



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01819269.6

[45] 授权公告日 2006年3月15日

[11] 授权公告号 CN 1245626C

[22] 申请日 2001.8.1 [21] 申请号 01819269.6
 [30] 优先权
 [32] 2000.11.21 [33] KR [31] 2000/69283
 [86] 国际申请 PCT/KR2001/001306 2001.8.1
 [87] 国际公布 WO2002/042770 英 2002.5.30
 [85] 进入国家阶段日期 2003.5.21
 [71] 专利权人 财团法人索尔大学校产学协力财团
 地址 韩国首尔
 [72] 发明人 尹保铉
 审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
 代理人 程金山

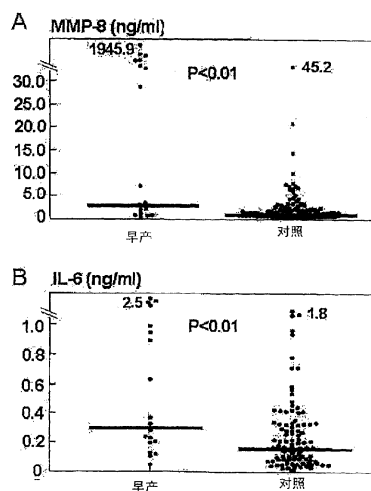
权利要求书2页 说明书17页 附图6页

[54] 发明名称

产前诊断早产、胎儿感染和胎儿损伤的诊断剂及含有它们的诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种产前诊断早产、胎儿感染和胎儿损伤的方法，和诊断用的诊断剂体系和诊断试剂盒。方法、诊断剂体系和试剂盒是基于这个发现，即当孕妇处于早产、子宫内感染和胎儿损伤的危险中时，羊水中 MMP-8 的水平明显较高。诊断剂体系和试剂盒可用于不具有以及具有早产或胎膜早熟破裂的临床信号的患者。由于与测量胎血细胞因子水平的常规方法相比，在灵敏度和特异性方面的优势以及它较小的侵袭力，该诊断剂体系和试剂盒在早产、胎儿感染和胎儿损伤的产前诊断方面是非常有用的。



1. 基质金属蛋白酶-8 抗体在制备诊断剂中的应用, 所述诊断剂用于通过
5 测量孕妇羊水样品中基质金属蛋白酶-8 的水平产前诊断早产、胎儿感染和
胎儿损伤。
2. 如权利要求 1 中所述的应用, 其中所述孕妇具有或不具有早产或胎膜
早熟破裂的临床信号。
3. 如权利要求 1 中所述的应用, 其中胎儿损伤是围生期疾病, 所述围生
10 期疾病包含新生儿脓毒症、呼吸窘迫综合征、肺炎、支气管肺发育异常、
心室内出血、坏死性小肠结肠炎或脑性麻痹。
4. 如权利要求 1 中所述的应用, 其中当羊水基质金属蛋白酶-8 的边界值
高于 23 ng/ml 时, 将孕妇鉴定为处于早产、胎儿感染和胎儿损伤的危险中。
5. 如权利要求 1 中所述的应用, 其中当羊水基质金属蛋白酶-8 的边界值
15 高于 23 ng/ml 时, 将孕妇鉴定为处于早产的危险中。
6. 如权利要求 1 中所述的应用, 其中当羊水基质金属蛋白酶-8 的边界值
高于 23 ng/ml 时, 将孕妇鉴定为处于胎儿感染的危险中。
7. 如权利要求 1 中所述的应用, 其中当羊水基质金属蛋白酶-8 的边界值
高于 23 ng/ml 时, 将孕妇鉴定为处于发展成脑性麻痹的危险中。
- 20 8. 如权利要求 1 中所述的应用, 其中当羊水基质金属蛋白酶-8 的边界值
高于 23 ng/ml 时, 将孕妇鉴定为处于围生期疾病的危险中。
9. 一种通过测量孕妇羊水样品中基质金属蛋白酶-8 的水平产前诊断早产、
胎儿感染和胎儿损伤的诊断剂, 其包含一种或多种抗基质金属蛋白酶-8
的抗体。
- 25 10. 如权利要求 9 中所述的诊断剂在定量分析特异抗原-抗体反应中的应
用, 所述定量分析特异抗原-抗体反应包含步骤:
 - 1) 在一个基质上吸附初级抗基质金属蛋白酶-8 抗体,
 - 2) 在存在羊水的条件下, 孵育吸附到所述基质上的抗基质金属蛋白酶
-8 抗体, 并洗涤所述基质以去除未结合的抗原,
 - 30 3) 将连接产色素酶或荧光剂的次级抗体与结合到初级抗体上的基质金

- 属蛋白酶-8 相偶联，其中所述初级抗体吸附到所述基质上，和
- 4) 通过加入着色剂进行显色反应，以定量分析特异抗原-抗体反应。
11. 如权利要求 10 中所述的应用，其中抗基质金属蛋白酶-8 抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。
- 5 12. 如权利要求 10 中所述的应用，其中基质选自硝酸纤维素膜、96-孔聚乙烯树脂培养板、96-孔聚苯乙烯树脂培养板和载玻片。
13. 如权利要求 10 中所述的应用，其中产色素酶选自过氧化物酶、碱性磷酸酶和生物素。
14. 如权利要求 10 中所述的应用，其中荧光剂选自 FITC 和 TRITC。
- 10 15. 如权利要求 10 中所述的应用，其中着色剂选自 4-氯-1-萘酚、二氨基联苯胺、氨乙基咔唑、2,2'-连氨基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)、邻-苯二胺和 N-四甲基联苯胺。
16. 一种通过测量孕妇羊水样品中基质金属蛋白酶-8 的水平产前诊断早产、胎儿感染和胎儿损伤的诊断试剂盒，其包含权利要求 9 的诊断剂。
- 15 17. 如权利要求 16 中所述的诊断试剂盒，其中试剂盒还包含标准的基质金属蛋白酶-8、基质、分析缓冲剂、连接产色素酶-或荧光化合物的次级抗体，和粘着平板覆盖物。

产前诊断早产、胎儿感染和胎儿损伤的诊断剂及含有它们的诊断试剂盒

5

发明领域

本发明涉及一种产前诊断早产、胎儿感染和胎儿损伤的诊断剂体系，
和一种利用该试剂的诊断试剂盒，更具体地，涉及羊水基质金属蛋白酶-
8 (MMP-8) 浓度作为早产、胎儿感染和胎儿损伤的产前诊断标记的应
10 用。

发明背景

在医学界很久以来就公认对早产或胎膜早熟破裂的预防比其出生后的
治疗更有意义。然而，目前已知很多因素引起早产或胎膜早熟破裂，
15 使得难以预防这种不希望的事件。传统预防早产的方法是鉴定高危群的
妇女，基于产科学和妇产科学、人口统计学和各种综合征的知识，应对
她们特别关注 (Main 等, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 151: 892-898, 1985)。然
而，该方法具有既不灵敏又不特异的问题。为防止该问题，大量的研究
针对于寻找生化标记来预测即将发生的早产和胎膜早熟破裂，使得血浆
20 雌二醇-17 β ，孕酮，C-反应性蛋白成为有前途的候选物。然而，发现这
些候选物的精确度很差。

除了这类生化预测标记外，如对胎膜早熟破裂的研究所揭示，基于
绒毛膜由纤维结缔组织组成和纤维结缔组织抗张强度由它的胶原含量确定
的事实，已有效关注胶原的生化作用。基于他们的发现，即与正常膜相
25 比，早熟破裂的胎膜具有低的胶原含量，一些科学家推断胎膜的早熟破
裂归因于比正常胎膜低的抗张强度 (*Obstet. Gynecol.*, 57:487-89, 1981)。
根据另一项研究，报道了在早熟破裂的胎膜和早产中胶原酶的血清活性
是高的 (*Obstet. Gynecol.*, 75:84-88, 1990)。然而，尚未阐明这种生化变
化的精确机制 (*FEBBS Letters*, 244(2):315-318, 1989)。

在统计学上，估计妊娠37周前早产的频率为约8-10%。在韩国，每年约50,000个婴儿早产。早产通常引起一系列的新生儿并发症，包括脓毒症，呼吸窘迫综合征，肺炎，支气管肺发育异常，脑室内出血，坏死性小肠结肠炎和大脑性麻痹。越早早产，这种后遗症的频率就越高，严重性就越大。

因此，如果能防止早产，则可能显著降低被这类疾病致残的早产儿的诞生。

近来的报道揭示至少30-40%的早产与子宫内感染有关（Butler NR., Bonham DG., Prenatal mortality. The first report of the British perinatal mortality survey, Edinburgh, Churchill Livingstone, 115-145, 1963 ; Romero R., Avila C., Sepulveda W., Preterm birth. Cause, prevention, and management., McGraw-Hill Company, 97-136, 1993; Romero R., Mazor M., Clin. Obstet. Gynecol., 31: 553, 1990; Gibbs RS., Romero R., Hiller SL., 等, Am. J. Obstet. Gynecol., 166: 1515, 1992)。

子宫内感染可通过下述过程对胎儿造成伤害。子宫内感染活化了母体和胎儿的免疫系统，以分泌炎性介质，如来自淋巴细胞的细胞因子和来自中性粒细胞的MMP（基质-金属蛋白酶）。当炎性介质达到一定水平时，促进子宫收缩的前列腺素就产生了，其引起导致早产的主动分娩。另外，升高的炎性介质水平导致胎儿受到胎儿炎性反应综合征（FIRS）的侵袭。由于成年人的自身免疫性疾病，炎性介质引起脓毒症或急性呼吸窘迫综合征或损害器官，同样，胎儿的全身器官被炎性介质伤害，导致脑白质损伤和支气管发育异常。因此，炎性介质的产前诊断对于预防早产和胎儿损伤是必需的。

通常，当前使用的子宫内胎儿感染的产前诊断方法是cordocentesis—即测量胎儿的血细胞因子水平，和脐带的组织检查以鉴定脐带炎（funisitis）。然而，由于它的侵袭力，cordocentesis的应用受到限制，并且脐带炎仅能在分娩后诊断（Yoon BH., Romero R., Park JS., Kim CJ., Choi JH., Han TR., Am. J. Obstet. Gynecol., 182 : 675-81, 2000; Yoon BH., Romero R., Kim KS., Park JS., Ki SH., Kim BI., Jun JK., Am. J. Obstet. Gynecol., 181: 773-9,1999; Romero R., Gomez R., Ghezzi F., Yoon BH.,

Mazor M., Edwin SS., Berry SM., Am. J. Obstet. Gynecol., 179: 186-93,1998)。

当感染或羊膜腔发炎时，羊水当中的白细胞数增加。羊水当中的中性粒细胞被认为是来源于胎儿的（Knauper V., Kramer S., Reinke H., Tschesche H., Eur. J. Biochem., 189: 295-300, 1990; Blaser J., Triebel S., Massjosthusmann U., Romisch J., Krahl-Mateblowski U., Freudenberg W., Fricke R., Tschesche H., Clinic. Chim. Acta., 244: 17-33, 1996; Segura-Valdez L., Pardo A., Gaxiola M., Uhal BD., Becerril C., Selman M., Chest., 117: 684-94, 2000; Romanelli R., Mancini S., Laschinger C., Overall CM., Sodex J., MaCulloch CA., Infect. Immun., 67: 2319-26, 1999; Maymon E., Romero R., Pacora P., Gomez R., Athayde N., Edwin S., Yoon BH., Am. J. Obstet. Gynecol., 183: 94-9, 2000)。因此，推定羊水中中性粒细胞的分泌产物可能反映了胎儿炎性反应。在本发明中，关注羊水中MMP-8的水平。羊水中MMP-8的测定可以是胎儿炎性反应综合征的标记，该综合征目前可通过分娩后脐带的组织学检查或用cordocentesis测定胎儿血细胞因子来诊断。

MMP（基质金属蛋白酶）系列，也全体被称为matrixin，是依赖锌的内肽酶，它们负责降解胞外基质蛋白。这些蛋白酶组成一个大且增长的蛋白家族，这些蛋白具有相似的结构和酶性质。MMP被广泛分为五组。连同MMP-1和MMP-13一起，MMP-8属于间质胶原酶组。MMP-8在大小上与其它间质胶原酶相似，但在很大程度上被糖基化。当完全糖基化时，MMP-8的酶原形式具有85 kDa的分子量。酶原去掉15-25 kDa片段转化成60-70 kDa的活性形式。原MMP-8在体外被各种蛋白酶激活，包括胰岛素，胰凝乳蛋白酶和组织蛋白酶G。同样发现有机汞制剂化合物也激活原MMP-8。尚未完全阐明MMP-8的体内活化机制。

涉及MMP-8的现有技术存在于美国专利号5,736,341中，其公开了基于对MMP-8的单克隆抗体，能敏感且特异地诊断牙周疾病的方法和测试试剂盒。在该专利中描述了在口腔中MMP-8水平的测量能定点特异诊断牙周炎，因为MMP-8与牙周炎发展过程中牙周结缔组织的破坏直接相关，并且通过含龈缝液的龈袋扩散到口腔中。为了特异且敏感地生化检

测发展中的牙周疾病，这些方法测量MMP-8的原形式到活性形式的转换，这是因为所述转换发生在牙周感染过程中。没有提及MMP-8关于早产和胎儿感染和损伤的应用。

5 美国专利号5,641,636引用了一种基于另一种基质胶原酶MMP-9的活性，预测胎膜破裂的方法，所述MMP-9与MMP-8属于不同的组别。MMP-9是92-kDa IV型胶原酶/明胶酶或MMP中具有最大分子量的明胶酶B。关于活化，MMP-9的酶原形式即原MMP-9最初被切割成约83 kDa的中间活性形式，伴随9 kDa的非活性切割片段产物。该中间活性形式被进一步蛋白裂解处理成67 kDa MMP-9的活性形式（J. Biol. Chem., 267 (30): 21712-10 21719, 1992）。MMP-9的活性形式表示转换成83 kDa的中间活性形式或具有明胶降解活性的67 kDa的完全活性形式。该专利测量了MMP-9降解变性的胶原如明胶的水解活性，以诊断胎膜的过早破裂。然而，由于在分娩前，MMP-9已存在于羊水中，该方法在预测胎膜早熟破裂方面具有有限的价值。

15 约30-40%的早产(preterm labour)或胎膜早熟破裂的患者经历了早产(preterm delivery)。在这种情形下，已知各种物质在羊水中以增加的水平存在，所述物质包括白细胞介素-6，白细胞介素-8，TNF- α ，白细胞介素-1 β ，GRO α ，RANTES，白细胞，MIP-1 α ，MCP-1，葡萄糖，PGE₂，和血管生成素。然而，这些物质很少用于预测早产，因为它们的水平保持20 不变或在无早产临床信号的孕妇羊水中检测不到，并且仅在早产发作或过早胎膜破裂后才增加。

发明概述

25 本发明人对预测早产、胎儿感染和胎儿损伤进行了集中彻底的研究，以通过测定胎儿血细胞因子克服cordocentesis的侵袭力问题和通过脐带的组织学检查克服脐带炎的分娩后鉴定问题，结果发现在无早产或早产的胎膜早熟破裂的临床信号的妇女以及具有这类信号的妇女羊水中检测到了MMP-8的活性，这使得能够开发能诊断早产，胎儿感染和胎儿损伤的方法和试剂盒。

30 因此，本发明的一个目的是提供一种在具有或不具有早产或胎膜早

熟破裂的临床信号的孕妇中产前诊断早产，胎儿感染和胎儿损伤的方法和试剂盒，从而可预防新生儿疾病和一系列并发症或后遗症，如脑性麻痹。

作为本发明的一个要素，提供了一种通过测量在具有或不具有早产或胎膜早熟破裂的临床信号的孕妇羊水中MMP-8的水平来产前诊断早产，胎儿感染和胎儿损伤的方法。

作为本发明的另一个要素，提供了一种产前诊断早产，胎儿感染和胎儿损伤的诊断剂体系和试剂盒。

10 附图简述

图1表示在自发早产患者和自发足月分娩的患者中羊水MMP-8和IL-6浓度的分布。

图2表示接收器运行特征曲线，其中灵敏度对特异性绘制曲线，以选择在鉴定自发早产过程中羊水MMP-8的边界值(cutoff value)。

15 图3表示在具有和不具有脐带炎的患者中羊水MMP-8浓度的分布。

图4表示接收器运行特征曲线，其中灵敏度对特异性绘制曲线，以选择在鉴定脐带炎过程中MMP-8的边界值。

图5表示在具有或不具有产前发育的脑性麻痹的患者中羊水MMP-8浓度的分布。

20 图6表示接收器运行特征曲线，其中灵敏度对特异性绘制曲线，以选择在鉴定产前发育的脑性麻痹过程中MMP-8的边界值。

发明详述

在一个实施方案中，本发明涉及测定羊水中MMP-8的活性，从而产前诊断早产，胎儿感染和胎儿损伤。

由于降解胞外基质蛋白的活性，MMP-8是依赖锌的内肽酶。属于间质胶原酶组，MMP-8可以酶原形式（原MMP-8）从嗜中性白细胞中纯化。原MMP-8分子量约85 kDa，被高度糖基化。依赖于活化的形式，酶原的活化通过切割酶原分子来实现，这产生了分子量在60-70 kDa变化的活性胶原酶。体内活化的机制可能涉及反应性氧和氧化剂如羟基。当去除了

原胶原酶的N-末端片段时，产生并暴露了酶的活性位点。

MMP-8以酶原形式（原MMP-8）由嗜中性白细胞产生。原MMP-8以便于贮藏的颗粒形式存在，并且响应于刺激而被分泌。分泌的原MMP-8在胞外间质组织中被活化并降解I，II和III型胶原，其对I型胶原具有高度的特异性。已知作为炎症相关的组织损伤的一种重要介质，在由炎性疾病引起的组织损伤中涉及该酶，所述炎性疾病如牙周炎，慢性阻塞性肺疾病，类风湿性关节炎等。另外，已知MMP-8通过引起子宫颈的消失和扩张而在分娩过程中被涉及。

基于这个发现，即在具有和不具有早产或胎膜早熟破裂的临床信号的妇女中，升高的MMP-8中期-三个月期羊水浓度高度预示着早产，本发明人开发了一种早产、胎儿感染和胎儿损伤的产前诊断方法。

根据本发明的一个实施方案，提供了一种早产、胎儿感染和胎儿损伤的产前诊断方法，其包含下述步骤：

- 1) 取孕妇的羊水样品；和
- 2) 定量测量羊水样品中的MMP-8。

不仅能对具有早产或胎膜早熟破裂的临床信号的妇女，而且能对不具有这类临床信号的妇女进行早产诊断。

通过在超声波扫描指导下经腹壁羊膜穿刺或用其它取样方法可获得羊水样品。为了定量测定羊水中MMP-8水平，如果基于抗原-抗体偶联，可使用任何分析方法，优选ELISA（酶联免疫吸附试验）。

为确定是否MMP-8是预测怀孕中期早产的有效临床指示剂，在患者中比较MMP-8与另一种炎症的有效指示剂IL-6的羊水浓度，所述患者不具有任何即将早产的临床信号在妊娠32周前自发早产或中期-三个月期(mid-trimester)羊膜穿刺后足月产。在那些早产患者中，MMP-8和IL-6的羊水浓度明显较高。如图1所示，羊水MMP-8浓度高于23 ng/ml的患者89%自发分娩。另外，统计学比较证实在预测早产的灵敏度和特异性方面MMP-8优于IL-6。考虑到灵敏度、特异性和总体优势率，选择23 ng/ml的羊水MMP-8水平作为适于预测早产的边界值。

高于边界值的升高的中期-三个月羊水MMP-8浓度表示妊娠32周前非常容易早产。因此，当在怀孕中期进行遗传羊膜穿刺时，定量羊水MMP-8

水平有助于鉴定可能早产的患者。

为证明MMP-8作为胎儿感染和胎儿损伤的临床预测剂的有效性，用采自连续患者的羊水培养需氧和厌氧菌和支原体，所述患者在羊膜穿刺72小时内分娩早产的单胎婴儿（妊娠期<36周），并用ELISA确定羊水MMP-8浓度。分娩后进行血浆的组织学检测。观察到阳性羊水培养物的患者MMP-8浓度明显高于阴性羊水培养物患者MMP-8浓度。同样，存在组织绒毛膜羊膜炎的血浆具有明显高于缺乏组织绒毛膜羊膜炎的血浆的羊水MMP-8水平（参见表1-4的数据）。

从这些结果，可以推断微生物感染羊水导致羊水MMP-8水平明显增加，对它的定量可诊断子宫内的感染。关于组织绒毛膜羊膜炎，它还导致羊水MMP-8水平的显著增加，使得羊水MMP-8水平的测定可反应子宫内感染。结果，MMP-8可用作子宫内感染和炎症以及早产的产前诊断的有效临床预测剂。尤其是，羊水MMP-8水平的定量可以较高的特异性和阳性预测值来诊断子宫内炎症。

为了直接诊断胎儿感染，根据存在或不存在脐带炎来比较MMP-8的羊水浓度。

胎儿炎性反应综合征（FIRS）是与即将的早产和不利的新生儿结果相关的多系统疾病。被看作是FIRS的组织学对应物，脐带炎（funisitis）已与脑性麻痹发展的增加的风险相关。在羊膜腔中的中性粒细胞是来源于胎儿的。基于这些发现，推测中性粒细胞的分泌产物可能是FIRS的指数。为检验这种推测，研究羊水基质金属蛋白酶-8（MMP-8）与脐带炎的关系。在存在脐带炎的情况下，观察到MMP-8浓度明显高于不具有脐带炎的情况。在鉴定脐带炎过程中MMP-8的诊断指数在灵敏度、特异性和阴性预测值方面是高的（参见表5和6，图3和4）。

从这些结果，发现在羊水MMP-8浓度和胎儿炎症（脐带炎）之间有强烈的相关性。因此，本发明建议对羊水MMP-8浓度的评估可有助于诊断胎儿感染，而不需常规的侵袭性的胎血取样。

由于羊水MMP-8浓度和胎儿感染之间的相关性，本发明人研究了羊水MMP-8浓度和新生儿疾病之间的关系，所述疾病包括新生儿脓毒症，呼吸窘迫综合征，肺炎，支气管肺发育异常，坏死性小肠结肠炎，和心

室内出血。在发病的新生儿中MMP-8浓度明显高于非发病的新生儿（参见表7）。在新生儿疾病鉴定过程中MMP-8的诊断指数在特异性、阳性和阴性预测值方面是优异的（参见表7和8）。另外，分娩患有新生儿脓毒症的婴儿的患者羊水MMP-8浓度明显高于分娩不患有新生儿脓毒症的婴儿的患者（ $P < 0.05$ ）（参见表9）。

综合的数据证实羊水MMP-8浓度在预测新生儿脓毒症和围生期疾病中可用作诊断标记。

在脑性麻痹的病因学中涉及子宫内感染或炎症。认为FIRS在足月和早产儿出生过程中引起胎儿大脑损伤。在感染的情况下，中性粒细胞是最频繁补充到羊水细胞，并且认为它们是来源于胎儿的。如在下述实施例2和3中所证实，发现在子宫内感染和/或炎症情况下，MMP-8，一种由活化的中性粒细胞分泌的酶，其羊水水平明显较高。基于这个背景，进行一种检验以确定是否在羊水中增加浓度的基质金属蛋白酶-8（MMP-8）与三岁时脑性麻痹的发展有关。

与新生儿患脑性麻痹的患者相比，从新生儿患脑性麻痹的患者中采样的羊水中，观察到明显较高水平的MMP-8（参见图5），证实MMP-8作为预测脑性麻痹的诊断标记是很有用的（参见图5和6，表11）。

我们可以看出升高的羊水MMP-8浓度与高于6倍几率患脑性麻痹相关。即，羊水MMP-8浓度可用作预测脑性麻痹的产前诊断标记。

广泛的研究后，选择了鉴定早产、胎儿感染和胎儿损伤的羊水MMP-8的边界值。在这点上，当羊水MMP-8的边界值高于5-100 ng/ml，优选高于10-50 ng/ml时，该孕妇被鉴定为处于早产，新生儿疾病，胎儿感染（脐带炎）和脑性麻痹的危险中。

基于羊水MMP-8浓度作为鉴定早产、胎儿感染和胎儿损伤的诊断标记的有用性，可开发诊断早产，胎儿感染和胎儿损伤的试剂体系。

因此，在本发明的另一个实施方案中，提供了一种鉴定早产，胎儿感染和胎儿损伤的诊断剂体系，这基于羊水MMP-8浓度的定量。详细地说，诊断剂体系利用包含下述步骤的分析机制：

- 1) 在基质上吸附初级MMP-8抗体，
- 2) 在存在羊水的条件下孵育吸附到基质上的MMP-8抗体，并洗涤基

质以去除未结合的抗原，

3) 将次级产色素的酶-或荧光-连接的抗体与结合到初级抗体上的MMP-8相偶联，其中所述初级抗体吸附到基质上，和

4) 通过使用着色剂在基质上进行显色反应，定量分析结合抗体的MMP-8的量。

用于步骤1的基质的实例包括硝酸纤维素膜，96-孔聚乙烯树脂培养板，96-孔聚苯乙烯树脂培养板和载玻片。

为了定量分析，将与结合到初级抗体的MMP-8偶联的次级抗体连接一种产色素酶，如过氧化物酶、碱性磷酸酶、和生物素，或一种荧光剂如FITC（异硫氰酸荧光素）和TRITC。

着色剂可选自4CN（4-氯-1-萘酚），DAB（二氨基联苯胺），AEC（氨基乙基吡唑），ABTS（2,2'-连氮基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)），OPD（邻-苯二胺）和TMB（N-四甲基联苯胺）。

原则上，诊断是基于羊水MMP-8浓度的量化，它利用MMP-8与它的抗体的反应。在这个关系中，单克隆或多克隆抗-MMP-8抗体被固定在固体基质上并与样品中的MMP-8反应，然后洗涤基质以去除未结合的抗体和MMP-8。然后，连接了酶或荧光剂的次级抗体或多克隆抗体与固定的MMP-8结合。辣根过氧化物酶多克隆抗体，或生物素化的兔多克隆或单克隆抗体通常用作次级抗体。在存在过氧化物和着色剂的条件下进行显色反应以目视显色。加入酸终止显色反应，然后在450 nm测量吸光度。

基于这个诊断机制，可建立使用相同诊断剂体系的诊断试剂盒。

因此，在本发明的另一个实施方案中，提供了鉴定和预测早产、胎儿感染和胎儿损伤的诊断试剂盒。借助于诊断试剂盒，可方便地在数量上或在质量上评估早产或胎膜早熟破裂。为了分析MMP-8抗原，通过使用金或胶体颗粒与抗MMP-8抗体偶联制备标记抗体。MMP-8的标记抗体与MMP-8结合以形成免疫复合物。该免疫复合物再与MMP-8抗体反应，然后加入通常由尿素等组成的过量标记抗体的洗液。当MMP-8浓度超过一定水平时，肉眼可见阳性结果。这种诊断试剂盒可包含抗-MMP-8抗体，标准MMP-8，基质，分析缓冲剂，产色素酶-或荧光标记的次级抗体，和粘着平板覆盖物。

备选地，本发明的诊断试剂盒可采用利用生物微芯片的自动分析方法。例如，可建立一个诊断试剂盒以进行利用抗MMP-8抗体包被的载玻片的免疫印迹。这个诊断试剂盒可包含生物微芯片，在其表面固定了抗MMP-8抗体，适当的缓冲剂，标准MMP-8和次级抗体。

5

实施例

根据下述实施例可更好地理解本发明，所述实施例是用来解释，而不应被解释为限制本发明。

实施例1：选择早产产前诊断的诊断边界值

10 充分的证据表示在早产的病因学中存在慢性子宫内感染。在本实施例中，进行一个试验以确定是否MMP-8和白细胞介素-6（IL-6）的羊水浓度可用来鉴定在无早产的临床信号的孕妇中易于自发早产的患者。

因此，用保存的羊水设计一个病例对照研究，所述羊水获自在中期-三个月期遗传羊膜穿刺的妇女。在19位妊娠32周前自发早产的患者中和95
15 位足月分娩正常婴儿的对照病例中用ELISA确定MMP-8和IL-6的羊水水平。在本分析中排除具有异常胎儿核型和严重畸形的病例。

自发早产的中值羊水MMP-8浓度为3.1 [0.3-1954.9] ng/ml，而在对照病例中水平为1.3 [<0.3-45.2] ng/ml。自发早产的患者中值羊水IL-6浓度为0.32 [0.04-2.52] ng/ml，而对照病例中水平为0.18 [0.01-1.81] ng/ml。采自
20 自发早产患者怀孕中期羊水的MMP-8和IL-6浓度明显高于足月分娩的对照病例（ $p < 0.01$ ），如图1所示。

评估了患者和对照病例MMP-8浓度后，当怀孕中期羊水MMP-8浓度高于23 ng/ml，则89%的调查病例自发早产。

另外，如图2所示，在遗传羊膜穿刺后，鉴定早产患者过程中，怀孕
25 中期23 ng/ml的羊水MMP-8边界值表现42% (8/19)的灵敏度和99% (94/95)的特异性，而0.6 ng/ml的IL-6边界值表现42% (8/19)的灵敏度和92% (87/95)的特异性。因此，在鉴定和预测早产的灵敏度、特异性和优势率方面MMP-8优于IL-6。结果，选择23 ng/ml的羊水MMP-8浓度作为鉴定早产的边界值。

30

实施例2: MMP-8的羊水浓度与子宫内感染和炎症之间的关系

在存在或不存在子宫内感染和炎症的情况下, 检查MMP-8的羊水浓度, 以确定是否羊水MMP-8浓度可用作鉴定子宫内感染和胎儿损伤的诊断标记。

5 在这点上, 在汉城国立大学医院(Seoul National University Hospital) (汉城, 韩国) 对255位连续的患者进行检查, 所述患者在羊膜穿刺72小时内分娩早产单胎婴儿 (妊娠期<36周)。羊水用来测量MMP-8水平, 以及用来培养需氧和厌氧菌和支原体。另外, 进行胎盘的组织学检查。在超声波扫描指导下, 通过经腹壁羊膜穿刺重新获得羊水。

10 2-1: 羊水培养

通过经腹壁羊膜穿刺重新获得羊水后, 立即将羊水置于带盖的无菌塑料管中, 并保存于此直至在厌氧性或需氧性培养基中培养。培养需氧或厌氧菌使用的是血琼脂, McConkey的琼脂, Bactec 6A管瓶, 巯基乙酸培养基, 布鲁氏菌血琼脂, 鲜肉提取物和补充以马血清、青霉素、多粘
15 菌素B和两性霉素B的类胸膜肺炎微生物肉汤。Mycotrim GU用于培养支原体。

2-2: 测量羊水MMP-8浓度

于700×g离心羊水样品10分钟。上清液用于测量羊水MMP-8浓度, 所述测量是用两个结合非重叠表位的单克隆抗体的ELISA (Amersham
20 Pharmacia Biotech, 英国) 进行。

2-3: 胎盘的组织学检查

分娩时胎盘完全取出后, 将切离自脐带的组织、绒毛膜板和胎盘膜在10%福尔马林中固定, 并包埋在石蜡中以制备载玻片。然后, 为了在显微镜下清晰可见, 用苏木精和伊红染色组织片段。将急性子宫内感染
25 定义为在检查胎膜、绒毛膜、蜕膜和绒毛膜板任一处时存在炎性变化。

在255位受试者中, 发现45例具有阳性羊水培养物, 这表示子宫内感染频率为18%。在进行113位患者胎盘的组织学检查时发现具有绒毛膜羊膜炎, 这表示子宫内感染炎症为44%。检测到中值羊水MMP-8浓度在具有阳性细菌羊水培养物的患者中为191.4 ng/ml水平, 在那些具有阴性培养
30 物的患者中为2.7 ng/ml水平。因此, 在子宫内感染患者中, 中值羊水MMP-8

浓度明显高于那些不具有子宫内感染的患者 ($p < 0.001$)。结果示于下表1中。

表1

根据羊水培养物结果，羊水MMP-8浓度

羊水细菌	中值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
阳性	191.4	<0.3-4202.7
阴性	2.7	<0.3-3929.0

5

边界值为23 ng/ml，鉴定阳性羊水培养物的MMP-8诊断指数是优异的：76%的灵敏度和93%的阴性预测值。结果示于下表2中。

表2

对于鉴定阳性羊水培养物，MMP-8的诊断指数

灵敏度	76%
特异性	70%
阳性预测值	35%
阴性预测值	93%

10

胎盘的组织学检查揭示：在存在绒毛膜羊膜炎的情况下，羊水MMP-8的中值浓度为160.9 ng/ml，而在不存在绒毛膜羊膜炎的情况下，为1.0 ng/ml。具有绒毛膜羊膜炎的患者中羊水MMP-8浓度明显高于那些不具有绒毛膜羊膜炎的患者 ($p < 0.001$)。结果示于下表3中。

15 表3

根据子宫内炎症，MMP-8浓度

组织绒毛膜羊膜炎	中值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
存在	160.9	< 0.3-4202.7
不存在	1.0	< 0.3-766.2

20

边界值为23 ng/ml，鉴定子宫内炎症（绒毛膜羊膜炎）的MMP-8诊断指数是优异的：72%的灵敏度，89%的特异性，84%的阳性预测值，和80%的阴性预测值。结果示于下表4中。

表4

鉴定子宫内炎症的诊断指数

灵敏度	72%
特异性	89%
阳性预测值	84%
阴性预测值	80%

实施例3：通过利用MMP-8的羊水浓度诊断脐带炎

- 5 在存在或不存在脐带炎的情况下，测量羊水MMP-8浓度，以确定是否羊水MMP-8浓度可用于直接诊断胎儿感染。

在汉城国立大学医院（汉城，韩国）对255位连续的患者中检查存在脐带炎和MMP-8的羊水浓度之间的关系，所述患者在羊膜穿刺72小时内分娩早产单胎婴儿（妊娠期<36周）。如果存在中性粒细胞渗透到脐血管壁或沃顿胶（Wharton jelly），则诊断为脐带炎。以与实施例2相同的方式进行MMP-8浓度的定量。

10

在59例患者中诊断有脐带炎（脐带炎频率23%）。中值羊水MMP-8浓度在具有脐带炎的患者中为433.7 ng/ml，在那些不具有脐带炎的患者中为1.9 ng/ml。因此，与那些不具有脐带炎的患者相比，具有脐带炎的患者具有明显较高的中值羊水MMP-8浓度（ $p < 0.001$ ）。结果示于下表5和图3中。

15

表5

根据存在或不存在脐带炎，MMP-8浓度

脐带炎	中值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
存在	433.7	1.5-3836.8
不存在	1.9	< 0.3-4202.7

- 20 利用接收器运行特征曲线分析选择脐带炎诊断中羊水分析物的边界值。结果，如图4所示，考虑到诊断脐带炎的灵敏度和阳性预测值，选择23 ng/ml作为MMP-8的边界值。在鉴定脐带炎过程中，MMP-8的诊断指数（边界值23 ng/ml）是优异的：90%的灵敏度，78%的特异性，和96%

的阴性预测值。结果归纳于下表6中。

表6

对于鉴定脐带炎，MMP-8的诊断指数

灵敏度	90% (53/59)
特异性	78% (153/196)
阳性预测值	55% (53/96)
阴性预测值	96% (153/159)

5 实施例4：通过利用羊水MMP-8浓度诊断新生儿疾病

基于脐带炎与增加的新生儿感染相关的并发症的风险有关联的假设，所述并发症例如脓毒症，肺炎，支气管非发育异常，坏死性小肠结肠炎，和心室内出血，比较具有这类新生儿疾病的病例与那些正常病例中羊水MMP-8浓度。

- 10 在汉城国立大学医院（汉城，韩国），对239位连续患者检查存在这类新生儿疾病与MMP-8的羊水浓度之间的关系，所述患者在羊膜穿刺72小时内分娩早产单胎婴儿（妊娠期<36周）。新生儿疾病依据新生儿并发症的发展所定义，所述并发症例如脓毒症，肺炎，支气管肺发育异常，坏死性小肠结肠炎，和心室内出血。在分娩72小时内，在存在阳性血培养物的条件下诊断先天新生儿脓毒症。新生儿呼吸窘迫综合征的诊断需要存在呼吸呼噜声和回缩（retracting），增加的氧需求（ $FiO_2 > 0.4$ ），和无呼吸疾病的其它病因的证据的诊断的放射照相和实验检查结果。在出生7日内，在存在明确的临床和放射检查结果，具有或不具有来自气管吸出物或胸腔管样品的阳性培养物的条件下诊断肺炎。用Bancalari等提议
- 15 的标准诊断支气管肺发育异常：（1）在生命的第一周期间需要间歇性的正压换气，并需要最少3天；（2）慢性呼吸疾病发展的临床信号，其特征
- 20 在于呼吸急促，脉间和肋下缩回，和听诊有罗音，所有持续长于28天；（3）需要多于28天补充氧气以维持 PaO_2 超过50 mmHg；（4）胸部X线照片显示两肺连续的实度股链，其与正常区域相交联，或增加的透明度。在某些病例中，需要尸检来诊断支气管肺发育异常。根据McMenamin等建议
- 25 的体系，将心室内出血划分等级。在存在腹部膨胀和不耐进食至少24小

时，以及X线照射发现肠壁滞留空气、肠破裂，和胎粪阻塞综合征，或通过手术或尸检发现坏死性肠破裂的情况下诊断坏死性小肠结肠炎。以与实施例2相同的方式进行羊水MMP-8浓度的定量。

239位受试者的107个婴儿（频率45%）诊断患有新生儿疾病。在不
5 存在严重新生儿疾病的情况下，中值羊水MMP-8浓度保持在2.35 ng/ml水平，而在存在严重新生儿疾病的情况下，观察到明显较高的MMP-8浓度（160.9 ng/ml）（ $p < 0.001$ ）。详细结果示于下表7中。

表7

根据存在或不存在新生儿疾病，MMP-8的浓度

新生儿疾病	中值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
存在	17.0	< 0.3-4202.7
不存在	2.35	< 0.3-1333.1

10

利用接收器运行特征曲线选择在诊断新生儿疾病中羊水分析物的边界值。结果，考虑到诊断新生儿疾病的灵敏度和阳性预测值，选择23 ng/ml作为MMP-8的边界值。鉴定新生儿疾病的MMP-8的诊断指数（边界值23
15 ng/ml）是优异的：77%的特异性，63%的阳性预测值，65%的阴性预测值。结果归纳于下表8。

表8

对于鉴定新生儿疾病，MMP-8诊断指数

灵敏度	50%
特异性	77%
阳性预测值	63%
阴性预测值	65%

另外，与不存在脓毒症相比（4.4 ng/ml），存在脓毒症的情况下中值
20 羊水MMP-8浓度明显较高（208.95 ng/ml）（ $p < 0.05$ ）。详细结果示于下表9中。

表9

根据存在或不存在新生儿脓毒症，MMP-8的浓度

新生儿脓毒症	中值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
存在	208.95	2.4-1568.6
不存在	4.4	<0.3-4202.7

在鉴定新生儿脓毒症过程中，MMP-8（边界值23 ng/ml）的诊断指数是优异的：67%的灵敏度，66%的特异性，和99%的阴性预测值。结果归纳于下表10中。

5 表10

对于鉴定新生儿脓毒症，MMP-8的诊断指数

灵敏度	67%
特异性	66%
阳性预测值	5%
阴性预测值	99%

实施例5：通过利用羊水MMP-8浓度，诊断脑性麻痹

10 在116位早产单胎婴儿（出生时妊娠期<35周）的母亲中检查MMP-8的羊水浓度与脑性麻痹的发展之间的关系，所述母亲经历了羊膜穿刺并被跟踪观察至少3年。在神经发育评估（发育重大事件的异常，依据Vojta方法的体位异常，和反射异常）方面肯定异常和持续肌紧张性异常的情况下，诊断脑性麻痹。

15 在婴儿发展成脑性麻痹的母亲中，其MMP-8的中值羊水浓度明显高于婴儿不发展成脑性麻痹的母亲（中值153.9 [范围< 0.3-1535.9] ng/ml 对中值6.4 [范围 < 0.3-3836.8] ng/ml; $p < 0.01$ ）。发展成脑性麻痹的婴儿比那些不发展成脑性麻痹的婴儿在更早的妊娠期分娩。调整出生时的妊娠期和羊水培养物的结果后，升高浓度的羊水MMP-8显著增加了发展成脑性麻痹的几率（优势率(odds ratio), 6.0; 95%的置信区间, 1.1-33.0; $p <$
20 0.05)。

利用接收器运行特征曲线选择羊水分析物在诊断脑性麻痹中的边界值。结果，考虑到诊断脑性麻痹的灵敏度和阳性预测值，选择23 ng/ml为MMP-8的边界值，如图6所示。在诊断脑性麻痹过程中，MMP-8的诊断

指数是优异的：85%的灵敏度，69%的特异性和97%的阴性预测值。结果归纳于下表11中。

表11

关于脑性麻痹，MMP-8的诊断指数

灵敏度	85%
特异性	69%
阳性预测值	26%
阴性预测值	97%

5

工业适用性

如上文所述，基于羊水MMP-8浓度的量化，提供了诊断剂体系和诊断试剂盒来产前诊断早产，胎儿感染和胎儿损伤。利用与色素形成相偶联的抗原-抗体反应，本发明的诊断剂体系和诊断试剂盒特征在于包含一种或多种抗MMP-8抗体。本发明的诊断剂体系和试剂盒可用于不具有早产或胎膜早熟破裂的临床信号的患者以及具有这类临床信号的患者。由于在灵敏度和特异性方面优于测量胎血细胞因子水平的常规方法，本发明在早产、胎儿感染和胎儿损伤的产前诊断方面是非常有用的。

10

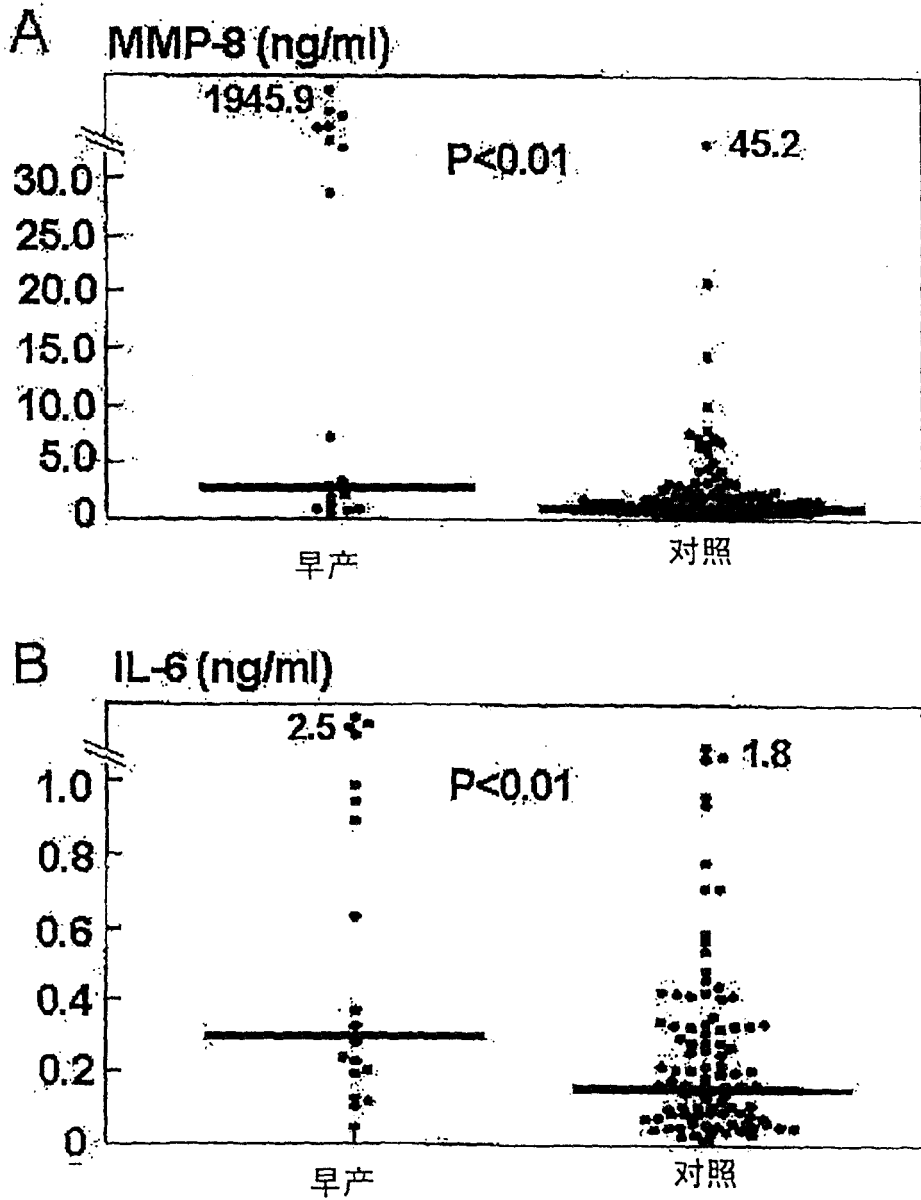


图 1

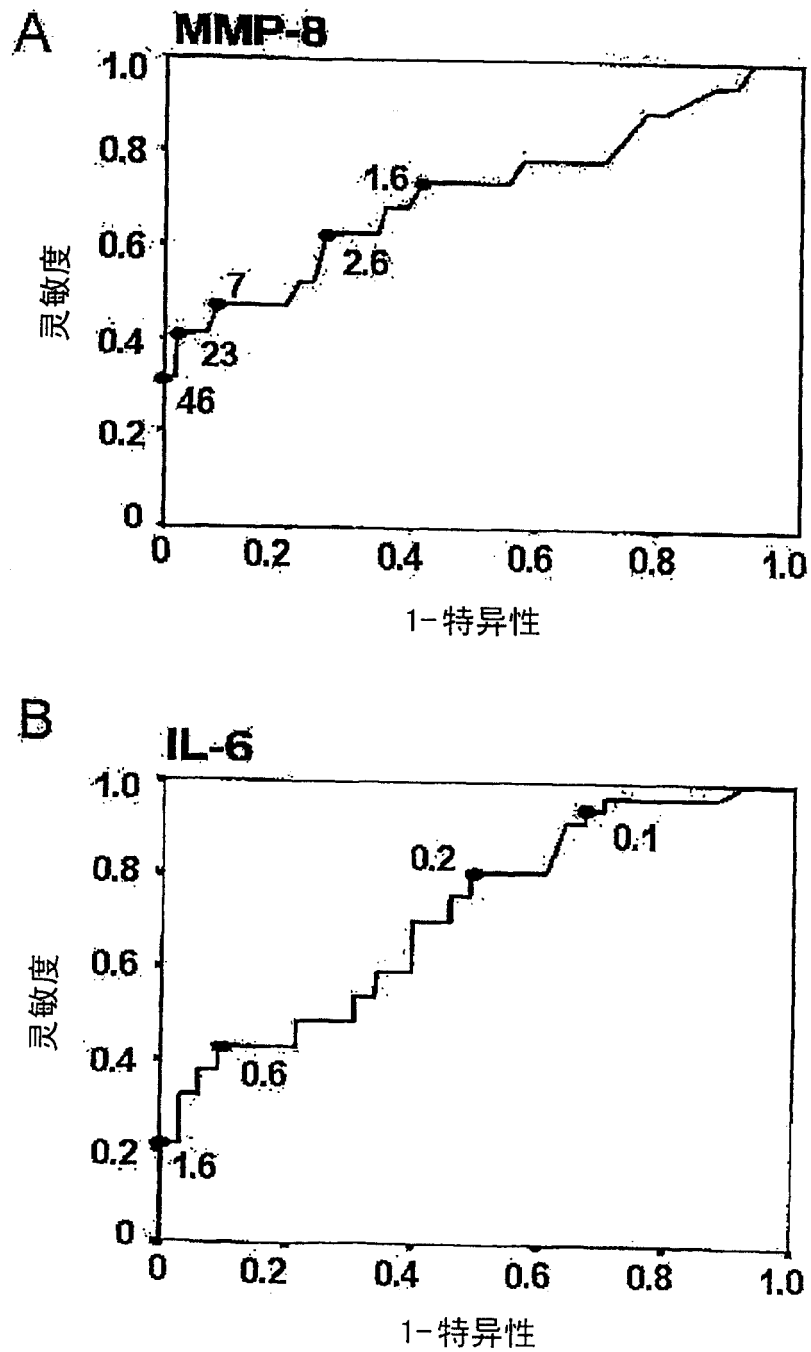


图 2

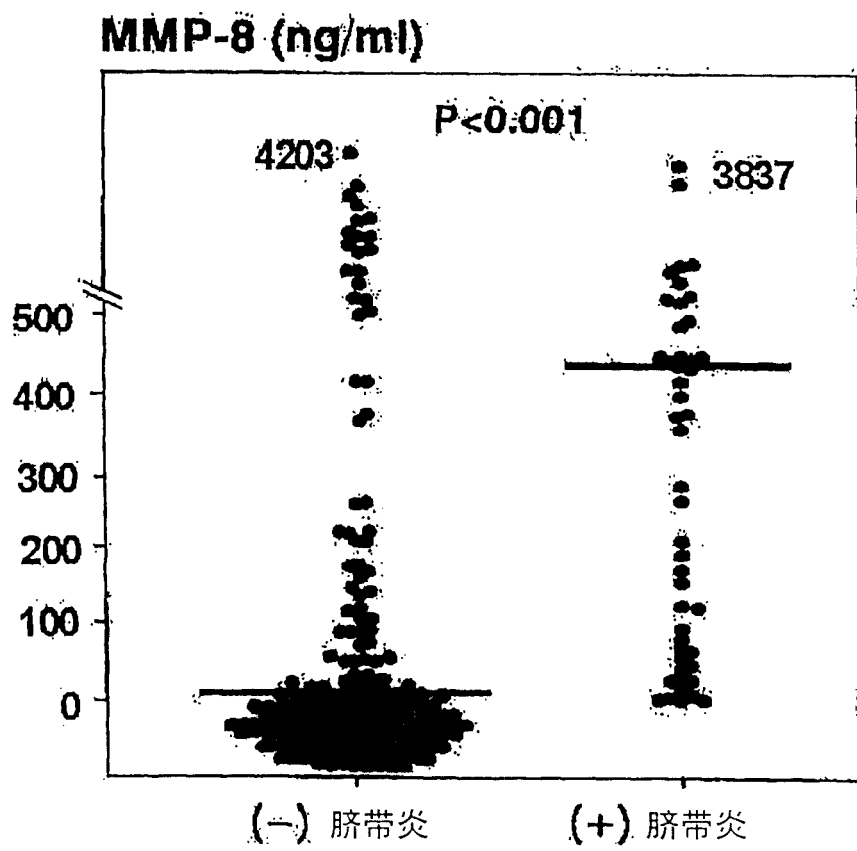


图 3

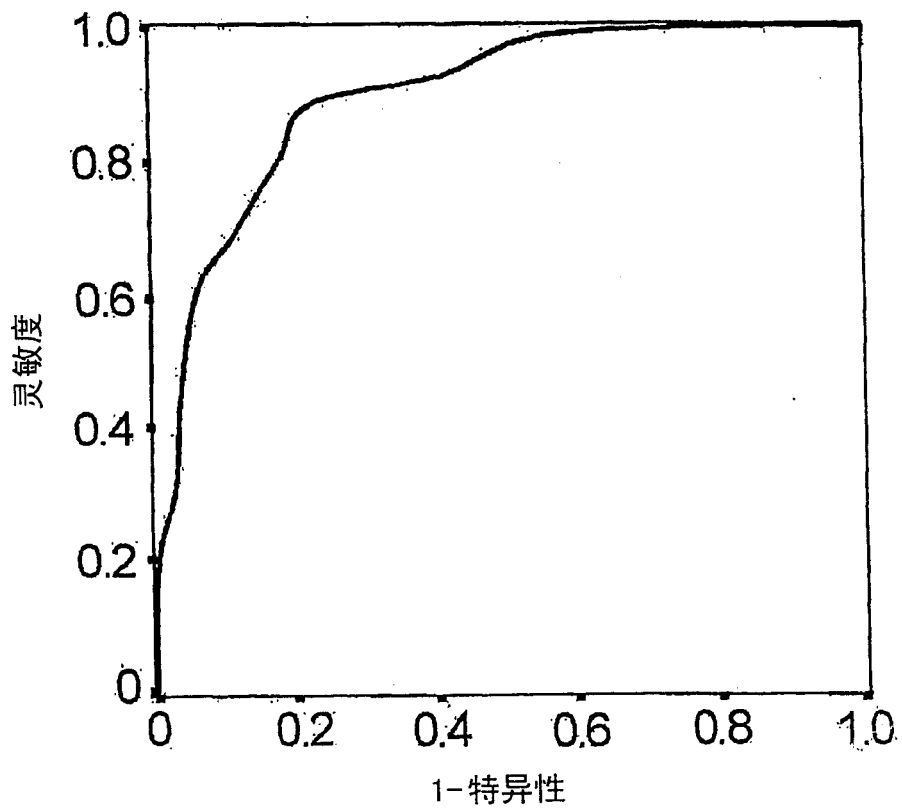


图 4

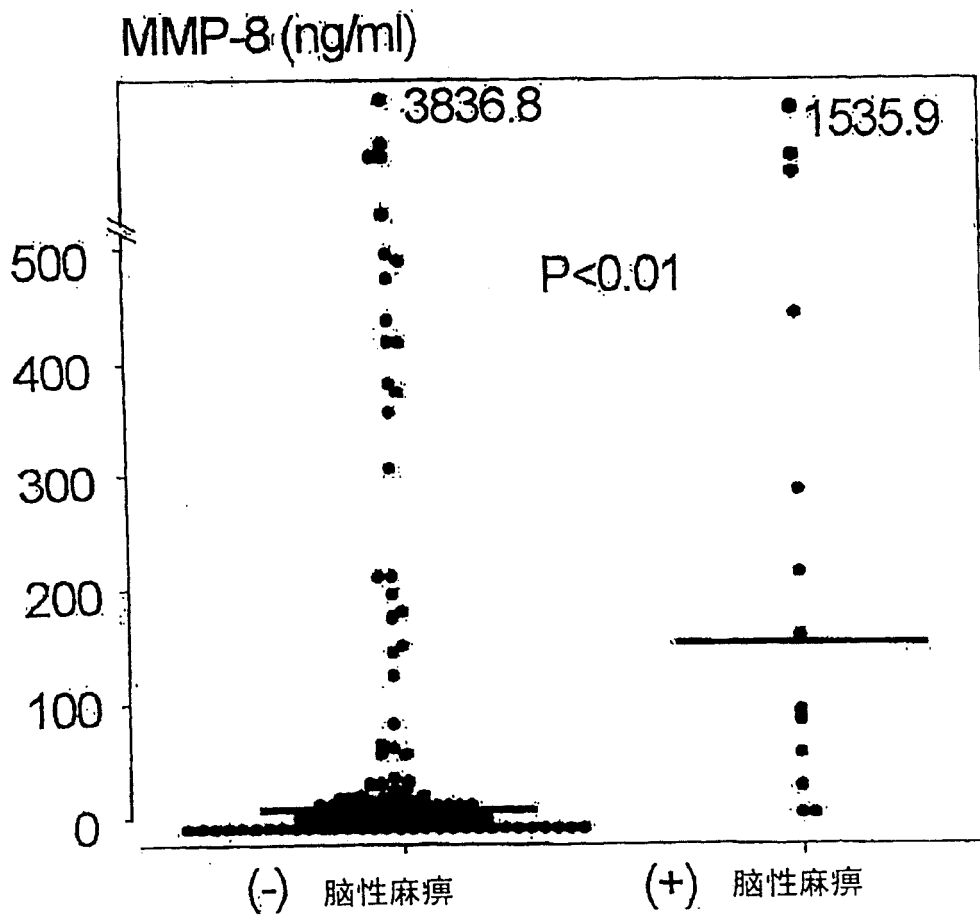


图 5

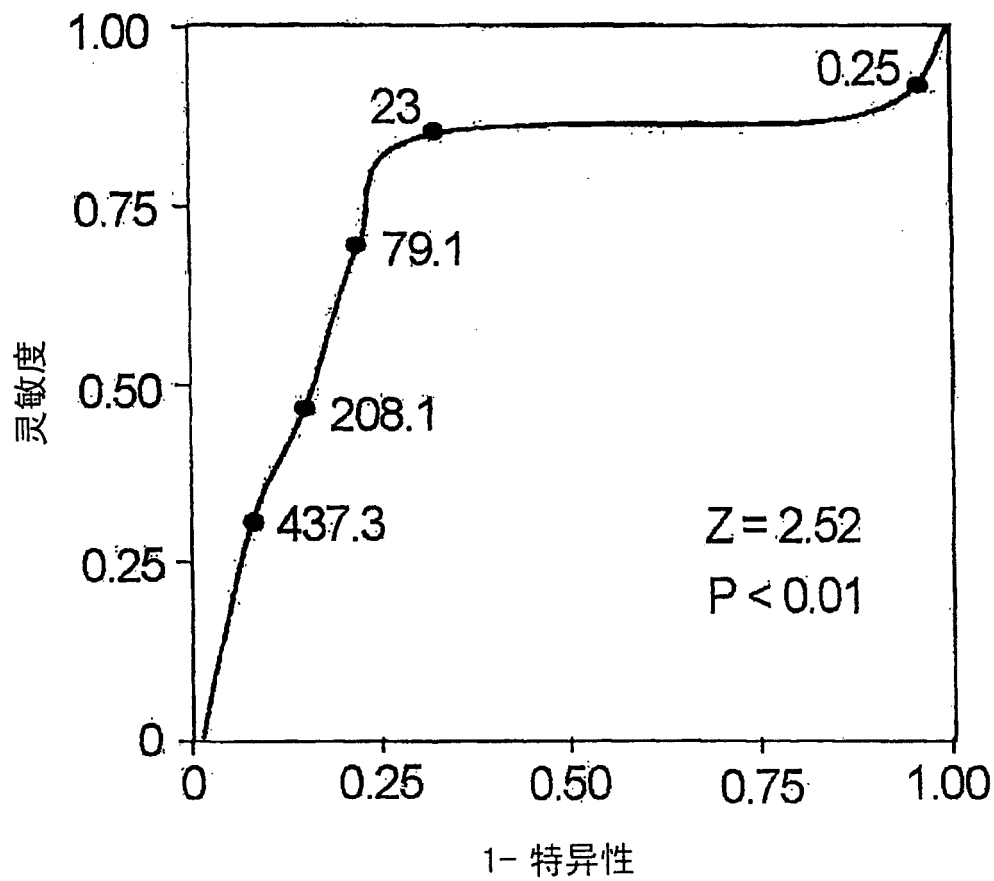


图 6

专利名称(译)	产前诊断早产、胎儿感染和胎儿损伤的诊断剂及含有它们的诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN1245626C	公开(公告)日	2006-03-15
申请号	CN01819269.6	申请日	2001-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人索尔大学校产学协力财团		
申请(专利权)人(译)	财团法人索尔大学校产学协力财团		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人索尔大学校产学协力财团		
[标]发明人	尹保铉		
发明人	尹保铉		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/37 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/552 G01N33/558 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/37 G01N33/689 G01N33/558 G01N2800/368 G01N33/54386 G01N2800/36 G01N2333/96486		
代理人(译)	程金山		
优先权	1020000069283 2000-11-21 KR		
其他公开文献	CN1476537A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种产前诊断早产、胎儿感染和胎儿损伤的方法，和诊断用的诊断剂体系和诊断试剂盒。方法、诊断剂体系和试剂盒是基于这个发现，即当孕妇处于早产、子宫内感染和胎儿损伤的危险中时，羊水中MMP-8的水平明显较高。诊断剂体系和试剂盒可用于不具有以及具有早产或胎膜早熟破裂的临床信号的患者。由于与测量胎血细胞因子水平的常规方法相比，在灵敏度和特异性方面的优势以及它较小的侵袭力，该诊断剂体系和试剂盒在早产、胎儿感染和胎儿损伤的产前诊断方面是非常有用的。

