

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4593106号
(P4593106)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06 Z N A
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D

請求項の数 11 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-510760 (P2003-510760)	(73) 特許権者	504006087
(86) (22) 出願日	平成14年6月28日(2002.6.28)		バイオインセプト、エルエルシー
(65) 公表番号	特表2005-512953 (P2005-512953A)		アメリカ合衆国、08003-3157
(43) 公表日	平成17年5月12日(2005.5.12)		ニュージャージー州、チェリー ヒル、ラーク レーン 1697
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/020599	(74) 代理人	100104411
(87) 国際公開番号	W02003/004601		弁理士 矢口 太郎
(87) 国際公開日	平成15年1月16日(2003.1.16)	(72) 発明者	バーネア、エイタン
審査請求日	平成17年6月22日(2005.6.22)		アメリカ合衆国、08003 ニュージャージー州、チェリー ヒル、ラーク レーン 1697
(31) 優先権主張番号	60/302,607		
(32) 優先日	平成13年7月2日(2001.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 着床前因子の新しいアッセイ方法および着床前因子ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列Met-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Alaである単離ペプチド。

【請求項2】

配列Val-Ile-Ile-Ile-Ala-Gln-Tyr-Met-Aspである単離ペプチド。

【請求項3】

請求項2記載の単離ペプチドであって、

ヒトCD2抗原に結合する抗CD2モノクローナル抗体と結合する単離ペプチド。

10

【請求項4】

配列Ser-Gln-Ala-Val-Gln-Glu-His-Ala-Ser-Thrである単離ペプチド。

【請求項5】

配列Met-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Pro-Serである単離ペプチド。

【請求項6】

配列Met-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Pro-Ser-Asp-Aspである単離ペプチド。

【請求項7】

20

請求項1、5、または6記載の単離ペプチドであって、ヒトCD2抗原に結合する抗CD2モノクローナル抗体と結合し、スποロゾイド周囲タンパクではない単離ペプチド。

【請求項8】

配列Ser-Gly-Ile-Val-Ile-Tyr-Gln-Tyr-Met-Asp-Asp-Arg-Tyr-Val-Gly-Ser-Asp-Leuである単離ペプチド。

【請求項9】

請求項8記載の単離ペプチドであって、ヒトCD2抗原に結合する抗CD2モノクローナル抗体と結合し、HIVタンパクではない単離ペプチド。

【請求項10】

配列Ser-Gln-Ala-Val-Gln-Glu-His-Ala-Ser-Thr-Asn-Xaa-Glyである単離ペプチドであって、Xaaはあらゆるアミノ酸とすることができるものである単離ペプチド。

【請求項11】

請求項10記載の単離ペプチドであって、ヒトCD2抗原に結合する抗CD2モノクローナル抗体と結合し、ヒトレチノイドおよびサイロイドホルモンレセプターのサイレンシングメディエータではない単離ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、受精したこと、および胚が生存していることを示すごく初期のマーカーである着床前因子（PIF, Preimplantation factor）に関し、PIF活性を検出する新規工程に関し、およびPIFペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

不妊は、世界中で数百万の夫婦が悩む重大な健康上の問題である。この問題の原因としては、ヒトの胚の初期の死が一般的な事象である。自然の単一妊娠の約73%が、妊娠の6週目に達する前に失われる（Boklage CE. Survival probability of human conceptions from fertilization to term. Int J Fertil 1990; 35: 75）。これはほとんどが、着床前もしくは着床した直後の初期の胚の死による。年齢が高い女性では低い受精率を示すという報告、および若い女性から卵母細胞の提供を受けることによりその率が改善するという報告から、卵母細胞の質が妊娠を成功させるのに重要な要因であることが分かる（Navot D, Bergh PA, Williams MAら、Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline female fertility. Lancet 1991; 337: 1375）。

【0003】

体外受精（IVF、In vitro fertilization）は不妊の問題に対処するために開発された技術である。しかし、着床のためにin vitroで胚を培養する人工的な条件下では、胚の生存を維持する事はより困難である。In vitroでは、胚の発達率はin vivoよりも低く、一般的に、25-65%の胚だけが胚床段階まで発達する（Gardner DK, Lane M, KOuridakis K, Schoolcraft WB. Complex physiologically based serum-free culture media increase mammalian embryo development. In: Gomel V, Leung PCK, eds. In vitro fertilization and assisted reproduction. Procc 10th World Congress, 1997: 187）。現段階の技術では、着床し、生存し続けること

10

20

30

40

50

ができそうな胚を識別することが出来ない。In vivoで、受精および初期の胚の着床のマーカーとして現在用いられているヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG、Human chorionic gonadotropin）のみが、着床後数日で検出することができる。胚が生存していることを示す適切なマーカーがないので、最近では、着床することが出来ないたくさんの胚が体内に移され、したがって、妊娠が成功する可能性を低下させている。

【0004】

胚が生存していないかもしれないという可能性に対処するために、よりたくさんの胚が同時に母体に移される。たくさんの胚を移すと、遺伝的に危険である多胎妊娠を導く可能性があり、一方、少数の胚を移すと、どの胚も着床しないかもしれず、全てのIVF周期（IVF cycle）を失う危険性がある。胚の選択を改善すること、および胚の生存を決定する適切なマーカーを決定することが必要であることは明らかである。さらに、生存していて、なおかつ着床可能な胚に特有な生成物の培養培地を検査するという非侵襲的な方法を用いると、胚に損傷を与えることなく、結果的に最も妊娠を成功させそうな胚を選択することが出来る。

10

【0005】

妊娠が成功するかしないかを決定する別の要因は、胚の免疫機構と母体の免疫機構との間の相互作用である。受精直後に、全身的に母体が妊娠を認識する。特定の初期の胚の信号により引き起こされる母体の免疫機構の調節がこの工程のかぎである。卵母細胞が受精されるとすぐに、その接合体はハッチング胚期に至るまで、硬い半透過性の膜である透明帯に覆われる。したがって、胚により分泌される化合物を通して、胚が卵管および子宮腔で発達する間と同時に、胚-母体の連絡が起こらなければならない。

20

【0006】

妊婦の血清と生存胚を適切な条件下で培養すると、CD2抗体の存在下で、血小板とTリンパ球によるロゼット形成の増加を引き起こす。1997年7月8日に発行された、Barneaらによる米国特許番号5,646,003、および1999年11月9日に発行されたBarneaらによる米国特許番号5,981,198に開示される通り、着床前因子（PIF）の存在は、リンパ球、血小板、妊娠した被験者から採取した熱不活性化血清、テンジクネズミ補体およびT11（抗CD2）モノクローナル抗体（Dakko, Denmark）を混合することにより検出され、血小板とリンパ球とのロゼット形成は、妊娠被験者ではPIFにより増加される。PIFは（i）2細胞期へ進行中の、生存する初期のヒトおよびマウス胚から分泌され、；胚を次のVIFへ移した3-4日後に末梢循環中で検出され、（iii）初期のネガティブなPIFの結果3%に対し、出産された新生児（take home babies）73%と関連し、（iv）子宮内で受精後5-6日で探知され、（v）非妊娠血清、もしくは生存していない胚中には存在せず、そして（vi）ヒトに加え、マウス、馬、牛、そして豚などの様々な妊娠した哺乳類に存在する。さらに、PIFは、自然流産の際にhCGの分泌が減少する2週間前に循環中から消失することが知られている。

30

【0007】

上述のPIFアッセイで用いたモノクローナル抗体は、CD2と呼ばれるリンパ球と関連した抗原に対して認識される。CD2はヒト末梢血液中のリンパ球上の約80-90%に、胸腺細胞の95%以上に、赤血球ロゼットを形成するTリンパ球の全てに、およびNK細胞の細胞垂集団に存在する。T細胞活性化に必要とされる抗原の量を減少させる接着分子としての機能、T細胞活性化の共刺激分子もしくは直接のプロモータとしての機能など、T細胞活性化においてCD2は様々な役割を果たしている。さらには、CD2はアネルギーの誘導、サイトカイン産生の調整、およびT細胞のポジティブセレクションの制御などに関与している。

40

【0008】

CD2の自然のリガンドは、構造的に関連したIgSF CAMs CD58（LFA-3）であり、それらは広く細胞に分布する細胞表面の接着リガンドである。さらに、C

50

CD2はCD48、CD59およびCD15 (Lewis x) 関連炭化水素構造と相互作用する。CD2はCD58と非常に低い結合力で、また非常に早い解離定数で結合する。CD2とそのリガンドCD58の横方向への再分布は細胞の接着性に影響する。CD2の接着性の制御は、抗原反応性を促進するCD2の能力に影響する。アビジチン(毒素抗毒素反応)制御能力のないCD2細胞株は抗原特異反応において著しい欠如を示す。上昇したCD2アビジチンから起こる接着の強さは、CD2仲介シグナル伝達とは別に、直接T細胞反応性に寄与する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

10

本発明は、PIFが存在することを検出するために用いられるアッセイ方法、およびそのアッセイ方法を用いて認識されるPIFペプチドに関する。具体的には、本発明はPIFを検出するためのフローサイトメトリーアッセイに関する。本発明は、少なくともある程度は、蛍光標識された抗リンパ球抗体および抗血小板抗体を用いたフローサイトメトリーではPIFの存在下ロゼット形成の増加を示した、という観察に基づく。さらに、本発明は、PIFの存在下CD2に結合するモノクローナル抗体が減少したことがフローサイトメトリーにより示された、という観察にも基づく。

【0010】

さらに、本発明は、PIFペプチドに関することであり、PIFペプチドがジャーカット細胞培養液に添加されたとき、PIFペプチドは(i) ジャーカット細胞への抗CD2 20 抗体の結合を減少させること、(ii) ジャーカット細胞でのCD2の発現を上昇させること、もしくは(iii) ジャーカット細胞の生存性を減少させること、のいずれかであることが観察される。さらに他の例では、本発明は、抗CD2抗体のCD2基質へ結合する際の試験試料の影響を決定することにより、PIFを検出するELISAアッセイを規定する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

発明を実施するための第1の形態において、本発明は、ある試料において着床前因子が存在するかを決定する工程を規定しており、その試料が抗CD2抗体のCD2抗原への結合を阻害する成分を含むかどうかを検出する工程を有し、抗CD2抗体のCD2抗原への 30 結合阻害能力は着床前因子の存在と正の相関を示す。

たとえば、そのような方法はフローサイトメトリー法、もしくは酵素抗体法において利用され、さもないれば、本分野で知られた技術を用いる。抗CD2抗体のCD2抗原への結合を感知するフローサイトメトリー法の非限定的な例は以下に示すPIFのためのフローサイトメトリーアッセイの項で述べる。

【0012】

本明細書で用いられる抗CD2抗体とは、CD2と特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体である。このようなモノクローナル抗体はPharmigenにより販売されている(下記参照)。

【0013】

40

CD2抗原は精製したCD2抗原の形で存在するか、細胞内に保持される。本発明を実施するための非制限的な形態において、その細胞はジャーカット細胞である。他のCD2発現細胞株も本分野では知られている。

【0014】

試料は血清試料(たとえば、受精/着床/胚の生存を検査する予定の被験者からの血清)であるか、培養液(たとえば、IVFに移される前の胚の生存を決定するための)試料であるか、もしくはPIFペプチドの存在を検査されることになっている溶液(たとえば、PIF acting agentを精製している間; 下記、例: PIFペプチドの認識の項参照)である。

【0015】

50

被験者はヒト（たとえば、妊娠していることが疑われるヒト）であるか、非ヒト被験者（たとえば、家畜もしくは動物園の動物）である。

【0016】

発明を実施するための第2の形態において、本発明は、ある試料において着床前因子が存在するかを決定する工程を規定しており、その試料がリンパ球、血小板および抗CD2抗体の間でのロゼット形成を増加させる成分を含むかどうかを、フローサイトメトリを用いて検出する工程を有し、ロゼット形成の増加は着床前因子の存在と正の相関を示す。たとえば、そのようなアッセイは、リンパ球と血小板に対して認識される蛍光標識された抗体を用いて行われ、抗血小板抗体と抗リンパ球抗体に対して異なる標識が用いられるのが好ましい。

10

【0017】

本発明は以下の単離されたペプチドを規定する。

【0018】

(1) 以下を含む集団から選択された配列を持つ単離されたペプチド：Met-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Ala；Met-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Phe-Ser；Met-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Phe-Ser-Asp；およびMet-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Phe-Ser-Asp-Asp、もしくはここで述べられたペプチドを有する単離されたペプチドで、抗CD2抗体と結合し、スποロゾイド周囲たんぱくではないペプチド。

20

【0019】

(2) 配列Ser-Gly-Ile-Val-Ile-Tyr-Gln-Tyr-Met-Asp-Asp-Arg-Tyr-Val-Gly-Ser-Asp-Leuを持つ単離されたペプチド、もしくはここで述べられたペプチドを有する単離されたペプチドで、抗CD2抗体と結合し、HIVたんぱく質ではないペプチド。

【0020】

(3) 配列Val-Ile-Ile-Ile-Ala-Gln-Tyr-Met-Aspを持つ単離されたペプチド、もしくはここで述べられたペプチドを有する単離されたペプチドで、抗CD2抗体と結合するペプチド。

30

【0021】

(4) 以下を含む集団から選択された配列を持つ単離されたペプチド、Ser-Gln-Ala-Val-Gln-Glu-His-Ala-Ser-ThrおよびSer-Gln-Ala-Val-Gln-Glu-His-Ala-Ser-Thr-Asn-Xaa-Gly、ここでXaaはいずれのアミノ酸でも良く、もしくはここで述べられたペプチドを有する単離されたペプチドで、抗CD2抗体と結合し、ヒトレチノイド およびサイロイドホルモンのサイレンシングメディエータ ではないペプチド。

【0022】

例：PIFペプチドの認識

PIFは限外ろ過、凍結乾燥、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、アフィニティクロマトグラフィー、そしてウエスタンブロットを用いて、大量のMECCMから単離された。ペニシリン、ストレプトマイシン、硫酸マグネシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウムおよび乳酸カルシウムを加え、0.1%BSAを添加されたHam's F10培地中で、2細胞胚期のマウス胚が数日間培養された。回収されたMECCMは使用されるまで-80℃で保存した。

40

【0023】

1リットルのMECCMがアミコン膜（3kDa カットオフ；YM-3kDa、Amicom. Millipore Co, USA）を用いた限外ろ過により精製された。収集されたMECCMはさらに300mLの精製水を用いて透析ろ過された。さらに、新鮮な培地（CM、胚は含まない）が同じ方法により処理された。MECCM-3kDa限外

50

ろ過、透析ろ過物のみがP I F活性を示し、それらは蓄積され、凍結乾燥により濃縮された。

【0024】

P I Fは抗C D 2モノクローナル抗体 (M a b C D 2) と結合することができる、ということが確認されている。したがって、まず、P I F活性分画が、アガロースーヒドラジドーM a b C D 2活性化ゲルを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製された。抗体アフィニティマトリックスは下記のように調整された。1. 5mgのM a b C D 2 (c l o n e P R A - 2. 1 0, P h a r m i g e n, B e c t o n D i c k i n s o n) は、E c o n o - P a c 1 0 D G脱塩カラムを用いて、pH 5. 5のカップリングバッファとバッファ交換され、さらに過ヨウ素酸ナトリウムで酸化され、製造元の指示 (A f f i - g e l H i d r a z i d e i m m u n o a f f i n i t y k i t, B i o R a d L a b o r a t o r i e s, C A, U S A) に従い、アガロースーヒドラジド活性化ゲル2mLにカップルされた。そして、M E C C M - 3 k D a限外ろ過ー透析ろ過ー凍結乾燥粉末はさらにM a b C D 2アフィニティクロマトグラフィーカラム (10×20mm) を用いて精製された。M E C C M - 3 k D a粉末2gは10mLの精製水に溶解され、pH中性化され、0. 22mシリンジ滅菌フィルタ (C o r n i n g I n c. N Y, U S A) を通してろ過溶出され、自然流下にてアフィニティクロマトグラフィーを5回行った。そのカラムはベッドボリューム (v o l u m e b e d) の5倍のpH 7. 2、100mMのリン酸食塩水緩衝液を用いて洗い、次にベッドボリュームの5倍の0. 5Mの塩化ナトリウムを用いて洗った。

10

20

【0025】

結合したP I Fは3mLの0. 1M酢酸で溶出された。P I F溶出分画は蓄積され、P I F活性が測定され、凍結乾燥により濃縮された。

【0026】

アフィニティクロマトグラフィーによりさらに精製されたM E C C M - 3 k D a超ろ過物、合計300mgが3回に分けてC l i p e u s C 1 8準備カラム (H i g g i n s A n a l y t i c a l, I n c., U S A) を用いたH P L Cで流された。準備H P L Cランニングパラメータは：流速 15ml/min、緩衝液 A=0. 1%トリフルオロ酢酸 (T F A) ; B=99. 9%アセトニトリル (C H 3 C N)、0. 1% T F A。勾配：0%B, 5分間、そして0-60%B、30分間、さらに0-100%B、3分間。

30

【0027】

H P L Cからの分画はさらに蒸発により濃縮された。H P L C濃縮分画はpH中性化され、P I F活性を再び測定された。幾つかの分画は高いP I F活性を示した (図1A参照)。これらの分画はさらにV y d a c C 8分析カラム (4. 6×250mm; H e s p e r i a, C A, U S A) を用いたH P L Cにより精製された。このH P L Cのパラメータは：流速 1ml/min、緩衝液 A=0. 1%トリフルオロ酢酸 (T F A) ; B=99. 9%アセトニトリル (C H 3 C N)、0. 1% T F A。勾配：0%B, 5分間、0-60%B、そして30分間、さらに0-100%B、3分間。幾つかの流出分画はP I F活性を示し (図1B)、さらにアミノ酸組成の決定が行われ、分子量 (M W) がマスペクトル法により決定された。

40

【0028】

M E C C Mから精製されたP I F活性分画はウエスタンブロット (W B) により正のシグナルを示した。C M限外ろ過ー凍結乾燥分画からの溶液がW Bのネガティブコントロールとして用いられた。W B条件は以下のとおりである。ゲルには、16. 5%のアガロース分解ゲルと4%のアガロース濃縮ゲルを持つ、S D S - P A G E事前泳動ゲル (B i o r a d) が用いられた。そのゲルは100mMトリス、100mMトリシン、0. 1% S D S、pH 8. 3 (トリスートリシン泳動バッファ) で泳動された。10マイクロリットルのトリシンサンプルバッファ [200mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス-H C l) pH 6. 8、2% ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、40%グリセロール、0. 04% クマシーブルーブリリアント (C B B - G 2 5 0)] (B i o R a

50

d) と 30 マイクロリットルの P I F - M E C C M 精製分画から成る試料が 5 分間 95℃ でインキュベートされた。冷却後、そのサンプルは S D S - ポリアクリルアミドゲル (P A G E) のウェルにロードされた。低分子量 (MW) のポリペプチドの分子量を決定するために、S D S - P A G E 標準物質 (B i o R a d) の 1 : 20 水希釈液 10 マイクロリットルが各ゲルのウェルにロードされた。電気分解のために、サンプルと標準物質は 5 分間 175 V で、そして 1 時間 60 V で泳動された。

【0029】

そして得られたゲルは、トランスファバッファとして 100 mM の C A P S [(3 - シクロヘキシルアミン) 1 - プロパン硫酸] 緩衝液、pH 11 を用いて電気ブロッティングされた。電気ブロッティングは 80 mA で 1 時間、0.22 μm ニトロセルロース膜 (B i o R a d) で行われた。

10

【0030】

そして、ニトロセルロース膜は、室温で、18 時間 5% ブロッキング溶液 (A m e r s h a m, P h a r m a c i a, B i o t e c h, N J, U S A) でブロックされ、P B S - T [リン酸食塩水緩衝液 - 0.05% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (T w e e n 20)] で 20 分間、4 回洗った。1 回目の抗体のインキュベーション用に、ブロックされた膜が、2 μg/ml の M a b C D 2 (P h a r m i g e n) - P B S - T 溶液と、室温で 2 時間インキュベートされ、上記のように洗った。2 回目の抗体のインキュベーション用に、その膜は抗マウス西洋ワサビ標識 (P B S - T 中 1 : 1000) 溶液と、室温で 1 時間インキュベートされ、E C L - 化学発光システム (A m e r s h a m) を用いて視覚化された。図 2 は M E C C M から精製された P I F ペプチドの典型的なウェスタンブロットを示している。

20

【0031】

P I F を測定するためのフローサイトメトリの方法 (F C) は、米国特許番号 5,646,003 および 5,981,198 に示す方法の効率性および生産性を向上させるために開発された。特に、いずれの抗体も P h a r m i g e n から入手できるが、M a b C D 2 もしくは M a b C D 2 - C y 5 (C y クロム標識抗体)、M a b C D 45 - P D (フィコエリスリン標識抗体) および M a b C D 41 a - F I T C (フルオレセイン イソチオシアネイト 標識抗体) を用い、妊娠したヒトの血清、非妊娠のヒトの血清、豚の血清、M E C C M、C M および単離された P I F 分画でのロゼット形成が F C により評価された。標識された P - L 複合体の割合は、C M に比較して M E C C M では 30 - 40% 高かった (図 3 A)。さらに、M E C C M もしくは妊娠血清を、固定化された M a b C D 2 と事前にインキュベーションすると、そのアッセイにおいて P - L 形成を阻害することがわかった。M a b C D 58 (リンパ球機能関連抗原 3、すなわち L F A 3) 抗体を L - P に添加しても、そのアッセイにおいて、P I F 活性試料の影響によるロゼット形成を完全に阻害しなかった。

30

【0032】

ジャーカット細胞 (J C) および M a b C D 2 - C y 5 を用いた F C - P I F 量的アッセイが開発された (図 3 B)。固定化された白血病細胞株を使うと、バイオアッセイによる P I F 活性の評価のための新鮮な提供血液を必要としなくてすむ。J C - F C アッセイはヒト血清サンプルでバリデートされ (表 1 参照)、P I F 精製の間の分画の P I F 活性を評価するために用いられた。

40

【0033】

精製された P I F 活性分画の分子量は、P e r s p e c t i v e B i o s y s t e m s (C a m b r i d g e, M A, U S A) の V o y a g e r - R P B i o s p e c t r o m e t r y M A L D I - T O F ワークステーションにて、マスマススペクトル分析により決定された。サンプルは 1% トリフルオロ酢酸を含む、アセトニトリル：水の 1 : 2 混合液から成るマトリックスと混合させた。スペクトルは約 200 スキャンの平均であった。M E C C M からの P I F ペプチドは 610 - 1845 D a の間の分子量を持つ (図 4)。

【0034】

50

さらに、PIF活性分画をMa b C D 2と事前にインキュベーションするとPIF活性を阻害することが評価された。これらのデータによると、PIFはC D 2もしくは相同なペプチドの一部でありうることが示唆された。しかし、精製したPIFペプチドの配列を確認してみると、これらのペプチドはC D 2の一部ではなく、それらのアミノ酸配列は特有であることが分かった。

【0035】

J C-F Cアッセイを用いることにより、M E E C M-PIFペプチドが、T細胞によって発現されるC D 2に対し、3つの異なる影響を持つことが分かった。これらの影響は、Ma b C D 2のJ Cへの結合の減少；J CによるC D 2発現のアップレギュレーション；または、J Cの生存性の減少、に関連している。

10

【0036】

マウス胚からの、精製されたPIF活性分画は、Applied Biosystems Pulsed Liquid Sequencer (モデル477A)によりエドマン分解法により配列が確認された。放出されたアミノ酸はフェニルイソチアン酸で派生され、PTH-アミノ酸になり、そのシークエンサーと連結するHPLCにて逆相HPLCにより検出されることができるようになる。PIF分画の幾つかは特有な配列であることがわかった。幾つかのペプチドはN末端の9および10残基が同じである配列であり、それは、それらのペプチドが共通の分子の様々な不完全な形態であることを示している(表I I参照)。PIFペプチドは、胚由来および妊娠に関連した小さなペプチドの、少なくとも3つの特有なファミリーとして認識された。3つのPIFペプチドから成るファミリーの20
アミノ酸配列はスポロゾイド周囲タンパク(マラリア寄生：熱帯熱マラリア原虫)のある部位と100%一致した。PIFペプチドのこのファミリーはJ CによるC D 2発現をアップレギュレートする。あるPIFペプチド(14アミノ酸)は初めの5アミノ酸だけが今述べたPIFペプチドファミリーと一致し、他のPIFペプチド(18アミノ酸)は、その11アミノ酸で、HIV-1 RNAディレクティッドDNAポリメラーゼ(逆転写酵素、E C 2. 7. 7. 49)と一致し、またJ CによるC D 2発現をアップレギュレートする。さらに、2つのアミノ酸(9および13アミノ酸)のファミリーは、10アミノ酸で、レチノイドおよびサイロイドホルモンレセプター(SMRT)(Chen and Evans, 1995)へのサイレンシングメディエータである、ヒトレセプター-相互作用因子の配列と一致する。このペプチドファミリーのなかでも比較的短いペプチドはJ CへのMa b C D 2の結合に対し競合的な影響を示し、比較的長いペプチドはJ Cの生存性を減少させる。核レセプターにより仲介される転写のサイレンシングは発達、分化および発がん性において重要である。

20

30

【0037】

PIFペプチドは、各アミノ酸のアミノ窒素がFmocでブロックされた、Fmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニル)化学を採用した、Applied Biosystems Peptide Synthesizerにおいて、固相ペプチド合成(SPPS)により合成された。カップリングは、ジイソプロピルエチルアミンの存在下、3 m o l / m l の2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート/1-ヒドロキシルベンゾトリアゾールを用いた、N-保護アミノ酸のカルボキシル基の活性化により行われた。活性化されたアミノ酸は続いて初めのペプチドに加えられた。その合成が終了すると、逆相HPLCにより最後の精製が行われ、相同性がMALDI-TOFマスペクトルおよびアミノ酸解析により確認された。PIF合成ペプチドは、ジャーカット細胞において、C D 2に同様な影響を示し(図6)、またMa b C D 2により免疫検出された。

40

【0038】

PIFのためのフローサイトメトリアッセイ

原材料

材料は、ジャーカット白血病細胞(JC)；クローニング培地；フローサイトメトリ測定用のファルコンチューブ；Ma b C D 2-Cy 5(Cy-クロム標識抗体、clone

50

R P A - 2 . 1 0 , P h a r m i g e n , B e c t o n D i c k i n s o n) ; 生物学的試料 (P I F 活性のアッセイがされる予定のヒトの血清、もしくは推測、または合成の P I F ペプチドの溶液) ; P B S - 2 % B S A (1 0 0 m M リン酸食塩水緩衝液 - 2 % ウシ血清アルブミン ; ネガティブコントロールとして) ; トリパン - 青染色液 ; 細胞培養のための C O ₂ インキュベーター ; フローサイトメーター

【 0 0 3 9 】

方法

J C 懸濁液を調製するために、
トリパン青染色液排除染色を用い、J C 培養の生存性を確認する。細胞の生存性は 8 0 - 9 0 % の間であるべきである。

10

その J C を 2 度 1 0 m L の P B S - 2 % B S A で洗う。

クローニング培地、または 5 , 0 0 0 , 0 0 0 細胞 / m l を含む P B S - 2 % B S A で、J C 懸濁液を調製する。

5 0 m l の J C 懸濁液をファルコンチューブに分配する (2 5 0 , 0 0 0 細胞 / m l) 。

【 0 0 4 0 】

サンプルのインキュベーションのために、
2 0 0 μ l の試料、初期の妊娠コントロールからの血清 (3 つのポジティブコントロール) 、または P B S - 2 % B S A (ネガティブコントロール) 、を加える。

室温で、2 0 - 3 0 分間インキュベートする。

P B S - 2 % B S A で 1 : 2 0 0 に希薄した、2 0 0 μ l の M a b C D 2 - C y 5 を加える。ゆっくり混合する。

20

室温で、2 0 - 3 0 分間インキュベートする。

【 0 0 4 1 】

フローサイトメトリによる決定のために、
各チューブの蛍光を測定する (4 8 8 n m レーザー励起波長) 。
生存している細胞と、全ての細胞と、全ての死んだ細胞の蛍光 (図 5 参照) を、コントロールと比較する。

P I F 活性を下記のように計算する。

全ての細胞の蛍光 / % 死んだ細胞 × 生存している細胞の蛍光

結果の解釈

30

P I F の負の活性は 1 3 0 - 3 4 0 の範囲になるはずである。

正の P I F サンプルは負の活性の範囲外である。

【 0 0 4 2 】

様々な論文をここでは引用しており、それらの内容は内容を変更することなく参考文献に載せた。

【 0 0 4 3 】

10

20

30

37人の患者からの血清におけるフロー
サイトメトリPIFアッセイの臨床評価

サンプル	感受性 (%)	特異性 (%)	正の予測値 (%)	負の予測値 (%)
初期の妊娠	91	92	92	92
中期の妊娠	66	92	86	73
後期の妊娠	100	92	83	92
すべての 妊娠サンプル	86	92	88	86

TABLE I.

【表 1】

【表 2】

ペプチドコード ／アミノ酸の数	配列	T細胞関連 CD 2 活性	配列の相同性 (参照)
MECCM-4 (9 アミノ酸)	[E]-m-v-r-i-k-p-g-s-a-[C]E	CD 2 活性の増加	スボロノイド周囲タンパク(マウス)と9アミノ酸において100%一致
MECCM-6 (13 アミノ酸)	[E]-m-v-r-i-k-p-g-s-a-n-k-f-s-[OH]	CD 2 活性の増加	スボロノイド周囲タンパク(マウス)と9アミノ酸において100%一致
MECCM-3 (15 アミノ酸)	[E]-m-v-r-i-k-p-g-s-a-n-k-p-s-d-d-[OH]	CD 2 活性の増加	スボロノイド周囲タンパク(マウス)と9アミノ酸において100%一致
MECCM-5 (14 アミノ酸)	[E]-m-v-r-i-k-y-g-s-y-n-n-k-p-s-d-[OH]	CD 2 活性の増加	スボロノイド周囲タンパク(マウス)と5アミノ酸において100%一致
MECCM-7 (18 アミノ酸)	[E]-s-g-i-v-i-y-q-y-m-d-r-y-v-g-s-d-i-[OH]	CD 2 活性の増加	HIV-1 RNA directed DNA ホリメラーゼ (逆転写酵素、EC2.7.7.49) と11アミノ酸において100%一致
P14-6 (9 アミノ酸)	[E]-v-i-i-a-q-y-m-d-[OH]	結合において、 Ma b CD 2 と競合	一致なし
P13-5 (10 アミノ酸)	[E]-s-q-a-v-q-e-h-a-s-t-[OH]	細胞の生存性の減少	ヒトリンノイド及びサイロイドホルモンレセプター(SMRT)へのサイレンシング剤エータと10アミノ酸において100%一致
P4-3 (13 アミノ酸)	[E]-s-q-a-v-q-e-h-a-s-t-n-g-[OH]	細胞の生存性の減少	ヒトリンノイド及びサイロイドホルモンレセプター(SMRT)へのサイレンシング剤エータと10アミノ酸において100%一致

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1A】マウス胚条件培地 (MECCM) からのPIFの精製；(A) Ma b CD 2 アフィニティクロマトグラフィーにより前もって精製されたMECCM-3 k D A 限外ろ過物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) プロファイル；(B) (A) からのPIF 活性分画をさらにHPLC精製したときのプロファイル

【図1B】マウス胚条件培地 (MECCM) からのPIFの精製；(A) Ma b CD 2 アフィニティクロマトグラフィーにより前もって精製されたMECCM-3 k D A 限外ろ過物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) プロファイル；(B) (A) からのPIF 活性分画をさらにHPLC精製したときのプロファイル

【図2A】MECCMから精製された様々なPIFペプチドのウェスタンブロット解析；まず、Ma b CD 2 が抗体として使われ、次に、アンチセンスのマウス西洋ワサビ過酸化酵素 (HRP) - ビオチン ストレプトアビジン複合体が抗体として用いられた。特異的

な P I F バンドが E C L 検出試薬 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) によって認識された。

【図 2 B】M E C C M から精製された様々な P I F ペプチドのウエスタンブロット解析；まず、M a b C D 2 が抗体として使われ、次に、アンチセンスのマウス西洋ワサビ過酸化酵素 (H R P) - ビオチン ストレプトアビジン複合体が抗体として用いられた。特異的な P I F バンドが E C L 検出試薬 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) によって認識された。

【図 2 C】M E C C M から精製された様々な P I F ペプチドのウエスタンブロット解析；まず、M a b C D 2 が抗体として使われ、次に、アンチセンスのマウス西洋ワサビ過酸化酵素 (H R P) - ビオチン ストレプトアビジン複合体が抗体として用いられた。特異的な P I F バンドが E C L 検出試薬 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) によって認識された。

10

【図 3 A】(A) 新鮮な培養培地 (C M)、マウス胚条件培地 (M E C C M) および M a b C D 2 の存在下、リンパ球-血小板のロゼット形成 (L - P) のフローサイトメトリによる決定。蛍光標識された L に特異的な抗体 (M a b C D 4 5 - P E) および蛍光標識された P に特異的な抗体 (M a b C D 4 2 a - F I T C) が L - P 複合体の検出に用いられた。M E C C M は培養培地 (C M) に比較して、3 0 - 4 0 パーセント高い L - P 形成を示した。

【図 3 B】(B) ジャーカット細胞 (J C) に結合する M a b C D 2 へ M E C C M がどのような影響を与えるかのフローサイトメトリの結果。J C は試料とインキュベートされ、さらに M a b C D 2 - C y 5 とインキュベートされた。M E C C M では、C D 2 に結合する抗体は P I F の存在を減少させた。矢印は P I F 活性を示す。

20

【図 3 C】

【図 4 A】M E C C M から精製された P I F ペプチドのマススペクトル。限外ろ過、透析、H P L C、M a b C D 2 アフィニティクロマトグラフィー、そしてさらに H P L C によって精製された M E C C M からの P I F 活性分画の分子量 (M W) がマススペクトルにより決定された。P I F の M W は A) 6 1 0 - 9 9 5 D a ; B) 9 6 3 - 1 8 4 8 D a ; そして C) 1 8 0 7 1 8 4 6 D a であった。

【図 4 B】M E C C M から精製された P I F ペプチドのマススペクトル。限外ろ過、透析、H P L C、M a b C D 2 アフィニティクロマトグラフィー、そしてさらに H P L C によって精製された M E C C M からの P I F 活性分画の分子量 (M W) がマススペクトルにより決定された。P I F の M W は A) 6 1 0 - 9 9 5 D a ; B) 9 6 3 - 1 8 4 8 D a ; そして C) 1 8 0 7 1 8 4 6 D a であった。

30

【図 4 C】M E C C M から精製された P I F ペプチドのマススペクトル。限外ろ過、透析、H P L C、M a b C D 2 アフィニティクロマトグラフィー、そしてさらに H P L C によって精製された M E C C M からの P I F 活性分画の分子量 (M W) がマススペクトルにより決定された。P I F の M W は A) 6 1 0 - 9 9 5 D a ; B) 9 6 3 - 1 8 4 8 D a ; そして C) 1 8 0 7 1 8 4 6 D a であった。

【図 5 A】ジャーカット細胞における、M a b C D 2 結合へ (A)、蛍光へ (B)、および生存性へ (C) 与える P I F の負の影響のフローサイトメトリ分析、および、M a b C D 2 結合へ (D)、蛍光へ (E)、および生存性へ (F) 与える P I F の正の影響のフローサイトメトリ分析。正のサンプルでの P I F は C D 2 と競合する (矢印は P I F 活性を示す。)

40

【図 5 B】ジャーカット細胞における、M a b C D 2 結合へ (A)、蛍光へ (B)、および生存性へ (C) 与える P I F の負の影響のフローサイトメトリ分析、および、M a b C D 2 結合へ (D)、蛍光へ (E)、および生存性へ (F) 与える P I F の正の影響のフローサイトメトリ分析。正のサンプルでの P I F は C D 2 と競合する (矢印は P I F 活性を示す。)

【図 5 C】ジャーカット細胞における、M a b C D 2 結合へ (A)、蛍光へ (B)、および生存性へ (C) 与える P I F の負の影響のフローサイトメトリ分析、および、M a b C

50

D2結合へ(D)、蛍光へ(E)、および生存性へ(F)与えるPIFの正の影響のフローサイトメトリ分析。正のサンプルでのPIFはCD2と競合する(矢印はPIF活性を示す。)

【図5D】ジャーカット細胞における、MabCD2結合へ(A)、蛍光へ(B)、および生存性へ(C)与えるPIFの負の影響のフローサイトメトリ分析、および、MabCD2結合へ(D)、蛍光へ(E)、および生存性へ(F)与えるPIFの正の影響のフローサイトメトリ分析。正のサンプルでのPIFはCD2と競合する(矢印はPIF活性を示す。)

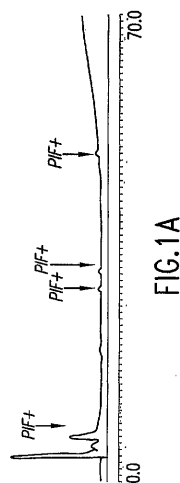
【図5E】ジャーカット細胞における、MabCD2結合へ(A)、蛍光へ(B)、および生存性へ(C)与えるPIFの負の影響のフローサイトメトリ分析、および、MabCD2結合へ(D)、蛍光へ(E)、および生存性へ(F)与えるPIFの正の影響のフローサイトメトリ分析。正のサンプルでのPIFはCD2と競合する(矢印はPIF活性を示す。)

【図5F】ジャーカット細胞における、MabCD2結合へ(A)、蛍光へ(B)、および生存性へ(C)与えるPIFの負の影響のフローサイトメトリ分析、および、MabCD2結合へ(D)、蛍光へ(E)、および生存性へ(F)与えるPIFの正の影響のフローサイトメトリ分析。正のサンプルでのPIFはCD2と競合する(矢印はPIF活性を示す。)

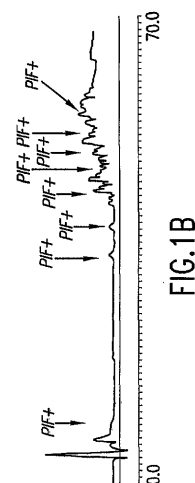
【図6】ジャーカット細胞における合成PIFペプチドのCD2発現に与える影響。

10

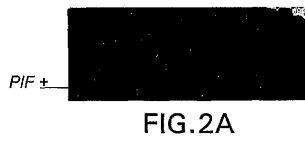
【図1A】



【図1B】



【図 2 A】



【図 2 B】

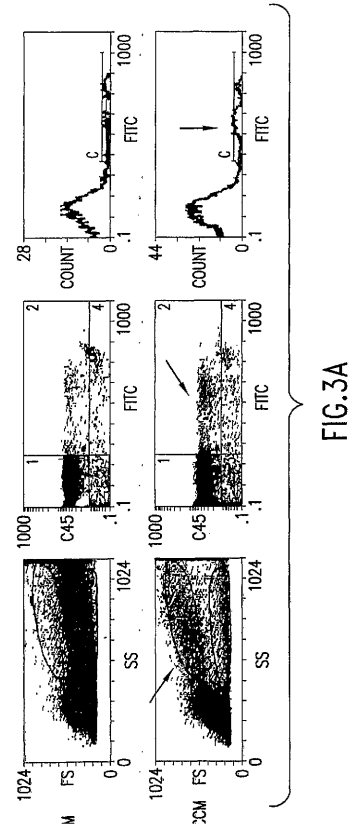


【図 2 C】

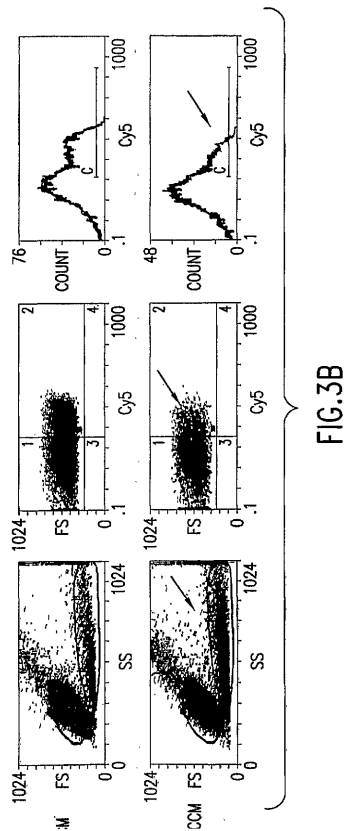
PIF +

FIG.2C

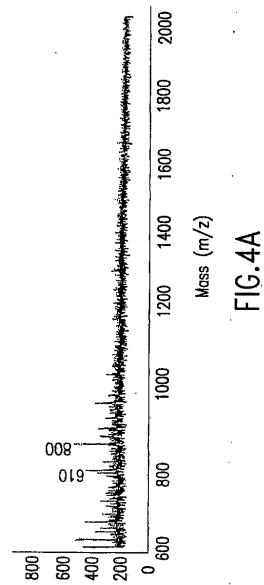
【図 3 A】



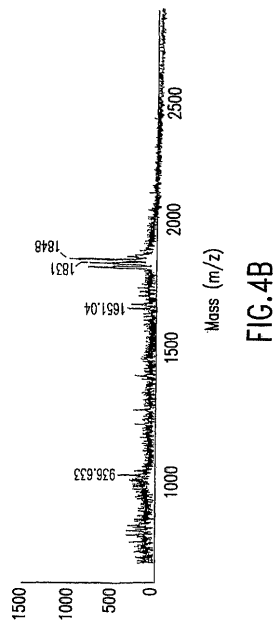
【図 3 B】



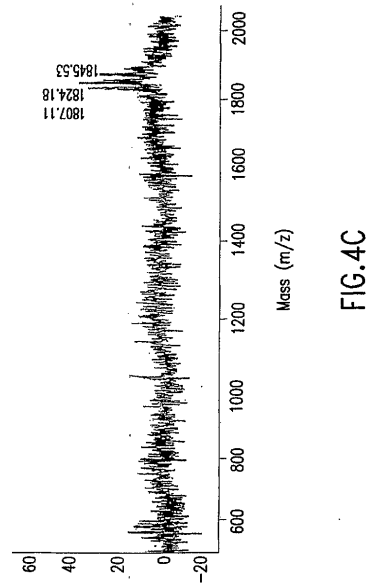
【図 4 A】



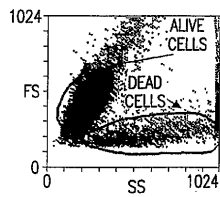
【図 4 B】



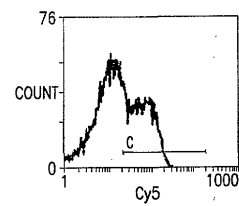
【図 4 C】



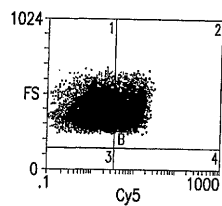
【図 5 A】



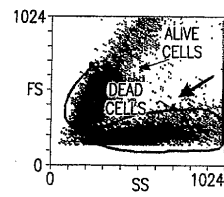
【図 5 C】



【図 5 B】



【図 5 D】



【図 5 E】

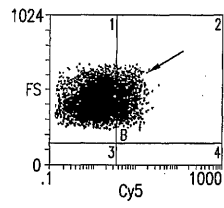


FIG.5E

【図 5 F】

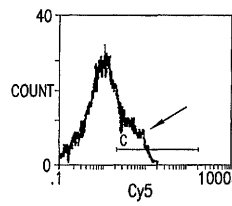


FIG.5F

【図 6】

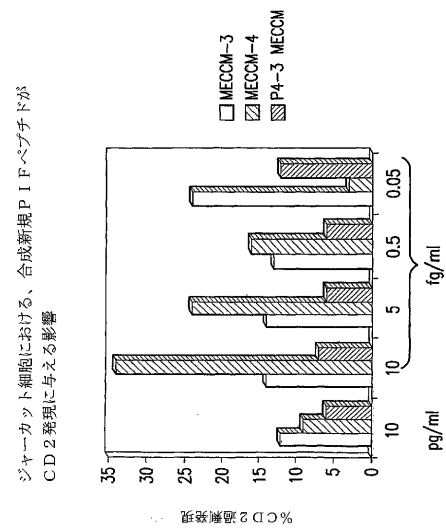


FIG. 6

フロントページの続き

(72)発明者 ペレズ、ルベン レネー ゴンザレス
アメリカ合衆国、02474 マサチューセッツ州、ウォータータウン、アパートメント 6-1
、リバーサイド ストリート 8アール

(72)発明者 リービス、ポール、シー.
アメリカ合衆国、03042 ニューハンプシャー州、エッピンス、ジェンネス ロード 90

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 Roussev, R.G., et al., Am. J. Reprod. Immunol., 1995年, Vol.33(1), p.68-73
Roussev, R.G., et al., Molecular Human Reproduction, 1996年, Vol.2(11), p.883-887
Gonzalez, R.R., et al., Am. J. Reprod. Immunol., 2001年 7月 2日, Vol.46(1), p.68-69
" NUCLEAR RECEPTOR CO-REPRESSOR 2 (N-COR2) (SILENCING MEDIATOR OF RETINOIC ACID AND THYROID HORMONE, Accession No. Q9Y618, [online], UniProt Knowledgebase, 2001年2月21日掲載, 2009年5月14日検索, インターネット, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y618.txt?version=8>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 7/00-7/66

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00-1/70

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed