



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1981196 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 03

(21) 申请号 200580015895. 5

(22) 申请日 2005. 05. 18

(30) 优先权数据

60/572, 519 2004. 05. 19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006. 11. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2005/000326 2005. 05. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02005/111626 EN 2005. 11. 24

(73) 专利权人 哥本哈根大学

地址 丹麦哥本哈根

专利权人 国家血清研究中心

哈罗德伍德医院

(72) 发明人 乌拉·M·韦威尔

迈克尔·克里斯蒂安森

卡米拉·弗勒利克 珍妮·莱加德

本特·诺加德-彼泽森

凯文·斯潘塞

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 钟晶

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1364772 A, 2002. 08. 21, 全文.

WO 03089627 A1, 2003. 10. 30, 全文.

Laigaard Jennie et al.. ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. 《Prenatal Diagnosis》. 2003, 第 23 卷 (第 13 期), 1086-1091.

审查员 杨冀川

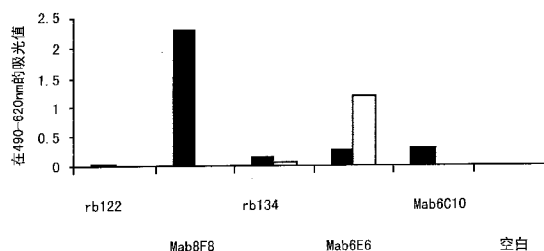
权利要求书 1 页 说明书 37 页 附图 39 页

(54) 发明名称

ADAM12, 一种细胞功能异常的新标记物

(57) 摘要

本发明提供了用于指示提供细胞功能异常的方法, 分析法和试剂盒, 令人惊奇地发现, 血清 ADAM12 浓度变化作为预测细胞功能异常带来的临床结果、并发症和死亡率的预后工具是有用的。本发明人描述了作为细胞功能异常全面标记物的 ADAM12, 同时本发明人第一次证明了, ADAM12 是胚胎和胎盘发育、功能的重要指示剂, 并且 ADAM12 可以反映疾病的存在, 分类或进展。本发明人开发了一种酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 和一种时间分辨荧光免疫分析法, 用于量化血清中的 ADAM12。



1. ADAM12 在制备用于筛查胎儿染色体紊乱的标记物中的应用,所述筛查的方法包括以下步骤:

(a) 通过检测下列 1) ~ 3) 确定从被测个体获得的样品中的 ADAM12 的水平:

1) ADAM12 多肽和 / 或

2) 编码 ADAM12 表达的多聚核苷酸,和 / 或

3) 特异的 ADAM12 蛋白酶活性,

其中,所述样品选自由血液、血清和血浆所组成的组;

(b) 进行所述水平相对于孕龄的标准化

(c) 将所述水平与参照水平进行比较;

(d) 鉴定是否该水平与所述参照水平不同,并且

如果该水平与参照水平不同,则评估是否所述胎儿具有提高的染色体紊乱的风险,其中所述染色体紊乱选自由 13 三体症、18 三体症、特纳氏综合症和非特纳氏性染色体异常组成的组。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,ADAM12 被评定为早孕期标记物。

3. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,ADAM12 被评定为中孕期标记物。

4. 根据权利要求 1 ~ 3 的任一项所述的应用,其中,所述样品是在孕龄 11 周之前和 / 或孕龄 12 周之后获得的。

5. 根据权利要求 1 ~ 3 的任一项所述的应用,其中,ADAM12 水平与至少一个选自以下组的标记物的数值结合,该组由甲胎蛋白、游离雌三醇、人绒毛膜促性腺激素、人绒毛膜促性腺激素游离 α 亚单位、人绒毛膜促性腺激素游离 β 亚单位、 β 核 hCG、过糖基化 hCG、胎盘生长激素、二聚抑制素 -A 的抑制素、妊娠相关的血浆蛋白 -A、PAPP-A 与 ProMBP 复合体、ProMBP、ProMBP 与血管紧张素和 / 或补充因子的复合体和剪切产物、Schwangerschaftsprotein 1、癌抗原 125、前列腺特异性抗原、白细胞酶、胚胎 DNA、胚胎 RNA、胚胎细胞、干细胞、雌二醇、超声标记物、颈部半透明、腿骨长度、缺少鼻骨、肠腔高回声、心脏中的强回声点、脉络膜囊肿、肾盂积水、胎儿畸形、类固醇、肽类、趋化因子、白介素、肿瘤坏死因子、转化生长因子 α 和 β 、急性期反应物、C 反应蛋白、纤连蛋白、母体或胚胎的单核苷酸多态性组成。

6. 根据权利要求 1 ~ 3 的任一项所述的应用,其中,计算不依赖孕龄的 ADAM12 值用于风险评估。

7. 根据权利要求 1 ~ 3 的任一项所述的应用,其中,不依赖孕龄的 ADAM12 与生物统计学、血清学或临床信息结合用于获得患胎儿染色体紊乱的风险。

ADAM12, 一种细胞功能异常的新标记物

技术领域

[0001] 本发明的整体发明意图是涉及, 一种通过确定 ADAM12 水平, 筛查个体中细胞功能异常的方法。

[0002] 具体的, 本发明涉及提供用于筛查妊娠和非妊娠个体中异常的方法, 其基于检测来自所述个体的生物样品的 ADAM12。具体的, 本发明描述了用于筛查妊娠和 / 或非妊娠个体中改变的局部增值状态的方法, 其包括检测 ADAM12 水平。

背景技术

[0003] 细胞功能异常是许多与生活方式和遗传有关的疾病中的普遍问题, 例如癌症和许多已知的染色体异常。

[0004] 唐氏综合症 (Down syndrome), 也称为 21 三体症, 是多种脑力发育迟缓的最普遍的先天性原因, 其为存在额外的 21 号染色体而导致的细胞功能异常的结果。以前, 胎儿的唐氏综合症可以通过包括羊水诊断或绒毛膜绒毛取样和染色体分型的诊断程序来确定。

[0005] 这些诊断程序是侵入性的并且对母体和胎儿都有风险。由于这个以及其它一些原因, 羊水诊断或绒毛膜绒毛取样和染色体分型不能在整个妊娠期间常规地进行。与此相反, 当对于妊娠的风险保证进行侵入性诊断程序的风险时, 可以利用一种或多种筛查方法进行确定。

[0006] 例如唐氏综合症的发生随着母亲年龄的增高而显著增高。以前, 唐氏综合症的产前检测集中在 35 岁以上的妊娠妇女, 在这个年龄唐氏综合症的风险接近或超过 (母亲年龄 >40 岁) 用来检测胎儿唐氏综合症的诊断程序的风险。多种其他胎儿染色体紊乱的发生, 例如特纳氏综合症和三倍体不依赖于母亲的年龄。因此, 产前筛查 21 三体症, 18 三体症和 13 三体症的标准方法涉及基于母亲的年龄选择妇女进行诊断性羊水诊断。但是, 年龄并不是充分的筛查依据, 因为, 只有约 20% 的唐氏综合症妊娠能够通过最具风险的妇女的 5% (也就是年龄在 35 岁以上的妇女) 进行羊水诊断和染色体分型来检测。并且, 因为在实际的临床实践中, 只有约一半的 35 岁以上的妇女进行了羊水诊断和染色体分型, 不到 10% 的唐氏综合症妊娠得到产前诊断。

[0007] 1984 年, 发现了降低的母血甲胎蛋白 (AFP) 与胎儿唐氏综合症之间的相关性。降低的母血 AFP 与胎儿唐氏综合症之间的相关性提供了在年轻的显然未受影响的家庭中使用非侵入性血液筛查试验的机会, 在所述家庭中发生了约 80% 的唐氏综合症。

[0008] 另一个筛查方法包括检测母血中游离雌三醇 (UE) 的水平。后来发现了完整 HCG 分子和 HCG 的 α 亚单位 (HCG 包括两个亚单位) 母血水平的提高与胎儿唐氏综合症之间的相关性。

[0009] 自从二十世纪 90 年代早期, 已经使用多标记物血液检验来筛查例如唐氏综合症。该检验的普遍的形式是三标记物三重检验 (triple test)。该三重筛查 (triple screen) 测量妊娠妇女血清中的 AFP、人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和游离雌三醇 (UE₃)。

[0010] 象三重检验这样的产前筛查能够用于减少对羊水诊断的需要或提高相同量的羊

水的遗传缺陷的检测。该三重筛查结合来自血清的三种标记物的分析来减少导致进行不必要的侵入程序的假阳性结果和导致严重遗传缺陷（例如 21 三体症）未被检出。

[0011] 在 35 岁以下的妇女中，双重筛查（AFP 和 HCG）能够在中孕期期间检测出约一半的唐氏综合症病例和大多数其他染色体缺陷。三重筛查（AFP、HCG 和 UE_3 ）使检出率提高了 5-10%，并进一步提高许多其他严重染色体缺陷的检出，因此降低了假阳性的量。

[0012] 但是，这样的比率意味着，双重和三重筛查依然没有检出很大数量的唐氏综合症和其他被妊娠影响的非整倍体，并且该检验仅限于中孕期。

[0013] 尽管三重筛查具有暗示的 15 至 20 孕周的筛查期，但这样的筛查已经被推荐在 16-18 孕周来以使脊柱裂检测时限最大化（Canick 和 Knight）。

[0014] 1992 年的一项对于仅 AFP 或多项分析的产前的母体血清筛查的调查报道，在第 13 周或更早的妊娠期几乎没有进行筛查（Palomaki 等人）。

[0015] 因此这些筛查存在另外的问题，即一旦预测到遗传缺陷的风险就要实行羊水诊断或其他侵入性产前确诊程序历来诊断遗传缺陷（例如唐氏综合症），正是在妊娠晚期，妊娠终止对于母亲在身体和精神上可能更加痛苦，并且能够利用的创伤性流产术例如真空吸刮术是更少的。最近，已经证明，在早孕期利用妊娠相关血浆蛋白 A（PAPP-A）和游离 β 人绒毛膜促性腺激素（ β HCG）的血清学标记物复合物和超声标记的颈部半透明（结合早孕期筛查）来筛查染色体疾病的方法，在 8-14 周发挥作用，其唐氏综合症检出率为大约 80% -90%，假阳性率为 3-5%（Bindra 等人，2002）。

[0016] 理论上，预测在相同妊娠的早孕期和中孕期检验的联合使用将是最有效的筛查，其具有 >90% 的唐氏综合症检出率以及大约 1% 的假阳性率（Wald 等人，1999）。

[0017] 但是，为了提高检出率和 / 或降低假阳性率，需要可以补充或替换现有筛查标记物的新标记物。

[0018] 人工筛查状态和不必要的相反结果的限制，具有潜在危害和价格昂贵的侵入性诊断程序，例如羊水诊断或绒毛膜取样，已经导致对于产前筛查唐氏综合症和非整倍体的更有识别能力的标记物的研究。

[0019] 随着胎儿疾病和不良妊娠的出现，例如妊娠早期的唐氏综合症和其他染色体疾病，已经开始研究多种生物化学标记物。已经常规使用的其他标记物为，所谓妊娠相关血浆蛋白 -A（PAPP-A）的 IGF 依赖型 IGFBP-4 和非 IGF 依赖型 IGFBP-5 蛋白酶，其还表现出作为生长发育迟缓和早产标记物的潜在的临床重要性。

[0020] 尽管这些筛查方法确实检测出胎儿唐氏综合症，但是仍然需要和期待一种方法，其能够检测出更多的胎儿唐氏综合症病例。因此，本发明描述了产前诊断领域的显著进步。

[0021] 已经通过免疫印迹，在妊娠血清中检测到 ADAM12，而在非妊娠血清中则没有（Shi 等人合，Loechel 等人），并且 ADAM12 的 mRNA 在胎盘中也特别丰富（Gilpin 等人）。

[0022] 在胎盘中，ADAM12 由滋养层产生。ADAM12 是一种去整合素和金属蛋白酶，其在乳癌和结肠癌以及它们的肝转移中被上调（Iba 等人 1999，Le Pabic 等人 2003），并且 ADAM12 的尿水平与乳癌中的疾病状态和发展有关（Roy 等人 2004）。

[0023] 本发明人在 2003 年公开了，ADAM12 是早孕期唐氏综合症母体血清标记物（Laigaard 等人 2003），并在 2005 年公开了母体血清中 ADAM12-S 水平是胎儿早孕期 18 三体症标记物（Laigaard 等人 2005）。

[0024] EP1524523 记载,在先兆子痫患者胎盘中,ADAM12 的表达、特殊转录受到强烈上调。但是,EP1524523 没有记载血清 ADAM12 的浓度变化,特别是没有记载其水平与孕龄的关系。

[0025] 如果 ADAM12 浓度没有进行关于孕龄的标准化 – 即转化成不依赖孕龄的值 – 例如通过母体血清中检测到的 ADAM12 浓度除以获得该样品的特殊孕龄的中值得到的值 (中值倍数,multiple of median-MoM),那么 ADAM12 浓度值的个体间差异将降低标记物的识别能力。

发明概要

[0026] 本发明提供了用于指示提供细胞功能异常的方法、分析法和试剂盒。令人惊奇地发现,血清 ADAM12 浓度变化作为预测细胞功能异常带来的临床结果、并发症和死亡率的预后工具是有用的。

[0027] 本发明人描述了作为细胞功能异常全面标记物的 ADAM12,同时本发明人第一次证明了,ADAM12 是胚胎和胎盘发育、功能的重要指示剂,并且 ADAM12 可以反映疾病的存在,分类或进展。

[0028] 本发明人开发了一种酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 和一种时间分辨荧光免疫分析法,用于量化血清中的 ADAM12。

[0029] 本申请在三项研究中证明,样品样品样品样品 ADAM12 减少了早孕期唐氏综合症和 18 三体症母体血清并终止了中孕期唐氏综合症妊娠,在三项研究中第一项包括来自早孕期唐氏综合症妊娠的 18 个母体血清样品,第二项包括来自早孕期唐氏综合症妊娠的 226 个早孕期母体血清样品和 89 个中孕期唐氏综合症妊娠母体血清样品,第三项包括来自早孕期 18 三体症妊娠的 10 个母体血清样品。因此 ADAM12 也许可以用作胎儿疾病的母体血清风险标记物。另外,在来自发生先兆子痫孕妇的早孕期妊娠的 160 个母体血清样品中,证明母体血清中 ADAM12 浓度减少,并且 ADAM12 可以用作病理性妊娠的不良结果的标记物。因此,本发明的一个目的是提供一种对现有标记物试验的改进,其表现出假阳性率降低或染色体疾病或不良妊娠结果的检出率提高。

[0030] 发明的详细描述

[0031] 细胞相互作用中的 ADAM12

[0032] ADAM12 是一种具有细胞黏附、金属蛋白酶和信号传导活性的多结构域蛋白质。在发育、再生和疾病期间的多个组织部分,ADAM12 具有严格的时空表达模式。

[0033] 在此,本发明人证明了,ADAM12 与增加肿瘤细胞侵染行为的显型有关并诱导其发生。

[0034] 因此,使用乳癌小鼠模型,本发明人证明了,表达 ADAM12 的小鼠比不表达 ADAM12 的小鼠更快地出现肿瘤。ADAM12 表达型肿瘤的肿瘤负荷大于非 ADAM12 表达型,并因此有更高的肿瘤细胞侵染行为。

[0035] 重要的是,本发明人证明了,在乳癌小鼠模型中,ADAM12 诱导产生更具侵染性的成长模式。在下述例子中,在促进乳腺中 ADAM12 表达的 MMTV 启动子 (小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV) 长末端重复 (LTR) 启动子 / 增强子) 的作用下,产生了 ADAM12 转基因小鼠。

[0036] 通过使用肿瘤倾向的小鼠 MMTV-PyMT 与这些 ADAM12 小鼠进行交配,产生

了一类新品种的小鼠:MMTV-PyMT-ADAM12。将 MMTV-PyMT 小鼠胚胎中乳瘤的发展与 MMTV-PyMT-ADAM12 小鼠进行比较。

[0037] 绝对和相对的肿瘤负荷被提高(分别为:g 肿瘤组织和 g 肿瘤组织/小鼠体重),无肿瘤时间确定为肿瘤快能够被触诊观察到之前的时间。本发明人发现,与 MMTV-PyMT 小鼠胚胎相比,MMTV-PyMT-ADAM12 小鼠明显有更具侵染性的过程。

[0038] 在分子水平上,本发明人发现,依据细胞类型,ADAM12 降低细胞增殖和使细胞对细胞凋亡(非恶性细胞)敏感,但重要的是对于恶性肿瘤细胞则没有。

[0039] 因此,依据细胞环境和暴露的抗原决定簇,ADAM12 似乎引导细胞表面细胞黏附受体功能的微妙平衡,这对于癌细胞的行为是十分重要的。

[0040] 表达 ADAM12 的乳癌细胞对细胞凋亡有抗性,而被诱导表达 ADAM12 的非致癌的“正常”细胞是敏感的。

[0041] 本发明人以前已经表示,“正常”基质细胞(3T3-L1)借助 ADAM12 的表达,与它们的对照细胞相比,对细胞凋亡更敏感(Kawaguchi 等人 2003)。

[0042] 接着,他们测验了这样的“正常”细胞和恶性乳癌细胞之间的差异。令人惊讶的是,他们发现表达 ADAM12 的恶性 MCF-7 乳癌细胞对细胞凋亡有抗性。这暗示我们已知过表达 ADAM12 的肿瘤细胞优于正常细胞,并且因此进一步表明 ADAM12 对于侵染性的显型是有贡献的。

[0043] 产生表达 ADAM12 的 MCF-7 细胞

[0044] 将缺少胞质端的全长 ADAM12(ADAM12- Δ cyt)克隆至逆转录病毒四环素应答质粒(pRevTRE)的 Xho I 位点。将得到的质粒转染入 293-10A1 细胞的包装细胞系。在 8 μ g/mL 聚凝胺(polybrene)存在下,用消毒过滤的含有 293-10A1 包装细胞系上清液的逆转录病毒转导 MCF-7 细胞。在 200 μ g/mL 匀霉素的存在下选择被转导的细胞。所建立的细胞系被常规地保存在 DMEM、10% FBS-tet、100 μ g/mL G418、100 μ g/mL 匀霉素、100ng/mL 强力霉素和青霉素/链霉素中。从生长培养基中去除强力霉素,诱导固定的被转导的 ADAM12- Δ cyt 的表达,并进而诱导 ADAM12 蛋白质。

[0045] 乳癌细胞对细胞凋亡敏感性的检测

[0046] 心肌细胞凋亡指数的测量结果为,结合使用 5 μ M 环己酰亚胺和 100ng/mL TNF α 处理 48 小时和 UVC 照射(60J/m²)24 小时后,检测在表达 ADAM12- Δ cyt 的培养菌和对照 MCF-7 中的具有浓缩细胞核的 Hoescht- 转染细胞的百分比。估计具有皱缩细胞核的细胞的百分比。本发明人发现,在此条件下少于 5% 的 MCF-7 细胞经历细胞凋亡,并且其不随 TNF α /UV 处理而改变。

[0047] 细胞功能异常

[0048] 因此本发明人提出,ADAM12 是一种用于细胞功能异常的全面标记物,因此一方面,本发明涉及用于筛查个体中细胞功能异常的方法,所述方法,其包括以下步骤:

[0049] a) 提供来自个体的身体样品

[0050] b) 确定所述样品中 ADAM12 水平/数值,其为通过检测

[0051] 1) ADAM12 多肽和/或

[0052] 2) 编码 ADAM12 的多聚核苷酸,和/或

[0053] 3) 特定的 ADAM12 蛋白酶活性,优选通过检测胰岛素样生长因子结合蛋白

3 (IGFBP-3) 及其衍生物,或其他适宜的 ADAM12 底物的剪切,包括它的脱落酶 (shedase) 活性;

[0054] c) 将所述水平 / 数值与参照水平 / 预先确定的数值进行比较;

[0055] d) 鉴定是否该水平 / 数值与所述参照水平 / 预先确定的数值不同,并且

[0056] 如果该水平与参照水平不同,则评估是否所述个体细胞具有提高的功能异常的风险。

[0057] 本文中,术语“细胞功能异常”涉及在细胞水平上改变的细胞裂解、细胞存活、细胞粘着、细胞迁移、细胞骨架形成、细胞外基质的组装和细胞分化。这些改变是许多病理生理过程例如但不限于:恶性、异常胚胎和胎盘发育、通常的生长障碍和器官对于伤害和压力的特异反应。

[0058] 这些病理生理过程由组织或组织液中的 ADAM12 水平反映出来,因此所述水平即为疾病的标记物。ADAM12 是临床前和临床疾病的一种标记物。ADAM12 水平反映疾病的存在和风险,预后,并有助于定义治疗或预防。

[0059] 本发明的一个实施方式中涉及,根据本申请的用于筛查个体中细胞功能异常的方法,其中所述参照水平是表示所述个体的正常生理状况。

[0060] 本发明的另一个实施方式涉及,根据本申请的用于筛查个体中细胞功能异常的方法,其中所述参照水平值是表示所述个体的异常状况。

[0061] 如果 ADAM12 水平偏离 - 即低于或高于 - 临床定义的临界值,例如 ADAM12 浓度或特定 ADAM12 核酸的大量复制的数值,则它可以用作标记物。ADAM12 水平还可以转变为可能性比率,单独或与其他标记物联合使用来确定临床状况或疾病的有关参数,例如存活的可能性。

[0062] 对于每个状况都定义了临床的临界值和 / 或 ADAM12 水平的常态分布,并且它们可以是在健康个体或者临床或生理上定义为良的人中获得的数值的确定的百分点或数值的分布。在一些例子中,例如妊娠,孕龄特异性区间将必须用统计学方法来定义。

[0063] 胚胎健康

[0064] 本发明的另一个目的是,确定 ADAM12 浓度是否是一种有效的胚胎健康的指示剂,因为胚胎发育是哺乳动物最活跃的细胞生长阶段之一。

[0065] 本申请证明,在 18 例和 226 例早孕期唐氏综合症妊娠中 ADAM12 浓度降低,在 89 例中孕期样品中 ADAM12 增加。

[0066] 在 10 例有 18 三体症胎儿的母体血清妊娠中,ADAM12 浓度降低,使得 ADAM12 成为对于 18 三体症的很有前景的标记物。如下述所示的例子,其在具有 730 例对照的 143 个病例中得到了证实。

[0067] 该实施例还证明,ADAM12 是早孕期和中孕期先兆子痫、特纳氏综合症和非特纳氏性染色体异常的标记物。另外,还证明通过在早孕期和中孕期联合 ADAM12 和其他标记物,大大增加了这样的标记物的识别能力。

[0068] 因此,对于唐氏综合症和其他胚胎染色体疾病,ADAM12 是一种很有前景的标记物。先兆子痫妊娠中的早孕期 ADAM12 母体血清的 ADAM12 浓度减少,使得 ADAM12 成为对于先兆子痫和胎盘疾病和不良妊娠结果的一种很有前景的标记物。

[0069] 因此,一方面本发明涉及用于筛查胎儿异常的方法,所述方法包括以下步骤:

[0070] a) 提供来自个体的身体样品

[0071] b) 确定所述样品中 ADAM12 水平 / 数值, 其通过检测

[0072] 1) ADAM12 多肽和 / 或

[0073] 2) 编码 ADAM12 的多聚核苷酸, 和 / 或

[0074] 3) 特定的 ADAM12 蛋白酶活性, 优选通过检测胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP-3) 及其衍生物, 或其他适宜的 ADAM12 底物的剪切; 。

[0075] c) 将所述水平 / 数值与参照进行比较;

[0076] d) 鉴定是否该水平 / 数值与所述参照不同, 并且

[0077] 如果该水平与参照不同, 则评估是否具有提高的所述胎儿异常和 / 或不良妊娠结果的风险。

[0078] 本文中, 术语“胎儿异常和不良妊娠结果”是指, 胎儿染色体疾病 - 以染色体结构异常的形式和它们的嵌合体 (mosaics): 畸形, 单基因遗传病或多基因遗传病, 偏离正常的发育, 先天性疾病, 胚胎疾病, 胎盘的病理状况, 子宫内生长迟缓, 先兆子痫, HELPP 综合症, 癫痫, 早产, 胎儿心脏病, 流产和胎儿死亡。

[0079] 因此, 本发明的另一个实施方式涉及一种依据本发明的方法, 其中, 所述胎儿异常选自 21 三体症, 18 三体症, 13 三体症, 先兆子痫, 子宫内生长迟缓, 异位妊娠, 开放性脊柱裂, 神经管缺损, 腹壁缺损, Edwards 综合症, Patau 综合症, 特纳氏综合症, 非特纳氏性染色体异常, X 单染色体症或 Klinefelter 综合症, 三倍体, 嵌合体症状和开放性脊柱裂组成的组。

[0080] 本发明的一个实施方式涉及一种依据本发明的方法, 其中, 所述胎儿异常是一种变异的生长状态, 其选自生长促进状态和生长抑制状态组成的组。这样的胎儿异常能够被证明为染色体疾病或病理性局部增殖状态。

[0081] 本发明的一个实施方式是 ADAM12 在确定妇女是否怀孕方面的用途。

[0082] 本发明的一个实施方式涉及, ADAM12 作为心脏病, 细胞肥大或血管生成的标记物。

[0083] 本发明的一个实施方式涉及, ADAM12 在对于肥厚型, 扩张型, 心律失常型右心室心肌病和限制型心肌病和左心室心肌肥大的分类, 预后, 鉴定和特征描述方面的用途。

[0084] 本发明的一个实施方式是 ADAM12 作为心脏病的筛查标记物的用途。

[0085] 在一个实施方式中, 本发明涉及一种依据本发明的方法, 其中, 胎儿异常和 / 或不良妊娠结果选自唐氏综合症 (21 三体症)、18 三体症、13 三体症、三倍体、嵌合体、先兆子痫、特纳氏综合症和非特纳氏性染色体异常组成的组。

[0086] 在一个优选的实施方式中, 本发明涉及一种依据本发明的方法, 其中胎儿异常和 / 或不良妊娠结果是唐氏综合症。

[0087] 在一个优选的实施方式中, 本发明涉及一种依据本发明的方法, 其中胎儿异常和 / 或不良妊娠结果是特纳氏综合症。

[0088] 在一个优选的实施方式中, 本发明涉及一种依据本发明的方法, 其中胎儿异常和 / 或不良妊娠结果是非特纳氏性染色体异常 (NTSCA), 即 47XXY, 47XXX, 47XYY 或三倍体。

[0089] 在一个优选的实施方式中, 本发明涉及一种依据本发明的方法, 其中胎儿异常和 / 或不良妊娠结果是先兆子痫。

[0090] 在一个优选的实施方式中, 本发明涉及一种依据本发明的方法, 其中胎儿异常和 /

或不良妊娠结果是 18 三体症。

[0091] 本发明的一个实施方式涉及一种依据本发明的方法,其中,计算不依赖孕龄的(MOM)或 ADAM12 的值用以评估胎儿或胎盘疾病的风险。

[0092] 在一个优选的实施方式中,把发明涉及一种方法,其中,不依赖孕龄的 ADAM12(MOM)与生物统计学,血清学或临床信息相结合来获得发生先兆子痫的风险。

[0093] 另外,相同类型的方法过去常用于获得其他上述不良妊娠结果的预后和诊断信息。

[0094] 本文中,术语“个体”是指母体和未出生的子代。

[0095] 本文中,术语“染色体疾病”是指任何常染色体或性染色体的三倍体、非整倍体或嵌合体等,即 21 三体症、18 三体症、13 三体症、特纳氏综合症等,和其他染色体结构异常,例如易位和缺失。

[0096] 本文中,术语“胎儿”是指从受精到孩子出生的任意型的胎儿,并因此包括指描述早期阶段的胚胎和胎儿(或胎儿)的阶段。

[0097] 本文中,术语“个体”是指最大范围的具有细胞功能异常风险的人,特别是指怀有胎儿的个体。虽然本实施方式描述母体样品中 ADAM12 的测量,氮本发明能够适用于直接对胎儿的测量,因此本发明的一个实施方式中涉及一种依据本发明的方法,其中该个体是胎儿。

[0098] 本文中,术语“病理”是指异常事物,如细胞功能异常,还有构成疾病或成为特殊疾病特征的结构和功能上偏离正常。

[0099] 换言之,把发明也能够描述成一种诊断哺乳动物胎儿的临床状况或诊断对于所述临床状况的易患素质的方法,其包括以下步骤:

[0100] a) 提供来自所述胎儿母亲的体液样品;并且

[0101] b) 测量所述体液样品中的 ADAM12 水平;并且

[0102] c) 诊断临床状况或诊断对于该临床状况的易患素质,其中大于或小于预先确定的数值的 ADAM12 水平表示临床状况或对于该临床状况的易患素质。

[0103] 其中,该临床状况选自唐氏综合症、先兆子痫和急性冠脉综合征,包括不稳定型心绞痛,心肌梗死和任何所述的胎儿异常和/或不良妊娠结果所组成的组。

[0104] 本发明的另一个实施方式涉及,确定妊娠妇女怀有唐氏综合症胎儿的风险的筛查方法,其包括,在妊娠的早孕期和/或中孕期测量所述妊娠妇女母血 ADAM12 水平,在妊娠的早孕期,对(1)怀有唐氏综合症胎儿的妊娠妇女和(2)怀有正常胎儿的妊娠妇女的所述 ADAM12 水平和参照的 ADAM12 水平值进行比较,所述比较表示所述妊娠妇女怀有唐氏综合症胎儿的风险,其中高 ADAM12 水平表示怀有唐氏综合症胎儿的可能性更高。

[0105] 样品

[0106] 本文中,术语“样品”是指从被分析个体中收集的液体或固体样品。优选该样品在分析时被液化。

[0107] 在本发明的另一个实施方式中,在测量 ADAM12 浓度之前,样品的处理步骤的最小化是必须的。本文中,“处理步骤”是指,在液体样品被用于分析,试剂盒或方法之前或之后,它的任何类型的预处理。预处理程序包括分离,过滤,稀释,蒸馏,浓缩,杂质化合物的灭活,离心,加热,固化,添加试剂或化学处理。

[0108] 根据本发明,被分析的样品是从任意种类的哺乳动物,包括人类、宠物动物、观赏动物、饲养动物中收集的。

[0109] 在本发明的另一个实施方式中,该样品是得自例如体液的来源。

[0110] 优选,该来源选自乳汁、精液、血液、血清、血浆、唾液、尿液、汗液、眼部晶状体液(ocular lens fluid)、脑脊液、脑脊髓液、腹水、粘液、滑液、腹膜液、阴道排出物、阴道分泌物、宫颈排出物、宫颈或阴道拭子材料或胸膜、羊膜液和其他分泌液,物质和器官如脑、心脏和肠的组织切片所组成的组。

[0111] 本发明的一个实施方式涉及,一种依据本发明的方法,其中所述身体样品或生物样品选择血液、尿、胸膜液、口腔清洗物、阴道清洗物、宫颈清洗物、组织切片和卵泡液所组成的组。

[0112] 本发明的另一个实施方式涉及,一种依据本发明的方法,其中所述生物样品选自血液、血浆和血清组成的组。

[0113] 本发明的优选的实施方式涉及,一种依据本发明的方法,其中所述生物样品是血清。

[0114] 采用的样品可以为了运输和进一步分析而干燥。因此本发明的方法包括液体和干燥样品两者的分析。

[0115] 本发明的一个实施方式中,母体血清样品采自妊娠妇女。然后通过常规分析方法,例如本领域技术人员已知的免疫学方法测量该母血 ADAM12 水平。

[0116] 然后将母体血清的 ADAM12 水平与一组参照数据表见,来确定该病人怀有例如唐氏综合症胎儿的风险是否增高。

[0117] 为了提高检测效果,可以将孕龄和母血 ADAM12 水平与一组参照数据比较,来确定该病人怀有例如唐氏综合症胎儿的风险是否增高。

[0118] ADAM12 水平的确定

[0119] 样品中一种已鉴定蛋白质例如 ADAM12 的水平的确定,可以通过本领域技术人员已知的检测分析来获得,例如但不限于免疫学方法,基因表达分析和其他已知方法。

[0120] ADAM(去整合素和金属蛋白酶)构成一个具有蛋白水解和细胞黏附活性的糖蛋白家族。

[0121] 人 ADAM12 以 ADAM12-L(长)和 ADAM12-S(短)两种形式存在,后者是 ADAM12 的分泌型。ADAM12-S 的 C 末端与 ADAM12-L 不同,它在此处不包括跨膜和细胞质结构域。ADAM12-S 与胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP-3)结合并具有抵抗胰岛素样生长因子结合蛋白 3 的蛋白水解活性,并且在更低程度上水解 IGFBP-5。在体外,44-kDa IGFBP-3 被 ADAM12 剪切产生几个 10 到 20kDa 的片段,这并不依赖胰岛素样生长因子(IGF)I 和 II。IGF I 和 II 是在几乎全部胎儿和成年人组织中产生的胰岛素原样多肽。IGF I 和 II 的缺乏引起小鼠胎儿的生长迟缓。IGFBPs 剪切成与 IGF 亲和力变低的更小的片段,这使得 IGFBP 对 IGFs 的促有丝剪切和 DNA 刺激作用的抑制作用消失。血浆中 75% 的 IGF 与 IGFBP-3 结合。

[0122] 因此,本发明的一个实施方式涉及,确定样品中的 ADAM12 水平,其中该 ADAM12 多肽能与 ADAM12-L(长)和 ADAM12-S(短)两者结合。

[0123] 借助本领域的普通技术可以进一步理解,ADAM12 是至少 33 个基因的复杂家族的一员。此外,可以合成具有氨基酸序列的微小差别或其他微小差别的多种形式的 ADAM12。

进一步在例如唐氏综合症中,一个以上的 ADAM12 基因被表达,因而产生一种或多种独特的变异体(以前所称切口,断裂,异常的形式)ADAM12。

[0124] 根据本发明,这些变异体能够通过常规的测量 ADAM12 的免疫学技术进行测量。提出的用于测量一个或多个与唐氏综合症有关的特定 ADAM12 变异体的分析法可能导致检测效果的进一步增强。

[0125] 本发明的另一个实施方式涉及,以源自 ADAM12 表达的 mRNA 形式的,样品中 ADAM12 多肽水平的确定,包括所有 ADAM12 的剪接变异体。

[0126] 从 6 孕周至足月 IGFBP-3 的血清浓度显著降低并且妊娠特异性蛋白剪切导致 29 至 30,19 和 15kDa 片段,这一发现与 ADAM12-S 将 IGFBP-3 剪切成为 10-20kDa 片段并因此可能是推测的妊娠血清中 IGFBP-3 蛋白酶之一的发现是一致的。

[0127] 因为 ADAM12 是 IGFBP-3 蛋白酶并且 IGFBP-3 是血清中最丰富的 IGFBP。所以 IGFBP-3 的蛋白水解将通过提高生物活性的 IGF I 和 II 的水平而刺激生长。而且,由于 PAPP-A 和 ADAM12 都是胎盘合成的 IGFBP-5 蛋白酶,因此作为胎儿异常的指示剂,ADAM12 是用于研究的合理的备选品。

[0128] 生物活性的胰岛素样生长因子 (IGF) I 和 II 对于胎儿生长是很重要的。其由胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) 1 至 6 调节。IGFBP-3 的蛋白剪切发生在人妊娠血清的中;因此,在妊娠期间 IGFBP-3 血清水平显著降低。ADAM12(去整合素和金属蛋白酶)是 IGFBP-3 和 IGFBP-5 的蛋白酶并存在于人妊娠血清中。

[0129] 另外,我们发现妊娠期间 ADAM12 浓度增加了 60 倍,这进一步解释了 IGFBP-3 浓度的降低。

[0130] Irwin 等人 (2000) 报道的结果中提供了另外的支持,其表示人胎盘滋养层分泌一种剪切 IGFBP-3,在中性和碱性 pH 中有活性并对邻二氮杂菲敏感的去整合素和金属蛋白酶。因为胎盘中 ADAM12 的 mRNA 特别丰富并且具有相同的外观特征,因此由滋养层分泌的蛋白酶可能是 ADAM12。

[0131] Langford 等人 (1995) 的发现表明,在具有子宫胎盘缺血的妊娠的晚孕期妊娠血清中 IGFBP-3 水平增高并且暗示 IGFBP-5 蛋白酶,PAPP-A 作为子宫内生长迟缓的预测物的作用,该发现使得 ADAM12 成为一个有趣的作为除 DS 外的不良妊娠结果的预测物的备选品。

[0132] 因此,本发明的另一个实施方式涉及,样品中 ADAM12 多肽水平的确定,其中所述水平是通过测量特异性 ADAM12 蛋白酶活性来计算的,优选通过检测 IGFBP-3 及其衍生物,或其他适宜的 ADAM12 底物的剪切。

[0133] 胎盘亮氨酸氨肽酶 (P-LAP),一种与妊娠期间催产素降解有关的 II 型跨膜蛋白酶,通过蛋白剪切被转变为可溶的形式。该研究的目的是确定 P-LAP 分泌酶行为的性质。氧肟酸基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 和 ONO-4817 和 TNF α 蛋白酶抑制剂 -2(TAPI-2) 减少了 P-LAP 的释放,而作为基质金属蛋白酶抑制剂的金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMP)-1 和 TIMP-2 对于中华地鼠卵巢 (CHO) 细胞稳定过表达 P-LAP 中的 P-LAP 释放没有影响,因而暗示在 P-LAP 脱落中可能涉及 ADAM(去整合素和金属蛋白酶)的成员。此外,ADAM9 和 ADAM12 的过表达增加了 P-LAP-CHO 转染中的 P-LAP 释放。人胎盘免疫组织化学分析证实了合体滋养层中 ADAM12 的强烈表达,而在整个胎盘中几乎没有检测到 ADAM9 的表达。这些结果说明,ADAM 长远,至少包括 ADAM12,牵涉到人胎盘中的 P-LAP 脱落。

[0134] 因此,本发明的另一个实施方式涉及,样品中 ADAM12 多肽水平的确定,其中所述水平是通过测量特异性 ADAM12 蛋白酶活性来计算的,优选但不限于通过检测人胎盘中的 P-LAP 脱落。

[0135] 参照

[0136] 为了确定细胞功能异常的临床严重程度,用于评测被测 ADAM12 的可检测信号的方法设计一种或多种参照方式。该参照也使得不直接或间接地与 ADAM12 浓度相关的分析和方法变化,试剂盒变化,处理变化和其他变化中的计算成为可能。

[0137] 本发明中,术语“参照”是指与数量、质量或类型有关的标准,与其相反的其他数值或特征可以与其比较,例如标准曲线。

[0138] 参照数据反映怀有唐氏综合症胎儿(也指受影响的)的妊娠妇女的 ADAM12 母血水平和/或怀有正常胎儿的妊娠妇女的 ADAM12 母血水平(也指未受影响的)。正如本领域技术人员普遍理解的,用于筛查胎儿唐氏综合症的方法是通过比较进行判断的过程。对于任何进行判断的过程,都需要基于患有该疾病或有关症状的病人和/或没有该疾病或有关症状的病人的参照数据。

[0139] 本发明中该参照数据是,怀有唐氏综合症胎儿的妊娠妇女和怀有正常胎儿的妊娠妇女两者中被测标记物,例如 ADAM12 的母血水平。通过收集大量样品的的参照数值建立一组参照数据。对本领域技术人员显而易见的是,通过包括增加参照数值的数量可以改善该组参照数据。

[0140] 本发明的另一个实施方式中,该参照方式是内参照方式和/或外参照方式。

[0141] 本文中术语“内参照方式”是指,不经使用者为每种确定进行直接处理而是结合一种用于确定 ADAM12 浓度的方法,从而只有“最终结果”或“最终测量值”被提供的参照。术语“最终结果”或“最终测量值”是指考虑参照数值时提供给使用者的结果。

[0142] 本发明的另一个实施方式中,内参照方式连同用于 ADAM12 浓度确定的设备被提供。

[0143] 本发明的另一个实施方式中,该装置选自检验设备(assay)、棒(stick)、干燥棒(dry-stick)、电气设备、电极,读取器(分光光度读取器,红外读取器,同位素读取器和类似读取器)、组织化学、和结合参照的类似手段所组成的组。

[0144] 本文中术语“外参照方式”是指,使用者为了在得到“最终结果”或“最终测量值”之前确定 ADAM12 浓度而直接进行处理的参照。

[0145] 本发明的另一个实施方式中,外参照方式选自表格,图表和类似参照方式,使用者能够将被测信号与所选的参照方式进行比较。该外参照方式设计被使用的设备排除在外的用作 ADAM12 的标度,数值参照,信息物等的参照。

[0146] 本发明的一个实施方式涉及一种依据本发明的方法,其中所述参照水平/预先确定的数值表示所述个体的正常生理状况。

[0147] 本发明的一个实施方式涉及一种依据本发明的方法,其中所述参照水平/预先确定的数值表示所述个体胎儿异常的状况。

[0148] 虽然任何已知的用于测量 ADAM12 母血水平的分析方法在本发明中都有效,但对于本领域技术人员显而易见的是,用于 ADAM12 的分析方法必须与产生 ADAM12 参照数据所使用的方法相同。如果一种新的分析方法被用于 ADAM12,则必须以该方法得到的数据为基

础,产生一组新的参照数据。因此,用于分析血液的技术对于参照数据和被筛查的样品应该是相同的。

[0149] 风险评估

[0150] 本发明已经成功地开发了一种新的 ELISA 方法,用于测量整个胎盘的 ADAM12。从早孕期至足月,母体血清中 ADAM12 浓度增加 60 倍,并且在有胎儿唐氏综合症的妊娠的早孕期显著降低,,在有唐氏综合症妊娠的中孕期增加。表 1 表示 ADAM12 表现为一种有效的唐氏综合症母体血清标记物。其识别能力优于其他任何已确定的早孕期标记物。同样地,中孕期的识别能力优于或接近于该孕龄期的熟知的标记物。

[0151] 为了确定病人怀有例如唐氏综合症胎儿的风险是否增加,必须建立一临界值。这一临界值可以通过实验室,医师或以每个病人的一个个病例为基础建立。

[0152] 该临界值可以基于多种标准,包括进行进一步侵入性诊断试验的妇女的数量,对于全部进行进一步侵入性诊断试验的妇女怀有唐氏综合症胎儿的平均风险,任何病人特异性风险高于一定风险水平,例如 1:400 或 1:250 (如筛查组织或个体妇女所定义的) 的妇女都应该进行进一步的侵入性诊断试验的决定或者其他本领域技术人员已知的标准。

[0153] 可以使用许多方法建立该极限水平,包括百分点,均值加减标准差,中值倍数,病人特异性风险或本领域技术人员已知的其他方法。

[0154] 本发明的另一个更多胎儿唐氏综合症病例被检出的实施方式中,利用双重或三重分析物检验,例如双重或三重标记的时间分辨荧光免疫分析法,分析血清的 ADAM12 和 β hCG 和 / 或 PAPP-A 或其他用于胎儿疾病的早孕期风险评估的早孕期标记物,和 AFP 和 / 或 hCG 或游离雌三醇或其他中孕期用于中孕期风险评估的中孕期标记物。

[0155] 虽然任何已知的用于测量这些分析物母血水平的分析方法在本发明中都有效,但对于本领域技术人员显而易见的是,用于每个标记物的分析方法必须与产生特殊标记物参照数据所使用的方法相同。如果一种新的分析方法被用于特殊标记物,则必须以该方法得到的数据为基础,产生一组新的参照数据。

[0156] 怀有唐氏综合症胎儿的病人特异性风险的计算优选是,借助使用 Bayes 法则,病人先验风险,和未患病和患病的妊娠的相对频率,该相对频率是通过将病人每种分析物 (早孕期的 ADAM12 和 β hCG 和 PAPP-A 和其他标记物,以及中孕期的 ADAM12、AFP、hCG、uE3 和抑制素 A 和其他标记物) 的定量水平和病人孕龄代入概率密度函数,该函数是使用多元判别分析或多维截断正态 (或其他) 分布而建立的。

[0157] 多元判别分析和其他风险评估的进行可以是,借助商业上可得到的统计学计算机软件包统计分析系统 (包括 SAS 研究所制造和出售的),或者通过本领域技术人员已知的其他多元统计分析或其他统计软件包或筛查软件。

[0158] 根据本发明优选的实施方式,母体血清样品采自妊娠妇女。然后,ADAM12 和其他标记物 (下文称为“标记物”) 母体血清水平的测量,当标记物是血清学标记物时,利用本领域已知的常规免疫学方法进行,当标记物是生物统计学标记物,例如超声测量法,即颈部半透明时,利用本领域技术人员已知的其他有关方法进行。

[0159] 虽然任何已知的用于测量这些分析物母血水平的分析方法在本发明中都有效,但对于本领域技术人员显而易见的是,用于每个标记物的分析方法必须与产生特殊标记物参照数据所使用的方法相同。如果一种新的分析方法被用于特殊标记物,则必须以该方法得

到的数据为基础,产生一组新的参照数据。

[0160] 为了风险评估或判别分析的目的,作出关于普通随意选定种群中唐氏综合症的先验概率的一个假定。通常,先验概率为大约 1:800。为了多元判别分析和风险评估,作出关于何种风险临界值水平构成阳性试验结果的判断。例如,如果需要对具有例如 1:400 或更高的怀有唐氏综合症胎儿的可能性的妊娠妇女进行进一步的侵入性诊断试验,那么当判别分析显示一个妊娠妇女具有例如 1:400 或更高的怀有唐氏综合症胎儿的可能性时,则认为该妊娠妇女具有阳性试验结果。如果表现阳性试验结果,则该病人应该建议进一步的侵入性诊断试验来证实唐氏综合症的存在。

[0161] 对本领域技术人员显而易见的是,在上述讨论的实施方式中,改变阳性风险临界值水平或使用可以适用于不同的种群亚组的不同先验风险,能够改变每个病人的判别分析的结果。

[0162] 这里描述的稳定性试验证明,ADAM12 具有对日常处理的高稳定性,因此,本发明人断定,ADAM12 是在临床应用上很有魅力的分析物。这里提供的数据表明,ADAM12 一种用于产前筛查的具有潜在价值的标记物。

[0163] 范围

[0164] 本发明人开发了一种用于血清中 ADAM12 量化的酶联免疫吸附分析法 (ELISA)。检验范围为 42 至 667 $\mu\text{g/l}$ 。重组 ADAM12 被用作校准的标准。同样地,使用 Perkin Elmer 的自动时间分辨荧光免疫分析平台,开发了具有 78 至 1248 $\mu\text{g/l}$ ADAM12 分析范围的自动时间分辨荧光免疫分析。

[0165] 因此,本发明的一个实施方式涉及一种依据本发明的分析法,其中该检测水平范围为从 20 $\mu\text{g/l}$ 至 2000 $\mu\text{g/l}$,如 20 $\mu\text{g/l}$ 至 1500 $\mu\text{g/l}$,20 $\mu\text{g/l}$ 至 1000 $\mu\text{g/l}$,20 $\mu\text{g/l}$ 至 800 $\mu\text{g/l}$,20 $\mu\text{g/l}$ 至 600 $\mu\text{g/l}$,20 $\mu\text{g/l}$ 至 400 $\mu\text{g/l}$,20 $\mu\text{g/l}$ 至 200 $\mu\text{g/l}$,50 $\mu\text{g/l}$ 至 2000 $\mu\text{g/l}$,100 $\mu\text{g/l}$ 至 200 $\mu\text{g/l}$,200 $\mu\text{g/l}$ 至 800 $\mu\text{g/l}$,400 $\mu\text{g/l}$ 至 1000 $\mu\text{g/l}$ 或 100 $\mu\text{g/l}$ 至 1200 $\mu\text{g/l}$ 。本领域技术人员应该认识到的是,通过应用更灵敏的检测分析方法,例如但不限于 PCR 或质谱测定法,可以提高检测水平。

[0166] 本发明人发现,ADAM12 在血清中更稳定。在一项研究中,血清浓度从例如 8 孕周的 180 $\mu\text{g/l}$ 增加到例如 16 孕周的 670 $\mu\text{g/l}$,但是从 10-16 孕周,本发明人发现高度变化但不降低的水平,其由三次多项式样条函数描述。如实施例 1 所述,从 18 周该水平增加至足月的 12000 $\mu\text{g/l}$ 的中值。

[0167] 在 18 例早孕期唐氏综合症妊娠中,ADAM12 浓度降低,因此中值倍数值为 0.14(0.01-0.76)。如实施例 1 所述,使用 ADAM12 和母亲年龄作为筛查标记物,MonteCarlo 评估发现,对于筛查阳性率 3.2% 和风险临界值 1:400,胎儿唐氏综合症的检出率为 82%。

[0168] 在 226 例早孕期唐氏综合症妊娠中 - 稍晚的孕龄检查 - 中值倍数为 0.79,但在 10-12 周明显低于 13-14 周 - 表示 ADAM12 是特别优良的早孕期标记物。如实施例 5 所述,在 89 例中孕期唐氏综合症胎儿妊娠母体血清样品中,中值倍数为 1.79,这表示 ADAM12 是特别优良的中孕期标记物。

[0169] 如实施例 4 所述,在 160 例从中孕期发生先兆子痫的妇女得到的早孕期血清样品中 - 得自哥本哈根早孕期筛查研究,log MoMADAM12 均值显著减少至 -0.066(范围:-1.009-0.441)。如实施例 13 所述在 67 例先兆子痫中 - 得自英国 Harold Wood 医院,

MoM ADAM12 同样在早孕期显著减少至 0.90,在中孕期增加至 1.14。

[0170] 18 三体症妊娠的中值 ADAM12MoM,如实施例 6 所述的 Danish 研究中,在早孕期减少至 0.29 并减少至 log MoM ADAM12 均值 -0.097,如实施例 7 所述,在中孕期增加至 log MoM ADAM12 均值 0.312。

[0171] 如实施例 8 所述,13 三体症妊娠的 log MoM ADAM12 均值在早孕期减少至 -0.221,中孕期增加至 0.170。

[0172] 如实施例 9 所述,特纳氏综合症的 log MoM ADAM12 均值在早孕期为 -0.177,在中孕期为 0.172。

[0173] 如实施例 10 所述,非特纳氏性染色体异常例如 47XXX,47XXY 和 47XYY 的 log MoM ADAM12 均值在早孕期减少至 -0.238,在中孕期增加至 0.212。

[0174] logMoM

[0175] 如果 ADAM12 浓度没有进行关于孕龄的标准化 - 即转化成不依赖孕龄的值 - 例如通过母体血清中检测到的 ADAM12 浓度除以获得该样品的特殊孕龄的中值得到的值 (中值倍数,multiple of median-MoM),那么 ADAM12 浓度值的个体间差异将降低标记物的识别能力。

[0176] 在被检查的状况中,与对照妊娠相比,ADAM12 的 logMoM 值在不同妊娠期间有特征性差异:

[0177] 在 21 三体症中:在 5-10 孕周 ADAM12 低。在 11-12 周与对照者相似,并从 13-20 周增加。

[0178] 在 18 三体症,13 三体症,45X0 (特纳氏综合症),非特纳氏性染色体异常和三倍体中,log MoM ADAM12 水平在早孕期减少,在中孕期增加。

[0179] 在先兆子痫中,log MoM ADAM12 水平,与对照者相比,在早孕期降低,在中孕期增加。

[0180] 方法

[0181] 最简单直接的方法是,免疫分析与分析检验相结合。通过任何本领域已知的免疫分析手段都可以检测出与 ADAM12 结合的抗体。优选,利用选自蛋白微阵列分析法、放射免疫分析法 (RIA)、酶联免疫吸附分析法 (ELISA)、荧光免疫分析法、免疫荧光统计分析法和免疫放射统计分析法组成的组的分析法,检测抗体的结合。

[0182] 更优选,利用 ELISA 检测抗体的结合。

[0183] 酶联免疫吸附分析法 (ELISA)

[0184] ELISA 依赖与 RIA 相似的原则,但其依赖于一种酶而非放射活性标签。更具体的是,在适宜底物的存在下,与抗体结合的酶可以产生可检测的信号。

[0185] 在示例的 ELISA 中,对本发明有用的抗体被固定在所选择的表面上,该表面表现蛋白亲和力,如聚苯乙烯微孔板的一个孔。然后,将包含抗原例如临床样品的怀疑试验组合物加入该孔。在结合和清洗来清除非特异性结合免疫复合物后,可以检出该结合抗原。通常,可以通过加入其他结合了与可检测标签联合的抗原的抗体进行检测,这种类型的 ELISA 是一种简单的“夹心 ELISA”。也可以通过加入结合了抗原的第二抗体后,加入对于第二抗体具有结合亲和力的、与可检测标签联合的第三抗体来检测。

[0186] 在另一个示例的 ELISA 中,包含抗原的怀疑样品被固定在孔表面,然后与抗体结

合。结合和适当的清洗后,检测该结合免疫复合物。初始抗体与可检测标签联合,则结合免疫复合物可以被直接检测。再者,可以使用对于第一抗体具有结合亲和力的、与可检测标签联合的第二抗体,对该免疫复合物进行检测。

[0187] 竞争性 ELISA 也是可以的,其中试验样品竞争性地与已知数量的标记抗原或抗体相结合。在使用包被孔孵育之前或期间,通过将样品与已知的标记品种混合,可以确定未知样品中反应品种的数量。样品中反应品种的存在使能够与孔结合的标记品种的数量减少并因而减少了最终的信号。

[0188] 关于使用方式,ELISA 通常具有一定特点,例如包被,孵育或结合,清洗以除去非特异性结合品种,和检测结合免疫复合物。这些将在下文中记述。

[0189] 用抗原或抗体包被一张板时,一般是用抗原或抗体溶液孵余该板的孔,过夜或在特定的几小时的时间内。然后清洗该板的孔来去除没有完全吸附的材料。然后用对于试验抗血清为免疫原中性的非特异性蛋白“包被”孔剩余可利用的表面。这包括牛血清白蛋白(BSA),酪蛋白和奶粉溶液。包被封闭固定化表面的非特异性吸附位点,并因此减少了抗血清在该表面上的非特异性结合引起的背景。

[0190] 在 ELISA 中,与直接程序相比,使用第二或第三检测手段可能是更经济的。因此,抗原或抗体与孔结合后,用非反应性材料包被来减少背景,并清洗以去除未结合的材料,固定化的表面与临床或生物样品接触,在有效的条件下被检测使免疫复合物(抗原/抗体)形成。然后,该免疫复合物的检测需要一个标记的第二结合配体或抗体,或者与标记的第三抗体或第三结合配体结合的第二结合配体或抗体。

[0191] “在有效的条件下以使免疫复合物(抗原/抗体)形成”的意思是,该条件优选包括用溶液例如 BSA、牛微球蛋白(BGG)和磷酸盐缓冲盐/吐温(Tween)稀释该抗原和抗体。加入的这些溶剂往往有助于非特异性背景的减少。

[0192] 该适宜条件还意味着,在一定温度下孵育一段充足的时间,使其有效结合。典型的孵育阶段是从约 1 到约 2 到约 4 小时,温度优选 25 到 27°C,或者可以在约 4°C 过夜。

[0193] 在 ELISA 中的全部孵育阶段,清洗该被接触的表面来清除未结合材料。清洗常包括用 PBS/Tween 或硼酸盐缓冲溶液的清洗。在试验样品和初始结合材料之间的特异性免疫复合物的形成中,以及接下来的清洗中,可以确定甚至是微量的免疫复合物的出现。

[0194] 为了提供一种检测手段,第二或第三抗体将具有相关标签使检测能够进行。优选,其为对于用适宜的染色体遗传底物孵育能产生颜色变化的酶。因此,例如,期待在有利于进一步的免疫复合物形成发展的条件下,例如在含有 PBS 的溶液如 PBS-Tween 中于室温下孵育 2 小时,用尿素酶、葡萄糖氧化酶、碱式磷酸酯酶或过氧化氢酶联的抗体接触和孵育第一或第二免疫复合物。

[0195] 用标记的抗体孵育,并随后清洗以去除未结合材料后,标签的数量被量化,例如,过氧化酶作为酶变迁时,通过用染色体遗传性底物如尿素和溴甲酚红紫或 2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)和过氧化氢孵育。

[0196] 然后通过测量产生颜色的程度,例如使用可见光分光光度计,进行量化。

[0197] 或者,该标签可以是化学发光体。或者该标签是可以使用时间分辨荧光免疫分析法检测的。

[0198] 蛋白微阵列分析

[0199] 本发明的另一个实施方式涉及,使用蛋白微阵列检测被检测样品中存在的至少一种形式的 ADAM12 的数量。使用抗体及其片段进行至少一种形式的 ADAM12 的捕获,其中,该检测是使用质谱仪,例如 MALDI-TOF 光谱仪进行的。此外,至少一种 ADAM12 在表面的结合可以被用来满足机理,并且可以使用质谱仪(例如 SELDI-TOF 光谱仪)进行检测。

[0200] 试剂盒

[0201] 当测量样品中 ADAM12 浓度时,无论是否需要快速鉴定,都提供了包括必要设备的试剂盒。

[0202] 本文中,术语“试剂盒”是指一组用于特殊目的的设备,例如该试剂盒的目的是确定样品中 ADAM12 浓度。该组设备,典型地,包括获得被测样品的设备,储存或支持所获得的样品的设备,提供对于样品中存在的 ADAM12 数量的可检测信号的设备和评测被测 ADAM12 的可检测信号的设备,而且可以加入其他设备。

[0203] 本发明的一个实施方式中,该试剂盒包括选自获得被测样品的设备,储存或支持所获得的样品的设备,提供对于样品中存在的 ADAM12 数量和/或浓度的可检测信号的设备和评测被测 ADAM12 的可检测信号的设备所组成组中的至少一种,如所述设备中的两种,例如三种和例如四种。

[0204] 当使用该试剂盒时,获得被测样品的设备包括,例如获得血样的注射器或者获得组织样品的注射器或解剖刀或者本领域技术人员熟知的其他常规设备。接着,将该样品转移至储存或支持所获得的样品的设备,并使用提供对于样品中存在的 ADAM12 数量的可检测信号的设备进行分析。对获得的信号进行分析和评价以确定细胞生长紊乱的临床严重程度,从而为疾病提供预后或诊断和/或提供该紊乱引起的并发症的最佳预防和/或治疗方法。

[0205] 提供对于样品中存在的 ADAM12 数量的可检测信号的设备选自检验设备(assay)、棒(stick)、干燥棒(dry-stick)、电气设备、电极,读取器(分光光度读取器,红外读取器,同位素读取器和类似读取器)、组织化学、和结合参照的类似手段所组成的组。

[0206] 其他提供对于样品中存在的 ADAM12 数量的可检测信号的设备可以是与所述样品中 ADAM12 的 mRNA 水平有关的,例如但不限于实时 PCR。

[0207] 自动分析

[0208] 为了减少分析的变化和人为的处理和记录的错误,使用本发明作为半自动或全自动分析系统的一部分是有利的,优选其中临床数据和分析结果及风险计算的处理和分析结果及风险评估的质量控制是在整体半自动系统中完成的,例如具有相同制造商的软件生命周期的自动时间分辨荧光免疫分析和自动时间分辨荧光免疫分析平台的联合。我们已经表示,ADAM12 分析对自动时间分辨荧光免疫分析平台发挥作用。本发明还包括内爆干燥试剂或干燥的被包被板的分析系统。进一步,血液或组织成分被存放在滤纸上,并在 ADAM12 量化前被萃取。

[0209] 多元分析平台,例如 Luminex 技术也是用于测量 ADAM12 值的本发明的一部分。

[0210] 筛查定时

[0211] 如本文所述,与以前的基于母体血清标记物的筛查方法相比,本发明的方法提供了更高的识别能力,更低的价格,更少的入侵和更多的用于胎儿非整倍体的产前筛查的地理上可接受的设备。

[0212] 进一步,本发明的一个重要的实施方式是,本发明的母体筛查方法由于母体血清筛查方法被大量使用,因此不仅能够在中孕期使用,也可以在早孕期使用。

[0213] 如本文所述,由于确定胎儿非整倍体诊断中的耽误导致更多的创伤性流产程序是必要的,因此中孕期试验是不利的。而且,孕妇及其家人对于健康孩子的情感和期望在妊娠期间不断增长,使得妊娠晚期的流产决定更加困难。

[0214] 本发明的一个实施方式涉及一种依据本发明的方法,其中 ADAM12 被评定为早孕期标记物。

[0215] 本发明的一个实施方式涉及一种依据本发明的方法,其中 ADAM12 被评定为中孕期标记物。

[0216] 早孕期和中孕期使用 ADAM12 作为标记物,提高了这些试验的效果并会导致更精确的风险妊娠的定义,其应该给出对诊断胎儿疾病的侵入性调查(即伴随染色体分型的羊水诊断或绒毛膜绒毛取样)。在早孕期和中孕期都使用 ADAM12 可以减少个体妇女参加由于筛查中的假阳性结果而失去胎儿的筛查计划中的风险。在早孕期的 11 孕周之前,ADAM12 单独或与其他标记物联合使用可以将早孕期筛查的效果提高到与目前被认为是最有效的“集成扫描”相似的程度。但是,集成扫描的缺点是,风险在中孕期报告给孕妇。由于从医学和心理上迟到的风险报告都是更不令人期待的,因此这是很不幸的。

[0217] 由于 ADAM12 在 21 三体症中的识别能力优良 - 即 MoM ADAM12 在 11 孕周前减少或 12 孕周后增加 - 因此该标记物对于“有效期”外从 10(11)-11(12) 周的 21 三体症筛查是有效的。这与具有在妊娠的其他时期的“无效期”的标记物如 PAPP-A, hCG 和 SP1 等是类似的。由于仅证明了 ADAM12 对于 21 三体症的无效期,因而当筛查其他胎儿或母体病症时,该用途是不必推荐的。

[0218] 因此,本发明的一个实施方式涉及一种方法,其中该样品在孕龄 11 周前或孕龄 12 周后获得。

[0219] 与其他已知标记物的联合

[0220] 在一个优选实施方式中,对母体血清或血浆中与一种以上的下述标记物联合的 ADAM12 和生物统计学标记物的测量,可以通过已知试验减少假阳性的数量并提高识别能力:

[0221] 甲胎蛋白 (AFP)

[0222] 游离雌三醇 (UE3)

[0223] 人绒毛膜促性腺激素 (hCG)

[0224] 人绒毛膜促性腺激素游离 α 亚单位 (游离 α -hCG)

[0225] 人绒毛膜促性腺激素游离 β 亚单位 (游离 β -hCG)

[0226] β 核 hCG

[0227] 过糖基化 hCG (ITG)

[0228] 胎盘生长激素 (PGH)

[0229] 抑制素, 优选二聚抑制素 -A (抑制素 A)

[0230] 妊娠相关的血浆蛋白 -A (PAPP-A)

[0231] PAPP-A 与 proMBP 复合体 (主要基础蛋白的前体形式)

[0232] ProMBP

- [0233] ProMBP 与血管紧张素和 / 或补充因子的复合体和剪切产物
- [0234] Schwangerschaftsprotein1 (SP1)
- [0235] 癌抗原 125 (CA125)
- [0236] 前列腺特异性抗原 (PSA)
- [0237] 白细胞酶
- [0238] 胚胎 DNA
- [0239] 胚胎 RNA
- [0240] 胚胎细胞
- [0241] 干细胞
- [0242] 雌二醇
- [0243] 超声标记物
- [0244] 颈部半透明
- [0245] 腿骨长度
- [0246] 缺少鼻骨
- [0247] 肠腔高回声
- [0248] 心脏中的强回声点
- [0249] 脉络膜囊肿 (Choroids plexus cysts)
- [0250] 肾盂积水
- [0251] 胎儿畸形
- [0252] 类固醇
- [0253] 肽类
- [0254] 趋化因子
- [0255] 白介素 (例如 IL-6, IL-4, IL-1)
- [0256] 肿瘤坏死因子
- [0257] 转化生长因子 α 和 β
- [0258] 急性期反应物
- [0259] C 反应蛋白
- [0260] 纤连蛋白
- [0261] 母体或胚胎的单核苷酸多态性, 例如 :TNF β 和甘露聚糖结合凝集素启动子区的多态性
- [0262] 补充成分
- [0263] HLA-G
- [0264] HLA 分子
- [0265] 因此在一个实施例中, 本发明涉及此处所述的方法, 其中 ADAM12 水平与选自上述定义的组的至少一种标记物的数值相结合。
- [0266] ADAM12 抗体
- [0267] 还可以被普遍理解的是, 在 ADAM12 特异性抗体的产生中, 一些抗体是对蛋白质特异性的, 一些抗体是对与抗原位点有关的碳水化合物特异性的。在整个本发明的描述中提到的 ADAM12 水平的测量包括, 使用对于蛋白质或与抗原位点或 ADAM12 上的其他位点有关

的碳水化合物特异性的抗体。

[0268] 我们已经高效地利用 ELISA 分析技术测量 ADAM12, 来区别 21 三体症患病和未患病的妊娠。使用 ADAM12 和母亲年龄作为风险标记物检测 21 三体症的效果已经被评估为, 3% 的假阳性率的 80%。本领域技术人员熟知的是, 使用抗体测量特异性分析物可能导致一定程度的与不同或相似底物的交叉反应。因此, 患病和未患病病例间的区别可能由于异常形式的 ADAM12 的存在而受到影响, 这是因为异常形式的 ADAM12 与所用抗体发生一定程度的交叉反应而被检出。一种异常形式的 ADAM12 可能被指定为一种新的生物化学底物。

[0269] 21 三体症患病的病例也可以通过异常形式的 ADAM12 进行特征化, 在这些病例中, 本领域技术人员能够开发出这些异常形式的特异性抗体, 可能导致这些症候的检测效果的进一步加强。

[0270] 或者, 唐氏综合症患病的病例也可以通过断裂形式的 ADAM12 (或片段) 进行特征化, 其包括组成 ADAM12 的氨基酸的不完整的部分。本领域技术人员将理解的是, 如果分析中使用的抗原决定基存在于 ADAM12 片段中, 则用来测量 ADAM12 的分析法也会检测 ADAM12 片段。

[0271] 本发明不限于上述实施方式, 而是包括全部可能的实施方式和下述实施例中公开的标记物的联合。

[0272] 这里描述的涉及本发明的方法和 / 或分析法的全部特征, 也可以适用于涉及试剂盒和反之亦然的实施方式, 因此在一个实施方式中, 本发明涉及一种在本发明的分析法中使用的试剂盒。

[0273] 显然, 本发明的一个方面的优选特征和特性也适用于本发明的其他方面。

[0274] 因此本申请中引用的全部专利和非专利参照全部编入。

[0275] 整个说明书中, 词语“包括”或其变体“包括”或“包括”是指, 含有一种规定的成分、整体或步骤, 或者成分、整体或步骤的组, 但不排除其他成分、整体或步骤, 或成分、整体或步骤的组。

[0276] 以下, 将以非限定性的图和实施例的方式对本发明进行说明。

附图说明

[0277] 图 1 表示确定最适包被抗体的试验。使用单克隆抗体 (Mab) 8F8 和 6E6, 以及多克隆家兔抗体 (rb) 122 和 134 包被 ELISA 盘。所用的生物素化抗体为 6E6 (黑色柱) 或 8F8 (白色柱)。

[0278] 图 2 表示冷冻 - 解冻。反复冷冻和解冻后的血清样品的分析结果。

[0279] 图 3 表示 ADAM12 的标准曲线。使用 6E6 包被和 8F8 作为检测的生物素化抗体, 490-620nm 的吸收度标准曲线。

[0280] 图 4 表示血清中 ADAM12 的稳定性。静脉穿刺和离心后, 不同储存温度下 ADAM12 对时间的稳定性。

[0281] 图 5 表示早孕期 $\log_{10}$ ADAM12 对天数的分散图。黑三角是唐氏综合症的值。

[0282] 图 6 表示 MMTV-PyMT 和 MMTV-PyMT-ADAM12-S 转基因小鼠中明显肿瘤的出现。每个转基因品系中乳腺肿瘤最明显的年龄。也表示每个品系 (n) 被分析动物的数量。

[0283] 图 7 表示 MMTV-PyMT 和 MMTV-PyMT-ADAM12- Δ cyt 转基因小鼠中明显肿瘤的出现。

每个转基因品系中乳腺肿瘤最明显的年龄。也表示每个品系 (n) 被分析动物的数量。

[0284] 图 8 表示绝对肿瘤质量 (g)。与母代的 MMTV-PyMT 相比, MMTV-PyMT-ADAM12- Δ cyt 转基因小鼠具有显著更多的侵染性; $p = 0.015$ 。

[0285] 图 9 表示相对肿瘤负荷 (g 肿瘤组织 / 小鼠重量)。与母代的 MMTV-PyMT 相比, MMTV-PyMT-ADAM12- Δ cyt 转基因小鼠具有显著更多的侵染性; $p = 0.087$ 。

[0286] 图 10 表示绝对肿瘤质量 (g)。与母代的 MMTV-PyMT 相比, MMTV-PyMT-ADAM12-S 转基因小鼠具有显著更多的侵染性; $p = 0.012$ 。

[0287] 图 11 表示相对肿瘤负荷 (g 肿瘤组织 / 小鼠重量)。与母代的 MMTV-PyMT 相比, MMTV-PyMT-ADAM12-S 转基因小鼠具有显著更多的侵染性; $p = 0.014$ 。

[0288] 图 12 表示 MoMADAM12 对 MoMPAPP-A 的图。

[0289] 图 13 表示 $C. \log$ MoM PAPP-A 对 $\log$ MoM ADAM12 的分散图。实心三角表示唐氏综合症的值。

[0290] 图 14 表示 $\log$ MoMADAM12 对 $\log \beta$ -hCG 的分散图。

[0291] 图 15 表示早孕期筛查标记物 ADAM12、母亲年龄、 β -hCG、PAPP-A 和颈部半透明 (NT) 的联合的 ROC- 曲线分析。

[0292] 图 16 表示中孕期 ADAM12。ADAM12 浓度对孕龄的图。实心三角表示唐氏综合症的值。

[0293] 图 17 表示对照妊娠中 ADAM12 的中值和三次多项式样条函数。

[0294] 图 18 表示作为孕龄函数的 DS 妊娠的 ADAM12MoM 分布。

[0295] 图 19 表示无重量修正的早孕期 T21 的 $\log$ DAM12 和 $\log$ 游离 β MoMs 间的相关性。

[0296] 图 20 表示无重量修正的早孕期对照组的 $\log$ DAM12 和 $\log$ 游离 β MoMs 间的相关性。

[0297] 图 21 表示无重量修正的早孕期 T21 的 $\log$ DAM12 和 $\log$ PAPP-A MoM 间的相关性。

[0298] 图 22 表示无重量修正的早孕期对照组的 $\log$ DAM12 和 $\log$ PAPP-AMoM 间的相关性。

[0299] 图 23 表示早孕期 T21 的 $\log$ DAM12 和 Δ NT 间的相关性。

[0300] 图 24 表示早孕期对照组的 $\log$ DAM12 和 Δ NT 间的相关性。

[0301] 图 25 表示无重量修正的中孕期 T21 的 $\log$ DAM12 和 $\log$ AFPMoMs 间的相关性。

[0302] 图 26 表示无重量修正的中孕期对照组的 $\log$ DAM12 和 $\log$ AFPMoMs 间的相关性。

[0303] 图 27 表示无重量修正的中孕期 T21 的 $\log$ DAM12 和 $\log$ fBhcG MoMs 间的相关性。

[0304] 图 28 表示无重量修正的中孕期对照组的 $\log$ DAM12 和 $\log$ fBhcG MoMs 间的相关性。

[0305] 图 29 表示

[0306] A. 早孕期 18 三体症妊娠 $\log$ MoMADAM12 值分布状态的图形描述。

[0307] B. 早孕期 18 三体症妊娠 $\log$ MoMADAM12 值的盒须图。

[0308] 图 30 表示 18 三体症妊娠 $\log$ MoM ADAM12 值的常态概率图。

[0309] 图 31 表示

[0310] A. 中孕期 18 三体症妊娠 $\log$ MoM ADAM12 值分布状态的图形描述。

[0311] B. 中孕期 18 三体症妊娠 $\log$ MoM ADAM12 值分布状态的盒须图。

- [0312] 图 32 表示中孕期 18 三体症妊娠 log MoM ADAM12 值的常态概率图。
- [0313] 图 33 表示
- [0314] A. 早孕期 13 三体症妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的图形描述。
- [0315] B. 早孕期 13 三体症妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的盒须图。
- [0316] 图 34 表示早孕期 13 三体症妊娠 log MoM ADAM12 值的常态概率图。
- [0317] 图 35 表示
- [0318] A. 中孕期 18 三体症妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的图形描述。
- [0319] B. 中孕期 18 三体症妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的盒须图。
- [0320] 图 36 表示中孕期 13 三体症妊娠 log MoM ADAM12 值的常态概率图。
- [0321] 图 37 表示
- [0322] A. 早孕期 45X0 妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的图形描述。
- [0323] B. 早孕期 45X0 妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的盒须图。
- [0324] 图 38 表示早孕期 45X0 妊娠 log MoM ADAM12 值的常态概率图。
- [0325] 图 39 表示
- [0326] A. 中孕期 45X0 妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的图形描述。
- [0327] B. 中孕期 145X0 妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的盒须图。
- [0328] 图 40 表示中孕期 45X0 妊娠 log MoM ADAM12 值的常态概率图。
- [0329] 图 41 表示 log MoM ADAM12 值分布状态如下所示：
- [0330] A. 早孕期 NTSCA 妊娠 log MoM ADAM12 值分布状态的图形描述。
- [0331] B. A 中描述的数据的盒须图。
- [0332] 图 42 表示早孕期 NTSCA 妊娠 log MoM ADAM12 值的常态概率图。
- [0333] 图 43 表示
- [0334] A. 中孕期 NTSCA 妊娠 log MoM ADAM12 值的分布状态。
- [0335] B. A 中描述的中孕期 NTSCA 妊娠 log MoM ADAM12 数据分布状态的盒须图。
- [0336] 图 44 表示中孕期 NTSCA 妊娠 log MoM ADAM12 数据的常态概率图。
- [0337] 实施例
- [0338] 实施例 1
- [0339] 在早孕期,作为唐氏综合症的早孕期母体血清标记物的 ADAM12:
- [0340] ADAM12 的 ELISA 的开发和对于丹麦病人的临床评估。
- [0341] 材料和方法:
- [0342] 血清样品
- [0343] 正常样品。在丹麦,奥尔胡斯,skejby 大学医院,作为日常 DS 产前筛查计划的组成部分,从早孕期妊娠妇女 (n = 154) 获得血清样品。该计划专门针对 8 到 13 孕周的妇女,并包括超声检查。
- [0344] 通过国家血清研究所 (Statens Serum Institute) 的其他日常严重畸形和 DS 产前筛查计划获得中孕期血清样品 (n = 91)。该筛查计划限于 14 到 20 孕周的妇女。全部早孕期和中孕期的样品都被放在干燥容器中,并保持冷藏 (4°C),直至经正常邮寄的邮资。
- [0345] 从参加哥本哈根,Hvidovre 大学医院的一项 ADAM12 试验性研究的妇女中获得临产样品 (n = 10)。这些妇女为 38 到 40 孕周,并且在取样前全部为正常妊娠而没有产科并

发病。在国家血清研究所,一个外表健康的 28 孕周的受试者为储藏温度和血液容器的对照捐献了血液。临产样品和用于储藏温度和血液容器的对照的样品被离心并保存在 -20°C ,直到研究和 / 或分析的时间。

[0346] DS 样品。早孕期 DS 样品 ($n = 18$) 为,由作为该筛查计划即早孕期的结果的 Skejby 筛查计划的样品 ($n = 3$),和在中孕期期间 ($n = 10$) 或出生时 ($n = 5$) 诊断的国家血清研究所正在进行的质量控制计划的样品 ($n = 15$) 组成。

[0347] 中孕期血清 DS 样品 ($n = 12$) 全部来自国家血清研究所正在进行的质量控制计划,并由中孕期 ($n = 8$) 或出生时 ($n = 4$) 诊断的样品组成。

[0348] 全部 DS 诊断都是通过染色体分型建立的。孕龄通过最后一次月经的日期确定,在大多数病例中,其被超声检查证实。

[0349] 伦理

[0350] 全部样品或者是为奥尔胡斯或哥本哈根郡科学伦理委员会支持的项目而收集,或者是作为国家血清研究所正在进行的质量控制计划的组成部分而得到的。

[0351] 反应物

[0352] 用于标准化的重组 ADAM12-S 是通过用编码人 ADAM12-S 的全长 cDNA (GenBank AF023477) 转染人 293-EBNA 而获得的,并如 Loechele 等人 (2000) 所述,使用阳离子交换和刀豆球蛋白 A 亲和层析进行纯化。使用 BCA 分析确定蛋白质的浓度 (Price, Rockford IL)。

[0353] 抗体

[0354] 本研究中,几种抗重组 ADAM12 的前述抗体被检测:鼠 IgG 单克隆抗体 8F8, 6E6 和 6C10;和多克隆抗体 rb122 和 rb134 (Gilpin 等人, 1998, Iba 等人, 1999, Kawaguchi 等人, 2002, Kronqvist 等人, 2002)。以试验性研究为基础,比较全部抗体在 ELISA 中的效果, 6E6 和 8F8 分别用于包被和检测步骤。

[0355] 生物素化

[0356] 为了产生生物素化的抗体,使用 NAPTM5 柱 (Amersham Biosciences, Sweden),将 8F8IgG 转染入由 0.10.1M NaHCO_3 (pH8.2) (Merck, Darmstadt, Germany) 组成的标记缓冲液中。使用标记缓冲液作为参照,从 280nm 的吸收度计算该浓度。向该抗体中加入溶于 2.5ml 二甲基甲酰胺 (LabScan, Valby-Denmark) 的 100mg 生物素 (Sigma1759) 的混合液 (10 μl per mg)。在室温下搅拌 2 小时后,通过使用 PD-10 柱的凝胶过滤,纯化生物素化的抗体 (Amersham Biosciences, Sweden)。从 280nm 的吸收度计算生物素化的单克隆抗体的浓度。

[0357] 标准品和对照品

[0358] 从 0.15M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的 1% (v/v) 牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma A4503) 和 0.05% (v/v) Tween20 (Merck) 组成的稀释缓冲液中被稀释的中孕期混合血清制备对照品。本发明人校准了抵抗重组 ADAM12 的晚孕期混合血清,并利用该混合血清制作里用于确定 ADAM12 浓度的标准曲线。通过在稀释缓冲液中稀释该血清来制备范围从 42 至 667 $\mu\text{g/l}$ 的标准品。

[0359] 全部标准品,对照品和样品的分析均为双份进行。

[0360] ELISA 的程序,优化和测试

[0361] 在 0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 中,用 0.41 $\mu\text{g/l}$ 孔的单克隆抗体 6E6 覆盖微孔板 (Nunc-ImmunoTM 板, MaxiSorpTM 表面, Nalge Nunc International-Denmark)。4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育后

将板清洗两次。全部清洗步骤是使用由有 0.05% (v/v) Tween20 (Merck822184) 的 0.1MPBS 组成的清洗缓冲液进行的。向板上加入由清洗缓冲液中的 1% (v/v) BSA (SigmaA4503) 组成的缓冲液, 来阻止非特异性结合。室温下将该板在封闭缓冲液中孵育 30 分钟, 然后清洗 3 次。加入封闭缓冲液中稀释的标准品, 对照品和样品 ($100\ \mu\text{l}$ /孔), 在室温下孵育 2 小时, 然后清洗 4 次。加入生物素化单克隆抗体 8F8 ($0.5\ \mu\text{g/ml}$) 并将该板在室温下孵育 1 小时, 然后清洗 4 次。加入过氧化物酶联链霉抗生物素 (蛋白), 在室温下孵育 1 小时, 然后清洗 3 次。通过加入 $100\ \mu\text{l}$ /孔由邻苯二胺 (OPD) 片 (Kem-En-Tec, Copenhagen, Denmark) 和溶于柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 中的过氧化氢组成的溶液, 获得一种颜色反应, 并在室温下孵育 30 分钟。加入 $150\ \mu\text{l}$ (10% v/v) 硫酸来停止该颜色反应, 并通过光谱 (490–620nm) (Victor, PLS-Wallac, Turku, Finland) 测量该颜色反应的强度。为了评估分析内和分析间的可变性, 本发明人在同一操作中对相同样品进行了 6 次分析, 并连续 6 天重复相同操作。

[0362] ADAM12 的稳定性

[0363] 为了研究 ADAM12 的稳定性, 本发明人进行了反复的冷冻-解冻试验。该研究是使用晚孕期混合血清进行的, 并对各等量进行两次分析。重组 ADAM12 储存于 -20°C 。

[0364] 本发明人还研究了血清中 ADAM12 的温度稳定性。样品采自国家血清研究所的一个外表健康的受试者晚孕期静脉穿刺。离心后立即分离血清: 15 份室温保存, 10 份 4°C , 10 份 37°C 保存。全部样品在同一操作中分析。

[0365] 为了确定所使用的血液容器的类型, 本发明人分析了来自包含在 EDTA, 柠檬酸盐, 肝素和干燥血液容器的血清/血浆。全部样品得自静脉穿刺并在相同条件下处理。

[0366] 临床评估

[0367] 唐氏综合症: 为了研究作为 DS 筛查标记物的 ADAM12 浓度值, 本发明人将证实有 DS 妊娠的 ADAM12 值和相同孕龄的非 DS 妊娠的母体血清 ADAM12 浓度值进行了比较。由于只有 3 个早孕期 DS 样品是新近的并是与对照品一同采集的, 而 15 个病例在 -20°C 存放了近 7 年, 因此本发明人分别检查了 MoM 值。

[0368] PAPP-A 和 β 人绒毛膜促性腺激素 (β hCG) 对 ADAM12

[0369] 为了建立早孕期血清样品中的 ADAM12, PAPP-A 和 β hCG 之间的关系, 本发明人使用了来自 Skejby 筛查计划的 154 个未患病的和 3 个 DS 样品, 为此以前作为常规早孕期筛查计划的一部分进行了 PAPP-A 和 β hCG 分析。另外, 本发明人使用了 15 个来自国家血清研究所的 DS 样品, 进行了相同的 β hCG 和 PAPP-A 分析。

[0370] 整个妊娠的 ADAM12: 为了评估整个妊娠的血清中 ADAM12 水平变化, 本发明人使用了 154 个早孕期血清样品, 91 个中孕期血清样品和 10 个临产血清样品, 即全部未患病血清样品。

[0371] 统计学

[0372] 通过关于孕龄 (天数) 的 $\log_{10}$ ADAM12 浓度的线性衰减, 建立血清 ADAM12 浓度中值。通过最后一次月经的日期确定孕龄, 其在大多数病例中被超声检查 (CRL or BPD) 证实。所有浓度都被转换成未患病的妊娠妇女的中值倍数。使用正态图可知与正态分布的相容性。使用 Pearson 相关系数得到相关性。通过发表的 Monte Carlo 模拟方法 (Larsen 等人, 1998) 制造的接受者操作特征曲线 (ROC) 分析, 对 ADAM12 单独或与其他标记物联合的筛查效率进行评估。使用妊娠妇女的标准化年龄分布 (Van der Veen 等人, 1997)。给出了出生 DS

孩子的预先的、年龄相关的风险取自 Cuckle 等人 (1987)。标记物 PAPP-A, β hCG 和颈部半透明 (NT) 的分布参数取自己公布的后设分析 (meta-analysis) (Cuckle&van Lith1999)。

[0373] 结果

[0374] ADAM12ELISA 和稳定性

[0375] 图 1A 表示单克隆抗体 6E6and8F8 的包被导致最大吸收。当 8F8 用作包被抗体时,背景水平高,因此本发明人在使用 6E6 作为被吸附在聚苯乙烯孔上的捕捉抗体,8F8 作为生物素化的检测器抗体。ADAM12ELISA 分析范围为 42-667 μ g/l (图 1B)。变化的分析内和分析间的系数分别是 5%和 13%。重组 ADAM12 标准品和妊娠血清的稀释曲线为线性并平行。

[0376] 储存于 -20°C 的重组 ADAM12 在大约 4 个月后开始降解。 -20°C 储存 6 个月后没能检测到血清中 ADAM12 的降解。本发明人发现,ADAM12 在经历至少 8 个冷冻和解冻的循环中是稳定的 (图 1C)。室温下 42 小时血清样品是稳定的,储存在 4°C ,则延长到 4 天 (图 1D)。存放于不同血液容器中的血浆样品的分析表示,血浆中被置于 EDTA 容器容器中的 ADAM12 几乎不能被检测到。关于可检测的血清 ADAM12 水平,肝素和柠檬酸容器与干燥容器是等效的。

[0377] 妊娠中的 ADAM12

[0378] 本发明人发现,整个妊娠中,血清 ADAM12 增加近 60 倍。8 孕周的中值是 180 μ g/l,而正常妊娠的临产中值是 12,000 μ g/l。154 例早孕期血清样品显示,随孕龄的显著增加。由于早孕期随孕龄的增长率在 10 周后降低,但本发明人完成了 2 个 log 线性衰减:一个是小于等于 70 天孕龄的样品,另一个是大于 70 天孕龄。Log 线性衰减导致中值为 8 周 180 μ g/l,9 周 262 μ g/l,10 周 383 μ g/l 和 11 周 450 μ g/l (图 2)。这里没有对从 10-14 周的孕龄期限详细描述,并且下面提及的结果表示,实际上,ADAM12 从 11 到 15 周减少,然后增加至临产的高浓度。中孕期血清样品 ($n = 91$) 分析和线性衰减表示,中值 14 周 592 μ g/l,15 周 630 μ g/l,16 周 670 μ g/l 和 17 周 712 的更低的增长率。其余为正常分布。临产血清 ($n = 10$) 分析显示中值 12,000 μ g/l。

[0379] 本发明人发现了,早孕期 log MoM ADAM12 与 log MoM PAPP-A 之间 ($r = 0.25$, $p < 0.01$) 和 log MoM ADAM12 与 log MoM β hCG 之间 ($r = 0.16$, $p < 0.05$) 的显著的相关性,但 log MoM ADAM12 与母体年龄 ($r = 0.05$, $p > 0.05$) 或颈部半透明 ($p > 0.05$) 之间没有相关性。早孕期 log MoM ADAM12 浓度分布均值 log MoM 为 0.00 且标准差为 0.28,与高斯分布是一致的。

[0380] 唐氏综合症妊娠的 ADAM12

[0381] 来自证实有 DS 妊娠的早孕期血清样品 ($n = 18$) 的分析显示 ADAM12 浓度降低,即在 0 和 246 μ g/l 之间 (图 2)。MoM 值为 0.14 (0.01-0.76)。早孕期样品的储备补充物的平均 MoM 为 0.17,来自早孕期筛查计划的样品的平均 MoM 为 0.29。相应的 PAPP-AMoM 值为 0.36 (0.02-1.04)。在患病的妊娠 ($n = 18$) 中,logMoMADAM12 均值 -1.28,标准差 0.78,显著低于 ($p < 0.001$) 正常妊娠。

[0382] 图 1 说明了,在生产 DS 孩子的风险临界值 1:200 和 1:400 时,与其他早孕期筛查标记物联用的 ADAM12 估测的高筛查结果。

[0383] 表 1 在临界值水平 1:200 和 1:400 时的不同筛查标记物的筛查结果

[0384]

标记物	风险 >1:200		风险 >1:400	
	DR	SPR	DR	SPR
ADAM12 & 年龄	77.7	1.5	81.5	3.2
PAPP-A & 年龄	52.3	5.1	66.2	11.2
βhCG & 年龄	42.4	5.1	59.9	12.9
NT & 年龄	67.4	2.8	74.3	5.9
ADAM12 & 年龄 & βhCG	82.8	1.5	86.3	3.1
ADAM12 & 年龄 & βhCG & PAPP-A	85.4	1.6	88.7	3.0
ADAM12 & 年龄 & βhCG & PAPP-A & NT	92.4	0.8	94.1	1.5

[0385] 实施例 2

[0386] 肿瘤小鼠

[0387] 材料和方法

[0388] 为了产生乳腺特异性 ADAM12 的转基因表达,我们使用了 MMTV-Sv40-Bssk 载体 (小鼠乳腺癌病毒 (MMTV) 长末端重复启动子 / 增强子 (LTR) 的被修饰的版本。全长 ADAM12-S cDNA, 和缺少胞质端的全长 ADAM12 (ADAM12-Δcyt) 的被剪切的版本分别被克隆入 MMTV-Sv40-Bssk 载体。使用 PvuI and SpeI 限制性内切酶切除无载体的 MMTVADAM2-S 和 MMTVADAM12Δ-cyt 片段。这些片段用于,按照标准程序 (Hogan B, Beddington R, Costantini F and Lacy E: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. CSHL Press, 1994), 通过将线性化启动子转基因盒显微注射入从超数排卵的捐赠者小鼠中分离的受精卵的雄性前核, 形成转基因小鼠。将具有繁殖性的胚胎注入代孕的接受者并使其发育至足月。为了产生 ADAM12-S, 捐赠者和接受者均使用 B6CBAF1 (C57B1/6j X CBAF1) 小鼠。为了产生 ADAM12-Δcyt 小鼠, 使用先天的小鼠品系 FVB/n。

[0389] 在 MMTV-LTR 转录控制下的胸腺中表达 PyV 中部 T (PyV middle T) (PyMT) 的杂交转基因 FVB/N-TgN (MMTVPyVT) 634Mu1 小鼠是从 Jackson 实验室获得的。这些小鼠在小鼠乳腺癌病毒长末端重复启动子 / 增强子 (LTR) 的控制下表达有活性的多瘤病毒 Middle T 致癌基因, 并自发地在肺中发生多病灶乳腺癌和转移的肿瘤 (Aldaz CM et al Carcinogenesis 17:2069-2072, 1996)。使 PyMT 雄鼠 (FVB) 与 MMTVADAM12-S 和 MMTVADAM12-Δcyt 鼠系的雌鼠交配。其后代包括新的独特的鼠系并形成 PyMT, MMTV-PyMT-ADAM12-S, 和 MMTV-PyMT-ADAM12Δcyt 组。

[0390] 每周两次观察交配得到的后代雌鼠的明显肿瘤的存在情况。记录出现胸腺肿瘤基因的年龄。记录未患病小鼠的数量作为年龄函数。使用两脚规测量肿瘤。将全部雌鼠在 12 周时进行无痛处死。切下肿瘤并称重, 测量长、宽、高 (cm³)。评价绝对和相对的肿瘤负荷 (分别为, g 肿瘤组织和 g 肿瘤组织 / 小鼠重量)。全部试验为按照丹麦动物 Inspectorate 的动物试验指南来指导的。

[0391] 实施例 3

[0392] ADAM12 的自动时间分辨荧光免疫分析法的开发

[0393] 程序

[0394] 如上所述使用相同反应物, 即, 使用生物素化抗体 8F8 和 6E6 包被和检测, 标准品为转染的人 293-EBNA 细胞产生的重组 ADAM12-S, 建立一种 ADAM12 时间分辨荧光免疫

分析法：在 0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 中用 0.41 μ g/孔的单克隆抗体 6E6 包被微孔板 (Nunc-Immuno™ Plate, MaxiSorp™ Surface, Nalge Nunc International-Denmark)。4℃ 过夜孵育后将板清洗两次。所有清洗步骤都是使用清洗缓冲液 (Delfia Wash Solution; Perkin-Elmer, Turku, Finland) 完成的：向每孔中加入由溶于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的 15g/L 牛血清白蛋白 (A4503, Sigma) 和 25g/L 蔗糖组成的干燥缓冲液 (150 μ L/well)。将这些板在室温下孵育 1 小时，抽吸，并在用封条密封和 4℃ 储存前，在 4℃ 下过夜干燥。除去封条后，将该板放在自动分析编程的自动时间分辨荧光免疫分析仪中，进行以下操作：1. 加入在多元缓冲液 (Perkin-Elmer) 中适当稀释的标准品和对照品，以及未稀释的临床血清样品，100 μ L/孔。室温孵育 2 小时并在清洗缓冲液 (Perkin Elmer) 中清洗 4 次。2. 以 100 μ L/孔，加入在多元缓冲液 (Perkin Elmer) 中适当稀释（取决于生物素化和纯化的质量）的生物素化 8F8，室温孵育 1 小时并清洗 4 次。3. 以 100 μ L/孔，加入 1:1000 多元缓冲液 (Perkin Elmer) 稀释的钨标记的链酶抗生物素（蛋白），室温孵育 1 小时，然后清洗 3 次。4. 以 200 μ L/孔加入加强溶液 (Perkin Elmer)，并记录荧光 10 分钟。

[0395] 使用 log- 样条函数通过自动时间分辨荧光免疫分析系统制作标准曲线。使用标准曲线计算浓度值。每次操作中的对照品为，使用通过多元缓冲液 (Perkin Elmer) 稀释产生的 161 μ g/L, 319 μ g/L 和 714 μ g/L 的对照品。

[0396] 特征描述

[0397] 重组 ADAM12-S 和妊娠血清的稀释曲线为线性且平行。均值校正为 113%（范围：106% -120%），并且在 119 μ g/L 和 356 μ g/L 之间该标准曲线为线性（斜率：0.91-1.00）。标准（测量）范围为 78-1248 μ g/L。灵敏度为 2.5-5 μ g/L。测量范围可以扩大到 5 μ g/L。对照品水平的分析内变化为 5.6%，8.5% 和 10.7%，分别是低，中和最高，分析间变化分别为 13.3%，10.9% 和 16.0%。

[0398] 实施例 4

[0399] 作为先兆子痫的 ADAM12

[0400] 妊娠妇女血清样品是从哥本哈根早孕期筛查研究计划收集的样品中获得的。160 个样品是从后来发生先兆子痫的妊娠妇女中获得的，并且所有的妇女都满足两个标准之一：以前血压正常的妇女中收缩压 >140mm Hg 且舒张压 >90mm Hg 或者在人身期间舒张压 >20mm Hg 的增长。324 个来自简单妊娠妇女的样品作为对照品进行分析。临床和妊娠结果数据为，从哥本哈根早孕期筛查研究的文件中得到。如上所述，使用 ADAM12 自动时间分辨荧光免疫分析仪对 ADAM12-S 进行分析。使用 ADAM12 浓度值对孕龄天数的 log 线性衰减，将全部浓度值转换为 MoM 值。

[0401] 结果

[0402] 在先兆子痫病人中，平均 log MoMADAM12 为 -0.066（范围：-1.009-0.441），显著低于 ($p = 0.008$) 正常妊娠的平均 logMoMADAM12 值 0.001（范围：-1.071-0.508）。

[0403] 结论

[0404] 先兆子痫中低水平的 ADAM12 使得 ADAM12 成为一种有用的先兆子痫标记物。

[0405] 实施例 5

[0406] 早孕期和中孕期唐氏综合症妊娠中的 ADAM12-British 研究

[0407] 材料和方法

[0408] 使用胎儿医学协会管理的实验室在英国的生物化学筛查中提及的来自包括 226 例 10-14 周唐氏综合症病例和 89 例中孕期唐氏综合症病例的妊娠妇女的样品,来研究 ADAM12MoM 数值在唐氏综合症中的分布。使用典型的对照品来建立 MoM 在正常妊娠中的分布。通过上述的免疫荧光检测方法来量化 ADAM12。随年龄增长单独使用 ADAM12 或与其他标记物的联合使用,通过 Larsen 等人,1998 和 Laigaard 等人,2003 描述的 Monte Carlo 模拟来评价筛查效果。

[0409] 结果

[0410] 图 1 表示 80 天 (11-12 周)-130 天 (18-19 周) 的 ADAM12 浓度中值的分布。其水平减少,直至 16 周,然后增加。通过如图 1 所示的三次多项式样条函数,正常样品得到了最佳描述。使用回归中值 MoMs 计算唐氏综合症中的 MoM,并且个体病例的分布作为孕龄的函数表示在图 2 中。从图中可以看到,早孕期的初期,ADAM12MoM 数值大大减少,早孕期后期更少,并在中孕期增加。在整个早孕期,平均 MoM 值为 0.79,中孕期为 1.79。84 天前采取的 21 三体症样品 ($n = 43$) 的平均 $\log\text{MoM}(\text{SD})$ 是 $-0.311(0.3186)$,对照组 ($n = 152$) 为 $0.015(0.3030)$ 。84 天之前,使用 1:100 的出生 DS 孩子的风险临界值,将 DS 胎儿的检出率 (DR) 评估为对于 1.4% 的假阳性率 (FPR) 的 18%。对于风险临界值 1:250 和 1:400,DR(FPR)s 分别是 36% (6.0%) 和 48% (12%)。在孕龄 84-97 天,DS 妊娠 ($n = 172$) 的 ADAM12 和对照组妊娠 ($n = 341$) 之间没有显著残别。在中孕期,21 三体症妊娠 ($n = 87$) 的平均 $\log\text{MoM}(\text{SD})$ 是 $0.257(0.2437)$,对照组妊娠 ($n = 341$) 为 $0.027(0.4136)$ 。对于风险临界值 1:100,1:250 和 1:400,评估的 DR(FPR)s 分别是 17% (1.4%),34% (5.5%) 和 46% (11%)。

[0411] 结论

[0412] 对于胎儿唐氏综合症,ADAM12 是一种良好的母体血清标记物,特别是在早孕期和中孕期。ADAM12 补充 PAPP-A, β hCG 和 NT,并能够与它们结合后被有效利用。

[0413] 实施例 6

[0414] 作为 18 三体症母体血清标记物的 ADAM12-Danish 研究。

[0415] 材料和方法

[0416] 来自有 18 三体症的早孕期妊娠妇女的血清是从哥本哈根国家血清研究所的生物库得到的。154 例有正常结果的妊娠用作对照组。孕龄和其他信息是从投稿论文提供的信息中得到的。使用上述的 ELISA 量化血清中的 ADAM12。

[0417] 结果

[0418] 18 三体症妊娠的 ADAM12 明显减少,在早孕期最为明显。与对照组 1.0 相比,MoM 中值是 0.29。

[0419] 结论

[0420] ADAM12 是早孕期胎儿 18 三体症的标记物。

[0421] 实施例 7

[0422] 作为 18 三体症母体血清标记物的 ADAM12-British 研究

[0423] 材料和方法

[0424] 使用胎儿医学协会管理的实验室在英国的生物化学筛查中提及的来自包括早孕期和中孕期的 143 例 18 三体症病例和 730 例对照组妊娠的妊娠妇女的样品,来研究

ADAM12MoM 数值在 18 三体中的分布。使用典型的对照品来建立 MoM 在正常妊娠中的分布。通过上述的免疫荧光检测方法来量化 ADAM12。

[0425] 结果

[0426] 早孕期 18 三体症妊娠 (n = 131) 的母体血清 ADAM12 平均 logMoM(SD) 是 -0.097(0.2661), 中孕期 18 三体症妊娠 (n = 12) 为 0.312(0.2607)。

[0427] 早孕期 18 三体症妊娠 logMoM ADAM12 值分布描述如下：

[0428] 早孕期 18 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值分布的图形描述如图 29A 所示。

[0429] 早孕期 18 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值的盒须图如图 29B 所示。

[0430] 早孕期 18 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值的常态概率图如图 30 所示。

[0431] 图 29B 的重要分布数据

[0432]

中值	-0,080
96.4% CI	-0,149 ~-0,042
范围	1,510756823
IQR	0,352862873
百分点	
2,5th	-0,719
25th	-0,263
50th	-0,080
75th	0,090
97,5th	0,425

[0433] 具有 log MoMADAM12 常态分布的依从性的统计分析

[0434]

	系数	p
Shapiro-Wilk 检验法	0,9869	0,2464
偏斜度	-0,3574	0,0907
峰度	0,5319	0,2079

[0435] 中孕期 18 三体症妊娠 logMoMADAM12 值分布如图 31 和以下所述：

[0436] 中孕期 18 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值分布的图形描述如图 31A 所示。

[0437] 中孕期 18 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值的盒须图如图 31B 所示。

[0438] 图 31B 中给出的分布的概率统计

[0439]

中值	0,318
96.1% CI	0,102 ~0,547
范围	0,921011306
IQR	0,401414338
百分点	
2,5th	-
25th	0,137
50th	0,318
75th	0,539
97,5th	-

[0440] 中孕期 18 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值的常态概率图如图 30 所示。

[0441] 具有 18 三体症妊娠 log MoMADAM12 值常态分布的依从性检测

[0442]

	系数	p
Shapiro-Wilk 检验法	0,9578	0,7524
偏斜度	-0,6157	0,3185
峰度	0,4025	-

[0443] 结论

[0444] ADAM12 在早孕期 18 三体症妊娠中适度减少,在中孕期 18 三体症妊娠中显著减少。ADAM12 是早孕期和中孕期胎儿 18 三体症的标记物。

[0445] 实施例 8

[0446] 作为 13 三体症母体血清标记物的 ADAM12-British Study

[0447] 材料和方法

[0448] 使用胎儿医学协会管理的实验室在英国的生物化学筛查中提及的来自包括早孕期和中孕期的 66 例 13 三体症病例和 730 例对照组妊娠的妊娠妇女的样品,来研究 ADAM12MoM 数值在 13 三体症中的分布。使用典型的对照品来建立 MoM 在正常妊娠中的分布。通过上述的免疫荧光检测方法来量化 ADAM12。

[0449] 结果

[0450] 早孕期 13 三体症妊娠 ($n = 60$) 的母体血清 ADAM12 平均 logMoM(SD) 是 $-0.221(0.356)$,中孕期 13 三体症妊娠 ($n = 6$) 为 $0.170(0.1853)$ 。

[0451] 早孕期:

[0452] 早孕期 13 三体症妊娠 logMoM ADAM12 值分布描述如下:

[0453] 早孕期 13 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值分布的图形描述如图 33A 所示。

[0454] 早孕期 13 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值的盒须图如图 33B 所示。

[0455] 图 33B 中给出的分布的概率统计

[0456]

中值	-0,175
97.3% CI	-0,265 ~ -0,035
范围	1,649930727
IQR	0,358247671
百分点	
2,5th	-1,164
25th	-0,359
50th	-0,175
75th	-0,001
97,5th	0,370

[0457] 早孕期 13 三体症妊娠 Log ADAM12MoM 值的常态概率图如图 34 所示。

[0458] 具有 13 三体症妊娠 log MoMADAM12 值常态分布的依从性检测

[0459]

	系数	p
Shapiro-Wilk 检验法	0,9292	0,0018
偏斜度	-0,9434	0,0045
峰度	0,8874	0,1605

[0460] 中孕期:

- [0461] 中孕期 13 三体症妊娠 logMoMADAM12 值分布描述如下：
- [0462] 中孕期 13 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值分布的图形描述如图 35A 所示。
- [0463] 中孕期 13 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值的盒须图如图 35B 所示。
- [0464] 图 35B 中给出的分布的概率统计
- [0465]

中值	0,160
96.9% CI	-0,087 ~0,426
范围	0,513107653
IQR	0,162221942
百分点	
2,5th	-
25th	0,065
50th	0,160
75th	0,227
97,5th	-

- [0466] 中孕期 13 三体症妊娠 LogADAM12MoM 值的常态概率图如图 36 所示。
- [0467] 具有 13 三体症妊娠 log MoMADAM12 值常态分布的依从性检测
- [0468]

	系数	P
Shapiro-Wilk 检验法	0,9918	0,9931
偏斜度	0,0396	-
峰度	-0,6852	-

- [0469] 结论
- [0470] ADAM12 在早孕期和中孕期 13 三体症妊娠中减少。ADAM12 是早孕期和中孕期胎儿 13 三体症的标记物。
- [0471] 实施例 9
- [0472] 作为特纳氏综合症母体血清标记物的 ADAM12-British Study
- [0473] 材料和方法
- [0474] 使用胎儿医学协会管理的实验室在英国的生物化学筛查中提及的来自包括早孕期和中孕期的 83 例特纳氏综合症病例和 730 例对照组妊娠的妊娠妇女的样品, 来研究 ADAM12MoM 母体血清数值在胎儿特纳氏综合症中的分布。使用典型的对照品来建立 MoM 在正常妊娠中的分布。通过上述的免疫荧光检测方法来量化 ADAM12。
- [0475] 结果
- [0476] 早孕期特纳氏综合症妊娠 (n = 77) 的母体血清 ADAM12 平均 logMoM(SD) 是 -0.177 (0.3195), 中孕期特纳氏综合症妊娠 (n = 6) 为 0.172 (0.1853)。
- [0477] 以下的图描述早孕期 45X0 妊娠分布状况：
- [0478] 早孕期 45X0 妊娠 Log ADAM12MoM 值分布的图形描述如图 37A 所示。
- [0479] 早孕期 45X0 妊娠 Log ADAM12MoM 值的盒须图如图 37B 所示。
- [0480] C. 图 37B 表示的分布的概率统计
- [0481]

中值	-0,128
96.0% CI	-0,255 ~-0,075
范围	1,530624082
IQR	0,345376449
百分点	
2,5th	-0,916
25th	-0,353
50th	-0,128
75th	-0,007
97,5th	0,466

[0482] 早孕期 45X0 妊娠 LogADAM12MoM 值的常态概率图如图 34 所示。

[0483] E. 具有早孕期 45X0 妊娠 log MoMADAM12 值常态分布的依从性检测

[0484]

	系数	p
Shapiro-Wilk 检验法	0,9747	0,1270
偏斜度	-0,3497	0,1940
峰度	0,4210	0,3610

[0485] 中孕期：

[0486] 中孕期 45X0 妊娠 logMoMADAM12 值分布描述如下：

[0487] 中孕期 45X0 妊娠 LogADAM12MoM 值分布如图 39A 所示。

[0488] A 的分布数据盒须图如图 39B 所示。

[0489] C. 图 39B 的重要统计学参数

[0490]

中值	0,163
96.9% CI	-0,143 ~0,494
范围	0,637059543
IQR	0,352161268
百分点	
2,5th	-
25th	-0,020
50th	0,163
75th	0,332
97,5th	-

[0491] 中孕期 45X0 妊娠 LogADAM12MoM 值的常态概率图如图 40 所示。

[0492] E. 具有中孕期 45X0 妊娠 log MoMADAM12 值常态分布的依从性检测

[0493]

	系数	p
Shapiro-Wilk 检验法	0,9126	0,4537
偏斜度	0,0384	-
峰度	-2,2991	-

[0494] 结论

[0495] ADAM12 在早孕期特纳氏综合症妊娠中减少,并在中孕期特纳氏综合症妊娠中增加。ADAM12 是早孕期和中孕期胎儿特纳氏综合症的标记物。

[0496] 实施例 10

[0497] 作为非特纳氏性染色体异常 (NTSCA), 例如 47XXX, 47XXY, 47XYY 母体血清标记物的 ADAM12-British Study

[0498] 材料和方法

[0499] 使用胎儿医学协会管理的实验室在英国的生物化学筛查中提及的来自包括早孕期和中孕期的 37 例 NTSCA 病例和 730 例对照组妊娠的妊娠妇女的样品, 来研究 ADAM12MoM 母体血清数值在 NTSCA 中的分布。使用典型的对照品来建立 MoM 在正常妊娠中的分布。通过上述的免疫荧光检测方法来量化 ADAM12。

[0500] 结果

[0501] 早孕期 NTSCA 妊娠 ($n = 24$) 的母体血清 ADAM12 平均 $\log\text{MoM}(\text{SD})$ 是 $-0.238(0.3223)$, 中孕期特纳氏综合症妊娠 ($n = 13$) 是 $0.212(0.1202)$ 。

[0502] Log ADAM12MoM 值分布如下所示:

[0503] 早孕期 NTSCA 妊娠 LogADAM12MoM 值分布的图形描述如图 41A 所示。

[0504] 早孕期 NTSCA 妊娠 LogADAM12MoM 值的盒须图如图 41B 所示。

[0505] 图 41B 的早孕期 NTSCA 妊娠 LogADAM12MoM 的重要统计学参数

[0506]

中值	-0,215
97.7% CI	-0,339 ~ -0,101
范围	1,732529106
IQR	0,282772361
百分点	
2,5th	-
25th	-0,365
50th	-0,215
75th	-0,082
97,5th	-

[0507] 早孕期 NTSCA 妊娠 LogADAM12MoM 值的常态概率图如图 42 所示。

[0508] 5. 具有常态分布的早孕期 $\log\text{MoM}$ ADAM12 值的依从性检测

[0509]

	系数	p
Shapiro-Wilk 检验法	0,9389	0,1542
偏斜度	-0,2236	0,6164
峰度	2,8927	0,0259

[0510] LogADAM12MoM 值的中孕期分布描述如下:

[0511] 中孕期 NTSCA 妊娠 LogADAM12MoM 值分布如图 43A 所示。

[0512] 中孕期 NTSCA 妊娠 LogADAM12MoM 值数据盒须图如图 43B 所示。

[0513] 图 43B 的重要统计学参数

[0514]

中值	0,182
97.8% CI	0,083 ~0,329
范围	0,351877697
IQR	0,163993273
百分点	
2,5th	-
25th	0,142
50th	0,182
75th	0,306
97,5th	-

[0515] 中孕期 NTSCA 妊娠 LogADAM12MoM 值的常态概率图如图 44 所示。

[0516] 具有中孕期 45X0 妊娠 log MoMADAM12 值常态分布的依从性检测

[0517]

	系数	p
Shapiro-Wilk 检验法	0,9414	0,4747
偏斜度	0,0926	0,8743
峰度	-1,2736	-

[0518] 结论

[0519] ADAM12 在早孕期 NTSCA 妊娠中明显减少,并在中孕期 NTSCA 中显著增加。ADAM12 是早孕期和中孕期胎儿 NTSCA 的标记物。

[0520] 实施例 11

[0521] 与其他血清学标记物和 NT(在 11-13 周被确定的)和母体年龄联合作为早孕期标记物的 ADAM12

[0522] 如果与其他血清学的(早孕期 PAPP-A, β hCG, proMBP 或 SP1)和超声(颈部半透明 (NT) 和鼻骨和其他生物统计学特征)标记物结合使用,则 ADAM12 作为 21 三体症的效率大大增强。

[0523] 结果

[0524] 84 天前采取的 21 三体症样品 (n = 43) 平均 logMoM(SD) 是 -0.311(0.3186), 对照组 (n = 152) 为 0.015(0.3030)。早孕期标记物之间的相关性如图 19-24 所示:

[0525] 颈部半透明和母体年龄之间没有相关性(见图 23):

[0526] 下表总结了早孕期的不同症状中 ADAM12 和 PAPP-A 和游离 β -hCG 与对照组之间的相关性

[0527]

试验	早 孕 期 Log ADAM 12 和 Log PAPP-A/ β hCG 之间的相关性
----	--

[0528]

类型	ADAM 12 vs.	x	R ²	± r
T21	PAPP	0,2036	0,0631	0,2512
T21	fBhCG	0,0386	0,0024	0,0490
T18	PAPP	0,2114	0,0368	0,1918
T18	fBhCG	0,1108	0,0088	0,0938
T13	PAPP	0,5044	0,1293	0,3596
T13	fBhCG	0,0641	0,0078	0,0883
特纳氏症	PAPP	0,2081	0,0574	0,2396
特纳氏症	fBhCG	0,0071	4,E-05	0,0063
对照	PAPP	0,2362	0,1047	0,3236
对照	fBhCG	0,0452	0,0039	0,0624

[0529] 不同症状中 Δ NT 和 ADAM12 的相关性：

[0530]

类型	ADAM 12 vs.	x	R ²	± r
对照	Δ NT	-0,1277	0,0120	0,1095
T13	Δ NT	1,1253	0,0300	0,1732
T18	Δ NT	-1,6464	0,0254	0,1594
T21	Δ NT	0,9229	0,0228	0,1510
特纳氏症	Δ NT	4,1292	0,1111	0,3333

[0531] 孕龄 84 前的早孕期评估效果的结果

[0532] 通过结合其他标记物确定 ADAM12 在早孕期 (<12 周) 的效果 -British 研究

[0533] 风险临界值 1:100 1:250 1:400

[0534] DR(%) FPR(%) DR(%) FPR(%) DR(%) FPR(%)

[0535] 标记物

[0536] ADAM12+ 年龄 29 21 49 7.0 60 126

[0537] ADAM12+ 双测试 59 22 73 5.7 79 8.9

[0538] ADAM12+ 双测试 +NT 78 1.1 85 27 88 4.3

[0539] 根据 Larsen 等, J Med Screen1998, 5:57 ~ 62 中描述的进行 DR 检测率以及 FPR 假阳性率评估

[0540] 结论：

[0541] 当与其他早孕期标记物结合使用时，ADAM12 是有效的早孕期初期 21 三体症标记物。这是该标记物首选的用途。

[0542] 实施例 12

[0543] 与其他血清学标记物和母体年龄联合作为中孕期 21 三体症标记物的 ADAM12

[0544] 如果与其他血清学的（中孕期 AFP 和 β hCG）和可能的超声标记物结合使用，则 ADAM12 作为 21 三体症的效率大大增强。

[0545] 结果

[0546] 在中孕期，21 三体症样品 ($n = 87$) 平均 $\log\text{MoM}(\text{SD})$ 是 0.257 (0.2437)，对照组 ($n = 341$) 为 0.027 (0.4136)。中孕期标记物之间的相关性如图 25-29 所示：

[0547]

中孕期 Log ADAM 12 和 Log AFP/fBhCG 之间的相关性

[0548]

类型	ADAM 12 vs.	x	R ²	$\pm r$
T21	AFP	0,0687	0,0061	0,0781
T21	fBhCG	-0,0789	0,0054	0,0735
对照	AFP	0,0348	0,0086	0,0927
对照	fBhCG	0,1034	0,0208	0,1442

[0549] 通过结合其他标记物确定 ADAM12 在中孕期 (>13 周) 的效果 -British 研究

[0550] 风险临界值 1 :100 1 :250 1 :400

[0551] DR(%) FPR(%) DR(%) FPR(%) DR(%)

FPR(%)

[0552] 标记物

[0553] ADAM12+ 年龄 29 21 49 7.0 60 126

[0554] ADAM12+AFP+ Δ CG 78 1.1 85 27 88 4.3

[0555] 根据 Larsen 等, J Med Screen1998,5:57 ~ 62 中描述的进行 DR 检测率以及 FPR 假阳性率评估

[0556] 数据来自 Rode 等, Prenat Dagn2003,593 ~ 598。

[0557] 结论：

[0558] 当与其他中孕期标记物结合使用时，ADAM12 是有效的 21 三体症中孕期母体血清标记物。这是该标记物首选的用途。

[0559] 实施例 13

[0560] 先兆子痫中的 ADAM12-British 研究

[0561] 在 Harold Wood 医院（埃塞克斯）和胎儿医学中心（伦敦），在一站式风险评估 (OSCAR)¹⁸ 中，利用胎儿颈部半透明和母体血清游离 β -hCG 和 PAPP-A，对全部妊娠妇女给与 21 三体症筛查。评估时将人口统计学特征，超声结果和生物化学检测结果输入计算机数据库。常规分析后，全部样品储存于 -20℃。

[0562] 一项鉴别所有单个妊娠的研究由数据库组成，其与早孕期筛查结合。然后研究这些病人每人的医院记录和产房记录，以鉴别受先兆子痫困扰的妊娠和获得分娩细节。先兆

子痫定义为,没有已患高血压或肾脏疾病的妇女在任意时刻的舒张压为 110mmHg 以上或间隔 4 小时的连续两个时刻的舒张压为 90mm Hg,并且在 24 小时收集的尿中存在多于 300mg 总蛋白或在试剂带上存在 1+ 白蛋白。²⁰ 共 67 个病例被鉴定,基于 35 周前分娩的需要,其中 33 例被鉴定为严重。作为对照组,一系列与孕龄和储存时间相匹配的病例与用于使用时间分辨荧光免疫检测的 ADAM12 分析的病例一同被得到。

[0563] 此外,作为研究实验的一部分,引入尿道多普勒测量,在 23-24 孕周多普勒检查时收集 75 个对照样品和 12 个 PET 病例。这些样品也用于分析 ADAM12。

[0564] 结果

[0565] 早孕期收集的病例组中,全部先兆子痫组的中值 MoMADAM12 低于正常的中值 MoM0.90。在严重先兆子痫组中,该中值甚至更低至 0.75MoM。在 23-24 周的病例中,先兆子痫组的中值 MoM 稍高于正常的中值 MoM1.14。

[0566] 结论:

[0567] 这些结果证实了例 4 中给出的数据。而且,ADAM12 可能也是中孕期先兆子痫的有用标记物。

[0568] 实施例 14

[0569] 不依赖孕龄的 ADAM12 值的计算

[0570] 由于在相同孕龄妊娠的 ADAM12 的明显变化和 ADAM12 随年龄的增长,因此几乎不能使用血清中 ADAM12 的绝对浓度作为标记物。这是通过表达 ADAM12 的母体血清水平 - 以任何直接或间接确定 - 作为妊娠的同一时间的正常妇女中被期待的水平的函数。孕龄可以表达为最后依次月经后的天数,作为胎儿生物统计学标记物或其他适于表现 ADAM12 随妊娠发展的变化的事物。

[0571] 制作独立于孕龄的 ADAM12 数值的一种方式,是使用特定孕龄的中值倍数,例如通过计算每周或每天的实验式中值。或者,可以使用其他与孕龄相关的标记物,例如冠臀长和二顶骨直径计算实验式中值。后者是 ADAM12 的优选用途。

[0572] 实施例 15

[0573] 作为 21 三体症和 18 三体症 10-12 孕周标记物的 ADAM12-Leeds Study

[0574] 本研究的目的是建立作为孕龄期 10-12 周的 21 三体症和 18 三体症母体血清标记物的性能,而以前的研究表示 ADAM12 的该识别能力可以被忽略。

[0575] 在 268 例对照妊娠和 20 例样品中,使用荧光免疫分析来确定 ADAM12 浓度。

[0576] 21 三体症 (n = 16) 和 18 三体症 (n = 4)。在利兹的筛查中心收集样品,于 -20℃ 储存,并且按储存时间的长短和冷冻 - 解冻循环次数匹配对照组和样品。

[0577] 结果

[0578] 通过 log 线性衰减估测每个孕周的 ADAM12 中值。估测的 ADAM12 中值在 9 周为 214ug/L,10 周为 275ug/L,11 周为 353ug/L,12 周为 454ug/L,13 周为 584ug/L。将全部样品 ADAM12 浓度转换为 logMoM 值,并且对照组中 logMoMADAM12 的分布为:均值:0.000,标准差:0.326。在 16 个 Ds 样品中,平均 logADAM12MoM 为 -0.044,并且与对照组没有显著差别 (p = 0.55)。在 DS 妊娠中,平均 ADAM12MoMs 为:9 周是 1.09 (n = 1),10 周是 0.9968 (n = 5),11 周是 0.8223 (n = 9),12 周是 1.113 (n = 1)。在 18 三体症妊娠中,theADAM12MoM 值 1.92,0.765,1.705 和 2.09 各自是在 9,11,12 和 13 周获得的。

[0579] 结论

[0580] 在 10-12 周,对于 21 三体症,ADAM12 不是一个良好的母体血清标记物,而对于 18 三体症它似乎是良好的标记物。当使用 ADAM12 作为染色体异常疾病的标记物时,在恰当的孕龄使用 ADAM12 和使用 logMoM 值是重要的。该研究是上述 Danish 研究 (Laigaard 等人, 2003) 和 British 研究 (Example5) 结果的一项独立确认。

[0581] 参考文献

[0582] EP 1 524 523

[0583] Blat C, Villaudy J, Binoux M. 1994. In vivo proteolysis of serum insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 results in increased availability of IGF to target cells. *J Clin Invest* 93:2286-2290.

[0584] Canick and Knight, supra (April 1992).

[0585] Cuckle HS, van Lith JM. 1999. Appropriate biochemical parameters in first-trimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 19:505-512.

[0586] Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. 1997. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 94, 387-402.

[0587] Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. 1998. A novel secreted form of human ADAM12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem* 273:157-166.

[0588] Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM. 1999. Cysteine-rich domain of human ADAM12 (meltrin α) supports tumour cell adhesion. *Am J Pathol* 154:1489-1501.

[0589] Kawaguchi N, Xu X, Tajima R, Kronqvist P, Sundberg C, Loechel F, Albrechtsen R, Wewer UM. 2002. ADAM12 protease induces adipogenesis in transgenic mice. *Am J Pathol* 160:1895-1903.

[0590] Kronqvist P, Kawaguchi N, Albrechtsen R, Xu X, **Schröder** HD, Moghadaszadeh B, Nielsen FC, **Fröhlich** C, Engvall E, Wewer UM. 2002. ADAM12 alleviates the skeletal muscle pathology in mdx dystrophic mice. *Am J Pathol* 161:1535-1540.

[0591] Laigaard J, **Sørensen** T, **Frölich** C, **Nørgaard-Pedersen** B, Christiansen M, **Schiøtt** K, Uldbjerg N, Albrechtsen R, Clausen H. V, Ottesen B, Wewer UM. 2003. ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenatal Diagnosis* 23:1086-1091.

[0592] Laigaard J, Christiansen M, **Frölich** C, **Nørgaard-Pedersen** B, Ottesen B, Wewer UM. 2005. The level of ADAM12-S in maternal serum is an early first trimester marker of fetal trisomy 18. *Prenatal Diagnosis* 25:45-46.

[0593] Larsen SO, Christiansen M, **Nørgaard-Pedersen** B. 1998. Calculation of ROC curves in multidimensional likelihood ratio based screening with Down's syndrome as a special case. *J Med Screen* 5(2):57-62

[0594] Laursen LS, Overgaard MT, Soe R, Boldt HB, Sottrup-Jensen L, Giudice

LC, Conover CA, Oxvig C. 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-5) independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. FEBS-Lett 504: 36-40.

[0595] Le Pabic H, Bonnier D, Wewer UM, Countand A, Musso O, Baffet G, Clement, B, Th  ret N. ADAM12 in human liver cancers: TGF  -regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodelling. Hepatology, 37: 1056-1066, 2003

[0596] Loechel F, Gilpin BJ, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. 1998. Human ADAM12 (meltrin α) is an active metalloprotease. J Biol Chem 273: 16993-16997.

[0597] Loechel F, Fox JW, Murphy G, Albrechtsen R, Wewer UM. 2000. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. Biochem Biophys Res Commun 278: 511-515.

[0598] Palomaki 等人, " Maternal Serum Screening for Fetal Down Syndrome in the United States: A 1992 Survey, " Am. J. Obstet. Gynecol., 169(6): 1558-1562 (1992).

[0599] Powel-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillet N, Stewart TA. 1990. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. Gen Dev 7: 2609-2617.

[0600] Roy, R., U. M. Wewer, MA Moses. Urinary ADAM12: Correlation with disease status and stage in breast cancer. Abstract to the AACR meeting 2004.

[0601] Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides K. 2002. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15030 pregnancies. Ultrasound Obstet Gynecol 20: 219-225.

[0602] Shi Z, Xu W, Loechel F, Wewer UM, Murphy LJ. 2000. ADAM12, a disintegrin and metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. J Biol Chem 275: 18574-18580.

[0603] van der Veen J, Beekhuis JR, Cornel MC, Mantingh A, de Walle HE, de Wolf BT. 1997. A demographic approach to the assessment of Down syndrome screening performance. Prenat Diagn 17: 717-724.

[0604] Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. 1999. N Engl J Med 341: 461-467.

[0605] Wald NJ, Hackshaw AK. 2000. Advances in antenatal screening for Down syndrome. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 14: 563-80.

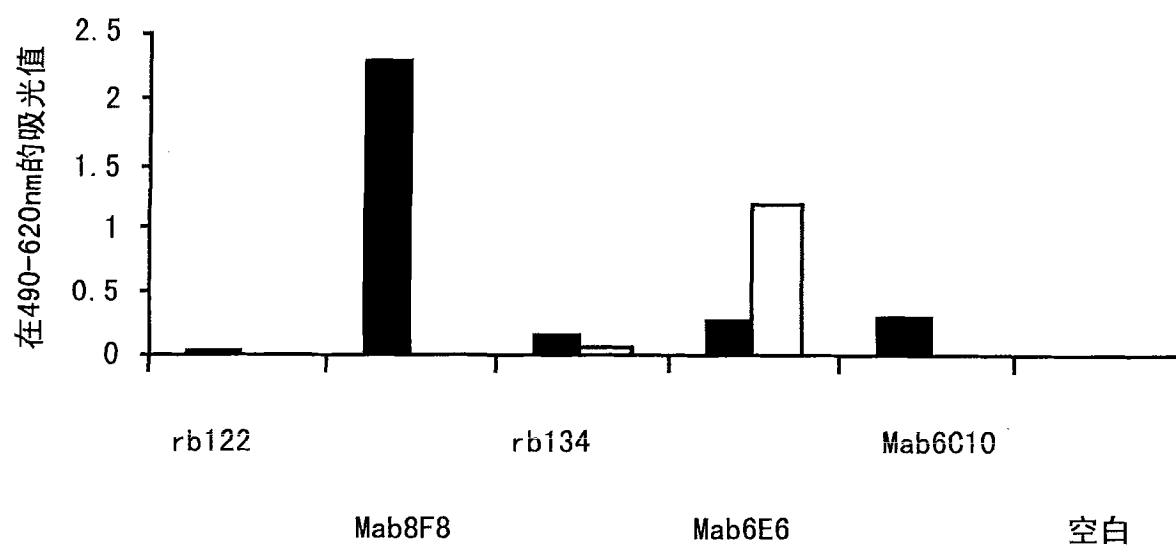


图 1

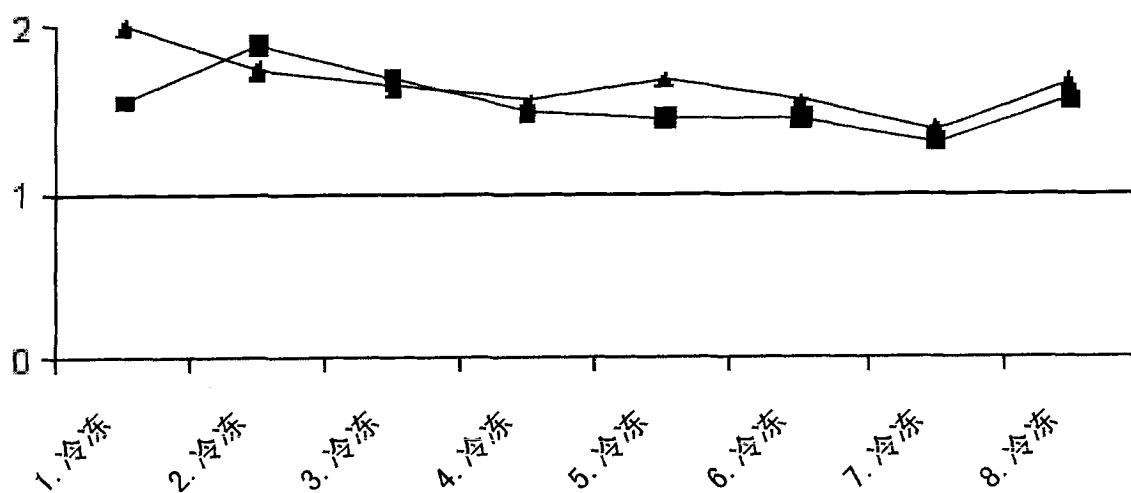


图 2

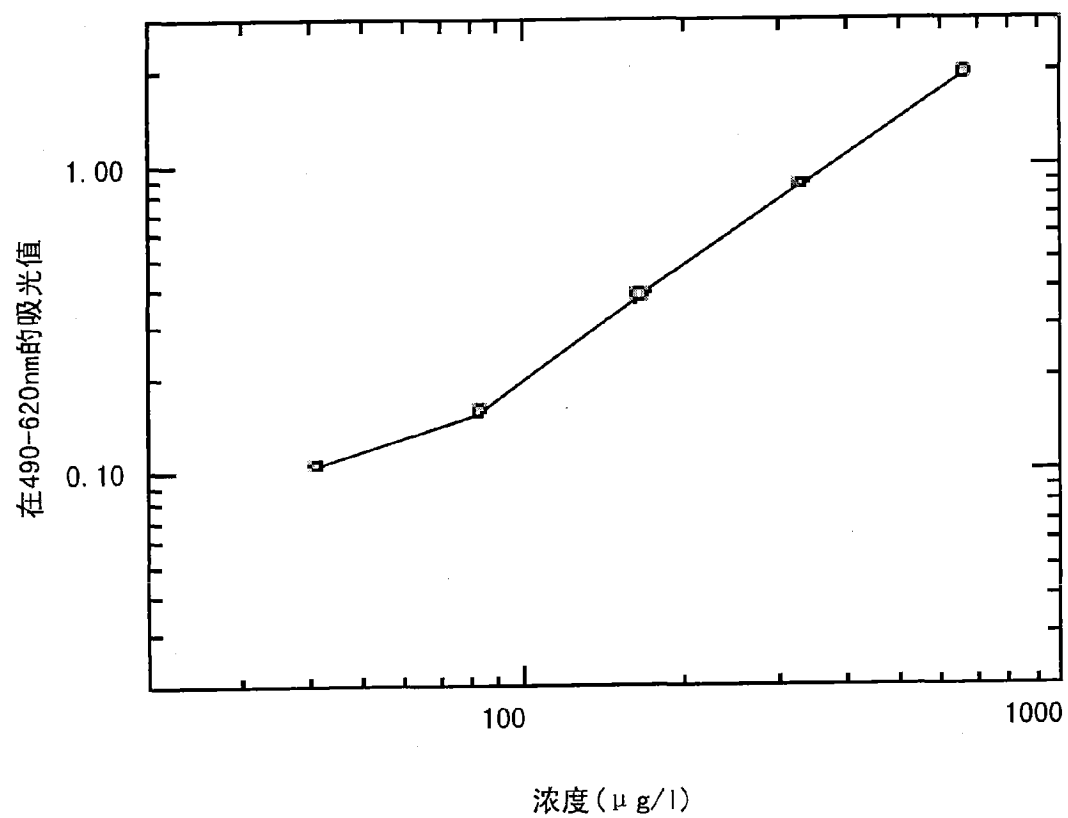


图 3

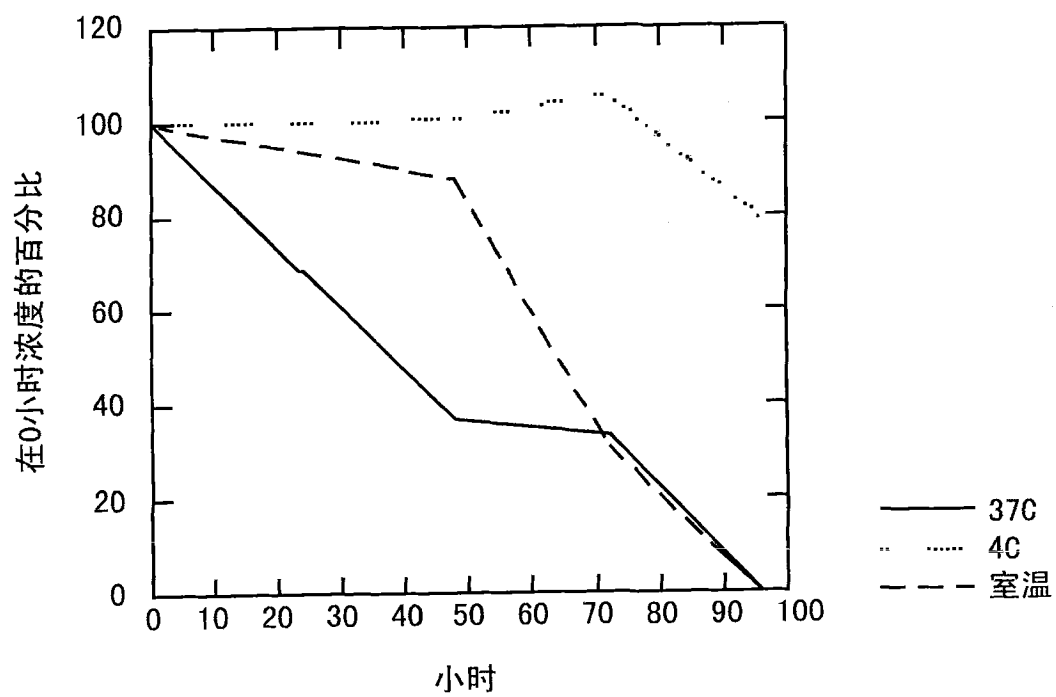


图 4

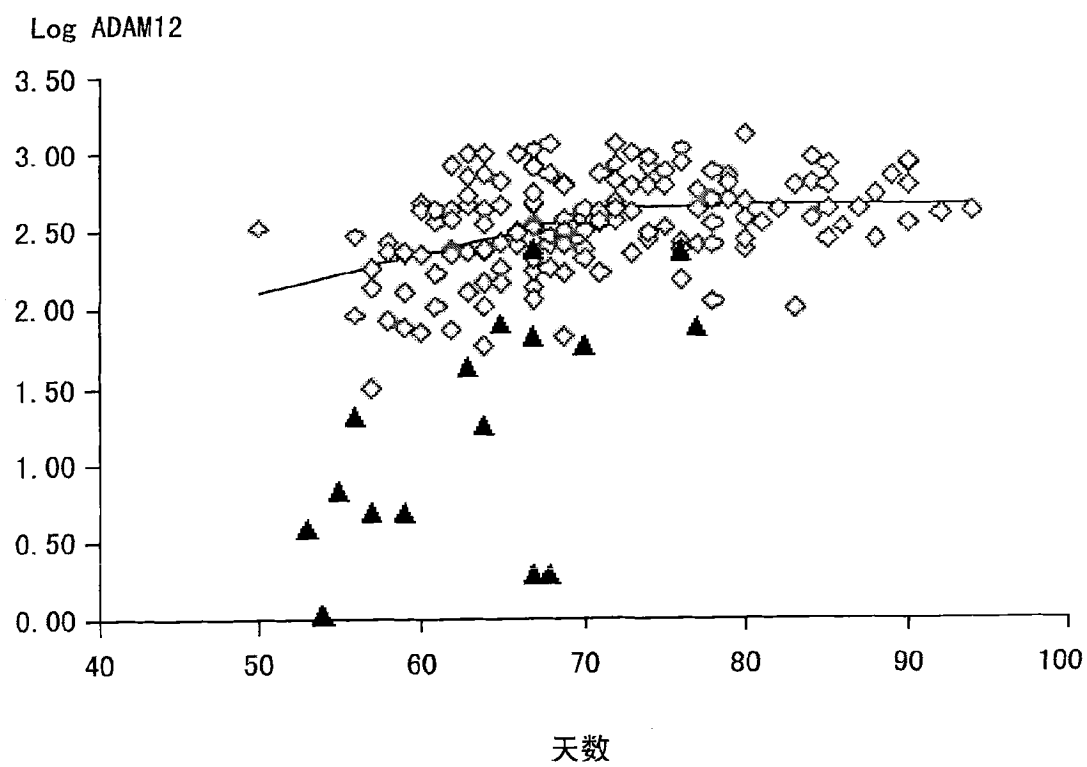


图 5

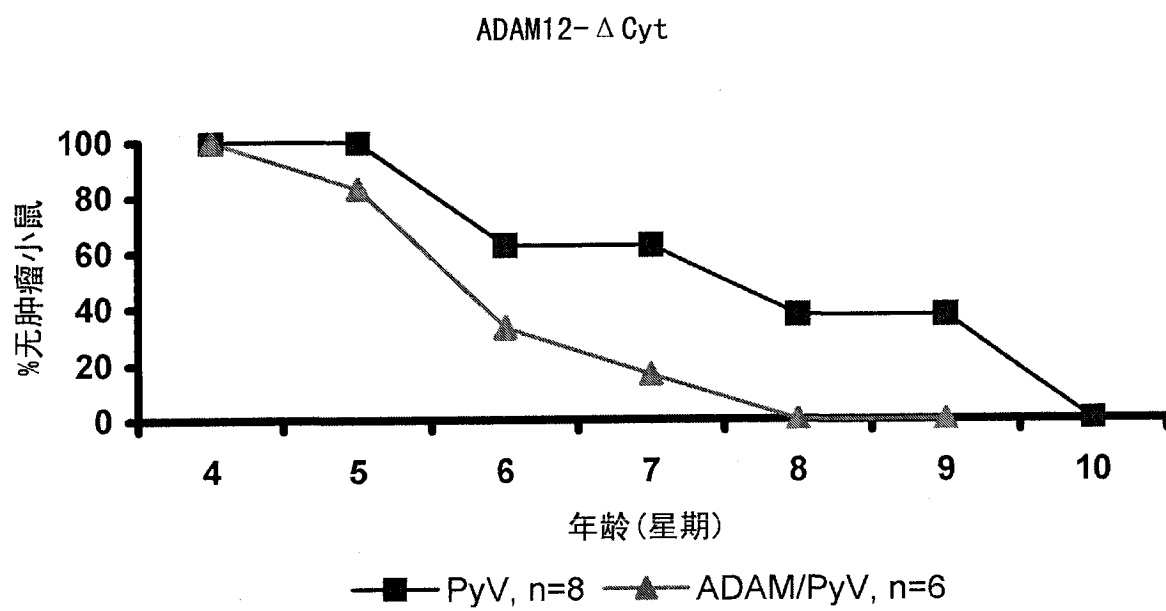


图 6

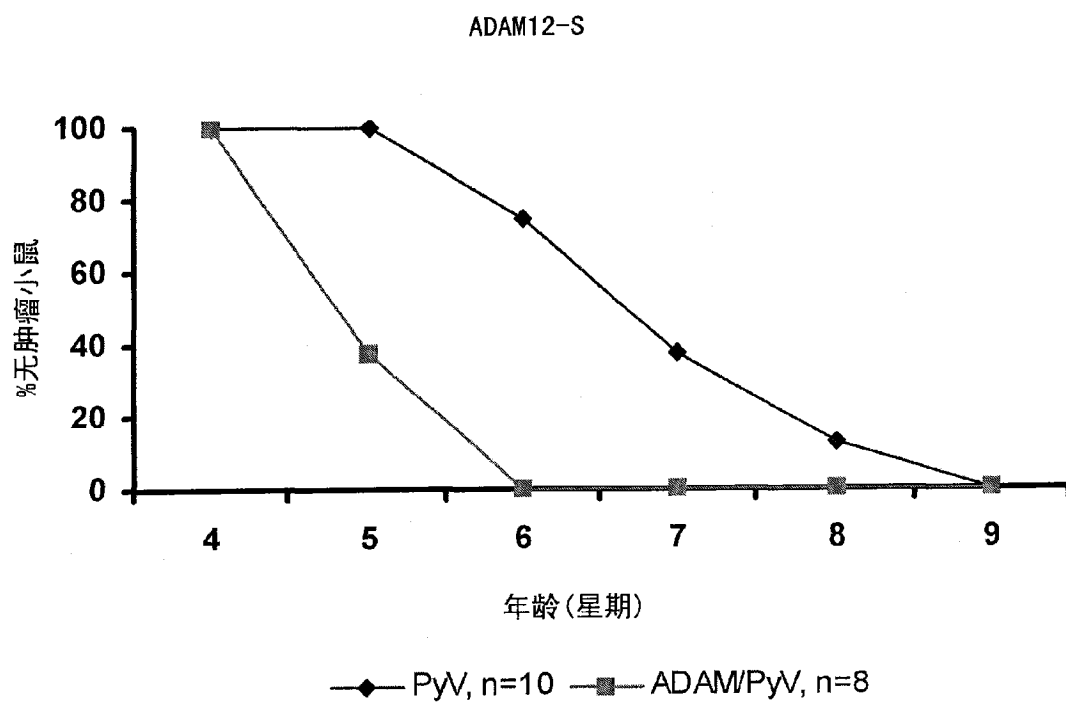


图 7

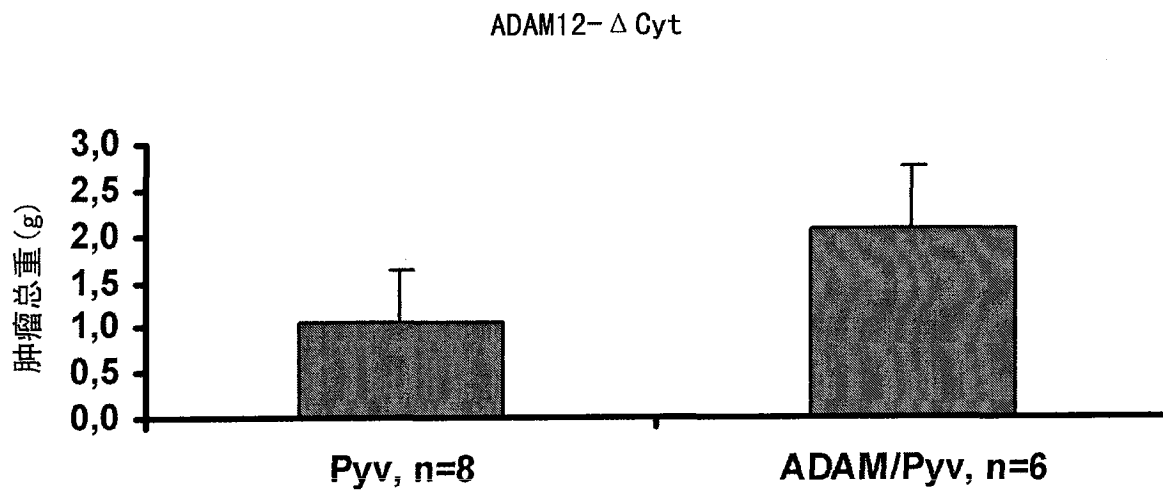


图 8

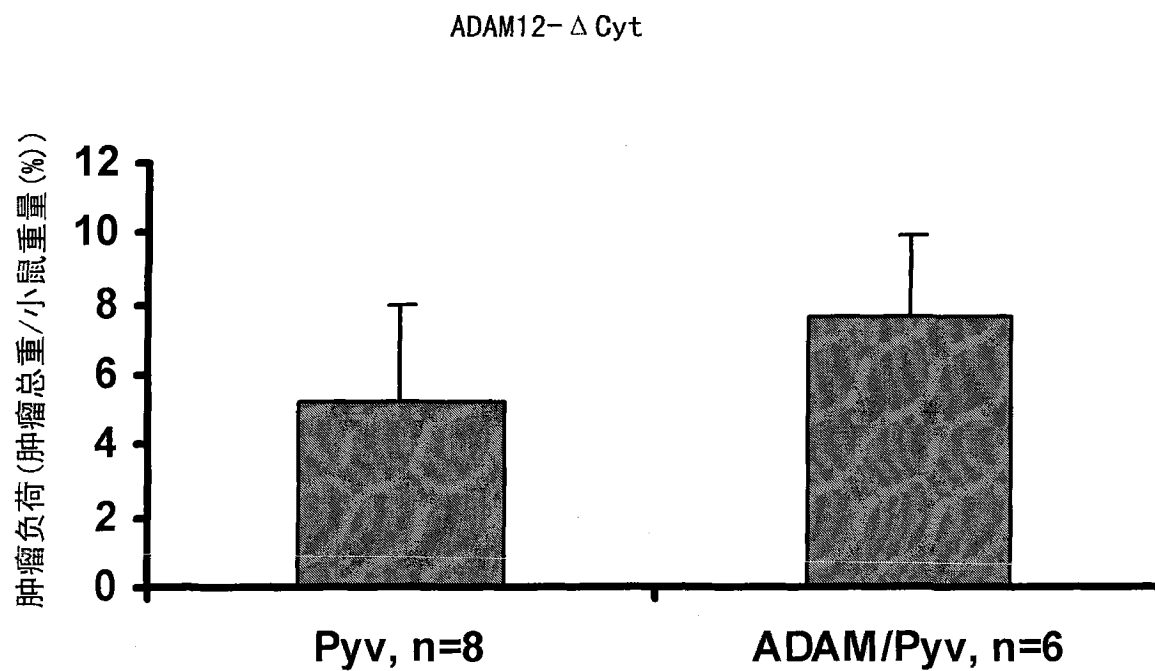


图 9

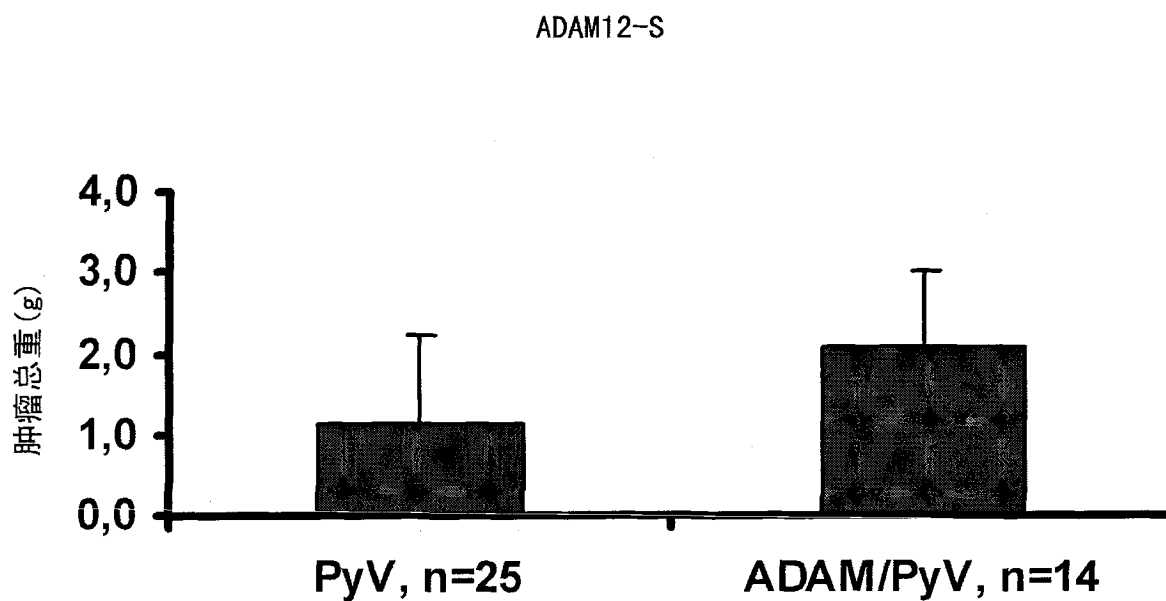


图 10

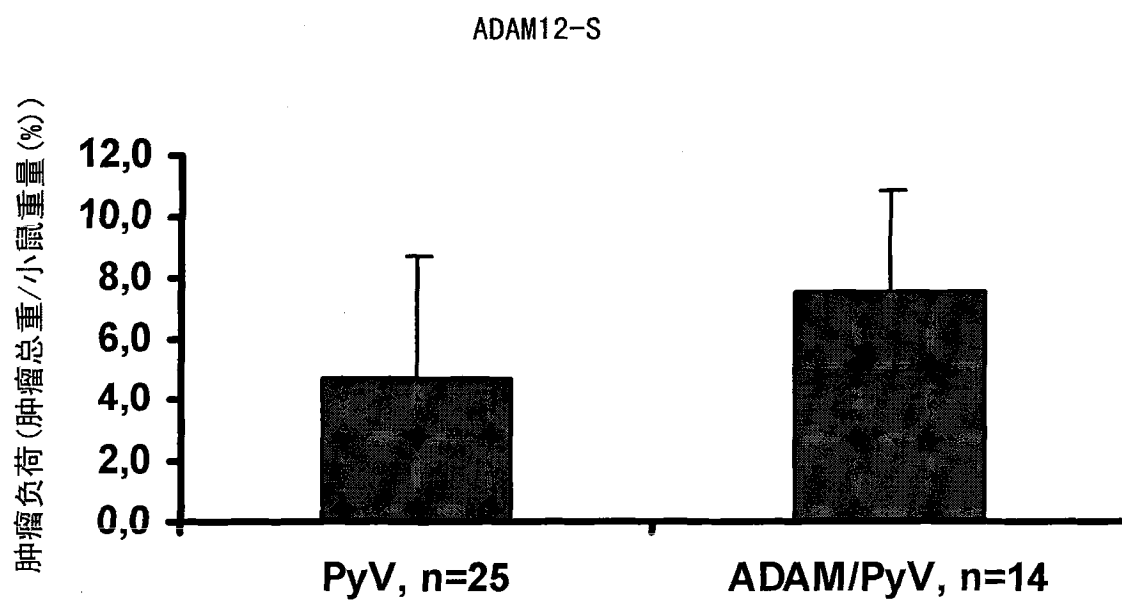


图 11

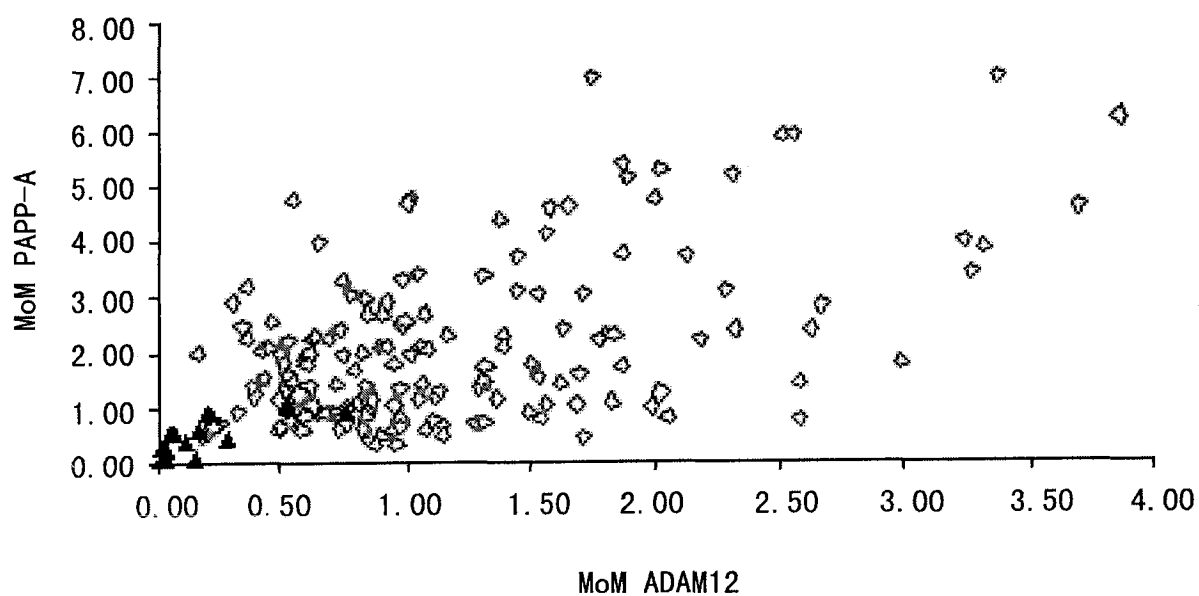


图 12

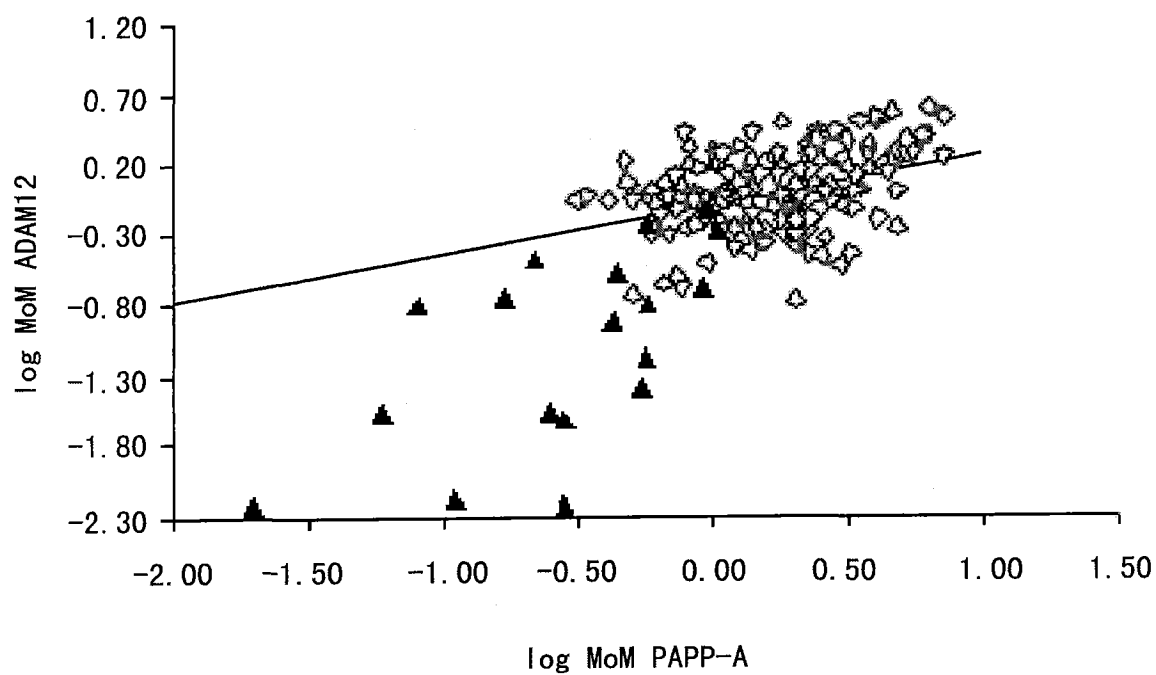


图 13

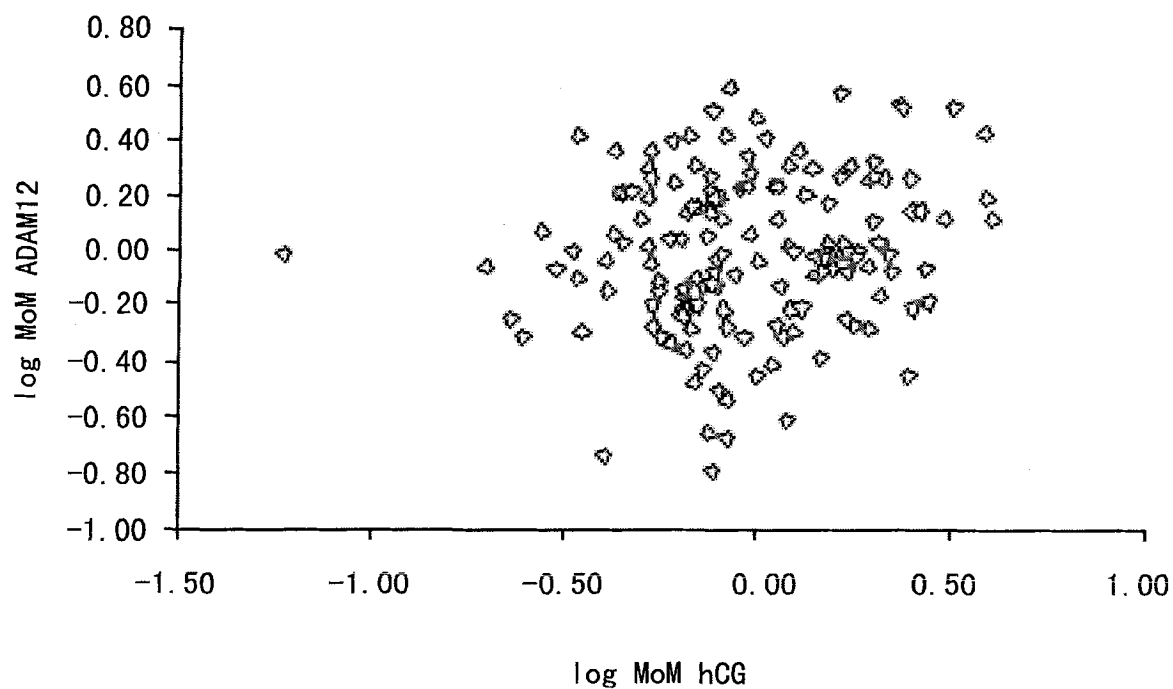


图 14

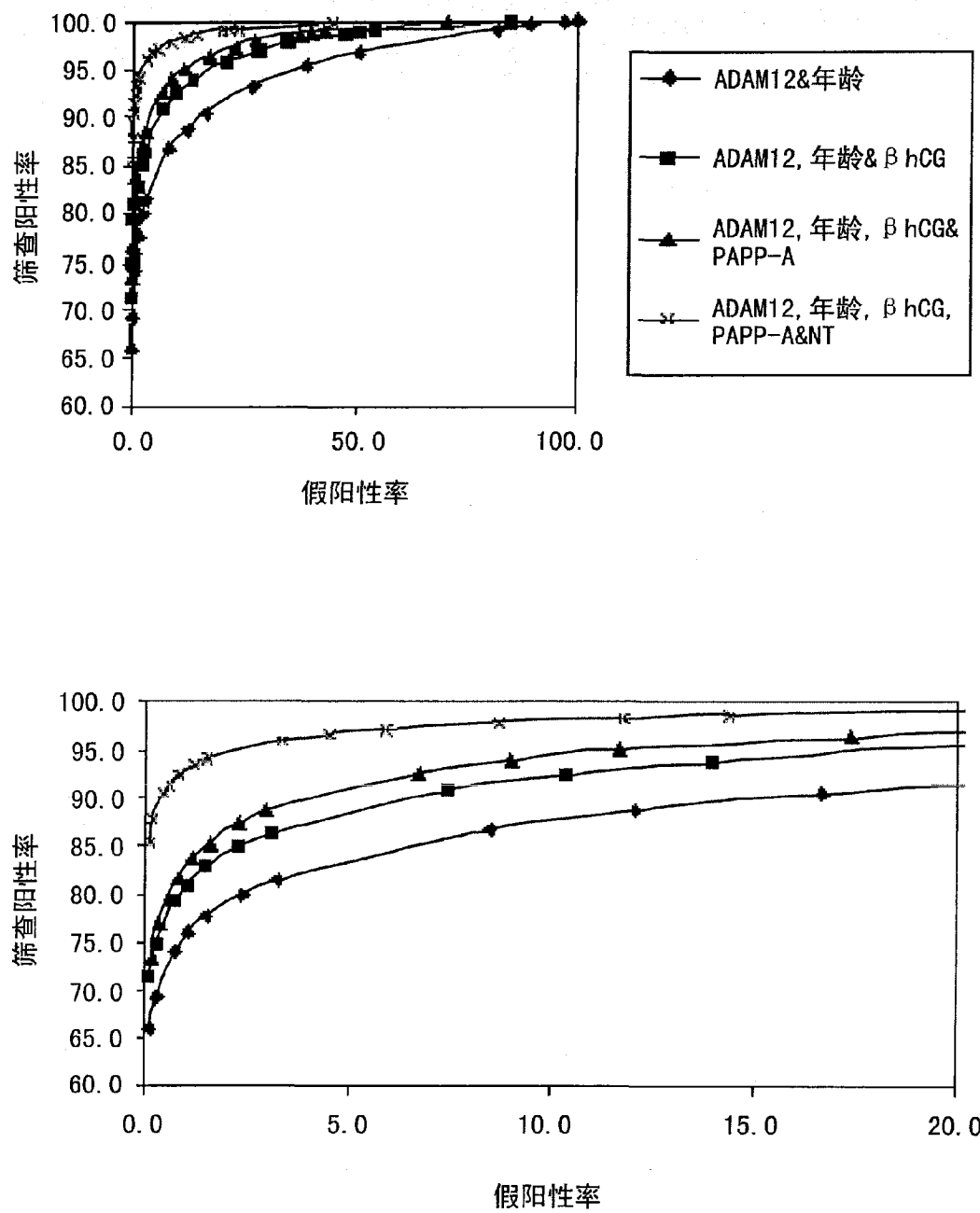


图 15

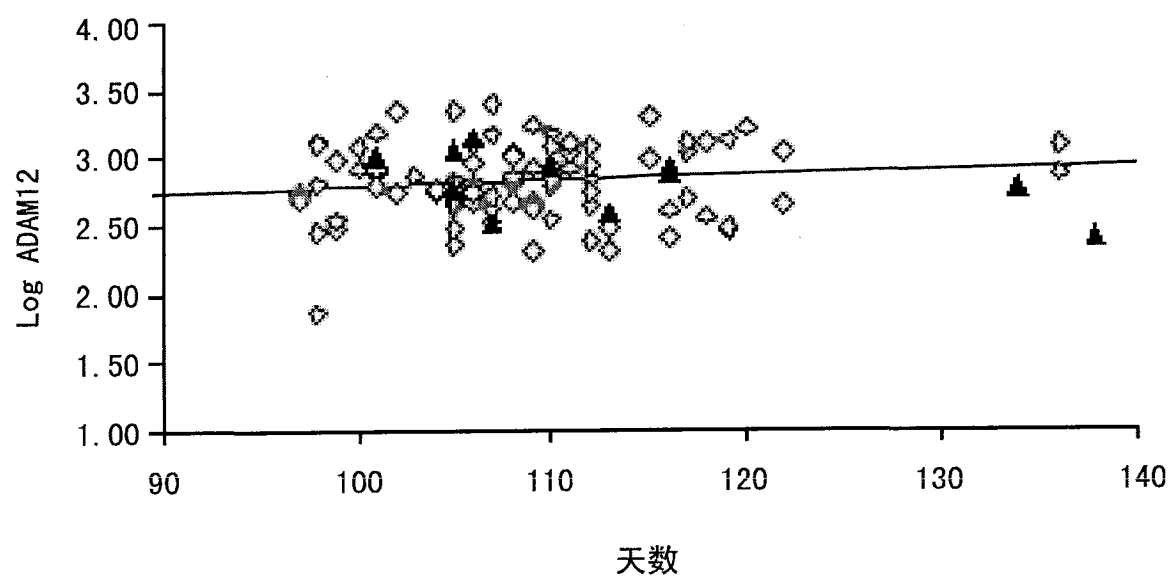


图 16

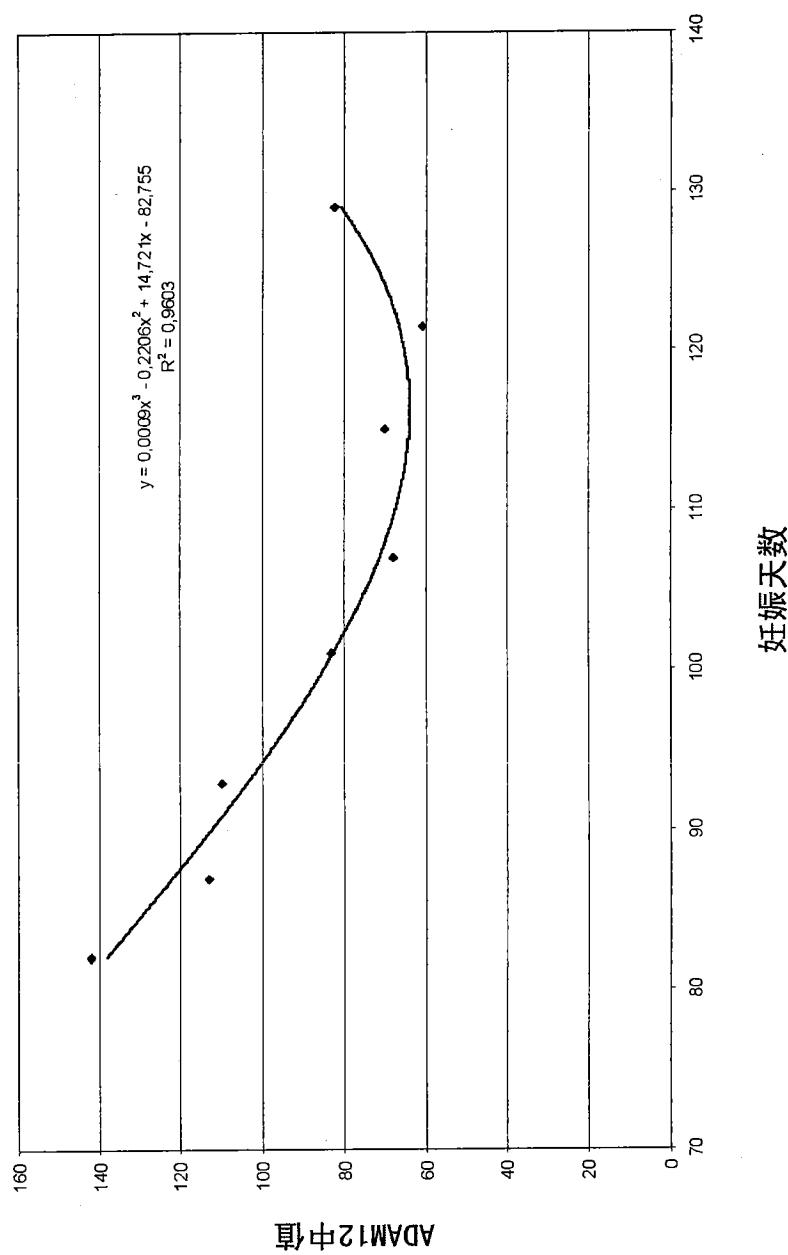


图17

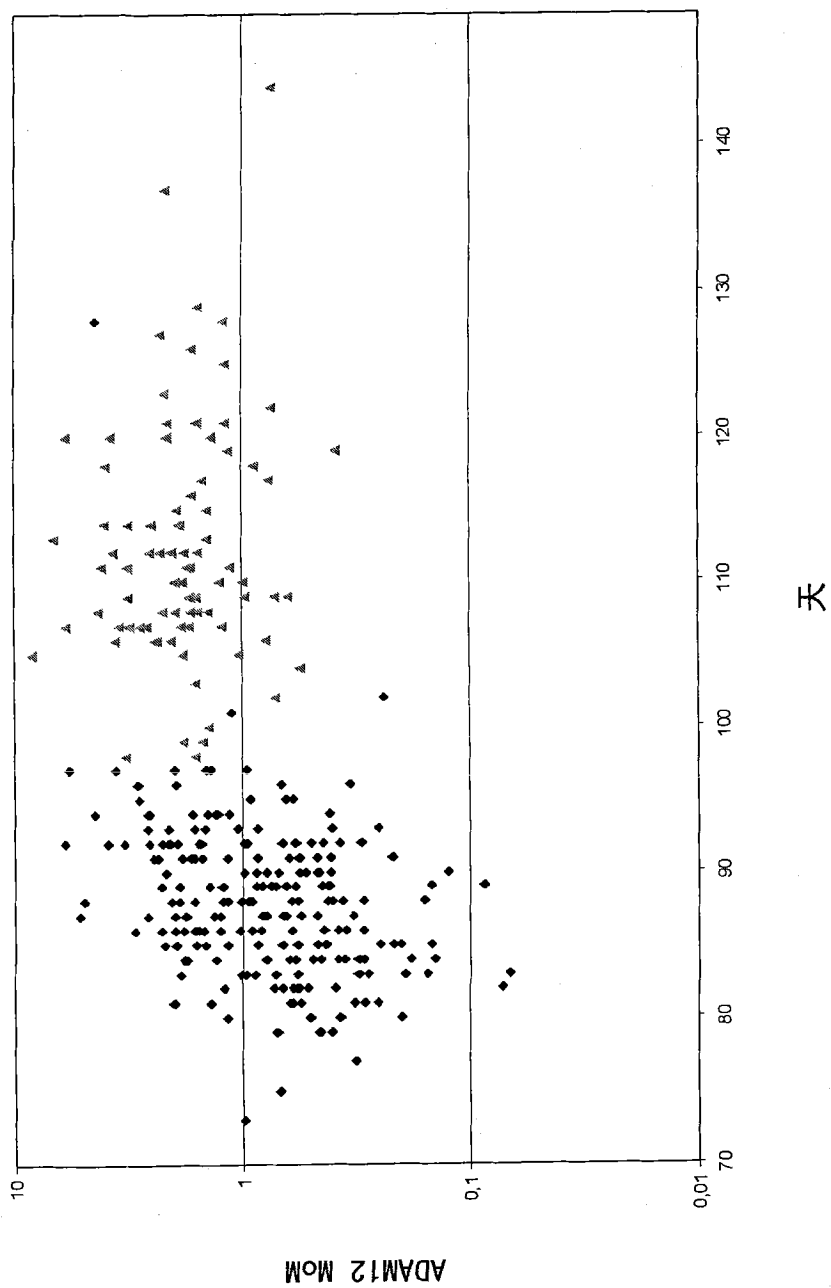


图18

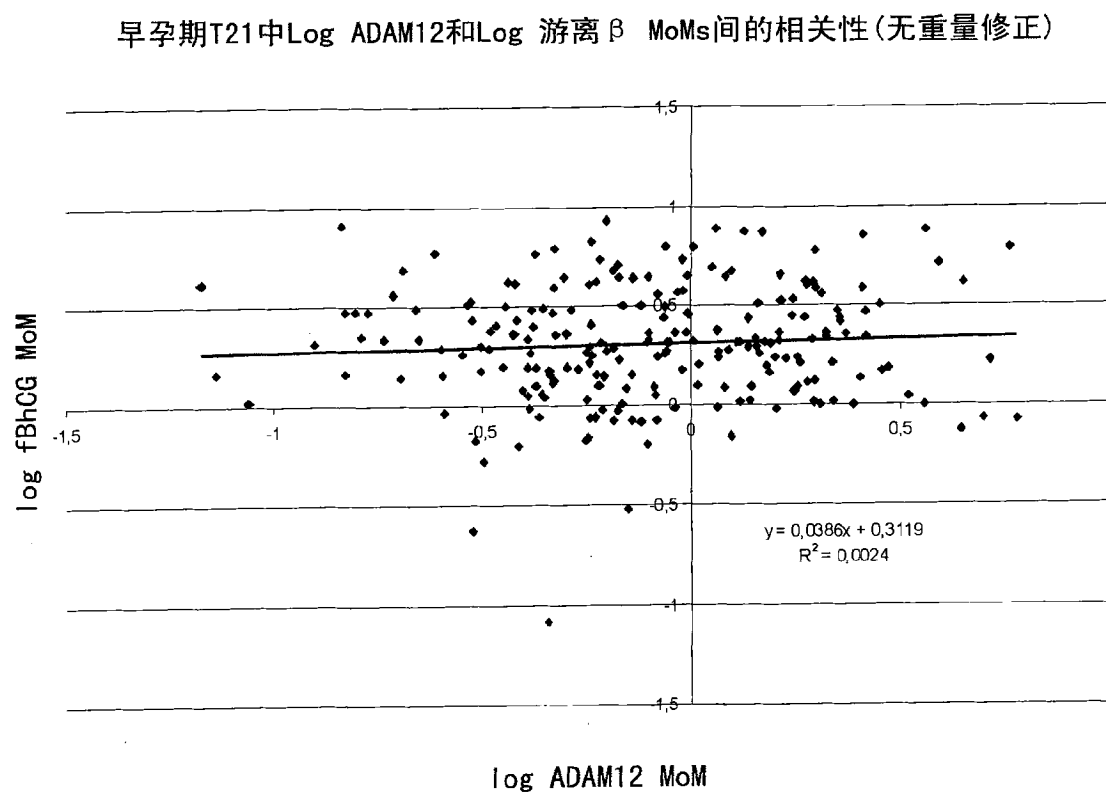


图 19

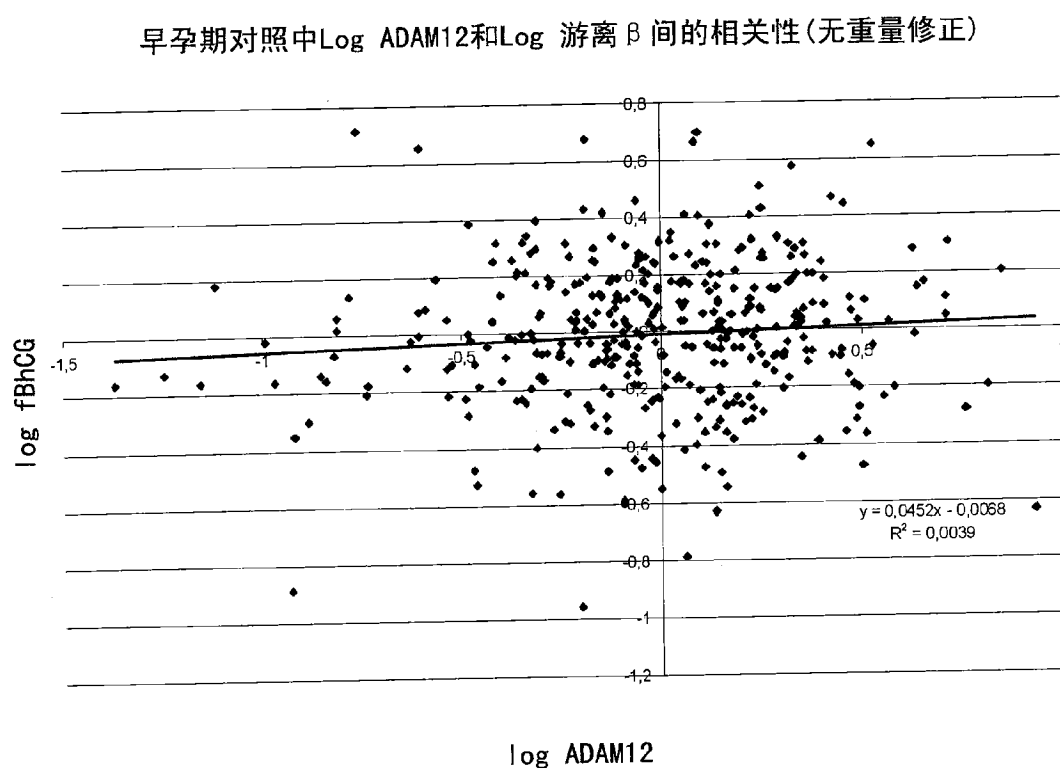


图 20

早孕期T21中Log ADAM12和Log PAPP-A MoMs间的相关性(无重量修正)

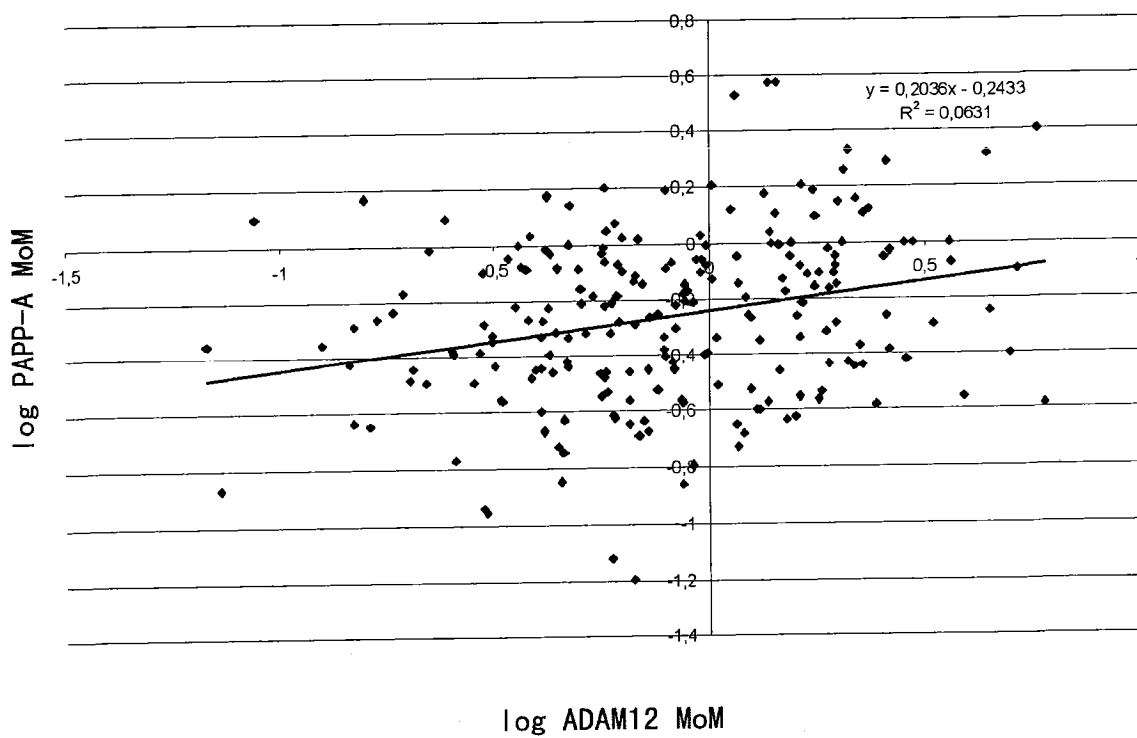


图 21

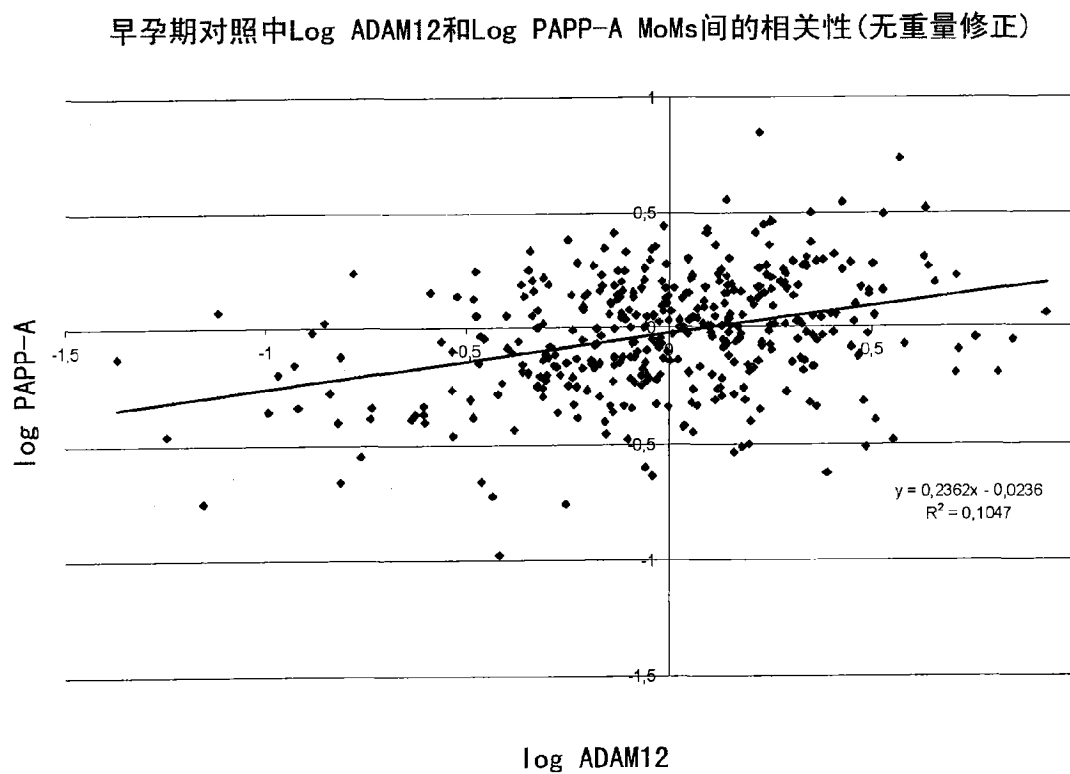


图 22

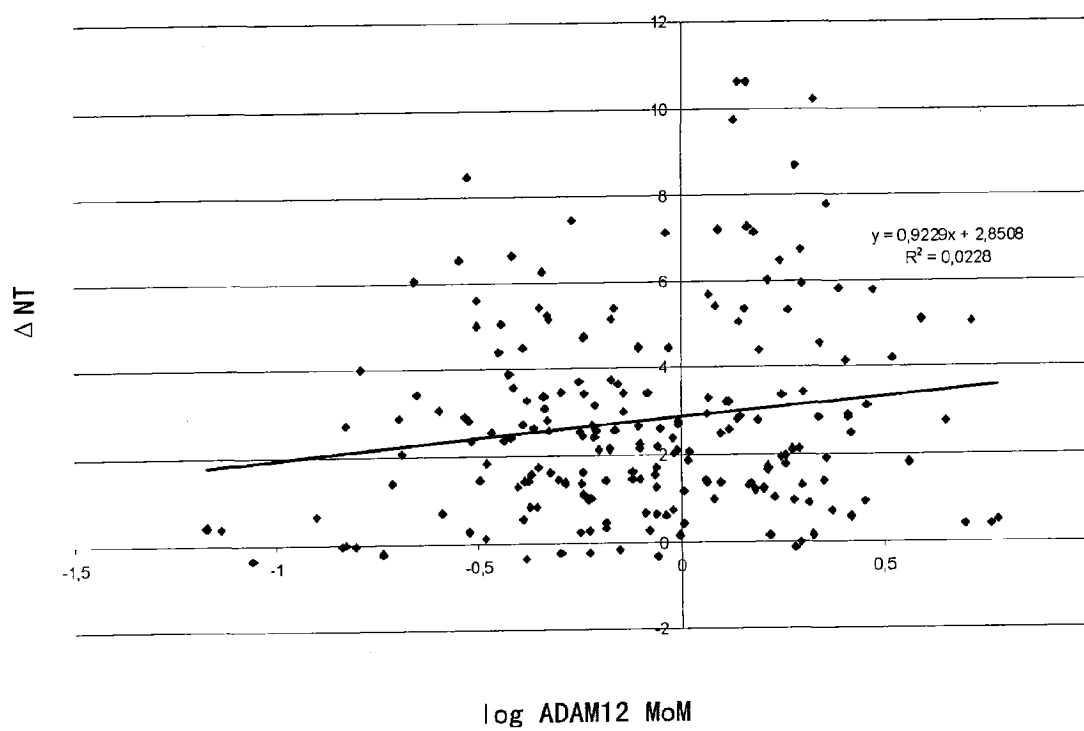
早孕期T21中Log ADAM12和 Δ NT间的相关性

图 23

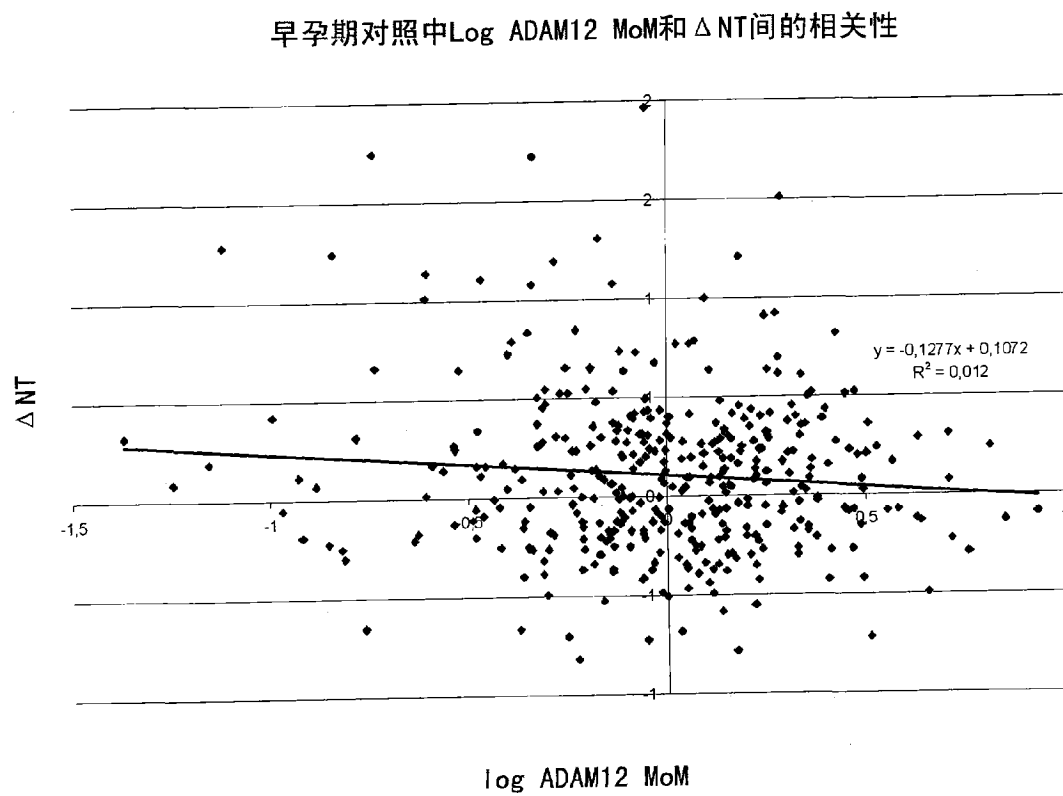


图 24

中孕期T21中Log ADAM12和Log AFP MoMs间的相关性(无重量修正)

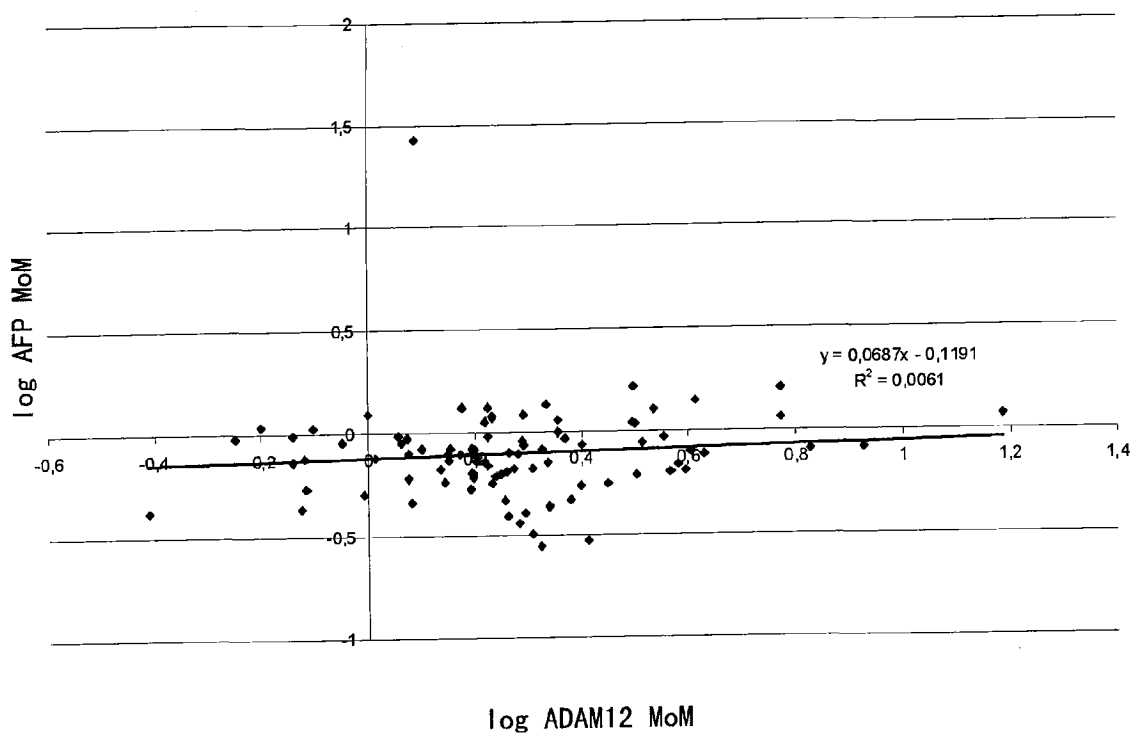


图 25

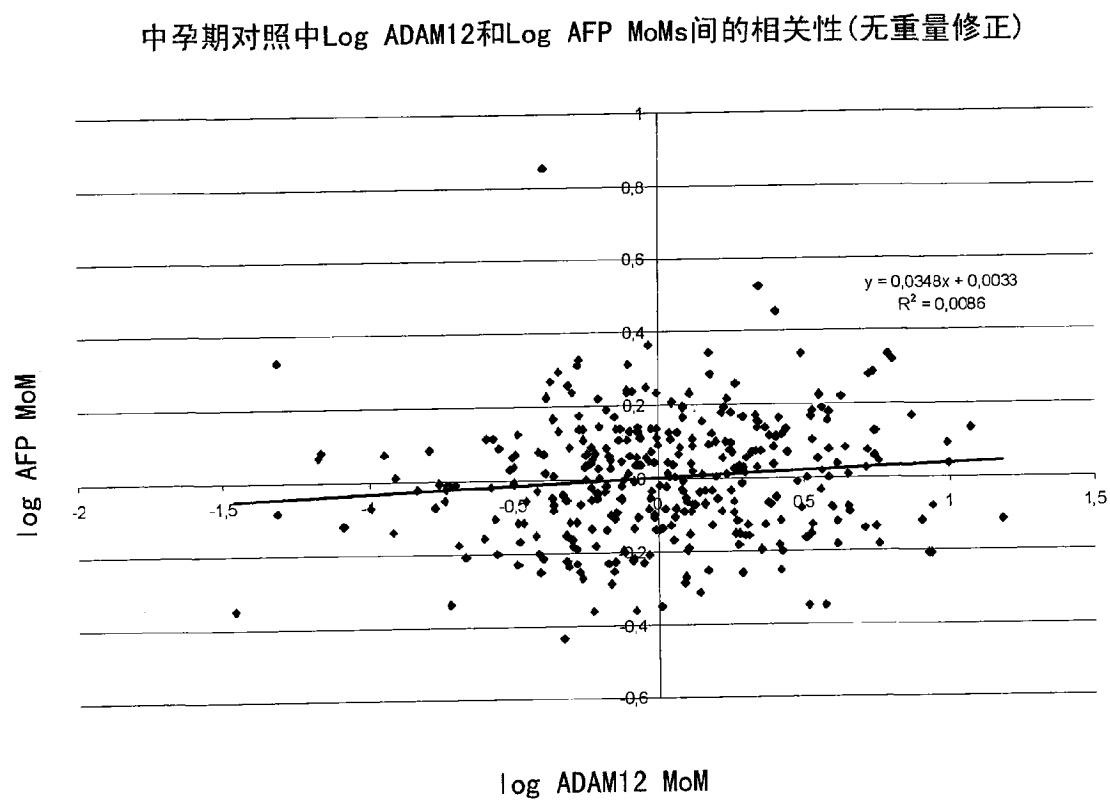


图 26

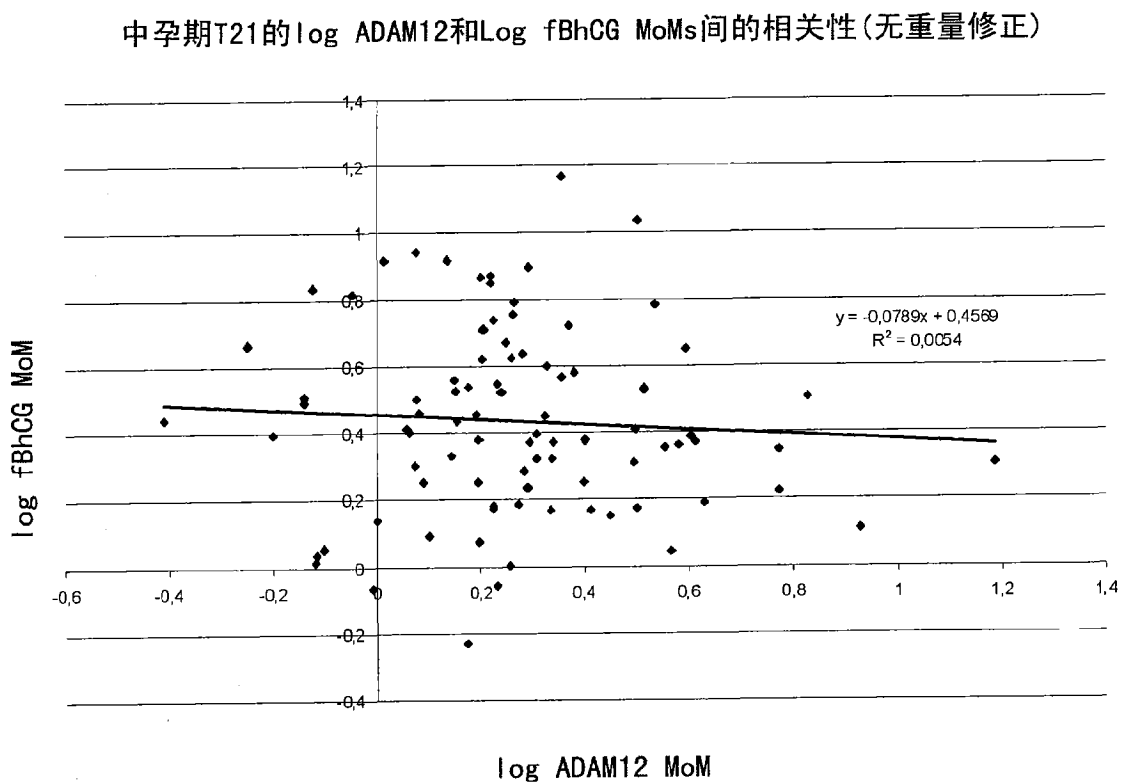


图 27

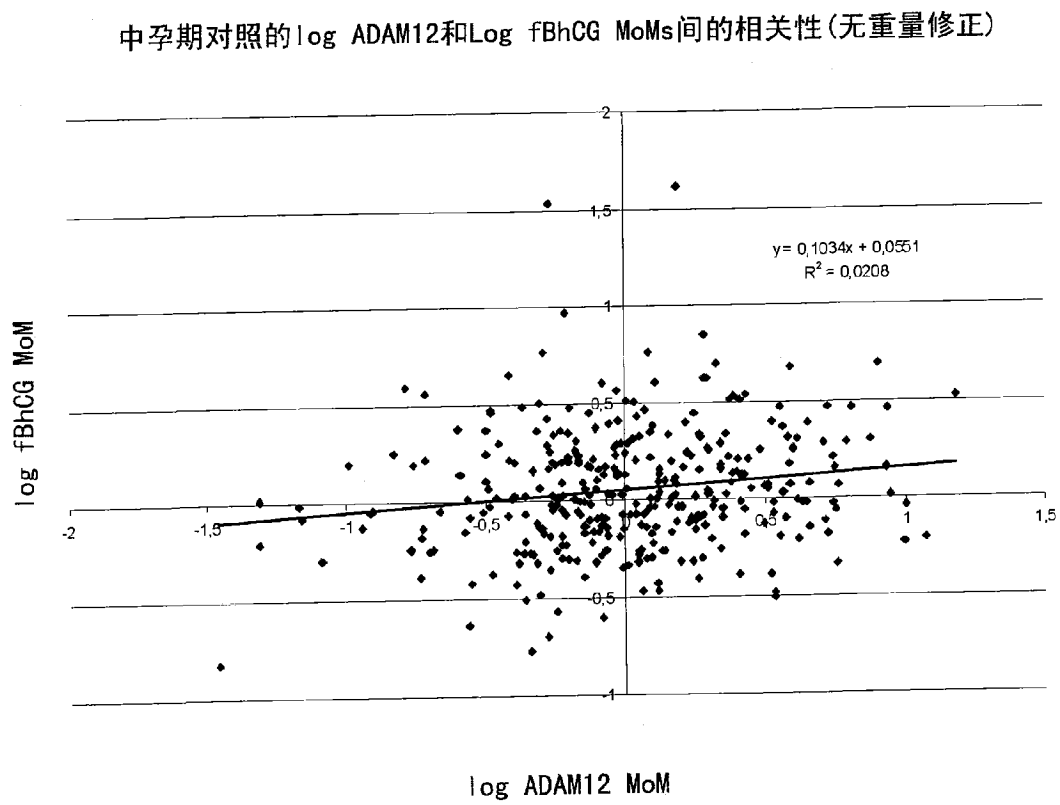


图 28

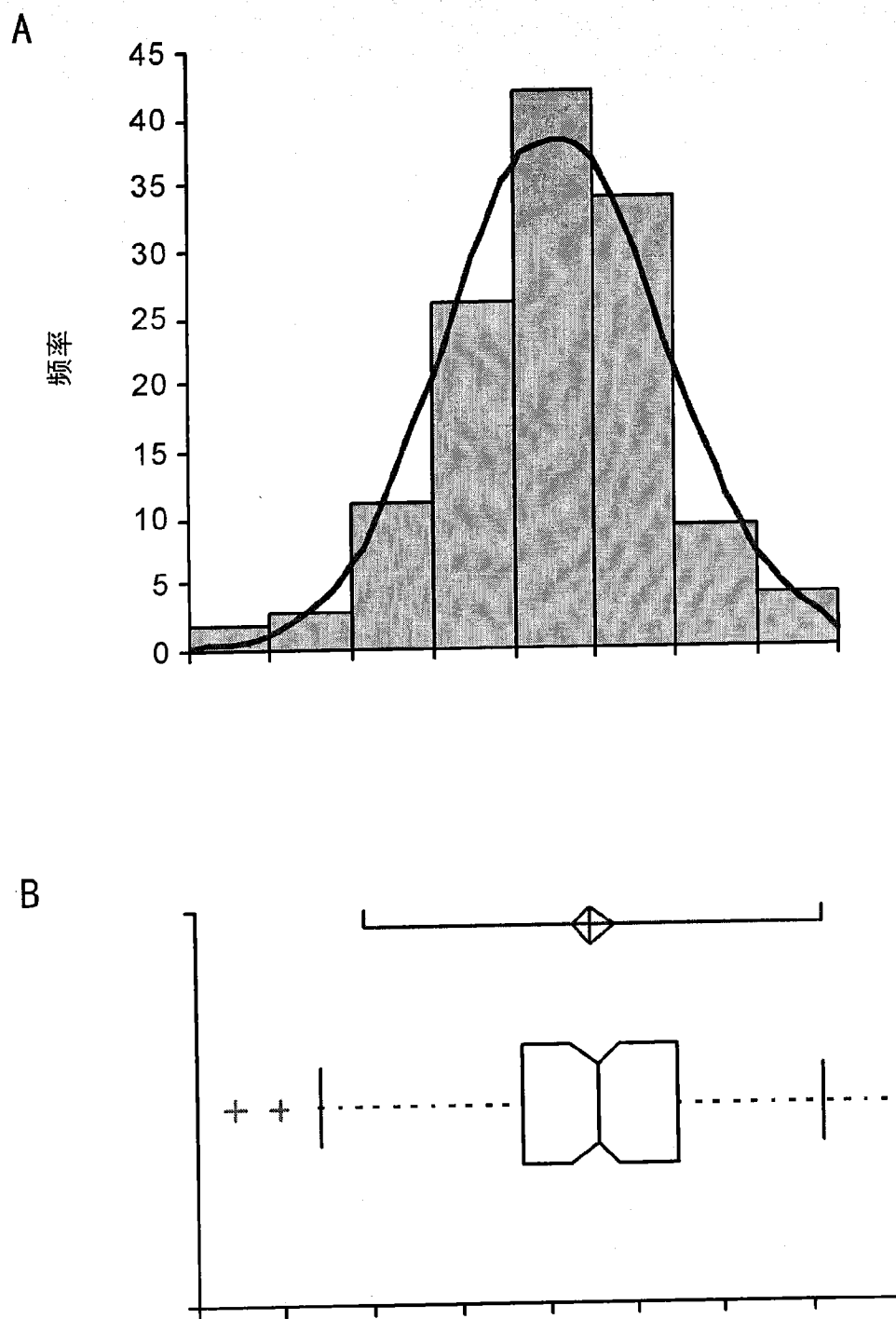


图 29

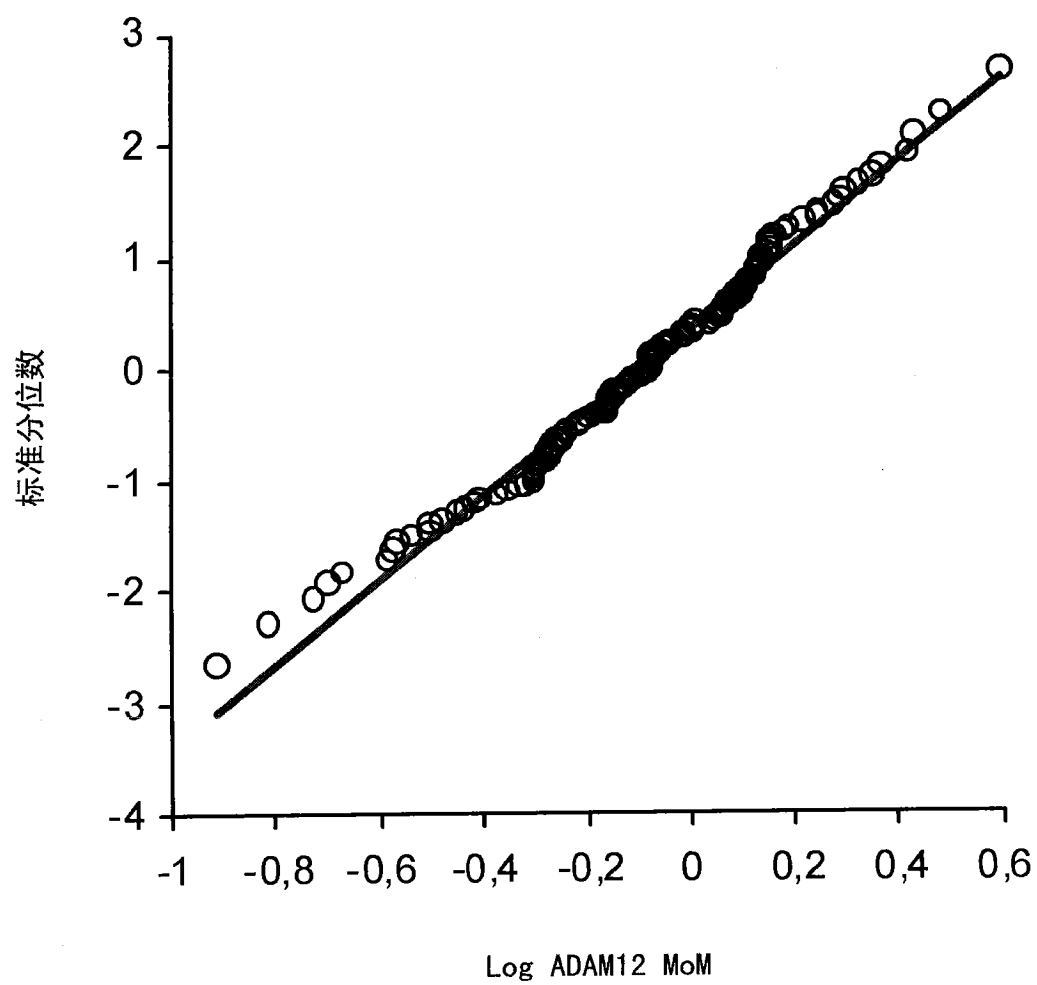


图 30

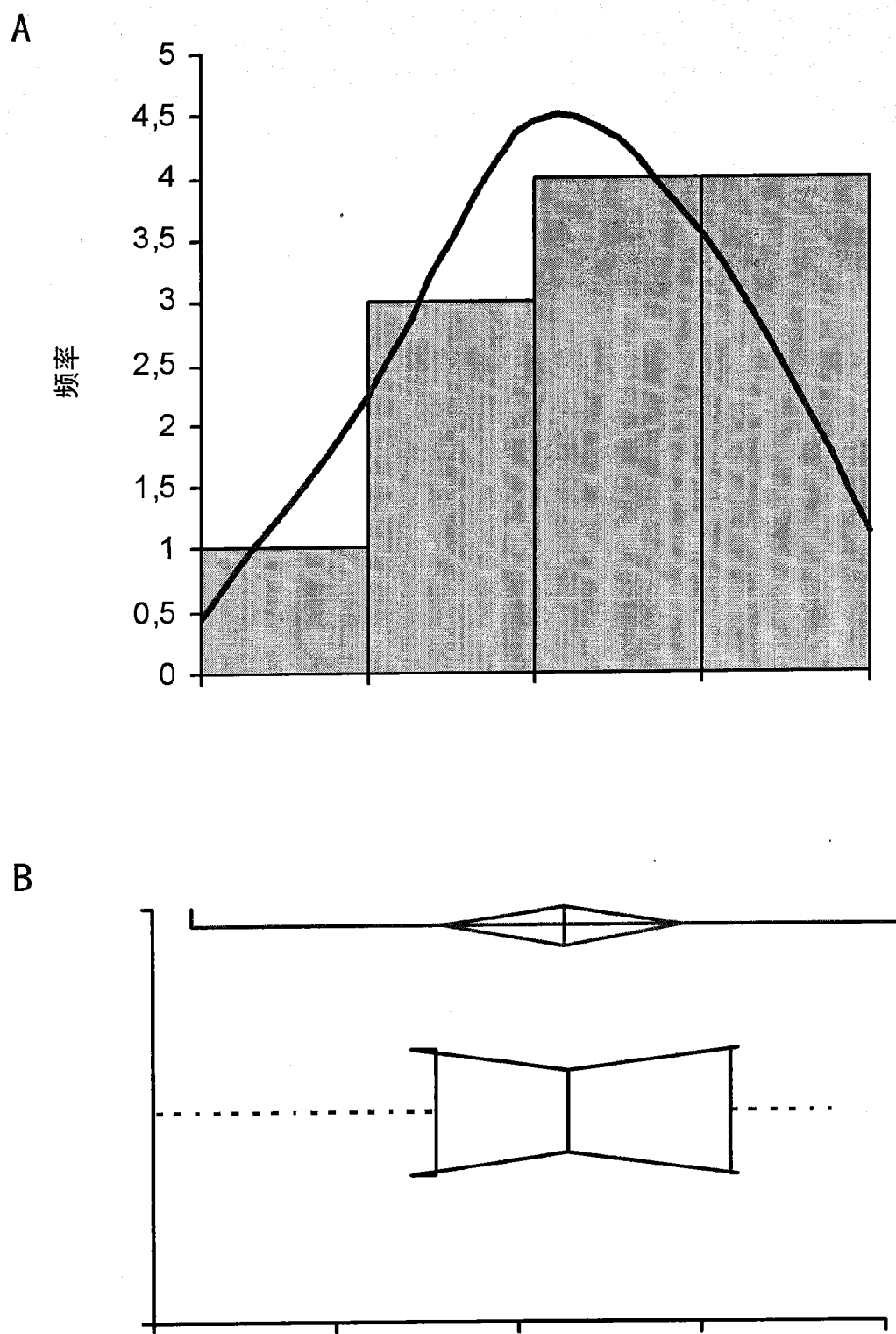


图 31

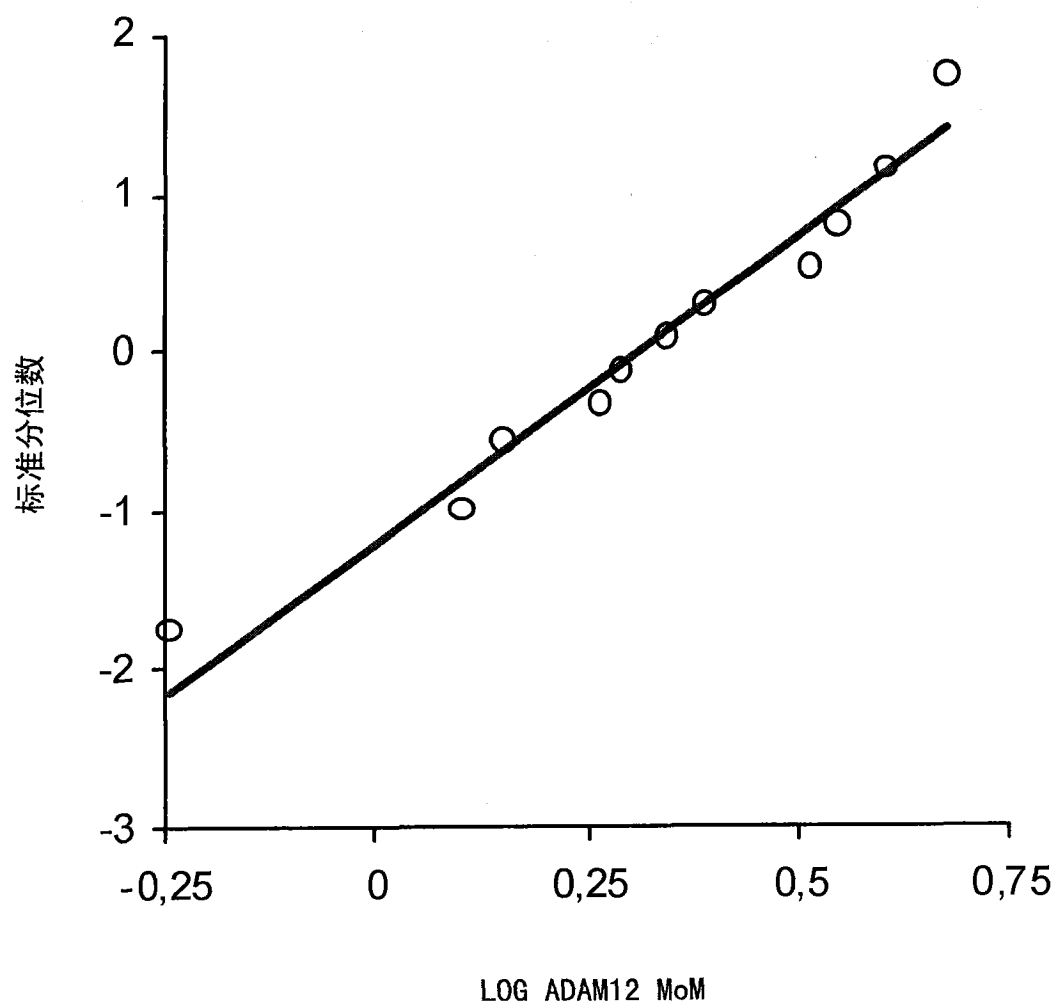


图 32

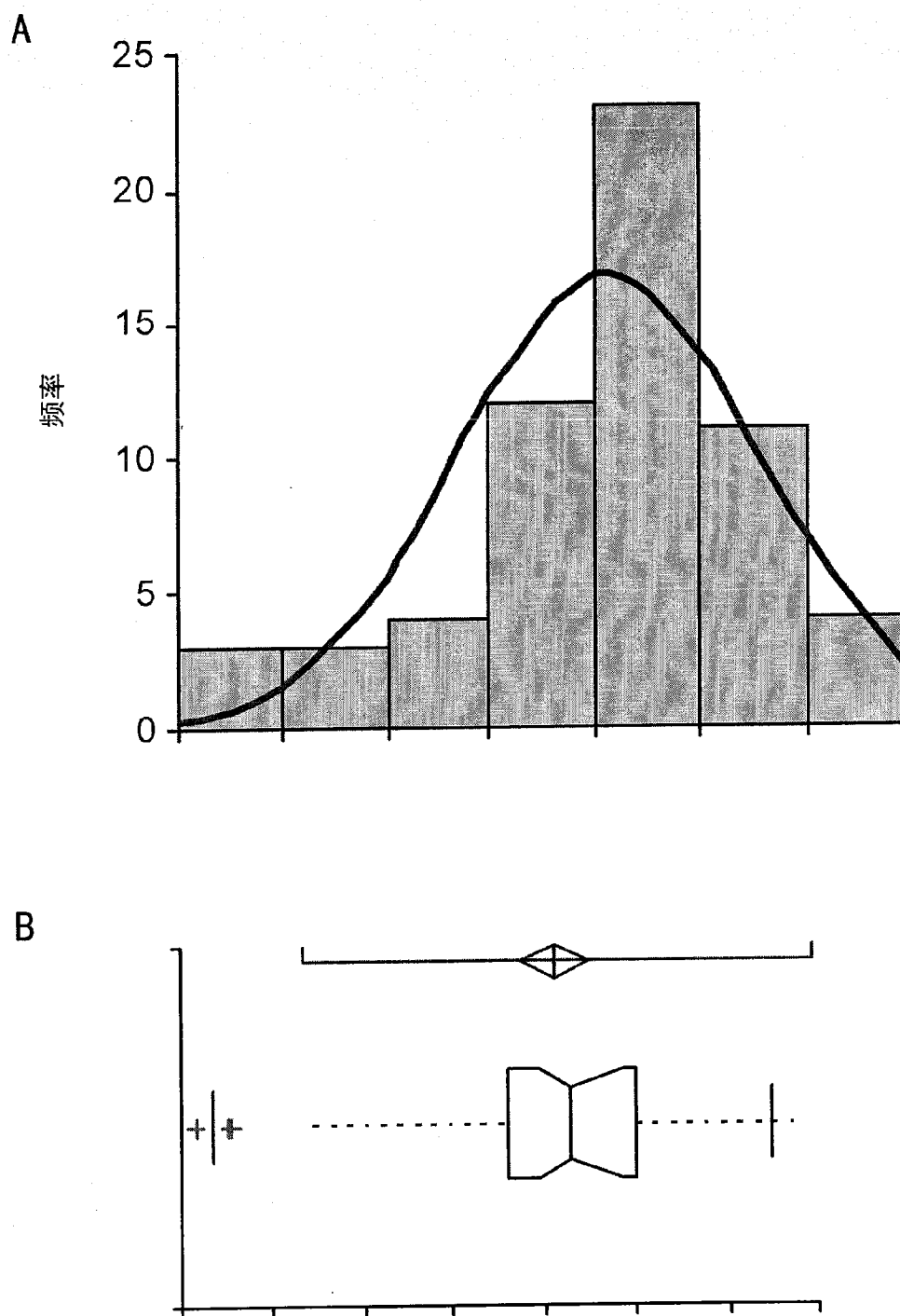


图 33

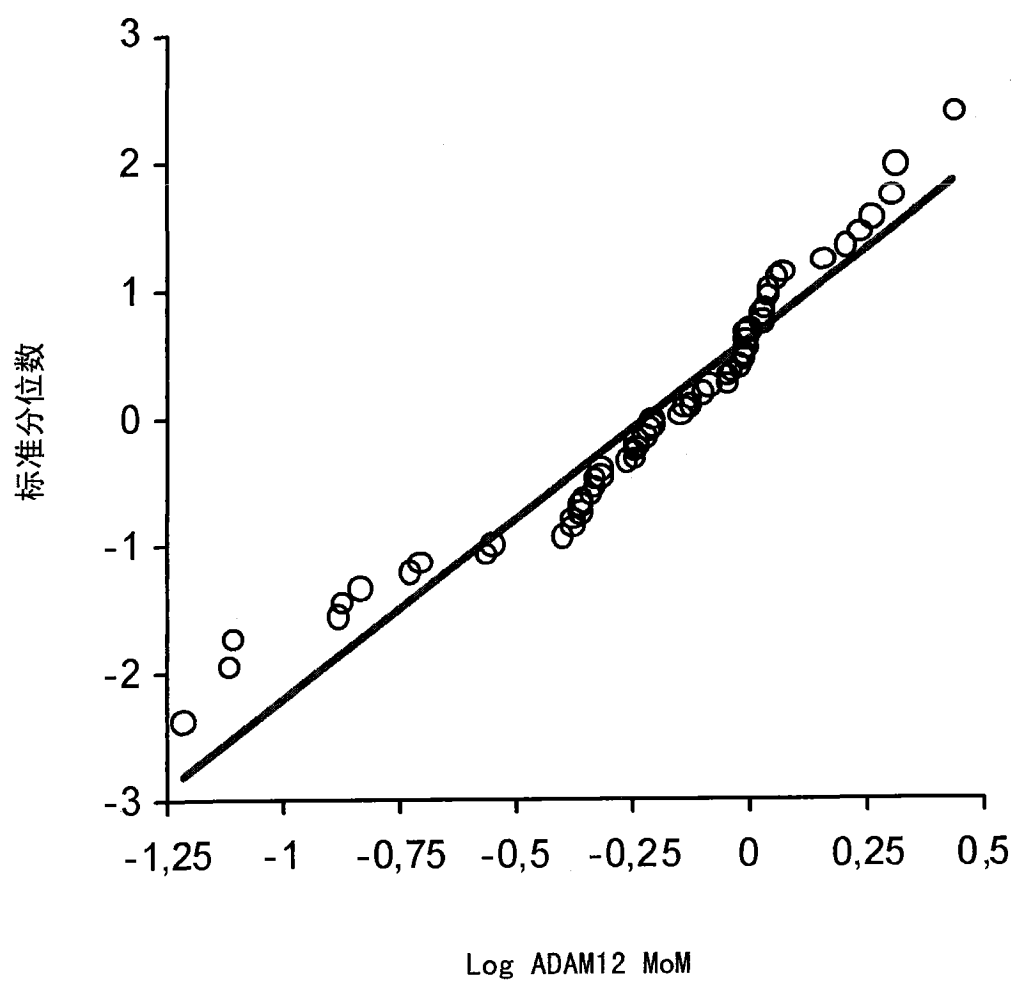


图 34

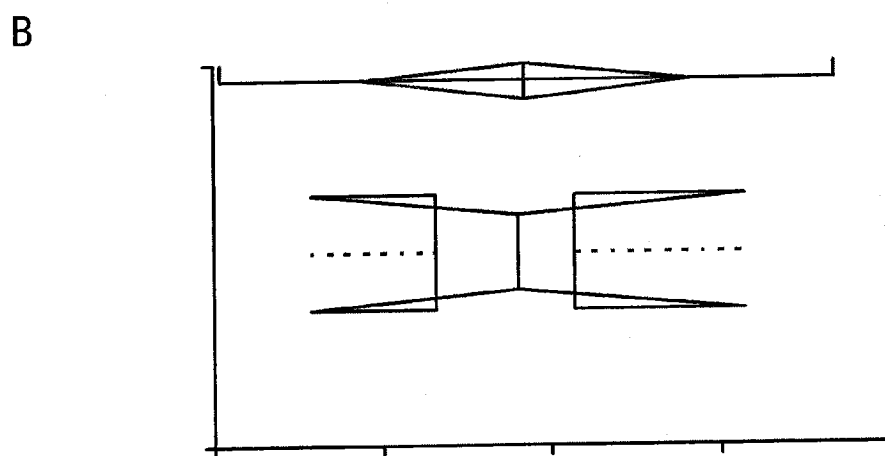
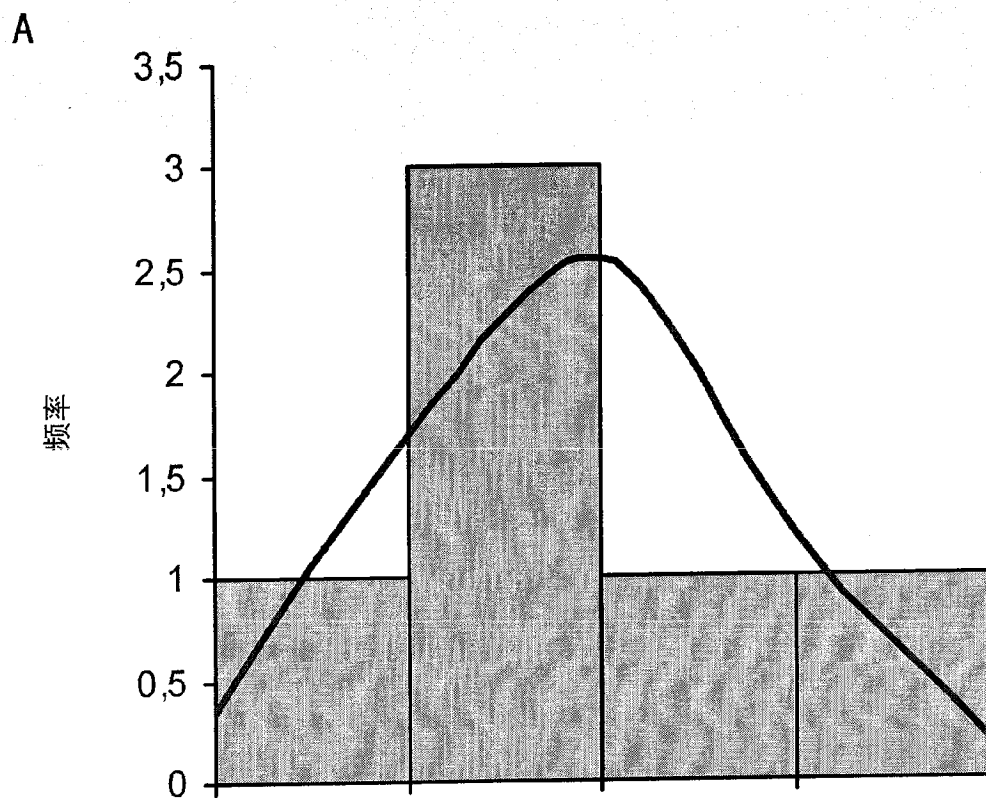


图 35

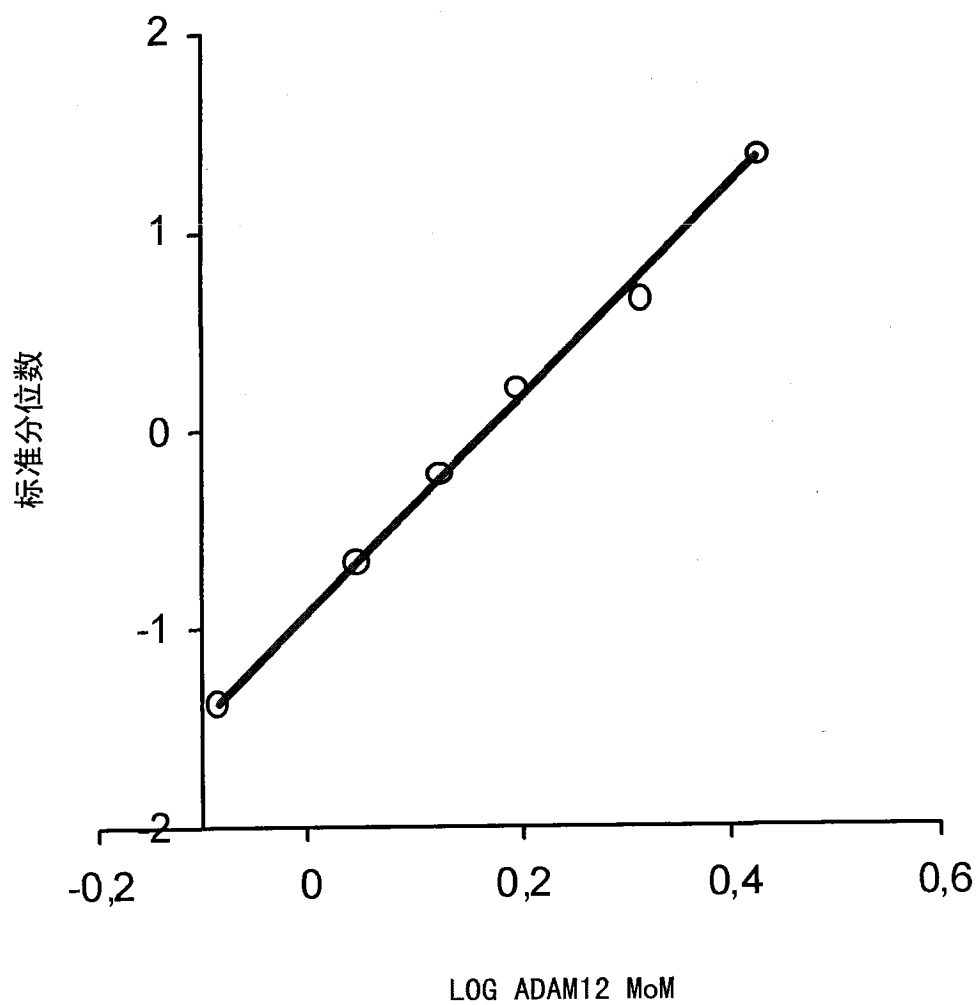


图 36

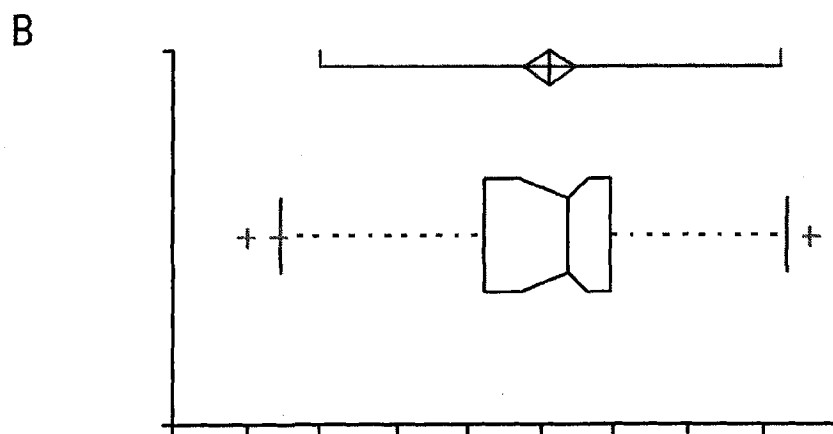
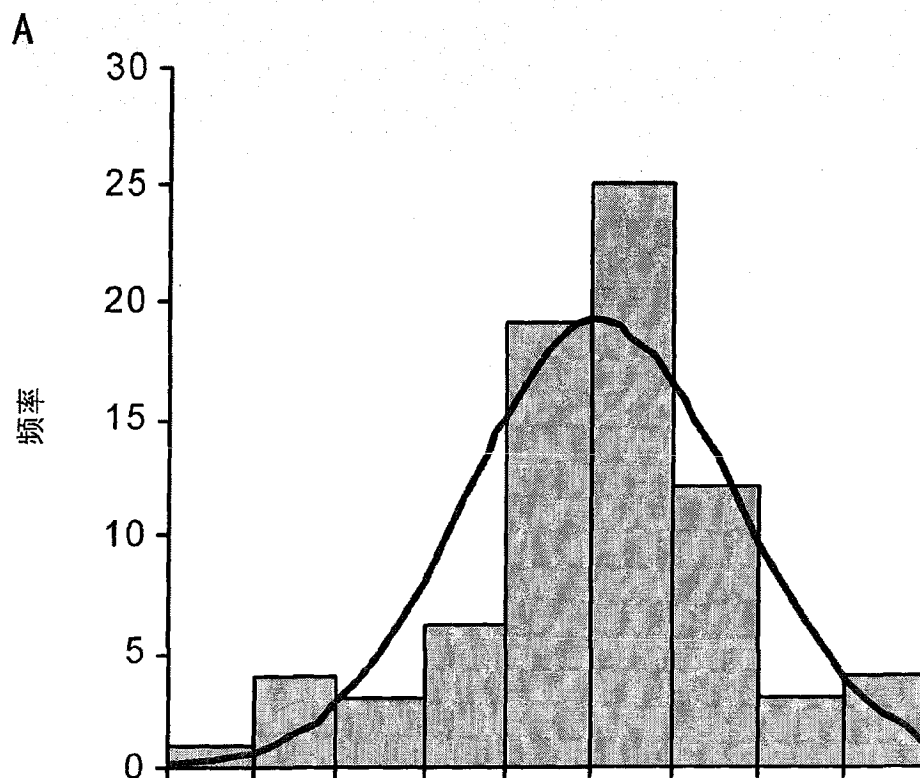


图 37

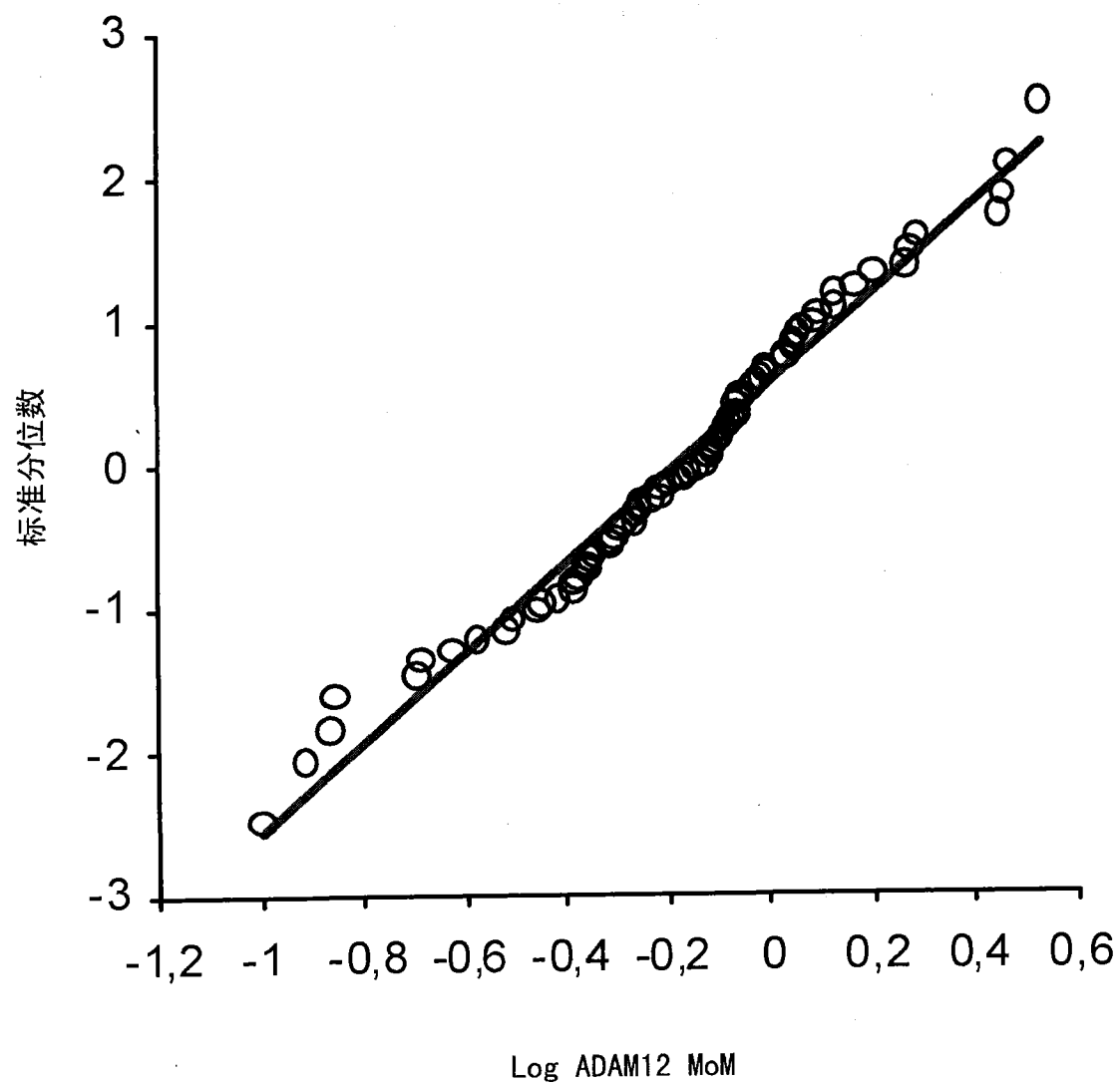


图 38

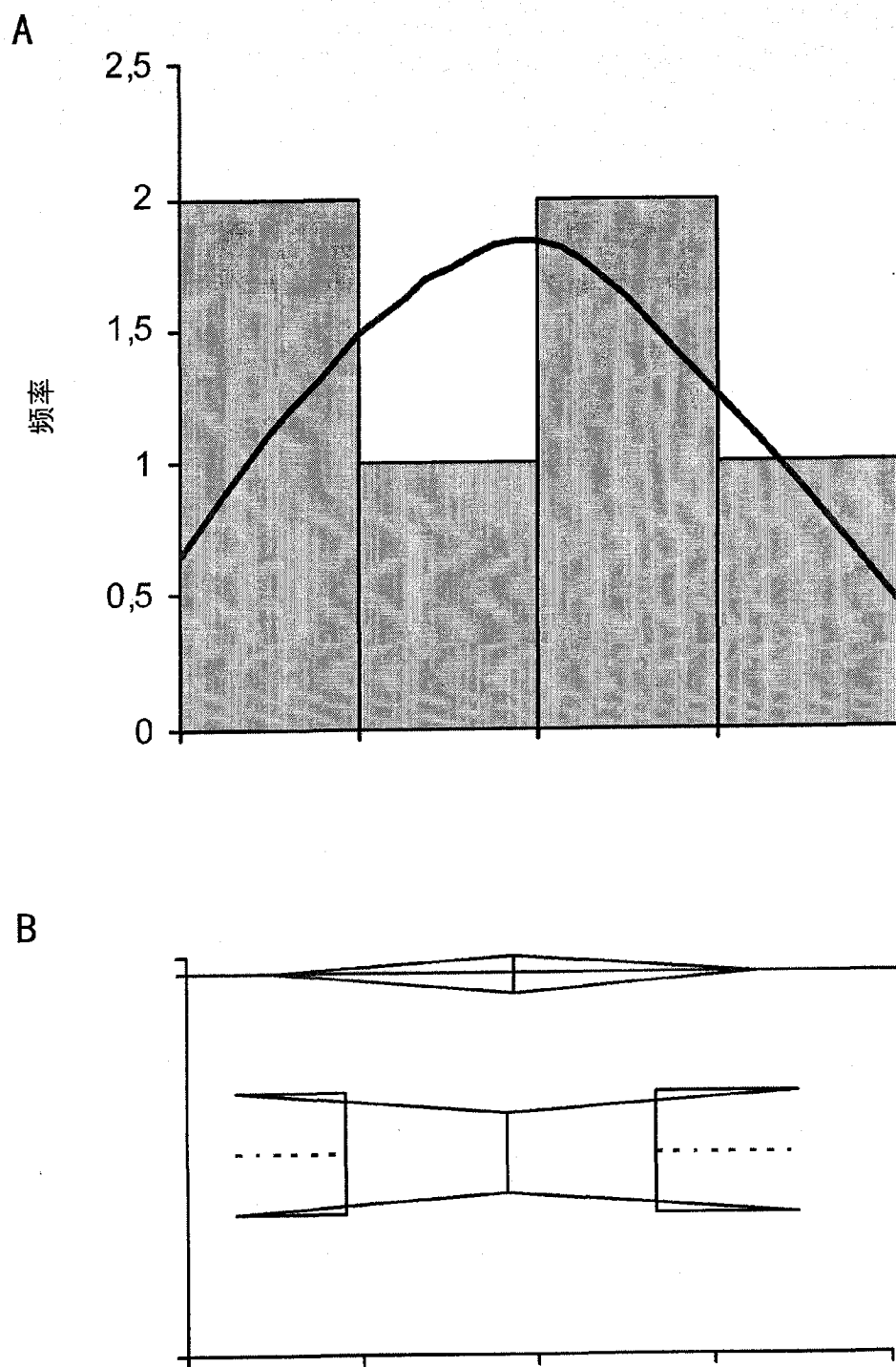


图 39

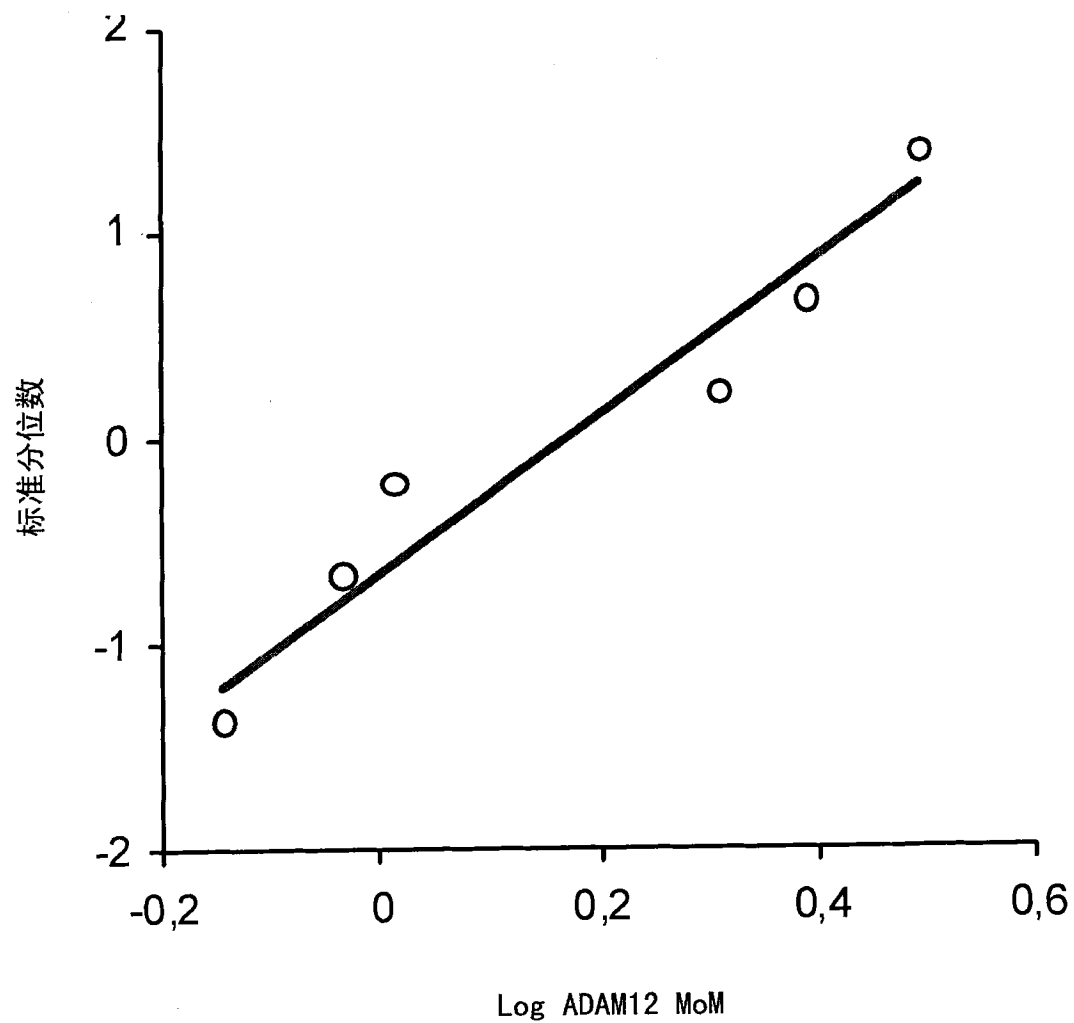


图 40

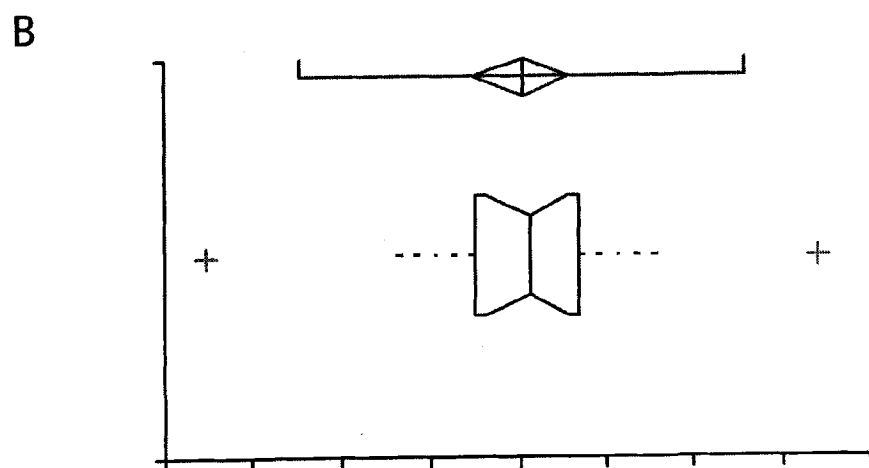
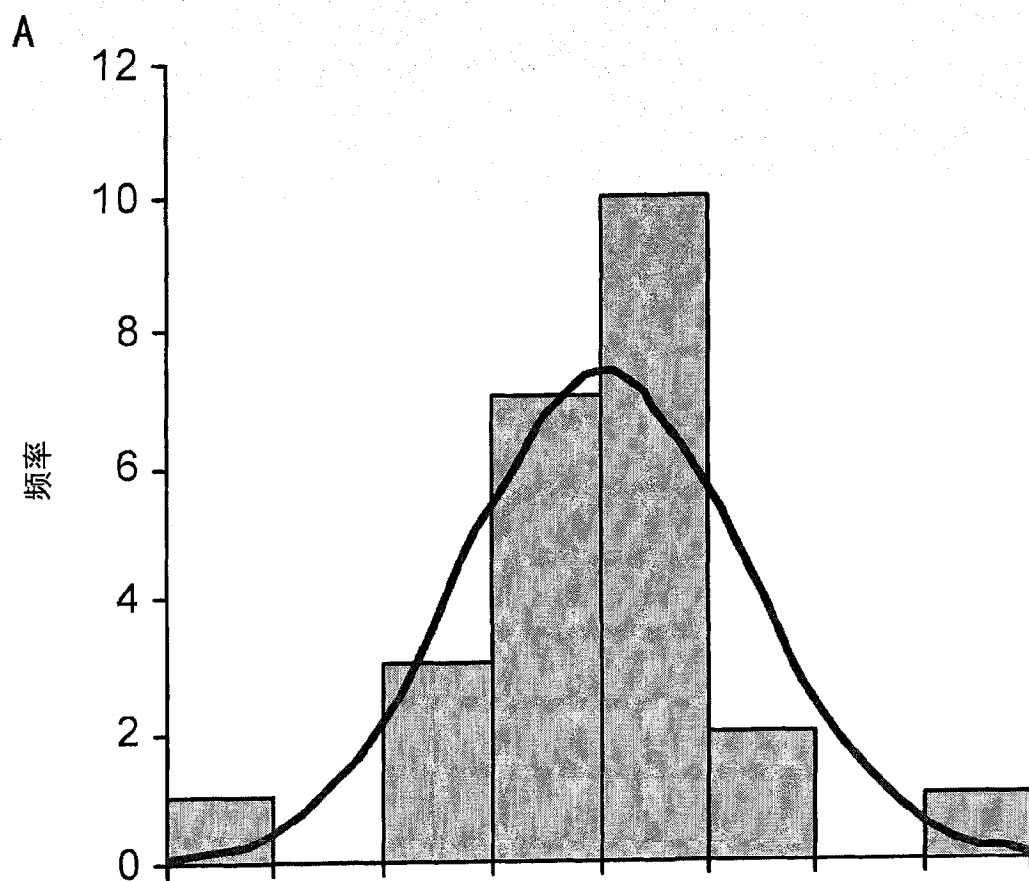


图 41

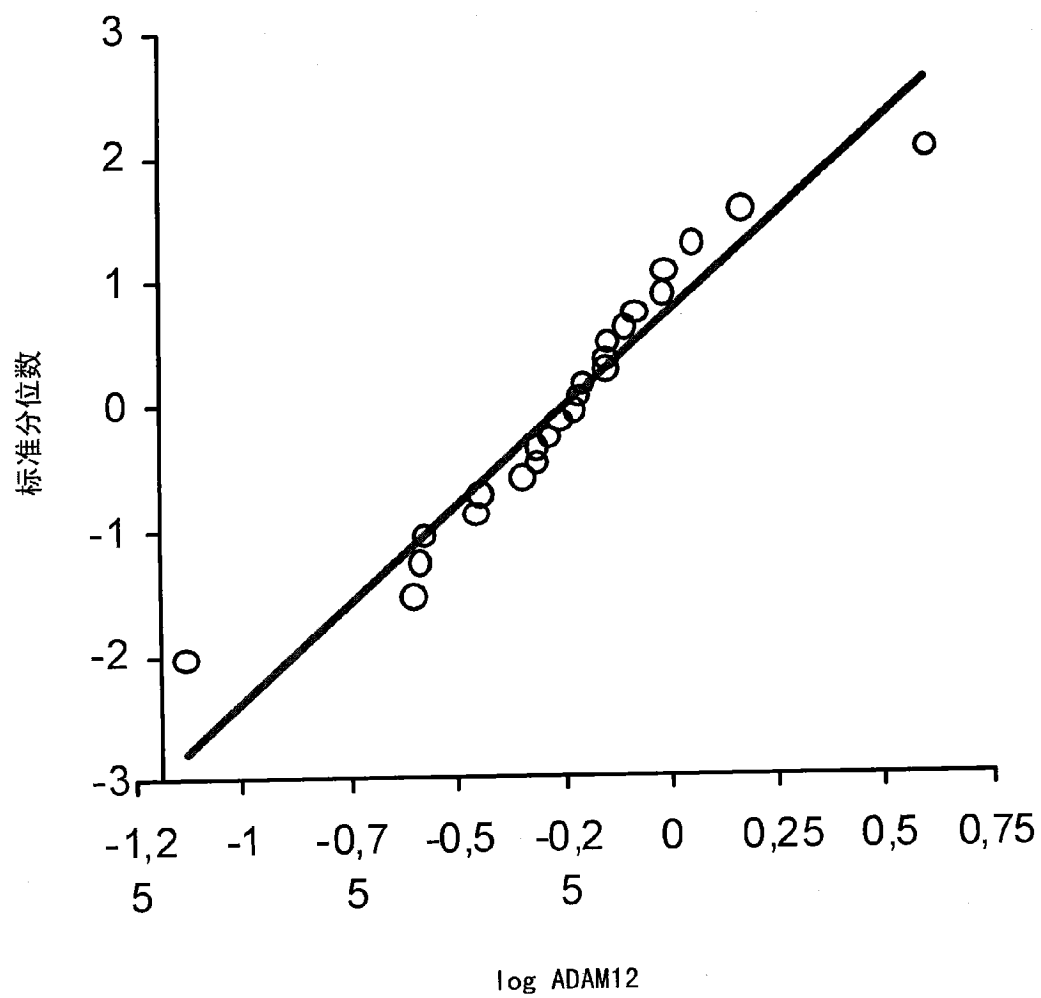


图 42

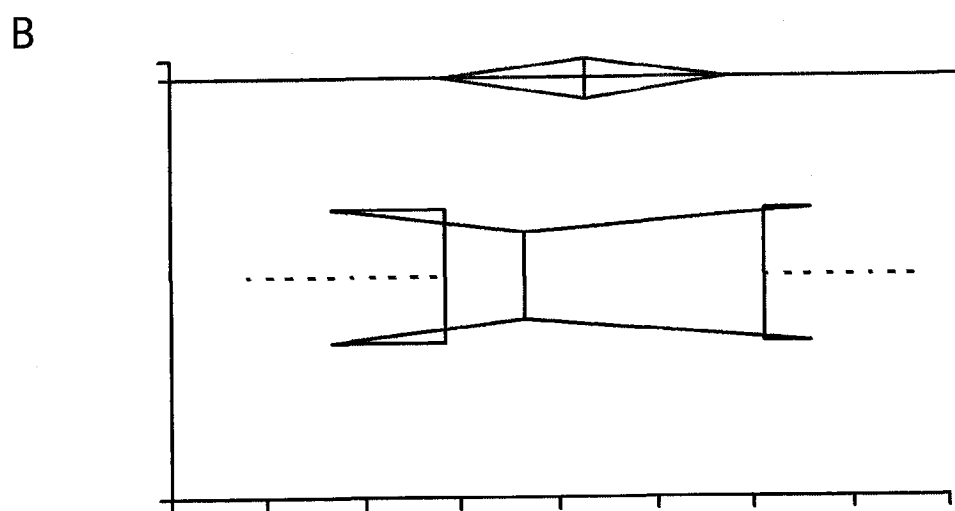
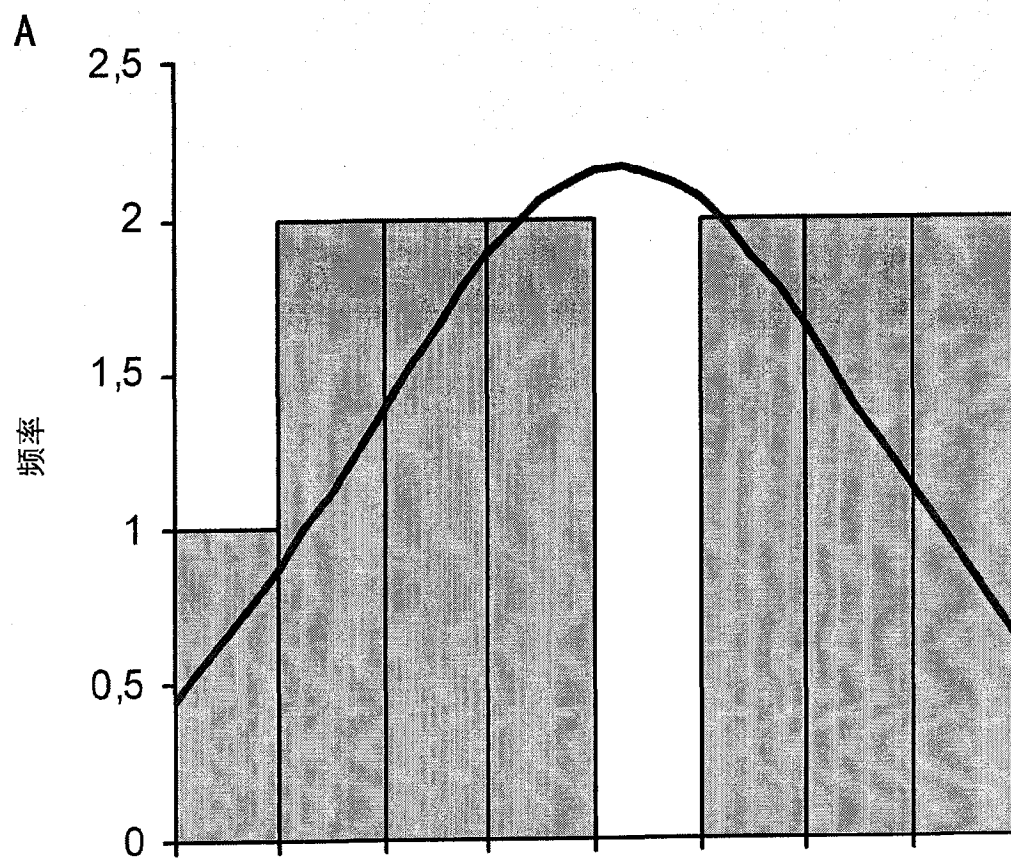


图 43

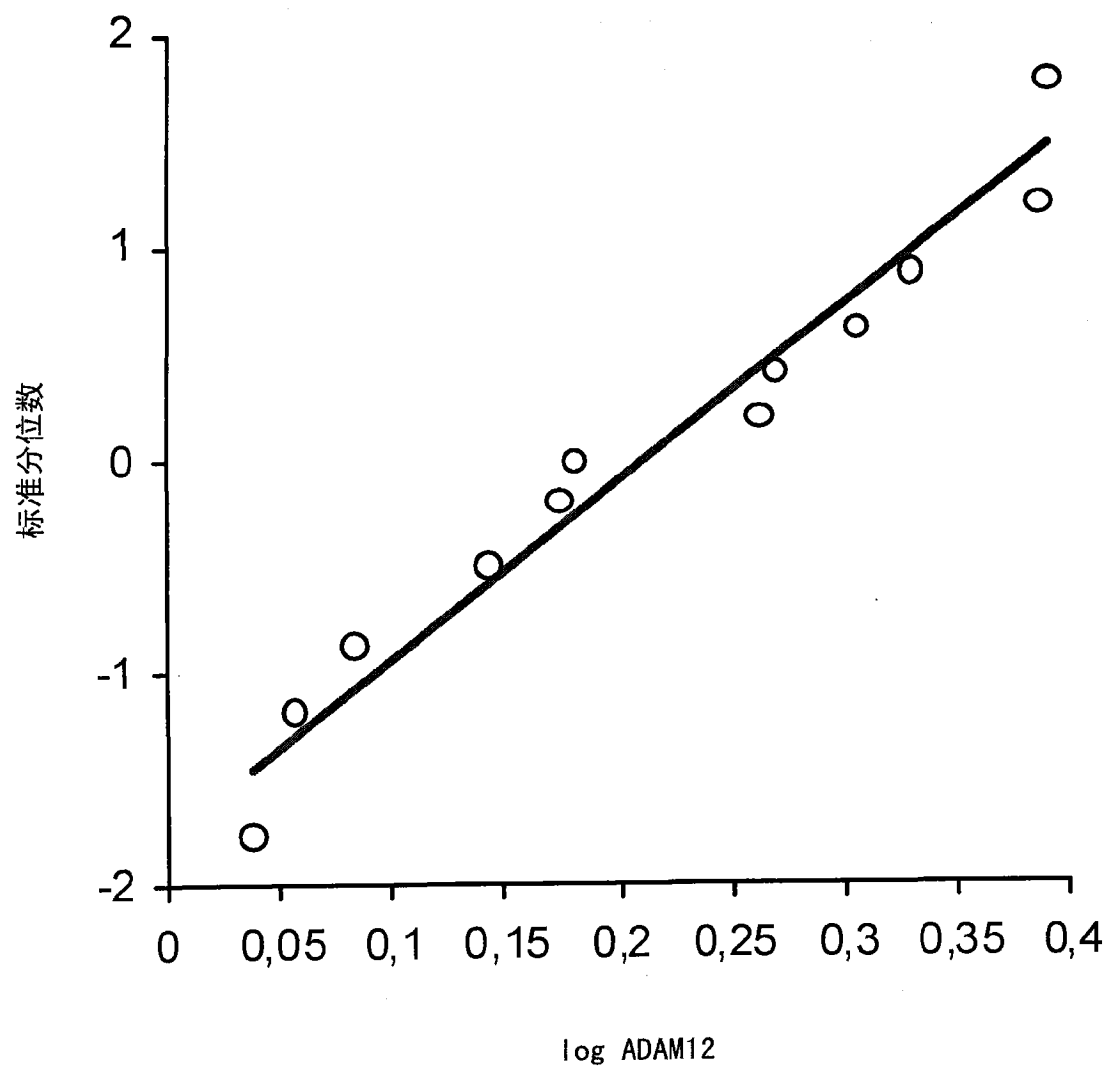


图 44