

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-511790

(P2006-511790A)

(43) 公表日 平成18年4月6日(2006.4.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 1
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	
	GO 1 N 27/62 F	
	GO 1 N 27/62 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2004-552155 (P2004-552155)	(71) 出願人	501497253
(86) (22) 出願日	平成15年11月13日 (2003.11.13)		サイファージェン バイオシステムズ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月4日 (2005.7.4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/036120		5, フレモント, ダンバートン サークル, 6611
(87) 国際公開番号	W02004/043238	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成16年5月27日 (2004.5.27)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/426,096	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成14年11月14日 (2002.11.14)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 羊膜内炎症のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

羊膜内炎症を同定することが可能であるバイオマーカーを発見した。単一のバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせは、少なくとも一つのバイオマーカーが、カルグラヌリン、好ましくはカルグラヌリンAまたはカルグラヌリンCである場合、患者の早産の危険性を認定するために使用され得る。特に、このバイオマーカーの濃度は、羊膜内炎症の規模に関連し、したがって早産に関連する。本発明は、羊水サンプル中の羊膜内炎症を示す少なくとも一つのバイオマーカーの存在を検出するための診断アッセイおよびキットを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

羊水サンプルにおける羊膜内炎症を示す少なくとも一つのバイオマーカの存在を検出するための診断アッセイであって、該診断アッセイは、以下、

(A) 吸着剤を羊水サンプルと混合する工程であって、該吸着剤は、羊膜内炎症に関連する少なくとも一つのバイオマーカに結合する、工程、次いで

(B) 該バイオマーカと該吸着剤との間の結合について該混合物をモニタリングする工程、

を含み、該アッセイが、カルグラヌリンである少なくとも一つのバイオマーカを検出する、診断アッセイ。

10

【請求項 2】

前記吸着剤は、固体基板に固定された抗体である、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

【請求項 3】

E L I S A 法である、請求項 2 に記載の診断アッセイ。

【請求項 4】

前記固体基板は、プローブである、請求項 2 に記載の診断アッセイ。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の診断アッセイであって、前記バイオマーカは、レーザー脱離 / イオン化質量分析法により検出される、診断アッセイ。

【請求項 5】

前記吸着剤は、プローブ上に固定される、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

20

【請求項 6】

前記吸着剤は、疎水性吸着剤である、請求項 5 に記載の診断アッセイ。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の診断アッセイであって、前記プローブは、C i p h e r g e n H 4 プローブまたは C i p h e r g e n H 5 0 プローブである、診断アッセイ。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の診断アッセイであって、該診断アッセイは、羊水の前記サンプル中の少なくとも一つのディフェンシンの存在についてさらに試験する、診断アッセイ。

【請求項 9】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 8 に記載の診断アッセイ。

30

【請求項 10】

請求項 3 に記載の診断アッセイであって、該診断アッセイは、羊水の前記サンプル中の少なくとも一つのディフェンシンの存在についてさらに試験する、診断アッセイ。

【請求項 11】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 10 に記載の診断アッセイ。

【請求項 12】

請求項 5 に記載の診断アッセイであって、該診断アッセイは、羊水の前記サンプル中の少なくとも一つのディフェンシンの存在についてさらに試験する、診断アッセイ。

40

【請求項 13】

請求項 12 に記載の診断アッセイであって、前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、診断アッセイ。

【請求項 14】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A である、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

【請求項 15】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン C である、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

【請求項 16】

羊水サンプル中の羊膜内炎症を示す少なくとも一つのバイオマーカの存在を検出するた

50

めのキットであって、該キットは、以下：

少なくとも一つの吸着剤であって、該吸着剤は、羊膜内炎症に関連する少なくとも一つのバイオマーカーに結合する、吸着剤；ならびに

該吸着剤と羊水サンプルとを混合する工程および該サンプルにおける該吸着剤とバイオマーカーとの間の結合について該混合物をモニタリングする工程についての指示書、を含み、

該キットは、カルグラヌリンを検出する少なくとも一つの吸着剤を含む、キット。

【請求項 17】

前記吸着剤は、固体基板に固定化された抗体である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のキットであって、該キットは、前記固体基板上に固定されたバイオマーカーを検出するために使用される酵素 - 抗体結合体をさらに含む、キット。

【請求項 19】

前記固体基板は、プローブである、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のキットであって、該キットの指示書は、レーザー脱離 / イオン化質量分析法による分析を明細に記す、キット。

【請求項 21】

前記固体基板は、プローブである、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 22】

前記吸着剤は、疎水性吸着剤である、請求項 21 に記載のキット。

【請求項 23】

請求項 22 に記載のキットであって、前記プローブは、C i p h e r g e n H 4 プローブまたは C i p h e r g e n H 5 0 プローブである、キット。

【請求項 24】

請求項 16 に記載のキットであって、該キットは、少なくとも一つのディフェンシンに結合する少なくとも一つの吸着剤をさらに含む、キット。

【請求項 25】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

請求項 18 に記載のキットであって、該キットは、少なくとも一つのディフェンシンに結合する少なくとも一つの吸着剤をさらに含む、キット。

【請求項 27】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 である、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 28】

請求項 20 に記載のキットであって、該キットは、ディフェンシンに結合する少なくとも一つの吸着剤をさらに含む、キット。

【請求項 29】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 28 に記載のキット。

【請求項 30】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 31】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン C である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 32】

妊娠中の患者の早産の危険性を認定するための方法であって、該方法は、少なくとも一つのカルグラヌリンのレベルについて該患者に由来する羊水サンプルを分析する工程を包含する、方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

請求項 3 2 に記載の方法であって、該方法は、前記少なくとも一つのディフェンシンのレベルについて前記サンプルを分析する工程をさらに包含する、方法。

【請求項 3 2】

請求項 3 2 に記載の方法であって、前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、方法。

【請求項 3 3】

請求項 3 1 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、HNP - 1 (- ディフェンシン 1) または HNP - 2 (- ディフェンシン 2) である、方法。

【請求項 3 4】

請求項 3 2 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、HNP - 1 (- ディフェンシン 1) または HNP - 2 (- ディフェンシン 2) である、方法。 10

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、HNP - 1 (- ディフェンシン 1) である、方法。

【請求項 3 6】

妊娠中の患者の早産の危険性を認定する方法であって、該方法は、以下、

(A) 該患者に由来する羊水サンプルを質量分光分析に供することにより生じたスペクトルを提供する工程であって、該質量分光分析は、生物学的または化学的に誘導体化されたアフィニティー表面でプロファイリングする工程を含む、工程、ならびに

(B) パターン認識分析により該スペクトルを配置する工程であって、該パターン認識分析は、該サンプル中のカルグラヌリンの存在を示す少なくとも一つのピークに適合される、工程を、包含する、方法。 20

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記パターン - 認識分析は、ディフェンシンを示す少なくとも一つのピークにさらに適合される、方法。

【請求項 3 8】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、方法。

【請求項 3 9】

請求項 3 7 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、HNP - 1 (- ディフェンシン 1) または HNP - 2 (- ディフェンシン 2) である、方法。 30

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、HNP - 1 (- ディフェンシン 1) である、方法。

【請求項 4 1】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、請求項 4 0 に記載の方法。 40

【請求項 4 3】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記化学的に誘導体化されたアフィニティー表面は、C i p h e r g e n H 4 プローブまたは C i p h e r g e n H 5 0 プローブである、方法。

【請求項 4 4】

前記患者は、正常な範囲外に高められた白血球数を有さない、請求項 3 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

早産は、周産期罹病率および周産期死亡率の主要な原因を引き起こす。毎年およそ4.5百万人の未熟児が、世界中で生まれ、新生児の医療がかなり進歩したにもかかわらず、未熟児の死亡率は未だに高い。さらに、生き残った未熟児は、長期のハンディキャップ（発育遅延脳性麻痺、盲目難聴、および慢性肺疾患が挙げられる）の危険性がある。この早産の社会的重荷は、米国において、出生時体重が900g以下（約27週）の生き残った未熟児1人あたりの平均経費が、彼らの医療および他の支持療法の費用を超えるという事実により明確に示される。従って、早産の予防は、産科医療および周産期医療に対する最も重要な試みである。その限定的な成功は、早産が、感染、脈管疾患、子宮の過剰な拡張、および慢性的なストレスの様な多様な病理のプロセスにより引き起こされる症候群であるという事実の一部起因する。

10

【0002】

子宮内感染は、早産の一般的かつ重要な原因として明らかになっている。子宮内感染は、羊膜腔の微生物の侵襲を有する母親に生じる、全ての早産の少なくとも第三番目の原因である。子宮内感染はしばしば、胎児炎症性反応症候群、分娩の切迫した開始の危険因子、短期新生児の合併症、ならびに長期のハンディキャップ（例えば、脳性麻痺および慢性肺疾患）の発生を伴う胎児の感染を生じる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

感染は早産の原因として関連するという、有力な証拠にもかかわらず、早期分娩の患者の抗生物質処置は、多くの試験において早産または新生児合併症の予防に有効であると証明されていない。有力な説明は、早期分娩を示す多くの患者は、子宮内感染を有さず、そのため抗生物質療法から利益を得られないかもしれないことである。さらに、子宮内感染および胎児の感染自体は、微生物学的に証明された感染の非存在下においてさえ有害な転帰に関連する。従って、無症状子宮内炎症を有する母親の正確なかつ迅速な同定は合理療法の開発よりも急務である。

20

【0004】

現在の証拠は、通常は無菌である羊水の分析が、感染および/または炎症の存在または非存在を決定するための最も正確な手段であることを示す。利用可能な試験は、限定された感度および特異性を有するが、標準的な微生物学的技術（例えば、微生物の培養）の結果は、時間がかかりかつ即時対応の決定に利用できない。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の要旨)

これらおよび他の必要性に取り組むために、本発明は、羊水サンプル中の羊膜内炎症を示す少なくとも一つのバイオマーカーの存在を検出するための診断アッセイおよびキットを提供する。この診断アッセイおよびキットは、(A)羊膜内炎症に関連する少なくとも一つのバイオマーカーに結合する吸着剤と羊水サンプルとを混合し、次いで(B)このバイオマーカーとこの吸着剤との間の結合についてこの混合物をモニタリングする工程を包含する。このアッセイまたはキットは、カルグラヌリン（特にカルグラヌリンA、カルグラヌリンC）である少なくとも一つのバイオマーカーを検出する。一つの実施形態において、この吸着剤は、固体基板に固定された抗体である。抗体を使用するこのアッセイまたはキットは、ELISAであり得、ここで使用される酵素-抗体結合体が、バイオマーカーを検出するために固定基板上に固定されている。いくつかの実施形態において、この吸着剤は、プローブ上に固定され、そしてこのバイオマーカーは、レーザー脱離/イオン化質量分析法により検出される。これらの実施形態において、この吸着剤は好ましくは、疎水性吸着剤、より好ましくは、CIPHERGEN H4プローブまたはCIPHERGEN H50プローブである。好ましい実施形態において、このアッセイおよびキットは、羊水サンプル中の少なくとも一種のディフェンシンの存在について8回さらに試験する

40

50

。特に、このディフェンシンは、HNP - 1 - ディフェンシン 1 または HNP - 2 (- ディフェンシン 2) であり得る。

【0006】

本発明は、妊娠患者における早産の危険性を検定するための方法を提供する。この方法は、患者に由来する羊水サンプルを、少なくとも一つのカルグラヌリンのレベルについて分析する工程からなる。好ましくは、この方法はさらに、少なくとも一つのディフェンシンのレベルについてサンプルを分析する工程を包含する。好ましい実施形態において、このカルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C であり、かつこのディフェンシンは、HNP - 1 (- ディフェンシン 1) または HNP - 2 (- ディフェンシン 2) である。

10

【0007】

本発明はさらに、妊娠患者における早産の危険性を検定するための方法を提供する。この方法は、(A) 患者に由来する羊水サンプルを、生物学的にまたは化学的に誘導されたアフィニティー上におけるプロファイリングを包含する質量分光分析に供することにより生ずるスペクトルを提供する工程、および (B) サンプル中のカルグラヌリンの存在を示す少なくとも一つのピークに適合するパターン - 認識分析によりこのスペクトルを配置する工程を包含する。好ましいこのパターン - 認識分析はさらに、ディフェンシンを示す少なくとも一つのピークに適合する。好ましい実施形態において、このパターン - 認識分析は、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C の少なくとも一つおよび HNP - 1 (- ディフェンシン 1) または HNP - 2 (- ディフェンシン 2) の少なくとも一つに適合する。この好ましいアフィニティー表面は、Ciphergen H4 プローブまたは Ciphergen H50 プローブである。この方法は特に、正常範囲を超えて増加した白血球数を有さない患者における早産の危険性を同定するのに有益である。

20

【0008】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

羊膜内炎症にそれぞれ関連するバイオマーカーが発見された。本文の文脈において、「バイオマーカー」は、有機生体分子であり、特に、羊膜内炎症を有さない「正常な」被験体から得られた比較可能なサンプルと比較した場合、羊膜内炎症を有する被験体から得たサンプル中に差次的に存在する、ポリペプチド、またはタンパク質である。バイオマーカーは、正常な患者のサンプルと比較したとき、羊膜内炎症を有する患者に由来するサンプルにおいて増加したレベルまたは減少したレベルで存在する場合、正常な患者および羊膜内炎症を有する患者に由来するサンプル中にそれぞれ差次的に存在する。

30

【0009】

本発明のバイオマーカーは、羊膜内炎症を同定することが可能である。本発明によると、バイオマーカーの少なくとも一つがカルグラヌリン (好ましくは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C) である場合、単一のバイオマーカーまたはバイオマーカーの組合せ (「バイオマーカープロファイル」) が使用され得る。本発明のバイオマーカーおよびバイオマーカープロファイルが、患者における早産の危険性を検定するために使用され得る。

【0010】

従って、本発明は、迅速かつ確実なプロテオームアプローチを提供し、早産を引きこし得る羊膜内炎症を同定する。これが早期分娩における羊水の初めてのプロテオミクスの特徴付けであり、かつ関連する変化の特徴付けおよび定量的検証を可能とするバイオマーカーの詳細な分析である。特に、バイオマーカーの濃度は、目的の生物学的徴候、すなわち、羊膜内炎症および早期分娩の規模に関連する。

40

【0011】

妊娠第二期の間、胎児の尿および肺の液体は、羊膜腔への二つの主な流入物である。胎児の炎症を併発した妊娠においてはさらに、この羊水は、好中球を含む。この好中球は、ほとんど胎児のものであり、母親起源の好中球ではない。そしてこの流動物中の炎症性媒介物の濃度から、切迫早期分娩および新生児の有害転帰の可能性が、母親の血液からより

50

も良く予測される。

【0012】

本発明のバイオマーカーは、主にディフェンシンおよびカルグラヌリンである。ディフェンシンは、先天性免疫系のタンパク質である。3つの主なヒト好中球ディフェンシン(HNP1~3)は、好中球に特有のファミリーに属し、これらの細胞におけるディフェンシン含有量の99%を占める。HNP-1、HNP-2およびHNP-3は、カチオン性の、トリスルフィド含有殺菌性ペプチドのファミリーに属する。これらディフェンシンの産生および放出は、サイトカインおよび殺菌性産物(例えば、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるリポ多糖類)により誘導される。

【0013】

カルグラヌリンは、タンパク質のS100群のメンバーであり、二つの標準的な(cannonical)EF-ハンド構造モチーフを含むカルシウム結合タンパク質である。カルグラヌリンは、アルツハイマー病、癌、心筋症、乾癬、リウマチ様関節炎、および他の炎症性障害のような疾患に関与し得ることからこれに対する注目が高まった。S100A8(カルグラヌリンA)およびS100A9(カルグラヌリンB)は結合し、ホモ二量体およびヘテロ二量体を形成し得、これら二量体もまた、殺菌性特性を有する。以下により詳細に記載される、本発明者らにより開発されたアプローチは、バイオマーカー(例えば、カルグラヌリンC)の同定を可能にした。カルグラヌリンCは、早期分娩または羊膜内感染において以前に研究されていない。

【0014】

本発明は、羊水のプロテオーム分析を包含し、子宮内炎症の強度(すなわち、白血球数と相関する)および臨床結果(すなわち、妊娠期間とMRスコアとの間の関係(以下に記載))により決定されるように、炎症性の兆候の規模に相関する半定量的な情報を得る。特に、本発明は、特定のディフェンシンおよびカルグラヌリンのパターンの分析に基づいて、早産の予測のための手段を包含する。本発明により同定されたバイオマーカーのプロフィールは、炎症の存在または非存在を確実に示す。このことは、上に記載したように、羊膜内炎症が、早産、未熟児の短期合併症、ならびに脳性麻痺および慢性肺疾患のような長期の疾患(squalea)の危険因子であるため最も重要である。

【0015】

さらに本発明の好ましい実施形態において、このようなプロテオーム分析は、分子微生物学的な技術と組み合わせられて、検出された炎症を引き起こす微生物を検出し、それにより抗菌治療法の選択の情報を与える。すなわち、本発明によるプロテオーム分析は、羊膜内炎症を罹患している患者を同定し得、そして所定の患者に由来する羊水サンプルを、従来の方法で試験し、炎症の原因である病原性微生物を同定し得る。従って、この試験データは、同定した微生物に対しておそらく有効である抗菌性レジメンを決定することに役立つ。

【0016】

本発明による、羊水のプロテオーム分析は、切迫早産の危険がある羊膜内炎症を伴う早期分娩の患者を同定する、迅速、簡単かつ確実な手段を提供する。このように同定された、このコホートの患者は、感染の根絶および/または有害転帰に関連する炎症応答を調節するために、特定の介入について試験するために選択され得る。

【0017】

本発明によるバイオマーカーは、妊娠被験体の二つの群(羊膜内炎症を有する被験体および正常な被験体)に由来する羊水から得られたサンプルの質量スペクトルを比較することにより同定された。この被験体は、標準的な臨床診断により診断された。

【0018】

これら二つのプールは、広範に希釈して使用され、種々のチップ表面を試験した。このチップ表面は、最適の識別可能な実施のために、Ciphergen Biosystems(Fremont, CA)により製造され、逆相H4(C-16長鎖脂肪族残基を伴う疎水性表面); SAX2(強アニオン交換体); WCX2(第四級アンモニウム、弱カ

10

20

30

40

50

チオン交換体；I M A C（カルボキシレート残基）；金属アフィニティーを含む。H 4 チップ表面について、最適化は、アセトニトリル勾配（10%～75%）のさらなる疎水性の洗浄の工程を包含する。リン酸緩衝化生理食塩水（P B S）に10倍に希釈された2 μ lの羊水を、24スポットH 4アレイのスポット上に配置し、乾燥を避けて加湿ボックス内でインキュベートする手順により、個々のピーク検出および低いシグナル対ノイズ（S/N）比のために最適であることが見出された。しかし、以下により詳細に記載されるように、本発明のバイオマーカーの結合に適した結合特性を有する限り他のチップが使用され得る。

【0019】

従って、本発明の一つの局面によると、羊膜内炎症の診断のためのバイオマーカーの検出は、バイオマーカーと吸着剤との間の結合を可能とする条件の下、患者に由来する羊水サンプルとその表面に吸着剤を有する基板とを接触させる工程を含み、次いでガス相イオン分光法（例えば、質量分析法）により吸着剤に結合したバイオマーカーを検出する。この目標のために利用され得る他の検出パラダイムとしては、最適方法（電気化学方法（ポルタンメトリー技術およびアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡、および高周波方法（例えば、多極共鳴分光））が挙げられる。顕微鏡検査（共焦点および非共焦点の両方）に加えて、例示的な最適方法は、蛍光、発光、化学発光、吸光度、リフレクタンス、透過率および複屈折指数または屈折指数の検出である（例えば、表面プラズモン共鳴、偏光解析法、共振ミラー法、回析格子カプラー導波管法または干渉法）。種々のフォーマットにおける免疫アッセイ（例えば、E L I S A）もまた、本発明に基づいて、固体相上に捕捉されたバイオマーカーの検出のために適合され得る（以下を参照）。 10 20

【0020】

本発明において使用するための好ましい質量分析技術は、Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization（SELDI）である（例えば、米国特許第5,719,060号および同上第6,225,047号（共にHutchensおよびYip）に記載される）。ここで、分析物（ここでは、一以上のバイオマーカー）をエネルギー源に提示するプローブの表面は、分析物分子の脱離/イオン化において活性的な役割を果たす。この文脈中「プローブ」は、イオン化およびガス相イオン分光計（例えば、質量分光計）への導入のために、プローブ界面と結合するためおよび分析物をイオン化するエネルギーに提示するために適合されたデバイスをいう。プローブとしては、代表的に、可撓性または剛性の固体基板が挙げられ、これは分析物が、イオン化エネルギーに提示されるサンプル提示表面を有する。 30

【0021】

SELDIの一つのバージョンは、Surface-Enhanced Affinity Captureまたは「SEAC」と呼ばれ、化学選択性表面からなるプローブ（「SELDIプローブ」）の使用を含む。「化学選択性表面」は、「結合部分」または「捕捉試薬」とも呼ばれる吸着剤あるいは、例えば、共有結合または配位共有結合を形成する反応を通して捕捉試薬に結合することが可能である反応部分のいずれかに結合される表面である。

【0022】

本明細書中語句「反応部分」は、捕捉試薬と結合することが可能である化学的部分を示す。エポキシドおよびカルボジイミジゾールは、抗体または細胞レセプターのようなポリペプチド捕捉試薬と共有結合するために有用な反応部分である。ニトリロ酢酸およびイミノジ酢酸は、ヒスチジン含有ペプチドと非共有的に相互作用する金属イオンに結合するためのキレート試薬として機能する有用な反応部分である。「反応表面」は、反応部分が結合される表面である。「吸着剤」または「捕捉試薬」は、本発明のバイオマーカーに結合することが可能である任意の物質であり得る。本発明によれば、SELDIにおいて使用するための適切な吸着剤は、米国特許第6,225,047号（前出）に記載される。 40

【0023】

吸着剤の一つの型は、クロマトグラフィーに代表的に使用される物質である「クロマト 50

グラフィー吸着剤」である。クロマトグラフィー吸着剤としては、例えば、イオン交換物質、金属キレート剤、固定化金属キレート、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、色素、混合様式吸着剤（例えば、疎水性の誘引/静電反発性吸着剤）が挙げられる。「生体特異的吸着剤」は、生体分子（例えば、ヌクレオチド、核酸分子、アミノ酸、ポリペプチド、単糖類、多糖類、脂肪酸、脂質、ステロイドまたはこれらの結合体（例えば、糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質）を含む吸着剤についての、別のカテゴリーである。特定の例において、この生体特異的吸着剤は、多タンパク質複合体、生体膜またはウイルスのような高分子構造であり得る。例示的な生体特異的吸着剤は、抗体、レセプタータンパク質、および核酸である。生体特異的吸着剤は代表的に、クロマトグラフィーの吸着剤よりも標的分析物に対して高い特異性を有する。

10

【0024】

SELDIの別のバージョンは、プローブ表面（「SENDプローブ」）に化学結合されるエネルギー吸収分子を含むプローブの使用を包含するSurface-Enhanced Neat Desorption (SEND)である。語句「エネルギー吸収分子 (EAM)」は、レーザー脱離イオン化源からエネルギーを吸収し、その後この分子と接触した分析物分子の脱離およびイオン化に寄与することが可能である分子を示す。EAMカテゴリーは、MALDIに使用される分子を含み、しばしば「マトリックス」と呼ばれ、ケイ皮酸誘導体、シナピン酸 (SPA)、シアノ-ヒドロキシ-ケイ皮酸 (CHCA) およびジヒドロキシ安息香酸、フェルラ酸、ならびにヒドロキシアセト-フェノン誘導体により例示される。このカテゴリーもまた、例えば、米国特許出願第5,719,060号および同上第60/351,971号(2002年1月25日出願)により列挙されたような、SELDIにおいて使用されるEAMを含む。

20

【0025】

Surface-Enhanced Photolabile Attachment and Release (SEPAR)と呼ばれるSELDIの別のバージョンは、分析物に共有結合しかつ光（例えば、レーザー光）に曝した後のこの部分における感光性結合の破壊を介してこの分析物を放出し得る表面に結合する部分を有するプローブの使用を含む。例えば、米国特許第5,719,060号を参照。SEPARおよびSELDIの他の形態は、本発明に従って、容易に適合され、バイオマーカーまたはバイオマーカープロファイルを検出する。

30

【0026】

本発明によるバイオマーカーの検出は、特定の選択条件（例えば、吸着剤または洗浄溶液）を使用することにより増強され得る。語句「洗浄溶液」は、分析物の吸着表面への吸着に影響を及ぼすかもしくは改変するかおよび/またはこの表面から非結合物質を除去するために使用される、薬剤（代表的には溶液）である。洗浄溶液の溶出特性は、例えば、pH、イオン強度、疎水性、カオトロピズム (chaotropism) の程度、界面活性強度、および温度に依存し得る。

【0027】

本発明の一つの局面によると、サンプルは、「バイオチップ」により分析される。用語「バイオチップ」は、捕捉試薬（吸着剤）が結合された一般に平面を有する固体基板を示す。しばしば、バイオチップの表面は、複数のアドレス可能な位置を含み、各位置は、そこに結合された捕捉試薬を有する。バイオチップは、プローブ界面に結合するように適合され得、それにより、ガス相イオン分光計、好ましくは質量分光計へ挿入され得るプローブとして機能し得る。あるいは、本発明のバイオチップは、別の基板上へ取り付けられて、分光計へ挿入され得るプローブを形成し得る。

40

【0028】

本発明に従う、バイオマーカーの捕捉のための種々のバイオチップは、Ciphergen Biosystems (Fremont, CA), Packard Bioscience Company (Meriden CT), Zyomyx (Hayward, CA)、およびPhyllos (Lexington, MA)のような販売元から購入可能

50

である。これらバイオチップの例は、米国特許第6,225,047号(前出)および同第6,329,209号(Wagnerら)ならびにPCT公開広報WO 99/51773(KuimelisおよびWagner)およびWO 00/56934(Englertら)に記載される。

【0029】

より具体的には、Ciphergen Biosystemsにより製造されるバイオチップは、アルミニウム基板上にむき出しの形態で提示される表面を有し、この表面に対して、アドレス可能な位置にクロマトグラフィー吸着剤または生体特異的吸着剤が取り付けられる。このむき出しの表面は、二酸化ケイ素により被膜される。

【0030】

例示的なCiphergen ProteinChip(登録商標)アレイは、バイオチップH4、バイオチップSAX-2、バイオチップWCX-2、およびバイオチップIMAC-3であり、これらは、ヒドロゲルの形態の官能化架橋化ポリマーを備え、バイオチップの表面に物理学的に取り付けられるか、またはバイオチップの表面にシランを介して共有結合される。H4バイオチップは、疎水結合のためのイソプロピル官能基を有する。SAX-2バイオチップは、アニオン交換のための第四級アンモニウム官能基を有する。WCX-2バイオチップは、カチオン交換のためのカルボン酸塩官能基を有する。IMAC-3バイオチップは、キレート化により Cu^{++} および Ni^{++} のような遷移金属イオンを吸着するニトリロ酢酸官能基を有する。これら固定された金属イオンは次に、配位結合によりバイオマーカーの吸着を可能にする。

【0031】

上記の原則に沿って、吸着剤を有する基板は、バイオマーカーが、この吸着剤に結合するように提示され得るために十分な期間、羊水を含むサンプルと接触する。インキュベーション期間後、この基板を、洗浄し、未結合物質を除去する。任意の適切な洗浄溶液が使用され得、好ましくは、水溶液が使用される。

【0032】

次いでエネルギー吸収分子は、結合バイオマーカーを伴う基板へ適用される。示されたように、エネルギー吸収分子は、ガス相イオン分光計中のエネルギー源からエネルギーを吸収する分子であり、それによって基板からバイオマーカーの脱離を補助する。例示的なエネルギー吸収分子としては、上に記載したように、ケイ皮酸誘導体、シナピン酸およびジヒドロキシ安息香酸が挙げられる。好ましくはシナピン酸が使用される。

【0033】

基板に結合するバイオマーカーは、ガス相イオン分光計中で検出される。このバイオマーカーは、レーザーのようなイオン化源によってイオン化され、生じたイオンは、イオン光学アセンブリによって回収され、次いで質量分析器が、通過するイオンを分散し、そして分析する。次いで検出器は、質量対電荷の割合へと、検出したイオンの情報を翻訳する。バイオマーカーの検出は、代表的に、シグナル強度の検出を含む。従って、バイオマーカーの量(quantity)と質量(mass)の両方が、決定され得る。

【0034】

マーカーの脱離および検出によって生じたデータは、プログラム可能なデジタルコンピュータの使用により分析され得る。このコンピュータプログラムは、データを分析し、検出されたマーカーの数を示し、必要に応じて検出された各バイオマーカーについてのシグナル強度および決定された分子量を示す。データ分析は、バイオマーカーのシグナル強度を決定する工程および予め決定された統計学的分布からはずれるデータを取り除く工程を包含し得る。例えば、観察されたピークは、ある基準に対する各ピークの高さを計算することによって標準化され得る。この基準は、機器および一定尺度に応じてゼロとして設定されたエネルギー吸収分子のような化学薬品によって生じたバックグラウンドノイズであり得る。

【0035】

コンピュータは、生じたデータを表示のための種々のフォーマットへ変換し得る。標

10

20

30

40

50

準的なスペクトルが表示され得るが、有用なフォーマットの一つにおいては、スペクトル図からの、ピークの高さおよび質量の情報のみをそのままに、よりきれいな画像を生じ、そしてより容易に見られるようなほぼ同一の分子量を有するバイオマーカーを使用可能にする。別の有用なフォーマットにおいて、二つ以上のスペクトルが、比較され、独特のバイオマーカーを都合よく強調し、このバイオマーカーは、サンプル間でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる。これらのフォーマットのいずれかを使用して、当業者はサンプル中に特有のバイオマーカーが存在するか否かを容易に決定し得る。

【 0 0 3 6 】

データを分析するために使用されたソフトウェアは、シグナルの分析にアルゴリズムを適用するコードを含み、シグナルが、本発明によるバイオマーカーに対応するシグナル中にピークを示すか否かを決定する。このソフトウェアはまた、観察されたバイオマーカーピークに関するデータを分類樹またはANN分析に供し、羊膜内炎症の診断を示すバイオマーカーのピークまたはバイオマーカーのピークの組み合わせが存在するか否かを決定し得る。

10

【 0 0 3 7 】

別の局面において、本発明は、羊膜内炎症の診断を補助するためのキットを提供する。このキットは、本発明によるバイオマーカーを検出するために使用される。このキットは、羊膜内炎症の患者に由来するサンプル中に差次的に存在するバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせの存在についてスクリーニングする。

【 0 0 3 8 】

一つの実施形態において、このキットは、本発明によるバイオマーカーを結合するのに適している吸着剤をその上に有する基板、および洗浄溶液または洗浄溶液を作製するための指示書を含み、ここで、吸着剤と洗浄溶液との組み合わせは、ガス相イオン分光計を使用してバイオマーカーの検出を可能にする。好ましい実施形態において、このキットは、固定化された金属アフィニティー捕捉チップ（例えば、H4チップ）を含む。

20

【 0 0 3 9 】

別の実施形態において、本発明のキットは、その上に吸着剤を備える第一の基板、およびこの第一の基板がプローブを形成するように位置決めされる第二の基板（ガス相イオン分光計へ挿入され得る）を含み得る。別の実施形態において、発明のキットは、分光計へ挿入され得る単一の基板を含み得る。

30

【 0 0 4 0 】

さらなる実施形態において、このキットは、ラベルまたは別個の挿入物の形態で適切な操作上のパラメーターについての指示を含み得る。例えば、この指示は、どのようにサンプルを回収するか、またどのようにプローブを洗浄するかの情報を消費者に与え得る。

【 0 0 4 1 】

本発明によるバイオマーカーはまた、サンプル中のバイオマーカーの存在を検出するための他の診断アッセイの製品にも有用である。例えば、このアッセイは、「吸着剤」、「結合部分」または「捕捉試薬」として、一以上のバイオマーカーに対する抗体を含み得る（但し、少なくとも一つのバイオマーカーは、カルグラヌリンである）。抗体は、バイオマーカーを含有すると推測されるサンプルと混合され、そしてバイオマーカー - 抗体結合についてモニターされる。このバイオマーカーの抗体は、放射活性標識および酵素標識を用いて標識される。好ましい実施形態において、このバイオマーカーの抗体は、固体マトリックス上に固定され、その結果、このバイオマーカー抗体は、サンプル中のバイオマーカーに対して接近可能になる。次いで、このサンプルを、このマトリックスの表面に接触させ、そしてこの表面を、バイオマーカー - 抗体結合についてモニターする。

40

【 0 0 4 2 】

例えば、このバイオマーカーは、酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）において検出され得、バイオマーカー抗体は、固相に結合され、そして酵素 - 抗体結合体は、サンプル中に存在するバイオマーカーを検出および/または定量するために使用される。あるいは、可溶化かつ分離されたバイオマーカーがニトロセルロール紙に結合したウエスタンブロー

50

ットアッセイが、使用され得る。高度に特異的、安定性の液体結合体と感受性色素基質との組み合わせは、迅速かつ正確なサンプルの同定を可能にする。膜のブロッキングおよび洗浄ならびに抗体の希釈のために必要とされる全ての溶液が提供される。バイオマーカーは、沈殿性基質または検出可能な基質の存在下においてフィルター紙をインキュベートすることによって、酵素または標識結合体化抗免疫グロブリン(Ig)(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ-Ig結合体)によって検出される。ウエスタンブロットアッセイは、所望のバイオマーカーについて50%を越える純度を必要としない利点を有する。ELISA技術およびウエスタンブロット技術の記述は、Ausubelら(編)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(John WileyおよびSons, 1988)の10章および11章に見出される。 10

【0043】

本発明は、以下の例示的な実施例を参照することによってさらに説明される。

【実施例】

【0044】

(対象群)

別々の患者に由来する全114個の羊水サンプルを本研究において分析した。90個のサンプルを、診断値を有するプロテオームパターンを確立するために使用し、24個のサンプルを、試験をするためおよびアルゴリズムを確認するために使用した。羊水を、羊膜腔の微生物学的な状態および/または胎児の肺の成熟度を評価するために実施した羊水穿刺によって得た。期限終了時の患者からサンプルを、選択的な帝王切開時に得た。早期分娩を、子宮収縮(少なくとも10分間に3回)または妊娠期間の37週未満における頸管拡張の進行の存在として定義した。膜の早期の早期破水(PROM)を、腔内の羊水の漏出、ならびにポジティブなシダ状結晶形成およびニトラジン試験の結果を検鏡検査で確認することによって診断した。研究のためのサンプルを、書面によるインフォームドコンセントを得た後Wayne State Universityによって承認されたIRBプロトコールの下収集した。研究のためのこれらサンプルの利用は、the National Institute of Child Health and Human DevelopmentのIRBによって承認された。好気性細菌、嫌気性細菌および生殖器のMycoplasmaの培養物を、グラム染色し、白血球および赤血球の計数を、収集後直ちに実施した。残りの羊水を、4で10分間、700gで遠心分離し、次いで、分析するまで-80でアリコート中に保存した。 20 30

【0045】

(SELDI-TOF質量分析についてのタンパク質プロファイリングプロトコール)

予備的な試験を実施し、タンパク質プロファイリングプロトコールを最適化した。羊水の以下の表Iに示すように、二つの極度な「疾患」群および「非疾患」由来するサンプルを使用して、二つのプールを生成した。

【0046】

これら二つのプールを、広範な希釈率において使用し、最適な、識別能力について、種々のチップ表面を試験した(逆相H4:C-16長鎖脂肪族残基を有する疎水性表面;強アニオン交換体SAX2:第四級アンモニウム;弱カチオン交換体WCX2:カルボン酸残基;金属アフィニティー:IMAC)。H4チップ表面について、最適化は、アセトニトリル勾配(10%~75%)のさらなる疎水性の洗浄の工程を包含した。リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)に10倍に希釈した2μlの羊水を、24-スポットH4アレイ(Ciphergen Biosystems(Fremont, CA)の製品)のスポット上に配置し、そして乾燥を避けるために加湿箱内でインキュベートする手順は、個々のピーク検出および弱いシグナル対ノイズ(S/N)比に最適であることを、本発明者らは見出した。一時間後、このサンプルを吸引し、そしてこのスポットを、5μlの25%アセトニトリル水溶液で個々に三回洗浄し、風乾させ、次いで0.5%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリル中に希釈したマトリックス溶液(エネルギー吸収分子)を用いて覆った。 40 50

【 0 0 4 7 】

【 表 1 】

表 I. 「学習」 SELDAI プロフィール に使用した
早産患者のチャートデータおよび羊水分析

患者の特徴	PT-CRL 「非疾患」 n=17	+AFC+WBC 「疾患」 n=21	-AFC+WBC n=7	+AFC-WBC n=8	-AFC-WBC n=24
年齢 (年: 平均 ± SD)	27 ± 7	27 ± 7	24 ± 5	28 ± 4	24 ± 5
人種 (アフリカ系 アメリカ人の割合%)	82%	85.7%	85.7%	100%	96%
パリティ (中央値 [範囲])	1 [0-2]	1 [0-7]	1 [0-6]	2 [0-6]	1 [0-8]
妊娠 (中央値 [範囲])	4 [3-10]	3 [1-10]	5 [1-7]	5.5 [1-8]	2 [1-11]
早産の病歴を有する患者 / 出産経験の有る患者	3/12	3/11	3/5	3/7	6/13
入院羊水穿刺 送達					
羊水穿刺の GA (wks ± SD)	29.7 ± 3	27.5 ± 4	26.5 ± 2	32.1 ± 1	30.0 ± 3
送達の GA (wks ± SD)	38.5 ± 1	27.6 ± 4	27.7 ± 3	33.0 ± 1	31.8 ± 4
PPROM (n [%])	0	8 [38%]	4 [57%]	7 [87.5%]	8 [33%]
誘発性分娩/自発性分娩	2/15	8/11	0/6	5/3	8/16
帝王切開出産	1	4	1	0	2
出生時体重 (グラム ± SD)	3290 ± 491	1117 ± 589	1073 ± 395	1952 ± 302	1858 ± 515
羊水の特徴					
WBC (細胞/mm ³ : 中央値 [範囲])	10 [0-80]	1800 [335-19200]	520 [200-14800]	23 [3-90]	3 [0-62]
グラム染色 ポジティブ	0	13	0	3	1
組織学的絨毛羊膜炎および/または 臍帯炎	1	19	7	3	5

GA: 妊娠週齢 ; WBC: 白血球数 (+WBC: WBC 数 >100 細胞/mm³);
AFC: 羊水培養物 ; (+AFC: ポジティブな羊水培養の結果)
「疾患」群および「非疾患」群は、学習 SELDAI プロフィール に使用した
二つの極度な群である。

各患者に由来する希釈した羊水を、二連のチップへ割り当て、各チップ上の二つのスポットを、2 μ l の PBS のみで覆った。このマトリックスを、1 μ l の -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) の 20% 飽和溶液 (一組のチップ上) のまたはシナピン酸 (SPA) の 0.5 μ l の飽和溶液の二つの連続的な適用 (他方の組のチップ上) いずれかから構成した。このチップを風乾させ、次いで Protein Chip (登録商標) ソフトウェア、バージョン 2.1b およびバージョン 3 を使用して、Protein Biology Systems (登録商標) II (PBS II) SELDI-TOF 質量分光計 (Ciphergen Biosystems) で読み取った。CHCA で覆ったチップを、初めに弱レーザー強度スポットプロトコール (CHCA-LL: レーザー強度 220、質量範囲 0 ~ 20,000 Da、検出器感度 6 で 1000 と 10,000 との間に最適化し、質量焦点 3300 Da、20 ショット発射、および開始 20 位 ~ 80 位までの 5 位ごとの平均化)、続いて強レーザー強度スポットプロトコール (CHCA-HL: レーザー強度 240、検出器の感度 10、25 ショット、22 位 ~ 82 位までの 5 位ごとに平均化) を使用して分析した。SPA で覆ったチップを、単一スポットプロトコール (SPA: レーザー強度 285、質量範囲 0 Da ~ 200,000 Da、26,500 Da での質量焦点を用いて 20,000 Da ~ 90,000 Da の間に最適化、検出器の感度 10、および 20 ショット発射、20 位 ~ 80 位まで 5 位ごとに平均化) を用いて分析した。PBS II 装具を、4 つの分子量ペプチドの標準物質 (arg-8-バソプレッシン、ウシインスリン鎖、ヒトインスリンおよびヒルジン) に対して外部からキャリブレーションした。

【0048】

(バイオマーカーの同定および定量の手順)

目的のピークについての等電点(タンパク質が、実効電荷を有さないpH)を、WCX2およびSAX2チップ上に希釈した羊水をスポットすることによって調べ、SELDI分析の前に、付加的なpHの溶液(50mM酢酸ナトリウムpH=4、50mMリン酸ナトリウムpH=6、50mM Tris pH=8または50mM炭酸ナトリウムpH=10)を用いて個々のスポットを洗浄した。緩衝溶液のpHが、その等電点より低い場合、タンパク質は、WCX2に対して優先的に結合する実効電荷を保有する。緩衝溶液のpHが、その等電点を越えている場合、これは、SAX2表面に優先的に結合する。従って、目的のタンパク質の等電点は、ピークが、SAX2チップおよびWCX2チップそれぞれに現れる、緩衝溶液のpHの間にある。

10

【0049】

(ゲル中におけるトリプシン消化)

ID-SDS-PAGE電気泳動を、予め形成した10~20%トリス-トリシングル(5-ウェルのゲル、Invitrogen, Carlsbad, CA)で実施した。サンプルを、非還元条件下で等量のトリシンローディング緩衝液(BioRad, La Jolla, California)と一緒に、5分間、羊水を煮沸することによって調製した。ゲルに、1ウェルあたり20 μ lサンプル容量を負荷し、120Vで泳動し、40%メタノール/10%酢酸中0.1%クマシーブルーR250を用いて1時間染色し、次いで40%メタノール/10%酢酸を繰り返し変えることによって脱染色した。低分子量マーカー(Ultralow Color マーカー、Sigma (St Louis, MO)の製品)または質量分光計の分子量標準物の混合物(0.5 nmolのウシチトクロムCおよび0.5 nmolのウシユビキチン、Ciphergen Biosystems)を、羊水サンプルと一緒にゲルへ負荷した。

20

【0050】

目的のバンドを、外科用メスを使用して正確に切り出し、切り刻み、次いでゲル中におけるトリプシン消化をペプチドマッピングキット(Ciphergen Biosystems (Fremount, CA)の製品)を使用して実施した。手順の最後に0.4mM HCl/25mM重炭酸アンモニウム中に0.2 μ gの酵素を含有する50 μ lのプロテオーム配列決定グレードトリプシン(Sigma)をゲル片を含む各チューブへ添加し、37 $^{\circ}$ Cのオープン中で16時間インキュベートした。盲検のゲル片を、このタンパク質のバンドと一緒に処理し、トリプシンの自己溶解から生じる生成物と目的のタンパク質に由来するフラグメントとを区別した。1.5 μ lの各消化物を、H4スポット上で直接に乾燥させ、次いで1 μ lの10%飽和CHCA溶液で覆った後ペプチドマップを、PBSSI装具中で手動で読んだ。

30

【0051】

(ペプチドの溶出)

各バンドに由来する少しのゲル片を、20 μ lの50%ギ酸/25%アセトニトリル/15%イソプロパノール中の音性浴槽内に30分間置いた。次いでこの溶液を取り除き、真空下でエバポレートした。そして溶出したタンパク質を、10 μ lの水に再懸濁し、この5 μ lをH4スポット上で乾燥させ、0.5 μ lの飽和SPA溶液の二つのアプリケーションで覆ってPBSSI装具中で手動で読んだ。

40

【0052】

(ゲル染色およびウエスタンブロットイング)

トリシンサンプル緩衝液(Bio-Rad)で1:1に希釈した5 μ lの羊水を、5分間煮沸し、16%連続(HNP-1~3について;図4b参照)または10~20%勾配(カルグラヌリンについて;図4c参照)の成形済のトリシン(Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA)の製品)の下で負荷した。いずれかのゲルを、クマシーブルー(図4b)で染色するか、またはウエスタンブロット(図4c)のためにPVDF膜フィルターへ電気泳動的に移した。簡単に言えば、フィルターを、

50

5%ミルクでブロッキングし、次いでカルグラヌリンについてマウスMac 387モノクローナル抗体(1:1000希釈; Labvision, Fremont, CA)またはウサギポリクローナル抗HNP-1~3抗体(1:1000希釈; ウサギ抗-ヒトHNP-1~3; Abcam, Cambridge, UK)のいずれかを用いて25で1時間インキュベートした。検出を、適切なホースラディッシュペルオキシダーゼ-結合体化二次抗体およびECL-キット(Amersham Biosystems)を使用して実施した。

【0053】

(オンチップ免疫アッセイ)

PS20アレイ上のスポット(タンパク質の共有結合性の固定化のためのエポキシ-活性化)を、製造者から購入したようにPBS中1mg/mlで希釈した2 μ lのアフィニティー精製抗体溶液(カルグラヌリン捕捉または抗ヒトHNP-1~3のためのMac 387)と共に1時間インキュベートした。対のチップを、同じ濃度で、適切にマウスIgGまたはウサギIgGでスポットした。非反応性活性部位を、1スポットあたり4 μ lの1M Tris、pH=9を用いて、室温で20分間インキュベートすることによってブロッキングした。次いで、チップを、850mMまでNaClを補充しかつ0.05%までTween-20を補充したPBS(結合緩衝液)を用いて洗浄した。5 μ lのサンプル(カルグラヌリンについて1:10~1:80、またはHNP捕捉については1:500~1:64,000に結合緩衝液中に段階的に希釈した)を、前処理したスポット上でインキュベートした。一時間後、このスポットを、初めに結合緩衝液を用いて、次いで10mM HEPESを用いて力強く洗浄し、風乾させ、適切なマトリックス溶液で覆い、次いでPBS II系中で読んだ。

【0054】

(ELISA)

羊水中のHNP-1~3の濃度を、19.5pg/mLの感度を有する商業的に入手可能な酵素-結合体化免疫吸着アッセイ(HyCult Biotechnologies, Uden, The Netherlands)により測定した。イントラアッセイおよびインターアッセイの変化率は、<2%であった。

【0055】

(統計学的分析)

データを、Kolmogorov-Smirnov試験を使用して正規性について試験し、そしてMann-Whitney試験(ノンパラメトリック)、Studentのt検定(パラメトリック)、または一方向のANOVA(多数の群間の比較についてパラメトリック)と比較した。比率間の比較を、Fisher直接確立検定を使用して実施した。受信者動作特性(ROC)曲線分析、比率間の一致、および計算を、MedCalc統計学ソフトウェアを使用して実施した(MedCalc, Broekstraat, Belgium)。

【0056】

(結果)

((1)羊水中の「学習」SELDIタンパク質プロフィール)

本発明者らは初めに90人の妊娠女性に由来する羊水サンプルを分析した(図1)。77個を、早期分娩(n=50)または早産PROM(n=27)の診断を伴う患者(平均妊娠期間:29週[95% CI:28-30])から得、13個は分娩時ではないが、出産予定日の患者(平均妊娠期間:39週[95% CI:39-40])から得た。第一の工程は、両極端の臨床的特徴および生物学的特徴を有する二つの群(つまり、「疾患」群および「非疾患」群)を生じるためのものであった。未熟児を出産した患者ならびに感染および炎症の証拠を有する患者を、「疾患」群を示すために選択した。感染を、微生物についてポジティブな羊水培養物として定義し、羊膜内炎症を、羊水WBC数>100細胞/mm³として定義した。「非疾患」群は、後に問題なく出産予定日新生児を分娩した無傷の膜を有する早期分娩の患者から構成された(早産のコントロール群:PT-CR

10

20

30

40

50

L)。羊水の回復時の出産予定日の患者は、さらなるコントロール群（出産予定日コントロール群：T - C R L）を示した。臨床的な症状（早期分娩または出産予定日妊娠期間）、早期分娩（ < 37 週）、羊水培養物および羊水WBC数による患者の分布を、図1に図示する。サブグループの臨床的特徴を、表1に表示する。両極端の「疾患」群および「非疾患」群は、最初の二つのカラムにある。

【0057】

予備的データを調べることは、SELDIタンパク質プロファイルのトレーシングの視覚的な検査、そして続く0.3%の質量精度統計値およびバイオマーカー統計値における「バイオマーカーのすばらしい(wizard)器具」を用いた評価から構成される。この分析は、情報を与えるピークを、三つの m/z （質量/電荷の比率）範囲内に集中したことを示した。目的のこれらの範囲は、CHCA - LLスペクトルにおける3300 ~ 3600 Daの間、CHCA - HLスペクトルにおける3600 ~ 5000 Daの間およびSPAによる10,000 ~ 14,000 Daの間であった（図2）。これらのゾーンにおける顕著なピークを、手動で選択し、そして各患者に由来するスペクトルを、ピークと同定の正確性について検証した。選択したピークについての m/z 値、標準化強度およびシグナル対ノイズの比率(S/N)を引き出した。次に、本発明者らは、本発明者らの診断上のプロームプロファイルについての厳密なフィルター選択物を規定するための段階的なストラテジーを確立した。この判定基準は、以下を含んだ：(1)全てのピークは、「疾患」状態に存在する。従って「非疾患」患者に普通に存在するピークの消滅または減少についての検索よりも「疾患」患者における新しいピークについての検索であった；(2)プロファイルのピークを、少なくとも二つの異なるレーザー強度プロトコールまたはマトリックスプロトコールで検出した；(3)プロファイル中の全てのピークは、「疾患」群と「非疾患」群との間で、少なくとも $p < 0.0001$ のレベルで顕著に異なるものであった（標準化強度の対数において）；(4)親のピークのみを、考慮した（個々にイオン化、最低限の酸化）；(5)ピークは、「非疾患」個体におけるベースラインのノイズが、顕著に高められた範囲に生じなかった；そして(6)最終の診断プロファイルは、極度に儉約すべきである。

10

20

【0058】

最初の四つの判定基準を適用した後、可能性のある差次的な値を有する13個の候補ピークが現れた（図2）。ピークの有無について客観的に記録するために、S/N比の評価に取り掛かった。選択のために使用したカットオフ(cut-off)は、「非疾患」群にそれぞれ対応する質量についてのS/N比の平均 ± 2 の標準偏差であった。次いで、プール指標を割り当てた：0の値を、ピークが、存在しなかったか、またはカットオフより下にある場合に使用し、そして1の値を、カットオフを超えるピークに割り当てた。プール指標の合計を、各患者について算定し、Mスコア（質量スコア）として参照した。このスコアは、三つの異なるマトリックスプロトコールにおける観察値の合計を示す（例えば、図2における最初の二人の患者は、12のMスコアを有するが、3人目および4人目は、それぞれ、0および3のスコアを有する）。

30

【0059】

「非疾患」の個体におけるベースラインノイズの範囲に生じなかったピーク（5番目の判定基準）を選択するために、本発明者らは、羊水の代わりにPBSを用いて混合したスポット($n = 20$)に由来するスペクトル上の平均質量に一致する13個で各マトリックスプロトコール(CHCA - LL、CHCA - HLおよびSPA)についてのノイズレベルを分析した。本発明者らは、「非疾患」群における平均ノイズレベル（対応する m/z 値でのS/N）が、PBSだけを用いたノイズレベルよりも顕著に高い($p < 0.05$)ピークを除去した。この判定基準を、正常な女性のトレーシングにおいて情報を与えるピークと隣接して存在するピークとの重複を最小化するために選択した。このアプローチの別の利点は、目的のピークの客観的な定量的分析および定性的分析が、すぐに可能であり、かつ試験の臨床実行において実質的な障害である「非疾患」サンプルの有効性から独立していることであった。

40

50

【0060】

上に概要を述べたフィルタリングストラテジーの連続的な適用の後、本発明者らは、四つのピークのセットを得た。これは、最終のプロテオームプロファイルを規定した。これら4つのピークの各々についての0値または1値の合計は、MRスコア（質量に限定されたスコア）を算定し、これは0～4の範囲に及ぶ（MRの算定のために選択されたピークを、図2の円内に示す；初めの二人の患者は、4のMRスコアを有し、三番目および四番目の患者は、それぞれ0および2であった）。従って、各患者は、二つのスコア（MスコアおよびMRスコア）を有した。表IIにおいて、MスコアおよびMRスコアを構成するピークを、1のプール指標をピークのみ由来するように（つまり、ピークが存在する）、観察した質量を示した。

10

【0061】

Mプロテオームプロファイルを構成する13個の最初のピークに加えて、およそ11.7 kDaの明確なピーク（基準またはRピークとして規定する、図2）が、全ての液体中に存在した。このピークを、SPAスペクトルのm/z軸の迅速な視覚性の方向付けに有用であることが分かった。

【0062】

「疾患」状態と「非疾患」状態との識別におけるMスコアおよびMRスコアの診断上の実施を試験するために、受動者動作特性曲線分析を実施した。MスコアおよびMRスコアを、感染の患者および炎症の患者と出産予定日に出産した早期分娩を伴うこれら患者との間の線引きにおいて同様に実施した。これは、MRスコアを構成する4つのピークが、述べた目的（つまり、節約）のために充分であることを示す。出産予定日に出産した早期分娩の全ての患者は、0または1のいずれかのMRスコアを有する（図3aの塗りつぶしてないひし形）。炎症および感染を有する全ての患者（図3aの塗りつぶした円）は、3または4のMRスコアを有した。従って、MRスコア>2は、これら二つの両極端の臨床状態の区別において100%の感度および100%の特異性を有した。

20

【0063】

MRスコアが、羊膜内炎症を伴う早産の患者と微生物学的に証明された感染を有する早産の患者とを識別することが可能であるかを決定するために、全ての集団に由来するサンプルを、評価した。2を超えるMRスコアは、子宮内炎症の検出において92.9%（26/28）の感度および91.8%（45/49）の特異性を有した（ROC曲線下の面積 = 0.948, SE = 0.031, 95% CI: 0.871 ~ 0.985）。二人の患者は、小さいMRスコアを伴いWBC > 100 / mm³を有した（感染について偽陰性）（図3a）。両者は、ネガティブな微生物培養物を有した。妊娠期間の28週間目で早産PROMを示す患者は、200 WBC / mm³を有し、9日後時期尚早に出産した。妊娠期の27週目で示された他の患者は、375 WBC / mm³を有し、腹部の外傷のために二回目の入院の間に妊娠期の30週目に出産した。3または4のMRスコアを有するWBC < 100 / mm³を伴う4人の女性が存在した（炎症について偽陽性）。妊娠期の30週～33週目で早産PROMを示した全ての患者が3日以内に出産し、そしてその全てにおいてUreaplasma urealyticumまたはMycoplasma hominisを羊水から単離した。

30

40

【0064】

2より大きいMRスコアは、86.2%の感度（25/29）、89.6%の特異性（43/48）を有する羊膜内感染を同定した（ROC曲線下の面積 = 0.893, SE = 0.042, 95% CI: 0.802 ~ 0.952）（図3a）。4人の患者は、微生物について陽性の羊水培養物を有するが、特徴的なプロファイルを示さなかった（つまり、感染について偽陰性：2人の患者は、P1の存在およびP2の存在により2のMRスコアの0および2のスコアを有した）。0のMRを有する二人の患者は、5 WBC / mm³より少ない羊水のWBC数を有した（羊膜内炎症無し）。一人の患者は、早産PROMを有し妊娠期の33週目で入院し、分娩誘導の後二日以内に出産した。羊水培養物は、Streptococcus agalactiaeについて陽性であり、2160gの体

50

重である新生児は、9 / 9 の A p g a r スコアを有し、合併症は有さなかった。二番目の患者は、早期分娩および無傷の膜を伴い妊娠期の 29 週目で入院し、S t r e p t o c o c c u s v i r i d a n s についてポジティブの羊水培養物を有し、そして 34 日後、妊娠期の 34 週目で出産した。新生児は、2260g であり、合併症は有さなかった。これら二人の患者のうちいずれの一人も、絨毛羊膜炎の組織学的な証拠は有さなかった。明白な偽陰性の結果も示す 2 の M R スコアを有する二人の患者が存在した。両者は、早産 P R O M を示し、そして羊水の培養物は、P r e v o t e l l a o r a l i s または G a r d e n e l l a v a g i n a l i s について陽性であったが、羊膜内炎症の証拠は無かった。両患者を、誘導し、そして 5 日以内に出産させたが、胎盤は、出産時に急性絨毛羊膜炎の証拠を有さなかった。従って、プロテオーム分析の明白な偽陰性のケースは、未熟児の炎症もしくは合併症の臨床的な証拠または組織学的な証拠のいずれも有さなかった。

10

【0065】

異常な M R スコア (3 ~ 4) および陰性羊水培養物 (感染について偽陽性の結果) を有する 5 人の患者が存在した。5 人全てが、 $100 / \text{mm}^3$ を越える羊水の W B C 数、絨毛羊膜炎の組織学的証拠を有し、そして入院後間もなく未熟児を出産した。従って全ての明白な偽陽性の結果は、異常な結果および急性炎症の組織学的な証拠に関連した。

【0066】

妊娠期間の生存率分析は、3 または 4 の M R スコアを有する患者は、0 ~ 2 の M R スコアを有する患者よりも出産間隔のためにより短い羊水穿刺を有したことを示した (対数ランク M a n t e l - H a e n s z e l 試験 二乗 42.6、 $p < 0.0001$)。出産間隔のための羊水穿刺の中央値は、3 または 4 の M R スコアを有する患者においては 1 日であったが、0、1 または 2 の M R スコアを有する患者については 19 日であった (95% C I の比率：18 ~ 20 日) (図 3 b)。この差は、母親の徴候または胎児の徴候について出産した 26 人の患者を、検閲した場合、顕著に高いままであった (0 ~ 2 の M R スコアを有する患者についての出産間隔までの羊水穿刺の中央値 = 3 ~ 4 の M R スコアについての 43 日対 2 日；対数ランク 二乗 22.7、 $p < 0.0001$ 、比率：21.5 日、C I 比率 95%：21 ~ 22)。

20

【0067】

((2) 早期患者の別々の集団における M R スコアの試験)

30

本発明者らは、羊水の 24 サンプルの別々のセットを盲目的に分析することによって M R スコアの性能を試験した。二人の研究者は、液体のバンクから 12 個の「疾患」サンプルおよび 12 個の「非疾患」サンプルを選択した。疾患患者についての選択の判定基準は、1) 無傷の膜を有する早期分娩の診断；2) 羊膜内炎症 (羊水 W B C $> 100 / \text{mm}^3$) および急性組織学的絨毛羊膜炎；3) 羊水穿刺後間もない自発性早期分娩、である。この集団は、二つの患者のサブグループ (微生物についてポジティブな羊水の培養物を有する 6 人およびネガティブな羊水の培養物を有する 6 人) から構成した。コントロールの患者は、早期分娩の診断および無傷の膜を有し、33 週前に羊水中に増大した W B C、ネガティブな培養物はなく、そして出産予定日に出産した。選択の判定基準を、早期分娩の際に、明白に規定した疾患または非疾患の患者におけるプロフィールを試験するために選択し、そして対照的に他の状態 (例えば、癌) において疾患についての真の「最も基準になるもの」は、羊水分析の時点で患者を分類するために有効なものはない。サンプルを無作為にコード化し、そして二人の他の研究者が、記載するように S E L D I 実験を実施し、そして独立して分析しかつスペクトルを記録した。3 または 4 の M R スコアは、100% の感度および特異性を用いて羊膜内炎症の存在を診断した。さらに、全てのサンプルにおける R ピークの存在に関する C H C A - L L プロトコールおよび S P A S E L D I プロトコールでの M R スコアを構成するピークの有無の迅速な目視評価によって、研究者らは、100% の感度および特異性を用いて炎症を再び主観的に診断することが可能であった。スコアおよび診断において 100% の評価者間の同意 ($\kappa = 1$) が存在した。この方法は、微生物学的に証明した羊膜内炎症を有する群を羊膜内炎症およびネガティブな羊水培

40

50

養物を有する群から区別することはできなかった。従ってプロテオームプロファイルは、感染よりも羊膜内炎症を同定する。

【0068】

((3) MRスコアを構成するバイオマーカーの同定)

本発明者らは、P2およびP1が、歯周病の患者に由来する歯肉滲出液中のSELDI-TOFによって事前に検出した好中球ディフェンシンの抗菌性ペプチドに特有のピークに基づいて、好中球ディフェンシン1および好中球ディフェンシン2(それぞれ、HN P-1およびHN P-2)であり得ると判断した。P1およびP2が、好中球ディフェンシンと一致するのかを決定するために、本発明者らは、アミノ酸のみによって互いに異なるこの三つのHN Pペプチド間を識別しないポリクローナル抗体を使用して、オン-チップ免疫アッセイを用いて行った。

10

【0069】

図4aは、プロファイリングスペクトル中のP1ピーク、P2ピークおよびP3ピーク(H4スポットでの)も、抗-HN P-1~3抗体で事前に被膜したスポット上で検出したが、IgG被膜したスポットでは検出なかったことを図示する。さらに、ペプチドの存在を、クマシー染色したゲル(図4b)およびウエスタンブロッティング(図4a-挿入)において適切な質量で「疾患」患者に由来するサンプル中に確認した。

【0070】

本発明者らは、羊水中のP1およびP2の平均質量と等量の混合物(各0.5ng)の三連のスポット上に組換えHN P-1ペプチドおよび組換えHN P-2ペプチドをスポットすることによって得たピークの平均質量とを比較することによって決定する質量の正確性を推定した。HN P-1およびHN P-2について観察した質量(羊水中)および算出した質量(SwissProt)を、表IIに示す。組換えペプチドを用いた三連のスポットから算出したアッセイ内の変動性は、0.07%であり、そして単一サンプル(組換えペプチドの混合物)と複合サンプル(羊水)の両方における質量の正確性は、0.2%であった。

20

【0071】

【表 2】

表 II. MスコアおよびMRスコアを構成するバイオマーカー

バイオマーカー	観察した質量 [95%CI]; PI	算定した質量; PI	タンパク質ID	
(P1)	3378.2 [3377.0-3379.4]; PI>8	3377.01; 8.67	HNP-2	
(P2)	3449.7 [3448.5-3451.0]; PI>8	3448.09; 8.68	HNP-1	
P3	3493.0 [3491.4-3494.5]			10
P4	3720.7 [3719.5-3721.9]			
P5	4149.0 [4147.5-4150.4]			
P6	4629.6 [4603.5-4655.7]			
(P7)	10471.7 [10467.9-10475.5]; PI: 4-6	10443.85; 5.82	カルグラヌリン C	
(P8)	10874.4 [10868.6-10880.2]; PI: 4-6	10834.51; 6.51	カルグラヌリン A	
P9	11362.3 [11355.2-11369.3]			
Rピーク	11790.4 [11785.9-11794.9]			
P10	12221.0 [12213.8-12228.1]			
P11	12354.4 [12345.3-12363.5]			20
P12	12730.5 [12724.5-12736.4]			
P13	13329.2 [13323.2-13335.3]			

円で囲ったピークは、MRスコアの構成要素である； PI: 等電点；

Rピーク: 基準のピーク

P 7 および P 8 の同定を確立するために、最初に本発明者らは、上記のようなゲル中におけるトリプシン消化を実施した。同時に、切り取ったゲルの小片からインタクトなタンパク質を溶出し、質量分光分析に供することによって、消化されたバンドの正確な質量を決定した。この技術は、切り取ったゲルのバンドが、SELDIでの目的のピークに実際に対応することを確証した。

【0072】

インタクトなタンパク質の観察した質量、等電点（表 II）、およびトリプシンによって生じたペプチドの質量を、検索可能なデータベース：

ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)、

Peptide (<http://www.expasy.ch/tools/peptide.html>)、および

MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtm14.0/msfit.htm>)

へ入力した。本発明者らが、本発明者らは、P 7 をカルグラヌリン C（目録番号 P 8 0 5 1 1）に対応させ、P 8 をカルグラヌリン A（目録番号 P 0 5 1 0 9）に対応させカルグラヌリン A、その後カルグラヌリン B およびカルグラヌリン C を認識するモノクローナル抗体（1：1000、Mac 387）を使用してオン-チップ免疫アッセイ（図 4 c）を用いて実行した。図 4 b および図 4 d は、クマシー染色したゲルおよびオン-チップ免疫アッセイに使用した抗体と同じ抗体を使用する従来のウエスタンブロッティングでの目的のバンドを示す。

【0073】

本発明者らは、本発明による羊水の迅速な SELDI 分析も、羊膜内炎症の程度、胎児

の結果の顕著な予後の指標についての定量的な情報を提供し得るのかを決定するために試みた。この情報は現在、炎症よりも感染を診断する迅速な試験（例えば、グラム染色）の結果のような羊水のWBC数および臨床徴候（母親の発熱、子宮の圧痛、または胎児の頻脈）を除いて、現場の人間には利用できない。

【0074】

この目的のために、本発明者らは、「学習」段階において研究した77人の早産患者に由来するMRピークの対数-正規化強度を分析した。対数変換後、全てのデータセットのピーク強度が、正規分布であった。予想通り、両極端の「疾患」群と「非疾患」群との間における全ての4つのピークの平均シグナル強度において顕著な違いが存在した（ $p < 0.001$ ）（図5）。また出産予定日に出産した早期分娩の患者（PT-CRL）と感染も増大したWBC数もなく早期に出産した群（これは少なくとも早期に出産の幾人かの患者において、WBC数 $< 100/mm^3$ に等しい羊膜内炎症の証拠が存在することを示す）（表Iにおける-AFC-WBC、図5）との間においてピーク強度に顕著な違いがまた存在した。

10

【0075】

（（4）出産予定日での羊水のSELDIプロファイル）

出産予定日での羊水の13サンプルの内の5サンプルが、SELDIでの検出可能なP1ピークおよびP2ピークを有した（つまり、S/Nカット-オフより上）（図2a）。しかし、可視のP7ピークまたはP8ピーク（図2c）を示すものはなく、従ってMRによって「非疾患」として診断した。この観察は、妊娠年齢が高くなるにつれて羊水中のHNPの高まる利用性と一致する。さらに、羊水中の好中球ディフェンシン（HNP-1およびHNP-2）の存在とカルグラヌリンの存在との間の分離を示し、そして複合的診断試験としてMRスコアの値を重要視させる。

20

【0076】

HNP-1~3は、先天免疫に含まれる抗菌活性を有するペプチドであり、活性化好中球内のアズール顆粒内に大量に存在する。従って、本発明者らは、HNPピーク（P1およびP2）の強度が、羊膜腔内における好中球活性の程度を反映すると判断した。なぜなら、これらの細胞が、胎児の炎症の範囲を胎児起源とすると考えられるためである。この仮説を試験するために、本発明者らは初めに、SELDIによって組換えHNP-1ペプチドおよび組換えHNP-2ペプチドの混合物を確実に定量するための本発明の能力を調べた。

30

【0077】

20ngと1 μ g（チップ上のペプチド量）との間に、正規化したピーク強度と用量依存性の関係が存在した（図6aおよび図6b）。HNP-1検出の限界は、5.8 fmolであった。興味深いことに、HNP-1の存在下においては、HNP-2ピークの強度は、顕著に低くなり、ピークの抑制効果またはこの二つのペプチド間の質量分光計中におけるイオン化能の差のいずれかを示した（図6a）。これらの結果は、HNP-2（P1）よりも羊膜内感染のより良い定量的な指標としてHNP-1（P2）を同定した。

【0078】

羊水のような複合サンプルにおける本発明者らの定量的な見積もりの正確性を調べるために、本発明者らはまた、ELISAによってペプチドの濃度を測定した。このアッセイは、使用した抗体が、この三つのエピトープ上の共通のエピトープを認識するので、全HNP-1~3量を定量する。ELISAは、SELDIを用いて見られた群間のHNP-1~3の濃度における有意な差を確認した（図6c）。ELISAによって測定したHNP量の対数と正規化したピーク強度の対数との間に顕著な線形の相関関係が存在した（P1についての $r^2 = 0.701$ 、P2についての 0.703 ）（図6d）。SELDIによって見積もったHNP-1~3と羊水白血球数（対数WBC/ mm^3 ）との間の相関関係は、SELDIとELISAによるHNP-1~3との間に観察された相関関係よりも弱かった（P1についての $r^2 = 0.491$ 、P2についての $r^2 = 0.501$ ）。

40

【図面の簡単な説明】

50

【0079】

【図1】図1は、羊水における「学習」Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization (SELDI) プロフィールについて使用された患者の区分のフローチャートである。

【図2】図2は、「疾患」患者、「非疾患」患者、およびT-CRL患者の代表的なタンパク質質量分光プロフィールを示し、この患者は、学習段階の間に調査された。M(P1-P13)およびMRスコア(円で囲まれたピーク)を含む識別可能なピークが、目的の三分子重量の領域内に示される(CHCA-LL実験プロトコールの下3300~3500ダルトン(Da)(a); CHCA-HLプロトコールの下3500~3800 Da(b); およびSPAプロトコールの下10-14 kDa(c))。

10

【図3】図3は、以下のような患者データを示す:(a) 散布図、早期の患者(n=77)から得た羊水サンプルのMRスコアと羊膜内炎症状態(WBC > 100細胞/mm³)または羊膜内感染(ポジティブな羊水培養の結果)から得た羊水サンプルのMRスコアとの間の関係性を示す。黒丸は、「疾患」患者を示す。白ひし形は、非疾患群を示す。残りの患者は、白丸により示される。(b) 羊水穿刺の後未分娩患者の確率の存在率分析を早期群の患者において実施した。黒四角は、3または4のMRスコアを有する患者を示す。白四角は、0~2のMRスコアを有する患者である。

【図4】図4は、オン-チップ抗体捕捉アッセイに基づく、好中球ディフェンシン(HNP-1~3)としてピークP1、P2、およびP3を(a)、ならびにカルグラヌリンとしてピークP7およびP8を(b)同定するデータを示す。抗体特異的ピークは、抗体が予め吸着された点(Ab)上であるが、IgGで予め処理された点上ではない点において、プロフィールトレース(H4)により同じ質量で区別される。この羊水サンプルは、代表的な「疾患」患者および「非疾患」患者に由来する。サンプルはまた、トリシングル上へ負荷され、そしてクマーシーブルー(b)により染色されるか、または、抗体捕捉に使用されるような同一の抗体(抗-HNP(aで挿入)または抗-Mac387(c))を使用するウェスタンブロット法のために処理される。

20

【図5】図5は、早期患者(n=77)のコホートにおけるMRスコア(標準化したピーク強度の対数)を含むピークの定量的分析を示し、このコホートは、羊膜内炎症(+WBC: WBC > 100/mm³)、または微生物学的に証明された感染(+AFC: ポジティブな羊水培養の結果)の存在または非存在により分類される。線は、この群の平均を示す。

30

【図6】図6は、H4点上の等量の組換えHNP-1と組換えHNP-2との混合物の定量的分析を示す。(a) 1μg(上)または2ng(下)のHNP1-2混合物を適用後得られたSELDIプロフィール。(b) SELDIトレースの対数標準化ピークの強度対HNP-1-2混合物の量を、スポットした。各点は、3点の独立したスポットからの平均およびSDを示す。(c) 羊膜内炎症(+WBC: WBC > 100/mm³)または微生物学的に証明された感染(+AFC: ポジティブな羊水培養の結果)の存在または非存在により分類された早期患者(n=77)のコホートにおいてELISAにより測定された羊水HNP-1~3の濃度。線は、群の平均を示す。(d) ELISAにより測定された羊水におけるHNP-1~3量(log)とSELDIによるP2ピーク(HNP-1)の対数標準化強度との間の相関。

40

【 図 1 】

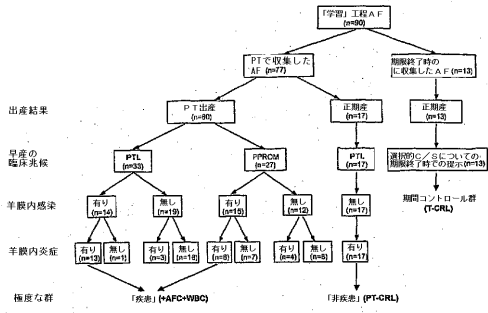


FIGURE 1

【 図 2 】

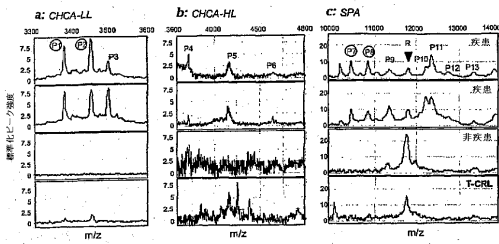


FIGURE 2

【 図 3 】

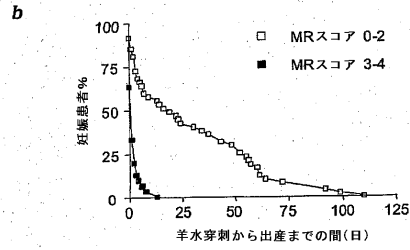
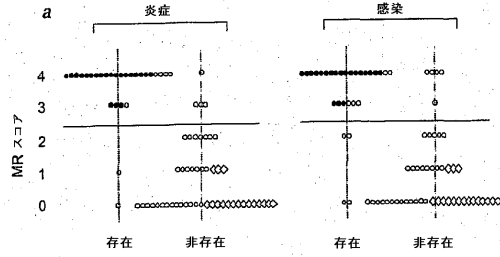


FIGURE 3

【 図 4 】

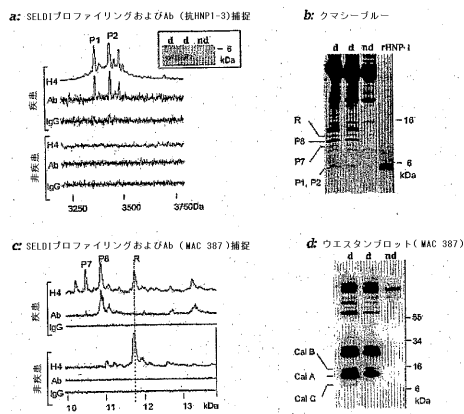


FIGURE 4

【 図 5 】

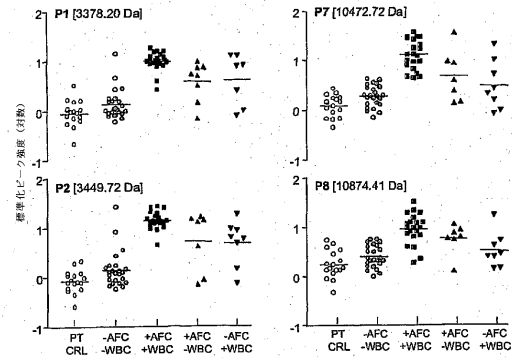


FIGURE 5

【 図 6 】

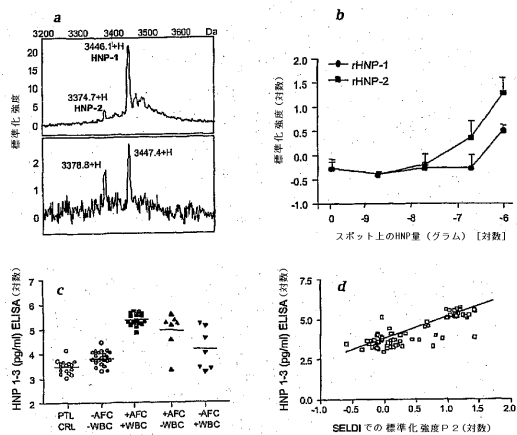


FIGURE 6

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成17年7月14日(2005.7.14)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

羊水サンプルにおける羊膜内炎症を示す少なくとも一つのバイオマーカーの存在を検出するための診断アッセイであって、該診断アッセイは、以下、

(A) 吸着剤を羊水サンプルと混合する工程であって、該吸着剤は、羊膜内炎症に関連する少なくとも一つのバイオマーカーに結合する、工程、次いで

(B) 該バイオマーカーと該吸着剤との間の結合について該混合物をモニタリングする工程、

を含み、該アッセイがカルグラヌリンである少なくとも一つのバイオマーカーを検出する、診断アッセイ。

【 請求項 2 】

前記吸着剤は、固体基板に固定された抗体である、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

【 請求項 3 】

ELISA法である、請求項 2 に記載の診断アッセイ。

【 請求項 4 】

前記固体基板は、プローブである、請求項 2 に記載の診断アッセイ。

【 請求項 5 】

請求項 4 に記載の診断アッセイであって、前記バイオマーカーは、レーザー脱離 / イオン

化質量分析法により検出される、診断アッセイ。

【請求項 6】

前記吸着剤は、プローブ上に固定される、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

【請求項 7】

前記吸着剤は、疎水性吸着剤である、請求項 6 に記載の診断アッセイ。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の診断アッセイであって、前記プローブは、Ciphergen H4 プローブまたは Ciphergen H50 プローブである、診断アッセイ。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の診断アッセイであって、該診断アッセイは、羊水の前記サンプル中の少なくとも一つのディフェンシンの存在についてさらに試験する、診断アッセイ。

【請求項 10】

前記ディフェンシンは、HNP-1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 9 に記載の診断アッセイ。

【請求項 11】

請求項 3 に記載の診断アッセイであって、該診断アッセイは、羊水の前記サンプル中の少なくとも一つのディフェンシンの存在についてさらに試験する、診断アッセイ。

【請求項 12】

前記ディフェンシンは、HNP-1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 11 に記載の診断アッセイ。

【請求項 13】

請求項 6 に記載の診断アッセイであって、該診断アッセイは、羊水の前記サンプル中の少なくとも一つのディフェンシンの存在についてさらに試験する、診断アッセイ。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の診断アッセイであって、前記ディフェンシンは、HNP-1 (- ディフェンシン 1) である、診断アッセイ。

【請求項 15】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A である、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

【請求項 16】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン C である、請求項 1 に記載の診断アッセイ。

【請求項 17】

羊水サンプル中の羊膜内炎症を示す少なくとも一つのバイオマーカーの存在を検出するためのキットであって、該キットは、以下：

少なくとも一つの吸着剤であって、該吸着剤は、羊膜内炎症に関連する少なくとも一つのバイオマーカーに結合する、吸着剤；ならびに

該吸着剤と羊水サンプルとを混合する工程および該サンプルにおける該吸着剤とバイオマーカーとの間の結合について該混合物をモニタリングする工程についての指示書、を含み、

該キットは、カルグラヌリンを検出する少なくとも一つの吸着剤を含む、キット。

【請求項 18】

前記吸着剤は、固体基板に固定化された抗体である、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

請求項 18 に記載のキットであって、該キットは、前記固体基板上に固定されたバイオマーカーを検出するために使用される酵素 - 抗体結合体をさらに含む、キット。

【請求項 20】

前記固体基板は、プローブである、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 21】

請求項 20 に記載のキットであって、該キットの指示書は、レーザー脱離 / イオン化質量分析法による分析を明細に記す、キット。

【請求項 22】

前記固体基板は、プローブである、請求項 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記吸着剤は、疎水性吸着剤である、請求項 2 2 に記載のキット。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のキットであって、前記プローブは、C i p h e r g e n H 4 プローブまたは C i p h e r g e n H 5 0 プローブである、キット。

【請求項 2 5】

請求項 1 7 に記載のキットであって、該キットは、少なくとも一つのディフェンシンに結合する少なくとも一つの吸着剤をさらに含む、キット。

【請求項 2 6】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 2 7】

請求項 1 9 に記載のキットであって、該キットは、少なくとも一つのディフェンシンに結合する少なくとも一つの吸着剤をさらに含む、キット。

【請求項 2 8】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 である、請求項 2 7 に記載のキット。

【請求項 2 9】

請求項 2 1 に記載のキットであって、該キットは、ディフェンシンに結合する少なくとも一つの吸着剤をさらに含む、キット。

【請求項 3 0】

前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、請求項 2 9 に記載のキット。

【請求項 3 1】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A である、請求項 1 7 に記載のキット。

【請求項 3 2】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン C である、請求項 1 7 に記載のキット。

【請求項 3 3】

妊娠中の患者の早産の危険性を認定するための方法であって、該方法は、少なくとも一つのカルグラヌリンのレベルについて該患者に由来する羊水サンプルを分析する工程を包含する、方法。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 に記載の方法であって、該方法は、前記少なくとも一つのディフェンシンのレベルについて前記サンプルを分析する工程をさらに包含する、方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 3 に記載の方法であって、前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 4 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) または H N P - 2 (- ディフェンシン 2) である、方法。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、H N P - 1 (- ディフェンシン 1) である、方法。

【請求項 3 8】

妊娠中の患者の早産の危険性を認定する方法であって、該方法は、以下、

(A) 該患者に由来する羊水サンプルを質量分光分析に供することにより生じたスペクトルを提供する工程であって、該質量分光分析は、生物学的または化学的に誘導体化されたアフィニティー表面でプロファイリングする工程を含む、工程、ならびに

(B) パターン認識分析により該スペクトルを配置する工程であって、該パターン認識分析は、該サンプル中のカルグラヌリンの存在を示す少なくとも一つのピークに適合され

る、工程
を、包含する、方法。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の方法であって、前記パターン - 認識分析は、ディフェンシンを示す少なくとも一つのピークにさらに適合される、方法。

【請求項 40】

請求項 38 に記載の方法であって、前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、方法。

【請求項 41】

請求項 39 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、HN P - 1 (- ディフェンシン 1) または HN P - 2 (- ディフェンシン 2) である、方法。

【請求項 42】

請求項 41 に記載の方法であって、前記ディフェンシンは、HN P - 1 (- ディフェンシン 1) である、方法。

【請求項 43】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

前記カルグラヌリンは、カルグラヌリン A またはカルグラヌリン C である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

請求項 38 に記載の方法であって、前記化学的に誘導体化されたアフィニティー表面は、C i p h e r g e n H 4 プローブまたは C i p h e r g e n H 5 0 プローブである、方法。

【請求項 46】

前記患者は、正常な範囲外に高められた白血球数を有さない、請求項 38 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/36120		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A23J 1/00; C07K 1/00, 14/00, 16/00, 17/00; C12M 1/34, 3/00; C12Q 1/00; G01N 33/48, 33/53, 33/543, 33/567 US CL : 422/50; 435/4.7.1.7.2.7.21.7.24.7.92.287.1.287.7.288.7; 436/514, 518, 541, 63, 824, 173; 530/412, 413				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 422/50; 435/4.7.1.7.2.7.21.7.24.7.92.287.1.287.7.288.7; 436/514, 518, 541, 63, 824, 173; 530/412, 413, 210/656				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STN (medicine, embase, biosis, caplus)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	USP 6,174,664 B1 (HEINE) 16 January 2001 (16.01.2001), column 6, lines 47-67; column 7, lines 1-52.	1-3, 8-13, 15-18, 24-29, 31		
Y	HEINE, RP et al. Amniotic fluid defensins: Potential markers of subclinical intrauterine infection. Clinical Infectious Diseases, 1998, vol. 27, pages 513-518, page 514, 2nd column, lines 1-37.	1-3, 8-13, 15-18, 24-29, 31		
Y	PANYUTICH, AV et al. An enzyme immunoassay for human defensins. Journal of Immunological Methods, 1991, vol. 141, pages 149-155, page 150, 2nd column, paragraph 4; page 151, 1st column, paragraphs 1-2.	1-3, 8-13, 15-18, 24-29, 31		
Y	USP 5,976,832 A (HITOMI et al) 02 November 1999 (02.11.1999), column 1, lines 38-53; column 13, lines 44-52.	1-3, 8-13, 15-18, 24-29, 31		
Y	ROBINSON, MJ and N HOGG. A comparison of human S100A12 with MRP-14 (S100A9). Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, vol. 275, pages 865-870, page 865, 1st column	1-3, 8-13, 15-18, 24-29, 31		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 09 June 2004 (09.06.2004)		Date of mailing of the international search report 05 AUG 2004		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Leon Lum <i>Janice Ford</i> Telephone No. 571-272-1600		

PCT/US03/36120

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KRONE, JR et al. BIA/MS: Interfacing Biomolecular Interaction Analysis with Mass Spectrometry. Analytical Biochemistry, 1997, vol. 244, pages 124-132, page 125, 2nd column, lines 40-44; page 126, 2nd column, lines 11-32.	4-5, 19-21 ----- 7, 23
Y	Passey, RJ et al. A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo. The Journal of Immunology, 1999, vol. 163, pages 2209-2216, page 2209, 1st column, line 11; page 2215, 1st column, lines 61-64.	14, 30
Y	USP 5,541,291 A (KEENE) 30 July 1996 (30.07.1996), column 9, lines 66-67; column 10, lines 1-9.	6, 22
A	USP 6,313,267 B1 (HITOMI et al) 06 November 2001 (06.11.2001), entire reference.	1-31
A	USP 6,225,047 B1 (HUTCHENS et al) 01 May 2001 (01.05.2001), entire reference.	1-31
A	USP 5,972,594 A (HEINE) 26 October 1999 (26.10.1999), entire reference.	1-31
A	USP 5,719,060 A (HUTCHENS et al) 17 February 1998 (17.02.1998), entire reference.	1-31
A	USP 5,516,702 A (SENYEI et al) 14 May 1996 (14.05.1996), entire reference.	1-31
A	HITOMI, J et al. A novel calcium-binding protein in amniotic fluid, CAAF1: its molecular cloning and tissue distribution. Journal of Cell Science, 1996, vol. 109, pages 805-815, entire reference.	1-31
A	HOFMANN, MA et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/Calgranulin polypeptides. Cell, 1999, vol. 97, pages 889-901, entire reference.	1-31
A	YANG, Z et al. Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. Journal of Leukocyte Biology, June 2001, vol. 69, pages 986-994, entire reference.	1-31
A	VOGL, T et al. S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. The Journal of Biological Chemistry, 1999, vol. 274, no. 36, pages 25291-25296, entire reference.	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/36120

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-31

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/36120

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-31, drawn to a diagnostic kit.

Group II, claim(s) 32-35, drawn to a method for qualifying the risk of preterm delivery.

Group III, claim(s) 36-44, drawn to a method for qualifying the risk of preterm delivery.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Group I includes the special technical features of an adsorbent that binds with a biomarker and monitoring the binding, which are missing from Groups II-III, and there are no common features between Group I and Groups II-III. Group II includes the special technical feature of analyzing a sample of amniotic fluid, which is missing from Groups I and III, and there are no common features between Group II and Groups I and III. Group III includes the special technical feature of mass spectroscopic analysis, which is missing from Groups I-II, and there are no common features between Groups III and Groups I-II.

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 バヒムシ, アイリーナ エー.

アメリカ合衆国 ミシガン 48084, トロイ, アリソップ プレイス 2728, アパートメント 309

(72) 発明者 クリストナー, ロバート

アメリカ合衆国 オハイオ 43620, トレード, パークウッド アベニュー 2262

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 EA01 FA12 GA06 JA08 LA12

专利名称(译)	用于羊膜腔内炎症的生物标志物		
公开(公告)号	JP2006511790A	公开(公告)日	2006-04-06
申请号	JP2004552155	申请日	2003-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	赛弗根生物系统股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	赛弗吉生物系统公司		
[标]发明人	バヒムシアイリーナエー クリストナーロバート		
发明人	バヒムシ, アイリーナ エー. クリストナー, ロバート		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N27/62 A23J1/00 A61B C07K1/00 C07K14/00 C07K16/00 C12M1/34 C12M3/00 C12N11/00 C12N11/16 C12Q1/00 G01N33/48 G01N33/537 G01N33/567 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/689 G01N2333/4721 G01N2333/4727 G01N2800/36 G01N2800/368		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N27/62.V G01N27/62.F G01N27/62.D		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA03 2G041/EA01 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/JA08 2G041/LA12		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/426096 2002-11-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

我们已经发现了能够识别羊膜腔内炎症的生物标志物。如果至少一种生物标志物是钙粒蛋白，优选钙粒蛋白A或钙粒蛋白C，则可以使用单一生物标志物或生物标志物组合来鉴定患者早产的风险。特别地，该生物标志物的浓度与羊膜内炎症的程度有关，因此与早产有关。本发明提供诊断测定和试剂盒，用于检测指示羊水样品中羊膜内炎症的至少一种生物标志物的存在。

【 図 1 】

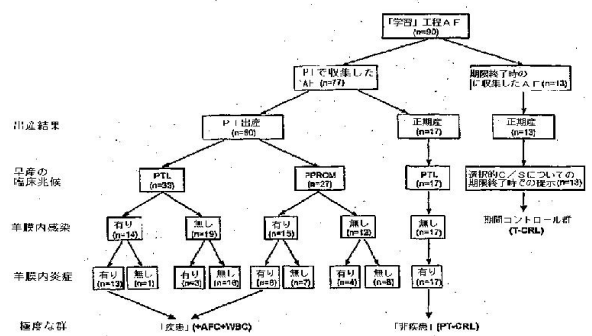


FIGURE 1

【 図 2 】