

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580047028. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月16日

[11] 公开号 CN 101163970A

[22] 申请日 2005.12.21

[21] 申请号 200580047028. X

[30] 优先权

[32] 2004.12.21 [33] US [31] 60/637,948

[86] 国际申请 PCT/US2005/047010 2005.12.21

[87] 国际公布 WO2006/069373 英 2006.6.29

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.23

[71] 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 克特林·S·布希姆斯基

伊琳娜·布希姆斯基

埃罗尔·诺尔维茨

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 顾晋伟

权利要求书 4 页 说明书 25 页 附图 14 页

[54] 发明名称

先兆子痫的诊断

[57] 摘要

本发明提供涉及检测和/或监测妊娠女性尿样中血管发生因子、尤其是 VEGF、PlGF 和 sFlt-1 水平的方法和组合物，以及这样的水平对妊娠首三个月、中三个月和/或末三个月中发生妊娠并发症、包括高血压病症比如先兆子痫之风险的影响。本发明还提供用于鉴定和筛选处于发生妊娠并发症比如先兆子痫之风险的患者的试剂盒。

1. 诊断妊娠女性为具有或易于发生高血压病症的方法，其包括将妊娠女性尿样中可溶性 fms-样酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 水平与适当的标准相比较，其中所述标准是从正常怀孕的妊娠女性所得尿样中特征性的 sFlt-1 水平。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述标准获取自正常怀孕的妊娠女性而且这种女性所处孕周对应于妊娠女性对象获取试验尿样时所处孕周。
3. 权利要求 1 的方法，其中与所述标准相比 sFlt-1 表达显著增加确定该女性处于发生高血压病症的风险。
4. 权利要求 1 的方法，其中 sFlt-1 水平大于 9.5 pg 每毫克尿肌酸酐是先兆子痫的诊断指标。
5. 权利要求 1 的方法，其中 sFlt-1 水平大于 40 pg 每毫克尿肌酸酐是重度先兆子痫的诊断指标。
6. 权利要求 1 的方法，其中所述高血压病症是妊娠引起的高血压、妊娠高血压、先兆子痫、EPH 妊娠中毒、子痫、并发先兆子痫、HELLP 综合征（溶血、肝脏酶升高、血小板计数低）和慢性肾病。
7. 权利要求 1 的方法，其中在测量相关血管发生因子水平之前采用稳定剂处理所述尿样。
8. 权利要求 1 的方法，其中采用免疫学分析进行测量。
9. 权利要求 8 的方法，其中所述免疫学分析是 ELISA。
10. 诊断妊娠女性为具有或易于发生高血压病症的方法，其包括将妊娠女性尿样中可溶性 fms-样酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 水平与适当的标准相比较，其中所述标准是从具有高血压病症的妊娠女性中所得尿样中特征性的 sFlt-1 水平。
11. 权利要求 10 的方法，其中所述标准获取自具有高血压病症的妊娠女性而且这种女性所处孕周对应于妊娠女性对象获取试验尿样时所处孕周。
12. 权利要求 10 的方法，其中与所述标准相比相似的 sFlt-1 表达确定妊娠女性具有高血压病症或有发生高血压病症的风险。
13. 权利要求 10 的方法，其中 sFlt-1 水平大于 9.5 pg 每毫克尿肌酸酐是先兆子痫的诊断指标。
14. 权利要求 10 的方法，其中 sFlt-1 水平大于 40 pg 每毫克尿肌酸酐是重度先兆子痫的诊断指标。
15. 权利要求 10 的方法，其中所述高血压病症是妊娠引起的高血

压、妊娠高血压、先兆子痫、EPH妊娠中毒、子痫、并发先兆子痫、HELLP综合征（溶血、肝脏酶升高、血小板计数低）和慢性肾病。

16. 权利要求 10 的方法，其中在测量相关血管发生因子水平之前采用稳定剂处理所述尿样。

17. 权利要求 10 的方法，其中采用免疫学分析进行测量。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述免疫学分析是 ELISA。

19. 诊断或辅助诊断妊娠女性为具有或易于发生高血压病症和/或某些与此相关因素的方法，其包括测量所述女性尿样中 sFlt-1 和胎盘生长因子（PIGF）的水平并计算 sFlt-1 和 PIGF 表达之间的关系，其中从这种计算中获得的关系指示该女性是否有发生高血压病症和/或某些与此相关因素的风险。

20. 权利要求 19 的方法，其中所得关系可用于评价妊娠女性发生高血压病症相关病况的风险，其中所述病况选自：血清尿酸增加、剖腹产分娩、收缩压和舒张压增加、试条蛋白尿、孕次、分娩时胎儿体重低、胎盘破坏、宫内发育迟缓（IUGR）、溶血、血小板减少、肝脏酶升高和 HELLP 综合征（溶血、肝脏酶升高、血小板计数低）。

21. 权利要求 19 的方法，其中所述计算是以下比率指标（uFP）： $\log [sFlt-1/PIGF \times 100]$ 。

22. 权利要求 21 的方法，其中 uFP 大于 1.4 是妊娠女性需要治疗以预防发生或恶化高血压病症相关症状之风险增加的先兆指标。

23. 权利要求 21 的方法，其中 uFP 大于 2.1 是重度先兆子痫的诊断指标。

24. 权利要求 21 的方法，其中 uFP 大于 2.1 是妊娠女性需要剖腹产分娩之风险增加的诊断指标。

25. 权利要求 19 的方法，其中所述高血压病症是妊娠引起的高血压、妊娠高血压、先兆子痫、EPH妊娠中毒、子痫、并发先兆子痫、HELLP综合征（溶血、肝脏酶升高、血小板计数低）和慢性肾病。

26. 权利要求 19 的方法，其中在测量相关血管发生因子水平之前采用稳定剂处理所述尿样。

27. 权利要求 19 的方法，其中采用免疫学分析进行测量。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述免疫学分析是 ELISA。

29. 确定妊娠女性是否处于发生高血压病症的风险的试剂盒，其包含：

（a）接受尿样的接受器；

- (b) 检测 sFlt-1 的工具;
- (c) 参照样品; 和
- (d) 用于诊断所述女性中高血压病症的说明。

30. 权利要求 29 的试剂盒, 其中所述试剂盒另外包含检测 PIGF 的试剂。

31. 权利要求 29 的试剂盒, 其中所述试剂盒另外包含稳定剂。

32. 权利要求 29 的试剂盒, 其中所述参照样品包含从正常怀孕女性所得尿样中特征性的 sFlt-1 水平。

33. 权利要求 29 的试剂盒, 其中所述试剂盒可用于诊断妊娠引起的高血压、妊娠高血压、先兆子痫、EPH 妊娠中毒、子痫、并发先兆子痫、HELLP 综合征(溶血、肝脏酶升高、血小板计数低)和慢性肾病。

34. 权利要求 7 的方法, 其中所述稳定剂是蛋白酶抑制剂。

35. 权利要求 16 的方法, 其中所述稳定剂是蛋白酶抑制剂。

36. 权利要求 26 的方法, 其中所述稳定剂是蛋白酶抑制剂。

37. 权利要求 31 的试剂盒, 其中所述稳定剂是蛋白酶抑制剂。

38. 权利要求 34 的方法, 其中所述蛋白酶抑制剂是以下的任何一种或其任意组合: AEBSF、Pefabloc SC、4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟、抗蛋白酶、抗蛋白酶二盐酸盐、抑酶肽、苯甲脒、盐酸苯甲脒、苯丁抑制素、抑糜酶素、E-64、L-反式-环氧琥珀酰-亮氨酸胺-(4-胍基)-丁烷、N-[N-(L-反式-羧基环氧乙烷-2-羧基)-L-亮氨酸]-精胺、乙二胺四乙酸及其钠盐、亮抑酶肽、N-乙基马来酰亚胺、胃酶抑素、胃酶抑素 A、膦酰二肽、叠氮化钠、胰蛋白酶抑制剂和 ϵ -氨基己酸。

39. 权利要求 35 的方法, 其中所述蛋白酶抑制剂是以下的任何一种或其任意组合: AEBSF、Pefabloc SC、4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟、抗蛋白酶、抗蛋白酶二盐酸盐、抑酶肽、苯甲脒、盐酸苯甲脒、苯丁抑制素、抑糜酶素、E-64、L-反式-环氧琥珀酰-亮氨酸胺-(4-胍基)-丁烷、N-[N-(L-反式-羧基环氧乙烷-2-羧基)-L-亮氨酸]-精胺、乙二胺四乙酸及其钠盐、亮抑酶肽、N-乙基马来酰亚胺、胃酶抑素、胃酶抑素 A、膦酰二肽、叠氮化钠、胰蛋白酶抑制剂和 ϵ -氨基己酸。

40. 权利要求 36 的方法, 其中所述蛋白酶抑制剂是以下的任何一种或其任意组合: AEBSF、Pefabloc SC、4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟、抗蛋白酶、抗蛋白酶二盐酸盐、抑酶肽、苯甲脒、盐酸苯甲脒、苯丁抑制素、抑糜酶素、E-64、L-反式-环氧琥珀酰-亮氨酸胺-(4-胍基)-丁烷、N-[N-(L-反式-羧基环氧乙烷-2-羧基)-L-亮氨酸]-精胺、乙二胺四乙酸及其钠盐、亮

抑酶肽、N-乙基马来酰亚胺、胃酶抑素、胃酶抑素 A、膦酰二肽、叠氮化钠、胰蛋白酶抑制剂和 ϵ -氨基己酸。

41. 权利要求 37 的试剂盒, 其中所述蛋白酶抑制剂是以下的任何一种或其任意组合: AEBSF、Pefabloc SC、4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟、抗蛋白酶、抗蛋白酶二盐酸盐、抑酶肽、苯甲脒、盐酸苯甲脒、苯丁抑制素、抑糜酶素、E-64、L-反式-环氧琥珀酰-亮氨酸胺-(4-胍基)-丁烷、N-[N-(L-反式-羧基环氧乙烷-2-羧基)-L-亮氨酸]-精胺、乙二胺四乙酸及其钠盐、亮抑酶肽、N-乙基马来酰亚胺、胃酶抑素、胃酶抑素 A、膦酰二肽、叠氮化钠、胰蛋白酶抑制剂和 ϵ -氨基己酸。

先兆子痫的诊断

相关申请参考

本申请要求 2004 年 12 月 21 日提交并且名称为“鉴定、诊断和跟踪患先兆子痫女性的方法和试验”的美国临时申请 No. 60/637,948 的权益。所参考申请的全部教导在此引入作为参考。

背景技术

先兆子痫是高达 6~8% 妊娠并发的高血压病症并且一直是母亲和围产期发病和死亡的首要因素 (1, 2)。但是, 尽管进行了广泛的研究, 这种多系统病症的病因学仍然未被完全了解。血管内皮活化随后血管痉挛似乎是先兆子痫发病机理的中心特征。其原因的理论包括胎盘的异常植入和发育、氧化应激、受损的内皮前列腺素类和一氧化氮稳态平衡、遗传多态性、异常的循环型自身抗体以及异常的母亲全身性炎症反应 (3, 4, 5, 6, 7)。最近, 更多关注于血管发生调节剂表达水平变化的影响, 其能引起先兆子痫的症状, 包括高血压、蛋白尿、内皮细胞活化和血小板聚集增加 (8, 9, 10, 11, 12)。

具体而言, 近来的研究已报导了临床先兆子痫患者的血管内皮生长因子 (VEGF)、胎盘生长因子 (PIGF) 和可溶性 fms-样酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 的母体血清浓度变化 (13, 14, 15)。VEGF 和 PIGF 是涉及胎盘发育的生长因子, 并且都有助于促有丝分裂活性和血管发生, 这对发育中胎儿至关重要。sFlt-1 是 Flt-1 受体的剪接变体。它缺少 Flt-1 的细胞质和跨膜结构域, Flt-1 是结合 VEGF 和 PIGF 并激活它们信号通路的受体。血清 sFlt-1 增加在临床可识别的先兆子痫发生之前约 5 周出现, 并且早在首三个月, 游离 PIGF 降低是显著的 (13, 15, 16)。相比较, VEGF 血清浓度在患有临床先兆子痫女性的整个妊娠期间较低 (15)。

这些血管发生因子还似乎在调节人肾小球血管生理中重要。向妊娠啮齿动物施用的外源性 sFlt-1 导致高血压、蛋白尿和肾小球内皮增生 (endotheliosis) (17)。相似地, 中和 VEGF (肾小球血管内皮的关键丝裂原存活因子) 导致凋亡增加、肾小球毛细血管修复受损以及重度蛋白尿 (18)。在重度先兆子痫中, 肾小球内皮增生是该病症的常见特征, 其进一

步支持高血压病症患者中血管发生因子变化和一般性肾功能之间的联系 (19, 20, 21, 22, 23)。

目前, 没有专门试验来预测或诊断先兆子痫或来预知该病症在特定患者中将发生的严重性。早期症状包括持久性头痛、视力或对光敏感性受损以及腹痛。然而, 直到典型地在妊娠第 20 周之后进行的常规内科检验中显示出血压升高和尿中蛋白质(蛋白尿), 通常不进行先兆子痫诊断(1)。先兆子痫的严重影响(包括发作、脑出血、弥散性血管内凝血和肾衰竭)可能在这种诊断后非常短时间内出现。这些方法是不精确的并且很少提供对发生最严重症状的可能性的深入了解。而且, 当前的诊断需要医师仔细检查和侵入性方法, 这进一步拖延了早期和立即评估并使之复杂化。需要早期、准确地检测和诊断先兆子痫和相关蛋白尿高血压病症的方法。

发明内容

本发明涉及确定或辅助确定妊娠女性处于发生先兆子痫或其它高血压病症的风险中的方法。在某些实施方案中, 本发明涉及确定或辅助确定妊娠女性具有先兆子痫的方法。在进一步实施方案中, 本发明涉及筛选或预筛选妊娠女性以识别具有低风险发生高血压病症的那些妊娠女性的方法, 这降低在妊娠期间对额外检查的需要。

申请人假定先兆子痫相关的母亲肾的功能和形态学紊乱指示尿中 sFlt-1、VEGF 和 PlGF 水平的改变可以聚类高血压病症并且从正常血压的妊娠对照中区分患重度先兆子痫的妊娠女性。虽然几篇近期公开文章报道循环中 sFlt-1 水平增加以及血清 PlGF 和 VEGF 水平降低可预测先兆子痫的发作, 但是之前还没有深入研究这些血管发生因子的尿排泄, 也没有在疾病严重程度情形中分析这样的排泄水平的具体作用。本发明提供监测和使用尿样中 sFlt-1、VEGF 和 PlGF 水平作为高血压病症包括先兆子痫的诊断指标。而且, 本发明提供非侵入式方法区分重度先兆子痫与其它高血压病症。所开发的方法和试验简单、廉价并且可在早至妊娠首三个月使用, 因此增加了早期检测和治疗的的可能性。而且, 虽然本发明参考妊娠女性描述, 本文所述方法还可用于评价非妊娠女性在妊娠期间发生高血压病症的风险。

在一个实施方案中, 通过测量从试验对象所得尿样中的 sFlt-1 浓度

并将该浓度与适当的标准比较，本发明提供诊断或辅助诊断妊娠女性具有或倾向于发生高血压病症的方法。例如，该标准可以是从小于妊娠正常的妊娠女性或从具有证实的高血压病症包括先兆子痫的妊娠女性所得尿中的 sFlt-1 浓度。这样的对象被称为参照对象。从参照对象获得参照样品，获得参照样品时参照对象所处妊娠周对应于获取试验样品时试验对象所处妊娠周。可以在从试验对象获取尿样的同时获取并分析参照样品。作为替代，可以使用已建立的标准（预先建立的标准或评价试验对象中所得尿样后形成的标准）。与正常妊娠女性尿中的 sFlt-1 浓度相比，所评价妊娠女性（试验对象）尿中 sFlt-1 浓度增加指示该女性出现先兆子痫或其它高血压病症的风险增加。sFlt-1 浓度增加到超过 9.5 pg 每毫克尿肌酸酐指示该妊娠女性发生轻度先兆子痫的风险增加，而 sFlt-1 浓度增加到超过 40 pg 每毫克尿肌酸酐指示该妊娠女性发生重度先兆子痫的风险增加。

在另一个实施方案中，本发明提供了通过测量从妊娠女性中所得尿样中的 PIGF 和 sFlt-1 浓度并将所得值进一步分析而评价或辅助评价妊娠女性将发生高血压病症的可能性的方法。在一个实施方案中，使用公式分析该值并计算所谓的女性 uFP，其等于 $\log [sFlt-1/PIGF \times 100]$ 。该分析的结果指示所评价的妊娠女性是否处于发生高血压病症的风险。例如，uFP 超过 1.4 是风险增加的先兆指标，妊娠女性将需要治疗以防止发生或恶化高血压病症相关症状。作为进一步实例，uFP 超过 2.1 在区分患重度先兆子痫的妊娠女性和正常血压对照中具有 88.2% 灵敏度和 100% 特异性。与目前可用的方法（通过试条试验和测量总蛋白质浓度评价蛋白尿）相比，本方法提供显著更准确的对妊娠女性重度先兆子痫的诊断。在本发明的另一个方面，所述 uFP 值被用作发生先兆子痫的特异性并发症风险的诊断指标，包括经剖腹产分娩、血清尿酸增加、收缩压和舒张压增加、试条蛋白尿、孕次（gravidity）、分娩时胎儿体重、胎盘早剥、宫内发育迟缓（IUGR）溶血、血小板减少、肝脏酶升高和 HELLP 综合征（溶血、肝脏酶升高、低血小板计数）。

上述方法中，可在禁食或非禁食状态下得到尿样。可以采用免疫学分析如 ELISA 检测血管发生因子。本文公开方法的一些方面中，妊娠女性可诊断为具有以下任何的高血压病症或者发生任何这些病症的风险增加：先兆子痫、子痫、轻度先兆子痫、慢性高血压、EPH 妊娠中毒、妊娠高血压、并发先兆子痫（包括在慢性高血压、慢性肾病或狼疮基础上发生的先兆子痫）、HELLP 综合征（溶血、肝脏酶升高、血小板

计数低)或肾病。虽然本发明参考妊娠女性(人)进行描述,但是其还可以用于诊断和/或评价在非人类雌性中发生高血压病症的风险。

在另一个实施方案中,本发明是用于确定妊娠女性是否具有发生高血压病症比如先兆子痫风险的诊断试剂盒。所述试剂盒可包括接受尿样的接受器,可检测样品中血管发生因子的工具(例如试剂),以及基于所得值评价发生高血压病症风险的指导。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包括试剂比如抗体,其用于检测血管发生因子比如 PIGF 和 sFlt-1,用于确定妊娠女性是否有发生先兆子痫的风险以及用于评价女性发生先兆子痫风险的指导,其可以包括参照或标准。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包括至少一种检测 PIGF 的抗体和至少一种检测 sFlt-1 的抗体。

除非另外指出,本文所用的所有技术和科学术语与本发明所属领域一般技术人员普遍理解的意义相同。虽然与本文描述方法和材料相似或相等的那些可用于实施或检验本发明,但是适当的方法和材料描述于下。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考通过参考并入本文。材料、方法和实施例仅仅是示例性的,而不具有限制含义。

从以下详细说明和权利要求,本发明的其它特征将是显而易见的。

附图说明

本专利的文件包含至少一个彩色附图。经要求并付必要费用后,将由专利商标局提供带有彩图的本专利副本。

图 1 显示加入本研究的患高血压病症的妊娠女性和对照的母亲特征、胎儿特征和临床表现。通过单因素 ANOVA (\dagger)、Kruskal-Wallis ANOVA (\ddagger)、卡方 (\P) 分析数据。

图 2 显示患不同高血压病症的妊娠女性的临床实验室特征。通过 Mann-Whitney 检验 (\S)、Student t-检验 (Υ) 分析数据。

图 3 显示随机小便中测量的血管发生因子浓度。通过 Kruskal-Wallis ANOVA (\ddagger) 分析数据并且值用每毫克肌酸酐表示 (mgc)。

图 4A-4D 显示不采用本文描述的稳定化处理, sFlt-1 和 VEGF 随时间的多肽降解。

图 5A-5B 显示 (A) sFlt-1 和 (B) PIGF 的代表性 ELISA 试验结果。

图 5C-5D 显示 (C) 用于从 ELISA 数据中计算 uFP 的代表性展开表和 (D) 与对照 (CRL) 相比患重度先兆子痫 (sPE) 的患者的平均 (+SD) uFP。

图 6 显示每个试验组和对照组中可溶性 fms-样酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 与游离胎盘生长因子 (PIGF) 之比率的散点图。NP-CTR: 非妊娠对照; P-CTR: 妊娠对照; p-HTN: 不满足重度先兆子痫标准的高血压/蛋白尿女性; sPE: 重度先兆子痫。

图 7 显示接受者工作曲线 (receiver operating curve, ROC) 分析, 证明 uFP ($\log [aFlt-1/PIGF \times 100]$) 区分正常血压对照与患重度先兆子痫女性的能力。

图 8 显示尿酸对比 uFP 数据的散点图; r: 回归线; PI: 预测区间 (群体置信区间)。73%尿酸数据可用于分析。sFlt-1: 可溶性 fms-样酪氨酸激酶-1; PIGF: 胎盘生长因子。

图 9 显示尿血管发生因子、白蛋白、肌酸酐的血清和尿浓度, 以及在随机小便中测量的总蛋白质比肌酸酐比率。对正态分布数据 (\dagger), 结果报告为平均值 \pm SEM, 或者对偏斜数据 (\ddagger) 报告为中值和范围。

图 10A-10B 显示 (A) 研究组的血清 VEGF 浓度以及它们的显著性水平, 和 (B) 研究组的尿 VEGF 浓度以及它们的显著性水平。NP-CTR: 非妊娠对照; P-CTR: 妊娠对照; mPE: 轻度先兆子痫; sPE: 重度先兆子痫。数据表示为平均值和 SEM。

图 11A-11B 显示 (A) 研究组的血清 sFlt-1 浓度以及它们的显著性水平, 和 (B) 研究组的尿 sFlt-1 浓度以及它们的显著性水平。NP-CTR: 非妊娠对照; P-CTR: 妊娠对照; mPE: 轻度先兆子痫; sPE: 重度先兆子痫。数据表示为平均值和 SEM。

图 12A-12B 显示 (A) 研究组的血清 PIGF 浓度以及它们的显著性水平, 和 (B) 研究组的尿 PIGF 浓度以及它们的显著性水平。NP-CTR: 非妊娠对照; P-CTR: 妊娠对照; mPE: 轻度先兆子痫; sPE: 重度先兆子痫。数据表示为平均值和 SEM。

图 13 显示源于患高血压病症的妊娠女性和对照对象的血管发生标志物以对数形式的排泄分数。

具体实施方式

先兆子痫发生在妊娠后半期并且与重要的母亲和胎儿发病和死亡有关。目前，没有有效的筛选试验来诊断或评价发生这种疾病和相关高血压病症的风险。结果是妊娠女性直到发生该病症相关并发症（包括血压升高和蛋白尿）后很久才接受有效的监测或治疗。此外，由于在妊娠早期阶段护理人员没有可排除妊娠女性具有风险的有效手段，因此很少或没有发生这些病症之风险的妊娠女性必须在她们整个妊娠期间经受不必要的症状检验。

如本文所述，申请人假设由于先兆子痫持续伴随母体肾脏的功能和形态学紊乱，因此患先兆子痫的妊娠女性的尿中血管发生因子水平被改变，并将提供更有效和更少侵入性的筛选方法以鉴定或辅助鉴定患高血压病症包括先兆子痫的妊娠女性。

本文所用的“先兆子痫”根据公认的标准定义为在个体间隔 4 到 6 小时有两次，血压至少 140/90mmHg 并且在 24 小时尿蛋白质排泄中尿中排泄至少 0.3 g 蛋白质（或试条试验中至少+1 或更大）。本文所用的“重度先兆子痫”也根据公认标准定义为间隔 6 小时至少两次血压至少 160/110 mmHg 并且在 24 小时尿蛋白排泄中大于 5 克蛋白质或在试条试验上持续+3 蛋白尿。重度先兆子痫可包括 HELLP 综合征（溶血、肝脏酶升高、血小板计数低）。重度先兆子痫的其它要素可包括根据美国人口统计小于 10% 百分比中的宫内发育迟缓（IUGR），持续性神经症状（头痛、视觉障碍）、上腹痛、少尿（少于 500mL/24h）、血清肌酐大于 1.0mg/dL、肝脏酶升高（大于正常两倍）、血小板减少（<100,000 个细胞/ μ L）。

本文描述的是与以下相关的方法和组合物，检测和/或监测妊娠女性尿样中血管发生因子尤其是 VEGF、PlGF 和 sFlt-1 的水平，以及这种水平与在妊娠女性妊娠过程中特定点处妊娠女性将发生高血压病症比如先兆子痫的可能性之间的关系。“妊娠过程”指很多妊娠阶段或时期，包括贯穿每个三月期以及从一个三月期向下一个三月期过渡期间的妊娠。“妊娠过程”包括正常妊娠和发生高血压病症的妊娠的妊娠期。“正

常妊娠”指没有并发症并且该女性不发生高血压病症的妊娠。

在公开的方法中，妊娠女性可诊断为具有任何以下高血压病症或者发生任何这些病症的风险增加：先兆子痫、子痫、轻度先兆子痫、慢性高血压、EPH 妊娠中毒、妊娠高血压、并发先兆子痫（包括慢性高血压、慢性肾病或狼疮基础上发生的先兆子痫）、HELLP 综合征（溶血、肝脏酶升高、血小板计数低）或肾病。虽然本发明参考妊娠女性进行描述，但是本文描述的方法还可以用于评价非妊娠女性在妊娠期间发生高血压病症的风险。

本文描述的方法和组合物能通过检测和/或监测妊娠女性尿样中血管发生标志物水平来实现评价和/或监测妊娠女性发生高血压病症的风险。如本文所述，这可通过在妊娠期间不同阶段获取尿样并分析其血管发生因子水平来实施。所得值还可与已知标准相比较。本文所用的“适当标准”指从参照对象中所得尿中血管发生标志物的水平。可从正常妊娠的妊娠女性尿样或从证实患有高血压病症比如先兆子痫的妊娠女性尿样中确定适当的标准浓度（参照对象）。形成适当标准基础的样品来自参照对象，当获取样品时，所述参照对象的妊娠周与获取试验样品时试验对象所处妊娠周相对应。可以在从试验对象获取尿样的同时获取并分析参照样品。作为替代，采用统计学研究和常规试验可前瞻性或回顾性确定标准表达水平以评价试验对象尿样。本领域一般技术人员采用公知方法可确定标准表达水平。

可经本发明方法评价的尿样包含足够水平的感兴趣血管发生因子用于经本文所述评价技术来检测。具体而言，尿样必须具有可检测水平的任一种 VEGF、PlGF 和 sFlt-1，所用评价技术适用于此。如果当分析时样品中含有可检测水平的感兴趣血管发生标志物，可在收集后立即或晚些时间分析尿样。例如可在-70℃冷冻尿样和/或在用稳定或保存感兴趣血管发生标志物的试剂预处理的容器中混合、合并或保存。在一个优选实施方案中，从早晨第一次小便中收集尿样。

本文所用的术语“血管发生标志物”指一种或多种分子比如 VEGF、PlGF 和 sFlt-1，其可单独或组合使用于检测或辅助检测发生高血压病症的风险；监测高血压病症相关的妊娠并发症进程；和/或监测治疗高血压病症相关的妊娠并发症的有效性。

本文所用的术语“多肽”指不限定具体长度的氨基酸聚合物。因此，肽、寡肽和蛋白质都包括在多肽的定义内。

可通过检测已转录分子表达或其相应蛋白质的多种公知方法的任何一种评价可用于本发明方法的血管发生标志物水平。这种方法的非限定性实例包括检测分泌蛋白的免疫学法、蛋白质纯化法、蛋白质功能或活性分析、核酸杂交方法、核酸逆转录法和核酸扩增法。在一个实施方案中，采用 ELISA 分析评价血管发生标志物水平。

在某些实施方案中，本发明包括在测量血管发生标志物水平之前采用一种或多种稳定剂处理妊娠女性的尿样和/或采用一种或多种稳定剂预处理用于收集这种尿样的容器。术语“稳定剂”指一种或多种能用于防止血管发生标志物降解的分子比如多肽或核酸。在一个实施方案中，稳定剂是蛋白酶抑制剂，包括任何以下物质：4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟 (AEBSF) 和 Pefabloc SC、抗蛋白酶 (Antipain) 和抗蛋白酶二盐酸盐、抑酶肽 (Aprotinin)、苯甲脒 (Benzamidin) 和盐酸苯甲脒、苯丁抑制素 (Bestatin)、抑糜酶素 (Chymostatin)、E-64(L-反式-环氧琥珀酰-亮氨酸酰胺-(4-胍基)-丁烷或 N-[N-(L-反式-羧基环氧乙烷-2-羧基)-L-亮氨酸]-精胺 (N-[N-(L-trans-carboxyoxiran-2-carbonul)-L-leucyl]-agmatine)、乙二胺四乙酸及其钠盐 (EDTA-Na₂)、亮抑酶肽 (Leupeptin)、乙基马来酰亚胺、胃酶抑素 (Pepstatin) 和胃酶抑素 A、磷酰二肽 (phosphoramidon)、叠氮化钠、胰蛋白酶抑制剂或 ϵ -氨基己酸。

申请人已证明患有高血压病症的妊娠女性尿中 sFlt-1 显著增加并且尿 PIGF 显著降低。本发明特征在于：测量尿样中 PIGF 和 sFlt-1 浓度并运用这些对立生长因子的比率来从具有其它形式高血压病症包括伴随或不伴随慢性高血压的轻度先兆子痫的妊娠女性以及正常血压对照中区分出具有重度先兆子痫的妊娠女性。本发明的方法还可用于评价妊娠女性发生特定高血压病症并发症包括先兆子痫的风险。这样的并发症可包括剖腹产分娩、血清尿酸增加、收缩压和舒张压增加、试条蛋白尿、孕次 (gravidity)、分娩时胎儿体重、胎盘剥离、IUGR、溶血、血小板减少、肝脏酶升高和 HELLP 综合征 (溶血、肝脏酶升高、血小板计数低)。

在某些实施方案中，可使用公式分析血管发生标志物的浓度或水平的测定结果。所得值提供有关妊娠女性将发生高血压病症比如先兆子痫

可能性的信息。本文所用的术语“公式”指任何数学表达式、运算法则或其它量度，其可用于评价感兴趣的血管发生标志物水平是否指示妊娠女性具有高血压病症和/或高血压病症的特定并发症或者有发生这些疾病的风险。

在一个实施方案中，使用公式计算妊娠女性的 uFP。对于本发明的目的，术语“uFP”指 $\log [sFlt-1/PIFG \times 100]$ 。在本发明的一个方面，uFP 超过 1.4 是风险增加的先兆指标，妊娠女性将需要治疗以防止发生或恶化高血压病症相关症状。在本发明的另一个方面，uFP 超过 2.1 指示妊娠女性具有重度先兆子痫或处于发生重度先兆子痫的风险。在本发明的又一方面，uFP 超过 2.1 指示妊娠女性有剖腹产分娩的风险。

在一些实施方案中，本发明提供涉及本发明方法和/或组合物的试剂盒。试剂可以是标记化合物或能检测对应尿样中本发明血管发生标志物的多肽以及用于检测多肽量的工具（例如结合该多肽的抗体）。用于和可用于本发明方法中血管发生标志物相对应多肽相结合的适当试剂包括抗体、抗体衍生物、抗体片段等。对于基于抗体的试剂盒，试剂盒可包括，例如：（1）第一抗体（例如，附着于固体支持物），其结合对应本发明血管发生标志物的多肽；和，任选地，（2）第二种不同抗体，其或与所述多肽相结合或与第一抗体相结合并且与可检测标记相偶联。

采用适当的样品来比较待测样品中所得结果。

所述试剂盒还可以包含其它的成分比如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。试剂盒还可以进一步包含检测可检测标记必需的成分（例如酶或底物）。

试剂盒的每个成分可被包封于单独容器内并且所有各种容器可包含在单个包装中，还附带说明书来解释采用试剂盒进行分析的结果。可采用稳定剂预处理所述容器和/或稳定剂可以是试剂盒的成分。

本发明还涉及评价患重度先兆子痫的女性中是否发生肾小球损伤可以解释尿样中血管发生标志物的释放增加。最近报道的研究支持这样的观点：胎盘形成缺陷导致胎盘缺血随后全身性释放损伤母亲血管内皮的细胞毒性产物。申请人假定血管发生中的这种紊乱还间接作用于母亲的全身脉管系统，包括肾脏中（19, 20, 21, 22, 23）。由于肾小球内皮增

生是先兆子痫的常见形态学损害，申请人关注尿样中血管发生标志物的水平增加是否因为由于肾小球损伤而导致这些标志物在尿中的分泌增加，或者尿排泄增加是否反映了胎盘或全身性血管合成的增加。申请人发现血清中血管发生因子水平不是一贯地与尿中该因子水平相关联。他们还发现患有重度先兆子痫的女性在临床明显的疾病时 VEGF 和 sFlt-1 的排泄分数增加，无论由蛋白尿程度所反映的肾小球完整性是否丧失。

本文所用的不定冠词和定冠词指至少一个该冠词的语法对象。

本文所用的术语“包括”意思是指短语“包括但不限于”，并且可与“包括但不限于”互换使用。

本文所用的术语“比如”意思是指短语“比如但不限于”，并且可与“比如但不限于”互换使用。

虽然所提供的详细描述参考 VEGF、PlGF 和 sFlt-1，本领域技术人员将清楚知道本描述还可应用于每种生长因子的家族成员、类似物、天然存在的等位基因变体、异构体、前体和/或变体。

除非另外指出，本发明的实施将运用在本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学常规技术。这些技术被描述于文献中。

实施例

在此一般性描述了本发明，通过参考以下实施例将更容易理解本发明，包括这些实施例仅仅是为了举例说明本发明某些方面的目的，而不是意图限制本发明。

实施例 1

患高血压病症的妊娠女性中 sFlt-1 水平增加和 PlGF 水平降低

参与者

采用 2004 年 2 月到 8 月之间 Yale New Haven 医院接纳的 68 名女性的尿样。在耶鲁大学人类调查委员会 (Human Investigation Committee of Yale University) 批准的规则下收集样品。从所有参与者那里得到书面知情同意书。基于月经日期和/或妊娠 20 周之前的超声检查确认胎龄。所有

请求加入研究的女性同意参加。申请人要求从允许进入产房以及分娩前高低风险病房 (the antepartum High and Low Risk Units) 的妊娠女性中招收并预期招收到患者。所招收患者都没有被排除在最后分析之外。

测试以下组的女性：重度先兆子痫 (sPE, n=17)、不满足重度先兆子痫标准与妊娠相关的高血压/蛋白尿病症 (pHTN, n=21)、健康妊娠对照 (P-CTR, n=16)、和健康非妊娠育龄期女性 (NP-CTR, n=14)。本文所用的“先兆子痫”根据公认标准定义为在每个体间隔 4 到 6 小时有两次，舒张血压至少 140/90 mmHg 并且在 24 小时尿蛋白质排泄中尿中排泄至少 0.3 g 蛋白质(或试条试验中蛋白尿至少+1)。本文所用的“重度先兆子痫 (sPE)”被定义为 HELLP 综合征 (溶血、肝脏酶升高、血小板计数低)，在 6 小时间隔中至少 2 次血压>160/110 mmHg、在 24 小时尿蛋白排泄中蛋白质>5 克、或在试条试验上持续+3 蛋白尿。该定义的其它要素包括根据美国人口统计小于 10% 百分比中的宫内发育迟缓 (IUGR)，持续性神经症状 (头痛、视觉障碍)、上腹痛、少尿 (少于 500 mL/24h)、血清肌酸酐>1.0 mg/dL、肝脏酶升高 (大于正常两倍)、血小板减少 (<100,000 个细胞/ μ L)。“慢性高血压 (crHTN)”指妊娠前或妊娠 20 周之前血压持续升高>140/90 mmHg。“蛋白尿”被定义为 24 小时尿收集物中蛋白质>300mg。为了评价胎盘高血压病症的组织学变化，申请人咨询了不了解本研究结果的临床病理学家产生的病理学报告。38 名高血压患者的病理学报告中有 29 名可以使用，并且对以下内容进行摘要：真皮炎的存在性、体积>3cc 的梗塞、与先兆子痫一致的病理学变化的征兆 (蜕膜血管没有滋养层浸润或生理性转化的征兆)、和/或剥离的征兆 (含铁血黄素沉积和/或绒毛间血栓)。

68 名参加研究的患者中，17 名满足 sPE 标准。在加入时，申请人仅仅了解女性是否高血压或该女性是否达到 sPE 标准。由于不能预见高血压状态的性质，pHTN (n=21) 组是不一致的，由具有 crHTN (n=10)、轻度先兆子痫 (n=9) 或高血压蛋白尿肾病 (n=2, 狼疮和肾病综合征) 在先病史的女性组成。

与 sPE 女性相比较，pHTN 组年龄显著较大 (Student-Newman-Keuls, p=0.021) (图 1)。取样时各组之间的胎龄 (GA) 没有差异。相似地，在我们的研究对象中，孕次、已产子女数或母亲体重没有差异。与 P-CTR 相比，sPE 和 pHTN 组的高血压女性的血压显著更

高（平均动脉压：sPE:122, pHTN:115, P-CTR : 77 mmHg, $p<0.001$ ）。更高比例的 sPE 女性表现出神经症状（图 1）。

发生在高血压组的临床实验室和胎盘组织学变化支持临床诊断（图 2）。

当用快速尿试条试验筛选时，sPE 女性患有更严重程度蛋白尿。然而，当分析实验室 24 小时尿蛋白质排泄时，不能证实 sPE 和 pHTN 组之间有差异。与 pHTN 女性相比，sPE 患者的乳酸脱氢酶-LDH（血管内容血的标志）、尿酸水平更高，并且血小板计数更低。妊娠期间由 sPE 并发剥离（含铁血黄素沉积和/或绒毛间血栓）的组织学征兆更常见（ $p=0.003$, Fisher's 精确检验）。

样品收集

标准采用无菌容器收集随机尿样（5-10mL/样品）。加入研究时，所有 sPE 女性安置导尿管（Foley catheter）以允许准确监测尿输出量。没有导尿管时，采用其它无菌技术（“直导管 straight cath”或“清洁收集 clean catch”）收集尿样。“直导管”技术是用直导管以无菌方式收集尿样的“入和出”方法。“清洁收集”技术是收集尿样同时尽可能避免细菌污染生殖器菌群。60%的 sPE 女性在开始硫酸镁发作预防之后加入研究。硫酸镁发作预防是临床先兆子痫患者的标准护理，由于用硫酸镁处理已显示能预防这些患者的发病。9 名女性在开始发作预防性治疗之前以及之后 2-12 小时收集尿样。平行进行尿样的生化分析。收集之后样品在 $3000\times g$ 和 $4^{\circ}C$ 下离心 20 分钟，等分试样并立即保存在 $-80^{\circ}C$ 直到采用特异性免疫分析检测 sFlt-1、VEGF 和 PlGF 水平。

免疫分析方法

根据制造商说明书（R&D Systems, Minneapolis, MN）进行人游离 VEGF、sFlt-1 和 PlGF 的 ELISA 分析。在预先用抗游离 VEGF、sFlt-1 或 PlGF 的捕获抗体包被的 96 孔板中分析样品，一式两份。孵育操作后洗涤并根据操作说明在 450nm 读数。分析中 VEGF、sFlt-1 和 PlGF 的最小可检测剂量分别是 5、5 和 7 pg/mL。分析间和分析内变异系数在 3%-10% 变化。由于蛋白尿可能经历日内变异，因此基于采用源于已知浓度的标准曲线由相同份试样测定肌酐和蛋白质浓度来计算数据并

将数据标准化。由肌酸酐和/或总蛋白质浓度将血管发生因子的水平标准化。

统计学分析

采用 Kolmogorov-Smirnov 法将所有数据组进行正态性检验并且报告为平均值和 95%置信区间 (95%CI) (对于正态分布数据) 或者中值加范围 (偏斜数据)。VEGF、sFlt-1 和 PIGF 浓度以算术平均数表示并且在数据对数变换之前 (Kruskall-Wallis ANOVA) 或之后 (单因素 ANOVA) 完成统计学分析。采用 Student's t-检验或 Mann-Whitney 秩和检验进行两组间比较。用 Fisher's 精确检验或卡方检验比较比例关系。我们应用单变量分析和多变量分析以及线性回归模型来识别作为自变量的母体或实验室特征与作为因变量的 sFlt-1/PIGF 比率之间的显著相关性。采用 Pearson 或 Spearman 积差相关法测量所选自变量之间的共线性以及因变量和自变量之间的其它相关性。采用 MedCalc (Broekstraat, Belgium) 统计学软件进行接受者工作曲线 (ROC) 分析。统计学显著性判断设置在 $p < 0.05$ 。

尿中 VEGF、sFlt-1 和 PIGF 水平

在取样时尿中 VEGF、sFlt-1、PIGF 和 GA 水平之间没有相关性 (VEGF: $r=0.09$, sFlt-1: $r=0.02$, PIGF: $r=-0.03$, $p > 0.05$)。下图 3 表示尿中血管发生因子水平 (以非对数形式)。

与 NP-CTR 相比, 患 sPE 女性的尿中 VEGF 水平较高 (Student-Newman-Keuls, $p=0.023$)。妊娠组之间尿中 VEGF 没有显著变化 (单因素 ANOVA, $p=0.536$)。与 NP-CTR 组相比, 健康妊娠女性尿中 PIGF 浓度显著增加 (Student-Newman-Keuls, $p < 0.001$)。与 NP-CTR 相比, 正常妊娠与尿中显著更高的 PIGF 水平有关 ($p < 0.001$)。与健康妊娠对照相比, pHTN 和 sPE 女性尿中 PIGF 输出量显著降低 ($p < 0.001$)。最后, 与 pHTN ($p=0.016$) 和 P-CTR ($p < 0.001$) 相比, 已经确定 sPE 女性尿中 sFlt-1 水平显著更高。与 P-CTR 组相比, pHTN 女性尿中 sFlt-1 输出量更高 ($p=0.001$)。P-CTR 和 NP-CTR 健康对照之间尿中 sFlt-1 水平没有显著性差异 ($p=0.594$)。

实施例 2

尿样中 sFlt-1 和 VEGF 的降解

进行试验以检验尿中血管发生因子的稳定性。测试来自先兆子痫患者的 8 个尿样 (i) 如本文所述作为尿样或 (ii) 在室温下 24 小时后。下图 4 显示采用 Bland-Altman 一致性方法分析这两种样品的 ELISA 数据之间的一致性。该分析对所述两次测量 (偏差) 之间差异值对其平均值进行作图分析, 以评估如果这两种技术之间的差异很重要, 这两种方法是否可以互换使用以及差异之间的变异性是否随测量值范围的增加而增加。结果证明 sFlt-1 的免疫反应性损失最大 (图 4A: 平均: 57.5 pg/mL), 随后是 VEGF (图 4B: 平均: 41.1 pg/mL)。对于 PIGF (图 4C), 负偏差 (-8.8 pg/mL) 提示室温 24 小时后测量值稍微增加, 提示其它因素比如样品蒸发还可能影响结果。图 4D 举例说明免疫反应性从之前作为 100% 水平而发生的相对变化。结果提示 sFlt-1 的免疫反应性统计学降低 (对于 sFlt-1, 带符号秩检验 $p=0.023$), VEGF 不变 ($p>0.05$), 以及 PIGF 显著增加 (带符号秩检验 $p=0.023$)。

实施例 3

尿中 sFlt-1/PIGF 比

如本文发现, 正常妊娠特征表现为尿中 PIGF 排泄增加, 而高血压状态特征表现为 sFlt-1 增加, 但尿中 PIGF 降低。下图 5A-5B 显示代表性 ELISA 试验, 证实这样的高血压状态对以下的影响: (A) 妊娠女性 sFlt-1 水平和 (B) 妊娠女性 PIGF 水平。考虑到这点, 申请人推断尿中 sFlt-1/PIGF (uFP) 比率将是个体尿中血管发生标志物稳态平衡的更好指标。采用以下公式计算该比率指标: $uFP = \log [sFlt/PIGF \times 100]$ 。下图 5C-5D 显示 (C) 用于从本文提供的 ELISA 数据计算 uFP 的展开表和 (D) 比较 sPE 患者与 P-CTR 的平均 (+SD) uFP。这些计算的结果证实, 与 pHTN (Student-Newman-Keuls, $p=0.008$)、P-CTR ($p<0.001$) 或 NP-CTR ($p<0.001$) 比较, sPE 女性中 uFP 显著升高 (图 6)。与 P-CTR ($p<0.001$) 和 NP-CTR ($p<0.001$) 比较, pHTN 组 uFP 值也显著升高。

对 uFP 进行 ROC 分析。通过这个分析, 已经确定在区分 sPE 女性和正常血压对照中, 截断值 >2.1 具有 88.2% 灵敏度和 100% 特异性 (曲线下面积, [95% CI]: 0.974[0.849-0.994]) (图 7)。从正常血压对照中聚类 sPE 女性时, uFP 明显比单独蛋白尿更好 (曲线下面积 [95% CI]:

0.809[0.635-0.924], $p=0.03$)。

在开始治疗之前和之后可获得尿样时通过比较一组 9 名女性中的 uFP 比率, 还研究了输注硫酸镁的可能作用。已经确定在对硫酸镁发作预防的反应中 uFP 在 2 到 12 小时没有显著变化(成对 t-检验, $p=0.854$)。

为了调查 uFP 比率和几种母亲和临床实验室因素之间的可能相关性, 申请人建立模型, 以 uFP 比率作为因变量, 相对以母亲年龄、孕次、已产子女数、GA、IUGR、收缩压和舒张压、蛋白尿、神经症状 (0=无; 1=有)、肝功能检验 (AST、ALT)、血小板计数、分娩方式 (剖腹分娩[CD]对比自然阴道分娩[SVD])、尿酸、血清 LDH、和剥离的组织病理学征兆 (0=无; 1=有) 作为自变量。这些变量输入多元线性回归模型中。发现尿酸和 CD 分娩最好地完成模型 ($r=0.628$) 并且与 uFP 相关 (对于 CS, $p=0.002$, 对于尿酸, $p=0.005$)。最后保留在我们模型中的 2 个参数 (CD 和尿酸) 之间没有显著的共线性 ($r=0.143$, $p=0.391$)。

在单变量分析中, 确定了 uFP 和母亲血清尿酸之间的显著相关性 (Pearson $r=0.458$, $p=0.003$) (图 8), 以及 uFP 和经 CD 分娩之间的显著相关性 (Spearman $r=0.514$, $p<0.001$)。与自然分娩的女性相比, CD 分娩女性的 uFP 比率显著升高 (平均[95%CI] CS: 2.6 [2.4-2.8]对比 SVD: 1.8 [1.8-2.3], $p=0.007$)。还进一步确定 uFP 比超过 2.1 的女性经 CD 分娩的风险增加 (OR [95% CI]: 6.57 [1.51- 28.53])。其它与疾病严重程度一致的变量与 uFP 显著相关: 收缩压和舒张压、试条蛋白尿 ($p<0.001$)、孕次、分娩时胎儿体重、胎盘剥离征兆、已产子女数和 IUGR ($p<0.05$)。

实施例 4

母亲血清和尿中血管发生因子浓度

参与者和样品收集

对于该研究, 申请人研究了从 2004 年 2 月到 2005 年 1 月之间 Yale New Haven Hospital 接纳的 64 名女性中获得的时间匹配的成对血清-尿样品。在耶鲁大学人类调查委员会批准的规则下收集样品。所有参与者在加入之前提供知情同意书。所有请求加入研究的女性同意参加。之前报告了 14 名女性的尿免疫学分析结果, 但没有报告血清免疫学分析结果。基于月经日期和/或妊娠 20 周之前的超声检查确认胎龄 (GA)。从已评价

或允许进入产房和分娩前高低风险病房的女性中招收对象。基于调查者之一的可获得性 (CSB), 潜在地请求我们的对象加入。加入研究的女性没有人被排除在最后分析之外。

申请人将患者分成以下几组: 重度先兆子痫 (sPE, n=27)、不满足重度先兆子痫标准的轻度先兆子痫高血压和蛋白尿女性 (mPE, n=15)、健康妊娠对照女性 (P-CTR, n=13)、和健康非妊娠育龄女性 (NP-CTR, n=9)。轻度先兆子痫根据公认标准定义为在每个体间隔 4 到 6 小时有两次, 舒张压至少 140/90 mmHg 并且在 24 小时尿蛋白质排泄中尿中排泄至少 0.3g 蛋白质 (或试条试验中至少 1+或更大)。sPE 被定义为 HELLP 综合征 (溶血、肝脏酶升高、血小板计数低), 在 6 小时间隔中至少 2 次血压 >160/110 mmHg, 在 24 小时尿蛋白排泄中蛋白质 >5 克, 以及在试条试验中持续 +3 蛋白尿。sPE 定义的其它要素包括, 宫内发育迟缓 (IUGR) < 10 个百分点, 持续性神经症状 (头痛、视觉障碍)、上腹痛、少尿 (少于 500mL/24h)、血清肌酸酐 >1.0mg/dL、肝脏酶升高 (大于两倍正常值)、血小板减少 (< 100,000 个细胞/ μ L)。慢性高血压 (crHTN) 被定义为妊娠前或妊娠 20 周之前 BP 持续升高 >140/90 mmHg。蛋白尿被定义为 24 小时尿收集期间蛋白质 >300mg。

标准采用无菌容器收集随机尿样 (5 到 10mL)。加入研究时, 所有 sPE 女性安置导尿管以允许准确监测尿排出量。没有导尿管时, 采用其它技术 (膀胱导管插入术或“清洁收集”方法) 收集尿样。同样在无菌条件下收集从 mPE、P-CTR 和 NP-CTR 女性获得的样品 (导尿管、膀胱导管插入术或“清洁收集”技术)。70% sPE 女性在开始硫酸镁发作预防之前加入。在收集尿的同时通过静脉穿刺收集血样并允许血样凝结。在允许时、引产术或剖腹分娩之前收集样品。血清和尿样品在 3000 \times g 和 4 $^{\circ}$ C 下离心 20 分钟, 等分上清液并立即贮藏在 -80 $^{\circ}$ C 直到采用特异性免疫分析测量 sFlt-1、VEGF 和 PlGF 水平。

VEGF、sFlt-1 和 PlGF 的免疫学分析方法

根据制造商说明书 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 进行人未结合的 VEGF、sFlt-1 和 PlGF 的 ELISA 分析。在预先用抗游离 VEGF、sFlt-1 或 PlGF 的捕获抗体包被的 96 孔板中分析血清和尿样品, 一式两份。孵育操作后洗涤并根据操作说明在 450nm 读数。分析中 VEGF、sFlt-1 和 PlGF 的最小可检测浓度分别是 2、5 和 7 pg/mL。采用 Softmax

软件 Pro 3.1.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 报告我们的数据并进行作图。如果样品孔的光密度超过零标准 (空白孔), 所述软件报告正值。如果样品孔的光密度低于零标准, 则报告负值并由计算机自动转变成零。当在任何分析中有不可检测水平 (值低于零标准) 的情况时, 血清 VEGF 是仅有的分析物。分析间和分析内变异系数从 3% 到 10% 变化。采用 VERSAmax™ 酶标仪和 Softmax Pro 3.1.1 软件以 570 nm 波长校正在 450nm 读出分析板。

白蛋白免疫分析方法

用捕获抗体 (10µg/ml 山羊抗人白蛋白抗体 (Bethyl Laboratories) 包被微滴定板 (Immuno MaxiSorp, Nalge Nunc, Rochester, NY)。洗涤板子、封闭板子、并与尿 (1:1000 稀释或 1:100 对于 NP 患者) 或血清样品 (稀释 1:150,000) 或 6.25 至 400 ng/ml 范围的人白蛋白校准物 (Bethyl Laboratories) 一起孵育板子。用偶联辣根过氧化物酶的山羊抗人白蛋白抗体 (1:150,000 稀释, Bethyl Laboratories) 和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 作为底物完成检测。用 2M 硫酸终止颜色反应并以 650nm 波长校正在 450nm 处读板。分析内变异系数小于 5%。分析的灵敏度是 1 ng/ml。

其它生化评估

采用比色分析 (Stanbio Laboratory, Boerne, TX) 根据源于已知浓度的标准曲线在用于免疫分析的相同份试样中测量血清和尿中肌酸酐水平。还采用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid) /硫酸铜试剂 (BCA 试剂盒, Pierce, Rockford, IL) 测量总蛋白质水平。尿中血管发生因子、蛋白质或白蛋白水平用尿中肌酸酐浓度进行标准化。

统计学分析

采用 Kolmogorov-Smirnov 法将所有数据组进行正态性检验并且报告为平均值和 95% 置信区间 (95% CI) 或均值标准误差 (SEM) (对于正态分布数据) 或中值加范围 (偏斜数据)。在数据对数转换之后完成血管发生因子排泄分数的统计学分析。采用单因素方差分析或适当时用 Kruskal-Wallis ANOVA 进行成对多重比较步骤。采用 Student's t-检验或 Mann-Whitney 秩和检验进行两组间比较。用 Fisher's 精确检验比较

比例关系。采用 Pearson 积差相关法测量所选自变量之间的共线性以及因变量和自变量之间的其它相关性。对于每种血管发生因子，采用下式计算排泄分数指标： $[Ua] \times [Sc] / [Sa] \times [Uc]$ ，其中[Ua]和[Sa]分别代表尿和血清中血管发生因子的浓度，以及[Uc]和[Sc]代表尿和血清中肌酸酐浓度。对白蛋白和总蛋白质进行相似的计算。申请人以 $p < 0.05$ 判断统计学显著性。

血管发生因子、蛋白质、尿中随机总蛋白质/肌酸酐比率、白蛋白和肌酸酐在血清-尿中的水平

图 9 显示免疫分析结果。组间血清和尿中 VEGF、sFlt-1 和 PlGF 浓度具有显著性差异。与 mPE 女性相比，sPE 女性血清蛋白质浓度显著更低 (Kruskal-Wallis ANOVA, $p < 0.05$) 但尿中并非如此 ($p = 0.495$)。尿中随机总蛋白质/肌酸酐比率长期被提倡为 24-小时尿中总蛋白质排泄的强预测因子 (25)。与其它研究组相比，sPE 女性而非 mPE 女性尿中随机总蛋白质比肌酸酐比率显著增加 (Kruskal-Wallis ANOVA, $p = 0.007$)。

血清白蛋白分析结果证实组间没有显著性差异 (图 9)。然而，根据随机尿样分析，组间白蛋白尿具有显著性差异 ($p < 0.001$)。mPE 组 ($r = 0.477$, $p = 0.080$) 或 sPE 组 ($r = 0.143$, $p = 0.472$) 蛋白尿和白蛋白尿之间没有显著相关性。与具有 mPE 的女性 (单因素 ANOVA, $p = 0.04$) 和 P-CTR 女性 ($p = 0.005$) 相比，具有 sPE 的女性血清肌酸酐浓度显著更高。

血清-尿中 VEGF 水平

妊娠的特征表现为血清 VEGF 水平降低 (NP-CTR 对 P-CTR, $p < 0.001$) (图 9)。与 P-CTR 相比，sPE 女性具有显著更低的血清游离 VEGF 浓度 (ANOVA Kruskal-Wallis, $p < 0.05$)，而与 mPE 女性相比并非如此 ($p > 0.05$) (图 10A)。NP-CTR、P-CTR 和 mPE 女性中尿中 VEGF 浓度没有差异 (单因素 ANOVA, $p = 0.371$)。相比而言，sPE 女性尿中 VEGF 浓度超过 mPE 组的两倍 ($p = 0.01$) (图 10B)。对于 sPE 组，白蛋白尿和尿中 VEGF 水平之间没有显著相关性 ($r = 0.083$, $p = 0.860$)。mPE 中蛋白尿和尿中 VEGF 浓度之间具有显著相关性 ($r = 0.713$, $p = 0.003$)，而 sPE 组并非如此 ($r = -0.021$, $p = 0.918$)，这表明 sPE 深深改变血清和

尿中这种血管发生因子的浓度，而与蛋白尿无关。

血清-尿中 sFlt-1 水平

妊娠与血清 sFlt-1 水平增加相关(ANOVA Kruskal-Wallis, NP-CTR 对 P-CTR, $p < 0.001$) (图 11A)。与健康妊娠对照相比,临床诊断时 mPE 和 sPE 组中平均血清 sFlt-1 水平都显著提高 ($p < 0.05$)。由于 sPE 女性血清中 sFlt-1 浓度比 mPE 高 47%,可区分 sPE 和 mPE (sPE 对 mPE, $p < 0.05$)。妊娠本身不影响尿中 sFlt-1 浓度(NP-CTR 对 P-CTR, $p > 0.05$) (图 11B)。然而,与 P-CTR 组相比, mPE 对象尿中 sFlt-1 水平显著更高 (ANOVA Kruskal-Wallis, $p = 0.007$)。尿中 sFlt-1 浓度随疾病严重程度而变化 (sPE 对 mPE, $p < 0.05$)。sPE 组内白蛋白尿和尿中 sFlt-1 水平之间没有显著相关性 ($r = 0.324$, $p = 0.873$)。mPE 组 ($r = 0.137$, $p = 0.628$) 或 sPE 组 ($r = 0.336$, $p = 0.087$) 蛋白尿和尿中 sFlt-1 浓度之间没有显著相关性。总之,先兆子痫女性血清和尿中 sFlt-1 浓度显著提高。这种紊乱随高血压病症的严重程度而变化。

血清-尿中 PIGF 水平

在正常妊娠期间血清和尿中 PIGF 浓度显著提高 (ANOVA Kruskal-Wallis, P-CTR 对 NP-CTR, $p < 0.05$) (图 12A 和 12B)。此外,与 P-CTR 相比, sPE 女性和 mPE 血清 PIGF 水平低五倍 (sPE 对 P-CTR, $p < 0.05$) (mPE 对 P-CTR, $p < 0.05$)。与 mPE 相比, sPE 女性血清 PIGF 水平显著更低 (sPE 对 mPE, $p < 0.05$) (图 12A)。相似地,对于尿中 PIGF 浓度保持该比率 (sPE 对 P-CTR, $p = 0.004$)。先兆子痫女性尿中 PIGF 浓度没有显著性差异 (sPE 对 mPE, $p = 0.733$)。对于 sPE 组,白蛋白尿和尿中 PIGF 水平之间没有显著相关性 ($r = -0.091$, $p = 0.653$)。sPE 中蛋白尿和尿中 PIGF 浓度之间是相反的并且具有显著相关性 (Pearson $r = -0.6$, $p = 0.002$)。总之,与 mPE 和 P-CTR 女性相比, sPE 女性具有显著更低的血清 PIGF 水平。在先兆子痫女性中尿中 PIGF 水平也更低,但不随高血压疾病严重程度而变化。

血管发生因子、白蛋白和蛋白质的排泄分数

为了评价重度先兆子痫女性中是否发生肾小球损伤可以解释尿样中血管发生标志物的释放增加,申请人分析了每种已鉴定血管发生标志

物的排泄分数与以高概率反映肾小球滤过能力受损的白蛋白尿、非特异性蛋白尿之间的关系。还对每个研究组进行了血管发生标志物的排泄分数与尿中随机总蛋白质比肌酸酐比率之间的相关性分析。物质的排泄分数代表排泄于尿中的该物质与肾小球滤过部分相比的比例。一般相对于肌酸酐清除率来报告，因为肌酸酐既不被吸收又不被显著分泌，因此抵消了尿浓度/稀释的任何作用。与 NP-CTR 相比，健康妊娠女性排泄显著更多的 VEGF (ANOVA $p < 0.001$) (图 9)。与 P-CTR 相比，pHTN 不影响 VEGF 排泄分数 ($p = 0.346$)。然而，与 pHTN ($p = 0.007$) 或 P-CTR ($p < 0.001$) 女性相比，sPE 显著增加 VEGF 排泄分数。

妊娠的特征表现为 sFlt-1 排泄分数显著降低 (P-CTR 对 NP-CTR, $p < 0.001$)。pHTN 不影响 sFlt-1 排泄分数 (P-CTR 对 pHTN, $p = 0.43$)；而与 P-CTR ($p < 0.001$) 和 pHTN ($p < 0.001$) 相比，sPE 逆转妊娠诱导的变化而引起 sFlt-1 排泄分数增加 (图 4)。

PIGF 排泄分数遵从与 sFlt-1 排泄分数相似的模型。与 NP-CTR 相比，P-CTR 女性的 PIGF 排泄分数降低 (P-CTR 对 NP-CTR, $p < 0.001$)。相似地，pHTN 不进一步影响 PIGF 排泄分数 (P-CTR 对 pHTN, $p = 0.125$)；而 sPE 女性患者中这种作用被部分地逆转 (sPE 对 pHTN, $p < 0.001$)。

妊娠的特征不表现为健康对照中白蛋白排泄分数增加 (NP-CTR 对 P-CTR, $p = 0.385$)。而且，与 pHTN 和 P-CTR 组相比，sPE 中白蛋白排泄分数显著增加 (单因素 ANOVA, $p < 0.001$)。

与健康妊娠 (NP-CTR 对 P-CTR, $p > 0.05$) 或 pHTN (P-CTR 对 pHTN $p > 0.05$) 相关的总蛋白质排泄分数没有显著变化。相反，本分析证实与 pHTN 女性相比，sPE 中总蛋白质排泄分数在疾病临床表现期时极显著地增加 (sPE 对 pHTN $p < 0.001$)。

白蛋白排泄分数与任何血管发生因子排泄分数之间没有显著相关性，除了患 pHTN 疾病的女性以外并且仅仅对于 sFlt-1 ($r = 0.639$, $p = 0.01$) 和 PIGF ($r = 0.687$, $p = 0.004$)。

在 NP-CTR 女性中蛋白尿与任何被调查的血管发生因子排泄分数之间无相关性 (Pearson, VEGF [$r = 0.33$, $p = 0.382$], sFlt-1 [$r = 0.40$, $p = 0.296$], PIGF [$r = 0.59$, $p = 0.09$])。鉴定了在 P-CTR 女性中蛋白尿与 sFlt-1 排泄分数之间

具有显著相关性 (sFlt-1 [$r=0.59, p=0.03$])。在健康 P-CTR 女性中 PIGF 和 sFlt-1 的排泄分数与蛋白尿不相关 ($p>0.05$)。然而, 在 pHTN 女性中蛋白尿与任何所述血管发生因子的排泄分数之间无相关性: VEGF ($r=0.42, p=0.118$)、sFlt-1 ($r=0.23, p=0.414$)、或 PIGF ($r=0.34, p=0.214$)。在 sPE 中, 蛋白尿与 VEGF ($r=0.30, p=0.127$) 或 sFlt-1 ($r=0.35, p=0.07$) 排泄分数之间无相关性。相反, 蛋白尿与 PIGF 排泄分数之间具有显著相关性 ($r=0.50, p=0.01$)。此外, 在 sPE 女性患者中尿中随机总蛋白质/肌酸酐比率与 PIGF ($r=0.60, p=0.002$) 或 sFlt-1 (sFlt-1: $r=0.50, p=0.007$) 排泄分数之间具有显著相关性。

申请人观察到与健康妊娠对照相比, sPE 中血清 VEGF 和 PIGF 水平显著更低而 sFlt-1 显著更高。与 sFlt-1 和 PIGF 不同, 所有研究组中尿中 VEGF 浓度保持显著高于其血清水平。然而, 甚至当考虑蛋白尿程度作为受损肾小球完整性的反映时, 申请人发现 sPE 与 VEGF 和 sFlt-1 排泄分数的增加相关。相比之下, 之前推测为先兆子痫标志物的 PIGF (分子量低很多的蛋白质) 与蛋白尿和尿中随机总蛋白尿/肌酸酐比率相关。基于本发明发现血清和尿中所有血管发生因子水平随高血压疾病严重程度而变化, sPE 区分自身为不同的高血压临床实体。然而, 血清和尿中浓度变化不平行发生。

申请人进一步确定 sPE 女性中血清游离 VEGF 水平降低, 但是其尿输出量却例外的增加。可通过其与血浆蛋白质比如 sFlt-1 的实质性结合来解释血清水平降低。因此, 可能不能通过只检测其游离形式的高度特异性 ELISA 检测 VEGF。随后, 尿中水平和排泄分数显著增加更可能是内在肾脏生产 (intrinsic kidney production) 的结果, 而较少可能由于肾小球渗漏所引起 (26)。本文所述发现即尿中 VEGF 水平显著增加不依赖于蛋白尿和血清 VEGF 水平进一步支持该理论。此外, 目前还不清楚肾脏增强 VEGF 生产的机制, 这需要进一步研究。

总之, sPE 的特征在于 VEGF 和 sFlt-1 排泄分数显著增加。这种增加的幅度与由总蛋白质排泄分数、白蛋白尿或尿中随机总蛋白质比肌酸酐比率反映的蛋白尿程度不相关。这表明血清水平变化和肾小球损伤不是造成先兆子痫中尿血管发生因子输出增加的唯一机制。

参考文献

1. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001; 357(9249):53-56.
2. MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol*. 2001;97:533-38.
3. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998;4:25-42.

4. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, et al.. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet* 1993;4:59.
5. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic antibodies against the angiotensin AT 1 receptor. *J Clin Invest* 1999; 103:945-952.
6. Fass MM, Schinling GA, Baller JFW, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low dose of endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171: 158-64.
7. Roberts JM, Redman CW. Preeclampsia: more than pregnancy induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447-51.
8. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111:649-58.
9. Volhard F: Die doppelseitigen haematogenen Nierenerkrankungen Beril, Springer. 1918.
10. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update*. 1998;4:25-42.
11. Takacs P, Kauma SW, Sholley MM, Walsh SW, Dinsmoor MJ, Green K. Increased circulating lipid peroxides in severe preeclampsia activate NF-kappaB and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2001;15:279-81.
12. Lockwood CJ, Peters JH. Increased plasma levels of ED1+ cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162:358-62.

13. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;12;350:672-83.
14. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111:649-58.
15. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 12; 350: 672-83.
16. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, Ecker J, Karumanchi SA. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 770-5.
17. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem* 2003; 278:12605-8.
18. American Collage of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Practice Bulletin. Washington, DC: ACOG Practice Bulletin No. 33, 2002.
19. Caron C, Goudehand J, Marey A, Beague D, Ducroux G, Drouvin F. Are haemostatic and fibrinolytic parameters predictors of preeclampsia in pregnancy-associated hypertension? *Thromb Haemost* 1991;66:410-14.
20. Spargo B, McCartney CP, Winemiller R. Glomerular capillary endotheliosis in toxemia of pregnancy. *Arch Pathol* 1959: 68:593-9.

21. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002; 160:1405-23.
22. Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM. Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:908-14.
23. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen- a review. *Placenta* 2000;21:S16-24.
24. American Collage of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Practice Bulletin. Washington, DC: ACOG Practice Bulletin No. 33, 2002.
25. Rodriguez-Thompson D, Lieberman. Use of a random urinary protein to creatinine ratio for the diagnosis of significant proteinuria during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:808-11.
26. Roes EM, Steegers EA, Thomas CM, Geurts-Moespot A, Raijmakers MT, Peters WH, Sweep CG. High levels of urinary vascular endothelial growth factor in women with severe preeclampsia. *Int J Biol Markers* 2004;19:72-5.

经参考并入

本文提及的所有出版物和专利经参考以其全部内容并入本文，就像每个出版物或专利具体地和个别地指出经参考并入一样。如有冲突，以本申请包括其中任何定义为准。

等同物

本领域技术人员应当认识到或能确定，使用不超过常规试验，有许多等同于本发明描述的具体实施方案。这样的等同物也将被以下权利要求所涵盖。

	P-CTR (n=16)	pHTN (n=21)	SPE (n=17)	p值
母亲特征				
年龄: 岁, 平均 [95%CI]	26.4 [23.7-29.1]	29.8 [27.2-32.3]	24.4 [21.6-27.2]	p=0.021 †
妊娠: 中值 [范围]	2 [1-6]	2 [1-8]	1 [1-7]	p=0.063
已产子女数: 中值 [范围]	1 [0-3]	0 [0-5]	0 [0-4]	p=0.250 ‡
母亲体重: kg, 平均 [95%CI]	81.8 [74.0-89.6]	100 [84.7-115.3]	88.8 [74.8-101.6]	p=0.166 †
妊娠期: 周, 中值 [范围] 征募	28.6 [7.0-39.0]	34.4 [16.6-40.4]	31.3 [24.1-40.2]	p=0.304 ‡
妊娠期: 周, 中值 [范围] 分娩	38.5 [37.4-39.6]	34.4 [32.4-36.6]	32 [29.5-1-34.4]	p=0.003 ‡
胎儿特征				
出生体重: g, 平均 [95%CI]	3355 [3093-3617]	2105 [1593-2617]	1622 [1095-2150]	p=0.001 †
临床表现				
心脏收缩BP: mmHg, 平均 [95%CI]	105.5 [99.1-111.9]	160.0 [149.7-170.4]	162.4 [155.7-169.2]	p<0.001 †
心脏舒张BP: mmHg, 平均 [95%CI]	64.4 [58.9-70.0]	94.6 [89.0-100.3]	101.5 [94.4-108.6]	p<0.001 †
神经症状:n [%]	0.0 [0.0]	3.0 [14.3]	7.0 [4.2]	p=0.008 ¶

以单因素ANOVA (†)、Kruskal-Wallis ANOVA (‡)、卡方检验 (¶) 分析数据

图 1

	PHTN (n=21)	sPE (n=17)	p值
临床实验室测试			
试条蛋白尿: 中值 [范围]	1.5 [0-4]	3 [1-4]	p<0.001 §
24-小时蛋白尿: g/dL, 中值 [范围]	0.9 [0.1-13.1]	3.0 [0.7-5.4]	p=0.109 §
AST:U/L 中值 [范围]	20.0 [8.0-59.0]	26.0 [5.0-1380.0]	p=0.166 §
ALT:U/L 中值 [范围]	14.0 [4.0-32.0]	25.0 [9.0-550.0]	p=0.010 §
血小板: 细胞 /uLx10 ³ 平均 [95%CI]	263.3 [221.5-305.1]	194.3 [149.2-239.4]	p=0.035 ¥
LDH: U/L 中值 [范围]	204.0 [153.0-366.0]	245.0 [184.0-2940.0]	p=0.015 §
尿酸: mg/dL, 中值 [范围]	5.8 [5.1-6.4]	6.7 [6.2-7.3]	p=0.025 §

以Mann-Whitney检验 (§)、Student t-检验 (¥) 分析数据

图2

	NP-CTR (n=14)	P-CTR (n=16)	pHTN (n=21)	sPE (n=17)	p值
VEGF: pg/mgc 中值 [范围]	93.5 [21.2-258.6]	152.0 [26.8-488.3]	140.6 [42.3-483.5]	214.8 [17.1-817.6]	p=0.019 †
PLGF: pg/mgc 中值 [范围]	14.7 [7.3-21.2]	65.7 [8.5-304.1]	22.1 [6.2-255.2]	19.2 [8.0-99.2]	p<0.001 †
sFLT: pg/mgc 中值 [范围]	10.5 [0.4-48.1]	15.6 [0.1-65.8]	56.1 [7.6-453.5]	145.5 [6.4-990.7]	p<0.001 †
蛋白质: mg/mgc 中值 [范围]	6.4 [4.3-9.2]	7.3 [2.4-23.4]	7.4 [5.4-32.3]	11.8 [4.3-28.7]	p<0.001 †
肌酸酐: mg/ml 中值 [范围]	1.3 [0.3-2.5]	1.0 [0.2-2.8]	0.5 [0.1-2.0]	0.7 [0.1-1.6]	p=0.032 †

以Kruskal-Wallis ANOVA (†) 分析数据; 数值以每毫克肌酸酐 (mgc) 表示

图3

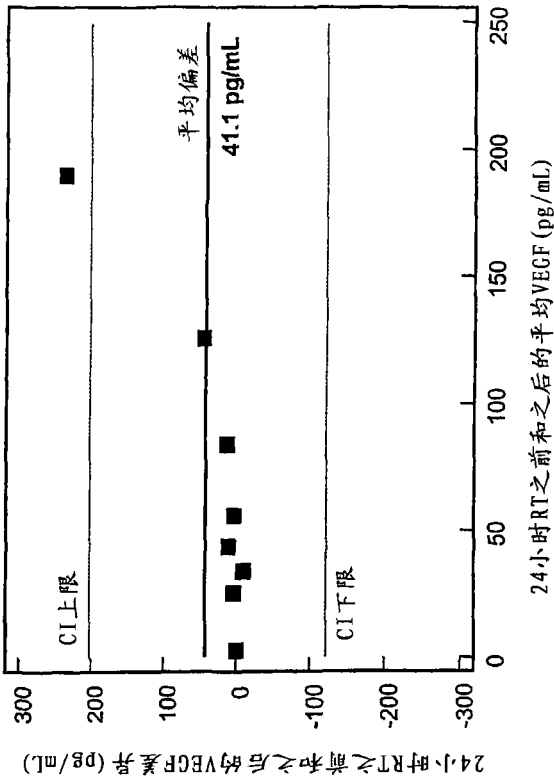


图4B

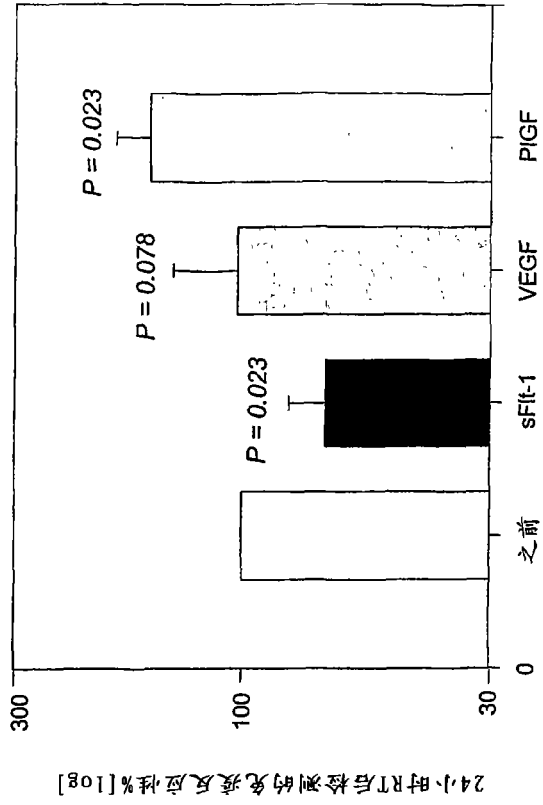


图4D

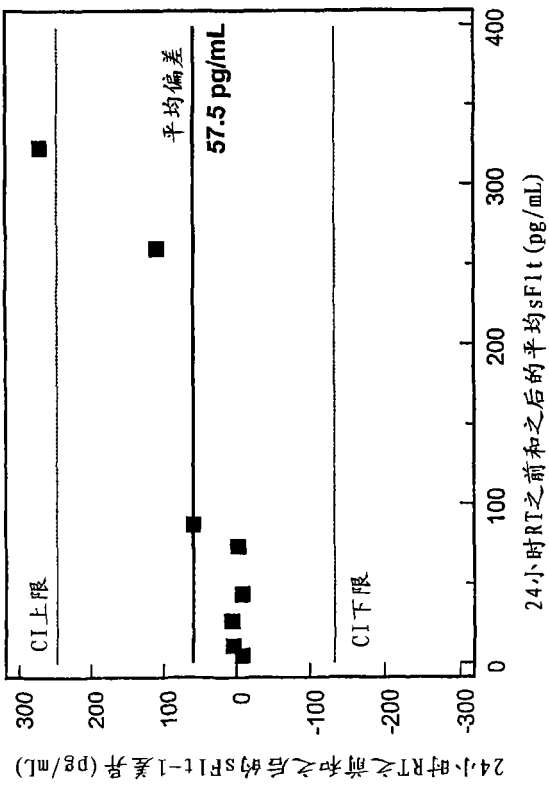


图4A

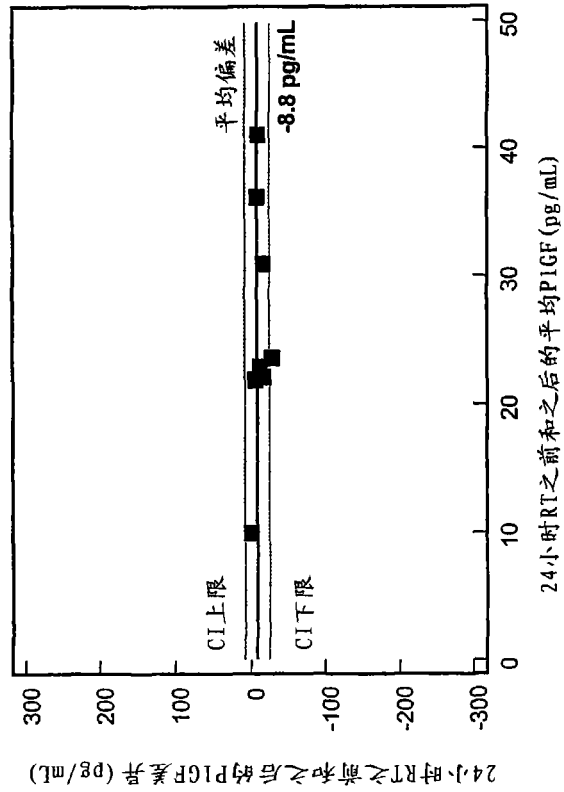


图4C

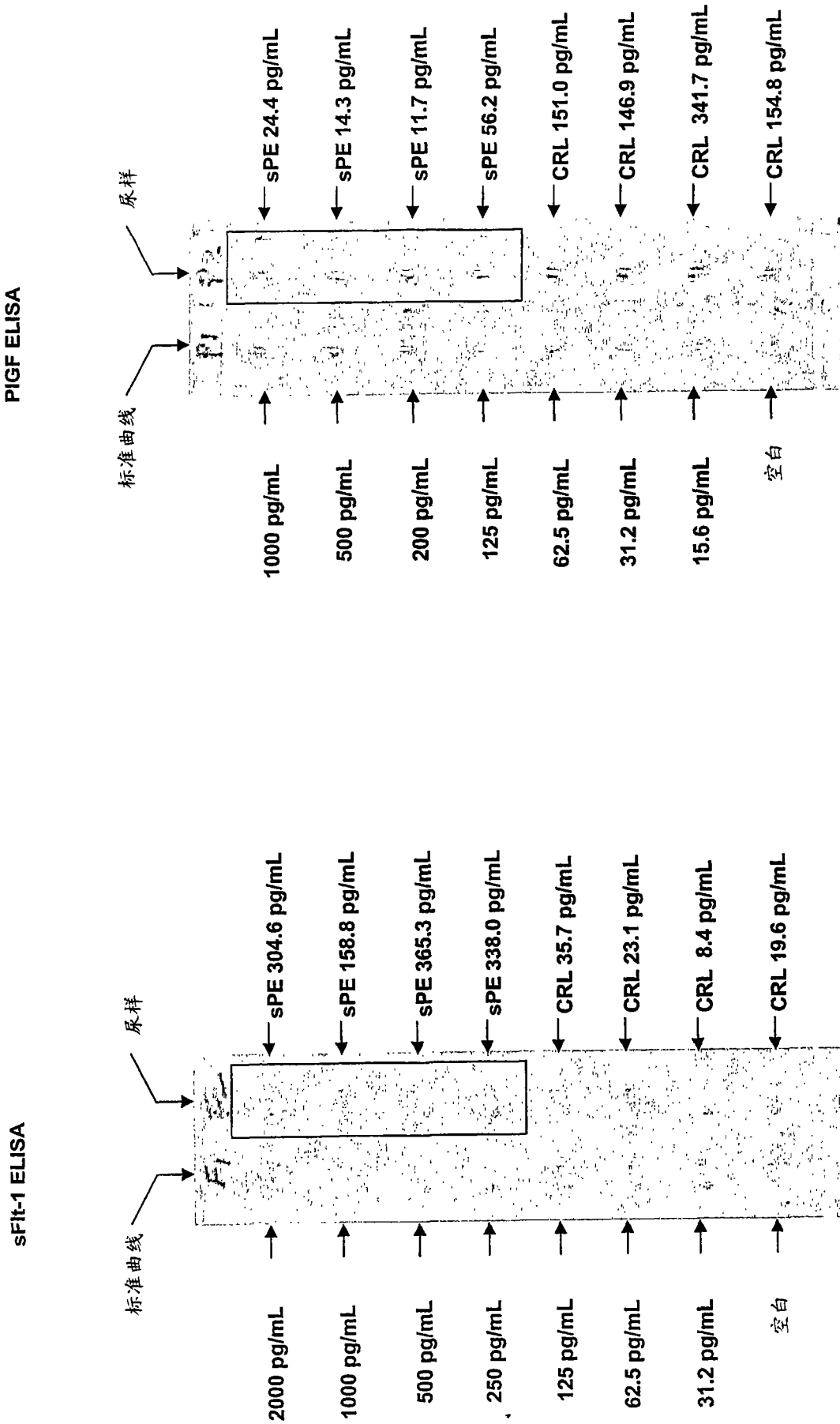


图 5A

图 5B

sFit-1 (A) 和PIGF (B) 的代表性ELISA试验。左侧孔表示各自的标准曲线，每个试验的右侧孔表示8个尿样的免疫反应性。上面的4个（框中所示）来自4名不同的重度先兆子痫患者（sPE）而下面的4个来自4名正常妊娠患者（CRL）。

样品ID	原始数值		log值		sFit-1 / PIGF 比		uFP	分类
	sFit-1	PIGF	log sFit-1	log PIGF	sFit-1/PIGF x 100	log[sFit-1/PIGFx100]		
样品01	304.6	24.4	2.5	1.4	1248.4	3.1	sPE	
样品02	158.8	14.3	2.2	1.2	1110.5	3.0	sPE	
样品03	365.3	11.7	2.6	1.1	3122.2	3.5	sPE	
样品04	338.0	56.2	2.5	1.7	601.4	2.8	sPE	
样品05	35.7	151.0	1.6	2.2	23.6	1.4	P-CRL	
样品06	23.1	146.9	1.4	2.2	15.7	1.2	P-CRL	
样品07	8.4	341.7	0.9	2.5	2.5	0.4	P-CRL	
样品08	19.6	154.8	1.3	2.2	12.7	1.1	P-CRL	

图5C

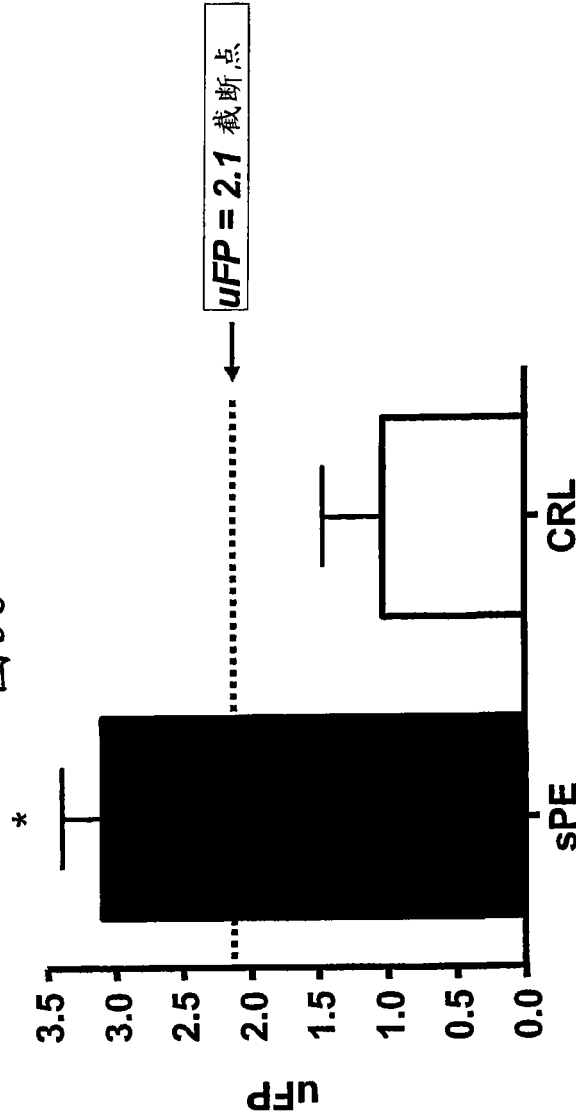


图5D

C: 用于计算前一张片子的试验中uFP的代表性展开表。D: 重度先兆子痫患者 (sPE) 对比对照 (CRL) 的uFP平均值 (+SD)。星号表示统计学显著性 (p<0.001)。点线表示从我们的出版物 [Am J Obstet Gynecol. 2005 Mar; 192(3): 734-41] 中sPE诊断值的uFP截断点。

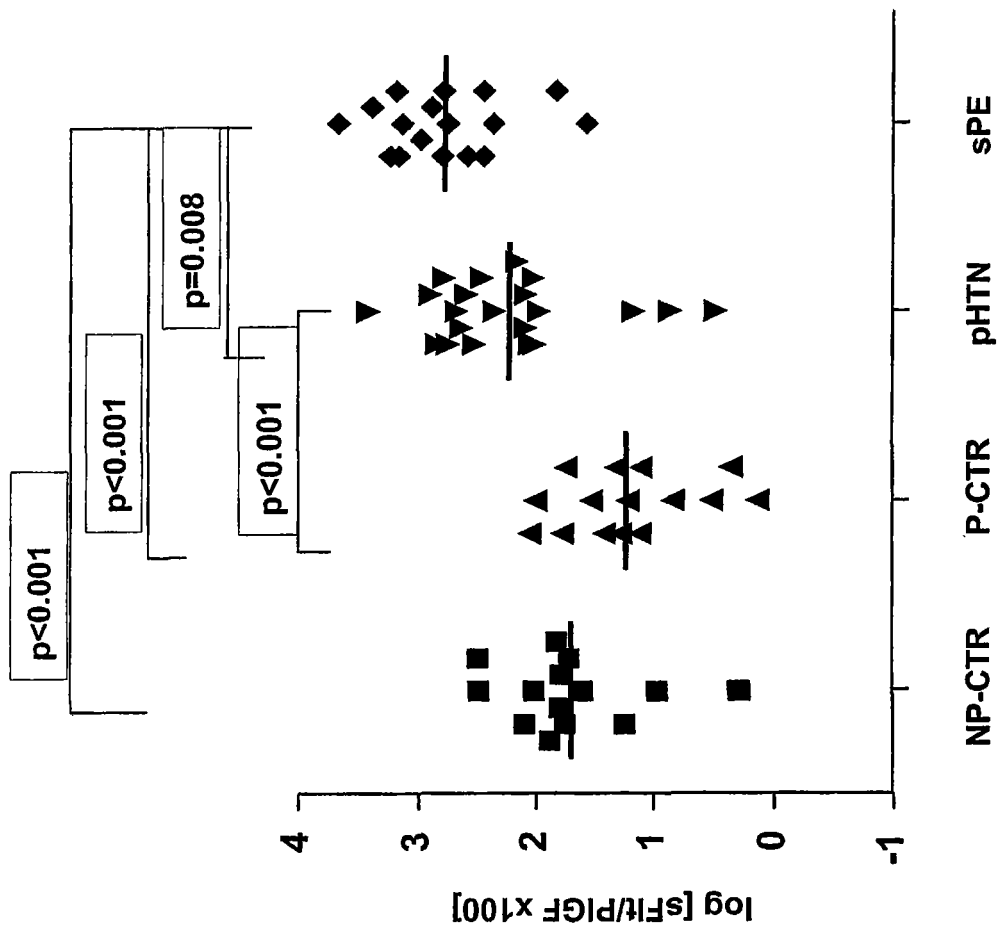
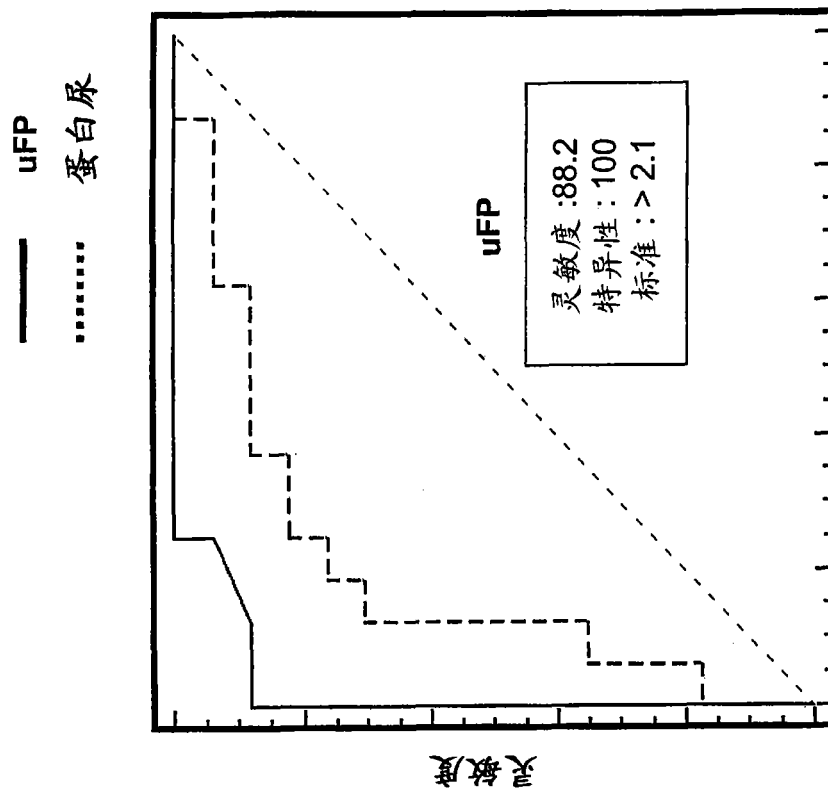


图6



100-特异性

图7

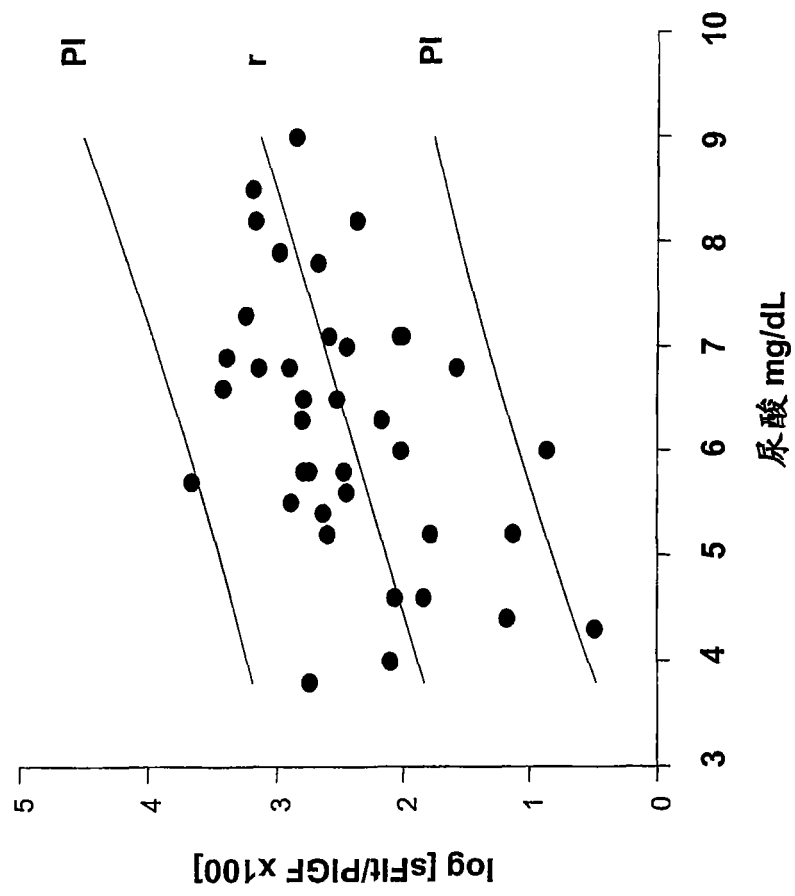


图8

	NP-CTR	P-CTR	mPE	SPE	p值	
VEGF	血 (pg/ml)	176.6 [78.7-819.0]	1.6 [0.0-59.8]	0.2 [0.0-123.9]	0.1 [0.0-48.1]	p<0.001 †
	尿 (pg/mgC)	74.0 [5.4-116.7]	97.6 [21.4-219.3]	45.2 [7.6-231.3]	114.1 [8.2-817.6]	p=0.021 †
sFlt-1	血 (pg/ml)	31.8 [20.1-64.9]	433.7 [189.0-1992.2]	1618.0 [539.4-3329.9]	2252.6 [1626.8-3328.2]	p<0.001 †
	尿 (pg/mgC)	2.4 [0.7-35.4]	1.5 [0.3-17.9]	10.9 [1.6-217.7]	81.7 [12.7-990.7]	p<0.001 †
PIGF	血 (pg/ml)	8.3 [5.4-10.0]	330.0 [26.2-933.7]	169.2 [46.4-805.6]	58.5 [4.6-269.8]	p<0.001 †
	尿 (pg/mgC)	9.9 [4.3-16.8]	55.8 [10.0-476.9]	13.6 [3.9-163.0]	17.3 [7.3-99.2]	p=0.001 †
蛋白质	血 (mg/ml)	62.8 [45.0-93.6]	60.8 [52.5-81.3]	55.7 [21.5-91.4]	48.6 [29.7-57.2]	p<0.001 †
	尿蛋白质/肌酐比 (mg/mgC)	5.5 [3.9-8.6]	6.8 [4.5-16.3]	5.7 [2.2-24.8]	10.5 [4.0-38.5]	p=0.007 †
白蛋白	血 (mg/ml)	23.0 ± 1.5	23.1 ± 1.5	30.8 ± 5.71	19.5 ± 1.4	p=0.235 †
	尿 (μg/mgC)	2.8 [1.3-7.2]	5.6 [1.7-21.5]	37.4 [7.8-503.6]	173.5 [52.1-3069.0]	p<0.001 †
肌酸酐	血 (mg/ml)	0.81 ± 0.1	0.59 ± 0.1	0.66 ± 0.1	0.80 ± 0.1	p=0.013 †
	尿 (mg/mgC)	121.5 ± 26.1	120.3 ± 11.3	136.5 ± 24.8	103.9 ± 15.7	p=0.634 †

通过单因素 ANOVA (†), Kruskal-Wallis ANOVA (‡) 分析数据

图 9

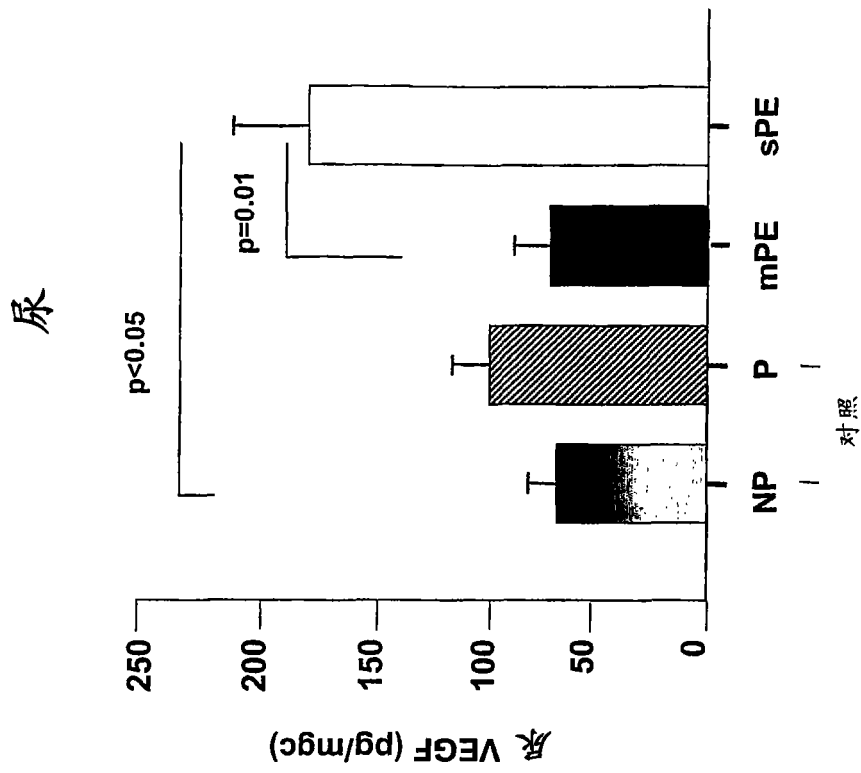


图10B

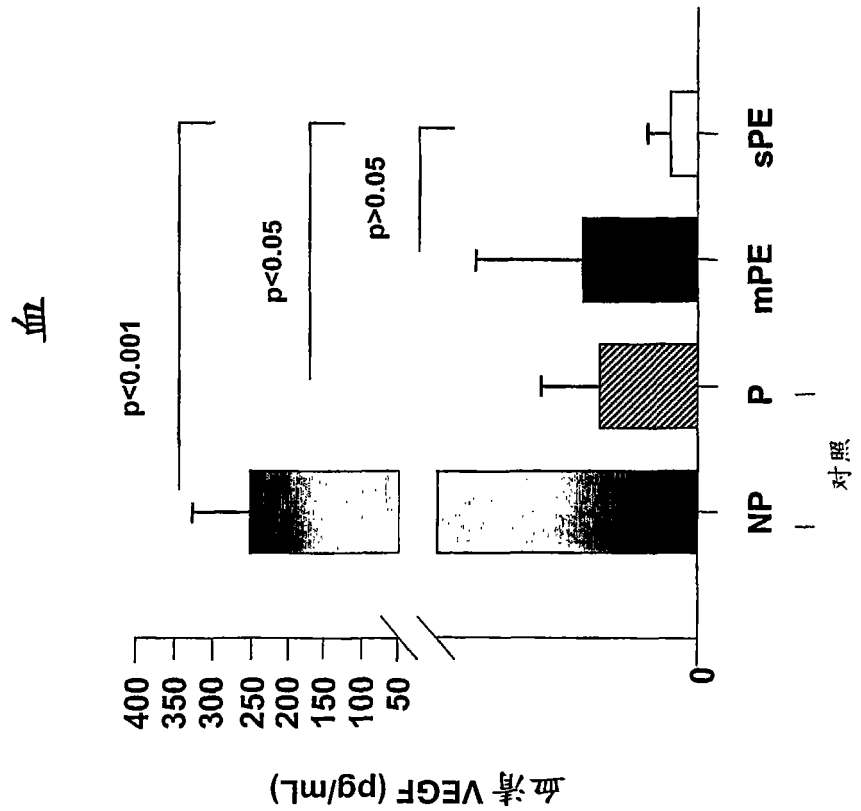


图10A

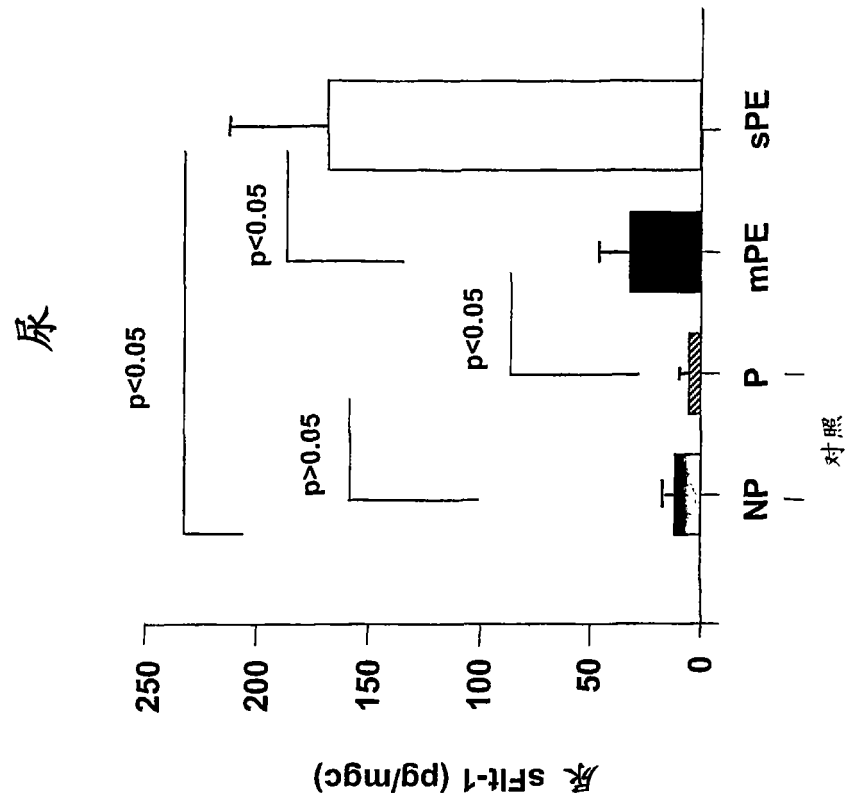


图11B

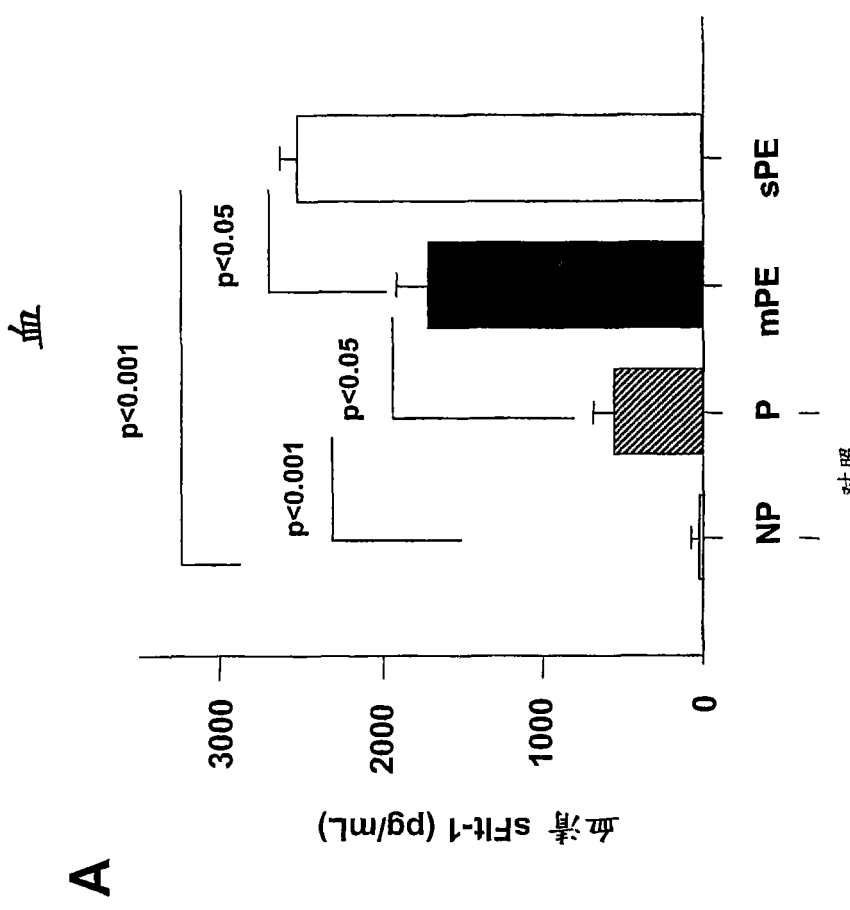


图11A

A

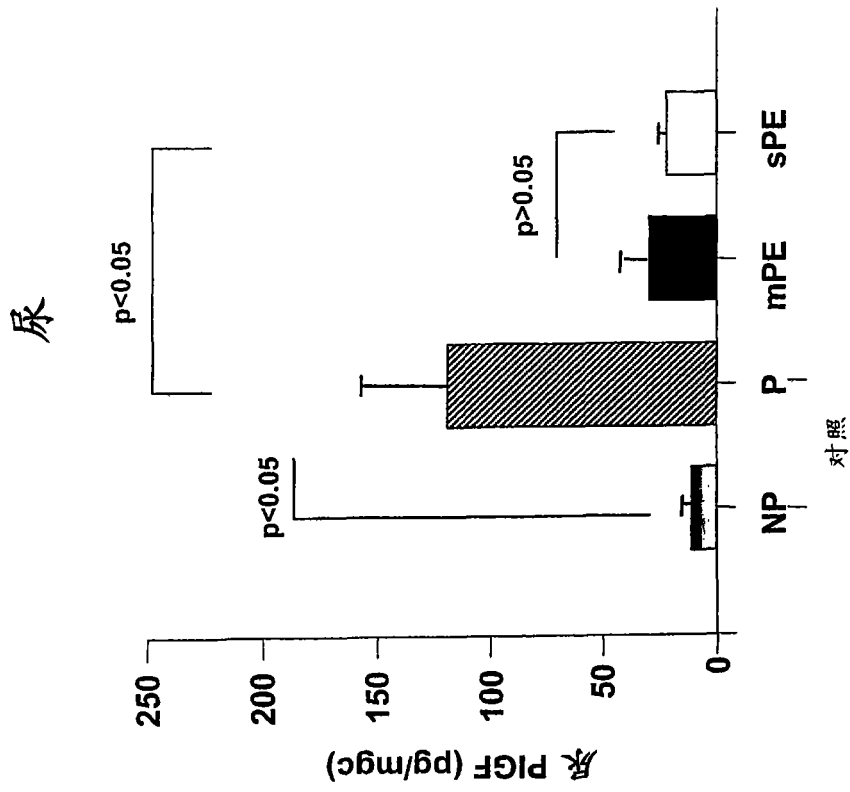


图12B

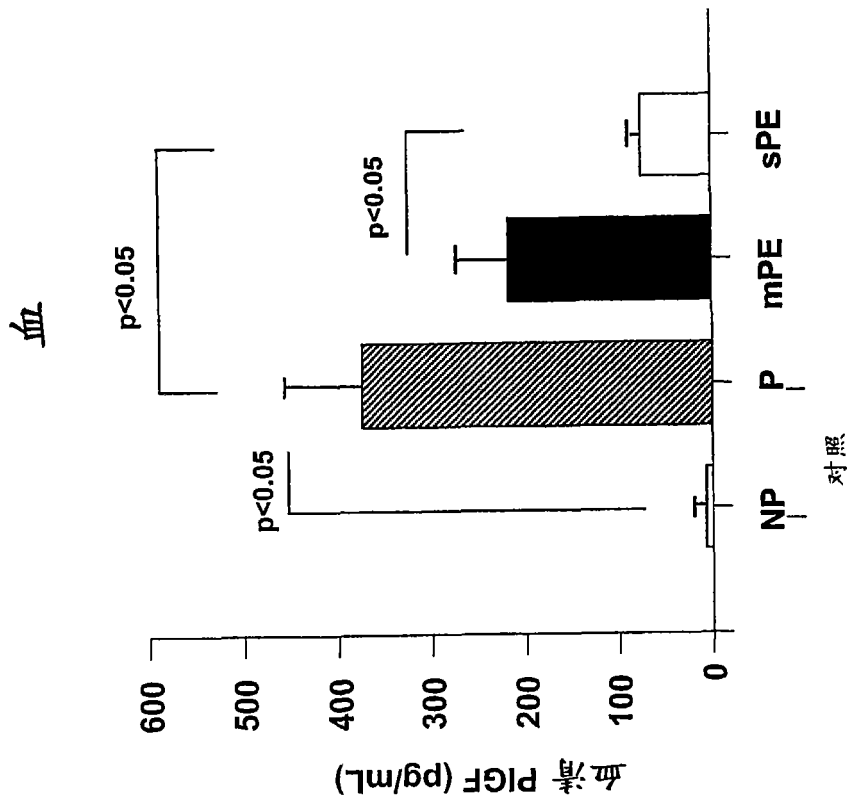


图12A

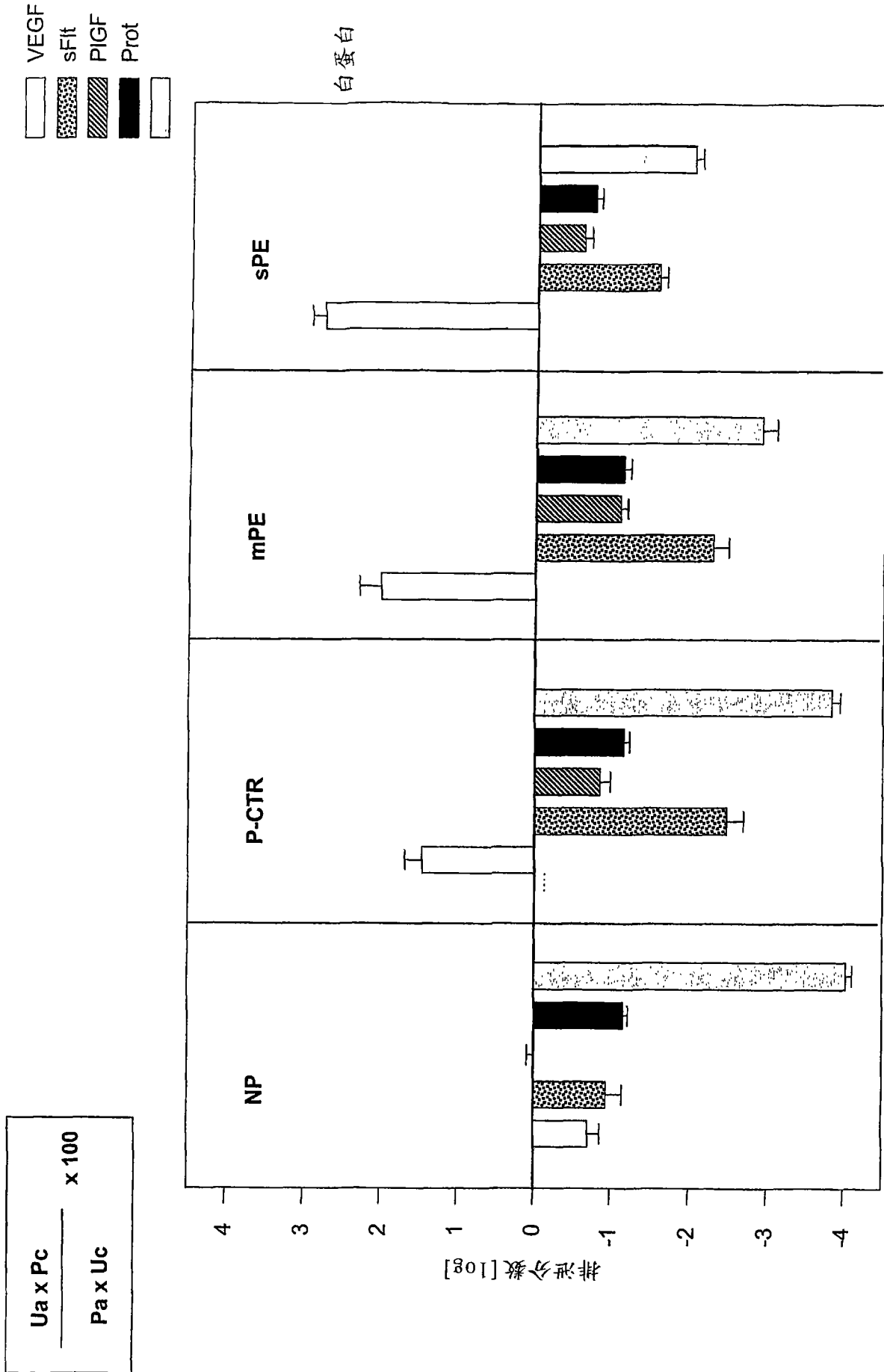


图13

专利名称(译)	先兆子痫的诊断		
公开(公告)号	CN101163970A	公开(公告)日	2008-04-16
申请号	CN200580047028.X	申请日	2005-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
当前申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	克特林S布希姆斯基 伊琳娜布希姆斯基 埃罗尔诺尔维茨		
发明人	克特林·S·布希姆斯基 伊琳娜·布希姆斯基 埃罗尔·诺尔维茨		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566 B01L3/00		
CPC分类号	G01N2800/321 G01N2800/368 G01N33/689 G01N2333/71		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	60/637948 2004-12-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供涉及检测和/或监测妊娠女性尿样中血管发生因子、尤其是 VEGF、PlGF和sFlt - 1水平的方法和组合物，以及这样的水平对妊娠首三个月、中三个月和/或末三个月中发生妊娠并发症、包括高血压病症比如先兆子痫之风险的影响。本发明还提供用于鉴定和筛选处于发生妊娠并发症比如先兆子痫之风险的患者的试剂盒。

	P42R (n=6)	p11M (n=7)	sFlt (n=7)	p1021 (n=6)
母体尿				
孕周: 孕10周	28.0(2.28)	28.0(2.23)	28.4(2.27)	p<0.01
孕周: 孕11周	21.0	21.0	21.0	p<0.001
孕周: 孕12周	11.0	11.0	11.0	p<0.001
孕周: 孕13周	8.8(7.4-10.6)	10.0(8.7-11.3)	8.8(7.4-10.6)	p<0.001
孕周: 孕14周	26.0(13.8)	34.4(15.4-61.6)	33.3(24.4-42.3)	p<0.001
孕周: 孕15周	38.5(17.4-58.0)	34.4(24.4-48.0)	32.0(25.3-38.4)	p<0.001
孕周: 孕16周				
孕周: 孕17周	35.0(25.5-48.0)	21.0(15.8-28.0)	16.2(10.5-23.0)	p<0.01
孕周: 孕18周				
孕周: 孕19周	10.5(7.0-14.0)	18.0(10.7-30.0)	18.2(12.1-26.2)	p<0.01
孕周: 孕20周	8.4(5.5-11.0)	9.6(6.5-13.0)	10.5(7.4-14.0)	p<0.01
孕周: 孕21周	0.0(0.0)	3.0(1.3)	7.0(4.2)	p<0.001

图1