

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-522942
(P2004-522942A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|--------------------|-------------|
| GO 1 N 33/573 | GO 1 N 33/573 A | 2G054 |
| GO 1 N 21/78 | GO 1 N 21/78 C | |
| GO 1 N 33/543 | GO 1 N 33/543 545Z | |
| GO 1 N 33/545 | GO 1 N 33/543 575 | |
| GO 1 N 33/552 | GO 1 N 33/545 A | |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に続く

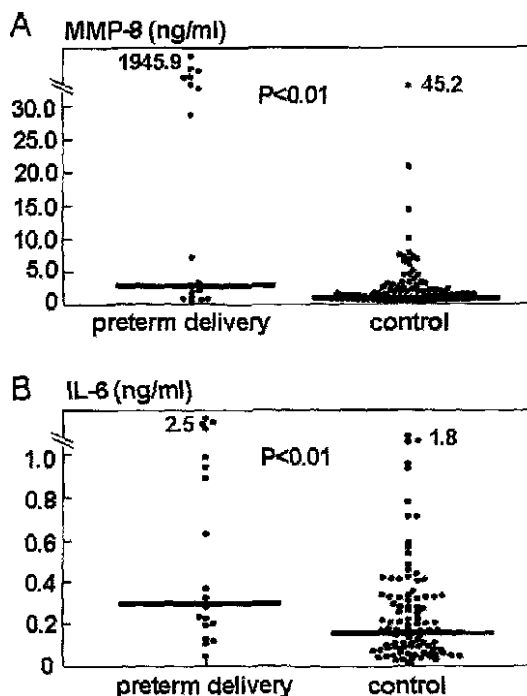
| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2002-544659 (P2002-544659) | (71) 出願人 | 503183673 ソウル ナショナル ユニヴァーシティー インダストリー ファンデーション 大韓民国 ソウル 151-818、クワ ナクク、ボン-チュン ドン、サン 4 -2 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年8月1日 (2001.8.1) | (74) 代理人 | 100102842 弁理士 葛和 清司 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年5月21日 (2003.5.21) | (72) 発明者 | ヨン, ボ ヒュン 大韓民国 ソウル 137-950、セオ チョーク、チャムウォン-ドン、シン バンポ 8-チャ アパートメント #3 05-603 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/KR2001/001306 | Fターム(参考) | 2G054 AB03 AB04 CA30 CE02 EA03 |
| (87) 国際公開番号 | W02002/042770 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成14年5月30日 (2002.5.30) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 2000/69283 | | |
| (32) 優先日 | 平成12年11月21日 (2000.11.21) | | |
| (33) 優先権主張国 | 韓国 (KR) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断用診断試薬及びこれを含む診断キット

(57) 【要約】

本発明は、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための方法及び産前診断のための診断試薬系及び診断キットに関するものである。本発明の方法、診断試薬系及び診断キットは、妊婦に、早産、子宮内感染及び胎児損傷の危険性がある場合に羊水内MMP-8の濃度が、有意に高くなるという発見に基づいている。本発明の診断試薬系及び診断キットは、早産症状や早期破水症状が見られる妊婦だけではなく、そのような症状が全く見られない妊婦にも適用できる。胎児血中サイトカインレベルを測定する従来の方法に比べて侵襲性が低く、敏感度と特異度に優れているため、本発明の診断試薬系及び診断キットは、早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断に非常に有用に使用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

1) 妊婦から羊水を採取する段階、及び
2) 該採取した羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 の濃度を測定する段階
からなる、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断する方法。

【請求項2】

妊婦が、早産または早期破水の症状が見られる、または見られない妊婦である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

新生児敗血症、呼吸窮迫症候群、肺炎、気管支肺異形成症、脳室内出血及び壊死性腸炎を含む周産期罹患を包含する、早産、胎児感染及び胎児損傷の危険性が、産前に診断される、請求項1に記載の方法。 10

【請求項4】

羊水のマトリックスメタロプロテアーゼ - 8 の基準値が、5ng/ml ~ 100ng/mlより高い場合に、妊婦が早産、胎児感染及び胎児損傷の危険性を有することが特定される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記妊婦の羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 の濃度が、10ng/ml ~ 50ng/mlより高い場合に、早産と診断する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記妊婦の羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 の濃度が、10ng/ml ~ 50ng/mlより高い場合に、胎児感染と診断する、請求項1に記載の方法。 20

【請求項7】

前記妊婦の羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 の濃度が、10ng/ml ~ 50ng/mlより高い場合に、脳性麻痺と診断する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記妊婦の羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 の濃度が、10ng/ml ~ 50ng/mlより高い場合に、周産期合併症と診断する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

1種または2種以上の抗-マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 抗体を含む請求項1に記載の方法を利用した診断試薬系。 30

【請求項10】

診断試薬系が、

- 1) 基材に抗-マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 1次抗体を吸着させる工程、
- 2) 基材に吸着した前記抗-マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 を羊水の存在下インキュベートし、基材を洗浄し、結合していない抗原を除去する工程、
- 3) 基剤に吸着した前記1次抗体に結合したマトリックスメタロプロテアーゼ - 8 と、発色酵素または蛍光物質が結合した2次抗体とを連結させる工程、及び
- 4) 発色剤を添加して前記基材において、発色反応を誘導し、特異的な抗原抗体反応を定量分析する工程

40

を含む、分析原理に基づく、請求項9に記載の診断試薬系。

【請求項11】

抗-マトリックスメタロプロテアーゼ - 8 抗体が、モノクローナルまたはポリクローナルである、請求項10に記載の診断試薬系。

【請求項12】

基材が、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製の96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製の96ウェルプレート及びスライドガラスからなる群から選択される、請求項10に記載の診断試薬系。

【請求項13】

発色酵素が、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ及びビオチンからなる群から 50

選択される、請求項10に記載の診断試薬系。

【請求項14】

蛍光物質が、FITC及びTRITCからなる群から選択される、請求項10に記載の診断試薬系。

【請求項15】

発色剤が、4-クロロ-1-ナフトール、ジアミノベンジジン、アミノエチルカルバゾール、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)、o-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンからなる群から選択される、請求項10に記載の診断試薬系。

【請求項16】

請求項9に記載の診断試薬系を含む診断キット。

【請求項17】

診断キットが、抗-マトリックスメタロプロテアーゼ-8抗体、標準マトリックスメタロプロテアーゼ-8、基材、分析用緩衝溶液、発色酵素または蛍光物質が結合した2次抗体、及び粘着性プレートカバーを含む、請求項16に記載の診断キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断用診断試薬及び該診断試薬を利用する診断キットに関する。より詳細には、早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断マーカーとしての羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ-8(MMP-8)濃度の使用に関する。

【背景技術】

20

【0002】

医学界では、今まで早産や早期破水を防止することが、その事後処理より好ましいと認識されてきた。しかし、早産や早期破水は、多種多様な原因に因って誘発されるため、望まない症状の予防は困難であった。早産を防止するための従来のアプローチは、産婦人科、人口統計学及び色々な症候群の知識に基づいて特別な注意を払わなければならない高いリスクの女性群を特定することであった(Main等, Am. J. Obstet. Gynecol., 1985年、第151巻、P.892-898)。しかし、このようなアプローチは、鋭敏でも特異的でもないという問題点がある。このような問題点を克服するために、突発的な早産や早期破水を予見するための生化学的なマーカーを発見するために多くの研究が続けられ、血漿エストラジオール-17ベータ、プロゲステロン、C-反応性蛋白質のような物質が候補に挙げられた。しかし、

30

【0003】

このような生化学的な予見可能なマーカーの特定以外にも、早期破水の研究を通して判明した、絨毛膜が線維性結合組織で構成され、コラーゲンの含量が線維性結合組織の抗張力を決定するという事実を基に、コラーゲンの生化学的役割の研究に高い関心が集まった。一部の研究者らは、早期に破水した羊膜が正常羊膜と比較してコラーゲン含量が低いという発見に基づき、早期破水が正常羊膜より低い抗張力に起因し得ると結論づけた(Obstet. Gynecol., 1981年、第57巻、P.487-489)。他の研究によれば、早期に破水した羊膜と早産した女性の血清では、コラゲナーゼの活性が高いと報告されている(Obstet. Gynecol., 1990年、第75巻、P.84-88)。しかし、今までこのような生化学的な変化の正確な機序は

40

【0004】

統計的には、妊娠37週以前に分娩する早産の発生頻度は、約8~10%と推算されている。韓国では、毎年約5万人の新生児が早産で生れている。早産は、敗血症、呼吸窮迫症候群、肺炎、気管支肺異形成症、脳室内出血、壊死性腸炎及び脳性麻痺等の深刻な新生児合併症を誘発する場合が多い。また、早産の時期が早ければ早いほど、このような後遺症(sequelae)を残す可能性が高く、その程度も酷い。ゆえに、早産を予防できれば、かかる疾患により障害を受ける未熟児の発生率を顕著に減らすことができる。

【0005】

最近の報告では、早産の少なくとも30~40%が子宮内感染に関連するものであることが開

50

示されている(Butler NR., Bonham DG., Prenatal mortality. The first report of the British perinatal mortality survey, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1963、P. 115-145; Romero R., Avila C., Sepulveda W., Preterm birth. Cause, prevention, and management., McGraw-Hill社, 1993年、P.97-136 ; Romero R., Mazor M., Clin. Obstet. Gynecol., 1990年、第31巻、P.553 ; Gibbs RS., Romero R., Hiller SL., 等, Am. J. Obstet. Gynecol., 1992年、第166巻、P.1515)。

【0006】

子宮内感染は、次の過程で胎児損傷を誘発する。子宮内感染は、母体と胎児の免疫体系を活性化し、リンパ球からのサイトカイン、および好中球からのMMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)のような炎症性メディエーターが分泌される。このような炎症性メディエーターの濃度が一定レベルに到達すれば、子宮収縮を促進するプロスタグランジンが産生され、その結果分娩陣痛が誘発され早産が起きる。また、増加したレベルの炎症性メディエーターは、胎児に胎児炎症反応症候群(FIRS)を起す。成人においては、炎症性メディエーターが敗血症や急性呼吸窮迫症候群を誘発したり、自己免疫疾患の結果、臓器を損傷すると同様に、胎児は炎症性メディエーターによって全身的に損傷を受け、脳白質病変及び気管支肺異形成症が発生する。したがって、産前に子宮内感染を診断することは、早産および胎児損傷を防止するために非常に重要である。

【0007】

一方、現在一般的に使用されている胎児の子宮内感染を産前に診断する方法としては、臍帯穿刺を行なって胎児の血中サイトカインレベルを測定する方法や臍帯の組織学的検査により臍帯炎を確認する方法が使用されている。しかし、臍帯穿刺は、侵襲的であるため利用に制限があり、臍帯炎の診断は、分娩後にだけ可能であるという問題点がある(Yoon BH., Romero R., Park JS., Kim CJ., Kim SH., Choi JH., Han TR., Am. J. Obstet. Gynecol., 2000年、第182巻、P.675-81 ; Yoon BH., Romero R., Kim KS., Park JS., Ki SH., Kim BI., Jun JK., Am. J. Obstet. Gynecol., 1999年、第181巻、P.773-9 ; Romero R., Gomez R., Ghezzi F., Yoon BH., Mazor M., Edwin SS., Berry SM., Am. J. Obstet. Gynecol., 1998年、第179巻、P.186-93)。

【0008】

また、羊膜腔の感染や炎症のケースでは羊水内の白血球の数が増加する。羊水内の好中球は、胎児に由来すると考えられる(Knauper V., Kramer S., Reinke H., Tschesche H., Eur. J. Biochem., 1990年、第189巻、P.295-300 ; Blaser J., Triebel S., Maasjosthusmann U., Romisch J., Krahl-Mateblowski U., Freudenberg W., Fricke R., Tschesche H., Clinic. Chim. Acta., 1996年、第244巻、P.17-33 ; Segura-Valdez L., Pardo A., Gaxiola M., Uhal BD., Becerril C., Selman M., Chest., 2000年、第117巻、P.684-94 ; Romanelli R., Mancini S., Laschinger C., Overall CM., Sodek J., McCulloch CA., Infect. Immun., 1999年、第67巻、P.2319-26 ; Maymon E., Romero R., Pacora P., Gomez R., Athayde N., Edwin S., Yoon BH., Am. J. Obstet. Gynecol., 2000年、第183巻、P.94-9)。従って、羊水内の好中球の分泌産物が、胎児の炎症反応を反映し得ると考えられる。本発明者では、羊水内MMP-8のレベルに注目した。羊水内MMP-8の定量は、現在、分娩後の臍帯の組織学的検査、または胎児の血中サイトカインを測定する臍帯穿刺によって診断可能な胎児炎症反応症候群のマーカーとなることができる。

【0009】

集合的に、マトリキシンとしても知られているMMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)群は、細胞外基質蛋白質を分解する機能を有する亜鉛含有エンドペプチダーゼである。これらのプロテアーゼは、類似の構造及び酵素機能を持った蛋白質で構成される大きな一群を形成する。MMPは、大きく5群に区分される。MMP-8は、MMP-1、MMP-13と共に間質コラゲナーゼ群に属する。MMP-8は、他の間質コラゲナーゼと大きさは類似しているが、ずっと多くグルコシル化されている。完全にグルコシル化された場合、MMPのプロ酵素形態は、85 kDaの分子量を持っている。前記プロ酵素は、15~25kDaの断片が消失し60~70kDaの活性形態に転換される。プロMMP-8は、in vitroでトリプシン、キモトリプシン、カテプシンG

10

20

30

40

50

のような多様な蛋白質分解酵素によって活性化される。また、有機水銀化合物がプロMMP-8を活性化させることが発見された。in vivoでのMMP-8の活性化機序は、いまだに完全に明らかにされていない。

【0010】

MMP-8に対する先行技術としては、MMP-8に対するモノクローナル抗体に基づく、鋭敏かつ特異的に歯周疾患を診断できる方法および試験キットが、米国特許第5,736,341号に開示されている。該特許には、MMP-8が歯周炎の進行する間、歯周結合組織の崩壊に直接関係し、歯肉溝液を含む歯肉ポケットを介して口腔内に拡散するため、口腔内のMMP-8の濃度を測定することによって部位特異的に歯周炎を診断できることが開示されている。進行中の歯周疾患を生化学的に特異的かつ鋭敏に検出するために、これらの方法は、プロ型のMMP-8の活性形態への変換を測定する。なぜなら、この変換が歯周感染の過程の最中に生じるからである。しかし、早産ならびに胎児感染及び損傷に関してMMP-8を使用した例は、まだ報告されたことがない。

10

【0011】

一方、MMP-8とは異なる群に属する別のマトリックスコラゲナーゼ(matrix collagenase)であるMMP-9に基づいて、早期破水の発生を予見する方法が、米国特許第5,641,636号に示されている。MMP-9は、92kDaのIV型コラゲナーゼ/ゼラチナーゼまたはゼラチナーゼBであり、MMP中最も分子量が大きい。MMP-9のプロ酵素形態、即ちプロMMP-9は活性化するために、まず開裂し、約83kDaの中間活性形態及び9kDaの非活性開裂断片を同時に生成する。前記中間活性形態は蛋白質分解によってさらにプロセッシングされ、67kDaのMMP-9の活性型になる(J. Biol. Chem., 1992年、第267(30)巻、P.21712-21719)。MMP-9の活性化とは、83kDaの中間活性形態またはゼラチン分解活性を持った67kDaの完全活性型への変換を意味する。早期破水を診断するために、前記特許は、変性したコラーゲン、例えばゼラチンを分解するMMP-9の加水分解活性を測定する。しかし、MMP-9は、分娩開始前にすでに羊水中に存在するために、この方法は早期破水を予見するには、限界がある。

20

【0012】

早期陣痛または早期破水患者の約30~40%が早産を経験する。このような場合、インターロイキン-6、インターロイキン-8、TNF- α 、インターロイキン-1、GRO、RANTES、白血球、MIP-1、MCP-1、グルコース、PGE₂及びアンジオゲニン等の多様な物質が、羊水内に高濃度で存在することが知られている。しかし、これらの物質は、早期陣痛の臨床兆候がない妊婦の羊水中では変化しないか、検出されず、そして早期陣痛または早期破水の発生後にのみその濃度が増加するため、早産の予測には有用性が低い。

30

【0013】

【特許文献1】

米国特許第5,736,341号

【特許文献2】

米国特許第5,641,636号

【0014】

発明の要約

胎児の血中サイトカインを測定する臍帯穿刺の侵襲性の問題点および胎児臍帯の組織学的検査によって分娩後に臍帯炎を確認するという問題を解決するために、本発明者らは、早産、胎児感染及び胎児損傷を予測するための集中的かつ広範囲の研究を行ない、その結果、早産または早期破水の臨床兆候が見られない妊婦の羊水中においても、かかる兆候を示す妊婦と同様にMMP-8の活性が検出されることを発見し、これにより、早産、胎児感染及び胎児損傷を診断できる方法及びキットを開発した。

40

【0015】

ゆえに、本発明の目的は、新生児罹患(neonatal morbidity)及び脳性麻痺のような深刻な合併症および後遺症を予防できるように、早産または早期破水の臨床兆候を有する、または有しない妊婦において早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための方法及びキットを提供することである。

50

【0016】

本発明の要素の1つとして、早期陣痛または早期破水の臨床兆候が見られる、またはみられない妊婦の羊水中のMMP-8のレベルを測定することによって、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための方法を提供する。

【0017】

本発明の別の要素としては、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための診断試薬系及びキットが提供される。

【0018】

本発明の詳細な説明

一態様において、本発明は、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための羊水中のMMP-8の活性測定に関する。 10

【0019】

MMP-8は、細胞外基質蛋白質を分解する活性を持っている亜鉛依存性のエンドペプチダーゼである。間質コラゲナーゼ群に属するMMP-8は、プロ酵素形態(プロMMP-8)で好中性白血球から精製され得る。プロMMP-8は、高度にグリコシル化されており、約85kDaの分子量を有する。プロ酵素の活性化は、プロ酵素分子の開裂によって起こり、活性化様式に依存して60~70kDaの分子量の活性コラゲナーゼが生成される。in vivoでのMMP-8の活性化機序には、水酸化ラジカルのような反応性酸素種及びオキシダントが関与すると考えられる。その結果として、プロコラゲナーゼのN-末端部分が除去され前記酵素の活性部分が生成され露出する。 20

【0020】

MMP-8は、好中性白血球によってプロ酵素形態として(プロMMP-8)産生される。プロMMP-8は、顆粒内に貯蔵された状態で存在し、刺激を受けると分泌される。分泌されたプロMMP-8は、細胞外間質で活性化され、I、IIおよびIII型コラーゲンを分解する。I型コラーゲンに対する特異性が高い。炎症に関連した組織損傷の主要なメディエーターとして知られているこの酵素は、歯周炎、慢性閉塞性肺疾患、リウマチ性関節炎等の炎症性疾患による組織損傷にも関与する。さらに、MMP-8は、子宮頸部の展退および開大を誘発して分娩の進行に関与するものとして知られている。

【0021】

本発明者らは、早期陣痛または早期破水の症状が見られる女性およびみられない女性の両方で、妊娠中期のMMP-8の高い羊水中濃度が、早産する可能性が高いことを示すという発見に基づき、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断する方法を開発した。 30

【0022】

本発明の一態様にしたがって、

- 1) 妊婦から羊水を採取する工程、及び
- 2) 羊水試料中のMMP-8を定量する工程からなる、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に検査する方法が提供される。

【0023】

早期陣痛または早期破水等の早産症状が見られる女性だけではなく、このような症状が見られない女性について早産を診断できる。 40

【0024】

羊水の採取は、超音波ガイド下で経腹的羊水穿刺によって行うか、または他の採取方法によって行うことができる。羊水中MMP-8レベルを定量するために、抗原抗体結合を原理とする全ての分析方法を使用でき、ELISA(酵素結合免疫吸着法)が好ましい。

【0025】

MMP-8が妊娠中期において早産を予測するための強力な臨床的指標として作用するかどうかを確認するために、早産の兆候が何も見られない妊娠中期に羊水穿刺を受けた後、妊娠32週前に自然早産した妊婦または満月分娩した妊婦のMMP-8の羊水中濃度を、別の優れた炎症マーカーであるIL-6のものと比較した。早産した妊婦においてMMP-8およびIL-6の羊水中濃度は有意に高かった。羊水中MMP-8の濃度が、23ng/mlより高い患者は、図1に見ら 50

れるとおり89%のケースで自然早産した。また、統計的に比較した場合に、早産を予測する感度および特異度において、MMP-8がIL-6より優秀だった。感度、特異度及びオッズ比を全体的に考慮し、早産予測のための羊水内MMP-8レベルの好適な基準値として23ng/mlを選択した。

【0026】

基準値より高い妊娠中期の羊水MMP-8濃度は、妊娠32週以内に早産する危険性が高いことを示す。したがって、妊娠中期に染色体検査のための羊水検査をする場合、羊水内MMP-8レベルを測定しておくことは早産が起り得る患者を特定するのに有用である。

【0027】

胎児感染及び胎児損傷を診断するための臨床的な予測指標としてのMMP-8の有用性を立証するために、妊娠週数が36週未満の単胎児を羊水検査の72時間以内に早産した妊婦から採取した羊水を、好気性菌、嫌気性菌及びマイコプラズマについて培養し、羊水内MMP-8濃度をELISAで測定した。出産後に、胎盤の組織学的検査を行なった。羊水培養が陽性の患者は、陰性の妊婦よりMMP-8の濃度が有意に高いことを観察した。また、胎盤に組織学的な絨毛膜炎がある場合は、それがない場合より羊水内MMP-8レベルが、有意に高かった(表1～表4参照)。

10

【0028】

前記結果から、羊水が菌に感染した場合には、羊水内MMP-8レベルが有意に増加するため、それを測定することによって子宮内感染を診断できることを確認した。組織学的な絨毛羊膜炎に関しても、やはり羊水内MMP-8レベルが有意に増加するため、羊水内MMP-8レベルを測定することによって子宮内感染を確認できる。結論として、MMP-8は早産だけでなく子宮内感染及び炎症を産前に診断するための効果的な臨床指標として使用できる。特に、羊水内MMP-8レベルの定量化により、さらに高い特異度と陽性予測値をもって子宮内炎症を診断できる。

20

【0029】

胎児感染を直接診断するために、臍帯炎の発生の有無に従ってMMP-8の羊水内濃度を比較した。

【0030】

胎児炎症反応症候群(FIRS)は、全身の色々な器官に影響を及ぼす疾患であり、早産が起きる可能性が高く、新生児にも色々な合併症や後遺症が発病する可能性が高い。臍帯の炎症(臍帯炎)は、このようなFIRSの組織学的証拠として考えられていて、脳性麻痺の発病とも関連性が高いものとして知られている。羊膜腔で発見される好中球は、胎児から由来する。このような事実に着目して、好中球からの分泌産物がFIRSの指標になるだろうと推論されている。前記仮説を試験するために、羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-8)と臍帯炎の間の相関関係を調査した。

30

【0031】

臍帯炎がある場合には、臍帯炎が無い場合よりMMP-8の濃度が有意に高いことが観察された。臍帯炎に対するMMP-8の診断能力もまた、非常に高い特異度、感度及び陰性予測値を示すことを確認した(表5及び表6、図3及び図4参照)。

【0032】

このような結果から、羊水内MMP-8の濃度が胎児炎症(臍帯炎)と密接な関連を有することが見出された。したがって、本発明は、既存の侵襲的な胎児血液採取を行うことなく、羊水内MMP-8の濃度を測定することによって胎児感染の診断を補助し得ることを示している。

40

【0033】

羊水内MMP-8の濃度と胎児感染との間の相関関係についての証拠により、本発明者らは、羊水内MMP-8の濃度と新生児敗血症、呼吸窮迫症候群、肺炎、気管支肺異形成症、壊死性腸炎及び脳室内出血等の新生児罹患との関係を調査した。新生児罹患がある場合に、新生児罹患がない場合よりMMP-8の濃度が有意に高いことを確認した(表7参照)。MMP-8の新生児罹患の特定における診断能力もまた特異度、陽性及び陰性予測値において優れていた(

50

表7及び表8参照)。また、新生児敗血症の新生児を出産した妊婦においては、新生児敗血症がない新生児を出産した妊婦より羊水内MMP-8の濃度が有意に高かった($p < 0.05$) (表9参照)。

【0034】

データは、総合すると、羊水内MMP-8の濃度が新生児敗血症及び周産期罹患(perinatal morbidity)を予測できる診断マーカーとして有用であり得ることを示している。

【0035】

子宮内感染または炎症は、脳性麻痺の主要原因として知られている。FIRSは、満月児および早産児で胎児の脳損傷を誘発するものと考えられている。好中球は、子宮内感染の場合に、羊水に最も頻繁に集まる細胞であり、胎児から由来すると考えられる。下記の例2及び3で示すように、活性化された好中球から分泌される酵素であるMMP-8の羊水内濃度は、子宮内感染または炎症の場合に有意に増加することが見出された。このような結果に基づいて、羊水内のマトリックスメタロプロテアーゼ-8 (MMP-8)の増加した濃度と脳性麻痺と診断された生後3歳の患者との関連性の有無を決定するための調査を行なった。

【0036】

その結果、脳性麻痺が発生していない新生児を分娩した妊婦に比べて、脳性麻痺が誘発された新生児を分娩した妊婦から採取された羊水内のMMP-8濃度は、有意に高かった(図5参照)。これは、MMP-8が脳性麻痺の予測のための診断マーカーとして極めて有用であることを立証するものである(図5及び図6、表11参照)。

【0037】

このような結果から、羊水内の高いMMP-8濃度は、脳性麻痺を発症する可能性が6倍高いことと関連することが分かった。言い換えれば、羊水内MMP-8の濃度は、脳性麻痺を予測するための産前診断マーカーとして有用に使用できる。

【0038】

前記結果を通して、本発明では、早産、胎児感染及び胎児損傷を特定するための羊水内MMP-8の好ましい基準値を選択した。このような側面から、羊水内MMP-8の基準値が、5~100 ng/ml以上の場合、好ましくは、10~50ng/ml以上の場合、妊婦は早産、新生児罹患、胎児感染(臍帯炎)及び脳性麻痺の危険性があると診断された。

【0039】

早産、胎児感染及び胎児損傷を診断する診断マーカーとしての羊水内MMP-8濃度の有用性に基づいて、早産、胎児感染及び胎児損傷を診断できる診断試薬系を開発できる。

【0040】

従って、本発明の別の態様において、羊水内MMP-8濃度の測定に基づいて、早産、胎児感染及び胎児損傷を診断するための診断試薬系を提供する。

【0041】

詳細には、診断試薬系は、下記の工程を含む分析機序を利用して達成される。

- 1) 基材にMMP-8 1次抗体を吸着させる工程、
- 2) 基材に結合した前記MMP-8 抗体を羊水の存在下インキュベートし、基材を洗浄して結合していない抗原を除去する工程、
- 3) 基材に吸着した前記1次抗体に結合し、MMP-8と、発色酵素または蛍光物質が結合した2次抗体とを連結させる工程、及び
- 4) 抗体に結合したMMP-8の量を定量分析するために、発色剤を使用して基材内で発色反応を誘導する工程。

【0042】

工程1の有用な基材としては、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製の96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製の96ウェルプレート及びスライドガラス等が使用できる。

【0043】

定量分析のために、1次抗体に結合したMMP-8と結合する2次抗体は、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ及びビオチンのような発色酵素、またはFITC(フルオレセインイソチオシアネート)及びTRITCのような蛍光物質と連結する。

10

20

30

40

50

【0044】

前記発色剤は、4CN(4-クロロ-1-ナフトール)、DAB(ジアミノベンジジン)、AEC(アミノエチルカルバゾール)、ABTS(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))、OPD(o-フェニレンジアミン)及びTMB(テトラメチルベンジジン)からなる物質群から選択できる。

【0045】

原則として、前記診断は、MMP-8とその抗体との反応を利用した、羊水内MMP-8濃度の測定に基づいている。このために、モノクローナルまたはポリクローナル抗-MMP-8抗体を固体基材に固定化させて、試料内のMMP-8と反応させた後に、未結合抗体とMMP-8を除去するために基材を洗浄する。その後、酵素または蛍光体と連結したモノクローナルまたはポリクローナル2次抗体を固定化されたMMP-8に結合させる。西洋ワサビペルオキシダーゼポリクローナル抗体またはビオチン化ウサギポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が一般的に2次抗体に使用される。ここに過酸化水素及び発色剤を加えると発色反応が起き、視覚化される。酸を添加して発色反応を停止させた後、450nmで吸光度を測定する。

10

【0046】

前記診断機序に基づいて、同様の診断試薬系を使用する診断キットが構成できる。

【0047】

従って、本発明のさらに別の態様において、早産、胎児感染及び胎児損傷を確認および予測するための診断キットを提供する。該診断キットを利用すれば、早期陣痛、早期破水を都合よく定量的または定性的に診断できる。前記MMP-8抗原の分析のために、抗-MMP-8抗体に金またはコロイド粒子等を結合させてマーカー抗体を作製できる。MMP-8に対するマーカー抗体は、MMP-8と結合して免疫複合体を形成する。該免疫複合体を再びMMP-8抗体と反応させ、その後、一般的に尿素等でできた過剰のマーカー抗体洗浄液を添加する。MMP-8濃度がある水準以上の場合には、陽性結果を目視できる。このような診断キットには、抗-MMP-8抗体、標準MMP-8、基材、分析用緩衝溶液、発色酵素または蛍光物質で標識された2次抗体及び粘着性プレートカバー等が含まれ得る。

20

【0048】

あるいは、本発明の前記診断キットは、生物学的マイクロチップを利用した自動化された分析方法を利用できる。例えば、前記診断キットは、抗-MMP-8抗体をコーティングしたスライドガラス等を利用して免疫プロットングを行なうように構成できる。このような診断キットは、抗-MMP-8抗体が表面に固定された生物学的マイクロチップ、適切な緩衝溶液、標準MMP-8及び2次抗体等を含み得る。

30

【0049】

例

下記の例を基に本発明をより詳細に説明する。但し、本発明の内容は下記の例に限定されるものではない。

【0050】

例 1：産前早産検査のための診断基準値の選定

慢性子宮内感染が早産の原因であることを種々の証拠が示している。本例では、MMP-8およびインターロイキン-6(IL-6)の羊水内濃度が早産の臨床兆候のない妊婦のうち、自然早産の危険性がある妊婦を特定するのに使用できるかどうかを調査した。

40

【0051】

そのために、染色体検査のために妊娠中期に羊水検査を行なった妊婦から得られた、羊水が保管されたケースを対象に患者対照研究を行なった。つまり、妊娠32週以前に自然早産した19例の患者と満月に正常新生児を分娩した95例の対照群でMMP-8とIL-6の羊水内レベルをELISAで測定した。この時、染色体検査結果が異常か、または胎児に主要な奇形が発見された場合は、分析対象から除外した。

【0052】

その結果、自然早産した患者の羊水内MMP-8の平均濃度は、3.1[0.3-1954.9]ng/mlである一方、対照群では1.3[<0.3-45.2]ng/mlだった。また、自然早産した患者の羊水内IL-6の

50

平均濃度は、0.32[0.04-2.52]ng/mlである一方、対照群では0.18 [0.01-1.81]ng/mlだった。図1に示すとおり、妊娠中期の羊水内MMP-8およびIL-6の濃度は、いずれも自然早産した患者の場合に満月分娩した対照群より有意に高かった($p < 0.01$)。

【0053】

また、早産した患者と対照群のMMP-8の濃度を比較した結果、妊娠中期の羊水内MMP-8の濃度が23ng/ml以上の場合には、前記患者の89%が自然早産した。

【0054】

さらに、図2に示すとおり、染色体検査のために羊水検査を行なった後に早期早産した患者を特定するに際して、妊娠中期の羊水内MMP-8の基準量を23ng/mlとした場合、早産を診断する感度は42%(8/19)、特異度は99%(94/95)であり、一方IL-6の基準値を0.6ng/mlとした場合、感度は42%(8/19)、特異度は92%(87/95)だった。よって、MMP-8がIL-6より早産の確認及び予測のための感度、特異度及びオッズ比について優れていた。結果的に、23ng/mlの羊水内MMP-8の濃度を未熟児の確認の為の基準値に選定した。

10

【0055】

例2: MMP-8の羊水内濃度と子宮内感染及び炎症の関係

羊水内MMP-8の濃度を子宮内感染及び胎児損傷を予測するための診断マーカーとして使用できるかどうかを決定する為に、子宮内感染および炎症がある場合と無い場合について羊水内MMP-8濃度を調査した。

【0056】

そのために、ソウル大学病院(ソウル、韓国)で単胎児を早産し(妊娠週数 < 36週)、早産前72時間以内に羊水検査を受けた妊婦255名を対象に選定した。羊水を対象に好気性および嫌気性菌ならびにマイコプラズマの培養だけではなくMMP-8濃度を測定した。さらに、胎盤の組織学的検査を行なった。この時、超音波ガイド下で経腹部羊水穿刺により羊水を採取した。

20

【0057】

2-1: 羊水培養

経腹部羊水穿刺による採取の直後、羊水をフタ付滅菌プラスチック容器に入れ、嫌気性及び好気性菌の為の培地で培養する前まで保管した。好気性及び嫌気性菌培養に有用な培地は、血液寒天、マッコンキー寒天、バクテック6Aバイアル、チオグリコレート培地、ブルセラ血液寒天、新鮮肉抽出物ならびに馬血清ペニシリンポリミキシンB及びアンホテリシンB等を添加したPPL0培地である。また、マイコトリムGU等を使用してマイコプラズマを培養した。

30

【0058】

2-2: 羊水内MMP-8濃度の測定

羊水試料を700 x gで10分間遠心分離した。重複しないエピトープに結合する二種のモノクローナル抗体を利用したELISA(Amersham pharmacia biotech, UK)で上清の羊水内MMP-8の濃度測定を行なった。

【0059】

2-3: 胎盤の組織学的検査

分娩後胎盤が完全に取り出された後、臍帯、絨毛膜板及び胎盤膜から摘出した組織を10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋して、スライドを製作した。その後、組織切片をヘマトキシリンおよびエオジンで染色して顕微鏡で観察した。急性子宮内炎症は、羊膜、絨毛膜、脱落膜及び絨毛膜板中いずれかの組織に炎症性変化が観察された場合と定義した。

40

【0060】

羊水培養の結果、対象255名中45名が陽性と判別され、これは子宮内感染の頻度が18であることを示している。胎盤の組織学的検査の結果、113名が絨毛羊膜炎と判別され、これは子宮内炎症の頻度が44%であることを示している。羊水内MMP-8の平均濃度は、羊水の菌培養が陽性だった患者の場合には、191.4ng/mlであるのに対し、結果が陰性の患者の場合には、2.7ng/mlだった。したがって、子宮内感染患者の羊水内MMP-8の平均濃度は、子宮内感

50

染がない妊婦より有意に高かった ($p < 0.001$)。その結果を下記表 1 に示す。

【 0 0 6 1 】

【 表 1 】

〈表 1〉 羊水培養の結果による羊水内 MMP-8 の濃度

| 羊水中の細菌 | 平均値 (ng/ml) | 範囲 (ng/ml) |
|--------|-------------|--------------|
| 陽性 | 191.4 | < 0.3-4202.7 |
| 陰性 | 2.7 | < 0.3-3929.0 |

10

【 0 0 6 2 】

23ng/ml を基準値にした場合、MMP-8 の診断能力は、羊水培養の陽性結果について 76% の敏感度および 93% の陰性予測値と優れていた。その結果を下記表 2 に示す。

【 0 0 6 3 】

【 表 2 】

〈表 2〉 羊水培養の陰性結果についての MMP-8 の診断能力

| | |
|--------|-----|
| 敏感度 | 76% |
| 特異度 | 70% |
| 陽性 予測値 | 35% |
| 陰性 予測値 | 93% |

20

【 0 0 6 4 】

胎盤の組織学的検査結果では、絨毛羊膜炎がある場合は、羊水内 MMP-8 の平均濃度が 160.9 ng/ml であり、絨毛羊膜炎がない場合には 1.0ng/ml だった。絨毛羊膜炎を有する患者は、絨毛羊膜炎がない患者より羊水内 MMP-8 濃度が有意に高かった ($p < 0.001$)。その結果を下記表 3 に示す。

【 0 0 6 5 】

【 表 3 】

〈表 3〉 子宮内炎症による MMP-8 の濃度

| 組織学的 絨毛羊膜炎 | 平均値 (ng/ml) | 範囲 (ng/ml) |
|------------|-------------|--------------|
| 有 | 160.9 | < 0.3-4202.7 |
| 無 | 1.0 | < 0.3-766.2 |

30

【 0 0 6 6 】

23ng/ml を基準値にした時、MMP-8 の診断能力は、子宮内炎症 (絨毛羊膜炎) に対し 72% の敏感度、89% の特異度、84% の陽性予測値及び 80% の陰性予測値と優れていた。その結果を下記表 4 に示す。

40

【 0 0 6 7 】

【 表 4 】

〈表 4〉 子宮内炎症に対する MMP-8 の診断能力

| | |
|--------|-----|
| 敏感度 | 72% |
| 特異度 | 89% |
| 陽性 予測値 | 84% |
| 陰性 予測値 | 80% |

50

【0068】

例 3: 羊水内MMP-8の濃度を利用した臍帯炎診断

羊水内MMP-8の濃度を測定することによってより直接的に胎児感染を診断できるかどうかを決定するために、臍帯炎発症に有無により羊水内MMP-8の濃度を比較した。

【0069】

ソウル大学病院(ソウル、韓国)で単胎児を早産し(妊娠週数 < 36週)、早産前72時間以内に羊水検査を受けた妊婦255名を対象に、臍帯炎の発症とMMP-8の羊水内濃度との関係を調査した。臍帯血管壁またはワルトンゼリー(Wharton jelly)内の好中球浸潤により臍帯炎を診断した。MMP-8の濃度測定は、例2と同様の方法で行なった。

【0070】

その結果、59名で臍帯炎が診断された(臍帯炎の頻度は23%)。これらの羊水内MMP-8の平均濃度は、臍帯炎がある場合には433.7ng/mlである一方、臍帯炎がない場合には1.9ng/mlであった。ゆえに、臍帯炎がある患者では、ない場合より羊水内MMP-8平均濃度が有意に高かった($p < 0.001$)。前記結果を下記表5及び図3に示す。

【0071】

【表5】

<表 5> 臍帯炎の有無によるMMP-8の濃度

| 臍帯炎 | 平均値(ng/ml) | 範囲(ng/ml) |
|-----|------------|-------------|
| 有 | 433.7 | 1.5-3836.8 |
| 無 | 1.9 | <0.3-4202.7 |

【0072】

羊水分析によって臍帯炎を診断するための羊水検体の基準値を決めるために、受診者動作特性曲線分析を行なった。その結果、図4に見られるとおり、臍帯炎診断の敏感度と陽性予測値を全て考慮して、MMP-8の基準値に23ng/mlを選択した。これを基準(基準値23ng/ml)に、MMP-8の臍帯炎に対する診断能力を確認した結果、敏感度90%、特異度78%及び陰性予測値96%と優れていた。その結果を下記表6に示す。

【0073】

【表6】

<表 6> 臍帯炎に対するMMP-8の診断能力

| | |
|-------|---------------|
| 敏感度 | 90% (53/59) |
| 特異度 | 78% (153/196) |
| 陽性予測値 | 55% (53/96) |
| 陰性予測値 | 96% (153/159) |

【0074】

例 4: 羊水内MMP-8の濃度を利用した新生児罹患診断

本発明者らは、敗血症、肺炎、気管支肺異形成症、壊死性腸炎及び脳室内出血等の新生児の感染に関連した合併症の危険性の増加と臍帯炎とが関連すると推定して、前記の新生児罹患があるケースの羊水内MMP-8の濃度と正常なケースの羊水内MMP-8の濃度とを比較した。

【0075】

ソウル大学病院(ソウル、韓国)で単胎児を早産し(妊娠週数 < 36週)、早産前72時間以内に羊水検査を受けた妊婦239名を対象に選定して、前記新生児罹患の発生とMMP-8の羊水内濃度の関係を調査した。新生児罹患は、敗血症、肺炎、気管支肺異形成症、壊死性腸炎及び脳室内出血等の新生児合併症が一つでも観察される場合と定義した。分娩後72時間以内で血液培養が陽性である場合に、先天性新生児敗血症と診断した。呼吸時雑音及び胸隔収

10

20

30

40

50

縮があり、酸素要求量が増加し($FiO_2 > 0.4$)、他の肺疾患の証拠なしに臨床病理検査上または放射線検査上に特徴的な所見がある場合を新生児呼吸困難症候群と診断した。肺炎は、生後7日以内の気管吸引物または胸腔チューブ試料からの培養が陽性であってもなくても、臨床的に、または放射線学的に明白な所見がある場合、これを肺炎と診断した。

【0076】

Bancalari等が定義したように(1)生後1週間の間、最少3日以上、間欠的陽圧換気が要求され、(2)生後28日以上頻呼吸、肋間または肋骨下陥没及び聴診上の呼吸性雑音を特徴とする、慢性呼吸疾患に進行する臨床症状があり、(3)生後28日以上、50mmHg以上の PaO_2 を維持するために追加の酸素の供給を必要とし、(4)胸部放射線所見で両側の肺に線状の陰影があり、正常なまたは増加した低吸収域が交互に現れる場合に気管支肺異形成症と診断した。

10

【0077】

幾つかのケースでは、剖検によって気管支肺異形成症を診断した。脳室内出血は、McNamin等の定義にしたがい診断した。最少24時間以上、腹部膨満と摂食困難(feeding intolerance)があり、放射線学的に腸壁内空気、腸破裂、および胎便閉鎖症候群の所見があり、または手術もしくは剖検所見で壊死性腸破裂がある場合に、これを壊死性腸炎と診断した。羊水内MMP-8の濃度測定は、前記例2と同様な方法で測定した。

【0078】

その結果、対象239名中107名(頻度45%)で新生児罹患の発病が診断された。羊水内MMP-8の平均濃度は、主要な新生児罹患がない場合には2.35ng/mlと測定された一方、新生児罹患がある場合には160.9ng/mlと測定され、有意に高かった($p < 0.001$)。詳細な結果を下記表7に示す。

20

【0079】

【表7】

〈表7〉 新生児罹患の有無によるMMP-8の濃度

| 新生児 罹患 | 平均値 (ng/ml) | 範囲 (ng/ml) |
|--------|-------------|--------------|
| 有 | 17.0 | < 0.3-4202.7 |
| 無 | 2.35 | < 0.3-1333.1 |

30

【0080】

羊水検体で新生児罹患を診断するための基準値を決めるために、受診者動作特性曲線分析を行なった。その結果、新生児罹患診断の敏感度と陽性予測値を全て考慮して、MMP-8の基準値に23ng/mlを選択した。MMP-8(基準値23ng/ml)の新生児罹患に対する診断能力を確認した結果、特異度(77%)、陽性予測値(63%)及び陰性予測値(65%)と優れていた。その結果を下記表8に示す。

【0081】

【表8】

〈表8〉 新生児罹患に対するMMP-8の診断能力

| | |
|--------|-----|
| 敏感度 | 50% |
| 特異度 | 77% |
| 陽性 予測値 | 63% |
| 陰性 予測値 | 65% |

40

【0082】

また、敗血症が発生しない場合の羊水内MMP-8の平均濃度は、4.4ng/mlである一方、敗血症が発生した場合には208.95ng/mlと測定され、有意に高かった($p < 0.05$)。詳細な結果を下記表9に示す。

50

【0083】

【表9】

〈表9〉 新生児敗血症の有無によるMMP-8の濃度

| 新生児 敗血症 | 平均値 (ng/ml) | 範囲 (ng/ml) |
|---------|-------------|--------------|
| 有 | 208.95 | 2.4-1568.6 |
| 無 | 4.4 | < 0.3-4202.7 |

【0084】

この時、23ng/mlを基準値にMMP-8の新生児罹患に対する診断能力を確認した結果、感度 10
 度(67%)、特異度(66%)及び陰性予測値(99%)と、優れていた。その結果を下記表10に示す。

【0085】

【表10】

〈表10〉 MMP-8の新生児敗血症の有無に対する診断能力

| | |
|--------|-----|
| 感度 | 67% |
| 特異度 | 66% |
| 陽性 予測値 | 5% |
| 陰性 予測値 | 99% |

20

【0086】

例5: 羊水内MMP-8を利用した脳性麻痺の診断

羊水検査を行ない、妊娠35週以前に単胎児で早産された116名の新生児を対象にした。こ
 れらを出生後3年間追跡観察して、羊水内MMP-8の濃度と脳性麻痺の発生との関係を調査し
 た。神経発生学的検査での一定の異常(発達のマイルストーンの異常、ボイタ法による姿
 勢の異常または反射異常)及び筋緊張の持続的な異常がある場合にこれを脳性麻痺と診断
 した。

【0087】

その結果、脳性麻痺がない新生児を分娩した妊婦の羊水内MMP-8の平均濃度は平均6.4ng/m
 l[範囲、< 0.3-3836.8]である一方、脳性麻痺が発生した新生児を分娩した妊婦では平均1 30
 53.9ng/ml[範囲、< 0.3-1535.9]と測定され、有意に高かった($p < 0.01$)。また、脳性麻痺
 が発生した新生児の出生週数は、そうでない場合よりさらに早かった。出生時の妊娠期間
 及び羊水培養の結果を補正した後にも、増加した羊水内MMP-8の濃度は、脳性麻痺発生の
 可能性を有意に増加させることを確認した(オッズ比、6.0; 95% 信頼区間、1.1-33.0; p
 < 0.05)。

【0088】

羊水検体で脳性麻痺を診断するための基準値を決めるために、受診者動作特性曲線分析を
 行なった。その結果、図6に示すとおり、脳性麻痺診断の感度と陽性予測値を全て考慮
 して、MMP-8の基準値に23ng/mlを選択した。MMP-8(基準値23ng/ml)の脳性麻痺に対する診
 断能力を確認した結果、感度(85%)、特異度(69%)及び陰性予測値(97%)と優れていた。 40
 その結果を下記表11に示す。

【0089】

【表11】

〈表 11〉 脳性麻痺に対する MMP-8 の診断能力

| | |
|---------|-----|
| 敏感度 | 85% |
| 特異度 | 69% |
| 陽性 予測 値 | 26% |
| 陰性 予測 値 | 97% |

【産業上の利用可能性】

【0090】

上記で詳しく見たように、本発明は羊水内MMP-8の濃度を測定することによって、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断できる診断試薬系と診断キットを提供する。発色反応と連結した抗原-抗体反応を利用して、本発明の診断試薬系及び診断キットは、抗-MMP-8抗体を1種または2種以上含むことを特徴とする。本発明の診断試薬系及び診断キットは早産症状や早期破水症状が見られる妊婦だけではなく、このような症状が全く見られない妊婦にも適用できる。胎児の血中サイトカインレベルを測定する従来の方法に比べて、本発明は優れた敏感度と特異度を示すため、早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断に非常に有用に使用できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】自然早産の患者及び自然満月分娩の患者の羊水内MMP-8及びIL-6の濃度分布を示したグラフである。

【図2】自然早産を予測できる基準値を決めるために、羊水内MMP-8の敏感度と特異度をプロットした受診者動作特性曲線を示したグラフである。

【図3】臍帯炎患者及び正常人の羊水内MMP-8の濃度分布を示したグラフである。

【図4】臍帯炎を予測できる基準値を決めるために、MMP-8の敏感度と特異度をプロットした受診者動作特性曲線を示したグラフである。

【図5】脳性麻痺を発症した新生児を分娩した患者と正常人の羊水内MMP-8の濃度分布を示したグラフである。

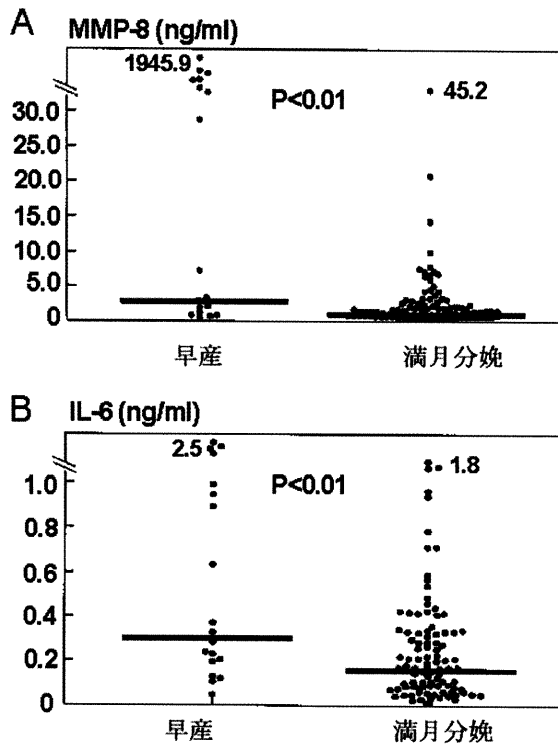
【図6】脳性麻痺の産前発症を予測できる基準値を決めるために、MMP-8の敏感度と特異度をプロットした受診者動作特性曲線を示したグラフである。

20

30

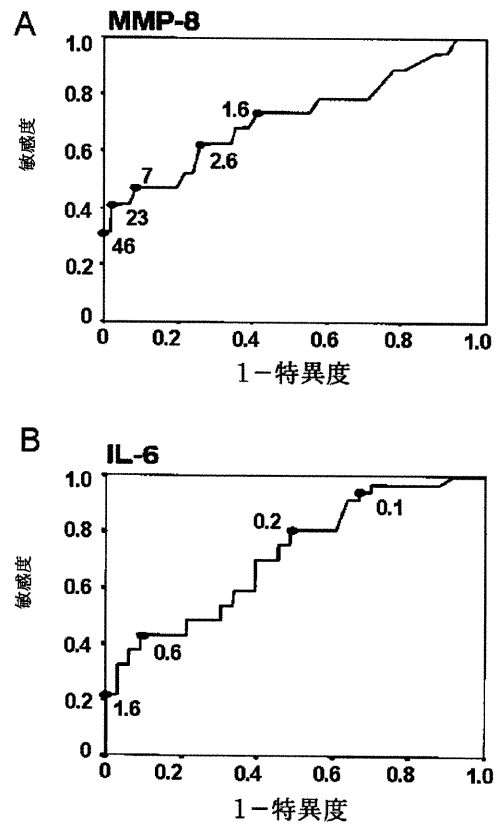
【 図 1 】

【 図 1 】



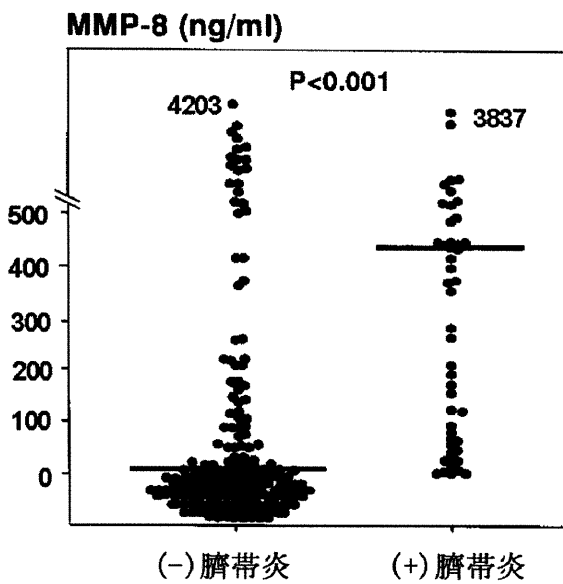
【 図 2 】

【 図 2 】



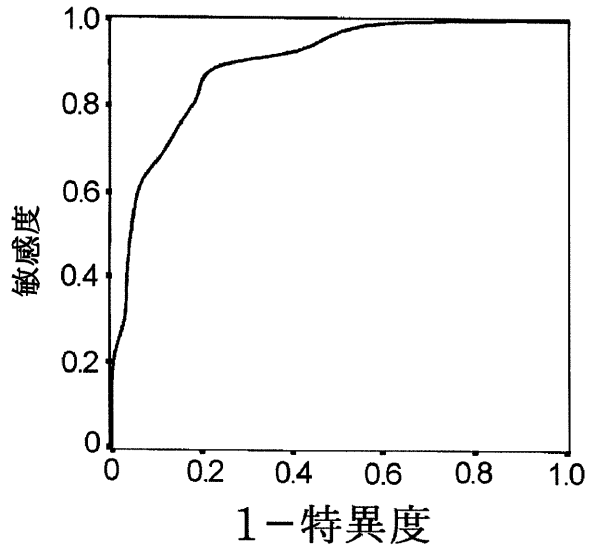
【 図 3 】

【 図 3 】



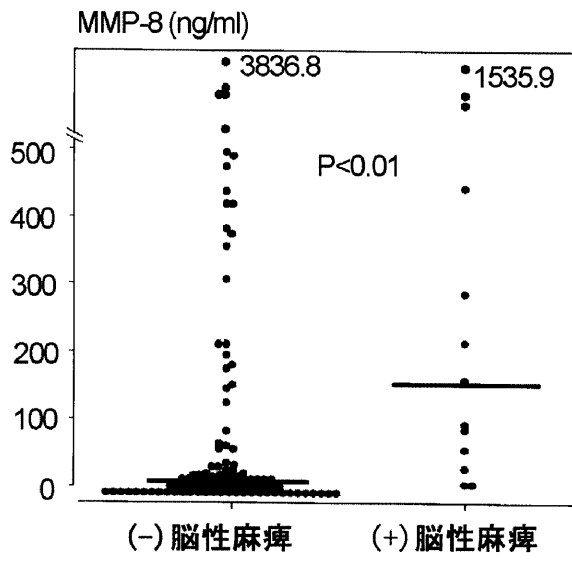
【 図 4 】

【 図 4 】



【 図 5 】

【 図 5 】



【 図 6 】

【 図 6 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/42770 A1

(51) International Patent Classification: G01N 33/53

(21) International Application Number: PCT/KR01/01306

(22) International Filing Date: 1 August 2001 (01.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2000/69283 21 November 2000 (21.11.2000) KR

(71) Applicant and
(72) Inventor: YOON, Bo Hyun [KR/KR]; #305-603 Shin Bampo 8-cha Apt., Chamwon-dong, Seocho-ku, Seoul 137-950 (KR).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: with international search report

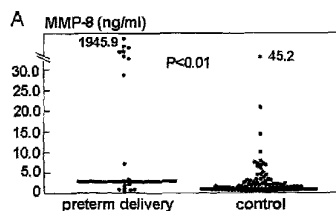
(74) Agent: LEE, Won-Hye; 8th Floor, Sung-ji Heights II, 642-16 Yoksam-dong, Kangnam-ku, Seoul 135-080 (KR).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

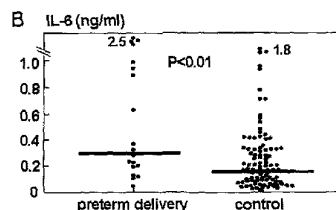
(54) Title: DIAGNOSTIC AGENTS FOR THE PRENATAL DIAGNOSIS OF PRETERM DELIVERY, FETAL INFECTION, AND FETAL DAMAGE, AND DIAGNOSTIC KIT CONTAINING THE SAME



WO 02/42770 A1



(57) Abstract: This invention is about a method for the prenatal diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, and diagnostic reagent system and diagnostic kit for the diagnosis. The method, diagnostic reagent system, and kit are based on the finding that the level of MMP-8 in the amniotic fluid is significantly higher when the pregnant woman is at risk for preterm delivery, intrauterine infection, and fetal damage. The diagnostic reagent system and kit can be applied to the patients without, as well as with, clinical signs of preterm labor or premature rupture of fetal membranes. With the superiority in sensitivity and specificity as well as its less invasiveness compared to the conventional method of measuring fetal blood cytokine levels, this diagnostic reagent system and kit is very useful in the prenatal diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage.



WO 02/42770

PCT/KR01/01306

DIAGNOSTIC AGENTS FOR THE PRENATAL DIAGNOSIS OF PRETERM
DELIVERY, FETAL INFECTION, AND FETAL DAMAGE, AND DIAGNOSTIC
KIT CONTAINING THE SAME

5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a diagnostic reagent system for the prenatal diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, and a diagnostic kit using the same reagents and, more particularly, to the use of an amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) concentration as a prenatal diagnostic marker for preterm delivery, fetal infection, and fetal damage.

15 BACKGROUND OF THE INVENTION

It has long been recognized in the medical world that the prevention of preterm delivery or premature rupture of fetal membranes is preferred to the post-treatment thereof. However, a great variety of factors are now known to cause preterm delivery or premature rupture of fetal membranes, making it difficult to prevent the undesirable events. Traditional approach to the prevention of preterm delivery was to identify high-risk group of women to which special attention should be paid based on the knowledge of

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

obstetrics and gynecology, demography, and various syndromes (Main et al., Am. J. Obstet. Gynecol., 151:892-898, 1985). However, this approach has the problem of being neither sensitive nor specific. To circumvent this problem, 5 extensive research has been directed to find biochemical markers for the prediction of impending preterm delivery and premature rupture of fetal membranes, leading to the nomination of plasma estradiol-17 beta, progesterone, C-reactive protein as promising candidates. However, these 10 candidates were found to be of poor accuracy.

Besides the identification of such biochemical predictable markers, significant attention has been paid to the biochemical role of collagen, based on the fact that the chorionic membrane is composed of fibrous connective tissue 15 and the tensile strength of fibrous connective tissue is determined by its collagen content, as revealed through studies on the premature rupture of fetal membranes. On the basis of their finding that prematurely ruptured fetal membranes has low collagen content compared to normal 20 membranes, some scientists concluded that the premature rupture of fetal membranes is attributable to the lower tensile strength than that of normal fetal membranes (Obstet. Gynecol., 57:487-89, 1981). According to another study, it was reported that the serum activity of collagenase was high 25 in prematurely ruptured fetal membranes and preterm labor

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

(Obstet. Gynecol., 75:84-88, 1990). However, the precise mechanism of such biochemical changes has not yet been elucidated (FEBS Letters, 244(2):315-318, 1989).

Statistically, the frequency of preterm delivery before 37 weeks of gestation is estimated to be about 8 to 10%. In Korea, about 50,000 neonates are prematurely delivered every year. Preterm delivery often causes serious neonatal complications including sepsis, respiratory distress syndrome, pneumonia, bronchopulmonary dysplasia, intraventricular hemorrhage, necrotizing enterocolitis and cerebral palsy. The earlier the preterm delivery is, the greater is the frequency and severity of such sequelae. Therefore, if preterm delivery is prevented, it will be possible to reduce remarkably the occurrence of premature neonates disabled by such diseases.

Recent reports disclose that at least 30 to 40% of preterm deliveries are associated with intrauterine infection (Butler NR., Bonham DG., Prenatal mortality. The first report of the British perinatal mortality survey, Edinburgh, Churchill Livingstone, 115-145, 1963; Romero R., Avila C., Sepulveda W., Preterm birth. Cause, prevention, and management., McGraw-Hill Company, 97-136, 1993; Romero R., Mazor M., Clin. Obstet. Gynecol., 31:553, 1990; Gibbs RS., Romero R., Hiller SL., et al., Am. J. Obstet. Gynecol., 166:1515, 1992).

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

Intrauterine infection may cause fetal damage by the following process. Intrauterine infection activates the maternal and fetal immune system to secrete inflammatory mediators, such as cytokines from lymphocytes and MMPs (matrix-metalloproteinases) from neutrophils. When the inflammatory mediators reach a certain level, prostaglandin, which promotes uterine contraction, is produced, causing active labor leading to preterm delivery. Additionally, increased levels of inflammatory mediators cause the fetus to be affected by fetal inflammatory response syndrome (FIRS). Inflammatory mediators cause sepsis or acute respiratory distress syndrome or damage organs as a result of autoimmune diseases in adults, likewise organs of the fetus can be systemically injured by inflammatory mediators, resulting in brain white matter lesions and bronchopulmonary dysplasia. Therefore, the prenatal diagnosis of intrauterine inflammation is essential for the prevention of preterm delivery and fetal damage.

Generally, the prenatal diagnostic methods of intrauterine fetal infection in current use are cordocentesis, by which fetal blood cytokine levels are measured, and histologic examination of the umbilical cord to identify funisitis. However, cordocentesis is limitedly used due to its invasiveness, and funisitis can be diagnosed only after delivery (Yoon BH., Romero R., Park JS., Kim CJ.,

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

Choi JH., Han TR., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 182:675-81, 2000; Yoon BH., Romero R., Kim KS., Park JS., Ki SH., Kim BI., Jun JK., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 181:773-9, 1999; Romero R., Gomez R., Ghezzi F., Yoon BH., Mazor M., Edwin
5 SS., Berry SM., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 179:186-93, 1998).

The white blood cell count in the amniotic fluid is increased in cases of infection or inflammation of the amniotic cavity. Neutrophils in the amniotic fluid are considered to be of fetal origin (Knauper V., Kramer S.,
10 Reinke H., Tschesche H., *Eur. J. Biochem.*, 189:295-300, 1990; Blaser J., Triebel S., Massjosthusmann U., Romisch J., Krahl-Mateblowski U., Freudenberg W., Fricke R., Tschesche H., *Clinic. Chim. Acta.*, 244:17-33, 1996; Segura-Valdez L., Pardo A., Gaxiola M., Uhal BD., Becerril C., Selman M.,
15 *Chest.*, 117:684-94, 2000; Romanelli R., Mancini S., Laschinger C., Overall CM., Sodex J., MacCulloch CA., *Infect. Immun.*, 67:2319-26, 1999; Maymon E., Romero R., Pacora P., Gomez R., Athayde N., Edwin S., Yoon BH., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 183:94-9, 2000). Therefore, it is postulated that
20 secretory products of neutrophils in amniotic fluid might reflect a fetal inflammatory response. In the present invention, the level of MMP-8 in the amniotic fluid is focused on. The determination of MMP-8 in amniotic fluid may be a marker of the fetal inflammatory response syndrome
25 which can be diagnosed currently by histologic examination

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

of the umbilical cord after delivery or by cordocentesis with the determination of fetal blood cytokines.

MMP (matrix metalloproteinase) series, also collectively known as matrixins, are zinc-dependent endopeptidases that function to degrade extracellular matrix proteins. These proteases constitute a large and growing family of proteins which share similar structures and enzymatic properties. MMPs are broadly classified into five groups. Along with MMP-1 and MMP-13, MMP-8 belongs to an interstitial collagenase group. MMP-8 is similar in size to other interstitial collagenases, but is glycosylated to a far greater extent. When fully glycosylated, a proenzyme form of MMP-8 has a molecular weight of 85 kDa. The proenzyme is converted into an active form of 60-70 kDa with the loss of 15-25 kDa segment. ProMMP-8 is activated *in vitro* by various proteinases, including trypsin, chymotrypsin and cathepsin G. Organomercurial compounds were also found to activate proMMP-8. The activation mechanism of MMP-8 *in vivo* has not yet been fully clarified.

The prior technique concerning MMP-8 is found in U. S. Pat. No. 5,736,341 which discloses methods and test kits capable of sensitive and specific diagnosis of periodontal diseases, based on monoclonal antibodies against MMP-8. Described in the patent is that, since MMP-8 is directly associated with the destruction of periodontal connective

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

tissues during progression of periodontitis and diffused into oral cavity through the gingival pocket containing gingival crevicular fluid, measurement of the MMP-8 level in the oral cavity enables the site-specific diagnosis of
5 periodontitis. For the specific and sensitive biochemical detection of periodontal diseases in progression, these methods measure the conversion of a proform of MMP-8 into an active form, because the conversion takes place during the process of periodontal infection. Nowhere is mentioned the
10 use of MMP-8 in connection with preterm delivery and fetal infection and damage.

U. S. Pat. No. 5,641,636 refers to a method of predicting the onset of fetal membrane rupture based on the activity of another matrix collagenase, MMP-9, which belongs
15 to a different group of enzymes from that of MMP-8. MMP-9 is a 92-kDa type IV collagenase/gelatinase or gelatinase B with the largest molecular weight among MMPs. For activation, the proenzyme form of MMP-9, i.e. proMMP-9, is initially cleaved into an intermediate active form of about 83 kDa
20 with concurrent production of a 9 kDa inactive cleavage fragment. The intermediate active form is further processed proteolytically into an active form of MMP-9 with 67 kDa (J. Biol. Chem., 267 (30):21712-21719, 1992). The activation of MMP-9 means the conversion into the 83 kDa intermediate
25 active form or the 67 kDa fully active form with gelatin

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

degradation activity. This patent measures the hydrolytic activity of MMP-9 to degrade denatured collagens, e.g. gelatins, to diagnose the premature rupture of fetal membranes. However, because MMP-9 is already present in the amniotic fluid before the onset of parturition, this method has limited value in predicting the premature rupture of fetal membranes.

Approximately 30 to 40% of patients with preterm labor or premature rupture of fetal membranes undergo preterm delivery. In this condition, various substances, including interleukin-6, interleukin-8, TNF- α , interleukin-1 β , GRO α , RANTES, white blood cells, MIP-1 α , MCP-1, glucose, PGE₂, and angiogenin, are known to be present at increased levels in the amniotic fluid. However, these substances are of poor utility for the prediction of preterm delivery because their levels remain unchanged or are not detected in the amniotic fluid of the pregnant women without clinical signs of preterm labor and are increased only after the onset of preterm labor or premature fetal membrane rupture.

20

SUMMARY OF THE INVENTION

The intensive and thorough research on the prediction of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, conducted by the present inventors to overcome the problem

25

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

of invasiveness of cordocentesis with the determination of fetal blood cytokines and the problem of post-delivery identification of funisitis through histologic examination of the umbilical cord, resulted in the finding that the activity of MMP-8 is detected in the amniotic fluid of women without clinical signs of preterm labor or preterm premature rupture of fetal membranes as well as those with such signs, which allowed the development of a method and kit capable of diagnosing preterm delivery, fetal infection, and fetal damage.

Therefore, it is the objective of the present invention to provide a method and kit for the prenatal diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage in pregnant women with or without clinical signs of preterm labor or premature rupture of fetal membranes, whereby neonatal morbidity and serious complications or sequelae, such as cerebral palsy, can be prevented.

As one element of the present invention, there is provided a method for the prenatal diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, by measuring the level of MMP-8 in the amniotic fluid in pregnant women with or without clinical signs of preterm labor or premature rupture of fetal membranes.

As another element of the present invention, there is provided a diagnostic reagent system and kit for the

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

prenatal diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5

Fig. 1 shows distributions of amniotic fluid MMP-8 and IL-6 concentrations in patients with a spontaneous preterm delivery and with a spontaneous full-term delivery.

10 Fig. 2 shows receiver operating characteristic curves in which sensitivity is plotted versus specificity to select a cutoff value for amniotic fluid MMP-8 in the identification of spontaneous preterm delivery.

Fig. 3 shows distributions of amniotic fluid MMP-8 concentrations in patients with and without funisitis.

15 Fig. 4 shows a receiver operating characteristic curve in which sensitivity is plotted versus specificity to select a cutoff value for MMP-8 in the identification of funisitis.

20 Fig. 5 shows distributions of amniotic fluid MMP-8 concentrations in patients with and without prenatal development of cerebral palsy.

Fig. 6 shows a receiver operating characteristic curve in which sensitivity is plotted versus specificity to select a cutoff value for MMP-8 in the identification of prenatal development of cerebral palsy.

25

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In one embodiment, the present invention pertains to determination of the activity of MMP-8 in the amniotic fluid, 5 thereby prenatally diagnosing preterm delivery, fetal infection, and fetal damage.

With activity to degrade extracellular matrix proteins, MMP-8 is a zinc-dependent endopeptidase. Belonging to an interstitial collagenase group, MMP-8 can be purified from 10 neutrophilic leukocytes in proenzyme form (proMMP-8). ProMMP-8 is highly glycosylated with a molecular weight of approximately 85 kDa. Activation of the proenzyme is achieved by cleavage of the proenzyme molecule, which creates the active collagenase whose molecular weight varies 15 from 60 to 70 kDa, depending on the mode of activation. The mechanism of activation in vivo likely involves reactive oxygen species and oxidants such as hydroxyl radicals. When the N-terminal segment of the procollagenase are removed, the active site of the enzyme is generated and exposed.

20 MMP-8 is produced as a proenzyme form (proMMP-8) by neutrophilic leukocytes. ProMMP-8 exists in granules for storage and is secreted in response to stimuli. Secreted proMMP-8 is activated at extracellular interstitium and degrades type I, II and III collagens with high specificity 25 for type I collagen. This enzyme, known as an important

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

mediator of inflammation-related tissue injury, is involved in the tissue injury caused by inflammatory diseases such as periodontitis, chronic obstructive pulmonary disease, rheumatoid arthritis, etc. Also, MMP-8 is known to be
5 implicated in the progression of labor by causing the effacement and dilatation of the uterine cervix.

Based on the finding that an elevated mid-trimester amniotic fluid concentration of MMP-8 in women both with and without clinical signs of preterm labor or premature rupture
10 of fetal membranes, is highly indicative of preterm delivery, the present inventors developed a prenatal diagnostic method of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage.

In accordance with an embodiment of the present invention, there is provided a method for the prenatal
15 diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, comprising the steps of:

- 1) sampling an amniotic fluid from a pregnant woman;
and
- 2) quantitatively measuring MMP-8 in the amniotic
20 fluid sample.

Not only women with clinical signs of preterm labor or premature rupture of fetal membranes, but also women without such clinical signs can be diagnosed for preterm delivery.

The sampling of an amniotic fluid can be achieved by
25 transabdominal amniocentesis under ultrasonographic guidance

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

or other sampling processes. For quantitative determination of an MMP-8 level in the amniotic fluid, any analytic methods, if based on antigen-antibody coupling, can be used, and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is preferred.

5 To determine if MMP-8 serves as a powerful clinical indicator for the prediction of preterm delivery in a mid-pregnancy stage, amniotic fluid concentrations of MMP-8 were compared with those of IL-6, another excellent indicator of inflammation, in patients who had a
10 spontaneous preterm delivery before 32 weeks of gestation or a term delivery after mid-trimester amniocentesis without any clinical signs of impending preterm delivery. The amniotic fluid concentrations of MMP-8 and IL-6 were significantly higher in those with preterm delivery.
15 Patient with an amniotic fluid MMP-8 concentration higher than 23 ng/ml had a spontaneous delivery in 89% of cases, as seen in Fig. 1. In addition, statistical comparison demonstrated the superiority of MMP-8 to IL-6 in sensitivity and specificity for the prediction of preterm
20 delivery. Considering sensitivity, specificity and odds ratio as a whole, an amniotic fluid MMP-8 level of 23 ng/ml was selected as a cutoff suitable for the prediction of preterm delivery.

An elevated mid-trimester amniotic fluid MMP-8
25 concentration higher than the cutoff means high risk of

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

preterm delivery before 32 weeks of gestation. Therefore, when genetic amniocentesis is conducted in a mid-pregnancy stage, the quantification of amniotic fluid MMP-8 levels is helpful in the identification of patients who are likely to undergo a preterm delivery.

To prove the usefulness of MMP-8 as a clinical predictor for fetal infection and fetal damage, amniotic fluids taken from consecutive patients who delivered preterm singleton neonates (gestational age < 36 weeks) within 72 hours of amniocentesis were cultured for aerobic and anaerobic bacteria and for mycoplasmas and amniotic fluid MMP-8 concentrations were determined by ELISA. A histologic examination of placenta was made after delivery. MMP-8 concentrations were observed to be significantly higher in patients with a positive amniotic fluid culture than in patients with a negative amniotic fluid culture. Also, the presence of histologic chorioamnionitis in placenta entailed a significantly higher amniotic fluid MMP-8 level than does the absence thereof (see data of Tables 1 to 4).

From these results, it can be inferred that the infection of amniotic fluid with microorganisms leads to such a significant increase in amniotic fluid MMP-8 level that quantification thereof can be diagnostic of intrauterine infection. As for histologic chorioamnionitis, it also induces a significant increase of amniotic fluid

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

MMP-8 level, so that the determination of the amniotic fluid MMP-8 level can reflect the intrauterine infection. In consequence, MMP-8 can be used as an effective clinical predictor for the prenatal diagnosis of intrauterine infection and inflammation as well as preterm delivery. Especially, quantification of amniotic fluid MMP-8 levels can diagnose intrauterine inflammation with higher specificity and positive predictive value.

In order to diagnose fetal infection straightforwardly, amniotic fluid concentrations of MMP-8 were compared according to the presence or absence of funisitis.

The fetal inflammatory response syndrome (FIRS) is a multi-system disorder associated with impending preterm delivery and adverse neonatal outcome. Regarded as the histologic counterpart of FIRS, inflammation of the umbilical cord (funisitis) has been associated with an increased risk for the development of cerebral palsy. Neutrophils found in the amniotic cavity are of fetal origin. Based on these findings, it is hypothesized that secretory products from neutrophils might be an index of FIRS. To test this hypothesis, the relationship between amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and funisitis was examined. The MMP-8 concentration was observed to be significantly higher in the presence of funisitis than in the absence of funisitis. The diagnostic indices of MMP-8

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

in the identification of funisitis were found to be high in sensitivity, specificity, and negative predictive value (see Tables 5 and 6, and Figs. 3 and 4).

From these results, it was found that there is a strong association between amniotic fluid MMP-8 concentrations and fetal inflammation (funisitis). Therefore, the present invention proposes that assessment of amniotic fluid MMP-8 concentrations may assist the diagnosis of the fetal infection without resorting to conventional invasive fetal blood sampling.

With the evidence of the correlation between the amniotic fluid MMP-8 concentration and fetal infection, the present inventors studied the relationship between amniotic fluid MMP-8 concentrations and neonatal morbidity, which includes neonatal sepsis, respiratory distress syndrome, pneumonia, bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis, and intraventricular hemorrhage. A significantly higher MMP-8 concentration was seen in the presence of neonatal morbidity than in the absence of neonatal morbidity (see Table 7). The diagnostic indices of MMP-8 in the identification of neonatal morbidity were excellent in specificity, and positive and negative predictive values (see Table 7 and 8). Additionally, the amniotic fluid MMP-8 concentration was significantly higher in patients who delivered neonates with neonatal sepsis than

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

in those who delivered neonates without neonatal sepsis (P<0.05) (see table 9).

The data, taken together, demonstrates that amniotic fluid MMP-8 concentration can be useful as a diagnostic marker in the prediction of neonatal sepsis and perinatal morbidity.

Intrauterine infection or inflammation has been implicated in the etiology of cerebral palsy. FIRS is believed to cause fetal brain damage in term and preterm birth. Neutrophils are the cells most frequently recruited into the amniotic fluid in cases of infection and they are considered to be of fetal origin. The amniotic fluid level of MMP-8, an enzyme secreted by activated neutrophils, was found to be significantly higher in cases of intrauterine infection and/or inflammation, as demonstrated in the following Examples 2 and 3. Based on this background, an examination was made to determine if increased concentrations of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in amniotic fluid are associated with the development of cerebral palsy at the age of three years.

A significantly higher level of MMP-8 was observed in the amniotic fluid taken from the patients whose newborns developed cerebral palsy, compared to those whose newborns did not develop cerebral palsy (see Fig. 5), demonstrating that MMP-8 is very useful as a diagnostic marker for the

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

prediction of cerebral palsy (see Figs. 5 and 6, and Table 11).

We could see that the elevated amniotic fluid MMP-8 concentration is associated with a six-fold higher odds of developing cerebral palsy. That is, the amniotic fluid MMP-8 concentration can be used as a prenatal diagnostic marker for the prediction of cerebral palsy.

After extensive studies, a cutoff value of amniotic fluid MMP-8 in the identification of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage was selected. In this regard, the pregnant woman was identified as being at risk for preterm delivery, neonatal morbidity, fetal infection (funisitis), and cerebral palsy when cutoff value of amniotic fluid MMP-8 is higher than 5 - 100 ng/ml and preferably higher than 10 - 50 ng/.

Based on the usefulness of the amniotic fluid MMP-8 concentration as a diagnostic marker in the identification of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, a reagent system can be developed for diagnosing preterm delivery, fetal infection, and fetal damage.

Therefore, in another embodiment of the present invention, there is provided a diagnostic reagent system for the identification of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, which is based on the quantification of amniotic fluid MMP-8 concentrations. In detail, the

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

diagnostic reagent system makes use of an analytic mechanism comprising the steps of:

- 1) adsorbing primary MMP-8 antibodies onto a matrix,
- 2) incubating the MMP-8 antibodies adsorbed onto the
5 matrix in the presence of an amniotic fluid and washing the matrix to remove unbound antigens,
- 3) coupling a secondary chromogenic enzyme- or fluorescent-linked antibody to the MMP-8 bound to the primary antibodies adsorbed onto the matrix, and
- 10 4) developing a chromogenic reaction in the matrix by use of a coloring agent with quantitative analysis of the amount of antibody-bound MMP-8.

Examples of the matrix useful in the step 1 include a nitrocellulose membrane, a 96-well plate of polyvinyl resin,
15 a 96-well plate of polystyrene resin, and a glass slide.

For quantitative analysis, the secondary antibody to be coupled to the MMP-8 bound to the primary antibody is linked to a chromogenic enzyme, such as peroxidase, alkaline phosphatase, and biotin, or a fluorescent agent such as FITC
20 (Fluorescein Isothiocyanate) and TRITC.

The coloring agent can be selected from a group of agents consisting of 4CN (4-chloro-1-naphtol), DAB (diaminobenzidine), AEC (aminoethyl carbazol), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), OPD (o-
25 phenylenediamine) and TMB (tetramethyl benzidine).

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

In principle, the diagnosis is based on the quantification of amniotic fluid MMP-8 concentrations, which takes advantage of the reaction of MMP-8 to its antibodies. In this connection, monoclonal or polyclonal anti-MMP-8 antibodies are immobilized to a solid matrix and reacted to MMP-8 in a sample, followed by washing the matrix to remove unbound antibodies and MMP-8. Then, a secondary monoclonal or polyclonal antibody which is linked with an enzyme or a fluorescent is bound to the immobilized MMP-8. A horseradish peroxidase polyclonal antibody, or a biotinylated rabbit polyclonal or monoclonal antibody is usually used as the secondary antibody. A chromogenic reaction for visualization is developed in the presence of a peroxide and a coloring agent. Addition of an acid halts the chromogenic reaction, followed by the measurement of absorbance at 450 nm.

Based on this diagnostic mechanism, a diagnostic kit can be configured, which uses the same diagnostic reagent system.

Therefore, in a further embodiment of the present invention, there is provided a diagnostic kit for the identification and prediction of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage. With the aid of the diagnostic kit, preterm labor or premature rupture of fetal membranes can be assessed quantitatively or qualitatively with

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

convenience. For the assay of an MMP-8 antigen, a marker antibody is prepared by coupling gold or colloid particles to an anti-MMP-8 antibody. The marker antibody against MMP-8 is bound to MMP-8 to form an immune complex. This immune
5 complex is again reacted with the MMP-8 antibody, and then washing fluid for excess marker antibody usually made of urea etc. is added. A positive result can be visualized by the eye when the MMP-8 concentration exceeds a certain level. Such a diagnostic kit may comprise anti-MMP-8 antibody,
10 standard MMP-8, matrix, assay buffer, chromogenic enzyme- or fluorescent-labeled secondary antibody, and adhesive plate cover.

Alternatively, the diagnostic kit of the present invention may adopt an automated analytic method using a
15 biological microchip. For instance, a diagnostic kit can be structured to perform immunoblotting using an anti-MMP-8 antibody-coated slide glass. This diagnostic kit may comprise a biological microchip onto the surface of which an anti-MMP-8 antibody is immobilized, appropriate buffer,
20 standard MMP-8, and secondary antibody.

EXAMPLES

A better understanding of the present invention may be
25 obtained in light of the following examples which are set

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

forth to illustrate, but are not to be construed to limit the present invention.

**EXAMPLE 1: Selection of Diagnostic Cutoff Value for Prenatal
5 Diagnosis of Preterm Delivery**

Strong evidences implicate chronic intra-uterine infection in the etiology of preterm delivery. In this example, an examination was conducted to determine if
10 amniotic fluid concentrations of MMP-8 and interleukin-6 (IL-6) can be used to identify patients at risk for spontaneous preterm delivery among pregnant women without clinical signs of preterm delivery.

For this end, a case-control study was designed with
15 stored amniotic fluid obtained from women who had mid-trimester genetic amniocentesis. Amniotic fluid levels of MMP-8 and IL-6 were determined by ELISA in 19 patients with a spontaneous preterm delivery before 32 weeks of gestation and 95 control cases who delivered normal neonates
20 at full-term. Cases with an abnormal fetal karyotype and major anomalies were excluded from this analysis.

The median amniotic fluid MMP-8 concentration with spontaneous preterm delivery was 3.1 [0.3-1954.9] ng/ml, while the level was 1.3 [<0.3-45.2] ng/ml in the control
25 cases. The median amniotic fluid IL-6 concentration was 0.32

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

[0.04-2.52] ng/ml in patients with spontaneous preterm delivery while the level was 0.18 [0.01-1.81] ng/ml in the control cases. Both MMP-8 and IL-6 concentrations of amniotic fluid taken at mid-pregnancy stage were significantly higher in patients with spontaneous preterm delivery than in the control cases with full-term delivery ($p < 0.01$), as shown in Fig. 1.

After the assessment of MMP-8 concentrations in patients and the control cases, when the amniotic fluid MMP-8 concentration at a mid-pregnancy stage was above 23 ng/ml, 89% of the cases investigated had a spontaneous preterm delivery.

Additionally, an amniotic fluid MMP-8 cutoff value of 23 ng/ml at a mid-pregnancy stage showed a sensitivity of 42% (8/19) and a specificity of 99% (94/95) in the identification of the patients with early preterm delivery after genetic amniocentesis, while an IL-6 cutoff value of 0.6 ng/ml showed a sensitivity of 42% (8/19) and a specificity of 92% (87/95), as shown in Fig. 2. Over IL-6, MMP-8 was therefore superior in sensitivity, specificity and odds ratio for the identification and prediction of preterm delivery. In consequence, an amniotic fluid MMP-8 concentration of 23 ng/ml was selected as a cutoff in the identification of prematurity.

25

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

EXAMPLE 2: Relationship between Amniotic Fluid Concentration of MMP-8 and Intrauterine Infection and Inflammation

Amniotic fluid concentrations of MMP-8 were examined
5 in the presence or absence of intrauterine infection and
inflammation to determine if the amniotic fluid MMP-8
concentration could be used as a diagnostic marker in the
identification of intrauterine infection and fetal damage.

In this regard, 255 consecutive patients who delivered
10 preterm singleton neonates (gestational age < 36 weeks)
within 72 hours of amniocentesis at Seoul National
University Hospital, Seoul, Korea, were examined. The
amniotic fluids were measured for MMP-8 level as well as
cultured for aerobic and anaerobic bacteria and for
15 mycoplasmas. In addition, histologic examination of the
placenta was performed. Amniotic fluid was retrieved by
transabdominal amniocentesis under ultrasonographic guidance.

2-1: Amniotic Fluid Culture

20 Immediately after being retrieved by transabdominal
amniocentesis, the amniotic fluid was put into sterile
plastic vessels with caps, and stored therein until
culturing in anaerobic or aerobic media. Useful in
culturing aerobes or anaerobes were blood agar, McConkey's
25 agar, Bactec 6A vial, thioglycollate broth, brucellar blood

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

agar, fresh meat extracts, and pleuropneumoni-like organism broth supplemented with horse serum penicillin polymixin B and amphotericin B. Mycotrim GU was used to culture mycoplasmas.

5

2-2: Measurement of Amniotic Fluid MMP-8 Concentration

Amniotic fluid samples were centrifuged at 700x g for 10 min. The supernatant was used to measure amniotic fluid MMP-8 concentration with ELISA (Amersham Pharmacia Biotech, UK) using two monoclonal antibodies which bind to non-overlapping epitopes.

2-3: Histologic Examination of Placenta

After the placenta was fully drawn out at delivery, tissues excised from the umbilical cord, the chorionic plate, and the placental membrane were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin to prepare slides. Afterwards, the tissue segments were dyed with hematoxylin and eosin for visualization under a microscope. Acute intrauterine inflammation was defined as the presence of inflammatory changes on examination of any of the fetal membrane, chorionic membrane, decidua and the chorionic plate.

Of the 255 subjects, 45 cases were found to have positive amniotic fluid culture, which shows the intrauterine infection frequency to be 18%. On histologic

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

examination of the placenta 113 patients were found to have chorioamnionitis, which indicates the intrauterine inflammation frequency to be 44%. The median amniotic fluid MMP-8 concentrations were detected at a level of 191.4 ng/ml in patients with positive amniotic fluid culture of bacteria and at a level of 2.7 ng/ml in those with negative culture. Therefore, the median amniotic fluid MMP-8 concentration in patients with intrauterine infection were significantly higher than those without intrauterine infection ($p < 0.001$). The results are given in Table 1, below.

TABLE 1
Amniotic Fluid MMP-8 Concentration According to Amniotic Fluid Culture Result

| Bacteria in Amniotic Fluid | Median Value (ng/ml) | Interval (ng/ml) |
|----------------------------|----------------------|------------------|
| Positive | 191.4 | <0.3-4202.7 |
| Negative | 2.7 | <0.3-3929.0 |

With a cutoff value of 23 ng/ml, the diagnostic indices of MMP-8 for the identification of positive amniotic fluid culture were excellent: sensitivity of 76% and negative predictive value of 93%. The results are given in Table 2, below.

TABLE 2
Diagnostic Indices of MMP-8 for the Identification of Positive Amniotic Fluid Culture

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

| | |
|---------------------------|-----|
| Sensitivity | 76% |
| Specificity | 70% |
| Positive Predictive Value | 35% |
| Negative Predictive Value | 93% |

Histologic examination of the placenta revealed that the median concentration of amniotic fluid MMP-8 was 160.9 ng/ml in the presence of chorioamnionitis, but 1.0 ng/ml in the absence of chorioamnionitis. The amniotic fluid MMP-8 concentration was significantly higher in patients with chorioamnionitis than those without chorioamnionitis ($p < 0.001$). The results are given in Table 3, below.

10

TABLE 3
MMP-8 Concentration According to Intrauterine Inflammation

| Histologic Chorioamnionitis | Median Value (ng/ml) | Interval (ng/ml) |
|-----------------------------|----------------------|------------------|
| Present | 160.9 | <0.3-4202.7 |
| Absent | 1.0 | <0.3-766.2 |

15 With a cutoff value of 23 ng/ml, the diagnostic indices of MMP-8 for the identification of intrauterine inflammation (chorioamnionitis) were excellent: sensitivity of 72%, specificity of 89%, positive predictive value of 84%, and negative predictive value of 80%. The results are given
20 in Table 4, below.

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

TABLE 4
Diagnostic Indices for the Identification of Intrauterine
Inflammation

| | |
|---------------------------|-----|
| Sensitivity | 72% |
| Specificity | 89% |
| Positive Predictive Value | 84% |
| Negative Predictive Value | 80% |

5

**EXAMPLE 3: Diagnosis of Funisitis By Use of Amniotic Fluid
Concentration of MMP-8**

Amniotic fluid MMP-8 concentrations were measured in
10 the presence or in the absence of funisitis to determine if
amniotic fluid MMP-8 concentrations could be utilized to
directly diagnose fetal infection.

The relationship between the presence of funisitis and
amniotic fluid concentrations of MMP-8 was examined in 255
15 consecutive patients who delivered preterm singleton
neonates (gestational age < 36 weeks) within 72 hours of
amniocentesis at the Seoul National University Hospital,
Seoul, Korea. Funisitis was diagnosed by the presence of
neutrophil infiltration into the umbilical vessel walls or
20 Wharton jelly. Quantification of MMP-8 concentration was
conducted in the same manner as in Example 2.

Funisitis was diagnosed in 59 cases (funisitis
frequency 23%). The median amniotic fluid MMP-8

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

concentrations were 433.7 ng/ml in patients with funisitis and 1.9 ng/ml in those without funisitis. Therefore, the patients with funisitis had significantly higher median amniotic fluid MMP-8 concentrations compared to those without funisitis ($p < 0.001$). The results are given in Table 5, below and Fig. 3.

TABLE 5
MMP-8 Concentration According to Presence or Absence of Funisitis

| Funisitis | Median Value (ng/mL) | Interval (ng/mL) |
|-----------|----------------------|------------------|
| Present | 433.7 | 1.5-3836.8 |
| Absent | 1.9 | <0.3-4202.7 |

Receiver operating characteristic curve analysis was employed to select a cutoff value for amniotic fluid analytes in the diagnosis of funisitis. As a result, a cutoff of 23 ng/ml was selected for MMP-8 in consideration of both sensitivity and positive predictive value for the diagnosis of funisitis, as seen in Fig. 4. The diagnostic indices of MMP-8 (cutoff 23 ng/ml) in the identification of funisitis were excellent: sensitivity of 90%, specificity of 78%, and negative predictive value of 96%. The results are summarized in Table 6, below.

TABLE 6

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

Diagnostic Indices of MMP-8 for the Identification of Funisitis

| | |
|---------------------------|---------------|
| Sensitivity | 90% (53/59) |
| Specificity | 78% (153/196) |
| Positive Predictive Value | 55% (53/96) |
| Negative Predictive Value | 96% (153/159) |

5 **EXAMPLE 4: Diagnosis of Neonatal Morbidity By Use of Amniotic Fluid MMP-8 Concentration**

Based on the postulation that funisitis would be associated with an increased risk of neonatal infection-related complications such as sepsis, pneumonia, bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis, and intraventricular hemorrhage, amniotic fluid MMP-8 concentrations in cases with such neonatal morbidity were compared with those in normal cases.

15 The relationship between the presence of such neonatal morbidity and amniotic fluid concentration of MMP-8 was examined in 239 consecutive patients who delivered preterm singleton neonates (gestational age < 36 weeks) within 72 hours of amniocentesis at the Seoul National University Hospital, Seoul, Korea. Neonatal morbidity was defined by
20 the development of neonatal complication, such as sepsis, pneumonia, bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis, and intraventricular hemorrhage. Congenital

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

neonatal sepsis was diagnosed in the presence of a positive blood culture within 72 hours of delivery. The diagnosis of neonatal respiratory distress syndrome required the presence of respiratory grunting and retracting, an increased oxygen requirement ($FiO_2 > 0.4$), and diagnostic radiographic and laboratory findings without the evidence of other causes of respiratory disease. Pneumonia was diagnosed in the presence of definite clinical and radiologic findings, with or without a positive culture from tracheal aspirate or chest tube specimen within 7 days of birth. Bronchopulmonary dysplasia was diagnosed by the criteria proposed by Bancalari et al.: (1) Intermittent positive-pressure ventilation was required during the first week of life and for a minimum of 3 days; (2) clinical signs of chronic respiratory disease developed, characterized by tachypnea, intercostal and subcostal retraction, and rales on auscultation, all persisting for longer than 28 days; (3) supplemental oxygen was required for more than 28 days to maintain a PaO_2 over 50 mmHg; (4) chest radiograph showed persistent strands of densities in both lungs, alternating with areas of normal or increased lucency. In some cases, an autopsy was needed for the diagnosis of bronchopulmonary dysplasia. Intraventricular hemorrhage was graded according to the system proposed by McMenamin et al. Necrotizing enterocolitis was diagnosed in the presence of abdominal

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

expansion and feeding intolerance for at least 24 hours with radiologic findings of air entrapment in enteric walls, intestinal rupture, and meconium obstructive syndrome, or by operational or autopsic findings of necrotic intestinal rupture. Quantification of amniotic fluid MMP-8 concentrations was conducted in the same manner as in Example 2.

107 neonates of the 239 subjects (frequency 45 %) were diagnosed to suffer neonatal morbidity. The median amniotic fluid MMP-8 concentration remained at a level of 2.35 ng/ml in the absence of major neonatal morbidity while a significantly higher MMP-8 concentration (160.9 ng/ml) was observed in the presence of major neonatal morbidity ($p < 0.001$). Details are given in Table 7, below.

TABLE 7
MMP-8 Concentration According to the Presence or Absence of Neonatal Morbidity

| Neonatal Morbidity | Median Value (ng/mL) | Interval (ng/mL) |
|--------------------|----------------------|------------------|
| Present | 17.0 | <0.3-4202.7 |
| Absent | 2.35 | <0.3-1333.1 |

Receiver operating characteristic curve analysis was employed to select a cutoff value for amniotic fluid analytes in the diagnosis of neonatal morbidity. As a result, a cutoff of 23 ng/ml was selected for MMP-8

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

considering sensitivity and positive predictive value for the diagnosis of neonatal morbidity. The diagnostic indices of MMP-8 (cutoff 23 ng/ml) for the identification of neonatal morbidity were excellent: specificity of 77%,
 5 positive predictive value of 63% and negative predictive value of 65%. The results are summarized in Table 8, below.

TABLE 8
 Diagnostic Indices of MMP-8 for the Identification of
 10 Neonatal Morbidity

| | |
|---------------------------|-----|
| Sensitivity | 50% |
| Specificity | 77% |
| Positive Predictive Value | 63% |
| Negative Predictive Value | 65% |

Additionally, the median amniotic fluid MMP-8 concentration was significantly higher in the presence of sepsis (208.95 ng/ml), compared to the absence of sepsis (4.4 ng/ml) ($p < 0.05$). Details are given in Table 9, below.
 15

TABLE 9
 MMP-8 Concentration According to the Presence or Absence of
 20 Neonatal Sepsis

| Neonatal Sepsis | Median Value (ng/mL) | Interval (ng/mL) |
|-----------------|----------------------|------------------|
| Present | 208.95 | 2.4-1568.6 |
| Absent | 4.4 | <0.3-4202.7 |

The diagnostic indices of MMP-8 (cutoff 23 ng/ml) in

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

the identification of neonatal sepsis were excellent: sensitivity of 67%, specificity of 66%, and negative predictive value of 99%. The results are summarized in Table 10, below.

5

TABLE 10
Diagnostic Indices of MMP-8 for the Identification of Neonatal Sepsis

| | |
|---------------------------|-----|
| Sensitivity | 67% |
| Specificity | 66% |
| Positive Predictive Value | 5% |
| Negative Predictive Value | 99% |

10

EXAMPLE 5: Diagnosis of Cerebral Palsy By Use of Amniotic Fluid MMP-8 Concentration

The relationship between amniotic fluid concentrations of MMP-8 and the development of cerebral palsy was examined in 116 preterm singleton newborns (gestational age at birth, < 35 weeks) born to mothers who underwent amniocentesis and were followed for at least 3 years. Cerebral palsy was diagnosed in the presence of a definite abnormality on the neurodevelopmental assessment (abnormality of developmental milestone, postural abnormality by the Vojta method, and reflex abnormality) and a persistent abnormality of muscle tone.

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

Median amniotic fluid concentration of MMP-8 was significantly higher in mothers whose newborns developed cerebral palsy than in mothers whose newborns did not develop cerebral palsy (median 153.9 [range <0.3-1535.9] ng/ml vs median 6.4 [range <0.3-3836.8] ng/ml; $p < 0.01$). Neonates who developed cerebral palsy were delivered at earlier gestational age than those without cerebral palsy. After adjustment for the gestational age at birth and the results of amniotic fluid culture, elevated concentrations of amniotic fluid MMP-8 significantly increased the odds of development of cerebral palsy (odds ratio, 6.0; 95% confidence interval, 1.1-33.0; $p < 0.05$).

Receiver operating characteristic curve analysis was employed to select a cutoff value for amniotic fluid analytes in the diagnosis of cerebral palsy. As a result, a cutoff of 23 ng/ml was selected for MMP-8 in consideration of both sensitivity and positive predictive value for the diagnosis of cerebral palsy, as shown in Fig. 6. The diagnostic indices of MMP-8 (cutoff 23 ng/ml) in the diagnosis of cerebral palsy were excellent: sensitivity of 85%, specificity of 69%, and negative predictive value of 97%. The results are summarized in Table 11, below.

TABLE 11
Diagnostic Indices of MMP-8 for Cerebral Palsy

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

| | |
|---------------------------|-----|
| Sensitivity | 85% |
| Specificity | 69% |
| Positive Predictive Value | 26% |
| Negative Predictive Value | 97% |

INDUSTRIAL APPLICABILITY

5 As described hereinbefore, a diagnostic reagent system
and a diagnostic kit are provided for the prenatal diagnosis
of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage,
based on the quantification of amniotic fluid MMP-8
concentration. Taking advantage of an antigen-antibody
10 reaction coupled with chromogenesis, the diagnostic reagent
system and diagnostic kit of the present invention is
characterized by comprising one or more of anti-MMP-8
antibody. The diagnostic reagent system and kit of the
present invention can be applied to the patients without, as
15 well as with, clinical signs of preterm delivery or
premature rupture of fetal membranes. With the superiority
in sensitivity and specificity to conventional method of
measuring fetal blood cytokine levels, the present invention
is very useful in the prenatal diagnosis of preterm delivery,
20 fetal infection, and fetal damage.

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

What is claimed is:

1. A method for the prenatal diagnosis of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage, comprising the
5 steps of:

1) sampling an amniotic fluid from a pregnant woman;
and

2) measuring matrix metalloproteinase-8 level in the amniotic fluid sample.

10

2. The method as set forth in claim 1, wherein the pregnant woman is one with or without clinical signs of preterm labor or premature rupture of fetal membranes.

15

3. The method as set forth in claim 1, wherein the risk of preterm delivery, fetal infection, and fetal damage is prenatally diagnosed, including perinatal morbidity comprising neonatal sepsis, respiratory distress syndrome, pneumonia, bronchopulmonary dysplasia, intraventricular
20 hemorrhage, and necrotizing enterocolitis, and cerebral palsy.

25

4. The method as set forth in claim 1, wherein the pregnant woman is identified as being at risk for preterm delivery, fetal infection, and fetal damage when cutoff

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

value of amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 is higher than 5 - 100 ng/ml.

5 5. The method as set forth in claim 1, wherein the pregnant woman is identified as being at risk for preterm delivery when cutoff value of amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 is higher than 10 - 50 ng/ml.

10 6. The method as set forth in claim 1, wherein the pregnant woman is identified as being at risk for fetal infection when cutoff value of amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 is higher than 10 - 50 ng/ml.

15 7. The method as set forth in claim 1, wherein the pregnant woman is identified as being at risk for the development of cerebral palsy when cutoff value of amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 is higher than 10 - 50 ng/ml.

20 8. The method as set forth in claim 1, wherein the pregnant woman is identified as being at risk for perinatal morbidity when cutoff value of amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 is higher than 10 - 50 ng/ml.

25 9. A diagnostic reagent system utilizing the method of

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

claim 1, comprising one or more anti-matrix metalloproteinase-8 antibody.

10. The diagnostic reagent system as set forth in claim 9, wherein the diagnostic reagent system is based on the analytic mechanism comprising the steps of:

- 1) adsorbing primary anti-matrix metalloproteinase-8 antibodies onto a matrix,
- 2) incubating the anti-matrix metalloproteinase-8 antibodies adsorbed onto the matrix in the presence of an amniotic fluid and washing the matrix to remove unbound antigens,
- 3) coupling a secondary chromogenic enzyme- or fluorescent-linked antibody to the matrix metalloproteinase-8 bound to the primary antibodies adsorbed onto the matrix, and
- 4) developing a chromogenic reaction in the matrix by adding coloring agent with quantitative analysis of the specific antigen-antibody reaction.

20

11. The diagnostic reagent system as set forth in claim 10, wherein the anti-matrix metalloproteinase-8 antibodies are monoclonal or polyclonal.

25 12. The diagnostic reagent system as set forth in

WO 02/42770

PCT/KR01/01306

claim 10, wherein the matrix is selected from a group of material consisting of a nitrocellulose membrane, a 96-well plate of polyvinyl resin, a 96-well plate of polystyrene resin, and a glass slide.

5

13. The diagnostic reagent system as set forth in claim 10, wherein the chromogenic enzyme is selected from a group of agents consisting of peroxidase, alkaline phosphatase and biotin.

10

14. The diagnostic reagent system as set forth in claim 10, wherein the fluorescent agent is selected from a group of agents consisting of FITC and TRITC.

15

15. The diagnostic reagent system as set forth in claim 10, wherein the coloring agent is selected from a group of agents consisting of 4-chloro-1-naphtol, diaminobenzidine, aminoethyl carbazole, 2,2'-azion-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), o-phenylenediamine, and tetramethyl benzidine.

20

16. A diagnostic kit, comprising the diagnostic reagent system of claim 9.

25

17. The diagnostic kit as set forth in claim 16,

WO 02/42770

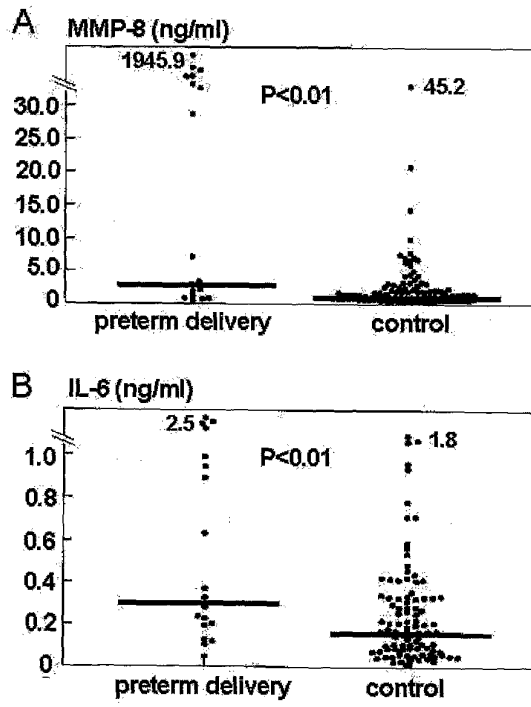
PCT/KR01/01306

wherein the kit comprises anti-matrix metalloproteinase-8 antibody, standard matrix metalloproteinase-8, matrix, assay buffer, chromogenic enzyme- or fluorescent compound-linked secondary antibody, and adhesive plate cover.

1/6

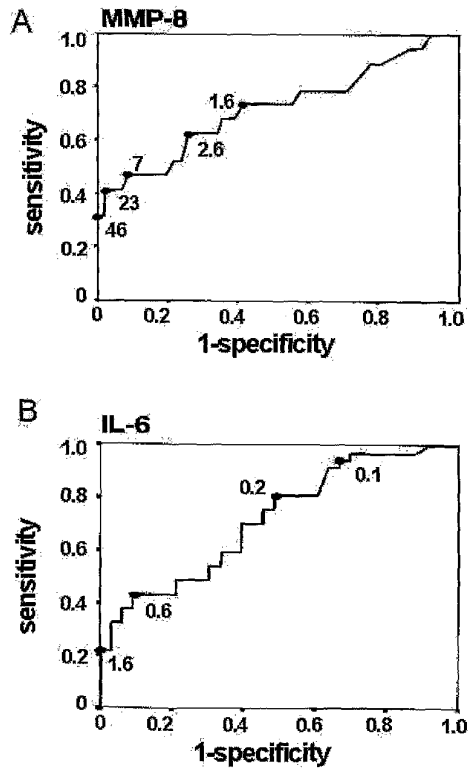
FIGURES

FIG. 1



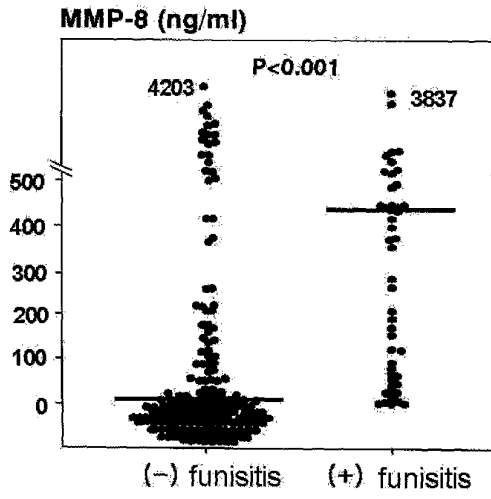
2/6

FIG. 2



3/6

FIG. 3

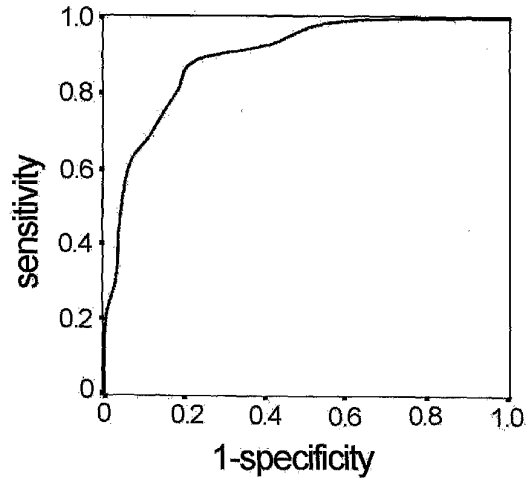


WO 02/42770

PCT/KR01/01306

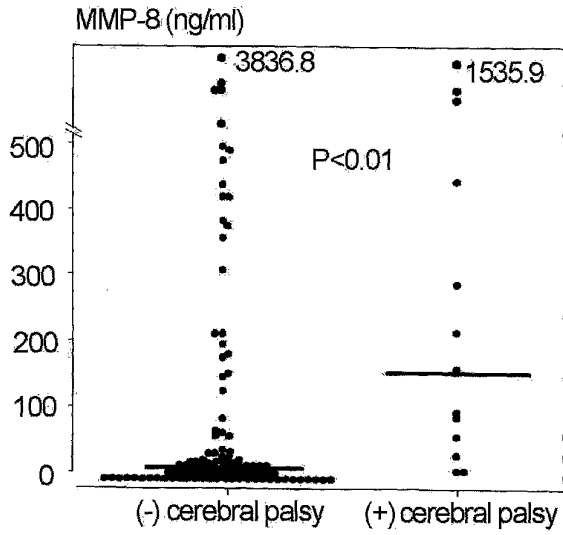
4/6

FIG. 4



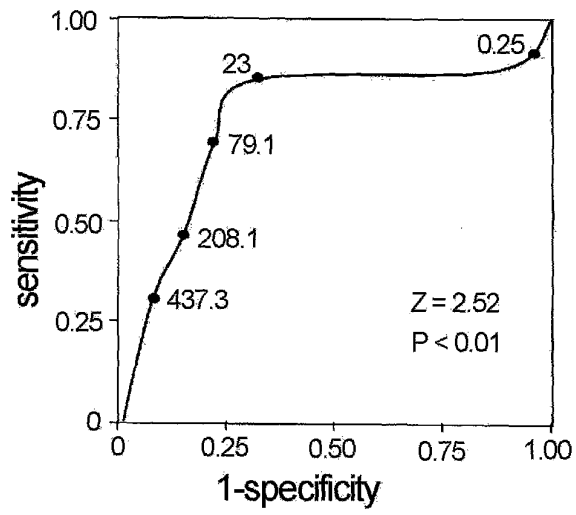
5/6

FIG. 5



6/6

FIG. 6



【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/KR01/01305 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC7 G01N 33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC07 G01N, A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for inventions since 1975, Korean Utility models and applications for Utility models since 1975 Japanese Utility models and application for Utility models since 1975 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, NPS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WATARI M, WATARI H, DISANTO ME, CHACKO S, SHI GP, STRAUSS JF 3rd., "Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrix-metabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells." In: <i>The American Journal of Pathology, American Association of Pathologists and Bacteriologists</i> , 1999 Jun, vol.154, no.6, p.1755-62 | 1-17 |
| A | TU FF, GOLDENBERG RL, TAMURA T, DREWS M, ZUCKER SJ, VOSS HF, "Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth" In: <i>Obstetrics and gynecology, Elsevier North Holland</i> , 1998 Sep, vol.92, no.3, p.446-9 | 1-17 |
| A | MORRISON JJ, CLARK IM, POWELL EK, CAWSTON TB, HACKETT GA, SMITH SK, "Tissue collagenase-serum levels during pregnancy and parturition" In: <i>European Journal of Obstetrics, Gynecology and reproductive biology, Elsevier Science Pub. Co.</i> , 1994 Mar, vol.54, no.1, p.71-5 | 1-17 |
| A | US 5545616 A (GENETECH, Inc.) 13 August 1996 See the whole document | 1-17 |
| A | US 5597700 A (California Research, LLC) 28 January 1997 See the whole document | 1-17 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 19 NOVEMBER 2001 (19.11.2001) | | Date of mailing of the international search report 21 NOVEMBER 2001 (21.11.2001) |
| Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, Daejeon-dong, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140 | | Authorized officer MIN, Man Ho Telephone No. 82-42-481-5578 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/KR01/01306 |
|--|-------------------------------------|--|
| Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) | | |
| This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: | | |
| 1. | <input checked="" type="checkbox"/> | Claims Nos.: 1-8 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 1-8 are directed to a method for the diagnosis, the search has been carried out and based on the alleged effects of the reagent and kit. |
| 2. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to part of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: |
| 3. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). |
| Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) | | |
| This International Search Authority found multiple inventions in this international application, as follows: | | |
| 1. | <input type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. |
| 2. | <input type="checkbox"/> | As all searchable claims could be established without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. |
| 3. | <input type="checkbox"/> | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: |
| 4. | <input type="checkbox"/> | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: |
| Remark on Protest | <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. |
| | <input type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/KR01/01306

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| US 5597700 A | 28.01.1997 | AU 2416295 B EP 755515 A DE 69513160 C | 10.06.1999 29.11.1997 29.01.1997 |
| US 5545616 A | 13.08.1996 | NONE | |

 フロントページの続き

| | | |
|---------------------------|----------------|------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
| G 0 1 N 33/577 | G 0 1 N 33/552 | |
| | G 0 1 N 33/577 | B |

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

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2004522942A5 | 公开(公告)日 | 2005-05-26 |
| 申请号 | JP2002544659 | 申请日 | 2001-08-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 首尔大学校产学协力团 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 首尔国际一一 | | |
| [标]发明人 | ヨーンボヒユン | | |
| 发明人 | ヨーン,ボ ヒユン | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12Q1/37 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/552 G01N33/558 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | G01N33/689 C12Q1/37 G01N33/54386 G01N33/558 G01N2333/96486 G01N2800/36 G01N2800/368 | | |
| FI分类号 | G01N33/573.A G01N21/78.C G01N33/543.545.Z G01N33/543.575 G01N33/545.A G01N33/552 G01N33/577.B | | |
| F-TERM分类号 | 2G054/AB03 2G054/AB04 2G054/CA30 2G054/CE02 2G054/EA03 | | |
| 优先权 | 1020000069283 2000-11-21 KR | | |
| 其他公开文献 | JP4011479B2 JP2004522942A | | |

摘要(译)

本发明中，早产，本发明涉及一种诊断试剂系统和诊断试剂盒的方法和用于诊断胎儿感染和胎儿损伤产前产前诊断。本发明中，所述诊断试剂系统和诊断试剂盒，在孕妇，早产的方法，羊水MMP-8的浓度，如果有宫内感染和胎儿损坏的风险，基于该发现，即显著更高。本发明的诊断试剂系统和诊断试剂盒不仅可以应用于具有早产症状或早期破裂症状的孕妇，而且可以应用于完全没有这种症状的孕妇。低侵入性的与测量胎儿血细胞因子水平和优异的灵敏度和特异性，诊断试剂系统和本发明的诊断试剂盒，早产，产前胎儿感染和胎儿损伤的常规方法相比它对诊断非常有用。