



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102792166 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201180010375. 0

(22) 申请日 2011. 01. 21

(30) 优先权数据

10382011. 4 2010. 01. 21 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/050867 2011. 01. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/089240 EN 2011. 07. 28

(73) 专利权人 艾基诺米公司

地址 西班牙瓦伦西亚

(72) 发明人 卡洛斯·西蒙瓦莱斯

安东尼奥·佩利塞尔马丁内斯

奥斯卡·贝兰加阿蒂恩萨

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 卢蓓

(51) Int. Cl.

G01N 33/92(2006. 01)

G01N 33/50(2006. 01)

(56) 对比文件

郑尧. 米非司酮和抗雌激素对卵巢切除后怀孕大鼠子宫的 PGF2 α 和 PGE2 浓度的影响.《国外医学妇产科学分册》. 1998, 第 25 卷 (第 1 期),

Hanna Achache. Endometrial receptivity

markers, the journey to successful embryo implantation.《Human Reproduction Update》. 2006, 第 12 卷 (第 6 期),

R. Chartrand. Effect of dietary fat sources on systemic and intrauterine synthesis of prostaglandins during early pregnancy in gilts.《Journal of Animal Science》. 2003, 第 81 卷 (第 3 期), 第 726-734 页.

邓文波. 前列腺素在胚胎着床和蜕膜化中的作用.《细胞生物学杂志》. 2008, 第 30 卷第 342-346 页.

Marta Wasielak. Effect of the conceptus on uterine prostaglandin-F2 α and prostaglandin-E2 release and synthesis during the periimplantation period in the pig.《Reproduction, Fertility and Development》. 2009, 第 21 卷第 709-717 页.

J. B. MAATHU. CYCLIC CHANGES IN THE CONCENTRATION OF PROSTAGLANDIN F2 α IN HUMAN UTERINE FLUSHINGS.《British Journal of Obstetrics and Gynecology》. 1978, 第 85 卷第 207-210 页.

Kristina Gemzell-Danielsson. The effect of antiprostestins (RU486) and prostaglandin biosynthesis

(续)

审查员 刘迎鸣

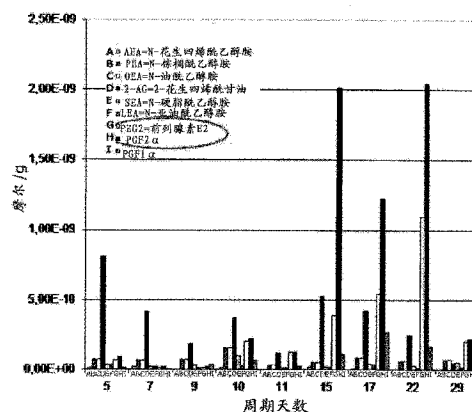
权利要求书1页 说明书15页 附图2页

(54) 发明名称

子宫内膜接受性的诊断方法

(57) 摘要

本发明涉及子宫内膜接受性的非侵入性诊断方法,其包括收集脂质生物标志物谱并且将其与参照脂质组生物标志物(特别是前列腺素 PGE2 和 / 或 PGE2 α) 比较。本方法尤其适用于确定雌性哺乳动物(优选女人)的生育力状态。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

inhibitor(naproxen) on uterine fluid prostaglandin F2α concentrations. 《Human Reproduction 》.1994, 第 9 卷 (第 9 期), Diederik Hoozemans.Human embryo	implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. 《Reproductive BioMedicine Online》.2004, 第 9 卷 (第 6 期),
--	--

1. 一种或更多种试剂在制备用于检测女人的子宫内膜对胚胎植入之接受性的试剂盒中的用途,其中所述一种或更多种试剂测定来自所述女人的子宫内膜流体样品中前列腺素 E2 (PGE2) 或者前列腺素 E2 (PGE2) 和前列腺素 F2 α (PGF2 α) 之组合的水平,其中当所述子宫内膜流体样品中 PGE2 或者 PGE2 和 PGF2 α 的水平与参照样品相比升高时,选择植入窗口。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述参照样品是在所述女人的非排卵期从所述女人获得的子宫内膜流体样品。

3. 根据权利要求 1 的用途,其中所述参照样品是在女人的非排卵期从女人群体获得的子宫内膜流体样品。

4. 根据权利要求 1 的用途,其中通过液相色谱与串联质谱相组合来测定所述 PEG2 和 PGF2 α 的水平。

子宫内膜接受性的诊断方法

技术领域

[0001] 本发明涉及子宫内膜对胚胎植入之接受性的非侵入性检测方法。本方法尤其适用于确定雌性哺乳动物（优选女人）的生育力状态。本发明还涉及实施所述方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 据估计尝试怀孕的夫妇中有 12% 患不孕症，由于怀孕年龄的增加，该数字正在上升。已越来越多地使用体外受精 (In vitro fertilisation, IVF) 来帮助不育夫妇怀孕。自 1978 年首次成功的 IVF 治疗使 Louise Brown 出生以来，许多技术上和医学上的进步帮助提高了效率；如今，接受 IVF 治疗的女人中 70% 左右有成功的结果。仍有约 50% 的患者没有怀孕或在早期流产，这需要科学界的进一步努力来继续该领域的研究。

[0003] 通常，IVF 是多步骤的过程，其涉及从雌性患者或供体取得成熟卵；将卵在人工培养基中孵育；从患者或供体收集精子并且进行后续的准备；用精子使卵受精；监测和选择优质胚胎；以及将这些转移至子宫腔。胚胎必须植入到接受性的子宫内膜上以使妊娠得以进行。公认的是，该特定步骤与大多数的失败相关，因此，寻找可能的原因和解决问题的方法是有临床意义的。

[0004] 被转移的胚胎的植入涉及接受性的子宫内膜与功能性囊胚之间的同步化的交流 [Wang, H., 和 Dey, SK. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Review Genetics*. 7:185-199]。这种现象仅发生在植入窗口期间，即在月经周期第 19 天至第 23 天（女人）之间的子宫内膜接受性自限期 (self-limited period)。在正常月经周期中，这通过卵巢雌激素和孕酮的局部作用来实现，其在子宫内膜诱发一系列细胞和分子事件，从而导致适当的子宫内膜接受性。用 50 多年前提出的 Noyes 标准确定子宫内膜的时期 (endometrial dating) 以估测子宫内膜接受性 [Noyes, RW., Hertig, AJ., 和 Rock, J. 1950. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*. 1:3-25]，该标准现在仍是测量子宫内膜接受性优选使用的方法。目前，根据供体卵 IVF 的 15 年经验，已为人所接受的是组织学评价几乎不增加有临床意义的信息，它应被子宫内膜接受性的功能性评价所替代。

[0005] 分子和细胞生物学时代以及新分析技术的开发为寻找对接受性子宫内膜更恒定的预测物提供了帮助。用类固醇激素诱导后，目前已鉴定出大量结构和分子介导物作为潜在的子宫内膜接受性生物标志物，包括子宫内膜细胞表面胞饮突 (pinopode) 的存在、粘附分子如整合素、细胞因子、生长因子、脂质等 [Nikas, G., 和 Aghajanova. 2002. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online* 4 Suppl. 3:18-23; Lessey, BA. 2003. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*. 68: 809-815; Robb L, Dimitriadis E, Li R, Salamonsen LA., 2002. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation. *J Reprod Immunol*. 57:129-141]。说明性地，在植入窗口所处的黄体中期，人子宫内膜中两种前列腺素 (PG) 前列腺素 E2 (PGE2) 和前列腺素 F2 α (PGF2 α) 的产生增加 [Hoozemans DA 等 Human

embryo implantation:current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology.Reprod Biomed Online2004,9(6):692-715]。

[0006] 此外,基因和蛋白质组分析为评价子宫内膜接受性增加了令人兴奋的新工具,而且子宫内膜活检样品可用于鉴定与子宫接受性相关的分子,以对更好的研究人植入。然而,这些办法尚未使结果适用于日常 IVF 临床实践,因为没有鉴定出对人植入关键的单个特定因素 [Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., 等 2006. The human endometrium as a fertility-determining factor. Human Reproduction Update. 12 :617-630]。此外,依赖活检的技术在应用中的主要缺陷在于它们的侵入性,以及破坏必需的植入终点的适时子宫内膜生物活检的必要性 [van der Gaast, MH., Beier-Hellwig, K., Fauser, BC., 等 2003. Endometrial secretion aspiration prior to embryo transfer does not reduce implantation rates. Reprod Biomed Online. 7 :105-109]。

[0007] 子宫内膜分泌物为非破坏性地研究子宫内膜接受性提供了新的可能。重要的是,子宫内膜流体的抽吸不影响怀孕率 [van der Gaast 等, 2003, 同上]。这种方法提供了与周期天数相关的单个蛋白质的可靠结果,在使用 luminex 系统的蛋白质阵列中证明了该方法的有效性 [Boomsma, CM., Kavelaars, A., Eijkemans, MJC., 等 2009. Cytokine profiling in endometrial secretions :a non invasive window on endometrial receptivity. Reprod Biomed Online. 18 :85-94],从而开辟了非侵入性应用的领域。

[0008] 虽然通过评价子宫内膜接受性已公开一些生化标志物 [Giudice, L. C. 1999. Hum Reprod 14 Suppl 2 :3-16 ;Achache, H 等 ;Human Reproduction Update, 2006 ;12 :731-46, Thomas, K 等 ;Fertil. Steril. 2003 ;80 :502-507 ;W003062832],本领域需要可用于临床的特异且可靠的分子生物标志物来检测女人子宫内膜对胚胎植入之接受性。

[0009] 代谢组学是致力于系统性研究细胞、组织和生物流体中的小分子(即代谢产物)的学科。代谢产物是细胞调控过程的终产物,可以将它们的水平当作生物系统对遗传或环境变化的经放大的应答。临床医生几十年来依赖于代谢组所包含信息中的一小部分,如测量葡萄糖来监测糖尿病和测量胆固醇来监测心血管健康。已开发了精密的新代谢组分析平台和信息学工具,来提供对代谢组的广泛和灵敏的测量。

[0010] 已知脂质作为结构组分(如细胞膜),能量储存组分和信号转导分子发挥重要作用。广义上脂质是疏水性或两亲性小分子,它们可完全或部分源自以碳阴离子为基础的硫酸酯缩合和/或以碳阳离子为基础的异戊二烯单元缩合。可以认为“脂质组”是代谢组学的子领域,其旨在通过在分子水平测量和表征广泛的脂质谱(脂质组谱(lipidomic profile))来阐明脂质环境中的生物过程。传统的临床脂质测量对甘油三酯、胆固醇或脂蛋白的总量进行定量。然而,血清脂质谱在分子水平上更复杂。目前的脂质组平台能定量表征多个脂质类型中的数百种不同的脂质分子种类,如鞘脂、磷脂、甾醇酯、酰基甘油、甾醇、胆汁酸、脂肪酸、类花生酸、前列腺素和类固醇 [Seppänen -Laakso, T 和 Orešič, M. 2009. How to study lipidomes. J Molec Endocr. 42 :185-190]。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明基于以下令人惊讶的发现:来自女人子宫内膜流体样品的选自前列腺素 E2(PGE2)、前列腺素 F2 α (PGF2 α) 及其组合的前列腺素的水平与子宫内膜对胚胎植入之接受性相关。因此,当在子宫内膜流体样品中测定时,所述前列腺素(PGE2 和/或 PGF2 α)

可用作子宫内膜对胚胎植入之接受性的生物标志物。

[0013] 一方面,本发明涉及当在子宫内膜流体样品中测定选自前列腺素 E2 (PGE2)、前列腺素 F2 α (PGF2 α) 及其组合的前列腺素时,其作为子宫内膜对胚胎植入之接受性的生物标志物的用途。

[0014] 另一方面,本发明涉及检测雌性哺乳动物的子宫内膜对胚胎植入之接受性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0015] a) 测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中选自前列腺素 E2 (PGE2)、前列腺素 F2 α (PGF2 α) 及其组合的前列腺素的水平;

[0016] 以及

[0017] b) 将所述子宫内膜流体样品中的所述前列腺素的水平与子宫内膜对胚胎植入之接受性相关联。

[0018] 另一方面,本发明涉及选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口的方法,其包括测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 的水平和 / 或 PGF2 α 的水平,其中当所述样品中所述前列腺素 PGE2 或 PGF2 α 中至少一种的水平与参照样品相比升高时,选择所述植入窗口。

[0019] 另一方面,本发明涉及评价雌性哺乳动物的生育力状态的方法,其根据所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平,及其与所述雌性哺乳动物生育力状态的相关性。

[0020] 另一方面,本发明涉及评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎的方法,其根据所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平,及其与胚胎接受和植入状态的相关性。在一个具体的实施方案中,所述雌性哺乳动物是进行体外受精 (IVF) 过程的女人。

[0021] 另一方面,本发明涉及监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度的方法,其根据所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平,及其与子宫内膜成熟度的相关性。

[0022] 另一方面,本发明涉及对雌性哺乳动物进行体外受精方法,其根据所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平,及其与子宫内膜成熟度的相关性,其中当所述子宫内膜成熟时,将胚胎引入所述雌性哺乳动物的子宫。

[0023] 另一方面,本发明涉及包含 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的参照脂质的试剂盒。所述试剂盒在检测雌性哺乳动物的子宫内膜对胚胎植入之接受性中,或在选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口中,或在评价雌性哺乳动物的生育力状态中,或在评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎中,或在监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度中,或在雌性哺乳动物中进行体外受精的方法中的用途构成本发明的另一方面。

[0024] 另一方面,本发明涉及能提高子宫内膜接受性的化合物的鉴定方法。

[0025] 另一方面,本发明涉及避孕剂的鉴定方法。

[0026] 另一方面,本发明涉及脂质组合物,其中所述脂质组合物获得自所述雌性哺乳动物的胚胎植入窗口期间的雌性哺乳动物子宫内膜流体样品。所述脂质组合物在测定雌性哺乳动物中子宫内膜对胚胎植入之接受性中的用途构成本发明的另一方面。

[0027] 另一方面,本发明涉及选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口的方法,其包括以下步

骤：

- [0028] a) 提供来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品；
- [0029] b) 从所述样品中收集脂质组谱；以及
- [0030] c) 将所述收集的脂质组谱与雌性哺乳动物的生育力状态相关联。

附图说明

[0031] 图 1 显示了女人自然月经周期期间的子宫内膜流体样品中不同脂质的水平；通过液相色谱与串联质谱相组合来鉴定脂质 [A :N- 花生四烯酰乙醇胺 (AEA) ;B :N- 棕榈酰乙醇胺 (PEA) ;C :N- 油酰乙醇胺 (OEA) ;D :2- 花生四烯酰甘油 (2-AG) ;E :N- 硬脂酰乙醇胺 (SEA) ;F :N- 亚油酰乙醇胺 (LEA) ;G :前列腺素 E2 (PGE2) ;H :前列腺素 F2 α (PGF2 α) ;I :前列腺素 F1 α (PGF1 α)]。

[0032] 图 2 显示了整个月经周期期间获取自女人子宫内膜流体样品的前列腺素 E2 (PGE2) 和前列腺素 F2 α (PGF2 α) 的水平 [组 I (第 0-8 天) ; 组 II (第 9-14 天) ; 组 III (第 15-18 天) ; 组 IV (第 19-23 天) 和组 V (第 24-30 天)]。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明的一个目的是为女人子宫内膜对胚胎植入之接受性的检测提供特异且可靠的生物标志物。所述生物标志物可用于，例如检测雌性哺乳动物的子宫内膜对胚胎植入之接受性，或选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口，或评价雌性哺乳动物的生育力状态，或评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎，或监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度，或雌性哺乳动物中进行体外受精的方法。在另一个具体的实施方案中，所述雌性哺乳动物是女人。在更具体的实施方案中，所述女人是进行体外受精 (IVF) 过程的女人。

[0035] 本发明人出乎意料地发现，一些脂质化合物可用作子宫内膜对胚胎植入之接受性的生物标志物。具体地，本发明人分析了与植入窗口重合的女人月经周期第 19 天至 21 天之间，子宫内膜流体样品中一些脂质的水平。因此，现在可通过测定月经周期期间子宫内膜流体样品中的脂质谱来鉴定雌性哺乳动物的植入窗口。该方法基于将已建立的来自雌性哺乳动物的脂质谱与参照脂质组生物标志物相比较。在一个具体的实施方案中，所述雌性哺乳动物是女人。

[0036] 在一个具体的实施方案中，本发明人观察到在与植入窗口重合的女人月经周期第 19 天至 21 天之间，两个特异性脂质（即前列腺素 PGE2 和 PGF2 α ）的浓度在子宫内膜流体样品中显著增加。因此，现在可通过测定月经周期期间子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平来鉴定女人的植入窗口。

[0037] PGE2 (7-[3- 羟基 -2-(3- 羟基辛 -1- 烯基) -5- 氧代 - 环戊基] 庚 -5- 烯酸) 是天然前列腺素，在医学上也被称为“地诺前列酮 (dinoprostone)”；它在分娩中有重要作用（软化宫颈和引起子宫收缩），而且还刺激成骨细胞使其释放因子，其通过成骨细胞刺激骨吸收。如同另一些前列腺素，地诺前列酮可用作堕胎药，因为它是直接血管扩张剂，放松平滑肌，而且抑制交感神经末梢释放去甲肾上腺素。

[0038] PGF2 α ((Z)-7-[(1R,2R,3R,5S)-3,5- 二羟基 -2-[(E,3S)-3- 羟基辛 -1- 烯基] 环戊基] 庚 -5 烯酸) 也是天然前列腺素，在医学上也被称为“地诺前列素 (dinoprost)”；它在医学上用来引产和作为堕胎药。

[0039] 因此,当在子宫内膜流体样品中测定时,所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 可用作雌性哺乳动物(优选女人)子宫内膜对胚胎植入之接受性的生物标志物。此外,尤其是当在雌性哺乳动物(优选女人)的子宫内膜流体样品中测定所述前列腺素时,所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 作为所述雌性哺乳动物子宫内膜对胚胎植入之接受性的生物标志物的用途构成本发明的一方面。本文所用“生物标志物”是指任何脂质如前列腺素(如 PEG2 和 PGF2 α),其在子宫内膜流体中的水平(浓度)根据目标的生理状态而改变。

[0040] 在一个具体的实施方案中,本发明根据以下发现:来自雌性哺乳动物(如女人)的子宫内膜流体样品中选自前列腺素 PGE2、PGF2 α 及其组合的前列腺素的水平可用作雌性哺乳动物(如女人)子宫内膜对胚胎植入之接受性的生物标志物。

[0041] 本文所用的术语“子宫内膜流体”是指腺上皮分泌物,其包含分泌到子宫腔内的所有化合物 [Aplin JD 等 The Endometrium, 2nd. edn: INFORMA healthcare; 2008]。简单地说,子宫内膜构成内衬于雌性哺乳动物(如女人或人或非人灵长类动物)的子宫壁(子宫壁的子宫肌层或中间层由平滑肌细胞和支持间质以及血管组织组成)的表面组织,或换句话说,子宫内膜是哺乳动物子宫的内膜。子宫内膜对雌激素和孕酮激素极为敏感而且由几个功能层构成。子宫内膜的组织结构包含外部细胞层(其构成上皮且与子宫腔直接接触)以及称为基质的内部细胞层(其占子宫内膜厚度的 80% 左右)。此外,子宫内膜包含血管和赋予子宫内膜其功能特性的专门化的细胞。子宫内膜上皮细胞构成连续的细胞层,其在两个区域形成:腔上皮(内衬于子宫内膜表面的上皮细胞)和腺上皮(形成子宫内膜表面下的腺体的上皮细胞),所述区域物质上不同而且分子上可识别 [Brown SE 等 Endometrial glycodelin-A expression in the luteal phase of stimulated ovarian cycles. Fertil Steril 2000, 74(1):130-133]。腔上皮是对病原体攻击的物理屏障,而且在其顶端表面形成称为胞饮突的结构,其负责吸收子宫腔物质;然而,腺上皮负责形成子宫内膜流体的分泌物,子宫内膜流体包含分泌到子宫腔的所有化合物 [Aplin JD 等 (2008) 同上]。

[0042] 所述子宫内膜腺体分泌物的关联性在农场动物模型中证实,其中抑制所述腺体的形成使得怀孕不能开始 [Gray CA 等 Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. Reproduction 2002, 124(2):289-300]。因此,尽管在人中没有直接证据,已提出子宫内膜腺体功能的缺陷可导致怀孕失败 [Burton GJ 等 Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. Placenta 2007, 28 Suppl A: S64-69]。因此有趣的是,如先前所报道的,子宫内膜流体的组成取决于子宫内膜腺体的活性而不是整个子宫内膜 [van der Gaast 等 The feasibility of a less invasive method to estimate endometrial maturation-comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy. BJOG 2009, 116(2):304-312]——van der Gaast 等证明一些蛋白质在子宫内膜组织中的水平与在子宫内膜流体中的水平不同而且彼此不对应。

[0043] 因此,本发明提供了检测雌性哺乳动物子宫内膜对胚胎植入之接受性的方法和试剂盒;选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口的方法和试剂盒;评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎的方法和试剂盒;监测子宫内膜成熟度的方法和试剂盒;以及对雌性哺乳动物进行体外受精的方法和试剂盒。在一个具体的实施方案中,所述雌性哺乳动物

是女人或雌性非人灵长类动物,优选女人。在一个更具体的实施方案中,所述女人是进行体外受精 (IVF) 过程的女人。在另一个具体的实施方案中,所述方法包括检测来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中选自 PGE2、PGF2 α 及其组合的前列腺素的水平,其中所述前列腺素的水平与子宫内膜对胚胎植入之接受性相关。在另一个实施方案中,所述方法包括在获取自雌性哺乳动物月经周期的多个阶段的一个或更多个子宫内膜流体样品中,检测来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平。在另一个实施方案中,该方法包括从来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中收集脂质组谱,并将所述收集的脂质组谱与所述雌性哺乳动物的生育力状态相关联。

[0044] 在一个实施方案中,本发明的方法基于以下发现:所述前列腺素 PGE2 和 PGF2 α 的水平在月经周期中在子宫内膜流体中具有时间模式,而且所述前列腺素在所述子宫内膜流体中的水平在植入窗口(即子宫内膜接受怀孕的时间窗口)期间升高。

[0045] 另一方面,本发明涉及检测雌性哺乳动物子宫内膜对胚胎植入之接受性的方法,以下称为“本发明方法 [1]”,所述方法包括以下步骤:

[0046] a) 测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中选自前列腺素 E2 (PGE2)、前列腺素 F2 α (PGF2 α) 及其组合的前列腺素的水平;以及

[0047] b) 将所述子宫内膜流体样品中的所述前列腺素的水平与子宫内膜对胚胎植入之接受性相关联。

[0048] 本文所用术语“子宫内膜对胚胎植入之接受性”是指子宫内膜接受性窗口期间的子宫内膜状态。术语“子宫内膜接受性窗口”是指理想的 28 天人月经周期中第 19 天至 21 天之间的时间段。已知其他哺乳动物有类似的周期,而且本领域普通技术人员能使本文所述的方法适于该周期。

[0049] 此外,本文所用的术语“哺乳动物”包括任何哺乳动物,如人和非人灵长类动物、牛、山羊、绵羊、马、猪、狗等。在一个优选的具体实施方案中,所述哺乳动物是女人。术语“女人”是指人的雌性。在一些实施方案中,本发明方法中的雌性哺乳动物是女人,月经周期的阶段是选自分泌早期和分泌中期。

[0050] 根据本发明,在来自所研究雌性哺乳动物(如女人)的子宫内膜流体样品中测定 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平。子宫内膜流体样品可用常规方法从所述雌性哺乳动物中获得。说明性地,来自女人的子宫内膜流体样品可通过实施例 1 中提到的方法获得,即通过子宫颈将易弯的空导管轻轻引入子宫腔,并逐步用注射器实施吸取。因为一个主要的挑战是收集足够纯的样品,以防止移除导管时被宫颈粘液污染,胚胎转移导管的外套被从外宫颈推进到适当的深度,接着实施吸取;然后在吸取子宫内膜分泌物之前吸出宫颈粘液。此外,虽然通常子宫内膜流体不含可影响结果的细胞,在一个实施方案中,提取出子宫内膜流体样品后,将样品离心以去除可存在于样品中的任何可能的细胞组分。符合要求的子宫内膜流体样品数与良好的样品收集操作相结合将足够避免错误结果。

[0051] 为了获得雌性哺乳动物子宫内膜对胚胎植入之接受性的更可靠检测,优选随月经周期来测定 PGE2 和 / 或 PGF2 α 在子宫内膜流体样品中的水平。因此,本发明方法 [1] 可每天进行,或每 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天进行,以使得可以随整个月经周期测定所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 在子宫内膜流体样品中的表达谱。通常,女人的子宫内膜流体样品可在以下时间获得:增生期(月

经周期第 1-14 天或 LH 峰之前)、分泌早期(月经周期第 15-19 天或 LH 峰之后第 1-5 天)、分泌中期(月经周期第 20-24 天或 LH 峰之后第 6-10 天)和分泌晚期(月经周期第 25-28 天或 LH 峰之后第 11-14 天)。根据本发明,在整个月经周期中,PGE2 和 / 或 PGF2 α 在子宫内膜流体样品中的水平在子宫内膜对胚胎植入有接受性期间是最高的。

[0052] 子宫内膜对胚胎植入之接受性的测定在很多技术(如 IVF、胚胎转移等)中以及在测定尝试自然受孕的夫妇的最佳受孕时期中特别重要。

[0053] 本文所用术语“水平”采用广义,可指定量的量(如重量或摩尔)、半定量的量、相对量(如在类别中的重量百分比或摩尔百分比,或者比率)、浓度等。在一个具体的实施方案中,PGE2 和 PGF2 α 的水平用摩尔 / 克流体表示[在这种情况下,尽管样品是液体,由于其体积小,对样品进行称重,所述化合物的浓度参照所述重量表示——值已适当地归一化]。

[0054] PGE2 和 / 或 PGF2 α 在子宫内膜流体样品中的水平的测定可根据待检测脂质使用任何适合的方法进行检测,并且可以任选地进行定量;说明性而非限制性地,方法包括薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、质谱(MS)、NMR 波谱等及其组合(如 LC/MS 等)。在一个具体的实施方案中,所述脂质(PGE2 和 PGF2 α)通过将 LC 与串联 MS 组合[LC/MS/MS]来鉴定。串联质谱仪包括三重四极杆、离子阱和四极杆 / 飞行时间仪器等。这些仪器通常使用四极杆技术,根据化合物在碰撞激活(片段化)前的分子量和对片段化成分的质量分析来分离化合物。这意味着该混合物必须纯化到这样的程度,即施加到质谱仪的样品没有其他相同质量的化合物。通常这可通过从组织中进行液-液萃取然后进行固相萃取方法来完成。四极杆技术提供约 1amu 的分辨率;通过使用允许更精细分辨率的 TOF/TOF 仪器来改进质谱仪的分离。

[0055] 已描述了测定生物样品中 PGE2 和 PGF2 α 的水平的替代性方法,如见 Voyksner&Bush,其公开对花生四烯酸代谢产物(其中包含前列腺素 PGE2 和 PGF2 α)进行热喷雾 HPLC/MS 分析经证明是敏感和特异的[Voyksner, R. D. & Bush, E. D. Determination of prostaglandins, and other metabolites of arachidonic acid by thermospray HPLC/MS using post column derivatization. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Volume 14, Issue 5:213-220(网上发表:13Apr 2005)];Surrenti 等公开了通过高效液相色谱(HPLC)分离和定量人胃液中的 PGE2 的快速实用方法[Surrenti C. 等, High Performance Liquid Chromatographic Method for Prostaglandin E² Determination in Human Gastric Juice Without Derivatization. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Volume 7, Issue 12, October 1984, pages 2409-2419];Bastani 等开发了以与串联质谱偶联之具有负电喷雾电离(ESI)的 LC(LC/MS/MS)为基础的分析方法来测定 PGF2 α 衍生物在不同生物样品中浓度[Bastani, N. E., 等 Determination of 8-epi PGF2 α concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, Volume 23 Issue 18, pages 2885-2890(网上发表:10Aug 2009)]。检测和任选地定量生物样品中的脂质的另一合适方法采用稳定的同位素示踪物来标记脂质。

[0056] 在一个具体的实施方案中,PGE2 和 PGF2 α 水平用液相色谱(LC)与串联质谱(MS)组合[LC/MS/MS]来测定。

[0057] PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平可根据定量和 / 或半定量分析。例如可以使用半定量方法来测定特定脂质 (PGE2 和 / 或 PGF2 α) 代谢产物在阈值以上的水平,或测定不同脂质代谢物的比例,而不用给出绝对或相对的数值。可以使用定量方法来测定在生物样品中特定脂质代谢物的相对或绝对量。

[0058] 在半定量方法中,阈值或截断值可通过本领域已知的任何方法来测定,而且任选地是预定的值。在一个具体的实施方案中,预定的阈值的意思是它是固定的,例如根据之前对测定和 / 或雌性哺乳动物 (如女人) 群体的经验。或者,术语“预定”的值也可表示达到阈值的方法是预定或固定的,即使不同测定之间具体值不同或甚至可每次测定均对值进行测定。

[0059] 另一方面,本发明涉及选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口的方法 (以下称为“本发明方法 [2]”),其包括测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PEG2 的水平、PGF2 α 的水平或 PEG2 和 PGF2 α 二者的水平,其中当所述样品中所述前列腺素 PGE2 或 PGF2 α 中至少一种的水平与参照样品相比升高时,选择所述植入窗口。

[0060] 本文所用表述“选择.....的方法”是指用来测定雌性哺乳动物 (如女人) 处于对胚胎植入的接受期的可能性的方法。本领域技术人员将观察到,对所研究的雌性哺乳动物 (如女人),所述预测不会 100% 正确。然而,所述表述要求预测方法对雌性哺乳动物 (如女人) 的统计上显著部分提供正确结果,这可用标准的统计学技术来确定,例如置信区间确定, p 值确定, Student's t 检验或 Mann-Whitney 检验,其在 Dowdy 和 Wearden, Statistics for Research, John Wiley&Sons, New York 1983 中有解释。合适的置信区间是至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、优选至少 90% 或最优选至少 95%。优选地, p 值是 0.2、0.1, 或最优选 0.05。

[0061] 本文所用术语“植入窗口”涵盖子宫内膜对怀孕有接受性的时间窗口;在人中,这发生在月经周期的分泌阶段。植入被确定为黄体生成素 (luteinising hormone, LH) 激增日期后的 6-8 天。可以根据正常月经模式将植入窗口估计为约所预计月经周期第 1 天之前 7 天,因此它对应于人理想的 28 天月经周期的 19 至 21 天。类似的周期已在其他哺乳动物中发现,因此本发明方法可适用于任何雌性哺乳动物。

[0062] 在所研究雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中测定 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平。在一个优选的具体实施方案中,所述雌性哺乳动物是女人。子宫内膜流体样品可通过在有关本发明方法 [1] 的内容中提到的常规方法从所述雌性哺乳动物中获得。此外,子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平的测定可以使用在有关本发明方法 [1] 的内容中讨论的任何合适方法来测定。在一个具体的实施方案中, PGE2 和 PGF2 α 的水平是、用液相色谱 (LC) 与串联质谱 (MS) 组合 [LC/MS/MS] 来测量。

[0063] 根据本发明的方法 [2], PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平的测定需要与所述前列腺素在参照样品中的水平相关联。有效的是,当所分析子宫内膜流体样品中所述前列腺素 PGE2 或 PGF2 α 中至少一种的水平与参照样品相比升高时,选择植入窗口。根据本发明,当所研究子宫内膜流体样品中所述前列腺素水平与参照样品相比至少是 1.1 倍、1.5 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍或甚至更多时,则所研究雌性哺乳动物子宫内膜流体样品中的前列腺素 (如 PGE2 或 PGF2 α) 水平与所述前列腺素在参照样品中的水平“相比升高”。

[0064] 本文所用术语“参照样品”是指在雌性哺乳动物（如女人）的非排卵期，从所述哺乳动物获得的子宫内膜流体样品。由于不同雌性哺乳动物（如女人）之间在非排卵期产生的所述前列腺素方面可能存在可能的不同，通常可通过合并雌性哺乳动物群体的相同量的样品来获得参照样品。在一个具体的实施方案中，典型的参照样品将从临床记录良好的女人获得。在所述样品中，生物标志物（PGE2 和 / 或 PGF2 α ）的正常浓度（即参照浓度）可通过例如建立参照群体的平均浓度来确定。为了确定生物标志物的参照浓度，应留意一些注意事项，如年龄等。说明性地，优选地在留意上述注意事项（例如年龄等）的情况下选择的至少 2 个、至少 10 个、至少 100 个、优选超过 1000 个雌性哺乳动物（如女人）的组的相同量可作为参照组。

[0065] 在一个具体的实施方案中，在女人非排卵期从女人或女人群体的子宫内膜流体中获得参照样品。尽管参照样品可在所述女人非排卵期的任何一天获得，但在一个具体的实施方案中，所述参照样品在月经周期的第 15 天之前获得，通常在月经周期的 5-11 天之间获得。可用上述月经周期阶段的子宫内膜流体样品来计算预定值。

[0066] 或者，为了获得更可靠的植入窗口的测定，优选随月经周期测定 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平。因此，本发明方法 [2] 可每天进行，或每 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天进行，从而可以在整个月经周期期间测定所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的表达谱。通常，女人的子宫内膜流体样品可在以下时间获得：增生期（月经周期第 1-14 天或 LH 峰前）、分泌早期（月经周期第 15-19 天或 LH 峰之后第 1-5 天）、分泌中期（月经周期第 20-24 天或 LH 峰之后第 6-10 天）以及分泌晚期（月经周期第 25-28 天或 LH 峰之后第 11-14 天）。通过这种方式，最佳植入窗口将对应于 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平在整个月经周期期间最高的那个时期。

[0067] 在一个具体的实施方案中，参照样品取自处于非排卵期的所研究的同一雌性哺乳动物（如女人），以定量所述前列腺素（PGE2 和 / 或 PGF2 α ）的水平；该信息可用作参考值。

[0068] 在另一具体实施方案中，参照样品取自处于非排卵期的一般性（generalised）的雌性哺乳动物群体（如女人群体），定量所述前列腺素（PGE2 和 / 或 PGF2 α ）的水平并且组合以建立参考值。

[0069] 根据本发明，分析在子宫内膜分泌物中的生物活性脂质来测定其相对水平，并且建立与植入和怀孕结果的相关性。

[0070] 因此，在另一方面，本发明涉及评价雌性哺乳动物的生育力状态的方法，其中所述方法包括：

[0071] - 测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 的水平、PGF2 α 的水平，或 PGE2 和 PGF2 α 二者的水平，以及

[0072] - 将所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与生育力状态相关联。

[0073] 如上所述获得的所研究雌性哺乳动物子宫内膜流体样品中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平可以使用有关本发明方法 [1] 的内容中讨论的任何合适方法来测定。

[0074] 该方法的目的是评价在植入窗口期间所述雌性哺乳动物子宫内膜的子宫内膜流体样品中所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平。子宫内膜流体中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平与子宫内膜接受性和怀孕的可能性相关。因此，根据本方法，知道所述雌性哺乳动物子宫内膜流体样品中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平，就可以知道其月经周期中最易受精的日期，

其满足怀孕的最佳条件。

[0075] 在本方法的一个优选的具体实施方案中,所述雌性哺乳动物是女人。

[0076] 另一方面,本发明涉及评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎的方法,其中所述方法包括:

[0077] - 测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 的水平、PGF2 α 的水平,或 PGE2 和 PGF2 α 二者的水平,以及

[0078] - 将所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与胚胎接受和植入状态相关联。

[0079] 如上所述获得的所研究雌性哺乳动物子宫内膜流体样品中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平可以使用有关本发明方法 [1] 的内容中讨论的任何合适方法来确定。该方法的目的也是评价在植入窗口期间所述雌性哺乳动物子宫内膜中所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平。PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与接受和植入胚胎的受体雌性哺乳动物的状态以及怀孕可能性相关。同样,根据本方法,知道所述雌性哺乳动物子宫内膜流体样品中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平,就可以知道雌性哺乳动物接受和植入胚胎的最合适的日期。

[0080] 在一个具体的实施方案中,所述雌性哺乳动物是女人,优选进行体外受精 (IVF) 过程的女人。在这种情况下,PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与接受和植入胚胎的受体女人的状态以及怀孕可能性相关。所述女人的子宫内膜流体样品可在植入胚胎前的任何时间获得,如从胚胎植入前几分钟(如 15 分钟)至几小时(如 4-6 小时),或甚至几天(如 1、7、14 或甚至更多)。在一个具体的实施方案中,该方法旨在施用于胚胎转移前 5-6 小时以非破坏性方式获得的子宫内膜流体。

[0081] 如上所述,对 IVF 过程,鉴定子宫内膜分泌物中作为子宫内膜接受性之生物标志物的特定脂质介导物的能力十分重要。由于不需要获得子宫内膜活检样品,可以避免对女人有压力的该步骤。此外,尽管开发了非侵入性技术(如超声波检查或磁力共振),所获得的正确子宫内膜时期(dating)是不准确的,该非侵入性技术仅提供子宫的形态信息,已被证明是不可靠的。本发明提供了测定胚胎转移前几小时的子宫生化特性和适当接受性子宫内膜的方法,因此增加了成功植入胚胎的机会。因此,通过优化子宫内膜因素,植入率可提高至少 5%,通常至少 10%。

[0082] 另一方面,本发明涉及监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度的方法,所述方法包括以下步骤:

[0083] a) 测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平,所述子宫内膜流体样品获取自所述雌性哺乳动物月经周期的多个阶段;以及

[0084] b) 将所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与子宫内膜成熟度相关联。

[0085] 或者,根据本方面,监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度的方法包括以下步骤:

[0086] a) 从所述雌性哺乳动物获得子宫内膜流体样品;

[0087] b) 测定所述雌性哺乳动物的所述子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平;

[0088] c) 用获取自所述雌性哺乳动物月经周期的多个阶段的子宫内膜流体样品来重复步骤 a) 和 b); 以及

[0089] d) 将所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与子宫内膜成熟度相关联。

[0090] 如上所述获得的所研究雌性哺乳动物子宫内膜流体样品中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α

水平可以使用有关本发明方法 [1] 的内容中讨论的任何合适方法来测定。

[0091] 根据本方法, 子宫内膜流体样品从所研究雌性哺乳动物月经周期的多个阶段 (例如对于女人的理想月经周期为增殖期 (月经周期第 1-14 天)、分泌早期 (月经周期第 15-19 天)、分泌中期 (月经周期第 20-24 天) 和分泌晚期 (月经周期第 25-28 天)) 获得, 以便能将所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与子宫内膜成熟度相关联, 从而知道子宫内膜在月经周期期间的状态。

[0092] 在一个具体的实施方案中, 所述雌性哺乳动物是女人, 如进行 IVF 过程的女人。

[0093] 另一方面, 本发明涉及对雌性哺乳动物进行体外授精的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0094] a) 测定来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平, 所述子宫内膜流体样品获取自所述雌性哺乳动物月经周期的多个阶段;

[0095] b) 将步骤 b) 的一个或多个子宫内膜流体样品中所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与子宫内膜成熟度相关联; 以及

[0096] c) 当所述子宫内膜成熟时, 将胚胎引入雌性哺乳动物的子宫。

[0097] 或者, 根据本方面, 对雌性哺乳动物进行体外授精的方法包括以下步骤:

[0098] a) 从所述雌性哺乳动物获得子宫内膜流体样品;

[0099] b) 测定所述雌性哺乳动物的所述子宫内膜流体样品中 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平;

[0100] c) 用获取自所述雌性哺乳动物月经周期的多个阶段的子宫内膜流体样品来重复步骤 a) 和 b);

[0101] d) 将步骤 c) 的一个或多个子宫内膜流体样品中所述前列腺素 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平与子宫内膜成熟度相关联; 以及

[0102] e) 当所述子宫内膜成熟时, 将胚胎引入雌性哺乳动物的子宫。

[0103] 如上所述获得的所研究雌性哺乳动物子宫内膜流体样品中的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平可以使用有关本发明方法 [1] 的内容中讨论的任何合适方法来测定。

[0104] 根据本方法, 如上所述从所研究雌性哺乳动物月经周期的多个阶段获得子宫内膜流体样品, 一旦子宫内膜成熟, 将胚胎引入到所述雌性哺乳动物的子宫。

[0105] 在一个具体的实施方案中, 所述雌性哺乳动物是女人, 如进行 IVF 过程的女人。

[0106] 本发明还涉及实施本发明方法的试剂盒。“试剂盒”是指至少包含 PGE2 的参照脂质或 PGF2 α 的参照脂质的任何制品 (如包装或容器)。试剂盒可作为实施本发明方法的单位来推广、分配或出售。此外, 试剂盒可包含描述试剂盒的包装内装物和使用说明。在一个实施方案中, 所述说明描述检测子宫内膜对胚胎植入之接受性、或选择胚胎植入窗口、或评价生育力状态、或评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎、或监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度、或对雌性哺乳动物进行体外受精的方法。

[0107] 除了所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的参照脂质 (如已知纯度和浓度的 PGE2 和 / 或 PGF2 α 脂质), 试剂盒还可包含一种或更多种试剂, 所述试剂根据在 PGE2 和 / 或 PGF2 α 水平的测定技术中的功能选择, ——本领域技术人员已知所实施的具体脂质水平测定技术需要的试剂。

[0108] 所述试剂盒可用于: 检测雌性哺乳动物中子宫内膜对胚胎植入的接受性, 或选择

雌性哺乳动物的胚胎植入窗口,或评价雌性哺乳动物的生育力状态,或评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎的条件下,或监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度,或对雌性哺乳动物进行体外受精。因此,所述试剂盒可用于准确地分析评价样品,以预测在胚胎转移过程前几小时的子宫内膜接受性。前述的试剂盒的用途构成本发明的另一方面。

[0109] 因此,如前面所提到的,基于植入窗口期间子宫内膜流体中脂质谱的鉴定,本发明提供了数种非侵入性诊断方法以及实施所述方法的试剂盒。在一个具体的实施方案中,所述脂质谱包含 PGE2 和 / 或 PGF2 α 。

[0110] 本发明提供的方法预计会将目前植入率增加至少 5%,优选至少 10%。通过提供获得成功的机会增加的更好的医疗帮助,植入率的提高对医学界和患者都有益。通过增加怀孕率,极大百分比的目前必须通过第二轮治疗的患者将不再需要第二轮治疗,从而避免可能存在的焦虑和经济问题。

[0111] 此外,本发明提供的方法和试剂盒将提供给医学界强大的诊断工具,其在 IVF 治疗中的胚胎转移前诊断子宫内膜接受性。所述方法将取消侵入方法的必要性,并且通过仅在胚胎转移过程前几个小时提供子宫内膜接受性的实时生物化学结果来改善目前的植入率。因此患者不需要进行令人不快的生物活检收集过程。

[0112] 本发明还提供了能提高子宫内膜接受性的化合物的鉴定方法以及避孕剂的鉴定方法。

[0113] 因此,另一方面,本发明还提供了能提高子宫内膜接受性的化合物的鉴定方法,其包括:

[0114] (i) 使产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的细胞与被检测的化合物相接触,以及

[0115] (ii) 测定所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平,

[0116] 其中如果所述化合物使所述细胞产生的所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 增加,则所述候选化合物适合提高子宫内膜接受性。

[0117] 另一方面,本发明还提供了避孕剂的鉴定方法,其包括:

[0118] (i) 使产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的细胞与被检验的化合物(候选化合物)相接触,以及

[0119] (ii) 测定所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平,

[0120] 其中如果所述化合物使所述细胞产生的所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 减少,则所述候选化合物适合作为避孕剂。

[0121] 在这两种情况下,在鉴定能提高子宫内膜接受性的化合物或鉴定避孕剂的所述方法中检测的候选化合物实际上可以是任何化学化合物,包括低分子量化合物和大分子,如蛋白质、核酸、脂质等。本文所用表述“接触”包括将候选化合物引入所述产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的细胞的任何可能方式。

[0122] 尽管几乎所有产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的细胞都可用于所述方法的实施中(用于鉴定能提高子宫内膜接受性的化合物或用于鉴定避孕剂),在一个具体的实施方案中,所述产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的细胞可以是子宫内膜上皮细胞[上皮子宫内膜细胞],优选人上皮子宫内膜细胞;在另一具体的实施方案中,所述产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的细胞是来自子宫内膜的细胞系,优选人子宫内膜细胞系,所述细胞具有产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的能力。在这种情况下,所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平可通过任何前述技术在培养基中测定。或

者,所述产生 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的细胞也可以存在于动物模型中;然后,所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 的水平可通过任何前述技术在来自所述动物模型的子宫内膜流体样品中测定。

[0123] 所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 产生的增加可指示候选化合物潜在地适于提高或增加子宫内膜对胚胎植入之接受性。类似地,所述 PGE2 和 / 或 PGF2 α 产生的减少可指示候选化合物可用作避孕剂,因为所述化合物降低子宫内膜对胚胎植入之接受性。

[0124] 另一方面,本发明涉及脂质组合物,其中所述脂质组合物获得自所述雌性哺乳动物的胚胎植入窗口期间的雌性哺乳动物子宫内膜流体样品。所述脂质组合物可用于确定子宫内膜对胚胎植入之接受性。

[0125] 在一个具体的实施方案中,所述雌性哺乳动物是女人。

[0126] 此外,在一个具体的实施方案中,所述脂质组合物包括选自以下脂质的脂质:N-花生四烯酰乙醇胺(AEA)、N-棕榈酰乙醇胺(PEA)、N-油酰乙醇胺(OEA)、2-花生四烯酰甘油(2-AG)、N-硬脂酰乙醇胺(SEA)、N-亚油酰乙醇胺(LEA)、前列腺素 E2(PGE2)、前列腺素 F2 α (PGF2 α)、前列腺素 F1 α (PGF1 α) 及其组合。在一个优选的实施方案中,所述脂质组合物包括选自 PGE2、PGF2 α 及其组合的前列腺素,因为该特异性脂质的水平在与植入窗口重合的女人月经周期第 19-21 天之间的子宫内膜流体样品中显著升高。

[0127] 因此,在另一方面,本发明涉及选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口的方法,其包括以下步骤:

[0128] a) 提供来自所述雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品;

[0129] b) 从所述样品中收集脂质组谱;以及

[0130] c) 将所述收集的脂质组谱与雌性哺乳动物的生育力状态相关联。

[0131] 来自所研究雌性哺乳动物的子宫内膜流体样品可通过如上所述的常规方法获得。

[0132] 从所研究雌性哺乳动物子宫内膜流体的所述样品中获得脂质组谱(lipidomic profile)可通过多种化学和高分辨率分析技术实现。合适的分析技术包括但不限于质谱(MS)和核磁共振波谱(NRS)。任何能解析(re-solving)各脂质或脂质类别并提供其结构信息的高分辨率技术可用于从所述生物样品中收集脂质谱。用质谱(MS)收集脂质组谱是本发明的一个实施方案。MS仪器可与高性能分离方法(如HPLC)连接。

[0133] 用于收集脂质组谱的分析技术应该能定量或测量各脂质或脂质类别的确切量或至少相对量。将收集的脂质谱与对参照脂质组生物标志物收集的脂质谱相比较时,使用所述各脂质或脂质类别的量。在一个具体的实施方案中,脂质水平用如下讨论的LC/MS/MS测定。

[0134] 参照脂质组生物标志物可用所研究的同一雌性哺乳动物建立,或者它可以来自一般性的群体。如果用同一雌性哺乳动物创建参照脂质组生物标志物,那么可以在所述雌性哺乳动物的非排卵期收集样品。然后,从该雌性哺乳动物的第一脂质谱中创建参照脂质组生物标志物。该脂质组生物标志物用作基准线或起点。可以在月经周期期间收集一系列脂质组谱。之后将这些脂质组谱与先前创建的参照脂质组生物标志物比较。

[0135] 也可以从雌性哺乳动物的一般性群体中创建参照脂质组生物标志物。如果使用一般性群体,那么将所述一般性群体的几个脂质谱组合,而脂质组生物标志物从该组合创建。

[0136] 在一个具体的实施方案中,参照脂质组生物标志物是选自以下的一种或更多种脂质:N-花生四烯酰乙醇胺(AEA)、N-棕榈酰乙醇胺(PEA)、N-油酰乙醇胺(OEA)、2-花生四

烯酰甘油 (2-AG)、N-硬脂酰乙醇胺 (SEA)、N-亚油酰乙醇胺 (LEA)、前列腺素 E2 (PGE2)、前列腺素 F2 α (PGF2 α)、前列腺素 F1 α (PGF1 α) 及其组合。在一个优选的实施方案中,所述脂质谱包括选自 PGE2、PGF2 α 及其组合的前列腺素,因为该特异性脂质的水平在与植入窗口重合的女人月经周期第 19-21 天之间的子宫内膜流体样品中显著升高。

[0137] 本发明的另一方面是试剂盒,其包含参照脂质以形成脂质组参照生物标志物。所述试剂盒可作为实施上述方法的单位来推广、分配或出售。此外,试剂盒可包含描述试剂盒的包装内装物和使用说明。在一个实施方案中,所述说明描述检测子宫内膜对胚胎植入之接受性、或选择胚胎植入窗口、或评价生育力状态、或评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎、或监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度、或对雌性哺乳动物进行体外受精的方法。

[0138] 除了形成脂质组参照生物标志物的所述参照脂质外,试剂盒还可包含一种或更多种试剂,所述试剂根据其在所选择的测定待分析子宫内膜流体样品中之脂质水平的测定技术中的功能选择,——本领域技术人员已知特定的所述脂质的水平测定技术的实施所需要的试剂。

[0139] 所述试剂盒可用于:检测雌性哺乳动物中子宫内膜对胚胎植入的接受性,或选择雌性哺乳动物的胚胎植入窗口,或评价雌性哺乳动物的生育力状态,或评价雌性哺乳动物所处状态是否适合接受和植入胚胎,或监测雌性哺乳动物的子宫内膜成熟度,或对雌性哺乳动物进行体外受精。因此,所述试剂盒可用于准确地分析评价样品,以预测在胚胎转移过程前几小时的子宫内膜接受性。前述的试剂盒的用途构成本发明的另一方面。

[0140] 以下实施例用于说明本发明,但并不限制本发明的范围。

[0141] 实施例 1

[0142] PGE2 和 PGF2 α 浓度在植入窗口期间明显增加

[0143] 1.1 材料

[0144] 用于质谱研究的 HPLC 级甲醇和乙腈购自 VWR international (Plainview, NY)。HPLC 级水、质谱 /HPLC 级醋酸、甲酸和醋酸铵购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

[0145] 1.2 方法

[0146] 设计。本发明人在获得签署的知情同意后对 39 名健康女人供体进行单盲研究。所有样品在女人的自然月经周期期间收集;分析之前对子宫内膜抽吸物编识别号并用标准方法保存。

[0147] 子宫内膜分泌物的抽吸过程。患者以截石位摆放,插入窥镜后清洗子宫颈。通过子宫颈将易弯的空导管 (Wallace, S mith Medical International) 轻轻推入 6cm 至子宫腔,并逐步用 10ml 注射器实施吸取。为防止移除导管时被宫颈粘液污染,胚胎转移导管的外套被从外部宫颈推进到 4cm 的深度,接着实施吸取。在抽出子宫内膜分泌物之前吸出宫颈粘液作为患者的内对照,以验证是否抽吸物代表的是宫颈粘液而不是子宫内膜分泌物。

[0148] 样品分析。通过液相色谱 (LC) 与串联质谱 (MS) 组合来测定子宫内膜流体提取物中的脂质。将 HPLC 级水加入样品中制成 30% 的有机溶液。如之前所述 [Bradshaw, HB., Rimmerman, N., Krey, JF 和 Walker, JM. 2006. Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 291 :R349-358], 在 C18 固相萃取柱上部分纯化脂质。简言

之,用 5ml 甲醇和 2.5ml 水处理每 500mg 层析柱,接着装入水 / 上清溶液。接着用 2ml 水和 1.5ml 55% 甲醇清洗柱。用 1.5ml 甲醇洗脱化合物。在质谱分析之前用最高速度的旋涡处理洗脱液。

[0149] 串联质谱仪包括三重四极杆、离子阱和四极杆 / 飞行时间仪器等。这些仪器通常使用四极杆技术,根据化合物在碰撞激活 (片段化) 前的分子量和对片段化成分的质量分析来分离化合物。这意味着该混合物必须纯化到这样的程度,即施加到质谱仪的样品没有其他相同质量的化合物。通常这可通过从组织中进行液 - 液萃取然后进行固相萃取方法来完成。四极杆技术提供约 1amu 的分辨率 ; 通过使用允许更精细分辨率的 TOF/TOF 仪器来改进质谱仪的分离。

[0150] 具体地,分析物的快速分离使用 10 μ L 注射 (Agilent 1100 series autosampler, Wilmington, DE) 在 Zorbax eclipse XDB 2.1 $\times$ 50mm 反相柱上进行。在一对 Shimadzu (Columbia, Maryland) 10AdVP 泵的压力下进行梯度洗脱 (200 μ L/ 分钟)。用配有电喷雾电离源的 Applied Biosystems/MDS Sciex (Foster City, CA) API 3000 三重四极杆质谱仪进行质谱分析。用 LC/MS/MS 系统上的多反应监测 (MRM) 来分析每种化合物的水平。

[0151] 质谱定量。用 Analyst 软件 (Applied Biosystems-MDS Sciex; Framingham MA) 完成分析物的定量,其通过对已知浓度的合成标准的线性回归进行 power 拟合来定量样品中分析物的量。统计学差异用 ANOVA 的 post-hoc Fisher' s LSD 来确定,平均数用 95% 置信区间 (SPSS software, Chicago, IL)。

[0152] 1.3 结果

[0153] 在两个单盲独立试验中分析整个月经周期获得的共 39 个子宫内膜流体样品 [组 I (0-8 天) (N = 8) ; 组 II (9-14 天) (n = 8) ; 组 III (15-18 天) (n = 8) ; 组 IV (19-23 天) (n = 8) 和组 V (24-30 天) (n = 7)] 中的脂质浓度变化。

[0154] 在第一个实验 (n = 13) 中,本发明人发现两种特异脂质 (PGE2 和 PGF2 α) 的浓度在与植入窗口重合的月经周期第 19-21 天之间有显著增加。样品中鉴定的其余脂质 [N- 花生四烯酰乙醇胺、N- 棕榈酰乙醇胺、N- 油酰乙醇胺、2- 花生四烯酰甘油、N- 硬脂酰乙醇胺、N- 亚油酰乙醇胺、PGF1 α] 在月经周期期间没有显著的变化 (图 1)。

[0155] 第二个实验 (n = 26) 证实了在第一个实验中报道的相同脂质的峰。两个实验 (n = 39) 组合的结果表明在临床植入窗口期间每种脂质的浓度分别有 2 倍和 20 倍的增长峰 (图 2)。

[0156] 这些结果表明, PGE2 和 / 或 PGF2 α 可以是人植入窗口期间子宫内膜接受性的重要生物标志物。

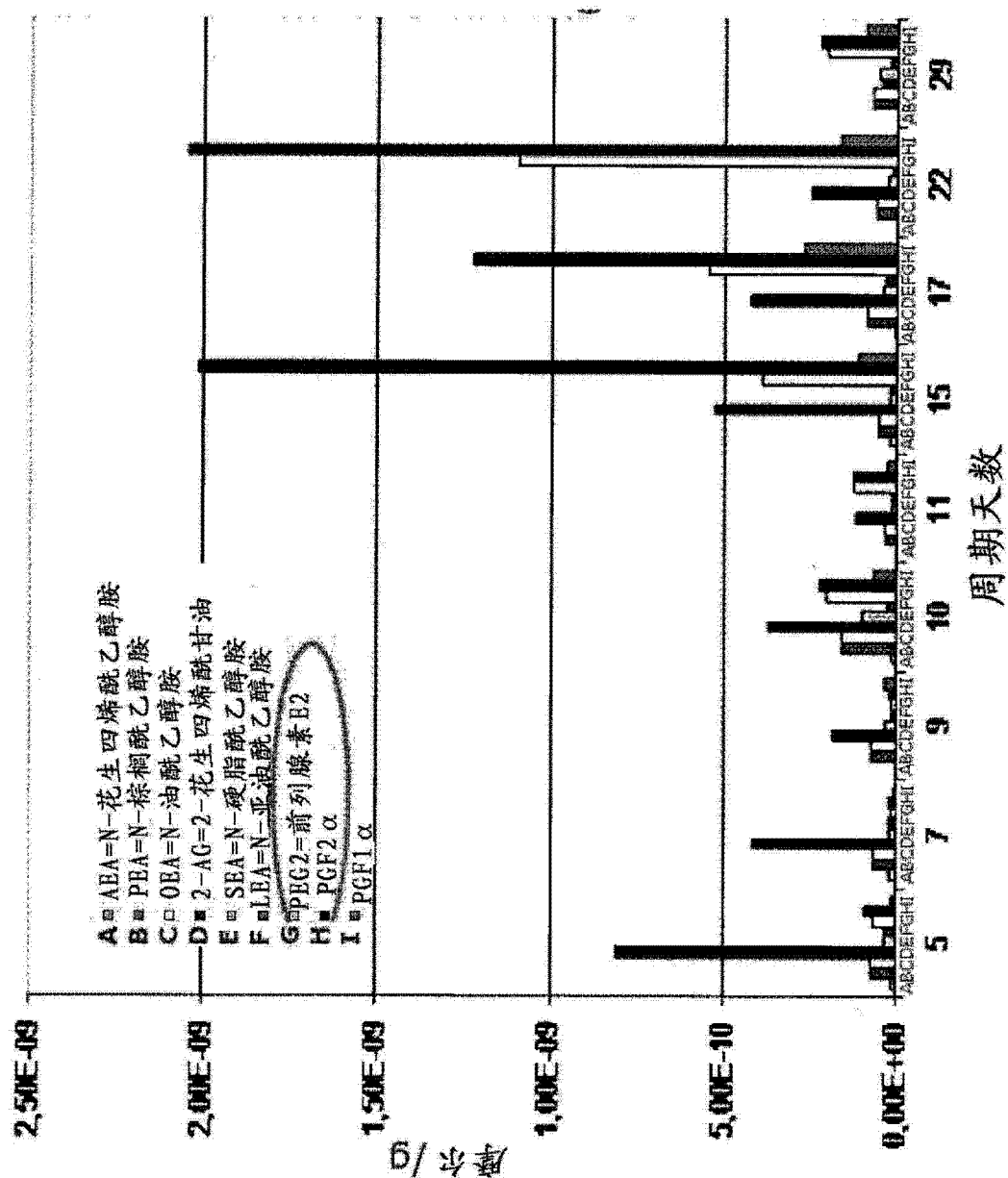


图 1

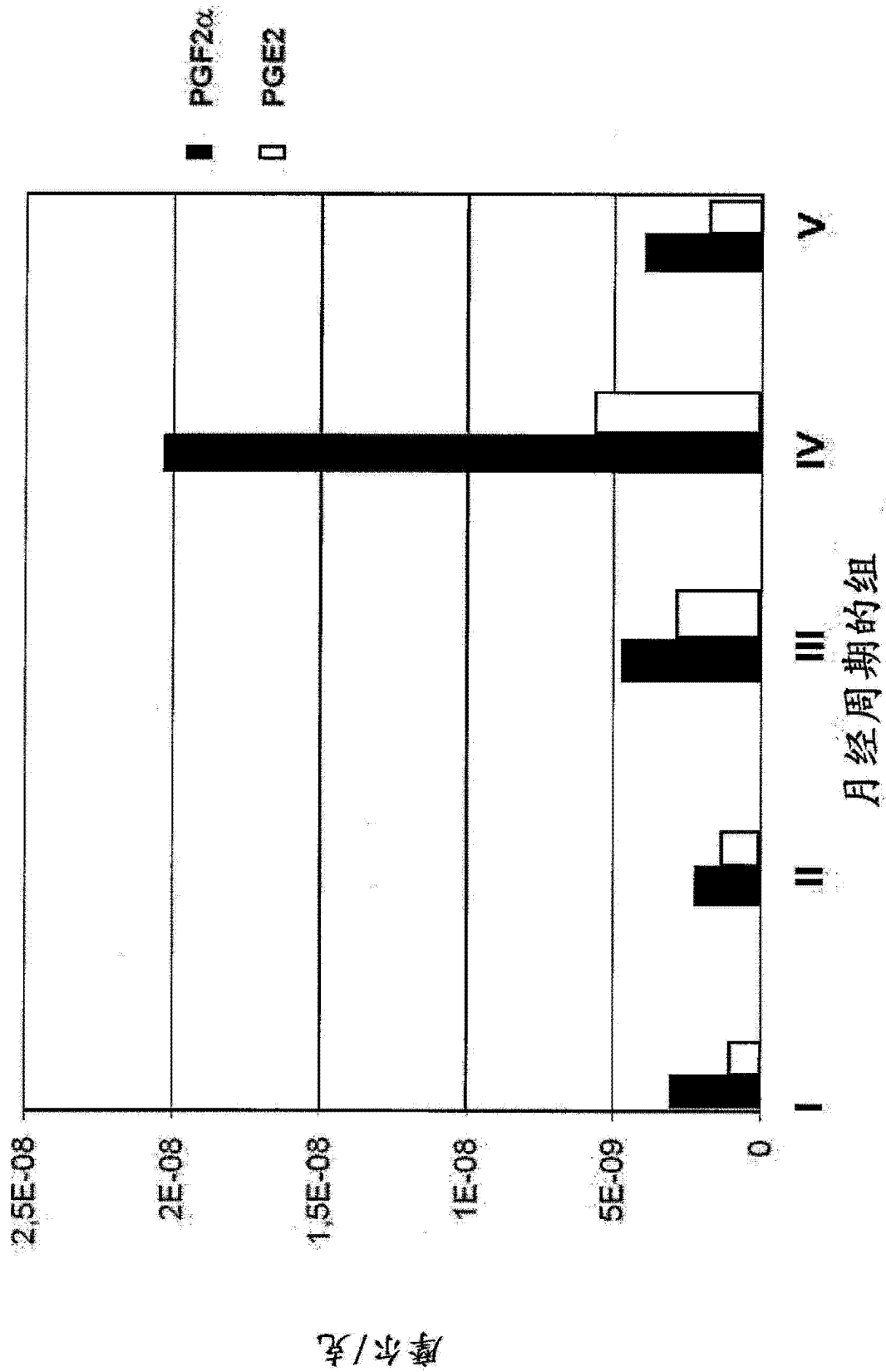


图 2