



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103755787 B

(45) 授权公告日 2016.05.18

(21) 申请号 201310654136.X

(22) 申请日 2002.06.28

(30) 优先权数据

60/302,607 2001.07.02 US

(62) 分案原申请数据

02813319.6 2002.06.28

(73) 专利权人 倍奥英赛普特有限责任公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 艾坦·巴尼

鲁宾·雷内·冈萨雷斯·佩雷斯

保罗·C·利维斯

(74) 专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理

事务所(普通合伙) 11269

代理人 甘玲

(51) Int. Cl.

G07K 7/08(2006.01)

(56) 对比文件

Roussev RG 等. A novel bioassay for detection of preimplantation factor (PIF). 《Am J Reprod Immunol.》. 1995, 第 33 卷(第 1 期), 68-73.

Roussev RG 等. Development and validation of an assay for measuring preimplantation factor (PIF) of embryonal origin. 《Am J Reprod Immunol.》. 1996, 第 35 卷(第 3 期), 281-287.

审查员 王慧

权利要求书1页 说明书9页 附图7页

(54) 发明名称

用于植入前因子的新型检测方法以及植入前因子肽

(57) 摘要

本发明涉及用于检测 PIF 存在与否的分析方法, 以及通过此方法鉴定出来的 PIF 肽。具体地说, 本发明涉及用于检测 PIF 的流式细胞术检测方法。它至少部分地基于如下观察结果: 利用了荧光标记的抗淋巴细胞和抗血小板的抗体的流式细胞术表明, 在 PIF 存在下, 玫瑰花结的形成增加。它还基于如下观察结果: 流式细胞术表明, 在 PIF 存在下, 与 CD2 结合的单克隆抗体减少了。本发明还涉及 PIF 肽, 当 PIF 肽被加入到 Jurkat 细胞培养物中时, 能够观察到它可以: 或者 (i) 减少抗 CD2 抗体与 Jurkat 细胞的结合; 或者 (ii) 增加 Jurkat 细胞中 CD2 的表达; 或者 (iii) 减小 Jurkat 细胞的存活性。在另外的实施方案中, 本发明提供了 ELISA 检测方法, 可以通过确定待测样品对抗 CD2 抗体与 CD2 底物相结合的效果而检测 PIF。

1. 一种由序列

Ser-Gly-Ile-Val-Ile-Tyr-Gln-Tyr-Met-Asp-Asp-Arg-Tyr-Val-Gly-Ser-Asp-Leu 组成的分离的肽。

用于植入前因子的新型检测方法以及植入前因子肽

[0001] 本申请是针对 2002 年 6 月 28 日递交的申请号为 201210307132. X、发明名称为“用于植入前因子的新型检测方法以及植入前因子肽”的分案申请。

[0002] 上述分案申请是针对 2002 年 6 月 28 日递交的申请号为 201110025233. 3、发明名称为“用于植入前因子的新型检测方法以及植入前因子肽”的分案申请。

[0003] 上述分案申请是针对 2002 年 6 月 28 日递交的申请号为 200710086405. 1、发明名称为“用于植入前因子的新型检测方法以及植入前因子肽”的分案申请。

[0004] 上述分案申请是针对 2002 年 6 月 28 日递交的申请号为 02813319. 6、发明名称为“用于植入前因子的新型检测方法以及植入前因子肽”的分案申请。

1. 技术领域

[0005] 本发明涉及植入前因子 (preimplantation factor, 以下简称为 PIF), 它是受孕和胚胎可存活性 (embryo viability) 的早期标志物。本发明还涉及检测 PIF 活性的新方法, 以及 PIF 肽。

2. 背景技术

[0006] 不育是困扰世界上数百万对夫妇的重要健康问题。人类孕体的早期死亡是一个常见现象, 而这也是造成不育的一方面因素。在自然的单个胎儿 (single conceptions) 中, 约有 73% 都在妊娠的第 6 周之前死亡 (Boklage CE., 从受孕至足月生产之间人类胎儿的存活概率. 国际生育学杂志 (Int J Fertil) 1990 ;35 :75)。这主要是由于在植入之前或植入后的很短时间内所发生的早期胚胎死亡。大龄妇女的生育率较低, 而由年轻妇女捐献卵母细胞后生育率提高, 与上述现象相关的数据表明: 对于获得成功的妊娠而言, 卵母细胞的质量很重要 (Navot D, Bergh PA, Williams MA 等, 较差的卵母细胞质量而不是植入失败引起了与年龄相关的雌性生育力的下降, 柳叶刀 (Lancet) 1991 ;337 :1375)。

[0007] 体外受精 (in vitro fertilization, 以下简称为“IVF”) 技术已经被发展起来, 用于解决不育的问题。但是, 在体外培养用于植入的胚胎时的人工条件下, 维持胚胎的可存活性甚至更困难一些。在体外, 胚胎的生长速度要比在体内时慢, 通常只有 25-65% 的胚胎能够发育到囊胚阶段 (在 Gomel V, Leung PCK, 编的“体外受精和辅助生殖” (In vitro fertilization and assisted reproduction) 第 10 届世界大会 (Procc 10th World Congress), 1997 :1 中的 Gardner DK, Lane M, KOuridakis K, Schoolcraft WB., 基于生理学复合体的无血清培养基增强哺乳动物胚胎发育 (Complex physiologically based serum-free culture media increase mammalian embryo development)) 现有技术尚不能鉴别出那些可能植入和存活的胚胎。人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 是目前正在使用的用于体内受精和早期胚胎植入的标志物, 但是, 它只有在植入后的几天才能被检测到。由于缺乏胚胎可存活性的适当标志物, 因此, 目前很多不能植入的胚胎都被转移了, 从而降低了获得成功妊娠的机会。

[0008] 为了解决胚胎可能无法存活的问题, 更多数量的胚胎被同时转移到了未来母亲的

体内。大量胚胎的转移可能导致多次怀孕 (multiple pregnancies), 这是固有的危险, 但如果只转移少量胚胎, 又可能有没有一个胚胎能植入的风险, 从而失去一整个 IVF 周期。很明显, 需要改进对胚胎的选择, 并定义准确的标志物以确定胚胎的可存活性。此外, 使用非侵入性方法, 通过在培养基中检测对可存活的、能植入的胚胎特异的产物, 将使得人们可以选择出那些最有可能产生成功妊娠的胚胎, 而不会对胚胎产生伤害。

[0009] 决定妊娠成功与否的另一个因素是孕体与母体免疫系统之间的相互作用。在受精后的很短时间内, 应该发生妊娠的系统母体识别 (a systemic maternal recognition of pregnancy)。由特异性早期胚胎信号所激发的母体免疫系统调节, 可能是该过程中的关键。一旦卵母细胞被受精, 合子直到孵化中的囊胚 (hatching blastocyst) 都被透明带 (the zone pellucida) 所包围, 透明带是坚硬的半透明的膜。因此, 当胚胎还在输卵管和子宫腔内发育时, 胚胎-母体之间的交流 (communication) 就已经通过胚胎所分泌的化合物而同时发生了。

[0010] 已经表明, 以孕妇的血清和可存活胚胎为条件的培养基, 可以提高血小板和 T 淋巴细胞在 CD2 抗体存在下形成玫瑰花结的量。正如在 1997 年 7 月 8 日授权的 Barnea 等人的美国专利 5,646,003 以及 1999 年 11 月 9 日授权的 Barnea 等人的美国专利 5,981,198 中已经公开的那样, 植入前因子 (PIF) 的存在可以通过将淋巴细胞、血小板、来自怀孕受试者的热失活的血清、豚鼠补体以及 T11 (抗 CD2) 单克隆抗体 (Dakko, 丹麦) 混合在一起而检测出来, 其中, 怀孕受试者的 PIF 提高了血小板和淋巴细胞之间形成的玫瑰花结的量。已经发现, PIF (i) 由二细胞期前的可存活的早期人和小鼠胚胎所分泌; 在 IVF 之后, 在胚胎转移后的 3-4 天, 可以在外周循环中检测到; (iii) 与 73% 的带回家的婴儿有关, 而在早期 PIF 阴性结果中则为 3%; (iv) 在子宫内受孕后 5-6 天可以检测出来; (v) 在未怀孕的血清或不可存活的胚胎中不存在; 以及 (vi) 除了人之外, 还存在于多种怀孕的哺乳动物中, 包括小鼠、马、奶牛和猪。此外, 如果发生自然流产, 在 hCG 分泌减少前的两周, 就已经观察到了 PIF 从循环系统中的消失。

[0011] 在上述 PIF 检测中所使用的单克隆抗体, 其靶标是被称为 CD2 的淋巴细胞相关抗原。CD2 存在于约 80-90% 的人外周血淋巴细胞上, 以及超过 95% 的胸腺细胞、所有形成红细胞玫瑰花结的 T 淋巴细胞以及 NK 细胞的一个亚型上。CD2 在 T 细胞活化中的各种作用已经被提出, 包括作为粘附分子以减小 T 细胞活化所需抗原的量, 以及作为 T 细胞活化的共同刺激分子 (costimulatory molecule) 分子或直接促进剂。而且, 已经暗示, CD2 在诱导免疫无能、细胞因子生产的调节以及 T 细胞正选择的调控中起作用。

[0012] CD2 的天然配基是结构相关的 IgSF CAMs CD58 (LFA-3), 一种组织分布较广的细胞表面粘附配基。此外, CD2 可以与 CD48、CD59 以及 CD15 (Lewis x) 相关的糖结构发生相互作用。CD2 以很低的亲和力与 CD58 结合, 而解离常数却非常大。CD2 及其配基 CD58 的侧向再分布也影响了细胞粘附的强度。CD2 粘附性的调控影响了 CD2 增强抗原敏感度的能力。不能进行亲和力调控的 CD2 细胞系在抗原特异性应答上表现出了明显的不足。CD2 亲和力提高所产生的粘附力, 直接为 T 细胞敏感度做出了贡献, 而后者与 CD2 介导的信号转导无关。

3. 发明内容

[0013] 本发明涉及用于检测 PIF 存在与否的分析方法, 以及通过此方法鉴定出来的 PIF

肽。具体地说,本发明涉及用于检测 PIF 的流式细胞术检测方法。它至少部分地基于如下观察结果:利用了荧光标记的抗淋巴细胞和抗血小板的抗体的流式细胞术表明,在 PIF 存在下,玫瑰花结的形成增加。它还基于如下观察结果:流式细胞术表明,在 PIF 存在下,与 CD2 结合的单克隆抗体减少了。

[0014] 本发明还涉及 PIF 肽,当 PIF 肽被加入到 Jurkat 细胞培养物中时,能够观察到它可以:或者 (i) 减少抗 CD2 抗体与 Jurkat 细胞的结合;(ii) 增加 Jurkat 细胞中 CD2 的表达;或者 (iii) 降低 Jurkat 细胞的存活性。在另外的实施方案中,本发明提供了 ELISA 检测方法,可以通过确定待测样品对抗 CD2 抗体与 CD2 底物相结合的效果而检测 PIF。

4. 附图说明

[0015] 图 1A-B. 由小鼠胚胎培养物条件培养基 (MECCM) 的 PIF 纯化;(A) 示出了 MECCM-3kDa 超滤液的高效液相色谱 (HPLC) 的谱图,所述超滤液先前已通过 MabCD2 亲和层析进行了纯化;(B) 示出了在对 (A) 中得到的 PIF 活性级分进行进一步 HPLC 纯化后的谱图。

[0016] 图 2A-C. 从 MECCM 纯化得到的不同 PIF 肽的 Western 印迹分析;MabCD2 被用作一抗,反意 (anti-sense) 小鼠马辣根过氧化物酶 (HRP)-生物素链霉亲和素复合体被用作二抗。通过 ECL 检测试剂 (Amersham Pharmacia Biotech) 鉴定特异性 PIF 带。

[0017] 图 3A-B. (A) 示出了在新鲜的培养基 (CM)、小鼠胚胎培养物条件培养基 (MECCM) 和 MabCD2 的存在下,淋巴细胞-血小板玫瑰花结形成 (L-P) 的流式细胞仪测定。L (MabCD45-PE) 和 P (MabCD42a-FITC) 的荧光标记的特异抗体被用于检测 L-P 复合物。与培养基 (CM) 相比,MECCM 的 L-P 形成要高 30-40%。(B) 示出了 MECCM 对 MabCD2 与 Jurkat 细胞 (JC) 相结合的作用的 FC。JC 与样品一起进行温育,并进一步与 MabCD2 Cy5 一起进行温育。与 CD2 结合的抗体被存在于 MECCM 中的 PIF 所降低。箭头指出了 PIF 活性。

[0018] 图 4A-C. 从 MECCM 纯化得到的 PIF 肽的质谱谱图。通过超滤、渗滤、HPLC、MabCD2 亲和层析以及进一步的 HPLC 而从 MECCM 纯化得到的 PIF 活性级分的分子量 (MW) 通过质谱测定。PIF 肽的 MW 为 A) 610-995Da ;B) 963-1848Da ;以及 C) 1807-1846Da。

[0019] 图 5A-F. PIF 对在 Jurkat 细胞中的 MabCD2 结合 (A)、荧光 (B) 和可存活性 (C) 的阴性作用以及 PIF 对 MabCD2 结合 (D)、荧光 (E) 和可存活性 (F) 的阳性作用的流式细胞术分析。在阳性样品中,PIF 与 CD2 竞争 (箭头指出了 PIF 活性)。

[0020] 图 6. 合成的 PIF 肽对 Jurkat 细胞 CD2 表达的影响。

5. 具体实施方式

[0021] 在第一组实施方案中,本发明提供了一种用于确定样品中是否存在植入前因子的方法,该方法包括检测样品中是否含有抑制抗 CD2 抗体与 CD2 抗原相结合的成分的步骤;其中,抑制抗 CD2 抗体与 CD2 相结合的能力与植入前因子的存在之间具有正相关性。

[0022] 例如,此类方法可以用于流式细胞术或者酶联免疫吸附测定方法之中,使用本领域公知的其他技术。在下面的第 7 部分中,介绍了用于检测抗 CD2 抗体与 CD2 相结合的流式细胞术方法的一个非限制性实例。

[0023] 此处所使用的术语抗 CD2 抗体,可以是与 CD2 特异性结合的单克隆或多克隆抗体。Pharmigen 就出售一种此类的单克隆抗体 (见下文)。

[0024] CD2 抗原可以是纯化 CD2 抗原的形式,也可以由细胞所携带。在本发明的一个非限制性实施方案中,所述细胞为 Jurkat 细胞。表达 CD2 的其他细胞系在本领域中是公知的。

[0025] 样品可以是血清样品(例如,来自有待检测受精/植入/胚胎存留的受试者的血清),可以是培养液样品(例如,为在 IVF 转移前确定胚胎的可存活性),也可以是有待检测 PIF 肽是否存在的溶液(例如,在 PIF 作用剂的纯化中;参见下面的第 6 部分)。

[0026] 受试者可以是人类受试者(例如疑为已受孕的人)或非人类受试者(例如农业动物或动物园的动物)。

[0027] 在第二组实施方案中,本发明提供了一种用于确定样品中是否存在植入前因子的方法,包括通过流式细胞术检测样品中是否含有能增加淋巴细胞、血小板和抗 CD2 抗体之间形成的玫瑰花结的成分的步骤,其中,玫瑰花结形成量的增加与植入前因子的存在之间具有正相关性。例如,此类检测可以通过使用荧光标记的以淋巴细胞和血小板为靶标的抗体而进行,其中,最好对抗血小板和抗淋巴细胞的抗体使用不同的标记。

[0028] 所述的增加是相对于已知的阴性对照而言的。

[0029] 本发明也提供了下列分离的肽:

[0030] (1) 一种分离的肽,具有选自由如下成员所构成的组的序列: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;以及 Met-Val-Arg-Ile-Lys-Pro-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Phe-Ser-Asp-Asp,或者一种包含所述肽的分离的肽,能够与抗 CD2 抗体相结合并且不是环孢子蛋白(circumsporooite protein);

[0031] (2) 一种具有序列 Ser-Gly-Ile-Val-Ile-Tyr-Gln-Tyr-Met-Asp-Asp-Arg-Tyr-Val-Gly-Ser-Asp-Leu 的分离的肽,或者一种包含所述肽的分离的肽,能够与抗 CD2 抗体相结合并且不是 HIV 蛋白;

[0032] (3) 一种具有序列 Val-Ile-Ile-Ile-Ala-Gln-Tyr-Met-Asp 的分离的肽,或者一种包含所述肽的分离的肽,能够与抗 CD2 抗体相结合;以及

[0033] (4) 一种分离的肽,具有选自由如下成员所构成的组的序列:Ser-Gln-Ala-Val-Gln-Glu-His-Ala-Ser-Thr 以及 Ser-Gln-Ala-Val-Gln-Glu-His-Ala-Ser-Thr-Asn-Xaa-Gly,其中 Xaa 可以是任何氨基酸,或者一种包含所述肽的分离的肽,能够与抗 CD2 抗体相结合并且不是人类类维生素 A(retinoid) 和甲状腺激素的沉默介质(silencing mediator)。

[0034] (5) 一种具有序列 Ser-Gln-Ala-Val-Gln-Glu-His-Ala-Ser-Thr-Asn-Met-Gly 的分离的肽。

[0035] 6. 实施例:PIF 肽的鉴定

[0036] 通过超滤、冻干、高效液相色谱(HPLC)、亲和层析和western印迹,将PIF从大体积的MECCM中分离出来。二细胞(two-cell-to)囊胚期的小鼠胚胎在含有下列成分的Ham's F-10培养基中培养数天:青霉素、链霉素、MgSO₄、NaHCO₃、KHCO₃和乳酸钙,此外还添加0.1%的BSA。使用前,MECCM一直储存在-80℃。

[0037] 将一升MECCM利用Amicon膜(3kDa截止;YM-3kDa,Amicon,Millipore Co.,美国)通过超滤进行纯化。利用300ml纯水对浓缩的MECCM进行进一步的渗滤。此外,也以同样的方式对新鲜的培养基(CM,不含胚胎)进行处理。只有MECCM-3kDa超滤液和渗滤液表现出了PIF活性,然后它们被收集起来并通过冻干法浓缩。

[0038] 已经观察到,PIF 能够结合抗 CD2 单克隆抗体 (MabCD2)。因此,首先通过亲和层析将 PIF 活性部分进行纯化,其中使用了琼脂糖 - 酰肼 -MabCD2 活化胶。按下述方法制备抗体亲和基质。通过 Econo-Pac 10DG 脱盐柱,将 1.5mg MabCD2(clone RPA-2.10, Pharmigen, Becton Dickinson) 与 pH 5.5 的偶联缓冲液进行缓冲液交换,并进一步用高碘酸钠氧化,并偶联至 2ml 的琼脂糖 - 酰肼活化胶上,可以按照制造商提供的说明进行 (Affi-gel Hydrazide 免疫亲和试剂盒, BioRad 实验室, 加州, 美国)。然后,利用 MabCD2 亲和层析柱 (10x20mm) 对 MabCD2-3kDa 超滤液 - 渗滤液冻干粉进行进一步纯化。将 2g MECCM-3kDa 粉末溶于 10ml 纯水中,将 pH 调至中性,通过 0.22m 注射器无菌滤器 (Corning Inc., NY, 美国) 进行过滤,并在重力流动的情况下通过亲和层析柱 5 次。所述柱子用 5 柱床体积的 pH 7.2 的 100mM 磷酸盐缓冲液冲洗,然后用 5 柱床体积的 0.5M NaCl 冲洗。

[0039] 结合上的 PIF 用 3ml 0.1M 的乙酸洗脱下来。将洗下 PIF 的级分收集起来,进行 PIF 活性检测,并通过冻干法浓缩。

[0040] 总量为 300mg 的经亲和层析进一步纯化的 MECCM-3kDa 超滤液被分为三批,在 Clipseus C18 制备性柱 (Higgins Analytical, Inc., 美国) 上进行 HPLC。制备性 HPLC 的运行参数为:流速,15ml/min。缓冲液:A = 0.1% 三氟乙酸 (TFA); B = 0.1% TFA, 溶于 99.9% 乙腈中 (CH₃CN)。梯度:0% B, 5 分钟,加上 0-60% B30 分钟,以及 0-100% B3 分钟。

[0041] 通过蒸发进一步浓缩 HPLC 的级分。将 HPLC 浓缩的级分的 pH 值调至中性,并再次检测 PIF 活性。几个级分表现出较高的 PIF 活性 (参见图 1A)。这些级分通过附加的 HPLC, 在 Vydac C8 分析柱 (4.6x250mm; Hesperia, 加州, 美国) 上加以纯化。附加 HPLC 的运行参数为:流速,1ml/min。缓冲液:A = 0.1% 三氟乙酸 (TFA); B = 0.1% TFA, 溶于 99.9% 乙腈中 (CH₃CN)。梯度:0% B, 5 分钟,加上 0-60% B30 分钟,以及 0-100% B3 分钟。几个洗脱级分表现出 PIF 活性 (参见图 1B), 并被进一步测序以确定其氨基酸组成,通过质谱确定它们的分子量 (MW)。

[0042] 由 MECCM 纯化得到的 PIF 活性级分在 Western 印迹 (“WB”) 中给出了正信号。在 WB 中,使用 CM 超滤冻干部分的溶液作为阴性对照。WB 的条件如下。对于胶,使用了 SDS-PAGE 预装胶 (pre-casting gels) (BioRad), 具有 16.5% 琼脂糖分离胶和 4% 琼脂糖浓缩胶。跑胶的溶液中含有 100mM Tris, 100mM Tricine, 0.1% SDS, pH 8.3 (Tris-Tricine 跑胶缓冲液)。由 30 微升 PIF-MECCM 纯化级分和 10 微升 Tricine 上样缓冲液 [200mM Tris (三羟甲基) 氨基甲烷 (Tris-HCl) pH 6.8, 2% 十二烷基磺酸钠 (SDS), 40% 甘油, 0.04% 考马斯亮蓝 (CBB-G250)] (BioRad) 组成的样品,在 95°C 下温育 5 分钟。冷却后,将样品加入到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 的上样孔中。为了确定低分子量 (MW) 多肽的分子量,将 10 微升用水按 1 : 20 稀释的 SDS-PAGE 标准物 (BioRad) 加入到每块胶的一个孔中。电泳时,样品和标准物在 175v 下跑 5 分钟,然后在 60v 下跑 1 小时。

[0043] 然后,将获得的胶进行电印迹 (electro-blot), 使用 100mM pH 为 11 的 CAPS [3-(环己氨基)-1-丙磺酸] 缓冲液作为转移缓冲液。电印迹在 80mA 下进行 1 小时,转移到 0.22 μm 硝酸纤维素膜 (BioRad) 上。

[0044] 然后,利用 5% 的封闭溶液 (Amersham, Pharmacia, Biotech, NJ, 美国) 在室温下封闭硝酸纤维素膜 18 小时,然后利用 PBS-T [磷酸盐缓冲液 - 0.05% 聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯 (Tween 20)] 冲洗 4 次,持续 20 分钟。进行一抗温育时,已封闭的膜于室温下在

2 μ g/ml 的 MabCD2 (Pharmigen)-PBS-T 溶液中温育 2 小时, 然后按上述方法冲洗。进行二抗温育时, 膜于室温下在马抗小鼠 IgG- 辣根过氧化物酶偶联物 (1 : 1000, 溶于 PBS-T) 溶液中温育 1 小时。然后, 通过 ECL- 化学荧光系统 (Amersham) 使 PIF 带可见。图 2 示出了从 MECCM 纯化得到的 PIF 肽的典型 WB。

[0045] 用于测定 PIF 的流式细胞术 (FC) 被发展起来, 提高了美国专利 5, 646, 003 和 5, 981, 198 中所介绍的方法的效率和重现性。尤其是, 采用怀孕和未怀孕的人和猪血清, MECCM, CM 以及分离的 PIF 级分, 通过 FC 对玫瑰花结的形成进行了评估, 利用了 MabCD2 或 MabCD2-Cv5 (Cy- 铬偶联的抗体), MabCD45-PE (藻红蛋白偶联的抗体) 以及 MabCD41a-FITC (异硫氰酸荧光素偶联的抗体), 所有的抗体都来自 Pharmigen。MECCM 与 CM 相比, 其标记的 P-L 复合体比例要高 30-40% (图 3A)。而且, 已经发现, 在检测分析中 MECCM 或怀孕的血清与固定化 MabCD2 的预温育, 阻止了 P-L 的形成。在检测分析中, 向 L-P 中加入 MabCD58 (淋巴细胞功能相关的抗原 -3 或 LFA-3) 抗体并不能通过 PIF 活性样品的作用而完全阻止玫瑰花结的形成。

[0046] 发展了一种利用 Jurkat 细胞 (JC) 和 MabCD2-Cy5 的 FC-PIF 定量检测法 (图 3B)。使用无限增殖的淋巴细胞系后, 就不再需要新鲜的供体血液以通过生物测定法评估 PIF 活性。已经确认 JC-FC 检测对于人血清样品 (参加表 I) 而言是有效的, 并且在 PIF 纯化期间被用于评估级分的 PIF 活性。

[0047] 纯化的 PIF 活性级分的 MW 通过质谱分析测定, 利用产自 Perspective Biosystems (Cambridge, MA, 美国) 的 Voyager-RP Biospectrometry MALDI-TOF 工作站。将样品与基质相混合, 其中, 所述基质存在于乙腈: 水为 1 : 2 的混合物中, 并含有 1% 的三氟乙酸。谱图为约 200 次扫描的平均值。来自 MECCM 的 PIF 肽的 MW 在 610-1845Da 之间 (图 4)。

[0048] 此外, 已经评估出了 PIF- 活性级分与 MabCD2 的预温育消除了该 PIF- 活性。这些数据表明, PIF 可能是 CD2 或同源肽的一部分。然而, 在对纯化的 PIF 肽进行测序之后, 证明了这些肽并不是 CD2 的一部分, 而且, 它们的氨基酸序列是独特的。

[0049] 通过 JC-FC 检测证明, MECCM-PIF 肽对 T 细胞所表达的 CD2 有三种不同的作用。这些作用涉及: 减小 MabCD2 与 JC 的结合; 通过 JC 对 CD2 表达进行向上调节 (up-regulating); 或降低 JC 的可存活性。

[0050] 从小鼠胚胎中得到的纯化 PIF 活性级分通过 Edman 降解进行测序, 采用 Applied Biosystems 脉冲液体测序仪 (Pulsed Liquid Sequencer) (型号 477A)。用异硫氰酸苯酯对释放出来的氨基酸进行衍生处理, 以便得到 PTH- 氨基酸, PTH- 氨基酸可以通过在与测序仪配合的 HPLC 系统上进行的反向 HPLC 检测出来。几种 PIF 级分得到了独一无二的序列。几种肽给出的序列, 其 N 端的九个或十个残基是完全相同的, 这表明这些肽是由相同的分子 (参见表 II) 截短后得到的不同形式。PIF 肽被确定为至少三个独特的家族, 为来源于胚胎的或妊娠相关的小肽。包括三种 PIF 肽的一个家族的氨基酸序列与环孢子蛋白 (Circumsporozoite protein) (疟原虫: 恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)) 的一个区域 100% 匹配。PIF 肽的这一家族通过 JC 向上调节 CD2 的表达。一种与上述 PIF 肽家族只有前五个氨基酸残基相同的 PIF 肽 (14 个氨基酸), 以及另一种与 HIV-1RNA 指导的 DNA 聚合酶 (逆转录酶, EC 2. 7. 7. 49) 序列有 11 个氨基酸匹配的 PIF 肽 (18 个氨基酸), 也可以

通过 JC 向上调节 CD2 的表达。此外,另一个包括两个 PIF 肽 (9 个和 13 个氨基酸) 的家族与人受体作用因子 (receptor-interacting factor) 的序列有 10 个氨基酸匹配,后者为类维生素 A 和甲状腺激素的沉默介质 (a silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor, SMRT) (Chen and Evans,1995)。该 PIF 肽家族的更短的成员表现出了对 MabCD2 与 JC 结合的竞争作用,而且更长的 PIF 肽降低了 JC 的可存活性。值得注意的是,由核受体介导的转录沉默在发育、分化和肿瘤形成中很重要。

[0051] PIF 肽通过固相肽合成 (SPPS) 法进行合成,使用 Applied Biosystems 肽合成仪,采用 Fmoc (9- 芴甲氧羰基) 化学法,其中每个氨基酸的氨基氮都被 Fmoc 所封闭。偶联时,利用 3mol/ml 的 2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1,1,3,3-tetramethyluronium 四氟硼酸酯 /1- 羟基苯并三唑,在二异丙基乙胺存在下,将 N 端已被保护起来的氨基酸的羧基活化。然后,将活化的氨基酸顺序地加入到新生的肽上。在合成完成后,通过反向 HPLC 进行最后的纯化,并通过 MALDI-TOF 质谱和氨基酸分析对其加以确认。PIF 合成肽在 Jurkat 细胞的 CD2 现象中表现出相似的作用 (图 6),也可以被 Mab CD2 免疫检测到。

[0052] 7. 用于 PIF 的流式细胞术

[0053] 7.1 材料

[0054] 材料包括:Jurkat 白血病细胞 (JC);克隆培养基;用于流式细胞仪测量的 Falcon 管;Mab CD2-Cy5 (Cy- 铬偶联的抗体, clone RPA-2.10, Pharmigen, Becton Dickinson);生物样品 (可以是有待检测 PIF 活性的人血清,也可以是假定的或合成的 PIF 肽的溶液);PBS-2% BSA (100mM 磷酸盐缓冲液 -2% 牛血清清蛋白;阴性对照);台盼蓝染液;CO₂ 细胞培养箱;流式细胞仪。

[0055] 7.2 方法

[0056] 制备 JC 悬液:

[0057] ■ 利用台盼蓝排阻染色法检测 JC 培养物的可存活性。细胞的可存活性应该在 80-90% 之间。

[0058] ■ 用 10ml PBS-2% BSA 冲洗 JC 两次。

[0059] ■ 在克隆培养基或 PBS-2% BSA 中制备 JC 悬液,含有 5,000,000 细胞 / 毫升。

[0060] ■ 将 50ml JC 悬液分散到 falcon 管中 (250,000 细胞 / 管)。

[0061] 样品温育:

[0062] ■ 加入 200 μl 样品,来自早期妊娠对照的血清 (3 个阳性对照) 或 PBS-2% BSA (阴性对照)。轻轻混合。

[0063] ■ 室温下温育 20-30 分钟。

[0064] ■ 加入 200 μl 在 PBS-2% BSA 中以 1 : 200 稀释的 MabCD2-Cy5。轻轻混合。

[0065] ■ 室温下温育 20-30 分钟。

[0066] 流式细胞仪测定:

[0067] ■ 测定每个管子的荧光 (488nm 激光激发波长)。

[0068] ■ 将活的和全部细胞与全部死细胞的荧光 (参见图 5) 与对照进行比较。

[0069] ■ 按下述方法计算 PIF 活性:

[0070] 全部细胞的荧光 / % 死细胞 x 活细胞的荧光

[0071] 结果的解释:

[0072] PIF 阴性的活性应该在 130-340 之间；

[0073] PIF 阳性样品在阴性参考范围之外。

[0074] 本文中引用了多篇参考文献,在此以引用的方式将其全部内容包括在本文中。

[0075] 表 1 37 名患者血清中流式细胞术 PIF 检测的临床有效性的确认

	样品	敏感度	特异性	阳性预测值	阴性预测值
		(%)	(%)	(%)	(%)
[0076]	妊娠早期	91	92	92	92
	妊娠中期	66	92	86	73
	妊娠晚期	100	92	83	92
	全部妊娠样品	86	92	88	86

[0077]

表 II 从植入前小鼠胚胎中获得的 PIF 肽的氨基酸序列

肽编码/氨基酸编号	序列	T 细胞相关 CD2 活性	序列匹配 (参考)
MECCM-4 (9AA)	[H]-m-v-r-i-k-p-g-s-a-[OH]	CD2 表达增加	与孢子孢子蛋白 (疟原虫; 恶性疟原虫) 有 9 个 AA 100% 匹配
MECCM-6 (13AA)	[H]-m-v-r-i-k-p-g-s-a-n-k-p-s-[OH]	CD2 表达增加	与孢子孢子蛋白 (疟原虫; 恶性疟原虫) 有 9 个 AA 100% 匹配
MECCM-3 (15AA)	[H]-m-v-r-i-k-p-g-s-a-n-k-p-s-d-d-[OH]	CD2 表达增加	与孢子孢子蛋白 (疟原虫; 恶性疟原虫) 有 9 个 AA 100% 匹配
MECCM-5 (14AA)	[H]-m-v-r-i-k-y-g-s-y-n-n-k-p-s-d-[OH]	CD2 表达增加	与孢子孢子蛋白 (疟原虫; 恶性疟原虫) 有 5 个 AA 100% 匹配
MECCM-7 (18AA)	[H]-s-g-i-v-i-y-q-y-m-d-d-r-y-v-g-s-d-l-OH]	CD2 表达增加	与 HIV-1 RNA 指导的 DNA 聚合酶 (EC 2.7.7.49) 有 11 个 AA 100% 匹配
P14-6 (9AA)	[H]-v-i-i-a-q-y-m-d-[OH]	与 MabCD2 竞争结合	无匹配
P13-5 (10AA)	[H]-s-q-a-v-q-e-h-a-s-t-[OH]	细胞可存活性降低	与人类维生素 A 和甲状腺激素受体的沉默介质 (SMRT) 有 10 个 AA 100% 匹配
P4-3 (13AA)	[H]-s-q-a-v-q-e-h-a-s-t-n-m-g-OH]	细胞可存活性降低	与人类维生素 A 和甲状腺激素受体的沉默介质 (SMRT) 有 10 个 AA 100% 匹配

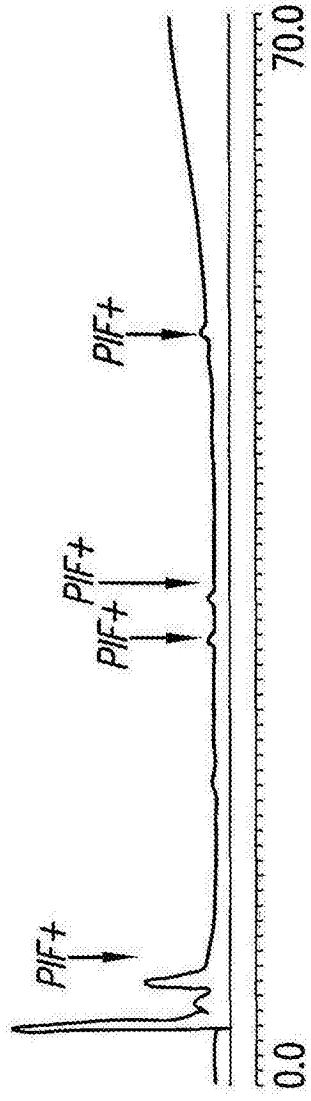


图 1A

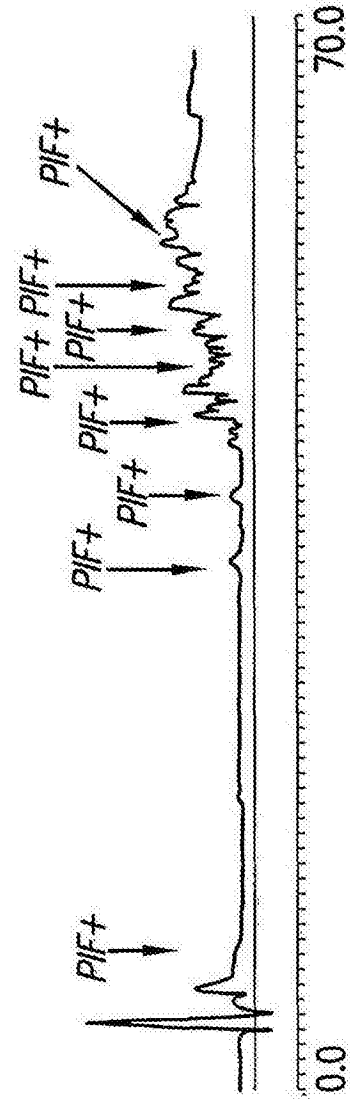


图 1B



图 2A



图 2B

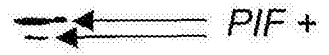


图 2C

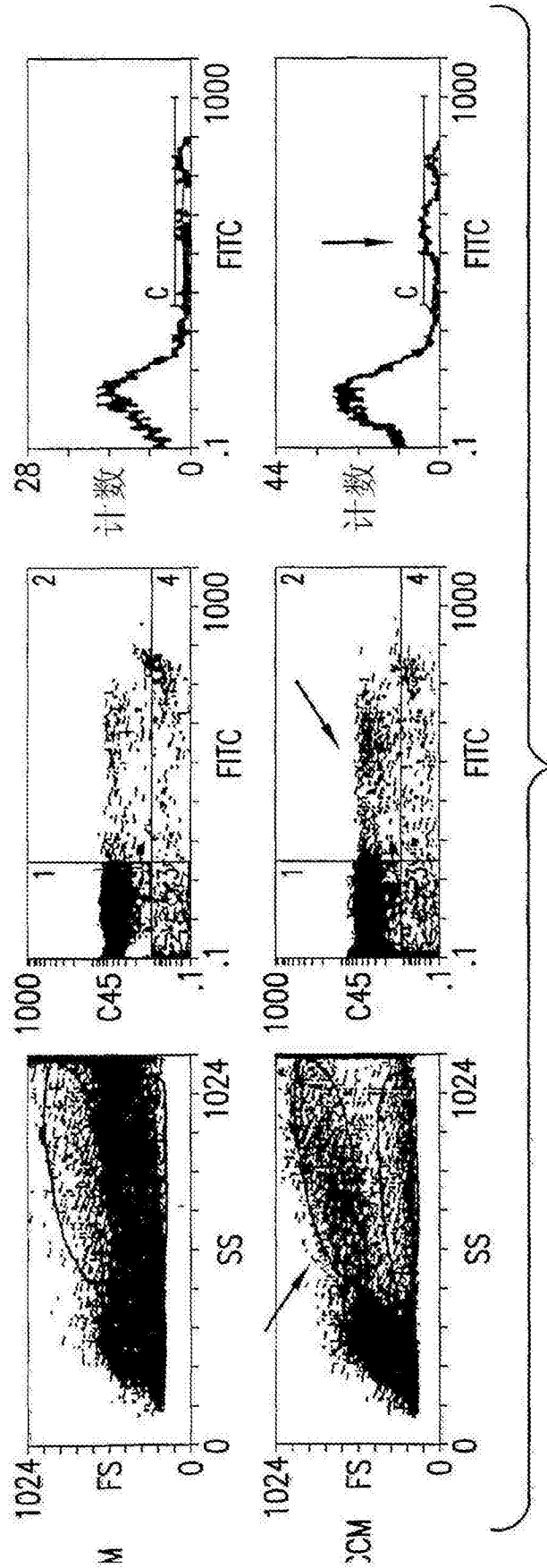


图 3A

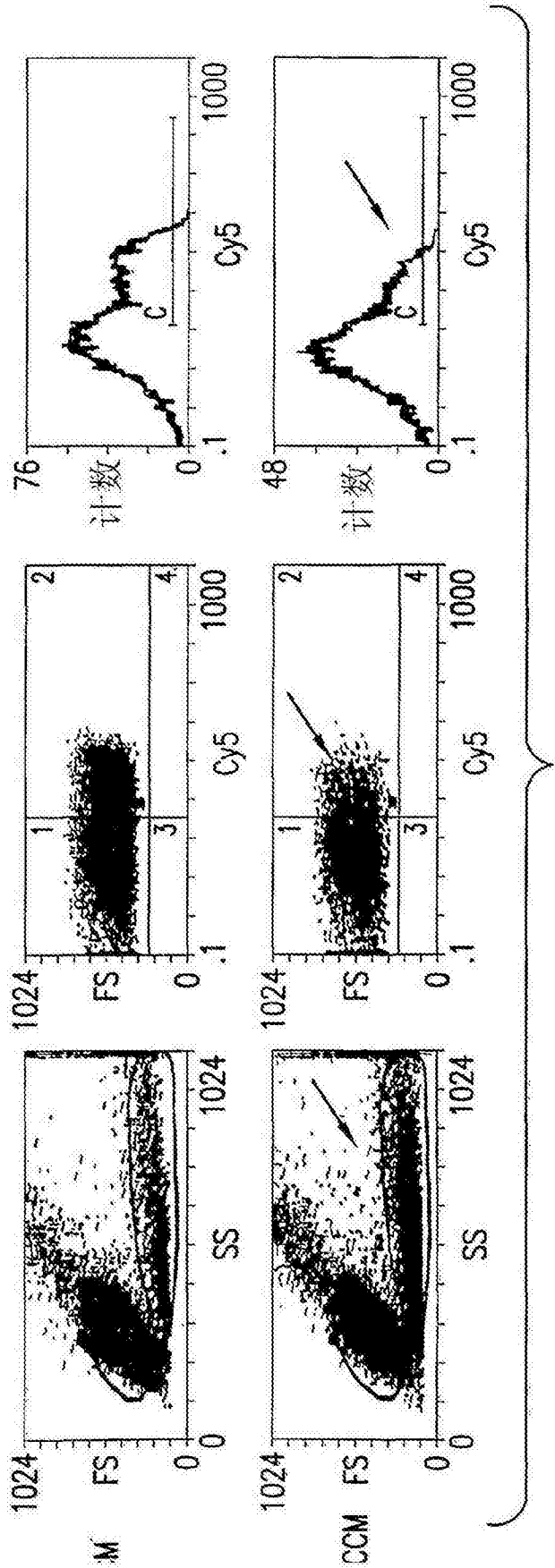


图 3B

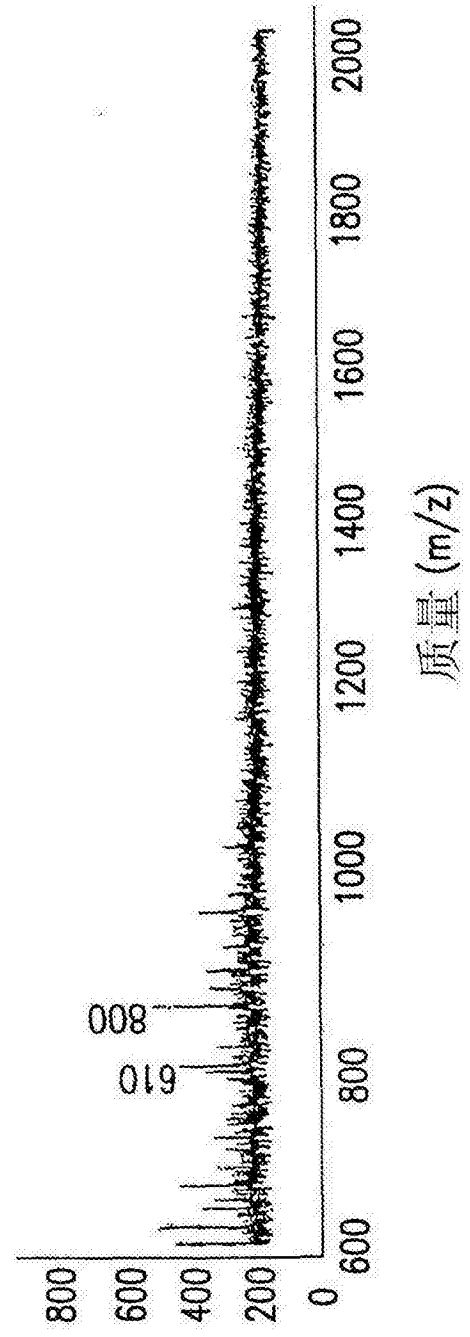


图 4A

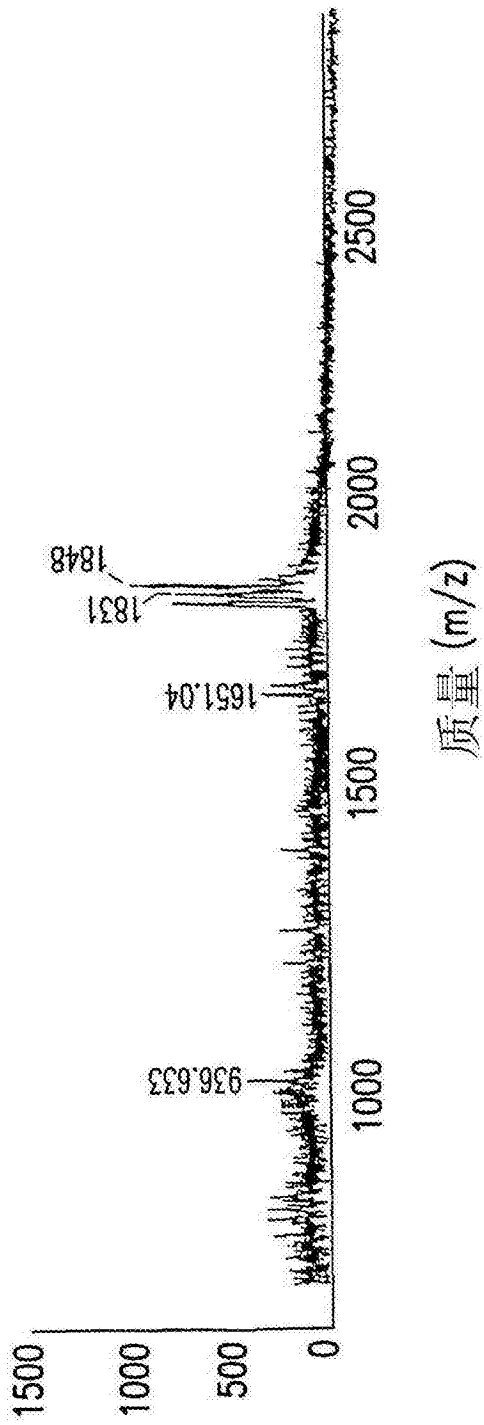


图 4B

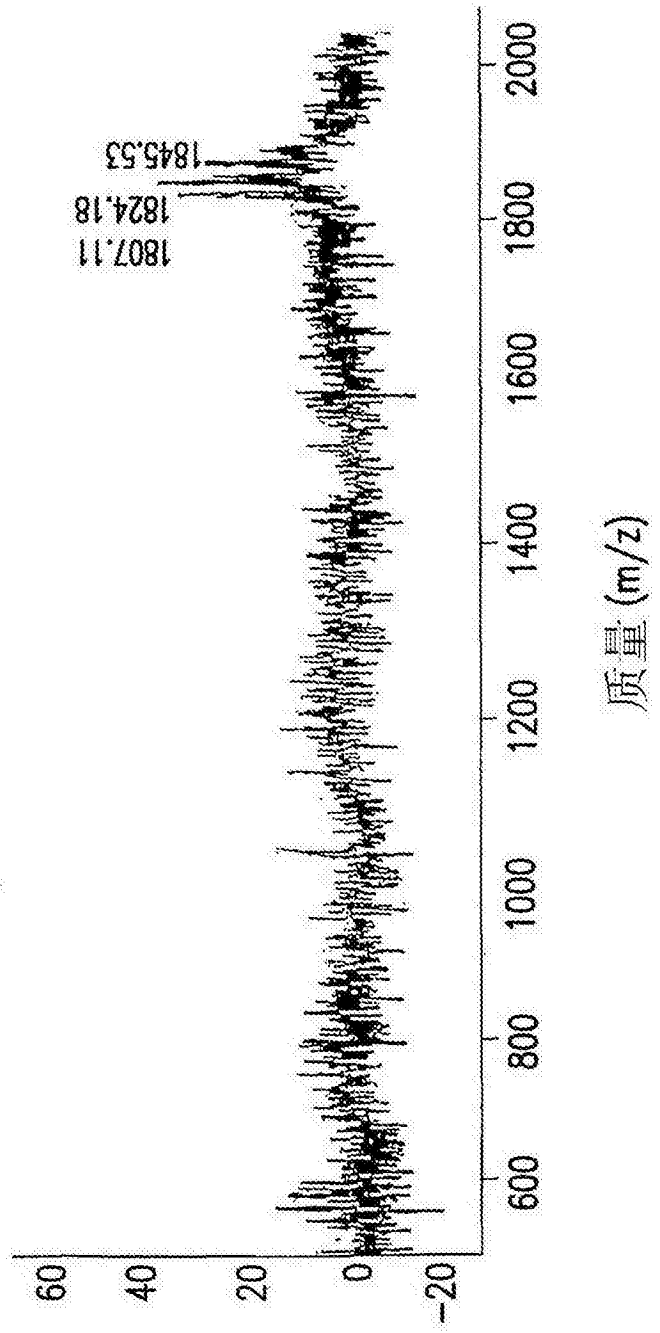


图 4C

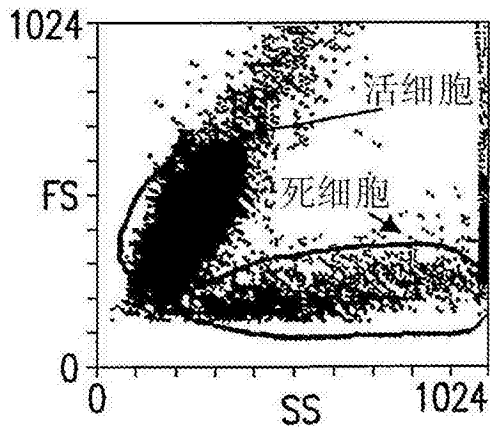


图 5A

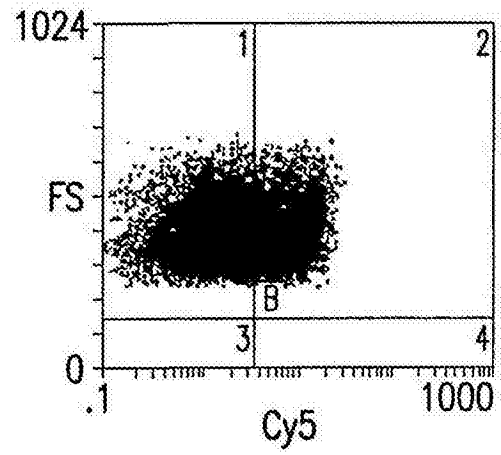


图 5B

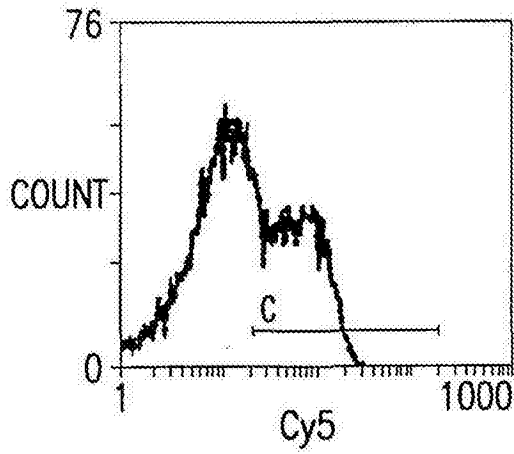


图 5C

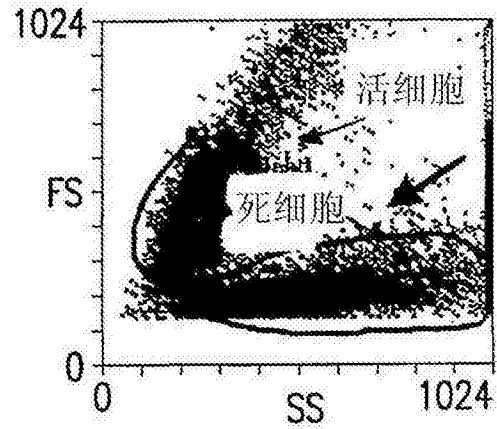


图 5D

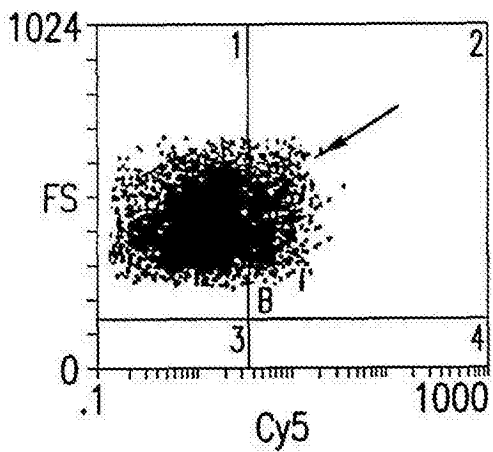


图 5E

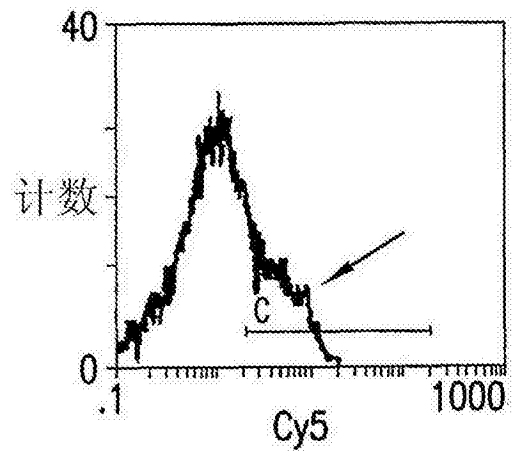


图 5F

合成的新PIF肽对Jurkat细胞
CD2表达的作用

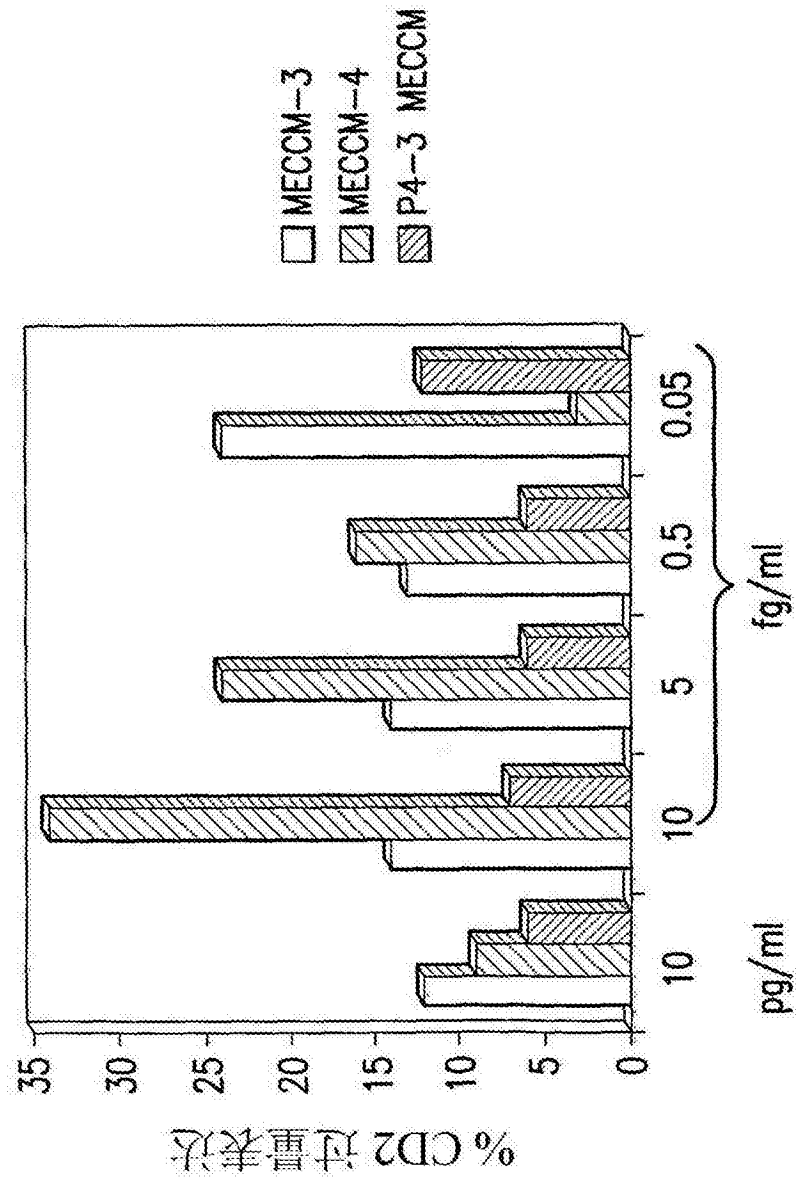


图 6

专利名称(译)	用于植入前因子的新型检测方法以及植入前因子肽		
公开(公告)号	CN103755787B	公开(公告)日	2016-05-18
申请号	CN201310654136.X	申请日	2002-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	倍奥英赛普特有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	倍奥英赛普特有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	倍奥英赛普特有限责任公司		
[标]发明人	艾坦巴尼 鲁宾雷内冈萨雷斯佩雷斯 保罗C利维斯		
发明人	艾坦·巴尼 鲁宾·雷内·冈萨雷斯·佩雷斯 保罗·C·利维斯		
IPC分类号	C07K7/08 G01N33/53 C07K7/06 C07K14/47 G01N33/68		
CPC分类号	C07K7/06 C07K14/4715 G01N33/689 G01N2333/70507		
代理人(译)	甘玲		
审查员(译)	王慧		
优先权	60/302607 2001-07-02 US		
其他公开文献	CN103755787A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于检测PIF存在与否的分析方法，以及通过此方法鉴定出来的PIF肽。具体地说，本发明涉及用于检测PIF的流式细胞术检测方法。它至少部分地基于如下观察结果：利用了荧光标记的抗淋巴细胞和抗血小板的抗体的流式细胞术表明，在PIF存在下，玫瑰花结的形成增加。它还基于如下观察结果：流式细胞术表明，在PIF存在下，与CD2结合的单克隆抗体减少了。本发明还涉及PIF肽，当PIF肽被加入到Jurkat细胞培养物中时，能够观察到它可以：或者(i)减少抗CD2抗体与Jurkat细胞的结合；或者(ii)增加Jurkat细胞中CD2的表达；或者(iii)减小Jurkat细胞的存活性。在另外的实施方案中，本发明提供了ELISA检测方法，可以通过确定待测样品对抗CD2抗体与CD2底物相结合的效果而检测PIF。

样品	敏感度 (%)	特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
妊娠早期	91	92	92	92
妊娠中期	66	92	86	73
妊娠晚期	100	92	83	92
全部妊娠样品	86	92	88	86