任选的”或“任选地”表示随后所述的事件或情况可以发生也可以不发生,并且表示该描述包括其中所述事件或情况发生的实例和其中所述事件或情况没有发生的实例。

[0050] 一般技术

[0051] 除非另外限定,本文中使用的技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常了解的含义。

[0052] 除非另外指出,本发明的实践将使用蛋白质生物学、蛋白质化学、分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在本领域技术人员的能力范围内。这样的技术在文献中有全面解释,如“Preeclampsia: Etiology and Clinical Practice (先兆子痫: 病因学和临床实践)”(F. Lyall编辑和M. Belfort编辑), Cambridge University Press (2007); “Chesley’s Hypertensive Disorders in Pregnancy, 第3版(M. Lindheimer, J. Roberts, F. G. Cunningham编辑), Elsevier (2009);” “Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆: 实验室手册)”, 第2版(Sambrook等, 1989); “Oligonucleotide Synthesis (寡核苷酸合成)”(M. J. Gait编辑, 1984); “Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学通用实验方案)”(F. M. Ausubel等编辑, 1987, 周期性更新); “PCR: The Polymerase Chain Reaction (PCR: 聚合酶链反应)”, (Mullis等, 编辑, 1994); 和Singleton等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (微生物学和分子生物学词典), 第2版, J. Wiley & Sons (New York, N. Y. 1994)。

[0053] 从妊娠妇女收集生物样品

[0054] 通常,从妊娠妇女收集生物样品。可以收集任何类型的生物样品,包括但不限于血清、血浆、血液、尿液、粘液、唾液、脑脊髓液、羊水、滑液、宫颈阴道液、灌洗液、胎盘、其他周围组织、组织,及其组合。在一个实施方案中,从妊娠妇女收集的生物样品只含有非胎儿组织。在另一个实施方案中,与母体非胎儿组织一起收集一些胎儿组织。

[0055] 当表示PEE的生物标志物(如蛋白质、肽和自身抗体)可定量时,使用本文中所述的方法测试妇女的PEE可以在妊娠过程的任何时间进行。可以在妊娠的头、中或末三个月过程中收集并测试生物标志物。在一个实施方案中,在约4周至约6周妊娠时;在约6周至约8周

时;在约8周至约10周时;在约10周至约12周时;在约12周至约14周时;在约14周至约16周时;在约16周至约18周时;在约18周至约20周时;在约20周至约22周时;在约22周至约24周时;在约24周至约26周时;在约26周至约28周时;在约28周至约30周时;或约30周时及以后,收集并测试生物标志物。这些范围不应当看作是限制性的,因为这样的测试可以在妊娠过程中的任何点进行。相反,提供这些范围来证明其中大部分妊娠妇女最可能进行该测试的妊娠周期的时间段。

[0056] PEE蛋白和肽的鉴别以及生物样品的测试

[0057] 用于测试妊娠妇女PEE的方法可以包括检测与没有产生PEE的健康妊娠妇女相比的生物样品中存在的与PEE相关的一种或多种肽、蛋白质和/或自身抗体的浓度、表达、胞内迁移或活性的差异。如本文中进一步所述的各种系统和方法可以用于鉴别、表征和定量肽、蛋白质或自身抗体。本文中提供了非限制性系统和方法。

[0058] 在一个实施方案中,可以使用质谱来鉴别在PEE或怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女与妊娠健康妇女之间差异表达的肽或蛋白质。在这样的实施方案中,本文中可以使用比较来自不同生物样品的多个质谱,将使用补偿非生物可变性的方法后数量上不同的大量离子定位,分离和表征目标蛋白质或肽生物标志物。

[0059] 在另一个实施方案中,可以使用毛细管液相色谱来鉴别在PEE或怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女与妊娠健康妇女之间差异表达的肽或蛋白质。本领域技术人员将认识到其他技术可以用于鉴别PEE蛋白和/或肽。下文描述了能够使其用作PEE诊断标志物的PEE蛋白和/或肽的特征。

[0060] 在分位数标准化后可以通过方差的单向或多向分析(ANOVA)来分析差异表达的蛋白质或肽,以鉴别在PEE和健康妊娠之间差异表达的蛋白质。参见,例如,图1和表1。在一个实施方案中,使用具有低于0.05假发现率的p-值,具有高于1.5倍数变化的上调蛋白质,或具有高于1.5倍数变化的下调蛋白质,可以认为是显著的并用于构建预测模型。在另一个实施方案中,使用具有低于0.05假发现率的p-值,具有高于2倍数变化的上调蛋白质,或具有高于2倍数变化的下调蛋白质,可以认为是显著的并用于构建预测模型。各种类型的软件可以用于统计学分析。此类软件的一个实例是Partek Genomics Suite。可以将蛋白质或肽接受统计学分析,以选择用于以下表征模型中检测和/或预测PEE的强有力模型:K-最近邻、最近质心、区别分析、支持向量机、偏最小二乘法、对角判别分析、随机森林和逻辑回归。如实施例中进一步详述的,使用少至3种蛋白质,多个模型可以产生具有 >0.9 的曲线下面积(AUC)的接收者工作特征曲线(ROC)。通常,ROC曲线下面积是考虑了灵敏度和特异性度量的测试准确度度量。1.0的AUC表示在该群中具有100%准确度。在不同的实施方案中,ROC曲线下面积可以是PEE检测准确度、PEE诊断准确度、PEE预测准确度、PEE发作预测准确度等的统计学测量。

[0061] 使用这种方法,在实施例1和表1中描述了发现与PEE相关的示例性肽和/或蛋白质。这些肽和/或蛋白质可以互换地称为“PEE蛋白”或“PEE肽”或“PEE多肽”并且可用于PEE的诊断、帮助诊断和/或治疗中。这些PEE蛋白还可以用于鉴别用于PEE治疗的患者亚群。

[0062] 生物样品的测试和PEE自身抗体的鉴别

[0063] 取自妊娠妇女的生物样品可以用于鉴别可以用于评估妊娠妇女是否已经产生或将产生PEE的自身抗体(即,PEE自身抗体)。测量自身抗体的各种技术是本领域技术人员已

知的。一种非限制性方法是使用 **ProtoArray®** 人蛋白质微阵列 V5 (微阵列) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 以测量来自健康妊娠妇女和 PEE 妊娠妇女的生物样品中的各种自身抗体。表示健康和 PEE 妊娠血清中的每种自身抗体丰度的相对荧光单位可以上传至任何类型的统计学软件并使用任何类型的统计学软件分析, 所述软件如 Partek's Genomics Suite (Partek Inc, St. Louis, MO)。数据可以分位数标准化, 接着进行方差的单向或多向分析 (ANOVA), 以鉴别在 PEE 和健康妊娠之间差异表达的自身抗体。

[0064] 示例性的在 PEE 和健康妊娠之间差异表达的自身抗体显示于表 4、表 5 和图 5-7 中。在一个实施方案中, 使用具有低于 0.05 假发现率的 p-值, 具有高于 1.5 倍数变化的上调蛋白质, 或具有高于 1.5 倍数变化的下调蛋白质, 可以认为是显著的并用于构建预测模型。在一个实施方案中, 至少约 8 种抗体可以提供 PEE 和健康妊娠样品之间 70% 变化的解释。在另一个实施方案中, 约 15 种抗体可以提供样品之间全部的 95% 差异的解释。本文中公开的 PEE 抗体可以用于评估产生 PEE 的风险, 监控 PEE 的发展和选择用于治疗的患者以及本文中所述的其他用途的各种方法。

[0065] 使用 PEE 蛋白和/或 PEE 自身抗体来检测 PEE 或诊断产生先兆子痫的风险的结合剂和方法

[0066] 本发明的结合剂可以用于鉴别取自怀疑处于产生 PEE 的风险中、已经患有 PEE 的妊娠妇女, 或取自健康妊娠妇女的生物样品中存在的蛋白质、肽和/或自身抗体。结合剂可以是一种或多种蛋白质、一种或多种肽、一种或多种抗体、一种或多种核酸, 或一种或多种核蛋白。结合剂可以包括多个用于蛋白质、肽和自身抗体的结合位点。在一个实施方案中, 结合剂可以用于鉴别将预测妊娠妇女是否将产生 PEE 或患有 PEE 或正从 PEE 恢复的蛋白质或肽。在这样的情况中, 结合剂可以用于帮助 PEE 或 PEE 状况的诊断。

[0067] 可以以本领域技术人员已知的方式来标记或修饰本发明的结合剂。例如, 结合剂可以包括标记。标记可以包括, 但不限于, 荧光标记、免疫标记、磁性标记、DNA 标记、小分子标记或放射性标记。

[0068] 可以以一定的方式来标记或修饰蛋白质结合剂。例如, 蛋白质结合剂可以包括标记。标记可以包括, 但不限于, 荧光标记、免疫标记、磁性标记、DNA 标记、小分子标记或放射性标记。

[0069] 可以以一定的方式来标记或修饰肽结合剂。例如, 肽结合剂可以包括标记。标记可以包括, 但不限于, 荧光标记、免疫标记、磁性标记、DNA 标记、小分子标记或放射性标记。

[0070] 可以以一定的方式来标记或修饰核酸结合剂。例如, 核酸结合剂可以包括标记。标记可以包括, 但不限于, 荧光标记、免疫标记、磁性标记、DNA 标记、小分子标记或放射性标记。

[0071] 可以以一定的方式来标记或修饰核蛋白结合剂。例如, 核蛋白结合剂可以包括标记。标记可以包括, 但不限于, 荧光标记、免疫标记、磁性标记、DNA 标记、小分子标记或放射性标记。

[0072] 结合剂可以以 10^{-15}M 、 10^{-14}M 、 10^{-13}M 、 10^{-12}M 、 10^{-11}M 、 10^{-10}M 、 10^{-9}M 、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M 、 10^{-5}M 、 10^{-4}M 、 10^{-3}M 或 10^{-2}M 的离解常数 (K_d) 结合一种或多种蛋白质、肽或自身抗体。在某些实施方案中, 结合剂可以以 10^{-12}M 至 10^{-5}M 、 10^{-10}M 至 10^{-5}M 、 10^{-8}M 至 10^{-5}M 、 10^{-7}M 至 10^{-5}M 、 10^{-10}M 至 10^{-8}M 、 10^{-9}M 至 10^{-7}M 或 10^{-8}M 至 10^{-6}M 的 K_d 范围结合一种或多种蛋白质、肽或自身抗体。

[0073] 在一个特定的实施方案中,结合剂可以结合1种蛋白质、肽和/或自身抗体。在另一个实施方案中,结合剂可以结合2种蛋白质、肽和/或自身抗体。在再另一个实施方案中,结合剂可以结合3种蛋白质、肽和/或自身抗体。在相关的实施方案中,结合剂可以结合1种或更多种、2种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、11种或更多种、12种或更多种、13种或更多种、14种或更多种、15种或更多种、16种或更多种、17种或更多种、18种或更多种、19种或更多种、20种或更多种、21种或更多种、22种或更多种、23种或更多种、24种或更多种、25种或更多种蛋白质、肽和/或自身抗体,多达最多30、40、50、60、70、80、90或100种蛋白质、肽和/或自身抗体。在一个特定的实施方案中,结合剂可以结合最多48种PEE蛋白和/或肽。在另一个特定的实施方案中,结合剂可以结合2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种蛋白质、肽和抗体组合的任意组合。

[0074] 本文中所述的PEE蛋白和PEE自身抗体可以用于诊断或帮助诊断处于产生PEE风险中的个体。PEE蛋白和PEE自身抗体还可以用于鉴别产生先兆子痫的风险、预测PEE的发作、监控PEE的进展、监控PEE的消退、鉴别应当对PEE进行治疗或继续对PEE进行治疗的患者亚群、评价妊娠妇女中PEE治疗的功效和/或鉴别应当监控PEE症状的患者亚群。

[0075] 在一个实施方案中,本发明的结合剂选自抗体、自身抗体、肽、多肽、寡核苷酸、小分子等。在一个特定的实施方案中,本发明的结合剂包括荧光标记或荧光免疫标记。在另一个特定的实施方案中,本发明的结合剂包括磁性标记或磁免疫标记。在另一个特定的实施方案中,本发明的结合剂包括放射性标记或磁放射性标记。在再另一个实施方案中,用寡核苷酸或小分子标记结合剂。

[0076] 在一个实施方案中,结合剂包括免疫测定。免疫测定可以用于检测、鉴别和/或定量取自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女和健康妊娠妇女的生物样品中存在的蛋白质或肽。在某些实施方案中,免疫测定可以是酶联免疫吸附测定(ELISA)。本文中使用的任何免疫测定可以掺入荧光、磁或放射性免疫标记。

[0077] 在另一个实施方案中,结合剂包括诊断阵列。诊断阵列可以用于检测、鉴别和/或定量取自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女和健康妊娠妇女的生物样品中存在的蛋白质或肽。阵列可以包括蛋白质或抗体覆盖的基质,在基质上包括多个离散的已知区域。阵列可以包括颗粒、纳米颗粒、珠子、纳米珠子或其他固体表面,其可以是多孔的或非多孔的,并且可以是各种大小的。在一个实施方案中,诊断阵列不包括荧光颗粒。在另一个实施方案中,诊断阵列包括荧光颗粒。在一个实施方案中,诊断阵列不包括磁性颗粒。在另一个实施方案中,诊断阵列包括磁性颗粒。

[0078] 在相关的实施方案中,本发明的结合剂包括颗粒、纳米颗粒、珠子、纳米珠子。在一个实施方案中,纳米颗粒、珠子或纳米珠子是荧光标记的。在另一个实施方案中,纳米颗粒、珠子或纳米珠子是磁性标记的。在另一个实施方案中,纳米颗粒、珠子或纳米珠子是放射性标记的。在再另一个实施方案中,用寡核苷酸或小分子标记纳米颗粒、珠子或纳米珠子。

[0079] 在另一个实施方案中,结合剂包括基于磁的蛋白质测定组分和/或纳米标记物。在这样的实施方案中,借助于磁纳米标记物,使用磁多重蛋白质测定来检测、鉴别和/或定量生物样品中存在的蛋白质或肽(Osterfeld等,“Multiplex Protein Assays Based on Real-Time Magnetic Nanotags Sensing,”PNAS,105,20637-20640(2008年12月12日在线

公开))。例如, MagArray蛋白质芯片可以用于诊断阵列。在这个实施方案中, 使用三步进行蛋白质或肽检测。首先, 基质上的探针特异性地结合样品中的蛋白质或肽。其次, 纳米标记物-标记的抗体结合结合的蛋白质或肽, 形成三明治-样结构。最后, 将外部磁场施加于芯片并且通过电测量由纳米标记物产生的杂散磁场, 以确定样品中靶标分子的存在。

[0080] 在相关的实施方案中, 本发明的结合剂包括纳米标记物。在一个实施方案中, 纳米标记物是荧光标记的。在另一个实施方案中, 纳米标记物是磁性标记的。在另一个实施方案中, 纳米标记物是放射性标记的。在再另一个实施方案中, 用寡核苷酸或小分子标记纳米标记物。

[0081] 在另一个实施方案中, 羧基珠子集可以用于测量目标蛋白质、肽。在此, 任何蛋白质或肽可以共价连接稳定的微珠表面, 接着进行荧光标记和荧光强度测量。Illumina的The VeraCode技术(Illumina Inc., Hayward, CA) 允许在标准96-孔微平板中的单个反应中, 以各种组合进行多达48种免疫测定。

[0082] 在再另一个实施方案中, 可以通过电化学发光ELISA来测量蛋白质、肽和自身抗体。Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, MD) 的多重电化学发光ELISA平台是高通量多重ELISA, 客户可设计的, 具有在同一孔中同时测量多达几种分析物的能力。

[0083] 在另一个实施方案中, 基于功能性蛋白质的测定可以用于检测目标蛋白质、肽或自身抗体的活性、结合、胞内迁移或翻译后加工中的差异。这样的测定包括竞争性结合测定、western印迹免疫印迹测定、脂质体免疫测定等。在一个特定的实施方案中, 并且只是举例, 如Invitrogen's **ProtoArray®**微阵列这样的测定可以用于检测目标的蛋白质-蛋白质相互作用。这个阵列允许剖析生物样品, 如来自怀疑处于PEE风险中的妊娠妇女的血清或尿液, 并且可以用于在生物上鉴别相关蛋白激酶底物、小分子结合伴侣、泛素连接酶底物和抗体的蛋白质相互作用。在一个实施方案中, 光谱成像可以用于检测蛋白质特征中的差异。

[0084] 可以通过结合剂, 使用以上部分中所述的功能性参数来检测PEE蛋白和/或PEE自身抗体。在其他实施方案中, 结合剂可以用于定量PEE蛋白、肽和/或自身抗体。这对于预测PEE发作、预测产生PEE的风险、诊断PEE或确定PEE症状的严重程度是有用的。

[0085] 使用本文中公开的PEE蛋白和/或PEE自身抗体的一个益处是可以以高水平的准确度来进行产生先兆子痫的风险的确定。可以分别通过灵敏度(正确鉴别先兆子痫阳性患者的准确度)和通过特异性(正确鉴别先兆子痫阴性患者的准确度); 阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)来描述准确度。

[0086] 在本文中提供的实施方案中, 针对怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女, 使用PEE蛋白和/或PEE自身抗体或肽/蛋白质和自身抗体两者的组合, 确定产生PEE的风险对于PEE的检测或预测是高度准确的。在本文中提供的实施方案中, 所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%准确度。此外, 在本文中提供的实施方案中, 对于PEE的检测或预测, 所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%准确度。

[0087] 在本文中提供的实施方案中, 对于PEE的检测或预测, 使用PEE蛋白和/或PEE自身抗体或肽/蛋白质和自身抗体组合确定怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女产生PEE的风险

是高度灵敏的。在本文中提供的实施方案中,所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%灵敏度。此外,在本文中提供的实施方案中,对于PEE的检测或预测,所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%灵敏度。

[0088] 此外,在本文中提供的实施方案中,来自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女的蛋白质、肽和/或自身抗体生物标志物的分析对于PEE的检测或预测是高度特异性的。在本文中提供的实施方案中,所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%特异性。此外,在本文中提供的实施方案中,对于PEE的检测或预测,所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%特异性。

[0089] 此外,在本文中提供的实施方案中,来自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女的蛋白质、肽和/或自身抗体生物标志物的分析对于PEE的检测或预测具有阳性预测值 (PPV; 真实阳性/正确诊断的阳性测试结果的比例)。在本文中提供的实施方案中,对于PEE的检测或预测,所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100% PPV。此外,来自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女的蛋白质、肽和/或自身抗体生物标志物的分析对于PEE的检测或预测具有阴性预测值 (NPV; 具有正确诊断的阴性测试结果的受试者的比例)。在本文中提供的实施方案中,对于PEE的检测或预测,所述方法提供至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100% NPV。

[0090] 在本文中提供的实施方案中,来自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女的生物标志物的分析提供曲线下面积 (AUC), 其是PEE检测的可能性的统计学测量,或预测产生PEE的可能性的统计学测量。在本文中提供的实施方案中,对于PEE的检测或对于产生PEE的预测,所述方法提供了至少0.80、至少0.81、至少0.82、至少0.83、至少0.84、至少0.85、至少0.86、至少0.87、至少0.88、至少0.89、至少0.90、至少0.91、至少0.92、至少0.93、至少0.94、至少0.95、至少0.96、至少0.97、至少0.98、至少0.99和1.0的AUC。

[0091] 取自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女或取自健康妊娠妇女的生物样品的分析包括只测试1种蛋白质、肽和/或自身抗体,测试1种或更多种、2种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、11种或更多种、12种或更多种、13种或更多种、14种或更多种、15种或更多种、16种或更多种、17种或更多种、18种或更多种、19种或更多种、20种或更多种、21种或更多种、22种或更多种、23种或更多种、24种或更多种、25种或更多种蛋白质、肽和/或自身抗体的组合,多达最多30、40、50、60、70、80、90或100种本文中公开的PEE蛋白、PEE肽和/或PEE自身抗体。

[0092] 在一个实施方案中,来自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女的生物标志物的分析包括检测至少一种选自表1的蛋白质的升高或降低。在这样的实施方案中,产生PEE的风险可以包括IGLC1、C8G、C2、APOA4、TF、SERPIND1、C1S、THBS1、APCS、CRP、IGFBP3、IGKC V-IV、

ITIH1、CLU、APOC2、PROS1、PAPPA、AFM、VWF、PRG2、APOB、FCN3、C8A、IGHG1、CD14、IGHG3、HPX、IGHG1、IGHG1、CLEC3B、APOE、PSG9、CP、GSN、FN1、FBLN1、KRT86、A2M、APOB、F5、ITIH4、hCG、KRT31、APOL1、HP、MBL2、C4BPB和/或F13B的蛋白质浓度的变化。在另一个实施方案中，来自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女的生物标志物的分析包括至少一种选自表2的蛋白质的变化。在这样的实施方案中，产生PEE的风险可以包括APCS、THBS1、PRG2、ITIH4、GSN、HPX、F5和/或TF的蛋白质浓度的变化。

[0093] 在一个实施方案中，可以使用3种蛋白质，以高水平的准确度（例如，至少约90%、95%、99%或100%），来鉴别处于产生PEE风险中的妊娠妇女。在一个实施方案中，3种蛋白质选自表1。在另一个实施方案中，任意3种蛋白质选自APCS、THBS1、PRG2、ITIH4、GSN、HPX、F5、TF、APOB、A2M、C4BPB、FN1、PAPPA和VWF。在相关的实施方案中，3种蛋白质的组合选自表3中呈现的组合。

[0094] 在另一个实施方案中，分析可以包括测试多达表1中公开的48种PEE蛋白中的任何一种或组合（2种或更多种，或3种或更多种）；或表2中公开的8种蛋白质中的任何一种或组合（2种或更多种，或3种或更多种）。表1的48种PEE蛋白的组合可以提供用于测定健康妊娠产生PEE风险的最小蛋白质组。表3提供了可以用于检测妊娠妇女中产生PEE风险的示例性3种蛋白质组合。在这些实施方案中的任一个中，测试可以任选使用下文中进一步公开的一种或多种PEE自身抗体来进行。

[0095] 在一些实施方案中，对于分离怀疑处于产生PEE风险中的妇女与将经历正常妊娠的妇女，最小的3种蛋白质组（3种蛋白质组合的性质可以不同）可以给出 >0.96 的AUC。在一个实施方案中，3种蛋白质的任意组合可以选自APCS、THBS1、PRG2、ITIH4、GSN、HPX、F5、TF、APOB、A2M、C4BPB、FN1、PAPPA和VWF。例如，3种蛋白质的一种组合可以是GSN、THBS1和PRG2。在其他实施方案中，对于分离怀疑处于产生PEE风险中的妇女与将经历正常妊娠的妇女，最小的2种蛋白质组可以给出 >0.95 的AUC。例如，2种蛋白质的一种组合可以是THBS1和PRG2。

[0096] 在本文中提供的实施方案中，来自怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女的生物标志物的分析包括至少一种选自表4或表5的自身抗体的变化（升高或降低）。表4提供了75种在PEE和健康妊娠之间差异表达的PEE自身抗体。表5提供了10种在PEE和健康妊娠之间差异表达的PEE自身抗体的一个子集。在一个实施方案中，产生PEE的风险包括RNF111、ACY3、GSTZ1、SCAMP1、KIAA1826、OSBPL1A、NDUFB2、JAK3、PI16、SCP2、SULT4A1、LOC283861、DLX1、KRT33B、PRKD2、BNIP1、U1snRNP68、KLHL29、PSPH、MEIS3、C16orf28、JUP、CTN NA3、CUEDC1、EMILIN1、CCDC53、UBE1DC1、JAK2、CD40、CAPZA2、DSN1、LOC284837、IGHA1、DACT3、CLIP3、TEC、PSMA1、SNURF、CSNK2A1、CSNK1D，或其组合的自身抗体的浓度的提高。在另一个实施方案中，产生PEE的风险包括AKT1、GAGE7B、SUGT1L1、SLC5A2、HMGB1、GPBP1L1、APEX1、RPS28、RPS10、RBMX、RPL39L、C18orf22、TSLP、GPR45、PIM1、RBMS3、IGLV2-14、CCL19、FGFR3、ANKHD1、ACP1、BEX5、GLO1、PIK3CG、MGC16075、PRC1、ZNRANB2、HSPA5、CDK5、HOXC8、TNFSF13B、SUPT4H1、ORC6L、FKSG44，或其组合的自身抗体的浓度的降低。在一个示例性实施方案中，产生PEE的风险包括谷胱甘肽转移酶 ζ 1（马来酰乙酰胺乙酸异构酶，GSTZ1）、磺基转移酶家族4A，成员1（SULT4A1）、连接桥粒斑珠蛋白（JUP）、含CUE结构域1（CUEDC1）、假定蛋白LOC284837，及其组合的自身抗体的浓度的提高。在另一个示例性实施方案中，产生PEE的风险包括酪蛋白激酶1、 δ （CSNK1D）、pim-1致癌基因（PIM1）、胞质分裂的蛋白调节子1（PRC1）、锌指、含RAN-结合结

构域2 (ZRANB2)、细胞周期蛋白依赖性激酶5 (CDK5),或其组合的自身抗体的浓度的降低。CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2,是可以检测PEE的3种自身抗体的一个实例,具有93%的准确度,0.93的曲线下面积。CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白是可以检测PEE的3种自身抗体的另一个实例,具有94%的准确度,0.94的曲线下面积。

[0097] 在其他实施方案中,评估怀疑处于产生PEE风险中的妊娠妇女涉及测试至少一种选自表1或2的蛋白质的变化、至少一种选自表4或表5的自身抗体的变化,及其组合,包括蛋白质和自身抗体的组合。

[0098] 本发明的PEE蛋白和/或PEE自身抗体还可以用于为了治疗目的鉴别处于先兆子痫风险中的妊娠妇女的患者亚群。在一些实施方案中,健康该亚群的PEE症状的产生、进展或消退。

[0099] 在一些实施方案中,在PEE症状发作之前或发作时,针对PEE进行治疗该亚群。在一些实施方案中,治疗是婴儿的分娩。在其他实施方案中,治疗可以是给药于妊娠妇女合适的抗高血压药物以降低血压、皮质类甾醇和/或抗惊厥药。在其他实施方案中,治疗是妊娠妇女卧床休息,以降低妊娠母体的血压和/或给胎盘提高血流。可以在全部阶段监控这个患者亚群的主治医生已知的各种生理参数,以确保她们的安全和她们孩子的安全。在一些情况中,进行监控以确定是否应当继续治疗或观察治疗是否是有效的。

[0100] 因此,使用本发明的PEE蛋白和/或PEE自身抗体和本文中所述的方法,本领域技术人员可以确定产生PEE的风险、可以确定PEE的发作、监控PEE的进展、监控PEE的消退、鉴别应当对PEE进行治疗或继续对PEE进行治疗的患者亚群、评价妊娠妇女中PEE治疗的功效和/或鉴别应当监控PEE症状的患者亚群。

[0101] 用于PEE的诊断、检测或预测的试剂盒

[0102] 本发明进一步提供了用于PEE的诊断、检测和预测的测定试剂盒。试剂盒包括用于检测来自妊娠妇女的生物样品中的PEE中涉及的蛋白质、肽或自身抗体或蛋白质、肽和自身抗体组合的试剂。试剂可以包括本发明的结合剂。试剂盒中发现的结合剂和试剂可以是标记的。例如,可以用荧光标记、放射性标记、免疫标记、磁性标记、小分子标记、基于DNA的标记和/或本领域已知的任何标记,来进行标记。试剂盒进一步包括组合物,其包括一个或多个至少含有结合剂的固体表面,所述结合剂能够特异性地结合生物样品中的目标蛋白质、肽或自身抗体生物标志物(或其组合)。试剂盒还包括测定的使用说明。在一个实施方案中,结合剂能够结合肽或蛋白质。在另一个实施方案中,结合剂能够结合自身抗体。在一个特定的实施方案中,试剂盒包括组合物,其包括一个或多个固体表面,所述固体表面包括选自APCS、THBS1、PRG2、ITIH4、GSN、HPX、F5、TF、APOB、A2M、C4BPB、FN1、PAPPA和VWF的PEE蛋白的结合剂。在另一个特定的实施方案中,试剂盒包括组合物,其包括固体表面,所述固体表面包括PEE蛋白THBS1和PRG2的结合剂。在另一个特定的实施方案中,试剂盒包括组合物,其包括固体表面,所述固体表面包括PEE蛋白GSN、THBS1和PRG2的结合剂。在另一个特定的实施方案中,试剂盒包括组合物,其包括固体表面,所述固体表面包括PEE自身抗体CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2的结合剂。在另一个特定的实施方案中,试剂盒包括组合物,其包括固体表面,所述固体表面包括PEE自身抗体CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白的结合剂。

[0103] 用于PEE的诊断、检测或预测的组合物

[0104] 本发明提供了包含一个或多个固体表面的组合物,所述固体表面包括PEE蛋白和

PEE自身抗体特异性的结合剂。在某些实施方案中,固体表面包括至少1种、1种或更多种、2种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、11种或更多种、12种或更多种、13种或更多种、14种或更多种、15种或更多种、16种或更多种、17种或更多种、18种或更多种、19种或更多种、20种或更多种、21种或更多种、22种或更多种、23种或更多种、24种或更多种、25种或更多种蛋白质、肽和/或自身抗体,多达最多30、40、50、60、70、80、90或100种蛋白质、肽和/或自身抗体的结合剂。在一个实施方案中,测量最多48种PEE蛋白和/或肽,用于风险评估。在另一个实施方案中,结合剂能够结合最多48种PEE蛋白和/或肽。在另一个实施方案中,固体表面可以包括能够结合2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种PEE蛋白、肽和抗体组合的任意组合的结合剂。在另一个特定的实施方案中,本发明提供了包含一个或多个固体表面的组合物,所述固体表面包括APCS、THBS1、PRG2、ITIH4、GSN、HPX、F5、TF、APOB、A2M、C4BPB、FN1、PAPPA和VWF的结合剂。在另一个特定的实施方案中,本发明提供了包含固体表面的组合物,所述固体表面包括PEE蛋白THBS1和PRG2的结合剂。在另一个特定的实施方案中,本发明提供了包含固体表面的组合物,所述固体表面包括PEE蛋白GSN、THBS1和PRG2的结合剂。在另一个特定的实施方案中,本发明提供了包含固体表面的组合物,所述固体表面包括PEE自身抗体CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2的结合剂。在另一个特定的实施方案中,本发明提供了包含固体表面的组合物,所述固体表面包括PEE自身抗体CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白的结合剂。

[0105] 在一些实施方案中,固体表面包含标记。在一个实施方案中,标记是免疫标记,例如,包含标记的一种或多种抗体或自身抗体。在另一个实施方案中,标记是磁性标记。在另一个实施方案中,标记是荧光标记。

[0106] 提供以下实施例用于说明的目的。这些实施例旨在显示本发明的某些方面和实施方案,而不是用来以任何方式限制本发明。

实施例

[0107] 实施例1:通过基于质谱的蛋白质组学鉴别血清蛋白生物标志物

[0108] 用ProteoPrep20血浆免疫耗竭试剂盒(Sigma-Aldrich,目录no.PROT20)耗尽来自健康和PEE妊娠的血清样品的20种最大量的血清蛋白。随后使来自每个样品的洗脱液接受胰蛋白酶消化,使用标准的胰蛋白酶消化实验方案。将胰蛋白酶肽在含有0.2%甲酸,2%乙醇和97.8%水的缓冲液中重建,接着进行质谱。所用的高性能液相色谱(HPLC)是Eksigent nano2D(Eksigent),使用自填充150 μ M ID C18,15cm柱。电喷雾来源是在LTQ Orbitrap Velos(Thermo Fisher)上以600nL/min运行的Michrom Advance。以数据依赖性方式进行数据获取,其中选择头12个(Velos)最强带电的肽离子用于电荷态2+和3+的MS/MS分段。随后用Msconvert Script将提取的数据转换成mzXML形式,随后用Sequest算法进行Sorcerer(SAGE-N)分析。使用前体离子的50ppm质量窗口,搜索国际蛋白质指数(IPI)人数据库。考虑了Cys上的丙酰胺的静态修正以及Met氧化和Lys乙酰化的可变修正。将所有搜索汇合并显示于Scaffold(Proteome Software)界面,其列出了鉴别的蛋白质,具有所鉴别的每种蛋白质的累积谱计数。

[0109] 将蛋白质ID与相应的谱计数一起上传至Partek's Genomics Suite(Partek Inc.,St.Louis,MO)并用其进行分析。将数据分位数标准化,接着方差(ANOVA)分析,以鉴别

PEE和健康妊娠之间差异表达的蛋白质。图1和表1。使用具有低于0.05假发现率的p-值,具有高于或低于1.5倍数变化的蛋白质,或具有高于1.5倍数变化的下调蛋白质,可以认为是显著的并用于构建预测模型。利用Partek Genomics Suite在以下分类模型中选择一种有力的模型,用于PEE的预测:K-最近邻、最近质心、区别分析、支持向量机、偏最小二乘法、对角判别分析、随机森林和逻辑回归。使用少如3种蛋白质,多个模型产生了具有0.95-1.0曲线下面积(AUC)的接收者工作特征曲线(ROC)。使用少如2种(例如,THSB1和PRG2)或3种(例如:GSN、THBS1、PRG2)蛋白质,这些模型中的任一种可用于PEE的诊断并且提供0.9或更高的灵敏度,1.0(100%)的特异性,PPV 1.0(100%),NPV 0.92(92%)。表2提供了与健康妊娠妇女相比,PEE妊娠妇女中8种差异表达的蛋白质的一个子集。表3提供了可以用于检测妊娠妇女产生PEE风险的3种蛋白质的示例性组合。

[0110]

表 1: PEE 和健康妊娠之间差异表达的蛋白质

IP1 基因名称	基因名称	其他别名	生物标志物标志物模式分析	PEE		健康 头三个月		健康 末三个月		整体健康		PEE/健康 头三个月		PEE/健康 末三个月		PEE/整体健康		ANOVA 后的 p 值 (B 表示 10 的幂)		
				平均	中值	平均	中值	平均	中值	平均	中值	平均	中值	平均	中值	PEE 与健康 头三个月	PEE 与健康 末三个月	PEE 与健康 头三个月与健康末三个月		
IP100154742	IGLC1	IGLC	1	22.01	17.07	19.44	18.55	55.22	56.14	29.66	20.66	1.13	-1.09	-2.51	-3.29	-1.35	-1.21	1.83E-01	1.13E-03	1.86E-02
IP100011261	CSG	RP11-229P13.14-003, CSK	1	6.07	6.00	6.59	6.71	8.57	9.63	7.16	7.37	-1.09	-1.12	-1.41	-1.61	-1.18	-1.23	3.06E-01	9.92E-02	3.15E-01
IP10030963	C2	DNB-12264.1.C02	1	15.73	15.18	16.98	16.68	21.36	24.94	18.23	16.91	-1.08	-1.10	-1.36	-1.64	-1.16	-1.11	3.72E-01	6.39E-02	2.11E-01
IP100847179	AP04	apo-A1P; apoA-1P; 载脂蛋白 A4	1	21.67	24.58	25.06	27.11	36.52	51.89	28.34	27.11	-1.16	-1.10	-1.69	-2.11	-1.31	-1.10	8.11E-01	9.41E-06	4.34E-05
IP10002463	TF	FR01400, FR01557, FR02086, TR011	1	175.93	150.40	120.15	100.80	422.88	486.54	206.64	150.40	1.46	1.49	-2.40	-3.23	-1.17	1.00	1.25E-02	1.87E-07	2.43E-08
IP10032950	SRP1	DZ2873, H2, HCF2, HCT1, HES2, IS2, TR011	1	20.38	26.66	22.96	22.05	31.39	29.91	25.37	23.34	-1.13	-1.07	-1.54	-1.45	-1.25	-1.13	5.51E-02	1.12E-04	7.35E-03
IP10001696	C1S		1	6.08	5.62	8.09	7.82	26.72	13.55	13.41	8.31	-1.33	-1.39	-4.39	-2.41	-2.21	-1.48	3.72E-01	3.09E-02	1.26E-01
IP100296099	THBS1	THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1	1	1.67	0.84	2.98	2.72	11.80	11.29	5.50	3.91	-1.78	-3.25	-7.06	-13.47	-3.29	-4.66	4.43E-03	2.13E-06	1.63E-03
IP100022391	AFK3	PTX2, SAP	1	1.76	0.00	0.32	0.00	12.72	11.60	3.86	0.49	5.49	#DIV/0!	0.00	-2.20	0.00	0.00	9.52E-01	2.75E-05	1.43E-04
IP100022389	CRP	RP11-419K10.4P1X1	1	1.30	0.60	1.96	1.49	4.23	4.03	2.61	2.72	0.66	0.40	0.31	0.15	0.50	0.22	8.36E-02	2.38E-01	8.01E-01
IP100018305	IGFBP3	IGFBP, IGFBP-3, IGF-3, IGF3	1	1.60	1.31	1.07	0.75	3.22	3.24	1.68	1.00	1.49	1.73	0.50	0.40	0.95	1.31	9.53E-01	8.71E-02	1.21E-01
IP100386133	IGKC		1	1.95	0.72	1.53	1.00	12.39	11.28	4.63	2.49	1.28	-1.38	-6.34	-15.61	-2.37	-3.45	2.51E-01	1.47E-02	9.45E-02
IP100292530	ITIH1	HIP, IATIH, IGHEP1, ITIH-1, ITIH, ITIH, SHIP	1	66.29	63.35	50.43	48.00	74.41	76.00	57.28	51.08	1.31	1.32	-1.12	-1.20	1.16	1.24	6.64E-03	9.68E-03	2.83E-01
IP100291202	CLU	CLU, AUC4, APO1, EUB1; SEP2, APO-1, SEP-2, SP-4G, TR01C; TR01A-2; NA1/NA2	1	22.52	19.03	16.34	16.18	36.83	34.18	22.19	17.23	1.38	1.18	-1.64	-1.80	1.01	1.10	9.56E-02	1.45E-02	1.50E-01
IP100021856	AFK2	AFK, C11, AFK-11	1	4.84	2.83	1.71	1.00	12.07	12.52	4.67	2.49	2.83	-2.49	-4.42	1.04	1.14	8.63E-02	7.70E-02	4.28E-01	
IP100294004	PNOS1	PNOS, PS21, PS22, PS2	1	1.38	0.80	1.43	1.22	5.06	4.98	2.46	1.78	-1.03	-1.52	-3.67	-6.22	-1.79	-2.23	6.76E-02	2.94E-01	9.31E-01

[0111]

IP10001869	PAPPA	3, PS34, PS25, PSA, TH PIS, TIER6	2	15.17	13.91	0.00	0.00	0.00	6.34	4.42	1.81	0.00	n/a*	n/a*	2.39	3.15	8.37	n/a*	4.63E-09	5.60E-02	1.67E-01
IP100019943	AIM	ALB2, ALBA, ALF	2	45.82	43.57	33.19	32.58	37.98	37.06	34.56	33.65	1.38	1.34	1.34	1.21	1.18	1.33	1.29	1.37E-04	1.26E-03	2.59E-01
IP100023014	VWF	F3WF, VWD	2	13.50	12.31	5.36	5.28	6.38	6.92	5.65	5.38	2.52	2.33	2.33	2.11	1.78	2.39	2.29	1.81E-08	4.38E-02	2.57E-01
IP100010341	PRG2	EMF5, MRP, MRP1	2	5.88	6.18	0.00	0.00	1.71	0.69	0.49	0.00	n/a*	n/a*	n/a*	3.43	8.92	12.02	n/a*	4.13E-18	8.51E-02	1.37E-04
IP100894122	APFB	FLR, LDLQ4	2	47.72	51.11	14.38	16.91	27.71	16.82	18.19	16.91	3.32	3.02	3.02	1.72	3.04	2.62	3.02	6.98E-10	3.35E-01	8.40E-05
IP100293925	PCN3	RP11-4C3.A.8, FONE, HAKA1	3	0.84	0.54	3.42	3.66	2.68	3.09	3.21	3.35	-4.08	-6.80	-6.80	-3.20	-5.74	-3.83	-6.23	3.40E-07	7.63E-02	3.10E-01
IP100011252	CSA		3	6.33	6.17	10.31	9.97	10.13	9.88	10.26	9.97	-1.63	-1.62	-1.62	-1.60	-1.60	-1.62	-1.62	1.58E-05	2.28E-03	5.01E-01
IP100645363	IGR1	I6E1, I6E-4, VIT7183- IGR1-2	3	57.04	48.73	118.56	118.79	68.19	58.03	104.17	108.71	-2.08	-2.44	-2.44	-1.20	-1.19	-1.83	-2.23	2.62E-14	1.00E-00	2.68E-05
IP100029260	CD14		3	1.76	1.58	3.31	3.12	2.61	2.82	3.11	3.12	-1.88	-1.98	-1.98	-1.48	-1.79	-1.77	-1.98	1.13E-03	8.94E-01	9.67E-02
IP100418153	IGR3	I6E3	5	46.09	45.75	62.48	62.45	18.95	0.00	50.04	54.25	-1.36	-1.36	-1.36	2.43	n/a*	-1.09	-1.19	2.82E-03	1.05E-02	3.66E-04
IP100022488	HPX	HK	5	107.96	118.79	177.09	202.43	47.60	45.24	140.10	150.40	-1.64	-1.70	-1.70	2.27	2.63	-1.30	-1.27	1.96E-09	5.72E-01	8.34E-03
IP100423463	IGR1	I6E1, I6E-4, VIT7183- IGR1-1	5	42.73	46.33	133.44	129.83	0.00	0.00	95.32	108.71	-3.12	-2.80	-2.80	n/a*	n/a*	-2.23	-2.35	2.62E-14	1.00E-00	2.68E-05
IP100784842	IGR1	I6E1, I6E-4, VIT7183- IGR1-3	5	43.05	42.80	105.74	108.71	0.00	0.00	75.53	94.17	-2.46	-2.54	-2.54	n/a*	n/a*	-1.75	-2.20	2.62E-14	1.00E-00	2.68E-05
IP100792115	CLX3 B	TM, TMA	5	3.54	3.85	7.90	7.82	1.54	0.79	6.08	7.23	-2.23	-2.03	-2.03	2.30	4.85	-1.72	-1.88	1.48E-13	7.40E-01	1.93E-05
IP100021842	APPE	AD2, LDLQ5, LPO	6	25.41	20.35	12.75	12.89	36.27	36.418	19.47	14.95	1.99	1.58	1.58	-1.43	-1.79	1.31	1.36	3.59E-04	2.37E-04	8.75E-02
IP100293461	PS39	PS34, PS3E-11, PS3E- 9, PS3E11, PS3E	6	7.91	7.65	0.00	0.00	12.10	11.75	3.46	0.00	n/a*	n/a*	n/a*	-1.53	-1.54	2.29	n/a*	2.01E-15	4.76E-03	3.80E-10
IP100017601	CP	CP-2	6	66.63	65.60	23.80	20.66	86.84	88.97	41.81	26.32	2.80	3.17	3.17	-1.30	-1.36	1.59	2.49	6.33E-13	4.38E-03	5.21E-09
IP100026314	GSN	RP11-477121.1, ADF, AGE1	7	24.95	23.78	37.68	37.06	35.55	35.89	37.07	37.06	-1.51	-1.56	-1.56	-1.42	-1.51	-1.49	-1.56	2.34E-10	4.56E-01	1.07E-04
IP100022418	PN1	CI6, ED-B, FIMC, FN, FNZ, GPN0, GPN2, LETS, MSF	8	72.41	74.33	57.22	56.05	55.55	53.98	56.74	56.05	1.27	1.33	1.33	1.30	1.38	1.28	1.33	2.89E-03	6.89E-07	8.87E-04
IP100296537	KEK1	C7A-4A1P9, 7, PBLN, PTEL1	8	9.89	10.28	3.83	3.91	10.00	10.18	5.59	4.66	2.59	2.63	2.63	-1.01	1.01	1.77	2.20	2.37E-08	5.49E-01	1.92E-02
IP100126255	KCTR6	IB6, IB1, KCTR1, KCTR6,	9	0.62	0.00	0.03	0.00	5.60	3.09	1.62	0.00	23.31	n/a*	n/a*	-9.08	0.00	-2.62	n/a*	5.75E-01	5.78E-03	6.83E-03

[0112]

IP100478003	A2M	MX, HB6 A2M, CPAMD5, FMP007, S863-7	9	317.37	279.48	279.48	279.48	279.48	166.86	150.40	247.30	279.48	1.14	1.00	1.90	1.86	1.28	1.00	2.74E-01	4.75E-05	1.25E-03
IP100022229	APOB	apoB-100, apoB-100, apoB-48, apolipoprotein B-100, apolipoprote in B48; mutant Apo B 100	9	208.63	176.95	56.18	56.05	56.05	179.25	129.83	91.34	69.57	3.71	3.16	1.16	1.36	2.28	2.54	6.98E-10	3.35E-01	8.40E-05
IP10002937	F5	FV, FVCE, FVCEGL1, THER2	9	1.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.58	0.00	0.34	0.00	4.07	n/a*	1.73	n/a*	2.94	n/a*	4.33E-01	2.98E-05	5.51E-04
IP100218192	ITIH4	PRO1851, CP120, H4P, HRP, IT1-HE4, ITHEL1, PK-120, PK120	9	11.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	3.59E-01	6.78E-05	1.28E-03
IP100736256	KC3	AW108023, KC3	9	0.28	0.00	0.18	0.00	0.00	0.16	0.00	0.17	0.00	1.52	n/a*	1.74	n/a*	1.58	n/a*	6.90E-01	2.24E-03	3.70E-03
IP100032513	KRT31	HA1, Ha-1, KCTHAI, Hha1	9	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	1.40	0.00	0.40	0.00	n/a*	n/a*	-8.66	n/a*	-2.47	n/a*	5.24E-01	2.01E-02	1.88E-02
IP100186903	APOL1	RP1 -6802, 2, APO-1, APO- , APO-1, FSSG4	9	7.48	5.57	3.61	3.91	3.91	7.62	7.15	4.76	4.52	2.07	1.43	-1.02	-1.28	1.57	1.23	6.93E-02	1.14E-07	3.25E-05
IP100641737	IP	IP, IP2ALPHA2, IPALIS	9	50.82	55.15	55.60	59.95	59.95	84.13	90.98	63.75	64.26	-1.09	0.92	-1.66	-1.65	-1.25	-1.17	5.96E-01	2.75E-02	8.28E-02
IP100004373	MBL2	RP11-94E3.1, COLECI , ISMPEC, MBL, MBL2D, MBP, MBP-C, MBP1	9	0.41	0.00	0.60	0.00	0.00	2.48	1.72	1.14	0.00	-1.48	n/a*	-6.10	0.00	-2.80	n/a*	4.81E-01	6.04E-02	1.74E-01
IP100025862	C4BPB	RP11-164023.3, C4BPB	9	0.23	0.00	0.22	0.00	0.00	1.24	0.00	0.51	0.00	1.08	n/a*	-5.32	n/a*	-2.18	n/a*	9.15E-01	7.78E-02	1.28E-01
IP100007240	F13B	FXIIIIB	9	0.26	0.00	0.08	0.00	0.00	1.02	0.00	0.35	0.00	3.28	n/a*	-3.93	n/a*	-1.34	n/a*	8.21E-01	7.70E-01	7.16E-01

*n/a 表示不可获得的值，因为蛋白质在 PB2 或健康妊娠中都不检测

[0113]

表 2: 与健康妊娠妇女相比, PEE 任何妇女中 8 种差异表达的蛋白质的一个集

IPI 基别	基因名称其他别名	生物标志物模式分析	PEE			健康			健康			PEE/健康			PEE/健康			ANOVA 后的 p-值 (E 表示 10 的幂)		
			末三个月			末三个月			末三个月			末三个月			末三个月			末三个月		
			平均	中值	生物标志物模式平均	平均	中值	中值	平均	中值	中值	平均	中值	中值	平均	中值	中值	PEE vs 健康	PEE vs 健康	PEE vs 健康
IP100022463	PRO 1400, PRO1557, P R02886, TF TRQL1	1	175.93	150.40	120.15	100.80	422.88	486.54	206.64	150.40	1.5	-2.4	-3.2	-1.2	1.0	1.25E-02	1.87E-07	2.43E-08		
IP100296099	THBS, THBS-1, TS P, TSP-1, TSP1	1	1.67	0.84	2.98	2.72	11.80	11.29	3.91	-1.8	-3.2	-7.1	-13.5	-4.7	4.45E-03	2.13E-06	1.63E-03			
IP100022391	PTX2, SAP	1	1.76	0.00	0.32	0.00	12.72	11.60	3.86	0.49	#DIV/0!	-7.2	0.0	-2.2	0.0	9.52E-01	2.75E-05	1.43E-04		
IP100010341	BMP6, MBP, MBP1	2	5.88	6.18	0.00	0.00	1.71	0.69	0.49	0.00	n/a*	3.43	8.92	12.02	4.13E-18	8.51E-02	1.37E-04			
IP100022488	HX	5	107.96	118.79	177.09	202.43	47.60	45.24	140.10	150.40	-1.64	-1.70	2.63	-1.30	-1.27	1.96E-09	5.72E-01	8.34E-03		
IP100026314	RP11-477J21.1, ADP, AGE1	7	24.95	23.78	37.68	37.06	35.55	35.89	37.06	-1.51	-1.56	-1.42	-1.51	-1.56	2.34E-10	4.56E-01	1.07E-04			
IP100022937	FY1, PCCE, RPRGL 1, THPR2	9	1.00	0.00	0.25	0.00	0.58	0.00	0.34	0.00	4.1	n/a*	n/a*	2.9	n/a*	4.33E-01	2.98E-05	5.51E-04		
IP100218192	ITIH4 K120	9	11.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	3.59E-01	6.78E-05	1.28E-03		

*n/a 表示不可获得的值, 因为蛋白质在 PEE 或健康妊娠中都不检测

[0114] 表 3: 可以用于妊娠妇女诊断 PEE、检测产生 PEE 的风险或健康 PEE 的进展或消退的 3 种 PEE 蛋白的示例性组合。

[0115]

	蛋白质1	蛋白质2	蛋白质3
组合1	APCS	THBS1	PRG2
组合2	APCS	THBS1	ITIH4
组合3	APCS	THBS1	GSN
组合4	APCS	THBS1	HPX
组合5	APCS	THBS1	F5
组合6	APCS	THBS1	TF
组合7	APCS	PRG2	ITIH4
组合8	APCS	PRG2	GSN
组合9	APCS	PRG2	HPX
组合10	APCS	PRG2	F5
组合11	APCS	PRG2	TF
组合12	APCS	ITIH4	GSN
组合13	APCS	ITIH4	HPX
组合14	APCS	ITIH4	F5
组合15	APCS	ITIH4	TF
组合16	APCS	GSN	HPX
组合17	APCS	GSN	F5
组合18	APCS	GSN	TF
组合19	APCS	HPX	F5
组合20	APCS	HPX	TF
组合21	APCS	F5	TF
组合22	THBS1	PRG2	ITIH4
组合23	THBS1	PRG2	GSN
组合24	THBS1	PRG2	HPX
组合25	THBS1	PRG2	F5
组合26	THBS1	PRG2	TF
组合27	THBS1	ITIH4	GSN
组合28	THBS1	ITIH4	HPX
组合29	THBS1	ITIH4	F5
组合30	THBS1	ITIH4	TF
组合31	THBS1	GSN	HPX

[0116]

组合32	THBS1	GSN	F5
组合33	THBS1	GSN	TF
组合34	THBS1	HPX	F5
组合35	THBS1	HPX	TF
组合36	THBS1	F5	TF

组合37	PRG2	ITIH4	GSN
组合38	PRG2	ITIH4	HPX
组合39	PRG2	ITIH4	F5
组合40	PRG2	ITIH4	TF
组合41	PRG2	GSN	HPX
组合42	PRG2	GSN	F5
组合43	PRG2	GSN	TF
组合44	PRG2	HPX	F5
组合45	PRG2	HPX	TF
组合46	PRG2	F5	TF
组合47	ITIH4	GSN	HPX
组合48	ITIH4	GSN	F5
组合49	ITIH4	GSN	TF
组合50	ITIH4	HPX	F5
组合51	ITIH4	HPX	TF
组合52	ITIH4	F5	TF
组合53	GSN	HPX	F5
组合54	GSN	HPX	TF
组合55	GSN	F5	TF
组合56	HPX	F5	TF

[0117] 实施例2:通过高密度蛋白质微阵列鉴别基于抗体的生物标志物

[0118] 利用**ProtoArray®**人蛋白质微阵列V5(微阵列)(Invitrogen,Carlsbad,CA)来鉴别血清IgG与一组抗原的相互作用。每个微阵列含有9400个分开的双份打印的蛋白质抗原,具有在杆状病毒中表达的N-端GST表位,并且在维持其细胞酶活性/天然构象的天然条件下进行亲和性纯化。每个蛋白质源自Ultimate ORF收集(Invitrogen,Carlsbad,CA)。将微阵列储存在-80℃,在使用前,平衡至4℃,持续20分钟。用5.0mL阻断缓冲液(100mM磷酸钠pH7.4,200mM NaCl,0.08%Triton X-100,25%甘油,20mM还原谷胱甘肽,1.0mM DTT,1%哈默斯坦级酪蛋白)阻断微阵列载玻片,在4℃下在4-孔托盘中温和摇动1hr。阻断步骤后,通过抽吸除去阻断缓冲液,并将PBST缓冲液(1XPBS,1%哈默斯坦级酪蛋白,0.1%Tween 20)中的5.0mL稀释血清(1:150)加入平板中,在4℃下温和振荡孵育90分钟。在下一个步骤中,除去血清样品,并用5.0mL新鲜PBST缓冲液洗涤平板5次,每次洗涤用温和振荡孵育5分钟。加入PBST缓冲液中稀释的5.0mL部分的二抗(抗-人抗体-Alexa**Fluor®**647缀合物),并将平板在4℃下温和振荡孵育90分钟。通过抽吸除去二抗溶液。然后用5.0mL新鲜PBST缓冲液洗涤平板5次,每次洗涤用温和振荡孵育5分钟。最后,通过离心干燥载玻片并使用Axon GenePix 4000B扫描仪(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)扫描。通过使用微阵列分析软件GenePix pro6.0(Molecular devices,Sunnyvale,CA)获取数据。在635nm下用600的PMT增益,100%的激光功率和0μm的焦点,来扫描载玻片。通过提交每个蛋白质微阵列的条形码,从Invitrogen网站(www.invitrogen.com/ProtoArray)上的ProtoArray中心门户获得

“.gal”文件。根据制造商的说明,使用Prospector **Analyzer**® 5.2 (Invitrogen, Carlsbad, CA),从.gpr文件提取数据。

[0119] 将表示健康和PEE妊娠的血清中的每种自身抗体丰度的相对荧光单位上传至Partek's Genomics Suite (Partek Inc., St. Louis, MO)并用其进行分析。将数据分位数标准化,接着方差(ANOVA)分析,以鉴别PEE和健康妊娠之间差异表达的自身抗体。(表4-5,图5-7)。图5是根据75种PEE自身抗体的ANOVA的主成分分析,使用 p 值 <0.05 ,发现在来自健康妊娠妇女和PEE妊娠妇女的血清样品中是差异测量的。从这组自身抗体的不同组合,可以准确地预测PEE。如果将自身抗体的倍数变化设定为 >2 倍的阈值,那么以下10种自身抗体鉴别为区分PEE的一个示例性集:CSNK1D、GSTZ1、CDK5、PIM1、ZRANB2、PRC1、CUEDC1、SULT4A1、LOC283861、连接桥粒斑珠蛋白。通过统计学建模可以选择3种自身抗体的集,以获得PEE的预测率。CSNK1D、CUEDC1和ZRANB2是给出具有0.93AUC的PEE预测率的3种自身抗体的一个示例性集。另一个3种自身抗体集,CSNK1D、SULT4A1和连接桥粒斑珠蛋白,对于PEE,给出了0.94的AUC。

[0120] 使用具有低于0.05假发现率的 p -值,具有高于2倍数变化的自身抗体,可以认为是显著的并用于构建预测模型。利用Partek Genomics Suite在以下分类模型中选择一种有力的模型,用于PEE的预测:K-最近邻、最近质心、区别分析、支持向量机、偏最小二乘法、对角判别分析、随机森林和逻辑回归。使用少如3种自身抗体,多个模型产生了具有0.9或更高AUC的ROC。这些模型中的任一个或多个可以用于PEE的诊断。

[0121]

表 4: PEB 和健康妊娠中差异表达的自身抗体

NO	75 PEB 自身抗体 (fc > .1.5; pFDR0.05)		缩写名称	全称	健康头三个月			健康末三个月			整体健康妊娠		PEB vs. 健康末三个月 p-值 (B是10的 幂)	PEB 平均 SEM	倍率 变化
	登录号	ProtoArray SpotID			Ultimate ORF ID	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均			
1	BC010369.1	B31R13C17 (18)	IOH13610	RNF111	B3 泛素蛋白连接酶 Arkadia	10.39	0.10	10.230.16	10.350.09	11.050.081.65E-04	1.76	上			
2	NM_080658.1	B02R14C07 (8)	IOH3352	ACY3	天冬氨酸脱羧酶(氨基环化酶) 3 谷胱甘肽转氨酶 ζ 1(马来酰基乙酰乙 酰异构酶)	13.58	0.13	12.020.20	13.270.17	12.580.181.04E-01	1.48	上			
3	NM_145870.1	B48R05C07 (8)	IOH4046	GSTZ1	谷胱甘肽转氨酶 ζ 1(马来酰基乙酰乙 酰异构酶)	13.17	0.14	12.500.20	13.030.13	14.190.228.82E-05	3.22	上			
4	NM_052822.1	B32R13C17 (18)	IOH12952	SCAMP1	分泌载体膜蛋白 1	10.16	0.13	9.680.05	10.060.11	10.910.151.95E-04	2.34	上			
5	XM_370653.2	B36R02C13 (14)	IOH26103	K1AA1826	含卷曲-卷曲结构域蛋白 K	10.50	0.11	10.000.23	10.400.11	11.240.162.00E-04	2.36	上			
6	BC041563.1	B32R16C15 (16)	IOH28055	OSBPL1A	鞣固醇结合蛋白样 1A	9.72	0.05	9.970.18	9.770.06	10.460.154.85E-02	1.41	上			
7	NM_004546.1	B47R03C03 (4)	IOH4818	NDUFB2	NADH 脱氢酶(泛醌) 1 β	10.95	0.08	11.300.14	11.020.07	11.610.131.88E-01	1.24	上			
8	PV3855	B43R15C21 (22)	PV3855	JAK3	酪氨酸-蛋白激酶 JAK3	10.07	0.09	10.410.09	10.140.08	10.730.121.70E-01	1.25	上			
9	BC035634.1	B12R17C11 (12)	IOH27582	PI16	肽酶抑制剂 16	10.89	0.11	10.660.20	10.840.09	11.600.152.24E-03	1.92	上			
10	BC005911.1	B44R14C17 (18)	IOH7548	SCP2	固醇载体蛋白 2	8.62	0.12	9.200.31	8.740.12	9.56 0.172.98E-01	1.28	上			
11	BC022459.1	B44R12C09 (10)	IOH11064	SULT4A1	磺基转移酶家族 4A, 成员 1	12.53	0.14	12.480.13	12.520.11	13.600.238.59E-03	2.17	上			
12	NM_175899.2	B32R06C19 (20)	IOH14092	LOC283861	未知(用于 MGC: 16479 的蛋白质)	9.90	0.16	10.400.25	10.000.14	11.280.288.28E-02	1.84	上			
13	BC053351.1	B24R17C07 (8)	IOH28952	DLX1	distal-less homeobox1	9.440.09	0.10	10.220.20	9.600.10	10.340.207.36E-01	1.08	上			
14	NM_002279.3	B01R05C13 (14)	IOH13096	KRT33B	角蛋白 33B	11.45	0.15	10.680.10	11.290.14	10.810.085.97E-01	1.10	上			
15	PV3758	B28R15C15 (16)	PV3758	PRKD2	蛋白激酶 D2, 转录产物 v BC12/腺病毒	10.570.11	0.11	10.630.30	10.580.10	11.550.222.10E-02	1.90	上			
16	BC010959.1	B47R13C09 (10)	IOH13742	BNIP1	E1B 19kDa 相互作用蛋白	10.32	0.07	10.210.14	10.300.06	10.910.157.39E-03	1.62	上			
17	RNP68 Hs~JVG: PM- 2136~ Ext: U1sn	B18R15C13 (14)	NA	U1snRNP68	小核核蛋白复合体 68	9.14	0.06	8.350.07	8.980.08	8.39 0.199.10E-01	1.02	上			
18	BC015667.2	B19R14C19 (20)	IOH14654	KLHL29	kelch-样 29(果蝇)	12.71	0.13	12.290.22	12.630.12	13.400.171.78E-03	2.16	上			
19	NM_004577.3	B32R05C21 (22)	IOH39828	PSPH	磷酸丝氨酸磷酸化酶	13.18	0.14	13.020.27	13.150.12	13.910.157.82E-03	1.85	上			
20	BC025404.1	B08R06C21 (22)	IOH11756	MEIS3	Meis homeobox 3, 转录产物 var	9.94	0.16	9.680.11	9.890.13	10.890.236.30E-03	2.30	上			
21	NM_023076.2	B35R03C17 (18)	IOH2885	C16orf28	环指蛋白 unkempt-样	11.02	0.12	10.760.05	10.970.10	11.580.133.36E-03	1.76	上			
22	NM_002230.1	B08R19C19 (20)	IOH54131	JUP	连接桥粒斑珠蛋白	10.23	0.19	10.440.13	10.270.15	11.370.245.39E-02	1.90	上			
23	BC022004.2	B31R04C15 (16)	IOH11222	CTNNA3	catenin (cadherin-相关蛋白), α 3	10.52	0.11	10.520.13	10.520.09	11.210.162.29E-02	1.62	上			
24	NM_017949.1	B28R09C13 (14)	IOH29099	CUBC1	含 CUE 结构域 1	12.64	0.15	13.680.51	12.850.18	13.740.248.90E-01	1.05	上			
25	BC007530.1	B44R16C17 (18)	IOH6875	EMILIN1	弹性蛋白微纤维界面 1	10.24	0.12	10.510.19	10.300.10	11.000.161.26E-01	1.40	上			

[0122]

26BC010889.1	B31R13C09 (10)	IOH12754	CCDC53	含卷曲-卷曲结构域 33	9.57	0.10	10.130.36	9.69	0.11	10.320.165.44E-01	1.14	上		
27NM_024818.1	B16R06C17 (18)	IOH9860	UBE1DC1	泛素-激活酶 E1-结构域 1	9.85	0.13	10.32	0.27	9.94	0.12	10.730.202.68E-01	1.33	上	
28PV4393	B08R15C19 (20)	PV4393	JAK2	Janus 激酶 2 (蛋白酪氨酸激酶)	10.05	0.16	10.55	0.32	10.15	0.14	10.910.163.27E-01	1.28	上	
29NM_001250.2	B32R14C21 (22)	IOH10427	CD40	CD40 分子, TNF 受体超家族	10.65	0.13	10.48	0.18	10.62	0.11	11.300.141.01E-02	1.76	上	
30NM_006136.1	B24R04C07 (8)	IOH7253	CAPZA2	加帽蛋白 (肌动蛋白结合) 肌肉	11.00	0.11	11.35	0.23	11.07	0.10	11.690.152.44E-01	1.27	上	
31BC058899.1	B20R07C01 (2)	IOH29087	DSN1	DSN1, MIND 着丝粒复合组分	11.69	0.13	11.41	0.19	11.64	0.11	12.430.207.68E-03	2.02	上	
32NM_194310.1	B48R07C09 (10)	IOH35456	LOC284837	限定蛋白 LOC284837	11.98	0.10	11.77	0.12	11.93	0.09	12.570.169.20E-03	1.74	上	
33BC005951.1	B48R04C19 (20)	IOH7490	IGHA1	免疫球蛋白重链恒定区 α 1	10.25	0.15	10.10	0.09	10.22	0.12	10.890.141.38E-02	1.74	上	
34BC034052.1	B36R11C21 (22)	IOH22224	DACT3	Dapper 同系物 3	11.77	0.17	11.86	0.23	11.79	0.14	12.580.175.75E-02	1.65	上	
35BC013116.1	B37R07C17 (18)	IOH28618	CLIP3	含 CAP-Gly 结构域衔接物蛋白	11.74	0.18	12.79	0.13	11.95	0.17	11.060.091.34E-06	-3.32	下	
36PV3269	B25R16C01 (2)	PV3269	TEC	tec 蛋白酪氨酸激酶	9.66	0.19	10.74	0.40	9.87	0.19	8.87	0.092.42E-06	-3.67	下
37NM_148976.1	B17R21C15 (16)	IOH41126	PSMA1	蛋白酶体亚基 α 型-1	10.53	0.16	11.56	0.41	10.74	0.17	9.74	0.133.67E-06	-3.52	下
38NM_005678.3	B05R09C11 (12)	IOH45840	SNURF	SNRPN 上游阅读框	12.61	0.15	13.46	0.39	12.78	0.16	11.860.142.81E-05	-3.04	下	
39PV3248	B05R15C17 (18)	PV3248	CSNK2A1	酪蛋白激酶 2, α 1 多肽	9.33	0.11	9.95	0.48	9.45	0.13	8.68	0.129.29E-05	-2.41	下
40PV3665	B05R16C01 (2)	PV3665	CSNK1D	酪蛋白激酶 1, δ	10.76	0.27	11.40	0.24	10.89	0.22	9.58	0.111.71E-04	-3.53	下
41NM_005163.1	B25R16C05 (6)	PV3685	AKT1	RAC-β 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶	8.59	0.18	9.11	0.18	8.69	0.15	7.83	0.102.65E-04	-2.43	下
42NM_021123.1	B05R13C01 (2)	IOH27363	GAGE7B	G 抗原 7	10.12	0.18	10.60	0.46	10.21	0.17	9.32	0.107.00E-04	-2.43	下
43BC020814.1	B06R12C01 (2)	IOH12692	SUGT1L1	SQT1, SKP1 的 G2 等位基因的抑制剂	11.57	0.14	11.94	0.36	11.65	0.13	10.920.108.78E-04	-2.03	下	
44NM_003041.1	B05R21C13 (14)	IOH38149	SLC5A2	钠/葡萄糖协同转运蛋白 2	9.55	0.11	9.79	0.14	9.60	0.09	8.99	0.101.03E-03	-1.74	下
45NM_002128.2	B10R15C03 (4)	IOH2937	HMGBl	高迁移率蛋白盒 1	11.63	0.11	11.94	0.20	11.69	0.10	10.980.151.61E-03	-1.95	下	
46NM_021639.2	B29R14C03 (4)	IOH10045	GPBP1L1	富含 GC 的启动子结合蛋白 1-样	12.44	0.14	12.79	0.63	12.51	0.16	11.580.131.79E-03	-2.31	下	
47BC008145.1	B13R14C21 (22)	IOH3304	APEX1	APEX 核酶 (多功能 DNA 修复酶)	10.99	0.11	11.00	0.05	10.99	0.09	10.370.095.93E-03	-1.55	下	
48NM_001031.4	B10R18C03 (4)	IOH58930	RPS28	40S 核糖体蛋白 S28	12.63	0.12	12.73	0.17	12.65	0.10	11.900.169.25E-03	-1.78	下	
49NM_001014.2	B01R16C19 (20)	IOH4063	RPS10	核糖体蛋白 S10	11.94	0.11	12.12	0.10	11.97	0.09	11.390.149.59E-03	-1.67	下	
50BC006550.1	B13R16C13 (14)	IOH6089	RBMX	RNA 结合基序蛋白, X-连接的	10.33	0.15	10.44	0.14	10.35	0.12	9.77	0.081.16E-02	-1.60	下
51NM_052969.1	B10R08C07 (8)	IOH12514	RPL39L	核糖体蛋白 L39-样	13.06	0.10	13.22	0.13	13.09	0.09	12.480.161.17E-02	-1.68	下	
52BC057772.1	B05R19C11 (12)	IOH29154	C18orf22	染色体 18 开放阅读框 22	10.22	0.15	10.30	0.09	10.24	0.12	9.58	0.101.24E-02	-1.64	下
53NM_138551.1	B05R05C05 (6)	IOH13700	TSLP	胸腺基质淋巴细胞生成素	11.740.10	11.880.02	11.770.08	11.180.151.27E-02				-1.63	下	
54NM_007227.3	B06R19C05 (6)	IOH40151	GPR45	G 蛋白-耦受体 45	8.97	0.16	8.950.10	8.970.13	8.230.091.37E-02			-1.65	下	
55PV3503	B01R16C01 (2)	PV3503	PIMI	pim-1 致癌基因	8.89	0.20	8.580.21	8.830.16	7.460.211.59E-02			-2.17	下	
56BC030290.1	B13R14C11 (12)	IOH21571	RBM53	RNA-结合基序, 单链相互作用蛋白 3	11.12	0.15	11.130.12	11.120.13	10.460.112.64E-02			-1.59	下	
57BC018749.1	B02R20C09 (10)	IOH14788	IGLV2-14	免疫球蛋白 λ 可变 2-14	10.63	0.12	10.650.06	10.630.09	10.050.132.65E-02			-1.52	下	
58PHC1244	B26R16C05 (6)	PHC1244	CCL19	趋化因子 (C-C 基序) 配体 19	12.16	0.17	12.120.19	12.150.14	11.360.143.26E-02			-1.69	下	
59PV3145	B09R15C15 (16)	PV3145	FGFR3	成纤维细胞生长因子受体 3	8.87	0.10	8.650.21	8.830.09	8.030.153.66E-02			-1.53	下	
60NM_024668.1	B15R12C09 (10)	IOH5012	ANKHD1	含锚蛋白重复和 KH 结构域	10.69	0.12	10.380.26	10.620.11	9.810.134.60E-02			-1.48	下	
61NM_007099.1	B48R03C09 (10)	IOH6098	ACP1	酸性磷酸酶 1, 可溶	12.08	0.13	13.410.33	12.350.16	12.880.161.12E-01			-1.45	下	

[0123]

NM_00101297	B19R21C19 (20)	IOH42168	BEX5	蛋白 BEX5	9.44	0.18	10.710.29	9.690.19	10.240.12	1.77E-01	-1.39	F
62B.1	B08R21C07 (8)	IOH10090	GL01	乳酰谷胱甘肽裂解酶	11.00	0.14	12.000.13	11.200.14	11.660.11	2.14E-01	-1.27	F
63NM_006708.1	B11R16C03 (4)	PV4786	PIK3CG	ID 类磷脂酰肌醇 3-激酶	8.83	0.18	8.270.13	8.710.15	7.890.11	2.47E-01	-1.30	F
64PV4786	B20R19C19 (20)	IOH57016	MGC16075	假定蛋白 MGC16075, mRNA	10.67	0.16	11.890.35	10.920.17	11.520.16	2.97E-01	-1.29	F
65NM_498434.1	B45R09C17 (18)	IOH5138	PRC1	胞质分裂的蛋白调节子 1	15.21	0.22	14.440.15	15.060.19	14.070.16	3.60E-01	-1.30	F
66NM_003981.2	B17R05C21 (22)	IOH36832	ZRANB2	伴指, 含 RAN-结合结构域 2	12.45	0.19	11.780.27	12.310.17	11.450.15	3.90E-01	-1.26	F
67NM_203350.1	B09R18C09 (10)	IOH26283	ZRANB2	伴指, 含 RAN-结合结构域 2	11.93	0.21	11.080.35	11.760.19	10.730.23	4.69E-01	-1.28	F
68BC039814.1	B18R14C07 (8)	IOH14762	HSPA5	热休克 70kDa 蛋白 5 (葡萄糖-reg	10.81	0.13	10.330.07	10.710.11	10.190.08	5.34E-01	-1.10	F
69NM_005347.2	B39R16C05 (6)	PV4676	CDK5	细胞周期蛋白-依赖性激酶 5	8.66	0.20	10.850.42	9.100.25	10.530.35	6.08E-01	-1.25	F
70PV4676	B01R19C17 (18)	IOH29029	H0XC8	homeobox C8	10.35	0.08	9.820.12	10.240.08	9.710.12	6.28E-01	-1.08	F
71BC053898.1	B05R03C13 (14)	IOH12947	TNFSF13B	肿瘤坏死因子 (配体) 超家族	13.67	0.11	13.140.15	13.560.10	13.040.14	7.00E-01	-1.07	F
72NM_006573.2	B23R03C05 (6)	IOH5411	SUPT4H1	Ty 4 同系物 1 的抑制剂	14.05	0.18	13.260.25	13.890.16	13.210.14	9.00E-01	-1.03	F
73NM_003168.1	B22R05C13 (14)	IOH39827	ORC6L	起点识别复合物, 亚基 61	12.31	0.19	11.480.08	12.150.17	11.450.12	9.21E-01	-1.02	F
74NM_014321.2	B17R09C11 (12)	IOH26532	FKSG44	含 PERM 结构域 8	13.67	0.11	13.030.27	13.540.11	13.010.14	9.43E-01	-1.01	F
75BC051695.1												

[0124]

表 5: PEE 和健康妊娠中 10 种差异表达的自身抗体的一个集

登录号	10 种差异表达的自身抗体 (fc>, <1.5; pFDR0.05)										健康头三个月		健康末三个月		整体健康妊娠		PEE		PEE vs. 健康末三个月	
	ProtoArray Spot ID	Ultimate ORF ID	缩写名称	全称	平均 (log2)	SEM	平均 (log2)	SEM	平均 (log2)	SEM	平均 (log2)	SEM	平均 (log2)	SEM	平均 (log2)	SEM	p-值 (是 10 的幂)	倍数变化 (log2)	上/下	
NM_145870.1	B48R05C07 (8)	IOH4046	GSTZ1	谷胱甘肽转转移酶 1 (马来酰基乙酰乙酸异构酶)	13.17	0.14	12.50	0.20	13.03	0.13	14.19	0.22	8.82E-05	3.22	上					
BC022459.1	B44R12C09 (10)	IOH11064	SULT4A1	磺基转转移酶 4A, 成员 1	12.53	0.14	12.48	0.13	12.52	0.11	13.60	0.23	8.59E-03	2.17	上					
NM_002230.1	B08R19C19 (20)	IOH54131	JUP	连接桥粒斑珠蛋白	10.23	0.19	10.44	0.13	10.27	0.15	11.37	0.24	5.39E-02	1.90	上					
NM_017949.1	B28R09C13 (14)	IOH29099	CUEDC1	含 CUE 结构域 1	12.64	0.15	13.68	0.51	12.85	0.18	13.74	0.24	8.90E-01	1.05	上					
NM_194310.1	B48R07C09 (10)	IOH35456	LOC284837	假定蛋白 LOC284837	11.98	0.10	11.77	0.12	11.93	0.09	12.57	0.16	9.20E-03	1.74	上					
PV3665	B05R16C01 (2)	PV3665	CSNK1D	酪蛋白激酶 1, δ	10.76	0.27	11.40	0.24	10.89	0.22	9.58	0.11	1.71E-04	-3.53	下					
PV3503	B01R16C01 (2)	PV3503	PIMI	pim-1 致癌基因	8.89	0.20	8.58	0.21	8.83	0.16	7.46	0.21	1.59E-02	-2.17	下					
NM_003981.2	B45R09C17 (18)	IOH5138	PRC1	胞质分裂的蛋白调节子 1	15.21	0.22	14.44	0.15	15.06	0.19	14.07	0.16	3.60E-01	-1.30	下					
BC039814.1	B09R18C09 (10)	IOH26283	ZRANB2	锌指, 含 RAN-结合结构域 2	11.93	0.21	11.08	0.35	11.76	0.19	10.73	0.23	4.69E-01	-1.28	下					
PV4676	B39R16C05 (6)	PV4676	CDK5	细胞周期蛋白依赖性激酶 5	8.66	0.20	10.85	0.42	9.10	0.25	10.53	0.35	6.08E-01	-1.25	下					

[0125] 实施例3:来自妊娠妇女的样品中PEE的预测

[0126] 在妊娠13周或之后,从呈现高血压并因此怀疑患有或正在产生PEE的妊娠妇女获

取50毫升血样。将血液凝固,以产生血清。用ProteoPrep20血浆免疫耗竭试剂盒(Sigma-Aldrich,目录no.PROT20)耗尽血清样品的20种最大量的血清蛋白。

[0127] 然后使用标准实验方案,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)鉴别和定量血清蛋白。在一个实施方案中,以下蛋白质特异性的抗体可以用于ELISA测定中:APCS、THBS1、PRG2、ITIH4、GSN、HPX、F5和TF。

[0128] 在另一个可替换的测定中,使用广谱成像仪来鉴别和定量血清蛋白。

[0129] 在再另一个测定中,使用MagArray蛋白质芯片来鉴别和定量血清蛋白。对于MagArray蛋白质芯片,将血清施加于芯片上,其中表面上的探针特异性地结合样品中的血清蛋白。其次,目标蛋白特异性的纳米标记物-标记的抗体结合探针所结合的血清蛋白,形成三明治样结构。第三,将外部磁场施加于芯片,通过电测量由纳米标记物产生的杂散磁场,以确定每种目标蛋白质的存在和含量。在一个实施方案中,以下靶标蛋白特异性的抗体可以用于MagArray测定中:APCS、THBS1、PRG2、ITIH4、GSN、HPX、F5和TF。在一个测定形式中,从之前的列表选择3个靶标,用于检测和定量,并用于该测定中,以形成三明治样结构。将3种蛋白质的结合数据定量。测定蛋白质的浓度,并与参照样品的浓度值进行比较,所述参照样品的浓度值取自大致相同孕龄的健康妊娠妇女的血清。

[0130] 在再另一个测定中,可以将羧基珠子集用于测量目标蛋白质、肽和自身抗体。在这个测定中,任何蛋白质或肽可以共价连接高度温度的微珠表面,接着进行荧光标记和荧光强度测量。Illumina的The VeraCode技术(Illumina Inc., Hayward, CA)允许在标准96-孔微平板中的单个反应中,以各种组合进行多达48个免疫测定。

[0131] 在再另一个可替换的方案中,可以通过电化学发光ELISA来测量蛋白质、肽和自身抗体。Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, MD)的灵敏多重电化学发光ELISA平台是高通量多重ELISA,客户可设计使用,具有在同一孔中同时测量多达10种分析物的能力。

[0132] 与取自健康妊娠妇女的血清样品中的那些蛋白质的水平相比,取自怀疑患有PEE的妇女的血清样品中3种蛋白质的任何浓度变化(上调或下调)表示PEE的诊断。然后将该结果传送给妊娠妇女的医生,并可以采取合适的治疗手段,以保护妊娠母体和生长中的胎儿。

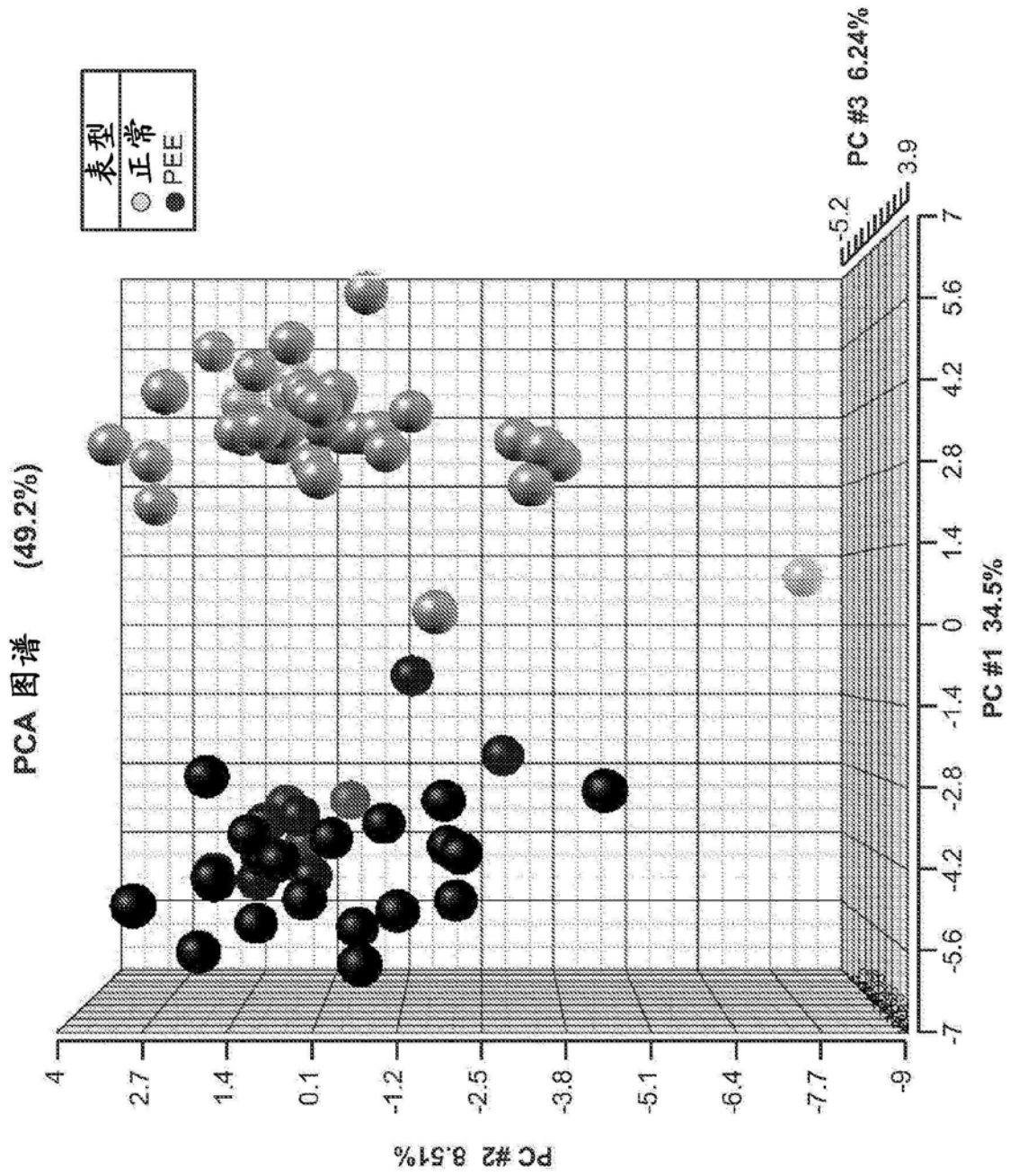


图1

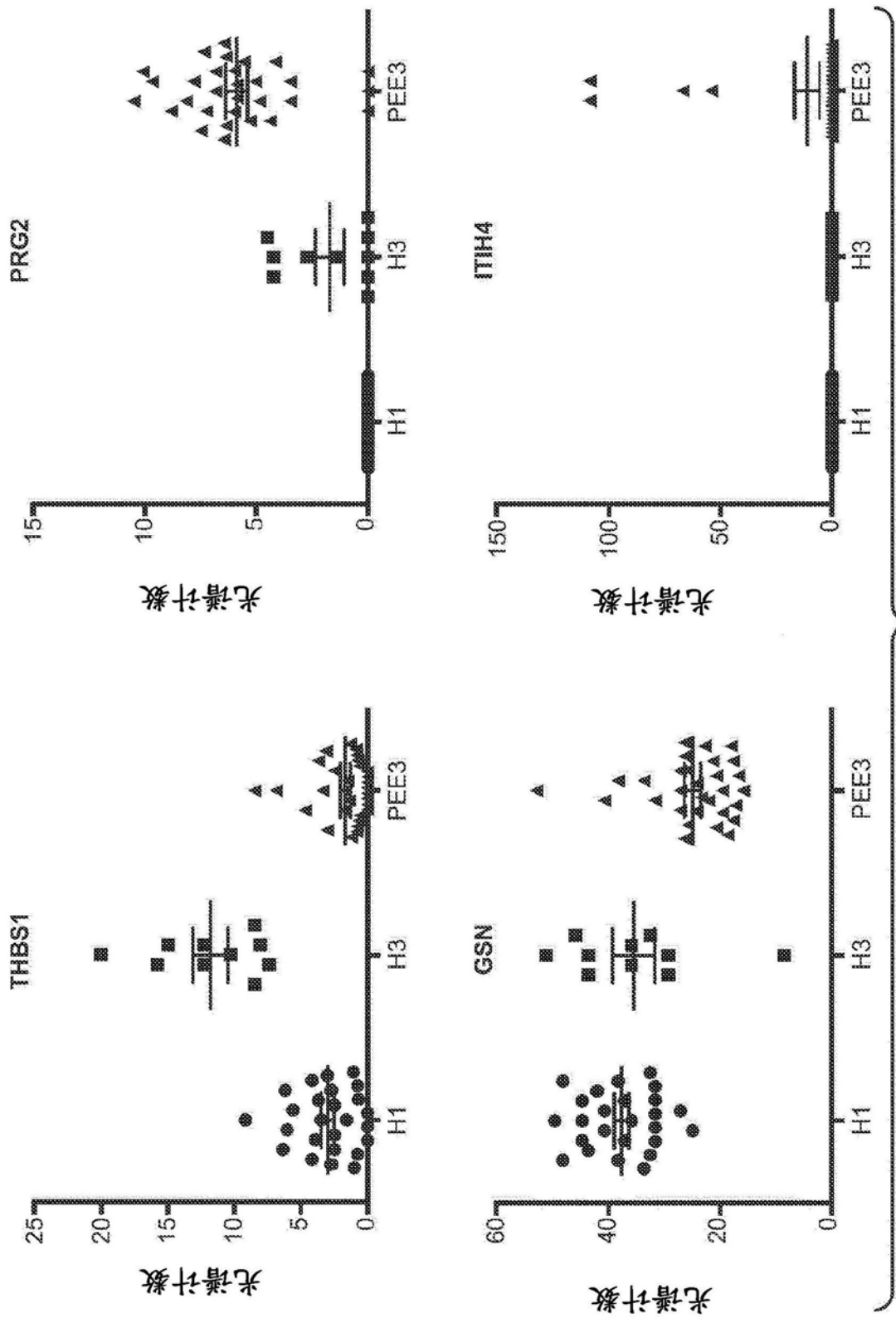


图2

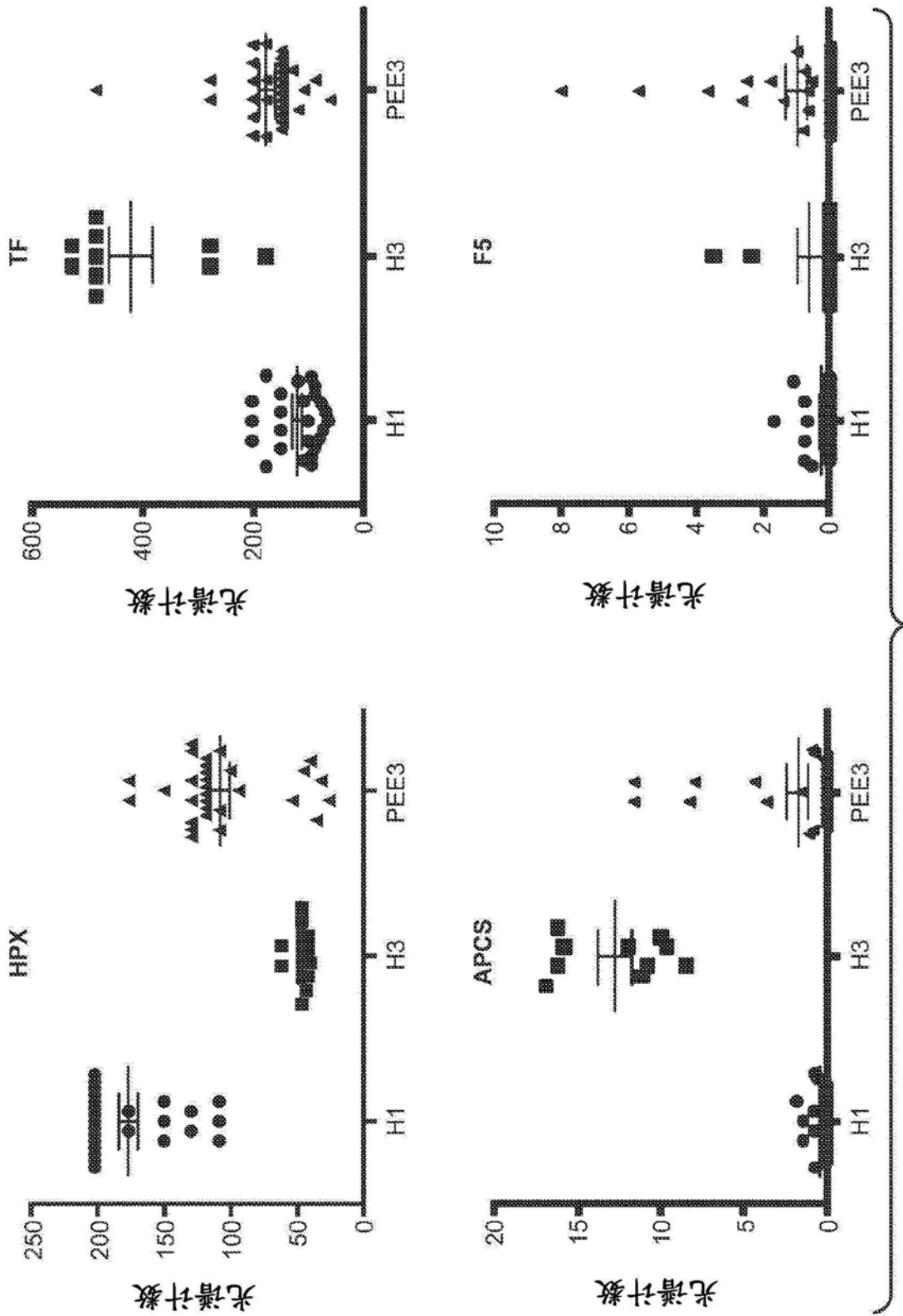


图2续

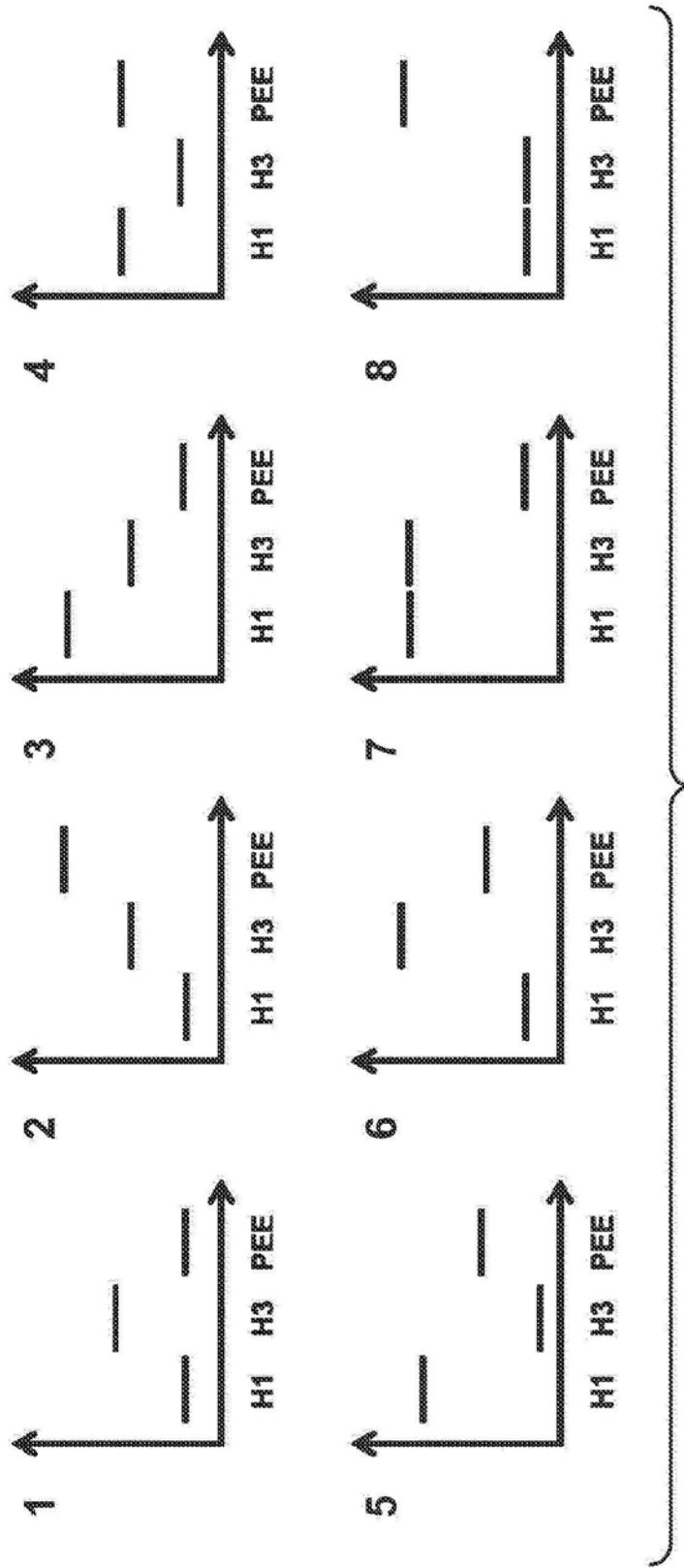


图3

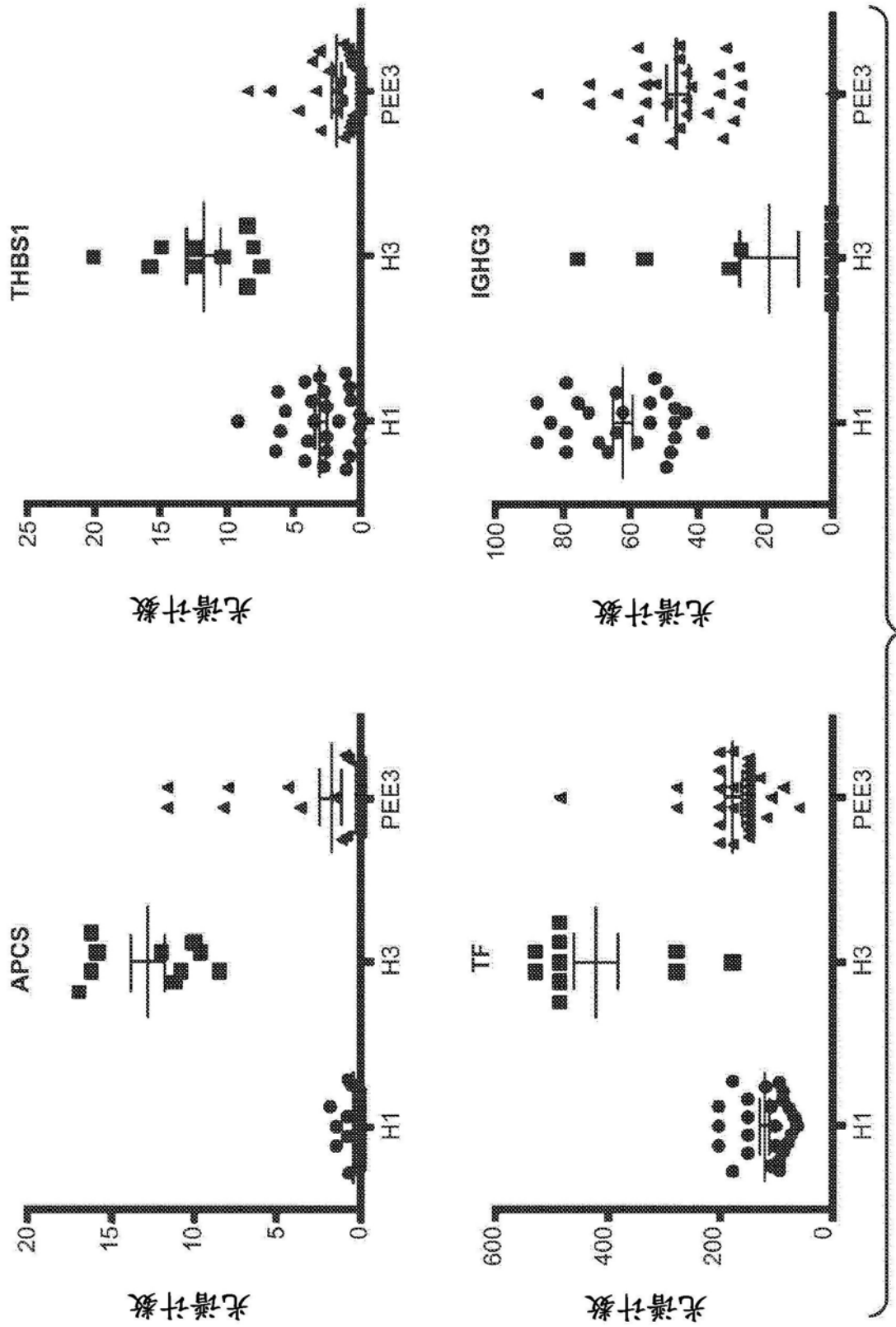


图4

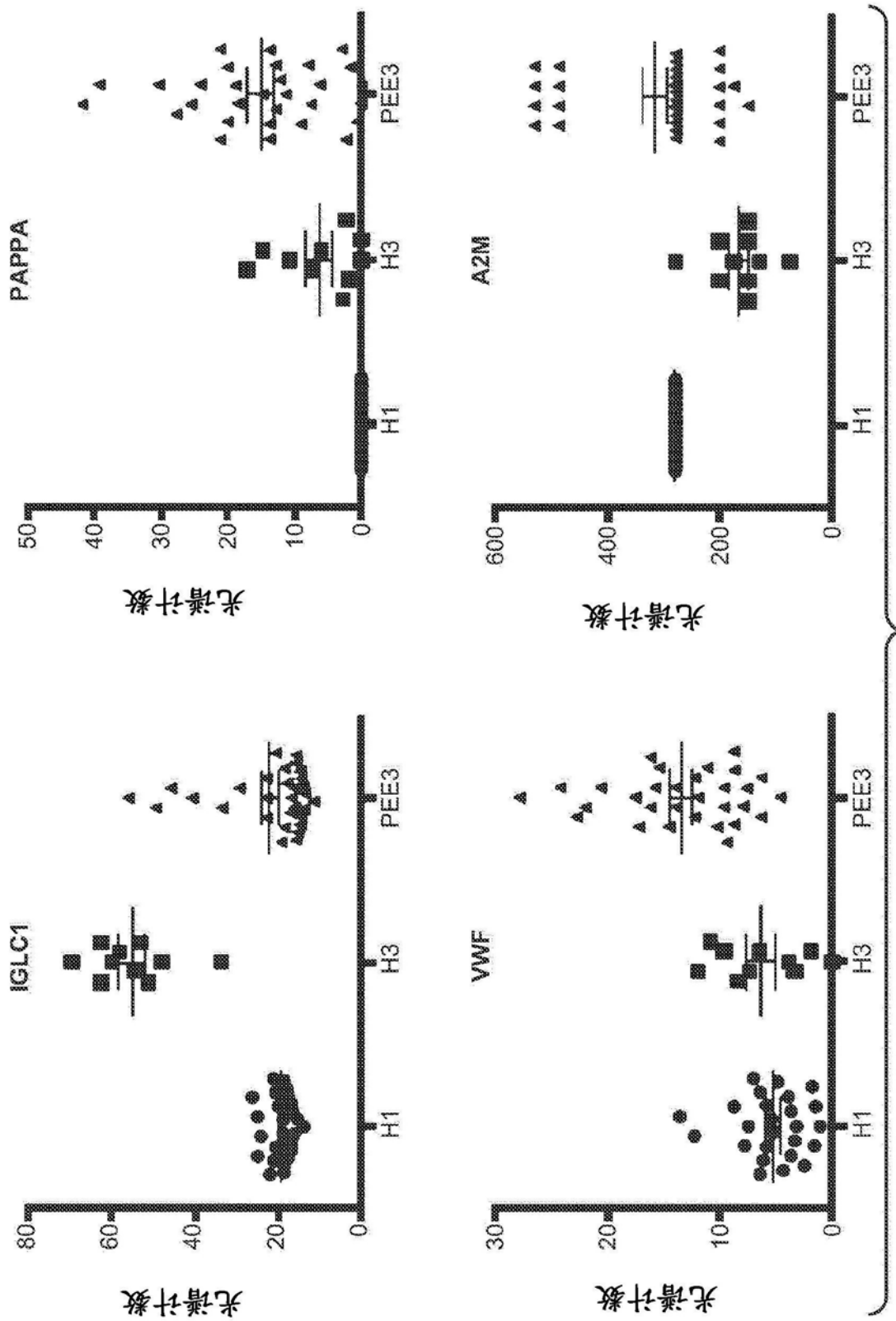


图4续

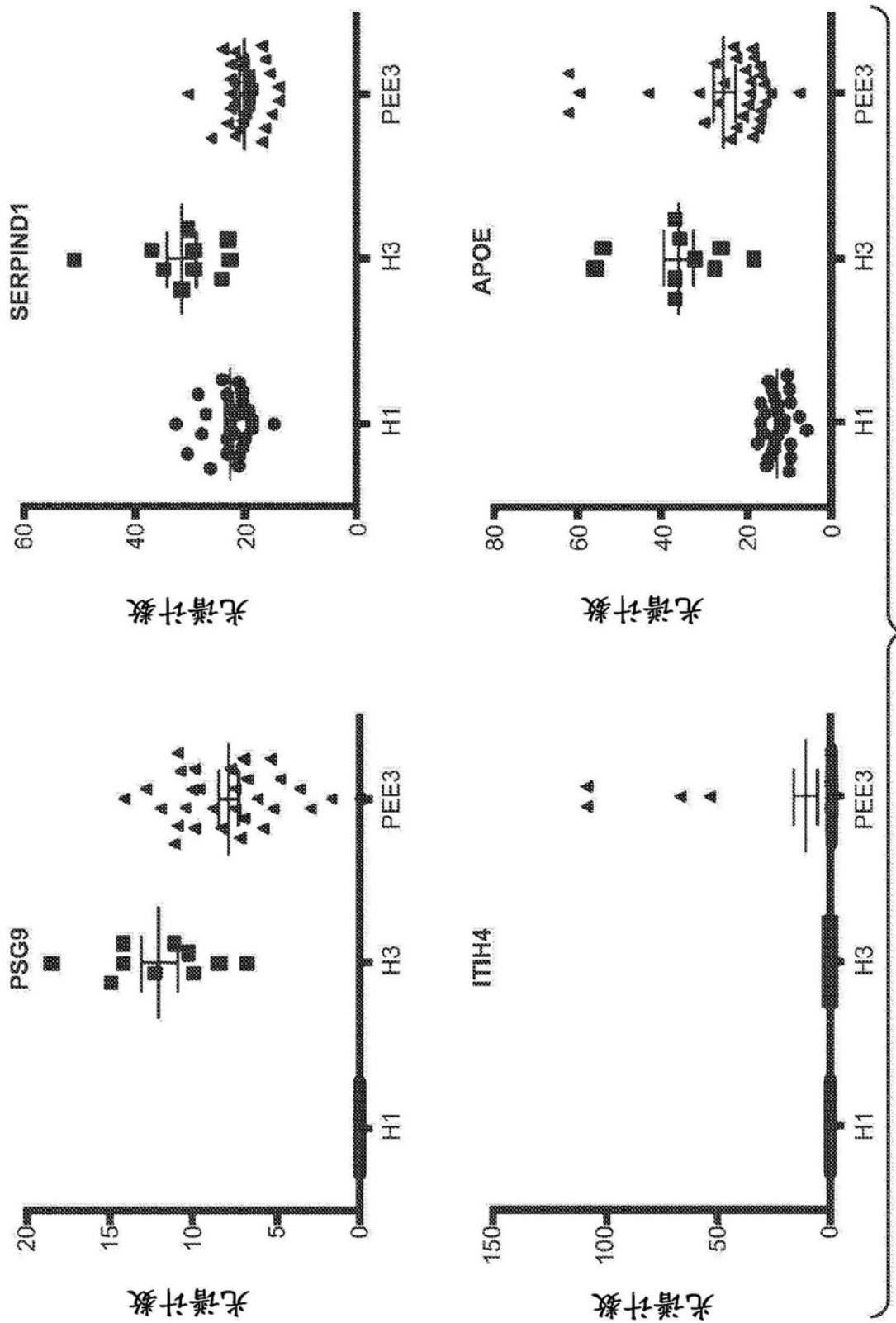


图4续

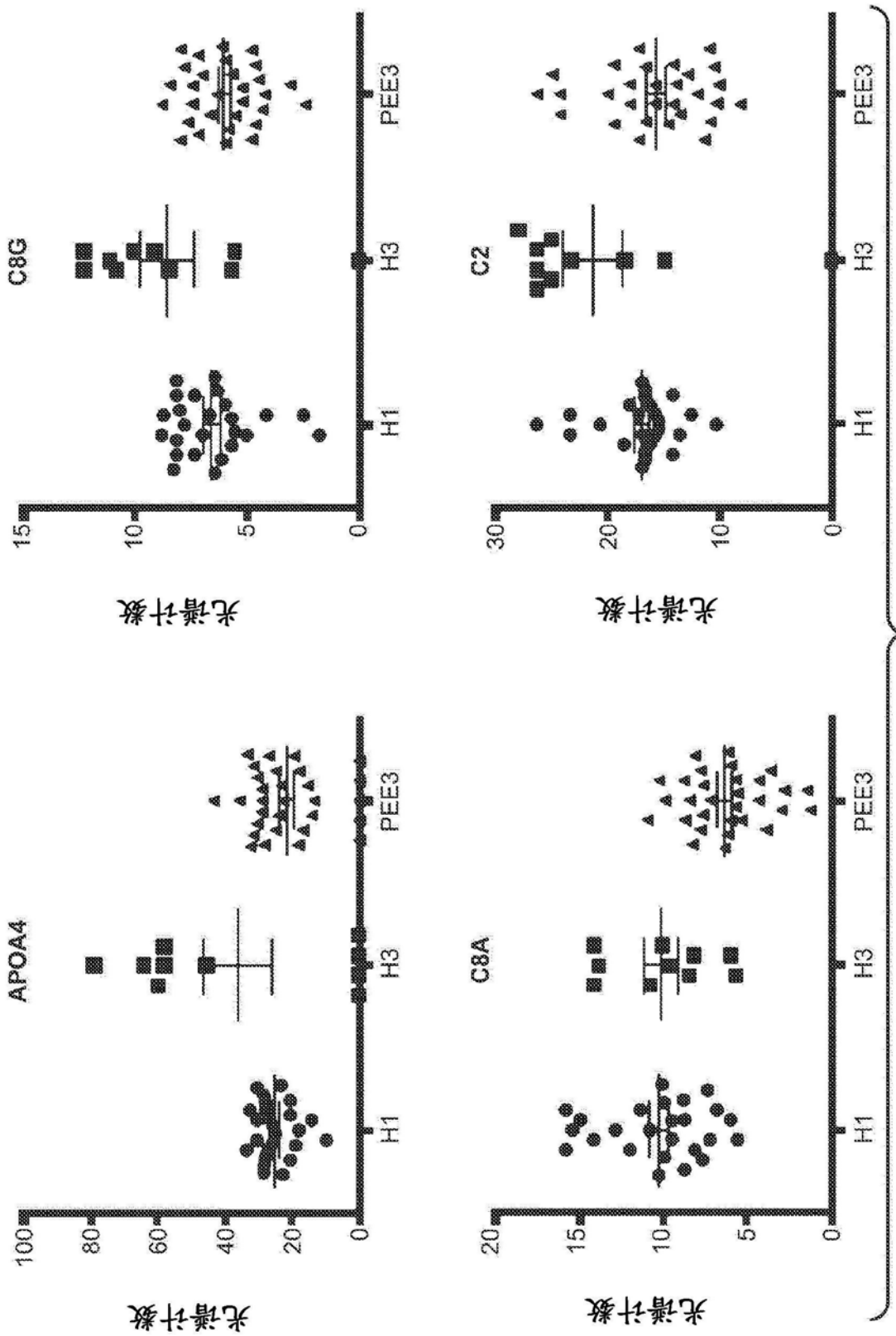


图4续

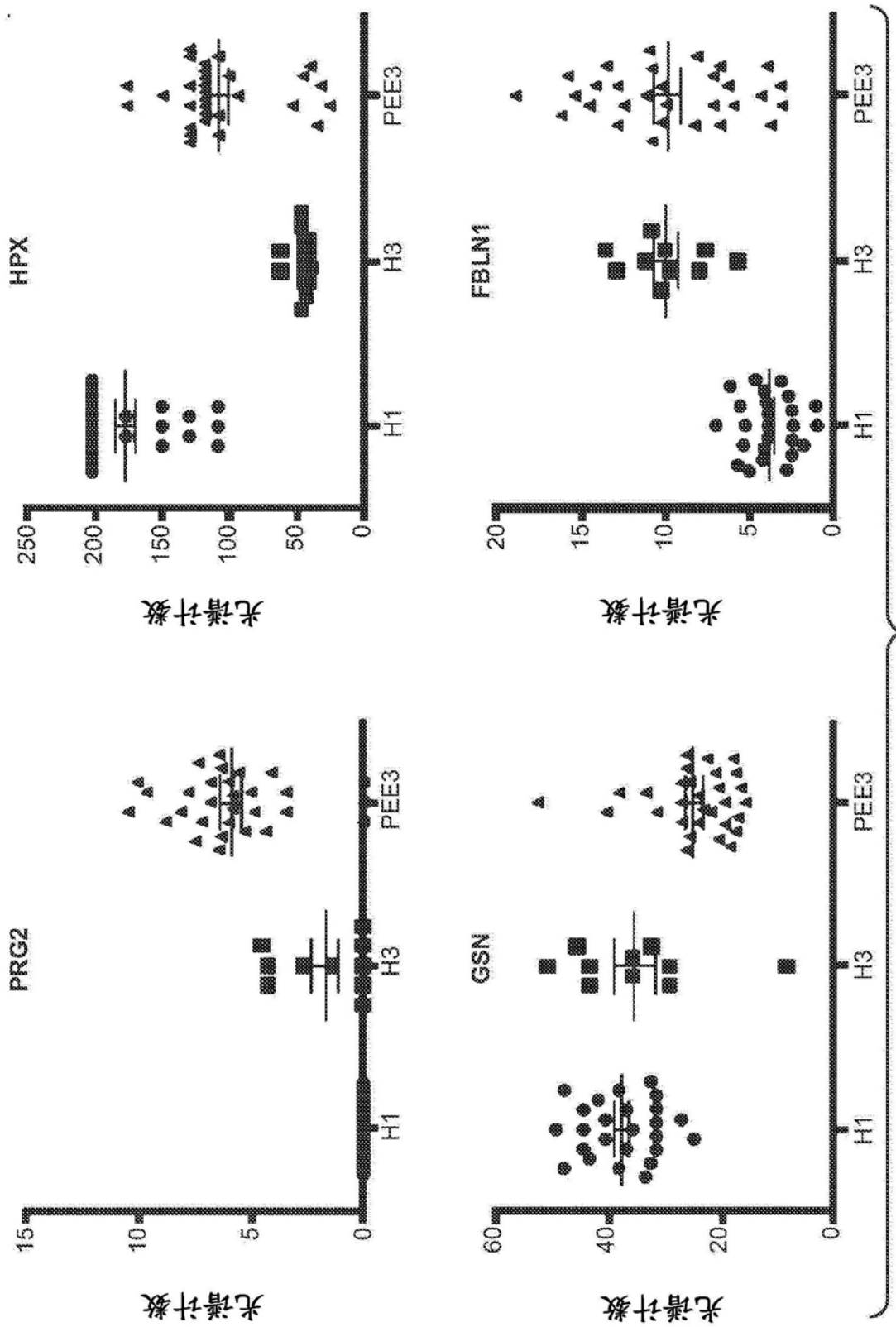


图4续

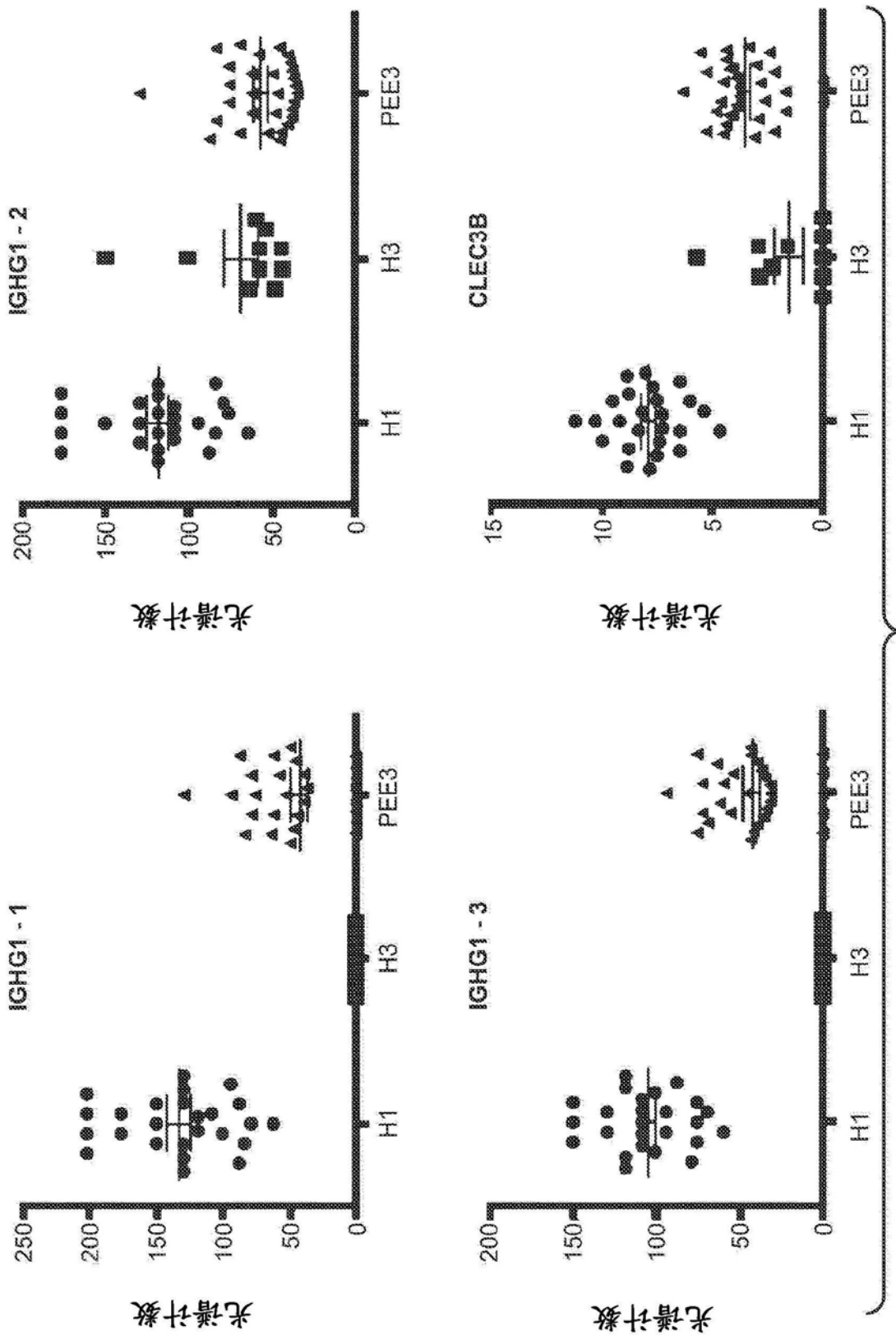


图4续

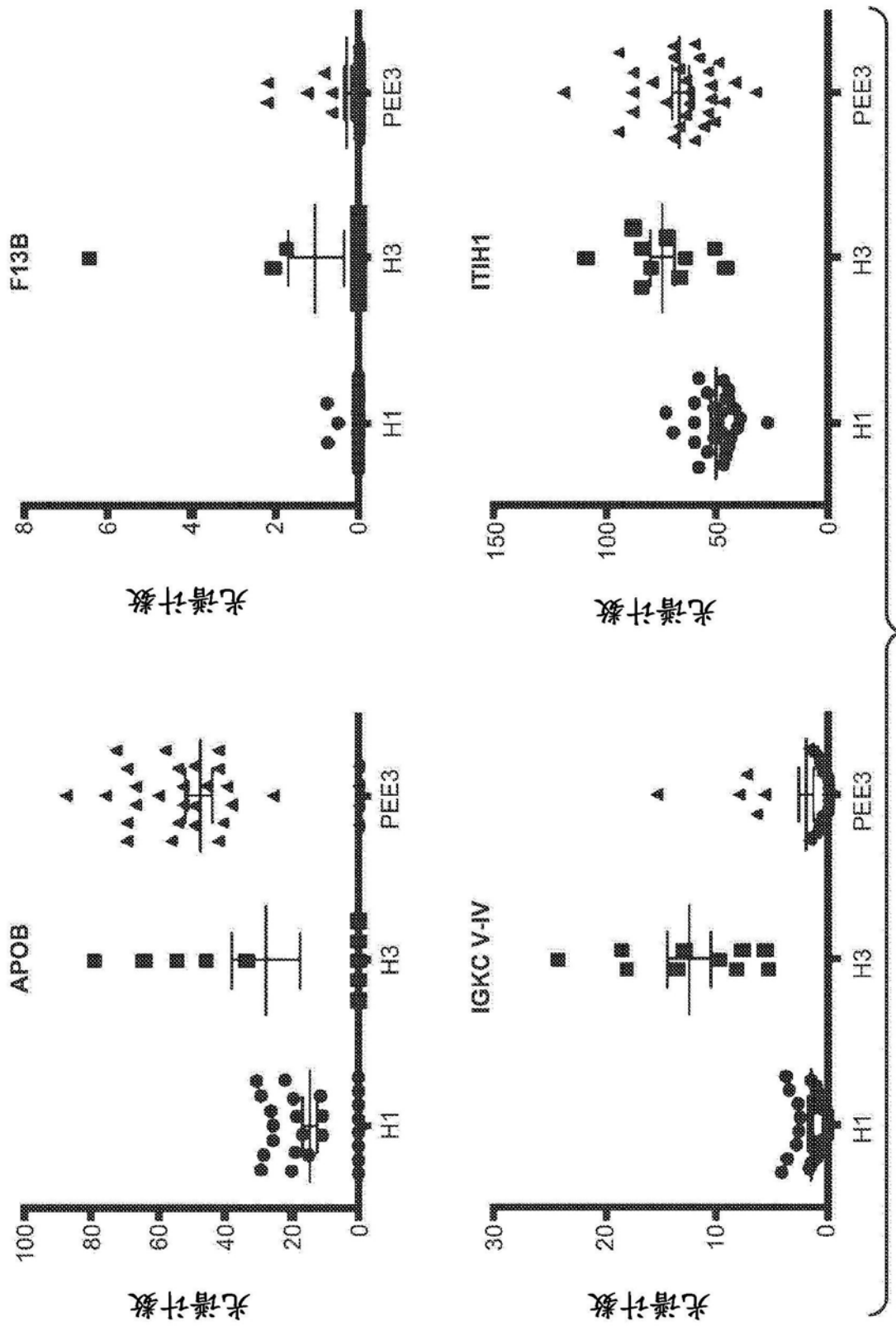


图4续

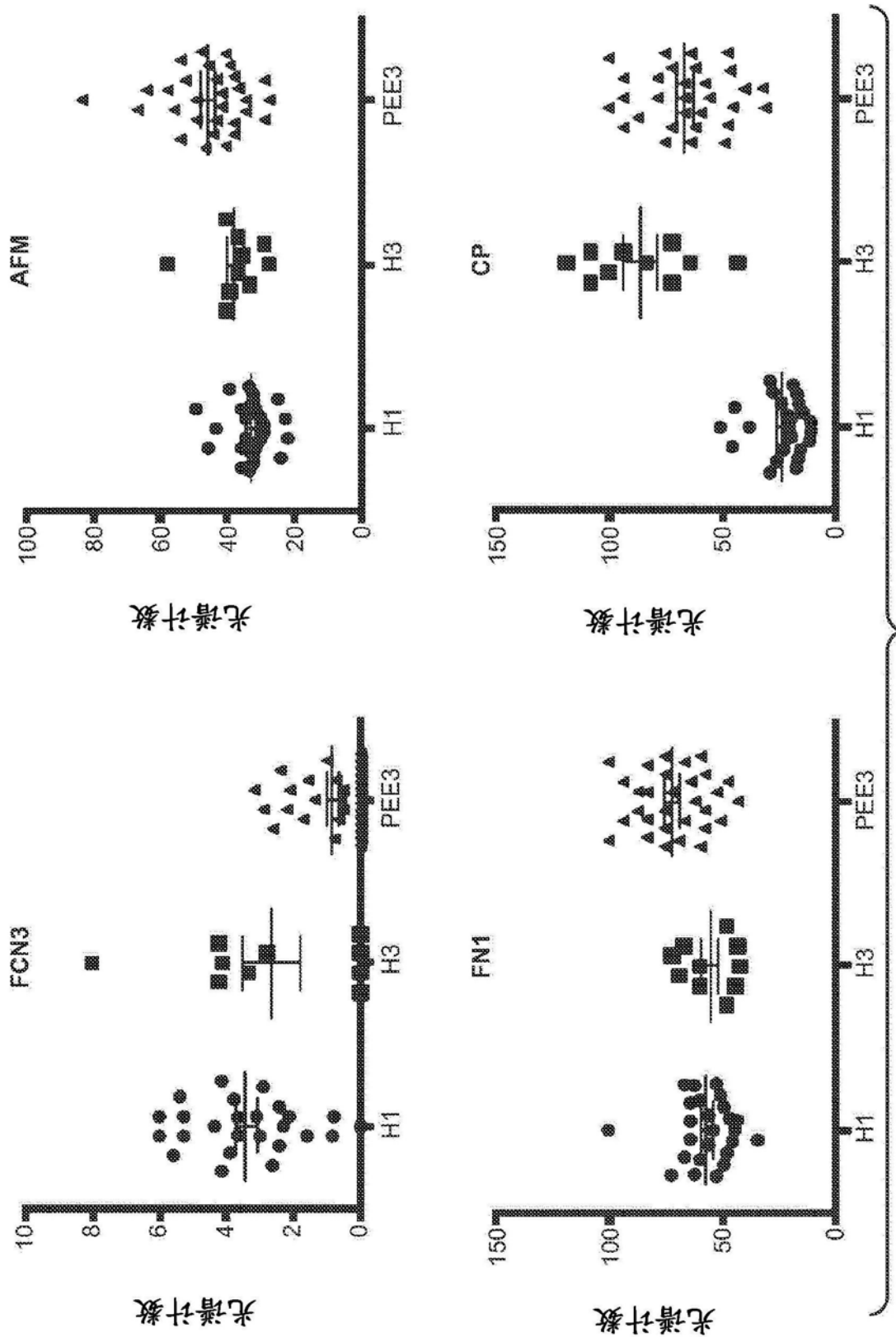


图4续

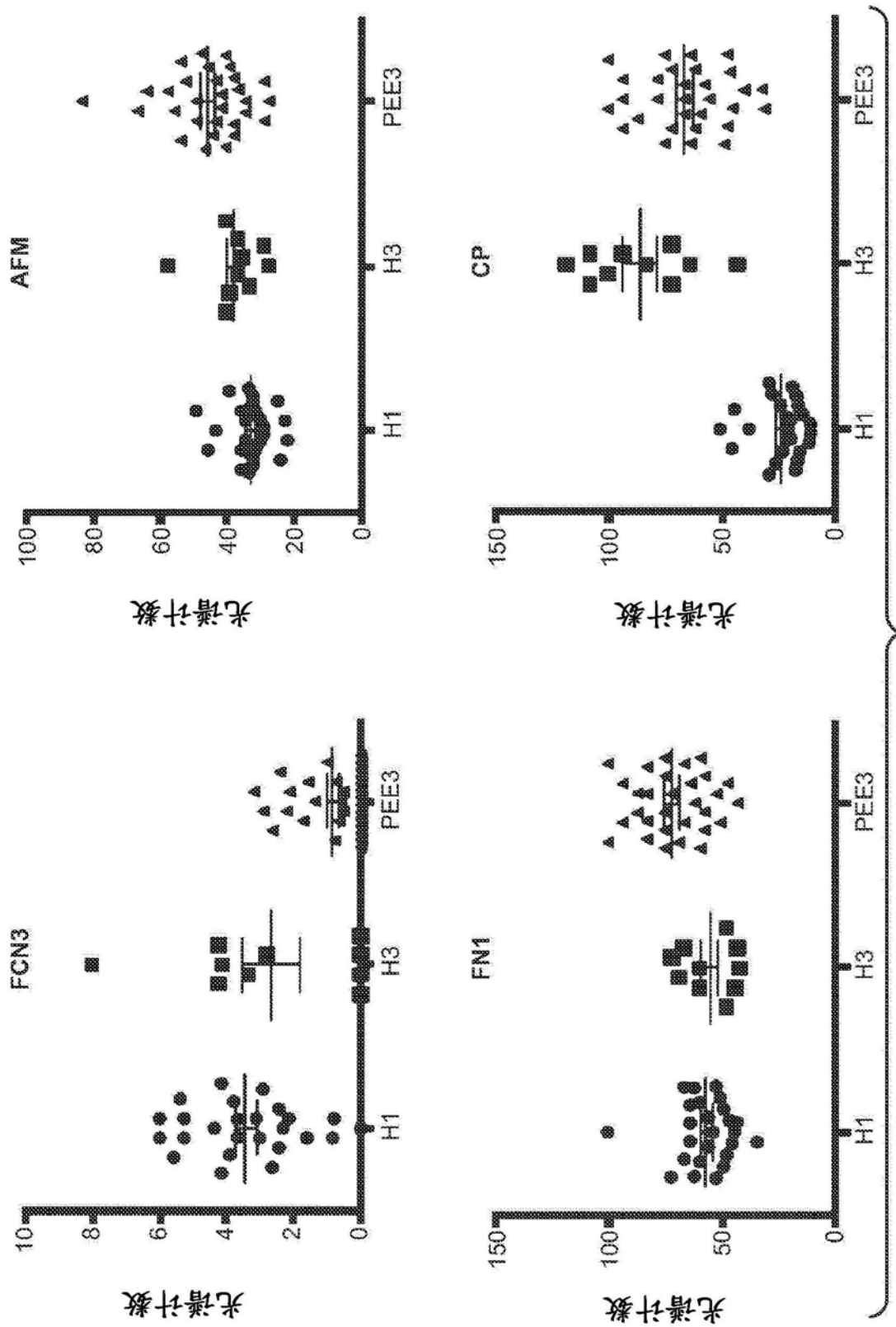


图4续

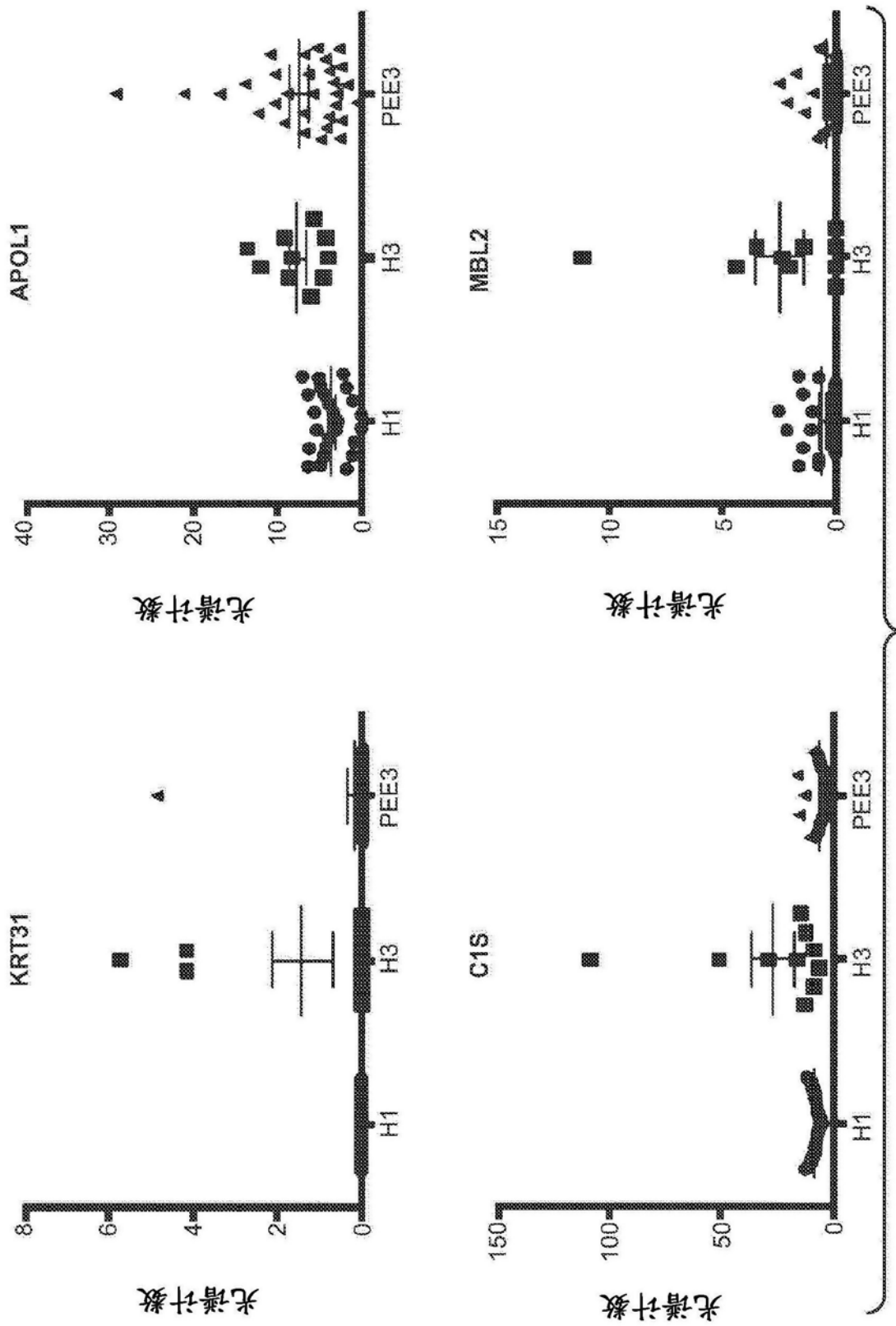


图4续

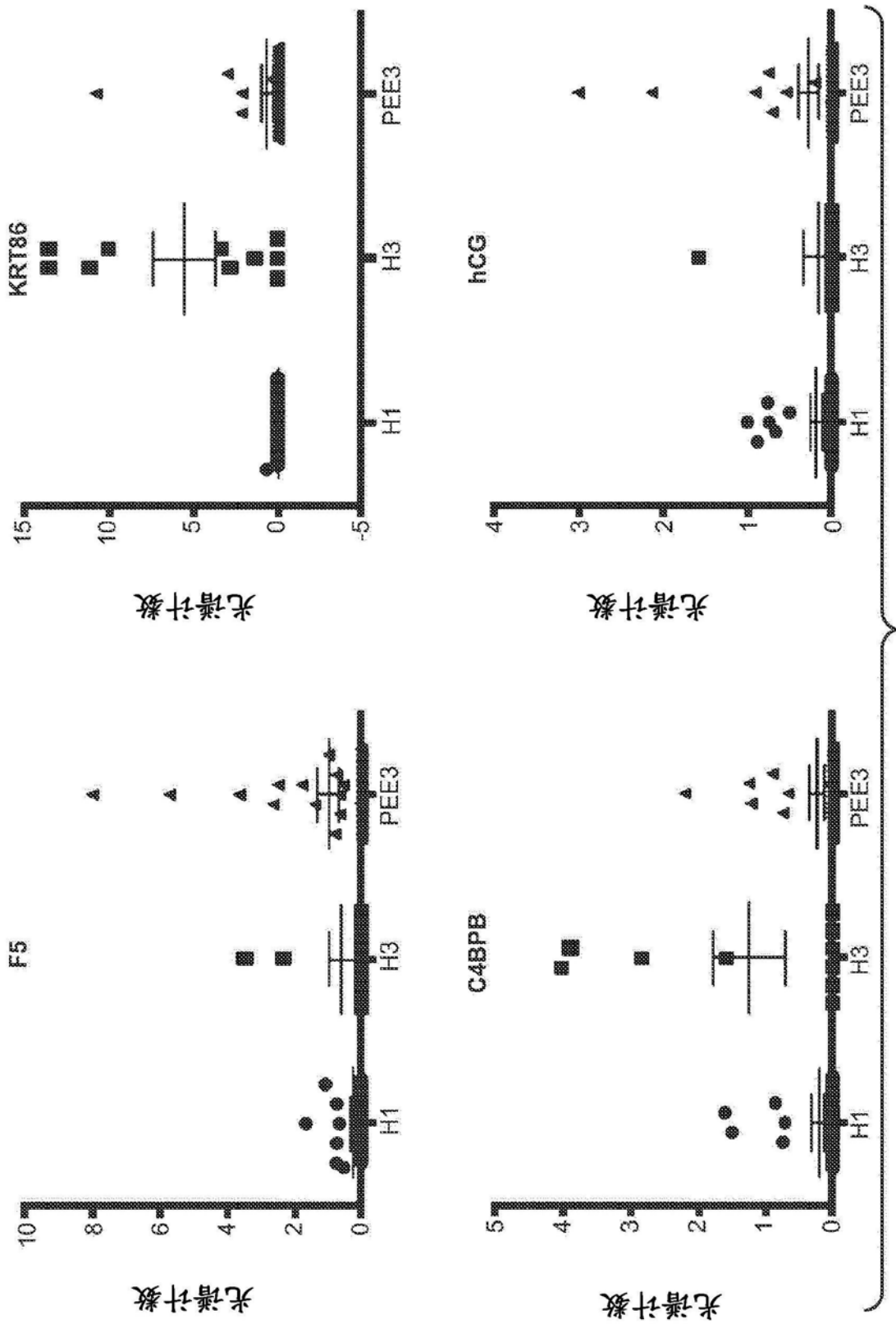


图4续

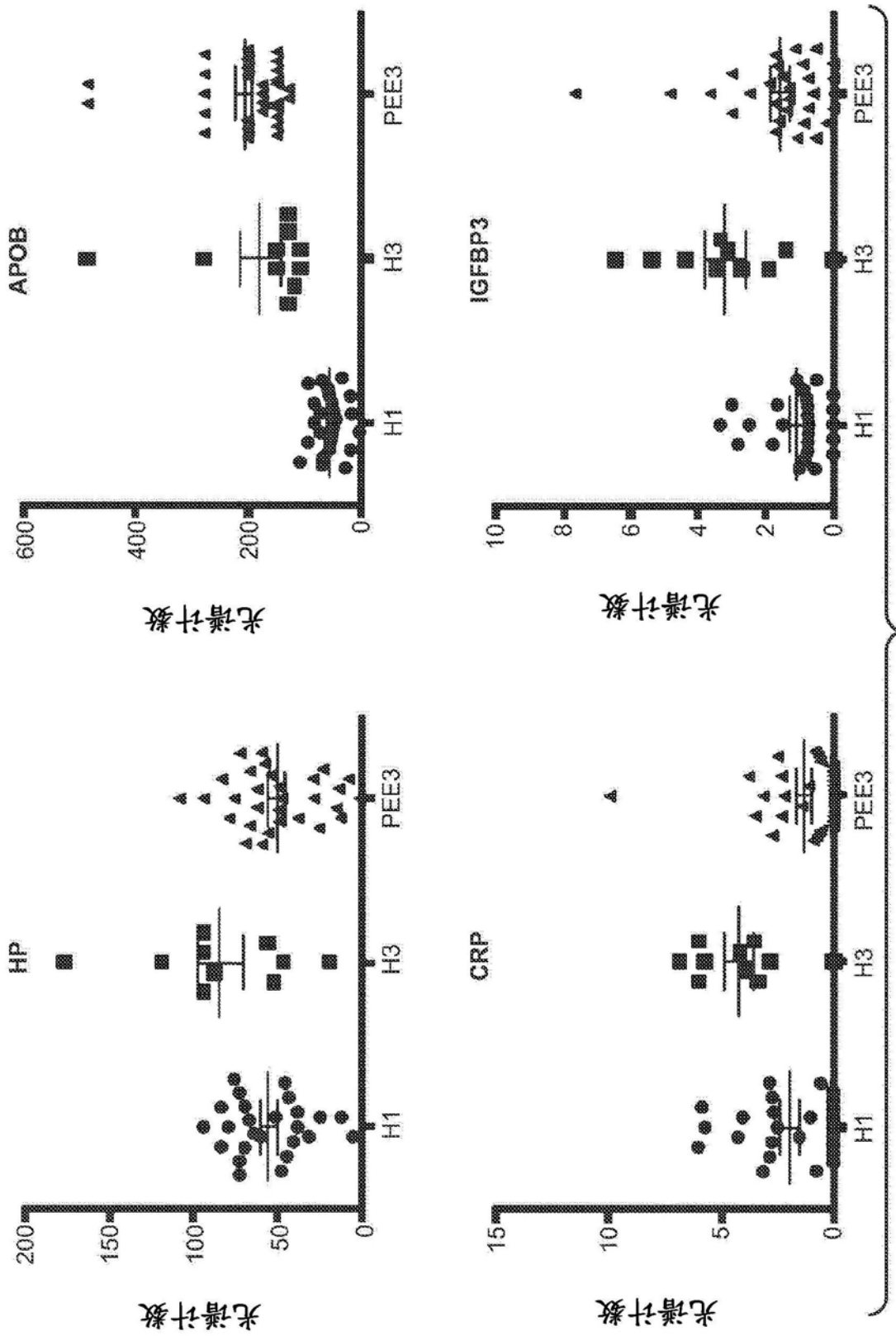


图4续

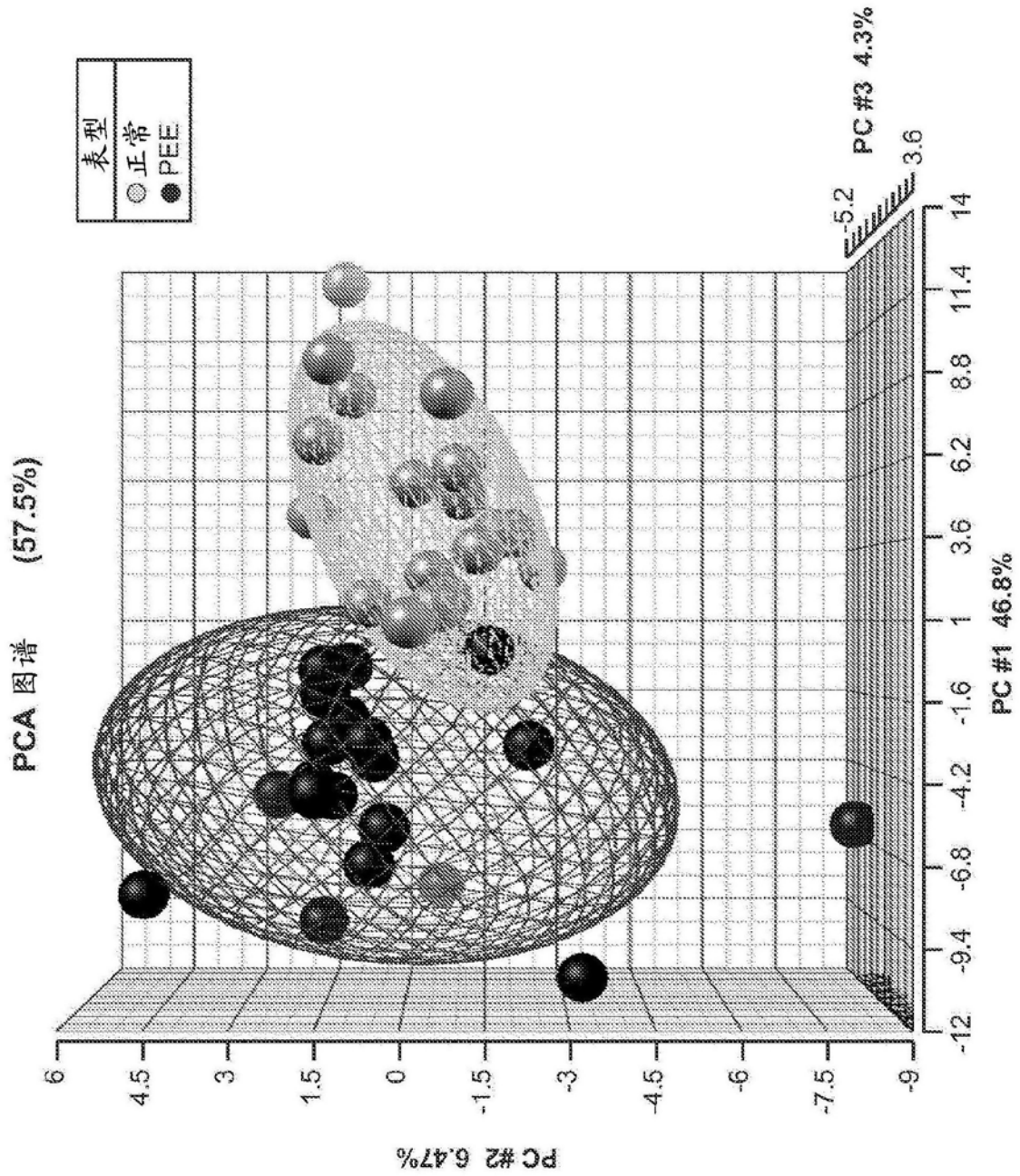


图5

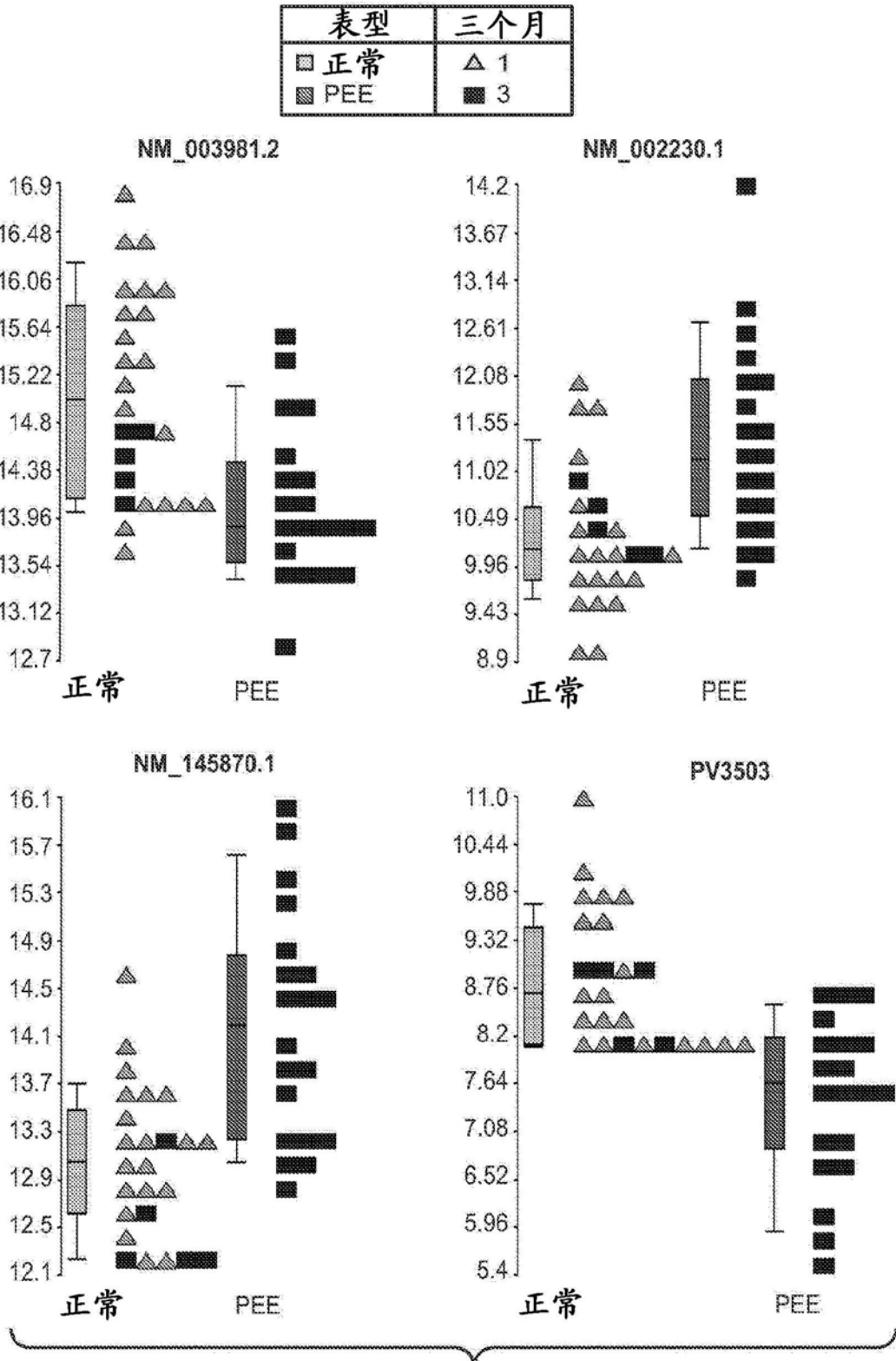


图6

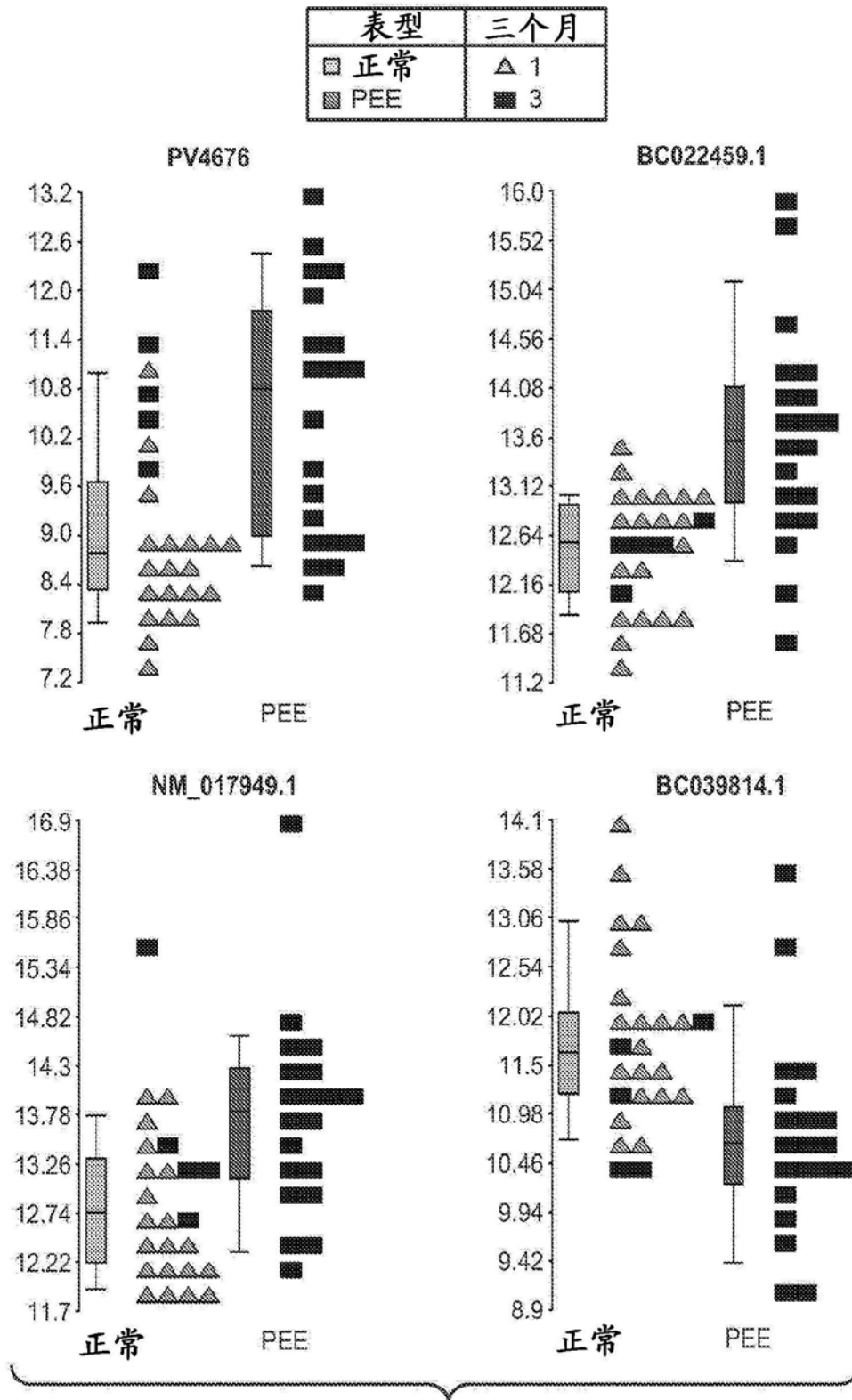


图6续

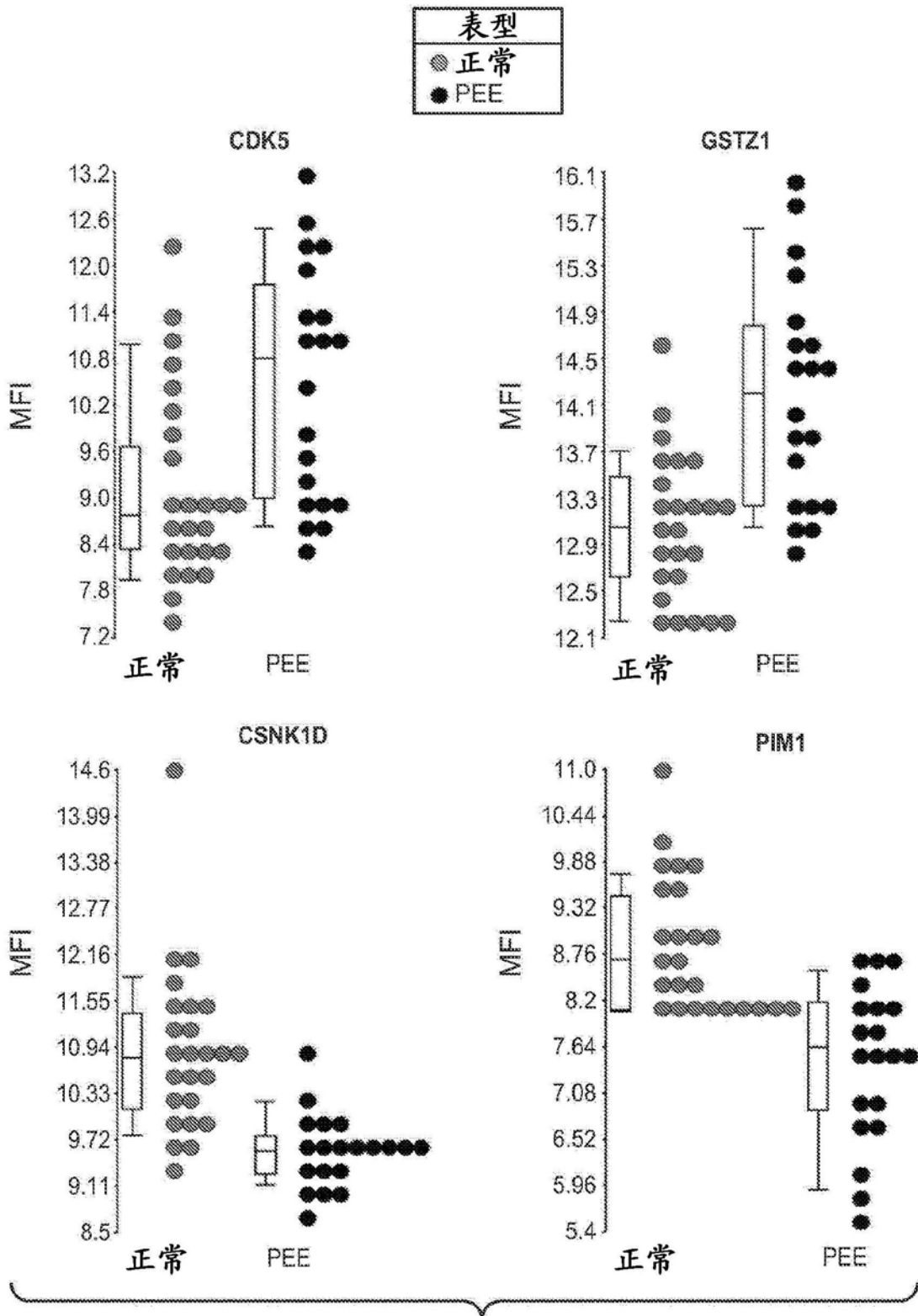


图7

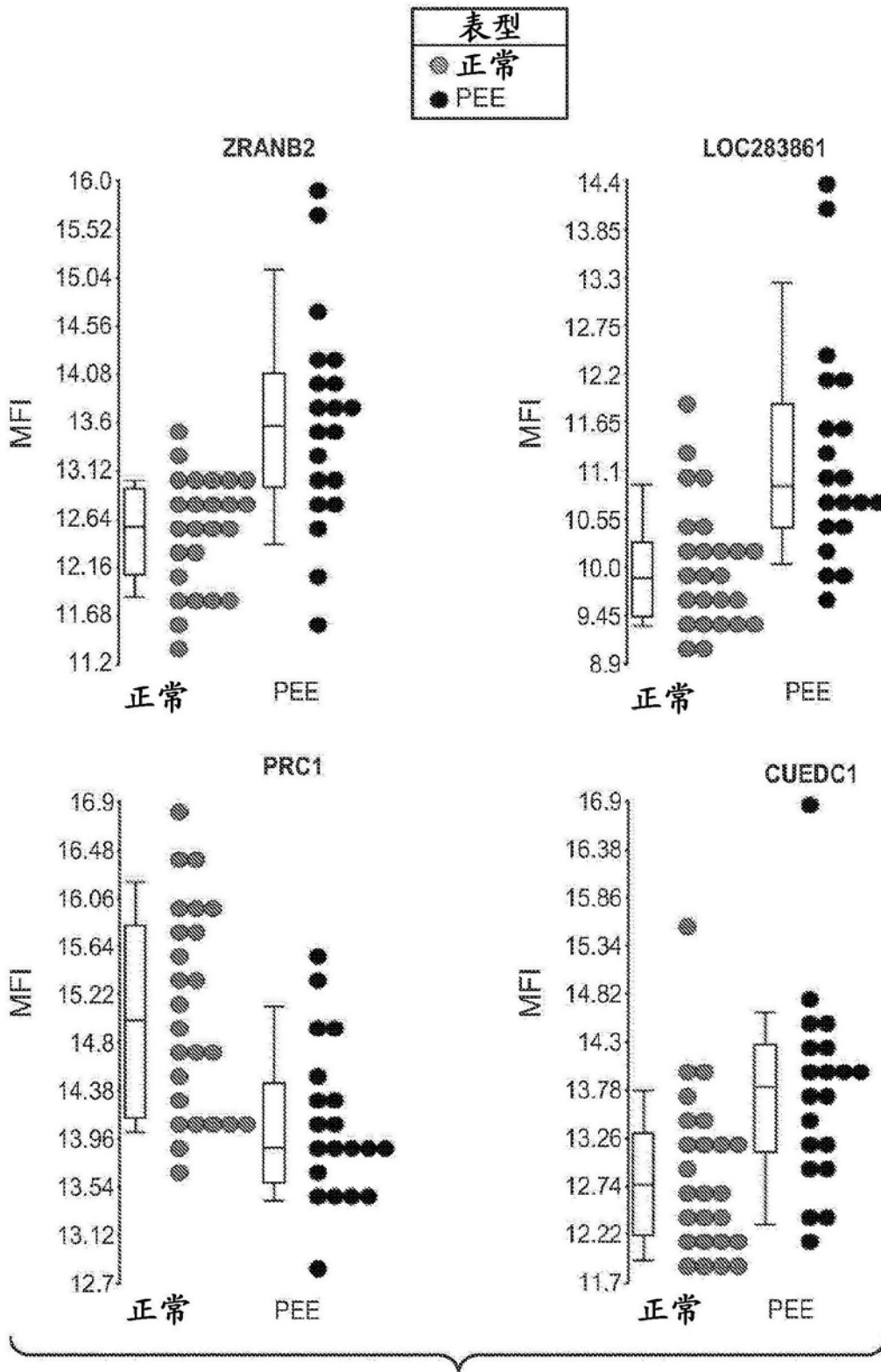


图7续

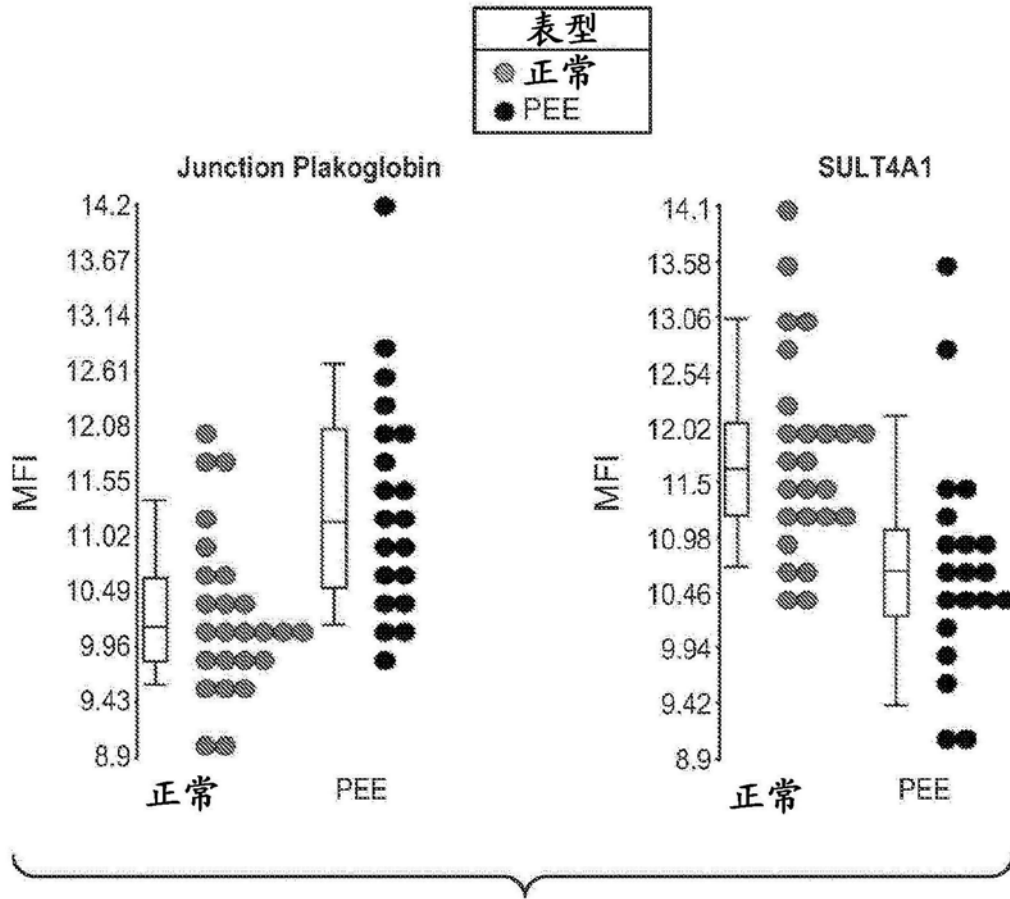


图7续

专利名称(译)	用于诊断先兆子痫的方法和组合物		
公开(公告)号	CN105308455B	公开(公告)日	2019-04-09
申请号	CN201480013907.X	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	伊穆科GTI诊治股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	伊穆科GTI诊治股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	伊穆科GTI诊治股份有限公司		
[标]发明人	S罗德 I阿布杜拉赫 MM萨尔瓦		
发明人	S·罗德 I·阿布杜拉赫 M·M·萨尔瓦		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/00 G01N33/564 G01N33/689 G01N2800/368 C07K14/003 G01N2800/60		
代理人(译)	李瑛		
审查员(译)	周洋		
优先权	61/785934 2013-03-14 US		
其他公开文献	CN105308455A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文提供了使用结合剂来检测来自妊娠妇女的生物样品中的PEE蛋白和/或PEE自身抗体的存在的方法、组合物和试剂盒。这样的方法和组合物可以用于预测先兆子痫的发作、监控先兆子痫的进展、监控先兆子痫的消退、评价先兆子痫治疗的功效、鉴别应当对先兆子痫进行治疗的患者亚群或鉴别应当对监控先兆子痫症状进行监控的患者亚群。

