

[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 200810177892.7

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 8 月 19 日

[11] 公开号 CN 101509917A

[22] 申请日 2008.10.17

[21] 申请号 200810177892.7

[30] 优先权

[32] 2007.10.18 [33] US [31] 11/874717

[71] 申请人 塞尔维马克二世有限责任公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 R·科肯耶西 J·赖

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 健 付 磊

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 8 页

[54] 发明名称

预测早产风险的方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及允许人们预测妊娠女性的早产风险的试剂盒和方法。发明人发现可以在宫颈分泌物中检测到各种不同的胞外基质成分。宫颈分泌物中发现的某种胞外基质蛋白的定量可用于宫颈生物力学状态的诊断,其表明早产是否可能。一些可在宫颈分泌物中发现的胞外基质成分包括核心蛋白聚糖、血小板反应素以及基质金属蛋白酶。

- 1、一种确定患者进入早产的风险的方法，所述方法包括：
 - a、从妊娠患者获得宫颈分泌物样品；
 - b、检测生物力学相关标记在宫颈分泌物样品中的存在，其中所述的生物力学相关标记选自血小板反应素 2 和核心蛋白聚糖及其组合；以及
 - c、将与标准化的基线标记水平比较生物力学相关标记的水平增加与早产风险增加相关联。
- 2、权利要求 1 的方法，其中所述的宫颈分泌物样品中的生物力学相关标记包括血小板反应素 2。
- 3、权利要求 1-2 中任一项的方法，其中所述的宫颈分泌物样品中的生物力学相关标记包括核心蛋白聚糖。
- 4、权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述的宫颈分泌物样品中的至少一种生物力学相关标记是血小板反应素 2。
- 5、权利要求 1-4 中任一项的方法，其中所述的宫颈分泌物样品中的生物力学标记包括血小板反应素 2 和核心蛋白聚糖。
- 6、权利要求 1-5 中任一项的方法，进一步包括检测基质金属蛋白酶 12，并将与标准化的基线标记水平比较基质金属蛋白酶 12 的水平增加与早产风险增加相关联。
- 7、权利要求 1-6 中任一项的方法，进一步包括确定针对患者的适宜治疗方案。
- 8、权利要求 1-7 中任一项的方法，其中所述针对患者的适宜治疗方案包括至少一种下述治疗，包括 i) 患者生活环境的改变，ii) 对患者采用药物治疗，iii) 患者行为改变的提议，以及 iv) 对患者更密切的监测。
- 9、权利要求 1-8 中任一项的方法，其中所述待施与给患者的药物治疗是孕酮或孕酮衍生物。
- 10、权利要求 8 的方法，其中所述待施与给患者的药物治疗是能刺激或阻断子宫收缩的化合物。
- 11、权利要求 10 的方法，其中所述的刺激子宫收缩的化合物是催产素或缩宫素。

12、权利要求 10 的方法，其中所述的抑制子宫收缩的化合物是缩宫素类似物。

13、权利要求 9-12 中任一项的方法，其中用于确定患者进入早产的风险的方法在给予药物治疗之前、期间或之后进行。

14、权利要求 1 的方法，其中检测生物力学相关标记存在是通过测量宫颈分泌物样品中编码生物力学相关标记的核酸分子的量来进行的。

15、权利要求 14 的方法，其中所述的核酸分子是 RNA 或 DNA。

16、权利要求 14-15 中任一项的方法，其中所述的核酸分子是 RNA。

17、权利要求 14-16 中任一项的方法，其中所述的核酸分子是 DNA。

18、权利要求 14-17 中任一项的方法，其中所述的 DNA 是 cDNA。

19、适于用来测定患者进入早产的风险的试剂盒，所述试剂盒包含：

a、拭子；

b、收集缓冲液；

c、用于检测宫颈分泌物样品中的选自血小板反应素 2 和核心蛋白聚糖及其组合的生物力学相关标记的水平增加的分析试剂；所述试剂包装入合适的密封容器内。

20、根据权利要求 19 的试剂盒，其中用于检测生物力学相关标记的水平增加的分析试剂能够用于检测下列物质的水平：基质金属蛋白酶-12、基质金属蛋白酶-8、基质金属蛋白酶-1、基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-3、基质金属蛋白酶-9、透明质酸酶、光蛋白聚糖、纤调蛋白、keratocan、PRELP biglycan、mimcan、serglycin、基底膜聚糖、集聚蛋白、多能聚糖、连接蛋白、CD44、TSG-6、bikunin、间 α 胰蛋白酶抑制剂、透明质酸合成酶、透明质酸、弹性蛋白、fibulins、原纤蛋白、腱生蛋白 X、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、乙酰肝素酶、赖氨酰氧化酶、V 型胶原、VI 型胶原、XII 型胶原、XIV 型胶原、XVIII 型胶原、XX 型胶原、钙网蛋白、CD47、多配体聚糖、磷脂酰肌醇聚糖、脂蛋白受体样蛋白 (LRP)、ADAM 蛋白酶、ADAMTS 蛋白酶、E-选择蛋白、L-选择蛋白、血小板因子 4、转化生长因子 β 1、2 和 3 (TGF- β)、表皮生长因子 (EGF)、角质形成细胞因子 (KGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、成纤维细胞生长因子 1 和 2 (FGF) 以及血小板衍生生长因子 (PDGF) 及其组合。

21、根据权利要求 19-20 中任一项的试剂盒，其中所述用于检测宫颈分泌物样品中生物力学相关标记的水平增加的分析试剂是通过选自下列的分析来进行分析的试剂：放射免疫分析、酶免疫分析、配体分析、免疫放射分析、荧光免疫分析以及酶联免疫吸附分析。

22、权利要求 19-21 中任一项的试剂盒，其中所述用于检测生物力学相关标记水平增加的分析试剂是包括以下物质的分析试剂：

- a) 结合至生物力学相关标记上的第一抗体；
- b) 识别第一抗体或生物力学相关标记的第二抗体，其中所述的第二抗体是通过化学发光、放射性标记、荧光标记或酶标记而标记的。

23、权利要求 19-22 中任一项的试剂盒，其中所述的生物力学相关标记水平增加的检测是通过测量宫颈分泌物样品中编码生物力学相关标记的核酸分子的量来实现的。

24、权利要求 19-23 中任一项的试剂盒，其中所述的待测核酸分子是 DNA 或 RNA。

预测早产风险的方法和试剂盒

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请是涉及 2007 年 10 月 18 日提交的美国专利申请 11/874,717 的（非美国）国家专利申请。

背景技术

(1) 技术领域

[0002] 本发明总体上涉及妊娠期间早产风险增加的诊断。更具体地，本发明涉及用于预测早产宫颈软化的方法和试剂盒。

(2) 相关技术的描述

[0003] 早产，以及随后的早产婴儿分娩，一直是婴儿死亡和发病的主要原因，也是社会的沉重经济负担。妊娠期间子宫颈的早产软化导致早产宫颈扩张（开放）以及消失（减薄），并使得妊娠女性处于早产的高风险。目前没有用于预测宫颈早产扩张的诊断方法，因此，无法预测无症状孕妇中的早产高风险。

[0004] 尽管在降低婴儿死亡率上取得了很大的进步，但在对抗早产方面几乎没有什么进展。当前，早产是决定婴儿死亡率的主要因素。在北美，大约十分之一的妊娠女性并发有早产。例如，一项历时数年的多中心实验结果表明，婴儿过早地（即 20 到 36 周妊娠期）出生，占到新生儿的 9.6%（Cooper 等, Amer. J. Obstet. Gynecol. 168:78, 1993）。尽管有许多确定的早产原因，诸如感染以及多胎妊娠，然而对于许多患者而言原因是未知的。近几十年来，在开发精确预测和治疗早产的方法方面，几乎没什么进展。

[0005] 早产婴儿消耗大量的卫生服务资源。据估计，每年早产婴儿的住院费用超过 110 亿美元。这些新生儿的短期花费是新生儿监护、父母在医院所耗费的时间、这些父母所需的社会工作者和保障人员、失去收入以及增加的车旅费。这些早产婴儿的长期花费与早产的下游效应有关，诸如长期的健康和发育问题、精神和身体障碍风险的增加，其可以影响孩子和父母的潜在收益。

[0006] 早产与分娩的诊断已持续成为问题。目前，有两类早产评估，传统诊断以及生物标记。尽管每一种都具有其优点并且两者都在区分误诊早产方面相对

较差。传统的诊断包括评价子宫收缩的频率、膜的状态、宫颈的扩张与消失以及孕龄。临床上流产被定义为进行性的子宫收缩、消失或者两者同时，伴有规律性的收缩导致在 37 周孕龄前生产。

[0007] 宫颈的变化也是早产的传统指标。宫颈的变化包括宫颈管消失的降低以及扩张。当宫颈的长度小于 1 厘米并且扩张 2 厘米或更多，以及规律性的收缩发生时，诊断为早产。然而，Meta 分析显示这些判据在预测早产上仅有 50% 的正确率。在 30 周孕龄前宫颈的长度小于 1.5 厘米被认为是早产的一个重要预报信号。然而，在 30 周后这种测量就是一个不可靠的预报信号。超过 80% 的宫颈消失也是一个强有力的预测因素。然而，收缩频率、规律性、持续时间以及所感知的痛苦水平的评估无法可靠地鉴别早产。

预测早产的生物标记

[0008] 目前，有几种生物标记用于试图充分地预测早产以预防早产。那些生物标记包括胎儿纤连蛋白、唾液雌三醇、蜕膜蛋白以及内分泌/旁分泌标记。这些生物标记中有两种已被深入地研究过。已经对胎儿纤连蛋白 (Terao, et al. 5,650,394) 以及唾液雌三醇进行了一些详细的研究，并且市场上可获得胎儿纤连蛋白。胎儿纤连蛋白测试 (目前市场上称 fFN) (Adeza Biomedical/Ross Products Divison Abbott Laboratories, Inc)，是基于胎儿纤连蛋白 (一种纤连蛋白的胎儿特异的糖蛋白形式) 的检测的。目前的测试基于 ELISA (酶联免疫斑点实验) 技术。这种测试的原理是，在阴道分泌物中发现胎儿纤连蛋白量的增加是胎膜和胎盘组织接面的扰动的信号，并因此是临近分娩的信号。在有症状的孕妇中，这种测试在 37 周孕龄前 (33) 预测早产的有效性有限 (58% 的敏感度)。然而，这种测试对在测试一周内的分娩具有比较好的预测效果 (34)。这种测试的另一个价值是其排除早产可能性的能力 (85% 特异性) (35)。因此，在无症状的孕妇 (低早产风险) 中，胎儿纤连蛋白测试的敏感性低，但在测试后预测早产的特异性高。

宫颈的生物力学特性

[0009] 宫颈软化是一个改变子宫颈的力学特性以便于扩张和消失的渐进的生理学过程。子宫颈，是子宫和宫颈交界处结缔组织丰富的括约肌，其功能是确保妊娠期间子宫内的胎体固留。在非妊娠阶段或妊娠的极早期，宫颈腔非常的狭窄，并且宫颈可以抗拒迫使其打开的机械应力。然而在妊娠末期，宫颈为了扩

张和消失变得高度可延展以允许新生儿从产道通过。延展性（亦称 宫颈软化）的渐进增加在妊娠早期就开始了，并在妊娠进程朝向妊娠晚期的最后阶段时加速（8-11）。然而，在此最后时期的宫颈仍然可行使固留胎儿的括约肌功能（12-14）。软化阶段之后是消失和扩展阶段，其特征是中性粒细胞浸润增加（15, 16）、前列腺素增加（17）、一氧化氮增加（18）、伴随基质降解的蛋白酶活性增加（19）、以及宫颈中的水平增加（16）。尽管消失和扩张阶段的分子学基础已被更好的了解了，但这些知识没有提高在早产时子宫颈的管理。

[00010] 间质胞外基质的重构（remodeling）是生理性宫颈软化的中心。宫颈间质胞外基质由 I 型和 III 型胶原、蛋白多糖、弹性蛋白、透明质（hyaluronan）以及结构性糖蛋白组成（4, 15, 16）。这种基质可被认为是一种纤维增强的复合材料，承载着插入在蛋白多糖和透明质的粘性基质中的 I 型和 III 型胶原纤维（20）。承载单位的定位或其在基质中分散程度的变更改变复合材料的机械特性（21）。充分的证据支持目前的观点：宫颈间质胞外基质在妊娠期间广泛地重构。在小鼠（22）、大鼠（23, 24）、豚鼠（25）、绵羊（26）、以及人（27, 28）中，胶原纤维以及束丛在宫颈软化时逐步地解离和解体。已发现在胶原纤维相关蛋白（诸如核心蛋白聚糖以及纤调蛋白聚糖）中的变化与宫颈的延展性增加有关（9, 29, 30）。胶原交联度的下降也有助于妊娠期间宫颈间质的解体增加（31）。

[00011] 根据本发明人在实验室的观察结果，血小板反应素 2 在保持以及改变宫颈的生物力学特性方面发挥作用。血小板反应素 2（TSP2）是一种能与很多分子相互作用的多体胞外基质糖蛋白（48, 49），其功能与 TSP1 明显不同（50）。对 TSP2 敲除鼠的研究发现，TSP2 的缺失与皮肤和肌腱（51）中纤维状胶原蛋白纤维的形态学改变相关，并且与那些组织抗伸强度的相应下降有关。

[00012] 在本发明人实验室中进行的 TSP2 敲除小鼠的初步研究验证了一种早产宫颈软化表现型。如同在本发明人实验室最近的一篇文章中所讨论的那样（32），在妊娠第 14 天时，与处于相应妊娠阶段的野生型小鼠比较，TSP2 敲除小鼠显示出宫颈增加了 4.5 倍的延展性，在第 18 天时增加了 6.1 倍。野生型小鼠宫颈的蛋白质印迹实验表明在妊娠期第 14 天和第 18 天检测到了 TSP2 的表达，但在第 10 天或在非妊娠宫颈中检测不到，表明 TSP2 的表达与宫颈的生物力学状态相关。此外，免疫组化研究显示，子宫颈中 MMP2（基质金属蛋白酶 2）的表达水平在妊娠期第 14 天增加了 11 倍而在第 18 天增加了 19 倍。

[00013] 尽管有这些研究和观测，早产宫颈软化以及消失的分子学基础仍不清楚。这点很大程度上归结于从高风险妊娠女性获得人类子宫活检标本的难度，以及迄今为止缺乏一种具有自发性早产宫颈软化的动物模型。实验系统的缺乏使得其不可能鉴别宫颈软化的关键性分子标记以及构建适宜的诊断试剂盒。

引用的参考文献

[00014] 下面的参考文献通过相关的数字标识在说明书全文中引用。申请人没有做任何陈述、推断或直接认定这些参考文献属于现有技术。这些文献通过参考文献并入本发明。

[00015] 1. Mortality and Morbidity Weekly Reports 1999. Preterm singleton births - United States, 1986-199, 48:185-189.

[00016] 2. Rogowski, J.A., 1998. The economics of preterm delivery. *Prenat. Neonat. Med.*, 3:16-20.

[00017] 3. Romero, R., Gomez, R., Mazon, M., Ghezzi, F., 和 Yoon, B.H. 1997. The preterm labor syndrome. In *Preterm Labor*. M. G. Elder, R. Romero, R.F.Lamont, editors, Churchill Livingstone, New York, 29-49.

[00018] 4. Leppert, P. C. 1995. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 38:267-279.

[00019] 5. Jewelewicz, R. 1991. Incompetent cervix: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Semin. Perinatol.* 2:156-161.

[00020] 6. Colombo, D.F., 和 Iams, J.D. 2000. Cervical length and preterm labor. *Clin. Obstet. Gynecol.* 43:735-745.

[00021] 7. Althuisius S, Dekker GA, van Geijn HP. Cervical incompetence: a reappraisal of an obstetrics controversy. *Obstet Gynecol Survey* 2002; 57:377-387.

[00022] 8. Cabrol, D. 1991. Cervical distensibility changes in pregnancy, term, and preterm labor. *Semin. Perinatol.* 2:133-139.

[00023] 9. Kokenyesi R, Woessner JF, Jr. 1990. Relationship between dilatation of the rat uterine cervix and a small dermatan sulfate proteoglycan. *Biol. Reprod.* 42:87-97.

[00024] 10. Harkness, M.L.R., 和 Harkness, R.D. 1959. Changes in the physical properties of the uterine cervix of the rat during pregnancy. *J. Physiol.* 148:524-547.

[00025] 11. Kaga, N., Katsuki, Y., Kanikuma, C, Obata, M., Shibutani, Y., 和 Omata, S.

1996. Usefulness of a new tactile sensor for measurement of uterine cervical ripening in mice in a quantitative and noninvasive manner. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175:713-718.

[00026] 12. Uldbjerg, N. 1989. Cervical connective tissue in relation to pregnancy, labour, and treatment with prostaglandin E₂. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* 148:4-40.

[00027] 13. Thomson, A.J., Norman, J.E., 和 Greer, L.A. 1997. The cervix. In *Preterm Labor*. M.G. Elder, R. Romero, R.F. Lamont, eds., Churchill Livingstone, New York, 445-455.

[00028] 14. Ludmir, J., 和 Sehdev, H.M. 2000. Anatomy and physiology of the uterine cervix. *Clin. Obst. Gynecol.* 43:433-439.

[00029] 15. Junqueira, L.C.U., Zugaibe, M., Toledo, O.M.S., Krisztan, R.M., 以及 Shigihara, K.M. 1980. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilatation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138:273-281.

[00030] 16. Rath, W., Winkler, M., 和 Kemp, B. 1998. The importance of extracellular matrix in the induction of preterm delivery. *J. Perinat. Med.* 26:437-441.

[00031] 17. Gibb, W. 1998. The role of prostaglandins in human parturition. *Ann. Med.* 30:235- i 241.

[00032] 18. Chwalisz, K., 和 Garfield, R.E. 1998. Role of nitric oxide in the uterus and cervix: implications for the management of labor. *J. Perinat. Med.* 26:448-457.

[00033] 19. Winkler, M., 和 Rath, W. 1999. Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. *J. Perinat. Med.* 27:45-60.

[00034] 20. Aspden, R.M. 1988. The theory of fibre-reinforced composite materials applied to changes in the mechanical properties of the cervix during pregnancy. *J. Theor. Biol.* 130:213- 221.

[00035] 21. Hukins, D.W.L. 1984/Collagen orientation. In *Connective Tissue Matrix*, D.W.L. Hukins, editor. Verlag Chemie, Weinheim. 211-240.

[00036] 22. Leppi, T.J. 和 Kinnison, P.A. 1971. The connective tissue ground substance in the mouse uterine cervix: an electron microscopic study. *Anat. Rec.*

170:97-118.

[00037] 23. Yu, S.Y., Tozzi, C.A., Babiarz, J., Leppert, P.C. 1995. Collagen changes in rat cervix in pregnancy - polarized light microscopic and electron microscopic studies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209:360-368.

[00038] 24. Saito, Y., Takahashi, S., 和 Maki, M. 1981. Effects of some drugs on ripening of uterine cervix in castrated and pregnant rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 133:205-220.

[00039] 25. Hegele-Hartung, C, Chwalisz, K., Beier, H.M.,和 Elger, W., 1989. Ripening of the uterine cervix of the guinea-pig after treatment with the progesterone antagonist onapristone (ZK 98.299): and electron microscopic study. *Human Reprod.* 4:369-377.

[00040] 26. Ellwood, D.A., Anderson, A.B.M., Mitchell, M.D., Murphy, G., 和 Turnbull,A.C. 1981. Prostanoids, collagenase and cervical softening in sheep. In *The Cervix in Pregnancy and Labour*. D.A. Ellwood and A.B.M. Anderson editors, Churchill Livingstone, London, 57-73.

[00041] 27. Buckingham, J.C., Selden, R.,和 Danforth, D.N. 1962. Connective tissue changes in the cervix during pregnancy and labor. *Ann. New York Acad. Sci.* 97:733-742.

[00042] 28. Theobald, P.W., Rath, W., Kuhnle, H.,和 Kuhn, W. 1982. Histological and electron-microscopic examinations of collagenous connective tissue of the non-pregnant cervix, pregnant cervix, and the pregnant prostaglandin-treated cervix. *Arch. Gynecol.* 231:241-245.

[00043] 29. Kokenyesi, R., 和 Woessner, J.F., Jr. 1991. Effects of hormonal perturbations on the small dermatan sulfate proteoglycan and mechanical properties of the uterine cervix of late pregnant rats. *Connective Tissue Res.* 26:199-205

[00044] 30. Westergren-Thorsson, G., Norman, M., Bjornsson, S., Endresen, U., Stjernholm, Y., Ekman, G., and Malmstrom, A. 1998. Differential expressions of mRNA for proteoglycans, collagens and transforming growth factor-beta in the human cervix during pregnancy and involution. *Biochim. Biophys. Acta* 1406:203-213.

[00045] 31. Glassman, W., Byam-Smith, M.,和 Garfield, R.E. 1995. Changes in rat

cervical collagen during gestation and after antiprogesterone treatment as measured in vivo with light- induced autofluorescence. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173:1550-1556.

[00046] 32. Kokenyesi, R., Armstrong, L.C., Agah, A., Artal, R., 和 Bornstein, P. 2004. Thrombospondin 2 deficiency in pregnant mice results in premature softening of the uterine cervix. *BiolReprod.* 70:385-390.

[00047] 33. Revah A, Hannah ME, Sue-A-Quan AK. 1998. Fetal fibronectin as a predictor of preterm birth: an overview. *Am J Perinatol.* 15:613-621.

[00048] 34. Peaceman AM, Andrews WW, Thorp JM, Cliver SP, Lukes A, Iams JD, Coultrip L, Eriksen N, Holbrook RH, Elliott J, Ingardia C, Pietrantonio M. 1997. Fetal fibronectin as a predictor of preterm birth in patients with symptoms: a multicenter trial. *Am J Obstet Gynecol.* 177:13-18.

[00049] 35. Leitich H, Kaider A. 2003. Fetal fibronectin--how useful is it in the prediction of preterm birth? *BJOG* 110 Suppl 20 : 66-70.

[00050] 36. Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, Mercer BM, Moawad A, Das A, Thom E, McNellis D, Copper RL, Johnson F, Roberts JM. 1996. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N Engl J Med.* 334:567-572.

[00051] 37. Iams JD. 2003. Prediction and early detection of preterm labor. *Obstet Gynecol.* 101:402-412.

[00052] 38. Garfield RE, Chwalisz K, Shi L, Olson G, Saade GR. 1998. Instrumentation for the diagnosis of term and preterm labour. *J Perinat Med.* 26:413-436.

[00053] 39. Fittkow CT, Shi SQ, Bytautiene E, Olson G, Saade GR, Garfield RE. 2001. Changes in light-induced fluorescence of cervical collagen in guinea pigs during gestation and after sodium nitroprusside treatment. *J Perinat Med.* 29:535-543.

[00054] 40. Bukowski R, Mackay L, Fittkow C, Shi L, Saade GR, Garfield RE. 2001. Inhibition of cervical ripening by local application of cyclooxygenase 2 inhibitor. *Am J Obstet Gynecol.* 184:1374-1378.

[00055] 41. Heine RP, McGregor JA, Goodwin TM, Artal R, Hayashi RH, Robertson

PA, Varner MW. 2000. Serial salivary estriol to detect an increased risk of preterm birth. *Obstet Gynecol.* 96:490-497.

[00056] 42. Ellis MJ, Livesey JH, Inder WJ, Prickett TC, Reid R. 2002. Plasma corticotropin-releasing hormone and unconjugated estriol in human pregnancy: gestational patterns and ability to predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 186:94-99.

[00057] 43. 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. 2001. The Preterm Prediction Study: toward a multiple-marker test for spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 185:643-651.

[00058] 44. Leppert, P.C., Kokenyesi, R., Klemenich, C.A., 和 Fisher, J. 2000. Further evidence of a decorin-collagen interaction in the disruption of cervical collagen fibers during rat gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182:805-812.

[00059] 45. Kobayashi H, Sun GW, Terao T. 1999. Immunolocalization of hyaluronic acid and inter-alpha-trypsin inhibitor in mice. *Cell Tissue Res.* 296:587-597.

[00060] 46. Chapdelaine P, Vignola K, Fortier MA. 2001. Protein estimation directly from SDS-PAGE loading buffer for standardization of samples from cell lysates or tissue homogenates before Western blot analysis. *Biotechniques* 31 :478- 482.

[00061] 47. Kokenyesi R, Murray KP, Benshushan A, Huntley ED, Kao MS. 2003. Invasion of interstitial matrix by a novel cell line from primary peritoneal carcinosarcoma, and by established ovarian carcinoma cell lines: role of cell-matrix adhesion molecules, proteinases, and E-cadherin expression. *Gynecol Oncol* 89:60-72.

[00062] 48. Adams, J.C. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001 ; 17:25-51.

[00063] 49. Bornstein, P., Armstrong, L.C., Hankenson, K.D., Kyriakides, T.R., 和 Yang, Z. 2000. Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biol* 19:557- 568.

[00064] 50. Bornstein, P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. 2001. *J Clin Invest* 107:929-934.

[00065] 51. Kyriakides, T.R., Zhu, Y.H., Smith, L.T., Bain, S.D., Yang, Z.T., Lin, M.T., Danielson, K.G., Iozzo, R.V., LaMarca, M., McKinney, C.E., Ginns, E.I., 和 Bornstein, P. 1998. Mice that lack thrombospondin-2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol* 140:419-430.

[00066] 52. Kokenyesi, R., 和 Woessner, J.F., Jr. 1989. Purification and characterization of a small dermatan sulfate proteoglycan implicated in the dilatation of the rat uterine cervix. *Biochemical Journal* 260:413-419.

发明概述

[00067] 发明人做了令人惊奇而又重要的发现：胶原原纤维相关蛋白参与人类妊娠期间子宫颈的变化。因此，本发明人设想，胶原原纤维相关蛋白、糖胺聚糖、糖胺聚糖相关蛋白以及其它的胞外基质成分，包括结构以及重构和调节成分（例如，基质金属蛋白酶（“MMP”））可作为预测哺乳动物（包括人）的早产子宫软化以及早产风险的生物标记。

[00068] 因此，本发明涉及一种在妊娠女性中预测早产的方法，包括以下步骤：从妊娠女性获得子宫下段/子宫颈样品，评估样品中胞外基质成分（亦称生物标记）的水平，将胞外基质成分的水平与标准对照或基线标准相比较，并预测早产宫颈软化和早产的风险。子宫下段/子宫颈样品可以是子宫下段组织活检标本、宫颈分泌物或阴道分泌物。优选地，样品是宫颈分泌物，其可以用拭子（swab）非侵入性地获得。

[00069] 优选的胞外基质成分包括血小板反应素 2（“TSP2”）、透明质酸（“HA”）、基质金属蛋白酶-2（“MMP2”）、基质金属蛋白酶-12（“MMP12”）、核心蛋白聚糖、光蛋白聚糖（lumican）以及纤调蛋白。更优选的胞外基质成分包括 TSP2、HA、MMP2 以及 MMP12。表 1 提供了可有效用于评估宫颈软化状态以及早产宫颈软化风险的生物标记列表。

[00070] 对照标准品可以是的标准量或系列稀释的胞外基质成分。基线标准品可以是组成型表达（即不与妊娠进程特异相关的）存在于子宫下段细胞中的蛋白或其它生物分子，诸如例如肌动蛋白、甘油醛磷酸脱氢酶（“GAPDH”）等等。胞外基质成分可以通过本领域已知的任意特定生物分子识别分析方法来检测和定量，诸如抗体分析、适体（aptamer）分析、配体-受体分析以及别构酶活性分

析。标准的抗体分析可以是 ELISA、蛋白质印迹、点印迹、RIA（放射免疫分析）、抗体夹心分析、抗体捕获分析、抗原捕获分析等等。该方法中可检测一个或多个生物标记。在这个具体实施方式的另一方面，可评估多个生物标记并且可基于多重信号作出诊断决定。

表 1：可用于评估宫颈软化/早产风险的生物标记

光蛋白聚糖、纤调蛋白、核心蛋白聚糖、keratocan、PRELP biglycan、mimcan、serglycin、基底膜聚糖、集聚蛋白、多能聚糖、连接蛋白、CD44、TSG-6、bikunin、间 α 胰蛋白酶抑制剂、透明质酸合成酶、透明质酸酶、弹性蛋白、fibulins、原纤蛋白、腱生蛋白 X、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、乙酰肝素酶（heparanase）、赖氨酰氧化酶、V 型胶原、VI 型胶原、XII 型胶原、XIV 型胶原、XVIII 型胶原、XX 型胶原、钙网蛋白、CD47、多配体聚糖、磷脂酰肌醇聚糖、脂蛋白受体样蛋白（LRP）、ADAM 和 ADAMTS 蛋白酶、E-选择蛋白、L-选择蛋白、血小板因子 4、转化生长因子 β 1、2 和 3（TGF- β ）、表皮生长因子（EGF）、角质形成细胞因子（KGF）、血管内皮生长因子（VEGF）、肝细胞生长因子（HGF）、成纤维细胞生长因子 1 和 2（FGF）、以及血小板衍生生长因子（PDGF）。

[00071] 在另一个具体实施方式中，本发明涉及能检测和定量与早产宫颈软化以及早产风险相关的生物标记的早产检测试剂盒。在一个具体实施方式中，试剂盒包括用于临床应用的第一部分，其包括从妊娠女性获得阴道子宫分泌物样品的拭子以及缓冲液。在用于诊断应用的第二部分中，试剂盒包括包括机械支持物（如膜、检测管、培养皿、多孔板等），以及特异性识别生物标记的第一试剂。在一个优选的实施方式中，试剂盒在第二部分中包括第二试剂，信号分子，其中所述的信号分子连接至第二试剂上，以及任选地作为内对照的生物标记。试剂（第一或第二）可以是适体、配体、受体、酶的底物、酶的产物、别构调节剂、能够特异地结合生物标记的抗体或其片段。就第二试剂而言，第二试剂能够特异地结合第一试剂或生物标记，或结合两者。优选的第一试剂是特异结合生物标记的抗体或抗体片段。优选的生物标记是下面中的一个或多个：核心蛋白聚糖、TSP2、MMP2、MMP12 以及 HA。信号分子可以是发光部分（例如荧光标签）、酶（例如 HRP 或碱性磷酸酶）、放射性标记（例如 ^{125}I ）、高亲和力部分（例如生物素）等。在试剂盒具体实施方式的另一方面，试剂盒可以在一个

单一部分中包括用于从妊娠女性获得阴道子宫分泌物样品的拭子、缓冲液、机械支持物、第一试剂、第二试剂以及对照生物标记（见上文）。

[00072] 在本发明的另一个具体实施方式中，用于定量生物力学相关标记的试剂盒是通过测量宫颈分泌物样品中编码生物力学相关标记的核酸分子的量来完成的。

[00073] 在本发明的一个具体实施方式中，待测的核酸分子是 DNA。

[00074] 在本发明的另一个具体实施方式中，待测的核酸分子是 RNA。

[00075] 在本发明的一个具体实施方式中，待测的核酸分子是 cDNA。

[00076] 本发明的另一个具体实施方式涉及一种在妊娠患者中检测早产风险的方法，该方法包括以下步骤：(a) 从患者获取宫颈分泌物样品，优选使用拭子；(b) 将含有宫颈分泌物样品的拭子置于缓冲液中；(c) 将含有各种生物标记的缓冲液进行定量免疫检测；(d) 测定样品中与宫颈软化相关的一个或多个生物标记的相对量，以及 (e) 基于那些相对量评估早产风险。生物标记的相对量意思是将样品中生物标记的量相对于样品中基线对照标记量来进行量化。基线对照标记是在整个妊娠过程中水平不发生改变或变化非常小的标记。在一个优选的具体实施方式中，样品被置于临床环境，例如，医生的办公室，加入到缓冲液中（所述的缓冲液协助保持样品中的生物标记以及基线对照标记的完整性），并转移至实验检测设备。在实验设备上，对样品进行处理，例如在定量免疫检测或原理相似的生物分子检测中那样，并且，将一个或多个生物标记相对于一个或多个基线对照标记进行定量。基于一个或多个生物标记的相对量来确定早产的风险，并且与患者和/或患者健康护理工交流所述的风险。

[00077] 在本发明优选的试剂盒和方法的优选方面，MMP12、核心蛋白聚糖或 TSP2 单独或与一种或多种其它生物标记联合显著地高于基线水平的升高，指示早产风险升高。基线水平的意思是，足月生产女性的宫颈分泌物中表达的任意一个或多个生物标记的标准化的平均光密度（以本文所述的任意单位（下文））。光密度可以以任意的单位表达。优选地，流产阳性水平是至少一个生物标记上比正常基线水平高至少一个标准差。任意一个或多个指的是 TSP2 单独或与核心蛋白聚糖或 MMP12，或者表 1 中所列举的（下文）任意其它的生物标记的组合或其多重组合，能被定量以及用于确定流产风险。

[00078] 尽管本发明人设想检测宫颈样品可以在妊娠的任意时间点获得，优选的

收集样品的时间包括妊娠 22 周和 26 周。可以收集在其它时间的更多样品用于监测那些认为是有更大流产风险的个案。在另一方面，由于本发明涉及确定宫颈某些程度或其它生物力学状态，该检测可在人工流产前提供给患者，以评估宫颈是否具有允许分娩的能力。

[00079] 本发明人设想上面所述的宫颈生物标记测试可能在其它妊娠相关的评估情况下有用。例如，这种生物标记测试可用于监测抑制（停止或减缓）宫颈软化和/或子宫收缩的治疗的有效性。另外，生物标记测试可用于评估妊娠期间任何时刻宫颈（但不应该仅限于妊娠条件下）的状态。例如，生物标记测试可以用于确定子宫是否有了分娩婴儿的充足准备（诸如在施用催产素前），因而协助缓解下游的问题。那些本发明所涉及领域的普通技术人员，可以合理地了解本发明在无数的产科和妇科测试中的适用性。

附图说明

[00080] 图 1 描述了来源于以孕龄周表示的各个妊娠阶段女性子宫下段组织中的血小板反应素 2 的原位染色定量水平。

[00081] 图 2 描述了来源于以孕龄周表示的各个妊娠阶段女性子宫下段组织中的核心蛋白聚糖的原位染色定量水平。

[00082] 图 3 描述的蛋白质印迹条带显示人子宫分泌物样品中蛋白胞外基质成分的存在。

[00083] 图 4 描述的点印迹条带显示了人子宫分泌物样品中透明质酸的存在。

[00084] 图 5 描述了检测来源于妊娠女性宫颈拭子样品的人宫颈各种胞外基质成分的光密度测定值的柱状图。TSP2=血小板反应素 2、ADAMTS4=老年痴呆症相关血小板反应素 1 基序 4，MMP3=基质金属蛋白酶 3，MMP1=基质金属蛋白酶 1，MMP8=基质金属蛋白酶 8。

[00085] 图 6 描述了早产患者相对于那些足月分娩患者的 TSP2 水平的光密度测定值的柱状图。光密度测定值标准化为总蛋白水平。

[00086] 图 7 描述了早产患者相对于那些足月分娩患者的核心蛋白聚糖水平的光密度测定值的柱状图。光密度测定值标准化为总蛋白水平。

[00087] 图 8 描述了早产患者相对于那些足月分娩患者的金属蛋白酶 12 水平的光密度测定值的柱状图。光密度测定值标准化为总蛋白水平。

优选的具体实施方式的描述

[00088] 发明人惊奇地发现,胞外基质成分(如血小板反应素 2、MMP2、MMP12、HA 以及核心蛋白聚糖),其参与哺乳动物宫颈以及子宫下段部分的生物力学特性的调节:(1)妊娠期间,其在哺乳动物特别是人类的宫颈以及子宫下段部分差异表达,并且(2)可以在宫颈分泌物中被检测到。本发明人设想,这些以及其它的胞外基质成分,以及表 1 中所列的其它生物标记,能作为预测妊娠女性的早产风险以及评估宫颈处于分娩婴儿准备状态的生物标记。因此,本发明涉及诊断和预测女性早产宫颈软化风险以及伴随的早产风险的方法,以及评估宫颈处于分娩准备状态的方法,和用于诊断和预测女性早产宫颈软化以及伴随的早产的试剂盒,以及用于评估宫颈处于分娩准备状态的试剂盒。所述的方法和试剂盒包括一个或多个生物标记的使用,所述生物标记已被证明或合理地预期与宫颈和/或子宫下段部分的生物力学特性改变相关。生物标记优选但不限于选自血小板反应素 2 (TSP2)、核心蛋白聚糖、纤调蛋白、光蛋白聚糖、透明质酸(HA)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2, 亦称弹性蛋白酶)以及基质金属蛋白酶 12 (MMP12)的胞外基质成分。

[00089] 在本发明的一个具体实施方式中,确定患者进入流产的风险的方法包括(a)从妊娠患者获得宫颈分泌物样品;(b)检测宫颈分泌物样品中生物力学相关标记的存在,其中所述的生物力学相关标记选自小板反应素 2 和核心蛋白聚糖及其组合;并且(c)将与标准化基线标记水平比较生物力学相关标记的水平增加与早产风险升高相关联。

[00090] 在本发明的另一个具体实施方式中,确定患者进入流产风险的方法进一步包括检测基质金属蛋白酶 12 的存在,并且将与标准化基线标记水平相比较基质金属蛋白酶 12 的水平增加与早产风险升高相关联。

[00091] 在本发明的另一个具体实施方式中,确定患者进入流产的风险的方法进一步包括确定针对该患者的适宜的治疗方案,其包括至少一个以下的治疗:i)患者所处环境的改变;ii)对女性施用药物治疗;iii)对患者的行为变化的建议;以及iv)对患者的密切监测。

[00092] 在本发明的一个具体实施方式中,待施用给患者的药物治疗是孕酮或孕酮衍生物。孕酮衍生物的例子包括但不限于:微细化孕酮、注射 17-羟基孕酮以及口服醋酸甲羟孕酮。孕酮可以通过阴道、舌下或直肠递送给患者。

[00093] 在本发明的另一个具体实施方式中,施用给患者的药物是刺激或封闭子

宫收缩的化合物。优选地，刺激子宫收缩的化合物是催产素或缩宫素，以及抑制子宫收缩的化合物是缩宫素类似物。

[00094] 在本发明的另一个具体实施方式中，确定早产风险的方法，特别是生物力学相关标记的检测，是通过测量宫颈分泌物样品中编码生物力学相关标记的核酸分子的量来完成的。

[00095] 在本发明的一个具体实施方式中，待测的核酸分子是 DNA。

[00096] 在本发明的另一个具体实施方式中，待测的核酸分子是 RNA。

[00097] 在本发明的另一个具体实施方式中，待测的核酸分子是 cDNA。

[00098] 如同上面所讨论的（上文），所述的方法和试剂盒可利用基于抗体或适体的检测方法来确定生物样品中的生物标记的相对量，所述生物标记反应妊娠女性子宫下段或宫颈的状况。生物样品可以是组织活检标本（宫颈或子宫下段）、宫颈分泌物或阴道分泌物。样品可取自任何妊娠的哺乳动物，优选是人，可以在妊娠期间任何一个或多个时间点取样。在一个针对人的优选的具体实施方式中，宫颈分泌物样品可以由熟练的临床工作人员使用拭子在第 22、24、26、28、30 和 32 周孕龄获取，这些时间点确保有足够的时间以干涉而保护早期分娩。然而，实践本发明的熟练的产科医生容易认识到，本发明具有在妊娠期间多个其它时间点评估宫颈分子-生物力学状态的适用性。

[00099] 下面的实施例描述了试剂盒和方法，其采用宫颈分泌物样品。本领域技术人员容易理解无数的生物分子检测方法都可以用来实践本发明。对于基于抗体的检测方法的描述，参见 Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL Press, 1988, Cold Spring Harbor, NY, 其以参考文献的形式并入本文。对于基于适体的检测方法的描述，参见 Heyduk 和 Heuduk, “Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins,” Anal Chem. 2005 Feb 15;77(4):1147-56, 其以参考文献的形式并入本文。

实施例 1：评估宫颈分泌物样品中生物标记的试剂盒与方法

[000100] 宫颈分泌物以涤纶拭子收集。用拭子擦拭暴露的外子宫表面以及后穹窿，将拭子放置入包含生理盐水和防腐剂的采集瓶中。样品收集非常类似于采用宫颈分泌物作为起始物质的其它常规检测（胎儿纤连蛋白）所应用的。

[000101] 将浓缩清洁剂溶液加入到采集瓶，搅动拭子使得分子完全释放入溶液中。移除拭子，样品溶液以简单的离心澄清。将澄清的样品和纯化标准品的等

分试样（各种浓度的 TSP2、HA、MMP2 和 MMP12）加载至点印迹仪器，并且溶液引导通过高亲和力蛋白结合膜（PVDF）。得到的蛋白质点将用于蛋白质定量和生物标记定量。

[000102] 将包含蛋白质点的膜用封闭液（如溶于 Tris 缓冲盐水的 5%奶粉(dry milk)）处理 30 分钟。用特异性结合 TSP2、MMP2 以及 MMP12 的第一抗体孵育膜。在 HA 检测的情况下，用生物素化的透明质酸结合蛋白（来源于 Calbiochem）代替第一抗体。抗体和透明质酸结合蛋白可以溶于 5%的奶粉溶液。在 4℃孵育约 12 小时，或在室温或 37℃孵育更短的时间。在孵育之后，用 Tris 缓冲盐水洗涤膜，然后用过氧化物酶缀合的第二抗体（对于 TSP2、MMP2 以及 MMP12）进行孵育，或以过氧化物酶缀合的亲合素(对于 HA)孵育。孵育之后，用 Tris 缓冲盐水洗涤膜数次，并用二氨基联苯胺底物显色。用光密度计定量颜色强度。

[000103] 为生成标准曲线，将已知量的 TSP2、MMP2、MMP12 以及 HA 增量地点在膜上。检测方法与前面部分所描述的(上文)完全相同。通过绘图针对生物标记量的染色强度得到标准曲线。点-ELISA 分析中染色点的光学密度将通过采用诸如 Scion4.2 的程序分析 ELISA 膜上的数码图片来确定。TSP2、HA、MMP2 以及 MMP12 的标准曲线使得实践者可以确定样品中的生物标记的绝对量。将生物标记量对标准曲线进行标准化。

[000104] 该分析的敏感度可以通过采用荧光读出代替比色读出而提高。这一基于荧光的读出是基于上面所述(上文)的点-ELISA 的通用格式的，其中用产生荧光的底物代替二氨基联苯胺底物。检测该信号的设备以及密度定量基本上如比色方法所描述的那样执行。

[000105] 样品中的全蛋白含量可以通过 Chapdelaine 等的方法（46）来确定。该方法基于在膜结合蛋白上应用氨基黑溶液，并通过光密度计定量颜色强度。该方法已经成功地运用到培养基中的细胞中（47）。

实施例 2：子宫下段的生物标记表达

[000106] 妊娠保持到足月要求子宫和子宫颈的协调功能。宫颈是主要由耐受妊娠期间的实质改变以允许足月时扩张的结缔组织组成的括约肌样结构（Leppert, P.C, 1995, Clin Obstet Gynecol, 38:267-79）。人子宫的非正常改变被认为是“不完全子宫”或轻度早产宫颈软化和扩张的原因。这些宫颈病变是早产的重要原因

因。

[000107] 为了确定芥蒂组织的各个成分对宫颈功能的贡献，发明人选择研究各个结缔组织蛋白缺陷小鼠的宫颈特性。数种胶原纤维相关蛋白（核心蛋白聚糖、光蛋白聚糖、纤调蛋白、血小板反应素 2）已显示出调节小鼠胶原蛋白形态以及皮肤的机械特性。本发明的目的是通过确定血小板反应素 2 敲除(TSP2-敲除)小鼠宫颈的特性来更好地了解早产宫颈软化的分子机制(Kyriakides, T.R.,等, 1998, J Cell Biol, 140:419-30)。

[000108] 宫颈的延展性通过蠕变反应来测定，当与野生型小鼠比较时，显示 TSP2 敲除小鼠的宫颈延展性在妊娠第 14 天有 4.5 倍的增长，在妊娠第 18 天有 6.1 倍的增长 (Kokenyesi, R.,等,2004,Biol Reprod, 70:385-90,其在此作为参考文献引入)。在妊娠第 10 天的时候，TSP2 敲除小鼠的宫颈延展性类似于非孕野生型小鼠的宫颈。与生物缺陷的时序一致，TSP2 的表达模式（由蛋白质印迹实验确定）显示，TSP2 在妊娠第 14 天和第 18 天表达于小鼠宫颈中，但不在非孕阶段的第 10 天表达。除了延展性增加外，TSP2 敲除宫颈的缺陷性生物学功能还在 TSP2 敲除小鼠中得到证实。在妊娠第 15 天以米非司酮处理导致 TSP2 敲除小鼠相对于野生型小鼠加速分娩。妊娠第 14 天和 18 天，在 TSP2 敲除宫颈中发现基质金属蛋白酶 2(MMP2)免疫染色水平增加。相应地，通过明胶酶谱法检测妊娠第 14 天的 TSP2 敲除宫颈的抽提物发现 MMP2 活性增加。明胶酶谱检测没有发现 MMP9 活性的增加。酪蛋白底物酶原分析显示妊娠第 14 天的 TSP2 敲除宫颈的酪蛋白分解活性没有变化。发明人也探讨了 MMP3（溶基质素）、MMP7（基质溶素）、MMP13（主要的小鼠胶原酶）以及组织蛋白酶 G 的免疫组化颜色，因为他们是本领域已知的涉及结缔组织重构的蛋白酶。染色膜的光密度分析显示，妊娠第 14 天，TSP2 敲除宫颈的任何一种上述蛋白酶的染色强度没有发生显著变化。发明人没有能在 TSP2 敲除宫颈中检测到核心蛋白聚糖以及光蛋白聚糖（两种在宫颈中大量表达的 MMP 底物）的降解产物。还研究了妊娠第 14 天金属蛋白酶组织抑制子（TIMPs）的表达。TIMPs1、2 和 4 通过免疫组化染色检测；然而，光密度分析显示染色强度没有显著的变化。没有在宫颈中检测到 TIMP3。

[000109] 为了更好地理解 TSP2 敲除宫颈中超微结构改变的类型和大小，申请人应用定量形态测定来表征胶原间质基质的超微结构特征。开发了标准化的采

样方法以在透射电镜图象上获得基质结构的无差别表征。妊娠 14 天的 TSP2 敲除宫颈中，申请人观察到胶原纤维直径的增加，纤维直径分布的改变，胶原束横断面积的下降，胶原束内胶原纤维的包装密度下降，胶原纤维间低电子密度颗粒的聚集，以及紊乱的胶原基质的比例增加。

[000110] 通过免疫组化技术检查透明质酸在 TSP2 敲除宫颈中的存在。在间质中观察到较多的透明质酸染色，而在上皮中观察到较少的透明质酸染色。光密度分析显示，在妊娠第 14 天和第 18 天，透明质酸染色强度显著升高，但在第 10 天没有出现这种情况。从这些数据，本领域技术人员可以合理地推断小鼠子宫宫颈中 TSP2 的表达对于保持组织的完整性以及抵抗机械力而言是重要的。因此，TSP2 敲除小鼠是第一种能够研究自发性、早产宫颈软化的动物模型。TSP2 敲除小鼠在妊娠 14 天的早产宫颈软化与间质基质的超微结构的延展性改变和 MMP2 以及透明质酸水平的增加相关，然而很多其它的蛋白酶/蛋白酶抑制剂不受影响。这些结果暗示，早产宫颈软化是由于胶原束的组装/分解的平衡改变以及有限的蛋白水解参与而出现的。该数据证实了单个胶原束相关蛋白的缺乏可以显著地改变宫颈延展性，暗示 TSP2 以及其它的胶原束相关蛋白（诸如核心蛋白聚糖或光蛋白聚糖）在芥蒂组织整体性调节中起着特异地、非冗余的作用。虽然不希望受限于理论，申请人合理地推测，任意胶原纤维相关蛋白或宫颈胞外基质的调节剂的缺陷表达都可能导致妊娠女性宫颈的功能缺陷。

[000111] 因为尚未研究人生殖道内的 TSP2，发明人对人子宫下段的 TSP2 表达模式进行了免疫组化研究。可以在定位于所有从 27 到 36 周孕龄标本平滑肌细胞之间的结缔组织富集区域见到 TSP2 染色。平滑肌细胞本身几乎没有着色。妊娠 33-35 周的 TSP2 强度达到最高峰，在第 27-31 周以及 36-37 周更弱（参见图 1，其表示了人子宫下段相对于按周数表示的孕龄的 TSP2 染色定量）。

[000112] 下段子宫标本以 Institutional Review Board of Saint Louis University 所通过的方法获取。样本取自进行剖宫产而不是早产的患者。孕龄从 27 周到 37 周。标本在缓冲的福尔马林中固定，并进行免疫组化处理。TSP2 的特异单抗（来源于 BD Biosciences）以 1:50 的稀释比使用，其后是辣根过氧化物酶缀合的第二抗体。除了绵羊抗人核心蛋白聚糖的多克隆抗体（来源于 US Biological）以 1:50 的稀释比使用外，核心蛋白聚糖的免疫组化染色基本如所描述的那样施行（44）。图象以配备有数码镜头的 Nikon Eclipse E400 显微镜记录。核心蛋白聚糖的染色

模式用作参照,因为宫颈胞外基质内的核心蛋白聚糖表达已经被一再地证实了。在肌纤维之间的基质聚集位置上检测到TSP2(图1)和核心蛋白聚糖(图2)。平滑肌细胞显示出微弱的TSP2和核心蛋白聚糖染色。

实施例3: HA和MMP12作为宫颈生物标记

[000113] 在对自发性早产宫颈软化的进一步研究基础上,申请人发现在早产软化宫颈中,透明质酸(HA)、MMP2和MMP12免疫染色升高。因此,发明人设想HA、MMP2以及MMP12在宫颈中水平的升高可用于作为早产宫颈扩张的生物标记。

[000114] 采用根据Kobayashi及其伙伴的方法的免疫组化研究HA的水平(45)。这一检测方法基于生物素化HA结合蛋白与HA的特异性结合以及随后通过亲和素过氧化物酶的透明质酸结合蛋白可视化。通过从染色顺序中省略生物素化透明质酸结合蛋白来进行对照。该技术的特异性通过以10mU的链霉菌透明质酸酶在37°C预处理宫颈截面1小时而建立。这种预处理完全消除了截面的染色,表明透明质酸结合蛋白对小鼠宫颈截面中的HA是特异性的。免疫组化(采用Image J方法)用于定量染色强度。每种基因型和每个孕龄都研究了三个宫颈;每个宫颈至少有六个源于宫颈外口的高功率区域用于成像分析。

[000115] 在野生型小鼠中,HA的染色强度从妊娠10天的4.2单位(± 0.4 SEM)增加至妊娠14天的6.6单位(± 0.8 SEM),并且在妊娠18天增至13.5单位(± 1.1 SEM)。在TSP2敲除小鼠中,HA染色强度从妊娠10天的3.8单位(± 0.4 SEM)增加至妊娠14天的11.9单位(± 1.4 SEM),并且在妊娠18天增至17.4单位(± 1.0 SEM)。野生型小鼠以及TSP2敲除小鼠在妊娠第10天的HA染色强度上没有可检测的差异($p < 0.25$)。然而,TSP2敲除宫颈在妊娠14天和18天的HA染色强度上显著要更高一些($p < 0.01$)。

[000116] 还通过免疫组化染色研究了MMP12的表达。研究了妊娠14天妊娠雌性的宫颈。第一抗体(MMP12特异性抗体)购买自Santa Cruz Biotechnology, Inc。野生型宫颈的MMP12染色强度是10.5单位(± 0.9 SEM),在TSP2敲除宫颈中增长至16.5单位(± 0.5 SEM)。用组织形态计量学(采用所描述的用于蛋白酶的Image J程序)用于定量染色强度。每种基因型和每个孕龄都研究了三个宫颈;每个宫颈至少有六个源于宫颈外口的高功率区域用于成像分析。

实施例4: 人类宫颈/子宫下段

[000117] 测定了人类子宫下段（一种表征子宫到宫颈的过渡的组织）中的 TSP2 表达。子宫下段标本以 Institutional Review Board of Saint Louis University 所通过的方法来获取。样本取自进行剖宫产而不是早产的患者。孕龄从 27 周到 37 周。标本在缓冲液的福尔马林中固定，并进行免疫组化处理。TSP2 的特异单抗（来源于 BD Biosciences）以 1:50 的稀释比使用，其后是辣根过氧化物酶缀合的第二抗体。除了绵羊抗人核心蛋白聚糖的多克隆抗体（来源于 US Biological）以 1:50 的稀释比使用外，核心蛋白聚糖的免疫组化染色基本如所描述的那样施行（44）。将核心蛋白聚糖的染色模式作为参照，因为宫颈胞外基质内的核心蛋白聚糖表达已经被一再地证实了。图象以配备有数码镜头的 Nikon Eclipse E400 显微镜记录。

[000118] 在肌纤维之间的基质聚集位置中检测到 TSP2 和核心蛋白聚糖。平滑肌细胞显示了微弱的 TSP2 和核心蛋白聚糖染色。因此，由于已经证实了 TSP2 存在于人类子宫宫颈中，本领域技术人员可以合理地预期 TSP2 可能也存在于宫颈分泌物中（见下文）。

[000119] 接下来，对代表各个不同孕龄阶段的生物活检标本进行 TSP2 染色，玻片的染色强度通过应用 Image J 程序（NIH Image 程序的变体）从数码图片定量。评估了每个标本的六个高功率区域。TSP2 的染色强度显示了从 27 周孕龄到 35 周孕龄的增长趋势，以及随后在 36 到 37 周孕龄的下降趋势（图 1）。

实施例 5：宫颈分泌物中的生物标记

[000120] 检测了人类子宫分泌物中的候选生物标记 TSP2、HA、MMP2 和 MMP12。从孕龄 37 周的妊娠女性获得的宫颈分泌物用于测定那些示例性的生物标记 TSP2、MMP2、MMP12 以及 HA 是否可以在宫颈分泌物中特异地检测到。为了用于检测 TSP2、MMP2、MMP12，将宫颈分泌物（标本总量的 20%）与电泳上样缓冲液混合，并且将样品在 4%（对于 TSP2 和 MMP2）以及 10%（对于 MMP12）的聚丙烯酰胺凝胶中电泳。蛋白质印迹以及膜的洗涤如前面所述的那样进行（52）。TSP2 以 1: 100 稀释比的单抗（BD Biosciences）检测；MMP2 以 1: 100 稀释比的单抗（Calbiochem）检测；MMP12 以 1: 100 稀释比的多抗（Santa Cruz Biotechnology）检测。辣根过氧化物酶缀合的第二抗体以 1: 500 的稀释比使用。反应性条带采用二氨基联苯胺底物显影。

[000121] 特异性的反应性条带以箭头标出（图 3）。MMP2 和 MMP12 条带的分

子量是符合预期的 (72kDa 以及 54kDa)。MMP12 的蛋白质印迹显示了额外的更低分子量的条带, 可能是酶前体的蛋白水解过程中的标志。TSP2 条带的分子量比预期的 62kDa 要小, 其表明宫颈分泌物中 TSP2 的水解。

[000122] 宫颈分泌物中的 HA 采用点-ELISA 方法检测。将宫颈分泌物 (10% 的总标本) 调节至含有 1M 的 HCl 胍以及 5% 的巯基乙醇以破坏粘液聚集。混合物以 15,000×g 离心 5 分钟, 用斑点杂交仪器将上清加载至 PVDF 膜上。膜以蛋白质印迹实验相同的方式处理, 不同的是用生物素化 HA 结合蛋白替代第一抗体, 以及用辣根过氧化物酶缀合的亲和素复合物替代第二抗体。

[000123] 应用 HA 探针所导致的黑色环 (图 4 中以箭头标记的顶排的点) 表明 HA 的检测。缓冲液对照点以及那些没有 HA 探针的点, 没有显示可见的染色信号。这些数据暗示 HA 在宫颈分泌物中是特异性可检测的。

实施例 6: 宫颈分泌物样品的收集与分析

[000124] 样品收集: 宫颈分泌物以涤纶拭子从患者收集。拭子擦拭暴露的外子宫表面以及后穹窿, 将拭子放置入包含生理盐水、氨基丁三醇缓冲液、蛋白酶抑制剂 (EDTA, 苯甲基磺酰氟、胃蛋白酶抑制剂) 以及抗菌剂 (叠氮化钠) 的采集瓶中。样品收集过程非常类似于采用宫颈分泌物作为起始物质的其它常规临床检测 (胎儿纤连蛋白) (参见 Coleman 等, "Fetal fibronectin detection in preterm labor: evaluation of a prototype bedside dipstick technique and cervical assessment", Am J Obstet Gynecol. 1998 Dec; 179 (6 Pt 1) : 1553-8), 其在此通过参考文献并入本文。

[000125] 用于分析的样品制备: 在将标本加载至膜上之前, 将生物标记溶解。将浓缩的尿素/DTT 溶液加入至收集瓶, 得到终浓度是 1M 尿素以及 10mM 的 DTT (二硫苏糖醇), 并且搅动拭子使得大分子完全释放入溶液中。移除拭子并且将所获得的样本分成等分试样。加入十二烷基硫酸钠 (SDS) 至一份等分试样, 终浓度为 1%, 然后将等分试样加热至沸腾, 以 15,000×g 离心 10 分钟。上清液用于 TSP2、MMP2 以及 MMP12 的检测和其它蛋白的定量。另一份等分试样 (或其它的等分试样) 以 15,000×g 离心 10 分钟, 上清用于 HA 或其它粘多糖的检测。这些生物标记在缓冲液中是水溶性的, 并且预期其存在于上清液中。

[000126] 有显色的点-ELISA: 将澄清的样品加载至斑点杂交仪器, 将溶液引导通过高亲和力的膜 (用于蛋白质生物标记 [例如, TSP2、MMP12、MMP2] 的硝

酸纤维素膜，用于非蛋白质生物标记[例如 HA]的 PVDF[聚偏氟乙烯]膜)。硝酸纤维素膜然后以 5%奶粉溶液（在 Tris 缓冲盐水中）处理 30 分钟。然后这些膜以对蛋白质生物标记（例如 TSP2、MMP2 和 MMP12）特异的第一抗体孵育。PVDF 膜以 0.2%BSA（牛血清白蛋白）溶液（在 Tris 缓冲盐水中）处理 30 分钟。然后，在 HA 作为生物标记的情况下，用生物素化透明质酸结合蛋白（购买自 Calbiochem）孵育膜。在最初的测试中，孵育在 4℃持续约 12 小时。在孵育之后，用 Tris 缓冲生理盐水（含有 0.3%的 Tween20）洗涤膜，然后以辣根过氧化物酶缀合的第二抗体（对于 TSP2、MMP2 以及 MMP12）孵育，或者用辣根过氧化物酶缀合的亲和素（对于 HA）孵育。孵育之后，用 Tris 缓冲盐水（含有 0.3%的 Tween20）洗涤膜数次，并且采用二氨基联苯胺底物显色。

[000127] 基于化学发光的检测：在另一个比色读出的（见上文）具体实施方式中，本发明可以通过采用基于化学发光读出的分析来执行。基于化学发光的分析应用如上所述的通常的酶免疫斑点实验（Spot-Elisa）平台；然而，在信号显示过程中，采用化学发光生成底物代替二氨基联苯胺底物（诸如，Luminol）。化学发光信号的检测以及光密度定量可以采用成像系统执行，诸如 Kodak Gel Logic 440 Imaging Station，其可以以感光胶片的敏感性记录化学发光信号。这种装置包括一个成像分析软件以执行所检测信号的定量分析。

[000128] 内标准：考虑到瞬时生物标记工具的相对特性，采用一个或多个内标准用于建立基线以及用于作为所收集的样本的变化量的对照。内标准包括那些在宫颈分泌物中无论宫颈处于妊娠过程的何种阶段、其表达量均一致的蛋白。

[000129] 点-ELISA 的标准曲线：将已知量的重组或纯化的 MMP2、MMP12 以及 HA 以增加量的方式点在膜上。这些材料是可从 Calbiochem/EMD Biosciences(LA Jolla, CA)购买的。目前，没有任何商业上可购买的纯化 TSP2，因此，来源于 BD Biosciences（San Diego, CA）的 RSV-3T3 细胞裂解物就作为稳定的 TSP2 源使用。将这些已知的物质溶解于用于点杂交上样的缓冲液中。这些标准品的检测方法与与所描述的完全相同(上文)。标准曲线由光密度测定法确定的点光学密度相对于生物标记的量而生成。

[000130] 光密度测定法：点-ELISA 分析的染色点的光学密度通过分析 ELISA 膜的数码图象确定，并且在 Kodak Image Station 中采用嵌入的图象分析软件分析光学密度。HA、MMP2 以及 MMP12 的标准曲线使得可以确定样品中生物标

记的绝对量。TSP2 的标准曲线使得可以以任意单位的光学密度确定 TSP2 的量。生物标记的量然后标准化为单位蛋白水平。

[000131] 蛋白质定量：将点-ELISA 的光学密度标准化为宫颈分泌物中的蛋白水平。样品中的蛋白质含量通过 Chapdelaine 等（46）的方法测定。该方法是基于在膜结合蛋白上使用氨基黑溶液的，并且通过光密度测定法获得颜色强度的定量。该方法已经被成功地用于定量细胞裂解物的蛋白质水平（47）。

实施例 7：检测宫颈分泌物的斑点杂交方法

[000132] 采用涤纶拭子从阴道穹窿收集宫颈分泌物。将宫颈分泌物的每根拭子置入含有 1.5ml 冰冷样品收集缓冲液（10mM 的 Tris/HCl, pH: 7.4, 0.15 M NaCl, 20mM EDTA, 5uM 胃蛋白酶抑制剂 A, 1uM 亮肽素, 10ug/ml 抑肽酶）的 15ml 蓝色顶盖的试管中。样品可在置于-20℃冷动机中长期保存前保存在冰箱中数天。

[000133] 解冻样品并在管中加入 1.5ml 冷的抽提缓冲液（10mM Tris/HCl, pH: 7.4, 2M 尿素, 0.3M NaCl, 20mM EDTA）来抽提。将试管（仍旧含有拭子）涡旋 30 秒，然后移除并丢弃拭子。将抽提物等分入两个 1.5ml 微量离心管用于在-20℃冷动机储存。

[000134] 将冷冻的抽提物在冰上解冻以用于分析，在微量离心机中以最高速度离心 10 分钟。2ml 的上清用于蛋白质定量，100ml 的上清用于免疫斑点印迹。蛋白质定量采用 Chapdelaine 等, Biotechniques, 2001, 31/478-482(其在此以参考文献的方式引入本文)的氨基黑染色方法完成。将 BSA 标准品溶解在 0.5 倍的抽提缓冲液中。

[000135] 免疫斑点印迹采用 PVDF（固相膜）膜进行。将抽提物（100ml）在真空泵的协助下引导通过膜。膜以 tris 缓冲盐水（TBS; 参见 Sambrook, Fritsh and Maniatis, “molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, CSHLP 1989, CSH, New York, 其在此以参考文献并入）简单清洗并与 5%奶粉在 TBS 中在室温下孵育 1 小时。

[000136] 第一抗体从购买的抗体溶液以 1:100 的稀释比在奶粉/TBS 中稀释。抗体与膜在 4℃孵育 14 小时。然后以含有 0.3%(v, v)Tween-20 的 TBS 洗涤膜 3 次，每次 10 分钟。然后以辣根过氧化物酶缀合的第二抗体在室温下将膜孵育 1 小时。第二抗体从购买的抗体溶液以 1:500 的稀释比在奶粉/TBS 中稀释。膜然后以含有 0.3%(v, v)Tween-20 的 TBS 洗涤 3 次，每次 10 分钟。

[000137] 膜通过与含有 Tris/HCL, pH: 7.4, 0.6mg/ml 的二氨基联苯胺、0.03% NiCl 以及 0.003%过氧化氢的溶液孵育来显色。干燥显色的斑点, 并采用数码相机拍照。蛋白质斑点以及免疫印迹斑点的光密度分析通过 Image J (一种公共领域的 Java 图片处理程序, 可从 <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/intro.html> 免费获得) 完成。光密度分析结果显示在图 5, 其清楚地描绘了随妊娠发展的基质蛋白表达变化。

实施例 8: 早产预测

[000138] 在一个怀孕患者的临床实验中, 显示候选的 TSP2、核心蛋白聚糖以及 MMP12 生物标记在预定要进入早产的妊娠女性的宫颈分泌物中具有增加的水平。

[000139] 临床研究了 56 例妊娠女性。所有的女性是无症状患者 (不显示早产迹象)。这些女性同意参加提供以宫颈拭子收集的宫颈分泌物标本。宫颈分泌物在尿素溶液中提取, 并且抽提物在点杂交形式下研究。将每个标本的三等分试样应用到膜上。蛋白质水平采用 Amido Black 技术 (58) 测定。TSP2、核心蛋白聚糖以及 MMP12 的水平采用特异性抗体, 利用化学发光检测方法测定。在 X 射线胶片上捕捉化学发光信号, 并且用光密度分析法分析胶片上的黑点以获得光学密度值。更黑的点产生更高的光学密度, 其显示更强的化学发光信号, 并且因此显示更多的生物标记。将光学密度值标准化为标本的蛋白质含量以提供光学密度单位/微克蛋白的最终测量值。

[000140] 在患者群体中, 三位女性在标本收集 (孕龄 27 至 30 周) 时是无症状的, 然后他们在孕龄 33 周被诊断出具有早产的症状 (图 6、7 和 8 的早产风险组)。

[000141] 在 27 至 30 周的孕龄范围内, 有一个 10 名女性的匹配组, 她们的宫颈分泌物在第 27 至 30 周孕龄收集, 但这些女性从不显示早产的迹象 (图 6、7 和 8 的无风险组)。

[000142] 早产风险组和无风险组通过用于不等样品大小和不等方差的测试来比较。当与无风险组的女性 (n=10) 比较时, TSP2 以及核心蛋白聚糖的水平 (以“光密度/微克蛋白单位”表示) 在早产风险组 (n=3) 女性中明显要更高 ($p < 0.01$)。初步的数据提示, 这三种宫颈生物标记应在大量的研究对象中进行研究。

[000143] 在说明书附图中, 图 1 描绘的是人子宫下段部分中的血小板反应素 2 的表达。图 2 描绘的是人子宫下段部分中的核心蛋白聚糖的表达。图 3 描绘的

是宫颈分泌物中的 MMP2、MMP12 以及 TSP2 的检测。图 4 描述的是宫颈分泌物中的 HA 检测。图 5 描绘的是宫颈标记表达。图 6 描绘的是宫颈分泌物中的血小板反应素 2。图 7 描绘的是宫颈分泌物中的核心蛋白聚糖。图 8 描绘的是宫颈分泌物中的 MMP12。

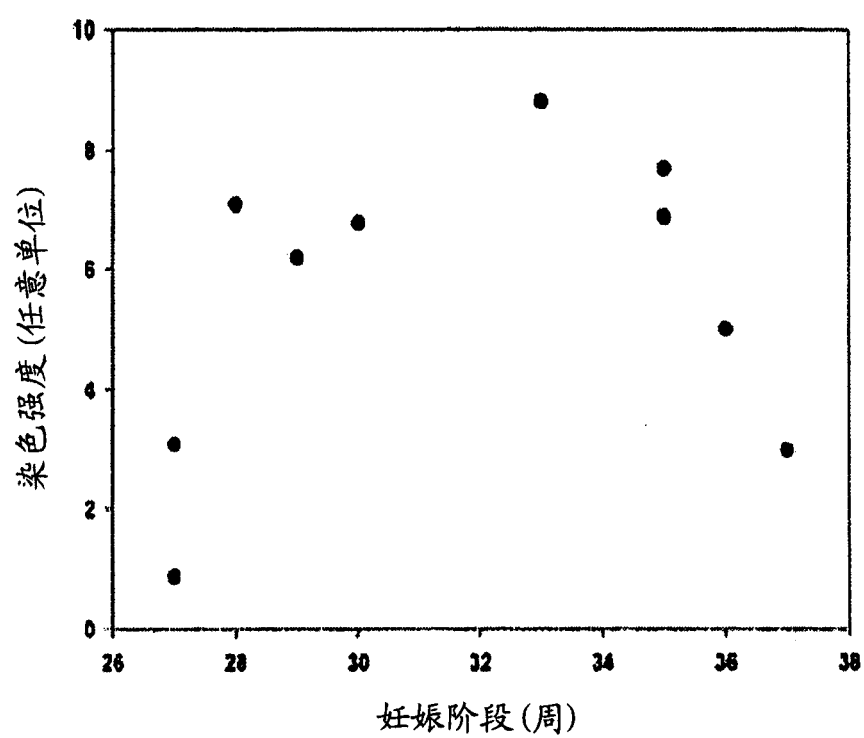


图 1

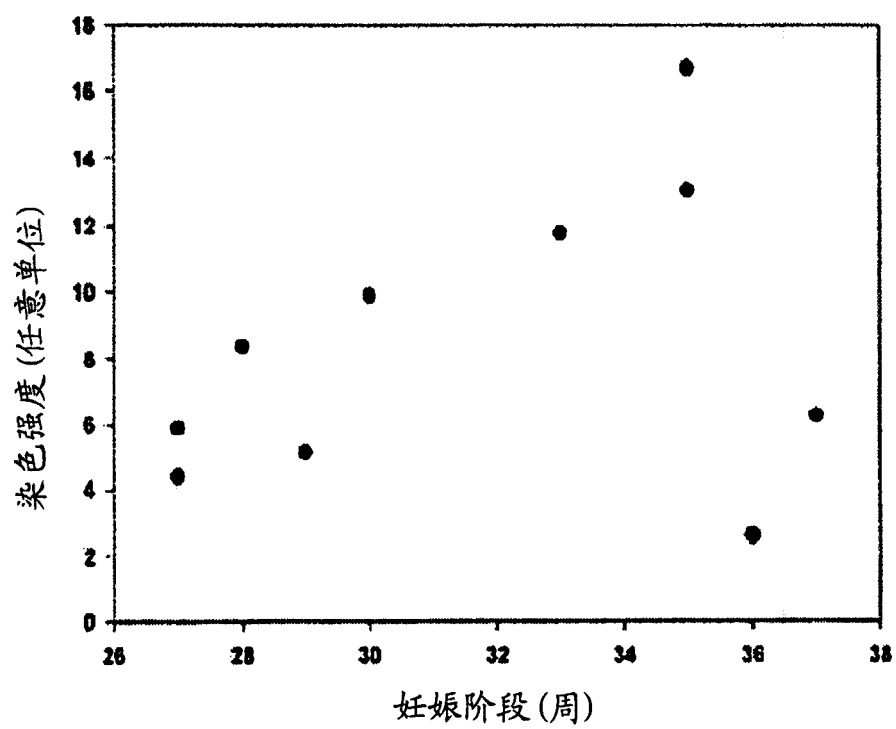


图 2

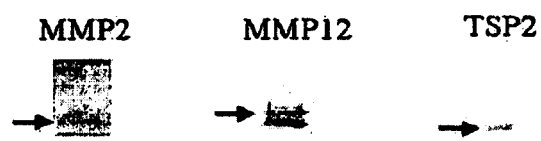


图 3

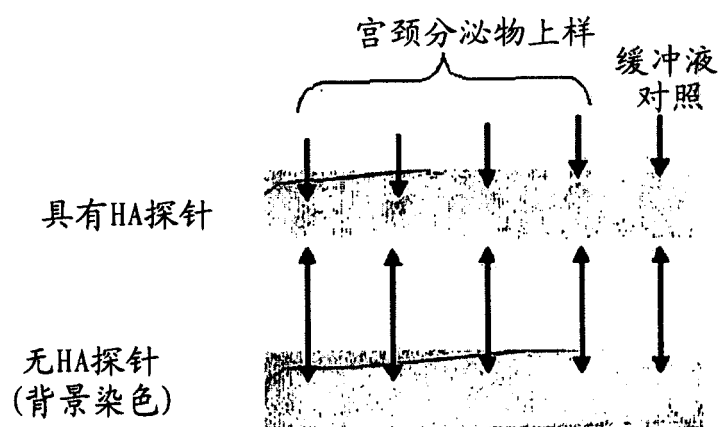


图 4

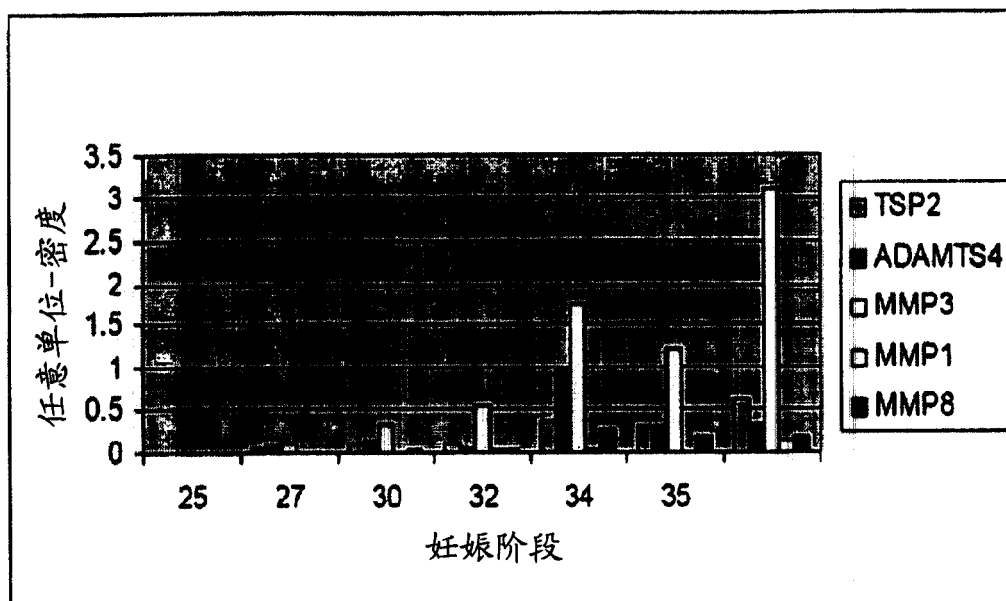


图 5

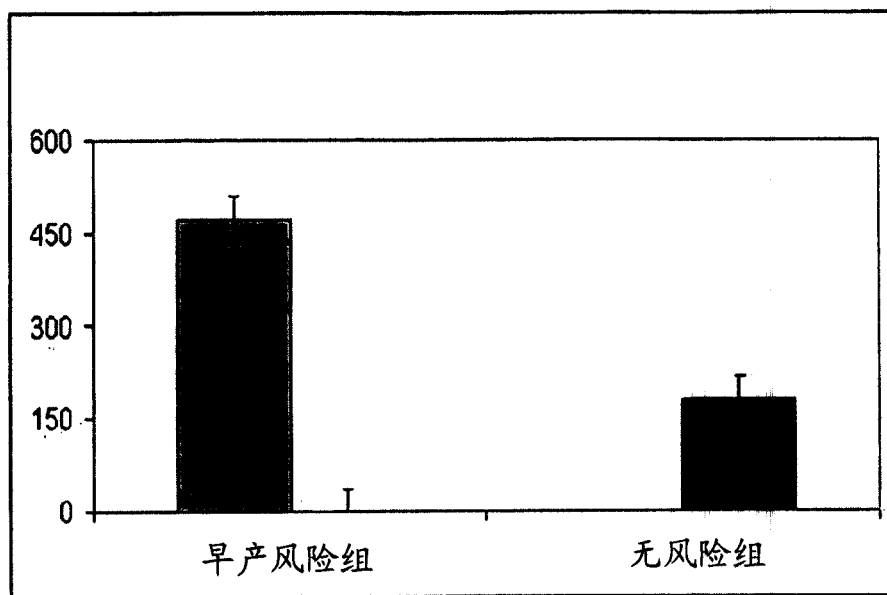


图 6

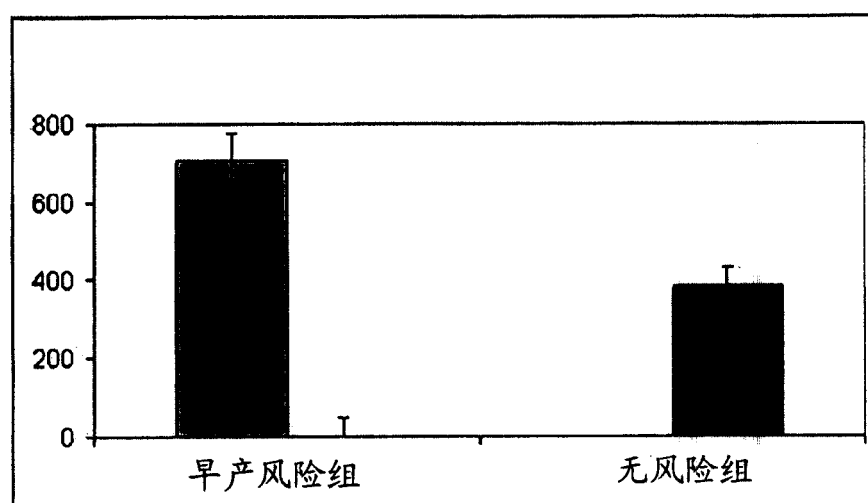


图 7

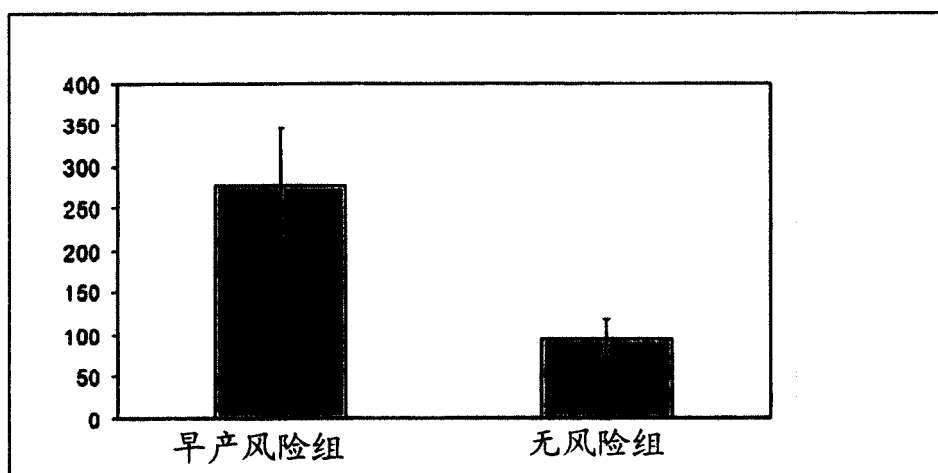


图 8

专利名称(译)	预测早产风险的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN101509917A	公开(公告)日	2009-08-19
申请号	CN200810177892.7	申请日	2008-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	塞尔维马克二世有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	塞尔维马克二世有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	塞尔维马克二世有限责任公司		
[标]发明人	R科肯耶西 J赖		
发明人	R·科肯耶西 J·赖		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N2800/50 G01N2800/368 G01N2800/60 G01N33/689		
代理人(译)	刘健 付磊		
优先权	11/874717 2007-10-18 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及允许人们预测妊娠女性的早产风险的试剂盒和方法。发明人发现可以在宫颈分泌物中检测到各种不同的胞外基质成分。宫颈分泌物中发现的某种胞外基质蛋白的定量可用于宫颈生物力学状态的诊断，其表明早产是否可能。一些可在宫颈分泌物中发现的胞外基质成分包括核心蛋白聚糖、血小板反应素以及基质金属蛋白酶。

光蛋白聚糖、纤调蛋白、核心蛋白聚糖、keratocan、PRELP biglycan、mimcan、serglycin、基底膜聚糖、集聚蛋白、多能聚糖、连接蛋白、CD44、TSG-6、bikunin、间 α 胰蛋白酶抑制剂、透明质酸合成酶、透明质酸酶、弹性蛋白、fibulins、原纤蛋白、腱生蛋白 X、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、乙酰肝素酶 (heparanase)、赖氨酰氧化酶、V 型胶原、VI 型胶原、XII 型胶原、XIV 型胶原、XVIII 型胶原、XX 型胶原、钙网蛋白、CD47、多配体聚糖、磷脂酰肌醇聚糖、脂蛋白受体样蛋白 (LRP)、ADAM 和 ADAMTS 蛋白酶、E-选择蛋白、L-选择蛋白、血小板因子 4、转化生长因子 β 1、2 和 3 (TGF- β)、表皮生长因子 (EGF)、角质形成细胞因子 (KGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、成纤维细胞生长因子 1 和 2 (FGF)、以及血小板衍生生长因子 (PDGF)。