



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106560002 A

(43)申请公布日 2017.04.05

(21)申请号 201580028929.8

卢克·罗姆奥茨

(22)申请日 2015.04.01

(74)专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 11129

(30)优先权数据

代理人 高芬芳

2014901190 2014.04.02 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2016.12.01

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 35/54(2015.01)

PCT/AU2015/050147 2015.04.01

C12Q 1/68(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/149129 EN 2015.10.08

(71)申请人 哈德逊医学研究中心亨利王子医学研究所

地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 洛伊斯·萨拉蒙森

特蕾西·艾杰尔 纳塔利·汉纳

权利要求书3页 说明书18页 附图5页

(54)发明名称

用于分析辅助生育技术成功的预后检测

(57)摘要

本发明提供了一种确定女性受试者胚胎成功植入导致怀孕的可能性的方法。此处启用一种基于怀孕结果的预后评价的改进的辅助生育技术方案。本文提供了一种包括用于预后评估的试剂的组合物。本文给出的是包含在胚胎植入前生物流体样品中生物标志物IL-8、G-CSF和/或VEGFA的水平测定的分析方法。

1. 用于鉴定女性受试者胚胎植入可能的结果的检测方法,所述结果选自怀孕和未孕,所述检测包括测定来自所述受试者液体样品中生物标志物的浓度,所述生物标志物选自包括IL-8,G-CSF和VEGFA的生物标志物,其中所述生物标志物的水平或相对于对照的水平比率为成功怀孕的可能性提供指征。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其中所述生物样品选自由子宫冲洗物、血液、血浆或血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液组成的名录。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其中IL-8或G-CSF的水平升高表示实现怀孕的可能性低。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其中IL-8或G-CSF的水平降低表示实现怀孕的可能性较高。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其中VEGFA的水平升高表示实现怀孕的可能性较高。

6. 根据权利要求1所述的检测方法,其中VEGFA的水平降低表示实现怀孕的可能性低。

7. 根据权利要求1所述的检测方法,进一步能够区分临床妊娠和早期临床妊娠。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其中升高的VEGFA表示临床妊娠。

9. 根据权利要求7所述的检测方法,其中VEGFA水平降低表示早期临床妊娠。

10. 根据权利要求1-9任一所述的检测方法,其中还可以检测选自CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮的生物标志物中的一种或多种。

11. 根据权利要求1所述的检测方法,其中所述女性受试者正在接受激素刺激周期。

12. 根据权利要求1所述的检测方法,其中所述女性受试者正在经历自然排卵周期。

13. 根据权利要求1所述的检测方法,其中所述液体样品是子宫冲洗物样品。

14. 根据权利要求1所述的检测方法,其中所述液体样品是血液、血浆或血清样品。

15. 根据权利要求1所述的检测方法,其中所述液体样品是选自子宫冲洗物、血液、血浆、血清、腹水、淋巴液和尿液的两种或多种。

16. 根据权利要求1所述的检测方法,其中在单边层面测定生物标志物的水平。

17. 根据权利要求16所述的检测方法,其中通过基于抗体的检测测定生物标志物的水平。

18. 根据权利要求1所述的检测方法,其中通过编码每种生物标志物的mRNA的量来测定生物标志物的水平。

19. 一种鉴定接受辅助生育技术程序的女性受试者关于怀孕或未孕的可能性的多重检测方法,并且如果怀孕,所述方法能鉴定出是临床妊娠还是早期临床妊娠,所述分析方法包括测定来自所述受试者的子宫液体中的IL-8,G-CSF和VEGFA的水平,其中,当IL-8和/或G-CSF的水平低时,则认为成功妊娠是有可能的;当IL-8和/或G-CSF的水平高时,则认为成功妊娠可能性较低;如果VEGFA水平高,则认为成功妊娠可能性较高;如果VEGFA水平低,则认为成功妊娠可能性较低;如果VEGFA水平高,则认为可能是临床妊娠;如果VEGFA水平低,则认为极有可能是早期临床妊娠。

20. 根据权利要求19所述的多重检测方法,其中基于所期望的结果,临床医生可以决定不进行胚胎移植。

21. 根据权利要求19所述的多重检测方法,其中所述子宫样品为子宫冲洗物样品。

22. 根据权利要求19所述的多重检测方法,其中在蛋白水平测定IL-8,G-CSF和VEGFA的水平。

23. 根据权利要求19所述的多重检测方法,其中在mRNA水平测定IL-8,G-CSF和VEGFA的水平。

24. 根据权利要求19所述的多重检测方法,其中两种或多种生物标志物的所述水平是水平比率。

25. 根据权利要求19至24任一所述的多重检测方法,其中还可以检测选自CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮的生物标志物中的一种或多种。

26. 根据权利要求19所述的多重检测方法,其中所述女性受试者正接受激素刺激周期。

27. 根据权利要求19所述的多重检测方法,其中所述女性受试者正经历自然排卵周期。

28. 根据权利要求1所述的检测方法或权利要求19所述的多重检测方法,其中IL-8的低水平是从0-15微微克/mI;IL-8的高水平是从20至100微微克/mI;G-CSF的低水平是从0至2000微微克/mI;G-CSF的高水平是从3000至10000微微克/mI;VEGFA的低水平是从0至20微微克/mI;VEGFA的高水平是从30至100微微克/mI;这些水平是3mI子宫冲洗物中的水平。

29. 一种在胚胎植入人类女性之前基于子宫内膜容受性确定是否进行胚胎植入的多重检测方法,所述检测包括测定子宫冲洗物中IL-8,VEGFA和G-CSF的水平,其中IL-8和G-CSF的水平低并且VEGFA的水平升高表示可以进行植入,而IL-8和G-CSF的水平升高并且VEGFA的水平低则表示不进行植入。

30. 根据权利要求29所述的多重检测方法,其中还可以检测选自CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮的生物标志物中的一种或多种。

31. 一种改进的辅助生育技术方案,其中所述程序包括使女性患者镇静并从所述患者上收集卵子,所述改进包括测定子宫样品中的IL-8,G-CSF和/或VEGFA的水平,其中IL-8和/或G-CSF的水平升高且VEGFA的水平低表明怀孕可能性较低,而IL-8和/或G-CSF的水平降低且VEGFA的水平高则表明成功怀孕的可能性较高,因而基于成功怀孕的可能性做出是否继续植入的决定。

32. 根据权利要求31所述的改进的辅助生育技术方案,其中VEGFA水平升高表明是相对于早期临床妊娠的临床妊娠,而VEGFA的水平降低表明是相对于临床妊娠的早期临床妊娠。

33. 根据权利要求31所述的改进的辅助生育技术方案,其中G-CSF水平高表明可能是早期临床妊娠,并且G-CSF水平低表明临床妊娠的可能性较高。

34. 根据权利要求31、32、或33所述的改进的辅助生育技术方案,其中还可以检测选自CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮的生物标志物的一种或多种。

35. 根据权利要求31所述的改进的辅助生育技术方案,其中所述人类女性受试者正在接受激素刺激周期。

36. 根据权利要求31所述的改进的辅助生育技术方案,其中所述人类女性受试者正在经历自然排卵周期。

37. 根据权利要求31所述的改进的辅助生育技术方案,其中在来自所述受试者的子宫冲洗物样品中测定IL-8,VEGFA和G-CSF的水平。

38. IL-8,VEGFA和G-CSF的水平或水平比率在测定临床妊娠胚胎成功植入的可能性水平的检测生产中的用途。

39. 根据权利要求38所述的用途,其中IL-8, VEGFA和G-CSF现有水平的知识提供用于生成算法的培用数据的第一知识库,所述第一知识库基于第二知识库数据的输入为预测实现临床妊娠的成功程度提供概率指数,所述第二知识库数据包括来自具有妊娠成功的未知可能性的患者所述相同的生物标志物的水平。

40. 根据权利要求38或29所述的用途,其中还可以检测选自CRP, IL-17, IL-6和/或孕酮的生物标志物中的一种或多种。

41. 一种鉴定人类女性受试者关于在胚胎植入后区分未孕、临床妊娠和早期临床妊娠的方法,所述方法包括在液体样品中测定IL-8, G-CSF和/或VEGFA的水平,其中IL-8或G-CSF的水平升高表明怀孕的可能性较低,而IL-8或G-CSF的水平降低表示成功怀孕的可能性较高,并且,其中VEGFA相对于对照水平升高则表明是相对于早期临床妊娠的临床妊娠,而VEGFA相对于对照水平降低则表明是相对于临床妊娠的早期临床妊娠。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述液体样品是子宫冲洗物样品。

43. 根据权利要求41所述的方法,其中所述液体样品是血液、血浆、血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液。

44. 根据权利要求41或42所述的方法其中所述液体样品是选自子宫冲洗物、血液、血浆、血清、腹水、淋巴液和尿液的两种或多种。

45. 用于在人类女性受试者中评估子宫内膜容受性的试剂盒,包括检测IL-8, VEGFA和/或G-CSF的配体,以及测定那些生物标志物的浓度的试剂,或检测编码IL-8, VEGFA和/或G-CSF的mRNA水平的试剂。

46. 根据权利要求45所述的试剂盒,进一步包括检测CRP, IL-17, IL-6和/或孕酮中的一种或多种的试剂。

47. 治疗女性受试者以提升所植入的胚胎发展为临床妊娠的可能性的方法,所述方法包括在植入前对所述受试者施以有效剂量的IL-8拮抗剂, G-CSF和/或VEGFA的拮抗剂,或VEGFA促进剂。

48. IL-8拮抗剂, G-CSF和/或VEGFA的拮抗剂,或VEGFA促进剂在药物生产中的用途,所述药物用于提高可导致成功临床妊娠的胚胎的子宫内膜容受性。

用于分析辅助生育技术成功的预后检测

申请信息

[0001] 本申请与2014年4月2日提交的,名称为“预后检测”的澳大利亚临时专利申请No.2014901190有关,并要求其优先权,其全部内容通过引用的方式并入本文中。

背景技术

领域

[0002] 本文公开教导用于确定胚胎成功植入女性受试者体内导致怀孕的可能性的分析方法。本文提供了改进的基于妊娠结果的预后评价的辅助生育技术操作方法。本文给出了包括用于所述预后评价的试剂的组合物。

相关领域的说明

[0003] 作者在本说明书中提到的出版物的著录细节按字母顺序被放在了说明书末尾。

[0004] 本说明书中对任何先用技术的引用都不是,也不应被视为,对该现有技术是任何国家的公知常识的一部分的承认或任何形式的暗示。

[0005] 辅助生育技术(Assisted reproductive technology,ART)对人类女性实现成功怀孕的能力产生了重要的影响。

[0006] 然而,ART过程对于受试者来说是一个具有情绪波动并有压力的体验。能够降低不成功的植入结果将有助于减少这种压力,并降低该程序的整体成本。

[0007] 做为ART在人类临床环境中盛行的标志,MacaIdowie et al. (2013) 澳大利亚和新西兰的辅助生育技术2011,悉尼:澳大利亚新南威尔士大学全国围产期流行病学和统计单位(MacaIdowie et al. (2013) Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand 2011, Sydney: National Perinatal Epidemiology and Statistics Unit, the University of New South Wales, Australia)的报告:,指出,在2011年,澳大利亚使用这种方法的妇女增长了8.3%。在95.1%的案例中,妇女使用的都是自己的(自体同源的)卵母细胞或胚胎。接近三分之一的妇女采用了冷冻/解冻的胚胎。尽管这增加了辅助生育技术的使用,但成功的临床妊娠比率并不太高。事实上,在2011年,仅有23.1%获得了临床妊娠并且只有17.5%的婴儿安全降生(MacaIdowie et al. (2013) supra)。

[0008] 研究了一系列参数,例如,受试者的年龄、自体和卵母细胞/胚胎移植受体周期和相对于冷冻/解冻的胚胎新鲜胚胎的使用,对ART成功与否的影响。但是,仍然需要基于知识的评估方案来辅助临床医生确定女性受试者的子宫是否对胚胎容受性做好了充分的准备。

发明内容

[0009] 本文提供了一种辅助生育技术的改良方案,其中在排卵诱导触发后2天时(OI+2天),如人绒毛膜促性腺激素触发(hCG+2天),促性腺激素释放激素类似物触发(GnRH_a+2天)或其它药物触发2天或相当于早期分泌期的时候,用生物液体样品来评估子宫内膜的容受性。该生物样品包括子宫样品或血液、血浆、血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液样品。用特定的生物标志物确定这一周期内成功植入受精胚胎的可能性的程度,并进一步确定怀孕是临

床妊娠还是早期临床妊娠。改进后的方案使临床医生能够确定是否进行胚胎移植或冷冻储藏胚胎以便后续使用。尽管如此,所述方案还可以用来在辅助生育技术程序中检测子宫内膜容受性。本文包括了一种含有进行所述方法所需试剂的组合物。

[0010] 因此,本说明书提供了一种在植入时间窗口之前(即,在OI+5天,例如hCG+5天或GnRHa+5天时或相当于中期分泌期时)进行的子宫内膜容受性检测方法。根据本发明开发的分析方法可以实现,并且可以在胚胎转移/移植时及时解释结果以减少子宫腔中的干扰。这对减轻潜在的受试者的压力是有效的,并且具有很高的预测结果。在对比多种生物标志物的水平,或2种或多种生物标志物相对于对照水平或比率的水平比率的情况下,所述分析方法是基于知识的。因此,本文提供的是一种基于知识的评估方案,它能使临床医生能够确定胚胎移植导致成功的临床妊娠的相对可能性。

[0011] 本文的分析方法能够确定模拟周期或自然周期内的女性受试者体内的容受性,以便弄清楚在胚胎移植时是否会出现可行的容受性子宫内膜。这帮助临床医生确定是进行胚胎移植还是冷冻胚胎并等待子宫条件更适于成功胚胎转移和移植的自然周期或另一个处理周期。所述方法还可以用于在激素刺激前评估子宫内膜容受性。

[0012] 在一个实施例中,所述样品是激素刺激周期内(相当于早期分泌期时)在收集卵时(hCG诱导排卵后两天[hCG+2天],GnRHa(GnRHa+2天)或其它药物(OI+2days))获得的子宫冲洗样品形式的子宫样品。或者,所述样品是血液、血浆或血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液。所检测的生物标志物包括IL-8,G-CSF和VEGFA。本文所考虑的另外的标志物包括CRP,IL-17,IL-6和孕酮。当IL-8和/或G-CSF的一种或多种的水平低,且/或VEGFA水平高时,所述分析可以确定出合适的子宫内膜容受性。此外,VEGFA的水平还可用于鉴别与早期临床妊娠相比能成功发展成临床妊娠的受试者。高VEGFA水平表示有可能是临床妊娠。可以将那些实际怀孕的人与那些未怀孕的人的进行VEGFA水平的对比。

[0013] 因此,本文提供的是用于鉴定女性受试者胚胎移植可能的结果的检测方法,所述结果选自怀孕和未孕,所述检测方法包括,测定来自所述受试者的液体样品中生物标志物的浓度,所述生物标志物包括IL-8,G-CSF和VEGFA,其中所述生物标志物的水平和水平比例为成功怀孕的可能性提供指征。也可以包括选自CRP,IL-17,IL-6和孕酮的其它标志物。

[0014] 本文提供的是用于鉴定女性受试者胚胎移植可能的结果的检测方法,所述结果选自怀孕和未孕,所述检测方法包括,测定来自所述受试者的液体样品中生物标志物的浓度,所述生物标志物包括IL-8,G-CSF和VEGFA,其中所述生物标志物的水平和水平比例为成功怀孕的可能性提供指征。也可以包括选自CRP,IL-17,IL-6和孕酮的其它标志物。

[0015] 本文提供的是用于鉴定女性受试者胚胎移植可能的结果的检测方法,所述结果选自怀孕和未孕,所述检测方法包括,测定来自所述受试者的血液、血浆、或血清样品中生物标志物的浓度,所述生物标志物包括IL-8,G-CSF和VEGFA,其中所述生物标志物的水平和水平比例为成功怀孕的可能性提供指征。也可以包括选自CRP,IL-17,IL-6和孕酮的其它标志物。

[0016] 本文进一步提供了鉴定接受辅助生育技术程序的女性受试者在怀孕或未孕方面可能的结果的多重检测方法,并且如果怀孕,该方法能鉴定出是临床妊娠还是早期临床妊娠,所述分析方法包括测定来自所述受试者的液体样品中的包括IL-8,G-CSF和VEGFA在内的生物标志物的水平,其中当IL-8和/或G-CSF的水平低时,则认为成功妊娠是有可能的;当

IL-8和/或G-CSF的水平高时,则认为成功妊娠可能性较低;如果VEGFA水平高,则认为成功妊娠可能性较高;如果VEGFA水平低,则认为成功妊娠可能性较低;如果VEGFA水平高,则认为可能是临床妊娠;如果VEGFA水平低,则认为极有可能是早期临床妊娠。多变量分析可以包括来自超过一种来源(例如,子宫冲洗物和血清)的生物标志物或者关于体重指数(BMI)和年龄的生物标志物。

[0017] 本文提供的是用来进行测定一种、两种或全部三种生物标志物的分析的试剂盒。本文还考虑了一种用于辅助分析数据的计算机程序。在一个实施例中,本文提供的分析方法可以用于现有的与病理学服务相关的以知识为基础的架构或平台。例如,所述分析方法的结果可以通过通信网络(例如英特网)传输至储存了算法的处理系统中,并且可以用来生成预测的后验概率值,该后验概率值翻译成导致成功妊娠的子宫内膜容受性或非容受性的可能性指数,然后将该指数以预兆或预测报告的形式转发给临床医生。

[0018] 因此,本文提供了一种包括检测生物标志物浓度所需的试剂以及用于帮助将报告确定并传输至临床医生的电脑硬件和/或软件的组合物或试剂盒或电脑系统。提及所述生物标志物的“水平”还包括IL-8,G-CSF和/或VEGFA的2种或多种的比率测定。

[0019] 同时,IL-8,G-CSF和VEGFA是选定的生物标志物,本发明还包括其它生物标志物,例如,可增强特异性和灵敏度的生物标志物。其它生物标志物包括CRP,IL-17,IL-6和孕酮。这些还可能指,采用患者身体检查参数,例如BMI和年龄的多变量分析。

[0020] 并且,可以在启动辅助生育技术程序之前,进行本发明的主题分析,以评估子宫内膜容受性。所述分析还可以辅助预测早产。

[0021] 所述生物标志物分析的结果还可以开发有利于子宫内膜容受性并协助得到一个良好的临床妊娠结果的药物。例如,IL-8拮抗剂,G-CSF拮抗剂以及VEGFA或VEGFA拮抗剂被提出在促进成功的胚胎移植结果以达到临床妊娠状态方面是有用的。

[0022] 表1提供了缩略词列表。

表1

缩略词

缩略词	定义
-----	----

+2	+ 2 天
+5	+ 5 天
ART	辅助生育技术
AUC	曲线下面积
BMI	体重指数
CRP	C 反应蛋白
CSF3	集落刺激因子 3 (G-CSF)
G-CSF	粒细胞集落刺激因子也称 CSF3 或集落刺激因子 3
GnRHa	促性腺素释放素模拟物
GnRHa+2	相当于周期中的早期分泌阶段, GnRHa (或其它刺激物) 用来诱发排卵
GnRHa+5	相当于周期中的中期分泌阶段, GnRHa (或其它刺激物) 用来诱发排卵
hCG	人绒毛膜促性腺激素
hCG+2	相当于周期中的早期分泌阶段, hCG (或其它刺激物) 用来诱发排卵
hCG+5	相当于周期中的中期分泌阶段, hCG (或其它刺激物) 用来诱发排卵
IL-6	白细胞介素-6
IL-8	白细胞介素-8
IL-17	白细胞介素-17
IVF	体外受精
OI	诱导排卵
缩略词	定义
OI+2	相当于周期中的早期分泌阶段, 用药物来刺激排卵
OI+5	相当于周期中的中期分泌阶段, 用药物来刺激排卵
ROC	接受者操作特性曲线
VEGFA	血管内皮生长因子

附图说明

[0023] 图1是结合了G-CSF, IL-8和VEGFA作为原发性不孕预测指标的多变量算法的ROC曲线图示。91.9%的妇女被正确分类。

[0024] 图2A到C是收集自在hCG+2时(排卵期)接受了ART激素刺激周期的女性的子宫冲洗物中生物标志物水平的图示。分析了样品中的IL-8, G-CSF和VEGFA。用ART周期的结果, 即怀

孕、未孕、早期临床妊娠和有繁殖活力的卵子捐赠者,来定义患者。横杠表示平均值。单位是微微克/mL。

[0025] 图3是hCG+2时(排卵期)女性血清中G-CSF(CSF3)浓度的图示。按照怀孕(血清阳性,n=13)和未孕(血清阴性,n=72)的ART周期的结果将参与者分组。

本发明的详细说明

[0026] 在本说明书中,除非上下文另有要求,应将词语“包括”或其变体,例如“包含”或“含有”,理解成表示包含一个指定的元素或整数或方法步骤,或者元素或整数或方法步骤的组,但并不排除任何元素或整数或方法步骤,或者元素或整数或方法步骤的组。

[0027] 如本说明书所使用的,单数形式“一”、“一个”和“一种”包括复数形式,除非文中另有清楚的规定。因此,例如,提到“生物标志物”包括单一的生物标志物,以及两种或多种生物标志物;提到“胚胎”包括单一的胚胎,以及两个或多个胚胎;提到“公开”包括公开给出的单个方面和多个方面;等等。本文给出和提供的各方面都包括在术语“发明”中。所有这些方面都提供在本发明的范围内。提到“样品”,包括子宫样品、或血液、血浆或血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液样品。

[0028] 除非另有明确表示,本文中使用的各种指定范围内的数值均,就像指定范围内的最小值和最大值的前面均出现了词语“约”或“大约”。此外,采集方式、液体体积以及浓度水平(例如,洗出液比吸引液)将导致不同的范围。尽管如此,本领域技术人员会在不脱离本发明的范围的前提下,为了具体的范围,抵补这里给出的“低”值和“高”值。并且,这些范围的公开旨在作为一个连续的范围,包括最小值和最大值之间的每个值。此外,本发明的主题程序扩展至两种或多种提供数值的标志物,所述数值与导致临床妊娠的成功胚胎移植的可能性水平相关。根据所提供的值,它们都基于采用mi IIIpIex试剂盒的Luminex平台。不同分析平台的使用可能导致不同的值。可以采用转换因子使不同分析平台所得到的值等同于Luminex平台所得到的值。通过估计确定灌洗的稀释因子:稀释因子=血清浓度除以灌洗尿液浓度。“OI+2”表示通过人绒毛膜促性腺激素(hCG)或通过其它药物或激素例如但不限于促性腺激素释放激素模拟物(GnRHa)诱导排卵后两天。

[0029] 与妊娠有关的“成功”不一定代表该妊娠将足月。其它后期的着床因素可能导致流产。提到成功的妊娠意味着不论妊娠最终结果的临床妊娠进展。

[0030] 为人类女性受试者在鉴定辅助生育技术之后可能的成功妊娠的结果方面提供一种子宫内膜容受性快速、高效以及灵敏的检测。

[0031] 本文给出了用来鉴定潜在的人类女性受试者关于自体同源的、冷冻/解冻的、或异源的胚胎移植在成功妊娠的可能性方面的检测方法。如上面所述,成功的妊娠指临床妊娠的发展。本质上,细胞因子生物标志物是从液体样品中确定的,在取样和转移周期内对患者怀孕或没有怀孕以及早期临床妊娠或临床妊娠的可能性方面进行辨别。所述生物标志物在确定使用捐赠的卵子或捐赠的受精胚胎的受试者实现妊娠成功与否方面也是有用的。可以将所述生物标志物考虑为单独一组或与患者身体特征组合,比如BMI和年龄。关于“液体样品”,包括子宫冲洗物、血液、血浆和血清、腹水、淋巴液、组织液和尿液。生物标志物可以从一个来源或从两个或多个来源的液体样品中确定(例如,子宫冲洗物和血清)。

[0032] 所述生物标志物包括IL-8, VEGFA和G-CSF。所列的生物标志物的顺序并不代表关于它们对预后结果的重要性或相关性的权重。并且,还可以包括另外的生物标志物,例如

CRP、IL-17, IL-6和孕酮。相对于对照来确定这些生物标志物的水平,包括两种或以上生物标志物的水平比率。对照包括研究中的一组受试者的水平,或者可以利用通过大量研究得到的数据库统计得出。关于“第一知识库”,其包括生物标志物的水平或水平比率与确定的妊娠结果之间的相关性的形式的数据。第二知识库代表来自接受预后检测的受试者的数据。第二知识库里的数据与第一知识库相比较,来确定成功妊娠的可能性。此外,生物标志物可以用身体参数,例如BMI和年龄,以及从两种不同的来源(例如,来自子宫冲洗物的IL-8,G-CSF和VEGFA以及来自血液、血浆或血清的IL-6和/或孕酮)中进行多变量分析。

[0033] 本质上,人类女性受试者可以在自然周期后或者激素刺激治疗后进行卵子收集。此时测定的生物标志物的水平或比率在确定是否进行接下来的胚胎受精或等待下一轮周期方面是有用的。在一个实施例中,这一周期中的IL-8或G-CSF水平升高或低水平的VEGFA表示成功妊娠的可能性较低。或者,低水平的IL-8或G-CSF或高水平的VEGFA表示成功妊娠的可能性较大。检测结果也适用于在辅助生育技术程序中的激素刺激前的检测子宫内膜容受性且本文也涉及这种检测。

[0034] 在采集卵子时,女性受试者通常是镇静的,并且这时方便获得子宫样品用于检测生物标志物的水平。在一个实施例中,用软导管来灌注1-10mI随后用来子宫冲洗的生理盐水。同时,穿刺样品也同样适用,为了现有程序的目的,子宫冲洗被认为是最佳的。关于“1-10mI”的生理盐水,包括1,2,3,4,5,6,7,8,9和10mI。1-3mI的生理盐水被认为是最佳的。所述样品可以检测编码IL-8,G-CSF或VEGFA的蛋白水平或相关的mRNA水平。穿刺可以在5-1,000 μ I范围。在另一实施例中,从血液、血浆或血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液中测定所述生物标志物。在另一实施例中,在一份样品(例如,子宫冲洗物)中测定IL-8,G-CSF和VEGFA,并在另一份样品(例如,血液、血浆或血清)中测定CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮。在进一步的实施例中,可以单独测定全部的IL-8,G-CSF,VEGFA,CRP,IL-17,IL-6和孕酮,或结合BMI与年龄测定。

[0035] 在女性受试者睡眠状态和采集子宫样品的时候,可以方便地测定所述生物标志物的水平和/或比率以鉴别出具有胚胎植入预期结果的受试者。结果包括怀孕或未孕。对于那些怀孕的受试者,所述生物标志物还可以预测临床妊娠或早期临床妊娠。在一个实施例中,G-CSF的水平减少表示可能的妊娠结果。升高的G-CSF水平表示表示妊娠的可能性降低。可以用IL-8获得类似的结果。另一方面,降低的VEGFA水平更有可能与不良的妊娠结果有关。如上所述,本检测方法可以用于在辅助生育技术程序中的刺激之前检测子宫内膜容受性。

[0036] 为了使那些受试者怀孕,与VEGFA的水平降低相关的早期临床妊娠相比较,VEGFA的水平升高代表可能是临床妊娠。

[0037] 因此,本文给出了一种用于鉴定女性受试者关于辅助生育技术中胚胎移植预期结果的方法,所述方法包括确定液体样品中生物标志物的水平,所述生物标志物包括IL-8,G-CSF和/或VEGFA,其中IL-8和/或G-CSF的水平升高表示成功妊娠的可能性较低,并且IL-8和/或G-CSF的水平降低表示成功妊娠的可能性较高,并且在VEGFA水平降低表示较低可能性的成功妊娠的结果的条件下,妊娠应当是成功的,该妊娠是临床前妊娠而不是临床妊娠。

[0038] 因此,VEGFA的水平升高表示成功妊娠,并且该妊娠为临床妊娠。还可以测定其它标志物或因子,包括CRP,IL-17和/或IL-6的水平,以及BMI的水平和患者的年龄。

[0039] 本文提供的是一种用于鉴定女性受试者关于胚胎移植的可能的结果的检测方法,

所述结果选自怀孕和未孕,所述检测包括,测定来自受试者的子宫样品的生物标志物的浓度,所述生物标志物选自包含IL-8,G-CSF和VEGFA在内的生物标志物,其中所述生物标志物的水平或水平比率为成功妊娠的可能性提供指示。

[0040] 本文使用的是一种多重检测,用来鉴定接受辅助生育技术程序的女性受试者在怀孕或未孕方面的可能性,并且如果怀孕,能鉴定出该怀孕是临床妊娠还是早期临床妊娠,所述检测包括测定来自所述受试者的液体样品中IL-8,G-CSF和VEGFA的水平,其中当IL-8和/或G-CSF的水平低时,则认为成功妊娠是有可能的;当IL-8和/或G-CSF的水平高时,则认为成功妊娠可能性较低;如果VEGFA水平高,则认为成功妊娠可能性较高;如果VEGFA水平低,则认为成功妊娠可能性较低;如果VEGFA水平高,则认为可能是临床妊娠;如果VEGFA水平低,则认为极有可能是早期临床妊娠。

[0041] 在一个实施例中,所述液体样品是子宫冲洗物样品。在另一个实施例中,所述液体样品是血液、血浆、血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液。

[0042] 在一个实施例中,所述女性受试者或者接受激素辅助周期,或者是自然周期。在一个实施例中,在任意激素辅助周期开始前评估子宫内膜容受性。

[0043] 同时,对于在卵子收集期间一次获得子宫样品,这是这方便的,现有的程序并不妨碍多个样品的获取。然而,优选地,女性受试者在收集卵子时被取样或者,对于拥有冷冻/解冻胚胎的女性受试者来说,取样在激素辅助周期的OI+2天时(例如hCG+2或GnRH+2或有另外的药物触发OI)或在相当于早期分泌期的时候进行。可以通过hCG或其它药物诱导排卵,例如但不限于GnRHa。血液或其它液体样品可以在任何时间获得,并且获得它们是微创的。在患者进行卵子采集的同时方便地获取非灌洗样品。

[0044] 所述生物标志物的水平或水平比率可以与经历了周期或处在非周期阶段的受试者相比较,或者与一组接受类似程序的女性相比较,或者与通过统计试验数据收集的第一知识库相比较。如上所示,在检测对象中测定的生物标志物的水平代表未知的预测结果的第二知识库。将所述第二知识库与第一知识库相比较。

[0045] 同时,并不旨在限制主题方法的解释,关于生物标志物的水平“升高”或“降低”的具体值,举一个降低与升高的G-CSF的例子,样品0-2,000皮克/mI为降低,而样品3,000至10,000皮克/mI为升高。这些数字在来自3mI的子宫冲洗物中是有代表性的且会基于样品收集的精确方法而改变。

[0046] 水平降低的VEGFA的例子是,样品为0至20皮克/mI,而样品30至100皮克/mI为水平升高。这些数字在来自3mI的子宫冲洗物中是有代表性的,并且它们会基于样品收集的精确方法而改变。

[0047] 降低的IL-8的示例是指样品为0-15皮克/mI,而升高的IL-8指样品为100皮克/mI。这些数字在来自3mI的子宫冲洗物中是有代表性的,并且它们会基于样品收集的精确方法而改变。

[0048] 这些数值都基于Luminex平台。范围可以基于所使用的病理学平台而不同。

[0049] 本发明并不受限于所有女性受试者中的这些数值范围,但这里给出的范围仅在将由临床医生监测的可能的水平方面给出了指导。此外,可以考虑患者的身体特征,例如BMI和年龄。

[0050] 本文提供的这种鉴定检测方法尤其可以用在现有的知识体系结构或与病理学/临

床服务有关的平台中。在一个实施例中,通过通信网络(例如,英特网)将检测的结果传输至处理系统,该处理系统中存储有运算程序,并可以用来生成预测的后验概率值,该值翻译成具体结果的概率,然后以预兆或预测报告的形式被发送至终端用户(例如,临床医生)。

[0051] 因此,所述检测可以是试剂盒或电脑系统的形式,其包括检测所述生物标志物浓度所需的试剂,并且所述电脑硬件和/或软件有利于报告的确定及传送给临床医生。

[0052] 因此,本文使用了一组生物标志物,包括IL-8,G-CSF和/或VEGFA。这组包括了一组生物结合剂或配体,用来检测所述生物标志物中的任意一种、任意两种或多种或全部三种的水平。因此,可以对子宫或其它样品进行包括IL-8,G-CSF,VEGFA,IL-8+G-CSF,IL-8+VEGFA,G-CSF+VEGFA,IL-8+VEGFA或IL-8+G-CSF+VEGFA在内的生物标志物的检测。还可以测定IL-8,G-CSF和/或VEGFA中的两种或多种的比率。还可以在任何激素治疗开始前检测这些生物标志物,以评估子宫内膜容受性。可以包括其它生物标志物,例如CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮。

[0053] 本文提供了一种用于鉴定女性受试者关于胚胎移植的可能结果的预后检测,所述结果选自怀孕或未孕,并且,如果是怀孕,能鉴定出是临床妊娠还是早期临床妊娠,所述检测包括,测定来自所述受试者的液体样品中的选自IL-8,G-CSF和VEGFA的生物标志物的浓度;其中所述生物标志物的水平或水平比率为成功妊娠的可能性提供指征。如上所示,可以选择并检测所述三种生物标志物中的任意一种或多种。测定全部三种可以提高预后检测结果的灵敏度和特异性水平。在不脱离主题发明范围的前提下,还可以包括另外的生物标志物。

[0054] 本文进一步提供的是一种用于鉴定女性受试者在胚胎移植方面的可能的结果的预后检测,所述结果选自怀孕或未孕,并且,如果是怀孕,能鉴定出是临床妊娠还是早期临床妊娠,所述检测包括,测定来自所述受试者的液体样品中的选自IL-8,G-CSF,VEGFA,CRP,IL-17,IL-6和孕酮的生物标志物的浓度。如上所示,可以是IL-8,G-CSF或G-CSF中的任一种或多种,或者IL-8,G-CSF,VEGFA,CRP,IL-17,IL-6或孕酮中的两种或多种。此外,所述“结果”包括早产或不会足月的妊娠的可能性。

[0055] 在一个实施例中,所述液体样品是子宫冲洗物。在一个实施例中,所述液体样品是血液、血浆、血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液。在一个实施例中,所述生物标志物在两种或多种不同的液体样品中测定。

[0056] 在一个实施例中,本文给出的是一种用于鉴定女性受试者在胚胎移植方面的可能结果的检测,所述检测包括测定来自所述受试者的液体样品中的生物标志物的浓度,所述生物标志物选自包括了IL-8,G-CSF和VEGFA的生物标志物;将这些浓度水平进行第一知识库数据产生的算法运算,所述第一知识库数据包括了来自具有已知妊娠状态结果的受试者相同的生物标志物的水平,其中所述算法为所述受试者怀孕或未孕进程的提供概率指数。关于“算法”,是一种进行多变量分析功能的运算。后者可以包括例如BMI和年龄等因素。所述运算可以进一步区分临床妊娠和早期临床妊娠。

[0057] 在一个实施例中,所述女性受试者正在接受激素刺激。在另一个实施例中,所述女性受试者正在经历自然排卵周期。

[0058] 所述第一知识库的数据还可以来自具有已知的妊娠结果的多个受试者或多组受试者。

[0059] 所述生物标志物的水平或浓度的测定建立了基于相对于对照组的生物标志物浓度的诊断规则。所述诊断规则或者基于一种统计和机器学习算法的应用。另外,这种算法使用了生物标志物和培训用数据中观察到的植入结果(具有已知的结果状态)之间的关系,以推算出随后用来预测即使是未知状态下的植入状态的关系。采用了为受试者将怀孕,并且一旦怀孕,是临床妊娠还是早期临床妊娠的可能状态的提供概率指数的算法。该算法执行一种多变量分析功能。

[0060] 因此在一个实施例中,本发明基于统计与机器学习算法的运用提供了一种诊断规则。这种算法使用了生物标志物和培训用数据中观察到的植入结果(具有已知植入状态)之间的关系,以推算出随后用来预测即使具有未知状态的受试者的状态的关系。数据分析领域的技术人员知道,在本发明没有重大改变的前提下,可以使用培训用数据中的很多不同形式的推算关系。

[0061] 本发明考虑到知识库的培训用数据的使用,从而生成在输入第二个知识库数据时提供一种预测可能的结果的概率指数的算法,所述培训用数据包括来自具有已知植入结果的受试者的生物标志物的水平,所述第二个基于知识的数据包括来自具有位置植入结果的受试者的相同生物标志物的水平。

[0062] 所述“受试者”一般是人类女性。在一个实施例中,所述人类女性选自生育年龄范围内。但是,本发明可延伸应用至兽医领域。因此,所述受试者可以是非人类的雌性哺乳动物,例如牛、马、羊动物或非人类的灵长类动物。尽管如此,本发明特别适用于在人类女性中检测胚胎植入活动的结果。

[0063] 术语“培训用数据”包括相对于对照的生物标志物的水平的知识。这是第一知识库。“对照”包括在具有已知成功或失败的植入状态的受试者或受试者组的生物标志物的水平,或者可以是基于试验统计确定的水平。术语“水平”还包括生物标志物的水平比率。

[0064] “培训用数据”还包括IL-8,G-CSF和/或VEGFA中的一种或多种的浓度。所述数据可以包括这些生物标志物中的增加或减少信息。另外的生物标志物还可以包括,例如CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮。

[0065] 本发明进一步涉及用于鉴定接受辅助生育的女性受试者的试剂板,所述试剂板包括特异性结合生物标志物的试剂,所述生物标志物包括IL-8,G-CSF和/或VEGFA,所述试剂板被用于测定所述生物标志物的一种或多种的水平,并随后将所述水平进行第一知识库数据产生的算法,所述第一知识库数据包括来自在胚胎移植方面具有已知状态的受试者相同生物标志物的水平,其中所述算法提供为已经或还未成功怀孕的受试者提供概率指数。“成功”怀孕是一种导致临床妊娠的怀孕。“成功”怀孕的定义并不将导致流产的后续活动考虑在内。可以检测另外的生物标志物例如CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮。

[0066] 所检测的女性受试者体内的所述生物标志物的浓度或水平提供本文所指的作为“第二知识库数据”的输入检测数据。所述第二知识库数据要么相对于对照考虑,要么被输入至由第一知识库数据产生的算法中,第一知识库数据包括具有已知植入结果的受试者体内的生物标志物的水平信息。所述第二知识库数据来自具有胚胎移植活动方面的未知状态的受试者或受试者组。所述算法的输出是概率或可能性因素,作为本文所指的成功怀孕的受试者就最终实现临床妊娠而言的概率指数。可以在一种液体样品(如,子宫样品或血清)中或从两种或多种来源(例如,子宫样品和血清)中测定水平。

[0067] “特异性结合”所述生物标志物的所述试剂一般包括免疫活性分子,例如抗体或杂交体,衍生物包括重组体或其修饰形式,或其抗原结合片段。所述试剂还可以是受体或其它配体。这些试剂辅助测定所述生物标志物的水平。

[0068] 因此,本发明进一步提供了选自IL-8,G-CSF和/或VEGFA的生物标志物的固定化配体反应板。所述反应板包括1、2或全部3种生物标志物配体。还可以包括另外的生物标志物,例如CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮。在一个实施例中,所述反应板是1、2或全部3种生物标志物的配体形式的试剂组合。这种配体包括IL-8,G-CSF和/或VEGFA的抗体。试剂组合还包括IL-8,G-CSF,VEGFA,CRP,IL-17,IL-6和孕酮中的三种或多种的结合或检测试剂,附带条件是所述结合或检测试剂至少对IL-8,G-CSF和/或VEGFA中的两种或多种具有特异性。

[0069] 本发明的另一个方面涉及用于鉴定女性受试者辅助生育方面的结果的组合或试剂盒。所述试剂盒包括物质的组合,所述物质包括IL-8,G-CSF和/或VEGFA的配体的一种或多种;所述试剂盒进一步包括有利于与配体结合的生物标志物的浓度测定的试剂。在使用中,所述试剂盒有利于生物标志物的测定。然后用所述水平或水平比率与对照比较,或接受第一知识库数据产生的算法运算,所述第一知识库数据包括来自具有已知植入结果状态的受试者或受试者组的水平,其中所述算法提供所述已有或没有特定结果的受试者的概率指数。在一个实施例中,所述结果为怀孕或未孕。在其它实施例中,所述结果为临床妊娠或早期临床妊娠。

[0070] 所述配体,例如每种生物标志物的特异性抗体,为所述至少两种或多种生物标志物提供定量或定性检测或测定。关于“水平”,包括质量体积浓度,单位体积活性或每体积单位或其它适当的代表单位,以及水平比率。

[0071] 所述“样品”包括子宫样品,例如子宫冲洗物或穿刺物。子宫冲洗物提供最一致的数据。尽管如此,所述检测可以被调整使用血液、血浆或血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液。或者,所述样品为进行生化检查的组织样品。

[0072] 在接受辅助生育技术程序的受试者中鉴定至少IL-8,G-CSF和/或VEGFA的水平有助于鉴别植入结果。基于本文公开的内容,本领域技术人员还可以确定另外的能提供更好的灵敏度和特异性的生物标志物。这样确定也被认为落入本发明的保护范围。

[0073] 如上所述,所述“配体”或“结合剂”等术语,指任何能够特异地或基本特异地(具有有限的交叉反应性)结合所述生物标志物抗原表位的化合物、组合物、或分子。所述“结合剂”一般具有单一特异性。尽管如此,本文还涉及对两个或多个生物标志物具有多重特异性的结合剂。所述结合剂(或配体)是典型的抗体,例如单克隆抗体,或其衍生物或类似物,但也包括并不限于,Fv片段;单链Fv(scFv)片段;Fab'片段;F(ab')₂片段;人源化抗体和抗体片段;骆驼化抗体和抗体片段;以及前述物质的多价形式。还可以酌情使用多价结合试剂,包括但不限于:单一特异性的或双特异性的抗体;例如二硫键稳定的Fv片段、scFv串联体[(scFv)₂片段]、双抗体(diabodies)、三抗(tribodies)体或四抗体(tetrabodies),它们通常是共价连接的,或者以其它方式稳定的(即,亮氨酸拉链或螺旋稳定)scFv片段。“结合剂”还包括如本领域所述的适体。

[0074] 制备抗原特异的结合剂的方法,包括抗体和它们的衍生物和类似物和适体,都是本领域已知的。多克隆抗体可以通过免疫动物获得。单克隆抗体可以根据一般的(杂交瘤)方法来制备。抗体衍生物和类似物,包括人源化抗体,可以通过从编码单克隆抗体的DNA中

分离DNA片段,以及根据标准方法将合适的V区域亚克隆化形成合适的表达载体来重组制备得到。文献中描述了噬菌体展示和核酸适体技术,并且可以用亲和力极低的交叉反应对抗原特异的结合试剂进行体外克隆扩增。噬菌体展示试剂和系统可以商购获得,并且包括重组噬菌体抗体系统(RPAS),可以从新泽西州皮斯卡塔韦的安发玛西亚生物技术公司(Amersham Pharmacia Biotech, Inc. of Piscataway)商购,pSKAN噬菌体展示系统可以从佛罗里达州马可岛MoBiTec公司(MoBiTec, LLC of Marco Island, Florida)购得。核酸适体技术记载在下面这些文献中,例如但不限于,美国专利号5,270,163;5,475,096;5,840,867和6,544,776。

[0075] ECLIA法,ELISA法和Luminex LabMAP免疫测定法是用来检测所述生物标志物水平的检测方法的示例。在一个实施例中,第一结合剂/抗体与表面接触,并且包括可检测基团的第二结合剂/抗体与所述第一抗体结合。可检测基团的示例包括,例如但不限于:用来结合第二结合剂的荧光基团、酶、抗原表位(例如,当所述第二结合剂/抗体是一个鼠抗,它可以被荧光标记的抗鼠抗体检测到),例如抗原或结合对的成员,如生物素。所述表面可以是平面的表面,例如,可以是典型的网格型阵列(例如,但不限于,96孔板或平面微阵列)的情况,或,非平面的表面,例如,包被的微珠阵列技术,每“种”微珠都是被标记的,例如,被荧光标记的(例如美国专利号6,599,331,6,592,822和6,268,222中记载的Luminex技术)或被量子点技术标记的(如美国专利号6,306.610中所记载)。这种检测也可以被视为实验室信息管理系统(LIMS)。

[0076] 在微珠形式的免疫检测中,可以使用Luminex LabMAP系统。LabMAP系统包含用两种光谱不同的荧光染料内部染色的聚苯乙烯微球。使用这些荧光染料的精确比例,创建一个由100个不同的具有特定光谱地址的微球组组成的阵列。每个微球组可以在其表面处理不同的反应物。因为微球组可以被他们的光谱地址所识别,所以可以将它们结合,从而在一个单独的反应容器中允许同时测定多达100种不同的分析物。三分之一与报告分子耦合的荧光染料对在所述微珠表面发生的生物分子相互作用进行定量。当在Luminex分析仪中通过两个独立的激光器时,在快速流动的液流中分别查询每个微球。高速数字信号处理基于各自的光谱地址区分出所述微球,并在几秒钟内定量出每个样品所述表面发生的反应。

[0077] 如本文所使用的,“免疫检测”指免疫的分析法,通常是,但不完全是,可以检测和定量所需的生物标志物的夹心分析法,所述生物标志物是IL-8,G-CSF和/或VEGFA。还可以测定另外的生物标志物,例如,CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮。

[0078] 用来测定子宫IL-8,G-CSF和/或VEGFA中一种或多种的水平的检测产生的数据可以用来在女性受试者中确定胚胎移植活动的发展至临床妊娠的可能性。包括一种或多种生物标志物的水平的数据的输入与对照比对,或将其输入可提供成功妊娠的可能性值的算法。关于如上所述的“成功妊娠”,指怀孕。还可以区分出进一步的结果例如临床或早期临床妊娠。辅助生育技术方法还可以通过题述的预后检测进行监测。

[0079] 如上所述,本文给出了用于通过测定特定识别的生物标志物的水平并利用这些水平作为算法中的第二知识库数据来鉴定女性受试者关于胚胎植入预期结果的方法,所述算法通过第一知识库数据或具有已知植入结果的患者中相同生物标志物的水平产生。还提供了从临床妊娠中鉴别出早期临床妊娠的方法,包括在受试者液体样品中测定特定识别的选自至少IL-8,G-CSF和VEGFA的生物标志物的存在和/或速率。“速率”表示在患者样品中所述

生物标志物浓度随时间的变化。

[0080] 术语“对照样品”包括任何可被用于建立第一知识库数据的来自具有已知胚胎植入结果的受试者的样品。

[0081] 本发明的所述方法可以用来测定辅助生育技术周期的可能的结果(即,怀孕或未孕)。本发明还可以用来监测怀孕进展,并监测胚胎植入前的特定治疗是否有效。尤其是,所述方法可以用来确定子宫内膜是否存在最容易接受的植入发生并发展至临床妊娠的条件。

[0082] 如上所示,抗体可以用在一些依靠所述生物标志物和所述抗体的抗原决定簇之间的结合相互反应的任何免疫检测中。这种检测的示例有,放射性免疫测定、酶免疫测定(如,ECLIA,ELISA)、免疫荧光检测法、免疫沉淀法、乳胶凝集反应、血凝反应和组织化学试验。所述抗体可以用来检测和定量样品中所述生物标志物的水平,以便测定导致成功怀孕的可能性水平的子宫内膜容受性。

[0083] 本发明的所述抗体还尤其可以用在免疫组化分析中,例如,在细胞层面或亚细胞层面,检测某种生物标志物,将其定位到特定的细胞和组织上,以及进行特定的亚细胞定位,并定量其表达水平。

[0084] 本领域已知的用光学和电子显微镜定位抗原的细胞化学技术可以用来检测所述生物标志物。通常,本发明的抗体可以用可检测的物质标记,并且基于可检测物质的存在,生物标志物蛋白可以在组织和细胞中定位。可检测的物质的示例包括,但不限于,如下:放射性同位素(例如, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I),荧光标记(例如,FITC、罗丹明、稀土荧光粉),发光标记例如发光氨;酶标记(如,辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶,荧光素酶,碱性磷酸酶,乙酰胆碱酯酶)、生物素基团(它可以用标记的抗生物素蛋白检测,例如,含有可以通过光或热的方法检测出的荧光标记或酶活性的链酶亲和素),可被次级报告分子(例如,亮氨酸拉链对序列,第二抗体的结合位点,金属结合域;表位标记)识别的预定的多肽表位。在一些实施例中,标记是通过不同长度的间隔臂连接的,以减少潜在的空间位阻。还可以将抗体与高电子密度物质耦合,例如铁蛋白或胶体金,它们很容易被电子显微镜观察到。

[0085] 所述抗体或样品可以被固定在可固定化细胞、抗体等物质的载体或固体支持物上。例如,所述载体或支持物可以是硝化纤维、或玻璃、聚丙烯酰胺、辉长岩、和磁铁矿。所述支持物可以具有任何可能的构造,包括球形的(例如,微珠)、圆柱状的(例如,检测管或检测孔的内表面,或者检测棒的外表面)、或平面的(例如,板材、测试条)。还可以使用间接的方法,该方法中,通过引入对生物标志物蛋白具有抗体反应特异活性的第二抗体,扩大初级抗原-抗体的反应。通过实例,如果对生物标志物蛋白具有特异性的抗体是兔IgG抗体,所述第二抗体可以用本文所描述的可检测的物质标记的羊抗鼠 γ -球蛋白。

[0086] 在放射性标记被用来作为可检测的物质的条件下,所述生物标志物可以通过放射自显影技术定位。可以通过用各种光学方法测定所述放射自显影中的粒子密度对放射自显影技术的结果定量。

[0087] 在此所描述的本发明的方法还可以用微阵列进行,例如寡核苷酸微阵列、cDNA微阵列、基因组DNA微阵列、或抗体微阵列。

[0088] 在一个实施例中,本发明的方法涉及检测编码所述生物标志物的mRNA,并涉及基于表达水平测定生物标志物的水平。本领域技术人员可以构建在样品中检测编码所述生物标志物的mRNA序列所用到的核苷酸探针。合适的探针包括基于编码所述生物标志物区域的

至少五个依次的氨基酸的核酸序列的核酸分子,优选包括15至30个核苷酸。核苷酸探针可以用可检测的物质标记,例如,可提供适当信号并具有足够半衰期的放射性标记,例如 ^{32}P , ^3H , ^{14}C 或其它。其它可以使用的可检测物质包括可以被特定标记的抗体、荧光化合物、酶、标记抗原的特异抗体和发光化合物所识别的抗原。可以选择合适的标记,所述标记具有能够被检测到的探针对核苷酸的结合率和杂交率以及可用于杂交的核苷酸的数量。标记的探针可以在固体支持物上与核酸杂交,例如沙姆布鲁克等,分子克隆实验指南(第2版),1989(Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. (2nd ed.), 1989)中记载的硝酸纤维素滤膜或尼龙膜。可以用核算探针检测编码所述生物标志物的基因。在一个实施例中,通过具体确定生物标志物的表达水平用所述探针鉴定女性受试者。

[0089] 所述探针可以被用在杂交技术中,用来检测编码生物标志物蛋白的基因的表达。所述技术一般涉及,在有利于探针与核酸的互补序列进行特异性退火的条件下,用探针接触并孵育来自女性受试者子宫样品或其它细胞来源的核酸(例如,mRNA)。孵育后,去除没有退火的核酸,并检测那些已经与探针杂交的核酸的存在。

[0090] mRNA的检测涉及将mRNA逆转录成cDNA和/或用扩增方法例如聚合酶链式反应(PCR)对特定的基因序列进行扩增,接着用本领域技术人员熟知的技术分析所扩增的分子。合适的引物可以由本领域技术人员常规设计出来。

[0091] 本文所述的杂交和扩增技术可以用来定量和定性检测编码所述生物标志物的基因的表达。例如,RNA可以从已知表达了编码所述生物标志物的细胞或组织中分离出来,并利用本文涉及的杂交(如,标准的Northern分析)或PCR技术来检测所述RNA。该技术可以用来检测因正常或异常的选择性剪接造成的转录物大小之间的差别。该技术可以用来检测正常个体和那些表现出肿瘤症状的个体中检测到的有关生物标志物蛋白或基因全长和/或选择性剪接转录物的水平的定量差异。

[0092] 所述引物和探针可以用在上述的原位检测方法中,即,直接用在子宫内膜活检获得的患者组织的组织切片(固定的和/或冷冻的)上。

[0093] 本发明提供一种鉴定女性受试者关于胚胎移植的特定的结果的方法,包括:

- (a) 提供来自所述受试者的液体样品;
- (b) 提取包括来自所述样品的选自IL-8, G-CSF和VEGFA的生物标志物基因或其蛋白的mRNA的核酸分子;
- (c) 采用聚合酶链式反应扩增所提取的mRNA;
- (d) 检测编码所述生物标志物的mRNA的水平;并
- (e) 将一种或多种所述生物标志物的水平进行可提供胚胎植入可能结果的概率指数的运算。可以测定其它标志物,例如CRP, IL-17, IL-6和/或孕酮。一个实施例中的“液体样品”包括子宫冲洗物。在另一个实施例中,它是血液、血浆、血清、腹水、淋巴液、组织液或尿液。而在另一个实施例中,筛选两种或多种液体样品中的生物标志物。在一个实施例中,生物标志物水平被测定并用来与患者的BMI和/或年龄结合进行多变量分析。

[0094] 本文所述的方法可以用预制并包装好的诊断试剂盒进行,试剂盒包括用来进行本发明所述任意方法所需的试剂。例如,所述试剂盒可以包括至少一种本文所述的具体的核酸或抗体,其可以被方便地用在,例如,临床设备中,以筛选和诊断患者,并筛选和鉴定那些具有关于胚胎成功植入的子宫内膜容受性的个体。所述试剂盒还可以包括用于在所述聚合

酶链式反应中扩增编码所述生物标志物的核酸引物。所述试剂盒还可以包括本发明的方法中有用的核苷酸、酶和缓冲液以及电泳标记,例如200bp梯度标记。所述试剂盒还包括开展本发明的所述方法的详细说明。

[0095] 本文所提供的是一种基于算法的筛选检测,用于筛选来自接受辅助生育技术程序的女性受试者的样品。通常,输入数据基于一种或多种选自IL-8,G-CSF和VEGFA的生物标志物的水平收集得到,并进行一种运算,以评估水平的任何升高或降低的统计显著性,这些信息是随后的输出数据。用于评估输入数据的计算机软件和硬件也包括在本发明中。

[0096] 本发明的另一方面涉及一种治疗接受辅助生育技术程序的女性受试者的方法,所述方法包括对受试者进行诊断检测,确定IL-8,G-CSF和/或VEGFA中的一种或多种的水平,生成成功的胚胎植入的概率指数,并且在女性受试者具有非容受性的子宫内膜的风险的前提下,为受试者提供所述生物标志物的促进剂或拮抗剂,以形成容受性的子宫内膜。

[0097] 本发明进一步提供一种或多种选自IL-8,G-CSF和VEGFA的生物标志物的水平在概率指数的产生中的使用,用于诊断检测中,以预测出胚胎植入后的具体结果。

[0098] 本发明的检测允许结合至现有或新开发的病理架构或平台系统中。例如,本发明涉及一种允许用户测定受试者关于胚胎植入的预测结果的状态的方法,所述方法包括:

通过通信网络从所述用户那接受以IL-8,G-CSF和/或VEGFA的浓度或水平的形式的数据;

通过提供可能性指数值的运算处理所述数据;

根据所述可能性指数值与预定值相比较的结果确定所述受试者的状态;并

将所述受试者的状态的指征通过通信网络传达给用户。

[0099] 方便起见,所述方法一般还通常进一步包括:

让用户利用远程终端站确定数据;并

将来自所述远程终端站的数据通过通信网络传递给基站。

[0100] 所述基站可以包括第一和第二处理系统,这种情况下所述方法可以包括:

(a) 传递所述数据至第一处理系统;

(b) 传递所述数据至第二处理系统;并

(c) 使所述第一处理系统执行算法功能并生成可能性指数值。

[0101] 所述方法还可以包括:

将所述算法功能的结果传递至所述第一处理系统;并

使所述第一处理系统确定所述受试者的状态。

[0102] 如上所述,可以筛选其它生物标志物例如CRP,IL-17,IL-6和/或孕酮。

[0103] 关于上面所列的“算法”或“算法功能”包括多变量分析功能的性能。除上面所描述的那些以外,还可以执行一系列不同的架构和平台。应当意识到,可以使用适用于实施本发明的任何形式的架构。但是,使用分布式的架构是一种有益的技术。尤其是,在各自的地理位置可提供多个终端站。这可以通过降低数据带宽成本和要求增加系统的效率,并确保如果一个基站发生拥堵或出错,其它基站会接管过来。这也允许负载均衡,保证系统入口在什么时候都是可用的。

[0104] 在这种情况下,需要确保另一个基站包括相同的信息和识别标志,使得不同的终端站可以使用。

[0105] 应当意识到,在一个实施例中,所述终端站可以是手持式设备,例如掌上电脑(PDAs)、手机、等等,它们能将受试者数据通过通信网络例如英特网传送给基站,并接收报告。

[0106] 在上面这些方面中,术语“数据”表示所述生物标志物的水平或浓度。所述“通信网络”包括英特网。当使用服务器时,通常是客户服务器或更具体地是简单对象应用协议(SOAP)。

实施例

[0107] 通过下面非限制性的实施例进一步描述本文公开的各方面。

实施例1

子宫内膜容受性测试

[0108] 在植入的窗口期之前(hCG+5天或相当于分泌期中期)进行子宫内膜容受性预测试验,用于IVF临床。hCG可以用其它能引起排卵诱导触发的药物代替(例如,GnRH α)。这样既保证了完成检测程序以及结果报告/解释的时间,又把胚胎移植/植入时子宫腔中的干扰降至最低。在一组收集自有孕育能力和不孕妇女的子宫冲洗物样品中检测十种推荐的子宫内膜容受性标志物(在容受性分泌期中期研究中确定的)。不同于以往的研究,这些样品都是在她们自然周期的分泌期早期(早期容受性)阶段收集得到的。

[0109] 测试组包括有孕育能力(n=19)和原发性不孕(n=18)的妇女,对于原发性不孕妇女,男性因素、排卵、和输卵管缺陷等可能导致她们不孕的原因已被排除。

表2提供了选择标准。

表2

子宫内膜容受性的分泌早期标志物鉴定试验中包括的妇女受试者的纳入与排除标准

	有孕育能力的妇女	不孕妇女
数量	19	18
年龄(均值 \pm 标准差)	36 \pm 4 岁	35 \pm 5 岁
纳入标准	在自然怀孕之前	无在先的怀孕
排除标准	卵巢和输卵管异常	男性因素、卵巢和输卵管异常

[0110] 对个体分析物以及他们的比率进行Kruskal-Wallis分析,发现G-CSF(p=0.007),以及G-CSF/VEGFA(0.004)和VEGFA/IL-8(0.078)的比例在可孕妇女和不孕妇女之间存在统计学上的显著差异。在其它检测的分析物中,另外的分析物在可孕和不孕之间不存在统计学上的显著差异。

[0111] 受试者工作特征曲线分析(ROC)发现G-CSF(AUC=0.760,p=0.001).VEGFA和IL-8

存在显著性结果,但没有达到它们能提供阳性AUC值分别为0.658和0.589的显著性。ROC曲线还分析了这三种分析物的比例,发现如下显著性结果:G-CSF/VEGFA (AUC=0.778, $p=0.001$), 和VEGFA/IL-8 (AUC=0.670, $p=0.066$)。

[0112] 多变量逻辑分析确认G-CSF, VEGFA和IL-8的组合以图1所示的91.9%的诊断效率(ROC的AUC=0.969, $p<0.001$)提供了诊断特征。数据显示出较高水平的灵敏度和特异性。在错误分组的三名妇女中,两名为可孕的,一名为不孕的。应当注意的是,当评估这些数据时,现有文献并没有确定妇女是每一轮周期可孕还是孕育能力真正持续,因此,可能的情况是,征集到的一些妇女之前可孕,但现在不孕。

[0113] 本实施例中报道的研究检测了从自然周期中处于分泌期早期的具有正常生育能力的或原发性不孕的妇女中收集的样品。而本检测的预期用途是,在怀疑是非容受性子宫内膜的条件下,用于那些因原因不明性不孕症而接受辅助生育技术(ART)的妇女。这些妇女大多接受了刺激周期。虽然可以设想的是,在ART刺激开始前检测子宫内膜容受性可能是有用的,但在刺激周期内预测容受性以确定胚胎移植时是否存在一个可行的容受性子宫内膜,也许更重要。这会帮助临床医生确定是否继续进行胚胎移植或冷冻胚胎并等待一个子宫条件更有利于胚胎移植或植入的自然周期或治疗周期。

实施例2

接受ART的小组分析

[0114] 因此,在刺激周期内对一小组接受ART的女性进行了分析。在激素刺激周期内的hCG+2天(相当于分泌期早期)的卵子收集期间收集了子宫冲洗物。可以使用其它物质触发排卵,例如GnRHa或其它药物。随后将患者分为“怀孕”、“未孕”、或早期临床妊娠(即,虽有初始的阳性妊娠检测结果,但超声未检测到胚囊)。此外,还检测了来自正常可孕的正接受激素刺激周期的作为卵子捐助者的妇女的冲洗物。

[0115] 结果(图2)表明,与那些怀孕的相比较,没有怀孕的妇女体内的G-CSF被显著上调($p=0.0002$)。并且,可以看出,在被刺激的卵子捐赠者中,她们的G-CSF水平与实现妊娠的不孕妇女中的类似。对于结果是早期临床妊娠的妇女,她们的G-CSF达到了成功妊娠组的最高值。这与显示升高的G-CSF表明不孕的子宫内膜的早期数据一致。

[0116] 妊娠不成功和那些经历早期临床妊娠的女性体内的VEGFA都是降低的。这可能暗示,当G-CSF不能从早期临床妊娠中区分出妊娠时,VEGFA可以潜在地进行这种区分。

[0117] 没有获得怀孕的女性体内的IL-8的水平与那些怀孕的女性相比较并无显著提高。这与自然周期的初步研究中显示的明显相反,初步研究显示可孕组中观察到较高的IL-8水平。在初步研究中,可孕组升高的IL-8可能反映出容受性的开始以及它相关的炎症状态。但是,在这些用激素刺激的不孕的女性中,显示升高的IL-8可能反映了子宫内膜的慢性炎症状态。因此,被治疗的不孕女性中水平升高的IL-8可能是不利的,并且因此在评估女性对激素刺激程序的反映方面具有潜在作用。

实施例3

分析

[0118] 此处显示的数据鉴定了一组可以在她们月经周期的分泌期早期容受性阶段区分可孕和不孕女性的三种生物标志物。随后对少部分接受刺激ART周期的女性的研究揭示了G-CSF能单独地从那些没有怀孕的女性中区分出那些继续怀孕进程的女性。此外,VEGFA可

以将临床妊娠从早期临床妊娠中区分开,而1L-8在不会怀孕的女性体内是升高的。

实施例4

预测接受ART的女性体内结果的临床试验

[0119] 从参加ART治疗的IVF临床的女性中进行样品收集。收集的样品是子宫冲洗物和血液;二者都在卵子获取时(01+2例如,hCG+2或GnRHa+2或用其它药物)收集。样品从122名女性中收集。它被选择用来检测所述样品并在收集到的所有冲洗物和匹配的血清样品中进行t-检验数据分析。用logitboost回归算法进行结合的标志物的多变量分析。

[0120] 用下述公式计算所述冲洗物的稀释因子:稀释因子=血清尿素浓度除以冲洗物尿素浓度。还可以提出将一些冲洗物标志物与血清标志物结合。

结果

参与者总人数=122。

匹配的血清和可用的冲洗物数量=121。

具有“怀孕”结果的女性人数=13(其中三名后来流产)。

没有进行胚胎移植的女性人数(各种原因)=34,并作为确定的无成功结果的从本分析中排除。

具有“未孕”结果的女性人数=72她们中的58人提供了BMI/年龄。

具有“早期临床妊娠”结果的女性人数=2。目前将她们从分析中排除,因为并不清楚在“早期临床”妊娠中是否存在子宫内膜与胚胎的相互作用。

[0121] 用t-检验进行了统计学分析,对比“未孕”组(n=72)和“怀孕”组(n=13包括了后面流产的)。将后面流产的包括进来是有疑问的,因为当发生某些形式的子宫内膜-胚胎附着时,并不足以维持妊娠,因此子宫内膜是否“正常容受”并不清楚,尽管它已容受至某种程度。

[0122] 更早的实施例结合G-CSF(CSF3),1L-8和VEGFA检测了冲洗物。其它因素CRP,1L-17,1L-6和孕酮也被包括进来。最后关于这组,将患者的年龄和体重指数作为多变量分析的一部分也进行了检测。

[0123] 结果如表3和图3所示。

表3

生物标志物水平

分析物	冲洗物	血清
G-CSF	P=0.067	P=0.034
1L-8	P=0.026	P=0.495
VEGF	P=0.154	P=0.463
1L-6	P=0.451	P=0.075
1L-17	P=0.005	P=0.261

冲洗物的多变量分析

[0124] 生物标志物G-CSF,1L-8和VEGFA结合年龄和BMI给出了0.969,p<0.0001的ROC值。标准值0.573给出了96.6%的特异性、84.6%的灵敏度。

血清的多变量分析

[0125] 在血清分析中将妊娠/流产与未孕作比较。

[0126] 结果1:年龄、BMI、G-CSF,1L-8和VEGFA(具有患者的身体特性)生成了9.84, $p < 0.0001$ 的ROC区域。仅包括那些怀孕并且没有流产的。标准值0.741给出了93.1%的特异性,100%的灵敏度。

[0127] 结果2:年龄、BMI、G-CSF,1L-8和VEGFA(具有患者的身体特性)生成了0.981, $p < 0.0001$ 的ROC区域。包括了那些流产的女性。标准值0.759给出了93.1%的特异性,100%的灵敏度。

[0128] 结果3:年龄、BMI、G-CSF,1L-8、VEGFA和孕酮生成了0.999, $p < 0.0001$ 的ROC区域。包括了那些流产的女性。标准值0.699给出了96.6%的特异性,100%的灵敏度。

[0129] 结果4:年龄、BMI、G-CSF,1L-8、VEGFA和1L-6生成了0.977, $p < 0.0001$ 的ROC区域。包括了那些流产的女性。标准值0.657给出了96.6%的特异性,84.6%的灵敏度。

[0130] 结果5:年龄、BMI、G-CSF,1L-8、VEGFA和CRP生成了0.993, $p < 0.0001$ 的ROC区域。包括了那些流产的女性。标准值0.481给出了100%的特异性,92.3%的灵敏度。

[0131] 动力分析表明360份样品中的血清1L-6水平达到了显著性 ($p < 0.05$)。但是,它是一次利用了G-CSF与冲洗物中的支持标志物一起的组合的分析物多变量分析。血清孕酮被提出在血清多变量分析中提供进一步的分析物。

[0132] 利用基于血清检测子宫内膜容受性的检测的功能具有许多优点。这样的检测不需要进行任何损伤性的灌洗程序或真正的活检/刮除收集。

[0133] 本领域技术人员可以领会的是,本文公开的内容可以变化和修改,而不仅仅是那些具体描述的内容。可以理解的是,公开内容考虑了所有的这种变化和修改。本文还提供本说明书单独或整体上涉及或提到的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征或组合物或化合物中的任意两种或多种的任意和全部组合。

参考文献

Macaldowie et al.(2013)Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand 2011,Sydney:National Perinatal Epidemiology and Statistics Unit, the University of New South Wales,Australia

Sambrook et al,Molecular Cloning,A Laboratory Manual.(2nd ed.),1989

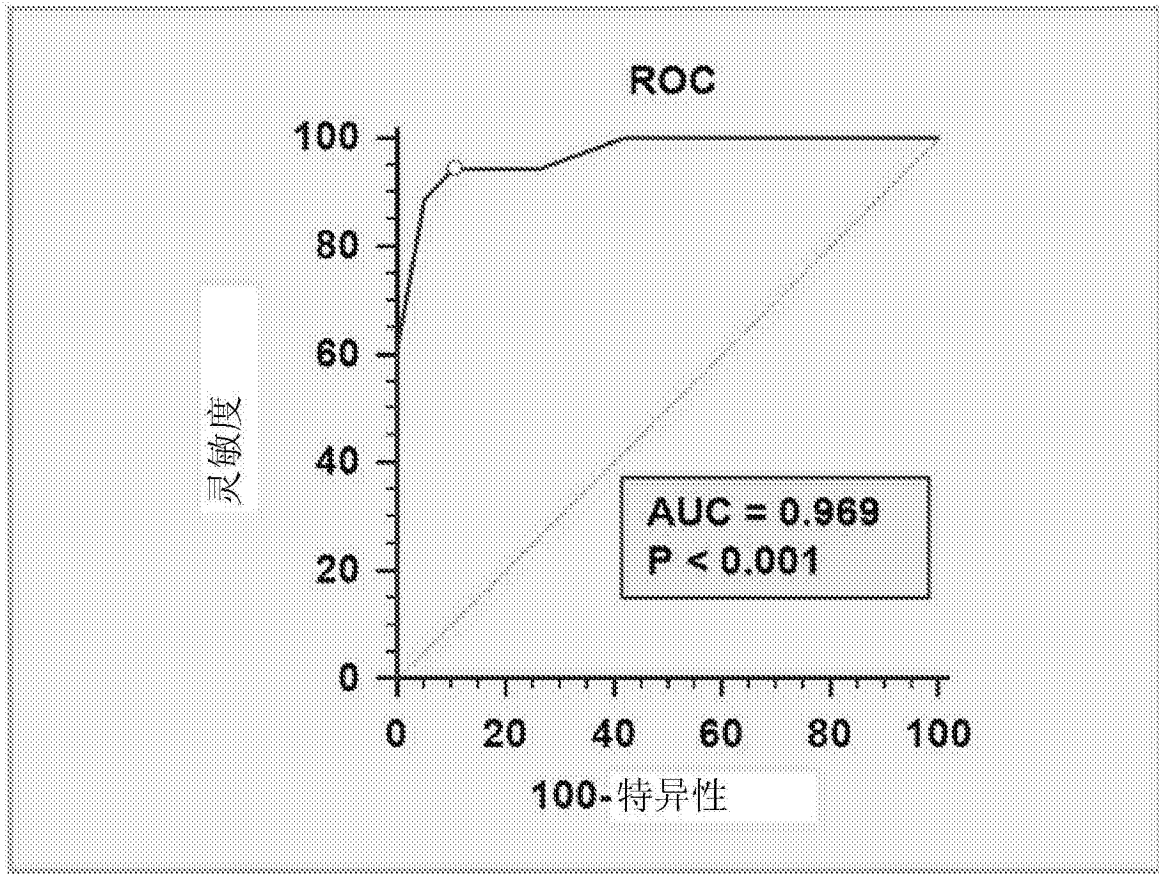


图1

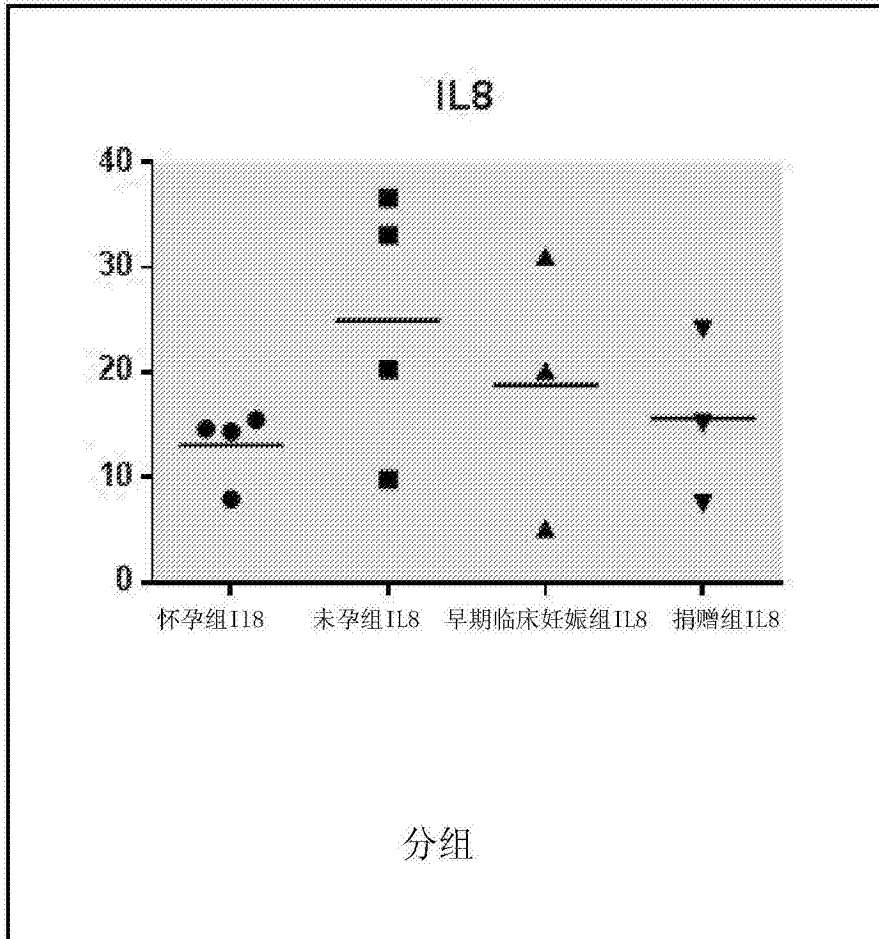


图2A

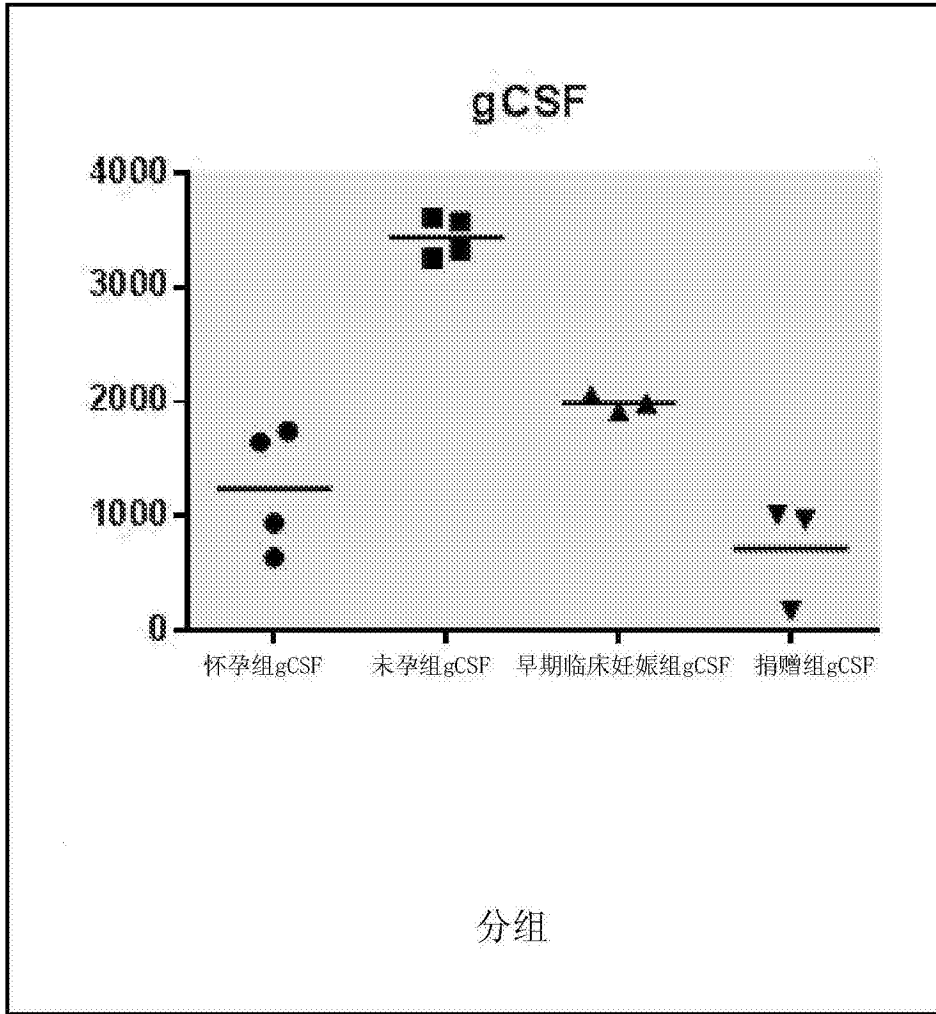


图2B

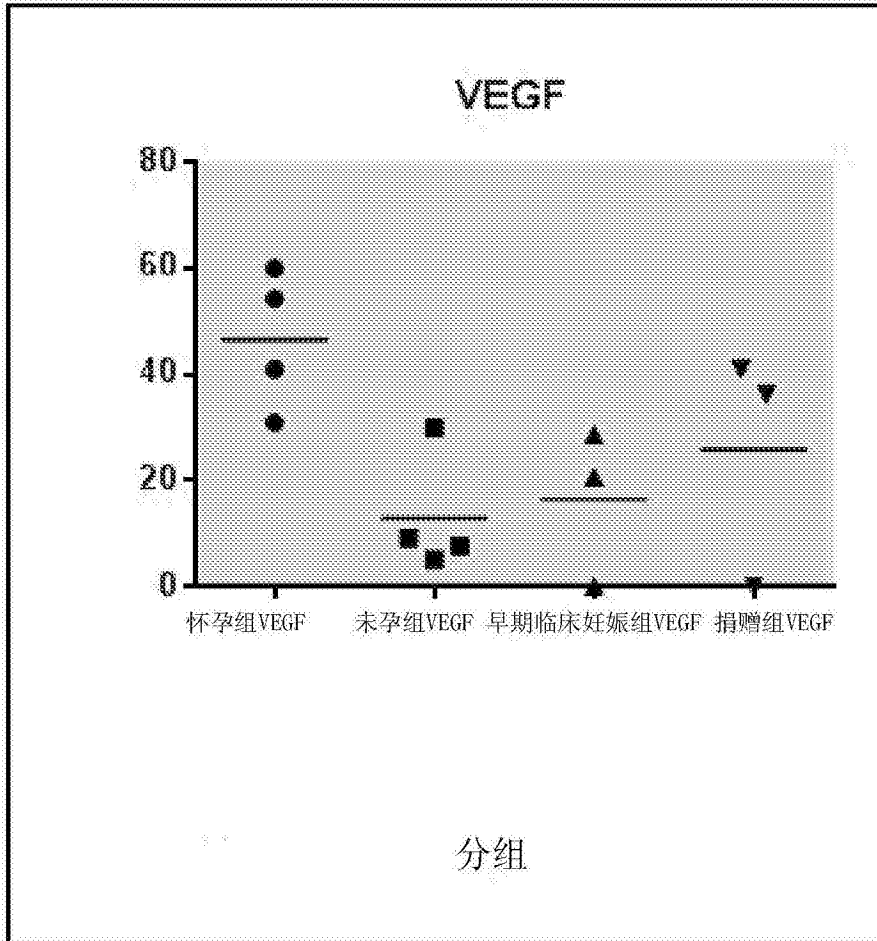


图2C

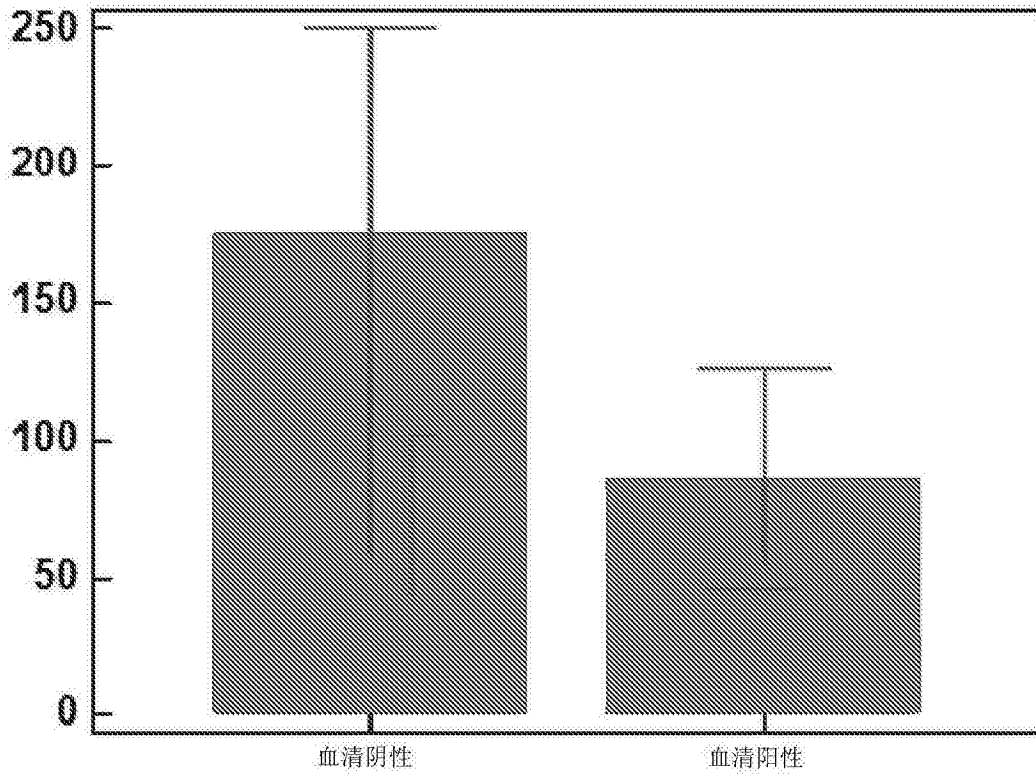


图3

专利名称(译)	用于分析辅助生育技术成功的预后检测		
公开(公告)号	CN106560002A	公开(公告)日	2017-04-05
申请号	CN201580028929.8	申请日	2015-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	哈德逊医学研究中心亨利王子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	哈德逊医学研究中心亨利王子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	哈德逊医学研究中心亨利王子医学研究所		
[标]发明人	洛伊斯萨拉蒙森 特蕾西艾杰尔 纳塔利汉纳 卢克罗姆奥茨		
发明人	洛伊斯·萨拉蒙森 特蕾西·艾杰尔 纳塔利·汉纳 卢克·罗姆奥茨		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/54 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/689 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N2333/49 G01N2333/52 G01N2333/535 G01N2333/5421 G01N2800/368		
代理人(译)	高芬芳		
优先权	2014901190 2014-04-02 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种确定女性受试者胚胎成功植入导致怀孕的可能性的方法。此处启用一种基于怀孕结果的预后评价的改进的辅助生育技术方案。本文提供了是一种包括用于预后评估的试剂的组合物。本文给出的是包含在胚胎植入前生物流体样品中生物标志物IL-8、G-CSF和/或VEGFA的水平测定的分析方法。

