



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1697972 B

(45) 授权公告日 2010.09.29

(21) 申请号 03824113.7
 (22) 申请日 2003.08.12
 (30) 优先权数据
 60/403,407 2002.08.13 US
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2005.04.12
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/US2003/025125 2003.08.12
 (87) PCT申请的公布数据
 W02004/014220 EN 2004.02.19
 (73) 专利权人 N-DIA 公司
 地址 美国纽约

代理人 黄革生 林柏楠
 (51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 1088584 A, 1994.06.29, 全文.
 US 5284749, 1994.02.08, 全文.
 US 5877029, 1999.03.02, 全文.
 审查员 边昕

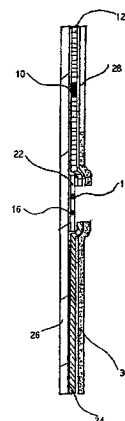
(72) 发明人 D·D·彼得鲁宁 B·B·富克斯
 E·I·扎赖斯基
 M·N·博尔托夫斯卡亚
 S·V·纳济莫娃
 N·A·斯塔罗维斯塔亚
 A·B·康斯坦丁诺夫
 M·I·马尔什斯卡亚

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
 11247

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图 1 页

(54) 发明名称
 检测阴道分泌物中羊水的装置和方法

(57) 摘要
 本发明涉及通过 PAMG-1 检测抗体来检测阴道中少量羊水的诊断方法和装置。如图 1 所示,该装置包括含有已标记的 M271 抗体区 (10) 的衬垫 (12), 测试区 (14) 和对照区 (16)。



1. 一种在检测孕妇阴道分泌物中少量羊水时使假阳性和假阴性结果的可能性最小化的方法,其中所述方法包括:

i. 选择用于测定孕妇阴道分泌物中胎盘 α 1- 微球蛋白的最低背景浓度的高度特异性单克隆抗体对;以及

ii. 选择至少一种呈现出比 i 中抗体更低结合特异性的其它抗 -PAMG-1 单克隆抗体,所述抗体旨在和 i 中的抗体组合使用用于准确设立规定的灵敏度阈值以检测孕妇阴道分泌物中的少量羊水,

其中,将以预定比例组合使用的所述抗 -PAMG-1 单克隆抗体 (i) 和 (ii) 用于设定阴道分泌物中每毫升 0.05 至 0.2 纳克的所述 PAMG-1 背景浓度值和每毫升 5-10 纳克的所述试条装置灵敏度阈值之间的最佳间距,从而将检测孕妇阴道分泌物中少量羊水时的假阴性和假阳性结果的可能性最小化。

2. 权利要求 1 的方法,其中将单克隆抗体对 i 中的高度特异性单克隆抗体置于试条装置的检测部分中。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述高度特异性单克隆抗体对与标记物结合。

4. 权利要求 3 的方法,其中标记物是染料颗粒。

5. 权利要求 1 的方法,其中将单克隆抗体对 i 中的单克隆抗体之一置于试条装置的测试区中。

6. 权利要求 5 的方法,其中将一种或多种其它抗 -PAMG-1 单克隆抗体 ii 与单克隆抗体对 i 之一以预定比例置于试条装置的测试区中。

7. 权利要求 6 的方法,其中,用于与所述单克隆抗体对 i 组合的一种或多种所述抗体 ii 被用来设立所述试条装置的预定灵敏度阈值。

8. PAMG-1 特异性抗体对用于制备在孕妇阴道分泌物中检测渗漏羊水的设备的用途,其中该抗体对对于高于 PAMG-1 背景浓度的 PAMG-1 水平敏感。

9. 根据权利要求 8 的用途,其中权利要求 1 中定义的单克隆抗体对 i 中的一个抗体被固定在固相支持物上。

10. 根据权利要求 9 的用途,其中固相支持物是一种液体能通过毛细作用在其中迁移通过的膜。

11. 根据权利要求 9 的用途,其中抗体是单克隆抗体。

12. 根据权利要求 9 的用途,其中权利要求 1 中定义的单克隆抗体对 i 之一被固定在固相支持物上,固相支持物上还包括固定的对 PAMG-1 特异的第二抗体。

13. 根据权利要求 12 的用途,其中固定在固相支持物上的抗体的比例提供了每毫升 5 至 7 纳克的 PAMG-1 检测阈值水平。

14. 根据权利要求 11 的用途,其中单克隆抗体选自:由保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心 VKPM 且保藏号为 VKPM-93 的杂交瘤 N271 生产的 M271;由保藏在 VKPM 且保藏号为 VKPM-92 的杂交瘤 N52 生产的 M52;由保藏在 VKPM 且保藏号为 VKPM-94 的杂交瘤 N42 生产的 M42。

15. 一种装置,其包含具有可移动的 PAMG-1 特异性抗体的检测部分,所述检测部分位于在固相支持物上的,具有固定的 PAMG-1 特异性抗体的捕获部分的上游,由此可移动抗体通过流体样本进行移动从而使得可移动抗体可以与样本中任何 PAMG-1 结合并且所形成的

可移动抗体-PAMG-1 复合物可以与固定的抗体结合,并且其中可移动抗体带有标记物,其中捕获部分还包含至少一种和可移动的和固定的 PAMG-1 抗体同时使用的其它单克隆抗 PAMG-1 抗体,所述单克隆抗 PAMG-1 抗体具有比可移动的和固定的 PAMG-1 抗体低的结合特异性。

16. 权利要求 15 的装置,其中抗体是单克隆抗体。

17. 权利要求 15 的装置,其中所述固相支持物是膜支持物。

18. 权利要求 15 的装置,其中标记物是胶体金。

19. 权利要求 15 的装置,其中,固定在固相支持物上的抗体的比例提供了每毫升 5 至 7 纳克的 PAMG-1 检测阈值水平。

20. 权利要求 15 的装置,其中可移动的抗体是由保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心 VKPM 且保藏号为 VKPM-93 的杂交瘤 N271 生产的 M271 ;固定的抗体是由保藏在 VKPM 且保藏号为 VKPM-92 的杂交瘤 N52 生产的 M52 ;另一个固定的抗体是由保藏在 VKPM 且保藏号为 VKPM-94 的杂交瘤 N42 生产的 M42。

21. 根据权利要求 12 的用途,其中固定在固相支持物上的抗体的比例提供了检测浓度超过每毫升 3 纳克的 PAMG-1 的阈值水平。

22. 根据权利要求 15 的装置,其中固定在固相支持物上的抗体的比例提供了检测浓度超过每毫升 3 纳克的 PAMG-1 的阈值水平。

23. 一种装置,其包含具有可移动的 PAMG-1 特异性抗体的检测部分,所述检测部分位于在固相支持物上的,具有固定的 PAMG-1 特异性抗体的捕获部分的上游,其中可移动的抗体是由保藏在俄罗斯国立工业微生物保藏中心 VKPM 且保藏号为 VKPM-93 的杂交瘤 N271 生产的 M271 ;固定的抗体是由保藏在 VKPM 且保藏号为 VKPM-92 的杂交瘤 N52 生产的 M52 ;其中可移动的抗体包含标记。

24. 根据权利要求 23 的装置,其中所述标记是胶体金。

检测阴道分泌物中羊水的装置和方法

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求 2002 年 8 月 13 日提交的、申请号为 60/403407 的美国临时申请的优先权,该申请的内容在此引入作为参考。

[0003] 发明领域

[0004] 本发明涉及准确检测阴道中少量羊水的诊断方法。具体地,本发明涉及采用特异选择的能与胎盘 α_1 -微球蛋白特异性结合的单克隆抗体。更为具体的是,本发明涉及选择一对抗 -PAMG-1 抗体 (“基础对”),该对抗体为检测孕妇阴道分泌物中最低背景浓度的 PAMG-1 提供了足够的灵敏性。此外,本发明涉及包含 PAMG-1 抗体的固相免疫检测系统,其中将两种或更多种抗 -PAMG-1 抗体的组合固定在装置的固相支持物上,从而精确建立预定的灵敏度阈值水平。

背景技术

[0005] 在大约 10% 的孕妇中会发生胎膜 (羊膜囊) 过早破裂,如果得不到及时治疗,将造成大约 10% 的围产期死亡。术语 PROM (胎膜早破) 涉及在足月或不足月分娩开始的 24 小时前或更多小时前发生的膜自发破裂。PPROM 指的是早产膜早破。大约有 30-50% 这样的过早破裂发生在怀孕 37 周之前。在这样的情况下,由于 PROM 与胎儿肺系统发育障碍和子宫内感染风险的显著增加相关,胎膜破裂的确切诊断是非常重要的。这样的感染在子宫内渗透会使产妇和围产期发病率及死亡率上升大约 10 个百分点。在怀孕 38 至 40 周及时诊断破裂是极为重要的,因为一旦检测出 PROM,就应该尽可能快地诱发分娩。破裂诊断在怀孕 37 周前也很重要,因为它使得能够防止羊膜内感染和对胎儿肺发育进行刺激。

[0006] 目前诊断膜破裂没有“金标准”。PROM 是一个动态过程,因此膜破裂和诊断状态的实施之间的间隔、“高”渗漏的出现、间歇渗漏、与种群相关的 PROM 发生率的变化以及能干扰检测结果的材料都是如不解决将造成不准确的报道的因素。这些不准确性可能在解释旨在揭示用于鉴别 PROM 的最佳手段的研究时导致错误。

[0007] PROM 的诊断传统上依赖于患者报告液体从阴道流出。物理检查能够给出明确的诊断;然而,在检查中有时也存在结果的内在不一致或者摸棱两可。这种情况造成对验证性诊断试验的需要 (Lockwood C. J. et al., Am. J. Obstet. Gynecol., 1994, v. 171, No 1, pp. 146-150)。目前所采用的一些用于检测阴道中羊水的方法都存在不足,例如羊齿试验 (fern test) (M. L. Friedman and T. W. McElin, “破裂胎膜的诊断”, American Journal of Obstetrics and Gynecology 1969, Vol. 100, pp. 544-550)。该方法基于观察羊水在载玻片上干燥后形成的所谓树状图形而进行羊水检测。然而,该方法不够准确,因为它是以阴道中羊水高度挥发的特性为基础的。其产生的错误结果可达 30% 之多。

[0008] 也有人提出通过采用一些染料:尼罗蓝,丫啶橙,溴百里酚蓝,硝嗪 (Nitrazine) 等来检测胎膜的破裂 (M. L. Friedman and T. W. McElin, 见上文)。该方法不够便捷,而且由于阴道中羊水的易挥发的化学性质及其的某些可能混合而具有缺点。例如,阴道感染可能会影响上述检测的结果。对目前流行的 Nitrazine 和 Ferning 检测的早期研究表明,

这些检测具有很高的不准确率,自膜破裂后一个小时以上这种不准确率随时间延长愈发增高,且在24小时后变成不确定的。该研究表明,在PROM延长的情况下,这些检测并未比简单的临床评估提供了更好的诊断信息 (Gorodeski I.G, Haimovitz L., Bahari C.M., *Journal Perinat. Med.*, 1982, v. 10, No6, pp286-292)。更近一些的检测数据为 (Trovo S. et al., *Minerve Ginecol.* 1998, v. 50, No12, pp. 519-512) :

[0009] Nitrazine 检测显示的灵敏度为 70%,特异性为 97%,准确度 90% ;

[0010] Ferning 检测显示的灵敏度为 70%,准确度为 93%。

[0011] 近来有人提出基于羊水中蛋白质的免疫化学分析来检测胎膜的破裂。停泊式免疫化学分析 (Docked immunochemical analysis) 利用以下羊水蛋白质来检测膜破裂: α -胎蛋白,催乳素,纤连蛋白,以及胰岛素样生长因子结合蛋白 1,见 B. L. Rochelson 等:“快速检测——可能应用于膜的早熟破裂诊断中”, *Obstetrics and Gynecology*, 1983, v. 62, pp. 414-418 ;P. R. Koninckx 等:“阴道液中催乳素的浓度:一种诊断膜破裂的新方法”, *British J. Obstetr. Gynecol.*, 1981, v. 88, pp. 607-610 ;P. Hellemans 等:“在羊膜破裂早期检测中应用 ROM Check 免疫测定的初步结果”, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1992, v. 43(3), pp. 173-179 ;Rutanen, E. M. 等:“宫颈/阴道分泌物中胰岛素样生长因子结合蛋白-1 的检测:在胎膜破裂诊断中与 ROM Check 膜免疫检测相比较”, *Clin. Chim. Acta.*, 1993, v. 214, pp. 73-81。Rutanen, E. M., 等后来研发了一种采用倒置色谱膜的色谱检测 (FI-84863 ;美国专利 US5554504)。

[0012] 这些基于 α -胎蛋白 (AFP) 和催乳素 (PRL) 的方法是不可靠的,因为 AFP 和 PRL 蛋白的血液/羊水比率很容易发生明显变化。AFP 和 PRL 仅仅在怀孕的第二个三个月期在羊水中以高浓度存在。足月时两种蛋白的羊水/血清蛋白浓度比率均仅为大约 3 至 4。

[0013] 另一种基于阴道分泌物中胎儿纤连蛋白检测的方法也不令人满意。例如即使在胎膜不破裂的情况下,胎儿纤连蛋白也可能存在 (P. Hellemans, 等:“在羊膜破裂早期检测中利用 ROM Check 免疫检测的初步结果”, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1992, v. 43(3), pp. 173-179 ;C. Lockwood, 等:“在宫颈和阴道分泌物中胎儿纤连蛋白可作为早产的预报物”, *NewEngland Journal of Medicine*, 1991, v. 325, pp. 669-674), 因此产生了假阳性结果。

[0014] 所有这些以检测 α -胎蛋白、催乳素和纤连蛋白为基础的胎膜破裂检测方法是不准确的,因为在这些蛋白质的羊水浓度以及这些蛋白的羊水与血清相对浓度的调控上存在可变的因素。

[0015] 对于最新的 IGFBP-1 检测,关于其特异性和准确度,存在矛盾数据。一种快速试条检测 (strip test) (OY Medix Biochemica 的 PROM 检测, Finland, 也称为 Amni-check, MAST Diagnostica, Germany), 已经被研发出来用于检测阴道分泌物中 IGFBP-1 的存在 (Rutanen EM, Karkkainen TH, Lehtovirta J., Uotila JT, Hinkula MK, Hartikainen AL. “在胎膜破裂诊断中胰岛素样生长因子结合蛋白-1 的快速试条检测的评价”, *Clin Chim Acta* 1996, Sep30 ;v. 253(1-2), pp. 91-101)。E. Rutanen 报道了该测定法的检测限度的设定应该使宫颈分泌物中低于 400ng/ml (低于孕妇血清中 IGFBP-1 水平的 95%) 的 IGFBP-1 浓度保持阴性。然而,在出血的情况下,要对检测结果进行谨慎的解释,因为直接来自胎盘床的血可能比来自宫颈血管的血液含有更多量的 IGFBP-1。

[0016] 按照该测定法,所有来自临床确诊为 PROM 的妇女的样本 (n = 55) 均显示阳性结果,而来自无症状妇女的 75 份样本中有 71 份为阴性。在这组样本中,检测的灵敏度为 100% 而特异性为 94.7%。这一事实可以用该检测的第一步中采用的单克隆抗体的特异性不足(交叉反应)来解释。

[0017] 在对 181 名怀疑有 PROM 但最初检查 PROM 结果不确定的患者中,该检测的结果为 64 例阳性,117 例阴性。64 例阳性患者中 50 人 (78.1%) 在妊娠 37 周之前分娩,其中 42 人 (65.6%) 在取样之后 2 周之内分娩。具有阴性结果的 117 名患者中 5 人由于与 PROM 无关的原因选择了剖宫产。在其他的 112 名患者中,102 人 (91.1%) 足月分娩,另外 10 人 (8.9%) 在 37 周之前分娩,其中 7 人 (6.3%) 在取样后 2 周之内分娩 (E. Rutanen 等, 1996)。遗憾的是,没有有关 PROM 确诊的妇女中此 PROM 检测的灵敏度和特异性的数据。

[0018] 在 W. Wolitmann 的研究中,Amni-check 被用于检测来自临床未确定 PROM 的妇女的 150 份羊水样本和 50 份阴道分泌物样本中的 IGFBP-1。该检测具有 97% 的灵敏度和 100% 的特异性 (Wolitsmann W. 等, Z. Gebursh. Neonatal, 1995, v. 199, pp. 243-244)。

[0019] V. Ragosh 评价了在 75 份阴道分泌物样本中 Amni-check 检测的诊断准确度。该检测显示了 100% 的灵敏度和 83% 的特异性。研究者报道了假阳性率高度取决于分娩活动。在子宫收缩的妇女中,该检测具有 59% 的特异性 (Ragosch, V. 等, Geburtsh. U. Frauenheilk., 1996, Vol. 56, pp. 291-296)。

[0020] 在 E. Darj 和 S. Lyrenas 进行的一项研究中 (Acta Obstet. Gynecol. Scand., 1998, v. 77, pp. 295-297), PROM 检测在临床确诊患者 (具有明显膜破裂的妇女或具有完整膜的妇女) 中具有 95.7% 的灵敏度和 93.1% 的特异性。然而,在怀疑有 PROM 的患者中, PROM 检测的灵敏度和特异性仅仅分别为 70.8% 和 88.2%。这种差异能够通过该检测的截断值 (400ng/ml) 来解释,该值使得不可能检测未确诊患者阴道分泌物中少量的羊水 (例如,在小破裂的情况下)。

[0021] 因此,膜完整的妇女的显著的阴道 IGFBP-1 背景水平和检测中的高截断阈值会对检测的灵敏度和特异性造成损害,从而影响未确诊患者中该检测的准确性。血清和 / 或炎症分泌物的混合也会影响检测的准确性 (见上述 E. Darj et S. Lyrenas 的数据)。该检测的作者没有研究此问题。

[0022] 为了避免部分上述缺点,采用针对胰岛素样生长因子的两个结合位点的两种单克隆抗体来检测未结合的胎盘 α_1 -微球蛋白级分 (美国专利 US5968758、5597700、5891722、5877029)。

[0023] 在这些专利中,未结合的 PAMG-1 和 IGFBP-1 这两种蛋白质的同一性是毫无根据假定的。而事实上,这样的假定只能建立在这些蛋白质的一级结构和基因比较的基础上。

[0024] 在上述的专利中,不可能建立起这种检测的灵敏度阈值,以便获得可能的最高程度准确度 (99% 或以上)。这些检测的共同问题是待测物质的背景水平和背景浓度的可变性。例如,孕妇阴道分泌物中的另一种蛋白质 IGFBP-1 的背景水平在 0.5 至 90ng/ml 这样一个大的范围内变化 (见 Rutanen 的研究)。第二个重点是含有待测物质的炎症分泌物或血清在阴道分泌物中混合的可能性。这可能导致假阳性结果。

[0025] D. Petrunin 首先对蛋白质 PAMG-1 进行了描述 (Petrunin D. 等, Akusherstvo i Ginekologia, 1977, No. 1, p. 64, in Russian; 还可参见 PMID:65924, MEDLINE 的 PubMed 索

引：“免疫化学鉴别器官特异性人胎盘 α -球蛋白及其在羊水浓度”，Akusherstvo i Ginekologia(Moscow)1977Jan, Vol. 1, p,64)。获得了针对已纯化和分离的该蛋白质的抗体，并且可采用免疫化学方法在妊娠的不同阶段检测羊水（包括取自阴道的羊水）中该蛋白质的含量。还检测了该蛋白质在胎儿和成人的血液及不同器官中的浓度。

[0026] 在随后几年中，直至1990年，这一研究小组继续发表了关于此蛋白质研究的新结果(Petrinin, D. 等,“在妊娠期间四种胎盘蛋白的比较研究”，Akusherstvo i Ginekologia,1988, No. 1, pp. 50-52;Zaraisky, E. 等, VoprosyMed. Khemii,1980, No 5, pp. 131-132;Tatarinov, Y. 等, Uspekhi Sovr.Biologii 1990, Vol. 109, pp. 369-373; Boltovskaya, M. 等, Bulletin of Experimental Biology and Medicine,1991, No. 7, pp. 397-400;Nasimova, S. V. 等, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1993 Sep;Vol. 116, No. 9, pp. 302-304(所有这些文献均为有英文摘要的俄文文献))。D. Petrinin 获得了有关 PAMG-1 分离方法的发明证书(#SU-1614184A1, 优先权年份为1988年)。

[0027] 在1988-1989年，有几篇论文详细地公开了相似的蛋白质-胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)的部分或全部序列，它获自羊水、胎盘或人肝细胞瘤(Bell S等,1988; Luthman H. 等,1989;Julkunen 等,1988;Lee, Y. 等,1988)。该基因定位于人的第7号染色体的7p14-7p12片段上。在1991年之前，研究者给这种蛋白起了不同的名称： α_1 -PEG、PP-12、IGFBP、BP-25等。

[0028] 在1980-1982年间，Bohn 从胎盘分离出一种蛋白并称之为PP-12。在他的文章中，对比了PP-12与较早发现的PAMG-1蛋白，并讨论了它们之间的异同。

[0029] 与其他研究文章相对比的是Bell等(1988)发表的一篇文章，他发现了 α_1 -PEG蛋白的N-末端肽的多态性，即在第11和第12位的位置，并得出结论——事实上有两种不同的蛋白而不是一种。

[0030] S. Bell 再一次引用他自己的关于羊水中两种不同的 α_1 -PEG蛋白的文章。该文章接受了1990年系统命名委员会的决定(关于IGF结合蛋白的系统命名的报道, Journ. Clin. Endocr. And Metabol. 1990, 70, #3, P. 817)，它确定蛋白质AFBP、PP-12、 α_1 -PEG、GH-蛋白、结合蛋白28、26、25、JB-1是相同的，并给予它们通用名称hIGFBP-1。

[0031] 一种所谓的游离PAMG-1被用于检测胎膜破裂。然而，如上所述，并未建立高准确度的检测法(>99%)。这一目标后来通过我们的新方法和装置得以实现，见本申请的描述。本发明采用选择一对单克隆抗体以提供足够的灵敏度来检测阴道分泌物中极低浓度PAMG-1的方法，并且还涉及选择一些其它的抗PAMG-1抗体，将它们与上述的两种抗体组合起来，从而可以精确建立试条装置灵敏度的预定阈值。这转而有可能使检测结果的假阳性率最小化。

[0032] 本发明始自D. Petrinin的先期研究，他分离并描述了胎盘 α -微球蛋白，并采用免疫化学方法对其在羊水、血液和一些组织中的浓度进行了彻底测量。该出版物属于任何研究者都应会考虑的公知领域。PAMG-1的分离方法受官方发明人证书(#SU-1614184A1, 优先权年份为1988)，即前苏联的同族专利的保护。

[0033] 发明概述

[0034] 本发明涉及检测妊娠期间阴道分泌物中少量羊水的方法。

[0035] 本发明涉及在孕妇阴道分泌物中检测高于羊膜蛋白 PAMG-1 最小背景浓度的 PAMG-1 (其指示羊水的存在) 的方法。

[0036] 在一个具体的实施方案中, 用于检测 PAMG-1 蛋白的方法是利用一对特异选择的单克隆抗体来检测阴道分泌物中最低背景浓度的 PAMG-1 蛋白质。该对抗体与至少一种另外的抗 PAMG 单克隆抗体联合使用, 以便精确建立给定的检测灵敏度阈值。

[0037] 本发明还考虑于一个试条装置中联合使用 PAMG-1 捕获抗体, 从而能更精确地设定阴道分泌物中羊膜蛋白 PAMG-1 的检测方法的灵敏度阈值。该方法比只采用一对选定的抗体可以对灵敏度和动力学范围提供更大的控制。

[0038] 研究发现, 该方法的最适灵敏度阈值水平接近 5ng/ml, 因为可能由炎症引起的阴道分泌物中 PAMG-1 的上限水平不会超过 3ng/ml, 而在另一方面, 在健康孕妇的阴道分泌物中 PAMG-1 的常规背景水平是大约 0.2ng/ml。待测物质的背景水平和阈值浓度之间的显著差异使得假阴性和假阳性结果最小化。在一个实施方案中, 识别羊膜 PAMG-1 的第一步发生在试条装置的衬垫 (pad) 部分, 在此处特异选择且已标记的抗体定位于其上。反应的第二步骤发生在试条装置的测试区 (test region), 此处固定有所选择的抗体对中的第二抗体和优选的至少一种另外的抗 PAMG-1 抗体。

[0039] 总而言之, 我们公开了用于检测孕妇阴道中少量羊水的方法和装置。优选地, 该方法基于抗胎盘 α_1 -微球蛋白 (PAMG-1) 的单克隆抗体对的选择。选择的目的是首先是检测在阴道分泌物中 PAMG-1 的最低背景浓度。有了该信息, 任何能检测高于该阈值水平的 PAMG-1 的分析技术都能够被用来检测阴道分泌物中的羊水。基于该信息, 可以制造基于使用相同抗体对和另外的抗体的装置, 以便降低并准确设定装置的灵敏度阈值, 从而使假阴性和假阳性结果的可能性最小化。

[0040] 捕获抗体及其片段的各种组合, 或者任何其他分子的组合均是可行的, 只要其具有与本文所述特性相同的特性。

[0041] 在本发明的一个实施方案中, 该方法包括将含有 PAMG-1 蛋白质的样本与单克隆抗体, 即所选抗体对中的第一抗体接触, 该抗体选择性地检测 PAMG-1。该方法还包括形成抗体-PAMG-1 复合物的抗体, 以及通过抗体对中的另一个标记了的单克隆抗体检测该抗体-PAMG-1 复合物的步骤。它最后包括定量测量羊膜未破裂的孕妇阴道中的最低背景浓度 PAMG-1。该方法常用于 ELISA 类试验中。

[0042] 在本发明的另一实施方案中, 装置使含有 PAMG-1 蛋白质的样本与标记了的单克隆抗体, 即所选抗体对中的第一抗体接触, 该抗体选择性地检测 PAMG-1。它进而包括形成抗体-PAMG-1 复合物的抗体、该复合物的水平流动、以及通过另一个识别 PAMG-1 的单克隆抗体检测此抗体-PAMG-1 复合物的步骤, 由此装置的灵敏度阈值采用另外的抗体设定在 5-7ng/ml 左右, 从而具有比采用识别 PAMG-1 的单克隆抗体对所能获得的准确度要高的准确度。

[0043] 附图简述

[0044] 图 1 是本发明装置的示意性纵剖面图, 所说装置可以用于检测 PAMG-1 的存在以便诊断胎膜破裂。

[0045] 图 2 是图 1 装置的平面图。

[0046] 发明详述

[0047] 本发明通过检测在阴道分泌物中极低浓度的胎盘 α_1 -微球蛋白而解决了上述有关准确检测阴道分泌物中的羊水的问题。由于 PAMG-1 的低背景浓度水平（在孕妇阴道分泌物中大约为 0.2ng/ml），该方法被证明是有利的。本发明的关键点在于选择单克隆抗体以检测低浓度的该蛋白，这样允许对这些蛋白的值进行定量，从而反过来使得可以采用任何分析技术来检测 PAMG-1 水平。PAMG-1 以低浓度存在于阴道分泌物中是可以预见的，因为毛细血管壁对血液蛋白的通透性取决于蛋白质翻译后的修饰及其与其它分子的相互作用 (Marinaro J. A. 等 :O-糖基化延缓了人 IGF 结合蛋白 6 从循环中的清除 ;Eur J Endocrinol 2000 年 5 月 ;142(5) :512 ;Schneeberger E. E. :蛋白质和小泡在毛细管内皮中的转运 ;Fed Proc 1983 年 5 月,15 ;42(8) :2419-2424 ;Minshall RD 等 :小泡形成和在 内皮细胞中的运输以及内皮屏障功能的调节 ;Histochem Cell Biol 2002 年 2 月 ;117(2) :105-12 ;DeI Vecchio PJ 等 :单层内皮对大分子的通透性 ;Fed Proc 1987 年 6 月 ;46(8) :2511-5 ;Siflinger-Birnboim A 等 :单层内皮的选择性 :对提高通透性的影响 ;Microvasc Res 1998 年 11 月 ;36(3) :216-27 ;Ghinea N, Milgrom EA :LH/CG 受体的新功能 :激素在靶器官中横穿内皮屏障的胞转作用 ;Semin Reproduct Med 2001 ;19(1) :97-101)。经过翻译后修饰的或与另外的分子建立非共价键的 PAMG-1 分子是最少渗透进入阴道分泌物中的分子。这样的分子在阴道分泌物中的浓度应该很低，除非羊膜囊破裂。PAMG-1 分子的异质性也可能是可变剪接的结果。Bell 等提出了羊水中两种接近但不相同的蛋白 α_1 -PEG 的数据。 α_1 -PEG 与 PAMG-1 相似。不同分子渗透进入阴道分泌物中的渗透性高低取决于毛细血管壁的选择通透性和选择性分泌过程。成功的免疫检测试验要求检测在阴道分泌物中低背景浓度的 PAMG-1 分子。

[0048] 成功选择出了能进行这样检测的一对单克隆抗体。所检测的 PAMG-1 分子的确切特征对于本发明的目的来说并不重要，重要的是在阴道中它必须以低浓度存在。该参数足以将灵敏度阈值设定在低水平，从而保持检测阈值和阴道分泌物中 PAMG-1 背景水平之间的显著差异。这种最佳阈值的选择允许过滤掉检测中潜在的假阴性和假阳性结果。

[0049] 具体地，对胎盘 α_1 -微球蛋白的单克隆抗体 (MAb) 进行了研究，该研究以该 MAb 在本发明另一 MAb 的 MAb-PAMG-1-缀合物系统中的反应性为基础（实施例 4，表 6）。特别地，采用 M271-M52 已发现了最高效价。然而，采用抗体对 MAb271-MAb52 以及常规 ELISA 技术，申请人未能在阴道分泌物中检测到任何 PAMG-1 浓度。研发出了用于抗体对 MAb271-MAb52 的高灵敏度 ELISA 技术（实施例 5，表 7），并且用其测量阴道样本（实施例 6，表 8）以及孕妇宫颈和阴道分泌物（实施例 7，表 9）中低浓度的 PAMG-1（皮克级）。在 ELISA 中，第一层由高度特异性的 MAb271 形成。辣根过氧化物酶缀合物含有 MAb52，用不含任何抑制剂的缓冲液稀释。

[0050] 从实施例 7、表 9 中可以看出，没有怀孕并发症的孕妇宫颈和阴道分泌物中 PAMG-1 的浓度范围为 0.05 至 0.22ng/ml。人们可以从这一数据中看出：

[0051] - 正常 PAMG-1 (8 例) 浓度位于某一稳定水平附近。在阴道和宫颈中 PAMG-1 的相对稳定性可用于指示方法参数的稳定性和收集样本的方式的标准化。

[0052] - 在宫颈分泌物中 PAMG-1 正常浓度的平均水平是大约 151pg/ml，在阴道分泌物中为大约 110pg/ml；

[0053] - 在与血管障碍（贫血、胎儿发育迟缓）无关的妊娠病理学的情况下，也可观察到

接近正常水平的 PAMG-1；

[0054] - 血液混合伴随着宫颈中 PAMG-1 浓度的升高, 观测到 290pg/ml 水平, 而正常浓度为 151pg/ml；

[0055] - PAMG-1 水平在早产或妊娠中毒症状存在时会提高, 这可能由于胎膜对蛋白质的通透性提高所致；

[0056] - 如果出现羊水渗漏, PAMG-1 水平急剧升高 (升高 10-50 倍)。

[0057] 如以下实施例所示, 选择了一对单克隆抗体 M271 和 M52 用于进一步研发本发明方法和装置以及试剂盒。

[0058] 因此, 本发明涉及特别是所选择的具有 PAMG-1 结合亲和力的单克隆抗体对、包括具有 PAMG-1 结合亲和力的抗体的生物学组合物、采用本发明抗体检测 PAMG-1 的试剂盒、以及用于生产本发明抗体的细胞系。本发明还涉及检测 PAMG-1 以及胎膜破裂的装置和方法, 其基于阴道分泌物中 PAMG-1 的存在所指示的阴道中羊水的存在。

[0059] 如这里将要更加详细描述, 本发明部分基于单克隆抗体对的研究, 该对抗体允许检测孕妇阴道分泌物中 PAMG-1 的最低背景浓度。首先, 阴道分泌物中 PAMG-1 的最低背景浓度和它在羊水中的高浓度使得可以将装置的灵敏度阈值设定在低水平并由此使得可以检测阴道分泌物中极少量的羊水, 其次, 这使得可以以最佳方式, 具体地在胎膜未破裂的孕妇阴道分泌物中典型的 PAMG-1 最低背景浓度水平和羊水中典型的高水平 PAMG-1 之间, 设置装置的灵敏度阈值。另外的一种或多种 PAMG-1 单克隆抗体可以允许更准确地将装置的灵敏度阈值建立在预定水平, 如用于半定量分析。而且, 因为在阴道分泌物中羊水的存在是胎膜破裂的指示, 在阴道分泌物中检测 PAMG-1 也能用于检测胎膜破裂。所有这些结合起来使得检测 PROM 和 PPRM 的试验具有最少的假结果。

[0060] 根据本发明, PAMG-1 特异性抗体可以掺入到用于检测 PAMG-1 及进而基于阴道分泌物中 PAMG-1 的存在而检测胎膜破裂的物质组合物、试剂盒、装置以及方法中。

[0061] PAMG-1 蛋白

[0062] PAMG-1 是一种存在于孕妇血清、羊水和阴道分泌物中以及所有人的血清中的蛋白质。在未孕妇女 (0-60ng/ml) 和孕妇 (5-120ng/ml) 血清中存在 PAMG-1, 此处的检测浓度取决于在检测中所采用的单克隆抗体对 (实施例 1, 表 1 及 2)。众所周知, 采用针对相同蛋白的不同抗体对, 会得到该蛋白的不同测定浓度。因此, 在 Diamandi A. 等的类似研究中 (参见 Diamandi A. 等: “胰岛素样生长因子结合蛋白 3 的免疫检测”, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000 年 6 月, Vol. 85, No. 6, pp. 2327-2333), 三种 ELISA 变体显示了 IGFBP-3 的三种不同浓度, Diamandi A. 等将其归因于每种抗体对挑拣特异的翻译后修饰的蛋白分子的能力。研究发现, PAMG-1 在羊水中的浓度明显比血清中高 (2000-75000ng/ml)。

[0063] PAMG-1 于 1977 年由 D. Petrunin 从羊水中分离, 并且起初被称为特异性的胎盘 α_1 - 球蛋白 (D. Petrunin 等: “人胎盘器官特异性 α_1 - 球蛋白的免疫鉴别及其在羊水中的含量”, *Akusherstvo i Ginekologiya*, 1977, N 1, pp. 64-65, Moscow, USSR (见实施例 2))。

[0064] 一种相似但不相同的蛋白, 被标识为 PP12 (胎盘蛋白 12), 随后由 Bohn 等从胎盘和胎膜中分离并纯化。(“新胎盘特异性蛋白 (PP12) 的分离和表征”, *Arch. Gynecol.*, 1980, Vol. 229, pp. 279-291)。S. Bell 等报道了与 PP12 不同的子宫内膜 PEG-1 蛋白的分离, 该

蛋白在 N 端 15 个氨基酸的肽中有两个氨基酸替代 (氨基酸 N11,12) (S. Bell 等, American Journal of Reproductive Immunology, 1989, Vol. 20, pp. 87-96)。

[0065] 为了进一步表征从羊水中鉴定的这些蛋白的特征,进行了一系列检测以确定 PAMG-1 的分子量。采用免疫印记法测定了 PAMG-1 的分子量,发现其为 32KD (千道尔顿, KD 是原子质量单位) (Boltovskaya, M. N. 等:“采用单克隆抗体的胎盘 α_1 -微球蛋白 [PAMG-1] 组织化学和临床诊断研究”, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1991, No. 10, pp. 397-400)。申请人随后假定 PAMG-1 涉及 IGFBP 蛋白家族 (见美国专利 US5968758)。

[0066] PAMG-1 可以以不同的异构体存在,即经过不同的翻译后修饰。抗体可以对一种异构体比对另一种异构体具有不同的特异性,这可有利地用于本发明的检测试验中。

[0067] PAMG-1 的抗体

[0068] 起初,采用了 PAMG-1 单特异性抗体 (例如, Tatarinov, Y. 等, Uspekhi Sovr. Biologii, 1990, Vol. 109, pp. 369-373)。随后,获得仅能识别那些无 IGF-1 和 IGF-2 的 PAMG-1 的抗体 (美国专利 US5891722)。

[0069] 这里,术语“抗体”指的是具有本申请中所述结合亲和力的任何蛋白,而与获得蛋白的方法无关。例如,蛋白质可以是单克隆抗体或其片段,或具有本申请中所述结合特异性的任何分子。

[0070] 根据本发明,从体液分离的、重组产生的或化学合成的 PAMG-1 多肽,以及其片段或者其它衍生物或类似物,包括融合蛋白,都可以用作免疫原来生产识别 PAMG-1 多肽的抗体。这些抗体包括但不限于多克隆抗体,单特异性抗体,单克隆抗体,嵌合抗体,单链抗体, Fab 片段,以及 Fab 表达文库。本发明的抗 PAMG-1 抗体可具有交叉反应性,例如,它们可以识别不同物种的 PAMG-1。多克隆抗体具有更大的交叉反应的可能性。作为选择,本发明的抗体可以是对单一形式的 PAMG-1 特异的。优选地,该抗体对人 PAMG-1 是特异性的。

[0071] 可采用本领域已知的各种方法来生产 PAMG-1 多肽或其衍生物或类似物的多克隆抗体。为了生产抗体,可通过对各种宿主动物注射 PAMG-1 多肽或其衍生物 (例如,片段或融合蛋白) 进行免疫,这些动物包括但不限于兔,小鼠,大鼠,绵羊,山羊等。在一个实施方案中, PAMG-1 多肽或其片段可以缀合至免疫原性载体上,例如,牛血清白蛋白 (BSA) 或匙孔血蓝蛋白 (KLH)。可采用各种佐剂来提高免疫应答,其取决于宿主种类,包括但不限于弗氏佐剂 (完全的和不完全的),矿物凝胶例如氢氧化铝,表面活性物质例如溶血卵磷脂, pluronic polyols, 聚阴离子,肽,油乳剂,匙孔血蓝蛋白,二硝基酚,以及可能有用的人类佐剂例如 BCG (卡介苗) 以及小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。

[0072] 为了制备抗 PAMG-1 多肽或其片段、类似物或衍生物的单克隆抗体,可以采用通过培养中的连续细胞系生产抗体分子的任何技术。这些技术包括但不限于最初由 Kohler 和 Milstein 建立的杂交瘤技术 (Nature 1975, 256:495-497), 以及 trioma 技术、人 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等, Immunology Today 1983, 4:72; Cote 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1983, 80:2026-2030), 以及生产人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985)。在本发明的另一实施方案中,单克隆抗体可以在无菌动物中生产 (国际专利公开号 W089/12690, 1989 年 12 月 28 日公布)。事实上,根据本发明,可采用已建立的“嵌合抗体”

生产技术 (Morrison 等, J. Bacteriol. 1984, 159 :870 ;Neuberger 等, Nature 1984, 312 : 604-608 ;Takeda 等, 1985, Nature 314 :452-454), 该技术将来自针对 PAMG-1 多肽的小鼠特异性抗体分子的基因与来自具有合适生物活性的人抗体分子的基因剪接在一起 ;这种抗体也包含于本发明的范围内。这种人或人源化嵌合抗体优选用于人类疾病或病症的治疗中 (在下文描述), 因为人或人源化抗体比异种抗体有小得多的可能性引起免疫应答, 尤其是针对它们自身的变态反应。

[0073] 根据本发明, 可采用生产单链抗体的技术 (Huston 的美国专利 US5476786 和 5132405 ;US4946778) 来生产 PAMG-1 多肽特异性单链抗体。事实上, 这些基因可以递送至体内表达。本发明的另一实施方案利用构建 Fab 表达文库的技术 (Huse 等, Science 1989, 246 :P1275-1281), 从而方便快捷地鉴别出具有针对 PAMG-1 多肽或其衍生物或类似物的期望特异性的单克隆 Fab 片段。

[0074] 包含抗体分子独特型的抗体片段可以通过已知技术生产。例如, 这样的片段包括但不限于 :可以由胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab)2 片段 ;可以通过还原 F(ab)2 片段的二硫桥而产生的 Fab 片段, 以及可以采用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段。

[0075] 在抗体的生产中, 对期望抗体的筛选可以通过本领域的公知技术完成, 例如, 放射免疫检测试验, ELISA (酶联免疫吸附检测试验), “夹心”免疫检测试验, 免疫放射分析试验, 凝胶扩散沉淀反应, 免疫扩散试验, 原位免疫检测试验 (例如, 采用胶体金, 酶或放射性同位素标记), 蛋白质印迹, 沉淀反应, 凝集试验 (例如, 凝胶凝集试验, 血细胞凝集试验), 补体结合试验, 免疫荧光检测试验, 蛋白 A 检测试验, 以及免疫电泳检测试验等。在一个实施方案中, 通过检测第一抗体上的标记来检测抗体的结合。在另一实施方案中, 通过检测与第一抗体结合的第二抗体或试剂来检测第一抗体。在又一实施方案中, 第二抗体被标记。许多在免疫试验中检测结合的方法在本领域中是已知的, 并且包含于本发明的范围之内。例如, 为了选择识别 PAMG-1 多肽特异表位的抗体, 可以分析产生的杂交瘤的产物与含有该表位的 PAMG-1 多肽片段的结合。为了选择对特定动物物种的 PAMG-1 多肽具特异性的抗体, 可以基于与从该动物物种的细胞表达或分离出来的 PAMG-1 多肽的阳性结合进行选择。

[0076] 根据本发明的特异性抗体

[0077] 根据本发明的杂交瘤细胞系通过以下方法产生。首先, 用 PAMG-1 免疫具有脾和淋巴结 B 细胞的小鼠。然后产生杂交瘤以永生 B 细胞。该 B 细胞可以是脾和 / 或淋巴结 B 细胞。然后, 那些产生具有 PAMG-1 结合亲和力的单克隆抗体的杂交瘤用 ELISA 法鉴别 : 第一层 : PAMG-1 ; 第二层 : 杂交瘤上清液 ; 以及第三层 : 辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠抗体缀合物。然后, 这些鉴别出来的杂交瘤在体外或腹水中培养, 并且分离其所生产的单克隆抗体。在一个具体实施方案中, 抗体来自保藏于俄罗斯国立工业微生物保藏中心 (Russian National Collection of Industrial Microorganisms Depository), 保藏号分别为 VKPM H-92, VKPM H-93, VKPM H-94 的杂交瘤 N52, N271 以及 N42。

[0078] 根据本发明的组合物

[0079] 本发明还涉及一系列包括两种或更多种根据本发明的抗体的组合物。在一个实施方案中, 组合物包括一对抗体和结合于其中一个抗体上的可检测标记。可采用各种可检测标记, 包括但不限于 : 染色的颗粒、酶、荧光染料以及放射性同位素。可检测标记的一个具体

实例是平均大小为 20 至 30nm 的金染色颗粒。可检测标记的另一例子是辣根过氧化物酶。可检测标记与抗体结合的方法见于例如, Harlow, E. 及 Lane, D., *Methods In Enzymology*, 1981, Vol. 73, pp. 3-46; “*Antibodies a Laboratory Manual*”, Gold Spring Harbor Laboratory, 1988, pp. 322, 323 及 343; 和 *Pierce Catalog*, pp. T9-T17 (1996)。合适的酶包括但不限于, 碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶。其它可用于本发明中的标记物或标记包括胶体金、带色乳胶珠、磁珠、荧光标记 (例如, 异硫氰酸荧光素 (FITC)), 藻红素 (PE)、得克萨斯红 (TR)、罗丹明、游离或螯合的镧系元素盐 (特别是 Eu^{3+}), 几种荧光团)、化学发光分子、放射性同位素 (^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , 螯合的 Tc 等) 或磁共振成像标记。其他标记包括荧光淬灭和荧光转移标记, 例如, 用于均相及固相检测中。而且, 根据本发明的标记可以是表位、结合配偶体, 或者是与另一种分子相互作用的“柄”, 例如生物素-链霉亲和素; 谷胱甘肽-GST; 六组氨酸-镍等。本发明也考虑采用第二抗体作为标记, 该第二抗体本身被可检测地标记 (例如, 在所采用的抗 PAMG-1 抗体对具有来自两种不同动物物种的 Fc 部分的情况下)。

[0080] 在另一实施方案中, 组合物还包括两种或更多种定位在本发明的试条装置的测试区的单克隆抗体。

[0081] 根据本发明的试剂盒

[0082] 本发明还涉及检测 PAMG-1 的试剂盒。在一个实施方案中, 试剂盒包括根据本发明的一对抗体: 其中之一对 PAMG-1 高度特异。在此试剂盒的一个变体中, 一个或另一个抗体带有与抗体结合的可检测标记。在另一实施方案变体中, 所选择抗体对中的一个或另一个抗体结合于固相支持物上。在该变体中, 所选择抗体对中的固定抗体带有可检测的标记。在另一实施方案中, 组合物包括三种或更多单克隆抗体, 其中之一可移动并且可检测, 从而该组合允许调整免疫色谱分析试验的灵敏度阈值。

[0083] 在一个特定实施方案中, 具有最高结合亲和力的抗 PAMG-1 抗体可移动, 并置于装置的衬垫区域中以用于起始的样本接触。另一抗体置于装置的测试区域中。作为选择, 其它具有 PAMG-1 高结合亲和力的单克隆抗体, 即使其亲和力达不到最高亲和力, 也可以以不同组合配制以固定在装置的测试区域中, 从而建立或调整本发明装置的预定灵敏度阈值。这可以通过常规实验完成, 如实施例 11 所示。不同的抗体组合物可以将本发明装置的信号检测阈值建立在预定水平。

[0084] 检测 PAMG-1 的方法和装置

[0085] 本发明确立了对于检测导致羊水渗漏进入阴道的胎膜破裂, PAMG-1, 特别是羊水中存在的量比正常阴道液中存在的量多得多的 PAMG-1, 是一种有用的分析物。换句话说, 它允许对膜, 即羊膜囊的早熟破裂进行诊断。本发明进一步确立了用于检测正常情况、各种阴道炎症以及真实膜破裂情况下 PAMG-1 的截断值。在鉴定了该分析物和指示膜破裂的相对水平后, 本领域技术人员就可以有利地采用已知的任何检测蛋白质的分析技术来确定患者是否发生了膜早熟破裂。

[0086] 免疫检测试验, 特别是免疫色谱试验是根据本发明的优选技术, 而免疫试验将在以下详细描述。这些试验具有特异性、准确度、速度和经济上的优势。

[0087] 本发明也可以采用其他方法来检测和定量 PAMG-1, 但这些方法可能需要昂贵的设备并且受限于实验室条件。一种这样的技术是质谱分析法, 例如, 采用具有延迟引出 (delayed extraction) 和在飞行时间室具有反射器 (reflectron) 的基质辅助的激光解吸

(MALDI) 飞行时间 (TOF) 质谱分析法 (MS)。优选的 MALDI 分析试验采用硅阵列。一种用于 MALDI 的阵列的例子是在氧化硅上的 200 μm 环形凝胶垫, 具有 350 μm 的中心距。在凝胶垫之间的疏水表面 (防水表面) 为 MALDI 提供了更加聚焦的基质 / 蛋白点, 从而提高了定量信号。例如, 采用 Packard Bioscience system 所产生的点, 直径可小于 200 μm 。Piezo 系统可以将大约 300pL 的 MALDI 基质 (例如, DHB, 芥子酸) 递送至亲和捕获剂 - 肽点的确切位置, 从而产生均一的肽 / 基质晶体。在 MALDI-MS (例如, Perseptive Voyager) 中该晶体的解吸 / 电离 (Karas 等, Ion Processes, 1987, v. 78, pp. 53-68 或 Zenobi 等, Mass Spectrom. Rev. 1998, v. 17, pp. 337-366) 产生质谱, 其中肽峰的高度与包含该肽的蛋白质的量相关。

[0088] 一种可供选择用于本发明的技术是毛细管电泳色谱, 其可用于定量少量样本中的分析物。

[0089] 而且, 定量生物化学技术, 例如聚丙烯酰胺凝胶电泳、高效液相色谱, 以及类似技术都可单独或结合起来使用, 以检测并定量样本中 PAMG-1 的量。

[0090] 检测 PAMG-1 的免疫学方法和装置

[0091] 本领域已知的检测抗体与抗原的免疫特异性结合的各种方法都可用于检测根据本发明的结合。一种涉及复合物分析的检测抗原抗体相互作用的早期方法是通过凝胶中的沉淀进行的。对分析物 - 检测抗体结合对的另一检测方法包括利用放射性碘化的检测抗体或与 IgG 有反应性的放射性碘化的蛋白质, 如蛋白 A。这些早期的方法对本领域技术人员来说是公知的, 如在 Methods in Enzymology, 1980, v. 70, pp. 166-198 所综述的。通过选择可以产生高于这里所公开的 PROM 阈值的阳性结果的抗体和条件, 可以在本发明的实施中采用这些技术。

[0092] 后来的方法仅仅采用一种抗体来确定样本中待分析物的存在, 该方法包括竞争性结合试验。在这一技术中, 抗体 (最常见地被固定在固相支持物上) 暴露于怀疑包含分析物的样本及已知数量的标记的分析物。随后这两种分析物, 即标记的分析物和样本中的分析物, 竞争抗体上的结合位点。检测游离的标记分析物或结合的标记分析物, 由此从该检测中得出样本中竞争性分析物的数量。该方法的更完全的说明见于“抗原抗体反应的基本原则”, Elvin A. Labat, (Methods In Enzymology, 70, 3-70, 1980)。在这一例子中, 标记的分析物可采用放射性同位素或酶标记。

[0093] 近来, 免疫试验利用双抗体法来检测分析物的存在。这些技术也可见于上述 Methods In Enzymology 中。因此, 根据本发明的一个实施方案, 每一标记物的存在分别通过采用针对待检测的标记物的一对抗体来确定。抗体对的其中之一在这里被作为“检测抗体”而所述抗体对中的另一个被称作“捕获抗体”。因此, 本发明的一个实施方案采用双抗体夹心方法来检测阴道液样本中 PAMG-1。在该方法中, 分析物被夹在检测抗体和捕获抗体之间, 捕获抗体不可逆地固定在固相支持物上。检测抗体带有可检测的标记, 以便鉴定抗体 - 分析物三明治的存在, 从而确定分析物的存在。

[0094] 固相支持物的常规早期形式包括板, 管或聚苯乙烯珠, 所有这些在放射免疫和酶免疫试验领域都是公知的。近来, 许多多孔材料, 例如尼龙、硝化纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维和其他多孔聚合物也用作固相支持物。

[0095] 这样, 在一个特定实施方案中, 本发明的装置包括用于实施免疫色谱试验的手段 (“免疫色谱试验装置”)。该装置包括用于引导液体的固相手段。如这里所用, 术语“引导

液体的固相手段”指的是允许液体迁移通过的固相支持物（例如，通过毛细作用）。具有这一性质的典型产品是硝化纤维素膜，其能通过本领域已知的方法制备。

[0096] 许多免疫色谱试验手段和格式在本领域是已知的，并且能用于本发明的实施。在试条或流过装置 (flow-through device) 中用膜作为固相支持物的免疫色谱分析试验已充分建立，用于临床实验室或者用于替代的（即非实验室）现场测试中。免疫色谱试验装置的常用形式是装在塑料支架中的膜（纤维素的或非纤维素的）。塑料支架使膜保持合适的外形，以便确保整个装置的正确功能。试验装置的基本结构有许多变体。例如，Litman 等（美国专利 US5156952 和 5030558）公开了用于确定样本中极少量分析物存在的分析试验方法和装置。Ullman 等（美国专利 US5137808 和 4857453）公开了一种容纳测试试验膜的装置，其中膜本身含有液体试剂以帮助样本流动。Dafforn 等（美国专利 US4981768）公开了一种具有用于施加样本和额外液体的窗口的装置。Corti 等（欧洲专利申请 89118378.2），Greenquist 等（美国专利 4806312）和 Berger 等（美国专利 5114673）也公开了分析试验装置。

[0097] 优选地，免疫色谱试验装置包括指示试验正确进行的对照。该对照可以是在固相支持物上位于比检测区距样本施加点更远的点上的特异结合反应物，它在分析物存在或不存在的条件下与标记的试剂结合，从而指示可移动受体与液体样本迁移了足够的距离从而可以给出有意义的结果。

[0098] 适合用于免疫色谱试验的标记 (label) 包括酶、荧光团、发色团、放射性同位素、染料、胶体金、胶体碳、乳胶颗粒以及化学发光剂。在采用对照标志分子时，受体和对照标志分子可以使用相同或不同的标记。

[0099] 本发明的一个实施方案采用流过型 (Flow-through type) 免疫试验装置。Valkirs 等（美国专利 4632901）公开了一种装置，其包括对抗原分析物具特异性的抗体，其中该抗体结合于多孔膜或滤膜上，而将液体样本加到该多孔膜或滤膜。当液体流过膜时，靶分析物与抗体结合。样本加入后加入标记了的抗体。标记的抗体的可见检测指示了样本中存在靶分析物。

[0100] Kromer 等公开了流过装置的另一例子 (EP-A0229359)，其描述了一种试剂递送系统，该系统包括由分散在水溶性聚合物中的试剂或其成分所饱和的基质，该聚合物用于控制试剂的溶解速率，以便将其递送至位于该基质之下的反应基质。

[0101] 在迁移型分析试验中，固相支持物，例如膜，由进行试验所需要的试剂浸透。提供分析物检测区，在此标记的分析物被结合且读取试验结果。例如，见 Tom 等（美国专利 4366241）以及 Zuk (EP0143574A)。迁移试验装置通常含有与带色标记物，例如胶体金或碳结合的试剂，从而允许试验结果可视检测而无需添加其它物质。见例如，Bernstein (美国专利 4770853)，May 等 (W088/08534)，以及 Ching 等 (EP0299428A)。所有这些已知的流过装置均可用于本发明。

[0102] 直接标记是可用于根据本发明的免疫色谱试验的一个标记例子。直接标记被限定为在其自然状态很容易被看见的（无论是裸眼还是通过滤光器）和 / 或施加刺激，例如 U.V. 光后可以促发荧光的实体。可用于本发明的带色标记的例子包括金属溶胶颗粒，例如，由 Leuvering (US4313734) 所公开的金溶胶颗粒；染料溶胶颗粒，如 Gribnau 等 (US4373932) 以及 May 等 (W088/08534) 所公开的；染色乳胶，如 May, 上引文，

Snyder (EP0280559A, 0281327A) 所公开的 ; 或者如 Campbell 等所公开的 (US4703017) 包封在脂质体中的染料。其他直接标记包括放射性核素, 荧光部分或发光部分。除这些直接标记手段之外, 包含酶的间接标记也可用于本发明中。各种类型的酶联免疫试验是本领域公知的, 例如, 碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶, 溶菌酶, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 乳酸脱氢酶, 尿素酶, 这些和其它酶已由 Eva Engvall 在 *Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT In Methods In Enzymology*, 70. 419-439, 1980 和 US4857453 中详细讨论了。

[0103] 在一个具体实施方案中, 本发明的诊断装置包括具有靠近样本引入点的检测部分和位于该位置下游的捕获部分的膜组装物。检测部分包含抗体 (检测抗体), 其将与存在于样本中的任何本发明分析物反应。检测抗体可逆固定于膜上且在使用时随样本迁移。优选但并不必需的是检测抗体被标记, 例如采用放射性核素, 酶, 荧光部分, 发光部分或者带色标记物 (例如现有技术中所公开并在以上讨论的那些) 进行标记。特别地, 可以采用反应活性标记物, 因而例如, 抗体在捕获抗原之前可出现金色而捕获后将变成紫色。

[0104] 如前所述, 捕获部分位于检测部分的下游, 包含捕获抗体, 该抗体不可逆的固定在固相支持物上, 每一种抗体固定在捕获部分的不同位置。抗体和必需试剂采用本领域标准工艺固定在固相支持物上, 如先前在流过型免疫试验装置中所述的那样。一般地, 通过非极性蛋白质亚结构和非极性支持物基质材料之间的疏水相互作用, 抗体被吸附在固相支持物上。

[0105] 本发明的免疫色谱试验技术的一个具体优点在于它克服了这类试验中不能提供定量数据的缺点。这样, 捕获部分可以包含固定的 PAMG-1 特异抗体的混合物, 这样仅仅在样本中的 PAMG-1 量超过期望的检测阈值时才产生信号。

[0106] 此外, 本发明考虑采用均相免疫试验格式。这样的竞争均相方法的一个例子是 Rubenstein 和 Ullman 的美国专利 US3817837, 其公开了一种技术, 其中配体和与酶结合的配体竞争抗体结合位点。由于抗体与酶结合的配体的结合改变了其酶学活性, 故存在的配体的浓度可以通过检测混合物转换底物为产物的速率来评估。这样, 在均相方法中, 可检测的标记物的特性将根据结合与否而在本质上是不同的。在它的结合状态, 标记物将具有更大或更小信号强度。通常, 抗体与标记的配体的结合导致信号强度下降, 例如, 当采用酶标记时。这一种类的典型产品包括 Syva Company 的 EMIT 酶免疫试验系统和 Abbott Diagnostics 的 TDX 荧光偏振免疫试验系统。一个特定的均相试验可以通过将所有分析物布置于珠子上来制备, 在此情况下将样本导入, 珠子随后离心沉降并检测之。

[0107] 可以用于本发明的其他生物诊断装置包括 G. Grenner, P. B. Diagnostics Systems, Inc., 在美国专利 US4906439 和 US4918025 中所公开的装置。Grenner 的 US4906439 中的装置包括诊断测试元件和带有流体递送元件的样本加样单元, 流体递送元件的特征在于其具有一个上带有将样本递送至测试元件的多个沟槽的层。Grenner 的 US4918025 涉及一种包括样本导入手段的装置, 该手段是例如膜, 其邻近包含固定的试剂的毛细管和废液池。样本沉积后固定试剂从毛细管中释放以完成反应, 而过量的液体被废液池保存, 因而该装置是自容纳的。

[0108] 虽然用膜检测是优选的, 但可以理解的是也可以以上述相似的方式采用其他技术和相应传感装置。目前可获得几种类型的自动检测试验装置, 其能同时进行多个样本的分析。这些自动试验装置包括连续 / 随机访问试验装置。其例子包括 PB Diagnostic System

Inc. 的 OPUS™, 以及由 Abbott Laboratories of North Chicago, III. 在 1988 年介绍的 IMX™。通常, 待测流体的样本典型地在样本杯中提供, 并且所有处理步骤自动完成, 包括将样本吸入分析试验元件, 孵育和读取所获信号。自动试验系统一般包括一系列工作站, 每个完成检测程序中的一个步骤。试验元件可通过各种手段由一个工作站转移至下一个工作站, 所述手段为例如传送带或可移动的齿条, 以保证检测步骤按顺序完成。这些试验元件还可包括储液池用以储存试剂、混合流体、稀释样本等。试验元件还包括开口, 以允许将预定量样本液, 以及如果必要, 任何其它必需试剂施加至多孔膜上。样本元件也可以包括窗口, 以允许读取作为处理步骤结果而获得的信号, 信号典型的是多孔膜上存在的试剂的荧光或比色变化, 信号读取可以例如通过光谱仪或荧光计 (这些都包括在分析试验系统之内) 进行。PB Diagnostic System Inc. 的自动分析试验仪器在美国专利 US5051237, 5138868, 5141871 和 5147609 中公开。

[0109] 可用于本发明的其他种类的免疫化学分析仪系统是生物传感器或光学免疫传感器系统。通常, 光学生物传感器是利用光学原理定量地将感兴趣的化学或生物化学浓度或活性转换成电信号的装置。这些系统可分为四个主要类型: 反射技术; 表面等离子共振; 光纤技术和集成光学装置。反射技术包括椭圆光度法, 多重合成反射光谱仪 (multiple integral reflectionspectroscopy), 以及荧光毛细填充装置 (fluorescent capillary fill device)。光纤技术包括渐逝场荧光, 光纤毛细管, 以及光纤荧光传感器。集成光学装置包括平面渐逝场荧光, 输入分级耦合免疫传感器, Mach-Zehnder 干涉仪, Hartman 干涉仪和微分干涉仪传感器。结合反应的全息检测通过在结合对的一个反应物结合至结合对中固定的第二反应物时, 检测在预定成像位置所产生的全息图像的存在而得以完成 (见美国专利 US5352582, Lichtenmalter 等 1994. 10. 4 授予)。光学免疫传感器的例子由 G. A. Robins (生物传感器进展), 在 Vol. 1, pp. 229-256, 1991 中的综述文章里一般描述。这些装置的更多的具体描述可见于美国专利 US4810658, 4978503, 5186897; R. A. Brady 等 (Phil. Trans. R. Soc. Land. B316, 143-160, 1987) 以及 G. A. Robinson 等 (Sensors and Actuators. Elsevier, 1992)。

[0110] 本发明的方法和相关试剂盒可以与多种光学测量系统结合并应用于其中。特别地, 当本发明的试剂盒和材料可以以免疫检测试验形式实施时, 这样的形式本身能够体现在各种光电测量系统中。更特别的是, 可以应用在本发明中的各种光学免疫传感器技术是已知的。因此, 例如, 装置和技术例如反射技术, 表面等离子共振, 光纤波导技术和集成光学装置, 均可以被采用并具体地配置以根据本发明方法检测并显示患者生物样本的检查结果。特定的反射技术, 例如反射计和椭圆光度法, 以及光纤的具体应用, 光波导, 荧光毛细填充装置和集成光学生物传感器是可用的多种装置和仪器中的少数几种。这些装置的综述见于 Robinson, G. A., Optical Immunosensors: An Overview, Advances In Biosensors, Vol. 1, pp. 229-256 (1991)。

[0111] 更具体地, 椭圆光度法基于: 偏振光束的方向首先朝向参比表面 (标准) 随后朝向样本表面, 然后可以将反射结果的特性及程度进行对比。具体地, 分析物与受体的结合可以以该表面相对于参比表面的厚度来检测。

[0112] 对于多重内反射光谱学, 例如, 配体和其受体可以被共价固定在平的溶凝石英波导器的光学表面上, 其后光束可以在波导管内被内部反射并且透入邻近波导器的溶液中,

这样可以测量在标准和样本之间的折射差异。在该特定方式中,可结合荧光标记并测定所产生的荧光来确定存在的结合程度。

[0113] 另一可采用的技术被称为荧光毛细管填充装置。在该特定技术中,利用了两块分开毛细管大小间距的玻璃板。受体分子可以被固定在基板上,其也充当光波导器。可利用 FITC 标记进行竞争性或夹心试验,诱导的荧光与来自结合源(相对地来自未结合源)的信号耦合到波导器中。该信号通过其离开波导器时的角偏向而被区分。还制备了表面等离子体共振 (SPR) 装置,其工作基础是:入射到金属薄膜上的光耦合到与金属薄膜中的集成电子振荡 (collective electron oscillation) 相关的表面模式中。共振条件取决于金属膜的光学特性,其厚度,其任一面上的电介质的折射指数,以及光入射角度。受体分子结合于金属膜的顶面,而在膜的底面用光照射,例如通过棱镜基底。靶分析物在结合至这些受体上时,将引起共振条件的变化,因为它造成了局部折射率的变化。随金属膜表面上光束入射角度的变化,通过监控反射光强度来观察共振。共振角度的变化与结合的分析物的量直接相关。

[0114] 涉及光纤系统的技术包括渐逝场 (evanescent field) 荧光。在该例子中,将光纤末端的覆盖层去除,这样就产生了瞬逝地与周围介质相互作用的传感器元件。受体分子结合于暴露的光纤表面,可通过利用受体和缀合蛋白的天然荧光直接进行检测。竞争性或夹心试验可利用 FITC 标记进行以获得更高的灵敏度。在操作中,光波被耦合至纤维中,而部分瞬逝产生的荧光被耦合回纤维中并被传播回检测器。

[0115] 另一利用光纤技术学的技术涉及光纤毛细管,其中裸露光纤被包绕在圆柱形填充腔中,形成一个传感器元件,其与紧紧围绕着纤维的填充体积部分发生瞬逝相互作用。受体分子可以结合至裸露的纤维表面,并且可以进行夹心或竞争性置换试验。光波被耦合入纤维中,而部分瞬逝诱导的荧光被耦合回纤维中并被传播回检测器。来自靶分析物的信号通过其离开纤维的角偏向而从背景源中区别出来。其他利用上述某些相同原理的纤维光学技术,例如光纤荧光也可以用于本发明。

[0116] 其他光子技术,例如干涉测量术包括具有例如两个通道的薄膜波导器的配置,在第一个通道上可固定受体分子,而第二个通道被遮蔽以提供参照通道。例如,激光可以被耦合至波导器中并且分成两条通路,这样折射率和覆盖物厚度的变化可以通过光束的相转变结果来检测,而光束的相转变转而又与结合的分析物的量相关联。该方法的一种变形是采用 Hartman 干涉仪,在其中提供的是单通道多模薄膜平面波导器。受体分子可以固定在该通道上,而激光可以耦合入波导器中,这样两个模态沿通道传播。多模几何光学是这样的,即较高等级模态具有大的渐逝场,从而提供信号机制,而较低级别模态实际上不存在渐逝场,从而提供参考机制。与靶分析物的结合将导致通道上方覆盖层厚度和折射率的变化,其可以通过较高等级模态的渐逝场(导致该模态的相转变)来检测。由于较低等级模态或参考模态不发生这样的变化,就不会产生相转变,因而在信号和参考光束之间的测量差异能相关地确定结合的分析物的量。

[0117] 虽然上述说明介绍了一般概念和一些细节,但是现有的各种光学传感器技术都可用于实现本发明。可以理解,上述描述并不是穷尽或限制性的,而是可采用各种现有技术,只要其可成功地检测结合的差别,并进而确定感兴趣的相应标记物或分析物的存在和量即可。当然,如上所强调的,无论采用什么技术,本发明包括同时检测和测量至少三种分析物。

[0118] 检测 PAMG-1 的免疫色谱方法

[0119] 下面将描述根据本发明检测 PAMG-1 的方法的实施方案。

[0120] 在检测方法的一个实施方案中,样本中 PAMG-1 的检测通过包含 PAMG-1 的样本与根据本发明的免疫测定系统接触以形成抗体-PAMG-1 复合物来进行。然后,检测抗体-PAMG-1 复合物。在这一实施方案的一个变形中,抗体带有可检测的标记,检测抗体-PAMG-1 复合物的步骤包括检测可检测的标记。

[0121] 在该方法的另一实施方案中,样本中 PAMG-1 的检测通过将样本与具有 PAMG-1 高结合亲和力的抗体(如 M271,以下示例)接触,从而形成抗体 M271-PAMG-1 复合物来完成。该复合物然后与固定的第二抗体(例如,M52)接触。第二抗体与第一抗体在免疫学上是不同的,并且不发生交叉反应,因而这些抗体能同时结合至 PAMG-1 分子。固定的抗体结合至迁移的抗体-PAMG-1 复合物上以形成固定的抗体-PAMG-1 抗体复合物。PAMG-1 通过检测该异三聚体复合物而得以检测。如上所述,具有 PAMG-1 高特异性的抗体优选用于 PAMG-1 的起始识别。

[0122] 当上述方法中以可检测标记物标记了所选择抗体对中的一个抗体时,该方法的变体包括将样本在与第二固定的抗体接触之前,先与标记的第一抗体接触。在这一变体方案中,标记的抗体用于结合样本中的 PAMG-1。该方法的另一实施方案包括以下步骤:向多孔材料的可移动标记抗体区加入包含 PAMG-1 的流体样本,该多孔材料允许抗体和蛋白质在其中迁移,该抗体区包括具有 PAMG-1 高特异性的可移动抗体,从而抗体与 PAMG-1 结合形成抗体 PAMG-1 复合物;复合物迁移至固定有第二抗体的测试区,该第二抗体具有 PAMG-1 结合亲和力,从而使第二抗体与标记抗体-PAMG-1 复合物结合,形成固定的复合物;在测试区检测固定的复合物。

[0123] 该方法的另一实施方案是标准的夹心试验,其中未标记的抗体被固定在任何表面上。加入包含 PAMG-1 的流体样本导致固定的抗体与 PAMG-1 结合形成抗体 PAMG-1 复合物。加入标记的抗体,形成由固定抗体-PAMG-1-标记抗体形成的固定复合物,并检测该复合物。

[0124] 根据上述方法,抗体可包括可检测标记物或标记,而检测抗体-PAMG-1 或 PAMG-1-抗体复合物的步骤包括检测此可检测标记物或标记。可用的可检测标记物的例子包括染色的颗粒,酶,染料和放射性同位素。在一个特定实施方案中,可检测标记物是金黄色颗粒,例如,具有平均大小为大约 20nm 至 30nm 的颗粒。在另一实施方案中,可检测标记物是辣根过氧化物酶。

[0125] 检测 PAMG-1 的装置示例

[0126] 可以提出各种装置用于检测样本中的 PAMG-1 蛋白。用于检测 PAMG-1 的本发明装置的一个具体实施方案如图 1-2 所示。根据本发明的装置优选能检测具有大约 5ng/ml 至 50 μ g/ml PAMG-1 的样本中的 PAMG-1。也优选装置的检测阈值为大约 5-7ng/ml。PAMG-1 背景浓度与检测装置灵敏度阈值之间的差距越大,假阳性的可能性就越低。在本节中,根据本发明的不同的可能装置实施方案体现在图 1,2 中所示的装置上。要注意的是该装置可以设计为用于简单地检测阴道分泌物样本中 PAMG-1 的存在。

[0127] 这里所用的术语“大约”指的是本领域普通技术人员测定的具体值的可接受误差范围,其部分取决于该值是如何被测量或确定的,即,测量系统的局限性。例如,“大约”可以是按本领域的实践在 1 个或 1 个以上标准差范围内。作为选择,“大约”可以是不超过给定

值的 20% 的范围, 优选不超过 10%, 更优选不超过 5%, 更优选不超过给定值的 1%。作为选择, 具体到特定的生物系统或方法, 该术语可以指一个值的数量级范围之内, 优选 5 倍之内, 更优选 2 倍之内。当具体的值在说明书和权利要求书中予以描述时, 除非另行指明, 应理解术语“大约”指的是该具体值的可接受误差范围。

[0128] 本发明装置的详述

[0129] 为了举例说明, 本说明涉及以下例举的单克隆抗体。然而, 不一定必须采用这些特异性单克隆抗体。如图 1 和 2 所示, 该装置包括由几个顺序互连的元件构成的条状体。更具体地, 装置的部件 12 包括衬垫, 在其上包含 M271 抗体区 10, 其中 M271 抗体为被标记的抗体, 例如, 通过染色的颗粒 SP 标记 (图中未示出)。衬垫 12 可以由玻璃纤维纸或任何其他多孔并且允许各种样本颗粒及物质在其中迁移通过的材料制成。染色的颗粒可以包括具有平均大小 20 至 30nm 的金颗粒。M271 抗体区还包含由同样染色颗粒标记的小鼠 IgG 免疫球蛋白。通过采用标记的 M271 抗体和标记的小鼠 IgG 免疫球蛋白的溶液浸渍衬垫 12, 将标记的 M271 抗体和鼠 IgG 免疫球蛋白引入衬垫 12 的带状部分 10。M271 抗体和小鼠 IgG 免疫球蛋白的溶液可以采用绘图笔 (drawing pen) 或微滴形成装置引入硝化纤维膜 22 中。硝化纤维膜 22 连接于衬垫 12 纵向方向上的一端, 其包含测试区 14 和对照区 16。测试区 14 和对照区 16 都横向排列在装置的整个宽度上。测试区 14 是硝化纤维膜 22 的带状部分。测试区 14 包含附着于硝化纤维膜 22 的 M52 抗体。对照区 16 包含附着于硝化纤维膜 22 的抗小鼠免疫球蛋白抗体。对照区 16 横跨测试条 22 的整个宽度。将滤纸膜 24 连接在硝化纤维膜 22 上位于该硝化纤维膜 22 与衬垫 12 连接端的相对另一端。滤纸膜 24 纵向连接于硝化纤维条 22 的该端。装置的表面覆盖特异性保护膜 28 和 30, 例如, 特意设计用于试条装置的薄胶带。膜 28 表面上绘有箭头 18 以显示衬垫 12 的样本加样端。衬垫 12、硝化纤维膜 22 和滤纸条 24 被附着在粘性的刚性塑料基底 26 上。

[0130] 图 1, 2 的说明

[0131] 10-M271 抗体区;

[0132] 12- 衬垫;

[0133] 14- 测试区;

[0134] 16- 对照区;

[0135] 18- 箭头;

[0136] 22- 硝化纤维膜;

[0137] 24- 滤纸膜;

[0138] 26- 粘性的刚性塑料基底;

[0139] 28- 带箭头的部分透明的保护膜;

[0140] 30- 不透明保护膜。

[0141] 本发明装置的优选实施方案

[0142] 在本部分所描述的实施方案中, 该装置包括一个由允许抗体和蛋白质迁移通过的多孔样本加样基质形成的 M271 抗体衬垫区 10。M271 抗体区 10 包括 M271 抗体, 其能高度特异的与 PAMG-1 结合。将包含 PAMG-1 的流体样本引入 M271 抗体区, 导致 M271 抗体与 PAMG-1 结合形成抗体 M271-PAMG-1 复合物。该装置还包括测试区 14, 其与 M271 抗体区流体连结, 由允许抗体和蛋白质在其中迁移通过的多孔材料形成。测试区 14 包括固定在测试区 14 中的

M52 抗体,该抗体也能与 PAMG-1 结合。M52 抗体与 M271 抗体在免疫学上是不同的,从而 M271 和 M52 抗体可同时与 PAMG-1 结合。将流体样本引入 M271 抗体区 10,导致抗体 M271-PAMG-1 复合物迁移到测试区 14,在这里抗体 M271-PAMG-1 复合物与 M52 抗体结合,并通过 M52 抗体固定在测试区。该装置基于固定在测试区 14 中的 M52 抗体的存在检测样本中的 PAMG-1。根据该实施方案,两种抗体都是根据本发明的抗体。以上所述的抗体对的选择过程可以由任何本领域技术人员重复进行。作为结果,仅仅 PAMG-1 形成抗体 M271-PAMG-1-M52 抗体复合物,该复合物被固定在测试区 14 中。这样固定在测试区 14 中的 M52 抗体的存在指示着样本中 PAMG-1 的存在。

[0143] 在该装置的这一实施方案中,M271 抗体与可检测标记结合,该标记用于检测固定在测试区 14 中的 PAMG-1。可以使用的可检测标记的例子包括但不限于,染色的颗粒,酶,染料,荧光染料,以及放射性同位素。在一个实施方案中,可检测标记是平均大小为大约 20-30nm 的金颗粒。在一个实施方案中,M271 抗体是冻干状态的标记抗体。

[0144] 在该实施方案的一个变体中,在 M271 抗体衬垫区的 M271 抗体采用可检测标记物标记,该装置还包括测试区,其包含 M52 抗体。衬垫区和测试区为流体连接。

[0145] 在该装置的另一实施方案中(也体现在图 1-2 所示的装置中),该装置具有带近端和远端的条状体。条状体的 M271 抗体区 10 由允许抗体和蛋白质在其上迁移通过的材料制成。条状体的 M271 抗体区 10 包括 M271 抗体,其具有 PAMG-1 高度特异结合亲和力,将包含 PAMG-1 的流体样本引入 M271 抗体衬垫区,结果 M271 抗体与 PAMG-1 结合形成抗体 M271-PAMG-1 复合物。

[0146] 条状体还包括测试区 14,其邻近 M271 抗体区 10 并且与 M271 抗体区 10 通过流体连接。测试区 14 由允许抗体和蛋白质在其上迁移通过的材料形成。测试区 14 包括固定于其上的 M52 抗体,该抗体具有 PAMG-1 结合亲和力,将流体样本引入 M271 抗体区 10 导致抗体 M271-PAMG-1 复合物迁移至测试区 14,在那里抗体 M271-PAMG-1 复合物与 M52 抗体结合并通过 M52 抗体固定在测试区 14 中。测试区还包括固定在测试区 14 中的 M42 抗体和 M52 抗体。未标记的 M52 和 M42 抗体组合起来允许对本发明试条装置的灵敏度阈值进行微调(实施例 11)。该装置基于在测试区 14 中固定标记抗体 M271-PAMG-1 复合物来检测样本中的 PAMG-1。

[0147] 对照区。本发明的装置包括一个标准对照区 16(FIGS1-2)。该对照区用于验证装置的正确运行。然而,要注意的是,任何可选择的对照区设计均可用于本发明的装置。

[0148] 带有一个对照区的装置包括由允许抗体和蛋白质在其上迁移的材料形成的 M271 抗体区 10,M271 抗体区 10 包括没有固定在其中的标记的 M271 抗体,该抗体具有 PAMG-1 高度特异性,将包含 PAMG-1 的流体样本引入 M271 抗体衬垫区 10 中,结果 M271 抗体与 PAMG-1 结合形成抗体 M271-PAMG-1 复合物。该装置还包括与 M271 抗体区 10 流体连接的测试区 14,其由允许抗体和蛋白在其上迁移的材料形成。测试区 14 还包括固定在测试区 14 中的 M52 抗体,其具有 PAMG-1 结合亲和力。M52 抗体与 M271 抗体具有不同的免疫学,这样 M271 和 M52 抗体能同时与 PAMG-1 结合。将流体样本引入 M271 抗体区 10,导致抗体 M271-PAMG-1 复合物迁移入测试区 14,在其中抗体 M271-PAMG-1 复合物与 M52 抗体结合并通过 M52 抗体固定在测试区 14 中。该装置基于在测试区 14 中固定标记的 M271 抗体来检测样本中的 PAMG-1。当样本中存在的 PAMG-1 浓度低时,至少一些标记的 M271 抗体从 M271 抗体区 10 迁移经过

测试区 14 到达对照区 16。抗小鼠抗免疫球蛋白抗体固定在对照区 16 中。抗免疫球蛋白抗体与标记的 M271 抗体结合从而使对照区染色。如果样本中存在高浓度的 PAMG-1, 则仅仅有少量的标记 M271 抗体能够到达对照区 16, 这样对照区的着色可能太浅, 以致无法以肉眼观察。为了避免这种可能性, 将标记的小鼠 IgG 免疫球蛋白加入 M271 抗体区 10。此免疫球蛋白不与 PAMG-1 结合, 并且自由经过 M52 抗体测试区 14 而迁移至对照区 16, 在那里其与抗小鼠抗球蛋白抗体结合并且使对照区 16 着色。对照区验证装置是否能发挥正常功能, 而无须考虑样本中 PAMG-1 的浓度。

[0149] 而本发明装置的另一组件是与测试区材料紧密孔隙连接的多孔材料。装置的这一部件作为泵起作用, 帮助液体、蛋白质和抗体在装置上移动。可用于标记小鼠抗体和 IgG 免疫球蛋白的可检测标记物的例子包括但不限于染色的颗粒, 酶, 染料和放射性同位素。在一个实施方案中, 可检测标记是荧光染料。而在另一实施方案中, 可检测标记是染色的颗粒。在一个实施方案中, M271 抗体为标记的抗体, 其与标记的小鼠免疫球蛋白 IgG 处于冻干状态。

[0150] 用于上述装置各种区域的材料可以是任何允许抗体和蛋白在其上迁移的材料的组合。合适材料的例子包括但不限于玻璃纤维、多孔塑料、硝化纤维以及滤纸。

[0151] 装置的各部件可以以任何功能性组合方式进行定位, 只要在本发明的装置的任何实施方案中, 存在所选择的抗体对能检测孕妇阴道分泌物中最低背景浓度的 PAMG-1 即可。

[0152] 本发明的装置可以任选地包括覆盖装置的至少一部分的保护性膜。它可以是透明或不透明的, 在其表面上可以具有必要的商标、信息标记 / 标识或箭头。

[0153] 检测胎膜破裂

[0154] 在胎膜没有破裂时, 存在于羊水水中的 PAMG-1 浓度大约至少比孕妇血清中的浓度高 100 倍, 而比孕妇阴道分泌物中的浓度高大约至少 3000 倍。作为结果, 即使在阴道分泌物样本中溶解小量的羊水 (大约每 1ml 阴道分泌物 1/100 之一滴), 也有足够数量 PAMG-1 存在于该阴道分泌物中来指示胎膜发生了破裂。进而, 因为血清中 PAMG-1 的浓度低, 样本中血清的不明显混入 (10-15%) 不会对本发明的装置和方法产生的结果形成影响。

[0155] 因为阴道分泌物中羊水的存在指示胎膜破裂, 故在阴道分泌物中检测 PAMG-1 也能用于检测胎膜破裂。

[0156] 根据本发明检测羊水中 PAMG-1 的方法是高度灵敏的。例如, 可检测浓度为 0.05ng/ml 的 PAMG-1 (实施例 6, 7)。因为血清中 PAMG-1 的最大浓度为大约 25ng/ml, 而与之相比羊水水中的最小浓度为大约 1680ng/ml, 并且因为阴道分泌物中 PAMG-1 的背景浓度非常低, 大约为 0.2ng/ml, 故本发明的方法中可以采用较低的 PAMG-1 阈值水平, 以检测阴道中羊水的存在。在本发明中通过采用较低检测阈值, 可避免大多数错误结果。

[0157] 本发明的装置和方法的设计在于通过采用对 PAMG-1 具有高度特异性和灵敏性的抗体对来避免错误结果。此外, 本发明的装置的灵敏度阈值可以准确设定在接近 5-7ng/ml 的预定水平。

[0158] 作为结果, 本发明的装置和方法不会被阴道炎或其他会对现有用于检测胎膜破裂的方法的准确性产生负面影响的因素所影响。PAMG-1 在炎症分泌物中的最大浓度为 3ng/ml (实施例 8, 表 10, 11)。如果血清混入阴道分泌物中不超过 10-15%, 会产生同样浓度的 PAMG-1。此外, 血清与羊水中 PAMG-1 浓度的巨大比率使得本发明的方法和装置即使采用低

PAMG-1 检测阈值,也不太可能由于阴道分泌物中存在血清而产生假阳性结果。如这里所述,该装置和方法可很容易地以便捷的方式使用,因而它能够用于门诊病人。例如,该方法可以与能够由没有经验或经验很少的患者操作的易用装置配合使用。使用该装置无需特定的时间,也无需为了使用该装置而在检测前对样本浓度进行稀释或调配。这使得该方法和装置高度可靠并且不容易出现操作错误。该方法还可以被设计成简单地以有/无方式确定样本中 PAMG-1 的存在以及阴道中羊水的存在。

[0159] 本发明提供了基于孕妇阴道分泌物中 PAMG-1 的存在来检测胎膜破裂的方法和装置。相应地,本发明用于检测胎膜破裂的方法简单地包括在阴道分泌物中检测 PAMG-1 的步骤,阴道分泌物中 PAMG-1 的存在指示胎膜破裂的发生。本发明的关键部分是逐步选择可以检测孕妇阴道分泌物中极低背景浓度的蛋白 PAMG-1 的抗体对。可以预见阴道分泌物中存在低浓度的 PAMG-1,因为毛细血管壁对血液蛋白的通透性取决于蛋白的翻译后修饰以及它们与其它分子的相互作用 (Marinaro J. A. 等,“O-糖基化延迟了人 IGF 结合蛋白-6 从循环中清除”, *European Journal of Endocrinology*, 2000 年 5 月, Vol. 142(5), p. 512; Schneeberger E. E.,“蛋白和小泡在毛细血管内皮中的运输”, *Fed. Proc.*, 1983 年 5 月, Vol. 42(8), pp. 2419-24; Minshall R. D. 等,“小泡在内皮细胞中的形成和运输以及内皮屏障功能的调节”, *Histochem. Cell Biol.* 2002 年 2 月, Vol. 117(2), pp. 105-12; Del Vecchio P. J. 等,“内皮单层对大分子的通透性”, *Fed Proc* 1987 年 6 月, Vol. 46(8), pp. 2511-2515; Siflinger Birnboim A 等,“内皮单层的选择性:对通透性增加的影响”, *Microvascular Research* 1998 年 11 月, Vol. 36(3), pp. 216-227; Ghinea N., Milgrom, E. A.,“LH/CG 受体的新功能:在靶器官中激素跨内皮屏障的胞转作用”, *Semin. Reproduct. Med.*, 2001, Vol. 19(1), pp. 97-101)。进行了翻译后修饰或其它分子建立非共价键的 PAMG-1 应该是最少渗入阴道分泌物中的分子。这样的分子在阴道分泌物中的浓度应该很低。不同分子渗透性的低或高取决于毛细血管壁的选择通透性和选择分泌过程。因为已知孕妇阴道分泌物中羊水的存在能指示胎膜破裂,因此阴道分泌物中 PAMG-1 的检测也能用于检测胎膜破裂的存在。用于检测阴道分泌物中 PAMG-1 的方法和装置的例子包括这里更详细描述的方法和装置。在此也更详细的描述了进一步包括基于检测阴道分泌物样本中 PAMG-1 而检测胎膜破裂的步骤的方法。

[0160] 如上所述,根据本发明检测胎膜破裂的方法和装置是高度特异、灵敏及准确的。灵敏度和准确性的原因在于孕妇阴道分泌物中 PAMG-1 的低背景浓度和高得多的本发明装置预设的灵敏度阈值之间存在很宽的差距,而该阈值又低于由胎膜破裂造成羊水渗漏入阴道时阴道分泌物中 PAMG-1 的典型浓度。而阈值的准确设定又通过在测试区 14 中采用至少一种或多种抗 PAMG-1 的附加抗体来精确建立本发明装置的预定阈值灵敏度而实现(实施例 9)。相应地,本发明的装置和方法的设计通过采用高度特异性抗体对 M271 和 M52 以及至少一种附加抗体 M42,避免了产生假阴性和阳性结果。结果,方法和装置的准确性不受阴道感染或可以降低检测胎膜破裂的现有技术方法的准确性的某些其它因素影响。本发明用于检测怀孕妇女阴道分泌物中 PAMG-1 的优选装置和方法也被设计成易于方便而快捷地使用,这样可以将本发明装置用于门诊病人。例如,本方法可以与能够由对装置没有经验或经验很少的患者操作的易用装置配合使用。使用该装置无需特定的时间,也无需在检测前对样本浓度进行稀释或调配。这使得本发明用于检测胎膜破裂的方法和装置高度可靠并且不容

易受操作错误的影响。本发明装置的临床试验结果见实施例 10。在阴道炎时阴道分泌物中 PAMG-1 浓度的测量结果见实施例 8。可从实施例 8 中看到炎症分泌物中观察到的 PAMG-1 最大浓度接近 3ng/ml。

[0161] 实施例

[0162] 以下实施例进一步详细描述了 PAMG-1 从羊水中的分离, 抗 PAMG-1 抗体对的选择, 该抗体特异性的研究, 以及在阴道炎的炎症分泌物中 PAMG-1 的浓度。这些实施例用来说明本发明的某些方面, 并不是用来限定本发明的范围。

[0163] 实施例 1 : 在血液和羊水中的 PAMG-1 浓度

[0164] 通过采用如实施例 3 所述产生的单克隆抗体对以 ELISA 方法, 检测了未孕妇女、孕妇 (妊娠 37-40 周) 的血清中及羊水中 (妊娠 39-40 周) 的 PAMG-1 浓度。

[0165] 抗体 M1, M271, M152, 和 M392 在 pH 为 9.5 的 0.05M 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液中于 6°C 经 18 小时吸附于聚苯乙烯板上 (每孔 100 μ l 抗体溶液)。用含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 pH7.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 每孔 200 μ l, 37°C 温育一小时, 以去除聚苯乙烯上的非特异性吸附。

[0166] 100ul PAMG-1 抗原以 50, 25, 12, 6, 3, 1.5 和 0.7ng/ml 的浓度加到每个孔中。血清或羊水样本用含有 0.01% BSA 和 0.05% Twin 20 的 PBS 缓冲液稀释。将稀释后的样本加入孔中, 37°C 温育一小时。反应通过邻苯二胺在 0.05M 柠檬酸磷酸缓冲液 (pH4.7) 中的溶液进行显色, 其中 37°C 温育 20 分钟。在 492nm 波长处读取光密度。

[0167] 查出第一层中抗体的浓度和缀合物的浓度, 从而建立 PAMG-1 的标准光密度曲线, 其具有最大斜率约 45° (提高一个光学单位对应于样本中 PAMG-1 浓度提高 1ng/ml)、1.5 光学单位的上限 (对于 PAMG-1 浓度, 50ng/ml) 和零浓度点不超出 0.1 光学单位。研究的样本 (血清, 羊水, 阴道和宫颈分泌物) 冻存于 -40°C。每个样本检测三次。血清稀释至原浓度的 1/5。羊水样本稀释至原浓度的 1/2000。如果样本具有超过 1.5 单位的光密度, 将其进一步稀释并再次检测。

[0168] 所获得的数据概括于下表 1-3。

[0169] 表 1

[0170] 未孕妇女血清中 PAMG-1 的浓度 (ng/ml)

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	20	0	15	12
2	20	0	15	13
3	60	5	50	46
4	50	7	48	50
5	40	4	30	34

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
6	64	15	50	56
7	20	7	15	14
8	48	8	35	30
9	15	0	10	14
10	40	5	20	35

[0171] 表 2

[0172] 孕妇（妊娠 37-40 周）血清中 PAMG-1 的浓度 (ng/ml)

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	90	8	70	50
2	100	15	90	75
3	105	16	95	75
4	120	22	100	94
5	100	12	98	90
6	98	14	95	80
7	104	20	90	80
8	98	25	75	60
9	64	5	55	40
10	70	10	60	40

[0173] 表 3

[0174] （妊娠 39-40 周）羊水中 PAMG-1 的浓度 (ng/ml)

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	8000	1680	6400	5000

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
2	12000	8000	6000	5000
3	10000	6000	7000	6000
4	6000	2000	5000	4500
5	8000	12000	5800	5000
6	7000	20000	5000	5000
7	6000	2000	4000	3000
8	75000	8000	5000	4700
9	2000	3000	1440	1500
10	40000	13000	36000	25000

[0175] 实施例 2 :PAMG-1 的分离

[0176] D.Petrinin 在 1980 年提出了 PAMG-1 分离的改进方法 (Petrinin, D. D., Kozlyaeve, G. A., Tatarinov, Yu. S., Shevchenko, O. P., Bulletin of Experimental Biology and Medicine, No5, p. 558, 1980 (俄语))。方案的步骤概括于下表 4

[0177] 表 4

[0178] PAMG-1 的分离步骤

分离步骤	纯度%	产率%
妊娠 16-25 周的羊水	4	100
用 0.5% 氯化镧沉淀	25	90
用 50% 饱和度的硫酸铵沉淀	35	70
用 60% 饱和度的硫酸锂沉淀	60	60
反相色谱分离	90	30

[0179] 将 PAMG-1 从妊娠 16-25 周的羊水中分离。羊水从医学原因导致怀孕终止的妇女中获得。我们以体积比 20 : 1 在羊水中加入 10% 氯化镧溶液 (使其终浓度为 0.5%) 并且在 4°C 中保持 18 个小时。沉淀形成并 8000rpm 离心 30 分钟进行分离。在 Na₂HPO₄ 饱和溶液中溶解沉淀, 并且在 8000rpm 离心 30 分钟以分离在该过程中产生的不溶性镧系盐沉淀。所获溶液用 50% 饱和度的硫酸铵 4°C 温育 18 个小时进行分级分离, 将所得沉淀溶解在蒸馏

水中,两种情况下均将溶解的沉淀级分的体积恢复至羊水的起始体积。然后,我们用 60% 饱和度硫酸锂沉淀溶液,之后用少量的蒸馏水溶解沉淀。透析后,我们通过添加等体积吸湿剂至蛋白溶液中,混合并孵育 10-15 分钟,用焦磷酸钙吸附混合物,然后通过离心分离吸湿剂。

[0180] 实施例 3: 本发明稳定杂交系的建立

[0181] 杂交瘤实验 1。采用取自 5 只 BALB/c 小鼠脾淋巴结的淋巴细胞。小鼠通过在爪垫中 5 次注射 PAMG-1 而免疫。每次注射比例为 1 : 1 的 100 μ g PAMG-1 和弗氏完全佐剂。在细胞融合之后,将细胞接种于 1152 孔中。总共 363 株原代杂交瘤被检测,其中 38 株为 PAMG-1 阳性。然后,通过研究与育性- α -2-微球蛋白 (fertility α -2-microglobulin), 人绒毛膜促性腺激素,滋养层 β -1-糖蛋白,人胎盘催乳激素, α -胎蛋白,以及人血清白蛋白的交叉反应性结合而检测单克隆抗体的特异性。选择了 14 株原代杂交瘤,其单克隆抗体与其它蛋白没有交叉反应。然后,采用有限稀释法将原代 PAMG-1 特异性杂交瘤克隆两次。最后,选择出 5 个克隆,它们是单克隆抗体 M1、M38、M42、M52、M91 的明显最稳定的高产生生产者。

[0182] 杂交瘤实验 2。采用来自 5 只小鼠的脾淋巴细胞。小鼠通过在腹膜内 5 次注射 100ug PAMG-1 而免疫。每次注射比例为 1 : 1 的 PAMG-1 和弗氏完全佐剂。接种了 1344 孔并且检测了 562 株杂交瘤。在其中,45 株呈 PAMG-1 阳性,19 株不与其它蛋白发生交叉反应,即是 PAMG-1 特异的。将无交叉反应的杂交瘤克隆两次,并且其中 6 个克隆被证明是单克隆抗体 M122、M152、M211、M271、M371 和 M392 的最稳定多产者,将其选择出来待用。

[0183] 因而,产生了 11 个抗 PAMG-1 的单克隆抗体,然后,从这些抗体选择抗体对来检测孕妇阴道分泌物中最低背景浓度的 PAMG-1,如实施例 4 所述。

[0184] 根据本发明的特异细胞系

[0185] 抗体 M271 和 M52 分别通过杂交瘤细胞系 M271 和 M52 生产,产生单克隆抗体的细胞系这里被称为 M271 和 M52,以及 M42 (其生产用于建立并调整装置的灵敏度阈值的单克隆抗体,如下所述)。

[0186] 表 5 报道了来自 2 个实验的杂交瘤生产的结果

[0187] 表 5

	总数	第一杂交瘤	第二杂交瘤
孔,总数	2496	1152	1344
原代杂交瘤数目	925	363	562
产生 PAMG-1 阳性单克隆抗体的杂交瘤数目	83	38	45
产生 PAMG-1 特异性单克隆抗体的杂交瘤数目	33	14	19

	总数	第一杂交瘤	第二杂交瘤
被选择用于进一步研究的生产单克隆抗体的稳定杂交瘤系的数目	11	5	6

[0188] 实施例 4 :检测孕妇阴道分泌物中最低浓度的 PAMG-1 的单克隆抗体对的选择

[0189] PAMG-1 以 1ug/ml 在 pH9.5 的 0.05M 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液中通过在 4°C 温育 18 小时而吸附于聚苯乙烯板。将下表 6 中列出的抗体自 3mg/ml 起始的系列稀释物加入到孔中。然后将板 37°C 温育一小时。将以辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠抗 IgG 抗体的抗体缀合物加入到孔中。反应用含有邻苯二胺的 0.05M 柠檬酸 - 磷酸缓冲液 (pH4.7) 在 37°C 温育 20 分钟进行显色。定量单克隆抗体的效价。

[0190] 表 6

[0191] 本发明的单克隆抗体结合浓度 1ug/ml 的 PAMG-1 的结合亲和力

MAb	在 PAMG-1 浓度为 1 μg/ml 时的效价
M1	1 : 900000
M42	1 : 1000000
M52	1 : 1000000
M91	1 : 1000000
M122	1 : 2000000
M152	1 : 1000000
M392	1 : 1000000
M371	1 : 400000
M271	1 : 3000000
M38	1 : 50000
M211	1 : 50000

[0192] 表 6 中所示的单克隆抗体浓度是抗体结合 PAMG-1 的最小浓度,其时溶液中 PAMG-1 的浓度为 1ug/ml。浓度越低,抗体检测最低浓度 PAMG-1 的能力就越高。单克隆抗体 M271 和 M52 被选择开发用于 PAMG-1 的高灵敏度 ELISA。

[0193] 在 ELISA 中单克隆抗体 M271 没有显出与以下羊水中的各蛋白质的交叉反应:育性 α-2-微球蛋白,人绒毛膜促性腺激素,滋养层 β-1-糖蛋白,人胎盘催乳激素,α-胎蛋白,

人血清白蛋白。

[0194] 除此之外,在用柱进行的实验中, M271 抗体被固定在琼脂糖上而使未稀释的羊水通过柱子。电泳后从柱子获得的洗脱液显示出一条与 PAMG-1 的分子量相吻合的分子量条带 (28-30kDa)。将高度特异性的单克隆抗体 M271 置于本发明的横向流动试条装置的衬垫中。

[0195] 与抗体 M271 相比,在 ELISA 中抗体 M52 与血清和羊水中丰富的 IGFBP-3 蛋白存在交叉反应。在阴道分泌物中所检测到的非糖基化 IGFBP-3 的浓度为大约 600ng/ml (实施例 9)。在采用本发明的试条装置的实验中,这一浓度的 IGFBP-3 不抑制浓度为 5ng/ml 的 PAMG-1 的识别。

[0196] 实施例 5 :胎盘 α 1- 微球蛋白的高灵敏度 ELISA 试验

[0197] 采用标准 ELISA 和 M271-M52 抗体对不能检测到阴道分泌物中的 PAMG-1。为了允许检测,通过将检测所要求的 PAMG-1 浓度降至 0.05ng/ml 来提高 ELISA 的灵敏度。

[0198] 研发了带有抗体 M271-M52 的夹心免疫检测系统,其显示灵敏度为每毫升 50 皮克 (0.05ng/ml) :

[0199] 第一层 :单克隆抗体 M271,在 pH9.5 的碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液中,浓度为 6 μ g/ml。

[0200] 第二层 :PAMG-1,浓度为 3200,1600,800,400,200,100,50pg/ml,以及稀释至 1/2 浓度的宫颈和阴道分泌物,在 pH7.0 缓冲液中。

[0201] 第三层 :用缓冲液稀释至 1/1000 的 M52 缀合物。

[0202] 灵敏度的提高通过改变第一和第三层而获得。与高灵敏度系统相比,在灵敏度为 1ng/ml 的常规系统中,第一层由浓度为 10 至 20ug/ml 的 M271 形成,缀合物的稀释度 (辣根过氧化物酶标记的 M52) 是 1/40000。

[0203] 获得了标准校准曲线。如以下表 7 所示,其中 PAMG-1 浓度以每毫升所含皮克量表示 (pg/ml),在波长 450nm 下观察到的颜色的光密度以标准的无量纲单位表示。

[0204] 表 7

[0205] 高灵敏度 ELISA 的校准曲线

PAMG-1 pg/ml	3200	1600	800	400	200	100	50	0
E450nm	2.000	1.725	1.432	1.130	0.851	0.600	0.304	0.051

[0206] 实施例 6 :怀孕妇女阴道分泌物中 PAMG-1

[0207] 表 8

[0208] 孕妇阴道分泌物中 PAMG-1 的浓度 (ng/ml)。

[0209] 采用抗 PAMG-1 的不同单克隆抗体对进行测量 (妊娠 29-41 周)

[0210]

N	妊娠周数	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	29	25	0.15	5	6

N	妊娠周数	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
2	34	50	0.1	10	8
3	37-38	70	0.22	30	15
4	37-38	60	0.06	25	10
5	33-34	30	0.05	13	5
6	29-30	45	0.05	13	5
7	33	50	0.16	14	10
8	30	60	0.09	15	12
9	39-40	84	0.21	28	18
10	35-36	90	0.13	30	19
11	38-39	90	0.13	30	20
12	38	65	0.15	25	15
13	31	95	0.35	45	30
14	39	44	0.05	10	5
15	29-30	80	0.2	28	12
16	40-41	58	0.078	24	10
17	37	90	0.15	40	30
18	29-30	70	0.4	15	12
19	29	65	0.64	15	12
20	30	80	0.1	22	20

[0211] 在测量最低浓度后,每种抗体采用辣根过氧化物酶标记。在 ELISA 试验中,将浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 的未标记抗体引入板的孔中。然后,将浓度为 50, 100, 200, 400, 800, 1600,

3200pg/ml 的 PAMG-1 引入塑料板上作为第二层。最后,将其它抗体中的一种的缀合物引入板的每个孔中。选择出下列成对起作用的抗体(这里显示为抗体-缀合物):M1-M91 ; M271-M52 ;M152-M91 ;M392-M371。

[0212] 这些抗体对被用于测量孕妇阴道分泌物中 PAMG-1 的浓度。最后,挑选出了 M271-M52 抗体对,对于该抗体对,测量到的阴道分泌物中的 PAMG-1 浓度最低。针对 M271-M52 对,采用高灵敏度 ELISA 测量 PAMG-1 浓度。所选择的抗体对 M271-M52 和几种其它抗体对被用来检测未怀孕和已怀孕妇女羊水和血清中 PAMG-1 的浓度(实施例 1,参考前文)。

[0213] 实施例 7 :孕妇阴道和宫颈分泌物中 PAMG-1

[0214] 表 9

[0215] 孕妇阴道和宫颈分泌物中 PAMG-1 的浓度,皮克每毫升 (pg/ml)。下表中正常妊娠指没有任何诊断到的自正常妊娠过程的偏高。

[0216] PAMG-1 浓度采用 M271-M52 抗体对以高灵敏度 ELISA 测量。

N	宫颈分泌物中的 PAMG-1, pg/ml	阴道分泌物中的 PAMG-1, pg/ml	妊娠周数	备注
1	230	150	29	正常妊娠
2	220	100	34	正常妊娠
3	340	150	38	糜烂,宫颈分泌物中有血
4	110	220	37-38	正常妊娠
5	100	60	37-38	正常妊娠
6	350	78	40-41	宫颈分泌物中有血
7	60	400	29-30	先兆流产
8	50	50	33-34	正常妊娠
9	180	50	29-30	正常妊娠
10	470	150	37	宫颈分泌物中有血
11	600	640	29	先兆流产
12	150	160	33	正常妊娠
13	170	90	30	正常妊娠

N	宫颈分泌物中的 PAMG-1, pg/ml	阴道分泌物中的 PAMG-1, pg/ml	妊娠周数	备注
14	122	210	39-40	羊水过少, 妊娠中毒
15	300	50	39	妊娠中毒, 阴道炎
16	56	130	35-36	胎盘后血液供应障碍
17	120	130	38-39	贫血
18	1000	5000	30-31	羊水渗漏
19	400	200	29-30	先兆流产
20	800	350	31	妊娠中毒

[0217] 实施例 8 : 患有阴道炎的孕妇阴道分泌物中的 PAMG-1

[0218] 表 10

[0219] 患有阴道炎的孕妇阴道分泌物中胎盘 $\alpha 1$ -微球蛋白浓度。采用非高灵敏度 ELISA 测量。

患者编号	PAMG-1 (ng/ml)
1	1.2
2	2.0
3	0
4	2.5
5	1.5
6	1.9
7	1.5
8	2.0
9	1.4

患者编号	PAMG-1 (ng/ml)
10	1.2
11	1.0
12	0
13	0
14	3.0
15	1.5

[0220] 表 11

[0221] 患有阴道炎的孕妇阴道分泌物中胎盘 α 1- 微球蛋白浓度。

N	姓名 (姓的首字母, 名的首字母, 中名的首字母)	诊断	本发明装置的结果 (“-”为“阴性”)	ELISA ng/ml
1	Ch., G. A.	妊娠 40 周, 阴道炎	-	1.2
2	To., E. N.	妊娠 38 周。胎儿营养不良。阴道炎	-	2.0
3	Ne., N. N.	妊娠 33 周。肾盂肾炎。阴道炎	-	0
4	St., A. G.,	妊娠 38 周。骨盆狭窄。阴道炎	-	2.5
5	So., T. N	妊娠 40 周。阴道炎	-	1.5
6	Ch., O. G.	妊娠 29-30 周。早产危险。阴道炎	-	1.9
7	Ry., V. V.	妊娠 29 周。分娩迹象。阴道炎	-	1.5
8	Ma., K. S.	妊娠 38 周。宫颈糜烂。阴道炎	-	2.0
9	St., L. E.	妊娠 38-39 周。狭窄骨盆。宫颈糜烂。阴道炎	-	1.4
10	La., V. S.	妊娠 36-37 周。早产危险。阴道炎	-	1.2
11	Si., M. A.	妊娠 39 周。肾病。贫血。阴道炎	-	1.0

N	姓名(姓的首字母,名的首字母,中名的首字母)	诊断	本发明装置的结果(“-”为“阴性”)	ELISA ng/ml
12	Sh. S. V.	妊娠 37-38 周。肾病。阴道炎	-	0
13	Ab. , R. V.	妊娠 36-37 周。早产危险。阴道炎	-	0
14	Gu. , E. K.	妊娠 36 周。早产危险。阴道炎	-	3.0
15	Ro. , N. V.	妊娠 35 周。阴道炎	-	1.5
16	De. , S. V.	妊娠 32 周。宫颈糜烂。阴道炎	-	0
17	Zd. , I. V.	妊娠 35 周。早产危险。宫颈糜烂。阴道炎	-	1.0
18	Ko. , T. V.	妊娠 24 周。早产危险。阴道炎	-	0
19	Ma. , I. V.	妊娠 36 周。早产危险。阴道炎	-	0
20	Io. , I. V.	妊娠 40 周。宫颈糜烂。阴道炎	-	0
21	Ma. , S.	妊娠 39 周	-	0
22	Ve. , E. L.	妊娠 38 周。宫颈糜烂。阴道炎	-	0
23	St. , I. N.	妊娠 36 周。肾病。阴道炎	-	0
24	Ro. , V. A.	妊娠 39-40 周。贫血。阴道炎	-	0
25	Pu. , T. A.	妊娠 38-39 周	-	0
26	Tu. , Y. A.	妊娠 21 周。怀疑 PROM	-	0
27	No. , G. V.	妊娠 22 周。妊娠终止的危险	-	0
28	Ma. , E. V.	妊娠 31-32 周。肾盂肾炎。阴道炎	-	0
29	St. , I. V.	妊娠 36 周。妊娠终止的危险	-	0
30	Ka. , K. P.	妊娠 32 周。肾病	-	0

[0222] 实施例 9 :试条装置特征的修饰

[0223] 在第一个实验中,制备浓度为 1,1/2,1/4,1/8,1/16,和 1/32mg/ml 的 M52 Mab 溶液。每种溶液被放置于一个试条装置中。三种 Mab 的混合物 (M52、M271、M42) 也被稀释成

原浓度的 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 和 1/32, 并将每种稀释溶液分别引入到单独的试条装置中。然后, 将浓度为 50ng/ml 的 PAMG-1 溶液加入到 12 个试条装置的每一个上。纯 M52 抗体的溶液在 1/8 浓度时在检测区造成了可见的有色条带, 而在 Mab 混合物中有色条带在 1/2 浓度时可见。因此, Mab 混合物抑制 PAMG-1 分子的结合, 由此调节了条带的可见性。

[0224] 将抗体浓度为 :M52 :0. 8mg/ml, M271 :0. 1mg/ml, 和 M42 :0. 1mg/ml 的单克隆抗体放置于多个试条装置的测试区中。然后, 将在一个宽浓度范围的 PAMG-1 (从 12800ng/ml 至 7ng/ml), 以及浓度为 1ng/ml 的 PAMG-1 加入到本发明每个试条装置的测试区。在 PAMG-1 浓度从 12800ng/ml 至 7ng/ml 的范围内, 检测条带可以被人眼看见, 但在浓度为 1ng/ml 时看不见。同时, 当以相同浓度采用纯 M52 溶液时, 在 PAMG-1 的整个浓度范围 (包括 1ng/ml) 都能看见检测条带, 尽管在 1ng/ml 时强度很弱。这极大提高了在患有某些医学病症例如炎症的患者中产生假阳性结果的可能性。

[0225] 1. 在测试区采用两种抗体的组合来调节本发明试条装置的灵敏度

[0226] 在第一个研究中, 只有 M52 抗体 (浓度 0. 4mg/ml) 被引入测试区中。在第二个研究中, M52 抗体 (浓度 0. 4mg/ml) 和 M271 抗体 (浓度 0. 4mg/ml) 被引入测试区中。M271 抗体缀合有金颗粒, 将其以选定浓度引入衬垫区, 以使 510nm 波长处光密度为 10。将该缀合物在 10% 蔗糖和 2% 酪蛋白溶液中引入衬垫。PAMG-1 被滴定至浓度为 20, 10, 5 和 1ng/ml。

[0227] 在如下表中, 数值为用扫描仪以 Sigma Scan 程序测量的相对光密度指数。M271 抗体在衬垫中 ;M271+M52 组合在测试区中。“+”代表测试条带是可见的 (颜色足以被人眼所检测), “-”代表测试条带不能被人眼检测到。

[0228]

PAMG-1 浓度, ng/ml	20	10	5	1
MAb M52 可见的	62 +	58 +	39 +	2 -
Mab M52+M271 可见的	82 +	8 -	2 -	4 -

[0229] 检测灵敏度从第一研究中的 5ng/ml 变成第二研究中的 20ng/ml。可以归纳出通过在测试区加入 Mab M271, 获得了灵敏度的 4 倍抑制。

[0230] 2. 采用两种抗体的组合调节试条装置中的测试条带的颜色强度

[0231] 在第一个研究中, 只有 M52 抗体 (浓度 0. 8mg/ml) 被引入测试区中。在第二个研究中, M52 抗体 (浓度 0. 8mg/ml), M271 抗体 (浓度 0. 7mg/ml) 和 M42 抗体 (浓度 0. 8mg/ml) 被引入测试区中。用于测试区的抗体混合物制备如下 :M52 抗体溶液 14 μ l (微升), 浓度为 8. 6mg/ml, 与 7 μ l 浓度为 13. 9mg/ml 的 M42 溶液以及 3 μ l 浓度为 10. 9mg/ml 的 M271 溶液混合。然后, 加入缓冲液至总体积为 150ul, 并且将溶液引入试条装置中。

[0232] 在下表中, 显示了相对光密度。

PAMG-1 浓度, ng/ml	50	25	12	6	3	1.5
MAb M52 可见的	17 +	13 +	9 +	5 +	2 -	0 -
MAb M271+M52+M42 可见的	25 +	18 +	13 +	3 -	0 -	0 -

[0233] 光密度曲线的斜率（坡度）在第一和第二研究中是不同的。在 PAMG-1 浓度为 12ng/ml 时，在第二个研究中试条上的显色线要比第一研究中的明亮。在 PAMG-1 浓度为 6ng/ml 时，试条上的显色线在第一个研究中是可见的，而在第二个研究中不可见。

[0234] 采用抗体的组合观察到视觉上获得更明亮的条带。因此，虽然灵敏度接近，人眼所观察到的颜色强度是不同的。

[0235] 3. 采用四种抗体的组合来调节本发明装置的灵敏度和颜色强度曲线的斜率

[0236] 在下表中，“+”代表可见的测试条带，“-”代表不能被肉眼检测到的测试条带。

PAMG-1 浓度, ng/ml	0	1	2.5	5	10	25	50
MAb M52+M42+M172	-	-	-	-	+	+	+
Mab M271+M52+M42+M122	-	-	-	+	+	+	+

[0237] 因此，通过组合抗体可以调节检测的灵敏度。

[0238] 实施例 10 : 临床试验结果

[0239] 研究方案

[0240] 患者采用“临床评估”- 对照和本发明的装置进行评价。

[0241] 入选条件：

[0242] 1) 妊娠龄为 20.0-41.0 周。

[0243] 2) 患者报告有暗示 PROM 或 PPRM 的征兆或症状。

[0244] 3) 在获得用于评价患者是否有 PROM 或 PPRM 的样本前，未进行手指阴道检查。

[0245] 4) 患者同意无菌窥器检查以收集标准临床评价（pooling、硝嗪、羊齿试验）和用于 PAMG-1 检测的无菌拭子。

[0246] 排除条件：

[0247] 1) 任何来源的活性阴道出血

[0248] 2) 前置胎盘

[0249] 可从 Sharp Memorial Mary Birch Hospital for Women (San Diego) 和 Summit Medical Center (Oakland) 获得 192 名患者自 2000 年 12 月 15 日起的统计分析。

[0250] 在 192 名患者中有两名,本发明的装置给出了阳性结果而标准临床评估没有显示出任何 PROM 的迹象。这两例因而最初被计为是本发明装置的假阳性结果(见以下“不正确”数据)。然而,在检测后的数小时之内这两名患者迅速出现了 PROM 的症状。在第二次临床评估中被确诊为 PROM,而本发明装置的这两个结果因而被认为是真实的阳性(以下“正确”栏代表最后试验数据)。

- | | | |
|--------|--|---------------------------------|
| [0251] | 组合的数据 | 组合的数据 |
| [0252] | (不正确的) | (正确的) |
| [0253] | Dx PROM | Dx PROM |
| [0254] | $a = 84, b = 5, c = 2, d = 101$ | $a = 88, b = 1, c = 0, d = 103$ |
| [0255] | 灵敏度 = $a / (a+c) = 84 / (84+2) = 97.7\%$ | 灵敏度 = $84 / (84+0) = 100\%$ |
| [0256] | 特异性 = $d / (b+d) = 101 / (5+101) = 95.3\%$ | 特异性 = $103 / (1+103) = 99\%$ |
| [0257] | PPV = $a / (a+b) = 84 / (84+5) = 94.4\%$ | PPV = $88 / (88+1) = 99\%$ |
| [0258] | NPV = $d / (d+c) = 101 / (101+2) = 98.1\%$ | NPV = $103 / (103+0) = 100\%$ |
| [0259] | 其中 | |
| [0260] | a 是所观察到的真实阳性病例数; | |
| [0261] | b 是所观察到的假阴性病例数; | |
| [0262] | c 是所观察到的假阳性病例数; | |
| [0263] | d 是所观察到的真实阴性病例数; | |
| [0264] | 灵敏度 = $a / (a+c)$; 特异性 = $d / (b+d)$; | |
| [0265] | 阳性预测值: $PPV = a / (a+b)$; | |
| [0266] | 阴性预测值: $NPV = d / (d+c)$; | |
| [0267] | <u>真实阳性</u> 是本发明装置的阳性反应数,其中 PROM 被随后的临床评价确诊, | |
| [0268] | <u>真实阴性</u> 是被随后的临床评价确诊的阴性反应数, | |
| [0269] | <u>假阳性</u> 是阳性反应数,但是 PROM 未被随后的临床评价所确诊, | |
| [0270] | <u>假阴性</u> 是阴性反应数,但是随后的临床评价确诊为 PROM。 | |
| [0271] | 表 12. 采用本发明的装置 (Lot C 98-0007) 在 Third Maternity Hospital of Moscow, Russian Federation, Obstetrics and Gynecology Department#2 进行的试验。 | |
| [0272] | | |

N	姓名(姓首字母, 名首字母, 中名首字母)	诊断	Amnisure 结果	备注
1	Ser., L. B.	妊娠 17 周。先兆流产。阴道炎	阴性	临床观察:无渗漏
2	Ga., L. A.	妊娠 17 周。先兆流产	阴性	临床观察:无渗漏
3	Kuz., M. B.	妊娠 23 周。pH 阴性。出血	阴性	无渗漏

N	姓名(姓首字母, 名首字母, 中名首字母)	诊断	Amnisure 结果	备注
4	Bul., M. V.	妊娠 39 周。怀疑渗漏。阴道炎	阳性	临床观察: 阴道排出物增加。进一步观察: 验证阳性检测(更多排出物, 开始分娩)
5	Kra., E. U.	妊娠 40 周, 妊娠中毒。羊膜穿刺	阴性	临床观察: 无渗漏
6	Mel., N. V.	妊娠 39 周。妊娠中毒。尿结石	阴性	临床观察: 无渗漏
7	Buh., S. N.	妊娠 29 周。高血压	阴性	临床观察: 无渗漏
8	Niv., I. P.	妊娠 27-28 周。先兆流产	阴性	临床观察: 无渗漏
9	Aik., A.	妊娠 35 周。先兆流产。阴道炎	阴性	临床观察: 无渗漏
10	Yak., L. A.	妊娠 40 周	阴性	临床观察: 无渗漏
11	Kis., G. V.	妊娠 33 周。先兆流产。阴道炎	阴性	临床观察: 无渗漏
12	Koch., L. A.	妊娠 34 周。怀疑渗漏	阴性	临床观察: 无渗漏
13	Bai., S. A.	妊娠 32 周。先兆流产。妊娠中毒	阴性	临床观察: 无渗漏
14	Mor., I. S.	妊娠 32 周。先兆流产。阴道炎	阴性	临床观察: 无渗漏
15	Ugr., T. I.	妊娠 32-33 周。妊娠中毒。羊水少	阴性	临床观察: 无渗漏
16	Pav., N. A.	22-23 周妊娠。妊娠中毒。阴道炎	阴性	临床观察: 无渗漏
17	Bog., T. I.	妊娠 29 周。先兆流产	阴性	临床观察: 无渗漏
18	Var., T. I.	妊娠 32 周。妊娠中毒	阴性	临床观察: 无渗漏
19	Dal., O. V.	妊娠 35 周。妊娠中毒。阴道炎	阴性	临床观察: 无渗漏
20	Koz., O. A.	妊娠 40 周	阴性	临床观察: 无渗漏

N	姓名(姓首字母, 名首字母, 中名首字母)	诊断	Amnisure 结果	备注
21	Sen., S. G.	妊娠 12-13 周。先兆流产	阴性	临床观察:无渗漏
22	Pol., E. A.	妊娠 21 周。先兆流产	阴性	临床观察:无渗漏
23	Ber., L. M.	妊娠 24 周。先兆流产	阴性	临床观察:无渗漏
24	Ard., V. M.	妊娠 39 周。急性妊娠中毒。胎盘功能不全	阴性	临床观察:无渗漏
25	Aki., A.	妊娠 8 周。妊娠中毒。阴道炎	阴性	临床观察:无渗漏

[0273] 表 13 采用本发明的装置 (Lot C 98-0007) 在 Third Maternity Hospital of Moscow, Russian Federation 进行的试验。

N	姓名	诊断	Amnisure 结果	备注
1	Fan., E. A.	妊娠 38 周。水肿	阴性	临床观察确认检测结果
2	Sem., Z. D.	妊娠 36 周。妊娠中毒	阴性	临床观察确认检测结果
3	Tab., N. V.	妊娠 36-37 周。先兆流产	阴性	临床观察确认检测结果
4	Zah., O. P.	妊娠 35 周。水肿。阴道炎	阴性	临床观察确认检测结果
5	Dem., O. V.	妊娠 38-39 周。水肿	阴性	临床观察确认检测结果
6	Vul., D. V.	妊娠 32 周。先兆流产。阴道炎	阴性	临床观察确认检测结果
7	Klo., V. V.	妊娠 38-39 周。水肿。肾盂肾炎。宫颈糜烂	阴性	临床观察确认检测结果
8	Bor., E. A.	妊娠 35-36 周。胎盘循环障碍	阴性	临床观察确认检测结果
9	Jer., E. A.	妊娠 40-41 周	阴性	临床观察确认检测结果
10	Vik., N. P.	妊娠 41-42 周。肾盂肾炎。水肿。阴道炎	阴性	临床观察确认检测结果
11	Tul., O. S.	妊娠 35-36 周。妊娠中毒。肥胖	阴性	临床观察确认检测结果
12	Med., T. E.	妊娠 38-39 周。静脉曲张	阴性	临床观察确认检测结果
13	Kuz., T. A.	妊娠 39-40 周	阴性	临床观察确认检测结果

N	姓名	诊断	Amnisure 结果	备注
14	Kab., E. M.	妊娠 39-40 周。水肿。羊水过多	阴性	临床观察确认检测结果
15	Che., E. V.	39-40 周妊娠。水肿。贫血	阴性	临床观察确认检测结果
16	Tih., T. Y.	妊娠 40 周。先兆子痫	阴性	临床观察确认检测结果
17	Bah., N. I.	妊娠 39-40 周。分娩预后。怀疑 渗漏	阴性	临床观察确认检测结果
18	Gol., N. V.	妊娠 38-39 周。胎儿缺氧	阴性	临床观察确认检测结果
19	Gri., O. V.	妊娠 25 周。先兆流产	阴性	临床观察确认检测结果

[0274] 表 14。采用本发明的装置 (Lot C 98-0007) 在 Third Maternity Hospital of Moscow, Russian Federation 进行的试验。

N	诊断	Amnisure 结果	备注
1	妊娠 40 周。巨大胎儿。怀疑 渗漏	阳性	在 4 小时中出现分娩阵痛和 分娩活动。观察到明显渗漏
2	妊娠 34 周。先兆流产	阴性	临床观察 6 小时 : 无渗漏
3	妊娠 39 周	阴性	临床观察 : 无渗漏
4	妊娠 40 周	阴性	临床观察 : 无渗漏
5	妊娠 39-40 周	阴性	临床观察 : 无渗漏
6	妊娠 39-40 周	阴性	临床观察 : 无渗漏
7	妊娠 39-40 周。宫颈糜烂	阴性	临床观察 : 无渗漏
8	妊娠 40 周。分娩症状。羊 水渗漏	阳性	临床观察 : 羊水渗漏
9	妊娠 39 周	阴性	临床观察 : 无渗漏
10	妊娠 39-40 周	阴性	临床观察 : 无渗漏
11	妊娠 39 周	阴性	临床观察 : 无渗漏

[0275] 表 15 采用本发明的装置 (Lot C 98-0007) 在 Third Maternity Hospital of Moscow, Russian Federation, Obstetrics 及 Gynecology Chair of the State Moscow

University of Russia 进行的试验。

N	诊断	Amnisure 结果	备注
1	妊娠 39 周。肾病。羊水过多	阴性	在 4 小时内出现分娩阵痛,分娩活动。 观察到明显渗漏
2	妊娠 41 周。水肿	阴性	临床观察 6 小时:无渗漏
3	妊娠 39-40 周。巨大胎儿。分娩症状。肾病	阴性	临床观察:无渗漏
4	妊娠 39-40 周	阴性	临床观察:无渗漏
5	妊娠 37-38 周。出血混合。高血压	阴性	临床观察:无渗漏
6	妊娠 36 周。肾病	阴性	临床观察:无渗漏
7	妊娠 40 周。怀疑渗漏	阳性	临床观察:渗漏。在 30 分钟内出现分娩
8	妊娠 39-40 周	阴性	临床观察:无羊水渗漏
9	妊娠 38-39 周	阴性	临床观察:无渗漏
10	妊娠 38 周	阴性	临床观察:无渗漏
11	妊娠 39 周。十几岁的产妇	阴性	临床观察:无渗漏
12	妊娠 32 周。胎儿营养不良	阴性	临床观察:无渗漏
13	妊娠 39-40 周。妊娠中毒	阴性	临床观察:无渗漏
14	妊娠 24 周。先兆流产	阴性	临床观察:无渗漏
15	妊娠 34-35 周。妊娠中毒	阴性	临床观察:无渗漏
16	妊娠 33 周。水肿	阴性	临床观察:无渗漏
17	妊娠 34-35 周。妊娠中毒	阴性	临床观察:无渗漏
18	妊娠 35-36 周。胎儿营养不良	阴性	临床观察:无渗漏
19	妊娠 32 周。先兆流产	阴性	临床观察:无渗漏

N	诊断	Amnisure 结果	备注
20	妊娠 38-39 周。怀疑渗漏。阴道排出物中有血混合	阴性	临床观察:无渗漏。10 小时破水,分娩开始
21	妊娠 40-41 周。分娩症状	阴性	临床观察:无渗漏
22	妊娠 25 周。先兆流产	阴性	临床观察:无渗漏
23	妊娠 28 周。妊娠中毒	阴性	临床观察:无渗漏

[0276] 备注:表 13, 14, 15 中的羊水渗漏通过阴道排出物数量及超声波扫描检查来进行临床评价。

[0277] 在阴性检测结果时长期临床观察是可能的, 因为患者住院以治疗相伴的疾病。

[0278] 本发明不限于这里所述的具体实施方案的范围。事实上, 除在这里所描述的那些之外, 从先前的描述和附图, 本发明的各种改变对于本领域技术人员来说是显而易见的。这样的改变也包括在所附的权利要求书的范围之内。

[0279] 还要理解的是, 所有的值均为近似值, 提供这些值旨在描述目的。

[0280] 本申请中所引用的专利、专利申请、公开出版物、产品说明和方案为所有目的特此全部引入作为参考。

[0281] 表 16。在俄罗斯国立工业微生物保藏中心 (Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) Depository) (1 Dorozhny proezd 1, Moscow 117545, Russia) 保藏的微生物。

名称	保藏日	保藏号
杂交瘤细胞系 N52	2003 年, 5 月 22	VKPM H-92
杂交瘤细胞系 N271	2003 年, 5 月 22	VKPM H-93
杂交瘤细胞系 N42	2003 年, 5 月 22	VKPM H-94

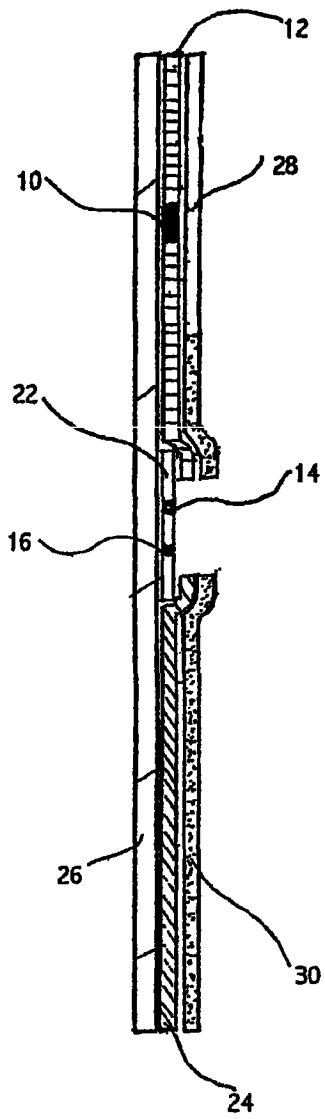


图 1

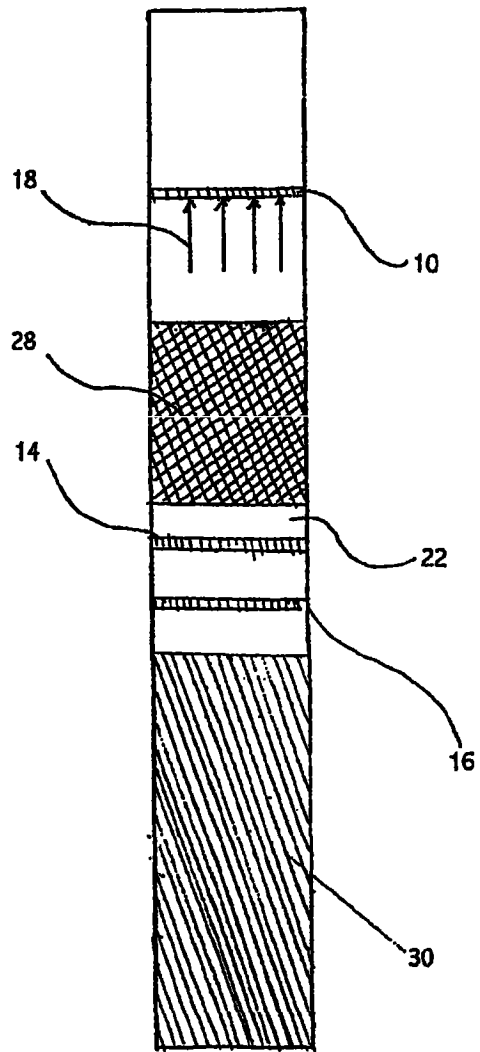


图 2