



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102822669 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201080049381. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 08. 19

G01N 33/48(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/235503 2009. 08. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/045957 2010. 08. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02011/022526 EN 2011. 02. 24

(71) 申请人 犹他州大学研究基金会

地址 美国犹他州

申请人 布里格姆·扬大学

IHC 医疗卫生服务公司

(72) 发明人 S·W·格拉夫 M·S·埃斯普林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 孔青 李进

权利要求书 2 页 说明书 27 页

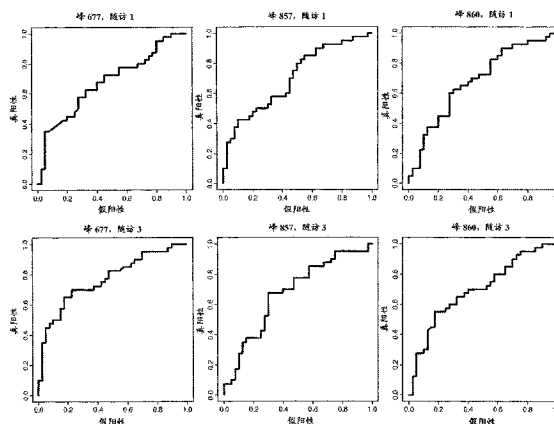
序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于评价早产风险的生物标志物的鉴定和定量

(57) 摘要

本文描述用于评价怀孕受试者中早产风险的方法。所述方法包括检测和定量来自受试者的生物样品中与早产有关的第一生物标志物和第二生物标志物。本文亦描述用于预测早产风险的分离的生物标志物和试剂盒。



1. 用于评价怀孕受试者中早产风险的方法,所述方法包括:
  - (a) 检测存在于来自受试者的生物样品中的第一生物标志物和第二生物标志物的组合,其中所述第一生物标志物包含氨基酸序列 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3 或其任何组合,和所述第二生物标志物为包括以下的蛋白质:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合;和
  - (b) 定量生物样品中所述第一和第二生物标志物的量。
2. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 包括测量所述第一和第二生物标志物的丰度。
3. 权利要求 2 的方法,所述方法还包括比较生物样品中所述第一和第二生物标志物的丰度与来源于未经历早产受试者的对照生物样品中所述第一和第二生物标志物的对照浓度,以确定早产风险增加。
4. 权利要求 3 的方法,其中确定早产风险增加包括确定所述生物样品中至少一种肽的丰度显著低于对照生物样品中至少一种肽的对照浓度。
5. 权利要求 2 的方法,所述方法还包括比较生物样品中所述第一和第二生物标志物的丰度与来自受试者的生物样品中参考分子的对照浓度,以确定早产风险增加。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述第一生物标志物包括至少两种具有氨基酸序列 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 或 SEQ ID NO 3 的肽。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述第一生物标志物包括至少三种具有氨基酸序列 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 或 SEQ ID NO 3 的肽。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述第二生物标志物为至少两种选自以下的蛋白质:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述第二生物标志物为至少三种选自以下的蛋白质:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述第二生物标志物为至少四种选自以下的蛋白质:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述第二生物标志物为促肾上腺皮质激素释放因子、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。
12. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述第一生物标志物为 SEQ ID NO 1。
13. 权利要求 1 的方法,其中检测步骤 (a) 包括蛋白质组学技术。
14. 权利要求 1 的方法,其中检测步骤 (a) 包括 (1) 在使得能够形成抗体-抗原复合物的条件下使所述生物样品与抗体接触,所述抗体对所述第一或第二生物标志物具有免疫特异性;和 (2) 测定所述抗体-抗原复合物的形成以检测生物样品中的所述第一或第二生物标志物。
  15. 权利要求 14 的方法,其中所述抗体包括单克隆抗体。
  16. 权利要求 14 的方法,其中所述抗体与载体分子偶联或缀合。
  17. 权利要求 14 的方法,其中所述抗体与固体载体偶联或缀合。

18. 权利要求 17 的方法,其中在形成所述抗体-抗原复合物之后,去除未结合固体载体上抗体的生物样品的任何组分。

19. 权利要求 1-18 中任一项的方法,其中所述生物样品包括血清、血浆、血液、尿、脑脊液、羊水、滑液、宫颈阴道分泌物、灌洗液或其任何组合。

20. 权利要求 1-18 中任一项的方法,其中所述生物样品为血清。

21. 权利要求 1-18 中任一项的方法,其中所述生物样品为血液。

22. 用于评价怀孕受试者中早产风险的方法,所述方法包含:

(a) 自受试者获得生物样品;

(b) 使所述生物样品与第一抗体和第二抗体接触,其中在使所述样品与所述第一抗体和第二抗体接触时,所述第一抗体结合第一生物标志物并形成第一抗体-抗原复合物和所述第二抗体结合第二生物标志物并形成第二抗体-抗原复合物;其中所述第一生物标志物包含氨基酸序列 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3 或其任何组合并且所述第二生物标志物为包括以下的蛋白质:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合;

(c) 对所述第一抗体-抗原复合物和第二抗体-抗原复合物的形成进行测定以定量生物样品中的其第一生物标志物和第二生物标志物的量;和

(d) 比较生物样品中的所述第一生物标志物和第二生物标志物的量与未经历早产受试者中相同生物标志物的量以评价早产风险。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述第一抗体和第二抗体独立地包括单克隆抗体。

24. 用于评价怀孕受试者中早产风险的试剂盒,所述试剂盒包括:

(a) 至少第一和第二抗体,其中所述第一抗体能够选择性结合具有包含 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 和 SEQ ID NO 3 的氨基酸序列的第一生物标志物并形成第一抗体-抗原复合物,和其中所述第二抗体能够选择性结合包括促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合的第二生物标志物并形成第二抗体-抗原复合物;和

(b) 测定所述第一抗体-抗原复合物和第二抗体-抗原复合物形成的与所述第一抗体和第二抗体功能性相关的指示物。

25. 权利要求 24 的试剂盒,所述试剂盒还包括经配置以定量生物样品中所述第一生物标志物和第二生物标志物量的指示物。

26. 权利要求 24 的试剂盒,其中所述第一抗体和第二抗体独立地包括单克隆抗体。

## 用于评价早产风险的生物标志物的鉴定和定量

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 该申请要求于 2009 年 8 月 20 日提交的美国临时申请序列号 61/253,503 的优先权。该申请通过引用以其整体就其全部教导结合到本文中。

[0003] 致谢

[0004] 导致本发明的研究部分地由国立卫生研究所资助（经费号为 R21HD047319 和 U01HD050080）。在本发明中美国政府拥有一定权利。

[0005] 序列表的交叉引用

[0006] 用序列标识符号码 (SEQ ID NO) 来引用本文描述的肽。SEQ ID NO 在数字上对应于序列标识符 <400>1、<400>2 等。用书写的计算机可读格式 (CFR) 表示的序列表通过引用以其整体结合到本文中。

[0007] 背景

[0008] 早产影响全部孕妇的多于 10%。其也是与新生儿相关的疾病和死亡的主要原因之一。与足月出生的婴儿相比较,过早出生的婴儿遭受 40 倍增加的新生儿死亡,并且对于主要医学并发症例如大脑性麻痹、慢性呼吸性疾病、失明和耳聋可处于显著增加的风险中。另外,长期神经和发育问题已在多达 70% 出生体重小于 1.5 磅的儿童中得到确定。据估计,仅在美国,这些并发症每年与数十亿美元的直接费用和未实现的潜能有关。

[0009] 尽管该问题的重要性,但关于体内发生的什么导致早产和分娩,一直存在不确定性。虽然有效处理这些问题的能力由于存在关于早产 (PTB) 原因的不确定性而仍是有限的,但如果给予足够的预警,医学专业人员可采取医疗措施。如果一个人可预测哪些孕妇有可能经历早产,则可给予可延迟或甚至预防早产的药物。另外,激素衍生物已知可提高胎儿肺成熟度,并且如果尽早检测到早产风险,如果经母亲给予胎儿所述衍生物,则因此可减少与早产有关的主要并发症之一。然而,目前似乎没有办法知道哪些孕妇处于出现该妊娠并发症的风险中。因此,一个重要且未满足的需要是制定用于早期检测处于早产风险中的母亲的试验程序。

[0010] 概述

[0011] 本文描述了用于评价怀孕受试者早产风险的方法。这些方法包括检测和定量来自受试者的生物样品中与早产相关的第一生物标志物和第二生物标志物。亦详述了可用于预测早产的生物标志物。本发明的优点将在随后的描述中部分地阐述,并且根据描述部分地将为清楚明了的,或者可通过实施下述方面而领会。下述优点将通过在所附权利要求中所特别指出的元素和组合来实现和达到。应理解的是,以上一般性描述和以下详细描述两者均仅为示例性和说明性的且不为限制性的。

[0012] 附图简述

[0013] 结合到该说明书并构成该说明书的部分的附图说明了下述几个方面。

[0014] 图 1 显示对于第一生物标志物筛查的接受者操作曲线 (receiver operator curve (ROC))。

[0015] 图 2 显示对于第一生物标志物和第二生物标志物筛查的生物样品接受者操作曲

线 (ROC)。

[0016] 详述

[0017] 在公开并描述本发明化合物、组合物和 / 或方法之前, 应理解的是, 下述方面不限于特定化合物、合成方法或用途, 因为这些当然可变化。还应理解的是, 本文使用的术语仅用于描述具体方面的目的而并非旨在限制。

[0018] 在该说明书和随后的权利要求书中, 将提及许多术语, 其将被限定具有以下含义:

[0019] 必须指出的是, 如说明书和所附权利要求中所用的, 单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“所述”包括复数指示对象, 除非上下文另外明确指明。因此, 例如提及“生物标志物”包括两种或更多种这样生物标志物的混合物等。

[0020] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情形可发生或可不发生, 并且所述描述包括其中事件或情形发生的情况和其中其不发生的情况。

[0021] 本文使用的“受试者”指处于早产风险并受益于本文所述方法的孕妇。

[0022] 本文使用的“早产 (preterm birth)”包括在完全妊娠期之前婴儿的分娩。例如, 认为少于 37 周妊娠期婴儿的分娩为早产。术语早产是提早分娩 (preterm delivery) 和提前分娩 (premature delivery) 的同义词。

[0023] 本文使用的术语“生物标志物”可用于指以不同浓度存在于孕妇体内并用于预测早产风险的天然存在的生物分子。例如, 生物标志物可为相对于未经历早产的受试者中相同生物标志物的量, 以更高或更低量存在于处于早产风险的受试者中的肽。生物标志物可包括除肽以外的其它分子包括小分子, 例如但不限于生物胺和类固醇。

[0024] 本文使用的术语“肽”可用于指包含通过一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的  $\alpha$  氨基连接的两个或更多个氨基酸的天然或合成分子。肽不受长度限制, 并且因此“肽”可包括多肽和蛋白质。

[0025] 本文使用的术语“分离的”, 就肽而言, 如果物质是天然存在的, 则指的是已从其原始环境移出的物质。例如, 存在于活动物中的天然存在的肽是未分离的, 但是从自然系统中的一些或所有共存物质中分离的相同肽是分离的。这样分离的肽可为组合物的部分并且仍可被分离, 因为所述组合物不是其自然环境的部分。“分离的”肽还包括合成的或经重组 DNA 技术制备的物质。

[0026] 本文使用的术语“特异性免疫反应的”指的是可测量和可重现的特异性免疫反应例如肽与抗体之间的结合, 所述抗体决定生物样品中或肽和其它生物制品的异源种群中肽的存在情况。术语“特异性免疫反应的”可包括结构形状和表面特征的特异性识别。因此, 在指定条件下, 与特定肽特异性免疫反应的抗体不以显著量结合存在于样品中的其它肽。多种免疫测定方式可用于测定与特定肽特异性免疫反应的抗体。例如, 固相 ELISA 免疫测定被常规用于选择与肽特异性免疫反应的单克隆抗体。参见例如 Harlow 和 Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York (其通过引用结合到本文中) 中的可用于测定特定免疫反应性的免疫测定方式和条件。

[0027] 本文使用的术语“抗体”指的是与给定抗原特异性免疫反应的免疫球蛋白。术语“抗体”意欲包括任何同种型 (IgG、IgA、IgM、IgE 等) 的完整抗体及其片段。本文使用的“抗体”还包括抗体制剂。使用本领域已知的各种技术, 抗体可用可检测标记来标记。标记

可为放射性同位素、荧光化合物、化学发光化合物、酶或酶辅因子或本领域已知的任何其它标记。在一些方面，与目的肽结合的抗体可不被标记，但反而可通过与第一抗体特异性结合的经标记第二抗体的结合来检测。

[0028] 本文使用的术语“检测”是指一种或多种生物标志物例如肽及其它生物分子的不可检测的、低的、正常的、或高血清浓度的定量测量。

[0029] 本文使用的术语“定量化”和“定量”可互换使用并且指测定样品中物质（例如生物标志物）的量或丰度（无论是相对还是绝对的）的方法。

[0030] 本文使用的术语“约”用于提供数值范围端点的灵活性，条件是给定的值可为所述端点的“高一点”或“低一点”而不影响所需结果。

[0031] 为了方便起见，本文使用的多个条目、结构元素、组成元素和 / 或物质可呈现在共同列表中。然而，这些列表应解释为好像列表的各成员各自确定为单独且独特的成员。因此，仅基于其在共同组中的呈现而没有相反指明，所述列表中的单个成员不应解释为相同列表中任何其它成员的实际等价物。

[0032] 本文中浓度、量及其它数值数据可用范围格式来表达或呈现。应理解所述范围格式仅为了方便和简洁起见而使用并因此应灵活地解释为不仅包括作为范围界限明确列举的数值，而且还包括所述范围内包括的所有单个数值或子范围，好像每一数值和子范围被明确列举。作为例证，“约 1- 约 5”的数值范围应解释为不仅包括明确列举的约 1- 约 5 的值，而且还包括所指明范围内的单个值和子范围。因此，包括在该数值范围内的为单个值例如 2、3 和 4 及子范围例如 1-3、2-4 和 3-5 等，以及单独地 1、2、3、4 和 5。该同样的原理适用于仅将一个数值列举为最小或最大值的范围。另外，不论所描述范围或特性的宽度，所述解释应适用。

[0033] 本文描述了用于鉴定处于早产风险中的怀孕受试者的方法。已鉴定了第一生物标志物和第二生物标志物，其可用于鉴定可处于早产风险中的在妊娠早期 - 中期期间的怀孕受试者。所述标志物可使得能够诊断区分早产与显示类似症状的其它病况。尽早鉴定处于更大早产风险中的受试者将具有相当大的价值，这样可更密切地监测受试者。

[0034] 当表明早产的第一生物标志物和第二生物标志物在受试者中可量化时，使用本文所述方法测试怀孕受试者可在怀孕期间的任何时间进行。例如，一方面，第一生物标志物和第二生物标志物可在约 20 周 - 约 34 周妊娠时测试。另一方面，第一生物标志物和第二生物标志物可在约 24 周 - 约 32 周妊娠时测试。应指出的是，这些范围不应视为限制，因为所述测试可在怀孕期间的任何时刻进行。相反地，提供这些范围是为了表明其中所述测试最有可能在大多数受试者中进行的妊娠周期的时期。

[0035] 在鉴定处于早产风险的受试者中有用的生物标志物包括各种肽和其它生物分子。用本文所述与早产发生率相关的技术和方法，已鉴定了某些肽和其它生物分子。这些肽和其它生物分子中一种或更多种的定量提供受试者早产风险的一些指征 (indication)，并因此可提供预防性治疗的机会。应指出的是，预测早产并发症的任何生物标志物应视为在本发明权利要求书的范围内。然而，一方面，与早产并发症相关的第一生物标志物或第二生物标志物的非限定性实例可包括经发现与对照受试者（即未经历早产并发症的孕妇）存在统计差异 ( $p \leq 0.01$ ) 和  $p$  (概率) 值  $< 0.02$  作为截断的分子和肽。

[0036] 一方面，生物标志物包括第一生物标志物和第二生物标志物。在该方面，第

一生物标志物可包括与早产有关的肽例如具有以下氨基酸序列或其任何组合的肽：  
QLGLPGPPDVPDHAAYHPF (SEQ ID NO 1)、

[0037] NVHSAGAAGSRMFRPGVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF (SEQ ID NO 2)、

[0038] NVHSAGAAGSRM<sup>(0)</sup>NFRPGVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF (SEQ ID NO 3)。另一方面，第二生物标志物可包括与早产有关的全长蛋白或蛋白质的肽片段。该第二生物标志物可包括但不限于促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合。在又另一方面，第二生物标志物包括促肾上腺皮质激素释放因子、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合。这些全长蛋白的序列可在 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 得到。

[0039] 用于鉴定生物标志物的如在国际公布号 WO 2008/079407 (其通过引用以其整体结合到本文中用于该申请内的所有目的) 中公开的蛋白质组学技术, 可用于鉴定和定量用于评价怀孕受试者中早产风险的生物标志物。一方面, 用于测试怀孕受试者潜在早产的方法可包括与对照 (即在不经早孕的孕妇中生物标志物的相对浓度或量) 相比较, 检测存在于生物样品中与早产有关的第一和第二生物标志物组合的浓度或量的差异。一方面, 蛋白质组学系统和方法可用于鉴定和定量第一和第二生物标志物。例如, 本文可使用比较来自不同生物样品的多个质谱, 在使用补偿非生物差异的方法之后对量不同的质量离子进行定位, 分离并表征目的生物标志物。这样的方法可包括分馏多个生物样品中的每一个以形成多个洗脱, 在多个洗脱时间得到来自多个洗脱中每一个的多个质谱, 并且找到生物样品之间似乎量上不同的目的分子离子峰。方法可另外包括鉴定对应于在生物样品之间基本上一致的内源性参考分子的质谱参考峰, 所述内源性参考分子具有与目的峰基本上类似的洗脱时间和质荷比, 并且通过将目的峰标准化为内源性参考分子的质谱峰来补偿每一个生物样品在多个洗脱之间的非生物变异。方法可进一步包括实施碰撞诱导的裂解研究, 所述研究使用多个碰撞能量中的每一个, 一次运行一个并将所生成的许多碎片离子质谱求和而不是平均化以形成单一的累积子碎片质谱, 并且使用子碎片质谱以建立氨基酸序列数据, 其然后用于鉴定对应于单一比对的质谱中目的峰的肽。

[0040] 另一方面, 含有第一和第二生物标志物的生物样品可经分馏以形成多个洗脱, 在多个洗脱时间得到来自多个洗脱中每一个的多个质谱, 并且鉴定对应于多个洗脱中每一个中洗脱的内源性比对分子的质谱比对峰。方法可进一步包括通过比对来自多个洗脱中每一个的质谱比对峰而比对来自各洗脱的许多质谱, 将许多所比对的质谱求和形成单一比对的质谱, 并且鉴定对应于单一比对的质谱中目的峰的肽。尽管考虑各种技术, 但一方面比对许多质谱可进一步包括目视比对许多质谱。另外, 分馏存在于多个生物样品中的多种生物分子中的每一种可通过许多方法来实现, 例如通过毛细管液相色谱 (cLC)。用于检测和定量本文所述第一和第二生物标志物的具体方法和参数在实施例中提供。

[0041] 用于检测和定量本文所描述第一和第二生物标志物的蛋白质组学技术利用对于用作内部对照的所有血清为天然的分子, 其可用于校正样品加载、电离效率和质谱仪灵敏度的差异。进一步关于以上讨论, 如果在比较组之间峰可显示量上相似, 其被选为参考, 在与候选生物标志物相同的洗脱窗口中来自柱的洗脱物在其质荷比方面与候选生物标志物相似, 并且足够丰富, 使得每一个样品将具有多于 3 倍噪声水平的量。这里所描述的参考峰为与试样处理、色谱加载、电离效率或仪器灵敏度波动相关但不是由于峰数量的生物差异

的峰高或面积的定量校正。该参考称为内部定量对照。在其它方面,外部对照可用于促进生物标志物的定量。在该方面,可将已知量的化合物加入到生物样品中以便可计算生物标志物与对照的比率。所述比率然后可与来自对照样品的比率相比较以评价早产的风险。

[0042] 如以上所描述的,包括 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合的第一生物标志物已被鉴定为早产的预测物 (predictor)。内部定量对照用于定量 SEQ ID NOs 1-3。用于 SEQ ID NO 1(m/z 677) 的参考 (即内部对照) 对于其单同位素峰的 +3 荷电状态具有 673.36 的 m/z。中性母体质量 (neutral parent mass) 为 2017.07 质量单位,并且色谱洗脱时间为 15.5 分钟。然而,假定洗脱时间将在不同日或伴随更换柱稍微变化,将洗脱时间提供为其洗脱时间相对于内部时间对照的分数 (0.9968, 即其洗脱比内部时间对照早其自身保留时间的 0.0032 倍) 和作为其洗脱时间与 SEQ ID NO 1(m/z 677) 比较的分数 (1.0558, 即其洗脱比生物标志物早其自身洗脱时间的 0.05286)。

[0043] 第二内部定量对照用作 SEQ ID NO 2(m/z 857) 和 SEQ ID NO 3(m/z 860) 的参考。参考分子的 m/z 在其 +5 荷电状态为 842.39, 中性母体质量为 4206.07 质量单位。色谱洗脱时间为约 15.8 分钟。然而,考虑到洗脱时间可变性,其洗脱时间更适当地相对于内部时间对照和 SEQ ID NO 2(m/z 857) 的洗脱时间来描述。关于内部时间对照,内部定量对照在内部时间对照的洗脱之后洗脱为其自身洗脱时间 0.0159 倍洗脱时间的因子 (或时间对照标志物的 1.0161 的比率)。关于 SEQ ID NO 2(m/z 857), 内部定量标志物在生物标志物之后实现其自身洗脱时间 0.0539 倍的因子 (或生物标志物洗脱时间的 1.0700 的因子)。

[0044] 尽管各质量可由洗脱时间 (保留时间) 确定,洗脱时间 (保留时间) 也可表示为内部时间对照的函数。这通过生物标志物之前的时间标记与目的峰之后的时间标记之间的目的峰的相对位置来测定。认为该测定为  $R_f$  值。 $R_f$  值计算如下:

[0045]  $R_f = (\text{生物标志物的洗脱时间} - \text{时间标记之前的洗脱时间}) / (\text{时间标记之后的洗脱时间} - \text{时间标记之前的洗脱时间})$ 。

[0046] 使用上述技术,包括 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合的第一生物标志物已被鉴定为早产的指示物 (indicator)。关于第一生物标志物 (即 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合) 的鉴定和定量的具体细节在实施例中提供。对于 SEQ ID NOs 1-3 的另外结构性质在下文提供。SEQ ID NO 1, 其为肽, 在 677 具有质量离子峰 (m/z), 平均质量为 2026.98 道尔顿, 平均洗脱时间为  $14.30 \pm 0.47$  分钟, 和  $R_f$  值为  $0.535 \pm 0.052$ 。

[0047] SEQ ID NO 2, 其为肽, 在 857 具有质量离子峰 (m/z), 平均质量为 4279.25 道尔顿, 平均洗脱时间为  $17.20 \pm 2.04$  分钟, 和  $R_f$  值为  $0.781 \pm 0.086$ 。

[0048] SEQ ID NO 3, 其为肽, 在 860 具有质量离子峰 (m/z), 平均质量为 4295.25 道尔顿, 平均洗脱时间为  $16.13 \pm 1.97$  分钟, 和  $R_f$  值为  $0.695 \pm 0.134$ 。

[0049] 使用以上和在实施例中描述的技术, 第二生物标志物, 其包括促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合, 当与第一生物标志物 (即 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合) 结合时已被鉴定为早产的指示物。

[0050] 因此, 提供了用于评价怀孕受试者潜在早产的方法。一方面, 方法包括检测来自受试者的生物样品中与早产有关的本文所描述第一和第二生物标志物, 其中所述第一生物标志物具有与序列 (由 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 或 SEQ ID NO 3 表示的序列) 相同或同源

的氨基酸序列,和所述第二生物标志物包括促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合。接着,对生物样品中第一和第二生物标志物的丰度进行定量。在处理和分离之后第一和第二生物标志物的丰度作为也存在于生物样品中用作内部对照组的参考分子的函数得以测量。本文使用的术语“丰度”代表在给定质谱中经质谱仪测量的特定质量离子的数目或在代表完全洗脱区间的几个质谱中观察到的特定质量离子数目的总和。生物标志物丰度对该内部对照的标准化减少非生物变异并提高在风险预测中利用生物标志物的能力。换句话说,通过选择在受试者之间以相对恒定的丰度存在于生物样品中用于参考的分子,在生物样品处理中的差异可经校正,特别是当比较在不同日实施且可经长的时间期间展开的运行。这样,依所涉及的特定生物标志物而定,生物标志物的相对丰度可变化。因此可对于每一个生物标志物/参考比率建立特定截断值使得高于或低于一定值的生物标志物峰值丰度与参考峰值丰度的比率可为早产风险显著增加的预测。

[0051] 对于潜在早产的测试也可通过比较来自受试者具有表明正常分娩的已知丰度的那些相同生物标志物的生物样品中第一和第二生物标志物的丰度来实现。一方面,如果第一生物标志物为单独的 SEQ ID NO 1 或与 SEQ ID NOs 2 和 3 的任何组合的 SEQ ID NO 1,如果受试者具有所测量的 SEQ ID NO 1 丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 50%,那么可发生早产。另一方面,如果受试者具有所测量的单独 SEQ ID NO 1 或与 SEQ ID NOs 2 和 3 组合的 SEQ ID NO 1 的丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 30%,那么可发生早产。在又另一方面,如果受试者具有所测量的单独 SEQ ID NO 1 或与 SEQ ID NOs 2 和 3 组合的 SEQ ID NO 1 的丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 10%,那么可发生早产。

[0052] 另一方面,如果第一生物标志物为 SEQ ID NO 2,如果受试者具有所测量的 SEQ ID NO 2 丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 50%,那么可发生早产。另一方面,如果受试者具有所测量的 SEQ ID NO 2 丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 30%,那么可发生早产。在又另一方面,如果受试者具有所测量的 SEQ ID NO 2 丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 10%,那么可发生早产。

[0053] 另一方面,如果第一生物标志物为 SEQ ID NO 3,如果受试者具有所测量的 SEQ ID NO 3 丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 55%,那么可发生早产。另一方面,如果受试者具有所测量的 SEQ ID NO 3 丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 35%,那么可暗示早产。在又另一方面,如果受试者具有所测量的 SEQ ID NO 3 丰度为小于至少 22 周妊娠的对照丰度的约 15%,那么可发生早产。

[0054] 可含有第一生物标志物和第二生物标志物的任何类型生物样品可经筛查,包括这样的非限制性实例例如血清、血浆、血液、尿、脑脊液、羊水、滑液、宫颈阴道分泌物、灌洗液、组织及其组合。

[0055] 尽管第一生物标志物(即 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合)和第二生物标志物存在于大多数孕妇体内,但持续经历早产的许多孕妇在妊娠期间与具有正常分娩的妇女相比较具有较低血清浓度的第一生物标志物。然而,依所筛查的具体蛋白质或肽而定,与具有正常分娩的妇女相比较,持续经历早产的妇女的第二生物标志物(即促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合)更低或更高。关于第二生物标志物血清浓度的进一步细节参见实施例部分的表

16. 值得注意的是, 先前已评价了第二生物标志物对于早产的可预测性。参见 Goldenberg RL, Iams JD, Mercer BM, Meis PJ, Moawad A, Das A, Miodovnik M, Vandorsten PJ, Caritis SN, Thurnau G, Dombrowski MP; Maternal-Fetal Medicine Units Network. 早产预测研究: 关于用于自发性早产的多标志物试验 (The Preterm Prediction Study: toward a multiple-marker test for spontaneous preterm birth). *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(3):643-51。然而, 如由以上所提及参考文献指出的那样, 当不存在第一生物标志物下检测和定量第二生物标志物 (即促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合) 时, 其不提供足够的用于临床预测 PTB 的特异性或灵敏度。

[0056] 一方面, 与对照相比, PTB 病例中第一生物标志物 (即 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合) 较不丰富。因此, 比较来自受试者的生物样品中一种或更多种第一生物标志物的丰度相对于来自未经历早产受试者的已知对照浓度, 或者相对于来自所测试受试者的已知生物标志物浓度, 可预测早产。具有较高或较低第一生物标志物丰度的那些受试者可具有增加的早产风险, 并可因此足够早地被鉴定以使得能够适当治疗。在预测早产中特定生物标志物的丰度在以下详细描述。

[0057] 一方面, 为了计算早产受试者和对照受试者的生物标志物丰度, 在 28 周妊娠时对第一生物标志物取对数比。例如,  $\log 676.7/673.36$  (SEQ ID NO 1/参考峰) 的对数比得到平均对照为  $0.579 \pm 0.101$  和平均 PTB 为  $-0.015 \pm 0.090$ 。  $\log 856.8/842.8$  (SEQ ID NO 2/参考峰) 的对数比得到平均对照 (未经历早产的受试者) 为  $0.231 \pm 0.102$  和平均 PTB (处于早产风险中的受试者) 为  $-0.149 \pm 0.095$  (实施例中表 12)。参照实施例中表 12, 计算其它生物标志物的对数比。  $\log 860.0/842.8$  (SEQ ID NO 3/参考峰) 的对数比得到平均对照为  $0.201 \pm 0.096$  和平均 PTB 为  $-0.204 \pm 0.088$ 。换句话说, 处于早产风险中的受试者将最可能单独或共同地呈现 SEQ ID NO 1 减小、SEQ ID NO 2 减小和 SEQ ID NO 3 减小。

[0058] 考虑到所述描述, 一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 1 (m/z 677) 的丰度与参考分子在 m/z 673 的丰度的比率被测量为小于约 1.0, 那么其可为早产风险显著增加的预测。另一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 1 (m/z 677) 的丰度与参考分子在 m/z 673 的丰度的比率被测量为小于约 0.8, 那么其可为早产风险显著增加的预测。在又另一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 1 (m/z 677) 的丰度与参考分子在 m/z 673 的丰度的比率被测量为小于约 0.6, 那么其可为早产风险显著增加的预测。

[0059] 另外, 一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 2 (m/z 857) 的丰度与参考分子在 m/z 843 的丰度的比率被测量为小于约 0.6, 那么其可为早产风险显著增加的预测。另一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 2 (m/z 857) 的丰度与参考分子在 m/z 843 的丰度的比率被测量为小于约 0.5, 那么其可为早产风险显著增加的预测。在又另一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 2 (m/z 857) 的丰度与参考分子在 m/z 843 的丰度的比率被测量为小于约 0.44, 那么其可为早产风险显著增加的预测。

[0060] 另外, 一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 3 (m/z 860) 的丰度与参考分子在 m/z 843 的丰度的比率被测量为小于约 0.6, 那么其可为早产风险显著增加的预测。另一方面, 在至少 22 周妊娠, 如果 SEQ ID NO 3 (m/z 860) 的丰度与参考分子在 m/z 843 的丰度的比率被测量为小于约 0.4, 那么其可为早产风险显著增加的预测。在又另一方面, 在至

少 22 周妊娠,如果 SEQ ID NO 3(m/z 860) 的丰度与参考分子在 m/z 843 的丰度的比率被测量为小于约 0.2,那么其可为早产风险显著增加的预测。

[0061] 在某些方面,以上所计算的对数比可用于统计学预测处于经历早产风险中的孕妇的风险。第一生物标志物和第二生物标志物预测能力的一种公用量度为其灵敏度和特异性。本文使用的“灵敏度”为作为真阳性率定义的统计术语(例如经生物标志物正确鉴定,后来经历早产的孕妇百分数)。本文使用的术语“特异性”定义为真阴性率(例如正确鉴定无并发症妊娠的孕妇百分数)。为了使用本文描述的第一生物标志物和第二生物标志物用于预测早产,建立数字阈值。为了建立数字阈值,对于特定生物标志物的数值范围考虑从最低至最高并且在每一个点受试者百分数正确鉴定为阳性和在相同点对照百分数错误鉴定为阳性。对于特定生物标志物的值范围可通过从具体数据集的最低至最高取实际数量值来计算。这称为接受者操作曲线(ROC)。一方面,假阳性率可限于 20%,其通常认为是临床试验所能容许的最大值。假阳性率(即由生物标志物鉴定处于经历早产风险中的无并发症妊娠的妇女百分数)根据 100%减去真阴性率来计算。在 20%或更小假阳性率的阈值,其相当于特异性为 80%或者更高,确定用于确定某人处于风险中还是不处于风险中的阈值。

[0062] 参照实施例中的表 13 和 14,对于 4 个对数比(即第一生物标志物)中每一个的阈值经测定用于鉴定处于早产风险中的受试者。计算每一个的阈值使得存在 80%或者更多的特异性(真阴性率),其与不多于 20%的假阳性率相同。使用数学上测定的阈值,4 个比率独立地提供灵敏度(真阳性)和特异性(真阴性)比率(表 13 和 14)。参照表 14,SEQ ID NO 1(即 log 677/673) 的比率对于预测早产提供最大的灵敏度(65%)和特异性(85%)。因此,一方面,鉴定和定量存在于孕妇中的 SEQ ID NO 1(即 log 677/673) 为经历早产可能性的准确预测物。尽管 SEQ ID NO 1(即 log 677/673) 的比率为有用的,也预期对数比的组合可用于预测早产风险。因此,本文鉴定的第一生物标志物(即 SEQ ID NOs 1-3) 为预测早产风险的强有力工具。

[0063] 本文所描述的第一生物标志物可预测早产。然而,在一些情况下对于早产的测试预测值可通过筛查和定量第二生物标志物而改进。一方面,可筛查来自受试者的生物样品中的第一生物标志物和第二生物标志物,其中所述第一生物标志物为与由 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3 表示的序列相同或同源的氨基酸序列或其任何组合,和所述第二生物标志物为促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合。在该方面,当单独筛查第二生物标志物时,其不为 PTB 的指征。然而,当以与第一生物标志物的组合(即 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合)来筛查第二生物标志物时,与单独筛查第一生物标志物相比较,预测 PTB 的灵敏度增加。一方面,当针对 PTB 而一起筛查第一和第二生物标志物时,灵敏度为大于 80%或者为 80-90%。在某些方面,灵敏度为 90%或者更大。另一方面,当针对 PTB 而一起筛查第一和第二生物标志物时,特异性为至少 80%。为了比较,当仅检测和定量第一生物标志物时,灵敏度为约 65%。

[0064] 一方面,当筛查生物样品中的第二生物标志物时,所述第二生物标志物为至少两种选自以下的蛋白质:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。

[0065] 另一方面,当筛查生物样品中的第二生物标志物时,所述第二生物标志物为至少

三种选自以下的蛋白质：促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。

[0066] 在另一方面，当筛查生物样品中的第二生物标志物时，所述第二生物标志物为至少四种选自以下的蛋白质：促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。

[0067] 在又另一方面，当筛查生物样品中的第二生物标志物时，所述第二生物标志物为五种蛋白质，其包括促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。

[0068] 表 1-6 包括但不限于其可经筛查以预测 PTB 的第一和第二生物标志物的可能组合。在这些表中，第一生物标志物包括 SEQ ID NO 1 (单独或者与 SEQ ID NOs 2 和 3 组合)、SEQ ID NO 2 (单独或者与 SEQ ID NOs 1 和 3 组合) 和 SEQ ID NO 3 (单独或者与 SEQ ID NOs 1 和 2 组合) 并且第二生物标志物包括蛋白质 (即促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合) 的各种组合。例如，在表 1 中，第一生物标志物为 SEQ ID NO 1 并且第二生物标志物选自包括以下的列表：促肾上腺皮质激素释放因子、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合。因此，一方面，第一生物标志物可包括 SEQ ID NO 1 并且第二生物标志物可包括促肾上腺皮质激素释放因子。另一方面，第一生物标志物可包括 SEQ ID NO 1 并且第二生物标志物可包括促肾上腺皮质激素释放因子和凝血酶抗凝血酶复合物。在又另一方面，第一生物标志物可包括 SEQ ID NO 1 并且第二生物标志物可包括促肾上腺皮质激素释放因子、凝血酶抗凝血酶复合物和铁蛋白。在又另一方面，第一生物标志物可包括 SEQ ID NOs 1、2 和 3 并且第二生物标志物可包括促肾上腺皮质激素释放因子、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。表 1-6 每一个可通过该方法来解释。

[0069]













实例如血清、血浆、血液、尿、脑脊液、羊水、滑液、宫颈阴道分泌物、灌洗液、组织及其组合。然而,一方面,可为便利的是,筛查得自受试者的血清样品中的肽。另一方面,可为便利的是,筛查得自受试者的血液样品中的肽。

[0076] 本文还描述了可用于预测怀孕受试者将经历早产的概率的分离肽(即第一生物标志物和第二生物标志物)和分离肽的混合物。这样的蛋白质和肽可用作许多试验测定中的阳性对照以及用于产生抗体。一方面,例如,所分离的蛋白质或肽为具有与由 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 或 SEQ ID NO 3 表示的序列相同或同源的氨基酸序列的第一生物标志物。另一方面,第二生物标志物为包括以下的分离蛋白质或肽:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其组合。肽合成为本领域熟知,并且应理解为一且拥有肽序列,本领域普通技术人员之一能够使用多种技术来合成本文所公开的肽。所述技术可不受限地包括液相合成和固相合成方法以及各种化学连接方法例如优先硫醇捕获、天然化学连接、表达的蛋白质连接、酰基启动的捕获和施陶丁格连接(Staudinger ligation)方法,仅举几例。另外,肽也可使用重组 DNA 技术来合成。

[0077] 在某些方面,以上所描述的蛋白质组学技术可用于鉴定和定量生物标志物;然而,能够检测和/或定量生物样品中生物标志物的其它方法相应地可在本文中使用。一种潜在类型的肽测定包括免疫测定。许多免疫测定方案为已知,其利用抗体来筛查生物样品中的特定肽,包括均相和非均相的以及竞争性和非竞争性方法。例如,这样的技术可包括使用固体载体、免疫沉淀等。然而,通常,用于检测肽的免疫测定通常包涉及使用标记抗体。这样的标记可包括已知的任何类型物质,包括荧光标记、化学发光标记、放射性标记、酶标记等。这样,应理解的是,所述免疫测定试验为本领域熟知,并且用于检测生物样品中肽的特定方法不应视为限于本发明权利要求书的范围。免疫测定将在下文更充分讨论。

[0078] 在其它方面,可使用对本文所描述的第一生物标志物和第二生物标志物具有特异性免疫反应性的抗体。一方面,例如,提供了对具有包含 SEQ ID NO 1 的氨基酸序列的第一生物标志物具有免疫特异性的抗体。另一方面,提供了对具有包含 SEQ ID NO 2 的氨基酸序列的第一生物标志物具有免疫特异性的抗体。在又另一方面,提供了对具有包含 SEQ ID NO 3 的氨基酸序列的第一生物标志物具有免疫特异性的抗体。

[0079] 一方面,提供了对其中第二生物标志物为促肾上腺皮质激素释放因子的第二生物标志物具有免疫特异性的抗体。另一方面,提供了对其中第二生物标志物为防卫素的第二生物标志物具有免疫特异性的抗体。另一方面,提供了对其中第二生物标志物为铁蛋白的第二生物标志物具有免疫特异性的抗体。另一方面,提供了对其中第二生物标志物为乳铁蛋白的第二生物标志物具有免疫特异性的抗体。另一方面,提供了对其中第二生物标志物为凝血酶抗凝血酶复合物的第二生物标志物具有免疫特异性的抗体。另一方面,提供了对其中第二生物标志物为肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体的第二生物标志物具有免疫特异性的抗体。

[0080] 抗体可为多克隆、单克隆或重组抗体,并且它们可通过任何本领域已知的方法产生。抗体片段也认为在本发明的范围内。本发明方面的抗体可来自任何动物来源包括鸟类和哺乳动物。一方面,例如,抗体可来源于人、鼠科动物(例如小鼠和大鼠)、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马、鸡等。

[0081] 一方面,多克隆抗体可用于独立地检测和定量生物样品中本文所描述的第一生物标志物和第二生物标志物以评价早产风险。多克隆抗体可通过本领域普通技术人员熟知的多种方法产生。例如,多克隆抗体可在宿主动物例如兔、大鼠、小鼠、绵羊、山羊等体内产生。宿主动物用游离或载体偶联的肽例如经腹膜内和/或皮内注射来免疫。注射物质通常为含有约 100  $\mu$ g 肽或载体蛋白的乳剂。依宿主种类而定,多种佐剂可用于增加免疫反应。佐剂的实例可不受限地包括弗氏佐剂(完全和不完全的)、矿物凝胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、普卢兰尼克多元醇(pluronic polyols)、聚阴离子、肽类、油乳剂、镇眼帽贝血蓝蛋白、二硝基酚,和潜在有用的人佐剂例如卡介苗菌株(BCG)和短小棒状杆菌。这些和其它佐剂为本领域熟知。在一些情况下以约 2 周间隔可能需要几次加强注射,以提供可被检测的有用抗体效价。在来自所免疫动物血清中的抗体效价可通过选择抗体,例如通过将肽吸附到固体载体上并根据本领域熟知的方法洗脱所选择的肽来增加。

[0082] 另一方面,单克隆抗体可用于独立地检测和定量生物样品中的第一生物标志物和第二生物标志物以评价早产风险。单克隆抗体指仅识别一种抗原的抗体。这些抗体由产生单一抗体的杂交瘤细胞的子细胞而产生。单克隆抗体通常对于任何与其免疫反应的表位显示单一亲和力。单克隆抗体可含有具有多个抗体结合部位的抗体分子,每一个结合部位对不同的表位具有免疫特异性,例如双特异性单克隆抗体。单克隆抗体可通过本领域技术人员已知的多种方法得到。参见例如, Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); 美国专利号 4376110; Ausubel 等编辑, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. 和 Wiley Interscience, N.Y., (1987,1992); 和 Harlow 与 Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan 等编辑, *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. 和 Wiley Interscience, N.Y., (1992,1993), 其中每一个通过引用结合到本文中。

[0083] 还应指出的是,用于本文的抗体可为单一特异性或多特异性(例如双特异性、三特异性或具有更大的多重特异性)。多特异性抗体可对肽的不同表位具有特异性,或者它们可对目的肽和异源表位(例如异源肽或固体载体材料)两者具有特异性。另外,抗体也可自本文所描述的任何区域生物标志物制备。

[0084] 作为实例,单克隆抗体可使用良好建立的方法制备。一方面,单克隆抗体使用杂交瘤技术制备。在这样的方法中,小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物用免疫剂(例如本发明方面的肽)免疫以引起淋巴细胞产生或能够产生将与免疫剂特异性结合的抗体。或者,淋巴细胞可在体外免疫。淋巴细胞然后使用合适的融合剂例如聚乙二醇与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞。永生化细胞系通常为转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、兔、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在合适培养基中培养,所述培养基可含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞生长或生存的物质。例如,如果亲本细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT 或 HPRT),用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤,氨基嘌呤和胸苷(“HAT 培养基”)以抑制 HGPRT- 缺乏细胞的生长。

[0085] 可测定其中培养杂交瘤细胞的培养基中单克隆抗体的存在情况。优选地,由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定例如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)得到测量。所述技术和测定为本领域已知的。在产生所需单克隆抗体的杂交瘤细胞经鉴定后,细胞可通过有限稀释方法来亚克隆并用已

知方法培养。单克隆抗体可通过常规免疫球蛋白纯化方法例如蛋白 A-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析、亲和色谱法等自培养基中分离或纯化。单克隆抗体也可通过重组 DNA 方法例如在美国专利号 4,816,567 中描述的那些方法制备,其通过引用结合到本文中。用于产生本领域技术人员已知抗体的其它方法认为在本发明范围内。

[0086] 因此,一方面,提供了用于试验怀孕受试者潜在早产的方法。所述方法可包括自受试者获得生物样品,使所述生物样品与第一抗体和第二抗体接触,其中在使所述样品与所述第一抗体和第二抗体接触时,所述第一抗体结合第一生物标志物并形成第一抗体-抗原复合物并且所述第二抗体结合第二生物标志物并形成第二抗体-抗原复合物;其中所述第一生物标志物包含氨基酸序列 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3 或其任何组合并且所述第二生物标志物为包括以下的蛋白质:促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合,并且对第一抗体-抗原复合物和第二抗体-抗原复合物的形成进行测定以将生物样品中的第一生物标志物和第二生物标志物的量进行定量。接着,将所述第一生物标志物和第二生物标志物的量与来自未经历早产的生物样品的相同生物标志物的量进行比较。生物样品中目的生物标志物的存在情况和量提供了早产风险的指征。

[0087] 如已所述的,已知多种免疫测定能够检测和/或定量生物样品中的肽。一方面,免疫测定可为竞争性测定。例如,具有被试验肽序列的经标记肽与对至少一部分肽序列具有特异性的抗体接触以使得形成抗体-抗原(或肽)复合物。把生物样品加入到肽/抗体混合物中使得存在于生物样品中的任何目的肽与经标记的肽竞争,导致标记的强度降低。竞争性测定可包括一步或两步方案,其为本领域所熟知。

[0088] 另一方面,免疫测定可为非竞争性或夹心测定。所述测定通常提供更高水平的测定灵敏度和特异性。非竞争行测定方式也可利用一步或两步方案。通常所述测定包括固定在物理载体(physical support)上的抗体,其中固定化抗体对目的生物标志物(即第一或第二生物标志物)具有免疫学特异性。把生物样品加入到与也对目的肽具有免疫学特异性的经标记抗体一起的载体上。存在于生物样品中的肽将结合与支载体一起的固定化抗体。经标记抗体也结合目的肽,并因此借助肽和固定化抗体也固定于物理基底。随后可检测经标记抗体上的标记以定量生物样品中第一生物标志物和第二生物标志物的量并与对照组(即不经历早产的怀孕受试者)相比较。在一些方案中,未固定化的经标记抗体可在检测标记之前被洗掉。在该情况下,标记的强度与存在于生物样品中的第一生物标志物和/或第二生物标志物的量成比例。

[0089] 考虑本领域熟知的多种配置的固体载体基底。所述基底可包括用于固定检测物质例如抗体或抗体锚的任何合适基底。例如,合适的基底可包括任何固体载体,例如能够与检测物质形成键而不显著影响抗体功能性的任何固体有机、生物聚合物或无机载体材料。有机固体载体材料的实例可不受限地包括聚合物例如聚苯乙烯、尼龙、酚醛树脂、丙烯酸共聚物例如聚丙烯酰胺等。生物聚合物载体材料的实例可不受限地包括纤维素、聚葡聚糖、琼脂糖、胶原、几丁质等。无机载体材料的实例可不受限地包括玻璃珠(多孔和无孔)、不锈钢、金属氧化物包括多孔陶瓷例如  $ZrO_2$ 、 $TiO_2$ 、 $Al_2O_3$ 、和  $NiO$ 、砂等。

[0090] 本文可使用本领域已知的多种特异性测定方法。所述特异性测定方法可包括方案例如放射免疫测定法(RIA)、酶免疫测定法(EIA)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、荧光免

疫测定法 (FIA)、荧光偏振免疫测定法 (FPIA)、抑制免疫散射浊度分析法 (nephelometric inhibition immunoassays) (NIA)、微粒子酶免疫测定法 (MEIA)、化学发光磁免疫测定法 (CMIA) 等。

[0091] 各种可检测标记 (即指示物) 可与本发明方面的抗体偶联。合适的标记可不受限地包括放射性核素 (例如  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$  等)、酶 (例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等)、荧光部分或蛋白质 (例如荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP、BFP 等), 或发光部分 (例如由 QUANTUM DOT CORP., Palo Alto, Calif. 提供的 Qdot<sup>®</sup> 纳米粒)。上面所提及用于实施各种免疫测定的通用技术为本领域普通技术人员已知。

[0092] 一方面, 免疫测定可包括 ELISA, 其中使抗原 (即第一生物标志物、第二生物标志物或其组合) 结合包括但不限于 96 孔板的固体表面, 随后使用抗原特异性的单克隆抗体。在孵育期间之后, 第一抗体被洗掉并且施用识别所结合单克隆抗体的第二抗体 (用辣根过氧化物酶修饰, HRP)。在第二次孵育之后, 过量的第二抗体被洗掉并且加入所加 HRP 的底物, 其生成化学发光产物或荧光产物并且测量“颜色”或光。

[0093] 除免疫测定以外, 还考虑用于检测生物样品中肽的另外方法, 其中全部将被视为在本发明的范围内。一方面, 例如, 可利用质谱 (MS) 技术。一个具体实例可包括高通量 MS 分析技术例如基质辅助激光解吸电离。在这样的技术中, 样品可被发送至每小时可快速处理数百生物样品的专门设备。

[0094] 本文还描述了用于试验来自怀孕受试者的生物样品以评价早产风险的试剂盒。所述试剂盒可由医院、诊所、参考实验室、医生办公室等采用以帮助做出医学决定, 并且如果必要, 提供可行的治疗或干预。另外, 所述试剂盒还可使得与早产有关的其它医学病症的诊断、预后或风险评价得以进行。

[0095] 因此, 一方面, 提供了用于试验怀孕受试者潜在早产的试剂盒。所述试剂盒可包括第一和第二抗体, 其中所述第一抗体能够选择性结合具有氨基酸序列 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 和 SEQ ID NO 3 的第一生物标志物并形成第一抗体-抗原复合物, 其中所述第二抗体能够选择性结合包含促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其任何组合的第二生物标志物并形成第二抗体-抗原复合物; 和测定所述第一抗体-抗原复合物和第二抗体-抗原复合物形成的与所述第一抗体和第二抗体功能性相关的指示物。试剂盒可进一步包括对所用特定试验测定必要或有益的任何试剂。

[0096] 试剂盒可含有检测和定量生物样品中生物标志物的任何工具 (means), 并且试剂盒的内容物可依所使用的检测测定类型而定有必要地变化。除必需试剂以外, 试剂盒可包括用于结合第一和第二生物标志物的抗体、固体基底、用于检测抗体-抗原复合物的另外抗体等。如所暗示的, 抗体或抗体片段可以游离形式存在或固定于基底例如塑料平皿、试管、试样棒、珠等。试剂盒还可包括用于检测和 / 或用于标记阳性或阴性对照的合适试剂、洗涤溶液、稀释缓冲液等以及说明书。

## 实施例

[0097] 提出以下实施例以便提供给本领域普通技术人员如何制备和评价本文所描述和要求保护的化合物、组合物和方法的完整公开和描述, 实施例旨在纯粹为示例性的并且并

非意欲限制发明人所认为的其发明的范围。已做出努力以确保数字（例如量、温度等）方面的准确性但应说明一些误差和偏差。除非另外指明，份为按重量份，温度以℃表示或者在环境温度下，并且压力为或接近大气压。存在反应条件的许多变化和组合，例如组分浓度、所需溶剂、溶剂混合物、温度、压力和可用于优化得自所描述过程的产品纯度和产率的其它反应范围和条件。优化所述过程条件仅需合理和常规的实验。

[0098] 血清采集

[0099] 研究涉及在 24 或 28 周妊娠取血的孕妇，她们坚持完成其妊娠。这些妇女中有 80 人为无并发症怀孕，没有早产 (PTB) 证据。这些构成对照组。这些妇女中有 80 人患有 PTB (< 37 周妊娠)。这些妇女构成 PTB 病例。这 160 名妇女的血清使用本文所描述的蛋白质组学技术来研究。参与该研究的各组人口统计资料列于表 7 中。

[0100] 表 7. 人口统计资料 (\*p < 0.001)

[0101]

	24 周对照 N=40	24 周病例 N=40	28 周对照 N=40	28 周病例 N=40
母亲年龄(岁)	23.2 ± 0.83	23.6 ± 0.81	24.3 ± 0.9	24.2 ± 0.94
分娩时的妊娠年龄(周)	38.9 ± 0.19	31.4 ± 0.44*	38.9 ± 0.18	32.3 ± 0.28*
从随访 1 至分娩的时间(周)	15.1 ± 0.18	7.8 ± 0.45*	15.1 ± 0.18	8.6 ± 0.31*
经产状况(%未经产的)	30.0	32.5	30.0	32.5
种族(%非洲裔美国人)	75.0	70.0	77.5	67.5

[0102] 乙腈沉淀

[0103] 将 2 体积的 HPLC 级乙腈 (400 μ L) 加至 200 μ L 的血清中，剧烈涡旋 5 秒钟并使其在室温下静置 30 分钟。然后在室温下，将来自 (血清采集) 的样品在 12000rpm 下和在 IEC Micromax RF 离心机 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 中离心 10 分钟。然后将等分试样的上清液转移至含有 300 μ L HPLC 级水的微量离心管中。把样品短暂涡旋以混合溶液，然后在 Labconco CentriVap Concentrator (Labconco Corporation, Kansas City, MO) 中冻干至 ~ 200 μ L。在冻干之前加入的水体积帮助从溶液中完全除去乙腈。这是必需的，因为乙腈与用于测定蛋白质浓度的测定不相容。上清液蛋白质浓度使用按照制造商说明书实施的 Bio-Rad 微量滴定板蛋白质测定来测定。把含有 4 μ g 蛋白质的等分试样转移至新的微量离心管中并冻干至接近干燥。样品用 HPLC 水加至 20 μ L 并且然后使用 20 μ L 88% 的甲酸酸化。

[0104] 将乙腈处理 (沉淀后) 的血清样品 (40 μ L) 装入 250 μ L 用具有隔膜的聚丙烯扣帽密闭的锥形聚丙烯小瓶 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) 中，并且放入保持在 4℃ 的 FAMOS® 自动进样器 48 孔板中。FAMOS® 自动进样器以 40 μ L/ 分钟的流速注射 5 μ L 每种血清样品至使用 0.1% 甲酸酸化的 HPLC 水的液相色谱保护柱上。盐和其它杂质用酸化水从保护柱上洗掉。由于 FAMOS® 自动进样器吸取三倍装到柱子上的体积，当样品体积有限时，通过手动注射样品是必要的。这通过以下来实现：将 10 μ L 体积样品注射到保护柱的空白回路上游并且输入程序指令给 FAMOS® 自动进样器以注射代替所述样品的 10 μ L 的 HPLC 水样品。血清样品装到保护柱上并脱盐就好像已从锥形小瓶装入。

[0105] 用于 Mass Spec 分析的液相色谱法分离

[0106] 实施毛细管液相色谱法 (cCL) 以分馏样品。毛细管 LC 使用内部组装的

1mm(16.2  $\mu$ L) 微孔保护柱 (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA) 和 15cmx250  $\mu$ m 内径毛细管柱。保护柱经干法填装并使用 POROS R1 反相介质 (Applied Biosystems, Framingham, MA) 将毛细管柱匀浆填充。使用水相 (98% HPLC 级 H<sub>2</sub>O, 2% 乙腈, 0.1% 甲酸) 和有机相 (2% HPLC H<sub>2</sub>O, 98% 乙腈, 0.1% 甲酸) 进行柱平衡和色谱分离。分离通过以下实现: 开始以 95% 水溶液柱平衡 3 分钟, 随后通过 2.75% / 分钟梯度增加至 60% 有机相, 其然后以 7% / 分钟增加至 95% 有机相的浓度。梯度在 95% 有机相保持 7 分钟以洗脱样品的更疏水组分, 并然后经 5 分钟使梯度返回到 95% 水相并保持在该浓度下达 2 分钟以重新平衡柱。所有分离以 5  $\mu$ L / 分钟流速来进行。色谱法使用 LC Packings Ultimate Capillary HPLC 泵系统, 带有 FAMOS® 自动进样器 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA), 由 Analyst QS® (Applied Biosystems, Foster City, CA) 控制。

#### [0107] MS 分析

[0108] MS 校准在运行样品前每天使用外部对照进行。如果需要, 调整设置以优化信噪比和使灵敏度最大。

[0109] cLC 系统直接偶联至质谱仪。来自毛细管柱的流出物通过 IonSpray 源 (Applied Biosystems) 直接引至 QSTAR Pulsar I 四极正交飞行时间质谱仪。收集 m/z 500-2500 的数据, 于 5 分钟开始并于 55 分钟结束。对开始时间的延迟输入程序指令, 因为伴随 5  $\mu$ L / 分钟的流速, 样品自保护柱到质谱仪花费超过 5 分钟, 并且因此在 5 分钟之前不可获得有用的数据。数据收集、处理和初步格式化使用带有附加的 BioAnalyst (Applied Biosystems) 的 Analyst QS® 软件包来完成。

[0110] 在整个 cLC 洗脱期间, 对 5 分钟 -55 分钟之间的每一样品每 1 秒获得质谱。消耗每一受试者血清的 cLC 分馏蛋白质的洗脱图, 报告为总离子色谱图, 对其检查以确保其与先前运行的人血清一致。如果没有足够样品来重做分析, 对具有总体丰度小于正常的 50% 或大于正常的 200% 或缺乏三个宽离子强烈区域特色系列的样品进行再运行或者忽略。

#### [0111] 峰比对

[0112] 由于样品在不同日运行且柱的洗脱时间可变化, 在整个有用的色谱图中, 以约 2 分钟间隔洗脱的具有平均丰度的 10 个内源性分子种类 (有用色谱图为约 15 分钟 -35 分钟) 被确定。在目的洗脱区域内建立两分钟窗口以使得文件大小保持易管理。MS 计算机的 Extract Ion Chromatogram (XIC) 功能用于显现每一个洗脱时间标志物所需 m/z 范围的洗脱。然后对于每一样品运行确定每一个比对峰的洗脱时间并继而借助 Set Selection 功能用作 2 分钟窗口的中心。这把所有的运行比对至所述窗口的相同中点。然后 Show Spectra 功能可用于从所有质谱产生单一平均质谱。

#### [0113] 数据分析

[0114] 支持 Q-Star (q-TOF) 质谱仪的软件程序 Analyst® 使得能够汇编 16 个单独液相色谱运行并比较在类似洗脱时间的那些运行内的质谱。如上所述的, 在 20 分钟有用洗脱期间内, 建立 10 个 2 分钟窗口以使数据文件的大小保持易管理。亦如上所述的比对 2 分钟窗口。在 10 个 2 分钟洗脱间隔中, 首先要分析的是第二个 2 分钟窗口, 被选择是因为通常有更多的肽种类存在。肽类通过它们的多荷电状态的特性外观来鉴定, 其似乎是具有高斯形状的定义明确的峰簇, 且单个峰被少于 1 个质 / 荷单位分开而不是单峰或峰被 1 个质 / 荷单位分开。经历 PTB 的 8 个受试者组和来自对照 (无 PTB) 的 8 个受试者组被彩色编码和

重叠。然后数据经目视检查并且记录似乎是由一种颜色主导的分子种类。所使用的软件限于仅显现 16 个样品。对大于 16 的取样大小,数据集进行多重比较。对于进一步考虑的化合物,两组间同样明显的差异需要在至少三分之二的数据集中观察。

[0115] 然后,对在两个研究组之间似乎不同的分子进行单独检查。这些候选种类全部是肽。在提取定量数据之前,检查质谱以确保肽峰具有相同的  $m/z$  并且也代表了相同的荷电状态以进一步确保相同的肽被考虑。另外,第二个附近的峰,其未证实在两组之间的丰度差异,被选为参考。该峰用于将目的候选峰标准化并且在样品处理、样品装载和电离效率中校正差异。

[0116] 然后通过 Analyst<sup>®</sup> 软件“提取”分子种类以确定各单独运行中单个分子种类的峰最大值。该特征并不限制对两分钟洗脱窗口的特定  $m/z$  检验并因此用于比对 cLC 洗脱时间的峰可另外用于确保洗脱图中的位置为相同的并因此确保每次选出相同的分子种类。

[0117] 各分子种类的峰高度认为是其丰度的合理估计。各候选化合物的丰度经列表并且各候选物种类的计算值与附近的参考种类成比例。由于考虑单一类型,单变量统计分析被用来评价两组间该肽丰度的可能差异。

[0118] 内源性时间比对分子

[0119] 用于时间比对的参考峰的质量和典型洗脱时间概述在表 8 中。

[0120] 表 8. 时间比对标志物的质量和洗脱时间

[0121]

内源性时间参考的质量(道尔顿)	平均洗脱时间(分钟)
1464.65	14.68
1439.52	17.01
2009.95	18.83
5062.28	21.34
546.31	23.54
545.33	26.12
1046.67	27.60
636.31	32.44
779.52	34.59
1619.07	36.88

[0122] 存在于所有孕妇血清中的这些内源性分子种类的位置知识也使它们能够用于毛细管液相色谱洗脱图中 PTB 生物标志物的比对和定位的时间标志物。

[0123] 生物标志物特性

[0124] 在时间比对之后,生物标志物候选物在其中重叠有各分配一种颜色的 PTB 病例和对照的初始过程中经目视鉴定。似乎主要为一种颜色的那些峰经进一步研究。然后通过配备为用于 QqTOF 质谱仪 (Applied Biosystems) 的操作系统的 Analyst<sup>®</sup> 软件 (Applied Biosystems) 的计算机对单个谱进行峰高度测定。然后对生物标志物的量列表。另外,还选出在相同时间窗口出现的第二个峰,其在病例与对照组之间在量上无差异。这表示内源性对照以使得能够减少非生物差异。这通过候选峰的量除以内源性对照的量来实现。记录各样品比率的大小并且使用学生 t 检验比较 PTB 病例与对照来求出统计学差异。

[0125] 对于第一生物标志物,三个种类具有显著性差异 ( $p < 0.0001$ ),暗示它们可使得两组极好的分离。包括三种 PTB 生物标志物的第一生物标志物的各质量和洗脱时间概述于表 9 中。

[0126] 表 9. 第一生物标志物的质量和洗脱时间

[0127]

SEQ ID	峰(m/z)	平均质量	平均洗脱时间
NO 1	676.7	2026.98	14.30 + 0.47
NO 2	856.8	4279.25	17.20 + 2.04
NO 3	860.0	4295.25	16.13 + 1.97

[0128] 洗脱时间（保留时间）表示为内部时间对照的函数。这通过生物标志物之前的时间标志物与目的峰之后的时间标志物之间目的峰的相对位置来确定。这通过下式计算：

[0129]  $R_f = (\text{生物标志物的洗脱时间} - \text{时间标志物之前的洗脱时间}) / (\text{时间标志物之后的洗脱时间} - \text{时间标志物之前的洗脱时间})$

[0130]  $R_f$  值比实际的洗脱时间更可靠。洗脱时间可随着新柱子或带有污垢的现有柱子性能的变化而变化,但是  $R_f$  不随这些变化而改变。第一生物标志物（即 SEQ ID NO 1-3）的  $R_f$  值提供于表 10 中。

[0131] 表 10. 使用内部时间比对峰的第一生物标志物的  $R_f$  值

[0132]

SEQ ID	峰(m/z)	N	相对于边界时间标志物的 $R_f$ 值	
NO 1	676.7	12	0.535 + 0.052	(在时间标志物 2 和 3 之间)
NO 2	856.8	12	0.781 + 0.086	(在时间标志物 2 和 3 之间)
NO 3	860.0	9	0.695 + 0.134	(时间标志物 2 和 3 之间)

[0133] 通过参考对内源性共洗脱对照来减少差异

[0134] 目前血清蛋白组学方法的特征之一是使用存在于所有种类中并且在病例与对照之间没有差异的内源性分子。将生物标志物的丰度对该内部对照标准化减少非生物学差异并提高风险预测中利用生物标志物的能力。标准化涉及在数学上将目的峰丰度除以参考峰丰度。丰度为由机器得到的值。给定分子的丰度表示在给定的质谱经质谱仪测量的特定质量的离子数目或在代表完整洗脱间隔的若干质谱上观察到的特定质量离子数目的总和。分子离开色谱柱通常需要 1.0-1.5 分钟而在洗脱间隔期间每 1 秒获取质谱。

[0135] 对第一生物标志物,使用三种内部参考。对于峰 m/z 676.7 (SEQ ID NO 1),使用在 m/z 673.3 的共洗脱参考峰。对于峰 m/z 856.8 (SEQ ID NO 2) 和峰 m/z 860.0 (SEQ ID NO 3),选择在 m/z 843.8 的共洗脱参考峰。用这些比率计算对数比的平均值（表 11 和 12）。

[0136] 在第一生物标志物中,发现 3 种（即 SEQ ID NO 1 (m/z 676.7)、SEQ ID NO 2 (m/z 856.8) 和 SEQ ID NO 3 (m/z 860.0) 在病例和对照之间在量上显著差异。表 11 和 12 列出病例和对照分别于 24 和 28 周妊娠时的生物标志物丰度。

[0137] 表 11. 病例和对照中第一生物标志物（标准化后）的丰度（24 周妊娠）

[0138]

比率	平均对照	平均 PTB	P 值
log 676.7/673.3	0.503+0.094	0.198+0.076	0.007
log 856.8/842.8	0.284+0.092	-0.137+0.086	0.002
log 860.0/842.8	0.009+0.098	-0.376+0.088	0.005

[0139] 表 12. 病例和对照中第一生物标志物（标准化后）的丰度（28 周妊娠）

[0140]

比率	平均对照	平均 PTB	P 值
log 676.7/673.3	0.579+0.101	-0.015+0.090	< 0.001
log 856.8/842.8	0.231+0.102	-0.149+0.095	0.007
log 860.0/842.8	0.201+0.096	-0.204+0.088	0.002

[0141] 使用第一生物标志物预测处于经历早产风险中的妇女

[0142] 如上所述,生物标志物预测能力的一种公用量度为其灵敏度和特异性。如在表 13 和 14 中显示的第一生物标志物的阈值经测定以鉴定处于出现 PTB 的风险中的受试者。计算每一个的阈值以使得将存在 80%或更高的特异性(真阴性率)。如所指出的,这与不高于 20%假阳性率相同。使用这些数学上测定的阈值,如表 13 和 14 中概述的,四个比率独立地提供以下灵敏度(真阳性)和特异性(真阴性)比率。

[0143] 表 13. 24 周时的第一生物标志物(标准化后)的灵敏度和特异性

[0144]

比率	阈值	灵敏度	特异性
log 677/673	<0.00	35%	92.5%
log 857/843	< -0.215	45.0%	82.5%
log 860/843	< -0.585	45.0%	80.0%

[0145] 表 14. 28 周时的第一生物标志物(标准化后)的灵敏度和特异性

[0146]

比率	阈值	灵敏度	特异性
log 677/673	<0.00	65%	85%
log 857/843	<-0.347	38%	82%
log 860/843	<-0.222	55%	80%

[0147] 灵敏度为统计学术语,定义为真阳性率或者特别地在该病例中为经生物标志物正确鉴定并在后来出现 PTB 的孕妇百分数。特异性定义为真阴性率或者在此情况下为正确鉴定无并发症怀孕的孕妇百分数。为了以该方式使用生物标志物用于预测,必须建立数字阈值。为了建立该数字阈值,生物标志物的值范围通常认为是从最低到最高,并且在每一点受试者的百分比正确鉴定为阳性和在同一点对照组的百分比错误地鉴定为阳性。这被称为接受者操作曲线(ROC)。假阳性率被限定为 20%。这对于临床试验通常认为是最大容许。假阳性率(经生物标志物鉴定为处于后期 PTB 风险中的无并发症怀孕、对照组的妇女百分数)根据 100%减去真阴性来计算。无论阈值是否为 20%或者更小(其相当于 80%或更高的特异性)的假阳性率,确定了用于确定某个人是处于风险中还是不处于风险中的阈值。四个比率中每一个的阈值经确定其使得能够鉴定受试者处于后期 PTB 的风险中。计算每一个的阈值以使得将存在 80%或者更高的特异性(真阴性率)。如所指出的,这与不多于 20%的假阳性率相同。使用这些数学上确定的阈值,四个比率独立地提供以下灵敏度(真阳性)和特异性(真阴性)比率,如在表 13 和 14 中概述的。峰的组合未显著提高在 677 (SEQ ID NO 1) 的峰预测后期 PTB 的能力。

[0148] 图 1 显示 ROC 曲线,表明第一生物标志物(即 SEQ ID NO 1-3)在 24 和 28 周取样后预测后来 PTB 的预测能力。对于每次随访的各标志物,曲线下面积和 95%置信区间也包括在内。

[0149] 第一生物标志物的鉴定

[0150] 使用在两个质谱仪之间配有碰撞室的串联 MS 以引起母肽裂解,与可搜索数据库

(MASCOT) 作比较根据第二个 MS 步骤中观察到的裂解模式测量氨基酸序列。自同一母蛋白、间- $\alpha$  胰蛋白酶抑制剂、重链 4 (ITIH4) 获得三种肽, 而自第二蛋白、间- $\alpha$  胰蛋白酶抑制剂重链相关蛋白 (IHRP) 获得最终肽。表 15 提供第一生物标志物 (分别为 SEQ ID NOS 1-3) 的氨基酸序列。

[0151] 表 15. 第一生物标志物 (SEQ ID NOs 1-4) 的氨基酸序列

[0152]

M/z	MW	序列	母蛋白
677	2026.98	qlglpgppdvpdhaayhpf	ITIH4-2
857	4279.25	nvhsagaagsrmnfrpgvlssrqlglpgppdvpdhaayhpf	ITIH4-2
860	4295.25	nvhsagaagsrm(O)nfrpgvlssrqlglpgppdvpdhaayhpf	ITIH4-2

[0153] 这些肽似乎是源自称作间- $\alpha$  胰蛋白酶抑制剂的蛋白超家族。更具体地讲, 这些肽似乎源于两种目前被认为是间- $\alpha$  胰蛋白酶抑制剂重链 4 的同工型即同工型 1 (ITIH4-1) 和同工型 2 (ITIH4-2) 的不同蛋白质。两种同工型具有一些序列同源性, 但是也具有不存在于另一同工型中的氨基酸部分。两种同工型并非简单地代表其中一种是另一种的截断。

[0154] “第二生物标志物”的分析

[0155] 6 种另外的生物标志物 (定义为“第二生物标志物”) 用第一生物标志物 (即 SEQ ID NOs 1-3 或其任何组合) 的组合来分析, 所述第二生物标志物包括促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体或其组合。

[0156] 对与第二生物标志物组合的第一生物标志物 (包括 SEQ ID NOs 1-3) 进行逻辑回归分析, 所述第二生物标志物包括促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体的。第一生物标志物 (即 SEQ ID NOs 1-3) 借助接受者操作曲线用于分级性能。对于所有统计学检验, 报到了将统计显著性定义为  $p$ -值  $< 0.05$  的名义上的双侧  $p$ -值。SAS 版本 8.2 (SAS Institute, Cary, NC) 用于这些分析。

[0157] 第二生物标志物的相对丰度

[0158] 病例和对照之间丰度具有显著差异的第二生物标志物 (即促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体) 列于表 16 中。第二生物标志物的丰度通过以上所描述的方法来测定。

[0159] 表 16. 在病例和对照的血清中第二生物标志物相对丰度的比较

[0160]

标记	早产		对照		P 值
	平均	标准偏差	平均	标准偏差	
胎盘生长因子	446.82	45.99	596.69	63.36	0.05
凝血酶抗凝血酶	274.80	255.91	293.83	269.60	0.02
24 周妊娠					
标记	早产		对照		P 值
	平均	标准偏差	平均	标准偏差	
促肾上腺皮质激素释放因子	0.3585	0.0189	0.2844	0.0122	0.0006
防卫素	612.0	106.6	427.4	92.1	0.039
铁蛋白	18.97	3.37	10.00	1.48	0.043
乳铁蛋白	245.0	42.0	484.6	100.7	0.046
凝血酶抗凝血酶	546.8	366.3	835.5	453.7	0.044
TNF 1 型受体	1114.1	119.0	880.4	33.7	0.018

[0161] 使用第一生物标志物和第二生物标志物组合预测处于经历早产风险中的妇女

[0162] 正如以上刚刚讨论的那样,第一生物标志物可与 5 种另外蛋白质(即第二生物标志物)结合,以提供一组具有 89.8%灵敏度和 81.0%特异性的生物标志物,所述第二生物标志物包括促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体(TNF $\alpha$ )、凝血酶-抗凝血酶 III 复合物(TAT)、铁蛋白(FER)和乳铁蛋白(LACTO)的。逻辑回归模型用于考虑不同生物标志物的这些各种组合。模型给出就患者而言的预测概率。因此,标志物组合的截断值基于预测概率。产生特异性 > 80%的概率被用于每一分析。

[0163] 为了确定哪个种类对两个临床组之间提供更好的区分,第一生物标志物(即 m/z 677(SEQ ID NO 1)、857(SEQ ID NO 2)、860(SEQ ID NO 3))加第二生物标志物(即 5 种蛋白质生物标志物中的 4 种)被联合试验以观察 5 种另外的蛋白质生物标志物中每一种被排除的效果:因此,全板(8 种生物标志物)减去以下得到灵敏度和特异性:

[0164]

	灵敏度	特异性
全板减去 TAT	81%	81%
全板减去 TNF $\alpha$	68%	92%
全板减去 LACTO	81%	80%
全板减去 CRF	65%	84%
全板减去 FER	76%	82%

[0165] 这些数据提示提供另外的最佳组间区分的两种蛋白质为 TNF $\alpha$  和 CRF。

[0166] 尽管全板和其它排除一种蛋白质的组合提供具有适当灵敏度和特异性(80%/80%)的生物标志物组合,商业上可合乎需要的是使用更少的生物标志物。为此评价了具有以下结果的更小组合:

[0167]

	灵敏度	特异性
肽 m/z 677 + CRF + FER:	80%	80%
肽 m/z 677 + CRF + LACTO:	64%	82%
肽 m/z 677 + CRF + FER + LACTO:	75%	84%
肽 m/z 677 + CRF + FER + TNFar:	83%	82%
肽 m/z 677 + CRF + LACTO + TNFar:	79%	82%
肽 m/z 677 + CRF + TNFar:	79%	~80%
肽 m/z 677 + CRF + FER + LACTO + TNFar:	89%	~80%

[0168] 图 2 显示 ROC, 其表明包括如下 9 种预测物组合在内的第一和第二生物标志物的预测能力, 以预测在 28 周取样后产生后来 PTB :SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3、促肾上腺皮质激素释放因子、防卫素、铁蛋白、乳铁蛋白、凝血酶抗凝血酶复合物和肿瘤坏死因子  $\alpha$  1 型受体。还报告了曲线下面积和 95% 置信区间。

#### [0169] ELISA 测定 I

[0170] 以下 ELISA 测定可用于检测和定量生物样品中目的生物标志物。将对目的肽 (抗原) 具有免疫特异性的第一抗体吸附到 96 孔微滴板的表面。将 25 微升血清或已知、分级浓度的目的肽标准品加入到各孔中。血清与第一抗体孵育 30 分钟。包被在孔表面的第一抗体结合抗原, 使之固定。把 200 微升含有也对该抗原具有免疫特异性的第二抗体的第二溶液加入到每孔中。第二抗体已用标志物例如辣根过氧化物酶或化学发光前体标记。把这些孔孵育 30 分钟以使得第二抗体结合抗原 - 第一抗体复合物以形成抗体 - 抗原 - 抗体“夹心”, 其本身结合于孔表面。然后小心和充分地冲洗孔以除去任何未结合的第二抗体。然后, 加入含有对第二抗体标记的特异性底物的溶液。在辣根过氧化物酶的情况下, 对应于所结合第二抗体的量, 在孔中发生颜色变化。在化学发光标志物的情况下, 底物自非化学发光分子种类转化成发光的化学发光产物。产物发出的光与存在于孔中的抗原量成比例并通过“板读数器 (plate reader)”, 一种专门在特定波长下测量所发出光的并记录其强度的光谱仪来测量。

#### [0171] ELISA 测定 II

[0172] 以下 ELISA 测定可用于检测和定量生物样品中目的生物标志物。除了第二抗体用生物素分子标记以外, 该测定与 ELISA 测定 I 类似。在抗体 - 抗原 - 抗体形成之后冲洗孔之后, 把含有结合辣根过氧化物酶的链霉抗生物素的溶液加入到孔中以使得与生物素分子反应。在该具体测定中无色底物转化成有色产物。测量为特定波长光的吸光度的颜色强度与存在于孔中的抗原量成比例。通过比较其吸光度与吸光度对比一系列已知、分级浓度抗原的校正标准品的浓度图可估计未知物的浓度。

[0173] 应该理解, 以上所描述的组合物和应用模式仅说明本发明优选实施方案。本领域技术人员可设计各种修改和替代性编排而不背离本发明的精神和范围并且所附权利要求书意欲涵盖这样的修改和编排。因此, 尽管本发明已结合目前被认为是本发明最实用和优选的实施方案用细节和详情来描述, 但对本领域普通技术人员清楚明了的是, 可作出许多修改包括但不限于大小、材料、形状、形式、功能和操作方式、装配和使用的变化而不背离本文所阐述的原则和概念。



<210> 3  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> 人

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12).. (12)  
 <223> 在残基12的Xaa代表氧化的甲硫氨酸。在整个申请中其被称为M(O) .

<400> 3

Asn Val His Ser Ala Gly Ala Ala Gly Ser Arg Xaa Asn Phe Arg Pro  
 1                    5                    10                    15

Gly Val Leu Ser Ser Arg Gln Leu Gly Leu Pro Gly Pro Pro Asp Val  
                   20                    25                    30

Pro Asp His Ala Ala Tyr His Pro Phe  
                   35                    40

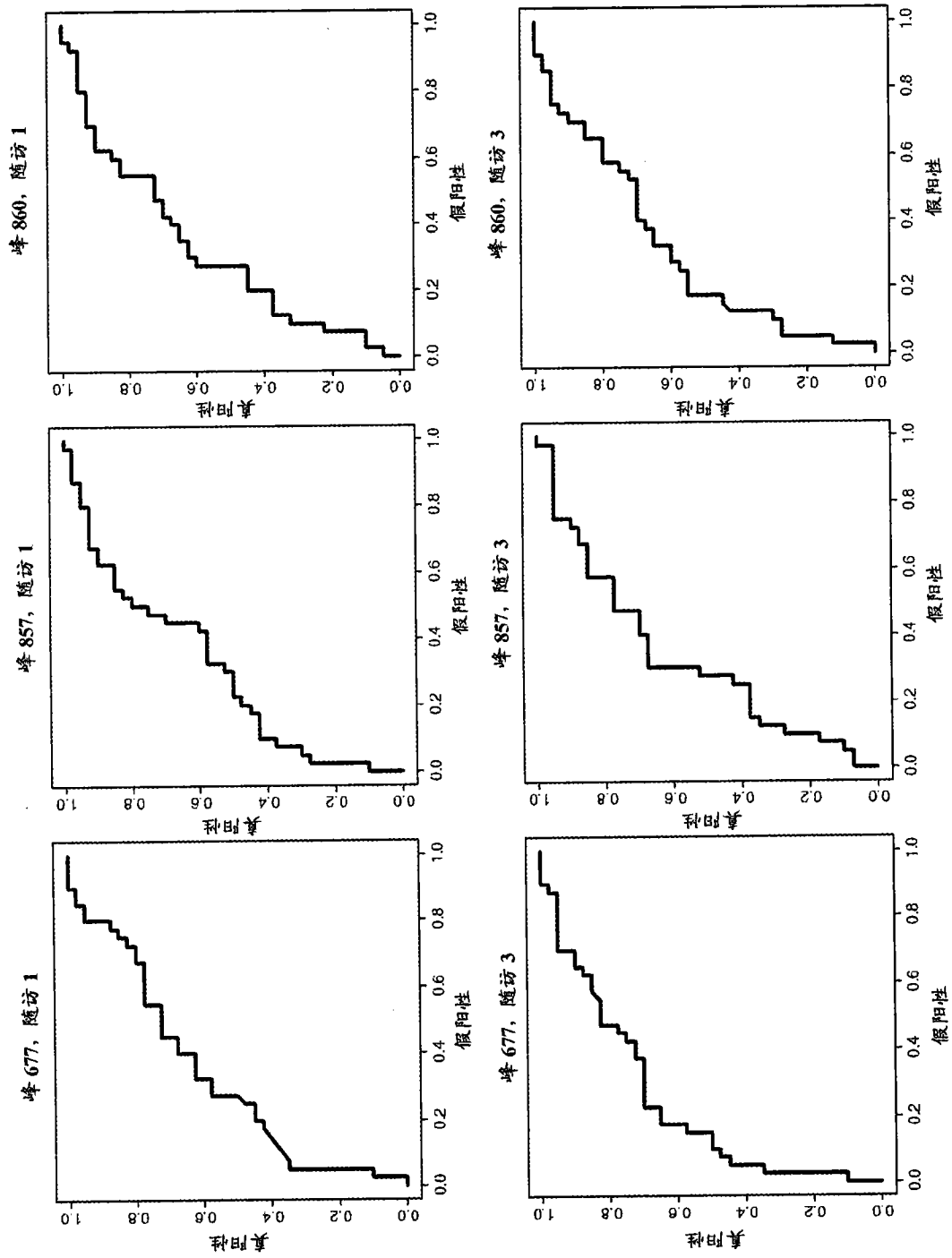


图 1

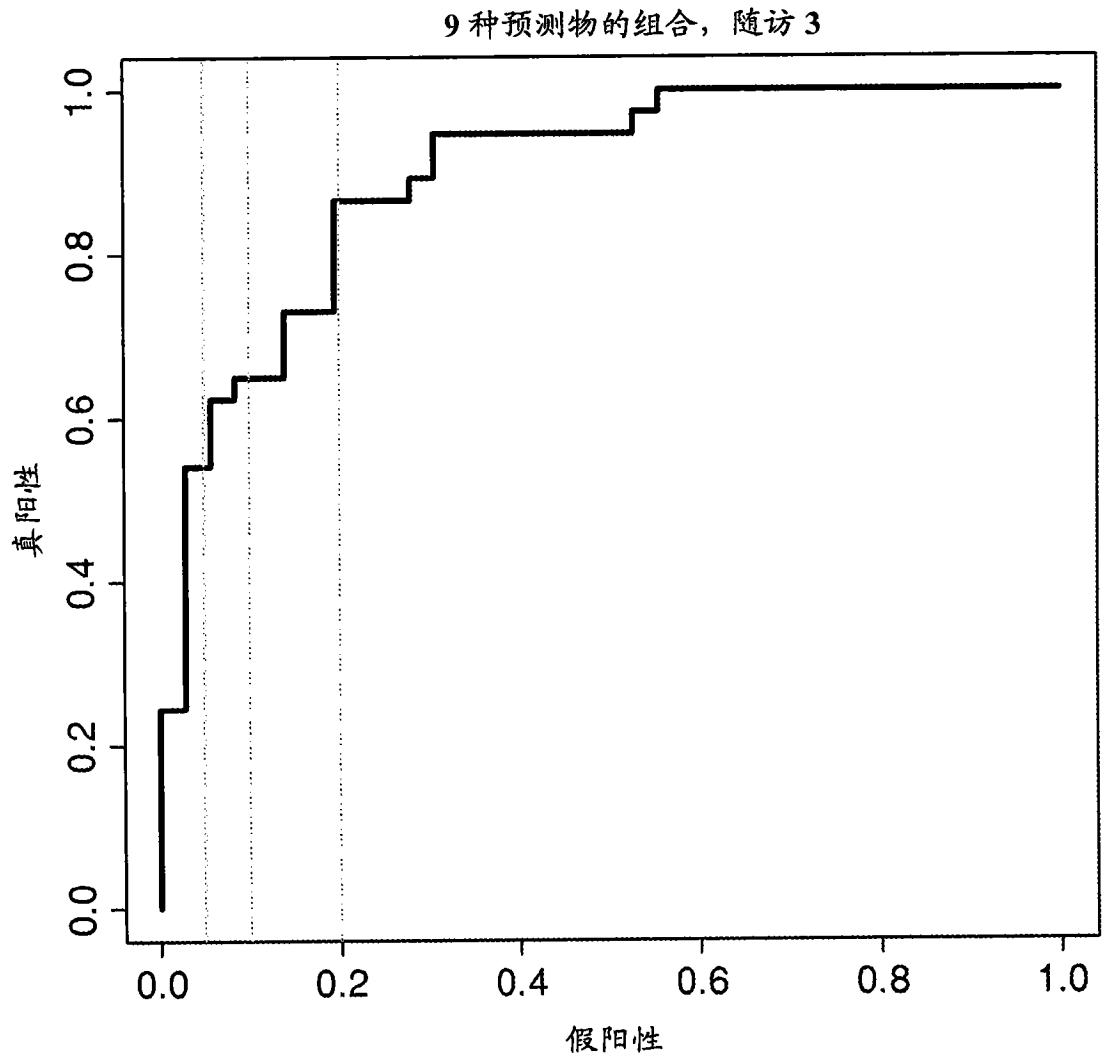


图 2

专利名称(译)	用于评价早产风险的生物标志物的鉴定和定量		
公开(公告)号	<a href="#">CN102822669A</a>	公开(公告)日	2012-12-12
申请号	CN201080049381.2	申请日	2010-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	犹他州大学研究基金会 布里格姆·扬大学 IHC医疗卫生服务公司		
申请(专利权)人(译)	犹他州大学研究基金会 布里格姆·扬大学 IHC医疗卫生服务公司		
当前申请(专利权)人(译)	犹他州大学研究基金会 布里格姆·扬大学 IHC医疗卫生服务公司		
[标]发明人	SW格拉夫 MS埃斯普林		
发明人	S· W· 格拉夫 M· S· 埃斯普林		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/368 G01N33/689		
代理人(译)	孔青 李进		
优先权	61/235503 2009-08-20 US		
其他公开文献	CN102822669B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文描述用于评价怀孕受试者中早产风险的方法。所述方法包括检测和定量来自受试者的生物样品中与早产有关的第一生物标志物和第二生物标志物。本文亦描述用于预测早产风险的分离的生物标志物和试剂盒。

