



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102224420 B

(45) 授权公告日 2014.09.17

- (21) 申请号 200980146884.9
- (22) 申请日 2009.11.24
- (30) 优先权数据  
61/200,150 2008.11.24 US
- (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2011.05.24
- (86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2009/065795 2009.11.24
- (87) PCT国际申请的公布数据  
W02010/060102 EN 2010.05.27
- (83) 生物保藏信息  
PTA-8423 2007.05.09
- (73) 专利权人 科尔泰拉公司  
地址 美国加利福尼亚州  
专利权人 高等教育联邦体系匹兹堡大学  
佛罗里达大学研究基金公司
- (72) 发明人 D·R·斯图尔特 K·P·康拉德  
A·耶亚巴兰
- (74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247  
代理人 黄草生 林柏楠
- (51) Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)
- (56) 对比文件  
US 20080108572 A1, 2008.05.08, 说明书第  
2 页第 15 段, 第 4 页第 37 段, 第 8 页第 67-68 段,

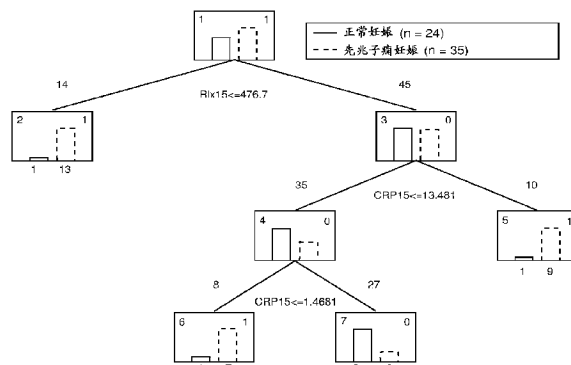
第 9 页第 81-82 段.  
US 20080108572 A1, 2008.05.08, 说明书第  
2 页第 15 段, 第 4 页第 37 段, 第 8 页第 67-68 段,  
第 9 页第 81-82 段.  
CN 101163970 A, 2008.04.16, 全文.  
WO 2008134881 A1, 2008.11.13, 全文.  
Roberta B.Ness, et al..Heterogeneous  
causes constituting the single syndrome  
of preeclampsia: A hypothesis and its  
implications.《Am J Obstet Gynecol》.1996,  
第 175 卷 (第 5 期), 1365-1370.  
Chunfang Qiu, et al..A Prospective  
Study of Maternal Serum C-Reactive Protein  
Concentrations and Risk of Preeclampsia.《Am  
J Hypertens》.2004, 第 17 卷 (第 2 期), 第 156  
页左栏倒数第 7-4 行, 右栏倒数第 5-2 行.  
K.SPENCER, et al..First-trimester  
maternal serum PP-13, PAPP-A and  
second-trimester uterine artery  
Doppler pulsatility index as markers  
of pre-eclampsia.《Ultrasound Obstet  
Gynecol》.2007, 第 29 卷 (第 2 期), 128-134.  
H.S.Hwang.Maternal serum highly  
sensitive C-reactive protein in normal  
pregnancy and pre-eclampsia.《International  
Journal of Gynecology and Obstetrics》.2007,  
(续)

审查员 张绚

权利要求书2页 说明书20页 附图6页

(54) 发明名称  
先兆子痫的预测和预防

(57) 摘要  
本发明涉及评估怀孕妇女升高的先兆子痫风险的方法。本文描述的方法应用测量怀孕妇女生物样本中的松弛素水平,以及任选地测量 C-反应蛋白水平。本发明还包括通过给怀孕妇女施予松弛素药物制剂而降低先兆子痫风险的方法。



[ 转续页 ]

[ 接上页 ]

(56) 对比文件

第 98 卷 ( 第 2 期 ), 105-109.

WAYNE H. DECKER, et al.. Some Effects

of Relaxin in Obstetrics. 《Obstet  
Gynecol》. 1958, 第 12 卷 ( 第 1 期 ), 37-46.

1. 测量 H2 松弛素浓度的试剂在制备用于在怀孕 5 周至 15 周的怀孕妇女中评估怀孕妇女是否具有升高的发展先兆子痫的风险的试剂盒中的用途,所述评估包括:

a) 使用所述试剂测量在先兆子痫症状显现之前自所述怀孕妇女获得的生物样本中 H2 松弛素的浓度;以及

b) 当所述 H2 松弛素浓度低于怀孕妇女最低四分位浓度的截断值时,确定所述怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险,

其中所述最低四分位浓度的截断值是指将在怀孕妇女中所测得的 H2 松弛素浓度中的下 25%浓度与上 75%浓度分开的 H2 松弛素浓度。

2. 权利要求 1 的用途,其中应用抗所述 H2 松弛素的抗体测定所述 H2 松弛素。

3. 权利要求 2 的用途,其中应用酶联免疫吸附测试法 (ELISA) 测定所述 H2 松弛素。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述在先兆子痫症状显现之前是从怀孕 5 周延至 15 周的所述受试者的第一个三月期期间。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述最低四分位浓度的截断值为约 500pg/ml。

6. 权利要求 5 的用途,其中所述试剂盒还包括测量所述生物样本中的 C- 反应蛋白 (CRP) 浓度的试剂,并且当所述 CRP 浓度大于约 13.5mcg/ml 时确定所述怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险。

7. 根据权利要求 6 的用途,其中当所述 CRP 浓度大于约 13.5mcg/ml 且所述 H2 松弛素浓度大于约 500pg/ml 时,确定所述怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险。

8. 权利要求 5 的用途,其中所述试剂盒还包括测量所述生物样本中的 C- 反应蛋白 (CRP) 浓度的试剂,并且当所述 CRP 浓度低于约 1.5mcg/ml 时确定所述怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险。

9. 根据权利要求 8 的用途,其中当所述 CRP 浓度低于约 1.5mcg/ml 且所述 H2 松弛素浓度大于约 500pg/ml 时,确定所述怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险。

10. 权利要求 6 或 8 的用途,其中用于测量 C 反应蛋白浓度的试剂是抗 CRP 抗体。

11. H2 松弛素在制备用于减少怀孕妇女发展先兆子痫可能性的药物制剂中的用途,其中,所述怀孕妇女为在其妊娠第一个三月期获得的生物样本中具有少于约 500pg/ml H2 松弛素浓度的怀孕妇女;以及

其中,给所述怀孕妇女施用 H2 松弛素药物制剂以减少其发展先兆子痫的可能性。

12. 权利要求 11 的用途,其中在整个怀孕末期 (terminal part) 以每天约 30  $\mu$ g/kg 体重的量施用 H2 松弛素给所述怀孕妇女。

13. 权利要求 11 的用途,其中将 H2 松弛素施用给所述怀孕妇女,以在整个怀孕期间维持约 10ng/ml 的松弛素血清浓度。

14. 权利要求 11 的用途,其中在通过免疫测试法确定血清 H2 松弛素浓度后,选择所述怀孕妇女。

15. H2 松弛素和用于确定血清 H2 松弛素浓度的试剂在制备用于减少怀孕妇女发展先兆子痫可能性的试剂盒中的用途,

其中,利用所述试剂选择在其妊娠第一个三月期获得的生物样本中具有少于约 500pg/ml H2 松弛素浓度的怀孕妇女;以及给所述怀孕妇女施用 H2 松弛素药物制剂以减少其发展先兆子痫的可能性。

16. 权利要求 15 的用途,其中在整个怀孕末期以每天约  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重的量施用 H2 松弛素给所述怀孕妇女。

17. 权利要求 15 的用途,其中将 H2 松弛素施用给所述怀孕妇女,以在整个怀孕期间维持约  $10\text{ng}/\text{ml}$  的松弛素血清浓度。

18. 权利要求 11-17 之任一项的用途,其中用于测定 H2 松弛素浓度的试剂为抗松弛素抗体。

19. 权利要求 18 的用途,其中所述松弛素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

20. 权利要求 19 的用途,其中所述单克隆抗体为由美国典型培养物保藏中心 PTA-8423 的杂交瘤产生的单克隆抗体。

## 先兆子痫的预测和预防

[0001] 相关申请

[0002] 本发明要求 2008 年 11 月 24 日提交的美国临时专利申请 No. 61/200, 150 的 35U. S. C. 119(e) 之下的权益, 所述申请在此为所有目的通过引用全文并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及评估怀孕妇女中升高的先兆子痫风险的方法。本文描述的方法应用测量怀孕妇女生物样本中的松弛素水平, 以及任选地测量 C- 反应蛋白水平。本发明还包括通过给怀孕妇女施予松弛素药物制剂而降低先兆子痫风险的方法。

### 背景技术

[0004] 先兆子痫 (也称为毒血症) 是威胁生命的病症, 其影响怀孕妇女, 通常是在第二或第三个三月期的后期的怀孕妇女, 以及在生产后第一个六周的产后妇女。其通过尿液中新出现的蛋白 (蛋白尿) 和高血压来诊断。该病症影响怀孕妇女的肾、肝、脑、心脏和胎盘。先兆子痫在约 8% -10% 的怀孕中发生, 并且仅可以通过怀孕的终止来缓解, 即通过诱导分娩或剖腹产。其原因仍大量未知。先兆子痫最通常在首次怀孕中发生。还已知某些群体的怀孕妇女的先兆子痫的风险中度升高, 包括 35 岁以上或 18 岁以下的妇女, 具有这一病症的遗传易感性的妇女, 之前患有高血压、糖尿病、自身免疫疾病 (如狼疮)、各种遗传性血栓形成倾向 (如因子 V Leiden)、或肾病的妇女, 肥胖妇女以及多胎妊娠 (双胞胎、三胞胎或更多) 的妇女。发展先兆子痫的最显著的单风险是在之前的怀孕中有过先兆子痫。

[0005] 尽管先兆子痫通常在怀孕第 20 周后发生, 但如有水泡状胎块的话, 其也可以更早开始。先兆子痫可以逐渐发生或突然发生, 以及可在整个怀孕期间保持温和或变得严重。除高血压和蛋白尿之外的通常症状还有升高的尿酸、视觉问题诸如闪光或模糊的视力、持续头疼、手和腿极度肿胀、液体滞留、右上腹部疼痛。若不治疗, 先兆子痫能够损坏母亲的肝或肾, 剥夺胚胎的氧气以及引起子痫 (发作)。具有先兆子痫征兆的怀孕妇女必须由医生密切监视。中度至重度先兆子痫通常需要在医院以卧床休息、硫酸镁和高血压药物进行治疗。不幸的是, 生产仍然是先兆子痫唯一真实的“治愈”。实际上, 当妇女患有严重先兆子痫或近足月时有轻度至中度先兆子痫, 生产仍然是目前最佳的疗法。然后用药物启动分娩, 除非确实需要剖腹产术。在生产后的前几天内, 母亲的血压通常恢复正常, 然而, 对于严重的先兆子痫, 则通常需要多周才能使血压恢复正常。

[0006] 具体地, 当怀孕妇女发生高血压 (相隔至少 4 小时的两次独立读数为 140/90mm Hg 或更高) 以及在 24 小时的尿样中 300mg 蛋白 (即, 蛋白尿) 时, 即诊断为先兆子痫。过去很长时间都将肿胀或浮肿 (尤其是手和脸部) 认为是诊断先兆子痫的重要体征, 但在当前的医学实践中仅有高血压和蛋白尿是诊断所需要的, 因为高达 40% 的正常怀孕妇女也可以有浮肿。然而, 压痕性水肿 (即当按压时由留下的凹痕而能注意到的不寻常肿胀, 尤其是手、腿或脸的那些) 可以是有意义的并且必须报告给医生。尽管子痫可能是致命的, 但先兆子痫可以明显无症状, 或可与一般的怀孕相关微恙的症状一起存在。例如, 上腹部疼痛反映涉

及肝脏并且是称为HELLP综合征（即，溶血、升高的肝酶和低血小板）的严重型先兆子痫所典型的，其容易与怀孕中非常常见的问题即胃灼热相混淆。因此，先兆子痫的推定诊断依赖于同时发生的先兆子痫特征，而通常直到观察到生产后症状的消退才能确诊。

[0007] 尽管在先兆子痫筛选领域中取得了一些进展，但是临床医生仍然在努力寻找最佳的策略以监测有先兆子痫风险的妇女。期望有能够保护母亲和孩子均免受先兆子痫损害的方法。本发明通过提供确定怀孕妇女是否患有先兆子痫或有先兆子痫倾向的方法，从而满足了这一需求。

[0008] 优选实施方案概述

[0009] 本发明提供了评估怀孕妇女发展先兆子痫的风险以及降低怀孕妇女发展先兆子痫的可能性的方法。本发明的一个主要优点是可在怀孕早期评估发展先兆子痫的风险，因此可及时地开始治疗。本发明另一优点是可用相对低水平的松弛素或其激动剂治疗已确定为有增加的先兆子痫风险的怀孕妇女，由此预防或减轻先兆子痫。早期施用松弛素能够显著地减少如下怀孕妇女中由于先兆子痫导致的妊娠并发症的数量，其中所述妇女在她们怀孕的第一个三月期期间相对缺乏H2松弛素。由于松弛素在怀孕妇女中天然存在，用外源松弛素治疗应不会伴随有害的副作用。本发明的另一优点是可选择富集的患者群用于科研和/或临床研究，以更好的理解先兆子痫、以及有先兆子痫倾向的怀孕受试者亚群中的疾病进展。

[0010] 一方面，本发明提供了在怀孕的人类女性中评估发展先兆子痫的风险的方法，包括选择在妊娠的第一个三月期中的怀孕妇女，以及检测该怀孕妇女的松弛素蛋白水平以评估该妇女发展先兆子痫的风险。另一方面，本发明提供了在怀孕的人类女性中评估发展先兆子痫的风险的方法，包括选择在妊娠的第二个三月期中的怀孕妇女，以及检测该怀孕妇女的松弛素蛋白水平以评估该妇女发展先兆子痫的风险。另一方面，本发明提供了在怀孕的人类女性中评估发展先兆子痫的风险的方法，包括选择表现出先兆子痫症状之前的怀孕妇女，以及检测该怀孕妇女的松弛素蛋白水平以评估该妇女发展先兆子痫的风险。可在血液中检测松弛素。优选地，通过应用抗松弛素抗体检测松弛素，诸如单克隆抗体或多克隆抗体。在本发明一个实施方案中，该妇女已怀孕5至14周。在本发明另一实施方案中，该妇女已怀孕5至28周。本发明另一实施方案中，该妇女孕有超过一个的小孩。在本发明另一实施方案中，该怀孕妇女年龄超过35岁。在另一实施方案中，该怀孕妇女年龄不超过18岁。在另一实施方案中，该怀孕妇女具有先兆子痫的遗传倾向。在本发明的另一方面，该方法还包括检测该怀孕妇女的C-反应蛋白（CRP）的水平。可以在血液中检测CRP。优选地，通过应用抗CRP抗体检测CRP，诸如单克隆抗体或多克隆抗体。

[0011] 另一方面，本发明提供了在怀孕的人类女性中降低发展先兆子痫的可能性的方法，包括选择在妊娠的第一个三月期中的怀孕妇女，其中该怀孕妇女在其血流中具有少于约500pg/ml的松弛素水平。另一方面，本发明提供了在怀孕的人类女性中降低发展先兆子痫的可能性的方法，包括选择在妊娠的第二个三月期中的怀孕妇女，其中该怀孕妇女在其血流中具有少于约500pg/ml的松弛素水平。另一方面，本发明提供了在怀孕的人类女性中降低发展先兆子痫的可能性的方法，包括选择表现出先兆子痫症状之前的怀孕妇女，其中该怀孕妇女在其血流中具有少于约500pg/ml的松弛素水平。该方法还包括给该怀孕妇女施予松弛素药物制剂，以降低该怀孕妇女发展先兆子痫的可能性。可以按每天约10 μg/

kg 至 100  $\mu$ g/kg 患者体重的量将松弛素施予怀孕妇女。在一个优选的实施方案中,以每天约 30  $\mu$ g/kg 患者体重的量将松弛素施予怀孕妇女。可在注意到缺陷后马上开始松弛素施予,并可在整个怀孕期持续。照这样,将松弛素施予受试者,以在整个怀孕期间维持例如约 10ng/ml 的松弛素血清浓度。可皮下 (SQ) 或通过其他途径施予松弛素药物制剂。例如,可通过输注泵连续输注而递送松弛素。

[0012] 本发明药物制剂中使用的松弛素可以是,例如,合成或重组的松弛素,或药学上有效的松弛素激动剂或模拟物。在本发明的一个实施方案中,松弛素是 H1 人松弛素。在另一实施方案中,松弛素是 H2 人松弛素。在另一实施方案中,松弛素是 H3 人松弛素。在另一实施方案中,松弛素是合成或重组人松弛素,或药学上有效的松弛素激动剂或松弛素模拟物。因此,有先兆子痫风险的怀孕人类女性可用合成或重组人松弛素或松弛素激动剂或模拟物的药物制剂进行治疗。在本发明一个实施方案中,用合成人松弛素治疗怀孕妇女。在另一实施方案中,用重组人松弛素治疗怀孕妇女。在另一实施方案中,用药学上有效的松弛素激动剂或模拟物治疗怀孕妇女。可通过多种不同的途径将松弛素施予怀孕妇女,包括但不限于:皮下、肌内、静脉内、舌下以及通过吸入。一个优选的施予途径是皮下 (SQ) 施用。

[0013] 本发明还提供了松弛素在评估怀孕的人类女性发展先兆子痫的风险中的用途,包括选择在妊娠的第一个三月期中的怀孕妇女,以及检测该怀孕妇女的松弛素蛋白水平以评估该妇女发展先兆子痫的风险。本发明还提供了松弛素在评估怀孕的人类女性发展先兆子痫的风险中的用途,包括选择在妊娠的第二个三月期中的怀孕妇女,以及检测该怀孕妇女的松弛素蛋白水平以评估该妇女发展先兆子痫的风险。本发明还提供了松弛素在评估怀孕的人类女性发展先兆子痫的风险中的用途,包括选择先兆子痫症状表现之前的怀孕妇女,以及检测该怀孕妇女的松弛素蛋白水平以评估该妇女发展先兆子痫的风险。本发明还提供了松弛素用于降低怀孕的人类女性发展先兆子痫的可能性的用途,包括选择在妊娠的第一个三月期中的怀孕妇女,其中该怀孕妇女在其血流中具有少于约 500pg/ml 的松弛素水平。本发明还提供了松弛素用于降低怀孕的人类女性发展先兆子痫的可能性的用途,包括选择在妊娠的第二个三月期中的怀孕妇女,其中该怀孕妇女在其血流中具有少于约 500pg/ml 的松弛素水平。本发明还提供了松弛素用于降低怀孕的人类女性发展先兆子痫的可能性的用途,包括选择先兆子痫症状表现之前的怀孕妇女,其中该怀孕妇女在其血流中具有少于约 500pg/ml 的松弛素水平。

[0014] 此外,本发明提供了评估怀孕妇女是否具有升高的发展先兆子痫的风险的方法,包括:a) 测量生物样本中 H2 松弛素浓度,其中所述生物样本获自先兆子痫症状表现之前的该怀孕妇女;以及 b) 当 H2 松弛素浓度低于怀孕妇女的最低四分位浓度的截断值时,确定该怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险。在一些实施方案中,该最低四分位浓度是指这样的 H2 松弛素浓度,即,将在一组具有类似孕龄和类似地点的怀孕妇女中所测得的 H2 松弛素浓度中的下 25% 浓度与上 75% 浓度分开的 H2 松弛素浓度。在一些实施方案中,用于本发明目的的具有类似孕龄的类似怀孕妇女人群是与受试对象(例如,步骤 a 和 b 的怀孕妇女)具有相同的三月期的一群怀孕妇女,优选加或减一个月孕龄,或更优选加或减两周孕龄。在一些实施方案中,用于本发明目的的具有类似地点的类似怀孕妇女人群是与受试者(例如,步骤 a 和 b 的怀孕妇女)居住在相同洲、相同国家、优选 1000 英里以内、或更优选 500 英里以内的一群怀孕妇女。在一些优选的实施方案中,生物样本包含血浆或血清。在一

些优选的实施方案中,通过应用抗 H2 松弛素抗体测定 H2 松弛素,而在这些实施方案的亚组中,应用酶联免疫吸附测定试验 (ELISA) 测定 H2 松弛素。在一些实施方案中,在先兆子痫症状表现之前是指怀孕妇女的第一个三月期期间,从怀孕 5 周延伸至 15 周。本发明还提供了这样的方法,即其中该怀孕妇女属于有先兆子痫倾向的组,该组包括以下一种或多种:首次怀孕、超过 35 岁、小于 18 岁、多胎妊娠以及原有病症。在一些实施方案中,原有病症选自高血压、糖尿病、狼疮、血栓形成倾向、肾病以及肥胖。在一些优选的实施方案中,最低四分位浓度的截断值为约 500pg/ml。此外,本发明提供方法,其还包括测量生物样本中的 C-反应蛋白 (CRP) 浓度,以及当 CRP 浓度大于约 13.5mcg/ml 时,甚至当 H2 松弛素浓度大于约 500pg/ml 时,确定该怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险。备选地,本发明提供方法,其还包括测量生物样本中的 C-反应蛋白 (CRP) 浓度,以及当 CRP 浓度低于约 1.5mcg/ml 时,甚至当 H2 松弛素浓度大于约 500pg/ml 时,确定该怀孕妇女具有升高的发展先兆子痫的风险。本发明还提供了评估怀孕妇女是否患有先兆子痫的方法,包括:a) 测量获自怀孕妇女的生物样本中的 H2 松弛素浓度;以及 b) 当 H2 松弛素浓度低于怀孕妇女的最低四分位浓度的截断值时,确定该怀孕妇女患有先兆子痫。在一些优选的实施方案中,当怀孕妇女已经呈现出至少一种先兆子痫症状时,从该怀孕妇女获得生物样本,并且应用本发明方法部分地诊断该怀孕妇女患有先兆子痫。在这些实施方案的一个亚组中,该至少一种先兆子痫的症状包括以下一种或多种:浮肿、严重头疼、视力改变、上腹部疼痛、恶心、呕吐、头晕、尿排出量减少、以及每周超过 2 磅的突然体重增加。

[0015] 此外,本发明还提供了减少怀孕妇女发展先兆子痫的可能性的方法,包括:a) 选择在其妊娠的第一个三月期中获得的生物样本中具有少于约 500pg/ml 血清 H2 松弛素浓度的怀孕妇女;以及 b) 施予 H2 松弛素药物制剂给该怀孕妇女以减少其发展先兆子痫的可能性。在一些实施方案中,在整个孕期末部分(例如,确定 H2 松弛素浓度之后)以每天约 30  $\mu$ g/kg 体重的量施予 H2 松弛素给怀孕妇女。在一些实施方案中,将 H2 松弛素施予怀孕妇女,以在整个怀孕期间维持约 10ng/ml 的松弛素血清浓度。在优选的方法中,通过免疫测试试验,确定血清 H2 松弛素浓度。在一些实施方案中,怀孕前三月期是从怀孕 5 周至 15 周。在一些实施方案中,怀孕妇女是有先兆子痫倾向组中的一部分,该组包括以下一种或多种:首次怀孕、超过 35 岁、小于 18 岁、多胎妊娠以及原有病症。在这些实施方案的亚组中,原有病症选自高血压、糖尿病、狼疮、血栓形成倾向、肾病以及肥胖。在一些特别优选的实施方案中,怀孕妇女来自北美。更优选地,怀孕妇女来自北美的工业东北部(例如,匹兹堡 250 英里以内)。

[0016] 此外,本发明提供了与 H2 松弛素反应的单克隆抗体,该单克隆抗体由美国典型培养物保藏中心 (ATCC) PTA-8423 所示杂交瘤产生。在其他实施方案中,提供了免疫测试试剂盒,其包含由 PTA 8423 杂交瘤产生的单克隆抗体,微量板,以及测量样本中 H2 松弛素的说明书。在一些优选的实施方案中,免疫测试是 H2 松弛素捕获测试,其还包括多克隆抗松弛素抗体。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 描述了先兆子痫 (PE) 妇女 (HPU 及 HP 组) 相对于孕龄的血清松弛素浓度。线条连接来自相同受试者的样本。菱形描述来自后期发展先兆子痫并在第一个 15 周内具有低于 500pg/ml 的内源松弛素水平的怀孕妇女的样本。正方形描述了来自后期发展先兆子

痫但在第一个 15 周内具有高于 500pg/ml 的内源松弛素水平的怀孕妇女的样本。菱形描述了来自没有发展先兆子痫的怀孕妇女的样本。应当注意,具有正常怀孕结果的妇女儿无在第一个 15 周具有低于 500pg/ml 的松弛素水平。

[0019] 图 2 描述了从研究受试者收集的第一个样本的松弛素浓度的二元直方图(即,先兆子痫聚类)。因为受试者在不同的时间被募集至本研究中,所述第一个样本获自 5 至 11 周孕龄。

[0020] 图 3 描述了 HPU 和 HP 怀孕(即,先兆子痫妇女)的分类回归树(CART),其中分裂数为 1 且末节点数量为 2。应用松弛素(RIx)的特异性为 96%,而灵敏度为 37%。用于这一分类树的数据显示于图 1。这说明了血清松弛素可用于鉴定具有在其怀孕后期发展先兆子痫的高风险的妇女人群。这一预测可在先兆子痫临床症状出现前数月作出。

[0021] 图 4 显示了 HPU 和 HP 怀孕(即,先兆子痫妇女)的 CART,其中分裂数为 3 且末节点数量为 4。应用松弛素(RIx)和 C-反应蛋白(CRP),特异性为 93%,而灵敏度与单独的松弛素(RIx)相比提高至 83%(参见图 3)。增加 CRP 测量使得能够鉴定通过单独测定松弛素(RIx)浓度而没有鉴定出来的有先兆子痫倾向的妇女。

[0022] 图 5 显示了 HPU、HU 或 HP 怀孕(即,高血压妇女,包括先兆子痫妇女)的分类树,其中分裂数为 3 且末节点数量为 4。应用松弛素(RIx)和 C-反应蛋白(CRP)测量,特异性为 63%以及灵敏度为 96%。

[0023] 图 6 显示了 HPU、HU 或 HP 怀孕(即,高血压妇女,包括先兆子痫妇女)的分类树,其中分裂数为 5 且末节点数量为 6。应用松弛素(RIx)、C-反应蛋白(CRP)和肌酸酐(CREAT)测量,特异性为 92%以及灵敏度为 87%。

[0024] 发明详述

[0025] 总体概述

[0026] 一方面,本发明涉及评估怀孕的人受试者发展先兆子痫的风险的方法。本文描述的方法应用测量生物样本中松弛素的水平,以及任选地 C-反应蛋白(CRP)的水平,其中所述生物样本从怀孕妇女的妊娠第一个三月期期间获得。由于先兆子痫是妇女孕期入院的主要原因之一,因此其与健康护理系统的高成本相关。迄今为止,以先兆子痫或其症状就诊的怀孕妇女的预后是不好的,因为出于对母亲或胎儿健康的关注,先兆子痫常导致通过剖腹产术早期终止妊娠,尤其是当母亲的血压升高超过 140/90mmHg 时更是如此。当前除了终止怀孕外,无法治愈先兆子痫。为缓解这一问题,本发明提供了能用于评估发展先兆子痫的可能性或风险的检查。在优选的实施方案中,在怀孕早期(例如,前三月期)进行该检查,使得可监测妇女并且采取合适的介入以防止先兆子痫的完全发展。早期意识到升高的先兆子痫风险,可以使主治医师从一开始即稳定怀孕患者的状况。以预防或降低高血压的治疗形式进行的干预反过来可以减少母亲和孩子死亡的风险,并进一步减少早期终止妊娠的风险。

[0027] 如本文所述,测量怀孕妇女的松弛素水平可预测该妇女是否将发展先兆子痫。如此,低水平的松弛素是该病症的高特异指示物。除非另外指出,本文使用的就人受试者而言的术语松弛素(天然松弛素和內源松弛素)是指 H2 松弛素。图 1 和 3 描述了当怀孕妇女的松弛素水平低于 500pg/ml 时,该妇女将发展先兆子痫的可能性高达 96%(参见图 3 的 CART 分析)。实际上,应用图 1 数据鉴定的先兆子痫妇女有三分之一具有低于 500pg/ml 的松弛

素水平。在其他实施方案中,除了松弛素水平外,还通过测量天然 C- 反应蛋白 (CRP) 水平,使该检查变得甚至更灵敏。例如,图 4 说明了当 CRP 低于约  $1.5 \mu\text{g/ml}$  或大于约  $13.5 \mu\text{g/ml}$  时,该检查的灵敏度升至 83%。

[0028] 在另一方面,本发明提供了通过施予药物活性 H2 松弛素或 H2 松弛素激动剂来预防或降低发展先兆子痫的可能性的方法。更具体地,若内源松弛素水平低于  $500\text{pg/ml}$ ,则可施予外源 H2 松弛素给怀孕妇女,以在怀孕期间稳定该妇女并预防先兆子痫发展。如此,可以在整个妊娠末期(例如,H2 测量之后)用合成或重组人松弛素或松弛素激动剂的药物制剂治疗怀孕妇女,其中松弛素主要作为预防剂起作用。

[0029] 定义

[0030] 术语“内源松弛素”或“天然松弛素”在本文中可互换使用,并且指本领域公知的天然存在的肽激素松弛素。在妇女中,松弛素由卵巢黄体、乳腺产生以及在怀孕期间还通过胎盘、绒毛膜和蜕膜产生。排卵后由于黄体产生松弛素,内源松弛素水平上升,并且在月经周期的中和后黄体期达到峰值。如该周期未受孕,松弛素浓度降至不能检测。然而,如果该周期受孕,则松弛素浓度迅速上升,并在第一个三月期达到峰值。松弛素浓度然后开始缓慢下降,但在整个孕期保持升高的水平。除非另外指出,本文使用的就人受试者而言的术语松弛素(天然松弛素和内源松弛素)是指 H2 松弛素。

[0031] 本文使用的术语“外源松弛素”是指非内源的人松弛素,包括完整的全长人松弛素或保留了生物活性的松弛素分子的一部分。术语“外源松弛素”包括人 H1 前松弛素原、松弛素原和松弛素;H2 前松弛素原、松弛素原和松弛素;以及 H3 前松弛素原、松弛素原和松弛素。术语“松弛素”还包括来自重组、合成或天然来源的生物活性(本文也称为“药物活性”)松弛素,以及松弛素变体,诸如氨基酸序列变体。如此,该术语包括合成的人松弛素和重组的人松弛素,包括合成的 H1、H2 和 H3 人松弛素和重组的 H1、H2 和 H3 人松弛素。该术语还包括具有松弛素样活性的活性剂,诸如松弛素激动剂、松弛素模拟物和/或松弛素类似物及其保留了生物活性的部分,包括竞争性地从松弛素受体(例如,LGR7 受体、LGR8 受体、GPCR135、GPCR142 等)上将结合的松弛素置换下来的所有活性剂。因此,药物有效松弛素激动剂或模拟物是具有松弛素样活性的任何活性剂,其能够结合松弛素受体以引发松弛素样反应。此外,本文使用的人松弛素的核酸序列不必与人松弛素(例如,H1、H2 和/或 H3)的核酸序列 100% 相同,而是可以与人松弛素的核酸序列至少约 40%、50%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同。本文所使用的松弛素可通过本领域公知的任何方法制得。此类方法的实例例如描述于美国专利 5,759,807 号以及 Büllersbach 等 (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266(17):10754-10761。松弛素分子和类似物的实例例如描述于美国专利 5,166,191 号。

[0032] 天然存在的生物活性松弛素可源自人、鼠科动物(即,小鼠或大鼠)、猪或其他哺乳动物来源。还包括的是经修饰以增加体内半衰期的松弛素,例如,聚乙二醇化松弛素(即,与聚乙二醇缀合的松弛素);对松弛素中受降解酶切割的氨基酸进行的修饰,等等。该术语还包括包含了具有 N- 和/或 C- 端截短的 A 和 B 链的松弛素。一般地,在 H2 松弛素中,A 链可从 A(1-24) 至 A(10-24) 变化,以及 B 链可从 B(1-33) 至 B(10-22) 变化;以及在 H1 松

弛素中, A 链可从 A(1-24) 至 A(10-24) 变化, 以及 B 链可从 B(1-32) 至 B(10-22) 变化。还包括在术语“松弛素”范围内的是松弛素、前松弛素原和松弛素原的一个或多个氨基酸残基的其它插入、替换、或缺失, 糖基化变体, 未糖基化松弛素, 有机或无机盐, 共价修饰的衍生物。该术语还包括具有与野生型(例如, 天然存在的)序列不同的氨基酸序列的松弛素类似物, 包括但不限于美国专利 5, 811, 395 号公开的松弛素类似物。对松弛素氨基酸残基的可能的修饰包括游离氨基基团(包括 N 端)的乙酰化、甲酰化或类似保护, C-端基团的酰胺化, 或羟基或羧基基团的酯形成, 例如通过添加甲酰基修饰 B2 的色氨酸(Trp)残基。甲酰基是容易移除的保护基的典型实例。其他可能的修饰包括用不同的氨基酸(包括天然氨基酸的 D 形式)替换 B 和 / 或 A 链中的一个或多个天然氨基酸, 包括但不限于: 用正亮氨酸(Nle)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)或高丝氨酸(HomoSer)替换 B24 的 Met 部分。其他可能的修饰包括从链中缺失天然氨基酸, 或往链中添加一个或多个额外的氨基酸。其他的修饰包括在松弛素原的 B/C 和 C/A 接合处的氨基酸替换, 该修饰促进 C 链从松弛素原切下; 以及包含非天然存在的 C 肽的变体松弛素, 例如, 如在美国专利 5, 759, 807 中所描述的那样。

[0033] 术语“松弛素”还包括包含松弛素和异源多肽的融合多肽。异源多肽(例如, 非松弛素多肽)融合配偶体可以位于融合蛋白中松弛素部分的 C 端或 N 端。异源多肽包括免疫学可检测的多肽(例如“表位标签”); 能产生可检测信号的多肽(例如, 绿色荧光蛋白, 酶诸如碱性磷酸酶, 以及其他本领域公知的多肽); 治疗性多肽, 包括但不限于: 细胞因子、趋化因子和生长因子。产生变体的所有此类松弛素分子的结构变化或改变均包含在本发明的范围之内, 只要保留了松弛素的功能(生物)活性。优选地, 松弛素氨基酸序列或结构的任何修饰不会增加其在用该松弛素变体治疗的个体中的免疫原性。具有期望功能活性的这些松弛素变体可以应用本领域公知的体外和体内测试法很容易地得以鉴定。

[0034] 在一些实施方案中, 本发明提供了包括施用松弛素激动剂的方法。在一些方法中, 该松弛素激动剂激活一个或多个选自但不限于 RXFP1、RXFP2、RXFP3、RXFP4、FSHR(LGR1)、LHCGR(LGR2)、TSHR(LGR3)、LGR4、LGR5、LGR6、LGR7(RXFP1) 和 LGR8(RXFP2) 的松弛素相关 G 蛋白偶联受体(GPCR)。在一些实施方案中, 松弛素激动剂包含 Compugen 的 WO 2009/007848 中式 I 氨基酸序列(对于松弛素激动剂序列的教导, 在此通过引用并入本文)。示例性松弛素激动剂还公开于 Corthera 的国际申请 PCT/US2009/044251 中, 对于 SEQ ID NO :4-8 的松弛素激动剂的教导, 其在此通过引用并入本文。

[0035] 本发明还包括式 I 多肽的同源物, 此类同源物可与示范性松弛素激动剂(例如, Corthera 的 PCT/US2009/044251 中的 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6) 的氨基酸序列至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或更高, 如 100% 相同, 这可应用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 BlastP 软件利用缺省参数确定, 所述参数任选地且优选地包括以下: 过滤开启(这一选项应用 Seg(蛋白)程序从查询中滤除重复性或低复杂性序列); 用于蛋白的评分矩阵是 BLOSUM62; 字长为 3; E 值为 10; 空位罚分为 11、1(开始和(开始以及延伸))。任选地以及优选地, 应用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 BlastN 软件利用缺省参数确定核酸序列的同一性/同源性, 所述参数优选包括应用 DUST 过滤程序, 以及还优选包括具有 10 的 E 值、过滤低复杂性序列、以及 11 的字长。最后, 本发明还包括上述多肽的片段, 以及具有天

然存在的或随机地或以靶向方式人工诱导的突变（诸如一个或多个氨基酸的缺失、插入或替换）的多肽。

[0036] 术语“妊娠 / 怀孕”是指妊娠的 9 个月（自最后月经期起的 40 周），传统上将其划分为三个三月期，即各大约 3 个月的不同时期，在这些时期发生 胎儿发育的不同阶段。前三月期（第一个三月期, first trimester）是基础细胞分化的时间。认为结束于母亲首次感知胎动（胎动感）时，其通常发生在大约第三个月末（或孕龄的约 12 至 14 周）。中三月期（第二个三月期, second trimester）是身体系统快速生长和成熟的时期（孕龄的约 15 至约 28 周）。取决于医院护理，中三月期的早产胎儿可能存活。末三月期（第三个三月期, third trimester）标志着胎儿生长的最终阶段，其中系统被完善、脂肪在胎儿皮肤下积聚、以及胎儿移至出生的位置（孕龄的约 29 至约 42 周）。这一三月期结束于胎儿出生。

[0037] 术语“约”，当在所陈述的数值的上下文中使用时，包括该所述值上下达 10% 的范围（例如，所述值的 90-110%）。例如，约 30mcg/kg/ 天的静脉（IV）输注速率包括 27mcg/kg/ 天至 33mcg/kg/ 天的 IV 输注速率。

[0038] “治疗有效量”是指当与患者的基线状态相比或与未治疗或安慰剂治疗（例如，没有用松弛素治疗）的受试者的状态相比时，可以在患者中产生可测量的期望医学或临床益处的药理学活性松弛素的量。

[0039] 先兆子痫

[0040] 先兆子痫（或子痫前期）可由浅植入的胎盘引起，所述胎盘变得缺氧，从而导致免疫反应，所述免疫反应的特征在于从该胎盘分泌上调的作用于血管内皮的炎性介质。浅植入可源于母体免疫系统对胎盘的反应。这一理论涉及这样的证据，所述证据提示胎儿及其胎盘对母体抗原缺乏建立的免疫耐受性。在先兆子痫的一些情况下，据认为对于胎盘分泌以下调母体免疫反应的蛋白质，母亲缺乏受体 (Moffett 等, Placenta Suppl. A :S51-6, 2007)。然而，在多数先兆子痫的情况中，母体对胎盘的反应似乎允许发生正常的植入。可能是，具有由潜因病症诸如慢性高血压或自身免疫疾病导致的较高炎性基线水平的妇女对妊娠的炎症影响具有较低的耐受性。

[0041] 许多理论试图解释先兆子痫为什么产生，并且已将该综合征与以下病症的存在联系起来，包括内皮细胞损伤、胎盘的免疫排斥、胎盘灌注不良 (compromised placental perfusion)、改变的血管反应性、前列环素和血栓 烷之间的不平衡、降低的肾小球滤过率及盐和水的滞留、降低的血管内容积、增加的中枢神经系统的易激惹性 (irritability)、弥漫性血管内凝血、子宫肌肉过度紧张 (stretch) (局部缺血)、包括维生素缺乏在内的饮食因素、以及遗传因素。

[0042] 对先兆子痫的理解为其是一个两阶段的过程，具有高度变化的第一阶段，其使胎盘易于缺氧，随后为可溶因子的释放，所述因子导致例如内皮细胞受损、改变的血管反应性、经典的肾小球内皮增生损伤、降低的血管容积、炎症等等。有些研究支持这样的观点，即，胎盘血液供应不足导致释放激素或化学剂，在有该病症倾向的母亲中，所述激素或化学剂引起对内皮（血管内衬）的损伤、代谢改变、炎症。以及其他病理反应 (Drife 和 Magowan (编辑). Clinical Obstetrics and Gynaecology, 第 39 章, 第 367-370 页)。

[0043] 有些研究提示由于不充分灌注导致的缺氧将上调 VEGF 及 PLGF 拮抗剂 sFlt-1, 其导致母体内皮的损伤和限制胎盘生长 (Maynard 等, J Clin Invest, 111(5) :649-58,

2003)。此外, TGF- $\beta$  拮抗剂内皮糖蛋白 (endoglin) 在发展先兆子痫的怀孕妇女中升高 (Venkatesha 等, Nat Med, 12(6):642-649, 2006)。可溶的内皮糖蛋白似乎由胎盘响应母体免疫系统产生的细胞表面内皮糖蛋白的上调而上调, 尽管也有可能是 sEng 由母体内皮细胞产生。sFlt-1 和 sEng 两者的水平均随着疾病严重性的升高而升高, 在 HELLP 综合征的情况下, sEng 的水平超过 sFlt-1 的水平。HELLP 综合征是先兆子痫的严重变体, 其特征是溶血、升高的肝酶、以及低血小板。sFlt-1 和 sEng 两者的水平在所有怀孕妇女中均有一定程度的升高, 支持了在怀孕妇女中高血压疾病是正常的妊娠适应性出错的观点。在与浅植入相关的先兆子痫的情况下, 胎盘细胞滋养层的初始母体排斥可能是不适当重建的螺旋动脉的原因, 其导致下游缺氧以及出现响应于上调的 sFlt-1 和 sEng 的母体症状。

[0044] 也有证据表明在发展先兆子痫的妇女中胎儿细胞诸如胎儿成红细胞以及无细胞胎儿 DNA 在母体循环中升高。这些发现导致了这样的假说, 即先兆子痫是一个疾病过程, 诸如缺氧损伤等胎盘损伤通过该过程使得升高的胎儿物质进入母体循环, 导致免疫反应和内皮损伤, 最终导致先兆子痫和子痫。

[0045] 统计显示先兆子痫以及相关的妊娠疾病, 诸如子痫和妊娠高血压疾病, 是全球母亲死亡、以及婴儿死亡和疾病的主要原因。每年约有 76,000 妇女死于这些疾病。先兆子痫尤其危险, 因为有些妇女完全没有经历症状。这是为什么改进筛选和预测对于诊断该病症如此迫切的原因。在妇女诊断为先兆子痫或高血压妊娠后, 她们可接受任何一种或多种以下药物: 包括甲基多巴 (methyldopa)、肼苯哒嗪 (hydralazine)、拉贝洛尔 (labetalol)、硝苯吡啶 (nifedipine)、硫酸镁、倍他米松 (betamethasone) 和地塞米松 (dexamethasone)。

[0046] 预防策略诸如钙、阿司匹林和抗氧化剂 (例如, 维生素 C 和 E) 一直未获得完全的成功。在某些情况下, 基于统合分析 (meta-analysis) (PARIS collaboration), 使用阿司匹林可能小幅减小先兆子痫的风险, 但其不是治愈性的。血压的紧密控制可能预防严重的母亲病态, 诸如中风, 但也不能完全治疗该疾病。

[0047] 松弛素

[0048] 内源或天然松弛素是在大小和形状上与胰岛素类似的肽激素。更具体地, 松弛素是内分泌和自分泌 / 旁分泌激素, 其属于胰岛素基因超家族。编码蛋白的活性形式由 A 链和 B 链组成, 两链通过二硫键 (两个链间和一个链内) 靠在一起。因此, 在二硫键的部署上, 该结构与胰岛素非常类似。在人类中, 有三个已知的非等位松弛素基因, 即松弛素 -1 (RLN-1 或 H1)、松弛素 -2 (RLN-2 或 H2) 和松弛素 -3 (RLN-3 或 H3)。H1 和 H2 共享很高的序列同源性。对于该基因, 存在两种可变剪接转录变体编码所述不同的同种型。H1 和 H2 在生殖器官中差异性地表达 (参见美国专利 5,023,321 号; 以及 Garibay-Tupas 等人, Molecular and Cellular Endocrinology 219:115-125, 2004), 而 H3 主要在脑中发现。松弛素肽家族及其受体的进化在本领域中有描述 (参见 Wilkinson 等, BMC Evolutionary Biology 5(14):1-17, 2005; 以及 Wilkinson 和 Bathgate, 第 1 章, Relaxin and Related Peptides, Lan des Biosciences and Springer Science+Business Media, 2007)。

[0049] 松弛素被认为活化特定的松弛素受体, 即 LGR7 (RXFP1) 和 LGR8 (RXFP2) 以及 GPCR135 和 GPCR142。LGR7 和 LGR8 是含有富亮氨酸重复的 G 蛋白偶联受体 (LGR), 其代表 G 蛋白偶联受体的一个独特亚群。它们含有七螺旋跨膜结构域和一个大的糖基化胞外域, 与糖蛋白激素受体诸如 LH 受体或 FSH 受体远源相关。这些松弛素受体在心脏、平滑肌、结缔

组织以及中枢和自主神经系统中发现。有效的松弛素,诸如 H1 和 H2、猪和鲸松弛素拥有一定的共同序列。偏离保守的 H1 和 H2 序列的松弛素,诸如大鼠、鲨鱼、狗和马松弛素,显示出通过 LGR7 和 LGR8 受体的生物活性的降低 (Bathgate 等, *Ann NY Acad Sci*, 1041 :61-76, 2005 ;Receptors for Relaxin Family Peptides)。然而,与 H2 松弛素类似, H3 松弛素活化 LGR7 受体 (Satoko 等, *J Biol Chem*, 278(10) :7855-7862, 2003)。此外, H3 也显示出活化 GPCR135 受体 (Van der Westhuizen, *Ann NY Acad Sci*, 1041 :332-337, 2005) 和 GPCR142 受体。GPCR135 和 GPCR142 是两个结构上相关的 G 蛋白偶联受体。小鼠和大鼠 GPCR135 显示出与人 GPCR135 很高的同源性 (即, 大于 85%), 以及具有与人 GPCR135 非常类似的药理学特性。人和小鼠以及大鼠松弛素 -3 以高亲和力结合并活化小鼠、大鼠和人 GPCR135。相反, 小鼠 GPCR142 与人 GPCR142 则更不那么保守 (即, 74% 同源性)。克隆了来自猴、牛和猪的 GPCR142, 并显示与人 GPCR142 高度同源 (即, 超过 84%)。来自不同物种的 GPCR142 的药理学表征显示松弛素 -3 以高亲和力与来自不同物种的 GPCR142 结合 (Chen 等, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(1) :83-95, 2005)。

#### [0050] 松弛素与妊娠

[0051] 松弛素的特征性功能与雌性的生殖道生理学相关, 包括对参与怀孕期间子宫颈和阴道的细胞外基质重塑以及足月胎膜破裂的生化过程的调节。 这些修饰使得后代可以移动通过产道以及防止难产 (即, 在生产时, 胎儿的下降或子宫颈的扩张或两者的显著变慢或停止)。此外, 松弛素促进子宫和胎盘生长, 以及影响子宫内膜的血管发育和增殖 (Parry 等, *Adv Exp Med Biol*, 612 :34-48, 2007)。

[0052] 在人类中, 在循环中发现的松弛素主要由卵巢黄体产生, 在怀孕和未怀孕女性中均如此。其在排卵的约第 14 天内达到峰值, 并然后在未怀孕的情况下下降, 导致月经。在妊娠的第一个三月期中, 血清水平上升。此外, 松弛素还由蜕膜和滋养层产生, 但认为该松弛素不进入循环。松弛素在前三月期的第 14 周期间达到峰值。松弛素在怀孕期间对于生殖组织和几种其他组织的生长和重建是重要的。如上所述, 松弛素的作用由松弛素受体介导。

[0053] 先兆子痫母亲产下的孩子通常具有低的出生体重, 并且在生命后期有并发心血管疾病的更高风险。生产具有低出生体重婴儿的母亲有更高的发生缺血性心脏病和死亡的风险。特别地, 生产早产小婴儿的先兆子痫妇女因缺血性心脏病或死亡的入院率比对照妇女高 10 倍。有很强的证据表明, 罹患先兆子痫的妇女与不患有这一病症的妇女相比, 其心血管风险上升。实际上, 任何的怀孕高血压病症均增加后期的高血压和中风风险。还已知在生产后 2 至 4 个月, 三分之二的先兆子痫妇女仍然可能具有微量白蛋白尿 (即, 少量蛋白, 例如白蛋白漏出到尿液中)。在绝经后妇女中, 微量白蛋白尿是一个实质性的心血管风险因素。此外, 先兆子痫还与抗胰岛素性和升高的高半胱氨酸水平相关, 其在妇女中是长期风险 (Davison 等, *J Am Soc Nephrol*, 15 :2440-2448, 2004)

[0054] 在正常妊娠期间, 肾小球滤过率 (GFR) 以及肾血浆流量分别升高 40-65% 及 50-85%。值得注意的, 松弛素在妊娠期间介导肾血管扩张。已知松弛素增加血管明胶酶活性, 由此将大 ET 转化为 ET<sub>1-32</sub>, 其通过内皮 ETB 受体和一氧化氮导致肾血管扩张、超过滤, 以及减少的小肾动脉的肌源性反应性 (Jeyabalan 等, *Frontiers in Bioscience* 12 : 2425-2437, 2007)。

[0055] 尿酸是嘌呤代谢的终产物。嘌呤由身体天然产生,此外还可以来自食物。在人类中,多数循环尿酸由肝产生,并且约 66% 由肾排出,而约 33% 由胃肠道排出。在正常妊娠期间尿酸的血清浓度通常下降,原因是增加的 GFR、降低的近端肾小管再吸收以及肾小球滤过膜的静电荷的可能改变。据信,来自先兆子痫胎盘的抗血管生成因子可能对疾病期间的肾小球内皮增生(即,先兆子痫所特征性的肾组织学病损)、蛋白尿和高血压有贡献。在多数先兆子痫的妇女中,肾血浆流和肾小管滤过率轻微下降,这是升高的入球小动脉阻力和/或降低的超滤系数的结果。主要由于降低的肾清除,血清尿酸浓度升高。降低的 GFR 导致降低的尿酸滤过负荷。此外,血浆容量收缩(plasma volume contraction)促进与钠偶联的近端肾小管重吸收升高。先兆子痫中尿蛋白排泄的升高可继发于肾小球滤过膜的大小和/或电荷选择性改变、可能增加的肾小球毛细血管压、以及近端肾小管重吸收的受损(参见上述 Jeyabalan 等)。

[0056] 在正常的人类妊娠期间,总蛋白、白蛋白、低分子量蛋白、以及肾小管酶的尿排泄升高。在先兆子痫妊娠中,肾功能降低。根据一些研究,GFR 和有效肾血浆流量(ERPF)分别降低 32% 和 24%(参见 Jeyabalan 等,同上)。先兆子痫中负责肾循环受损的精确机制仍然未知。据认为降低的 ERPF 是由高肾血管阻力导致的。升高的肾输入(肾小球前小动脉)阻力可能是升高的总肾血管阻力的主要促成因素。在这里,在先兆子痫中升高的入球小动脉张力(tone)可能保护肾小球免受由高的全身动脉压引起的损伤。降低的 ERPF、超滤系数,或其两者可能是先兆子痫中降低的 GFR 的可能机制(参见 Jeyabalan 等,同上)。

[0057] 尽管不希望受理论束缚,但广泛地认为松弛素作用下面的机制是基于对血管扩张和血管发生的刺激。首先,据信松弛素刺激子宫中的血管发生,以提供胎儿和母体血管更好的连接(即,增加母体螺旋动脉的数量、修饰母体螺旋动脉和/或促进滋养层对母体螺旋动脉的侵入)。升高的血管发生和血管扩张靶向先兆子痫的发病机理,即从母体向孩子的供血不足以及减少的胎盘和母体器官灌注。当将松弛素施予怀孕妇女时,松弛素与子宫和胎盘中的受体结合,并刺激 VEGF 产生。而后,VEGF 与内皮细胞结合以刺激血管发生。这提供了母亲和孩子间更好的血液供应。其次,松弛素是有力的血管扩张药,并且因此可以改善子宫胎盘和母体全身器官的灌注,在先兆子痫中这两者均减少。松弛素通过一氧化氮合酶途径起作用,由此刺激一氧化氮 NO 以增加人的血管扩张。因此,在妊娠期间施予松弛素可防止先兆子痫最不利的症状之一(即,140/90mmHg 或以上的高血压)的发生。第三,已知肾小球滤过率(GFR)和肾血浆流量(RPF)在先兆子痫中下降,其为妊娠的严重高血压并发症。因此,施予松弛素还可以增加怀孕妇女的肾血流量,由此进一步降低先兆子痫的风险。此外,松弛素具有潜在的抗炎作用。

[0058] C-反应蛋白(CRP)和妊娠

[0059] CRP 是指由肝对身体的炎症作出反应而产生的血浆蛋白。所述炎症可能由损伤、感染或诸如高血压等病症引起。CRP 被认为是先天免疫系统的一部分,以及慢性全身性炎症的标志物。CRP 还是心血管事件的独立预测因素。据信 CRP 在正常妊娠中作为急性期反应物而升高,就如同白蛋白合成由于 IL-6 和其它在循环中升高的细胞因子而降低一样。值得注意的是,IL-1 和 IL-6 水平在先兆子痫中更高,这可以解释为什么 CRP 水平在先兆子痫中也更高。这一发现与正常妊娠的炎症反应是一致的,所述炎症反应在先兆子痫中被加剧。因此,除了血清松弛素水平外还测量怀孕妇女的血清 CRP 水平能够进一步洞察这些妇女发展

先兆子痫的可能性。通过应用 CRP 作为另一因子,本文中描述的 H2 松弛素检查的灵敏度得到升高。

[0060] 血清 CRP 也已经被发现在有子痫(例如,在先兆子痫妊娠中发作)史的妇女中升高。实际上,有先兆子痫或子痫史的妇女在孕后有升高的心血管疾病风险,其原因仍然不明。据信炎症、血脂异常和抗胰岛素性与更高的先兆子痫风险相关,并且 CRP,当升高时,是炎症和心血管风险的指示物(Hubel 等, Hypertension 51 :1499-1505, 2008)。

[0061] 低松弛素水平预示先兆子痫

[0062] 应用 CART(分类回归树)分析在实验实施例公开的研究中从怀孕妇女获得的数。用于先兆子痫预测的参数是松弛素,以及任选的 C-反应蛋白(CRP)。如可从图 1 看到的那样,将妊娠期间的孕龄分解为三个阶段,即 0-15 周(第一个三月期)、15-25 周(第二个三月期)以及 25-35 周(第三个三月期)。尽可能早地在怀孕妇女中测试先兆子痫标志物是有益的,由此可以开始治疗以预防疾病完全发展。因此,在妊娠的第一个三月期中测试妇女优于在第二个或第三个妊娠三月期中测试妇女。若不可能更早地测试,则可以在妊娠第二个和/或第三个三月期中测试妇女。

[0063] CART 是非参数技术,取决于因变量是分类变量还是数值变量,可以分别产生分类树或回归树。这些树基于建模数据集中某些变量的值通过一系列规则而形成。就此,规则的选择所基于的基础是:基于变量值的分裂所能够达到的基于因变量而区分观察结果的程度。一旦选择了规则并且将节点分裂为 2 后,可以将相同的逻辑应用于每一个子节点(即,其为一个递归过程)。当 CART 检测到无进一步的增进(gain)时或者当某些预设的终止规则被满足时,可终止分裂。树的每一个分枝都终止在末节点。每一观察落入一个且确切地一个末节点中,并且每一末节点由一组规则唯一地定义。

[0064] 先兆子痫通常由诸如高血压和蛋白尿等症状来定义。某些怀孕妇女还罹患升高的尿酸。因此,先兆子痫妇女落入两组,即表现出高血压和蛋白尿的那些(HP),以及表现出高血压、蛋白尿和尿酸的那些(HPU)。值得注意的是,当怀孕妇女没有表现出蛋白尿症状时,她们通常被认为患有妊娠高血压而非先兆子痫,诸如当她们表现出高血压和升高的尿酸(HU)时。为本文讨论的 CART 分析的目的,于表 1 定义以下组。

[0065]

表 1
正常妊娠
HPU = 高血压、蛋白尿、尿酸
HP = 高血压、蛋白尿
HU = 高血压、尿酸
先兆子痫 = HPU 和 HP 的并集
妊娠高血压 = HPU、HP 和 HU 的并集

[0066] 参考图 3 的分类树,分裂数是 1,末节点数是 2。更具体地,上部方框显示有 35 例受试者归类为先兆子痫(虚线),以及 24 例受试者归类为正常(实线)。在总共 59 例研究受试者中,14 例受试者具有低于 476.7pg/ml 的 H2 松弛素水平,并且 45 例受试者具有高于 476.7pg/ml 的 H2 松弛素水平。为进一步确定该松弛素检查的特异性如何,将先兆子痫和正常受试者分裂为 2 组,左侧的一个框显示低于 476.7pg/ml 松弛素的那些受试者,右侧的一个框显示高于 476.7pg/ml 松弛素的那些受试者。如可从左边看到的那样,在具有低于 476.7pg/ml 的松弛素水平的那些个体当中,13 个个体发展了先兆子痫,而仅有一个个体具

有正常的妊娠,从而使得这一检查高度特异(对于更详细的分析,参见实施例 2)。

[0067] 应用来自澳大利亚的一个较不充分定义的怀孕妇女人群中获得的样本,进行了单独的较小研究。在此第二个研究中,仅有两个样本含有少于 500pg/ml 的松弛素,并且在这两个当中仅有一个样本获自先兆子痫受试者。这与应用采自明确孕龄的北美(例如,匹兹堡, PA) 怀孕妇女的样本进行的第一个较大研究不同。除了怀疑的两个研究之间的取样差异之外,推测该澳大利亚研究人群是同质的高加索人群,而北美研究人群中超过 30% 的受试者是非洲裔美国人。因此,在优选的实施方案中,在妊娠的第一个三月期中从怀孕妇女获得血样。在一些实施方案中,怀孕妇女是北美人。在这些实施例的一个亚组中,北美受试者来自美国和 / 或加拿大。在其它实施方案中,研究受试者是非洲后裔。

[0068] 施予松弛素预防先兆子痫的发展

[0069] 先兆子痫是一种危险病症,可在怀孕、生产和产后多达 6 周期间随时出现,尽管其最通常在末三月期发生并且最通常直到妊娠 20-35 周才会发生。先兆子痫可逐步发展,或可非常突然地出现,甚至在约数小时中突发,即使可能数月都没有观察到体征和症状。当先兆子痫无症状,在常规血压检查和 / 或尿检以及孩子快足月(36 周后)期间意外的暴露时,则诱导分娩,使孩子出生并且精心地监护母亲。如果先兆子痫在怀孕较早期发生,其影响甚至更深远。例如,可能开出卧床休息、药物以及甚至住院的处方,以保持母亲的血压在控制下。为了婴儿的利益,最好使其保持在子宫中的时间尽可能长。不幸的是,先兆子痫的唯一治愈是孩子生产,因此可能为了母亲的利益而在足月前生产婴儿。医生可能开出抗高血压药的处方,诸如  $\beta$ -受体阻断剂、钙通道阻断剂、胍苯哒嗪、 $\alpha$ -甲基多巴、可乐宁(clonidine),以及在罕有的情况下,呋喃苯胺酸(fasix)或利尿剂(water pills),尽管后者通常是不推荐的。如果用药物和治疗不能控制血压并且母亲和 / 或婴儿的健康有危险,则可能给予母亲类固醇以帮助婴儿的肺成熟,从而能早产活的婴儿。

[0070] 本发明提供了鉴定有先兆子痫倾向的怀孕妇女的方法,由此可采取步骤以减少该妇女发展先兆子痫的可能性。本发明还提供了降低先兆子痫风险或预防先兆子痫的方法,包括:当在获自孕妇的第一个妊娠三月期的血样的血浆或血清中测量到低于约 500pg/ml 的 H2 松弛素水平时,在妊娠第一个和 / 或第二个三月期期间向该孕妇施予 H2 松弛素。优选地,一旦测得低松弛素水平(例如,低于 500pg/ml),即将 H2 松弛素预防性地施予怀孕妇女。然而,先兆子痫常直到妊娠第 25-30 周才显现。因此,如果在症状显现之前在妊娠期后期施予松弛素,对于降低先兆子痫全面爆发的可能性可能仍然有益。

[0071] 在本发明的一个实施方案中,松弛素是合成的人松弛素。在本发明的另一实施方案中,松弛素是重组人松弛素。在本发明的另一实施方案中,松弛素是松弛素激动剂或松弛素模拟物。若施予松弛素,其优选为 H2 松弛素。在其他实施方案中,松弛素是包含 H2 松弛素的 A 或 B 链以及 H1 或 H2 松弛素的 A 或 B 链的嵌合松弛素,合成的人松弛素和嵌合体可从 CBL Biopharma(Boulder, CO) 获得。在一些实施方案中,松弛素是 H2 松弛素激动剂,诸如由 Compugen(Tel Aviv, Israel) 生产的那些。在其他较不优选的实施方案中,松弛素是 H1 人松弛素,或 H3 人松弛素。一旦确定缺乏,可以以每天约 10  $\mu$ g/kg 至约 100  $\mu$ g/kg 受试者体重的量将松弛素施予受试者。在一个优选的实施方案中,在整个妊娠期间或妊娠的部分期间以约 30  $\mu$ g/kg 受试者体重的量将松弛素施予受试者。如此,施予松弛素给受试者,以例如使松弛素的血清浓度在整个妊娠期维持在约 10ng/ml。可皮下或通过其他途径施予

松弛素药物制剂。

[0072] 据信施予松弛素给怀孕妇女的有益效果是松弛素作为受体特异性活性剂起作用的直接结果,其刺激血管发生及血管扩张两者。升高的血管发生靶向先兆子痫的原因,即母体向孩子的供血不足——其最终导致母亲中危险的高血压。升高的血管扩张进一步帮助降低血压,以及增加肾的肾血流量,其进一步减少先兆子痫的症状。因此,当怀孕的人类女性接受含有靶向特定松弛素受体(例如,LRG7、LGR8、GPCR135、GPCR142受体)的药物活性松弛素或药学有效松弛素激动剂的药物组合物时,结果是先兆子痫的改善或防止。

[0073] 富集人群

[0074] 早期检测的一个优点是富集一组更可能罹患该疾病的妇女用于科学研究和/或临床研究,以及帮助检查预防性措施。本发明提供了新的筛选方法,其包括选择富集的患者人群用于临床和/或科学研究,以更好地理解先兆子痫和疾病进程、以及对抗其的方法。富集的妇女群可通过低松弛素水平的检查而定义,其中为得到科学和/或临床相关结果,需要少得多的患者。可对在妊娠的第一个或第二个三月期中或先兆子痫症状显现之前的怀孕妇女检查血流中的松弛素水平,并选择具有少于约500pg/ml松弛素水平的那些用于该富集的患者人群。没有这一有价值的选择过程,将需要筛选上百个妇女以确定新药或活性剂是否对先兆子痫有效。因此,本发明提供了在临床和/或科学研究期间筛选治疗或预防先兆子痫的新药的方法,包括从富集的人群中选择具有较高的发展先兆子痫可能性的怀孕妇女,并对这些妇女测试该新药的效果。富集的人群包括具有少于约500pg/ml的血流松弛素水平的在妊娠的第一个和第二个三月期中或在先兆子痫症状显现之前的妇女。

[0075] 松弛素组合物和制剂

[0076] 将松弛素、松弛素激动剂、松弛素模拟物和/或松弛素类似物配制为在本发明方法中使用的药物。可刺激与生物学或药学活性松弛素(例如,合成松弛素、重组松弛素)或松弛素激动剂(例如,松弛素类似物、松弛素样调节剂或松弛素模拟物)和松弛素受体结合相关的生物反应的任何组合物或化合物均可用作本发明的药物。有关制剂和施用技术的一般细节详细地描述于科学文献中(参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton Pa.)。可根据本领域用于药物生产的任何已知方法制备含有药学活性松弛素的药物制剂。可配制在本发明方法中使用的含有药物活性松弛素或松弛素激动剂的制剂,用于以任何常规的可接受的方法施用,包括但不限于皮下(SQ)、肌内、静脉内、舌下、局部、口服、以及通过吸入。示例性的实例显示如下。在一个优选的实施方案中,皮下(SQ)施予松弛素。

[0077] 当皮下(SQ)递送药物时,含有药学活性松弛素或药学上有效的松弛素激动剂的制剂可以是无菌可注射制剂的形式,诸如无菌可注射水或油性混悬液。例如,可将松弛素稀释于pH 5.0的醋酸钠中,松弛素在其中非常易溶且稳定。只要需要,可通过连续输注,用松弛素组合物治疗患者。例如,松弛素输注泵可以通过插管将松弛素递送至皮下应用的针头,并且可将该泵用带子绑在患者衣服下。在监控患者的先兆子痫症状时,还可以通过适时地注射松弛素而进行松弛素施用。可基于患者调节对于患者的剂量。

[0078] 可根据已知技术应用上述提及的那些合适的分散剂或湿润剂以及悬浮剂配制松弛素混悬液。无菌可注射制剂还可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂当中的无菌可注射溶液或混悬液。在可接受载体和溶剂中,尤其可应用的是水和林格氏溶液(等渗氯化

钠)。此外,还可常规地使用无菌不挥发油作为溶剂或悬浮介质。为这一目的,可应用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸诸如油酸同样地可用于于注射液的制备中。

[0079] 本发明的水性混悬液含有与适于生产水性混悬液的赋形剂混合的松弛素。此类赋形剂包括悬浮剂,诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯树胶,以及分散剂或润湿剂,诸如自然存在的磷脂(例如,卵磷脂)、烯化氧与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸盐)、环氧乙烷与长链脂肪酸的缩合产物(例如,十七碳烯基氧基十六烷醇(heptadecaethylene oxycetanol))、环氧乙烷与衍生自脂肪酸及己糖醇的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)、或环氧乙烷与衍生自脂肪酸及己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯)。水性混悬液还可含有一种或多种防腐剂,诸如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯;一种或多种着色剂;一种或多种矫味剂和一种或多种增甜剂,诸如蔗糖、阿斯巴甜或糖精。可调节制剂的摩尔渗透压浓度。

[0080] 可通过将松弛素悬浮于植物油,诸如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油;或矿物油,诸如液体石蜡中,配制油性混悬液。油性混悬剂可含有增稠剂,诸如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。可添加增甜剂以提供适口的口服制剂。这些制剂可通过添加抗氧化剂诸如抗坏血酸进行保存。

[0081] 可从与分散剂、混悬剂和/或湿润剂以及一种或多种防腐剂混合的松弛素,配制适于通过添加水而制备水性混悬剂的本发明可分散粉末剂和粒剂。合适的分散剂或湿润剂以及悬浮剂由上述的那些示例。还可存在其他的赋形剂,例如增甜剂、矫味剂和着色剂。

[0082] 本发明的药物制剂还可以是水包油乳剂。油相可以是植物油,诸如橄榄油或花生油;或矿物油,诸如液体石蜡,或这些的混合物。合适的乳化剂包括天然存在的树胶,诸如阿拉伯树胶和黄蓍树胶;天然存在的磷脂,诸如大豆卵磷脂;酯或衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯,诸如失水山梨糖醇单油酸酯,以及这些偏酯与环氧乙烷的缩合产物,诸如聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯。乳剂还可含有增甜剂和矫味剂。可用增甜剂诸如甘油、山梨糖醇或蔗糖一起配制糖浆剂和酏剂。此类制剂还可含有缓和剂、防腐剂、矫味剂或着色剂。

[0083] 松弛素制剂的施予和剂量方案

[0084] 在本发明方法中使用的含有药学活性 H<sub>2</sub> 松弛素或药学上有效的 H<sub>2</sub> 松弛素嵌合体、激动剂或模拟物的制剂可应用任何常规的可接受的方法施用,包括但不限于:皮下、肌内、静脉内、舌下、局部、口服以及通过吸入。根据药物的药代动力学和其它特征以及患者的健康状况,施予将会不同。一般的指导显示如下:

[0085] 本发明的方法降低怀孕妇女发展先兆子痫的可能性。足以完成这一目的的单独的或与另一活性剂或药物结合的松弛素的量被认为是治疗有效剂量。对这一用途有效的给药进度和给药量,即“剂量方案”,将取决于多种因素,包括患者健康的一般情况、患者的身体状况、妊娠类型(即,单胎 vs. 多胎妊娠)、年龄等等。在计算患者的剂量方案时,施用模式也考虑在内。剂量方案还需要考虑药代动力学,即吸收率、生物利用率、代谢率、清除率等等。基于这些原则,松弛素可用于减少或预防怀孕妇女中的先兆子痫的发展。本发明还提供了松弛素或松弛素激动剂或模拟物以及任选地另一药物用于同时、分开或顺次施用的应用。例如,本发明提供了松弛素以及任选地高血压药物在需要时在治疗中用于联合使用的

应用。在另一实例中,本发明还提供了松弛素以及任选地  $MgSO_4$  在联合治疗中用于发作的预防。

[0086] 本发明还提供了松弛素在制备用于减少或预防怀孕妇女发展先兆子痫的药物中的用途。如此,制备该药物用于在怀孕期间施予。本发明还提供了松弛素或松弛素类似物或模拟物,用于在降低发展先兆子痫的可能性的方法中使用,其中制备松弛素以施用给怀孕妇女。

[0087] 技术现状允许临床医生为每一个怀孕妇女分别确定松弛素的剂量方案。如在实例中所阐述的那样,以下提供的有关松弛素的指南可用于指导确定剂量方案,即,当实施本发明方法时所施予的含有药物活性松弛素的制剂的给药进度和剂量水平。作为一般性的指导,预期药物活性 H1、H2 和 / 或 H3 人松弛素(例如,合成、重组、类似物、激动剂、模拟物等)的日剂量通常为落在每天 10-100  $\mu g/kg$  受试者体重的范围中的量。在一个优选的实施方案中,在整个妊娠期间松弛素的剂量为 30  $\mu g/kg/天$ 。在另一实施方案中,这些剂量例如导致约 10ng/ml 的血清松弛素浓度。在一个实施方案中,在整个妊娠期或妊娠的一部分以约 30  $\mu g/kg/天$  施予药学上有效的松弛素或其激动剂。在另一实施方案中,在整个妊娠期或妊娠的一部分以约 10-100  $\mu g/kg/天$  施予药学上有效的松弛素或其激动剂。在另一实施方案中,持续施予松弛素以使松弛素的血清浓度维持在约 0.5 至约 300ng/ml,更优选约 0.5 至约 100ng/ml,以及最优选约 0.5 至约 10ng/ml。最优选地,持续施予松弛素以在整个妊娠期间维持 10ng/ml 或更高的松弛素血清浓度。这些松弛素浓度能够减少先兆子痫以及伴随之,母亲症状,诸如高血压病(hypertension)、高血压(high blood pressure)、蛋白尿、肾机能不全以及死亡的发展可能性。此外,这些松弛素浓度能够减少或预防胎儿低出生体重的可能性和相关风险以及婴儿死亡。取决于受试者,维持松弛素的施予一段特定的时期、或实现怀孕母亲和孩子稳定所需的时间。例如,可在整个妊娠末期通过持续输注施予松弛素。这可通过输注泵或其他方式实现。备选地,可在在妊娠的第一个和 / 或第二个三月期中仅在需要时施予松弛素。

[0088] 松弛素特异性抗体和 CRP 特异性抗体

[0089] 本文描述了产生能够特异性识别松弛素和 / 或 CRP 的表位的抗体的方法。此类抗体可包括但不限于:多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$  片段、由 Fab 表达文库产生的片段、抗独特型(抗-Id)抗体、以及上述任一个的表位结合片段。为产生抗松弛素和 / 或 CRP 的抗体,可通过注射松弛素或 CRP 蛋白或其部分,免疫各种宿主动物。此类宿主动物可包括但不限于:兔、小鼠和大鼠。可应用各种佐剂以增强免疫反应,这取决于宿主物种,包括但不限于:弗氏佐剂(完全和不完全)、矿物凝胶诸如氢氧化铝、表面活性物质诸如溶血卵磷脂、复合多元醇(pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油乳剂、钥孔虫戚血兰蛋白、二硝基酚、以及可能有用的人佐剂诸如 BCG(卡介苗)和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)。

[0090] 多克隆抗体是异质抗体分子群,其产生自用抗原免疫的动物的血清,所述抗原诸如松弛素或 CRP、或松弛素或 CRP 的抗原性功能衍生物。为产生多克隆抗体,可通过注射松弛素或 CRP 免疫诸如上述那些的宿主动物。可通过标准技术在一段时间监测免疫动物中的抗体滴度,诸如应用固定化多肽的酶联免疫吸附测试(ELISA)。需要时,可将抗体分子从动物(例如,从血液中)分离,并且通过公知的方法进一步纯化,诸如蛋白 A 层析法,以获得

IgG 级份。单克隆抗体是抗具体抗原诸如松弛素或 CRP 的同质抗体群,其可通过本领域公知的由培养连续细胞系生产抗体分子的任何技术而获得。此类抗体可以是任何的免疫球蛋白类型,包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 及其任何亚型。产生本发明的 mAb 的杂交瘤细胞可在体外或体内培养。

[0091] 作为制备单克隆抗体分泌性杂交瘤的替代方案,可通过应用松弛素、CRP 或其衍生物筛选重组组合免疫球蛋白文库(例如,抗体噬菌体展示文库)而鉴定和分离抗松弛素和/或 CRP 的单克隆抗体。用于产生和筛选噬菌体展示文库的试剂盒可商业获得。此外,包含了人和非人部分的重组抗体,诸如嵌合和人源化单克隆抗体,也在本发明的范围之内,其可应用标准重组 DNA 技术制得。嵌合抗体是其不同部分源自不同动物物种的分子,诸如具有衍生自鼠科动物 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些抗体(例如,美国专利 4,816,567 号和 4,816,397 号)。人源化抗体是来自非人物种的抗体分子,其具有一个或多个来自该非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白的构架区(例如美国专利 5,585,089 号)。此类嵌合和人源化单克隆抗体可通过本领域公知的重组 DNA 技术产生。

[0092] 本文描述的抗体可用于任何如下检查试验中,在该试验中检查怀孕妇女血液的松弛素水平以确定该妇女与她们的健康对应者相比是否有更高的发展先兆子痫的风险。若血液中的松弛素水平下降至低于约 500pg/ml,则该妇女有更高的发展先兆子痫的风险,并需要小心地监测和/或在全部或部分妊娠期间用松弛素治疗。任选地,可进一步检查怀孕妇女血液的 CRP 水平,以实现更灵敏的测试。若血液中的 CRP 水平低于 1.5mcg/ml 或高于 13.5mcg/ml,则该妇女有甚至更高的可能性发展先兆子痫。任何允许精确确定血液中松弛素和/或 CRP 水平的测试手段均可在本文中应用,包括 ELISA、生物测试、免疫测试和其他手段。还可应用可商购的试剂盒。

#### [0093] 实验

[0094] 本文中使用了以下缩写:mg 或  $\mu$ g(微克);ml(毫升);pg(皮克);BMI(体重指数);CART(分类回归树);CI(置信区间);CREAT(肌酸酐);CRP(C-反应蛋白);ELISA(酶联免疫吸附测定法);HP(高血压、蛋白尿);HPU(高血压、蛋白尿、尿酸);HU(高血压、尿酸);R1x 或 RLX(松弛素)。

[0095] 以下具体实施例旨在举例说明本发明,而不应理解为对权利要求范围的限制。

#### [0096] 实施例 1

##### [0097] 先兆子痫怀孕妇女的研究

[0098] 松弛素是从卵巢黄体释放的肽激素,其为怀孕者中的强血管扩张剂。血清 H2 浓度在第一个三月期期间升高,并且在第二个三月期早期达到峰值,与显著的母体肾及全身血管扩张一致。相反,不充分的血管扩张适应性和升高的全身血管阻力是先兆子痫的标志。这一实施例描述了测量怀孕期间的血清松弛素、以及确定第一个三月期期间降低的血清松弛素与升高的先兆子痫发展风险的相关性。

[0099] 进行了 62 位少于 13 周孕龄的妇女的巢式病例-对照研究。在 62 例研究受试者中,37 位妇女发展了先兆子痫(由在 20 周孕龄后新发作的高血液和蛋白尿来定义)。剩余的受试者是血压正常的并且具有无并发症的妊娠。通过 ELISA(尽管其他测试法也适于这一目的,诸如生物测试法、RT-PCR 等)测量 H2 松弛素水平。应用包括逻辑斯蒂回归在内的描述性统计学用于数据分析。

[0100] 具体地,通过免疫测试法,应用 R&D Systems Analytical Testing Service(Minneapolis, MN),测量人松弛素 2 在血清中的浓度。在这一免疫测试法中使用的 H2 松弛素特异性单克隆抗体是由 3F2.F2 杂交瘤细胞产生的小鼠 IgG1。3F2.F2 杂交瘤细胞由 BAS Medical,即现在的 Corthera Inc. (San Mateo, CA) 开发,并根据布达佩斯条约于 2007 年 5 月 9 日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA),专利保藏号为 PTA-8423。应用了 3F2.F2 抗体的 H2 松弛素 ELISA 已经得到充分地确认。应用重组人 IGF-I、IGF-II、胰岛素(氨基酸 25-100)、胰岛素样 3、松弛素 1(H1) 和松弛素 3(H3) 没有观察到显著的交叉反应性或干扰。此外,应用重组犬、猪或啮齿类动物(小鼠和大鼠)松弛素 2 没有观察到显著的交叉反应性或干扰。

[0101] 先兆子痫妇女和对照之间的血清松弛素浓度没有显著差异(中位数和四分位距: 670.4[456.9-1117.2]vs. 802.3[570.8-966.4]pg/ml,  $p = 0.47$ )。然而,具有低于 477pg/ml 松弛素浓度(接近最低四分位数的截断值)的妇女具有 6.2(95% CI 1.3-30.7,  $p = 0.025$ )的发展先兆子痫的比值比(odds ratios)。在针对样本收集时的孕龄、体重指数(BMI)、种族和吸烟状况进行调整后,这些妇女具有高 7.4 倍的可能性发展先兆子痫(95% CI 1.4-38.9,  $p = 0.02$ ),这是意想不到地高的。这一强相关性在具有新发作的高血压、蛋白尿和高尿酸血症的妇女亚组中持续,所述亚组是更同质的先兆子痫子集,具有更高的不利后果率(调整后的 OR 6.9,95% CI 1.2-40,  $p = 0.03$ )。

[0102] 这一研究表明低血清松弛素浓度是先兆子痫的独立危险因素。继发于妊娠早期松弛素缺乏的不充分血管扩张适应性可能进一步促进先兆子痫的发病。

[0103] 实施例 2

[0104] 先兆子痫预测的统计学分析

[0105] 使用 CART(分类回归树)分析从 69 例怀孕妇女获得的数据,所述妇女具有表 2 所显示的特征。这一扩大分析基于从实施例 1 的最初研究受试者以及多个其他受试者得到的数据。用于先兆子痫预测的参数首先是 H2 松弛素水平,然后还有 C-反应蛋白(CRP)水平。如可从图 1 看到的那样,将

[0106] 妊娠期间的孕龄分解为三个阶段,即 0-15 周(第一个三月期)、15-25 周(第二个三月期)以及 25-35 周(第三个三月期)。图 1 描述了先兆子痫妇女(HPU 及 HP 组)相对于孕龄的血清松弛素浓度。线条连接了来自相同受试者的样本。三角形描述了来自后期发展先兆子痫并在第一个 15 周内具有低于 500pg/ml 的内源 H2 松弛素水平的怀孕妇女的样本。正方形描述了来自后期发展先兆子痫但在第一个 15 周内具有高于 500pg/ml 的内源 H2 松弛素水平的怀孕妇女的样本。菱形描述了来自没有发展先兆子痫的怀孕妇女的样本。应当注意,这些妇女中几无在第一个 15 周中具有低于 500pg/ml 的 H2 松弛素浓度。

[0107] 表 2 怀孕受试者的特征

[0108]

分类	总数	高加索人	非洲裔美国人
HP	15	11	4
HPU	19	12	7
HU	10	6	4
正常	25	16	9
共计	69	45	24

[0109] 在 CART 分析中,对在第一个 15 周期间自受试者采集的所有样本取平均值。这是

因为对于每一个受试者,有不同数量的被收集的在妊娠期的不同时间的样本。参考图 3 的分类树,分裂数是 1 且末节点数为 2。更具体地,上部方框显示有 35 例具有低于 476.7pg/ml 的天然 H2 松弛素水平的先兆子痫受试者(见虚线柱),以及 24 例具有高于 476.7pg/ml 的天然 H2 松弛素水平的正常受试者(见实线柱)。为进一步确定松弛素检查的特异性,将先兆子痫和正常受试者分为 2 组,左侧的框 2 显示低于或等于 476.7pg/ml H2 血清松弛素的那些受试者,以及右侧的框 3 显示高于 476.7pg/ml 血清 H2 松弛素的那些受试者。如可从左边框 2 看到的那样,在具有低于或等于 476.7pg/ml 松弛素的 H2 松弛素水平的那些个体当中,13 个个体发展了先兆子痫,而仅有一个个体具有正常的妊娠,这使得这一检查高度特异。如可在右边框 3 中看到的那样,在具有高于 476.7pg/ml 的 H2 松弛素水平的那些个体当中,23 个个体具有正常的妊娠以及 22 个个体发展了先兆子痫。右边框 3 显示的结果促使包含第二参数以增加该检查的灵敏度。

[0110] 图 4 显示了与图 3 相同的分类树,加入了基于 C-反应蛋白(CRP)水平的再一分裂。将具有高于 476.7pg/ml 的 H2 松弛素水平的受试者分裂为具有低于或等于 13.481mcg/ml CRP 水平的个体以及具有高于 13.481mcg/ml CRP 水平的个体。值得注意的,具有高于 13.81mcg/ml CRP 水平的那些妇女非常可能发展先兆子痫,其显示在框 5 中,框 5 表示 9 个发展先兆子痫的怀孕妇女以及具有正常妊娠的一个怀孕妇女。将框 4 进一步分裂为具有低于或等于 1.4681mcg/ml CRP 水平的个体以及具有高于 1.4681mcg/ml CRP 水平的个体。如可在框 6 看到的那样,7 个个体发展先兆子痫而仅有一个个体具有正常的妊娠,使得这一检查更为灵敏。通过应用 CRP 测定,该检查的灵敏度升高至 83%。

[0111] 图 5 显示了高血压妊娠(HPU、HU 和 HP 受试者,也参加表 1 和 2)的分类树。基于妊娠早期的血清 H2 松弛素和 CRP 浓度将受试者分为 4 组。通过应用这两个量度,获得了非常好的灵敏度水平。实际上,应用松弛素和 CRP 测量两者,特异性为 63%以及灵敏度为 96%。

[0112] 图 6 显示了高血压妊娠的另一分类树(即,48 位包括 HP、HPU 和 HU 在内的高血压妇女和 25 位正常妇女)。将受试者如图 5 那样基于血清 H2 松弛素和 CRP 水平、以及基于肌酸酐水平分裂,以进一步精化该预测。通过应用这三个分析物,开发了用于预测后期将发展高血压的妊娠的非常灵敏且特异的算法。应用松弛素、CRP 和肌酸酐(CREAT),特异性为 92%以及灵敏度为 87%。由于这些妇女不是先兆子痫,而仅是高血压妊娠的候选者,除 H2 松弛素和 CRP 之外,还应用 CREAT 确定高血压的可能性。

[0113] 实施例 3 在怀孕妇女中预测先兆子痫

[0114] 在怀孕早期从怀孕妇女收集血清样本。通过 ELISA 确定血清 H2 松弛素浓度和 CRP 浓度。应用图 3 显示的算法,确定发展先兆子痫的可能性。例如,若血清 H2 松弛素的水平为 300pg/ml,则对该患者进行治疗,以预防几乎确定的先兆子痫发展。若血清松弛素水平为 600pg/ml,则还检查 CRP 水平。若 CRP 水平超过 1.5mcg/ml 且低于 13.5mcg/ml,则认为该妊娠是正常怀孕。然而,若怀孕受试者的 CRP 水平落入这一范围之外,则她具有升高的发展先兆子痫的风险。

[0115] 在不背离本发明范围和精神的情况下,本发明的各种修饰和变形对本领域技术人员而言将是显而易见的。尽管已根据特定优选的实施方案描述了本发明,但应当理解不能将所要求保护的发明不适当地限定为此类特定的实施方案。实际上,用于实施本发明的所描述的方式的各种变形也在权利要求的范围之内,其中所述变形是本领域技术人员理解

的。

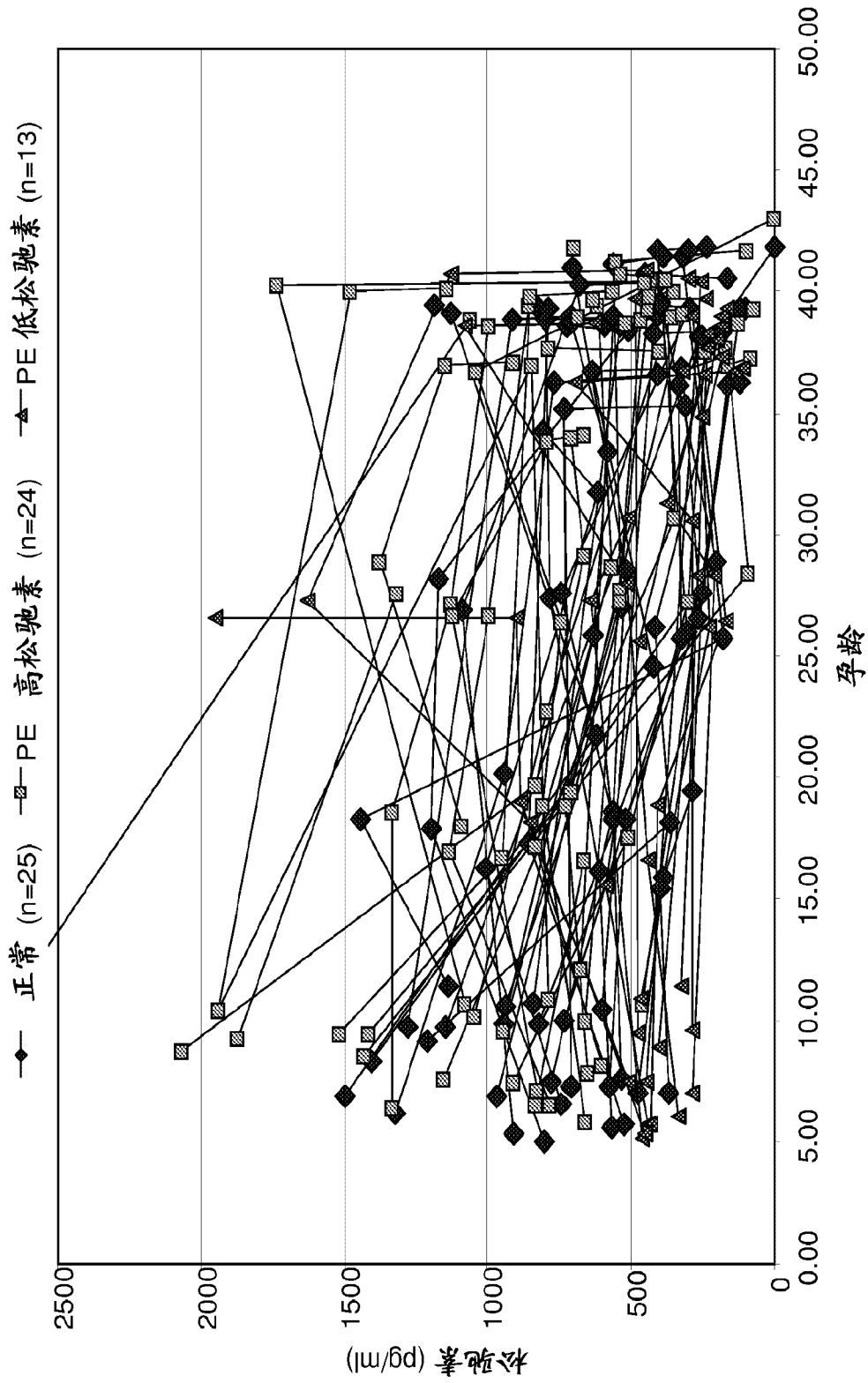


图 1

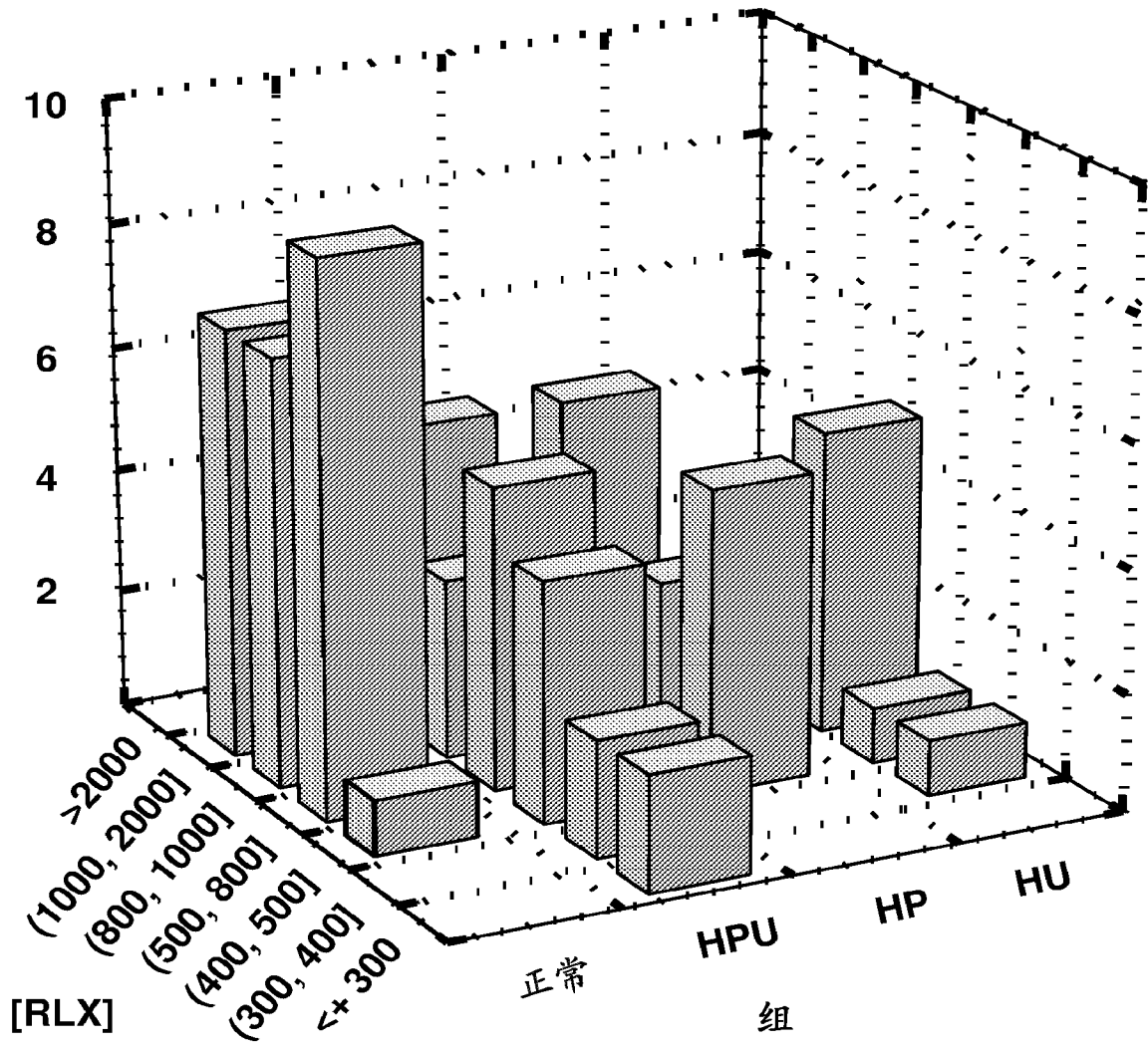


图 2

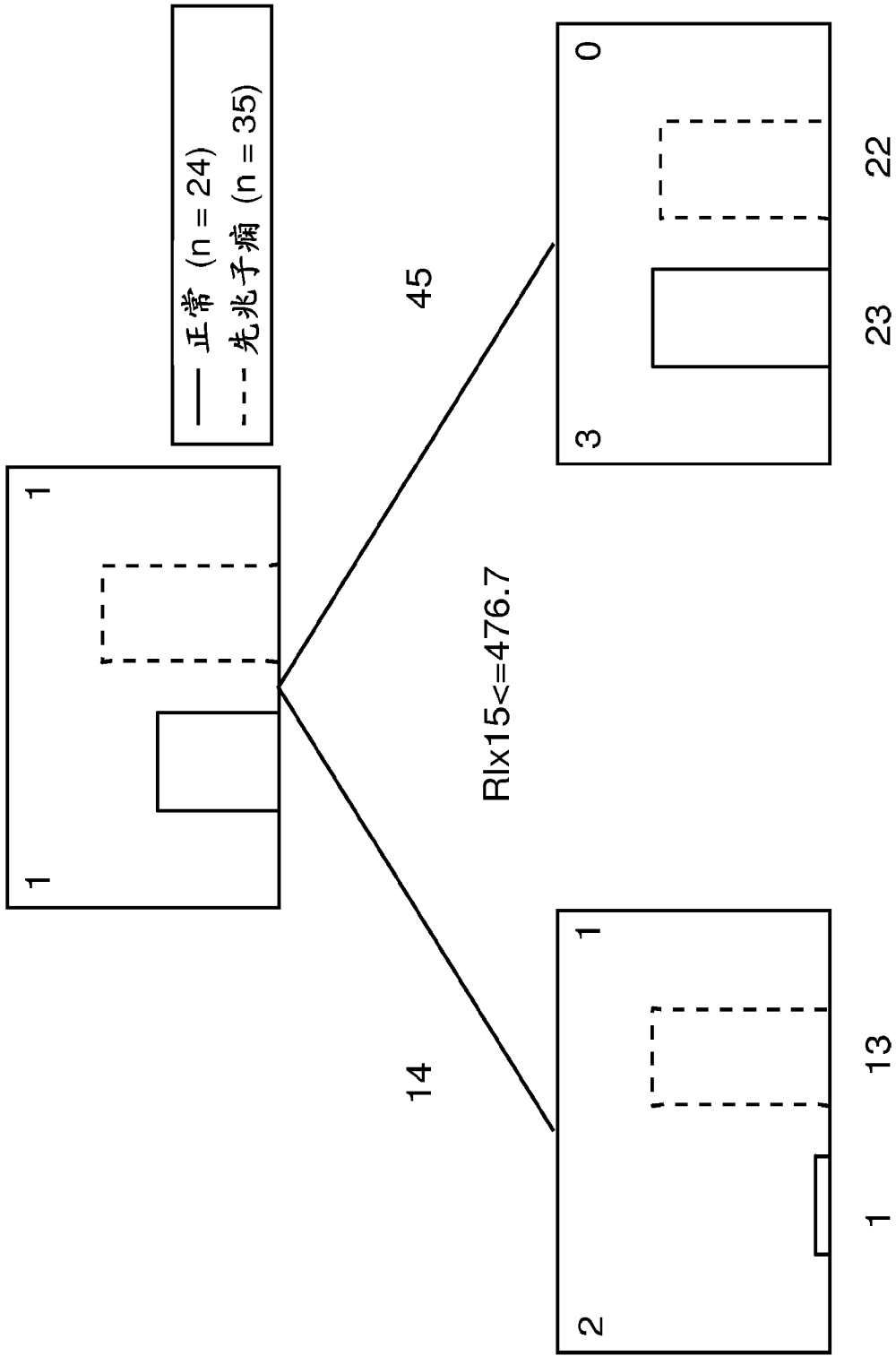


图 3

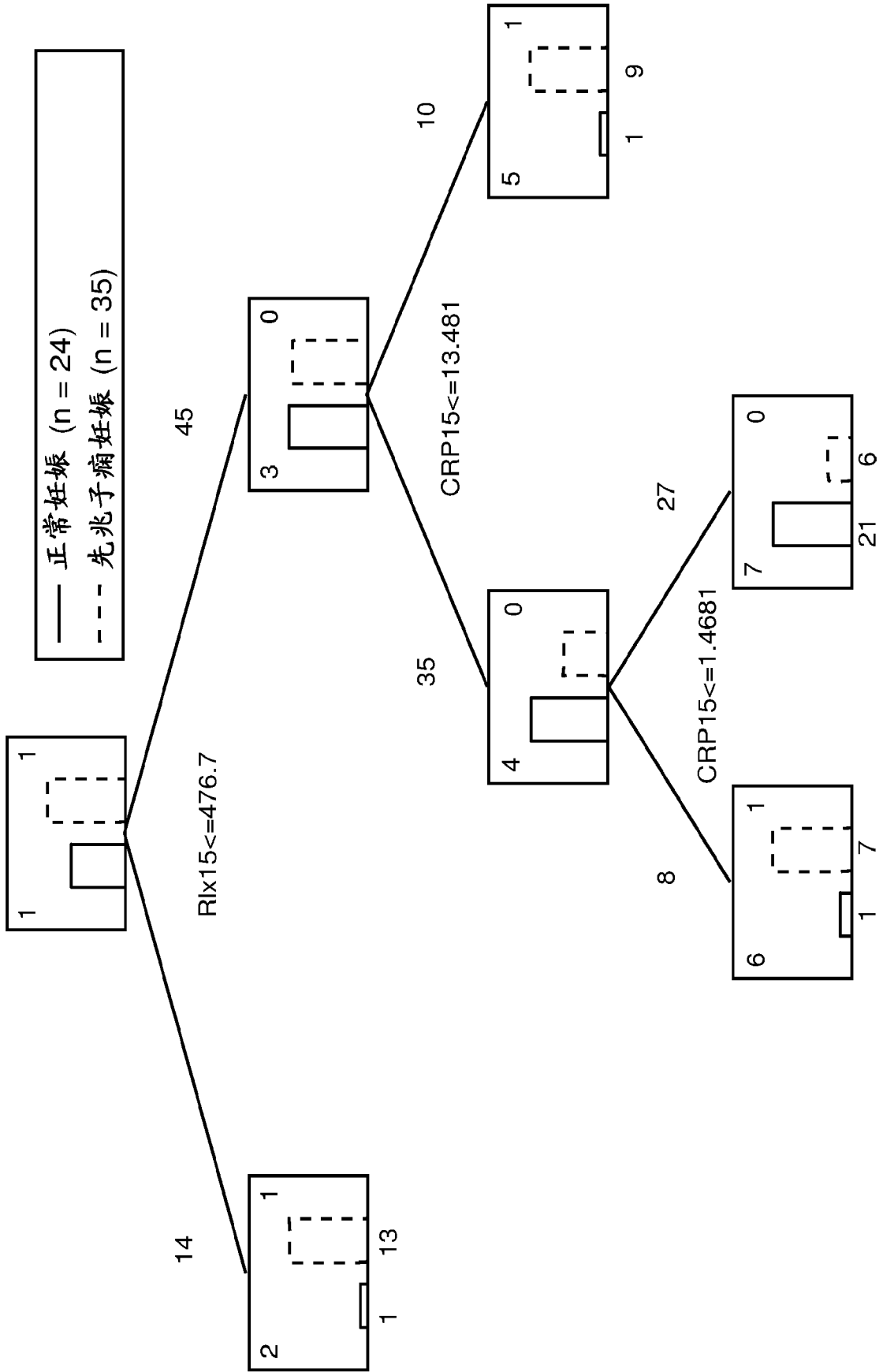


图 4

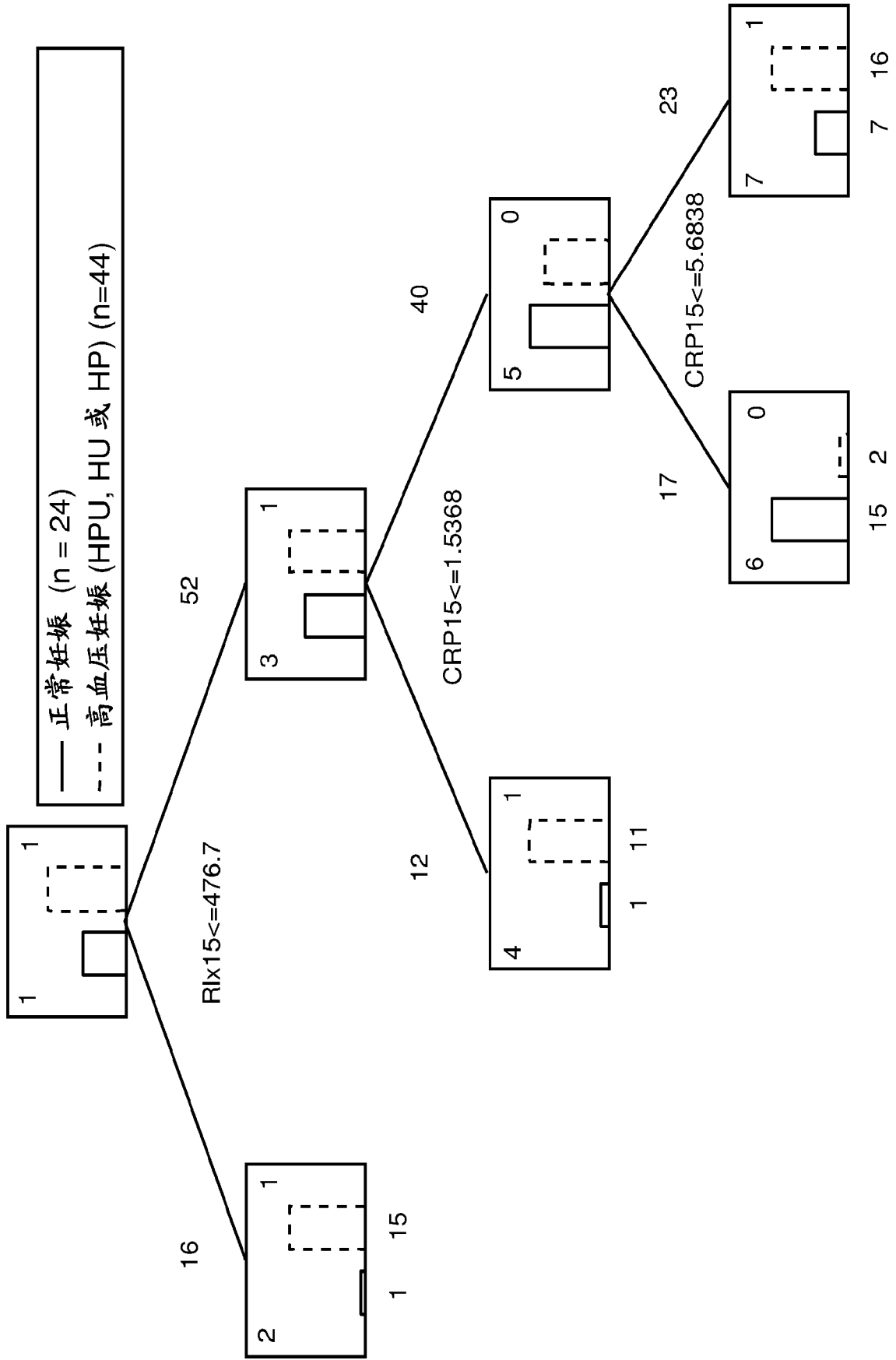


图 5

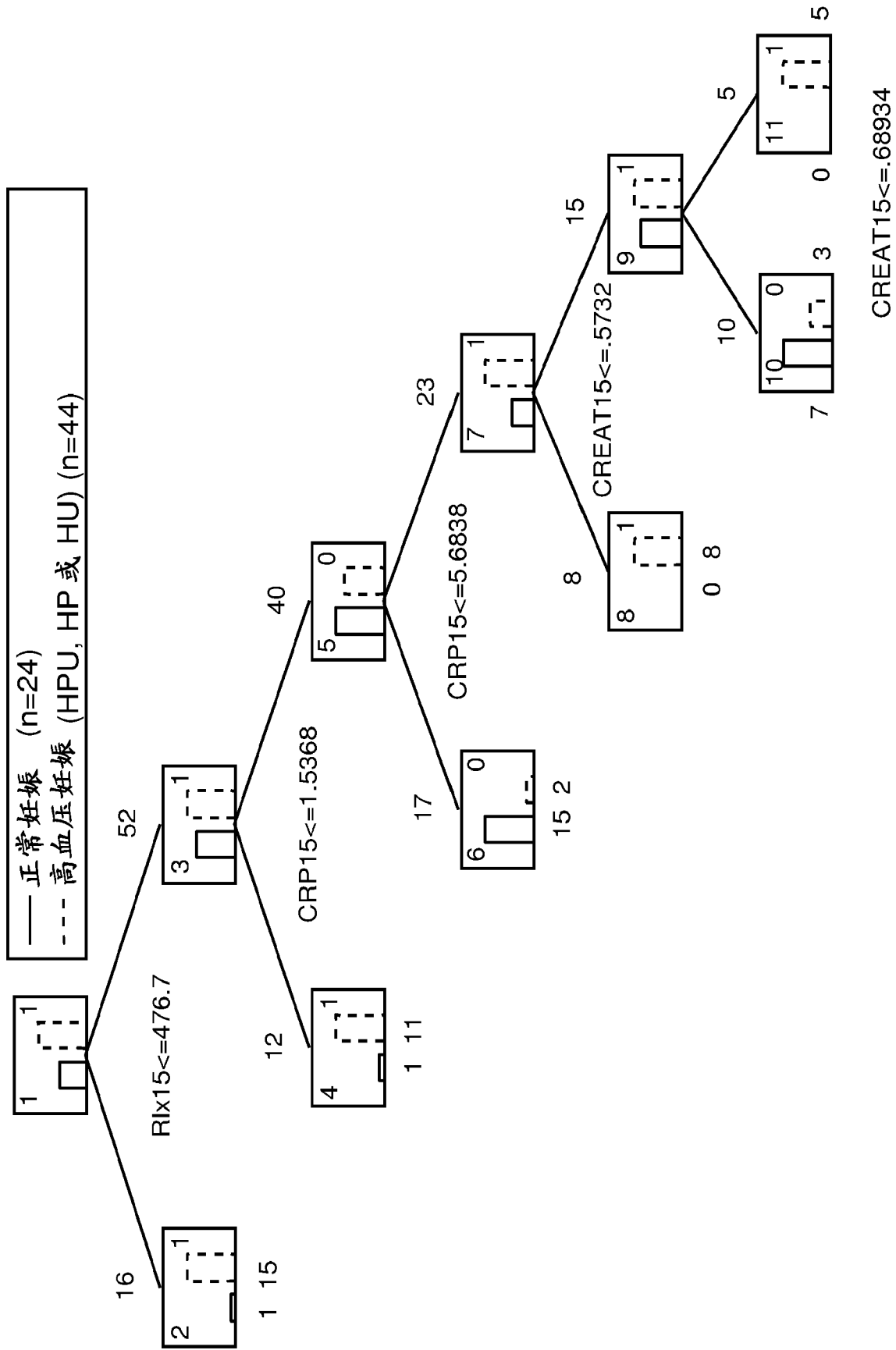


图 6

专利名称(译)	先兆子痫的预测和预防		
公开(公告)号	<a href="#">CN102224420B</a>	公开(公告)日	2014-09-17
申请号	CN200980146884.9	申请日	2009-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	科尔泰拉公司 佛罗里达大学研究基金公司		
申请(专利权)人(译)	科尔泰拉公司 佛罗里达大学研究基金公司		
当前申请(专利权)人(译)	科尔泰拉公司 佛罗里达大学研究基金公司		
[标]发明人	DR斯图尔特 KP康拉德 A耶亚巴兰		
发明人	D·R·斯图尔特 K·P·康拉德 A·耶亚巴兰		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/00		
CPC分类号	G01N33/689 G01N2800/50 G01N2800/368 A61P3/04 A61P13/12 A61P15/00 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/68 G01N2800/22		
审查员(译)	张绚		
优先权	61/200150 2008-11-24 US		
其他公开文献	CN102224420A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及评估怀孕妇女升高的先兆子痫风险的方法。本文描述的方法应用测量怀孕妇女生物样本中的松弛素水平，以及任选地测量C-反应蛋白水平。本发明还包括通过给怀孕妇女施予松弛素药物制剂而降低先兆子痫风险的方法。

