

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534224

(P2004-534224A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
GO 1 N 33/52	GO 1 N 33/52	A
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-505617 (P2003-505617)	(71) 出願人	503454056 アイダホ リサーチ ファウンデーション アメリカ合衆国, アイダホ州 83844 -3003, モスクワ, ユニヴァーシティ オブ アイダホ, モリル ホール 10 3
(86) (22) 出願日	平成14年6月10日 (2002.6.10)	(74) 代理人	100072349 弁理士 八田 幹雄
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月10日 (2003.12.10)	(74) 代理人	100102912 弁理士 野上 敦
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/018479	(74) 代理人	100110995 弁理士 奈良 泰男
(87) 国際公開番号	W02002/103352	(74) 代理人	100111464 弁理士 齋藤 悦子
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		
(31) 優先権主張番号	60/299, 553		
(32) 優先日	平成13年6月19日 (2001.6.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 妊娠状態の決定方法

(57) 【要約】

動物が交配後妊娠しなかったかあるいは妊娠しているかどうかを決定するための方法およびキット。妊娠誘導タンパク質の発現のレベルを、妊娠状態の情報が望まれる動物で測定し、そのレベルを妊娠していない動物のレベルと比較する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物の交配後の妊娠初期期間中の動物の妊娠誘導タンパク質の発現のレベルを測定し、さらに動物における該タンパク質の発現のレベルを同種の妊娠していない動物のレベルと比較することを有する動物の妊娠状態の決定方法。

【請求項 2】

妊娠誘導タンパク質はタイプ I インターフェロン誘導タンパク質 (Type I Interferon-induced protein) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

タイプ I インターフェロン誘導タンパク質はインターフェロン - タウ (I F N) 誘導タンパク質 (Interferon-tau-induced protein) である、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

動物は反芻動物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

有蹄動物以外の反芻動物は、フタコブラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、及びビクーナから選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

動物は有蹄動物である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ヤク、水牛、バイソン、アンテロープ、及びシカから選択される、請求項 6 に記載の方法。 20

【請求項 8】

動物は、雌ヒツジまたは雌ウシである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

動物は有蹄動物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

動物は、ウマまたはブタである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

タンパク質は、2' , 5' - オリゴアデニレートシテターゼ、2 - ミクログロブリン、I F N 調節因子 1、ユビキチン交差反応性タンパク質、及び M x タンパク質から選択される、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 12】

タンパク質は M x タンパク質である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質の発現レベルは、タンパク質をコードする m R N A のレベルを測定することによって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

m R N A の測定は、ノーザンプロット分析、スロット - プロット分析、またはポリメラーゼ連鎖反応による、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

タンパク質の発現レベルは、タンパク質のレベルを測定することによって測定される、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 16】

タンパク質の産生のレベルの測定は、タンパク質への抗体の結合を評価することによるまたはタンパク質の機能に基づくアッセイによる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

タンパク質の産生のレベルは、比色アッセイによって検出される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

タンパク質の発現レベルは、動物の細胞におけるタンパク質の発現を測定することによっ 50

て測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

細胞は有核血液細胞である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

細胞は末梢血単核細胞である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

タンパク質の発現レベルは、動物の体液を分析することによって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

体液は、乳汁、唾液、尿、または鼻、眼、若しくは膺の分泌物から選択される、請求項 21 に記載の方法。 10

【請求項 23】

体液は、血液、血漿、または血清である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

動物は、妊娠初期期間中の動物のタンパク質の発現のレベルが同種の妊娠していない動物のタンパク質の発現のレベルに比して上昇していない場合には妊娠していないと決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

動物は、妊娠初期期間中の動物のタンパク質の発現のレベルが同種の妊娠していない動物のタンパク質の発現のレベルの 2 倍以上である場合には妊娠していると決定される、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 26】

動物は、妊娠初期中の動物のタンパク質の発現のレベルが同種の妊娠していない動物のタンパク質の発現のレベルの 4 倍以上である場合には妊娠していると決定される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

比較は、動物におけるタンパク質の発現のレベル及び妊娠しているまたは妊娠していないことが知られている動物の発現のレベルの並列比較 (side-by-side comparison) による、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

比較は履歴コントロール (historical control) を用いることによる、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 29】

妊娠認識シグナル伝達の期間中に行なわれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

動物の交配から 12 ~ 30 日の間の期間中に行なわれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

動物の交配から 12 ~ 21 日の間の期間中に行なわれる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

動物の交配から 18 ~ 21 日の間の期間中に行なわれる、請求項 31 に記載の方法。 40

【請求項 33】

試験サンプルを保持するための容器、該容器中の試験サンプルと混合されると、オペレーターが試験サンプル中の妊娠誘導タンパク質のレベルを目視で測定できるような、一以上の試薬、およびサンプル中のタンパク質のレベルに基づいて動物の妊娠状態を決定するための指示書を有する、動物の妊娠状態を決定するためのキット。

【請求項 34】

妊娠誘導タンパク質はインターフェロン - タウ (IFN τ) 誘導タンパク質 (Interferon-tau-induced protein) である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

IFN τ 誘導タンパク質は Mx タンパク質である、請求項 34 に記載の方法。 50

【請求項 36】

I F N 誘導タンパク質は I S G - 17 である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

妊娠誘導タンパク質のエピトープに結合する抗体が結合する試験表面、タンパク質の第二のエピトープに結合する第二の標識抗体を有する容器、タンパク質の基準濃度を有する標準サンプルを有する容器、標識された第二の抗体と接触すると、存在するタンパク質の相対的な量が目視できるような試薬、および試験サンプルが妊娠または妊娠していない状態を示す量のタンパク質を含むかどうかを決定するためのキットの使用に関する指示書を有する、動物の妊娠状態を決定するためのキット。

【請求項 38】

妊娠誘導タンパク質はインターフェロン - タウ (I F N) 誘導タンパク質である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

I F N 誘導タンパク質は M x タンパク質である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

I F N 誘導タンパク質は I S G - 17 である、請求項 38 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、動物の妊娠状態の決定方法に関するものである。特に、本発明は、有蹄動物以外の動物 (non-ungulate)、有蹄動物、及び反芻動物の妊娠状態の決定方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

家畜の育成において、交配した動物の妊娠状態を正確に決定することは非常に重要である。特に、交配した動物が妊娠していないことを正確にかつ早期に同定することは経済上重要である。現在、動物、例えば、ウシを交配すると、妊娠状態が触診等の方法によって決定されるが、この方法は交配してから 30 日後までは正確な妊娠状態の決定ができない。ウシは約 21 日の発情周期を有するため、これは、現在利用されている方法では、妊娠しそこなった動物を交配する機会、即ち、交配を失敗した直後の発情期間を少なくとも 1 回失うであろうことを意味する。

【0003】

これは、ウシの交配工業、特に酪農工業では重要な経済的な結果を有する。効率よく牛乳を生産する農業には、ウシが自然分娩してから 80 ~ 100 日で妊娠するようにうまく交配することが必要である。しかしながら、酪農用のウシは、人工受精では受精率が低く、平均で 1 回の妊娠に 2.5 ~ 3 回受精が必要である。したがって、酪農家が、交配に失敗した後の次の発情期間に動物を再交配する機会を失うことなく動物が妊娠していないことを正確に決定する方法に対する必要性がかなりある。

【0004】

参考によって本明細書中に引用される、Sasser、米国特許第 4,705,748 号には、受胎動物によって生産されるタンパク質を検出することによって妊娠を決定する方法が開示される。この方法によって、ウシは、交配してから 27 日という初期に妊娠していることが決定された。Sasser は、次の発情期間が妊娠していないウシで始まるであろう時期前の妊娠の診断は開示しておらず、また、妊娠していないことの初期の決定をも開示していない。

【0005】

有蹄動物の妊娠の母体の認識は、黄体退行シグナル、プロスタグランジン F₂ (P G F₂) ; Yankey et al., Expression of the antiviral protein Mx in peripheral bl

10

20

30

40

50

ood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. *Journal of Endocrinology* 170, R7-R11 (2001); Bazer et al., Regulation of endometrial responsiveness to estrogen and progesterone by pregnancy recognition signals during the peri-implantation period. In *Molecular and Cellular Aspects of Peri-implantation Processes*, pp 27-47. Ed S.K. Dey. Springer-Verlag, New York, Inc. (1995)) の生産が減少または変化する、受胎動物による局所的な及び全身の遺伝子の調節を伴う。これは、受胎動物が生産する絨毛性性腺刺激ホルモンによる黄体 (CL) への直接的な黄体刺激効果を有する、霊長動物における妊娠の認識と反対である (Bazer et al. 1995)。有蹄動物における母体認識に関するシグナルは、妊娠の第 2 ~ 第 3 週のインターフェロン - タウ (Interferon-tau) (IFN) の受胎動物による分泌物である (Bazer et al., 1995; Godkin et al., *J. Reprod. Fert.* 65:141-150(1982))。IFN は、子宮内膜のエストロゲン及びオキシトシンレセプターの増加を防止し、PGF₂ のオキシトシン誘導性黄体退行パルス除去して、CL 機能を維持する (Spencer et al., *Endocrinology* 136:4932-4944 (1995))。 10

【0006】

IFN は、IFN、及び (Samuel, *Virology* 183:1-11 (1991))、ならびにさらに最近では、インターフェロン (Lefevre, F., et al., *Biochimie* 80:779-788 (1998)) をも含む、タイプ I IFN 群のひとつである。タイプ I IFN レセプターならびにヤヌスキナーゼ (JAK) - シグナルトランスデューサー及び転写の活性化因子 (STAT) シグナル伝達経路を介した IFN のシグナル伝達 (Stewart et al., *Endocrinology* 142:98-107 (2001)) は、2', 5' - オリゴアデニレートシンテターゼ (2', 5' oligoadeny late synthetase) (Johnson et al., *Biol. Reprod.* 64:1392-1399 (2001))、2 - ミクログロブリン (Vallet et al., *J. Endocrinol.* 130:R1-4 (1991))、IFN 調節因子 1 (Spencer et al., 1998)、ユビキチン交差反応性タンパク質 (Johnson et al., *Biol. Reprod.* 62:622-627(2000))、及び Mx タンパク質 (Charleston and Stewart, *Gene* 137:327-331 (1993); Ott et al., *Biol. Reprod.* 59:784-794 (1998)) 等のヒツジの子宮で数多くの遺伝子を誘導する。抗ウイルス応答におけるこれらのタンパク質の多くの機能の特徴がかなり明らかであるものの、妊娠初期中のその役割は明らかではない。 20

【0007】

Mx タンパク質は、単量体の GTPase であり、動物の種及びウイルスのタイプによって、ウイルスの複製の強力な阻害剤となる (Samuel, *Virology* 183:1-11 (1991))。ヒツジ、ウシ、ブタ、及びウマ等の、様々な種由来の Mx タンパク質の配列が GenBank により公的に利用でき、それぞれ、GenBank の受託番号 X66093、U88329、M65087、及び U55216 で寄託されている。Mx の抗ウイルス効果は、通常、マイナス鎖 RNA ウィルス (例えば、オルトミキソウィルス (orthomyxovirus)) に対するものであるが、その発現はタイプ I IFN レセプターを有する全ての細胞中で誘導され、細菌及びウイルス感染を区別するのに使用されてきた (Haller et al., *Rev. Sci. Tech.* 17:220-230 (1998))。近年、Mx の mRNA 及びタンパク質は、妊娠した雌ヒツジの子宮壁内で上皮 (13 日まで) から子宮筋層 (15 日まで) まで上昇することが示され、レベルは 25 日をとおして上昇したままだった (Ott et al., *Biol. Reprod.* 59:784-794 (1998))。加えて、Mx の mRNA レベルは、子宮腔中に rIFN を注射したことに応答して黄体中で上昇した (Spencer et al., *Biol Reprod* 61:464-470 (1999))。 30 40

【0008】

これらの結果から、IFN は、1) すべての子宮細胞型 (即ち、上皮、間質及び子宮筋層) でならびに CL で直接作用する; または 2) 子宮の細胞及び卵巣等の他の器官でパラクリン/内分泌効果を有する物質 (サイトカイン) を誘導する; または 3) 子宮粘膜の成分に影響を及ぼして、免疫系を循環した後、様々な子宮細胞及び CL に影響を与えることが示された。

【0009】

しかしながら、妊娠状態を評価する試験として子宮組織中の Mx タンパク質のレベルを測 50

定することは実用的でない。侵襲性でかつ時間と手間がかかるプロセスである上、Mxの子宮レベルを測定するのに必要である子宮組織の破壊が妊娠に有害な影響を与える傾向がある。

【0010】

家畜の妊娠または妊娠していないことを決定する信頼性の高い、再現性のある及び非侵襲性的の方法に対する必要性がかなりある。

【発明の開示】

【0011】

発明の要約

2', 5'-オリゴアデニレートシンテターゼ、2-ミクログロブリン、IFN調節因子1、ユビキチン交差反応性タンパク質(「インターフェロン刺激遺伝子因子17(interferon stimulated gene factor 17)」(「ISG-17」))としても知られている)、及びMxタンパク質などの、本明細書中では「妊娠誘導タンパク質(pregnancy-induced protein)」と称される、いくつかのタンパク質をコードする遺伝子の発現が妊娠の初めの1ヶ月の間、特定の動物で有意に増加することを発見した。さらに、妊娠誘導タンパク質の発現の増加が妊娠していない動物では起こらないことを発見した。

10

【0012】

多くの動物では、妊娠誘導タンパク質の発現の増加は、妊娠の母体認識に関するシグナルと称される、その存在の胚からの母親へのシグナルである、ホルモン、タイプIインターフェロンの胚による分泌によるものである。インターフェロンアルファ(IFN α)、インターフェロンベータ(IFN β)、インターフェロンオメガ(IFN ω)、インターフェロンドelta(IFN δ)、及びインターフェロンタウ(IFN τ)等の、様々なタイプIインターフェロンは、様々な種の胚によって分泌される。例えば、IFN α は反芻動物で妊娠認識ホルモンとして分泌され、IFN β はブタで分泌される。ウマ及び他のウマ科等の、他の種では、妊娠誘導タンパク質であるMxタンパク質が妊娠初期中に子宮で検出できるものの、現在まで、タイプIインターフェロンのウマの受胎動物による分泌は示されていなかった。むしろ、ウマや受胎動物がタイプI IFNを産生しない他の種では、子宮が胚の存在に応答してタイプIインターフェロンを産生することが可能である。

20

【0013】

一実施態様においては、本発明は、動物の妊娠状態を決定する方法である。本発明のこの実施態様によると、妊娠初期中の妊娠誘導タンパク質(pregnancy induced protein)の発現のレベルを測定し、同種の妊娠していない雌動物における同じ期間中の妊娠誘導タンパク質の発現のレベルと比較する。好ましくは、測定、比較される妊娠誘導タンパク質は、タイプIインターフェロン誘導タンパク質である。最も好ましくは、妊娠誘導タンパク質は、Mxタンパク質またはISG-17である。

30

【0014】

本明細書中で使用される、「妊娠誘導タンパク質(pregnancy-induced protein)」ということばは、母体遺伝子によって発現し、その発現が妊娠の存在に応答して誘導されるタンパク質を意味する。妊娠誘導タンパク質は、このようなタンパク質が母体遺伝子によっても発現し、この母体の発現が妊娠の存在に応答して誘導される場合でなければ、受胎動物によって生産されるタンパク質とは区別される。

40

【0015】

本明細書中で使用される、「妊娠初期」ということばは、妊娠誘導タンパク質のレベルが同種の妊娠していない動物に比して妊娠動物では上昇する妊娠認識シグナル伝達(pregnancy recognition signaling)期間中または後の時期を意味する。交配がうまくいかない、即ち、妊娠しなかった動物が妊娠認識シグナル伝達の期間を経るか経ないかにかかわらず、「妊娠初期」ということばは、妊娠していない動物に関しては、交配がうまくいった場合には妊娠初期がある期間を意味するように本明細書中で使用される。具体的には、本発明の方法に関して使用される、妊娠初期の期間は、受胎してから最初の約1ヶ月末で終了する。

50

【0016】

本明細書中で使用される、「妊娠認識シグナル伝達の期間」ということばは、胚が、その分泌により胚の存在を母体に認識させる、タンパク質またはホルモンを分泌する間の期間を意味する。交配がうまくいかない、即ち、妊娠しなかった動物が妊娠認識シグナル伝達期間を経るか経ないかにかかわらず、このことばは、妊娠していない動物に関しては、交配がうまくいった場合には、生化学的なシグナル伝達が受胎動物及び子宮間で起こる期間を意味するように本明細書中で使用される。

【0017】

本発明によると、妊娠した動物は、同種の妊娠していない動物に比べて、妊娠認識シグナル伝達の期間中などの、妊娠初期中の、M \times タンパク質またはISG-17などの、一以上の妊娠誘導タンパク質の発現のレベルが顕著に高くなるであろう。妊娠していない動物は、その動物が交配したか否かにかかわらず、この期間中に、M \times タンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の発現の基準レベル付近を示すであろう。

10

【0018】

他の実施態様においては、本発明は、受胎動物が妊娠の母体の認識に関するシグナルとしてタンパク質またはホルモンを分泌する種の動物の生殖状態を決定するためのキットである。本発明のこの実施態様によると、キットは、試験サンプルを保持するための容器、試験サンプルと混合されると、オペレーターが、試験サンプル中の、M \times タンパク質またはISG-17等の、一以上の妊娠誘導タンパク質のレベルを目視で測定できるような、一以上の試薬、およびサンプル中のタンパク質のレベルを決定するための指示書を有する。好ましくは、キットは、オペレーターが、サンプル中の測定されたタンパク質のレベルに基づいて動物の妊娠状態を決定できるような指示書をさらに含む。

20

【0019】

本発明を、M \times タンパク質を参照しながら以下にさらに詳細に説明する。当業者は、下記開示が、詳細に説明されるM \times タンパク質に加えて、2', 5'-オリゴアデニレートシンターゼ、 α 2-ミクログロブリン、IFN調節因子1、及びユビキチン交差反応性タンパク質等の、IFN誘導タンパク質などの、他のタイプIインターフェロン誘導タンパク質等の、他の妊娠誘導タンパク質に適用できることを理解するであろう。したがって、下記開示において、「M \times タンパク質」ということばに言及すると、他の妊娠誘導タンパク質を代わりに使用してもよい。

30

【0020】

図面の簡単な説明

図1は、雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBMC（抹消血単核細胞）のM \times mRNAのノーザンブロット分析である。レーン1～6は、妊娠した雌ヒツジを表わし、およびレーン8～13は、妊娠していない雌ヒツジを表わす。M \times mRNAは、約2.5 kbで泳動された。

【0021】

図2は、雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBMCから単離された全細胞RNAのスロット-ブロット分析の結果を示すグラフである。M \times mRNAレベルは、D26で交配したが妊娠しなかった雌ヒツジに対して妊娠した雌ヒツジで約4倍より大きかった（ $P < 0.01$ ）。PSPB（妊娠に特異的なタンパク質B）レベル（ ）から、妊娠状態が確認され、これは誕生した子羊の数と相関した。（図2のCNTSは、化学発光ノーザンブロットの光子計測数を示す。）

40

図3は、人工授精してから0～30日での人工授精された妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBMC中のM \times mRNAの発現を示す棒グラフである。（図3のCNTSは、化学発光スロット-ブロットの光子計測数を示す。）

図4は、人工授精してから15及び18日の妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBMCのM \times タンパク質発現のウェスタンブロット分析である。

【0022】

発明の詳細な説明

50

本発明は、妊娠初期中に増加したレベルの一以上の妊娠誘導タンパク質を分泌する動物種に適用できる。好ましくは、動物種は、妊娠の母体認識に関するシグナルとしてタイプ I インターフェロンを分泌するものである。最も好ましくは、動物種は、妊娠の母体認識に関するシグナルとしてホルモン I F N を分泌するものである。これらの動物では、増加したレベルの、I F N 等の、タイプ I インターフェロンは、妊娠認識シグナル伝達の期間中 M x タンパク質の発現の促進を誘導する。本発明によると、妊娠初期中に、好ましくは交配後の妊娠認識シグナル伝達の期間中を含む期間中に、適当な動物で、M x タンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の発現が増加しないことは、動物が妊娠していないという陽性の表示である。これに対して、この期間中にタンパク質の発現が増加する、陰性の結果は、動物が妊娠していることを示す。

10

【0023】

本願では、M x タンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の発現が増加しないことを陽性結果と称し、タンパク質の発現が増加することを陰性結果と称する。農場主または牧場主または動物育種に携わる他の人に最も関心があるのは、妊娠ではなくむしろ、妊娠していないことを発見することであるため、最初は「陽性」及び「陰性」結果ということばの一般的な使用とは逆であるように見える、この用語が本明細書中では使用される。動物が妊娠していると決定されたら、妊娠が終了した兆候を探すために雌を見る以外には、確かに妊娠していることを確かめる作業をさらに行なうことはない。これに対して、動物が妊娠していないと決定されたら、次の発情の開始についてさらに評価されなければならない、さらに再度交配させるであろう。したがって、確実に妊娠させるために動物に労力がさらに払われる起動力を提供するのは妊娠をしていないものを見つけることである。

20

【0024】

上述したように、本発明は、I F N 等のタイプ I インターフェロンが妊娠の母体認識に関する単一のシグナルまたは一以上のシグナルのうちの一である種の動物等の、妊娠初期中に増加したレベルの妊娠誘導タンパク質を産生する種に属する雌動物に適用できる。本発明の方法に適する動物としては、有蹄動物及び有蹄動物以外の反芻動物がある。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ヤク、水牛、及びバイソン等の、反芻動物であってもよい。また、アンテロープ、ガゼル、ヘラジカ、トナカイ、ムース、オオツノヒツジ、キリン、及びウシ、ヒツジ、及びヤギ科の他のものなどの家畜化されていない有蹄動物もまた、本発明に適する有蹄の反芻動物に含まれる。本発明の方法に適する有蹄動物以外の反芻動物としては、フタコブラクダ及びヒトコブラクダならびにラマ、アルパカ、及びビクーナ等の他のラクダ科 (camelids) が挙げられる。本発明に適する反芻動物以外の有蹄動物としては、家畜化された及び家畜化されていないブタ及びウマがある。本発明の方法に適する動物には、有蹄動物及び有蹄動物以外の反芻動物以外の動物が包含される。例えば、ヒト等の霊長類、さらにはイヌ及びネコが、本発明の方法に適すると考えられる。

30

【0025】

本発明の方法によると、交配後の適当な期間中に、動物を、以降、M x タンパク質で具体的に説明される、妊娠誘導タンパク質の増加した発現の、存在に関して、またはより正確には存在しないことに関して試験される。試験は、M x タンパク質が発現する細胞を利用してまたは M x タンパク質が検出される体液中で行なわれてもよい。

40

【0026】

動物が M x タンパク質の発現を増加するまたは増加しないかを決定する際に、妊娠していないことが知られている動物における発現のレベルとの比較がなされる。この比較は、例えば、交配されたが妊娠状態が不明である動物からの試験サンプルの並列比較 (side-by-side comparison) を行なうことによってなされてもよい。またはおよび好ましくは、比較は、交配されたが妊娠状態が不明である動物からのサンプルを試験し、このサンプル中の M x タンパク質のレベルを妊娠していない動物に存在することが知られている M x タンパク質のレベルと比較する、すなわち履歴コントロール (historical control) を用いることによってなされてもよい。

【0027】

50

本発明を、抹消血単核細胞 (P B M C) での M x タンパク質の向上した発現の測定について本明細書で詳述する。しかしながら、血流中に存在する他の有核細胞等の、M x タンパク質を発現するいずれの細胞が P B M C の代わりに使用されてもよい。同様に、本発明による向上した M x の発現は、乳汁、唾液、尿または鼻、眼、若しくは膺の分泌物、または全血、血漿若しくは血清等の体液の分析によって測定されてもよい。

【 0 0 2 8 】

ほとんどの種での母体認識の期間はほとんど同時、例えば、雌ヒツジでは交配してから 1 2 ~ 1 4 日目及び雌ウシでは 1 5 ~ 1 8 日目に起こるが、妊娠の母体認識が起こる胚のシグナル伝達の期間は異なる種によって幾分異なる。したがって、本発明の方法が有効に実施される交配後の実際の日には異なるであろう。例えば、家畜化されたヒツジでの妊娠シグナル伝達の母体認識の期間は、具体的には、交配してから約 1 1 日から始まり、約 2 1 日目まで続く。ウシでは、この期間は、具体的には、交配してから約 1 3 日から始まり、約 3 5 日目まで続く。

10

【 0 0 2 9 】

試験サンプルにおける M x タンパク質発現のレベルを M x タンパク質発現の基準の (妊娠していない) レベルと比較する際には、基準より具体的に 2 倍以上高い M x タンパク質発現が陰性試験結果であり、即ち、その動物は妊娠していないとは決定されない。一般的に、妊娠認識シグナル伝達の期間中の M x タンパク質発現のピークレベルでは、妊娠した動物は、基準の 4 若しくは 5 倍、またはそれ以上までの M x タンパク質発現のレベルを有するであろう。

20

【 0 0 3 0 】

本発明によると、方法は、妊娠誘導タンパク質のレベルが同種の妊娠していない動物と比較して妊娠している動物でもはや上昇しなくなるまでシグナル伝達の期間の始まりから開始していずれの時期に行なってもよい。妊娠した動物が妊娠していない動物に比べて高い M x タンパク質発現を有するのはこの期間中である。ゆえに、ヒツジやウシでは、妊娠状態を決定するために M x タンパク質発現のレベルを比較するのに好ましい期間は、交配後 1 2 ~ 3 0 日の間である。より好ましい期間は、交配後 1 2 ~ 2 1 日の間である。最も好ましい期間は交配後 1 5 ~ 2 1 日の間であり、最も好ましい時期はウシでは 1 8 日であり、ヒツジでは 1 5 日である。

30

【 0 0 3 1 】

M x タンパク質発現のレベルは、この測定がなされるいずれの方法によって測定されてもよい。適当な方法としては、E L I S A 試験、M x タンパク質の機能に基づくアッセイ、またはウェスタンブロットによるなど、M x タンパク質自身を検出することがある。また、適当な方法としては、ノーザンブロット、スロットブロット、または P C R によるなど、M x m R N A のレベルの増加を検出することがある。好ましい実施態様においては、M x タンパク質発現のレベルは、ヒト家庭での妊娠診断キットで使用される方法と同様の、例えば、M x タンパク質への抗体の結合に基づいた、比色アッセイによってサンプル中に存在する M x タンパク質のレベルを検出することによって測定される。

【 0 0 3 2 】

本発明の方法は、動物が妊娠していないことを予想どおりに決定する正確で再現性のある試験であり、また、動物が妊娠していることを決定するのに同様に使用されてもよい。必ずしも他の妊娠誘導タンパク質ではそうではないが、特に M x タンパク質に関しては、動物が妊娠していることを誤って示す、M x タンパク質発現のレベルが増加する偽陰性結果の源が動物が重篤なウィルス感染にかかっている場合にある。

40

【 0 0 3 3 】

本発明のキットは、「免疫測定 (immunometric)」または「サンドイッチ」アッセイとして知られているもの等の、酵素様免疫吸着法 (E L I S A) に基づくことが好ましい。このようなアッセイは、リガンド (抗原等) を、干渉しないようにかつ異なるエピトープ部位でリガンドと複合体を形成する 2 以上のレセプター分子 (抗体等) で「サンドイッチ」することを含む。このようなアッセイの例は、David et al., 米国特許第 4 , 4 8 6 , 5 3

50

0号に記載される。または、キットは、化学発光アッセイ、強化発光アッセイ(enhanced luminescence assay)、及びラジオイムノアッセイに基づくものであってもよい。好ましい実施態様においては、キットは、M×タンパク質等の、有益なタンパク質のエピトープに結合する抗体が結合する、スライドまたは複数の試験ウェル等の、試験表面を有するパッケージ、タンパク質の第二のエピトープに結合する第二の標識された抗体を有する容器、タンパク質の基準濃度を有する標準サンプルを有する容器、標識された第二の抗体と接触すると、存在するタンパク質の相対的な量が目視できるような試薬、および試験サンプルが妊娠または妊娠していない状態を示すM×タンパク質の量を含むかどうかを決定するためのキットの使用に関する指示書を有する。

【0034】

コントロールに比した試験サンプル中の、M×タンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の相対的な量を測定することによる妊娠状態の決定のための本発明のキットは、多くの様々な様式で配合されてもよく、これは本明細書の記載を読めば当業者には明らかであろう。本発明のキットのこれらの様々な配合は本発明に包含されるものである。

【0035】

本発明を、下記詳細な実施例でさらに記載するが、本発明を限定するものではない。実施例では、M×タンパク質を参照しながら本発明の方法を説明する。しかしながら、本発明の方法は、他の妊娠誘導タンパク質にも適用できる。

【0036】

実施例1 動物モデル

60匹のU.S. Sheep Experiment Station(USSES, Dubois ID)の成熟した、顔の白い雌ヒツジ(white-faced, ewe)を、同調させて、経子宮頸部による(transcervical)または腹腔鏡による人工授精(「AI」)のいずれかによって交配した。腹腔鏡によるAIは、Stellflug et al., J. Anim. Sci. 79:568-573 (2001)に開示される方法に従って行なった。人工授精の日を0日(D0)と称した。AIから26日目(D26)に、血液(10ml)を、EDTA含有真空管(vacutainer tube)(Sherwood Medical, St. Louis MO)中に頸静脈穿刺によって集めた。PBMCを以下の実施例2に記載されるのと同様にして単離した。妊娠を、妊娠に特異的なタンパク質B(PSPB; Biotracking Inc, Moscow ID)について血清をアッセイすることによって決定し、子羊が生まれた日(lambing date)及び生まれた子羊の数を記録した。

【0037】

実施例2 PBMCの単離

血液を処理するまで氷上に保存した。サンプルを、4で300×gで20分間、遠心した。パフコートを除き、5に対して1の割合で、0.87% Tris-NH₄Cl溶解バッファーに再懸濁した。サンプルを37で5分間インキュベートし、300×gで10分間、遠心した。上清を除去し、ペレットを10mlの1×PBSで洗浄し、300×gで10分間、遠心した。上清を除去した後、細胞ペレットをタンパク質の抽出のために-80で冷凍した、または2ml TRIzol(Life Technologies, Grand Island NY)で溶解して、RNAの抽出のために-80で貯蔵した。

【0038】

実施例3 RNAの抽出、ノーザン及びスロット-プロット分析

全細胞RNAを、製造社の指示に従ってTRIzolを用いて抽出した。RNAを、A260:280比によって定量した。PBMC中のM×転写物の大きさ及び数を確立するために、RNA(5µg)を1%アガロース/0.615Mホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、キャピラリーブロッキング(capillary blotting)によってナイロン膜(Nytran, Schleicher & Schuell, Keene NH)に移した。PBMC中のM×mRNAレベルの定量を目的として、RNA(5µg)を真空濾過(Minifold II, Schleicher & Schuell, Keene NH)によってナイロン膜に移した。プロットを、ノース2サウスハイブリダイゼーションキット(North2South Hybridization kit)(Pierce, Rockford IL)を用いてビオチン標識ヒツジM×アンチセンスcRNAプローブ(Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998))

10

20

30

40

50

)で調べ、化学発光シグナルをバイオ-ラッド フルオール-S マルチイメージャーシステム(Bio-Rad Fluor-S Multilmager system)及びクオンティティワンソフトウェア(Quantity One software)(Bio-Rad, Hercules CA)を用いて定量した。スロット-プロットをはずして、ヒツジの18s rRNA cDNAプローブで再度調べて、RNAローディングでの変動を修正した。

【0039】

ノーザンプロット分析では、図1に示されるように、妊娠したおよび交配したが妊娠しなかった雌ヒツジから単離されたPMBc中に、単一の、約2.5kDのバンドが検出され、これはヒツジの子宮のMx cDNAの既知のサイズと一致する(Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998))。

10

【0040】

AI後のD26に集められたPBMcから単離された全細胞RNAの、図2に示されるような、スロットプロット分析から、交配したが妊娠しなかった(n=26)雌ヒツジに対して妊娠した雌ヒツジではMx mRNAレベルが4倍増加したことが示された(P<0.01)。加えて、複数個(3個または4個; n=10)を有する雌ヒツジは、1個(n=10)または2個(n=9; P<0.05)を有するものに比べてMx mRNAレベルがより高かった。PSPB(妊娠に特異的なタンパク質B)アッセイの結果から妊娠の状態が決定され、さらに従来報告されているのと同様に、PSPBのレベルが生まれた子羊の数と相関した(Willard et al., J. Anim. Sci. 73:960-966 (1995))。

【0041】

実施例4 ヒツジの妊娠初期中のMxタンパク質mRNAの経時的な発現

第二の研究では、図3に示されるように、ヒツジの妊娠初期中のMx mRNAの経時的な発現を調べた。34匹の成熟したサフォーク雌ヒツジ(Suffolk ewe)を、同調させて、腹腔鏡によるAIによって交配した。血液(20ml)をD0、及びD9~D30までは3日毎に頸静脈穿刺によって集め、PBMcを単離した。妊娠を、D30でリアルタイム超音波検査及びPSPBアッセイによって確認した。図3に示される結果は、すべての雌ヒツジの代表的なサブセットであり、受精してからはじめの30日の間の4匹の妊娠したおよび4匹の交配したが妊娠しなかった雌ヒツジの結果を示すものである。これから、1回のプロットですべての複製物が分析でき、プロット間のシグナル強度に関連する問題を排除できた。結果から、妊娠した雌ヒツジで増加したMx mRNAレベルがD15で始まる(P<0.01)ことが示された。レベルはD21でピークに達し、それ以降は徐々に減少した。D30で、妊娠した雌ヒツジでのMxレベルは、交配したが妊娠しなかった雌ヒツジに比べて2倍高いままであった(P<0.01)。

20

30

【0042】

実施例5 タンパク質の単離およびウェスタンプロット分析

全細胞タンパク質を、製造社の指示に従って、M-PER試薬(M-PER reagent)(Pierce, Rockford IL)を用いて抽出した。サンプルのタンパク質濃度を、ウシ血清アルブメン(albumen)を標準物質として使用したBCAアッセイ(Pierce, Rockford IL)によって定量した。D15及びD18で妊娠したおよび交配したが妊娠しなかった雌ヒツジから単離されたPMBcのタンパク質(8µg/サンプル)を12% SDS-PAGEによって分離し、電気泳動によりニトロセルロース膜(BA83, Schleicher & Schuell, Keene NH)に移した。25で2時間、トリス緩衝化生理食塩水(Tris-buffered saline)及びTween 20(TBST)における5%脱脂粉乳中で非特異的な結合部位をブロックした後、膜を、4で一晩、ポリクロ-ナルウサギヒツジMxペプチド抗血清(#90618-2; 0.7µg/ml)の1:1000希釈液と共にインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ウサギIgG(0.8µg/ml)を、第2の抗体として1:200, 000の希釈率で使用した。化学発光シグナルを、ウェストフェムトマキシマムセンシティブティ-サブストレート(West Femto Maximum Sensitivity Substrate)(Pierce, Rockford IL)を用いて発色させ、フルオール-S マルチイメージャーシステム(Fluor-S Multilmager system)及びクオンティティワンソフトウェア(Quantity One software)

40

50

を用いて定量した。

【0043】

図4に示されるように、Mxタンパク質(約75kDa)はD15またはD18のオープンな(妊娠していない)雌ヒツジのいずれでも検出されなかったが、双方の日にちで妊娠した雌ヒツジのPBMCではかなりアップレギュレートされた。別の2つのバンド(約48及び36kDa)が妊娠した雌ヒツジのPBMCで検出された。

【0044】

実施例6 分析

化学発光シグナルをSASのGLM方法(Version 8.1, SAS Inc, Gary NC)を用いて分析した。このモデルは、必要であれば、状態(妊娠対交配したが妊娠しなかった)、状態に入る(nested within status)雌ヒツジ、日数(0、9、12、15、18、21、24、27、及び30)および適当な相互作用を含んだ。F検定での誤差項は、誤差に関する平均2乗の期待値にしたがった。18srRNAに関するシグナルは、モデルの同時変量(covariate)として泳動して、ローディングでの変動を修正した。結果は、調節された最小二乗手段(adjusted Least Squares Means)(LSM)及びこみにした標準誤差(pooled standard error)として報告した。

【0045】

実施例7 ウシ

33匹の家畜用雌ウシを人工授精によって交配し、MxmRNAのレベルを上記実施例2及び3に記載される方法によって測定した。15日目では、MxmRNAのレベルは、後に妊娠したことが決定した雌ウシでおよび後に妊娠していなかったことが決定した雌ウシでほぼ同じであることが分かった。18日目では、MxmRNAのレベルは、後に妊娠していなかったことが決定した雌ウシで検出された値の約3倍と、後に妊娠したことが決定した雌ウシでは顕著に増加していることが分かった。

【0046】

これらの結果から、妊娠認識シグナル伝達に応答してMx遺伝子発現が迅速にかつ持続して活性化されることが示され、さらに、IFNの局所的な効果に加えて、ヒツジ及びウシでは迅速な全身応答があることが示される。加えて、Mx発現は、妊娠が確立されない際(交配したが妊娠しなかった動物)にはPBMCで増加しなかった。IFNによる妊娠認識シグナル伝達は従来子宮内膜の遺伝子発現の局所的な調節(Stewart et al., Endocrinology 142:98-107 (2001); Johnson et al., Biol. Reprod. 64:1392-1399 (2001); Vallet et al., J. Endocrinol. 130:R1-4 (1991); Spencer et al., Biol. Reprod. 58:1154-1162 (1998); Johnson et al., Biol. Reprod. 62:622-627 (2000); Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998); Spencer et al., Biol. Reprod. 61:464-470 (1999))およびPGF₂の黄体退行パルスを除去するためのエストロゲン及びオキシトシンレセプター発現の抑制からのみ起こると考えられたので、これらの知見は重要である。したがって、本発明の方法およびキットは、家畜の妊娠していない、及び妊娠していることの決定の新規でかつ経済上重要な方法を提供するものである。

【0047】

本願で列挙されたすべての文献及び特許は、参考によって本明細書中に引用される。

【0048】

本明細書に記載される本発明のさらなる修飾、使用、および用途は、当業者には明らかであろう。このような修飾は下記特許請求の範囲に包含されるものである。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBMC(抹消血単核細胞)のMxmRNAのノーザンプロット分析である。レーン1~6は、妊娠した雌ヒツジを表わし、およびレーン8~13は、妊娠していない雌ヒツジを表わす。MxmRNAは、約2.5kbで泳動された。

10

20

30

40

50

【図2】雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBM Cから単離された全細胞RNAのスロット-プロット分析の結果を示すグラフである。Mx mRNAレベルは、D26で交配したが妊娠しなかった雌ヒツジに対して妊娠した雌ヒツジで約4倍以上であった（ $P < 0.01$ ）。PSPB（妊娠に特異的なタンパク質B）レベル（ ）から、妊娠状態が確認され、これは誕生した子羊の数と相間した。（図2のCNTSは、化学発光ノーザンプロットの光子計測数を示す。）

【図3】人工授精してから0~30日での人工授精された妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBM C中のMx mRNAの発現を示す棒グラフである。（図3のCNTSは、化学発光スロット-プロットの光子計測数を示す。）

【図4】人工授精してから15及び18日の妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBM CのMxタンパク質発現のノーザンプロット分析である。

【図2】

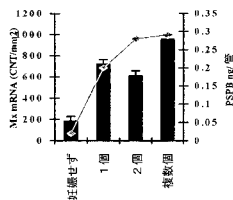


図2

【図3】

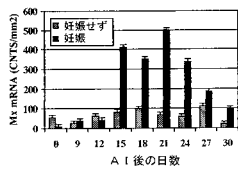


図3

【 図 1 】

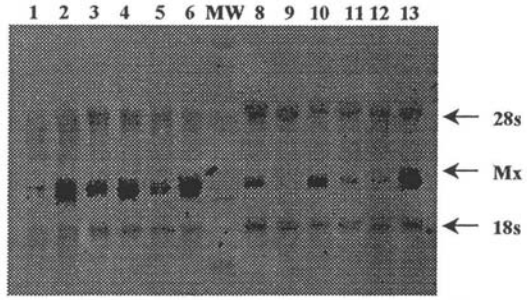


図 1

【 図 4 】

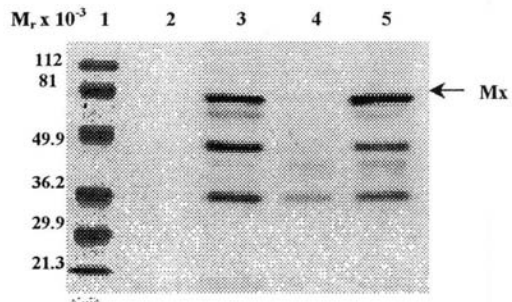


図 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/103352 A1

(51) International Patent Classification: G01N 33/48, 33/53 (BF, BI, CR, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(21) International Application Number: PCT/US02/18479

Declarations under Rule 4.17:

(22) International Filing Date: 10 June 2002 (10.06.2002)

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NZ, NO, NI, NL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MY, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/299,553 19 June 2001 (19.06.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IDAHO RESEARCH FOUNDATION [US/US]; 103 Merrill Hall, University of Idaho, Moscow, ID 83844-3003 (US).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): OTT, Troy, L. [US/US]; 2121 Vandal Drive, Moscow, ID 83843 (US).

(74) Agent: EISENBERG, Howard; Suite 1600, 601 S.W. Second Avenue, Portland, OR 97204-3157 (US).

(81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NZ, NO, NI, NL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NZ, NO, NI, NL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MY, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— of inventorship (Rule 4.17(iii)) for US only
Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/103352 A1

(54) Title: DETERMINATION OF PREGNANCY STATUS

(57) Abstract: A method and kit for determining whether an animal is not pregnant, or is pregnant following a breeding. The level of expression of a pregnancy induced protein is determined in an animal for which pregnancy status information is desired and the level is compared to that of the level in animals that are not pregnant.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

Determination of Pregnancy Status

Field of the Invention

The invention relates to methods for determining the pregnancy status of animals. Particularly, the invention relates to methods for determining the pregnancy status of non-ungulates, ungulates, and ruminant animals.

Background of the Invention

In the rearing of livestock, it is very important to accurately determine the pregnancy status of bred animals. In particular, it is the accurate and early identification of failed pregnancy of an animal that has been bred that is economically important. Presently, once an animal is bred, for example a cow, pregnancy status is determined by such methods as palpation, which does not provide an accurate determination of pregnancy status until after 30 days following breeding. Because cattle have an estrous cycle of about 21 days, this means that with presently available methods at least one opportunity for breeding an animal that fails to conceive, the estrus period immediately following the failed breeding, will be missed.

This has important economic consequences for the cattle breeding industry, especially for the dairy industry. Efficient milk production farming requires that cows be successfully bred to become pregnant 80-100 days after

WO 02/103352

PCT/US02/18479

2

calving. Dairy cows, however, have a low fertility rate with artificial insemination, requiring, on average, 2.5 to 3 inseminations per conception. Therefore, a significant need exists for a method by which a dairy farmer may accurately determine that an animal is not pregnant without missing an opportunity to re-breed the animal at the next estrus period following an unsuccessful breeding.

Sasser, U.S. Patent No. 4,705,748, incorporated herein by reference, discloses a method for determining pregnancy by detecting a protein produced by a conceptus. By this method, cattle were determined to be pregnant as early as day 27 following breeding. Sasser does not disclose the diagnosis of pregnancy prior to the time when a subsequent estrus period will have commenced in non-pregnant cattle and does not disclose an early determination of non-pregnancy.

Maternal recognition of pregnancy in ungulates involves local and systemic gene regulation by the conceptus that results in reduced or altered production of the luteolytic signal, prostaglandin F₂α ((PGF₂α); Yankey et al., Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. Journal of Endocrinology 170, R7-R11 (2001); Bazer et al., Regulation of endometrial responsiveness to estrogen and progesterone by pregnancy recognition signals during the peri-implantation period. In Molecular and Cellular Aspects of Peri-implantation Processes, pp 27-47. Ed S.K. Dey. Springer-Verlag, New York,

WO 02/103352

PCT/US02/18479

3

Inc. (1995)). This is in contrast to pregnancy recognition in primates, which involves a direct luteotrophic effect on the corpus luteum (CL) by conceptus-produced chorionic gonadotropin (Bazer et al. 1995). The signal for maternal recognition in ungulates is the secretion by the conceptus of interferon-tau (IFN τ) during the second and third week of pregnancy (Bazer et al., 1995; Godkin et al., J. Reprod. Fert. 65:141-150(1982)). IFN τ prevents increases in endometrial estrogen and oxytocin receptors, to abrogate oxytocin-induced luteolytic pulses of PGF2 α , and maintains CL function (Spencer et al., Endocrinology 136:4932-4944 (1995)).

IFN τ is a member of the Type I IFN family, which also includes IFN α , β , and ω (Samuel, Virology 183:1-11 (1991)), and, more recently, interferon δ (Lefevre, F., et al., Biochimie 80:779-788 (1998)). IFN τ signaling through the Type I IFN receptor and Janus Kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) signal transduction pathway (Stewart et al., Endocrinology 142:98-107 (2001)) induces a number of genes in the ovine uterus including 2',5' oligoadenylate synthetase (Johnson et al., Biol. Reprod. 64:1392-1399 (2001)), β 2-microglobulin (Vallet et al., J. Endocrinol. 130:R1-4 (1991)), IFN regulatory factor 1 (Spencer et al., 1998), ubiquitin cross-reactive protein (Johnson et al., Biol. Reprod. 62:622-627(2000)), and Mx protein (Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998)). While the functions of many

WO 02/103352

PCT/US02/18479

4

of these proteins in the antiviral response are well characterized, their roles during early pregnancy are not.

Mx proteins are monomeric GTPases, which, depending on the species of animal and type of virus, are potent inhibitors of viral replication (Samuel, *Virology* 183:1-11 (1991)). The sequences of Mx proteins from various species, including sheep, cattle, pigs, and horses, are publicly available through GenBank and have been assigned GenBank Accession numbers X66093, U88329, M65087, and U55216, respectively. Although the antiviral effects of Mx are generally directed against negative-stranded RNA viruses (e.g. orthomyxovirus), their expression is induced in all cells that possess Type I IFN receptors and has been used to distinguish between bacterial and viral infection (Haller et al., *Rev. Sci. Tech.* 17:220-230 (1998)). Recently Mx mRNA and protein were shown to be elevated from epithelium (by day 13) to myometrium (by day 15) within the uterine wall in pregnant ewes and levels remained elevated through day 25 (Ott et al., *Biol. Reprod.* 59:784-794 (1998)). In addition, Mx mRNA levels were elevated in the corpus luteum in response to injections of roIFN γ into the uterine lumen (Spencer et al., *Biol Reprod* 61:464-470 (1999)).

These results indicated that IFN γ was either: 1) acting directly on all uterine cell types (i.e., epithelial, stromal and myometrial) and on the CL; or 2) inducing substances (cytokines) that have paracrine/endocrine effects on uterine

WO 02/103352

PCT/US02/18479

5

cells and other organs including the ovaries; or 3) affecting components of the uterine mucosal and circulating immune systems which then affect the various uterine cells and CL.

It is impractical, however, to measure the level of Mx protein in uterine tissue as a test for evaluating pregnancy status. Besides being an invasive and time and labor intensive process, the disruption of uterine tissues necessary to determine the uterine levels of Mx would tend to have a deleterious effect on a pregnancy.

A significant need exists for a reliable, reproducible, and non-invasive method for determining pregnancy or lack of pregnancy in domestic livestock.

Summary of the Invention

It has been discovered that the expression of the genes encoding for several proteins, herein referred to as "pregnancy-induced proteins", including 2',5' oligoadenylate synthetase, β 2-microglobulin, IFN regulatory factor 1, ubiquitin cross-reactive protein (also known as "interferon stimulated gene factor 17" ("ISG-17")), and Mx protein, increases significantly in certain animals during the first month of pregnancy. It has further been discovered that the increase in the expression of the pregnancy-induced proteins does not occur in animals that are not pregnant.

In many animals, the increase in expression of the pregnancy induced protein is due to the secretion by the

WO 02/103352

PCT/US02/18479

6

embryo of a hormone, Type I interferon, that is the signal from the embryo to the mother of its existence, referred to as the signal for maternal recognition of pregnancy. Different type I interferons, including Interferon alpha (IFN α),
5 Interferon beta (IFN β), Interferon omega (IFN ω), Interferon delta (IFN δ), and Interferon tau (IFN τ) are secreted by the embryos of different species. For example, IFN τ is secreted as a pregnancy recognition hormone in ruminants and IFN δ is secreted in swine. In other species, such as horses and other
10 equidae, although the pregnancy-induced protein Mx protein is detectable in the uterus during early pregnancy, to date the secretion by the equine conceptus of a Type I interferon has not been demonstrated. Rather, in equines and other species whose conceptuses do not produce a Type I IFN, it is possible
15 that the uterus produces Type I interferon in response to the presence of the embryo.

In one embodiment, the invention is a method for determining the pregnancy status of an animal. According to this embodiment of the invention, the level of expression of a
20 pregnancy induced protein during early pregnancy is determined and compared to the level of the expression of that pregnancy induced protein during the same period in a non-pregnant female animal of the same species. Preferably, the pregnancy induced protein that is determined and compared is a Type I
25 interferon-induced protein. Most preferably, the pregnancy induced protein is Mx protein or ISG-17.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

7

As used herein, the term "pregnancy-induced protein" refers to a protein that is expressed by a maternal gene and which expression is induced in response to the presence of a pregnancy. A pregnancy-induced protein is distinct from a protein that is produced by the conceptus, unless such protein is also expressed by a maternal gene and this maternal expression is induced in response to the presence of a pregnancy.

As used herein, the term "early pregnancy" refers to that time during or following the period of pregnancy recognition signaling in which the level of a pregnancy induced protein is elevated in a pregnant animal compared to a non-pregnant animal of the same species. Although animals that are bred unsuccessfully, that is do not become pregnant, may or may not undergo a period of pregnancy recognition signaling, the term "early pregnancy" is used herein with regards to non-pregnant animals to refer to the period of time in which there would be an early pregnancy if the breeding had been successful. Typically, the period of early pregnancy, as used in relation to the method of the invention, ends at about the end of the first month following conception.

As used herein the "period of pregnancy recognition signaling" refers to that time during which the embryo secretes a protein or hormone, the secretion of which causes recognition by the mother of the existence of the embryo. Although animals that are bred unsuccessfully, that is do not

WO 02/103352

PCT/US02/18479

8

become pregnant, may or may not undergo a period of pregnancy recognition signaling, the term is used herein with regards to non-pregnant animals to refer to the period of time in which, had the breeding been successful, biochemical signaling would
5 be occurring between the conceptus and the uterus.

In accordance with the invention, an animal that is pregnant will exhibit a markedly higher level of expression of one or more pregnancy-induced proteins, such as Mx protein or ISG-17, during early pregnancy, such as during the period of
10 pregnancy recognition signaling, than will a non-pregnant animal of the same species. A non-pregnant animal, whether or not the animal has been bred will exhibit about the baseline level of the pregnancy-induced protein expression, including Mx protein, during this period.

In another embodiment, the invention is a kit for
15 determining the reproductive status of an animal of a species in which the conceptus secretes a protein or hormone as a signal for maternal recognition of pregnancy. According to this embodiment of the invention, the kit includes a
20 receptacle for holding a test sample, one or more reagents which when combined with the test sample enable an operator to visually determine the level of one or more pregnancy-induced protein, such as Mx protein or ISG-17, in the test sample, and instructions for determining the level of the protein in the
25 sample. Preferably the kit further contains instructions that

WO 02/103352

PCT/US02/18479

9

enable the operator to determine the pregnancy status of the animal based on the determined level of protein in the sample.

The invention is further illustrated below with reference to Mx protein. One skilled in the art will understand that
5 the disclosure below is applicable to other pregnancy-induced proteins, such as other Type I interferon-induced proteins such as IFN γ induced proteins, including 2',5' oligoadenylate synthetase, β 2-microglobulin, IFN regulatory factor 1, and ubiquitin cross-reactive protein, as well as to the
10 illustrated Mx protein. Therefore, in the following disclosure, at the mention of the term "Mx protein", any other pregnancy-induced protein may be substituted.

Brief Description of the Figures

Figure 1 is a Northern Blot analysis of Mx mRNA from PBMC
15 (peripheral blood mononuclear cells) at day 26 following artificial insemination in ewes. Lanes 1-6 represent pregnant ewes and lanes 8-13 represent non-pregnant ewes. Mx mRNA migrated at ~ 2.5 kb.

Figure 2 is a graph showing the results of a slot blot
20 analysis of total cellular RNA isolated from PBMC at day 26 following artificial insemination in ewes. Mx mRNA levels were about 4 fold greater in pregnant versus bred, non-pregnant ewes at D 26 ($P < 0.01$). PSPB (pregnancy-specific protein B) levels (◆) confirmed pregnancy status and were

WO 02/103352

PCT/US02/18479

10

correlated with number of lambs born. (CNTS in Fig. 2 refers to photon counts on a chemiluminescent Northern blot.)

Figure 3 is a bar graph showing the expression of Mx mRNA in PBMC from artificially inseminated pregnant and non-pregnant ewes from Day 0 to Day 30 following the artificial insemination. (CNTS in Fig. 3 refers to photon counts on a chemiluminescent slot blot.)

Figure 4 is a Western Blot analysis of Mx protein expression from PBMC in pregnant and non-pregnant ewes 15 and 18 days following artificial insemination.

Detailed Description of the Invention

The present invention is applicable to any animal species that secretes increased levels of one or more pregnancy induced proteins during early pregnancy. Preferably, the animal species is one that secretes a Type I interferon as a signal for maternal recognition of pregnancy. Most preferably, the animal species is one that secretes the hormone IFN τ as a signal for maternal recognition of pregnancy. In these animals, the increased levels of Type I interferon, such as IFN τ , induces an increased expression of Mx protein during the period of pregnancy recognition signaling. According to the invention, the lack of an increase in expression of a pregnancy-induced protein, such as Mx protein, in a suitable animal during early pregnancy, preferably the period of time which would encompass the period

WO 02/103352

PCT/US02/18479

11

of pregnancy recognition signaling following a breeding, is a positive indication that the animal is not pregnant.

Conversely, a negative result, that is the presence of an increase in expression of the protein during this period is an indication that the animal is pregnant.

In this application, the lack of an increased expression of the pregnancy induced protein, such as Mx protein, is referred to as a positive result whereas the presence of an increased expression of the protein is referred to as a negative result. This terminology, which might at first appear to be contrary to the usual usage of the terms "positive" and "negative" result, is utilized herein because it is the finding of non-pregnancy, rather than of pregnancy, which is of most concern to a farmer or rancher or other person engaged in animal husbandry. If an animal is determined to be pregnant, no additional work is expended to ensure that she is indeed pregnant, outside of watching her to look for signs that the pregnancy has been terminated. In contrast, if an animal is determined to be not pregnant, then she must be further evaluated for the onset of her next estrus and will be bred again. Therefore, it is the finding of non-pregnancy that provides the impetus for additional labor to be expended upon the animal to ensure that she does indeed become pregnant.

As stated above, the invention is applicable to any female animal belonging to a species that produces increased

WO 02/103352

PCT/US02/18479

12

levels of a pregnancy-induced protein during early pregnancy, such as an animal of a species in which a Type I interferon such as IFN γ is the sole signal or one of more than one signal for maternal recognition of pregnancy. Animals suitable for the method of the invention include ungulates and non-hoofed ruminants. The ungulates may be ruminants, such as cattle, sheep, goats, yak, water buffalo, and bison. Included among the ungulate ruminants suitable for the invention are also non-domesticated ungulates such as antelopes, gazelles, elk, reindeer, moose, bighorn sheep, giraffes, and other members of the cattle, sheep, and goat families. Ruminant non-ungulates suitable for the method of the invention include bactrian and dromedary camels and other camellids, such as llamas, alpacas, and vicunas. Ungulate non-ruminants suitable for the invention include domesticated and non-domesticated swine and horses. Animals suitable for the method of the invention include animals other than ungulates and non-hoofed ruminants. For example, it is conceived that primates such as humans, as well as dogs and cats, are suitable for the method of the invention.

In accordance with the method of the invention, during an appropriate time period following breeding, an animal is tested for the presence, or more precisely for the lack of presence, of an increased expression of a pregnancy-induced protein, exemplified hereafter as Mx protein. The test may be

WO 02/103352

PCT/US02/18479

13

performed utilizing any cell in which Mx protein is expressed or in any bodily fluid in which Mx protein is found.

When determining whether an animal has or does not have an increase in expression of Mx protein, a comparison is made
5 to the level of expression in animals that are known to be not pregnant. The comparison may be made, for example, by running a side-by-side comparison of a test sample from an animal that has been bred and which the pregnancy status is uncertain. Alternatively and preferably, the comparison is made by
10 testing a sample from an animal that has been bred and which the pregnancy status is uncertain and comparing the level of Mx protein in the sample to the level of Mx protein known to be present in non-pregnant animals, that is using a historical control.

15 The invention is illustrated herein with reference to determining the increased expression of Mx protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). However, any cell in which Mx protein is expressed, including other nucleated
cells present in the bloodstream, may be utilized in place of
20 PBMC. Likewise, it is conceived that increased Mx expression in accordance with the invention may be determined by analysis of fluids, such as milk, saliva, urine, or nasal, ocular, or vaginal secretions, or whole blood, plasma, or serum.

Although the period of maternal recognition in most
25 species occurs about the same time, for example at days 12 to 14 following breeding in ewes and days 15 to 18 in cows, the

WO 02/103352

PCT/US02/18479

14

period of embryonic signaling that results in maternal recognition of pregnancy varies somewhat amongst different species. Accordingly, the actual dates following breeding on which the method of the invention may be effectively practiced will vary. For example, the period of maternal recognition of pregnancy signaling in domesticated sheep typically begins about day 11 following breeding and continues to about day 21. In cattle, this period typically begins about day 13 and continues to about day 35.

When comparing the level of Mx protein expression in a test sample to the baseline, (non-pregnant) level of Mx protein expression, typically a doubling or higher in Mx protein expression over the baseline is a negative test, that is the animal is not determined to be not pregnant. Usually, at peak levels of Mx protein expression during the period of pregnancy recognition signaling, a pregnant animal will have levels of Mx protein expression that are up to four or five times, or higher, that of baseline.

In accordance with the invention, the method may be practiced at any time commencing with the onset of the period of signaling until the time that the level of the pregnancy induced protein is no longer elevated in pregnant animals compared to non-pregnant animals of the same species. It is during this time that pregnant animals have an increased expression of Mx protein compared to non-pregnant animals. Thus, in sheep and cattle, a preferred time period for

WO 02/103352

PCT/US02/18479

15

comparing the level of Mx protein expression to determine pregnancy status is between 12 and 30 days following breeding. A more preferred time period is between days 12 and 21 following breeding. A most preferred time period between days 5 15 and 21, and a most preferred time is on day 18 in cattle and day 15 in sheep.

The level of Mx protein expression may be determined by any method that permits this determination to be made. Suitable methods include detecting the Mx protein itself, such 10 as by ELISA test, an assay based on Mx protein function, or a Western blot. Suitable methods also include detecting increased levels of Mx mRNA, such as by Northern blot, slot blot, or PCR. In a preferred embodiment, the level of Mx protein expression is determined by detecting the level of Mx 15 protein present in a sample by a colorimetric assay based, for example, on the binding of an antibody to the Mx protein, similarly to the methods that are used in human pregnancy diagnostic kits.

The method of the invention is an accurate, reproducible 20 test that predictably determines that an animal is not pregnant, and may likewise be used to determine that an animal is pregnant. With regards to Mx protein in particular, but not necessarily the other pregnancy induced proteins, the only source of false negative results that would erroneously 25 indicate that the animal is pregnant, that is an increased

WO 02/103352

PCT/US02/18479

16

level of Mx protein expression, is if the animal is suffering from a severe viral infection.

The kit of the invention is preferably based on an enzyme linked assay (ELISA), such as what is known as an "immunometric" or "sandwich" assay. Such an assay involves "sandwiching" a ligand (such as an antigen) with two or more receptor molecules (such as antibodies) which complex with the ligand in a non-interfering manner and at different epitopic sites. Examples of such assays are described in David et al., U.S. Pat. No. 4,486,530. Alternatively, the kit may be based on chemiluminescence assays, enhanced luminescence assays, and radioimmunoassays. In a preferred embodiment, the kit includes a package, which package houses a test surface, such as a slide or multiple test wells, that is bound to an antibody that will bind to an epitope of the protein of interest, such as Mx protein, a container housing a second antibody that will bind to a second epitope of the protein, which second antibody is labeled, a container housing a standard sample having a baseline concentration of the protein, a reagent that when contacted to the labeled second antibody permits the relative amount of the protein present to be visualized, and instructions for use of the kit to determine whether a test sample contains an amount of Mx protein indicative of pregnancy or non-pregnancy status.

The kit of the invention for determining pregnancy status by determining the relative level of a pregnancy induced

WO 02/103352

PCT/US02/18479

17

protein, such as Mx protein, in a test sample compared to a control may be formulated in many different ways, which ways will be apparent to those skilled in the art upon reading the description herein. It is intended that these various
5 formulations of the kit of the invention are included in the invention.

The invention is further described in the following illustrative, non-limiting, examples. The examples describe the method of the invention with reference to Mx protein.
10 However, the method of the invention is applicable to other pregnancy induced proteins.

Example 1 Animal Models

Sixty (60) mature, white-faced, ewes from the U.S. Sheep Experiment Station (USSES, Dubois ID) were synchronized and
15 bred either by transcervical or laparoscopic artificial insemination ("AI"). Laparoscopic AI was performed according the procedure disclosed in Stellflug et al., J. Anim. Sci. 79:568-573 (2001). The day of artificial insemination was designated Day 0 (D0). At 26 days after AI (D26), blood (10
20 ml) was collected by jugular venipuncture into EDTA-containing vacutainer tubes (Sherwood Medical, St. Louis MO). PBMC were isolated as described below in Example 2. Pregnancy was determined by assaying serum for pregnancy-specific protein B (PSPB; Biotracking Inc, Moscow ID) and lambing dates and
25 number of lambs born were recorded.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

18

Example 2. PBMC isolation

Blood was kept on ice until processed. Samples were centrifuged at 300 x g for 20 min at 4 C. The buffy coat was removed and resuspended in 0.87% Tris-NH₄CL lysis buffer at a 1 to 5 ratio. Samples were incubated for 5 min at 37°C and centrifuged at 300 x g for 10 min. The supernatant was removed and pellets were washed with 10 ml 1X PBS and centrifuged for 10 min at 300 x g. After removal of supernatant, cell pellets were either frozen at -80°C for protein extraction, or lysed with 2 ml TRIZOL (Life Technologies, Grand Island NY) and stored at -80°C for RNA extraction.

Example 3. RNA extraction, Northern and slot-blot analysis.

Total cellular RNA was extracted using TRIZOL according to manufacture's instructions. RNA was quantified by A260:280 ratio. To establish size and number of Mx transcripts in PBMC, RNA (5 µg) was electrophoresed in a 1% agarose/0.615 M formaldehyde gel and transferred to a nylon membrane (Nytran, Schleicher & Schuell, Keene NH) by capillary blotting. For quantification of Mx mRNA levels in PBMC, RNA (5 µg) was transferred to a nylon membrane by vacuum filtration (Minifold II, Schleicher & Schuell, Keene NH). Blots were probed with a biotin-labeled ovine Mx anti-sense cRNA probe (Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998)) using the North2South

WO 02/103352

PCT/US02/18479

19

Hybridization kit (Pierce, Rockford IL) and chemiluminescent signal was quantified using a Bio-Rad Fluor-S MultiImager system and Quantity One software (Bio-Rad, Hercules CA). Slot-blot analysis was performed and re-probed with an ovine 18S rRNA cRNA probe to correct for variations in RNA loading.

Northern blot analysis, as shown in Fig. 1, detected a single, approximately 2.5 kD, band in PBMC isolated from pregnant and bred, non-pregnant ewes, which agrees with the known size of the ovine uterine Mx cDNA (Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998)).

Slot blot analysis, as shown in Fig. 2, of total cellular RNA isolated from PBMC collected at D26 post-AI showed a four-fold increase in Mx mRNA levels in pregnant versus bred, non-pregnant (n=26) ewes (P<0.01). In addition, ewes carrying multiples (triplets or quads; n=10) had higher Mx mRNA levels than those carrying singles (n=10) or twins (n=9; P<0.05). Results from the PSPB (pregnancy-specific protein B) assay confirmed pregnancy status and, as reported previously, levels of PSPB were correlated with number of lambs born (Willard et al., J. Anim. Sci. 73:960-966 (1995)).

Example 4. Temporal expression of Mx protein mRNA during early pregnancy in sheep

A second study examined the temporal expression of Mx mRNA during early pregnancy in sheep, as shown in Fig. 3.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

20

Thirty four (34) mature Suffolk ewes were synchronized and bred by laparoscopic AI. Blood (20 ml) was collected by jugular venipuncture at D0, and every three days from D9 to D30, and PBMC were isolated. Pregnancy was confirmed by real-time ultrasonography and PSPB assay at D30. Results shown in Fig. 3 are a representative subset of all ewes and depict results from four pregnant and four bred, non-pregnant ewes during the first 30 days following insemination. This allowed analyzing all replicates on a single blot to eliminate problems associated with signal intensity between blots. Results showed Mx mRNA levels increased in pregnant ewes beginning at D15 ($P < 0.01$). Levels peaked at D21 and gradually declined thereafter. At D30, Mx levels in pregnant ewes remained elevated two-fold compared to bred, non-pregnant ewes ($P < 0.01$).

Example 5. Protein isolation and Western blot analysis.

Total cellular protein was extracted using M-PER reagent (Pierce, Rockford IL), according to manufacturers instructions. Protein concentration of samples was quantified by BCA assay (Pierce, Rockford IL) with bovine serum albumen as the standard. Proteins (8 $\mu\text{g}/\text{sample}$) from PBMC isolated from pregnant and bred, non-pregnant ewes at D15 and D18 were separated by 12% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (BA83, Schleicher & Schuell, Keene NH). Following blocking of non-specific binding sites

WO 02/103352

PCT/US02/18479

21

in 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline and Tween 20 (TBST) for 2 hours at 25°C, membranes were incubated with a 1:1000 dilution of a polyclonal rabbit ovine Mx peptide antiserum (#90618-2; 0.7µg/ml) at 4°C overnight. Goat anti-rabbit IgG (0.8 µg/ml) labeled with horseradish peroxidase was used at a 1:200,000 dilution as secondary antibody. Chemiluminescent signal was developed using the West Fento Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford IL) and quantified using the Fluor-S MultiImager system and Quantity One software.

As shown in Fig. 4, Mx protein (~75 kDa) was not detected in either D15 or D18 open (non-pregnant) ewes, but was strongly up-regulated in PBMC from pregnant ewes on both days. Two additional bands (~48 and 36 kDa) were detected in PBMC from pregnant ewes.

Example 6. Analysis.

Chemiluminescent signal was analyzed using GLM procedures of SAS (Version 8.1, SAS Inc, Gary NC). The model included, where appropriate, status (pregnant versus bred, non-pregnant), ewe nested within status, day (0, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, and 30) and appropriate interactions. Error terms in the F test were according to the expectation of mean squares for error. Signal for 18s rRNA was run as a covariate in the model to correct for variations in loading. Results

WO 02/103352

PCT/US02/18479

22

are reported as adjusted Least Squares Means (LSM) and pooled standard errors.

Example 7. Cattle

Thirty three dairy cows were bred by artificial
5 insemination and their levels of Mx mRNA were determined by
the method described above in Examples 2 and 3. On day 15,
levels of Mx mRNA were found to be about the same in cows that
were later determined to be pregnant and in cows that were
later determined not to be pregnant. On day 18, levels of Mx
10 mRNA were found to be have increased markedly in cows later
determined to be pregnant to about three times the level found
in cows later determined not to be pregnant.

The results demonstrate a rapid and sustained activation
of Mx gene expression in response to pregnancy recognition
15 signaling, and indicate that, in addition to local effects of
IFN γ , there is rapid systemic response in sheep and cattle.
In addition, Mx expression did not increase in PBMC when
pregnancy was not established (bred, non-pregnant animals).
These findings are significant because pregnancy recognition
20 signaling by IFN γ was heretofore considered to result solely
from local regulation of endometrial gene expression (Stewart
et al., *Endocrinology* 142:98-107 (2001); Johnson et al., *Biol.*
Reprod. 64:1392-1399 (2001); Vallet et al., *J. Endocrinol.*
130:R1-4 (1991); Spencer et al., *Biol. Reprod.* 58:1154-1162

WO 02/103352

PCT/US02/18479

23

(1998); Johnson et al., Biol. Reprod. 62:622-627 (2000);
Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al.,
Biol. Reprod. 59:784-794 (1998); Spencer et al., Biol. Reprod.
61:464-470 (1999)) and suppression of estrogen and oxytocin
5 receptor expression to abrogate luteolytic pulses of PGF_{2α}.
The methods and kits of the invention therefore provide new
and economically important methods of non-pregnancy, and
pregnancy, determinations in livestock.

All articles and patents cited in this application are
10 incorporated herein by reference.

Further modifications, uses, and applications of the
invention described herein will be apparent to those skilled
in the art. It is intended that such modifications be
encompassed in the following claims.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

24

Claims:

1. A method for determining pregnancy status in an animal comprising determining the level of expression of a pregnancy-induced protein in the animal during the period of
5 early pregnancy following breeding of the animal and comparing the level of expression of said protein in the animal to that of a non-pregnant animal of the same species.
2. The method of claim 1 wherein the pregnancy induced protein is a Type I Interferon-induced protein.
- 10 3. The method of claim 1 wherein the Type I Interferon-induced protein is an Interferon-tau (IFN τ)-induced protein.
4. The method of claim 1 wherein the animal is a ruminant.
5. The method of claim 4 wherein the non-ungulate
15 ruminant is selected from the group consisting of bactrian camel, dromedary camel, llama, alpaca, and vicuna.
6. The method of claim 4 wherein the animal is an ungulate.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

25

7. The method of claim 6 wherein the animal is selected from the group consisting of cattle, sheep, goats, yaks, water buffalos, bison, antelopes, and deer.

8. The method of claim 7 wherein the animal is a ewe or a cow.

9. The method of claim 1 wherein the animal is an ungulate.

10. The method of claim 9 wherein the animal is a horse or a swine.

11. The method of claim 1 wherein the protein is selected from the group consisting of 2',5' oligoadenylate synthetase, β 2-microglobulin, IFN regulatory factor 1, ubiquitin cross-reactive protein, and Mx protein.

12. The method of claim 11 wherein the protein is Mx protein.

13. The method of claim 1 wherein the level of expression of the protein is determined by determining the level of mRNA coding for the protein.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

26

14. The method of claim 13 wherein the determination of mRNA is by Northern blot analysis, slot-blot analysis, or polymerase chain reaction.

15. The method of claim 1 wherein the level of expression of the protein is determined by determining the level of the protein.

16. The method of claim 15 wherein the determination of the level of production of the protein is by evaluating the binding of an antibody to the protein or by an assay based on a function of the protein.

17. The method of claim 15 wherein the level of production of the protein is detected by a colorimetric assay.

18. The method of claim 1 wherein the level of expression of the protein is determined by determining the expression of the protein in a cell of the animal.

19. The method of claim 18 wherein the cell is a nucleated blood cell.

20. The method of claim 19 wherein the cell is a peripheral blood mononuclear cell.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

27

21. The method of claim 1 wherein the level of expression of the protein is determined by analyzing a bodily fluid of the animal.

22. The method of claim 21 wherein the bodily fluid is selected from the group consisting of milk, saliva, urine, or nasal, ocular, or vaginal secretions.

23. The method of claim 21 wherein the bodily fluid is blood, plasma, or serum.

24. The method of claim 1 wherein the animal is determined to be not pregnant if the level of expression of the protein in the animal during the period of early pregnancy is not elevated compared to the level of expression of the protein in a non-pregnant animal of the same species.

25. The method of claim 1 wherein the animal is determined to be pregnant if the level of expression of protein in the animal during the period of early pregnancy is two times or more the level of expression of the protein in a non-pregnant animal of the same species.

26. The method of claim 25 wherein the animal is determined to be pregnant if the level of expression of the

WO 02/103352

PCT/US02/18479

28

protein in the animal during the period of early pregnancy is four times or more the level of expression of the protein in a non-pregnant animal of the same species.

27. The method of claim 1 wherein the comparison is by
5 side-by-side comparison of the level of expression of the protein in the animal and the level of expression in an animal known to be pregnant or not pregnant.

28. The method of claim 1 wherein the comparing is by using an historical control.

10 29. The method of claim 1 which is performed during the period of pregnancy recognition signaling.

30. The method of claim 1 which is performed during the period between 12 and 30 days after breeding of the animal.

15 31. The method of claim 30 which is performed during the period between 12 and 21 days after breeding of the animal.

32. The method of claim 31 which is performed during the period between 18 and 21 days after breeding of the animal.

33. A kit for determining the pregnancy status of an animal, comprising a container for holding a test sample, one

WO 02/103352

PCT/US02/18479

29

or more reagents which, when combined with the test sample in the container, enable an operator to visually determine the level of a pregnancy-induced protein in the test sample, and instructions for determining the pregnancy status of the animal based upon the level of the protein in the sample.

34. The kit of claim 33 wherein the pregnancy induced protein is an interferon-tau (IFN τ) induced protein.

35. The kit of claim 34 wherein the IFN τ induced protein is Mx protein.

36. The kit of claim 34 wherein the IFN τ induced protein is ISG-17.

37. A kit for determining the pregnancy status of an animal, comprising a test surface that is bound to an antibody that will bind to an epitope of a pregnancy-induced protein, a container housing a second labeled antibody that will bind to a second epitope of the protein, a container housing a standard sample having a baseline concentration of the protein, a reagent that when contacted to the labeled second antibody permits the relative amount of the protein present to be visualized, and instructions for use of the kit to determine whether a test sample contains an amount of the protein indicative of pregnancy or non-pregnancy status.

WO 02/103352

PCT/US02/18479

30

38. The kit of claim 37 wherein the pregnancy induced protein is an IFN γ induced protein.

39. The kit of claim 38 wherein the IFN γ induced protein is Mx protein.

5 40. The kit of claim 38 wherein the IFN γ induced protein is ISG-17.

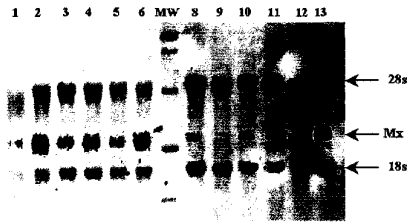


Figure 1

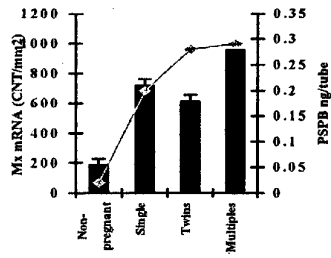


Figure 2

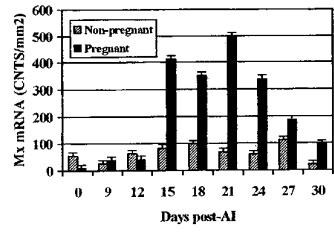


Figure 3

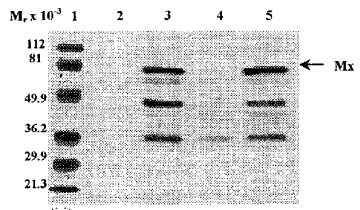


Figure 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/18479		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : G01N 33/48, 33/53 US CL : 436/65, 510 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/65, 510				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	HANSEN et al, Transient Ubiquitin Cross-Reactive Protein Gene Expression in the Bovine Endometrium, Endocrinology, Vol. 138, No. 11, 1997. see entire document.	1, 2, 4, 6-9 and 11		
A	JOHNSON et al, Pregnancy and Interferon-Tau Induce Conjugation of Bovine Ubiquitin Cross-Reactive Protein to Cytosolic Uterine Proteins, Biology of Reproduction, Vol. 58, 898-904 (1998), see entire document.	1-40		
A	US 4,705,748 (SASSER et al) 10 November 1987 (10.11.1987), see entire document.	1-40		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may have an effect on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may have an effect on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may have an effect on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 21 August 2002 (21.08.2002)		Date of mailing of the international search report 19 SEP 2002		
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer: <i>Valerie Bell-Harris for</i> Long LC Telephone No. (703) 308-0196		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/566 G 0 1 N 33/53 M
 G 0 1 N 33/566

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114649
 弁理士 宇谷 勝幸

(74)代理人 100124615
 弁理士 藤井 敏史

(72)発明者 オット, トロイ, エル.
 アメリカ合衆国, アイダホ州 8 3 8 4 3, モスクワ, ヴァンダル ドライブ 2 1 2 1
 Fターム(参考) 2G045 AA29 BB41 BB46 BB51 CA25 CA26 DA14 DA36 FB01 FB02
 FB03 FB05 GC15
 4B063 QA01 QA19 QA20 QQ02 QQ03 QQ08 QQ53 QQ79 QR08 QR32
 QR35 QR40 QR42 QR48 QR56 QR62 QS16 QS33 QS34 QS36
 QX01 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004534224A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003505617	申请日	2002-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	爱达荷研究基金会		
申请(专利权)人(译)	爱达荷研究基金会		
[标]发明人	オットロイエル		
发明人	オット, トロイ, エル.		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6876 C12Q2600/158 G01N33/689 G01N2333/4715 G01N2800/368		
FI分类号	G01N33/68 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/52.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB41 2G045/BB46 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	野上淳 宇谷 胜幸 藤井敏文		
优先权	60/299553 2001-06-19 US		
其他公开文献	JP2004534224A JP4216184B2		

摘要(译)

用于确定动物在交配后是否未怀孕或怀孕的方法和试剂盒。在需要怀孕状态信息的动物中测量妊娠诱导蛋白的表达水平，并将其水平与非怀孕动物的水平进行比较。