

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-106279

(P2009-106279A)

(43) 公開日 平成21年5月21日(2009.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 J	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/50 P	
	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 24 O L 外国語出願 (全 60 頁)		

(21) 出願番号	特願2008-268256 (P2008-268256)	(71) 出願人	508311824
(22) 出願日	平成20年10月17日 (2008.10.17)		サービマーク・ザ・セカンド・リミテッド
(31) 優先権主張番号	11/874, 717		・ライアビリティ・カンパニー
(32) 優先日	平成19年10月18日 (2007.10.18)		C E R V I M A R K I I , L L C
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国63117ミズーリ州セント・ルイス、サウス・ブレントウッド・ブールバード1034番、スイート910
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100100158
			弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100126778
			弁理士 品川 永敏
		(74) 代理人	100150500
			弁理士 森本 靖
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 早期陣痛の危険を予測するための方法およびキット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 妊婦における早期陣痛の危険を予測することを可能とするキットおよび方法の提供。

【解決手段】 早期陣痛となる患者の危険を測定する方法であって、 a . 妊娠中の患者から子宮頸部分泌試料を得て ; b . 子宮頸部分泌試料中での生体力学関連マーカーの存在を検出し、ここで、該生体力学関連マーカーはトロンボスポンジン 2 およびデコリンおよびそれらの組み合わせからなる群から選ばれ ; c . 規準化ベースラインマーカーレベルと比較して該生体力学関連マーカーの増大したレベルを、早期陣痛の増大した危険と関連させる、ことを含む、該方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

早期陣痛となる患者の危険を測定する方法であって、

a . 妊娠中の患者から子宮頸部分泌試料を得て；

b . 子宮頸部分泌試料中での生体力学関連マーカーの存在を検出し、ここで、該生体力学関連マーカーはトロンボスポンジン 2 およびデコリンおよびそれらの組み合わせからなる群から選ばれ；

c . 規準化ベースラインマーカーレベルと比較して該生体力学関連マーカーの増大したレベルを、早期陣痛の増大した危険と関連させる、
ことを含む、該方法。

10

【請求項 2】

子宮頸部分泌試料中の生体力学関連マーカーはトロンボスポンジン 2 を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

子宮頸部分泌試料中の生体力学関連マーカーはデコリンを含む、請求項 1 または 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

子宮頸部分泌試料中の生体力学関連マーカーの少なくとも 1 つはトロンボスポンジン 2 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 5】

子宮頸部分泌試料中の生体力学関連マーカーはトロンボスポンジン 2 およびデコリンを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 6】

更に、マトリックスメタロプロテイナーゼ 1 2 の存在を検出し、そして規準化ベースラインマーカーレベルと比較して該マトリックスメタロプロテイナーゼ 1 2 の増大したレベルを、早期陣痛の増大した危険と関連させる、ことを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 7】

更に、患者への適当な処置プロトコールの測定を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【請求項 8】

患者の適当な処置プロトコールは以下の処置： i) 患者の身体的な再配置、 i i) 患者への薬物治療の投与、 i i i) 患者への行動変化の推奨、および i v) 患者のより緊密なモニタリング、の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 9】

患者へ投与される薬物治療はプロゲステロンまたはプロゲステロンの誘導体である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 10】

患者へ投与される薬物治療は子宮収縮を刺激しまたは遮断する化合物である、請求項 8 記載の方法。

40

【請求項 11】

子宮収縮を刺激する化合物はピトシンまたはオキシトシンである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

子宮収縮を阻害する化合物はオキシトシン類縁体である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

早期陣痛となる患者の危険を測定する方法は薬物治療の投与の前、その間、またはその後に行なう、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 14】

生体力学関連マーカーの存在の検出は、子宮頸部分泌試料中の該生体力学関連マーカー

50

をコードする核酸分子の量を測定することによって実施する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

核酸分子はRNAまたはDNAである、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

核酸分子はRNAである、請求項 14 または 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

核酸分子はDNAである、請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 18】

DNAはcDNAである、請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 19】

適当な密閉容器中にパッケージされた、早期陣痛となる患者の危険を測定する際の使用に相当であるキットであって、

スワブ；

収集用緩衝液；

子宮頸部分泌試料中でのトロンボスポンジン 2 およびデコリンおよびそれらの組み合わせからなる群から選ばれる生体力学関連マーカーの増大したレベルの検出のためのアッセイ、

を含有する、該キット。

【請求項 20】

生体力学関連マーカーの増大したレベルの検出のためのアッセイは、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 12、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 8、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 2、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 3、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 9、ヒアルロニダーゼ、ルミカン、フィブロモジュリン、ケラトカン、PRELPバイグリカン、ミメカン、セルグリシン、パールカン、アグリン、パーシカン、リンクタンパク質、CD44、TSG-6、ピクニン、インターアルファトリプシンインヒビター、ヒアルロナンシンターゼ、ヒアルロン酸、エラスチン、フィブリン、フィブリリン、テネイシンX、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラナーゼ、リジルオキシダーゼ、V型コラーゲン、VI型コラーゲン、XII型コラーゲン、XIV型コラーゲン、XVII型コラーゲン、XX型コラーゲン、カルレティキュリン、CD47、シンデカン、グリピカン、リポ蛋白受容体類似蛋白(LRP)、ADAMプロテアーゼ、ADAMTSプロテアーゼ、E-セレクチン、L-セレクチン、血小板第4因子、トランスフォーミング増殖因子ベータ1、2および3(TGF-)、上皮増殖因子(EGF)、ケラチノサイト増殖因子(KGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)1および2、血小板由来増殖因子(PDGF)、およびそれらの組合せ、のレベルを検出することができる、請求項 19 記載のキット。

【請求項 21】

子宮頸部分泌試料中での生体力学関連マーカーの増大したレベルの検出のためのアッセイは、放射性免疫測定法、酵素免疫測定法、リガンドアッセイ、免疫放射線測定法、蛍光免疫測定法、および酵素結合免疫吸着測定法からなる群から選ばれるアッセイによって行なわれる、請求項 19 または 20 のいずれかに記載のキット。

【請求項 22】

生体力学関連マーカーの増大したレベルの検出のためのアッセイは、

a) 生体力学関連マーカーに対する一次抗体；および

b) 一次抗体または生体力学関連マーカーを認識する二次抗体、

を含有するアッセイである、

ここで、該二次抗体は、化学発光、放射性標識、蛍光標識、または酵素標識によって標識化される、

請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

生体力学関連マーカーの増大したレベルの検出は子宮頸部分泌試料中の生体力学関連マーカーをコードする核酸分子の量を測定することによって達成される、請求項19～22のいずれか1つに記載のキット。

【請求項24】

測定される核酸分子はDNAまたはRNAである、請求項19～23のいずれか1つに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、米国出願番号11/874,717(2007年10月18日出願)に関連する[非-米国]国際特許出願である。

10

【技術分野】

【0002】

本発明は一般的に、妊娠中の早期分娩の増大された危険の診断に関連する。より具体的には、本発明は、早期の子宮頸部の軟化の予測に有用な方法およびキットに関する。

【背景技術】

【0003】

早期陣痛、およびその後の早産児の分娩は、引き続き乳児死亡率および罹患率、並びに社会における重大な経済的な負担の主要な原因である。妊娠中の子宮頸部の未熟な軟化は、未熟な子宮頸部の拡張(開口)および展退(菲薄化)を生じ、そして妊婦を未熟分娩の高リスクに置く。現在、子宮頸部の未熟な拡張を予測するための診断方法はなく、従って、高リスクな早期分娩は無症候期の妊婦において予測することはできない。

20

【0004】

乳児死亡率を減少させるために多くの研究がなされているが、未熟分娩との闘いにおいてほとんど進歩はない。未熟分娩は現在、乳児死亡率を決定する際の主導の因子である。北米において、10人の妊婦中の約1人が早期分娩を併発する。例えば、数年間にわたる多施設治験の結果は、未熟に、すなわち20～36週の在胎期間の間に、出生した胎児は、出生の9.6%と説明されている(Cooperら著, Amer. J. Obstet. Gynecol. 168: 78, 1993)。多数の患者にとっての早期分娩の多数の同定された原因(例えば、感染症および多胎妊娠)が存在するが、該原因は未知である。早期陣痛を正確に予測しそして処置する方法を開発するのに最近10年間においてほとんど進歩はない。

30

【0005】

未熟に産まれた赤ん坊は実質的な医療財源を消費する。早産の入院費用は毎年110億ドルを越えるで見積もられている。これらの出生の実際的な短期間の費用は、新生児集中治療;親、ソーシャルワーカーおよびこれらの親のための補助スタッフによる病院で費やす時間;稼ぎの減少および移動の費用の増加である。これらの早産の長期間の費用は、早産の下流の影響(例えば、長期間の健康および発達上の問題、精神学および身体的なハンディキャップの危険の増大)に関係し、これは子供および親の稼ぎの可能性の両方に影響を与え得る。

【0006】

40

早期の陣痛(labor)および分娩(delivery)の診断は引き続き問題である。現在では、早期陣痛の評価の2つの分類:従来の診断およびバイオマーカーが存在する。各々はその利点を有するが、両者は偽早期陣痛の鑑別においてなおかなり乏しい。従来の診断は、子宮収縮の頻度、膜の状態、子宮頸部の拡張および展退、および在胎期間の評価を含む。臨床的な早期陣痛とは、規則的な収縮を伴う、進行性の子宮頸部の拡張、展退、またはその両方と定義され、これは、37週の在胎期間前の出生を生じる。

【0007】

子宮頸部の変化はまた早産分娩の従来の指標である。子宮頸部の変化は展退および拡張の減少を含む。子宮頸部が1cm未満の長さおよび2cm以上の拡張を有し、そして規則的な収縮が生じた場合に、早期陣痛が診断される。しかしながら、メタ分析は、これらの

50

基準が早産のわずか50%予測にすぎないと示した。30週の在胎期間前の1.5cm未満の子宮頸部の長さは、早期陣痛の有意な予知であることが分かっている。しかしながら、30週後では、この測定基準は信頼できない予知である。80%以上の子宮頸部の展退もまた強い予測因子であった。しかしながら、感知される痛みの収縮頻度、規則性、期間、およびレベルの評価は、信頼して早期陣痛を識別しない。

【0008】

早期陣痛を予測する際のバイオマーカー

現在、いくつかのバイオマーカーが使用されて、早期分娩を防止するために前もって十分に早期陣痛を予測しようと試みられている。これらのバイオマーカーは、胎児フィブロネクチン、唾液エストジオール、脱落膜タンパク質、内分泌/パラクリンマーカーを含む。これらのバイオマーカーの2つは十分に研究されている。胎児フィブロネクチン(Teraoら著, 5,650,394)および唾液エストジオールはある程度詳細に研究されており、そして胎児フィブロネクチンは商業的に入手可能である。該胎児フィブロネクチン試験(fFN(Adeza Biomedical/RossProducts Division Abbott Laboratories, Inc)として現在市販されている)は、腔分泌物からの胎児フィブロネクチン(フィブロネクチンの胎児特異的なグリコフォーム)の検出に基づく。現行の試験は、エライザ法に基づく。その試験の背後にある理論は、腔分泌物中に見られる胎児フィブロネクチンの増大量は胎膜および胎盤脱落膜の接合の妨害、従って切迫している分娩、をシグナルするというものである。症候期の妊婦において、該試験は、37週の在胎期間の完了前の早期分娩を予測するための限られた有効性(58%感受性)を有する(33)。しかしながら、該試験は、該試験の1週間以内に生じる分娩のより良い予測値(90%感受性)を有する(34)。この試験の別の価値は、早期分娩の可能性を排除する能力である(85%特異性)(35)。従って、無症候期の妊婦(早期分娩の危険が低い)において、胎児フィブロネクチン試験は低感受性であるが、該試験の後まもなく早期分娩を予測する高い特異性を有する。

【0009】

子宮頸部の生体力学の性質

子宮頸部の軟化は、拡張および展退のための準備における子宮頸部の力学的性質を変える漸進的な生理学的プロセスである。該子宮頸部(これは、該子宮および該子宮頸部の重なり境界での連結組織が多い括約筋である)は、妊娠期間における子宮内での受胎産物の保持を保証するように機能する。非妊娠期または妊娠の非常な早期において、子宮頸部の管腔は非常に狭く、そして子宮頸部はそれを開口するための機械的な力に抵抗することができる。しかしながら、妊娠の最後には、子宮頸部は、新生児が産道を通して通過することを可能とするために拡張しそして展退する目的で非常に伸展性となる。伸展性における漸次の増大(別称、子宮頸部の軟化)は妊娠の早期に始まり、そして妊娠が第3期における後期に向かって進行するにつれて促進される(8-11)。しかしながら、この後期における子宮頸部はなお、受胎産物を保持するために括約筋として機能することができる(12-14)。該軟化期に続いて、展退および拡張期があり、これは、好中球浸潤の増大(15、16)、プロスタグランジン産生の増加(17)、一酸化窒素の産生の増加(18)、マトリックス分解を伴うプロテアーゼ活性の増大(19)、および子宮頸部中でのサイトカインのレベルの増加(16)を特徴とする。該展退および拡張の期の分子的な基礎はよく理解されているが、この知識を有するからといって、早期分娩の時点での子宮頸部の管理は改善されていない。

【0010】

該間質性細胞外マトリックスのリモデリングは、生理学的な子宮頸部の軟化にとって中心である。子宮頸部間質性細胞外マトリックスはI型およびIII型コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、ヒアルロナン、および構造糖タンパク質から構成される(4、15、および16)。このマトリックスは、プロテオグリカンおよびヒアルロナンの粘糊性マトリックス中に包埋される荷重負荷(load-bearing)I型およびIII型のコラーゲン繊維との繊維強化複合体物質と見なされ得る(20)。該荷重負荷要素のアライメントまたは該マトリックス中での分散のそれらの程度の変化は、複合体物質の力学的な性質を変

える(21)。十分な証拠が、子宮頸部間質性細胞外マトリックスが妊娠期間に広範にリモデリングされるとの現行の概念を支持している。該コラーゲン繊維および繊維束は、マウス(22)、ラット(23、24)、モルモット(25)、ヒツジ(26)、およびヒト(27、28)中での子宮頸部の軟化の間に進行性で解離されそして崩壊される。コラーゲン原繊維関連タンパク質(例えば、デコリンおよびフィブロモジュリン)の変化は、子宮頸部の伸展性の増大と相関することが分かっている(9、29、30)。コラーゲン架橋の程度の低下はまた、妊娠期間での子宮頸部間質の組織崩壊の増大に寄与し得る(31)。

【0011】

発明者の実験室において行なわれた観察によれば、トロンボスポジン2は、子宮頸部の生体力学の性質の保持および形質転換において重要な役割を果たしている。トロンボスポジン2(TSP2)は、広範囲の分子相互作用が可能である多量体細胞外マトリックス糖タンパク質であり(48、49)、そしてTSP1とは機能的に区別される(50)。TSP2-ヌルマウスの研究は、TSP2の欠落が皮膚および腱中での繊維性コラーゲン繊維の形態学の変化(51)、およびそれら組織の引っ張り強さの対応する減少と関連することを示した。

10

【0012】

TSP2-ヌルマウスの予備的な研究(これは、発明者の実験室において行なわれた)は、未熟な子宮頸部の軟化表現型を実証した。発明者の実験室からの最近の論文中で議論されている通り(32)、妊娠の14日目までは、TSP2-ヌルマウスは、対応する妊娠の期にある野生型マウスと比較して、子宮頸部の伸展性の4.5倍の増大を、および18日目までは6.1倍の増大を示した。野生型子宮頸部のウェスタンブロットは、TSP2発現が妊娠の14日目および18日目で検出されるが、10日目または非妊娠子宮頸部においては検出されないことを示し、このことは、TSP2発現が該子宮頸部の生体力学の状態に相関することを示す。加えて、免疫組織化学的な研究は、子宮頸部中でのMMP2のレベルが妊娠の14日目では1.1倍および18日目では1.9倍増大することを示した。

20

【0013】

全てのこれらの研究および観察にもかかわらず、なお何が未熟な子宮頸部の軟化および拡張の分子的な基礎であるか不明なままである。このことは、高リスク妊娠からヒト子宮頸部のバイオプシーを得ることの困難さに、および自発性の未熟な子宮頸部の軟化を有する動物モデルの今までの非存在に大きく拠る。実験系のこの欠落は、子宮頸部の軟化の重要な分子マーカーを同定することおよび適当な診断キットを構築することを不可能とする。

30

【0014】

(引用文献)

以下の引用文献を、関連する数字の識別を用いて本出願中に引用する。本出願人は、従来技術としてのこれらの文献の状況に関して、言及せず、暗示せず、また示さない。これらの引用文献は、引用によって本明細書中にとり込む。

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

40

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

3. Romero, R., Gomez, R., Mazor, M., Ghezzi, F., and 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.

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

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

6. Colombo, D. F., and Iams, J.D. 2000. Cervical length and preterm labor. *Cli*

50

n. *Obstet. Gynecol.* 43: 735-745.

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

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

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.

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

11. Kaga, N., Katsuki, Y., Kanikuma, C., Obata, M., Shibutani, Y., and 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.

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.

13. Thomson, A. J., Norman, J. E., and Greer, I. A. 1997. The cervix. In *Preterm Labor*. M. G. Elder, R. Romero, R. F. Lamont, eds., Churchill Livingstone, New York, 445-455. 20

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

15. Junqueira, L. C. U., Zugaibe, M., Toledo, O. M. S., Krisztan, R. M., and 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.

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

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

18. Chwalisz, K., and 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.

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

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.

21. Hukins, D. W. L. 1984. Collagen orientation. In *Connective Tissue Matrix*, D. W. L. Hukins, editor. Verlag Chemie, Weinheim. 211-240. 40

22. Leppi, T. J. and Kinnison, P. A. 1971. The connective tissue ground substance in the mouse uterine cervix: an electron microscopic study. *Anat. Rec.* 170: 97-118.

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.

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

25. Hegele-Hartung, C., Chwalisz, K., Beier, H. M., and Elger, W. 1989. Ripeni 50

ng 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.

26. Ellwood, D. A., Anderson, A. B. M., Mitchell, M. D., Murphy, G., and 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.

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

28. Theobald, P. W., Rath, W., Kuhnle, H., and 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.

29. Kokenyesi, R., and 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.

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.

31. Glassman, W., Byam-Smith, M., and 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: 550-556.

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

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.

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.

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

36. Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, Mercer BM, Moawad A, Das A, Thom E, McNelis 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.

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

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.

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.

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. *A*

10

20

30

40

50

m J Obstet Gynecol. 184: 1374-1378.

41. Heine RP, McGregor JA, Goodwin TM, Artal R, Hayashi RH, Robertson PA, Varnier MW. 2000. Serial salivary estriol to detect an increased risk of preterm birth. Obstet Gynecol. 96: 490-497.

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.

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.

44. Leppert, P.C., Kokenyesi, R., Klemenich, C. A., and 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.

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.

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.

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.

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

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

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

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., and 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.

52. Kokenyesi, R., and 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.

【発明の開示】

【0015】

(発明の概要)

本発明者は、コラーゲン繊維関連タンパク質がヒトにおける妊娠期間での子宮頸部の変化に関与するとの驚くべき且つ重要な発見を成した。従って、本発明者は、コラーゲン繊維関連タンパク質、グリコサミノグリカン、グリコサミノグリカン - 関連タンパク質、および他の細胞外マトリックス成分（例えば、構造的な成分並びにリモデリング成分および制御因子因子（例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ（「MMPs」））が哺乳動物（例えば、ヒトを含む）における早期子宮頸部の軟化および早期陣痛の危険の予測においてバイオマーカーとして役立ち得ると、意図する。

10

20

30

40

50

【0016】

従って、本発明は、妊婦から子宮/子宮頸部の試料を得る工程、該試料中の細胞外マトリックス成分（別称、バイオマーカー）のレベルを評価する工程、該細胞外マトリックス成分のレベルを対照標準またはベースライン標準と比較する工程、および早期の子宮頸部の軟化および早期陣痛の危険を予測する工程を含む、妊婦における早期陣痛を予測する方法に関する。該子宮下部/子宮頸部の試料は、子宮下部組織バイオプシー、子宮頸部分泌物、または腔分泌物であり得る。好ましくは、該試料は子宮頸部分泌物であり、これはスワブを用いて非観血的に得ることができる。

【0017】

好ましい細胞外マトリックス成分は、トロンボスポンジン2（「TSP2」）、ヒアルロン酸（「HA」）、マトリックスメタロプロテイナーゼ2（「MMP2」）、マトリックスメタロプロテイナーゼ12（「MMP12」）、デコリン、ルミカン、およびフィブロモジュリンを含む。より好ましい細胞外マトリックス成分は、TSP2、HA、MMP2、およびMMP12を含む。表1は、子宮頸部の軟化の状態および早期の子宮頸部の軟化の危険の評価に有用なバイオマーカーのリストを提示する。

【0018】

該対照標準は、細胞外マトリックス成分の標準量または希釈系列であり得る。ベースライン標準は、子宮下部細胞中に常時（すなわち、妊娠の進行に特異的に関連しない）存在するタンパク質または他の生体分子（例えば、アクチン、グリセロアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ（「GAPDH」）など）であり得る。該細胞外マトリックス成分は、当該分野において知られるいずれかの特異的な生体分子認識アッセイ（例えば、抗体アッセイ、アプタマーアッセイ、リガンド受容体アッセイ、およびアロステリック酵素活性アッセイ）を用いて検出しそして定量化することができる。標準的な抗体アッセイは、ELISA、ウェスタンブロット、ドットブロット、RIA、抗体サンドイッチアッセイ、抗体捕捉アッセイ、抗原捕捉アッセイなどであり得る。1個以上のバイオマーカーを該方法において評価することができる。本発明の実施態様の別態様において、多数のバイオマーカーを評価することができ、そして診断決定をシグナルの多重度に基づいて行なうことができる。

表1：子宮頸部の軟化/早期分娩の危険を評価するのに有用なバイオマーカー

【表1】

<p>ルミカン、フィブロモジュリン、デコリン、ケラトカン、PRELPバイグリカン、ミネカン(mimecan)、セルグリシン、パールカン、アグリン、パーシカン、リンクタンパク質、CD44、TSG-6、ビクニン、インターアルファトリプシンインヒビター、ヒアルロナン(hyaluranan)シンターゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスチン、フィブリン、フィブリリン、テネイシンX、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラーゼ、リジルオキシダーゼ、V型コラーゲン、VI型コラーゲン、XII型コラーゲン、XIV型コラーゲン、XVII型コラーゲン、XX型コラーゲン、カルレティキュリン、CD47、シンデカン、グリピカン、リポ蛋白受容体類似蛋白(LRP)、ADAMおよびADAMTSプロテアーゼ、E-セレクチン、L-セレクチン、血小板第4因子、トランスフォーミング増殖因子ベータ1、2および3(TGF-β)、上皮増殖因子(EGF)、ケラチノサイト増殖因子(KGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)1および2、および血小板由来増殖因子(PDGF)</p>

【0019】

更に別の実施態様において、早期の子宮頸部の軟化および早期分娩についての危険に関連するバイオマーカーを検出しそして定量化することができる早期陣痛試験キットに関する。1実施態様において、該キットは第1の部分（これは、臨床条件において使用する）に、妊婦から子宮頸部分泌試料を経腔的に得るためのスワブを含む。該キットは、第2の部分（これは、診断条件において使用する）に、機械的な担体（例えば、膜、試験管、ペトリ皿、多ウェルプレートなど）、およびバイオマーカーを特異的に認識する第1薬物を

含む。好ましい実施態様において、該キットは、第2部中に第2薬物、シグナル分子を含み、ここで、該シグナル分子は、該第2薬物、および適宜、内部対照としての役目を果たすバイオマーカーと結合する。薬物(第1または第2)は、アプタマー、リガンド、受容体、酵素の産物、アロステリックな制御因子、抗体、またはそれらのいずれかのフラグメントであり得て、これは該バイオマーカーと特異的に結合し得る。第2薬物の場合には、該第2薬物は、第1薬物もしくはバイオマーカーのいずれか、またはその両方と特異的に結合し得る。好ましい第1薬物は、抗体またはバイオマーカーと特異的に結合する抗体フラグメントである。好ましいバイオマーカーは、以下: デコリン、TSP2、MMP2、MMP12、およびHAの1個以上である。シグナル分子は、蛍光分子(例えば、蛍光タグ)、酵素(例えば、HRPまたはアルカリ性ホスファターゼ)、放射性標識(例えば、¹²⁵I)、高親和性分子(例えば、ビオチン)などであり得る。該キット実施態様の別の態様において、該キットは、単一部分において、妊婦から子宮頸部分泌試料を経膣的に得るためのスワブ、緩衝液、機械的な担体、第1薬物、第2薬物、および対照バイオマーカー(上記)を含み得る。

10

【0020】

本発明の別の実施態様において、生体力学関連マーカーの定量化のためのキットは、該子宮頸部分泌試料中の生体力学関連マーカーをコードする核酸分子の量を測定することによって達成される。

【0021】

本発明の1実施態様において、測定される核酸分子はDNAである。

20

【0022】

本発明の別の実施態様において、測定される核酸分子はRNAである。

【0023】

本発明の1実施態様において、測定される核酸分子はcDNAである。

【0024】

更に別の実施態様において、本発明は、妊娠中の患者における早期陣痛の危険を測定するための方法に関し、該方法は(a)患者から好ましくはスワブを用いて子宮頸部分泌試料を得る工程、(b)該子宮頸部分泌試料を含有するスワブを緩衝液中に置き、(c)様々なバイオマーカーを含む緩衝液について定量イムノアッセイを行ない、(d)該試料中の子宮頸部の軟化に関連する1個以上のバイオマーカーの相対量を測定し、そして(e)該相対量に基づき該早期陣痛の危険を評価する、ことを含む。バイオマーカーの相対量とは、試料中のバイオマーカーの量が該試料中のベースライン対照マーカーの量に相対的に定量化することを意味する。該ベースライン対照マーカーとは、そのレベルが妊娠の進行の経過において変らないかまたはほとんど全く変らないマーカーである。好ましい実施態様において、該試料を臨床的な環境(例えば、医院)において採取し、該緩衝液(これは、試料中の該バイオマーカーおよびベースライン対照マーカーの完全性を維持するのに役立つ)中に置き、そして実験施設に移す。該実験施設において、該試料をプロセッシングし(例えば、定量的なイムノアッセイまたは同様な原理の生体分子アッセイにおいて)、そして1個以上のバイオマーカーを1個以上のベースライン対照マーカーに相対的に定量化する。該早期陣痛の危険は1個以上のバイオマーカーの相対量に基づいて測定し、そして該危険を患者および/または患者の医療従事者に連絡する。

30

40

【0025】

キットおよび方法の実施態様の両方の好ましい態様において、上記ベースラインレベルを有意に超える、MMP12、デコリンおよびTSP2の単独または1個以上の別のバイオマーカーとの組み合わせの増大は、早期陣痛の危険の増大を示す。ベースラインレベルは、期間終了時に分娩する女性の子宮頸部分泌物中で発現された該バイオマーカーのいずれかの1個以上の平均的な規格化された光学密度(本明細書[上記]中に記載する任意の単位)を意味する。光学密度は、任意の単位で示すことができる。好ましくは、該早産の正のレベルは、少なくとも1つのバイオマーカーの正常なベースラインレベルを超える少なくとも1つの標準偏差である。いずれか1個以上とは、TSP2の単独またはデコリン

50

、MMP12、もしくは表1(上記)中に記載するいずれか他のバイオマーカーとの組み合わせ、またはそれらの複数の組み合わせを定量化しそして使用して早期陣痛の危険を測定し得ることを意味する。

【0026】

本発明者によって、該子宮頸部試料は妊娠期間のいずれかの時点で(試料を収集するのに好ましい時間は妊娠の22週および26週を含む)得ることができる。他の時点でのより多くの試料を、早期陣痛のより大きな危険であると考えられる症例を追跡するのに、収集することができる。別の態様において、本発明はある程度まで該子宮頸部の該生体力学の状態を確認することに関するもので、該試験を分娩の誘発前に患者に供して、該子宮頸部が分娩を許容する能力を有するかどうかを評価することができる。

10

【0027】

本発明者は、上記子宮頸部バイオマーカー試験が他の妊娠関連評価状況においても有用であり得ることを意図する。例えば、このバイオマーカーアッセイを用いて、子宮頸部の軟化および/または子宮収縮を抑制する(停止または遅らせる)ために治療の有効性を追跡することができる。また、該バイオマーカーアッセイを用いて、妊娠期間のいずれかの時点での該子宮頸部の状態(しかし、妊娠状況だけに限定されない)を評価することができる。例えば、該バイオマーカーアッセイを用いて、該子宮頸部が赤ん坊を分娩するのに十分に準備されているかどうか(例えば、ピトシンの投与前に)を測定することができ、これによって、下流の問題を軽減するのに役立つ。本発明に係る当業者は、多数の産科学的および婦人科学的な試験への本発明の利用可能性を合理的に知ることができる。

20

【0028】

(詳細な記載)

好ましい実施態様の記載

本発明者は、細胞外マトリックス成分(例えば、トロンボスポンジン2、MMP2、MMP12、HA、およびデコリン)(これは、哺乳動物の子宮頸部および子宮下部の生体力学的な性質を調節するのに関与する)が、(1)哺乳動物(特に、ヒト)の子宮頸部および子宮下部における妊娠の進行の間に差次的に発現し、そして(2)子宮頸部分泌物中で検出され得る、ことを驚くべきことに発見した。本発明者は、これらのおよび他の細胞外マトリックス成分、並びに表1中に例示する他のバイオマーカーが、妊婦における早期陣痛の危険の予測においておよび赤ん坊の分娩のための子宮頸部の準備の評価において、バイオマーカーとして機能し得ることを意図する。従って、本発明は、女性における早期の子宮頸部の軟化および併発する早期陣痛についての危険を診断しそして予測する方法、並びに女性における早期の子宮頸部の軟化および併発する早期分娩においてそして分娩のための子宮頸部の準備の評価において有用なキットに関する。該方法およびキットは、1個以上のバイオマーカー(これは、子宮頸部および/または子宮下部の生体力学的な性質の変化に関係すると実証されるかおよび/または合理的に予測される)の使用を含む。該バイオマーカーは、トロンボスポンジン2(TSP2)、デコリン、フィブロモジュリン、ルミカン、ヒアルロン酸(HA)、マトリックスメタロプロテイナーゼ2(MMP2、別呼:エラスターゼ)、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ12(MMP12)から選ばれる細胞外マトリックス成分が好ましいが、必ずしもこれらに制限されない。

30

40

【0029】

本発明の1実施態様において、早期陣痛となる患者の危険を測定する方法は、(a)妊娠中の患者から子宮頸部分泌試料を得て;(b)該子宮頸部分泌試料中での該生体力学関連マーカーの存在を検出し(ここで、該生体力学関連マーカーは、トロンボスポンジン2およびデコリン並びにそれらの組み合わせからなる群から選ばれる);および、(c)規準化ベースラインマーカーレベルと比べて該生体力学関連マーカーの増大したレベルを早期陣痛の危険の増大と相関させる、ことを含む。

【0030】

本発明の別の実施態様において、早期陣痛となる患者の危険を測定する方法は更に、マトリックスメタロプロテイナーゼ12の存在を検出し、および規準化ベースラインマーカー

50

ーレベルと比べてマトリックスメタロプロテイナーゼ 1 2 の増大したレベルを早期陣痛の危険の増大と相関させることを含む。

【 0 0 3 1 】

本発明の別の実施態様において、早期陣痛の危険の測定方法は更に、患者のための適当な処置プロトコルの測定を含み、これは、以下の処置： i) 患者の身体的な再配置； i i) 女性への薬物治療の投与； i i i) 患者への行動変化の推奨；および、 i v) 患者のより緊密なモニタリング、の少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 3 2 】

本発明の 1 実施態様において、患者に投与される薬物治療は、プロゲステロンまたはプロゲステロンの誘導体である。プロゲステロンの誘導体の例は例えば、微粒子化プロゲステロン、注射性 1 7 - O H プロゲステロン、および経口メドロキシプロゲステロン酢酸を含むが、これらに限定されない。該プロゲステロンは、患者に経膈的に、舌下に、または直腸的に送達し得る。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の別の実施態様において、患者に投与される薬物治療は、子宮収縮を刺激または遮断する化合物である。好ましくは、子宮収縮を刺激する化合物はピトシンまたはオキシトシンであり、そして子宮収縮を阻害する化合物はオキシトシン類縁体である。

【 0 0 3 4 】

本発明の別の実施態様において、早期陣痛の危険の測定、特に生体力学関連マーカーの検出の方法は、該子宮頸部分泌試料中の該生体力学関連マーカーをコードする核酸分子の量を測定することによって達成される。

20

【 0 0 3 5 】

本発明の 1 実施態様において、測定される核酸分子は D N A である。

【 0 0 3 6 】

本発明の別の実施態様において、測定される核酸分子は R N A である。

【 0 0 3 7 】

本発明の 1 実施態様において、測定される核酸分子は c D N A である。

【 0 0 3 8 】

本明細書中に記載する通り（上述）、該方法およびキットを、妊婦の子宮下部または子宮頸部の状態を反映するバイオマーカーの生物学的な試料中の相対量を測定するために、抗体 - またはアプタマー - ベースアッセイを利用することができる。該生物学的な試料は、組織バイオプシー（子宮頸部または子宮下部）、子宮頸部分泌物、または膈分泌物であり得る。該試料は、妊娠の期間のいずれか 1 時点または複数の時点でいずれかの妊娠中の哺乳動物（ヒトが好ましい）から採取することができる。ヒトにとっての好ましい実施態様において、子宮頸部分泌試料は、在胎期間の 2 2、2 4、2 6、2 8、3 0 および 3 2 週で、早期分娩を保護するために介入する適当な時間を保証する時点で、スワブを用いて医師によって採取し得る。しかしながら、本発明の実施における産婦人科医は、本発明が子宮頸部の分子的な - 生体力学的な状態を評価するために、妊娠の期間の複数の他の時点での能力を有することを容易に認識するであろう。

30

【実施例】

40

【 0 0 3 9 】

以下の実施例は、子宮頸部分泌試料を用いる、キットおよび方法を記載する。当業者は、多数の生体分子検出方法が本発明の実施において使用し得ることを容易に認めるであろう。抗体ベースの検出方法に関する記載については、HarlowおよびLane著、Antibodies: A laboratory Manual, CSHL Press, 1988, Cold Spring Harbor, NY（これは引用によって本明細書中に取り込む）を参照。アプタマーベースの検出方法に関する記載については、HeydukおよびHeyduk著、「Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins,」 Anal Chem. 2005 Feb 15; 77(4): 1147-56（これは引用によって本明細書中に取り込む）を参照。

【 0 0 4 0 】

50

実施例 1

子宮頸部分泌試料中のバイオマーカーを評価するためのキットおよび方法

子宮頸部分泌物はダクロンスワブを用いて収集する。露出されている子宮腔部表面および後腔円蓋をスワブで採取し、そして該スワブを生理食塩水および保存剤を含有する収集バイアル中に置く。該試料の収集は、出発物質として子宮頸部分泌物を使用する他の通常のアッセイ（胎児フィブロネクチン）において使用される場合と非常に類似する。

【0041】

濃縮洗浄剤溶液を該収集バイアルに加え、そして該スワブを該溶液中への分子の完全な放出を達成する目的で攪拌する。該スワブを取り出し、そして該試料溶液を短時間の遠心分離によって清澄化する。該清澄化試料、および精製標準物質のアリコート（TSP2、HA、MMP2、およびMMP12の様々な濃度）をドットプロット装置中にロードし、そして該溶液を高親和性タンパク質結合膜（PDVF）を通した。得られたタンパク質スポットを、タンパク質量化およびバイオマーカー質量化のために使用する。

10

【0042】

該試料タンパク質スポットを含有する膜を、ブロッキング溶液（例えば、5%粉ミルク/トリス緩衝化生理食塩水）を用いて30分間処理する。該膜を、TSP2、MMP2、およびMMP12に特異的な一次抗体と一緒にインキュベートする。HA検出の場合には、ピオチン化ヒアルロナン結合性タンパク質（Calbiochem製）を一次抗体の代わりに使用する。該抗体および該ヒアルロナン結合性タンパク質を5%粉ミルク溶液中に溶解し得る。インキュベートは、4で約12時間であるかまたは室温もしくは37でより短時間とする。インキュベート後に、該膜をトリス-緩衝化生理食塩水で洗浄し、次いでペルオキシダーゼ-接合二次抗体（TSP2、MMP2、およびMMP12の場合）またはペルオキシダーゼ接合アビジン（HAの場合）と一緒にインキュベートする。このインキュベート後に、該膜をトリス-緩衝化生理食塩水で数回洗浄し、そして着色をジアミノベンジジン(diaminobenzidine)基質を用いて行なう。該着色強度は濃度測定を用いて質量化する。

20

【0043】

標準曲線を得るために、TSP2、MMP2、MMP12、およびHAの公知の量を膜上に量を増加させながらスポットする。検出方法は、先の項目に記載する方法と同一である（上記）。標準的な曲線は、バイオマーカーの量に対して染色強度をプロットすることによって導く。該スポット-ELISAアッセイ上の染色スポットの光学密度は、プログラム（例えば、シオン(Scion)4.2プログラム）を用いて該ELISA膜のデジタル化した画像を解析することによって測定する。TSP2、HA、MMP2、およびMMP12の場合の標準曲線は、当業者が試料中のバイオマーカーの絶対的な量を測定することを可能とする。バイオマーカーの量を標準曲線の対照に規格化する。

30

【0044】

該アッセイの感受性は、比色分析読み取りの代替物として蛍光読み取りを用いることによって増大し得る。該蛍光ベース読み取りは、上記のスポット-ELISAの一般的なフォーマット（ここで、蛍光発生基質をジアミノベンジジン基質の代わりに使用する）に基づく（上述）。該シグナルの検出のための装置および濃度測定の質量化は、比色分析法について記載するのと本質的に同様に実施する。

40

【0045】

該試料の全タンパク質の含量を、Chapdelaineら著の方法（46）によって測定し得る。この方法は、膜結合タンパク質上でのアミドブラック溶液の使用および濃度測定による色の強さの質量化に基づく。この方法は、培養物中で細胞に使用することに成功している（47）。

【0046】

実施例 2

子宮下部中でのバイオマーカーの発現

期間最後まででの妊娠の維持は、子宮および子宮頸部の協調された機能を要する。該子宮

50

頸部は、期間の最後に拡張を可能とするために、妊娠の期間に実質的なリモデリングを受ける連結組織から主に構成される括約筋様構造である (Leppert, P. C. 著, 1995, Clin Obstet Gynecol, 38: 267-79)。該ヒト子宮頸部の異常なリモデリングは、「無能な子宮頸部」、または未熟な子宮頸部の軟化および拡張のより緩和された形態の原因であると考えられる。これらの子宮頸部疾患は、未熟な分娩に対する有意な寄与である。

【0047】

連結組織の個々の成分の子宮頸部の機能への寄与を測定する目的で、本発明者は、連結組織の個々のタンパク質が欠損しているマウスの子宮頸部の性質を研究することを選択する。いくつかのコラーゲン繊維関連タンパク質 (デコリン、ルミカン、フィブロモジュリン、トロンボスポンジン2) は、マウスにおいてコラーゲン原繊維の形態および皮膚の力学的な性質を調節することが分かった。目的は、トロンボスポンジン2 - ヌル (TSP2 - ヌル) マウスの子宮頸部の特性を測定することによって、未熟な子宮頸部の軟化の分子的な基礎のより良い理解を得ることであった (Kyriakides, T. R. 著, 1998, J Cell Biol, 140: 419-30)。

【0048】

該子宮頸部の伸展性は腹ばい (creep) 試験によって測定し、そして TSP2 - ヌルマウスの子宮頸部は、野生型マウスと比較して、妊娠の14日目までには4.5倍の増大、および妊娠の18日目までには6.1倍の増大を示す (Kokenyesi, R. 著, 2004, Biol Reprod, 70: 385-90 (これは引用によって本明細書中に取り込む))。該 TSP2 - ヌル子宮頸部の伸展性は、非妊娠マウスおよび妊娠の10日目における野生型子宮頸部の場合と同様である。該生物学的な欠損のタイミングと一致して、TSP2の発現パターン (ウェスタンブロットによって測定する) は、TSP2が妊娠の14日目および18日目 (10日目または非妊娠期ではない) でのマウスの子宮頸部中で発現することを示す。伸展性の増大に加えて、該 TSP2 - ヌル子宮頸部の防御的な生物学的な機能はまた該 TSP2 - ヌルマウスにおいて実証される。妊娠の15日目でのマウスのミフェプリストン処置は、野生型マウスと比べて TSP2 - ヌルマウスにおける促進された分娩を生じる。マトリックスメタロプロテイナーゼ2 (MMP2) のレベルの増大が、妊娠の14日目および18日目での TSP2 - ヌル子宮頸部中で見られる。対応して、MMP2活性の増大は、妊娠の14日目での TSP2 - ヌル子宮頸部の抽出物中のゲラチン酵素電気泳動によって検出される。MMP9活性はゲラチン酵素電気泳動法によって全く見られない。カゼイン酵素電気泳動は、妊娠の14日目での TSP2 - ヌル子宮頸部のカゼイン分解性活性の変化を全く示さない。本発明者はまた、MMP3 (ストロメライシン)、MMP7 (マトリリシン)、MMP13 (主要なマウスコラゲナーゼ)、およびカテプシンGの免疫組織化学的な染色を評価した。その理由は、これらが連結組織のリモデリングに関与すると当該分野において知られるプロテアーゼであるというのが理由である。染色された膜の濃度測定分析は、妊娠の14日目での TSP2 - ヌル子宮頸部中でこれらのプロテアーゼのいずれの染色の強さの有意な変化を全く示さない。本発明者は、TSP2 - ヌル子宮頸部中でデコリンおよびルミカンの分解産物 (子宮頸部中で多量に発現する2個のMMP物質) を検出することができなかった。妊娠の14日目でのメタロプロテイナーゼ (TIMP) の組織インヒビターの発現もまた研究する。TIMP 1、2および4は免疫組織化学的な染色によって検出されるが; しかしながら、濃度測定分析は、染色の強さの有意な変化の非存在を示す。TIMP 3は、子宮頸部中に検出されない。

【0049】

該 TSP2 - ヌル子宮頸部の微細構造の変化の種類および大きさのより良い理解を得る目的で、出願人は、コラーゲン間質性マトリックスの微細構造の特徴を確認するために定量的な形態計測を使用する。標準化されたサンプリングプロトコルを、透過型電子顕微鏡像上のマトリックス構造の不偏の表示を得るために開発する。妊娠の14日目での TSP2 - ヌル子宮頸部において、出願人は、コラーゲン繊維の直径の増大、繊維の直径の分配の変化、コラーゲン繊維束の横断面の領域の減少、繊維束内のコラーゲン繊維の記録密度 (packing density) の減少、コラーゲン繊維間での電子顕微鏡で明るく見える粒子の蓄

10

20

30

40

50

積、および破壊されるコラーゲンマトリックスの比率の増加を観察する。

【0050】

TSP2 - ヌル子宮頸部中でのヒアルロنانの存在を、免疫組織化学的な方法によって検査する。該ヒアルロナン染色は間質中でより多く、そして上皮中でより少なく観察される。濃度測定分析は、妊娠の14日目および18日目(10日目ではない)でのヒアルロナン染色強度の有意な増大を示す。これらのデータから、当業者は、マウス子宮頸部中でのTSP2発現が組織完全性の保持および機械的な力に対する抵抗にとって重要であると合理的に結論付けることができる。従って、該TSP2 - ヌルマウスは、自発性の未熟な子宮頸部の軟化の研究を可能とする最初の動物モデルである。妊娠の14日目でのTSP2 - ヌルマウスにおいて見られる未熟な子宮頸部の軟化は、間質性マトリックスの微細構造の広範囲な変化、およびMMP2およびヒアルロナンレベルの増大と相関し、一方で多数の他のプロテアーゼ/プロテアーゼインヒビターシステムは影響を及ぼさない。これらの発見は、未熟な子宮頸部の軟化がコラーゲン繊維束のアセンブリ/ジアセンブリのバランスの変化を生じ、タンパク質分解性の作用の関与は限られる、ことを示唆する。このデータは、単一のコラーゲン繊維関連タンパク質が子宮頸部の伸展性を有意に変え得る(これは、TSP2および他のコラーゲン線維関連タンパク質(例えば、デコリンまたはルミカン)が連結組織の完全性の調節において特異的な非重複性の役割を果たすことを示唆する)ことを実証する。理論によって束縛されることを望むわけではないが、出願人は、いずれかのコラーゲン繊維関連タンパク質または該子宮頸部細胞外マトリックスの制御因子の防御的な発現は妊婦における防御的な子宮頸部の機能を導き得る、と合理的に推測する。

10

20

【0051】

TSP2がヒト生殖器系において研究されていないとの理由で、本発明者は、ヒト子宮下部中でのTSP2の発現パターンに関する免疫組織化学的な研究を行なう。TSP2染色は、在胎期間の27~36週に及ぶ全ての検体の平滑筋細胞間に存在する連結組織が豊富な領域中で見られる。平滑筋細胞それ自身の染色はほとんど存在しない。TSP2の染色強度は妊娠の33~35週にピークとなり、そして該染色は27~31週で強さが劣る(図1を参照、これは、週単位の在胎期に対するヒト子宮下部試料からの定量化されたTSP2染色を示す)。

【0052】

子宮下部検体を、セントルイス大学の治験審査委員会によって承認されたプロトコールによって得る。検体を、未熟な陣痛以外の徴候としての帝王切開を受ける患者から得る。在胎期間の範囲は27~37週である。該検体を緩衝化ホルマリン中に固定化し、そして免疫組織化学的検査のためにプロセッシングする。TSP2に特異的なモノクローナル抗体(BD Biosciences社製)を1:50希釈で用いて、その後西洋わさびペルオキシダーゼ接合二次抗体を用いる。ポリクローナルヒツジ抗-ヒトデコリン抗体(US Biological社製)を1:50希釈で使用すること以外には、デコリンについての免疫組織化学的染色を本質的に記載する通り(44)行なう。画像は、デジタルカメラを備えたニコンエクリプスE400顕微鏡によって記録する。デコリンの染色パターンを参考基準として使用するが、その理由は子宮頸部細胞外マトリックス中でのデコリン発現は何度も実証されているからである。TSP2(図1)およびデコリン(図2)は共に、筋繊維間でのマトリックス蓄積の位置で検出される。該平滑筋細胞は、TSP2およびデコリンの場合には非常に弱い染色を示す。

30

40

【0053】

実施例3

子宮頸部バイオマーカーとしてのHAおよびMMP12

自発性の未熟な子宮頸部の軟化の動物モデルの更なる研究において、本発明者は、未熟に軟化した子宮頸部中での上昇したヒアルロン酸(HA)、MMP2、およびMMP12の免疫染色を発見した。従って、本発明者は、子宮頸部中でのHA、MMP2、およびMMP12の増大したレベルが未熟な子宮頸部の拡張のためのバイオマーカーとして有用で

50

あることを意図する。

【0054】

H A レベルを、Kobayashi および共同研究者の方法 (4 5) に従う組織化学を用いて研究する。この検出方法は、ビオチン化 H A 結合性タンパク質の H A との特異的な結合、およびアビジンペルオキシダーゼによるヒアルロン酸結合性タンパク質のその後の視覚化に基づく。対照は、染色配列からビオチン化ヒアルロン酸結合性タンパク質を除外することによって行なう。この技術の特異性は、ストレプトマイセスヒアルロニダーゼの 1 0 m U を用いて 3 7 °C で 1 時間、子宮頸部切片を前処理することによって確立する。該前処理は該切片の染色を完全に排除し、このことはヒアルロン酸結合性タンパク質がマウス子宮頸部切片中の H A に特異的であることを示す。組織形態計測 (イメージ J プログラム (Image J program) を使用) を用いて、染色強度を定量化した。3 個の子宮頸部を各遺伝子型および各在胎期について研究し ; 各子宮頸部の子宮外口領域からの少なくとも 6 高倍率視野を画像解析に使用する。

10

【0055】

野生型マウスにおいて、H A の染色強度は、妊娠の 1 0 日目の 4 . 2 単位 (+ / - 0 . 4 S E M) から、妊娠の 1 4 日目の 6 . 6 単位 (+ / - 0 . 8 S E M) および妊娠の 1 8 日目の 1 3 . 5 単位 (+ / - 1 . 1 S E M) まで増大される。T S P 2 - ヌルマウスにおいて、H A の染色強度は、妊娠の 1 0 日目の 3 . 8 単位 (+ / - 0 . 4 S E M) から、妊娠の 1 4 日目の 1 1 . 9 単位 (+ / - 1 . 4 S E M) および妊娠の 1 8 日目の 1 7 . 4 単位 (+ / - 1 . 0 S E M) まで増大される。妊娠の 1 0 日目では野生型および T S P 2 - ヌル子宮頸部の H A 染色強度の間には検出可能な差違 ($p < 0 . 2 5$) は存在しない。しかしながら、H A 染色強度は、妊娠の 1 4 日目および 1 8 日目の T S P 2 - ヌル子宮頸部中で有意により高い ($p < 0 . 0 1$) ことが出現される。

20

【0056】

M M P 1 2 発現をまた、免疫組織化学的な染色によって研究する。妊娠の 1 4 日目の時限の妊婦からの子宮頸部を研究する。一次抗体 (M M P 1 2 特異的な抗体) を Santa Cruz Biotechnology, Inc. から購入する。M M P 1 2 の場合の染色強度は野生型子宮頸部中では 1 0 . 5 単位 (+ / - 0 . 9 S E M) であり、そして T S P 2 - ヌル子宮頸部中では 1 6 . 5 単位 (+ / - 0 . 5 S E M) まで増大される。組織形態計測 (プロテアーゼについての記載と同様にイメージ J プログラムを使用) を用いて染色強度を定量化する。3 個の子宮頸部を各遺伝子型および各在胎期について研究し ; 各子宮頸部の子宮外口領域からの少なくとも 6 高倍率視野を画像解析に使用する。

30

【0057】

実施例 4

ヒト子宮頸部 / 子宮下部

ヒト子宮下部 (子宮から子宮頸部までの移行を示す組織) 中での T S P 2 の発現を測定する。子宮下部検体を、セントルイス大学の治験審査委員会によって承認されたプロトコールによって得る。検体は、未熟な陣痛以外の徴候として帝王切開を受ける患者から得る。在胎期間の範囲は 2 7 ~ 3 7 週とする。該検体を緩衝化ホルマリン中に固定化し、免疫組織学検査のためにプロセッシングする。T S P 2 に特異的なモノクローナル抗体 (B D Biosciences 社製) を 1 : 5 0 希釈で使用し、続いて西洋わさびペルオキシダーゼ接合二次抗体を用いる。デコリンについての免疫組織化学的な染色は、ポリクローナルヒツジ抗 - ヒトデコリン抗体 (U S Biological 社製) を 1 : 5 0 希釈を使用することを除いて、記載 (4 4) と本質的に同様に行なう。デコリンの染色パターンを参考基準として使用し、その理由は子宮頸部細胞外マトリックス中でのデコリン発現は何度も実証されているからである。該画像は、デジタルカメラを備えたニコンエクリップス E 4 0 0 顕微鏡によって記録する。

40

【0058】

T S P 2 およびデコリンは共に、筋繊維間のマトリックス蓄積の位置で検出する。平滑筋細胞は、T S P 2 およびデコリンの場合には非常に弱い染色が示される。従って、T S

50

P 2 がヒト子宮頸部中に存在することが測定されたことから、当業者は、T S P 2 もまた子宮頸部分泌中に存在するであろうこと（上記）を合理的に予測し得る。

【 0 0 5 9 】

次に、様々な在胎期を代表するバイオプシー検体を T S P について染色し、そしてスライドからの染色強度をイメージJプログラム（N I H イメージプログラムの変形）を用いてデジタル化された画像から定量化する。6 高倍率視野を各検体について見積もる。T S P 2 の染色強度は、在胎期の 2 7 週から在胎期の 3 5 週までの増加傾向、および在胎期の 3 6 週および 3 7 週の間減少傾向を示す（図 1）。

【 0 0 6 0 】

実施例 5

子宮頸部分泌物中のバイオマーカー

候補バイオマーカーの T S P 2、H A、M M P 2、および M M P 1 2 をヒト子宮頸部分泌物中で検出する。在胎期間の 3 7 週での妊婦から得たヒト子宮頸部分泌物を用いて、典型的なバイオマーカーの T S P 2、M M P 2、M M P 1 2、および H A が子宮頸部分泌物中で具体的に検出され得るかどうかを測定する。T S P 2、M M P 2、M M P 1 2 の検出において、該子宮頸部分泌物（総検体の 2 0 %）を電気泳動ロード緩衝液と混合し、そして該試料を 4 %（T S P 2 および M M P 2 の場合）および 1 0 %（M M P 1 2 の場合）のポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させる。ウェスタンブロットおよび膜の洗浄を上記（5 2）の通り行なう。T S P 2 は、モノクローナル抗体（BD Biosciences 社製）を 1 : 1 0 0 希釈で用いて検出し；M M P 2 は、モノクローナル抗体（Calbiochem 社製）を 1 : 1 0 0 希釈で用いて検出し；M M P 1 2 は、ポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology 社製）を 1 : 1 0 0 希釈で用いて検出する。西洋わさびペルオキシダーゼ接合二次抗体を 1 : 5 0 0 希釈で使用する。反応帯域はジアミノベンジジン基質を用いて着色させる。

【 0 0 6 1 】

特異的な反応帯域は矢印によってマークする（図 3）。M M P 2 および M M P 1 2 の分子量は予想通りである（7 2 k D a、および 5 4 k D a）。M M P 1 2 ウェスタンは、別の低分子量の帯域、プロ酵素のタンパク質分解性プロセシングのあり得るサインを示す。T S P 2 帯域の分子量は予想される 6 2 k D a よりも小さかったが、これは子宮頸部分泌物中での T S P 2 のタンパク質分解を示す。

【 0 0 6 2 】

子宮頸部分泌物からの H A をスポット - E L I S A 方法を用いて検出する。該子宮頸部分泌物（総検体の 1 0 %）を 1 M グアニジン H C l および 5 % メルカプトエタノールを含むように調節して、粘膜凝集物を破壊する。該混合物を 1 5 , 0 0 0 × g で 5 分間遠心分離し、そして該上清液をドットブロット装置を用いて P V D F 膜上にロードする。該膜をウェスタンブロットと同一の様式で（ビオチン化 H A - 結合性タンパク質を一次抗体の代わりに置き換え、そしてペルオキシダーゼ接合アビジン化合物を二次抗体の代わりに置き換えることを除く）プロセシングする。

【 0 0 6 3 】

H A プローブの適用は暗色サークル（図 4 中に矢印によってマークした点の頂上の列）を生じ、これは H A の検出を示す。該緩衝液対照の点、および H A プローブを除外した点は、可視の染色シグナルを全く与えない。これらのデータは、H A が子宮頸部分泌物中で特異的に検出可能であることを示唆する。

【 0 0 6 4 】

実施例 6

子宮頸部分泌物試料の収集および分析

試料の収集

子宮頸部分泌物をダクロンスワブを用いて患者から収集する。露出された子宮腔部表面および後膈円蓋をスワブで採取し、そして該スワブを、生理食塩水、トリズマ(Trizma)緩衝液、プロテアーゼインヒビター（E D T A、フェニルメチルスルホニルフルオリド、ペ

10

20

30

40

50

プスタチン)および抗菌剤(アジドナトリウム)を含有する収集バイアル中に入れる。この試料収集方法は、出発物質として子宮頸部分泌物を使用する他の通常の臨床アッセイ(胎児フィブロネクチン)について使用される方法と非常によく類似する(例えば、Colemanら著、「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(これは引用によって本明細書中にとり込む)を参照)。

【0065】

分析のための試料調製

バイオマーカーは、検体を膜上にロードする前に可溶化させる。濃縮尿素/DTT溶液を該収集バイアルに加えて、最終濃度を1M尿素および10mM DTT(ジチオトレイトール)とし、そして該溶液中への該微粒子の完全な放出を達成させる目的でスワブを撹拌する。該スワブを取り出し、そして得られた試料をアリコートに分割する。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)をアリコートのサブセットへ1%の最終濃度まで加え、次いでこのものを沸騰するまで加熱し、15,000×gで10分間遠心分離する。該上清液を、TSP2、MMP2、およびMMP12の検出のため、および他のタンパク質の定量化のために使用する。別のアリコート(または、アリコートのサブセット)を15,000×gで10分間遠心分離し、そして該上清液をHAまたは他のグリコサミノグリカンの検出のために使用する。これらのバイオマーカーは緩衝液中で水溶性であり、そしてこのものは上清液であると予想される。

【0066】

着色を伴うスポット-ELISA分析

清澄化試料をドットプロット装置中にロードし、そして該溶液を高親和性膜(タンパク質バイオマーカーのためのニトロセルロース膜[例えば、TSP2、MMP12、MMP2]、および非タンパク質バイオマーカーのためのPVDF膜)[例えば、HA]を通す。次いで、ニトロセルロース膜を5%粉ミルク溶液(トリス緩衝生理食塩水中)を用いて30分間処理する。次いで、該膜を、タンパク質バイオマーカー(TSP2、MMP2、およびMMP12)に特異的な一次抗体と一緒にインキュベートする。PVDF膜を0.2%BSA(ウシ血清アルブミン)溶液(トリス緩衝溶液中)を用いて30分間処理する。次いで、バイオマーカーとしてHAの場合には、該膜をビオチン化ヒアルロン結合性タンパク質(Calbiochem社から購入)と一緒にインキュベートする。該インキュベートは初期の試験において4で約12時間進行させる。該インキュベート後に、膜をトリス-緩衝化生理食塩水(0.3%ツイーン20を含有)を用いて洗浄し、次いで西洋わさびペルオキシダーゼ接合二次抗体(TSP2、MMP2、およびMMP12の場合)または西洋わさびペルオキシダーゼ接合アビジン(HAの場合)と一緒にインキュベートする。このインキュベート後に、該膜をトリス緩衝化生理食塩水(0.3%ツイーン20を含有)を用いて数回洗浄し、そして着色をジアミノベンジジン基質を用いて行なう。

【0067】

化学発光-ベース検出

比色分析読み取り(上記)についての別の実施態様において、本発明を該アッセイの化学発光ベース検出を用いて行なうことができる。この化学発光ベース検出アッセイを上記の一般的なスポット-エライザプラットフォームを使用し;しかしながら、シグナルの着色の間、化学発光生成基質(例えば、ルミツール)をジアミノベンジジン基質の代わりに使用する。該化学発光シグナルの検出および濃度測定定量化は画像システム(コダックゲルロジック440画像ステーション(Kodak Gel Logic 440 Imaging Station);これは、写真用フィルムの感受性を用いて化学発光シグナルを記録することができる)を用いて実施することができる。この装置は、検出されたシグナルの定量分析を実施するために画像解析ソフトウェアを含む。

【0068】

内部標準

本発明のバイオマーカーベースツールの相対的な特性を考慮すれば、1個以上の内部標

10

20

30

40

50

準を使用して、ベースラインを確立し、そして収集された試料の量を変えるために調節する。内部標準は、妊娠の進行の間、子宮頸部の状態に係らず均一な量で子宮頸部分泌物中に見られるタンパク質を含む。

【0069】

スポット - E L I S A についての標準曲線

組み換えまたは精製の MMP 2、MMP 1 2、および HA の公知の量を、該膜上の量を増大させながらスポットする。これらの物質は、Calbiochem/EMD Biosciences 社 (La Jolla, CA) から商業的に入手可能である。現在、商業的に入手可能な精製 T S P 2 はなく、従って、BD Biosciences 社 (San Diego, CA) 製の R S V - 3 T 3 細胞ライセートを T S P 2 の均一な供給源として使用する。これらの公知物質をドットプロットをロードするのに使用する緩衝液中に溶解する。標準物質についての検出方法は記載 (上記) する方法と同一である。標準的な曲線は、バイオマーカの量に対して濃度測定によって測定される光学密度をプロットすることによって導く。

10

【0070】

濃度測定

スポット - E L I S A アッセイにおける染色されたスポットの光学密度は、該 E L I S A 膜のデジタル化画像を解析し、そして該コダックイメージングステーション内で包埋された画像解析ソフトウェアを用いて光学密度を解析することによって、測定する。HA、MMP 2、および MMP 1 2 についての標準曲線は、試料中のバイオマーカの絶対量の測定を可能とする。T S P 2 についての標準曲線は、光学密度の任意の単位として T S P 2 の量の測定を可能とする。次いで、バイオマーカの量は、単位タンパク質レベルに規格化される。

20

【0071】

タンパク質定量化

該スポット - E L I S A の光学密度を、子宮頸部分泌物中のタンパク質レベルに規格化する。該試料のタンパク質含量は、Chapdelaine ら著 (46) の方法によって測定する。この方法は、膜結合タンパク質上でのアミドブラック溶液の使用、および密度測定による色強度の定量化の達成に基づく。この方法を用いて、細胞ライセート中でのタンパク質レベルを定量化することに成功している (47)。

30

【0072】

実施例 7

子宮頸部分泌物の試験のためのドットプロットプロトコール

子宮頸部分泌物は、ダクロンスワブを用いる膈円蓋から収集する。子宮頸部分泌物の各スワブを、氷冷試料収集用緩衝液 (10 mM トリス / H C l、pH 7.4、0.15 M N a C l、20 mM E D T A、5 μ M ペスタチン A、1 μ M ロイペプチン、10 μ g / m L アプロチニン) の 1.5 mL を含有する 15 mL 青色トップチューブ中に入れる。該試料を、長期間の保存のために - 20 の冷凍室中に置く前に、数日間冷蔵庫中に保存してもよい。

【0073】

抽出のために該試料を解凍し、そして冷却抽出緩衝液 (10 mM トリス / H C l、pH 7.4、2 M 尿素、0.3 M N a C l、20 mM E D T A) の 1.5 mL を該チューブに加える。該チューブ (該スワブをなお含有する) を 30 秒間渦巻き、次いで該スワブを取り出しそして廃棄する。該抽出物を - 20 冷凍室中での保存のために、2 個の 1.5 mL 微量遠心機用チューブ中にアリコートする。

40

【0074】

分析のために、該凍結抽出物を氷上で解凍し、そして微量遠心機内でトップスピードで 10 分間遠心分離する。タンパク質の定量化のために、該上清液の 2 mL を使用し、イムノドットプロットのために、該上清液の 100 mL を使用する。タンパク質定量化は、Chapdelaine ら著, Biotechniques, 2001, 31/478-482 (これは引用によって本明細書中にとり込む) のアミド - ブラック染色方法を用いて行なう。該 B S A 標準物質を 0.5 x 抽出

50

緩衝液中に溶解する。

【0075】

イムノドットプロットを、P V D F (イムノビリオン - P) 膜を用いて行なう。該抽出物 (1 0 0 m L) を、真空ポンプの補助で該膜を通す。該膜をトリス緩衝化生理食塩水 (T B S ; Sambrook, FritshおよびManiatis著, 「Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2版」, CSHLP 1989, CSH, New York (これは引用によって本明細書中にとり込む)) を用いて簡単にすすぎ、次いでT B S中の5%粉ミルクと一緒に室温で1時間インキュベートする。

【0076】

一次抗体を、商業的に入手可能な抗体溶液から粉ミルク / T B S中に1 : 1 0 0希釈で希釈する。抗体を4 で14時間該膜と一緒にインキュベートする。次いで、該膜を、各々0.3% (容量比) ツイーン - 20を含有するT B Sを用いて10分間3回洗浄する。次いで、該膜を、西洋わさびペルオキシダーゼ接合二次抗体と一緒に室温で1時間インキュベートする。該二次抗体を、商業的に入手可能な抗体溶液から粉ミルク / T B S中に1 : 5 0 0希釈で希釈する。次いで、該膜を、各0.3% ツイーン - 20を含有するT B Sを用いて10分間3回洗浄する。

10

【0077】

膜をトリス / H C l、p H 7.4、0.6 m g / m L ジアミノベンジジン、0.03% N a C l、および0.003%過酸化水素を含有する溶液と一緒にインキュベートすることによって、膜を着色させる。該着色プロットを乾燥し、そしてデジタルカメラを用いて写真撮影を行なう。該タンパク質プロットの濃度測定分析およびイムノプロットを、イメージJ (パブリックドメインジャバイメージプロセッシングプログラム (<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/intro.html> から自由に入手可能)) を用いて行なう。濃度測定の結果を図5に提示し、これは、妊娠の進行に伴うマトリックスタンパク質発現の変化を明確に示す。

20

【0078】

実施例8

早期陣痛の予測

ヒトの妊娠患者の臨床治験において、候補バイオマーカーのT S P 2、デコリン、およびM M P 1 2は、早期陣痛に入ることが運命づけられている妊婦の子宮頸部分泌物中でのレベルが増大されることが分かった。

30

【0079】

56妊婦を臨床研究に登録する。全女性が無症候期の初妊婦 (早期陣痛の徴候を全く示さない) である。該女性が、子宮頸部スワブ上で収集された子宮頸部分泌物の検体を提供することに同意した。該子宮頸部分泌物を尿素溶液を用いて抽出し、そして該抽出物をドットプロットフォーマットで研究する。各検体の3組のアリコート将该膜に適用する。タンパク質レベルを、アミドブラック技術 (58) を用いて測定する。T S P 2、デコリン、およびM M P 1 2のレベルを、化学発光検出方法を利用して特異的抗体を用いて測定する。化学発光シグナルをx - 線フィルム上で捕捉し、そして該フィルム上の暗色スポットを濃度測定によって解析して、光学密度値を得る。該暗色スポットはより高い光学密度を生じ、これはより強い化学発光シグナル、従ってより良いバイオマーカーを示す。該光学密度値を該検体のタンパク質含有量に規格化して、光学密度単位 / マイクログラムタンパク質の最終的な測定値を供する。

40

【0080】

患者の個体群において、3女性が検体収集の時点 (27および30週の在胎期) では無症候であることが分かり、次いで彼女らは、33週の在胎期では早期陣痛の症状があると診断される (図6、7および8における早産の危険群)。

【0081】

27 ~ 30週の在胎期の範囲内では、子宮頸部分泌物を27 ~ 30週の在胎期で収集した10女性のマッチングした群が存在するが、しかし、これらの女性は早期陣痛の徴候を

50

決して示さない（図 6、7 および 8 における危険なしの群）。

【0082】

早産の危険群および危険なしの群の平均値を、不等なサンプルサイズおよび不等分散のための t 検定を用いて比較する。危険なしの群内の女性と比較する場合（ $n = 10$ ）、TSP2 およびデコリンのレベル（これは、光学密度 / マイクログラムのタンパク質単位で表す）は早産の危険群（ $n = 3$ ）の女性において有意により高い（ $p < 0.01$ ）。この予備的なデータは、これら 3 つの子宮頸部バイオマーカーがより多数の研究被験者において研究されるべきであることを示唆する。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図 1】図 1 は、在胎期間の週単位での妊娠の様々な期にある女性からの子宮下部組織中のトロンボスポンジン 2 のインシチュ染色レベルの定量化を示す図面である。

【図 2】図 2 は、在胎期間の週単位での妊娠の様々な期にある女性からの子宮下部組織中のデコリンのインシチュ染色レベルの定量化を示す図面である。

【図 3】図 3 は、ヒト子宮頸部分泌試料中でのタンパク質細胞外マトリックス成分の存在を示すウェスタンブロット条片を示す図面である。

【図 4】図 4 は、ヒト子宮頸部分泌試料中でのヒアルロン酸の存在を示すドットブロット条片を示す図面である。

【図 5】図 5 は、妊娠中のヒトから得られる子宮頸部スワブ試料によって免疫学的に検出される、ヒト子宮頸部の様々な細胞外マトリックス成分についての濃度測定値の棒グラフを示す図面である。TSP2 = トロンボスポンジン 2、ADAMTS4 = アルツハイマー疾患関連トロンボスポンジンタイプ 1 モチーフ 4、MMP3 = マトリックスメタロプロテイナーゼ 3、MMP1 = マトリックスメタロプロテイナーゼ 1、MMP8 = マトリックスメタロプロテイナーゼ 8。

【図 6】図 6 は、期間終了時に分娩する場合に対する早産分娩した患者におけるトロンボスポンジン 2（TSP2）レベルの光学濃度測定値の棒グラフを示す図面である。該光学濃度測定値は全タンパク質レベルに規格化した。

【図 7】図 7 は、期間終了時に分娩する場合に対する早産分娩した患者におけるデコリンレベルの光学濃度測定値の棒グラフを示す図面である。該光学濃度測定値は全タンパク質レベルに規格化した。

【図 8】図 8 は、期間終了時に分娩する場合に対する早産分娩した患者における MMP - 12 レベルの光学濃度測定値の棒グラフを示す図面である。該光学濃度測定値は全タンパク質レベルに規格化した。

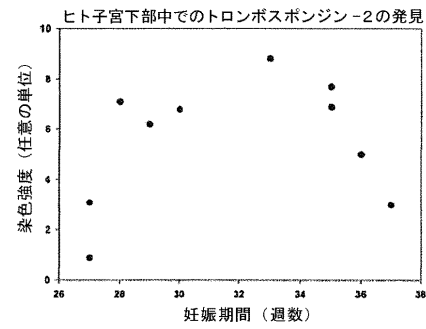
10

20

30

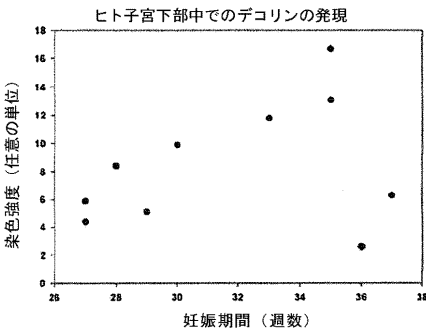
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

図 2



【 図 3 】

子宮頸部分泌物中のMMP2、MMP12およびTSP2の検出

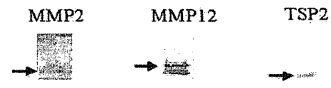


図 3

【 図 4 】

子宮頸部分泌物中のHAの検出

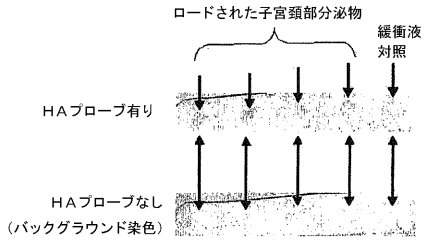


図 4

【 図 5 】

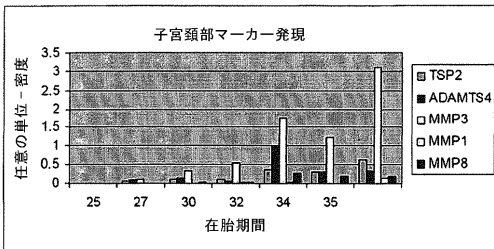


図 5

【 図 7 】

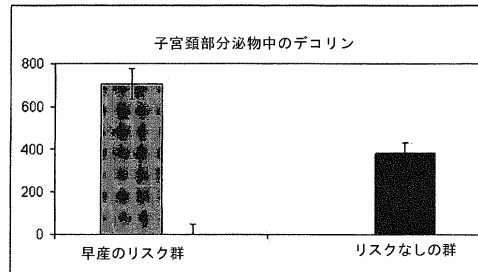


Figure 7: 子宮頸部分泌物中のデコリン

【 図 6 】

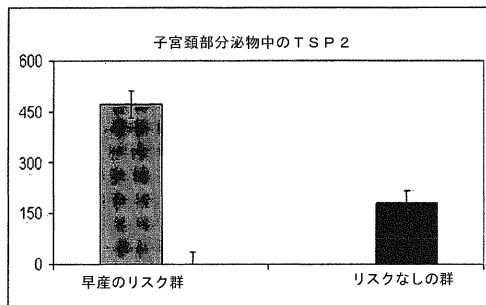


Figure 6: 子宮頸部分泌物中のトロンボスポンジン2

【 図 8 】

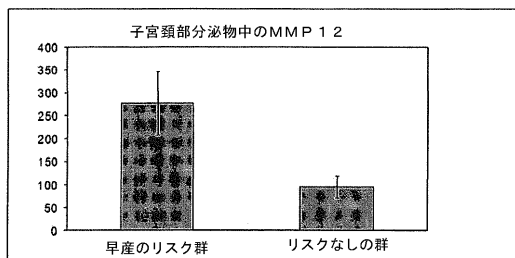


Figure 8: 子宮頸部分泌物中のMMP12

フロントページの続き

(72)発明者 ロベルト・コケニューエシ

アメリカ合衆国 6 3 1 2 2 ミズーリ州セント・ルイス、カークウッド、チェルシー・コート 6 5 1
番

(72)発明者 ジョディー・ライ

アメリカ合衆国 6 3 1 0 5 ミズーリ州セント・ルイス、ウエスト・ポロ・ドライブ 6 7 7 番

Fターム(参考) 2G045 DA12 DA13 DA14

4B063 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ43 QQ52 QR08 QR32 QR56

QR62 QS25 QS34 QX02

【 外国語明細書 】

METHODS AND KITS FOR PREDICTING RISK FOR PRETERM LABOR

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

- [0001] This application is a [non-U.S.] National Patent Application that relates to U.S. Patent Application Serial Number 11/874,717, filed on 18 October 2007.

BACKGROUND OF THE INVENTION

(1) Field Of the Invention

- [0002] The invention relates generally to the diagnosis of an increased risk for pre-term delivery during pregnancy. More specifically, the invention relates to methods and kits useful in the prediction of preterm cervical softening.

(2) Description Of the Related Art

- [0003] Preterm labor, and subsequent delivery of premature infants, continues to remain a major cause of infant mortality and morbidity, as well as a serious economic burden on society. Premature softening of the uterine cervix during pregnancy results in premature cervical dilatation (opening) and effacement (thinning), and puts pregnant women at high risk of premature delivery. Currently there is no diagnostic method to predict premature dilatation of the cervix, and, therefore, the high-risk of preterm delivery can not be predicted in asymptomatic pregnant women.
- [0004] While great strides have been made to decrease infant mortality, there has been little advancement in combating premature labor. Premature labor is now the leading factor in determining infant mortality. In North America, approximately one in ten pregnancies is complicated by preterm delivery. For example, the results of a multicenter trial spanning several years showed that infants born prematurely, i.e., between 20 and 36 weeks gestation, accounted for 9.6% of births (Cooper et al. Amer. J. Obstet. Gynecol. 168: 78, 1993). While there are many identified causes of preterm labor, such as infection and multiple gestation, for many patients the cause is unknown. There has been little advancement in recent decades to develop a method of accurately predicting and treating pre-term labor.
- [0005] Babies born prematurely consume substantial health care resources. The hospitalization cost of preterm births is estimated to exceed \$11 billion annually. The principle short term cost of these births is neonatal intensive care, time spent in the hospital by the parents, social workers and support staff for these parents, loss of

earnings and increased travel expense. The long term cost of these premature births relates to the downstream effects of premature birth, such as long term health and developmental problems, increased risk of mental and physical handicap, which can impact both the child's and parent's earning potential.

[0006] Diagnosis of preterm labor and delivery has continued to be problematic. Currently there are two categories of preterm labor assessment; traditional diagnosis and biomarkers. While each has its advantages both are still relatively poor at differentiating false preterm labor. Traditional diagnosis includes evaluation of the frequency of uterine contractions, status of the membranes, dilatation and effacement of the cervix, and gestational age. Clinical preterm labor is defined as progressive cervical dilatation, effacement, or both, with regular contractions leading to birth before 37 weeks gestation.

[0007] Cervical changes are also traditional indicators of preterm delivery. Cervical changes include a reduction in effacement, and dilatation. When a cervix has a length of less than 1 cm and a dilatation of 2 cm or more, and regular contractions are occurring, preterm labor is diagnosed. However meta-analysis has shown that these criteria are only 50% predictive of preterm birth. Cervical length of less than 1.5cm before 30 weeks gestation was found to be a significant predictor of preterm labor. However, after 30 weeks this measurement is an unreliable predictor. Cervical effacement of more than 80% was also a strong predictive factor. However, assessment of contraction frequency, regularity, duration, and level of perceived pain does not reliably distinguish preterm labor.

Biomarkers in Predicting Preterm Labor

[0008] Presently, several biomarkers are used to attempt to predict preterm labor sufficiently in advance to prevent preterm delivery. Those biomarkers include fetal fibronectin, salivary estriol, decidual proteins, and endocrine/paracrine markers. Two of these biomarkers have been thoroughly studied. Fetal fibronectin (Terao, et al. 5,650,394) and salivary estriol have been studied in some detail, and fetal fibronectin is commercially available. The fetal fibronectin test, currently on market as fFN (Adeza Biomedical /RossProducts Division Abbott Laboratories, Inc), is based on the detection of fetal fibronectin (a fetal-specific glycoform of fibronectin) from vaginal secretions. Current tests are based on the ELISA technique. The theory behind that test is that increased amounts of fetal fibronectin found in vaginal secretions signals

the disturbance of the junction of the fetal membranes and the placental deciduas, and, therefore, an impending delivery. In symptomatic pregnant women, the test has limited effectiveness (58% sensitivity) to predict preterm delivery before the completion of 37 weeks gestation (33). However, the test has better predictive value for deliveries occurring within 1 week of the test (90% sensitivity) (34). Another value of this test is the ability to exclude the possibility of preterm delivery (85% specificity) (35). Thus, in asymptomatic pregnant women (low-risk of preterm delivery) the fetal fibronectin test has low sensitivity, but high specificity for predicting preterm delivery soon after the testing.

Biomechanical Properties of Cervix

[0009] Cervical softening is a gradual physiological process that alters the mechanical properties of uterine cervix in preparation for dilatation and effacement. The uterine cervix, which is the connective tissue-rich sphincter at the overlapping boundary of the uterus and the cervix, functions to ensure the retention of the conceptus in the uterus during pregnancy. In the non-pregnant stage, or very early in pregnancy, the lumen of the cervix is very narrow, and the cervix is able to resist mechanical force to open it. By the end of the pregnancy, however, the cervix becomes highly extensible in order to dilate and efface to allow the passage of the newborn through the birth canal. The gradual increase in extensibility (a.k.a. cervical softening) begins early in pregnancy, and accelerates as pregnancy progresses toward the late stage in the third trimester (8-11). However, the cervix in this late stage is still able to function as a sphincter to retain the conceptus (12-14). The softening stage is followed by the effacement and dilatation stage, which is characterized by increased neutrophil infiltration (15, 16), increased prostaglandin production (17), increased nitric oxide production (18), increased protease activity with concomitant matrix degradation (19), and increased levels of cytokines in the cervix (16). Although the molecular bases of the effacement and dilatation stage are better understood, having this knowledge has not improved the management of the uterine cervix at the time of preterm delivery.

[00010] Remodeling of the stromal extracellular matrix is central to physiological cervical softening. Cervical stromal extracellular matrix is composed of types I and III collagens, proteoglycans, elastin, hyaluronan, and structural glycoproteins (4, 15, 16). This matrix can be considered a fiber-reinforced composite material with load-

bearing types I and III collagen fibers embedded in a viscous matrix of proteoglycans and hyaluronan (20). Altering the alignment of the load-bearing elements, or their degree of dispersal in the matrix changes the mechanical properties of composite materials (21). Ample evidence supports the current concept that cervical stromal extracellular matrix is extensively remodeled during pregnancy. The collagen fibers and bundles are progressively dissociated and disorganized during cervical softening in mice (22), rats, (23, 24), guinea pig (25), sheep (26), and human (27, 28).

Changes in collagen fibril-associated proteins, such as decorin and fibromodulin have been found to correlate with increased cervical extensibility (9, 29, 30). The loss in the degree of collagen crosslinking can also contribute to the increased disorganization of the cervical stroma during pregnancy (31).

[00011] According to observations made in inventor's laboratory, thrombospondin 2 plays a role in the maintenance and transformation of the biomechanical properties of the cervix. Thrombospondin 2 (TSP2) is a multimeric extracellular matrix glycoprotein that is capable of a wide variety of molecular interactions (48, 49), and is functionally distinct from TSP1 (50). Studies of TSP2-null mice have shown that a lack of TSP2 was associated with an altered morphology of fibrillar collagen fibers in skin and tendon (51), and with a corresponding decrease in tensile strength of those tissues.

[00012] Preliminary studies of a TSP2-null mouse, which were conducted in inventor's laboratory, demonstrated a premature cervical softening phenotype. As discussed in a recent paper from inventor's laboratory (32), by day 14 of pregnancy, the TSP2-null mice showed a 4.5-fold increase in cervical extensibility, and by day 18, a 6.1-fold increase, when compared to wild-type mice at the corresponding stages of pregnancy. Western blotting of wild-type cervixes showed that TSP2 expression was detected on day 14 and day 18 of pregnancy, but not on day 10 or in non-pregnant cervixes, indicating that TSP2 expression is correlated to the biomechanical status of the cervix. Additionally, immunohistochemical studies showed that levels of MMP2 in the uterine cervix increased 11-fold on day 14 and 19-fold on day 18 of pregnancy.

[00013] Despite all these investigations and observations, it still remains unclear what is the molecular basis of premature cervical softening and dilatation. This is due in large part to the difficulty of obtaining biopsies of human cervix from high-risk pregnancies, and to the absence heretofore of an animal model with spontaneous premature cervical softening. This lack of experimental systems has made it

impossible to identify key molecular markers of cervical softening and to construct an appropriate diagnostic kit.

References Cited

- [00014] The following references are cited throughout this disclosure using the associated numerical identifiers. Applicant makes no statement, inferred or direct, regarding the status of these references as prior art. These references are incorporated herein by reference.
- [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., Mazor, M., Ghezzi, F., and 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., and 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., and 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., and 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., and Greer, I.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., and 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., and 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., and 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.* 30:235-241.
- [00032] 18. Chwalisz, K., and 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., and 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. and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and Bornstein, P. 2004. Thrombospondin 2 deficiency in pregnant mice results in premature softening of the uterine cervix. *Biol Reprod.* 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, Pietrantoni 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. Leitch 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., and 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., and 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., and 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., and 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.

SUMMARY OF THE INVENTION

- [00067] The inventor has made the surprising and important discovery that a collagen fibril associated protein is involved in changes in the cervix during pregnancy in humans. Thus the inventor envisions that collagen fibril associated proteins, glycosaminoglycans, glycosaminoglycan-associated proteins, and other extracellular matrix components, including structural as well as remodeling and regulatory components (e.g., matrix metalloproteinases ("MMPs")) can serve as biomarkers in

the prediction of preterm cervical softening and the risk for preterm labor in mammals, including humans.

[00068] Thus, the invention is directed to a method of predicting preterm labor in a pregnant woman comprising the steps of obtaining a lower uterine/cervical sample from the pregnant woman, assessing the level of an extracellular matrix component (a.k.a. biomarker) in the sample, comparing the level of the extracellular matrix component to a control standard or a baseline standard, and predicting the risk for preterm cervical softening and preterm labor. The lower uterine/cervical sample can be a lower uterine tissue biopsy, a cervical secretion, or a vaginal secretion. Preferably, the sample is a cervical secretion, which can be obtained non-invasively with a swab.

[00069] Preferred extracellular matrix components include thrombospondin 2 ("TSP2"), hyaluronic acid ("HA"), matrix metalloproteinase 2 ("MMP2"), matrix metalloproteinase 12 ("MMP12"), decorin, lumican and fibromodulin. More preferred extracellular matrix components include TSP2, HA, MMP2 and MMP12. Table 1 provides a list of biomarkers useful in the assessment of the state of cervical softening and the risk for preterm cervical softening.

[00070] The control standard can be a standard amount or a dilution series of an extracellular matrix component. A baseline standard can be a protein or other biomolecules that is constitutively (i.e., not specifically associated with progression of pregnancy) present in lower uterine cells, such as for example actin, glyceraldehyde phosphodehydrogenase ("GAPDH") and the like. The extracellular matrix component can be detected and quantified using any specific biomolecular recognition assay known in the art, such as an antibody assay, an aptamer assay, a ligand-receptor assay and an allosteric enzyme activity assay. A standard antibody assay can be ELISA, western blotting, dot-blotting, RIA, antibody sandwich assay, antibody capture assay, antigen capture assay and the like. One or more biomarkers can be assessed in the method. In an alternative aspect of this embodiment, multiple biomarkers can be assessed and a diagnostic decision can be made based upon a multiplicity of signals.

Table 1: Useful Biomarkers for Assessing Cervical Softening / Risk for Preterm Delivery

Lumican, fibromodulin, decorin, keratocan, PRELP biglycan, mimecan, serglycin, perlecan, agrin, versican, link proteins, CD44, TSG-6, bikunin, inter alpha trypsin inhibitor, hyaluronan synthases, hyaluronidases, elastin, fibulins, fibrillins, tenascin X, heparan sulfate, keratan sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparanase, lysyl oxidase, type V collagen, type VI collagen, type XII collagen, type XIV collagen, type XVIII collagen, type XX collagen, calreticulin, CD47, syndecans, glypicans, lipoprotein receptor-like protein (LRP), ADAM and ADAMTS proteases, E-selectin, L-selectin, platelet factor 4, transforming growth factors beta 1, 2 and 3 (TGF- β), epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factors (FGF) 1 and 2, and platelet derived growth factor (PDGF).

[00071] In yet another embodiment, the invention is directed to a preterm labor test kit which can detect and quantify a biomarker that is associated with risk for preterm cervical softening and preterm labor. In one embodiment, the kit comprises in a first part, which is used in a clinical setting, a swab to obtain vaginally a cervical secretion sample from a pregnant woman, and a buffer. The kit comprises in a second part, which is used in a diagnostic setting, a mechanical support (e.g., membrane, test tube, Petri plate, multiwell plate, or the like), and a first agent that specifically recognizes a biomarker. In a preferred embodiment, the kit comprises in the second part a second agent, a signaling molecule, wherein the signaling molecule is linked to the second agent, and optionally a biomarker to serve as an internal control. An agent (whether first or second) may be an aptamer, a ligand, a receptor, a substrate of an enzyme, a product of an enzyme, an allosteric regulator, an antibody, or a fragment of any thereof, which can bind specifically to the biomarker. In the case of a second agent, the second agent can specifically bind to either a first agent, a biomarker, or both. A preferred first agent is an antibody or antibody fragment that binds specifically to a biomarker. A preferred biomarker is one or more of the following: Decorin, TSP2, MMP2, MMP12 and HA. A signaling molecule can be a luminescent moiety (e.g., fluorescent tag), an enzyme (e.g., HRP or alkaline phosphatase), a radiolabel (e.g., ¹²⁵I), high affinity moiety (e.g., biotin), or the like. In another aspect of the kit embodiment, the kit may comprise, in a single part, a swab

to obtain vaginally a cervical secretion sample from a pregnant woman, a buffer, a mechanical support, a first agent, a second agent, and a control biomarker (supra).

[00072] In another embodiment of the present invention, the kit for the quantification of a biomechanical associated marker is accomplished by measuring the amount of nucleic acid molecules coding for a biomechanical associated marker in the cervical secretion sample.

[00073] In one embodiment of the invention, the nucleic acid molecule to be measured is DNA.

[00074] In another embodiment of the present invention, the nucleic acid molecule to be measured is RNA.

[00075] In one embodiment of the invention, the nucleic acid molecule to be measured is cDNA.

[00076] In yet another embodiment the invention is drawn to a method for determining the risk for preterm labor in a pregnant patient, the method comprising the steps of (a) obtaining a cervical secretion sample from a patient, preferably using a swap, (b) placing the swap containing the cervical secretion sample into a buffer, (c) subjecting the buffer, which contains various biomarkers, to a quantitative immunoassay, (d) determining the relative amounts of one or more biomarkers associated with cervical softening in the sample, and (e) and assessing the risk for preterm labor, based upon those relative amounts. By relative amount of biomarker, what is meant is that the amount of biomarker in a sample is quantified relative to the amount of a baseline control marker in the sample. The baseline control marker is a marker whose level does not change, or changes very little over the course of pregnancy progression. In a preferred embodiment, the sample is taken in a clinical environment, e.g. the doctor's office, placed into the buffer, which helps to maintain the integrity of the biomarkers and baseline control markers in the sample, and transported to a laboratory testing facility. At the laboratory facility, the sample is processed, e.g., as in a quantitative immunoassay or similar-in-principle biomolecular assay, and the one or more biomarker is quantified relative to one or more baseline control marker. The risk for preterm labor is determined based upon the relative amount of one or more biomarker and that risk is communicated to the patient and/or patient's health care worker.

[00077] In a preferred aspect of both the kit and method embodiments, an increase in MMP12, Decorin or TSP2, either alone or in combination with one or more of another

biomarker, significantly above baseline levels, indicates an increased risk for preterm labor. Baseline levels means the average normalized optical density (in arbitrary units as described herein [infra]) of any one or more of the biomarkers expressed in cervical secretions of women who deliver at term. Optical density may be expressed in arbitrary units. Preferably, the preterm positive levels are at least one standard deviation above the normal baseline levels of at least one biomarker. By any one or more, what is meant is that TSP2 alone or in combination with either Decorin, MMP12, or any other biomarker set forth in Table 1 (infra) or multiple combinations thereof, can be quantified and used to determine risk for preterm labor.

[00078] While it is envisioned by the inventors that the cervical samples can be obtained at any point during pregnancy, preferred times to collect a sample include 22 weeks and 26 weeks of pregnancy. More samples at other times can be collected to monitor those cases considered to be of greater risk of preterm labor. In another aspect, since the invention is directed to ascertaining to some degree or other the biomechanical status of the cervix, the test can be provided to a patient prior to induction of labor to assess whether the cervix has the capacity to allow delivery.

[00079] The inventor envisions that the above described cervical biomarker test may be useful in other pregnancy-related assessment situations. For example, this biomarker assay can be used to monitor the effectiveness of therapy to inhibit (stop or slow down) cervical softening and/or uterine contractions. Also the biomarker assay can be used to assess the status of the cervix at anytime during pregnancy (but it shall not be limited to pregnancy situations only) For example, the biomarker assay can be used to determine whether the cervix is sufficiently ready to deliver a baby, such as prior to the administration of pitocin, thereby helping to mitigate downstream problems. The skilled artisan, to which this invention is directed, may reasonable see the applicability of this invention to myriad obstetrical and gynecological tests.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[00080] Figure 1 depicts a graph showing quantification of in situ staining levels of thrombospondin 2 in lower uterine tissues from women at various stages of pregnancy in weeks of gestation.

- [00081] Figure 2 depicts a graph showing quantification of in situ staining levels of decorin in lower uterine tissues from women at various stages of pregnancy in weeks of gestation.
- [00082] Figure 3 depicts western blot strips showing the presence of protein extracellular matrix components in human cervical secretion samples.
- [00083] Figure 4 depicts dot blot strips showing the presence of hyaluronic acid in human cervical secretion samples.
- [00084] Figure 5 depicts a bar graph of densitometry values for various extracellular matrix components of human cervixes as detected immunologically by cervical swab samples obtained from pregnant humans. TSP2 = thrombospondin 2, ADAMTS4 = Alzheimer's disease associated thrombospondin type 1 motif 4, MMP3 = matrix metalloproteinase 3, MMP1 = matrix metalloproteinase 1, MMP8 = matrix metalloproteinase 8.
- [00085] Figure 6 depicts a bar graph of optical densitometry values for thrombospondin-2 (TSP2) levels for patients who had preterm deliveries versus those that delivered at term. The optical densitometry values were normalized to total protein levels.
- [00086] Figure 7 depicts a bar graph of optical densitometry values for Decorin levels for patients who had preterm deliveries versus those that delivered at term. The optical densitometry values were normalized to total protein levels.
- [00087] Figure 8 depicts a bar graph of optical densitometry values for MMP-12 levels for patients who had preterm deliveries versus those that delivered at term. The optical densitometry values were normalized to total protein levels.

DESCRIPTION OF A PREFERRED EMBODIMENT

- [00088] The inventors made the surprising discovery that extracellular matrix components (e.g., thrombospondin 2, MMP2, MMP12, HA and decorin), which are involved in modulating the biomechanical properties of cervix and lower uterine segment in mammals, (1) are expressed differentially during the progression of pregnancy in cervix and lower uterine segments of mammals, in particular humans, and (2) are capable of being detected in cervical secretions. The inventors envision that these and other extracellular matrix components, as well as other biomarkers that are listed in table 1, can serve as biomarkers in the prediction of the risk for preterm labor in pregnant women and in the assessment of the readiness of a cervix for delivery of a baby. Thus the invention is directed to methods of diagnosing and

predicting the risk for preterm cervical softening and concomitant preterm labor in women, as well as the assessment of the readiness of a cervix for delivery, and kits that are useful in the diagnosis and prediction of preterm cervical softening and concomitant preterm labor in women, and in the assessment of the readiness of a cervix for delivery. The method and kit comprise the use of one or more biomarker(s), which is/are demonstrated to be or are reasonably expected to be associated with a change in the biomechanical properties of the cervix and/or lower uterine segment. The biomarkers are preferably but not necessarily limited to extracellular matrix components selected from thrombospondin 2 (TSP2), decorin, fibromodulin, lumican, hyaluronan (HA), matrix metalloproteinase 2 (MMP2, a.k.a. elastase), and matrix metalloproteinase 12 (MMP12).

[00089] In one embodiment of the present invention, a method for determining the risk of a patient going into preterm labor comprises (a) obtaining a cervical secretion sample from a pregnant patient; (b) detection the presence of a biomechanical associated marker in the cervical secretion sample, wherein the biomechanical associated marker is selected from the group consisting of thrombospondin 2 and decorin and combinations thereof; and (c) correlating an increased level of the biomechanical associated marker, as compared to a normalized baseline marker level, to an increased risk of preterm labor.

[00090] In another embodiment of the present invention, the method for determining the risk of a patient going into preterm labor further comprising detecting the presence of matrix metalloproteinase-12 and correlating an increased level of matrix metalloproteinase-12, as compared to a normalized baseline marker level, to an increased risk of preterm labor.

[00091] In another embodiment of the present invention, the method of determination of the risk for preterm labor further comprises the determination for an appropriate treatment protocol for the patient, which includes at least one of the following treatments: i) physical relocation of the patient; ii) administration of drug therapy to the woman; iii) recommendation of a behavioral change to the patient; and iv) closer monitoring of the patient.

[00092] In one embodiment of the invention, the drug therapy to be administered to the patient is progesterone or derivatives of progesterone. Examples of derivatives of progesterone include, but are not limited to, micronized progesterone, injected 17-

- OH progesterone and oral medroxyprogesterone acetate. The progesterone can be delivered to the patient vaginally, sublingually or rectally.
- [00093] In another embodiment of the present invention, the drug therapy to be administered to the patient is a compound that stimulates or blocks uterine contractions. Preferably, the compound that stimulates uterine contractions is pitocin or oxytocin, and the compound that inhibits uterine contractions is an oxytocin analogue.
- [00094] In another embodiment of the present invention, the method of determination of the risk for preterm labor, specifically the detection of a biomechanical associated marker, is accomplished by measuring the amount of nucleic acid molecules coding for the biomechanical associated marker in the cervical secretion sample.
- [00095] In one embodiment of the invention, the nucleic acid molecule to be measured is DNA.
- [00096] In another embodiment of the present invention, the nucleic acid molecule to be measured is RNA.
- [00097] In one embodiment of the invention, the nucleic acid molecule to be measured is cDNA.
- [00098] As discussed herein (supra), the methods and kits can utilize an antibody- or aptamer-based assay to determine the relative amounts in a biological sample of a biomarker that reflects the condition of the lower uterine segment or cervix of a pregnant woman. The biological sample can be a tissue biopsy (cervix or lower uterine segment), a cervical secretion, or a vaginal secretion. The sample can be taken from any pregnant mammal, preferably a human, at any one time or multiple times during pregnancy. In a preferred embodiment for humans, a cervical secretion sample may be taken by a skilled clinician using a swab at 22, 24, 26, 28, 30, and 32 weeks of gestation, times that ensure adequate time to intervene to protect early delivery. However, the skilled obstetrician in the practice of this invention would readily recognize that this invention has applicability at multiple other times during pregnancy to assess the molecular-biomechanical status of the cervix.
- [00099] The following examples describe a kit and method, which use a cervical secretion sample. The skilled artisan will readily appreciate that myriad biomolecular detection methods may be employed in the practice of this invention. For a description of antibody-based methods of detection, see Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL Press, 1988, Cold Spring Harbor, NY, which is herein

incorporated by reference. For a description of aptamer-based methods of detection, see Heyduk and Heyduk, "Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins," *Anal Chem.* 2005 Feb 15;77(4):1147-56, which is herein incorporated by reference.

Example 1: Kit and Method to Assess Biomarkers in Cervical Secretion Sample

- [000100] Cervical secretions are collected with Dacron swabs. The exposed ectocervical surface and the posterior fornix are swabbed, and the swabs are placed into a collecting vial containing physiological saline and preservatives. The sample collection is very similar to that used for other routine assays (fetal fibronectin) that use cervical secretions as the starting material.
- [000101] A concentrated detergent solution is added to the collecting vial, and the swabs are agitated in order to achieve complete release of molecules into the solution. The swabs are removed, and the sample solutions are clarified by brief centrifugation. The clarified samples and aliquots of purified standards (various concentrations of TSP2, HA, MMP2, and MMP12) are loaded into a dot-blotting apparatus, and the solution is drawn through a high-affinity protein-binding membrane (PVDF). The resulting protein spots will be used for protein quantification and for biomarker quantification.
- [000102] The membrane comprising the sample protein spots are treated with a blocking solution (e.g., 5% dry milk in Tris-buffered saline) for 30 minutes. The membranes are incubated with the primary antibodies specific for TSP2, MMP2 and MMP12. In the case of HA detection, a biotinylated hyaluronan-binding protein (from Calbiochem) is used instead of primary antibody. The antibodies and the hyaluronan-binding protein can be dissolved in 5% dry milk solution. Incubation is for about 12 hours at 4°C, or for shorter times at room temperature or 37°C. After the incubation the membranes are washed with Tris-buffered saline, and then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (for TSP2, MMP2 and MMP12), or peroxidase-conjugated avidin (for HA). After this incubation the membranes are washed several times with Tris-buffered saline, and the color development is done using diaminobenzidine substrate. The color intensity is quantified using densitometry.
- [000103] To generate a standard curve, known amounts of TSP2, MMP2, MMP12, and HA are spotted in increasing quantities on a membrane. The detection method is

identical to that described in the previous section (supra). Standard curves will be derived by plotting the staining intensity against the amount of biomarker. Optical densities of the stained spots on the spot-ELISA assays will be determined by analyzing the digitized images of the ELISA membranes using a program such as the Scion 4.2 program. The standard curves for TSP2, HA, MMP2 and MMP12 allows the practitioner to determine the absolute amount of a biomarker in a sample. The amount of a biomarker is normalized to the standard curve control.

[000104] The sensitivity of the assay can be increased by using a fluorescence readout as an alternative to a colorimetric read-out. This fluorescence-based readout is based on the general format of the spot-ELISA described above (supra), wherein a fluorescence-generating substrate is used instead of the diaminobenzidine substrate. The equipment for detection of the signal and the densitometric quantitation is performed essentially as described for the colorimetric approach.

[000105] The whole protein content of the samples can be determined by the method of Chapdelaine et al (46). This method is based on using amido black solution on membrane-bound proteins, and quantifying the color intensity by densitometry. This method has been successfully employed to cells in culture (47).

Example 2: Biomarker Expression in Lower Uterine Segment

[000106] The maintenance of pregnancy to term requires the coordinated function of the uterus and the uterine cervix. The cervix is a sphincter-like structure composed mainly of connective tissue that undergoes substantial remodeling during pregnancy to allow dilatation at term (Leppert, P.C, 1995, Clin Obstet Gynecol, 38:267-79). Abnormal remodeling of the human cervix is thought to cause "incompetent cervix", or milder forms of premature cervical softening and dilatation. These cervical disorders are significant contributors to premature deliveries.

[000107] In order to determine the contribution of individual components of connective tissues to cervical function, inventor chose to study cervical properties of mice deficient in individual proteins of connective tissue. Several collagen fibril-associated proteins (decorin, lumican, fibromodulin, thrombospondin 2) have been shown to regulate morphology of collagen fibrils, and mechanical properties of skin in mice. The objective was to gain a better understanding of the molecular basis of premature cervical softening by determining the characteristics of the cervix of the

thrombospondin 2-null (TSP2-null) mouse (Kyriakides, T.R., et al, 1998, J Cell Biol, 140:419-30).

[000108] The extensibility of the cervix was determined by creep testing, and the cervix of TSP2-null mice showed a 4.5-fold increase by day 14 of pregnancy, and a 6.1-fold increase by day 18 of pregnancy, when compared to wild-type mice (Kokenyesi, R., et al, 2004, Biol Reprod, 70:385-90, which is herein incorporated by reference). The extensibility of the TSP2-null cervix was similar to that of the wild-type cervix in non-pregnant mice and on day 10 of pregnancy. In agreement with the timing of the biological defect, the expression pattern of TSP2 (determined by Western blotting) showed that TSP2 was expressed in the cervix of mice on days 14 and 18 of pregnancy, but not on day 10 or at the non-pregnant stage. In addition to an increased extensibility, a defective biological function of the TSP2-null cervix was also demonstrated in the TSP2-null mice. Mifepristone treatment of mice on day 15 of pregnancy resulted in an accelerated delivery in TSP2-null mice compared to wild-type mice. An increased level of matrix metalloprotease 2 (MMP2) immunostaining was found in the TSP2-null cervix on day 14 and day 18 of pregnancy. Correspondingly, increased MMP2 activity was detected by gelatin zymography in extracts of TSP2-null cervix on day 14 of pregnancy. No MMP9 activity was seen by gelatin zymography. Casein zymography showed no change in caseinolytic activity of the TSP2-null cervix on day 14 of pregnancy. Inventor also evaluated immunohistochemical staining of MMP3 (stromelysin), MMP7 (matrilysin), MMP13 (the major mouse collagenase), and cathepsin G, because these are proteases known in the art to be involved in the remodeling of connective tissues. Densitometric analysis of stained membranes showed no significant change in the staining intensity of any of these proteases in the TSP2-null cervix on day 14 of pregnancy. Inventor failed to detect degradation products of decorin and lumican (two MMP substrates expressed abundantly in the cervix) in the TSP2-null cervix. The expression of tissue inhibitors of metalloproteases (TIMPs) on day 14 of pregnancy was also studied. TIMPS 1, 2, and 4 were detected by immunohistochemical staining; however, densitometric analysis showed the absence of significant changes in the staining intensity. TIMP3 was not detected in the cervix.

[000109] In order to gain a better understanding of the type and magnitude of the ultrastructural alterations in the TSP2-null cervix, applicant used quantitative morphometry to characterize the ultrastructural features of the collagenous stromal

matrix. A standardized sampling protocol was developed to obtain an unbiased representation of the matrix structures on the transmission electron microscopic images. In the TSP2-null cervix on day 14 of pregnancy, applicant observed an increased collagen fibril diameter, altered distribution of fibril diameters, a decrease in the cross-sectional area of collagen bundles, a decreased packing density of collagen fibrils within the bundles, an accumulation of electron lucent particles in between the collagen fibrils, and an increased proportion of the disorganized collagenous matrix.

[000110] The presence of hyaluronan in the TSP2-null cervix was examined by immunohistochemical techniques. The hyaluronan staining was observed more in the stroma, and less in the epithelium. Densitometric analysis showed a significant increase in the hyaluronan staining intensity on day 14 and day 18 of pregnancy, but not on day 10. From these data, the skilled artisan may reasonably conclude that expression TSP2 in the mouse uterine cervix is important for the maintenance of tissue integrity and resistance to mechanical force. Thus, the TSP2-null mouse is the first animal model that allows for the study of spontaneous, premature cervical softening. The premature cervical softening seen in the TSP2-null mouse on day 14 of pregnancy correlates with extensive alterations in the ultrastructure of the stromal matrix and increased MMP2 and hyaluronan levels, while many other protease/protease inhibitor systems are not affected. These findings suggest that the premature cervical softening is brought about by altered balance of assembly/disassembly of collagen bundles with limited involvement of proteolytic action. This data demonstrates that the absence of a single collagen fibril-associated protein can significantly alter cervical extensibility, suggesting that TSP2 and other collagen fibril-associated proteins (such as decorin or lumican) fulfill specific, non-redundant roles in regulation of the integrity of connective tissues. While not wishing to be bound by theory, applicant reasonably speculates that defective expression of any collagen fibril-associated protein or regulator of the cervical extracellular matrix may lead to defective cervical functioning in pregnant women.

[000111] Because TSP2 has not been studied in the human reproductive tract, the inventor carried out an immunohistochemical study on the expression pattern of TSP2 in human lower uterine segment. TSP2 staining was seen in the connective tissue-rich areas located between smooth muscle cells of all specimens ranging from 27 to 36

weeks of gestation. There was little staining of the smooth muscle cells themselves. Staining intensity of TSP2 peaked at 33-35 week of pregnancy, and the staining was less intense at 27-31 weeks, and 36-37 weeks (see figure 1, which depicts quantified TSP2 staining from human lower uterine samples versus gestational stage in weeks.)

[000112] Lower uterine segment specimens were obtained by a protocol approved by the Institutional Review Board of Saint Louis University. Specimens were obtained from patients undergoing Caesarian section for indications other than premature labor. The range of gestational ages was 27 to 37 weeks. The specimens were fixed in buffered formalin, and processed for immunohistochemistry. A monoclonal antibody (from BD Biosciences) specific for TSP2 was used at 1:50 dilution, followed by a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. Immunohistochemical staining for decorin was performed essentially as described (44), except that a polyclonal sheep anti-human decorin antibody (from US Biological) was used at 1:50 dilution. Images were recorded by Nikon Eclipse E400 microscope equipped with a digital camera. The staining pattern for decorin was used as a reference, because decorin expression in the cervical extracellular matrix has been repeatedly demonstrated. Both TSP2 (Figure 1) and decorin (Figure 2) were detected at locations of matrix accumulations between muscle fibers. The smooth muscle cells showed very weak staining for TSP2 and decorin.

Example 3: HA and MMP12 as Cervical Biomarkers

[000113] Upon further study of the animal model of spontaneous, premature cervical softening, inventor discovered elevated hyaluronic acid (HA), MMP2 and MMP12 immunostaining in the prematurely softened cervixes. Thus, inventor envisions that increased levels of HA, MMP2 and MMP12 in the cervix are useful as biomarkers for premature cervical dilatation.

[000114] HA levels were studied using histochemistry following the method of Kobayashi and co-workers (45). This detection method is based on the specific binding of biotinylated HA-binding protein to HA and the subsequent visualization of hyaluronic acid-binding protein by avidin peroxidase. Controls were performed by omitting the biotinylated hyaluronic acid-binding protein from the staining sequence. The specificity of this technique was established by pre-treating cervical sections with 10 mU of *Streptomyces hyaluronidase* at 37°C for 1 hour. Such pre-treatment

completely eliminated staining of the sections indicating that the hyaluronic acid-binding protein is specific for HA in mouse cervical sections. Histomorphometry (using the Image J program) was used to quantify the staining intensity. Three cervixes were studied for each genotype and each gestational stage; at least 6 high-power fields from the external os area of each cervix were used for image analysis.

[000115] In wild-type mice the staining intensity for HA increased from 4.2 units (± 0.4 SEM) on day 10 of pregnancy to 6.6 units (± 0.8 SEM) on day 14 of pregnancy, and to 13.5 units (± 1.1 SEM) on day 18 of pregnancy. In the TSP2-null mice the staining intensity for HA increased from 3.8 units (± 0.4 SEM) on day 10 of pregnancy to 11.9 units (± 1.4 SEM) on day 14 of pregnancy, and to 17.4 units (± 1.0 SEM) on day 18 of pregnancy. There was no detectable difference ($p < 0.25$) between the HA staining intensity of wild-type and TSP2-null cervix on day 10 of pregnancy. However, the HA staining intensity appeared to be significantly higher ($p < 0.01$) in the TSP2-null cervix on day 14 and day 18 of pregnancy.

[000116] MMP12 expression was also studied by immunohistochemical staining. Cervixes from timed pregnant females on day 14 of pregnancy were studied. The primary (MMP12-specific antibody) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. The staining intensity for MMP12 was 10.5 units (± 0.9 SEM) in the wild-type cervixes, and increased to 16.5 units (± 0.5 SEM) in the TSP2-null cervixes. Histomorphometry (using the Image J program as described for the proteases) was used to quantify the staining intensity. Three cervixes were studied for each genotype and each gestational stage; at least 6 high-power fields from the external os area of each cervix were used for image analysis.

Example 4: Human Cervix / Lower Uterine Segment

[000117] The expression of TSP2 in human lower uterine segment (a tissue that represent a transition from the uterus to the cervix) was determined. Lower uterine segment specimens were obtained by a protocol approved by the Institutional Review Board of Saint Louis University. Specimens were obtained from patients undergoing Caesarian section for indications other than premature labor. The range of gestational ages were 27 to 37 weeks. The specimens were fixed in buffered formalin, and processed for immunohistochemistry. A monoclonal antibody (from BD Biosciences) specific for TSP2 was used at 1:50 dilution, followed by a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. Immunohistochemical staining for decorin was performed essentially as described (44), except that a polyclonal sheep anti-human decorin antibody (from US Biological) was used at 1:50 dilution. The staining pattern for decorin is used as a reference, because decorin expression in the cervical extracellular matrix has been repeatedly demonstrated. The images were recorded by Nikon Eclipse E400 microscope equipped with a digital camera.

[000118] Both TSP2 and decorin were detected at locations of matrix accumulations between muscle fibers. The smooth muscle cells showed very weak staining for TSP2 and decorin. Thus, having determined that TSP2 is present in human uterine cervix, the skilled artisan may reasonably expect that TSP2 is likely also to be present in cervical secretions (infra).

[000119] Next, biopsy specimens representing various gestational stages were stained for TSP2, and the staining intensities from the slides were quantified from the digitized images using the Image J program (a variant of the NIH Image program). Six high-power fields were evaluated for each specimen. The staining intensity of TSP2 showed an increasing trend from 27 weeks of gestation to 35 weeks of gestation, and then a decreasing trend during 36 and 37 weeks of gestation (Figure 1).

Example 5: Biomarkers in Cervical Secretions

[000120] The candidate biomarkers TSP2, HA, MMP2, and MMP12 were detected in human cervical secretions. Human cervical secretions obtained from pregnant women at 37 weeks of gestation were used to determine if the exemplary biomarkers TSP2, MMP2, MMP12, and HA can be specifically detected in cervical secretions. For the detection of TSP2, MMP2, MMP12 the cervical secretions (20% of total

specimen) were mixed with electrophoresis loading buffer, and the samples were electrophoresed on a 4% (for TSP2 and MMP2), and a 10% (for MMP12) polyacrylamide gel. Western blotting and the washing of the membranes were performed as previously described (52). TSP2 was detected using a monoclonal antibody (BD Biosciences) at 1:100 dilution; MMP2 was detected using a monoclonal antibody (Calbiochem) at 1:100 dilution; MMP12 was detected using a polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) at 1: 100 dilution. The horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used at 1:500 dilution. Reactive bands were developed using diaminobenzidine substrate.

[000121] The specific reactive bands are marked by arrows (Figure 3). The molecular weight of MMP2 and MMP12 bands were according to expectations (72 kDa, and 54 kDa). The MMP 12 Western shows additional, lower molecular weight bands, a possible sign of proteolytic processing of the pro-enzyme. The molecular weight of the TSP2 band was smaller than the expected 62 kDa, which indicates proteolytic degradation of TSP2 in cervical secretion.

[000122] HA from cervical secretions was detected using the spot-ELISA method. The cervical secretion (10% of the total specimen) was adjusted to contain 1 M guanidine HCl and 5% mercaptoethanol, to disrupt mucus aggregates. The mixture was centrifuged at 15,000 x g for 5 minutes, and the supernatants were loaded onto PVDF membrane using a dot-blotting apparatus. The membranes were processed in an identical manner to the Western blots with the exception that a biotinylated HA-binding protein was substituted for the primary antibody, and a peroxidase-conjugated avidin compound was substituted for the secondary antibody.

[000123] The application of the HA probe resulted in dark circles (top row of dots marked by arrows in Figure 4) indicate detection of HA. The buffer control dot, and the dots where the HA probe was omitted, gave no visible staining signal. These data suggest that HA is specifically detectable in cervical secretions.

Example 6: Cervical Secretion Sample Collection and Analysis

[000124] Sample collection: Cervical secretions are collected from patients with Dacron swabs. The exposed ectocervical surface and the posterior fornix are swabbed, and the swabs are placed into a collecting vial containing physiological saline, Trizma buffer, protease inhibitors (EDTA, phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin), and antibacterial agent (sodium azide). This sample collection process is very similar to

that used for other routine clinical assays (fetal fibronectin) that use cervical secretions as the starting material (See Coleman et al., "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, which is incorporated herein by reference.

[000125] Sample preparation for analysis: The biomarkers are solubilized before loading the specimens onto membranes. A concentrated urea/DTT solution is added to the collecting vial, to bring the final concentrations to 1 M urea, and 10 mM DTT (dithiothreitol) and the swabs are agitated in order to achieve complete release of the macromolecules into the solution. The swabs are removed and the resultant sample is split into aliquots. Sodium dodecyl sulfate (SDS) is added to a final concentration of 1% to a subset of aliquots, which are then heated to boil, centrifuged at 15,000 x g for 10 minutes. The supernatants are used for the detection of TSP2, MMP2 and MMP12, and for other protein quantification. Another aliquot (or subset of aliquots) is (are) centrifuged at 15,000 x g for 10 minutes, and the supernatant is used for the detection of HA or other glycosaminoaglycans. These biomarkers are water soluble in buffer, and are expected to be in the supernatant.

[000126] Spot-ELISA analysis with color development: The clarified samples are loaded into a dot-blotting apparatus, and the solution is drawn through a high-affinity membrane (nitrocellulose membrane for protein biomarkers [e.g., TSP2, MMP12, MMP2], and PVDF membrane for non-protein biomarkers [e.g., HA]). Nitrocellulose membrane is then treated with 5% dry milk solution (in Tris-buffered saline) for 30 minutes. Then the membranes are incubated with the primary antibodies specific for protein biomarkers, e.g., TSP2, MMP2 and MMP12. PVDF membrane is treated with 0.2% BSA (bovine serum albumin) solution (in Tris-buffered saline) for 30 minutes. Then, in the case of HA as the biomarker, the membrane is incubated with a biotinylated hyaluronan-binding protein (purchased from Calbiochem). The incubation proceeds for approximately 12 hours at 4°C in the initial tests. After the incubation the membranes are washed with Tris-buffered saline (containing 0.3% Tween 20), and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (for TSP2, MMP2 and MMP12), or horseradish peroxidase-conjugated avidin (for HA). After this incubation the membranes are washed several times with Tris-buffered saline (containing 0.3% Tween 20), and the color development performed using diaminobenzidine substrate.

- [000127] Chemiluminescence-based detection: In an alternative embodiment to the colorimetric read-out (supra), the invention can be performed using chemiluminescence -based readout of the assays. This chemiluminescence -based assay utilizes the general Spot-Elisa platform described above; however, during the development of signal a chemiluminescence-generating substrate (such as Luminol) is used instead of the diaminobenzidine substrate. The detection of the chemiluminescence signal and the densitometric quantification may be carried out using an imaging system, such as the Kodak Gel Logic 440 Imaging Station, which is capable of recording chemiluminescence signal with the sensitivity of photographic film. This instrument includes an image analysis software to perform quantitative analysis of the detected signals.
- [000128] Internal Standards: Given the relative nature of the instant biomarker-based tool, one or more internal standards are used to establish a base-line and to control for varying amounts of collected samples. Internal standards include those proteins that are found in cervical secretions in uniform amounts regardless of the state of the cervix during the progression of pregnancy.
- [000129] Standard curves for spot-ELISA: Known amounts of recombinant or purified MMP2, MMP12, and HA are spotted in increasing quantities on the membranes. These materials are commercially available from Calbiochem/EMD Biosciences (La Jolla, CA). At present, there is no commercially available purified TSP2, so RSV-3T3 cell lysate from BD Biosciences (San Diego, CA) are used as a uniform source of TSP2. These known materials are dissolved in the buffer used for loading the dot blots. The detection method for the standards is identical to that described (supra). Standard curves are derived by plotting the optical density determined by densitometry against the amount of biomarker.
- [000130] Densitometry: Optical densities of the stained spots on the spot-ELISA assays are determined by analyzing the digitized images of the ELISA membranes, and analyzing the optical density using the embedded image analysis software in the Kodak Image Station. The standard curves for HA, MMP2 and MMP12 allow for the determination of the absolute amount of biomarkers in the samples. The standard curve for TSP2 will allow for the determination of TSP2 amounts as arbitrary units of optical density. The amounts of biomarkers are then normalized to unit protein level.
- [000131] Protein quantitation: Optical densities of the spot-ELISAs are normalized to protein levels in the cervical secretions. Protein content of the samples will be

determined by the method of Chapdelaine et al (46). This method is based on using amido black solution on membrane-bound proteins, and achieving quantitation of the color intensity by densitometry. This method has been successfully used to quantitate protein levels in cell lysates (47).

Example 7: Dot blotting protocol for testing of cervical secretions

- [000132] Cervical secretions were collected from vaginal fornix using Dacron swab. Each swab of cervical secretions was placed into 15 ml blue-top tubes containing 1.5 ml of ice-cold sample collection buffer (10 mM Tris/HCl, pH: 7.4, 0.15 M NaCl, 20 mM EDTA, 5 uM pestatin A, 1 uM leupeptin, 10 ug/ml aprotinin). The samples may be stored in a refrigerator for several days before placing them into -20°C freezer for longer term storage.
- [000133] For extraction the samples were thawed and 1.5 ml of cold extraction buffer (10 mM Tris/HCl, pH: 7.4, 2 M urea, 0.3 M NaCl, 20 mM EDTA) was added to the tubes. The tubes (still containing the swabs) were vortexed for 30 seconds, and then the swabs were removed and discarded. The extracts were aliquoted into two 1.5 ml microcentrifuge tubes for storage in -20°C freezer.
- [000134] For analysis the frozen extracts were thawed on ice, and centrifuged in a microcentrifuge at top speed for 10 minutes. For protein quantification, 2 ml of the supernatants were used, for immuno-dot blotting 100 ml of the supernatants were used. Protein quantitation was done using the amido-black staining method of Chapdelaine et al., *Biotechniques*, 2001, 31/478-482 (which is herein incorporated by reference). The BSA standards were dissolved in 0.5 X extraction buffer.
- [000135] Immuno-dot blotting was carried out using PVDF (Immobilon-P) membranes. The extracts (100 ml) were drawn through the membrane with the aid of a vacuum pump. The membranes were briefly rinsed with tris-buffered saline (TBS; see Sambrook, Fritsh and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.," CSHLP 1989, CSH, New York, which is herein incorporated by reference) and then incubated with 5% dry milk in TBS for 1 hour at room temperature.
- [000136] The primary antibodies were diluted in dry-milk/TBS at 1:100 dilution from the commercially-available antibody solutions. The antibodies were incubated with the membranes for 14 hours at 4°C . The membranes were then washed 3 times for 10 minutes each with TBS containing 0.3% (v,v) Tween-20. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour

at room temperature. The secondary antibodies were diluted in dry-milk/TBS at 1:500 dilution from the commercially-available antibody solutions. The membranes were then washed 3 times 10 minutes each with TBS containing 0.3% Tween-20.

[000137] The membranes were developed by incubating them with a solution containing Tris/HCL, pH 7.4, 0.6 mg/ml diaminobenzidine, 0.03% NiCl, and 0.003% hydrogen peroxide. The developed blots were dried, and photographed using a digital camera. Densitometric analyses of the protein blots and the immuno-dot blots were done using the ImageJ (a public domain Java image processing program available freely at <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/intro.html>.) Densitometry results are presented in Figure 5, which clearly depicts a change in matrix protein expression as pregnancy advances.

Example 8: Prediction of Preterm Labor

[000138] In a clinical trial of human pregnant patients, the candidate biomarkers TSP2, decorin, and MMP12 were shown to have increased levels in cervical secretions of pregnant women destined to enter preterm labor.

[000139] 56 pregnant women were enrolled into a clinical study. All women were asymptomatic primigravidas (showed no signs of preterm labor). The women consented to provide a specimen of cervical secretions that were collected on a cervical swab. The cervical secretions were extracted with a urea solution, and the extracts were studied in a dot-blotting format. Triplicate aliquots of each specimen were applied to the membrane. Protein levels were determined using the Amido Black technique (58). Levels of TSP2, decorin, and MMP12 were determined using specific antibodies utilizing a chemiluminescent detection method. The chemiluminescent signal was captured on x-ray film, and the dark spots on the film were analyzed by densitometry to obtain optical density values. The darker spot gives rise to higher optical density which indicates stronger chemiluminescence signal, and therefore, more biomarker. The optical density values were normalized to protein content of the specimens to provide the final measure of optical density unit/microgram protein.

[000140] In the patient population, three women were found who were asymptomatic at the time of specimen collection (at gestational ages of 27 and 30 weeks), and then they were diagnosed with symptoms of preterm labor at 33 weeks gestation (Preterm Risk Group on Figures 6, 7, and 8).

[000141] Within the 27-30 week gestational age range, there was a matching group of 10 women whose cervical secretions were collected at 27-30 weeks gestation, but these women were never showed signs of preterm labor (No Risk Group on Figures 6, 7 and 8).

[000142] The means of the Preterm Risk group and the No Risk Group were compared using a t test for unequal sample sizes and unequal variances. TSP2 and the decorin levels (expressed in optical density/microgram protein units) were significantly higher ($p < 0.01$) in women in the Preterm Risk Group ($n=3$), when compared to women in the No Risk Group ($n=10$). This preliminary data suggest that these three cervical biomarkers should be investigated in a larger number of study subjects.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for determining the risk of a patient going into preterm labor comprising:
 - a. obtaining a cervical secretion sample from a pregnant patient;
 - b. detecting the presence of a biomechanical associated marker in the cervical secretion sample, wherein the biomechanical associated marker is selected from the group consisting of thrombospondin 2 and decorin and combinations thereof; and
 - c. correlating an increased level of the biomechanical associated marker, as compared to a normalized baseline marker level, to an increased risk of preterm labor.
2. The method of claim 1 wherein the biomechanical associated marker in the cervical secretion sample comprises thrombospondin 2.
3. The method of any one of claims 1-2 wherein the biomechanical associated marker in the cervical secretion sample comprises decorin.
4. The method of any one of claims 1-3, wherein at least one of the biomechanical associated marker in the cervical secretion sample is thrombospondin 2.
5. The method of any one of claims 1-4, wherein the biomechanical associated marker in the cervical secretion sample comprises thrombospondin 2 and decorin
6. The method of any one of claims 1-5, further comprising detecting the presence of matrix metalloproteinase-12 and correlating an increased level of matrix metalloproteinase-12, as compared to a normalized baseline marker level, to an increased risk of preterm labor.
7. The method of any one of claims 1-6 further comprising the determination of an appropriate treatment protocol for the patient.

8. The method of any one of claims 1-7 wherein the appropriate treatment protocol for the patient includes at least one of the following treatments, including i) physical relocation of patient, ii) administration of drug therapy to patient, iii) recommendation of a behavioral change to patient, and iv) closer monitoring of patient.
9. The method of any one of claims 1-8 wherein the drug therapy to be administered to the patient is progesterone or derivatives of progesterone.
10. The method of claim 8 wherein the drug therapy to be administered to the patient is a compound that stimulates or blocks uterine contractions.
11. The method of claim 10 wherein the compound that stimulates uterine contractions is pitocin, or oxytocin.
12. The method of claim 10 wherein the compound that inhibits uterine contractions is an oxytocin analogue.
13. The method of any one of claims 9-12 wherein the method for determining the risk of a patient going into preterm labor is performed before, during, or after administration of drug therapy.
14. The method of claim 1, wherein detecting the presence of a biomechanical associated marker is carried out by measuring the amount of nucleic acid molecules coding for the biomechanical associated marker in the cervical secretion sample.
15. The method of claim 14 wherein the nucleic acid molecule is RNA or DNA.
16. The method of any one of claims 14-15 wherein the nucleic acid molecule is RNA.

17. The method of any one of claims 14-16 wherein the nucleic acid molecule is DNA.
18. The method of any one of claims 14-17 wherein the DNA is a cDNA.
19. A kit suitable for the use in determining the risk of a patient going into preterm labor comprising:
- a. a swab;
 - b. collection buffer;
 - c. an assay for the detection of an increased level of a biomechanical associated marker selected from the group consisting of thrombospondin 2 and decorin and combinations thereof in a cervical secretion sample; packaged in a suitable sealed container.
20. A kit according to claim 19 wherein the assay for the detection of an increased level of a biomechanical associate marker is capable of detecting levels of matrix metalloproteinase-12, matrix metalloproteinase-8, matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-3, matrix metalloproteinase-9, hyaluronidase, lumican, fibromodulin, keratocan, PRELP biglycan, mimecan, serglycin, perlecan, agrin, versican, link proteins, CD44, TSG-6, bikunin, inter alpha trypsin inhibitor, a hyaluronan synthase, hyaluronic acid, elastin, fibulins, fibrillins, tenascin X, heparan sulfate, keratan sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparanase, lysyl oxidase, type V collagen, type VI collagen, type XII collagen, type XIV collagen, type XVIII collagen, type XX collagen, calreticulin, CD47, syndecans, glypicans, lipoprotein receptor-like protein (LRP), an ADAM protease, an ADAMTS protease, E-selectin, L-selectin, platelet factor 4, transforming growth factor beta 1, 2 and 3 (TGF- β), epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factors (FGF) 1 and 2, and platelet derived growth factor (PDGF), and combinations thereof.
21. A kit according to any one of claims 19-20 wherein the assay for the detection of an increased level of a biomechanical associated marker in the

cervical secretion sample is performed by an assay selected from the group consisting of a radioimmunoassay, an enzyme immunoassay, a ligand assay, an immunoradiometric assay, a fluoroimmunoassay, and an enzyme-linked immunosorbent assay.

22. The kit of any one of claims 19-21 wherein the assay for the detection of an increased level of a biomechanical associated marker, is an assay comprising:

- a) a primary antibody to the biomechanical associated marker;
- b) a secondary antibody that recognizes the primary antibody, or the biomechanical associated marker,

wherein the secondary antibody is labeled by chemiluminescence, a radioactive label, a fluorescent label or an enzymatic label.

23. The kit of any one of claims 19-22 wherein the detection of an increased level of a biomechanical associated marker is accomplished by measuring the amount of nucleic acid molecules coding for a biomechanical associated marker in the cervical secretion sample.

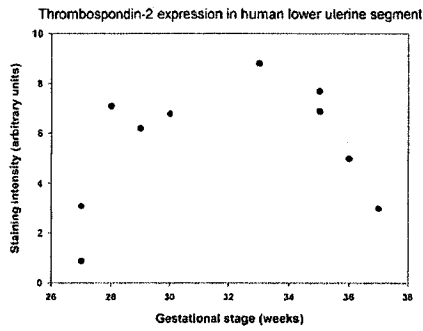
24. The kit of any one of claims 19-23 wherein the nucleic acid molecule to be measured is DNA or RNA.

ABSTRACT OF THE INVENTION

The invention is directed to kits and methods that allow one to predict the risk for preterm labor in a pregnant woman. The inventors have discovered that various extracellular matrix components can be detected in cervical secretions. The quantification of certain extracellular matrix proteins found within cervical secretions can be used as a diagnostic for the biomechanical state of the cervix, which indicates whether preterm labor is likely. Some extracellular matrix components that can be found in cervical secretions include decorin, thrombospondins and matrix metalloproteinases.

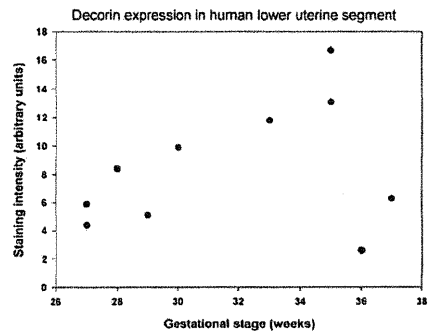
【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】

Figure 2



【 図 3 】

Detection of MMP2, MMP12 and TSP2 in cervical secretions



Figure 3

【 図 4 】

Detection of HA in cervical secretions

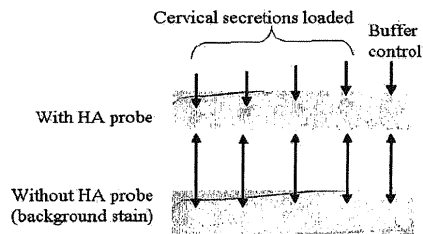


Figure 4

【 図 6 】

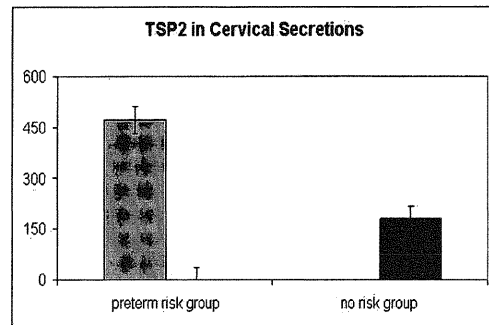


Figure 6: Thrombospondin 2 in Cervical Secretions

【 図 5 】

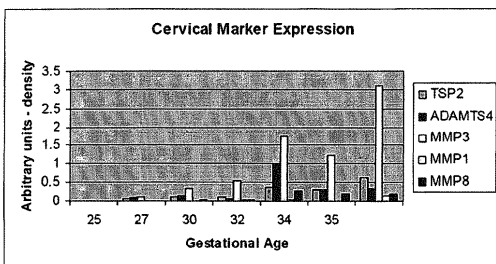


Figure 5

【 図 7 】

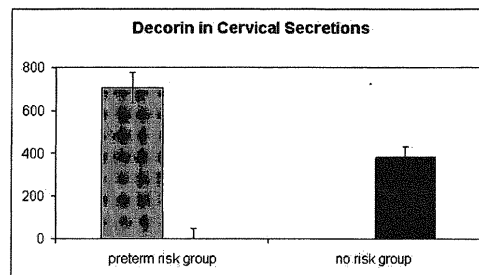


Figure 7: Decorin in Cervical Secretions

【 図 8 】

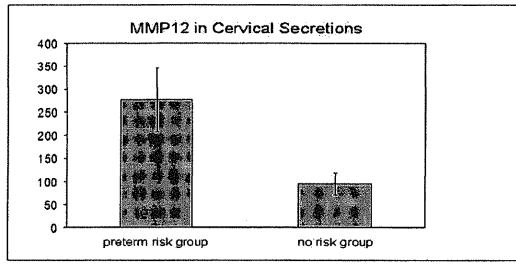


Figure 8: MMP 12 in Cervical Secretions

专利名称(译)	用于预测早产风险的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2009106279A	公开(公告)日	2009-05-21
申请号	JP2008268256	申请日	2008-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	服务标记第二有限责任公司 塞尔维马克二世有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	服务标记第二有限责任公司		
[标]发明人	ロベルトコケニューエシイ ジョディーライ		
发明人	ロベルト・コケニューエシイ ジョディーライ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/37 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A61P43/00 G01N33/689 G01N2800/368 G01N2800/50 G01N2800/60		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/37 G01N33/50.J G01N33/50.P G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	11/874717 2007-10-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够预测孕妇早产风险的试剂盒和方法。解决方案：测量早产患者风险的方法是：a. 从怀孕的患者那里获得宫颈分泌物样品；b. 确定宫颈分泌物样品中是否存在生物力学标记。进行检测，其中所述生物力学相关标志物选自血小板反应蛋白2和核心蛋白聚糖及其组合；c. 与标准化基线标志物水平相比，所述生物力学相关标志物的水平升高。与早产风险增加相关。[选择图]无

【 図 7 】

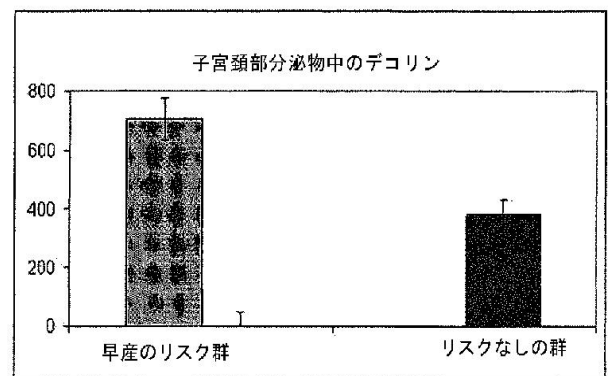


Figure 7: 子宮頸部分泌物中のデコリン