

(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2017-535794

(P2017-535794A)

(43) 公表日 平成29年11月30日(2017.11.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	2 G 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/48 M	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/483 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 132 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-543287 (P2017-543287)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月3日(2015.11.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年6月21日(2017.6.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/058877
 (87) 国際公開番号 W02016/073513
 (87) 国際公開日 平成28年5月12日(2016.5.12)
 (31) 優先権主張番号 62/074,384
 (32) 優先日 平成26年11月3日(2014.11.3)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 62/113,298
 (32) 優先日 平成27年2月6日(2015.2.6)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 62/211,660
 (32) 優先日 平成27年8月28日(2015.8.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 504006087
 バイオインセプト、エルエルシー
 アメリカ合衆国、08003-3157
 ニュージャージー州、チェリーヒル、ラークレーン 1697
 (74) 代理人 110002572
 特許業務法人平木国際特許事務所
 (72) 発明者 バルネア、エイタン アール、
 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
 Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36 FA29 FA37
 4B063 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QS33
 QS36 QX02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫調節不全についてのマーカーとしてのPIF結合

(57) 【要約】

複数の実施形態は、免疫調節不全についてのマーカーとして対象の循環中の免疫細胞へ結合する着床前因子(P I F)の検査方法に関する。いくつかの実施形態は、再発性妊娠中断(R P L)を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルの検出方法、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫機能障害のレベルの検出方法、ならびに有効量のPIFまたはその類似体を投与することを含む免疫機能障害のレベルの検出方法及び循環免疫細胞へのその結合の検査方法に関する。当該方法内で、対象の循環免疫細胞へのPIFの結合における約20パーセントの変化が、免疫機能障害のレベルを示す。

【選択図】 図10B

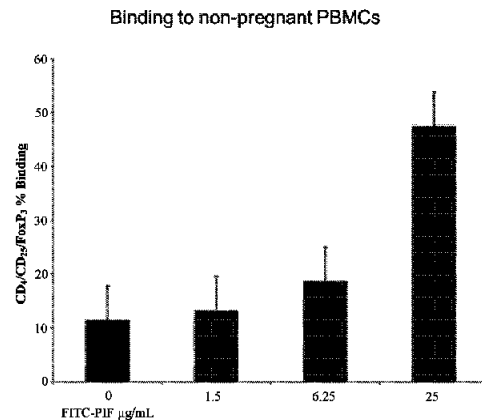


FIG. 10B

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫調節不全による再発性妊娠中断 (R P L) に罹患している雌性対象の識別方法であって、

有効量の着床前因子 (P I F) またはその類似体を、 1 つまたは複数の免疫細胞を含む前記対象由来の試料へ曝露すること、及び

前記対象の 1 つまたは複数の免疫細胞と P I F またはその類似体との結合事象を検査し、ここで、基準と比較した前記 1 つまたは複数の免疫細胞に対する P I F の結合の有意な変化が、前記 R P L が免疫調節不全によることを示すことを含む、前記方法。

10

【請求項 2】

基準と比較した前記 1 つまたは複数の免疫細胞に対する P I F から前記 1 つまたは複数のその類似体への結合のわずかな変化は、前記 R P L が免疫調節不全によるものではないことを示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記有効量の P I F は、約 3 0 0 ~ 約 5 0 0 n M の P I F である、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記試料を P I F またはその類似体へ曝露する前に、試料を前記対象から単離することをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記 P I F またはその類似体を 1 つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、P I F またはその類似体を固体支持体へ固定化することをさらに含み、前記固体支持体は、チップ、カラム、プレートまたは多重ウエルプレートから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記固体支持体は、カラムである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

結合事象を検査するステップは、P I F またはその類似体と 1 つまたは複数の免疫細胞との会合を観察、定量化及び / または検出することを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

結合事象を検査するステップは、前記 1 つまたは複数の免疫細胞による 1 つまたは複数のサイトカインの発現量を観察、定量化及び / または検出することを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

結合事象を検査するステップは、P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数を観察、定量化及び / または検出することを含み、ここで、前記 1 つまたは複数の免疫細胞は、C D 3 + 細胞、C D 4 + 細胞、C D 1 4 + 細胞、C D 4 5 + 細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうちの 1 つまたは組み合わせを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

結合事象を検査するステップは、前記免疫細胞の数をフローサイトメトリーによって定量化することを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 P I F またはその類似体を前記 1 つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、前記 P I F またはその類似体はカラムへ固定化され、ここで、前記 P I F またはその類似体を前記 1 つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、1 つまたは複数の免疫細胞の試料を、固定化した P I F またはその類似体を含む前記カラムへ曝露することを含み、かつここで、結合事象を検査する前記ステップは、フローサイトメトリーによって 1 つまたは複数の免疫細胞を定量化することを含み、ここで、前記 1 つまたは複数の免疫細胞は、C D 3

50

+ 細胞、CD4 + 細胞、CD14 + 細胞、CD45 + 細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうちの1つまたは組み合わせを含む、請求項9～10のステップのいずれかに記載の方法。

【請求項12】

前記循環免疫細胞は、樹状細胞である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記有意な変化は、CD14 + 細胞及び/または樹状細胞に対する前記PIFの結合の減少を定量化することを含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記有意な変化は、CD4 + 細胞、CD8 + 細胞、及び/またはナチュラルキラー(NK)細胞に対する前記PIFの結合の増加を定量化することを含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項15】

前記PIFまたはその類似体は、1つ以上のフルオレセインイソチオシアナート(FITC)標識を含み、かつ、結合事象は、蛍光のレベルを定量化及び/または検出することによって測定する、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

PIFまたはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前記ステップは、前記PIFまたはその類似体を前記対象へ投与することを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記有意な変化は、樹状細胞に対するPIFまたはその類似体の結合の減少、CD14 + 細胞に対するPIFまたはその類似体の結合の増加、及びCD4 + 細胞に対するPIFの結合の増加のうちの1つまたは組み合わせを含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項18】

免疫調節不全による再発性妊娠中断(RPL)に罹患している可能性が高い雌性対象の識別方法であって、

有効量の着床前因子(PIF)またはその類似体を、1つまたは複数の免疫細胞を含む前記対象に由来する試料へ曝露すること、及び

前記対象の前記1つまたは複数の免疫細胞とPIFまたはその類似体との結合事象を検査し、ここで、基準と比較した前記1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFの結合の有意な変化は、前記雌性対象が免疫調節不全によるRPLに罹患している可能性が高いことを示すこと

30

を含む、前記方法。

【請求項19】

基準と比較した前記1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFから前記1つまたは複数のその類似体への結合のわずかな変化は、前記雌性対象が、免疫調節不全によるRPLに罹患している可能性が高くないことを示す、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記有効量のPIFは、約300～約500nMのPIFである、請求項18または19のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項21】

試料をPIFまたはその類似体へ曝露する前に、前記試料を前記対象から単離することをさらに含む、請求項18～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記PIFまたはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、PIFまたはその類似体を固体支持体へ固定化することをさらに含み、ここで、前記固体支持体は、チップ、カラム、プレートまたは多重ウエルプレートから選択される、請求項18～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

50

前記固体支持体は、カラムである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

結合事象を検査する前記ステップは、P I F またはその類似体と 1 つまたは複数の免疫細胞との会合を観察、定量化及び / または検出することを含む、請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

結合事象を検査する前記ステップは、1 つまたは複数の免疫細胞による 1 つまたは複数のサイトカインの発現量を観察、定量化及び / または検出することを含む、請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

結合事象を検査する前記ステップは、P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数を観察、定量化及び / または検出することを含み、ここで、前記 1 つまたは複数の免疫細胞は、C D 3 + 細胞、C D 4 + 細胞、C D 1 4 + 細胞、C D 4 5 + 細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうち 1 つまたは組み合わせを含む、請求項 18 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

結合事象を検査する前記ステップは、フローサイトメトリーによって前記免疫細胞の数を定量化することを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 P I F またはその類似体は、前記 P I F またはその類似体を前記 1 つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、カラムへ固定化し、ここで、前記 P I F またはその類似体を前記 1 つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前記ステップは、1 つまたは複数の免疫細胞の試料を、固定化した P I F またはその類似体を含む前記カラムへ曝露することを含み、かつ、結合事象を検査する前記ステップは、フローサイトメトリーによって 1 つまたは複数の免疫細胞の数を定量化することを含み、ここで、前記 1 つまたは複数の免疫細胞は、C D 3 + 細胞、C D 4 + 細胞、C D 1 4 + 細胞、C D 4 5 + 細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうち 1 つまたは組み合わせを含む、請求項 26 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記循環免疫細胞は、樹状細胞である、請求項 18 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記有意な変化は、C D 1 4 + 細胞及び / または樹状細胞に対する前記 P I F の結合の減少を定量化することを含む、請求項 18 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記有意な変化は、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及び / またはナチュラルキラー (N K) 細胞に対する前記 P I F の結合の増加を定量化することを含む、請求項 18 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記 P I F またはその類似体は、1 つ以上のフルオレセインイソチオシアナート (F I T C) 標識を含み、かつ結合事象は、蛍光のレベルを定量化及び / または検出することによって測定する、請求項 18 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

P I F またはその類似体を 1 つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前記ステップは、前記 P I F またはその類似体を前記対象へ投与することを含む、請求項 18 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記有意な変化は、樹状細胞に対する P I F またはその類似体の結合の減少、C D 1 4 + 細胞に対する P I F またはその類似体の結合の増加、及び C D 4 + 細胞に対する P I F の結合の増加のうち 1 つまたは組み合わせを含む、請求項 18 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

子宮内膜症に罹患している雌性対象の識別方法であって、有効量の着床前因子（PIF）またはその類似体を、1つまたは複数の免疫細胞を含む、前記対象由来の試料へ曝露すること、及び前記対象の前記1つまたは複数の免疫細胞とPIFまたはその類似体との結合事象を検査し、ここで、基準と比較した前記1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFの結合の有意な変化は、前記雌性対象が子宮内膜症に罹患していることを示すことを含む、前記方法。

【請求項 36】

基準と比較した前記1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFから前記1つまたは複数のその類似体への結合のわずかな変化は、前記雌性対象が子宮内膜症に罹患していないことを示す、請求項35に記載の方法。

10

【請求項 37】

前記有効量のPIFは、約300～約500nMのPIFである、請求項35または36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

試料をPIFまたはその類似体へ曝露する前に、前記試料を前記対象から単離することをさらに含む、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

PIFまたはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、前記PIFまたはその類似体を固体支持体へ固定化することをさらに含み、前記固体支持体は、チップ、カラム、プレートまたは多重ウエルプレートから選択される、請求項35～38のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 40】

前記固体支持体は、カラムである、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

結合事象を検査する前記ステップは、PIFまたはその類似体と1つまたは複数の免疫細胞との会合を観察、定量化及び/または検出することを含む、請求項35～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

結合事象を検査する前記ステップは、前記1つまたは複数の免疫細胞による1つまたは複数のサイトカインの発現量を観察、定量化及び/または検出することを含む、請求項35～40のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 43】

結合事象を検査する前記ステップは、PIFまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数を観察、定量化及び/または検出することを含み、ここで、前記1つまたは複数の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうちの1つまたは組み合わせを含む、請求項35～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

結合事象を検査する前記ステップは、フローサイトメトリーによって前記免疫細胞の数を定量化することを含む、請求項43に記載の方法。

40

【請求項 45】

前記PIFまたはその類似体は、前記PIFまたはその類似体を前記1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、カラムへ固定化し、前記PIFまたはその類似体を前記1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、1つまたは複数の免疫細胞の試料を、固定化したPIFまたはその類似体を含む前記カラムへ曝露することを含み、かつ結合事象を検査する前記ステップは、フローサイトメトリーによって1つまたは複数の免疫細胞を定量化することを含み、ここで、前記1つまたは複数の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうちの1つまたは組

50

み合わせを含む、請求項 43 ~ 44 のステップのいずれかに記載の方法。

【請求項 46】

前記循環免疫細胞は、樹状細胞である、請求項 35 ~ 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記有意な変化は、CD14+細胞及び/または樹状細胞に対する前記PIFの結合の減少を定量化することを含む、請求項 35 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

前記有意な変化は、CD4+細胞、CD8+細胞、及び/またはナチュラルキラー(NK)細胞に対する前記PIFの結合の増加を定量化することを含む、請求項 35 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 49】

前記PIFまたはその類似体は、1つ以上のフルオレセインイソチオシアナート(FITC)標識を含み、かつ結合事象は、蛍光のレベルを定量化及び/または検出することによって測定する、請求項 35 ~ 48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

PIFまたはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前記ステップは、前記PIFまたはその類似体を前記対象へ投与することを含む、請求項 35 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記有意な変化は、CD3+細胞に対するPIFまたはその類似体の結合の増加及びCD45+細胞に対するPIFの結合の増加のうちの1つまたは組み合わせを含む、請求項 35 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 52】

免疫調節不全による子宮内膜症に罹患している可能性が高い雌性対象の識別方法であって、

有効量の着床前因子(PIF)またはその類似体を、1つまたは複数の免疫細胞を含む、前記対象由来の試料へ曝露すること、及び

前記対象の前記1つまたは複数の免疫細胞とPIFまたはその類似体との結合事象を検査し、基準と比較した前記1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFの結合の有意な変化は、前記雌性対象が、免疫調節不全による子宮内膜症に罹患している可能性が高いことを示すこと

30

を含む、前記方法

【請求項 53】

基準と比較した前記1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFから前記1つまたは複数のその類似体への結合のわずかな変化は、前記雌性対象が、免疫調節不全による子宮内膜に罹患していない可能性が高いことを示す、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記有効量のPIFは、約300~約500nMのPIFである、請求項 52 または 53 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 55】

試料をPIFまたはその類似体へ曝露する前に、前記試料を前記対象から単離することをさらに含む、請求項 52 ~ 54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

PIFまたはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、前記PIFまたはその類似体を固体支持体へ固定化することをさらに含み、前記固体支持体は、チップ、カラム、プレートまたは多重ウエルプレートから選択される、請求項 52 ~ 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

前記固体支持体は、カラムである、請求項 56 に記載の方法。

50

【請求項 5 8】

結合事象を検査する前記ステップは、P I Fまたはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞との会合を観察、定量化及び/または検出することを含む、請求項5 2～5 7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

結合事象を検査する前記ステップは、前記1つまたは複数の免疫細胞による1つまたは複数のサイトカインの発現量を観察、定量化及び/または検出することを含む、請求項5 2～5 7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

結合事象を検査する前記ステップは、P I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数を観察、定量化及び/または検出することを含み、ここで、前記1つまたは複数の免疫細胞は、C D 3 + 細胞、C D 4 + 細胞、C D 1 4 + 細胞、C D 4 5 + 細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうちの1つまたは組み合わせを含む、請求項5 2～5 9のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 1】

結合事象を検査する前記ステップは、フローサイトメトリーによって免疫細胞の数を定量化することを含む、請求項6 0に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記P I Fまたはその類似体は、前記P I Fまたはその類似体を前記1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、カラムへ固定化し、前記P I Fまたはその類似体を前記1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前記ステップは、1つまたは複数の免疫細胞の試料を、固定化したP I Fまたはその類似体を含む前記カラムへ曝露することを含み、かつ結合事象を検査する前記ステップは、フローサイトメトリーによって1つまたは複数の免疫細胞の数を定量化することを含み、ここで、前記1つまたは複数の免疫細胞は、C D 3 + 細胞、C D 4 + 細胞、C D 1 4 + 細胞、C D 4 5 + 細胞、樹状細胞、末梢血単核球のうちの1つまたは組み合わせを含む、請求項6 0～6 1のステップのいずれかに記載の方法。

20

【請求項 6 3】

前記循環免疫細胞は、樹状細胞である、請求項5 2～6 2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記有意な変化は、C D 1 4 + 細胞及び/または樹状細胞に対する前記P I Fの結合の減少を定量化することを含む、請求項5 2～6 3のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6 5】

前記有意な変化は、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及び/またはナチュラルキラー（N K）細胞に対する前記P I Fの結合の増加を定量化することを含む、請求項5 2～6 3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記P I Fまたはその類似体は、1つ以上のフルオレセインイソチオシアナート（F I T C）標識を含み、かつ結合事象は、蛍光の前記レベルを定量化及び/または検出することによって測定する、請求項5 2～6 5のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6 7】

P I Fまたはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前記ステップは、前記P I Fまたはその類似体を前記対象へ投与することを含む、請求項5 2～6 6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記有意な変化は、樹状細胞に対するP I Fまたはその類似体の結合の減少、C D 1 4 + 細胞に対するP I Fまたはその類似体の結合の増加、及びC D 4 + 細胞に対するP I Fの結合の増加のうちの1つまたは組み合わせを含む、請求項5 2～6 7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

50

再発性妊娠中断 (R P L) を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

R P L と診断されたまたは罹患している疑いのある対象に由来する試料を、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかの P I F アミノ酸に対して約 75% 相同である着床前因子 (P I F) またはその類似体を含む固体支持体へ曝露すること、

前記固定化した P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数を定量化すること、

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数を、R P L を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、ならびに

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、R P L を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数よりも約 20 パーセント多い場合、R P L を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類することを含む、前記方法。

【請求項 70】

R P L を発症するのに十分な、対象の免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかの P I F アミノ酸に対して約 75% 相同である前記固定化した P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、

前記対象の結合特性を作成すること、

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数を、R P L を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、ならびに

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、R P L を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数よりも約 20 パーセント多い場合、R P L を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類することを含む、前記方法。

【請求項 71】

R P L を発症するのに十分な対象の免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかの P I F アミノ酸に対して約 75% 相同である前記固定化した P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数を、R P L を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合する

10

20

30

40

50

免疫細胞の数と比較すること、ならびに

P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、R P Lを発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類することを含む、前記方法。

【請求項72】

R P Lを発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有している対象の治療方法であって、

前記対象由来の試料中の免疫細胞のうちの1個以上の存在、非存在、または量を検出すること、

前記対象由来の試料中の免疫細胞の数が、免疫細胞の基準数よりも約20パーセント多い場合、R P Lを発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有しているものとして、前記対象を診断すること、及び

有効量の免疫調節薬を投与することによって、前記対象を治療することを含む、前記方法。

【請求項73】

子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

子宮内膜症と診断されたまたは罹患している疑いのある対象由来の試料を、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかのP I Fアミノ酸に対して約75%相同であるP I Fまたはその類似体を含む固体支持体へ曝露すること、

前記固定化したP I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数を定量化すること、

P I Fまたはその類似体へ結合した前記免疫細胞の数を、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、ならびに

P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない前記対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した前記免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類することを含む、前記方法。

【請求項74】

子宮内膜症を発症するのに十分な、対象の免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかのP I Fアミノ酸に対して約75%相同である前記固定化したP I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、

前記対象の結合特性を作成すること、

P I Fまたはその類似体へ結合した前記免疫細胞の数を、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、ならびに

P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、子宮内膜症を発症するのに十分な

10

20

30

40

50

既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した前記免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類することを含む、前記方法。

【請求項75】

子宮内膜症を発症するのに十分な、対象の免疫調節不全のレベルの検出方法であって、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかのP I Fアミノ酸に対して約75%相同である前記固定化したP I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、

10

P I Fへ結合した前記免疫細胞の数を、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、ならびに

P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した前記免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類することを含む、前記方法。

20

【請求項76】

子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有している対象の治療方法であって、

前記対象由来の試料中の免疫細胞の存在、非存在、または量を検出すること、

前記対象由来の試料中の免疫細胞の数が、免疫細胞の基準数よりも約20パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有するものとして前記対象を診断すること、及び

治療有効量の免疫調節薬を投与することによって、前記対象を治療することを含む、前記方法。

30

【請求項77】

免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

免疫調節不全と診断されたまたは罹患している疑いのある対象由来の試料を、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかのP I Fアミノ酸に対して約75%相同であるP I Fまたはその類似体を含む固体支持体へ曝露すること、

40

前記固定化したP I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数を定量化すること、

P I Fまたはその類似体へ結合した前記免疫細胞の数を、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、ならびに

P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、既知の免疫調節不全に罹患していない前記対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した前記免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類すること

を含む、前記方法。

50

【請求項 78】

対象の免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかの P I F アミノ酸に対して約 75% 相同である P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、
前記対象の結合特性を作成すること、

10

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数を、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、
ならびに

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数よりも約 20% 多い場合、免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類すること
を含む、前記方法。

【請求項 79】

対象の免疫調節不全のレベルの検出方法であって、

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、これらの模倣体及びそれらの組み合わせから選択したいずれかの P I F アミノ酸に対して約 75% 相同である固定化した P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、

20

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数を、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合する免疫細胞の数と比較すること、
ならびに

30

P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数が、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその類似体へ結合した免疫細胞の数よりも約 20% 多い場合、免疫調節不全に罹患しているものとして前記対象を分類すること
を含む、前記方法。

【請求項 80】

免疫調節不全のレベルを有している対象の治療方法であって、

前記対象由来の試料中の免疫細胞のうち 1 個以上の存在、非存在、または量を検出すること、

前記対象由来の試料中の免疫細胞の数が、免疫細胞の基準数よりも約 20% 多い場合、免疫調節不全のレベルを有しているものとして、前記対象を診断すること、及び
有効量の免疫調節薬を投与することによって、前記対象を治療すること
を含む、前記方法。

40

【請求項 81】

定量化する前記ステップは、前記対象の結合特性を作成することを含む、請求項 69、70、71、73、74、75、77、78、または 80 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

前記対象の結合特性を作成することは、免疫調節不全のレベルと、P I F またはその類似体へ結合した C D 14 + 細胞の数、P I F またはその類似体へ結合した C D 4 + 細胞の数、及び P I F またはその類似体へ結合した C D 8 + 細胞の数のうちの 1 つまたは組み合わせとを相関させることを含む、請求項 81 に記載の方法。

50

【請求項 8 3】

免疫調節不全のレベルと、P I Fまたはその類似体へ結合したC D 1 4 + 細胞の数、P I Fまたはその類似体へ結合したC D 4 + 細胞の数、及びP I Fまたはその類似体へ結合C D 8 + 細胞の数のうちの1つまたは組み合わせとを関連させるとをさらに含む、請求項6 9、7 0、7 1、7 3、7 4、7 5、7 7、7 8、または8 0のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

免疫調節不全のレベルと、P I Fまたはその類似体へ結合した1 4 - 3 - 3 エータの結合親和性、P I Fまたはその類似体へ結合した1 4 - 3 - 3 エータの結合親和性、P I Fまたはその類似体へ結合したミオシン9の結合親和性、P I Fまたはその類似体へ結合したチモシン - 1の結合親和性、及びP I Fまたはその類似体へ結合したC D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、またはC D 1 4 + 細胞由来のC D 8 + 細胞の数のうちの1つまたは組み合わせの量とを関連させるステップは、公知の及び予測されたタンパク質相互作用に関するデータベースを用いて、直接的及び間接的な会合を含むタンパク質の相互作用を算出することを含む、請求項8 2に記載の方法。

10

【請求項 8 5】

前記P I Fへ結合する免疫細胞の数を検出または定量化するステップの前に、試料を対象から単離することをさらに含む、請求項6 9、7 0、7 1、7 3、7 4、7 5、7 7、7 8、または8 0に記載の方法。

【請求項 8 6】

試料を単離する前記ステップは、前記試料をP I Fへ曝露する前に、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及びC D 1 4 + 細胞を含む細胞集団のうちの1つまたは組み合わせを、前記対象の血液から単離することを含む、請求項8 5に記載の方法。

20

【請求項 8 7】

P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数よりも約1 5 パーセント～4 0 パーセント多い、請求項6 9～8 0のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、対象の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数よりも約1 5 パーセント～約4 0 パーセント少ない、請求項6 9～8 0のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8 9】

前記固体支持体は、ディッシュ、プレート、カラム、またはシリカチップである、請求項6 9に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記免疫細胞は、のC D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及びC D 1 4 + 細胞のうちの1つまたは複数である、請求項6 9～8 0のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

40

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 4 年1 1 月3 日出願の「P I F B i n d i n g a s a M a r k e r f o r I m m u n e D y s r e g u l a t i o n (免疫調節不全についてのマーカーとしてのP I F結合)」という表題の米国仮出願番号第6 2 / 0 7 4 , 3 8 4 号と、2 0 1 5 年2 月6 日出願の「P I F B i n d i n g a s a M a r k e r f o r I m m u n e D y s r e g u l a t i o n (免疫調節不全についてのマーカーとしてのP I F結合)」という表題の米国仮出願番号第6 2 / 1 1 3 , 2 9 8 号と、2 0 1 5 年8 月2 8 日出願の「C o m p o s i t i o n s a n d M e t h o d s f o r t h e T r e a t m e n t o f N e u r o d a m a g e (神経損傷の治療のための組成物及び方法)」という表題の米国仮出願番号第6 2 / 2 1 1 , 6 6 0 号、ならびに2

50

014年9月16日出願の「Methods for Treating Acute Radiation Syndrome (急性放射線症候群の治療方法)」という表題の米国仮出願番号第62/051,077号に対する優先権及びその利益を請求する2015年9月16日出願の「Compositions and Methods for Treating Acute Radiation Syndrome (急性放射線症候群を治療するための組成物及び方法)」という表題の国際出願番号第PCT/US15/50532号に対する優先権及びそれらの利益を請求する。各出願の内容は、それらの個々の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示の分野

本開示は概して、対象由来の細胞または他の生物試料へのPIF結合の検出及び/または定量化による、対象における免疫調節不全の識別に関する診断応用に関する。本開示は、ヒトを含む動物から得た試料の分析からの、免疫調節不全によって生じる再発性妊娠中断及び子宮内膜症の診断にも関する。免疫調節不全の識別は、免疫調節不全によって生じる疾患の治療及び/または根絶の適切な経過を判断するために重要である。

【背景技術】

【0003】

再発性流産または習慣性流産とも呼ばれる再発性妊娠中断(RPL)は、最後の月経周期から20週前に3回連続して妊娠中断するものとして歴史的に定義されている。散発性妊娠中断の発生率に基づくと、再発性妊娠中断の発生率は300例の妊娠においておよそ1例となるはずである。しかしながら、疫学的試験は、女性の1~2%が再発性妊娠中断を経験していることを明らかにしている。診断検査及び治療介入を必要とする臨床実体としてRPLを定義することは、その後の胎児の喪失についての危険性の上昇と当該障害についての治療可能な病因を発見する確率とに関する知識にかかっている。信頼可能な公表されたデータは2例ではなく3例以上の流産を有している集団におけるRPLについての病因を発見する確率を推定してきていないが、最良の入手可能なデータは、その後の妊娠における流産の危険性が、生児出生の履歴のない患者における3例の喪失後の33%と比較して、2例の喪失後に30%であることを示唆している。RPLの全症例のおよそ1/3以上が説明されていないままである。

【0004】

子宮内膜症は組織学的に、骨盤腹膜、卵巣、及び腸を含む子宮外位置への子宮内膜組織の変位を特徴とする。不妊及び骨盤痛の重要な原因である、子宮内膜症に関する個人の及び地球規模での社会経済的負担は、重要な意味を持つ。腹腔鏡検査が、依然として当該容態の診断のための基準診断法である。しかしながら、手術の侵襲的な性質は、当該疾患についての検査用バイオマーカーのないことと相まって、症状の発症から最終の診断まで平均7~11年の遅延を結果的に生じる。不運なことに、診断の遅延は、疾患進行の点で甚大な結果をもたらし得る。

【0005】

哺乳類動物の妊娠は、母体の免疫系が、両方の当事者系統にとって有益である非常に有効な様式で、胎児と相互作用する独特な生理学的現象である。胚由来因子である着床前因子(PIF-1)は、受精直後の妊娠の母方の認識を生み出すことによって妊娠の免疫寛容を生じ得る。

【発明の概要】

【0006】

免疫細胞上の細胞受容体に対するPIF結合の特性は、対象における免疫調節不全を診断するのに有用なシステムまたは装置を生み出すために利用することができる。本開示は、固定化PIFを含む固体支持体に関し、ここで、試料に対するPIF結合親和性を、免疫調節不全による再発性妊娠中断及び/または子宮内膜症に罹患している患者集団を識別するために分析し得る。

【0007】

10

20

30

40

50

本開示は、免疫調節不全についてのマーカーとして、対象の循環免疫細胞に対する着床前因子（PIF）またはその機能的断片若しくはその類似体の結合を検査する方法に関する。いくつかの実施形態は、有効量のPIFまたはその機能的断片を、1つまたは複数の免疫細胞を含む対象由来の試料へ曝露すること、及び対象の1つまたは複数の免疫細胞とPIFまたはその機能的断片との結合事象を検査することを含む、免疫調節不全による再発性妊娠中断（RPL）の履歴を有する雌性対象の識別方法に関し、ここで、基準と比較した1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFの結合の有意な変化は、当該RPLが免疫調節不全によることを示す。

【0008】

いくつかの実施形態において、基準と比較して1つまたは複数の免疫細胞に対する結合がPIFから1つまたは複数のその機能的断片へわずかに変化することは、RPLが免疫調節不全によるものではないことを示している。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、有効量のPIFは、溶液中で約300nMから約500nMのPIFであり得、または結合し、プラスチック表面上に被覆されたマトリックス材料へ吸着若しくは連結した抗体によって固定化し得る。

【0010】

本開示は、方法がさらに、試料をPIFまたはその機能的断片へ曝露する前に対象から試料を単離することを含み得る実施形態を提供する。いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、PIFまたはその機能的断片若しくはその類似体を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、PIFまたはその機能的断片若しくはその類似体を固体支持体へ固定化することを含み得、ここで、固体支持体は、チップ、カラム、プレート、または多重ウェルプレートから選択される。

20

【0011】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片と1つまたは複数の免疫細胞の間の結合を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、1つまたは複数の免疫細胞による1つまたは複数のサイトカインの発現量を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を観察、定量化、及び/または検出することを含み得、ここで、1個以上の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、または末梢血単核球（PBMC）のうちの1つまたは組み合わせを含み得る。

30

【0012】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、フローサイトメトリーによって試料中の免疫細胞数を定量化することを含み得る。

【0013】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片は、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、カラムへ固定し得、ここで、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、1つまたは複数の免疫細胞からなる試料を、固定化したPIFまたはその機能的断片を含むカラムへ曝露することを含み、かつここで、結合事象を検査するステップは、フローサイトメトリーによって1つまたは複数の免疫細胞の数を定量化することを含み、ここで、1つまたは複数の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、またはPBMCのうちの1つまたは組み合わせを含む。

40

【0014】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD14+細胞及び/または樹状細胞に対する当該PIFの結合の減少を定量化することを含み得る。

【0015】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD4+細胞、CD8+細胞、及び/ま

50

たはナチュラルキラー（NK）細胞に対する当該PIFの結合の増加を定量化することを含み得る。いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片若しくはその類似体は、1個以上のフルオレセインイソチオシアナート（FITC）標識を含み、ここで、結合事象を、FITC標識したPIFまたはその類似体へ曝露した試料中の蛍光レベルを、FITCの蛍光を生じるのに十分な光の波長による試料の刺激後に定量化及び/または検出することによって測定する。

【0016】

本開示の方法は、PIFまたはその機能的断片若しくはその類似体を対象の1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップに関する。いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片若しくはその類似体を対象へ投与することを含み得る。いくつかの実施形態において、有意な変化は、樹状細胞に対するPIFまたはその機能的断片の結合の減少、CD14+細胞に対するPIFまたはその機能的断片の結合の増加、及びCD4+細胞に対するPIFの結合の増加のうちの一つまたは組み合わせを含み得る。

10

【0017】

いくつかの実施形態は、有効量のPIFまたはその機能的断片を、1つまたは複数の免疫細胞を含む対象由来の試料へ曝露すること、及び対象の1つまたは複数の免疫細胞と、PIFまたはその機能的断片との結合事象を検査し、ここで、基準と比較した1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFの結合の有意な変化は、当該雌性対象が免疫調節不全によりRPLに罹患している可能性が高いことを示すことを含む、免疫調節不全によりRPLに罹患している可能性が高い雌性対象の識別方法に関する。

20

【0018】

いくつかの実施形態において、基準と比較して1つまたは複数の免疫細胞に対する結合がPIFから1つまたは複数のその機能的断片へわずかに変化することは、当該雌性対象が、免疫調節不全によるRPLに罹患している可能性が高くないことを示す。

【0019】

いくつかの実施形態において、有効量のPIFは、約300nMから約500nMのPIFであり得る。

【0020】

いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、試料をPIFまたはその機能的断片へ曝露する前に、対象から試料を単離することを含み得る。

30

【0021】

いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、PIFまたはその機能的断片を固体支持体へ固定化することを含み得、ここで、固体支持体は、チップ、カラム、プレート、または多重ウエルプレートから選択される。

【0022】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片と1つまたは複数の免疫細胞との結合を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。

【0023】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、1つまたは複数の免疫細胞による1つまたは複数のサイトカインの発現の量を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。

40

【0024】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を観察、定量化及び/または検出することを含み得、ここで、1個以上の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、または末梢血単核球（PBMC）のうちの一つまたは組み合わせを含み得る。

【0025】

50

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、フローサイトメトリーによって免疫細胞の数を定量化することを含み得る。

【0026】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片は、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、カラムへ固定化され得、ここで、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、1つまたは複数の免疫細胞からなる試料を、固定化したPIFまたはその機能的断片を含むカラムへ曝露することを含み、かつここで、結合事象を検査するステップは、フローサイトメトリーによる1つまたは複数の免疫細胞の数を定量化することを含み、ここで、1つまたは複数の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、またはPBM Cのうちの1つまたは組み合わせを含む。

10

【0027】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD14+細胞及び/または樹状細胞に対する当該PIFの結合の減少を定量化することを含み得る。

【0028】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD4+細胞、CD8+細胞、及び/またはナチュラルキラー(NK)細胞に対する当該PIFの結合の増加を定量化することを含み得る。

【0029】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片は、1つ以上のフルオレセインイソチオシアナート(FITC)を含み、かつここで、結合事象は、蛍光のレベルを定量化及び/または検出することによって測定する。

20

【0030】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、PIFまたはその機能的断片を対象へ投与することを含み得る。

【0031】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、樹状細胞に対するPIFまたはその機能的断片の結合の減少、CD14+細胞に対するPIFまたはその機能的断片の結合の増加、及びCD4+細胞に対するPIFの結合の増加のうちの1つまたは組み合わせを含む得る。

30

【0032】

いくつかの実施形態は、有効量のPIFまたはその機能的断片を、1つまたは複数の免疫細胞を含む対象由来の試料へ曝露すること、及び対象の1つまたは複数の免疫細胞とPIFまたはその機能的断片の間の結合事象を検査し、ここで、基準と比較した1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFの結合の有意な変化は、雌性対象が子宮内膜症に罹患していることを示すことを含む、子宮内膜症に罹患している雌性対象の識別方法に関する。

【0033】

いくつかの実施形態において、基準と比較して1つまたは複数の免疫細胞に対する結合がPIFから1つまたは複数のその機能的断片へわずかに変化することは、雌性対象が子宮内膜症に罹患していないことを示す。

40

【0034】

いくつかの実施形態において、有効量のPIFは、約300nMから約500nMのPIFであり得る。

【0035】

いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、対象由来の試料をPIFまたはその機能的断片へ曝露する前に、試料を対象から単離することを含み得る。

【0036】

いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、PIFまたはその機能的断片を固体支持体へ固定

50

化し、この中で固体支持体は、チップ、カラム、プレート、または多重ウエルプレートから選択することを含み得る。いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片と1つまたは複数の免疫細胞との結合を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。

【0037】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、1つまたは複数の免疫細胞による1つまたは複数のサイトカインの発現量を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。

【0038】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を観察、定量化、及び/または検出することを含み得、この中で1個以上の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、または末梢血単核球(PBMC)のうちの1つまたは組み合わせを含み得る。

10

【0039】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、免疫細胞の数をフローサイトメトリーによって定量化することを含み得る。

【0040】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片は、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、カラムへ固定化され得、ここで、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、1つまたは複数の免疫細胞の試料を、固定化したPIFまたはその機能的断片を含むカラムへ曝露することを含み、かつここで、結合事象を検査するステップは、1つまたは複数の免疫細胞の数をフローサイトメトリーによって定量化することを含み、ここで、1つまたは複数の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、またはPBMCのうちの1つまたは組み合わせを含む。

20

【0041】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD14+及び/または樹状細胞に対する当該PIFの結合の減少を定量化することを含み得る。

【0042】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD4+、CD8+、及び/またはナチュラルキラー(NK)細胞に対する当該PIFの結合の増加を定量化することを含み得る。

30

【0043】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片は、1個以上のフルオレセインイソチオシアナート(FITC)標識を含み、かつここで、結合事象は、蛍光のレベルを定量化及び/または検出することによって測定する。

【0044】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、PIFまたはその機能的断片を対象へ投与することを含み得る。

40

【0045】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、樹状細胞に対するPIFまたはその機能的断片の結合の減少、CD14+細胞に対するPIFまたはその機能的断片の結合の増加、及びCD4+細胞に結合するPIFの増加のうちの1つまたは組み合わせを含み得る。

【0046】

いくつかの実施形態は、有効量のPIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞を含む対象由来の試料へ曝露すること、及び対象の1つまたは複数の免疫細胞とPIFまたはその機能的断片との結合事象を検査し、ここで、基準と比較した1つまたは複数の免疫細胞に対するPIFの結合の有意な変化は、当該雌性対象が、免疫調節不全による

50

子宮内膜症に罹患している可能性が高いことを示すことを含む、免疫調節不全による子宮内膜症に罹患している可能性が高い雌性対象の識別方法に関する。

【0047】

いくつかの実施形態において、基準と比較して1つまたは複数の免疫細胞に対する結合がPIFから1つまたは複数のその機能的断片へわずかに変化することは、雌性対象が、免疫調節不全による子宮内膜症に罹患している可能性が低いことを示す。

【0048】

いくつかの実施形態において、有効量のPIFは、約300nMから約500nMのPIFであり得る。

【0049】

いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、対象由来の試料をPIFまたはその機能的断片へ曝露する前に、試料を対象から単離することを含み得る。

【0050】

いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、PIFまたはその機能的断片を固体支持体へ固定化し、ここで、固体支持体は、チップ、カラム、プレート、または多重ウエルプレートから選択することを含み得る。

【0051】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片と1つまたは複数の免疫細胞との結合を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。

【0052】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、1つまたは複数の免疫細胞による1つまたは複数のサイトカインの発現量を観察、定量化及び/または検出することを含み得る。

【0053】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、PIFまたはその機能的断片に対して結合する免疫細胞の数を観察、定量化、及び/または検出することを含み得、ここで、1個以上の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、または末梢血単核球(PBMC)のうちの1つまたは組み合わせを含み得る。

【0054】

いくつかの実施形態において、結合事象を検査するステップは、免疫細胞数をフローサイトメトリーによって定量化することを含み得る。

【0055】

いくつかの実施形態において、PIFまたはその機能的断片は、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露する前に、カラムへ固定化し得、ここで、PIFまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、1つまたは複数の免疫細胞の試料を、固定化したPIFまたはその機能的断片を含むカラムへ曝露することを含み、かつここで、結合事象を検査するステップは、1つまたは複数の免疫細胞の数をフローサイトメトリーによって定量化することを含み、ここで、1つまたは複数の免疫細胞は、CD3+細胞、CD4+細胞、CD14+細胞、CD45+細胞、樹状細胞、またはPBMCのうちの1つまたは組み合わせを含む。

【0056】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD14+細胞及び/または樹状細胞に対する当該PIFの結合の減少を定量化することを含み得る。

【0057】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、CD4+細胞、CD8+細胞、及び/またはナチュラルキラー(NK)細胞に対する当該PIFの結合の増加を定量化することを含み得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態において、P I Fまたはその機能的断片は、1個以上のフルオレセインイソチオシアナート(F I T C)標識を含み、かつここで、結合事象は、F I T C部分の蛍光を生じるのに十分な光の波長の存在下で、F I T C標識したペプチドによって発光される蛍光のレベルを定量化及び/または検出することによって測定する。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態において、P I Fまたはその機能的断片を1つまたは複数の免疫細胞へ曝露するステップは、P I Fまたはその機能的断片を対象へ投与することを含み得る。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態において、有意な変化は、樹状細胞に対するP I Fまたはその機能的断片の結合の減少、C D 1 4 + 細胞に対するP I Fまたはその機能的断片の結合の増加、及びC D 4 + 細胞に対するP I Fの結合の増加のうちの一つまたは組み合わせを含み得る。

【 0 0 6 1 】

本開示の一実施形態は、R P Lと診断された、または罹患している疑いがある対象に由来する試料を、P I Fまたはその機能的断片を含む固体支持体へ曝露すること、P I Fまたはその機能的結合断片へ結合する免疫細胞の数を定量化すること、P I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその機能的断片へ結合している免疫細胞の数と比較すること、及びP I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセントから約25パーセントまで多い場合、R P Lを発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、R P Lを発症するのに十分な免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。本開示の一実施形態は、R P Lと診断された、または罹患していると疑われる対象に由来する試料を、P I Fまたはその機能的断片を含む固体支持体へ曝露すること、P I Fまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を定量化すること、P I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数と比較すること、及びP I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、R P Lを発症するのに十分な免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

【 0 0 6 2 】

本開示の別の実施形態は、固定化したP I Fまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、対象の結合特性を作成すること、P I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fへ結合する免疫細胞の数と比較すること、及びP I Fへ結合した免疫細胞の数が、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、R P Lを発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、R P Lを発症するのに十分な対象の免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。いくつかの場合において、免疫細胞は、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及び/またはC D 1 4 + 細胞のうちの一つまたは複数である。

【 0 0 6 3 】

本開示の一実施形態は、固定化したP I Fまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、P I Fまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、R P Lを発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、

10

20

30

40

50

P I F またはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数と比較すること、及び P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、R P L を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F へ結合した免疫細胞の数よりも約 20 パーセント多い場合、R P L を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、R P L を発症するのに十分な対象の免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

【 0 0 6 4 】

本開示は、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及び C D 1 4 + 細胞のうちの 1 つ以上の存在、非存在、または量を検出すること、免疫細胞の数が、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及び C D 1 4 + 細胞の数よりも約 20 パーセント多い場合、R P L を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有しているものとして対象を診断すること、ならびに有効量の免疫調節薬を投与することによって対象を治療することを含む、R P L を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有している対象の治療方法にも関する。

10

【 0 0 6 5 】

本開示の一実施形態は、子宮内膜症と診断されている、または罹患していると疑われる対象に由来する試料を、P I F またはその機能的断片を含む固体支持体へ曝露すること、固定化した P I F またはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を定量化すること、P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F へ結合する免疫細胞の数と比較すること、及び P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F へ結合した免疫細胞の数よりも約 20 パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

20

【 0 0 6 6 】

本開示の一実施形態は、固定化した P I F またはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、対象の結合特性を作成すること、P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料に由来する、P I F へ結合する免疫細胞の数と比較すること、及び P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F へ結合した免疫細胞の数よりも約 20 パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、子宮内膜症を発症するのに十分な対象の免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

30

【 0 0 6 7 】

本開示の一実施形態は、固定化した P I F またはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F へ結合する免疫細胞の数と比較すること、及び P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、子宮内膜症を発症するのに十分な既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、P I F またはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数よりも約 20 パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、子宮内膜症を発症するのに十分な対象の免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

40

【 0 0 6 8 】

本開示の一実施形態は、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及び C D 1 4 + 細胞のうちの 1 つ以上の存在、非存在、または量を検出すること、免疫細胞の数が約 20 パーセント多い場合、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有しているものとして、対象を診断すること、ならびに有効量の免疫調節薬を投与することによって、対象を治療することを含む、子宮内膜症を発症するのに十分な免疫調節不全のレベルを有する対象の

50

治療方法に関する。

【0069】

本開示の一実施形態は、免疫調節不全に罹患しているまたは罹患していると疑われる対象に由来する試料を、PIFまたはその機能的断片を含む固体支持体へ曝露すること、固定化したPIFまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を定量化すること、PIFまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、PIFへ結合する免疫細胞の数と比較すること、及びPIFまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料に由来する、PIFへ結合した免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

10

【0070】

本開示の一実施形態は、固定化したPIFまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、対象の結合特性を作成すること、PIFまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、PIFへ結合する免疫細胞の数と比較すること、及びPIFまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、PIFへ結合した免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、対象の免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

20

【0071】

本開示の一実施形態は、固定化したPIFまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数を検出または定量化すること、PIFまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数を、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、PIFまたはその機能的断片へ結合する免疫細胞の数と比較すること、及びPIFまたはその機能的断片へ結合した免疫細胞の数が、既知の免疫調節不全に罹患していない対象の試料由来の、PIFへ結合した免疫細胞の数よりも約20パーセント多い場合、免疫調節不全に罹患しているものとして対象を分類することを含む、対象の免疫調節不全のレベルの検出方法に関する。

【0072】

本開示の一実施形態は、CD4+細胞、CD8+細胞、及びCD14+細胞のうち1つ以上の存在、非存在、または量を検出すること、免疫細胞の数が約20パーセント多い場合、免疫調節不全のレベルを有しているものとして対象を診断すること、ならびに有効量の免疫調節薬を投与することによって対象を治療することを含む、免疫調節不全のレベルを有する対象の治療方法に関する。

30

【0073】

いくつかの実施形態において、定量化するステップは、対象の結合特性を作成することを含む。いくつかの実施形態において、対象の結合特性を作成することは、免疫調節不全のレベルと、PIFまたはその機能的断片へ結合したCD14+細胞の数、PIFまたはその機能的断片へ結合したCD4+細胞の数、及びPIFまたはその機能的断片へ結合したCD8+細胞の数のうちの1つまたは組み合わせの量とを相関させることを含む。いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、免疫調節不全のレベルと、PIFまたはその機能的断片へ結合したCD14+細胞の数、PIFまたはその機能的断片へ結合したCD4+細胞の数、及びPIFまたはその機能的断片へ結合したCD8+細胞の数のうちの1つまたは組み合わせの量とを相関させることを含む。いくつかの実施形態において、免疫調節不全のレベルと、PIFまたはその機能的断片へ結合したCD14+細胞の数、PIFまたはその機能的断片へ結合したCD4+細胞の数、及びPIFへ結合したCD8+細胞の数のうちの1つまたは組み合わせの量とを相関させるステップは、PIFまたはその機能的断片と当該細胞との結合会合を検出及び/または定量化することを含む。いくつかの実施形態において、当該方法は、さらに、本明細書に開示する1つまたは複数の細胞タイプに対するPIFまたはその機能的断片の結合会合と、免疫機能障害に罹患している

40

50

または免疫機能障害と診断されていないことが知られているの対象由来のまたは当該対象と関連した結合会合とを相関させることを含む。いくつかの実施形態において、相関させるステップは、対象についての情報を、タンパク質または細胞の会合と関連する公知の値または予測値に関するデータベースを用いて、タンパク質または細胞の会合と関連する値と比較することを含む。いくつかの実施形態において、いかなる開示した法も、開示したアルゴリズムのうちのいずれかを用いることによって、開示した障害を発症するのに十分な免疫機能障害を対象が獲得するであろうまたは当該免疫機能障害に罹患している危険性を特徴づけ、識別し、または算出するステップを含む。いくつかの実施形態において、当該方法は、免疫調節不全のレベルと、P I Fまたはその機能的断片へ結合した14-3-3エータの結合、P I Fまたはその機能的断片へ結合したミオシン9の結合、P I Fまたはその機能的断片へ結合したチモシン1の結合、及びP I Fへ結合したCD4+細胞、CD8+細胞、またはCD14+細胞に由来するCD8+細胞の数のうちの1つまたは組み合わせの量とを相関させるステップを含み、公知の及び予測されたタンパク質相互作用に関するデータベースを用いて、直接的及び間接的な会合を含むタンパク質の相互作用を算出することを含む。いくつかの実施形態において、当該方法はさらに、固定化したP I Fへ結合する免疫細胞の数を検出または定量するステップの前に、試料を対象から単離することを含む。いくつかの実施形態において、試料を単離するステップは、固定化したP I Fへ試料を曝露する前に、CD4+細胞、CD8+細胞、及びCD14+細胞を含む細胞集団のうちの1つまたは組み合わせを対象の血液から単離することを含む。

10

20

【0074】

いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約40パーセント多い。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約45パーセント多い。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約45パーセント多い。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約45パーセント多い。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約30パーセント多い。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約35パーセント多い。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約40パーセント少ない。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約45パーセント少ない。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約25パーセント少ない。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、R P Lまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、P I Fまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、P I Fへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセ

30

40

50

ント～約30パーセント少ない。いくつかの実施形態において、免疫調節不全、RPLまたは子宮内膜症に罹患していると疑われる人の試料由来の、PIFまたはその類似体へ結合した免疫細胞の数は、基準試料由来の、PIFへ結合した免疫細胞の数よりも約15パーセント～約35パーセント少ない。いくつかの実施形態において、固定化したPIFまたはその類似体の量は、約200マイクロモル濃度超、300マイクロモル濃度超、400マイクロモル濃度超、500マイクロモル濃度超、600マイクロモル濃度超、700マイクロモル濃度超、800マイクロモル濃度超、900マイクロモル濃度超、または1000マイクロモル濃度超の濃度で付着する。いくつかの実施形態において、固体支持体は、ディッシュ、プレート、カラム、またはシリカチップである。

【0075】

本開示の一実施形態は、免疫調節不全によるRPLの病歴を有する雌性対象の識別方法に関し、有効量のPIFまたはその機能的断片を投与すること、及び循環免疫細胞への当該PIFの結合を検査し、ここで、基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の結合の変化は、当該対象のRPL病歴が免疫調節不全による可能性が高いことを示し、かつ基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の正常な結合は、対象のRPL病歴が免疫調節不全によるものではない可能性が高いことを示すことを含む。

【0076】

本開示の一実施形態は、有効量のPIFまたはその類似体を投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該PIFの結合を検査することを含む、免疫調節不全によるRPLに罹患している雌性対象の識別方法に関し、ここで、基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその類似体の結合の変化は、当該対象のRPL病歴が免疫調節不全による可能性が高いことを示し、かつ基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の正常な結合は、当該対象のRPL病歴が免疫調節不全によるものではない可能性が高いことを示す。

【0077】

本開示の一実施形態は、有効量のPIFまたはその類似体を投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該PIFの結合を検査することを含む、免疫調節不全によるRPLに罹患している可能性が高い雌性対象の識別方法に関し、ここで、基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の結合の変化は、当該対象が免疫調節不全によるRPLに罹患している可能性が高いことを示し、かつ基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の正常な結合は、当該対象が免疫調節不全によるRPLに罹患している可能性が高くないことを示す。

【0078】

本開示の一実施形態は、有効量のPIFまたはその機能的断片を投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該PIFの結合を検査することを含む、免疫調節不全に罹患している対象の識別方法に関し、ここで、基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の結合の変化は当該対象の免疫調節不全を示し、かつ基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の正常な結合は、当該対象の免疫調節不全の欠如を示す。

【0079】

本開示の一実施形態は、有効量のPIFまたはその機能的断片を投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該PIFの結合を検査することを含む、子宮内膜症に罹患している対象の識別方法に関し、ここで、基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の結合の変化は、当該対象の子宮内膜症を示し、かつ基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該PIFまたはその機能的断片の正常な結合は、当該対象の子宮内膜症の欠如を示す。

【0080】

いくつかの実施形態において、PIF結合は、対象からの免疫細胞の単離後にフローサイトメトリーによって測定する。いくつかの実施形態において、循環免疫細胞は、樹状細胞

10

20

30

40

50

胞である。いくつかの実施形態において、変化は、CD14+細胞及び/または樹状細胞に対するPIFの結合の減少である。いくつかの実施形態において、変化は、CD4+細胞、CD8+細胞、及び/またはナチュラルキラー(NK)細胞に対するPIFの結合の増加である。いくつかの実施形態において、非洗剤緩衝液は、スルファベタインである。

【0081】

本開示の性質及び利点に関する完全な理解のために、詳細な説明が、添付の図面に関連して以下に続く。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1A】樹状細胞(DC)へ結合するPIFの減少が、RPLの危険性に関するマーカーを表すことができる、またはRPLを獲得する若しくはRPLに罹患する危険性の上昇と相関していることを示す。実施した本実験において、4例のRPL対象は、mDCの10倍超の増加を示したのに対し、7例のRPL対象は、HP群と類似の値を有しており(0.10±0.08)、pDCの百分率における差は何ら観察されなかった(RPL群における0.113±0.09対HP群における0.116±0.03)。在胎期間は、HP群においてpDCの値もmDCの値も変化しなかった。PIF結合細胞は、RPL群におけるpDC及びmDCにおいて等しく減少した(pDC PIF+ : RPL群における41.2±19.2対HP群における58.2±18.3、p=0.0381 ; mDC PIF+ : RPL群における46.1±14.2対HP群における57.9±9.1 ; p=0.029)。個々のRPL対象に存在するmDCのレベルとmDC PIF+の%との関連性はなかった。

10

20

【図1B】樹状細胞(DC)へ結合するPIFの減少が、RPLの危険性に関するマーカーを表すことができる、またはRPLを獲得する若しくはRPLに罹患する危険性の上昇と相関していることを示す。実施した本実験において、4例のRPL対象は、mDCの10倍超の増加を示したのに対し、7例のRPL対象は、HP群と類似の値を有しており(0.10±0.08)、pDCの百分率における差は何ら観察されなかった(RPL群における0.113±0.09対HP群における0.116±0.03)。在胎期間は、HP群においてpDCの値もmDCの値も変化しなかった。PIF結合細胞は、RPL群におけるpDC及びmDCにおいて等しく減少した(pDC PIF+ : RPL群における41.2±19.2対HP群における58.2±18.3、p=0.0381 ; mDC PIF+ : RPL群における46.1±14.2対HP群における57.9±9.1 ; p=0.029)。個々のRPL対象に存在するmDCのレベルとmDC PIF+の%との関連性はなかった。

30

40

【図1C】樹状細胞(DC)へ結合するPIFの減少が、RPLの危険性に関するマーカーを表すことができる、またはRPLを獲得する若しくはRPLに罹患する危険性の上昇と相関していることを示す。実施した本実験において、4例のRPL対象は、mDCの10倍超の増加を示したのに対し、7例のRPL対象は、HP群と類似の値を有しており(0.10±0.08)、pDCの百分率における差は何ら観察されなかった(RPL群における0.113±0.09対HP群における0.116±0.03)。在胎期間は、HP群においてpDCの値もmDCの値も変化しなかった。PIF結合細胞は、RPL群におけるpDC及びmDCにおいて等しく減少した(pDC PIF+ : RPL群における41.2±19.2対HP群における58.2±18.3、p=0.0381 ; mDC PIF+ : RPL群における46.1±14.2対HP群における57.9±9.1 ; p=0.029)。個々のRPL対象に存在するmDCのレベルとmDC PIF+の%との関連性はなかった。

【図1D】樹状細胞(DC)へ結合するPIFの減少が、RPLの危険性に関するマーカーを表すことができる、またはRPLを獲得する若しくはRPLに罹患する危険性の上昇と相関していることを示す。実施した本実験において、4例のRPL対象は、mDCの10倍超の増加を示したのに対し、7例のRPL対象は、HP群と類似の値を有しており(0.10±0.08)、pDCの百分率における差は何ら観察されなかった(RPL群にお

50

ける 0.113 ± 0.09 対 HP 群における 0.116 ± 0.03)。在胎期間は、HP 群において pDC の値も mDC の値も変化しなかった。PIF 結合細胞は、RPL 群における pDC 及び mDC において等しく減少した (pDC PIF+ : RPL 群における 41.2 ± 19.2 対 HP 群における 58.2 ± 18.3 、 $p = 0.0381$; mDC PIF+ : RPL 群における 46.1 ± 14.2 対 HP 群における 57.9 ± 9.1 ; $p = 0.029$)。個々の RPL 対象に存在する mDC のレベルと mDC PIF+ の % との関連性はなかった。

【図 2】CD14+ 細胞に対する結合が対照と比較して増幅したことを示す。細胞を活性化した時に差は観察されなかった。PHA の存在下での他の系列に対する結合を対照と比較して検査した場合、CD4 に対する結合も CD8 に対する結合も低下したのに対し、CD19 に対する結合における差は確認されなかった。

【図 3 - 1】所与のサイトカインを発現する対象のリンパ球の百分率に及ぼす PIF の効果を検査し、本結果を健常対照の結果と比較した実験を示す。本実験は、PIF 単独を用いてかつ PHA による活性化後に実施した。本データは、PIF を PIFscr 対照と比較した IL10、IL4、及び TNF のレベルを検査する、対照対象における 24 ~ 96 時間の実験を示す。IL10+ 細胞の数は、対照と比較して有意に増加した。この増加に次いで、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA への曝露の 96 時間後に基線への回復が続いた。サイトカイン比を、対照と比較し、 30 nM の PIF は、炎症促進性 / 抗炎症性比 (TNF / IL10 / IL4) の低下をもたらした。加えて、これらのサイトカインに及ぼす $0 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA の効果を検査すると、用量依存性応答が確認され、ここで、対照と比較した PIF の最大効果が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ において確認された。

【図 3 - 2】図 3 - 1 の続きである。

【図 3 - 3】図 3 - 1 の続きである。

【図 3 - 4】図 3 - 1 の続きである。

【図 3 - 5】図 3 - 1 の続きである。

【図 3 - 6】図 3 - 1 の続きである。

【図 3 - 7】図 3 - 1 の続きである。

【図 3 - 8】図 3 - 1 の続きである。

【図 3 - 9】図 3 - 1 の続きである。

【図 4 - 1】所与のサイトカインを発現する対象のリンパ球の百分率に及ぼす PIF の効果を検査し、本結果を健常対照の結果と比較した実験を示す。本実験は、PIF 単独を用いてかつ PHA による活性化後に実施した。本データは、PIF を PIFscr 対照と比較した IL10、IL4、及び TNF のレベルを検査する、対照対象における 24 ~ 96 時間の実験を示す。IL10+ 細胞の数は、対照と比較して有意に増加した。この増加に次いで、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA への曝露の 96 時間後に基線への回復が続いた。サイトカイン比を、対照と比較し、 30 nM の PIF は、炎症促進性 / 抗炎症性比 (TNF / IL10 / IL4) の低下をもたらした。加えて、これらのサイトカインに及ぼす $0 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA の効果を検査すると、用量依存性応答が確認され、ここで、対照と比較した PIF の最大効果は $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ において確認された。

【図 4 - 2】図 4 - 1 の続きである。

【図 4 - 3】図 4 - 1 の続きである。

【図 5 - 1】所与のサイトカインを発現する対象のリンパ球の百分率に及ぼす PIF の効果を検査し、本結果を健常対照の結果と比較した実験を示す。本実験は、PIF 単独を用いてかつ PHA による活性化後に実施した。本データは、PIF を PIFscr 対照と比較した IL10、IL4、及び TNF のレベルを検査する、対照対象における 24 ~ 96 時間の実験を示す。IL10+ 細胞の数は、対照と比較して有意に増加した。この増加に次いで、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA への曝露の 96 時間後に基線への回復が続いた。サイトカイン比を、対照と比較し、 30 nM の PIF は、炎症促進性 / 抗炎症性比 (TNF / IL10 / IL4) の低下をもたらした。加えて、これらのサイトカインに及ぼす $0 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA の効果を検査すると、用量依存性応答が確認され、ここで、対照と比較

した P I F の最大効果は $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ において確認された。

【図 5 - 2】図 5 - 1 の続きである。

【図 6】R P L 対象の健常対照対象に対する比較を示す。本データは、いくつかのサイトカインの主要な変化を示した。P H A の存在下で、T N F / I L 1 0 比は、R P L 対象及び対照対象の両方において低下した。対照的に、P I F の存在下で、T N F / I L 1 0 比は、R P L 対象において上昇したが、対照対象では低下した。I N F 基線発現は、R P L 対象においてより高く、P H A はさらに、R P L 対象において I N F 基線発現を亢進させたのに対し、対照対象においては 4 倍亢進が確認された。しかしながら、P I F の存在下では、I N F 基線発現は、R P L 対象においてほぼ 3 倍低下した。R P L 対象において、基線 I L 4 は高く、P H A によって影響されることはなかったが、P I F によって減少した。対照対象において、基線 I L 4 は低く、P H A は I L 4 を 4 倍増加させた

10

が、P I F は、I L 4 を同量だけ減少させた。I N F g / I L 4 比は、同様に挙動した。

【図 7 A】P I F が末梢血単核球 (P B M C) に直接的に作用することを示す。P I F と粗面 L P S (R a L P S) または滑面 L P S (O 5 5 : B 5 L P S) との相互作用能を、頑強かつ感受性のある表面プラズモン共鳴 (S P R) 法を介して評価した。その後、この 2 つの L P S 分子は、5、25 及び $100 \mu\text{M}$ 濃度において、P I F 結合センサーを通過した。本データは、検査した全濃度において、観察可能な L P S (リガンド) 及び P I F - センサー相互作用を何ら示さなかった。

【図 7 B】P I F が末梢血単核球 (P B M C) に直接的に作用することを示す。P I F と粗面 L P S (R a L P S) または滑面 L P S (O 5 5 : B 5 L P S) との相互作用能を、頑強かつ感受性のある表面プラズモン共鳴 (S P R) 法を介して評価した。その後、この 2 つの L P S 分子は、5、25 及び $100 \mu\text{M}$ 濃度において、P I F 結合センサーを通過した。本データは、検査した全濃度において、観察可能な L P S (リガンド) 及び P I F - センサー相互作用を何ら示さなかった。

20

【図 8 A】図 8 A は、S P R 系分析を示す。S P R 系分析は、高濃度で検査した場合でさえ、P I F がその受容体自体もその下流の仲介因子 T L R 4 - M D 2 も標的としないことを示した。この相互作用の欠如をさらに確認するために、T L R 4 - M D 2 表面も構築して、図 8 B に示すように、高濃度 (0.5mM) の P I F へ曝露した。

【図 8 B】図 8 A の続きである。

【図 9 A - 1】C D へ結合する P I F が用量依存的であることを示す。

30

【図 9 A - 2】図 9 A - 1 の続きである。

【図 9 B】C D へ結合する P I F が用量依存的であることを示す。

【図 9 C - 1】P I F が C D 4 + / C D 2 5 + / F o x P 3 + 細胞を特異的に標的とすることを示す。

【図 9 C - 2】図 9 C - 1 の続きである。

【図 9 C - 3】図 9 C - 1 の続きである。

【図 9 D - 1】C D 3 に対する P I F の結合特異性を文書化するためのアイソタイプ対照を示す。

【図 9 D - 2】図 9 D - 1 の続きである。

【図 10 A】C D 3 + / C D 4 + 細胞に対する F I T C - P I F の結合は特異的であり、対照として機能したスクランブル型 P I F (P I F s c r) によって再現されないことを示す。

40

【図 10 B】C D 4 + / C D 2 5 + / F o x P 3 + 細胞に対する F I T C - P I F の結合が用量依存的であり、当該結合が、最低限の結合を有していることが公知のスクランブル型 P I F と比較して、高いペプチド用量で増幅することを実証する。アイソタイプ対照の使用はフローサイトメトリー実験の妥当性を実証した。そのようなデータは、P I F が調節性 T 細胞を特異的に結合することを示す。

【図 11】C D 1 4 + 細胞の抽出特性を示す。赤色 (上部) の線は、総可溶化液特性であるのに対し、青色 (下部) の線は、濾液、すなわち、P I F カラムへ結合した、数が非常に少ないタンパク質である。この数の減少は、予期通りであり、特異的な P I F - タ

50

ンパク質間相互作用を示した。

【図12A】インビボで培養したPIFがヒト免疫系を標的とすることを実証する。PIFが未処置のマウスにおける免疫系を標的とどうかを判定するために、FITC-PIFを静脈内(IV)または腹腔内(IP)注射した後、それぞれ5分後及び30分後に屠殺した。体内のPIFの全体的な分布を、撮像を通じて分析した。データは、標識したPIFの5分以内の多量の取り込みが脾臓及び骨髄内に確認されたことを明らかにした。標識したペプチドの多量の蓄積が腎臓において観察され、迅速なクリアランスを反映した。IP注射後に、この取り込み及びクリアランスは、予期した通り、IV投与後よりも緩徐であった。このことは、腎臓がPIFクリアランスの腫瘍部位であることを示す。

【図12B】インビボで培養したPIFがヒト免疫系を標的とすることを実証する。PIFが未処置のマウスにおける免疫系を標的とどうかを判定するために、FITC-PIFを静脈内(IV)または腹腔内(IP)注射した後、それぞれ5分後及び30分後に屠殺した。体内のPIFの全体的な分布を、撮像を通じて分析した。データは、標識したPIFの5分以内の多量の取り込みが脾臓及び骨髄内に確認されたことを明らかにした。標識したペプチドの多量の蓄積が腎臓において観察され、迅速なクリアランスを反映した。IP注射後に、この取り込み及びクリアランスは、予期した通り、IV投与後よりも緩徐であった。このことは、腎臓がPIFクリアランスの腫瘍部位であることを示す。

【図12C】PIFがインビボでの免疫系を直接的に標的とすることを更に確認する。本発明者らは、未処置のマウスにおけるT細胞及びB細胞抗原受容体シグナル伝達の調節因子である、循環CD45+細胞とのFITC-PIF相互作用を検査した。2色フローサイトメトリーを用いて、本発明者らは、単離した循環マウス白血球とともにインキュベートしたFITC-sPIFが、12.5~50µg/mlのFITC-PIFへ曝露した場合、当該細胞の最多25%と結合し、検査したペプチド濃度間で差は認められず、それぞれ23~25%であることを発見した。このことは、未処置のマウスにおいて、免疫が賦活化された場合に観察されるものと対照的に、PIF標的が限定されることを示す。

【図12D-1】PIFがインビボでの免疫系を直接的に標的とすることを更に確認する。本発明者らは、未処置のマウスにおけるT細胞及びB細胞抗原受容体シグナル伝達の調節因子である、循環CD45+細胞とのFITC-PIF相互作用を検査した。2色フローサイトメトリーを用いて、本発明者らは、単離した循環マウス白血球とともにインキュベートしたFITC-sPIFが、12.5~50µg/mlのFITC-PIFへ曝露した場合、当該細胞の最多25%と結合し、検査したペプチド濃度間で差は認められず、それぞれ23~25%であることを発見した。このことは、未処置のマウスにおいて、免疫が賦活化された場合に観察されるものと対照的に、PIF標的が限定されることを示す。FITC-PIF結合を示す。

【図12D-2】図12D-1の続きである。

【図13-1】バイオインフォマティクス分析を用いて、14-3-3シートに対するPIFの結合を示す。このようなデータは、PIFが、特異的な結合部位においてこのクラスのタンパク質との直接的な相互作用を通じて、当該タンパク質へ結合することを確認する。この結合は、14-3-3がコ・リガンド2BTPと相互作用する箇所が生じる。

【図13-2】図13-1の続きである。

【図13-3】図13-1の続きである。

【図14A-1】CD3+細胞及びCD45+細胞に対するFITC-PIFの結合が、健常な血清へのPBMCの前曝露によって影響されないことを示す。

【図14A-2】図14A-1の続きである。

【図14A-3】図14A-1の続きである。

【図14B-1】CD3+細胞及びCD45+細胞に対するFITC-PIFの結合が、健常な血清へのPBMCの前曝露によって影響されないことを示す。

【図14B-2】図14B-1の続きである。

【図14B-3】図14B-1の続きである。

【図14C-1】対照的に、子宮内膜症患者の血清への曝露後に、FITC-PIF結合

10

20

30

40

50

が低下することを示す。フローサイトメトリーデータはまた、平坦化したパターンを示す。

【図14C-2】図14C-1の続きである。

【図14C-3】図14C-1の続きである。

【図14D-1】対照的に、子宮内膜症患者の血清への曝露後に、FITC-PIF結合が低下することを示す。フローサイトメトリーデータはまた、平坦化したパターンを示す。

【図14D-2】図14D-1の続きである。

【図14D-3】図14D-1の続きである。

【図15】タンパク質標的群をより良好に定義し、観察されたタンパク質の異なる群を連関する中心的なタンパク質を識別するために実施したクラスター分析の結果を示す。先導する相互作用因子は、ビメンチン、カルモジュリン、SET-核癌遺伝子(アポトーシス阻害薬)及びミオシン9(MYH9)とした。この分析は、4つの主要なタンパク質群、すなわちPDI/HSP、ビメンチン/14-3-3、免疫活性化、及び細胞骨格に關するタンパク質を識別した。

【図16】TLR4効果の伝達に關するタンパク質を識別するために検査したCD14+細胞において識別したPIF標的の分析を示す。本データは、TLR4作用に対して有意なPIFによって標的化される3つの主要なタンパク質、すなわちミオシン9、免疫賦活化に關するチモシンa1、及び14-3-3エータを示した。

【図17A】表15と關連して実施したクラスター分析を示す。

【図17B】表15と關連して実施したクラスター分析を示す。

【図18A】PBMCにおけるNFAT発現に及ぼすPIFの効果を示す。ここに示すデータは、PIFが、同時活性化したPBMCにおいてCD4賦活化した細胞を減少させることを示す。データ及びウェスタンブロット分析を示す。

【図18B】PBMCにおけるNFAT発現に及ぼすPIFの効果を示す。ここに示すデータは、PIFが、同時活性化したPBMCにおいてCD4賦活化した細胞を減少させることを示す。データ及びウェスタンブロット分析を示す。

【図19】妊娠していない雌馬(雌のウマ)のものと比較した、受精12日後の妊娠雌におけるPIFの検出を示す。

【図20】妊娠した及び妊娠していない両方の雌馬における雌馬免疫細胞集団に対して結合するFITC標識したPIFを示す。単球に対する結合は、両方の集団において有意である。

【図21-1】受胎時からのマウスへのPIF投与のプロトコルを示す。自然妊娠中断及びLPS誘発性妊娠中断に及ぼすPIFの効果を示す。正常マウス及びLPS曝露した妊娠マウスの両方における胎児の発達に關するPIFの促進も示す。

【図21-2】図21-1の続きである。

【発明を実施するための形態】

【0083】

いくつかの実施形態において、「着床前因子」及び「PIF」という用語は、移植前のヒト胚によって分泌される15アミノ酸ペプチドであるPIF-1₍₁₅₎を指す。いくつかの実施形態において、PIFは、生存可能な胚によってのみ分泌される。PIFは、胎児及び胎盤によって分泌され、母体循環において検出することができ、母体循環中のPIFの存在は、生児出生と有意に相関する。PIFは、脱落膜に作用して、局所免疫を調節し、胚-脱落膜接着を亢進し、アポトーシスを制御することによって、着床を促進する上で必須の役割を担っている。着床及び栄養膜侵襲を促進することを越えて、PIFは、胚に及ぼす自家栄養保護効果も有し、発達を促進し、再発性妊娠中断(RPL)の病歴のある患者に由来する血清の毒性を打ち消す。加えて、PIFは、糖尿病の若齢マウスモデルにおける免疫調節効果を示し、ここで、PIFは、全身のTh1/Th2サイトカインを調節し、糖尿病発症を長期間予防する。自己免疫性脳炎モデルにおいて、PIFは、重症麻痺を逆転させ、神経炎症促進性Th1型遺伝子及びタンパク質を下方調節し、活性化

10

20

30

40

50

型脾細胞に及ぼす直接的な作用を通じて I L 6 及び I L 1 7 の分泌を阻害する。有効な胚 - 母体相互作用に対する決定的な要素は、免疫抑制のない免疫寛容の発達である。P I F は、自己免疫障害、移植、及び逆転した脳損傷の前臨床モデルにおいて実証されるように、活性化された全身免疫に及ぼす頑強な効果を有しながら最低限の効果を発揮するよう、全身の免疫を調節する。

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態において、「着床前因子」または「P I F」は、合成 P I F - 1 と呼ばれ得、これは、天然のペプチドの効果を複製し、活性化された末梢血単核球 (P B M C) の増殖及びサイトカインの分泌に及ぼす強力な免疫調節効果を発揮し、P B M C 上の新規の部位を通じて作用し、公知の免疫抑制薬とは異なる効果を有する。いくつかの実施形態において、「着床前因子」または「P I F」は、何らかのこのようなアミノ酸に対して約 7 5、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、または 9 9 % 相同である、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9 から選択されるアミノ酸、その模倣体、及びこれらの組み合わせを指す。

10

【 0 0 8 5 】

妊娠中、母系の免疫系は、父系遺伝子によってコードされる胎児同種抗原を許容しなければならぬ。妊娠部位は、免疫抑制性環境によって支配される。いくつかの許容機序は、胎児 - 母体インターフェイスで動作する、すなわち、F a s - F a s L 相互作用による脱落膜へと循環する免疫細胞におけるアポトーシスの、免疫調節効果を伴う妊娠特異的ホルモンの分泌、補体タンパク質の存在、ヒト白血球抗原 (H L A - G 及び H L A - E) によるナチュラルキラー (N K) 細胞活性の阻害、T 細胞活性の阻害、及びインドールアミン 2 , 3 ジオキシゲナーゼ (I D O) による調節性 T 細胞増殖の誘導として説明されている。

20

【 0 0 8 6 】

樹状細胞 (D C) は、ほぼすべての末梢組織において、ならびに一次性及び二次性リンパ器官において認められる抗原提示細胞 (A P C) である。D C の機能は、末梢において抗原性材料を収集して、それをリンパ節へ輸送することであり、ここで、リンパ節は、未処置の T リンパ球によって走査される。D C のサブセット、抗原のタイプ、及び微小環境に応じて、D C は、免疫を活性化することができ、または免疫寛容を誘導することができる。

30

【 0 0 8 7 】

免疫寛容原性 D C は、免疫寛容に関与する。免疫寛容原性 D C は、D C の機能的状態を表し、T 細胞活性化を阻害して調節性 T 細胞の発達及び増殖を誘導及び促進する能力によって定義される。P I F は、末梢血単核球からの免疫寛容原性 D C の発生における役割を担い得る。未処置の C D 1 4 単核球は、P I F の一次標的である。

40

【 0 0 8 8 】

胎児 - 母体インターフェイスにおける D C は、妊娠中の免疫ホメオスタシスの維持に関与する。D C 活性化の状態は、胎児 - 母体の免疫学的平衡に影響する鍵となる担い手として明らかとなった。その上、マウス脱落膜における D C の機能及び表現型は、胎児 - 母体インターフェイスに存在するパラクリン仲介因子の効果によって制御される。胎児は、循環母系 D C の表現型及び機能の調節も誘導し得る。末梢 D C は、胸腺へと再循環し得、獲得した胸腺寛容の誘導に寄与する。

【 0 0 8 9 】

正常ヒト妊娠における末梢血 D C は、H L A - D R 分子の同時発生の上方調節なしで、同時刺激分子及び成熟化マーカーの上方調節を特徴とする不完全活性化の状態認められ

50

た。単球由来のDCにおけるHLA-DR上方調節の阻害は、妊娠した雌性動物由来の血清によって維持される。可溶性循環因子は、DCの状態の調節に寄与し得ることが可能である。

【0090】

末梢血骨髄樹状細胞(mDC)及び形質細胞様樹状細胞の百分率及び比は、妊娠していない女性よりも妊娠した女性において低い。この差は、免疫刺激性mDCのレベル低下が、母親と胎児の間の免疫学的不均衡または免疫寛容の一時的な逆転に關与することを示し得る。

【0091】

調節性T細胞は、免疫応答において重要な役割を担っている。調節性T細胞は、妊娠の母性認識に重要とみなされ、免疫障害を制御する上での重要な要素とみられている。PIFは、この重要な免疫系統を標的にし得、PIFの調節作用をさらに支持する。免疫系に及ぼすPIFの作用は、直接的であると考えられており、CD14、CD4、及びCD8免疫系統は、同じ、たいていは細胞内にある、タンパク質標的を共有する。PIFは、その投与後短時間以内で免疫系を直接標的とし、全身免疫と有効に相互作用する。

10

【0092】

対象の循環免疫細胞へのPIFペプチドの結合は、正常であろうと、上昇しようとして、低下しようとして、当該対象の免疫健康についての情報を提供し得、対象のための「免疫フィットネスセンサー」として潜在的に作用し得る。

【0093】

本組成物及び方法を説明する前に、本開示が、説明する特定の過程、組成物、または方法に限定されないことは理解されるべきである。なぜならそれらは変化し得るからである。本明細書において使用する用語が、特定の版または実施形態のみを説明する目的のためにあり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるであろう本開示の範囲を限定しよう意図するものではないことも理解されるべきである。別段の定義がない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語はすべて、当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に説明するものと類似のまたは等価の何らかの方法及び材料が、本開示の実施形態の実施または検査において使用することはできるが、好ましい方法、装置、及び材料をこれから説明する。本明細書に記載の公開物はすべて、それらの内容の全体が参照により組み込まれる。本開示が、先行発明の効力によってこのような開示よりも古いものとして権利を与えられてはいないということを認めることとして、本明細書のいかなるものも解釈されるものではない。

20

30

【0094】

本明細書で及び添付の特許請求の範囲において使用するように、単数形「a」、「an」、及び「the」には、文脈が明確にその他の点で記載しない限り、複数の参照物も含む。したがって、例えば、「ペプチド」に対する参照は、当業者に公知の1つ以上のペプチド及びその等価物などに対する参照等である。

【0095】

本明細書で使用する場合、用語「約」は、ともに使用されている数値のプラスまたはマイナス10%を意味する。それゆえ、約50%は、45%~55%の範囲で意味する。

40

【0096】

「投与すること」は、治療薬とともに使用する場合、標的対象、器官、組織若しくは細胞の中若しくは上へ治療薬を直接投与すること、または治療薬を患者へ投与して、それにより治療薬が標的とする対象、器官、組織または細胞に正の影響を与えることを意味する。したがって、本明細書で使用する場合、「投与すること」という用語は、PIFとともに使用する場合、PIFを標的となる対象、器官、組織、または細胞の中または上へ提供すること、PIFを患者へ、例えば静脈内注射によって全身的に提供し、それにより、治療薬が標的となる器官、組織または細胞へ到達すること、PIFをそのコード配列の形態で標的組織へ(例えば、いわゆる遺伝子療法技術によって)提供することを含むことができるが、これらに限定しない。「投与すること」は、非経口、経口または局所投与によっ

50

て、あるいは他の公知の技術と組み合わせたこのような方法によって達成され得る。

【0097】

「類似体」という用語は、天然の全長のタンパク質と構造上類似しており、かつ当該類似体が元とする天然の全長タンパク質の少なくとも1つの生化学的活性または生物活性を共有する任意のペプチド模倣体、機能的断片、突然変異体、塩、医薬として許容され得る塩、多形、または非天然ペプチドを指す。いくつかの実施形態において、「類似体」という用語は、少なくとも1つのアミノ酸及び少なくとも1つの非天然アミノ酸残基を含む任意のポリペプチドを指し、ここで、当該ポリペプチドは、当該類似体が元とする天然の全長タンパク質の少なくとも1つの生化学的活性または生物活性を共有する。例えば、PIFの場合、PIF類似体は、野生型PIFと70%以上相同であり得、野生型PIFの少なくとも1つの結合特性を共有し得る。PIFは、複数の受容体へ結合することが公知である。それゆえ、いくつかの実施形態において、類似体は、野生型PIFと構造上類似しているが天然のPIFが結合する天然のリガンドのうちの1つへのみ結合するPIFペプチド模倣体、機能的断片、突然変異体、バリエーション、塩、多形、または非天然ペプチドを指す。

10

【0098】

本明細書で使用する「動物」または「患者」または「対象」という用語には、野生動物、家畜及び牧畜のようなヒト及び非ヒト脊椎動物を含むが、これらに限定しない。いくつかの実施形態において、「動物」または「患者」または「対象」という用語はヒトを指す。いくつかの実施形態において、対象はウマであり得る。いくつかの実施形態において、対象はマウスであり得る。いくつかの実施形態において、対象は、単離した細胞試料の源として機能する哺乳類動物であり得る。いくつかの実施形態において、対象は、細胞試料が単離または提供される非ヒト動物であり得る。いくつかの実施形態において、対象は、細胞試料が単離または提供される哺乳類動物であり得る。「哺乳類動物」という用語は、ヒト及び非ヒトの両方を包含し、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ヤギ、ウシ、ウマ、及びブタを含むがこれらに限定しない。

20

【0099】

「免疫調節 (immune - modulating)」または「免疫調節 (immunomodulating)」は、本開示の化合物が免疫系の1つ以上の態様を変化させる (調節する) 能力を指す。免疫系は、生体を感染から、ならびに複数の細胞間相互作用によってならびにサイトカイン、ケモカイン、リンホカイン及び抗体を含む、免疫細胞に対して自己分泌効果、パラクリン効果、及び内分泌効果を及ぼす可溶性因子を産生することによって互いに調節するリンパ球、マクロファージ、及び他の抗原提示細胞を包含する細胞機序及び体液機序による外来抗原から防護するよう機能する。

30

【0100】

「アレイ」は、当該用語が本明細書で使用される場合、典型的には、たがいにに関して空間的に離れた位置における、通常は、可能性のある相互作用パートナー (例えば、細胞) または他の試薬、基質などへの、配置された実体 (例えば、PIFまたはPIF類似体) の同時曝露を可能にするフォーマットにおける実体の配置を指す。いくつかの実施形態において、アレイは、固体支持体上の空間的に離れた位置に配置された実体を含む。いくつかの実施形態において、アレイ上の空間的に離れた位置は (その形状とは無関係に)、「スポット」と呼ぶ。いくつかの実施形態において、アレイ上の空間的に離れた位置は、互いに関して規則正しいパターンで (例えば、格子において) 配置される。

40

【0101】

「改善する」という用語は、本開示が、提供、適用または投与中の対象、器官、組織または細胞の様相、形態、特徴及び/または物理的屬性のいずれかを変化させることを伝えるために使用する。例えば、基準と比較した形態の変化は、循環免疫細胞に対するPIFの結合の減少、循環免疫細胞に対するPIFの結合の増加、循環免疫細胞に対するPIFの結合の変化がないこと、DCに対するPIFの結合の減少、DCに対するPIFの結合の増加、またはDCに対するPIFの結合の変化がないことのうちのいずれか単独によっ

50

てまたは組み合わせで示され得る。

【0102】

「阻害すること」という用語には、症状の発症を予防し、症状を緩和し、または疾患、容態若しくは障害を排除するための、本開示の化合物の投与を含む。

【0103】

本明細書で使用する場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、相互交換可能に使用し、アミド結合または非アミド等価物によって共有結合した2個以上のアミノ酸を指す。本開示のペプチドは、任意の長さであることができる。例えば、当該ペプチドは、長さ5～12、12～15、15～18、18～25、25～50、50～75、75～100、またはそれより長いなど、約2～約100以上の残基を有することができる。好ましくは、ペプチドは約2～約18残基である。本開示のペプチドには、L型異性体、D型異性体、ならびにL型異性体及びD型異性体の組み合わせを含む。当該ペプチドには、タンパク質の翻訳後プロセッシングと典型的に関係した修飾、例えば、環化（例えば、ジスルフィド結合またはアミド結合）、リン酸化、グリコシル化、カルボキシル化、ユビキチン化、ミリスチル化、または脂質修飾を含むことができる。

10

【0104】

「医薬として許容され得る」によって、担体、希釈剤または賦形剤が製剤または組成物の他の成分と適合性がなければならずかつ当該担体、希釈剤または賦形剤の受け手に対して有害であってはならないことが意味される。

【0105】

本明細書で使用する場合、「治療薬」という用語は、患者の望ましくない容態または疾患を治療、根絶、緩解、予防または改善するために利用する薬剤を意味する。一部において、本開示の実施形態は、RPLに関する対象の病歴またはRPLに対する素因を説明し得る免疫調節不全を含む、免疫調節不全についてのマーカーとして対象の循環免疫細胞に対するPIFの結合の検査方法に関する。

20

【0106】

組成物の「治療有効量」または「有効量」は、所望の効果を達成するために、すなわち、対象の循環免疫細胞との正常なまたは異常な結合を実証するために算出された事前に決めておいた量である。本方法によって企図される活性には、医学的治療薬及び/または診断用試薬適用の両方を含む。治療効果及び/または予防効果を得るために本開示により投与する化合物の具体的な用量はもちろん、例えば、投与する化合物、投与経路、及び検査中の容態を含む、症例を取り囲む特定の状況によって決定されるであろう。本化合物は、広範な薬用量範囲にわたって有効であり、例えば、投与する薬用量は通常、0.001～10mg/kgの範囲内に、より通常には0.1～3mg/kgの範囲に収まるであろう。しかしながら、投与する有効量は、検査する容態、投与する化合物の選択、及び選択する投与経路を含む関連状況の点で、医師または科学者によって判断されるであろうし、それゆえ、上述の薬用量範囲は、いかなる方法においても、本開示の範囲を制限するよう意図するものではないことが理解されるであろう。本開示の複数の実施形態の治療有効量の化合物は典型的には、生理学的に許容される賦形剤組成物で投与する場合、有効な全身濃度または組織中の局所濃度に到達するのに十分であるような量である。診断試薬の目的のために、有効量とは、試料または試料の構成要素へ結合するのに十分な化合物（生体外で固定されているまたは溶液中にある場合、PIFまたはその類似体など）の量である。いくつかの実施形態において、試料の構成要素は、1つの細胞または複数の細胞であり得る。

30

40

【0107】

概して、「試料」という用語は、本明細書で説明するように、関心対象の源から得られるまたは当該源に由来する生体試料を指す。いくつかの実施形態において、関心対象の源は、動物またはヒトのような生体を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、生体組織または生体液を含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、骨髄、血液、血球、腹水、組織または微小針生検、細胞含有体液、遊離浮遊核酸、痰、唾液、尿、脳脊髄

50

液、腹腔水、胸水、糞便、リンパ液、婦人科系流体、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻腔スワブ、乳管洗浄物若しくは気管支肺胞洗浄物などの洗浄物若しくは灌注物、吸引物、搔爬物、組織生検検体、外科的検体、糞便、他の身体流体、分泌物、及び/若しくは排泄物、ならびに/またはこれら由来の細胞などであり得、あるいはそれらを含み得る。いくつかの実施形態において、生体試料は、個体から得た細胞であり、または当該細胞を含む。いくつかの実施形態において、試料は、任意の適切な手段によって関心対象の源から直接得た「一次試料」である。例えばいくつかの実施形態において、一次生体試料は、生検（例えば、微小針吸引物または組織生検またはパンチ生検）、手術、体液（例えば、血液、リンパ液、糞便など）の収集物からなる群から選択する方法によって得る。いくつかの実施形態において、文脈から明らかであろうように、「試料」という用語は、一次試料を加工することによって（例えば、一次試料の1つ以上の構成要素を除去することによって及び/または一次試料へ1つ以上の薬剤を添加することによって）得る調製物を指す。例えば、半透膜を用いた濾過である。そのような「加工した試料」は、例えば、試料から抽出した核酸若しくはタンパク質、あるいはmRNAの増幅または逆転写、ある特定の構成要素の単離及び/または精製などのような技術へ一次試料を提供することによって得た核酸またはタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、試料は、対象から得た何らかの流体、細胞、組織、または収集物あるいはこれらの組み合わせである。試料は、研究目的、診断目的、治療目的、またはその他の目的のために得ることがある。本明細書に開示する方法のうちいずれも、1つまたは複数の試料をPIFペプチドまたはその類似体へ試料を曝露するステップの前に、試料を得るまたは単離するステップを含み得る。試料には、例えば、血液、血液成分、血漿、細胞、組織、毛髪、皮膚、尿、または糞便の試料を含むがこれらに限定しない。試料は、静脈穿刺、生検、流体収集、頬側スワブ、指穿刺、またはその他の手段のような方法によって得られ得る。いくつかの実施形態において、試料は、妊娠した雌性に由来し、妊娠していない雌性から採取した類似のまたは同じタイプの試料と比較される。いくつかの実施形態において、試料は、ヒトまたは他の哺乳類動物（ウシまたはウマなど）から採取する。いくつかの実施形態において、試料は、胎盤細胞、子宮内膜細胞、脾細胞、血球、リンパ球または免疫細胞のうち1つまたは複数を含む。

10

20

30

40

50

【0108】

本明細書で使用する「治療する」、「治療した」、または「治療すること」という用語は、治療処置及び予防手段または防止手段の両方を指し、ここで、目的は、望ましくない生理学的容態、障害または疾患を予防または遅延させること（弱体化させること）、あるいは有益なまたは所望の臨床結果を得ることである。本開示の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果には、症状の緩解、容態、障害または疾患の程度の減弱、容態、障害または疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、容態、障害または疾患の発症の遅延または進行の遅延、容態、障害または疾患の状態の緩解、及び寛解（部分的であろうと全体的であろうと）を、検出可能であろうと検出不可能であろうと、または容態、障害若しくは疾患の亢進若しくは改善を含むが、これらに限定しない。治療には、過剰なレベルの副作用を有さない臨床的に有意な応答を惹起することを含む。治療には、治療を受けていない場合に期待される生存と比較して生存を長期化することも含む。

【0109】

本明細書で使用する場合、「十分な」及び「生じるのに十分な」という用語は概して、公知の転帰をもたらすのに適切な現象、条件、治療、または介入を説明する。「子宮内膜症を発症するのに十分な」という用語は、子宮内膜症と相関する免疫機能障害のレベルを意味する。「RPLを発症するのに十分な」という用語は、再発性妊娠中断（RPL）と相関する免疫機能障害のレベルを意味する。「免疫機能障害を発症するのに十分な」という用語は、免疫機能障害を発症するのに十分な免疫低下のレベルを意味する。

【0110】

本明細書で使用する場合、「結合事象」という用語は、少なくとも2つの異なる分子間での共有結合または非共有結合を指す。いくつかの実施形態において、結合は、受動的な

静電性非共有結合を指す。いくつかの実施形態において、結合事象は、特定のリガンドが1つ以上のパートナーと結合する（例えば非共有結合する）緊密度及び/または特定のリガンドが1つ以上のパートナーから解離する速度若しくは頻度の尺度である。当該技術分野で公知のように、種々の技術のうちの一つを利用して、結合事象を決定することができる。多くの実施形態において、結合事象は、親和性の尺度を表す。いくつかの実施形態において、結合事象は、細胞とPIFまたはその類似体間で測定する親和性である。いくつかの実施形態において、細胞がPIFまたはその類似体へ結合する事象は、細胞が他のペプチドへ結合する親和性と比較して表す。いくつかの実施形態において、PIFまたはその類似体に対する細胞の相対的な結合事象は、アッセイするペプチドに対する細胞の結合事象全部の平均と比較した倍数変化として表す。いくつかの実施形態において、結合事象は、相対的な結合親和性である。いくつかの実施形態において、結合親和性は0である。いくつかの実施形態において、相対的な結合親和性は、約0～約1である。いくつかの実施形態において、相対的な結合親和性は、対照または一連の対照と比較して約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多くの倍数差である。いくつかの実施形態において、相対的な結合親和性は、約0～約-1である。いくつかの実施形態において、相対的な結合親和性は、対照または一連の対照と比較した約-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10またはそれより多くの倍数差である。

10

【0111】

本明細書で使用する場合、「結合特性」という用語は、2つ以上の分子の結合と関連する1つまたは複数の値を表すデータの集積を指す。いくつかの実施形態において、結合特性は、対象由来の試料と関係している。いくつかの実施形態において、「結合特性」という用語は、アミノ酸配列（PIFまたはその機能的断片など）が、免疫細胞または免疫細胞によって発現されるタンパク質を含む生体分子及び/または細胞へ結合、付着、吸収、または相互作用する1つまたは複数の特徴的な方法を含む1セットのデータを指す。

20

【0112】

一般的に言えば、「組織」という用語は、特定の機能の性能において連合した、同様に特化した細胞の何らかの集まりを指す。

【0113】

本明細書で使用する場合、「免疫細胞」は、免疫応答に関与する免疫細胞である。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、末梢血単核球（PBMC）、顆粒球、好塩基球、好酸球、好中球、マスト細胞、単球、マクロファージ、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞（DC）、B細胞、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、1つまたは複数のTLR、TCR、またはBCRのうちの一つまたは複数を発現する細胞から選択する細胞の集団のうちの一つまたは組み合わせを含む。免疫応答は、後天性または先天性であり得、関与する細胞には、顆粒球、好塩基球、好酸球、好中球、マスト細胞、単球、マクロファージ、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞（DC）、B細胞、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、抗体、リンパ球、サイトカイン、トール様受容体（TLR）、B細胞受容体（BCR）、T細胞受容体（TCR）、調節性T細胞、及び免疫応答に関与し得るその他の細胞を含み得るが、これらに限定しない。

30

【0114】

本明細書で使用する場合、「固体支持体」は、分離方法の固定相を指し、アミノ酸配列を固定化することができる非水性マトリックスである。そのような支持体には、アガロース、セファロース、ガラス、シリカ、ポリスチレン、コロジオン炭（collodion charcoal）、ビーズ、砂、及びその他の適切な材料を含む。何らかの適切な方法を使用して、アミノ酸配列を固体支持体へ固定または吸着することができ、固体支持体がリガンドまたは分子へ結合する能力の少なくとも一部を保有することができる。固体支持体は、ディッシュ、プレート、カラム、シリカチップの形態、またはペプチドを表面へ架橋するのに十分な何らかのマトリックス材料を任意に含むその他の適切な形態にあり得る。

40

【0115】

50

本明細書で使用する場合、「機能的断片」という用語は、断片を元とする野生型ポリペプチドと類似のまたは実質的に類似の少なくとも部分的な生体機能を保有するのに十分な長さのアミノ酸配列の何らかの部分の意味する。いくつかの実施形態において、細胞外マトリックスと結合したポリペプチドの機能的断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドに関して75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を含む、及び表4におけるポリペプチドへ結合する1つまたは複数のリガンドへの少なくとも部分的な結合を保有するのに十分な長さを有するポリペプチドである。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示する何らかのポリペプチドの断片であり、約20以下、約19以下、約18以下、約17以下、約16以下、約15以下、約14以下、約13以下、約12以下、約11以下、約10以下、約9以下、約8以下、約7以下、約6以下、約5以下、約4以下、約3以下、または約2以下の連続したアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約20以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約19以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約18以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約17以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約16以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約15以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約14以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約13以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約12以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約11以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約10以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約9以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約8以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約7以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約6以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約5以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約4以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約3以下のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、断片は、表4に開示した何らかのポリペプチドの断片であり、約2以下のアミノ酸の長さを有する。

【0116】

本明細書で使用する場合、「検査すること」は、1つまたは複数の要素間の特定の物理的特徴の存在または非存在を観察、定量化及び/または検出する作業を意味する。開示した方法の場合、いくつかの実施形態において、検査する作業は、PIFまたはその機能的断片が分子、アミノ酸配列、及び/または細胞と結合、会合またはそうでなければ相互作用する程度をモニター、観察、及び/または測定することを指す。

【0117】

本明細書で使用する場合、「分類すること」は、ある群の人間、対象、及び/または実体を、ある特定の容態(複数可)、特徴(複数可)、及び/または物理的特長を用いて割り当てるまたは特徴づけるまたは関連付ける作業を意味する。

10

20

30

40

50

【0118】

本明細書で使用する場合、「曝露すること」は、何かへ開いた要素を配置する作業を意味する。いくつかの実施形態において、曝露することは、環境の中に、及び要素と別の物質、試薬、条件、または刺激との接触を可能にするのに十分な条件下に要素を配置することを指す。いくつかの実施形態において、曝露するという用語は、PIFまたはその機能的断片を物質、試薬、または条件と接触させ、それにより当該接触が効果を生じることを含む。いくつかの実施形態において、曝露することは、有効量のPIFを対象へ投与することを含む。

【0119】

本明細書で使用する場合、「比較すること」は、2つの要素間の類似性または相違性を推定、測定、または評価する作業を意味する。本開示のいくつかの実施形態において、比較するステップは、実験、ある群の実験、またはこのような実験に使用するアルゴリズムにおいて適用されるような対照データに対してデータを収集及び/または分析及び/または正規化して、それにより量が測定され及び/または当該量に対応する値が、実験(複数可)の特長、条件、様式、対照または変数へ割り当てられることを含む。いくつかの実施形態において、比較することは、2つ以上のデータ点及び/またはデータ値間の類似性または相違性を観察することを含む。

【0120】

本明細書で使用する場合、「免疫調節不全」は、対象における免疫学的不均衡を特徴とする疾患または障害または容態を意味する。いくつかの実施形態において、免疫調節不全は、獲得した環境因子(病原体など)及び/または遺伝因子によって生じる対象における免疫学的不均衡を指す。いくつかの実施形態において、免疫調節不全は、対象と比較した異常な免疫細胞機能を指す。いくつかの実施形態において、異常な免疫細胞機能は、抗原特異的免疫応答を生じることのできるT細胞の不適切なクローン増殖によって顕著であり得る。いくつかの実施形態において、免疫調節不全は、再発性妊娠中断など、容態を獲得または経験することに対して対象をより許容させ得ることの可能な不適切な生得的免疫系反応を含む。免疫調節不全によって生じ得る疾患には、例えば、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アジソン病、I型(インスリン依存性)糖尿病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、紅斑性狼瘡、多発性硬化症、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、円形脱毛症(*alopecia greata*)、硬直性脊椎炎(*anklosing spondylitis*)、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖症候群(*ALPS*)、自己免疫性血小板減少性紫斑病、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、小児脂肪便症性皮膚炎(*celiac sprue-dermatitis*)、慢性疲労症候群性免疫不全症候群(*chronic fatigue syndrome immune deficiency syndrome*)(*CFIDS*)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、癩痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、CREST症候群、クローン病、デゴス病(*Degos' disease*)、円板状狼瘡、本態性混合性クリオグロブリン血症、線維筋痛症性線維筋炎(*fibromyalgia-fibromyositis*)、ギラン・バレー症候群、特発性肺線維症、特発性塞栓血小板減少性紫斑病(*ITP*)、IgA腎症、若年性関節炎、メニエール病、混合性結合組織病、尋常性天疱瘡、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群(*polyglandular syndrome*)、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、全身硬直症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、及びウエゲナー肉芽腫症を含み得る。

【0121】

本出願は、化合物を説明する。いかなる特定の理論によっても結び付けられることなく、本明細書に説明する化合物は、PIFの1つのまたは複数の受容体を介したPIF仲介性シグナル伝達のアゴニストとして作用する。したがって、これらの化合物は、RPL、

10

20

30

40

50

子宮内膜症、及び免疫調節不全の、しかしこれらに限定しない、治療において有意な治療上の利点を提供するシグナル伝達経路を調節する。本開示の化合物は非溶媒和化形態及び、水和形態を含む溶媒和化形態で存在し得る。本開示の化合物は、酸付加塩及び/または塩基付加塩を含むがこれらに限定しない、両方の医薬として許容され得る塩を形成することもできる。さらに、本開示の化合物は、無定形形態（非結晶形態）を含む種々の固体状態で、包接化合物、プロドラッグ、多形、生体加水分解可能なエステル、ラセミ混合物、非ラセミ混合物の形態で、または光学的に純粋な鏡像異性体及びジアステレオマーを含むがこれらに限定しない精製された立体異性体として存在し得る。概して、これらの形態はすべて、先に説明し及び本開示の範囲内に包含されるよう企図するように、本化合物の遊離塩基形態または遊離酸形態に対する代替的な形態として使用することができる。

10

【0122】

「多形」は、化合物の固体結晶形態を指す。同じ化合物の異なる多形は、異なる物理的、化学的及び/または分光学的特性を呈することができる。異なる物理的特性には、安定性（例えば、熱または光に対する）、圧縮率及び密度（製剤及び製品製造において重要）、ならびに解離速度（生物学的利用率に影響する可能性がある）を含むがこれらに限定しない。多形に関する異なる物理的特性は、多形の加工に影響を及ぼす可能性がある。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、本明細書に開示する組成物のうちのいずれかの少なくとも1つの多形を含む。

【0123】

先に記載したように、本開示の化合物はとりわけ、医薬として許容され得る塩、エステル、アミドまたはプロドラッグとして投与することができる。「塩」という用語は、本開示の化合物の無機塩及び有機塩を指す。当該塩は、化合物の最終的な単離及び精製の間インサイツで、あるいは遊離の塩基形態または酸形態における精製した化合物を、適切な有機塩基若しくは無機塩基または有機酸若しくは無機酸と個別に反応させること、及びこのように形成した塩を単離することによってインサイツで調製することができる。代表的な塩には、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、ホウ酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、及びラウリルスルホン酸塩、ならびにこれらに類するものを含む。当該塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、及びこれらに類するもののようなアルカリ金属及びアルカリ土類金属、ならびにアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン、及びこれらに類するものを含むがそれらに限定しない非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、及びアミンカチオンを含んでもよい。例えば、S. M. Berge, et al, "Pharmaceutical Salts," J Pharm Sci, 66: 1~19 (1977)を参照されたい。「塩」という用語は、無機酸及び/または有機酸を用いて形成された酸性塩ならびに無機塩基及び/または有機塩基を用いて形成された塩基性塩を指す。これらの酸及び塩基の例は、当業者に周知である。このような酸付加塩は通常、医薬として許容され得るであろうが、医薬として許容され得ない酸の塩は、本化合物の調製及び精製において有用となることがある。塩には、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、ピルビン酸塩、酢酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩及びベンゼンスルホン酸塩から形成される塩を含む。

20

30

40

【0124】

いくつかの実施形態において、PIFまたはPIF類似体またはPIF突然変異体のいずれかを含む組成物の塩は、遊離塩基、またはその塩、鏡像異性体若しくはラセミ化合物を適切な酸の1つ以上の等価物と反応させることによって形成され得る。いくつかの実施形態において、本開示の医薬として許容され得る塩は、少なくとも1つの塩基性基または少なくとも1つの塩基性ラジカルを有する類似体を指す。いくつかの実施形態において、

50

本開示の医薬として許容され得る塩は、酸付加塩を形成する遊離アミノ基、遊離グアニジノ基、ピラジニルラジカル、またはピリジニルラジカルを含む。いくつかの実施形態において、本開示の医薬として許容され得る塩は、(例えば)塩酸、硫酸若しくはリン酸のような無機酸を有する、または適切な有機カルボン酸若しくはスルホン酸、例えばカルボン酸若しくはスルホン酸、例えばトリフルオロ酢酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、ヒドロキシマレイン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸若しくはシュウ酸のような脂肪族モノ若しくはジカルボン酸、またはアルギニン若しくはリジンのようなアミノ酸、安息香酸、2-フェノキシ安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸のような芳香族カルボン酸、マンデル酸若しくは桂皮酸のような芳香族-脂肪族カルボン酸、ニコチン酸若しくはイソニコチン酸のようなヘテロ芳香族カルボン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸若しくは2-ヒドロキシエタンスルホン酸のような脂肪族スルホン酸、または芳香族スルホン酸、例えばベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸若しくはナフタレン-2-スルホン酸を有する本化合物の酸付加塩である類似体を指す。いくつかの塩基性基が存在する場合、モノ酸添加塩またはポリ酸添加塩が形成され得る。反応は、真空下でまたは凍結乾燥によって除去され得る、塩が不溶性である溶媒若しくは媒体において、または塩が可溶性である溶媒、例えば、水、ジオキサン、エタノール、テトラヒドロフランまたはジエチルエーテル、あるいは溶媒の混合物において実施され得る。反応は、メタセシス法でもあり得、当該反応は、イオン交換樹脂上で実施され得る。いくつかの実施形態において、塩は、患者によって生理学的に許容される塩であり得る。本開示による塩は、その無水形態において、または水和した結晶形態(すなわち、水の1つ以上の分子と複合体形成したまたは結晶化している)にあるように認められる。いくつかの実施形態において、PIFの塩は、固体支持体へ固定化され得、または医薬として許容され得る担体中で再懸濁され、本明細書に開示する何らかの方法において使用される溶液中にあり得る。

10

20

【0125】

本開示の化合物の医薬として許容され得るエステル为例としては、 $C_1 \sim C_8$ アルキルエステルが挙げられる。許容され得るエステルには、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルキルエステル、及びベンジルのようなアリールアルキルエステルも含む。 $C_1 \sim C_4$ アルキルエステルが通常使用される。本開示の化合物のエステルは、当該技術分野で周知の方法により調製してもよい。本開示の化合物の医薬として許容され得るアミド为例としては、アンモニア、第一級 $C_1 \sim C_8$ アルキルアミン、及び第二級 $C_1 \sim C_8$ ジアルキルアミンに由来するアミドが挙げられる。第二級アミンの場合、アミンはまた、少なくとも1個の窒素原子を含有する5員または6員のヘテロシクロアルキル基の形態にあってもよい。アンモニア、 $C_1 \sim C_3$ 第一級アルキルアミン及び $C_1 \sim C_2$ ジアルキル第二級アミンに由来するアミドが通常使用される。本開示の化合物のアミドは、当業者に周知の方法により調製してもよい。

30

【0126】

本明細書で使用する場合、「保存的」アミノ酸置換は、以下の表1~表3に示すように定義し得る。本開示のPIF化合物には、保存的置換(核酸配列またはアミノ酸配列のいずれかに由来)が、本開示のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾によって導入されたPIF化合物を含む。アミノ酸は、物理的特性ならびに二次及び三次タンパク質構造に対する寄与により分類することができる。保存的置換は、あるアミノ酸から、類似の特性を有する別のアミノ酸への置換として、当該技術分野で認識されている。いくつかの実施形態において、保存的置換は、ある核酸から、類似の特性を有する、またはコードする場合、類似の結合親和性を有する別の核酸への置換として、当該技術分野で認識されている。例示的な保存的置換を、表1に示す。

40

【表 1】

表1-保存的置換I

側鎖の特徴	アミノ酸
脂肪族	
非極性	G A P I L V F
極性-非帯電	C S T M N Q
極性-帯電	D E K R
芳香族	H F W Y
その他	N Q D E

10

【0127】

代替的に、保存的アミノ酸は、表2に示すようにLehninger, (Biochemistry, 第2版; Worth Publishers, Inc. ニューヨーク州ニューヨーク市(1975), 71~77頁)に説明されるように群分けすることができる。

【表 2】

表2-保存的置換II

側鎖の特徴	アミノ酸
非極性(疎水性)	
脂肪族:	A L I V P
芳香族:	F W Y
含硫:	M
境界性:	G Y
非帯電-極性	
ヒドロキシル:	S T Y
アミド:	N Q
スルフヒドリル:	C
境界性:	G Y
正に帯電(塩基性):	K R H
負に帯電(酸性):	D E

20

30

【0128】

代替的に、例示的な保存的置換を、表3に示す。

【表 3】

表 3 — 保存的置換III

元の残基	例示的な置換	
Ala (A)	Val Leu Ile Met	
Arg (R)	Lys His	
Asn (N)	Gln	
Asp (D)	Glu	10
Cys (C)	Ser Thr	
Gln (Q)	Asn	
Glu (E)	Asp	
Gly (G)	Ala Val Leu Pro	
His (H)	Lys Arg	
Ile (I)	Leu Val Met Ala Phe	
Leu (L)	Ile Val Met Ala Phe	20
Lys (K)	Arg His	
Met (M)	Leu Ile Val Ala	
Phe (F)	Trp Tyr Ile	
Pro (P)	Gly Ala Val Leu Ile	
Ser (S)	Thr	
Thr (T)	Ser	30
Trp (W)	Tyr Phe Ile	
Tyr (Y)	Trp Phe Thr Ser	
Val (V)	Ile Leu Met Ala	

【 0 1 2 9 】

本明細書で使用する場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、相互交換可能に使用し、アミド結合または非アミド等価物によって共有結合した2つ以上のアミノ酸を指す。本開示のペプチドは、任意の長さであることができる。例えば、本ペプチドは、長さ5～12、12～15、15～18、18～25、25～50、50～75、75～100、またはそれより長いなどの約2～約100以上の残基を有することができる。好ましくは、ペプチドは、長さ約2～約18残基である。本開示のペプチドには、l型及びd型異性体、ならびにl型及びd型異性体の組み合わせも含む。本ペプチドには、タンパク質の翻訳後プロセッシングと典型的に関係する修飾、例えば、環化（例えば、ジスルフィド結合またはアミド結合）、リン酸化、グリコシル化、カルボン酸化、ユビキチン化、ミリスチル化、または脂質修飾を含むことができる。いくつかの実施形態において、本開示の組成物または医薬組成物は、表4に示すPIF配列のうちの任意の1つまたは組み合わせと約70%以上、約75%以上、約79%以上、約80%以上、約85%以上、約86%以上、約87%以上、約90%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上、約99%の相同性を共有

する、表 4 に示す任意の P I F 配列の類似体に関する。いくつかの実施形態において、P I F または P I F ペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29 から選択するアミノ酸配列、これらの模倣体、または任意のこのようなアミノ酸配列と約 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的なこれらの機能的断片を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 20 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 21 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 22 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 23 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 24 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 25 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 26 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 27 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 28 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F は、配列番号 29 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相同的な配列を含む、当該配列から本質的になる、または当該配列からなる、アミノ酸配列を指し得る。いくつかの実施形態において、P I F 突然変異体は、X V Z I K P G S A N K P S D、X V Z I K P G S A N K P S X V Z I K P G S A N K P X V Z I K P G S A N K X V Z I K P G S A N、X V Z I K P G S A、X V Z I K P G S、X V Z I K P G、X V Z I K P、X V Z I K、X V Z I、X V Z から選択される配列を含み、式中、X は、非天然アミノ酸または天然アミノ酸である。いくつかの実施形態において、P I F 突然変

異体は、XVZIKPGSANKPSD、XVZIKPGSANKPS XVZIKPGSANKP XVZIKPGSANK XVZIKPGSAN、XVZIKPGSA、XVZIKPGS、XVZIKPG、XVZIKP、XVZIK、XVZI、XVZから選択される配列を含み、式中、Xは、非天然アミノ酸または天然アミノ酸であるが、例外は、Zがアルギニンの場合、Xはメチオニンではなく、及びXがメチオニンの場合、Zはアルギニンではないことである。いくつかの実施形態において、PIFの類似体または突然変異体は、合成でありまたは合成的に作製される。

【0130】

本明細書に開示するペプチドにはさらに、アミノ酸の構造的及び機能的類似体を有する化合物、例えば、合成または非天然のアミノ酸（ノルロイシンなど）またはアミノ酸類似体または非天然側鎖を有するペプチド模倣体を、当該模倣体が、本開示の化合物の1つ以上の機能または活性を共有する限り、含む。本開示の化合物にはそれゆえ、「模倣体」形態及び「ペプチド模倣体」形態を含む。本明細書で使用する場合、「非天然側鎖」は、複数のアミノ酸からなるポリペプチド鎖の主鎖を形成しない炭素原子、炭素原子、または炭素原子に対する共有結合によって結合した原子の修飾されたまたは合成の鎖である。ペプチド類似体は、ノルバリン、tert-ブチルグリシン、フェニルグリシン、He、7-アザトリプトファン、4-フルオロフェニルアラニン、N-メチル-メチオニン、N-メチル-バリン、N-メチル-アラニン、サルコシン、N-メチル-tert-ブチルグリシン、N-メチル-ロイシン、N-メチル-フェニルグリシン、N-メチル-イソロイシン、N-メチル-トリプトファン、N-メチル-7-アザトリプトファン、N-メチル-フェニルアラニン、N-メチル-4-フルオロフェニルアラニン、N-メチル-トレオニン、N-メチル-チロシン、N-メチル-バリン、N-メチル-リジン、ホモシステイン、及びTyrから選択する非天然アミノ酸のうちの1つまたは組み合わせを含み得、Xaa2は非存在であり、またはAla、D-Ala、N-メチル-アラニン、Glu、N-メチル-グルタミン酸、D-Glu、Gly、サルコシン、ノルロイシン、Lys、D-Lys、Asn、D-Asn、D-Glu、Arg、D-Arg、Phe、D-Phe、N-メチル-フェニルアラニン、Gln、D-Gln、Asp、D-Asp、Ser、D-Ser、N-メチル-セリン、Thr、D-Thr、N-メチル-トレオニン、D-Pro D-Leu、N-メチル-ロイシン、D-Ile、N-メチル-イソロイシン、D-Val、N-メチル-バリン、tert-ブチルグリシン、D-tert-ブチルグリシン、N-メチル-tert-ブチルグリシン、Trp、D-Trp、N-メチル-トリプトファン、D-Tyr、N-メチル-チロシン、1-アミノシクロプロパンカルボン酸、1-アミノシクロブタンカルボン酸、1-アミノシクロペンタンカルボン酸、1-アミノシクロヘキサンカルボン酸、4-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-カルボン酸、アミノイソ酪酸、(5)-2-アミノ-3-(1H-テトラゾール-5-イル)プロパン酸、Glu、Gly、N-メチル-グルタミン酸、2-アミノペンタン酸、2-アミノヘキサン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノオクタン酸、2-アミノノナン酸、2-アミノデカン酸、2-アミノウンデカン酸、2-アミノドデカン酸、オクチルグリシン、トラネキサム酸、アミノ吉草酸、及び2-(2-アミノエトキシ)酢酸からなる群から選択するアミノ酸である。アラニンの天然側鎖またはR基は、メチル基である。いくつかの実施形態において、本組成物の非天然側鎖は、水素原子のうちの1つ以上が重水素原子によって置き換えられたメチル基である。非天然側鎖は、以下の公開物、すなわち、WO/2013/172954、WO2013123267、WO/2014/071241、WO/2014/138429、WO/2013/050615、WO/2013/050616、WO/2012/166559、米国出願第20150094457号、Ma, Z., 及びHartman, M.C. (2012). *In Vitro Selection of Unnatural Cyclic Peptide Libraries via mRNA Display*. In J.A. Douthwaite & R.H. Jackson (Eds.). *Ribosome Display and Related Technologies: Methods and Protoc*

10

20

30

40

50

ols (367~390頁). Springer New Yorkにおいて当該技術分野に開示されており、これらはすべて、それらの全体が参照により組み込まれる。

【0131】

「模倣体」、「ペプチド模倣体 (peptide mimetic)」及び「ペプチド模倣体 (peptidomimetic)」は、本明細書で相互交換可能に使用し、概して、選択した天然ペプチドまたはタンパク質機能ドメイン (例えば、結合モチーフまたは活性部位) の三次結合構造または活性を模倣するペプチド分子、部分ペプチド分子または非ペプチド分子を指す。これらのペプチド模倣体には、組換えでまたは化学的に修飾したペプチド、及び以下にさらに説明するように、小分子薬模倣体のような非ペプチド薬を含む。いくつかの実施形態において、組成物、医薬組成物及びキットは、表4に示すPIF配列のうち任意の1つまたは組み合わせと約70%以上、約75%以上、約79%以上、約80%以上、約85%以上、約86%以上、約87%以上、約90%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上、約99%以上の相同性を共有するペプチドまたはペプチド模倣体または類似体を含み、ここで、1つまたは複数のアミノ酸残基は、非天然アミノ酸残基または非天然側鎖を有するアミノ酸残基である。いくつかの実施形態において、ペプチドまたはペプチド模倣体が提供され、ここで、ループが2つのシステイン残基間に形成される。いくつかの実施形態において、ペプチド模倣体は、公知の20のタンパク質新生アミノ酸のうち認められていないアミノ酸側鎖、当該分子の末端間または内部部分間での環化をもたらすよう使用する非ペプチド系リンカー、メチル基 (N-メチル化) または他のアルキル基によるアミド結合水素部分の置換、ペプチド結合と、化学処理または酵素処理に対して耐性のある化学基または化学結合との置き換え、N末端及びC末端修飾、ならびに非ペプチド性伸長 (ポリエチレングリコール、脂質、炭水化物、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオシド塩基、種々の小分子、またはリン酸基若しくは硫酸基など) との共役のような天然ペプチドに対して多くの類似性を有し得る。本明細書で使用する場合、「環状ペプチド模倣体」または「環状ポリペプチド模倣体」は、その構造の一部としてループ、架橋部分、及び/または内部架橋のような1つ以上の環状特長を有するペプチド模倣体を指す。本明細書で使用する場合、「架橋部分」という用語は、アミノ酸上の原子のうち1つまたは組み合わせを当該アミノ酸残基の外側にあるその他の原子へ化学的に連結する化学的部分を指す。例えば、アミノ酸三次構造の場合、架橋部分は、あるアミノ酸側鎖を別の連続的なまたは非連続的なアミノ酸側鎖と化学的に連結する化学的部分であり得る。

【0132】

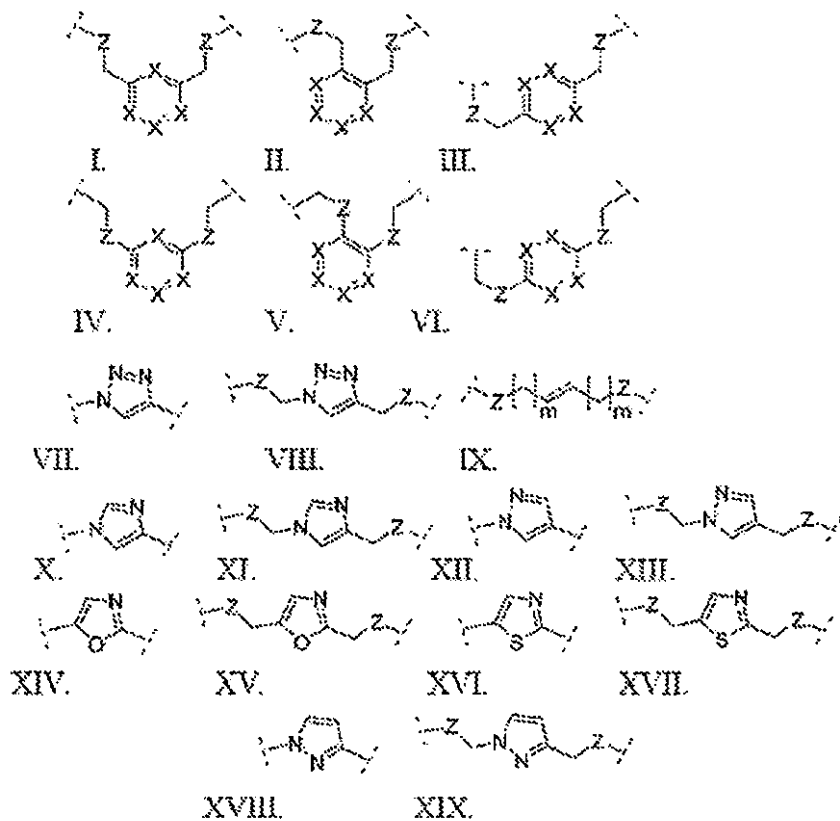
いくつかの実施形態において、ペプチドまたはペプチド模倣体が提供され、ここで、ループは、

10

20

30

【化 1】



10

20

からなる群から選択される架橋部分を含む。

【0133】

式中、各 X は独立して、N または CH であり、それにより環は 2 個を上回る N を含有せず、各 Z は独立して結合、NR、O、S、CH₂、C(O)NR、NRC(O)、S(O)vNR、NRS(O)v であり、各 m は独立して、0、1、2、及び 3 から選択され、各 v は独立して、1 及び 2 から選択され、各 R は独立して、H 及び C₁ ~ C₆ から選択され、かつ各架橋部分は、独立して選択された C₀ ~ C₆ スペースャーによってペプチドへ結合する。

30

【0134】

いくつかの実施形態において、本開示の PIF ペプチドは、20 の遺伝的にコードしたアミノ酸（または D 型アミノ酸）の 1 つ以上の天然側鎖を他の側鎖、例えば、アルキル、低級アルキル、環状 4 員、5 員、6 員、から 7 員までのアルキル、アミド、アミド低級アルキル、アミドジ（低級アルキル）、低級アルコキシ、ヒドロキシ、カルボキシ及びこれらの低級エステル誘導体と、ならびに 4 員、5 員、6 員、から 7 員までの複素環と置き換えることによってペプチド模倣体を生じるよう修飾される。例えば、プロリン類似体は、プロリン残基の環の大きさが 5 員から 4 員、6 員、または 7 員へと変化するようにすることができる。環状基は、飽和または不飽和であり得、不飽和の場合、芳香族または非芳香族であり得る。複素環式基は、1 つ以上の窒素ヘテロ原子、酸素ヘテロ原子及び/または硫黄ヘテロ原子を含有することができる。このような基の例としては、フラザニル、フリル、イミダゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、モルホリニル（例えば、モルホリノ）、オキサゾリル、ピペラジニル（例えば、1 - ピペラジニル）、ピペリジニル（例えば、1 - ピペリジニル、ピペリジノ）、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリジニル（例えば、1 - ピロリジニル）、ピロリニル、ピロリル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、チオモルホリニル（例えば、チオモルホリノ）、及びトリアゾリルが挙げられる。これらの複素環式基は、置換または非置換であることができる

40

50

。基が置換される場合、置換基は、アルキル、アルコキシ、ハロゲン、酸素、または置換若しくは非置換のフェニルであることができる。ペプチド模倣体は、リン酸化、スルホン化、ビオチン標識、または他の部分の付加若しくは除去によって化学的に修飾されたアミノ酸残基も有することができる。

【0135】

さらなる実施形態において、式 $R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5 - R_6 - R_7 - R_8 - R_9 - R_{10} - R_{11} - R_{12} - R_{13} - R_{14} - R_{15}$ であり、式中、 R_1 は Met または Met の模倣体であり、 R_2 は Val または Val の模倣体であり、 R_3 は Arg または Arg の模倣体、または任意のアミノ酸であり、 R_4 は Ile または Ile の模倣体であり、 R_5 は Lys または Lys の模倣体であり、 R_6 は Pro または Pro の模倣体であり、 R_7 は Gly または Gly の模倣体であり、 R_8 は Ser または Ser の模倣体であり、 R_9 は Ala または Ala の模倣体であり、 R_{10} は Asn または Asn の模倣体であり、 R_{11} は Lys または Lys の模倣体であり、 R_{12} は Pro または Pro の模倣体であり、 R_{13} は Ser または Ser の模倣体であり、 R_{14} は Asp または Asp の模倣体であり、かつ R_{15} は Asp または Asp の模倣体である化合物が提供される。さらなる実施形態において、式 $R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5 - R_6 - R_7 - R_8 - R_9 - R_{10}$ を含み、式中、 R_1 は Ser または Ser の模倣体であり、 R_2 は Gln または Gln の模倣体であり、 R_3 は Ala または Ala の模倣体であり、 R_4 は Val または Val の模倣体であり、 R_5 は Gln または Gln の模倣体であり、 R_6 は Glu または Glu の模倣体であり、 R_7 は His または His の模倣体であり、 R_8 は Ala または Ala の模倣体であり、 R_9 は Ser または Ser の模倣体であり、かつ R_{10} は Thr または Thr の模倣体である化合物、式 $R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5 - R_6 - R_7 - R_8 - R_9 - R_{10} - R_{11} - R_{12} - R_{13} - R_{14} - R_{15} - R_{16} - R_{17} - R_{18}$ を含み、式中、 R_1 は Ser または Ser の模倣体であり、 R_2 は Gly または Gly の模倣体であり、 R_3 は Ile または Ile の模倣体であり、 R_4 は Val または Val の模倣体であり、 R_5 は Ile または Ile の模倣体であり、 R_6 は Tyr または Tyr の模倣体であり、 R_7 は Gln または Gln の模倣体であり、 R_8 は Tyr または Tyr の模倣体であり、 R_9 は Met または Met の模倣体であり、 R_{10} は Asp または Asp の模倣体であり、 R_{11} は Asp または Asp の模倣体であり、 R_{12} は Arg または Arg の模倣体であり、 R_{13} は Tyr または Tyr の模倣体であり、 R_{14} は Val または Val の模倣体であり、 R_{15} は Gly または Gly の模倣体であり、 R_{16} は Ser または Ser の模倣体であり、 R_{17} は Asp または Asp の模倣体であり、かつ R_{18} は Leu または Leu の模倣体である化合物、及び式 $R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5 - R_6 - R_7 - R_8 - R_9$ を含み、式中、 R_1 は Val または Val の模倣体であり、 R_2 は Ile または Ile の模倣体であり、 R_3 は Ile または Ile の模倣体であり、 R_4 は Ile または Ile の模倣体であり、 R_5 は Ala または Ala の模倣体であり、 R_6 は Gln または Gln の模倣体であり、 R_7 は Tyr または Tyr の模倣体であり、 R_8 は Met または Met の模倣体であり、かつ R_9 は Asp または Asp の模倣体である化合物が提供される。いくつかの実施形態において、 R_3 は、Arg でも Arg の模倣体でもない。

【0136】

種々の技術が、対応する天然物と同じまたは類似の所望の生物活性を有するが、溶解度、安定性、及び/または加水分解若しくはタンパク質分解に対する感受性に関してペプチドよりも好ましい活性を有するペプチド模倣体を構築するために利用可能である（例えば、Morgan & Gainor, Ann. Rep. Med. Chem. 24, 243 ~ 252, 1989を参照されたい）。ある特定のペプチド模倣体化合物は、本開示のペプチドのアミノ酸配列を基にしている。しばしば、ペプチド模倣体化合物は、選択したペプチドの3次元構造を基にした3次元構造（すなわち、「ペプチドモチーフ」）を有する合成化合物である。ペプチドモチーフは、所望の生物活性、すなわち、PIF受容体に対する結合を有するペプチド模倣体化合物を提供し、ここで、模倣体化合物の結合活性は、実質

10

20

30

40

50

的に低下せず、しばしば、模倣体がモデル化される天然ペプチドの活性以上である。ペプチド模倣体化合物は、高い細胞透過性、より大きな親和性及び/または長い生物学的半減期のような治療上の適用を高める追加的な特徴を有することができる。

【0137】

ペプチド模倣体設計戦略は、当該技術分野で容易に入手可能である（例えば、Ripka及びRich, Curr. Op. Chem. Biol. 2, 441~2, 452, 1998、Hruby et al., Curr. Op. Chem. Biol. 1, 114~1, 119, 1997、Hruby & Baise, Curr. Med. Chem. 9, 945~9, 970, 2000を参照されたい）。あるクラスのペプチド模倣体は、部分的にまたは完全に非ペプチドであるがペプチド骨格原子を模倣しかつ天然アミノ酸残基の側鎖基の官能性を同様に模倣する側鎖基を含む主鎖である。いくつかのタイプの化学結合、例えば、エステル結合、チオエステル結合、チオアミド結合、レトロアミド結合、還元型カルボニル結合、ジメチレン結合及びケトメチレン結合は、プロテアーゼ耐性ペプチド模倣体の構築におけるペプチド結合に概して有用な置換基であることが当該技術分野で公知である。別のクラスのペプチド模倣体は、別のペプチドまたはタンパク質へ結合するが、天然ペプチドの構造的な模倣体では必ずしもない小さな非ペプチド分子を含む。さらに別のクラスのペプチド模倣体は、コンビナトリアルケミストリー及び大量の化学ライブラリーの発生から生じている。これらは概して、天然ペプチドと構造上無関連だが、元のペプチドの「トポグラフィック」模倣体として機能するための非ペプチド足場の上に位置する必要な官能基を有する、新規のテンプレートを含む（Ripka及びRich, 1998, 上述）。

10

20

【0138】

nPIF（配列番号1）という名称の、同定された最初の天然PIF化合物は、15のアミノ酸ペプチドである。このペプチドの合成版であるsPIF（配列番号13）は、天然ペプチドnPIF（配列番号I）と類似の活性を示した。このペプチドは、プラスモジウムであるスポロゾイト周囲タンパク質の小さな領域と相同である。第二のPIFペプチド（配列番号7）には13のアミノ酸があり、受容体相互作用因子（SMRT）として識別される甲状腺及びレチノイン酸転写コリプレッサーと呼ばれる大きなタンパク質の短い部分との相同性を共有し、合成版は、sPIF-2（配列番号14）である。第三の異なるペプチドnPIF-3（配列番号10）は、18のアミノ酸からなり、逆転写酵素の小さな部分と符合し、このペプチドの合成版sPIF-3は（配列番号15）である。nPIF-4（配列番号12）は、逆転写酵素の小さな部分との相同性を共有する。

30

【0139】

PIFペプチドのリストは、天然及び合成の両方とも、以下の表4に提供する。種々のPIFペプチド及びスクランブル型PIFペプチドに対する抗体も提供する。

【表 4】

表 4. PIF ペプチド

(配列番号)	ペプチド	アミノ酸配列
配列番号 1 単離された天然型、スポロゾイト周囲タンパク質 (マラリア)の領域と符合	nPIF-1 ₁₅	MVRIKPG S ANKPSDD
配列番号 2 単離された天然型、スポロゾイト周囲タンパク質 (マラリア)の領域と符合	nPIF -1 _(15-代替的)	MVRIKYGSNNKPSD
配列番号 3 単離された天然型、スポロゾイト周囲タンパク質 (マラリア)の領域と符合	nPIF-1 ₍₁₃₎	MVRIKPG SANKPS
配列番号 4 単離された天然型、スポロゾイト周囲タンパク質 (マラリア)の領域と符合	nPIF-1 ₍₉₎	MVRIKPGSA
配列番号 5 スポロゾイト周囲タンパク質マラリアの領域由来 の合成のスクランブル型アミノ酸配列	scrPIF-1 ₁₅	GRVDPSNKSMPKDIA
配列番号 6 単離された天然型、ヒトレチノイド及び甲状腺ホル モン受容体-SMRT の領域と符合	nPIF-2 ₍₁₀₎	SQAVQEHA
配列番号 7 単離された天然型、ヒトレチノイド及び甲状腺ホル モン受容体(SMRT)の領域と符合	nPIF-2 ₍₁₃₎	SQAVQEHA
配列番号 8 ヒトレチノイド及び甲状腺ホルモン受容体 SMRT の領域由来の合成のスクランブル型アミノ酸配 列	scrPIF-2 ₍₁₃₎	EVAQHSQASTMNG
配列番号 9	scrPIF-2 ₍₁₄₎	GQ AS S AQMNSTGVH
配列番号 10 天然型、Rev Trans の領域と符合	nPIF-3 ₍₁₈₎	SGIVIQYMDDRYVGSD L
配列番号 11 スポロゾイト周囲タンパク質マラリアの領域由来 の合成の、スクランブル型アミノ酸配列	negPIF-1 ₍₁₅₎ に ついて陰性対照	GMRELQRSANK
配列番号 12 単離された天然型、Rev Trans の領域と符合	nPIF-4 ₍₉₎	VIIIAQYMD
天然の単離された nPIF-1 ₁₅ の抗体	AbPIF-1 ₍₁₅₎	

10

20

30

40

(配列番号 13) スポロゾイト周囲タンパク質マラリアの領域由来の合成のアミノ酸配列	sPIF-1 ₍₁₅₎	MVRIKPGSANKPSDD
(配列番号 14) ヒトレチノイド及び甲状腺ホルモン受容体 SMRT 由来の合成のアミノ酸配列	sPIF-2 ₍₃₎	SQAVQEHAHNMG
(配列番号 15) スポロゾイト周囲タンパク質マラリアの領域由来の合成のアミノ酸配列	sPIF-3 ₍₁₈₎	SGIVYQYMDDRYVGS DL
(配列番号 16) スポロゾイト周囲タンパク質マラリアの領域由来の合成のアミノ酸配列	sPIF-1 ₍₉₎	MVR1KPGSA
天然の単離された nPIF-2 ₍₁₃₎ の抗体	AbPIF-2 ₍₁₃₎	
天然の単離された nPIF-3 ₍₁₈₎ の抗体	AbPIF-3 ₍₁₈₎	
(配列番号 17) 合成	sPTF-4 ₍₉₎	VIIIAQYMD
配列番号 18 合成	sPIF-1 ₍₅₎	MVRIK
配列番号 19 合成	sPIF-1 ₍₄₎	PGSA
配列番号 20	PIF (-3)	MVXIKPGSANKPSDD
配列番号 21	PIF (-1)	XVRIKPGSANKPSDD
配列番号 22	PIF (-1,-3)	XVXIKPGSANKPSDD
配列番号 23	PIF (-6)	MVRIKXGSANKPSDD
配列番号 24	PIF (-4)	MVRXKPGSANKPSDD
配列番号 25	PIF (-2)	MXRIKPGSANKPSDD
配列番号 26	mut1	MVRIKEGSANKPSDD
配列番号 27	mut3	MVRGKPGSANKPSDD
配列番号 28	mut4	MER1KPGSANKPSDD
配列番号 29	mut5	AVRIKPGSANKPSDD
n=天然, s=合成, scr =スクランブル型, 同ジアミノ酸, ()=アミノ酸の数, Ab=抗体, X = アルギニンを除く任意のアミノ酸		

10

20

30

40

50

【 0 1 4 0 】

本開示はとりわけ、試料中の数免疫細胞を検出するために、または試料中の免疫細胞由来のサイトカイン発現を刺激するために、固相または液体溶液中の診断試薬として使用する P I F またはその類似体に関する。別の実施形態において、P I F ペプチドまたは類似体を含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、治療有効量の P I F ペプチドまたはその医薬として許容され得る塩を含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、表 4 の配列識別子のうちの任意の 1 つ以上を含むペプチドを含んでいない。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、配列番号 1 を含むまたは配列番号 1 からなるペプチドを含んでいない。

【 0 1 4 1 】

指定した徴候に関する治療処置のために、作用薬をそれ自体投与してもよく、または経口投与、経皮投与、直腸投与、鼻腔投与、局所的静脈投与、若しくは好ましくは経口投与のための単位剤形における医薬組成物へと化合及び製剤化することができる。そのような医薬組成物は、当該技術分野で周知の様式で調製され、医薬担体を伴った、表5由来の作用薬のうち少なくとも1つまたは組み合わせを含む。本明細書のいたるところで使用する「作用薬」という用語は、式の化合物から選択した少なくとも1つの化合物またはその医薬として許容され得る塩を指す。

【0142】

そのような組成物において、活性のある化合物は、「有効成分」として知られる。当該組成物を製造する上で、有効成分は通常、担体と混合され、または担体によって希釈され、またはカプセル、サシェ、紙若しくは他の容器の形態にあり得る担体内に封入されるであろう。担体が希釈剤として機能する場合、当該担体は、有効成分のための媒体のビヒクル、賦形剤として作用する固体、半固体、または液体の材料であり得る。したがって、本組成物は、錠剤、丸剤、散剤、ロゼンジ剤、サシェ剤、オブラート剤、エリキシル剤、エマルション剤、液剤、シロップ剤、懸濁剤、軟質及び硬質ゼラチンカプセル剤、滅菌済み注射液、ならびに滅菌済み包装済み散剤の形態にあることができる。

10

【0143】

「医薬調製物」及び「医薬組成物」という用語には、哺乳類動物、例えば、ヒトへの投与に適した調製物を含む。本開示の化合物を医薬品として哺乳類動物、例えばヒトへ投与する場合、本化合物は、それ自体、または、例えば、医薬として許容され得る担体との組み合わせで約0.1～約99.5%の有効成分を含有する医薬組成物として、付与することができる。

20

【0144】

「医薬として許容され得る」という表現は、ヒトへ投与する場合に、生理学的に許容され得、かつ、胃のむかつき、めまい及びこれらに類するもののような、アレルギー反応または類似の不都合な反応を典型的に生じることのない、分子実体及び組成物を指す。好ましくは、本明細書で使用する場合、「医薬として許容され得る」という用語は、動物における、及びより具体的にはヒトにおける使用のために、連邦政府若しくは州政府の規制省庁によって認可された、または米国薬局方若しくは他の概して認識されている薬局方に列挙されたことを意味する。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、PIF、ペプチド、模倣体またはそれらの医薬として許容され得る塩及び少なくとも1つの医薬として許容され得る担体を含む。

30

【0145】

「医薬として許容され得る担体」という表現は、当該技術分野で認識されており、これには哺乳類へ本開示の化合物を投与するのに適した、医薬として許容され得る物質、組成物またはビヒクルを含む。担体には、ある器官、または身体の一部から、別の器官、または身体の一部へと本薬剤を運搬または輸送することに関与する、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料を含む。各担体は、製剤の他の成分と適合性があるという意味で「許容され得」なければならない、患者に対して損傷してはならない。医薬として許容され得る担体として機能できる物質のいくつかの例としては、ラクトース、グルコース及びスクロースのような糖類、トウモロコシデンブun及びジャガイモデンブunのようなデンブun類、カルボキシメチルセルロースナトリウム、セルロースエチル及び酢酸セルロースのようなセルロース及びその誘導体、粉状トラガカント、麦芽、ゼラチン、タルク、ココアバター及び坐剤用蠟のような賦形剤、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及びダイズ油のような油、プロピレングリコールのようなグリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールのようなグリコール、オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルのようなエステル、アガー、水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムのような緩衝剤、アルギン酸、発熱物質非含有水、等張性塩類溶液、リンゲル溶液、エチルアルコール、リン酸緩衝溶液、ならびに医薬製剤において採用される他の非毒性適合性物質が挙げられる。適切な医薬担体は、

40

50

その全体が参照により本明細書に組み込まれる E. W. Martin 著「Remington's Pharmaceutical Sciences」において説明されている。いくつかの実施形態において、医薬として許容され得る担体は、滅菌済みかつ発熱物質非含有の水である。いくつかの実施形態において、医薬として許容され得る担体は、乳酸リンゲル溶液として時に知られるリンゲル乳酸である。

【0146】

ラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムのような湿潤剤、乳化剤及び滑沢剤、ならびに着色料、放出剤、コート剤、甘味料、香味料及び着香料、保存料ならびに抗酸化物質も、本組成物中に存在することができる。

【0147】

医薬として許容され得る抗酸化物質の例としては、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム及びこれらに類するもののような水溶性抗酸化物質、パルミチン酸アスコルビル、酪酸化ヒドロキシアニソール (BHA)、酪酸化ヒドロキシトルエン (BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロール、及びこれらに類するもののような油溶性抗酸化物質、ならびにクエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸、及びこれらに類するもののような金属キレート剤が挙げられる。

【0148】

本開示の製剤には、経口投与、鼻腔投与、局所投与、頬側投与、舌下投与、直腸投与、膈内投与及び/または非経口投与に適したものを含む。製剤は、単位剤形において簡便に存在し得、薬学の分野で周知の任意の方法によって調製され得る。単一の剤形を生じるために担体と組み合わせることのできる有効成分の量は概して、治療効果を生じる化合物の当該量であろう。概して、100パーセントのうち、この量は、有効成分の約1パーセント~約99パーセント、好ましくは約5パーセント~約70パーセント、最も好ましくは約10パーセント~約30パーセントに及ぶであろう。

【0149】

適切な担体、賦形剤、及び希釈剤に関するいくつかの例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、アルギン酸リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム (calcium salicate)、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、トラガカント、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシ安息香酸塩及びプロピルヒドロキシ安息香酸塩、糖、ステアリン酸マグネシウム、水、及び鉱油が挙げられる。製剤は追加的に、滑沢剤、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、保存料、甘味料または香味料を含むことができる。組成物は、当該技術分野で周知の手順を採用することによって、患者への投与後に有効成分の迅速な、持続した、または遅延した放出を提供するよう製剤化され得る。

【0150】

インプラントによる局所送達は、医薬剤を含有するマトリックスの、影響される部位への外科的配置を説明する。植え込まれたマトリックスは、拡散、化学反応、または溶媒活性化因子によって医薬剤を放出する。

【0151】

例えば、いくつかの態様において、本開示は、表5の活性のある化合物と、医薬として許容され得る担体若しくは希釈剤とを含む医薬組成物、または表5の活性のある化合物を含む有効量の医薬組成物に関する。

【0152】

本開示の化合物は、注射による、例えば、ポーラス注射または連続的注入による、非経口投与のために製剤化することができる。本化合物は、所定の時間にわたって皮下的に持続的な注入によって投与することができる。注射のための製剤は、単位剤形において、例えば、アンプルまたは複数回用量容器において、保存料を添加して、存在することができる。本組成物は、油性または水性のビヒクル中の懸濁剤、液剤またはエマルションのような形態をとることができ、懸濁剤、安定化剤及び/または分散剤のような調合剤を含有す

10

20

30

40

50

ることができる。

【0153】

経口投与のために、本化合物は、これらの化合物を当該技術分野で周知の医薬として許容され得る担体と組み合わせることによって容易に製剤化することができる。このような担体によって、本開示の化合物は、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤及びこれらに類するものとして、治療される患者による経口消化のために製剤化することができる。経口使用のための医薬調製物は、固体賦形剤を添加すること、結果として生じる混合物を任意に粉碎すること、及び顆粒からなる混合物を加工することによって得ることができ、所望の場合、適切な助剤を添加することを変更して、錠剤または糖衣錠中心を得る。適切な賦形剤には、ラクトース、スクロース、マンニトール、及びソルビトールを含むがこれらに限定しない糖類のような充填剤、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及びポリビニルピロリドン（PVP）などだがこれらに限定しないセルロース調製物を含む。所望の場合、架橋したポリビニルピロリドン、アガー、またはアルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩などだがこれらに限定しない崩壊剤を添加することができる。

10

【0154】

糖衣錠中心へは、適切なコーティングを提供することができる。この目的のために、濃縮された糖溶液を使用することができ、当該糖溶液は任意に、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、及び/または二酸化チタン、ラッカー溶液ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を含有することができる。染料または顔料は、活性のある化合物の用量の異なる組み合わせの識別または当該組み合わせを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングへ添加することができる。

20

【0155】

経口的に使用することのできる医薬調製物には、ゼラチンでできた押込みばめカプセル剤、ならびにゼラチンとグリセロールまたはソルビトールのような可塑剤とでできた軟質の、調整されたカプセル剤を含むが、これらに限定しない。押込みばめカプセル剤は、例えばラクトースのような充填剤、例えばデンプンのような結合剤、及び/または例えばタルク若しくはステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤、及び任意に安定化剤と混合した有効成分を含有することができる。軟質カプセルにおいて、活性のある化合物は、脂肪油、液状パラフィン、または液状ポリエチレングリコールのような適切な液体中に溶解または懸濁することができる。加えて、安定化剤を添加することができる。経口投与のための製剤はすべて、このような投与に適した薬用量であるべきである。

30

【0156】

頬側投与のために、本組成物は、例えば、従来様式で製剤化した錠剤またはロゼンジ剤の形態をとることができる。

【0157】

吸入による投与のために、本開示による使用のための化合物は、高圧パックまたは噴霧器からのエアゾールスプレー提示の形態で、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体の使用とともに、簡便に送達される。加圧エアゾールの場合、薬用量単位は、測量された量を送達するための弁を提供することによって、決定することができる。例えば、吸入器または吹入れ器における使用のためのゼラチンのカプセル及びカートリッジは、本化合物とラクトースまたはデンプンのような適切な粉状基剤との粉状混合物を含有するよう製剤化することができる。

40

【0158】

本開示の化合物は、例えば、カカオバターまたは他のグリセリドのような従来の坐剤基剤を含有する坐剤または停留浣腸のような直腸組成物において製剤化することもできる。

【0159】

50

すでに説明した製剤に加えて、本開示の化合物は、デポ調製物として製剤化することもできる。このような長く作用する製剤は、植え込み（例えば、皮下または筋肉内）によって、または筋肉内注射によって投与することができる。デポ注射は、約1～約6か月間またはそれより長い間隔で投与することができる。したがって、例えば、本化合物は、適切なポリマー材料または疎水性材料（例えば、許容され得る油中のエマルジョンとしての）またはイオン交換樹脂とともに、またはやや可溶性の誘導体として、例えば、やや可溶性の塩として製剤化することができる。

【0160】

経皮投与において、本開示の化合物は、例えば、硬膏剤へ適用することができ、または生体へ結果的に供給される経皮的な治療系によって適用することができる。

10

【0161】

本化合物の医薬組成物は、適切な固体またはゲル相の担体または賦形剤も含むことができる。このような担体または賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類、デンプン類、セルロース誘導体、ゼラチン、及び例えばポリエチレングリコールのようなポリマーが挙げられるが、これらに限定しない。

【0162】

非経口投与のために、類似体は、例えば、医薬として許容され得る非経口ビヒクルと結合して、液剤、懸濁剤、エマルジョン剤または凍結乾燥散剤として製剤化することができる。このようなビヒクルの例は、水、塩類溶液、リンゲル溶液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンである。リポソーム及び、不揮発性油のような非水性ビヒクルも使用することがある。ビヒクルまたは凍結乾燥散剤は、等張性を維持する添加物（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール）及び化学的安定性を維持する添加物（例えば、緩衝液及び保存料）を含有してもよい。製剤は、通常使用する技術によって滅菌する。例えば、注射による投与に適した非経口組成物は、0.9%塩化ナトリウム溶液中に1.5重量%の類似体を溶解することによって調製する。

20

【0163】

本開示は、筋肉内、舌下、静脈内、腹腔内、髄腔内、腔内、尿道内、皮内、頬側、吸入を介した、噴霧器を介した及び皮下注射を介したを含む投与経路に関する。あるいは、医薬組成物は、個体から取り出した細胞へ種々の手段によって導入してもよい。このような手段には例えば、微粒子銃及びリポソームまたは他のナノ粒子用の装置を含む。

30

【0164】

経口投与のための固体剤形には、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤及び顆粒剤を含む。固体剤形において、類似体は概して、スクロース、ラクトース、デンプン、または他の概して安全とみなされる（GRAS）添加物のような少なくとも1つの不活性の医薬として許容され得る担体と混合させる。このような剤形は、通常の実施のように、不活性希釈剤以外の追加の物質、例えば、マグネシウム状態のような滑沢剤も含むことができる。カプセル剤、錠剤、及び丸剤とともに、剤形は、緩衝剤も含んでもよい。錠剤及び丸剤は、当該技術分野で公知の技術を用いて、腸溶コーティングとともに、または徐放形態で調製することができる。

40

【0165】

経口投与のための液体剤形には、水のような、当該技術分野で通常使用する不活性希釈剤を含有するエリキシルとともに、医薬として許容され得るエマルジョン、溶液、懸濁液及びシロップを含む。これらの組成物には、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、甘味料、香味料または着香料のような1つ以上のアジュバントも含むことができる。

【0166】

当業者は、組成物及び医薬組成物の適切な薬用量が治療中の固体及び目的に応じて変化し得ることを認識するであろう。例えば、個々の患者の年齢、体重、及び病歴が、療法の治療効能に影響し得る。さらに、組成物のより少量の薬用量が、症状の一過性の休止を生じるために必要とすることがあり、一方、より多量の用量が、疾患、障害、または徴候と関係する症状の完全な休止を生じるために必要とすることがある。有能な医師は、これらの

50

要因を考慮して、過度の実験なしで用量が所望の治療結果に達成しつつあることを確認するために投薬計画を調整することができる。臨床医及び/または治療医は、個々の患者の応答とともに療法をいかにかついつ中断、調整、及び/または終止させるかがわかっていることにも留意する。薬用量は、医薬組成物について選択した特定の類似体の強度によることもある。

【0167】

組成物または医薬組成物の用量は、変化し得る。組成物の用量は、1日1回であり得る。いくつかの実施形態において、複数回用量は、1日に対象へ投与され得る。いくつかの実施形態において、総薬用量は、少なくとも2回の適用期間において投与される。いくつかの実施形態において、期間は、1時間、1日、1か月、1年、1週間、または2週間であることができる。本発明の追加の実施形態において、総薬用量は、2つ以上の個別の適用期間において投与され、または1時間、1日、1か月、1年、1週間、若しくは2週間の時間経過にわたって個別の用量で投与される。

10

【0168】

いくつかの実施形態において、作用薬のうちの1つまたは複数は、免疫調節薬、ホルモン薬、抗炎症性化合物、アルファ-アドレナリン作動性アゴニスト、鎮痛性化合物、及び麻酔性化合物から選択される化合物のうちの1つまたは組み合わせである。そのような化合物の非限定例を以下の表5に示す。

【表 5】

表5

免疫調節薬の例としては以下を含む。

アズフィセル-T	
エタネルセプト	
グラチラマー	
レナリドマイド	
ミファミルチド	
ピメクロリムス	10
サイマルファシン	
チノコルジン	
6メルカプトプリン	
6MP	
アクテムラ	
アルフェロンN	
アナキンラ	
アルカリスト	
アボネクス	
アボスタートグリップ	20
ベリナート	
ベータセロン	
BG-12	
C1エステラーゼ阻害薬(組換え)	
C1阻害薬(ヒト)	
シンライズ	
コパキソン	
フマル酸ジメチル	
エカランチド	30
エクスタビア	
フィンゴリモド	
フィラジル	
ジレニア	
グラチラマー	
イカチバント	
免疫グロブリン	
インファージェン	
インターフェロンアルファn3	
インターフェロンアルファコン1	40
インターフェロンベータ1a	
インターフェロンベータ1b	

カルビトール
 キネレット
 メルカプトプリン
 ペグインターフェロンベータ1a
 プレグリディ
 プリントール
 プリクサン
 レビフ
 レビフレビドース
 リロナセプト
 ルコネスト
 シルツキシマブ
 シルバント
 テクフィデラ
 トシリズマブ

10

ホルモン薬の例としては以下を含む。

エストラジオール
 合成共役型エストロゲン
 吉草酸エストラジオール
 酢酸エストラジオール
 エストラジオールエストロゲン
 エストロピペート
 共役型エストロゲン
 プロゲステロン
 微粒子化プロゲステロン
 メドロキシプロゲステロン
 酢酸メドロキシプロゲステロン
 酢酸ノルエチンドロン
 ドロスピレノン
 レボノルゲストレル
 エチニルエストラジオール
 ノルゲステマート
 バゼドキシフェン
 GnRHアゴニスト
 ダナゾール
 テテストステロン

20

30

40

抗炎症性化合物の例としては以下を含む。

アスピリン
 セレコキシブ

ジクロフェナク	
ジフルニサル	
エトドラク	
ヘパリン	
イブプロフェン	
インドメタシン	
ケトプロフェン	
ケトロラクナブメトン	
ナプロキセン	10
オキサプロジン	
ピロキシカム	
プレドニゾン	
サルサラート	
スリンダク	
トルメチン	

アルファ-アドレナリン作動性アゴニストの例としては以下を含む。

メトキサミン	
メチルノルエピネフリン	20
ミドドリン	
オキシメタゾリン	
メタラミノール	
フェニレフリン	
クロニジン(混合型アルファ2-アドレナリン作動性及びイミダゾリンII受容体アゴニスト)	
グアンファシン(アルファ2A-アドレナリン受容体のサブタイプに対して優先)	
グアナベンズ(イミダゾリンIIと対照的なアルファ2-アドレナリン作動性に対して最も選択的なアゴニスト)	
グアノキサベンズ(グアナベンズの代謝産物)	
グアナチジン(末梢アルファ2-受容体アゴニスト)	30
キシラジン	
チザニジン	
メドミジン	
メチルドパ	
ファドルミジン	
デクスメドミジン	

鎮痛性化合物の例としては、以下を含む。

コデイン	
ヒドロコドン(ゾヒドロER)	40
オキシコドン(オキシコンチン、ロキシコドン)	
メタドン	
ヒドロモルホン(ジラウデイド、エキサルゴ)	

モルフィン(アビンザ、カディアン、MSIR、SMコンチン)、及び
フェンタニル(アクチク、デュラジェシック)

麻酔性化合物の例としては、以下を含む。

デスフルラン
イソフルラン
亜酸化窒素
セボフルラン
キセノン

10

【0169】

本開示の化合物は、例えば、アジュバントのような他の有効成分、または他の適合性のある薬剤若しくは化合物との組み合わせで投与することもでき、ここで、このような組み合わせは、本明細書に説明する方法の所望の効果を達成する上で望ましいまたは有利であることが判っている。

【0170】

システム及びアレイ

多くの実施形態において、アレイは、表面（複数可）へPIF及び/若しくはその類似体ならびに/または他のペプチド若しくは分子が空間的に離散した位置で固定された固体支持体を含む。このようなアレイは、任意の源（例えば、組換えで作製する、生化学的に単離する、合成する、市販のものを購入するなど）からPIF及び/またはその類似体を用いて調製することができる。その上、個々のペプチド成分の識別及び相対量は、特定のプロジェクトの必要条件または特定の研究者の関心に従って、決定または調整してもよい。

20

【0171】

例えば、多くの実施形態において、実行可能なだけ多くの異なるPIF及び/またはその類似体を含むアレイを設計、調製及び/または利用することが望ましいであろう。あるいはまたは加えて、いくつかの実施形態において、妊娠、子宮内膜症、またはRPLのような特定の細胞または細胞タイプまたは障害と関係する（または関係していない）ことが公知のペプチド成分のみを含むアレイを設計、調製、及び/または利用することが望ましくあり得る。数件の特定の例を付与するために、いくつかの実施形態において、1つまたは複数の異なるペプチド成分を含有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれより多数の異なる「スポット」（物理的に離散した位置）を含有するアレイを利用する。いくつかの実施形態において、約1～約100,000スポット、約100～約10,000、または約1,000～約5,000のスポットを含有するアレイを利用する。

30

【0172】

いくつかの実施形態において、アレイ上のスポットは、空間的な組織化を含む。いくつかの実施形態において、アレイ上のスポットは、格子の中に配置される。いくつかの実施形態において、統計的有意性が判定できるよう、複数の格子を用いて複数の実験を同じ実験的変化性で同時に実施して、それにより統計的有意性が決定できるよう、アレイは、反復性格子の中に配置される。

40

【0173】

いくつかの実施形態において、種々のPIFまたはPIF類似体またはこれらの組み合わせは、アレイ上の公知の位置及び成分の公知の組成の両方に各スポットが対応するアレイのスポットにおいて表される。ある特定の実施形態において、少なくとも1つの成分は、アレイ上に点在する。ある特定の実施形態において、成分は個別に点在する。いくつかの実施形態において、いくつかのペプチドまたは類似体の成分からなる混合物は、単一のスポット内に含有される。いくつかの実施形態において、本発明に従った使用のためのア

50

レイには、単一成分のスポットと成分の組み合わせのスポットとの両方を含む。いくつかの実施形態において、成分は、同じアレイにおいて複数回点在し、それによりアレイには、複製スポットを含む。いくつかの実施形態において、本発明に従った使用のためのアレイは、特定のPIFペプチドまたはその類似体を欠失するスポットを含有しており、それゆえ、例えば、PIFペプチドまたはその類似体を含有するスポットに加えて、陰性対照として利用され得る。ある特定の実施形態において、ローダミンデキストランは、陰性対照スポットの中に含まれる。

【0174】

本発明に従った使用のためのアレイは、任意の適切な基質材料上に調製され得る。多くの実施形態において、材料は、細胞、例えば、哺乳類動物細胞の生存可能性及び/または増殖を支持するであろう。いくつかの実施形態において、アレイは、ポリアミド、ポリエステル、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリアクリラート、ポリビニル化合物（例えば、ポリビニルクロリド）、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ニトロセルロース、綿、ポリグリコール酸（PGA）、セルロース、デキストラン、ゼラチン、ガラス、フルオロポリマー、フッ化エチレンプロピレン、ポリビニリデン、ポリジメチルシロキサン、ポリスチレン、ケイ素基質（溶融シリカ、ポリシリコン、または単一ケイ素結晶など）からなる群から選択される基質材料を利用する。あるいはまたは加えて、金属（金、銀、チタン薄膜）を使用することができる。いくつかの実施形態において、ポリアクリルアミドで被覆したアクリルスライドを使用する。いくつかの実施形態において、アレイは、スポットのペプチド成分（PIFまたはPIF類似体など）と細胞または細胞が発現するタンパク質の間の結合事象を支持する1つまたは複数の基質材料を利用する。いくつかの実施形態において、ポリアクリルアミドで被覆したアクリルスライドを使用する。いくつかの実施形態において、アレイは、スポットのペプチド成分（PIFまたはPIF類似体）と試料中の細胞または細胞が発現するタンパク質の間の結合事象を支持する1つまたは複数の基質材料を利用する。

10

20

【0175】

いくつかの実施形態において、本発明は、細胞を培養することにおける使用のためのアレイを提供する。いくつかの実施形態において、細胞を培養することにおける使用のためのアレイには、培地が提供される。いくつかの実施形態において、細胞を培養することにおける使用のためのアレイには、細胞培養を支持するための十分な容積の培地が1、2、3、4、5またはそれより長い日数提供される。

30

【0176】

いくつかの実施形態において、本発明は、診断用アッセイとしての使用のためのアレイを提供する。いくつかの実施形態において、アレイは、診断キットまたは検出キットの一部として提供される。いくつかの実施形態において、アレイは、検出キットの一部として提供される。ある特定の実施形態において、本発明に従った使用のためのキットには、1つ以上の基準試料、説明書（例えば、試料の加工用、検査の実施用、結果の解釈用など）、培地、及び/または検査を実施するのに必要な他の試薬を含み得る。

【0177】

いくつかの実施形態において、本システムは、固体支持体に対する少なくとも1つのPIFペプチドまたはその類似体を含む当該固体支持体を含む少なくとも1つのアレイを含み、ここで、当該アレイは、免疫調節不全と関係したポリペプチド配列を各々含む少なくとも2つ以上のポリペプチド、または本明細書に提供する複数の表のうちのいずれかのポリペプチドから選択されるその類似体を含む。いくつかの実施形態において、システムは、固体支持体を含む少なくとも1つのアレイを含み、ここで、固体支持体は、表面へ固定した1つまたは複数のPIFペプチド及び/またはその類似体、ならびに免疫調節不全、子宮内膜症、再発性妊娠中断、若しくは妊娠と関係したポリペプチド配列を各々含む少なくとも2つ以上のポリペプチド、または本明細書に開示するペプチドのうちのいずれかから選択されるその類似体を含み、ここで、当該固体支持体は、ポリスチレン（TCPS）、ガラス、石英、クォーツガラス、ポリ（エチレンテレフタル酸）（PET）、ポリエチ

40

50

レン、ポリビニルジフルオリド (P V D F)、ポリジメチルシロキサン (P D M S)、ポリテトラフルオロエチレン (P T F E)、ポリメチルメタクリル酸 (P M M A)、ポリカーボネート、ポリオレフィン、酢酸エチレンビニル、ポリプロピレン、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコン類、ポリ(メタ)アクリル酸、ポリアミド、塩化ポリビニル、ポリビニルフェノール、及びこれらのコポリマー混合物から選択される材料を含む。

【 0 1 7 8 】

いくつかの実施形態において、本システムは、(i) 第一及び第二の溶液を調製し、各第一及び第二の溶液は、免疫調節不全、子宮内膜症、R P I、若しくは妊娠と関係したポリペプチド配列と関係したポリペプチド配列またはその類似体を含む公知の濃度のポリペプチドを含むこと、(i i) 第一及び第二の溶液を固体支持体と、免疫調節不全、子宮内膜症、R P L、または妊娠と関係するポリペプチド配列またはその類似体を含むポリペプチドを固体支持体へ吸収させるのに十分な時間接触させ、ここで、免疫調節不全、子宮内膜症、再発性妊娠中断、若しくは妊娠と関係したポリペプチド配列と関係したポリペプチド配列またはその類似体は、表 1 または表 4 のポリペプチドから選択され、かつここで、溶液を調製して当該溶液を固体支持体と接触させるステップは、少なくとも 1 つのアレイ上に存在するスポットまたは離散した位置の数に対応して少なくとも約 1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600 または 700 回反復されることを含むステップによって調製した、固体支持体を含む少なくとも 1 つのアレイを含む。いくつかの実施形態において、第一及び第二の溶液を固体支持体と接触させる 1 回以上反復したステップは、免疫調節不全、子宮内膜症、R P L、または妊娠と関係したポリペプチド配列またはその類似体を含む各ポリペプチドが、少なくとも 1 つのアレイ上の離散した指定可能な位置で吸収されるよう自動化装置によって実施される。

10

20

【 0 1 7 9 】

いくつかの実施形態によると、アレイは、表面プラズモン共鳴または (S P R) を測定する装置内での使用のために構成された銀などの金属で被覆したチップまたはシリカ表面を含む。いくつかの実施形態において、チップは、C M 5 チップなど、ピアコアチップ (G E l i f e S c i e n c e s によって具備) である。当該センサーチップは、保護シースの中にあるポリスチレン支持フレームへと固定される。センサーチップ及びシース組立て体からなる各カセットは、気密性に密封したパウチの中で、窒素雰囲気下で個々にパックされる。

30

【 0 1 8 0 】

ピアコアチップは、製造元の説明書により使用することができる (https://www.gelifesciences.com/gehcsls_images/GELS/Related%20Content/Files/1443019450961/litdoc22031023_20150923164404.pdf に認められ、これは全体として参照により組み込まれる) が、当業者は、C M 5 チップが、非限定例として、その表面上にシクロメチルデキストランを含む、その上に 1 つまたは複数の本明細書に開示するポリペプチドまたは類似体が公知の化学作用を通じて固定化され得ることを知っているであろう。簡潔には、当該プロトコルは、以下の内、1 つまたは複数のステップを含む：

40

(a) チップ表面上での濃縮を防止するために、密封したセンサーチップパウチを室温で 15 ~ 30 分間平衡化させておく (b) 公知のランニングバッファーを用いてピアコア機器を準備する。当該緩衝液は濾過すべきであり (0 . 22 μ m)、集積緩衝液脱気装置を有していないシステムのために脱気する、(c) センサーチップパウチを開く。センサーチップ支持体が全回数においてシースへと完全に挿入されたままであることを確実にする、(d) 機器マニュアルハンドブックに説明されているように機器の中にセンサーチップをドッキングさせる、(c) 機器の中にドッキングされていない

50

センサーチップは、閉じた容器中に保存されるべきであり、ポリペプチドまたはその類似体を固定化する。リガンドまたは捕捉分子は、デキストラン上のカルボキシル基を介してセンサーチップ表面へ共有結合する。カップリングに使用することのできる分子にある官能基には、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-CHO$ 、 $-OH$ 及び $-COOH$ を含む。当該表面は、ほとんどの固定化アプローチのためによって調製され、カルボキシメチルデキストラン表面は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)からなる混合物を用いて活性化される。試薬溶液は、新鮮に調製され、使用直前に混合されるべきである。固定化の効率は、溶液が新鮮でない場合、低下するであろう。

【0181】

いくつかの実施形態によると、アレイは、キットの一部として供給され得る製剤を含む。いくつかの実施形態において、キットは、PIFペプチド及び/またはPIF類似体またはこれらの医薬として許容され得る塩を含んでおり、PIFペプチド及び/またはPIF類似体またはこれらの医薬として許容され得る塩は、非天然アミノ酸であり、または配列番号20と少なくとも70%相同である。別の実施形態において、キットは、再水和混合物を有する類似体の医薬として許容され得る塩を含む。別の実施形態において、類似体の医薬として許容され得る塩は、1つの容器中にあるのに対し、再水和混合物は、第二の容器中にある。再水和混合物は、乾燥形態で供給されてもよく、当該再水和混合物へ、水または他の液状溶媒が添加されて、投与前に懸濁液または溶液を形成してもよい。再水和混合物は、組成物を、少なくとも1用量の下剤を服用する対象へ投与する前に、本発明の凍結乾燥した不溶性の塩を可溶化するために設計された混合物である。別の実施形態において、期とは、経口的に利用可能な丸剤形態中の医薬として許容され得る塩を含む。

【0182】

いくつかの実施形態において、キットは、固体支持体に対する少なくとも1つのPIFペプチドまたはその類似体を含む固体支持体を含む少なくとも1つのアレイを含み、ここで、アレイは、免疫調節不全と関係したポリペプチド配列を各々含む少なくとも2つ以上のポリペプチド、または以下に説明するように、表4のポリペプチドから選択されるその類似体を含む。

【0183】

本キットは、2つ以上の容器、パック、またはディスペンサーを、調製及び固定化のための説明書とともに含有してもよい。いくつかの実施形態において、本キットは、本明細書に説明する医薬組成物または組成物を含む少なくとも1つの容器と、注射器のような組成物の送達のための手段を備えた第二の容器とを含む。いくつかの実施形態において、本キットは、溶液中のまたは凍結乾燥したまたは乾燥した類似体を、再水和混合物とともに含む組成物を含む。いくつかの実施形態において、当該類似体及び再水和混合物は、1つ以上の追加の容器中にあってもよい。

【0184】

本キット中に含まれる組成物は、異なる組成物の保管期限が保存され、かつ容器の材料によって吸収も変化もしないよう任意に選択した当該容器中に供給され得る。例えば、適切な容器には、試薬または食品を保持するために典型的に採用されるガラス、ポリカーボネートのような有機ポリマー、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、セラミック、金属または任意の他の材料から作製され得る単純なボトル、アルミニウムまたは合金のようなホイルで裏打ちされた内部からなり得るエンベロープを含む。他の容器には、検査チューブ、バイアル、フラスコ、及び注射器がある。容器は、取り外しの際に組成物の成分を混合させる容易に取り外し可能な膜によって分離された2つの区画を有し得る。取り外し可能な膜は、ガラス、プラスチック、ゴム、または他の不活性材料であり得る。

【0185】

キットはまた、説明材料とともに供給され得る。説明は、紙若しくは他の基材の上に印字され得、及び/またはフロッピーディスク、CD-ROM、DVD-ROM、ジップディスク、ビデオテープ、オーディオテープ、若しくは他の可読記録装置のような、電子可

10

20

30

40

50

読媒体として供給され得る。詳細な説明は、キットと物理的に関係していなくてもよく、代わりに、ユーザーは、当該キットの製造元または販売元によって指定された、または電子メールとして供給されたインターネットウェブサイトへ導かれ得る。

【0186】

別の実施形態において、投与されることになっている医薬製剤、すなわち、PIFペプチド及び/またはPIF類似体またはこれらの医薬として許容され得る塩を含む医薬製剤、容器（例えば、バイアル、ボトル、パウチ、エンベロープ、缶、チューブ、噴霧器、エアゾール缶など）、任意に、保管中及び使用前に製剤を収容するための任意に密封された固体支持体、ならびに本明細書に開示する徴候のうちの任意の1つ以上を治療するのに有効な様式で薬剤投与を実施するための説明書を含む包装したキットが提供される。説明書は典型的には、添付文書、ラベル、及び/または当該キットの他の構成要素上に記載された説明であろう。

10

【0187】

製剤のタイプ及び意図される投与様式に応じて、当該キットには、製剤を投与するための装置（例えば、経皮送達装置）も含まれる。投与装置は、点滴装置、スワブ、スティック、または噴霧器若しくはエアゾール缶のノズル若しくは出口であり得る。製剤は、本明細書に説明する任意の適切な製剤であり得る。例えば、製剤は、作用薬の単位薬用量を含む経口剤形、またはチューブ内に含有されるゲル若しくは軟膏であり得る。当該キットは、同じ薬剤の異なる薬用量からなる複数の製剤を含むしてもよい。当該キットはまた、異なる作用薬からなる複数の製剤を含むしてもよい。

20

【0188】

本キットにはまた、典型的には、個々のキット構成要素、すなわち、ペプチド形態（固定されたまたは固定されていない）と、投与装置（含む場合）と、本明細書に開示するペプチドの固定のための固体支持体または本明細書に開示する固定されたペプチドを含む固体支持体と、使用のために記載された説明とを包装するための手段を含む。このような包装手段は、ボール紙若しくは紙箱、プラスチックまたはホイルパウチなどの形態を取り得る。

【0189】

方法

本開示の実施形態は、免疫調節不全についてのマーカーとしての対象の循環免疫細胞へ結合するPIFの検査方法に関する。いくつかの実施形態は、有効量のPIFを投与すること、及び循環免疫細胞へのPIFの結合を検査することを含む、免疫調節不全によるRPLの病歴のある雌性対象の識別方法に関する。当該方法内で、基準と比較した循環免疫細胞に対するPIFの結合の正常値からの偏差は、対象のRPL病歴が免疫調節不全による可能性が高いことを示すのに対し、基準と比較した循環免疫細胞に対するPIFの正常な結合は、対象のRPL病歴が免疫調節不全によるものではない可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、対象の循環免疫細胞は、DCである。ある特定の実施形態において、DCは、pDC、mDC、またはこれらの組み合わせである。

30

【0190】

他の実施形態は、有効量のPIFを投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該PIFの結合を検査することを含む、免疫調節不全によるRPLに罹患している可能性が高い雌性対象の識別方法に関する。当該方法内で、基準と比較した循環免疫細胞に対するPIFの結合の減少は、対象が、免疫調節不全によりRPLに罹患している可能性が高いことを示し、基準と比較した循環免疫細胞に対するPIFの正常な結合は、対象が、免疫調節不全によりRPLに罹患していない可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、対象の循環免疫細胞は、DCである。ある特定の実施形態において、DCは、pDC、mDC、またはこれらの組み合わせである。

40

【0191】

他の実施形態は、有効量のPIFを投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該PIFの結合を検査することを含む、免疫調節不全に罹患している対象の識別方法に関する。

50

他の実施形態は、有効量の P I F またはその類似体を投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該 P I F の結合を分析することを含む、免疫調節不全に罹患している対象の識別方法に関する。当該方法内で、基準と比較した循環免疫細胞に対する P I F の結合の減少は、対象の免疫調節不全を示し、基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該 P I F の正常な結合は、対象者の免疫調節不全がないことを示す。いくつかの実施形態において、対象の循環免疫細胞は D C である。ある特定の実施形態において、D C は、p D C、m D C、またはそれらの組み合わせである。

【 0 1 9 2 】

他の実施形態は、有効量の P I F を投与すること、及び循環免疫細胞に対する当該 P I F の結合を検査することを含む、子宮内膜症に罹患している対象の識別方法に関する。当該方法内で、基準と比較した循環免疫細胞に対する P I F の結合の減少は、対象の子宮内膜症を示し、基準と比較した当該循環免疫細胞に対する当該 P I F の正常な結合は、対象に子宮内膜症がないことを示す。いくつかの実施形態において、対象の循環免疫細胞は D C である。ある特定の実施形態において、D C は、p D C、m D C、またはこれらの組み合わせである。

10

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施形態において、免疫調節不全に罹患している対象の識別方法は、有効量の P I F またはその類似体を 1 つまたは複数の免疫細胞を含む対象由来の試料へ曝露すること、及び対象の 1 つまたは複数の免疫細胞と P I F またはその類似体の間の結合事象を検査することを含み得、ここで、基準と比較した 1 つまたは複数の免疫細胞に対する P I F の結合の有意な変化は、対象が免疫調節不全に罹患していることを示す。

20

【 0 1 9 4 】

いくつかの実施形態において、結合事象は、アッセイによって検査、判定、測定、または特徴づけられ得る。いくつかの実施形態において、当該アッセイは例えば、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、フローサイトメトリー、またはアフィニティークロマトグラフィーであり得る。いくつかの実施形態において、P I F 結合は、例えば、バイオセンサーのようなセンサーを用いて判定され得る。

【 0 1 9 5 】

概して、E L I S A プロトコルは、マイクロプレートのウェル上へ被覆した、関心対象のタンパク質に特異的な捕捉抗体を用いて開始する。関心対象のタンパク質を含有する標準物、対照検体、及び未知のものを含む試料が、これらのウェル中へとピペティングされる。第一のインキュベーションの間、タンパク質抗原は、捕捉抗体へ結合する。洗浄後、検出抗体をウェルへ添加し、この抗体は、第一のインキュベーションの間に捕捉した固定化したタンパク質へ結合する。過剰量の検出抗体の除去後、H R P 複合体 (二次抗体またはストレプトアビジン) を添加して、検出抗体へ結合させる。第三のインキュベーション及び過剰量の H R P 共役体を除去するための洗浄の後、基質溶液を添加し、酵素によって、検出可能な形態 (色相シグナル) へと転換させる。この着色した生成物の強度は、元の検体中に存在する抗原の濃度と直接比例する。E L I S A を、抗原を定量化するために使用する。E L I S A は、結果が迅速で、一貫しており、かつ分析することが比較的容易にあるので、高処理量スクリーニングに適用可能である。結果は、高度に精製され、事前に適合した捕捉及び検出抗体を利用するサンドイッチ形式を用いて得ることができる。すぐに使える E L I S A キットは、何百もの通常検査されているタンパク質及び他の生体分子のために市販されている。

30

40

【 0 1 9 6 】

概して、フローサイトメトリーは、細胞蛍光及び光散乱に関する個々の測定が可能な方法である。そのような測定は、1 秒間当たり何千個もの細胞の速度で実施し、結果として生じる情報を用いて、細胞の部分集団を個々に選別または分離することができる。簡潔には、細胞をフローサイトメトリーの収集ステージ上へと搭載する。試料を流体システムへと引き入れ、フローチャンパーまたはフローセルへとポンプ輸送する。細胞は、シース流体流と組み合わせられ、シース流体流は迅速にそれを一度に一回移動させて、1 個以上の光

50

源（例えば、レーザー）を通過させる。レーザーからの光ビームは、細胞がフローチャンパーを通過すると当該細胞を励起させる。光散乱及び/または蛍光が捕捉され、スペクトルがフィルター処理され、光検出器を通じて電気信号（電圧）へと変換される。次に、外部コンピュータシステムが電圧データをデジタル化する。デジタル情報は、セルの特徴を定量化するために分析される。フローサイトメトリーは、1つ以上の試料の高速分析に特に有用であり得る。いくつかの場合、フローサイトメトリーは、滅菌PBS中でセルを2回洗浄すること、及びいかなる望ましくない細胞も0.16M塩化アンモニウム溶液で溶解することを包含し得る。免疫細胞は、1、5または10 μ g/mlのFITC-PIFまたはFITC-PIFscrとともに室温で1時間インキュベートした後、3回洗浄して、結合していないペプチドを除去して、フローサイトメトリーのために固定し得る。細胞タイプは、その散乱特性を基に分離してもよい。その内容が全体として参照により本明細書により組み込まれる公開第WO/2009/045443号は、フローサイトメトリーデータを取得する方法についての追加の情報を提供する。

10

【0197】

概して、アフィニティークロマトグラフィーは、複合体混合物から特定の分子または一群の分子を精製するための強力なクロマトグラフィー法である。酵素と基質環の間、受容体とリガンドの間、または抗体と光源の間の相互作用など、2つの分子間の高度に特異的な生物学的相互作用を基にしている。典型的には可逆的であるこれらの相互作用は、親和性リガンドと呼ぶ相互作用分子のうちの1つを固体マトリックス上へと配置して、標的分子が移動相にありながら固定相を作ることによって、精製に使用する。関心対象の分子は典型的には、周知かつ定義された特性を有するであろうし、当該特性は、アフィニティ精製法の間を利用することができる。当該方法自体は、固相または固定相または培地の上に標的分子を捕捉するものと考えることができる。移動相における他の分子は、この特性を有しないので、捕捉されないであろう。次に、固定相は、混合物から取り出し、洗浄し、溶離剤として公知の方法における捕捉から標的分子を放出することができる。いくつかの場合、アフィニティークロマトグラフィーは、関心対象のタンパク質が、関心対象のタンパク質を含む混合物をアフィニティークロマトグラフィー（AC）マトリックス上へ搭載すること、ACマトリックスをアルギニンまたはアルギニン誘導体を含む、pHが8.0より大きな洗浄溶液で洗浄すること、及び関心対象のタンパク質をACマトリックスから溶出することによって結合するACマトリックスを用いて、関心対象の精製したタンパク質を生成することを包含し得、ここで、洗浄は、非緩衝塩の存在なしで実施する。その内容が全体として参照により本明細書により組み込まれる公開第WO/2012/164046号は、アフィニティークロマトグラフィーを完了させる方法についての追加の情報を提供する。

20

30

【0198】

いくつかの実施形態において、PIFは、固体支持体及び1つまたは複数のPIFペプチドまたはその類似体と結合し得、ここで、1つまたは複数のPIFペプチドまたは類似体は、アレイの指定可能な位置で固体支持体へ付着させる。いくつかの実施形態において、固体支持体は、ポリマーで任意に被覆したスライドである。いくつかの実施形態において、固体支持体は、ポリマーで被覆されている。いくつかの実施形態において、ポリマーは、ポリアクリルアミドである。いくつかの実施形態において、固体支持体は、ポリスチレン（TCPS）、ガラス、石英、クォーツガラス、ポリ（エチレンテレフタレート）（PET）、ポリエチレン、ポリビニルジフルオリド（PVDF）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリカーボネート、ポリオレフィン、酢酸エチレンビニル、ポリプロピレン、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、シリコン類、ポリ（メタ）アクリル酸、ポリアミド、塩化ポリビニル、ポリビニルフェノール、ならびにこれらのコポリマー及び混合物から選択される材料である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの付着セットは、固体支持体へ固定された2つの異なるポリペプチドを含む。

40

【0199】

50

いくつかの実施形態において、P I F 結合は、標準または基準の結合特性と比較され得る。いくつかの実施形態において、基準の結合特性は、P B M C サブタイプに対する P I F 結合を検査するための比較として機能する。健常対象において、F I T C - P I F は、正常患者において低い 300 ~ 500 nM へ曝露した場合、約 100% の C D 14 + 細胞と、ならびに、T 細胞、B 細胞、及び N K 細胞に 10% 未満結合する。F I T C - P I F への同じ曝露の後の非妊娠対象における C D 14 + 細胞に対する結合における 20% 超の低下、ならびに T 細胞、B 細胞、及び N K 細胞に対する結合の 20% 超の亢進は、R P L または免疫調節不全についての危険性を構成する。P B M C に対する P I F の結合は、妊娠中に及びマイトジェンまたは免疫活性化因子への曝露後に、有意に増加する。未処置の細胞における C D 14 + 細胞と 100% を結合することができないこと、または活性化後の結合を亢進させることができないことは、R P L 及び子宮内膜症を含むがこれらに限定しない障害においてみられるような免疫機能障害を反映する。正常と比較した C D 14 + 細胞への P I F の結合の減少は、対象の先天免疫が影響されていることを示し得る。正常と比較した、T 細胞、B 細胞、N K 細胞及びこれらの組み合わせ (P B M C) から選択される細胞への P I F の結合の 20% 超の増加は、対象の適応免疫が影響されることを示し得る。したがって、いくつかの実施形態において、血液試料を患者から収集し、フィコール・ハイパックを用いて P B M C を分離し、分離した P B M C の結合特性を検査する。F I T C - P I F (500 nM) が、室温の培地 (R P M I 無血清) 中で 30 分間 P B M C へ曝露される。その後、P B M C を洗浄して、過剰量の F I T C - P I F を除去し、標識した P B M C をフローサイトメーターの中に入れ、特異的な抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 8 抗体、抗 C D 19 抗体、及び抗 C D 56 抗体を用いることによって、種々の免疫表現型との相互作用を 203 色で分析する。特異的結合は、ゲート処理された象限において判定する。基準結合特性は、P I F が C D 14 + 細胞 (すなわち、単球及び / またはマクロファージ) の約 100% へ結合し、かつ C D 4 細胞、C D 8 細胞及び / または B 細胞の約 10% 未満へ結合するというものである。それゆえ、いくつかの実施形態において、免疫調節不全は、P I F が C D 14 細胞 (すなわち、単球及び / またはマクロファージ) の約 80% のみへ結合し、かつ C D 4 細胞、C D 8 細胞ならびに / または T 細胞、B 細胞、及び N K 細胞の 20% 超へ結合する場合に識別される。代替的な実施形態において、F I T C - P I F が、約 25 μ M という比較的高濃度で添加される。当該比較的高濃度では、異なる結合結果が、種々の形態の免疫調節不全に罹患している対象において予期される。具体的には、より高い濃度では、C D 4 細胞、C D 8 細胞ならびに / または T 細胞、B 細胞、及び N K 細胞に対する P I F の結合は、正常対象において亢進すると予期され、したがって、結合の亢進がないこと、または亢進する結合がないことは、対象の免疫機能障害を示している。他の代替的な実施形態において、P I F 結合は、P H A の存在下で検査され、ここで、C D 4 + 細胞、C D 8 + 細胞、及び C D 19 + 細胞に対する結合は、およそ 30 倍低下すると期待される。それゆえ、P H A の存在下で、予期される通り亢進しない P H A 結合は、対象の免疫機能障害を示している。本明細書で、「基準」、「対照」、「標準」、「平均」という用語、及びこれらに類するものは概して、先に説明する正常な結合特徴を指す。

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態において、本開示の方法は、有意な変化を測定すること、分析することまたは比較することを含む。いくつかの実施形態において、「有意な変化」は、統計的に有意な結果を指す。概して、統計的有意性 (または統計的に有意な結果) は、p 値が有意レベル未満である場合に得られる。p 値は、帰無仮説が真であるとして、極端な結果を少なくとも得る確率であり、一方アルファ () レベルの有意性は、無機仮説が真であるとして、帰無仮説を拒絶する確率である。データ収集前に選択される有意性レベルは例えば、0.05 (5%) であり得る。いくつかの実施形態において、スチューデントの t 検定が、有意性を評価するために使用され得る。概して、t 検定は、帰無仮説が支持される場合に検定統計値がスチューデントの t 分布に従うあらゆる統計仮説検定である。この検定は、2 セットのデータが互いに有意に異なるかどうかを判定するために使用すること

10

20

30

40

50

ができ、検定統計値における尺度項目の値が公知であった場合、検査統計値が正規分布に従うであろう場合に最も普遍的に適用される。尺度項目が未知でありかつ、データを基にした概算値によって置き換えられる場合、検定統計値（ある特定の条件下において）は、学生t分布に従う。いくつかの実施形態において、他の統計的検定を用いて有意性を判定し得る。いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、PIFペプチドを用いて、PIFペプチドを使用して、異なる免疫表現型に対するその結合を検定し得る。いくつかの実施形態において、そのようなPIFペプチド結合が、妊娠対象及び非妊娠対象において比較され得る。いくつかの実施形態において、基準と比較したこのようなPIF結合の差は、平均±平均の標準誤差（SEM）または標準偏差（SD）として表し得る。いくつかの実施形態において、基準と比較したこのようなPIF結合の差は、2標準偏差として表し得る。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、免疫細胞機能に及ぼすPIFの効果を測定するために使用され得、ここで、RPLの病歴を有する対象は、基準と比較される。やってくる実施形態において、免疫細胞機能は、サイトカイン分布の変化を検査することによって判定され得る。いくつかの実施形態において、有意な変化は、±約20%であり得る。

10

【0201】

いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、子宮内膜症の病歴を有する1個体以上の対象に由来する血清によって影響されるかどうかを測定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、有意な変化は、±約20%であり得る。

20

【0202】

いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、またはこれらの類似体、及びそれらの組み合わせから選択される。ある特定の実施形態において、PIFペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、及びこれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、アミノ酸の構造的及び機能的類似体を有する化合物、例えば、合成アミノ酸または非天然アミノ酸あるいはアミノ酸類似体を有するペプチド模倣体から、当該模倣体が本開示の化合物の1つ以上の機能または活性を有する限り、選択され得る。

30

【0203】

いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、非妊娠マウスにおけるCD45+細胞に対する結合を検定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、FITC-PIF標的を評価することによって、インビボでPIF標的を判定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、標的は例えば、脾臓または骨髄であり得る。

【0204】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示する方法のうちのいずれもが、対象から試料を単離または採取するステップを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示する方法のうちのいずれもが、PIFまたはその類似体と1個以上の細胞の間の結合事象または結合親和性を検査または分析または測定する前に、試料を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）へ曝露することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示する方法のうちのいずれもが、試料を1つまたは複数の細胞に対するPIFまたはその類似体に対して曝露した後、単離されているかまたは試料中の成分としてのいずれかで、1つまたは複数の細胞を単離して、1つまたは複数の細胞のタンパク質発現に基づいた結合特性を作成することを含む。いくつかの実施形態において、当該方法は、単離した骨髄細胞、脾細胞、PBMC、CD45+細胞、CD14+細胞、CD4+細胞、CD8+細胞、樹状細胞、CD25+細胞、FoxP3+細胞、CD4+/CD25+/FoxP3

40

50

+ 細胞などの免疫細胞を含む。さらに、いくつかの実施形態において、測定するタンパク質発現は、1つまたは複数の単離した細胞が発現するサイトカインの量を測定または分析することを含む。

【0205】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示する方法のうちいずれもが、1つまたは複数の細胞へ結合したタンパク質へ共有結合したまたは非共有結合した色素または他の検出部分に由来する色素または蛍光の量を定量化することによって、当該タンパク質の量を分析するステップを含む。結合事象は、PIFまたはその類似体など、ポリペプチドへ結合するために当該技術分野で公知の任意の技術を用いて可視化、検出または定量化され得る。いくつかの実施形態において、PIFまたはその類似体のような固定化したタンパク質は、いかなる方法においても使用するポリペプチドの量の可視化または定量化を容易にする色素または他の標識の挿入、共有結合または非共有結合、または吸着を可能にする検出部分を含み得る。本明細書の方法のうちいずれもに有用なポリペプチドの標識の例は、次の通りである：レゾルフィン、マラカイトグリーン、フルオレセイン、FITCまたはジアミノベンジジンのような一重項酸素遊離基発生体、金属キレート剤のような分析物結合基（この非限定例としては、EDTA、EGTA、ピリジニウム、イミダゾール及びチオールが挙げられる）、ヨウ素のような重原子担体、ヒスチジンタグ、GSTタグ、FLAGタグ及びHAタグのような親和性タグ、ベンゾフェノン及びアリジジンのような光励起性架橋剤、アゾベンゼンのような光スイッチ標識、ならびにニトロベンジル基、ジメトキシニトロベンジル基またはNVOCのような感光性保護基、あるいはタグまたは標識を含む本明細書に開示するポリペプチド特異的抗体のような大きな高分子（本明細書に開示する免疫組織化学実験に使用するものは1つの非限定例である）。いくつかの実施形態において、本明細書に開示する方法のうちいずれもが、標識または検出部分の励起を電磁波で刺激することによって、タンパク質へ共有結合または非共有結合した色素または他の検出部分からの色素または蛍光の量を定量化することによって、1つまたは複数の細胞へ結合したタンパク質の量を分析するステップを含む。例えば、光励起性検出部分の場合、PIFまたは他のポリペプチドへ結合した化学部分は、濃度依存的様式でタンパク質から当該化学部分を切断する光へ曝露され得る。試料中の反応産物の量は、当該反応産物に対応して得たシグナルの量と相関させることができる。

10

20

30

【0206】

本開示はさらに、(a)本明細書に開示するアレイまたはシステムへ細胞試料を接触させること、(b)1つ以上の結合事象を定量化すること、(c)結合事象を基にした細胞試料の1つ以上の結合署名を判定すること、及び(d)細胞試料の結合署名を対照細胞試料の結合署名と比較することを含む、対象における免疫調節不全の診断方法に関する。本開示は、細胞試料を本明細書に開示するアレイまたはシステムへ接触させることを含む、細胞の単離方法も提供する。いくつかの実施形態において、細胞の単離方法は、細胞試料を本明細書に開示するアレイまたはシステムへ、細胞が細胞試料の他の成分よりも密にアレイまたはシステムへ接着するのに十分な時間、かつ十分な条件下で接触させることを含む。いくつかの実施形態において、細胞の単離方法はさらに、アレイまたはシステムを細胞試料の他の非結合成分を細胞から洗い出す緩衝液ですすぐことも含む。

40

【0207】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示する方法のうちいずれもが、1つまたは複数のPIFペプチドまたはその類似体を対象へ投与した後に、インビボでタンパク質へ共有結合または非共有結合した色素または他の検出部分から色素または蛍光の量を定量化することによって、1つまたは複数の細胞へ結合したタンパク質の量を分析するステップを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示する方法のうちいずれもが、1つまたは複数の細胞を単離して、1つまたは複数の細胞のタンパク質発現を基にした結合特性を作成することの前に、試料を1つまたは複数の細胞へインビボで対するPIFまたはその類似体へ曝露することを含む。いくつかの実施形態において、当該分析は、デジタル顕微鏡によって実施し得る。いくつかの実施形態において、当該分析は、生検の切片

50

を採取すること及び当該切片をデジタル顕微鏡または光学顕微鏡へ曝露することを含む。

【0208】

いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、例えばCD14+細胞、CD8+細胞、またはCD4+細胞などの免疫細胞に対する当該PIFペプチドの結合を、アフィニティークロマトグラフィーに続いて質量分析を実施してタンパク質を識別し、濃度を階級分けすることによってそれらの間の結合を比較することによって、判定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、例えば、CD14+細胞、CD8+細胞、またはCD4+細胞のような免疫細胞に対する当該PIFペプチドの結合を、アフィニティークロマトグラフィーに続いて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析を実施して、タンパク質を識別し、濃度を階級分けすることによってそれらの間の結合を比較することによって、判定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、本結果は、濃度量の階級分けまたはタンパク質発現の定量化が変化するかどうか、あるいは、関与する異なるタンパク質または経路があるかどうかを判定するために、異常なPBMCと比較され得る。

10

【0209】

いくつかの実施形態において、妊娠ウマ及び非妊娠ウマ由来の血清中のPIFが比較され得る。いくつかの実施形態において、妊娠ウマ及び非妊娠ウマ由来の血清中のPIFが比較され得る。いくつかの実施形態において、単離した細胞に対して結合している固定化されたPIFは、平均±標準誤差として表し得る。いくつかの実施形態において、健常な、PIF処置した、LPS処置した、及びPIF+LPS処置したマウスにおける血清及び胎盤におけるサイトカインレベルが比較され得る。いくつかの実施形態において、本結果は、平均±標準誤差として表し得る。いくつかの実施形態において、免疫機能障害は、値に有意な変化がある場合、診断され得る。例えば、いくつかの実施形態において、有意な変化は、平均の結果の標準誤差または標準偏差の約2倍よりも大きな移行を含み得る。

20

【0210】

いくつかの実施形態において、健常な、PIF処置した、LPS処置した、及びPIF+LPS処置したマウスにおける血清及び胎盤におけるサイトカインレベルが比較され得る。いくつかの実施形態において、本結果は、平均±標準誤差として表し得る。

【0211】

いくつかの実施形態において、免疫機能障害は、値に有意な変化があった場合、診断され得る。上述の実施形態のうちのいずれにもおいて、有意な変化は、平均の結果の標準誤差または標準偏差の約2倍よりも大きな移行を含み得る。

30

【0212】

本出願において開示するいかなる公開物も（雑誌の論文であろうと特許出願であろうと他の公開物であろうと）、それらの内容の全体が本明細書に組み込まれる。使用方法及び材料を説明する本開示及び実施形態は、以下の非限定例に対する参照により、さらに理解され得る。

【実施例】

【0213】

実施例1

PIFは、妊娠中に必須の役割を担っており、PBMCに及ぼすsPIFの免疫調節効果によって実証されているように、局所免疫にだけでなく、全身的にも作用する。観処置のCD14+単球は、PIFの主要な標的である。

40

【0214】

本研究の目的は、sPIFが、末梢血（PB）単球から免疫寛容原性DCを生じるうえで役割を担っているかどうかを調べることであった。これらの知見は、全身性母系免疫寛容を生じるうえでのこのペプチドの起こり得る関与を示すであろう。

【0215】

DCは、特異的抗原特性を有することによって、及びより重要なことには、免疫調節機能（T細胞活性化を阻害して、調節性T細胞の発達及び増殖を誘導及び促進する能力）に

50

よって免疫寛容原性と定義することができる。

【0216】

健常ドナーPBからの免疫磁気選別によって精製したCD14+単球を、「従来の」DC分化または推定免疫寛容原性(tolerogenic)分化を促進するために、異なるサイトカイン組み合わせを有する無血清条件下で培養した。

【0217】

表現型特徴づけ及び機能検査も、妊娠3か月及び6か月における女性のPBから単離したDCに関して実施した。

【0218】

PIFが免疫寛容原性DCの発生に関与する可能性があるという知見は、妊娠および自己免疫疾患中に生じる免疫変化をさらに説明することができた。

【0219】

妊娠中断についてのマーカーとしてのpDC及びmDCに対するPIFの結合

【0220】

生育可能な妊娠を通じてのPIFの産生は、胚が生存して子宮内環境を整えるために必要である。PIFは、母系免疫システムも整え、合成PIF(sPIF)は、天然PIFの機能を置き換える。子宮内膜細胞及び単球/マクロファージの細胞は、PIFの主要標的である。直接的な作用を通じて、PIFは、再発性妊娠中断(RPL)に罹患している対象に由来する血清の存在下で培養した胚の死亡を予防するための救助因子として作用する。その上、PIFは、RPL対象におけるナチュラルキラー(NK)細胞の細胞毒性を低下させることがすでに示されている。免疫系は、RPLにおける支配的な役割を直接的または間接的のいずれかで担っているため、かつ樹状細胞(DC)は、免疫応答を調節するので、本発明者らは、13人のRPL対象及び11人の健常妊娠(HP)対象における循環Th2促進形質細胞様DC(pDC)及びTh1炎症促進性骨髄性DC(mDC)に対する外来性PIFの数及び結合を比較した。

【0221】

使用した材料及び試薬：ポリプロピレンチューブ(Greiner)溶解溶液IX(BD Pharm Lyse)、リン酸緩衝塩類溶液(PBS)、ダルベッコA(Oxoid)、PIF-1 FITC(ロットAAF-192//387-66)、抗FITC(BD)、抗hCD123 PE(BD)、抗hCD11c APC(BD)、抗hHLA-DR PerCP(BD)、及びBD FACSCanto。

【0222】

方法：100µLの全血を2mLの溶解溶液とともに室温(RT)で10分間インキュベートした。試料を2mLのPBSで洗浄し、1200rpmで遠心分離した(小休止1)。ペレットを100µLのPBS中で緩徐に再懸濁し、抗CD123抗体、抗系統カクテル抗体、抗CD11c抗体及び抗HLA-DR抗体とともに暗所においてRTで15分間インキュベートした。試料を2mLのPBSで洗浄し、1200rpmで遠心分離した。ペレットを1mLのPBS中で緩徐に再懸濁し、0.118µMとともにRTで1時間インキュベートした。試料を2mLのPBSで洗浄し、1200rpmで遠心分離した。試料を500µMのPBSで再懸濁し、即時BD FACSCantoで測定した。

【0223】

結果：4人のRPL対象は、mDCの10倍超の増加を示したのに対し、7人のRPL対象は、HP群と類似の値を有しており(0.10±0.08)、pDCの百分率における差は観察されなかった(RPL群における0.113±0.09対HP群における0.116±0.03)。在胎期間は、HP群におけるpDCまたはmDCのいずれの値も変更しなかった。PIF結合細胞は、RPL群におけるpDC及びmDCにおいて等しく減少した(pDC PIF+ : RPL群における41.2±19.2対HP群における58.2±18.3、p=0.0381、mDC PIF+ : RPL群における46.1±14.2対HP群における57.9±9.1、p=0.029)。個々のRPL対象に存在するmDCのレベルとmDC PIF+の%の間には関連性がなかった(図1A~図1D

10

20

30

40

50

)。これらのデータは、DCに対するPIF結合の低下が、RPLの危険性に関するマーカーを表すことができることを示唆する。

【0224】

実施例2

RPLの症例における妊娠前の免疫の変化の識別

PIFが健常な非妊娠対象と比較して18回の流産歴のある対象における免疫欠如を識別することができるかどうかを判定するために、18回の流産歴のある対象を試験した。未処置の免疫細胞及び活性化した免疫細胞の両方に対するPIFの結合を検査した。概して、妊娠前は、PIFは主として、CD14+細胞へ結合するが、妊娠中は高フルオレセインイソチオシアナート(FITC)-PIF曝露時に結合が60~70%から80~90%まで高まった。それゆえ、妊娠前の結合の亢進は、免疫細胞の病的活性化を示す。そのような結合は、末梢血単核球(PBMC)にも影響する。この効果は、いくつかの遺伝子発現に及ぼす効果がありながら、サイトカイン分泌に及ぼす効果がモデル化されている、未処置の細胞において発揮される。対照的に、抗CD3、抗CD3/CD28、抗LPS、及び/または抗PHAによる活性化後に、免疫応答は大いに増幅される。それゆえ、PIFに対するPBMCの曝露後の不適切な応答は、妊娠前の過剰な免疫活性化を反映しており、潜在的な妊娠病理または起こり得る再発性妊娠中断(RPL)の指数を提供し得る。

10

【0225】

FITC-PIF結合を判定するために、18回の流産歴のある対象を試験した。加えて、所与のサイトカインを発現する本対象者のリンパ球の百分率に及ぼすPIFの効果を判定し、本結果を健常対照の結果と比較した。さらに、同じ実験を、PBMCを強力なマイトゲンである植物性血球凝集素(PHA)1µg/mLを用いて活性化することによって、実施した。

20

【0226】

正常なドナーのPBMCを洗浄して、1µg/mLのPHA及び30nMのPIF若しくはスクランブル型PIF(PIFscr)を含有するAIM-V培地中で培養した(24穴のクラスターにおける1穴あたり2.4×10⁶個)。培地は、2日後の後毎日、本実験が完了する4日後まで、PIF含有新鮮培地(PHA非含有)と交換した。それぞれ2µM及び10µg/mLのモネンシン及びブレフェルジン(Berfeldin)を収集6時間前に添加した。細胞を表面マーカー特異的抗体(CD4+)と混合した後、製造元のプロトコル(Beckman-Coulter)によって固定及び透過のために加工し、サイトカイン特異的抗体(抗IFNまたは抗IL10)を用いて染色した。細胞は、3色分析を用いるCoulter Epics XLフローサイトメーターにおいて分析した。散乱ゲート開閉は、小さな及び大きな(芽球性)リンパ球の両方を含んでおり、サイトカイン陽性細胞をすべて計数した。細胞は、1.5µg/mLのFITCへ30分間曝露した後、接着していないリガンドを洗い落とす。その後、PBMCに対する結合は、2色のフローサイトメーターを用いることによって判定した。データは、CD14+細胞に対する結合が、対照と比較して増幅することを示した(図2)。細胞を活性化した時、差は観察されなかった。PHAの存在下で他の系統に対する結合を対照と比較して検査した時、CD4及びCD8の両方に対する結合は低下したが、CD19に対する結合の差は確認されなかった(図2)。

30

40

【0227】

第二の実験において、所与のサイトカインを発現する対象のリンパ球の百分率に及ぼすPIFの効果を決定し、本結果を健常対照の結果と比較した。このことは、PIF単独及びPHAによる活性化後に実施した。データは、PIFをPIFscr対照と比較するIL10、IL4、及びTNFを検査する、対照対象における24~96時間の実験を示す。IL10+細胞の数は、対照と比較して有意に増加した。この増加に続いて、1µg/mLのPHAへの曝露96時間後に基線に戻った。サイトカイン比を対照と比較し、30nMのPIFは、炎症促進性/抗炎症性比(TNF/IL10/IL4)の低下をもた

50

らした。加えて、これらのサイトカインに及ぼす $0 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA を検査した時、用量依存的応答を特記し、ここで、対照と比較した PIF の最大効果は、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ で確認された (図 3 ~ 図 5、表 6 ~ 表 8)。

【表 6】

表6

低用量PHA活性化及びPBMCによる
サイトカイン特性に及ぼすPIFの効果

IFN- γ

		0	0.1	0.3	1	3
36 時間	3L	11.31	15.13	6.16	13.16	19.64
	3SMP	10.85	17.75	7.66	15.62	26.02

10

		0	0.1	0.3	1	3
60 時間	3L	11.45	20.01	15.38	17.9	27.14
	3SMP	10.66	21.78	13.33	22.53	29.78

20

		0	0.1	0.3	1	3
96 時間	3L	11.21	18.3	12.63	17.92	16.42
	3SMP	11.46	23.04	25.95	37.42	18.3

【表 7】

表7

低用量PHA活性化及びPBMCによる
サイトカイン特性に及ぼすPIFの効果

IL-4

		0	0.1	0.3	1	3
36 時間	3L	11.95	18.5	8.86	12.05	18.61
	3SMP	10.07	17.97	7.33	9.26	16.84

10

		0	0.1	0.3	1	3
60 時間	3L	13.48	19.25	19.6	22.73	29.52
	3SMP	12.45	22.62	12.47	22.13	25.2

		0	0.1	0.3	1	3
96 時間	3L	9.85	16.56	11.67	19.85	20.96
	3SMP	9.94	5.72	8.04	11.26	15.03

20

【表 8】

表8

低用量PHA活性化及びPBMCによる
サイトカイン特性に及ぼすPIFの効果

IL-10

		0	0.1	0.3	1	3
36 時間	3L	9.18	13.19	6.67	8.14	15.19
	3SMP	8.07	15.53	5.57	10.54	16.12

30

		0	0.1	0.3	1	3
60 時間	3L	9.13	14.57	14.03	29.18	32.71
	3SMP	9.65	18.27	11.69	18.29	24.38

40

		0	0.1	0.3	1	3
96 時間	3L	8.92	16.64	13.97	16.58	17.72
	3SMP	10.66	15.06	11.88	12.95	13.42

【 0 2 2 8 】

その後、RPL対象を健常対照対象と比較した。本データは、いくつかのサイトカイン

50

における主要な変化を示した。PHAの存在下で、TNF / IL10比は、RPL及び対照対象の両方において低下した。対照的に、PIFの存在下で、TNF / IL10比はRPL対象において増大したが、対照対象において低下した。INF 基線発現は、RPL対象においてより高かった。PHAはさらに、RPL対象においてINF 基線発現を亢進したが、対照対象においては4倍亢進を確認した。しかしながら、PIFの存在下で、INF 基線発現は、RPL対象においてほぼ3倍低下した。RPL対象において、基線IL4は高く、PHAによって影響されなかったが、PIFによって低下した。対照対象において、基線IL4は低く、PHAはIL4を4倍高めたのに対し、PIFは、IL4を同量だけ減少させた。INFg / IL4比は同様に挙動した(図6)。サイトカインにおける基線変化及びPHA誘発性変化の両方において、Th1 / Th2の上昇のような応答の差は、免疫調節不全を示す。

10

【0229】

実施例3

PIFは、14-3-3タンパク質、熱ショックタンパク質及びジイソメラーゼタンパク質を標的として、免疫応答を調節する：インビボでの免疫ターゲティングについての証拠

PIFペプチドの合成

合成PIF(MVRIKPGSANKPSDD; 15アミノ酸)及びスクランブル型PIF(PIFscr; GRVDPSNKSMPKDIA)を、Bio-Synthesis, IncのFmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニル)の化学的性質を採用する固相ペプチド合成(ペプチド合成装置, Applied Biosystems)によって合成した。最終精製は、逆相HPLCによって実施し、同一性は、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析及び95%超の純度のアミノ酸分析によって実証した。

20

【0230】

インビトロ表面プラズモン共鳴(SPR)分光光度法試験

SPR実験はすべて、ピアコアXユニット(GE Healthcare)を用いて実施した。実験は、37°Cで、HBS-EP(3mM EDTA及び0.005容積%を補充した10mM HEPES及び150mM NaCl)を用いて10µL/分の定常流量で実施した。界面活性剤P20は、ランニングバッファーとしてpH7.4へ調整した。まず、最適な固定化はPIF15に対して整え、RP(陰性対照として使用)及びTLR4-MD2はpHスカウティングを介して測定した。CM5チップのカルボキシル化デキストランマトリックス(GE Healthcare)に対するこれらのペプチドの共有結合固定化は、PIF15及びTLR4-MD2に対してpH5.0へならびにRPに対してpH4.0へ調整した10mM酢酸ナトリウムを固定化緩衝液として用いる標準的なアミンカップリングを用いて実施した。PIF15センサー表面を利用する実験すべてについて、RPは、第一基準フローセル(FC1)へ固定化し、PIF15は「下流の」フローセル(FC2)へ固定化した。センサーグラムは、基準減算シグナル(すなわち、FC2-FC1)として提示する。1µMの濃度でHBS-PE中に懸濁したCD14及びTLR4-MD2は各々、PIF15センサー表面上を通過し、PBMCsに及ぼす効果がPIFとCD14またはTLR4-MD2との結合を介して生じるかどうかを評価した。(p.vulgaris)由来の植物性血球凝集素(PHA)(Sigma-Aldrich)、大腸菌EH100由来の粗面(Ra)LPS(Sigma-Aldrich)及び大腸菌O55:B5由来の平滑LPS(Sigma-Aldrich)は、PIF15センサー表面上を通過して、PBMCに及ぼす刺激物質(PHA及びLPS)活性に対するPIFの調節効果がPIFと当該刺激物質の間の直接的な相互作用の結果であるのかまたは同族細胞効果を有するPIF由来なのかを検査した。刺激物質は、HBS-PE中に(PHAについては2.5、5若しくは10µMで、またはLPSについては5、25若しくは100µMで)懸濁した。PIF特異的モノクローナル抗体(クローンPIF-1/GENH1.12.7)(Genway Technologies)は、HBS

30

40

50

- P E中に(1000、500または250 nMで)懸濁し、陽性対照としてPIFセンサー表面上に負荷した。TLR4センサー表面も作製して(TLR4はFC2中に固定化した)、PIFとTLR4の間の相互作用の可能性をさらに評価した。PIFは、0.5 mMの濃度でHBS-NE中に懸濁し、TLR4センサー表面上に負荷した。

【0231】

P B M C 結合試験

不妊治療を経験した非妊娠対象は、標準的なインフォームドコンセントに署名した。試験は認可CARI Institute(イリノイ州シカゴ市)であった。血液は、識別子を有さない過剰な検体を使用する精密検査方法の一部として採取した(n=12)。追加の試料を得た。P B M Cは、末梢血から単離した(フィコール・ハイバック密度勾配法)。P B M Cは、FITC-PIF、FITC-PIFscr、及び大きさの符合した無関連ペプチドを(0~100 μM)濃度で、抗体カクテル(抗CD3、CD4、CD8、CD25、FoxP3; PD Pharmingen)とともにインキュベートした。アイソタイプ抗体は、陰性対照として使用した。2色及び3色染色を実施した。Coulter Epics XLフローサイトメーターによる蛍光測定(20000~50000回ゲート開閉した事象/試料)は、System IIソフトウェア(Beckman Coulter)を用いて分析した。

10

【0232】

P B M C

同意を得た後の3名の異なる非妊娠健常ドナーから全血ユニットを得た。フィコール・ハイバックを用いることによる分離の後、単離したP B M Cは、CD14、CD4またはCD8アフィニティカラムを用いて個別に各ユニットを通過させた。その後、細胞をPBSで洗浄し、無血清培地中で凍結させ、さらなる加工のためにEprogenへ-80で搬送した。

20

【0233】

CD14、CD8及びCD4細胞抽出

PIF樹脂アフィニティカラムは、本試験のために特別に設計され、通常使用する多ステップ法の代わりに用いた。本データは、PIFカラムのみを対照との比較として示した(アガーのみのカラムは、特定のタンパク質を抽出することができた)。簡潔には、PIF15に対し、N末端にある炭素スパーサー(C6)に続いて当該末端にシステインがあり、次に、システインのチオール基をアガロース樹脂(Biosynthesis, テキサス州)へ複合体化させた。細胞の抽出のためのプロトコルは次の通りであった。50 μL/mLのPIF樹脂を1分間遠心分離し(6,000 x g)、コンパクト反応チューブ(CRT)(Becton-Dickenson)中の150 μLの非洗剤系溶解緩衝液(NDLB)(Eprogen)で遠心分離により2回洗浄した。8~10 Mの細胞を含有するバイアルを1.5 mLのNDLBで、-80 に至る2回の凍結解凍周期によって溶解し、結果として生じる可溶化液を約6000 x gで遠心分離した。450 μLの可溶化液上清を、洗浄した樹脂を含有するCRTへ添加し、これうえお4 で1時間、間欠的にボルテックスしてインキュベートし、良好なPIF樹脂-タンパク質接触を確実にした。当該管を1分間遠心分離した(6000 x g)後、100 mLのNDLBで2回洗浄した。濾液を組み合わせ、ProteoSep(登録商標)RP HPLC実行のために400 μLの総容積へ希釈した。可溶化液で処理した樹脂を150 μLの0.1 Mグリシン-HCl溶液で2回、ボルテックスによって10分間抽出した後、1分間遠心分離した。PIF抽出したタンパク質を含有する結果として生じる濾液を組み合わせ、MS分析前に-80 で凍結した。

30

40

【0234】

プロテオミクスMS分析:トリプシン消化

タンパク質抽出物の溶液中トリプシン消化を、製造元の手順により、フィルター支援型試料調製消化キット(FASP)を用いて実施した(Protein Discovery, Expedeon)。簡潔には、上述由来の40 μLのタンパク質可溶化液を4 μモ

50

ルのDTTで、室温で1時間還元した。この試料をスピンフィルター中の200 μ Lの尿素試料溶液と混合し、14,000 \times gで15分間遠心分離した。さらなる200 μ Lの尿素試料溶液で洗浄した後、試料のフロースルーを廃棄した。スピンフィルター上のタンパク質を90 μ Lの尿素試料溶液中のヨードアセトアミド中、暗所で20分間アルキル化した。フィルター中のタンパク質を100 μ Lの尿素試料溶液で2回洗浄し、14000 \times gで10分間遠心分離した。次に、100 μ Lの50mM重炭酸アンモニウム(NH₄HCO₃)をスピンフィルターへ添加し、14000 \times gで10分間遠心分離し、2回以上反復した。トリプシン消化を37 $^{\circ}$ Cで一晩、1:100のトリプシン:タンパク質比を用いて実施した。インキュベーション後、スピンフィルターを40 μ Lの50mM NH₄HCO₃で2回洗浄し、14000 \times gで10分間遠心分離し、濾液を清潔な管へ収集した。50 μ Lの0.5M塩化ナトリウム溶液を添加して、14000 \times gで10分間遠心分離することによってペプチドを抽出した。トリプシン処理したペプチドを含有する収集した濾液を、5 μ Lのギ酸で酸性化し、C18固相抽出(SPE)(Supelco Discovery SPE, Sigma Aldrich)を介して脱塩した。濾液を真空下で乾燥させ、トリプシン処理したペプチドを、その後のLC-MS/MS分析のために20 μ Lの0.1%ギ酸中で再懸濁した。

10

【0235】

プロテオミクスMS分析: LC-MS/MS分析

試料は、Thermo LTQ Vclo二重圧リンカーイオントラップシステム(Thermo)へ連結したEasy nLC-IIシステム(Thermo)を用いた逆相ナノフロー液体クロマトグラフィー及びタンデム質量分析(LC-MS/MS)によって分析した。標準的なウマチトクロムC消化物を品質の対照として注入した。2マイクロリットルの試料をトラップカラム(EASY-Column 2cm、内径100 μ m、5 μ m、C18-A)上へとオートサンプラーを介して負荷した後、分析用カラム(EASY-Column、10cm、内径75 μ m、3 μ m、C18-A2)へと250nL/分の流量で方向づけた。移動相は、溶媒A(0.1%ギ酸含有99.9%水)及び溶媒B(0.1%ギ酸含有99.9%アセトニトリル)からなった。分離は、100分の実行時間を用いて達成した。第一の線形勾配は、90分間の2%~40%Bであり、第二の線形勾配は、5分間の40%~80%Bであり、5分間保持した後、初回移動相組成(2%B)へと戻した。タンデム質量スペクトル(MS/MS)は、データ依存走査によって所与のクロマトグラフィー時点で上位10の多量のイオンに関して獲得した。

20

30

【0236】

プロテオミクスMS分析: ペプチド/タンパク質識別

タンデム質量スペクトルはすべて、Xcalibur第2.7.0版によって抽出し、Sequest(Proteome Discoverer, Thermo)によって分析し、X!Tandem.Sequest(第1.3.0.339版)及びX!Tandemをセットアップして、トリプシンで指標を付けた逆に鎖状につながれたIPIマウスタンパク質データベース(第3.86版、119068件登録)を、0.8Daの断片イオン質量耐性及び2.0Daの親イオン耐性で検索した。システインのカルバミドメチル化は、固定化した修飾としてSequest及びX!Tandemにおいて指定し、メチオニンの酸化は種々の修飾としてであった。Scaffold3(Proteome Software, オレゴン州ポートランド市)を用いて、Sequest検索結果を編集し、MS/MSに基づいたペプチド及びタンパク質の識別を確証した。ペプチドの識別は、Peptide Prophetアルゴリズムによって指定されたように95.0%を超える確率で確立することができる場合に受理した。タンパク質の識別は、99.9%を超える確率で確立できかつ少なくとも2つの識別されたペプチドを含有する場合に適合するとした。タンパク質の確率は、Protein Prophetアルゴリズムによって割り当てられた。標識のない相対量の定量化は、スペクトル計数アプローチによって実施した。

40

【0237】

50

P I F 結合試験

C 5 7 B L / 6 マウスに 1 0 0 μ L の 5 0 0 n M F I T C - P I F を静脈内または腹腔内注射した。それぞれ 5 分後または 3 0 分後に、マウスを屠殺し、ヘキサンドライアイス浴中に浸漬し、凍結培地中に包埋し、4 0 μ m の全身切片を作製した。切片を脱水し、F I T C - P I F 蛍光を撮像するための励起波長 (2 9 5 n m) に設定した T y p h o o n (商標) 9 1 4 0 バイオアナライザー (G E H e a l t h c a r e) を用いて走査した。F I T C - P I F へ氷上で 1 時間曝露した C 5 7 B L / 6 マウスから白血球または脾細胞を収集した。細胞を洗浄し、1 m L の F A C S 緩衝液 (B e c t o n - D i c k i n s o n) 中に再懸濁し、F I T C - P I F と結合する細胞の百分率を、P E / C D 4 5 + 標識細胞に対してゲート開閉する 2 色フローサイトメーター (B e c t o n - D i c k i n s o n) を用いて測定した。

10

【 0 2 3 8 】

フローサイトメトリー試験

異なる濃度の F I T C - P I F へ氷上で 1 時間曝露した C 5 7 B L / 6 マウスから白血球または脾細胞を収集した。細胞を洗浄し、1 m L の F A C S 緩衝液 (B e c t o n - D i c k i n s o n) 中に再懸濁し、F I T C - P I F と結合する細胞の百分率を測定した。循環ネズミ免疫細胞に対する P I F の結合と関係した細胞タイプの識別を検査した。免疫細胞は、屠殺後に収集した。収集した細胞を F I T C - P I F (1 2 . 5 ~ 5 0 μ g / m L) の溶液とともに、抗 C D 4 5 (B D P h a r m i n g e n) とともにインキュベートした。アイソタイプ対照は、陰性対照として機能した。2 色染色は、従来の技術を用いて実施した。蛍光測定 (試料あたり 2 0 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0 例のゲート開閉した事象) は、データ獲得及び分析用の S y s t e m I I ソフトウェアを使用する C o u l t e r (登録商標) E p i c s (登録商標) X L (商標) フローサイトメーター (B e c k m a n C o u l t e r , I n c) において実施した。

20

【 0 2 3 9 】

統計分析

データは、ダネット誤差保護を備えた一元配置分散分析 (A N O V A) によって分析し、9 5 % の信頼区間は、データ分析用のマイクロソフトエクセルのための A n a l y s e - i t (登録商標) (A n a l y s e - i t S o f t w a r e , L t d) を用いて算出した。P < 0 . 0 5 の値を統計的に有意とみなした。経路分析は、I n g e n u i t y S y s t e m s ソフトウェアを用いて実行し、所与の経路のタンパク質確率における遺伝子の最大の数による等級分けは、P r o t e i n P r o j e c t アルゴリズムソフトウェアを用いて分析した。タンパク質標的はクラスター化及び相互作用を、S t r i n g 第 9 . 1 版ソフトウェアを用いて決定した。

30

【 0 2 4 0 】

P I F は、P B M C に直接作用する

P I F は、マクロファージによる L P S (リポ多糖、細菌抗原) 誘発性一酸化窒素 (N O) 産生を防止する。それゆえ、P I F が免疫細胞に直接作用するかどうか、または阻害作用が直接的なペプチド - L P S 相互作用による阻害効果であるかどうかを判定することは重要であった。P I F と粗面 L P S (R a L P S) または平滑 L P S (O 5 5 : B 5 L P S) の間の相互作用能力は、頑強かつ高感度の表面プラズモン共鳴 (S P R) 法を介して評価した。本方法は、リガンド - センサー相互作用が生じる場合に偏差するレーザービームを利用する。抗 P I F モノクローナル抗体の使用で、センサー表面に対する P I F の結合が活発であることを確認した。その後、5、2 5 及び 1 0 0 μ M 濃度における 2 つの L P S 分子は、P I F 結合センサー上を通過した (図 7 A 及び図 7 B) 。本データは、検査した全濃度において、観察可能な L P S (リガンド) 及び P I F - センサー相互作用を実証しなかった。L P S は主として、免疫シナプスを活性化しようマクロファージ上の C D 1 4 受容体を標的化することによって作用する。しかしながら、L P S は、C D 1 4 受容体とは無関係に作用することもできる。加えて、P I F は主として、刺激されていない C D 1 4 + 細胞を標的とする。

40

50

【0241】

それゆえ、本発明者らは、PIFがCD14受容体を介して免疫細胞と直接相互作用するかどうか、またはPIFがTLR4-MD2部位の下流を代替的に標的とするかどうかを検討した。TLR-4経路の阻害は、免疫細胞上のPIFの効果を遮断する。しかしながら、この情報は、リガンド自体がPIFによって標的とされるかどうかを完全に除外するものではない。SPRを基にした分析は、高濃度で試験した場合でさえ、PIFが受容体自体もその下流仲介因子TLR4-MD2も標的としないことを示した(図8A)。この相互作用がないことをさらに確認するために、TLR4-MD2表面も構築し、高濃度(0.5mM)のPIFへ曝露した(図8B)。そのような高濃度でさえ、固定化したTLR4-MD2に対するPIFの適切な結合が観察できなかった。したがって、PIFは、活性化因子との相互作用を介した二次的な相互作用を通じてよりもむしろ特異的な標的を包含する同族細胞過程を通じて採用する。

10

【0242】

PIFは、CD4+/CD25+/FoxP3+細胞を標的とする

PIFは10%未満のT細胞と結合し、これはマイトジェンの存在下で大いに拡大する効果である。調節性T細胞が耐性における主要な役割を担っているので、本発明者らは、PIFが未処置の細胞においてこの重要な細胞サブタイプと相互作用するかどうかをさらに検討した(図9)。2色のフローサイトメトリーを用いて、本発明者らは、未処置のCD3+細胞に対するFITC-PIF結合を検討し、用量依存的結合を示した(図9A及び図9B)。さらにCD4+/CD25+細胞に対する結合を測定し、PIFはこれらのTreg細胞を標的とすることを示した(図9C)。対照的に、PIFは、ゲート開閉したCD8+/CD25+細胞へ結合できず、その相互作用の特異性を反映していた(データ非表示)。図9Dは、アイソタイプ対照が有意な結合を示さなかったことを示しており、PIFの特異性を示している。その後、本発明者らは、PIFが標的とする細胞がCD4+/CD25+/FoxP3+であるかどうかを検討した。図10A及び図10Bは、これらの細胞に対するFITC-PIF結合が用量依存的であり、かつ当該結合が、最低減の結合を有することが公知のスクランブル型PIFと比較して高いペプチド用量で増幅されることを示している。このようなデータは、PIFが調節性T細胞を特異的に結合することを示している。

20

【0243】

PIFは、刺激していないヒトCD14細胞、CD4細胞、及びCD8細胞におけるタンパク質を標的とする

胚におけるPIFタンパク質標的の識別のための新規の方法が開発及び確証された。本方法は、PIFアフィニティークロマトグラフィー後の質量分析に基づいている。PIFは、刺激していないCD14+細胞を標的とするが、PIFは、当該受容体またはその下流の仲介因子へ結合しない。それゆえ、本発明者らは、生得的細胞(CD14+)及び免疫の適応部分に属する細胞(CD4細胞及びCD8細胞)の両方における免疫細胞における特異的PIF標的を識別することを目的とした。健常ドナー由来のある全単位の血液を用いて、PBMCをまず分離し、その後、95%超の純度に到達する抗CD14+抗体カラムを通過させた。次に、収集した細胞を抽出し、抗PIF系アフィニティークロマトグラフィーを通過させた。図11は、抽出後のCD14+細胞のクロマトグラフィー特性を示す。非常に多数のタンパク質を抽出物中で識別した。対照的に、濾液における抽出後、タンパク質の数は少なく、生得的PIF-タンパク質相互作用を示した。明らかに、存在する総タンパク質のうちわずかな部分のみがPIFアフィニティ樹脂上に保有されているのに対し、可溶化物中のタンパク質のほとんどは溶出されている。第一の抽出後の残余の保有されていないタンパク質のその後の再抽出は、追加のタンパク質が可溶化物から抽出されないことを示し、PIFアフィニティカラム抽出が完全であり、MSによって識別されたタンパク質に対して特異的であることを示した。非洗剤系溶解緩衝液の使用が決定的であることを特記することは重要である。洗剤を含有する溶解緩衝液を使用した場合、タンパク質抽出が上手くいかなかったことが観察された。

30

40

50

【 0 2 4 4 】

同様に、CD4+及びCD8+PBMCを全単位の血液から単離した後、それぞれ、抗CD4+抗体カラム及び抗CD8+抗体カラムを用いて精製した。収集した細胞を各々溶解し、CD14+細胞と同じ様式で、半定量質量分析によって抽出した。収集した細胞を各々抽出し、収集したタンパク質を識別した。PIFタンパク質標的の主要な細胞位置を検討すると、大部分は細胞質位置に認められ、その他は核に、及びまれに膜に存在した。このような観察は、新規のクロマトグラフィー法がPIF結合パートナーを識別するための頑強な手段であることを示す。これらのPIFアフィニティカラム抽出物から単離したタンパク質は次に、LC/MS/MSを用いて分析した。以下の表9～表11は、CD14細胞における70超のタンパク質標的がPIFアフィニティ抽出及びLCMSMSによって識別され、当該タンパク質標的のうちのいくつかは同じクラスに属するアイソタンパク質であったことを示す。表12及び表13は、PIF抽出物がCD4及びCD8リンパ球に非常に類似していることを明確に示すCD4及びCD8の細胞可溶化液について識別したタンパク質を詳述する。さらに、識別したCD14タンパク質をCD4細胞及びCD8細胞についてのCD14タンパク質と比較する時(表14)、PIFが、これらの免疫細胞系列における十分に規定したクラスのタンパク質を特異的に標的にし、3つの系列すべてについて抽出したタンパク質がほぼ同一であることを示す明確な事態が生じる。ターゲティングにおけるこの特異性は、免疫応答のPIF調節の性質を解読する上で役立つべきである。

【表9】

表9

CD14		
14-3-3タンパク質エータ		
14-3-3タンパク質ガンマ		
14-3-3タンパク質テータ		
14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ	X	
60Sリボソームタンパク質L22		10
78kDaグルコース調節タンパク質 HSPA5(70)		
酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質32ファミリーメンバーA	X	
アクチン、細胞質2型		
アクチニンαアイソフォーム3型		
活性化RNAポリメラーゼII転写活性化補助因子p15		
アネキシンA1		
アポリポタンパク質B受容体		
架橋統合因子(bridging integrator)2		
カルモジュリン(断片)	X	20
カルレティキュリン	X	
120kDaのセントロソームタンパク質(断片)		
コロニン1A		
伸長因子1ベータ(断片)		
エンドプラスミン		
フィラミンA		
ゲルゾリン		
グルコシダーゼ2サブユニットベータ	XX	
グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素		30
熱ショックタンパク質HSP90-ベータ()	XX-	
造血系細胞特異的タンパク質		
肝細胞癌由来成長因子	X	
ヒストンH4		
ヒストン結合タンパク質RBBP7		
ホルネリン		
ビンキュリンのアイソフォーム1型		
アデニルシクラーゼ結合タンパク質1型のアイソフォーム2型		40
熱ショックタンパク質HSP90-アルファのアイソフォーム2型	XX	
ロイシンリッチリピートフライトレス相互作用タンパク質1型のアイソフォーム2型		
ヌクレオフォスミンのアイソフォーム2型		
タンパク質SETのアイソフォーム2型	X	
Ras抑制因子タンパク質1型のアイソフォーム2型		
ミエロペルオキシダーゼのアイソフォームH14型		

14-3-3タンパク質ベータ/アルファのアイソフォーム短型(Short)		
14-3-3タンパク質イプシロンのアイソフォームSV型		
潜在型形質転換成長因子ベータ結合タンパク質1型	TGFBP1	
リンパ球特異的タンパク質1型		
マトリン3		
骨髄系細胞核分化抗原		
ミオシン9		
核自己抗原性精子タンパク質		10
核ユビキチンカゼイン及びサイクリン依存性キナーゼ基質1型		
ヌクレアーゼ感受性エレメント結合タンパク質1型(断片)		
ヌクレオリン		X
プラスチン2		
血小板因子4バリエント		
タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ		
タンパク質ジスルフィドイソメラーゼA4		
タンパク質S100-A8		
RasGTPアーゼ活性化様タンパク質IQGAP1		20
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子1型		
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子2型(断片)		
血清除去応答タンパク質		X
タリン1型		
トロンボスポンジン1		X
チモシアルファ1		X
甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質3型		
トランスゲリン2型		30
移行性小胞体ATPアーゼ		
トロポモジュリン3		
トロポミオシアルファ1鎖		
トロポミオシアルファ3鎖		
トロポミオシアルファ4鎖		X
チューブリンアルファ4A鎖		
腫瘍タンパク質D52様2型, アイソフォームCRA_e		
ビメンチン		

【表 1 0】

表10

CD4		
14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ		
酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質32ファミリーメンバーA		
アクチン, 細胞質1型		
カルモジュリン		
カルレティキュリン	PDIA2/パートナー	10
軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質	トロンボスポンジン5型	
コフィリン1		
肝細胞癌由来成長因子		
熱ショックタンパク質HSP90アルファのアイソフォーム2型		
タンパク質SETのアイソフォーム2型		
ヌクレアーゼ感受性エレメント結合タンパク質1型(断片)		
ヌクレオリン		
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子1型		
血清アルブミン		20
血清除去応答タンパク質		
タリン1		
トロンボスポンジン1		
トロンボスポンジン4		
チモシンアルファ1		
トロポミオシンアルファ4鎖		
チューブリンアルファ1C鎖		

【表 1 1】

表11

CD8	
14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ	
酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質32ファミリーメンバーA	
アクチン, 細胞質1型	
カルモジュリン	
カルレティキュリン	
軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質	10
コフィリン1	
グルコシダーゼ2型サブユニットベータ	
肝細胞癌由来成長因子	
ヒストンH2A1型-B/E	
タイチンアイソフォーム11型	
熱ショックタンパク質HSP90-アルファのアイソフォーム2型	
タンパク質SETのアイソフォーム2型	
ヌクレオリン	20
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子1型	
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子2型	
血清アルブミン	
血清除去応答タンパク質	
トロンビン軽鎖	
トロンボスポンジン1	
トロンボスポンジン4	
チモシンアルファ1	
トロポミオシンアルファ4鎖	30
チューブリンアルファ1C鎖	

【表 1 2】

表 12

CD8						
タンパク質名	タンパク質受入番号	タンパク質 分子量	注入 1	注入 2	注入 3	平均
トロンボスポンジン 1	TSP1_HUMAN	129,381.70	7	7	7	7
血清アルブミン	sp P02768 1ALBU_HUMAN	69,366.90	3	6	8	6
軟骨オリゴマーマト リックスタンパク質	B40KJ3_HUMAN,COMP HUMAN, G3XAP6_HUMAN	77,211.80	4	4	5	4
トロンボスポンジン 4	E7ES19_HUMAN,TSP4 HUMAN	96,003.30	3	3	3	3
アクチン, 細胞質 1 型	ACTB-HUMAN	41,737.80	3	3	3	3
トロポミオシンアル ファ 4 鎖	sp P67936 TPM4_HUMAN	28,522.40	3	3	3	3
チモシンアルファ 1	B8ZZQ6_HUMAN,sp P0645 4-2PTMA_HUMAN	12,073.40	2	2	4	3
熱ショックタンパク 質 HSP90-アルファ のアイソフォーム 2 型	sp P07900-2HS90A_HUMA N, sp P07900 HS90A_HUMAN	84,663.20	2	2	2	2
カルレティキュリン	CALR_HUMAN	48,142.90	2	2	2	2
血清除去応答 タンパク質	SDPR_HUMAN	47,172.90	2	2	2	2
酸性ロイシンリッチ 核リンタンパク質 32 ファミリーメンバー	AN32A_HUMAN	28,586.10	2	2	2	2
14-3-3 タンパク質ゼ ータ/デルタ	1433Z_HUMAN,E7EX29_H UMAN	28,037.30	2	2	2	2
カルモジュリン	CALM_HUMAN,E7ETZ0_H UMAN, H0Y7A7_HUMAN	16,838.00	2	2	2	2
タリン 1	TLN1_HUMAN	269,765.10	1	1	1	1
ヌクレオリン	NUCL_HUMAN	76,615.90	1	1	1	1
チュープリナルフ ァ 1C 鎖	F5H5D3_HUMAN,G3V1U9_ HUMAN, TBA1A_HUMAN,TBA1B_H UMAN	50,135.70	1	1	1	1

10

20

30

40

ヌクレアーゼ感受性エレメント結合タンパク質 1 型(断片)	H0Y449_HUMAN,YBOX1_HUMAN	35,923.80	1	1	1	1
タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	sp Q01105-2 SET_HUMAN	32,103.30	1	1	1	1
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 1 型	J3KTL2_HUMAN,sp Q07955-2 SRSF1_HUMAN,sp Q07955-3 SRS	28,329.70	1	1	1	1
肝細胞癌由来成長因子	A8K8G0_HUMAN,Q5SZ07_HUMAN,	22,964.00	1	1	1	1
コフィリン 1	COF1 HUMAN,E9PP50_HUMAN	18,503.20	1	1	1	1

【表 1 3】

表 13

CD4

タンパク質名	タンパク質受入番号	タンパク質分子量	注入 1	注入 2	注入 3	平均
軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質	B4DKJ3_HUMAN,COMP_HUMAN,G3XAP6_HUMAN	79,694.20	10	10	11	10
血清アルブミン	sp P02768 ALBU_HUMAN	69,366.90	4	7	12	8
トロンボスポンジン 1	TSP1_HUMAN	129,381.70	6	6	6	6
チモシンアルファ 1	B8ZZQ6_HUMAN,sp P06454-2 PTMA_HUMAN	12,073.40	4	5	7	5
熱ショックタンパク質 HSP 90 アルファのアイソフォーム 2 型	sp P07900-2 HS90A_HUMAN,sp P07900 HS90A_HUMAN	84,663.20	4	4	4	4
カルレティキュリン	CALR_HUMAN	48,142.90	4	4	4	4
トロポミオシンアルファ 4 鎖	sp P67936 TPM4_HUMAN	28,522.40	4	4	4	4
タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	sp Q01105-2 SET_HUMAN	32,103.30	3	4	4	4
トロンボスポンジン 4	E7ES19 HUMAN,TSP4_HUMAN	96,005.30	3	3	3	3
トロンピン軽鎖	E9PIT3 HUMAN,T11RB_HUMAN	65,408.20	3	3	3	3
14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	1433Z_HUMAN,E7EX29_HUMAN	27,745.90	3	3	3	3
肝細胞癌由来成長因子	A8K8G0_HUMAN,Q5SZ07_HUMAN, spp51858-2 ITDGF_HUMAN,	26,788.60	3	3	3	3
カルモジュリン	CALM1_HUMAN,E7ETZ0_HUMAN, F10Y7A7_HUMAN	16,838.00	3	3	3	3
チューブリンアルファ 1C 鎖	F5115D3_HUMAN,G3V1U9_HUMAN,TBA1A_HUMAN, TBA1B_HUMAN	50,135.70	2	2	3	2
ヌクレオチン	NUCL_HUMAN	76,615.90	2	2	2	2
血清除去応答タンパク質	SDPR_HUMAN	47,172.90	2	2	2	2

10

20

30

40

アクチン, 細胞質 1 型	ACTB_HUMAN	41,737.80	2	2	2	2
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 1 型	BKTL2_HUMAN,sp Q07955-2 SRSF1_HUMAN,sp O07955-3 SRS	28,329.70	2	2	2	2
セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 2 型	D4DN89J_HUMAN,SRSF2_HUMAN	25,477.10	1	2	3	2
ヒストン H2A 1-B/E 型	H2A IB_HUMAN,H2A1C_HUMAN, H2A1D_HUMAN	14,136.10	2	2	2	2
タイチンアイソフォーム 11 型	sp Q8WZ42-1 [T1T1N_HUMAN-R, sp Q8WZ42-I	0	2	2	2	2
グルコシダーゼ 2 型サブユニットベータ	K7ELL7_HUMAN,sp P14314-2 GLU2B_HUMAN.	59,425.80	1	1	1	1
酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質 32 ファミリーメンバー	AN32A_HUMAN	28,586.10	1	1	1	1
コフィリン 1	COF1_HUMAN,E9PP50_HUMAN	18,503.20	1	1	1	1

10

20

【表 1 4】

表 14

CD14+細胞における PIF 標的

識別されたタンパク質	受入番号	分子量	注入 1	注入 2	注入 3	平均
酸化ストレス及びタンパク質ミスフォールディング						
移行性小胞体 ATP アーゼ	TERA_HUMAN	89 kDa	3	2	3	3
タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ	PDIA1_HUMAN	57 kDa	3	2	2	2
タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A4	PD1A4_HUMAN	73 kDa	4	1	2	2
カルレティキュリン	CALR_HUMAN	48 kDa	7	4	6	6
核自己抗原精子タンパク質	sp P49321 NASP_HUMAN	85 kDa	2	0	1	1
78 kDa グルコース調節型タンパク質 (HSP70AS)	GRP78_HUMAN	72 kDa	6	3	3	4
エンドプラスミン (HSP90b)	ENPL_HUMAN	92 kDa	0	2	1	1
熱ショックタンパク質 HSP 90 ベータ 0	HS908_HUMAN	83 kDa	2	1	1	1
熱ショックタンパク質 HSP 90 アルファ -12	sp P07900-2 HS90A_HUMAN	98 kDa	1	2	1	1
トロンボスポンジン 1	TSP1_HUMAN	129 kDa	7	5	8	7
細胞生存及び DNA 損傷対照						
ビメンチン	BOY1C4_HUMAN (+1)	50 kDa	9	11	9	10
14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	1433Z_HUMAN (+1)	28 kDa	4	3	4	4
14-3-3 タンパク質エータ	1433F_HUMAN	28 kDa	1	1	2	1
14-3-3 タンパク質テータ	1433T_HUMAN	28 kDa	1	1	2	1
14-3-3 タンパク質ガンマ	1433G_HUMAN	28 kDa	3	3	3	3
14-3-3 タンパク質ベータ/アルファ 1	sp P31946-2 1433B_HUMAN	28 kDa	3	3	4	3

10

20

30

40

14-3-3 タンパク質イ ブシロン 1	sp P62258-2 1433E_HUMAN	27 kDa	4	4	2	3
ホルネリン	HORN_HUMAN	282 kDa	1	0	2	1
アネキシン A1	ANXA1_HUMAN (+1)	39 kDa	0	0	2	1
マクロファージ及び好中球の活性化						
ミオシン 9	sp P35579 MYH9_HUMAN	227 kDa	11	9	10	10
チモシナルファ 1	B8ZZQ6_HUMAN (+1)	12 kDa	5	5	4	5
リンパ球特異的タン パク質 1 型	sp P33241 LSP1_H UMAN	37 kDa	4	2	1	2
ミエロペルオキシダ ーゼ HI4-1	sp P05164-2 PERM_HUMAN	74 kDa	2	2	2	2
骨髄系細胞核分化 抗原	MNDA_HUMAN	46 kDa	2	2	2	2
カルモジュリン(断片)	HOY7A7_HUMAN (+2)	21 kDa	6	4	3	4
ヒストン H4	114_HUMAN	11 kDa	3	0	2	2
ヒストン結合タンパ ク質 RBBP7	E9PC52_HUMAN (+8)	47 kDa	2	0	1	1
タンパク質 S100-A8	S10A8_HUMAN	11 kDa	2	1	2	2
細胞骨格						
トロポミオシナル ファ 4 鎖	sp P67936 TPM4_HUMAN	29 kDa	8	7	8	8
アクチン, 細胞質 2 型	ACTG_HUMAN	42 kDa	6	7	7	7
タリン 1	QSTCU6_HUMAN (+1)	258 kDa	5	6	8	6
フィラミン A	QS1IY54_HUMAN (+2)	277 kDa	5	3	7	5
アクチニンアルファ 1 型アイソフォーム 3 型	B7TY16_HUMAN (+3)	107 kDa	5	4	3	4
トロポミオシナル ファ 3 鎖	QSVU59_HUMAN (+1)	27 kDa	4	2	5	4
アデニリルシクラ ーゼ結合タンパク質の アイソフォーム 2 型 Isoform 2of Adenylyl cyclase associated protein	sp Q01518-2 CAP1_HUMAN	52 kDa	4	3	2	

10

20

30

40

ピンキュリンのアイソフォーム 1 型	sp PI 8206-2 VINC_HUMAN	117 kDa	3	2	3	3
チューブリンアルファ 4A 鎖	A8MUB1_HUMAN (+2)	48 kDa	2	3	1	2
コロニン 1A	COR1A_HUMAN	51 kDa	2	2	1	2
ゲルゾリン	F5F1A8_HUMAN (+4)	81 kDa	3	1	1	2
トロポミオシナルファ 1 鎖	B7Z596_HUMAN (+2)	32 kDa	1	0	4	2
マトリン 3	A8MXP9_HUMAN (+4)	100 kDa	1	2	1	1
プラスチン 2	B4DUA0_HUMAN (+1)	22 kDa	1	1	2	1
トロポモジュリン 3	TMOD3_HUMAN	40 kDa	1	2	1	1
架橋統合因子 2 型	F5FI0W4_HUMAN (+2)	59 kDa	1	2	0	1
Ras 抑制因子タンパク質 1 型のアイソフォーム 2 型	sp Q15404-2 RSU1_HUMAN	26 kDa	0	1	2	1
120 kDa のセントロソームタンパク質 (断片)	D6RF.X9_HUMAN (+2)	96 kDa	2	0	0	1

10

20

【 0 2 4 5 】

ストリングソフトウェア分析：P I F は、C D 1 4 細胞における 4 つの主要タンパク質群 1 7 9、すなわち P D I / H S P、ピメンチン / 1 4 - 3 - 3、マクロファージ / 好中球の活性化、細胞遊走及び膜アーキテクチャを標的とする

C D 1 4 細胞において、いくつかは、同じクラスに属するアイソタンパク質である。それゆえ、クラスター分析を実施して、タンパク質標的をより良好に定義し、観察した異なる群のタンパク質を関連させる中枢的なタンパク質を識別した (図 1 5)。主要な相互作用因子は、ピメンチン、カルモジュリン、S E T - 核癌遺伝子 (アポトーシス阻害薬) 及びミオシン 9 (M Y H 9) であった。本分析は、タンパク質の 4 つの主要な群、すなわち、P D I / H S P、ピメンチン / 1 4 - 3 - 3、免疫活性化、及び細胞骨格に關与するものを識別した。ストリングソフトウェア系分析によって、本発明者らは、生物学的機能を基にした有意な等級分けを P I F タンパク質が標的とすることを判定でき (表 1 5)、アクチン及び一酸化窒素の調節は、同様に細胞外エキソソームにおいても識別され及び有効な細胞間連絡を可能にする細胞の外側へ輸送することのできるタンパク質であり得るほとんどのタンパク質と最高に連結し得ると等級分けした。

30

【表 15】

表 15

CD14+細胞、CD4+細胞及び CD8+細胞におけるクラスター分析及び等級分け

CD14	統計分析
生物学的機能	
アクチン結合	(1.6e-7)
細胞骨格タンパク質/RNA 結合	(1.4e-4)
一酸化窒素シンターゼ調節因子活性	(5.9e-4)
分子機能:	
アクチン結合	(1.6e-7)
血小板脱顆粒	(1.9e-7)
ミトコンドリア膜へのタンパク質の挿入	(1.9e-7)
位置	
細胞外小胞性エキソソーム	1.8-17e (N=36)
サイトゾル	4e-12 (N=31)
膜結合型小胞	(1.8e-1)

10

20

CD8	統計分析
生物学的機能	
折りたたまれていないタンパク質に対する応答	(1.8e-5)
小胞体ストレスに対する応答	(9.7e-5)
血小板脱顆粒/活性化	1.4e-2
分子機能:	
インテグリン結合	7.6-3
インテグリン結合	7.6-3
ポリ(A)RNA 結合を結合するタンパク質複合体	1.3-2
位置	
細胞外小胞性エキソソーム	(15 タンパク質) 1.3e-7
膜結合型小胞	(13 タンパク質).3e-4

30

CD4	統計分析
生物学的機能	
折りたたまれていないタンパク質に対する応答	8.3e-6
血小板脱顆粒/活性化	4.4e-4
エキソサイトーシス	1.1e-4
小胞体ストレスに対する応答	(1.9e-4)
分子機能:	
インテグリン結合及びタンパク質複合体結合	(4.9e-3)

40

ポリ(A)RNA 結合	(1.1e-2)
一酸化窒素シンターゼ調節因子	(1.1e-2)
位置	
細胞外小胞性エキソソーム	(2e-9)
膜結合型小胞	(6.4e-6)
小器官内腔	(1.2e-4)

【0246】

CD14+細胞において、PIFは、ピメンチン及びPDIを標的とする：酸化ストレスにおける役割

10

抽出後、CD14+タンパク質は、質量分析を用いて識別した。先の表9～表11に列挙したように、およそ70のタンパク質標的を識別した。PIFは、サイトカインの分泌及び発現、及び未刺激のまたは活性化されたヒトPBMCにおけるいくつかの他の遺伝子を調節する。識別した標的すべてのタンパク質群約10%を表した14-3-3群が最高である。当該標的の構造は、2つの異なるサブタイプを結合する二量体として非常に同様に機能している。これらの多機能性足場であるホスホセリン/ホスホトレオニン結合タンパク質は、細胞シグナル伝達、ストレスに対する応答及びアポトーシス促進性シグナルBad及びBaxの遮断に関与している。当該タンパク質は、同様に、いくつかのタンパク質、酵素及びペプチドを標的とする。したがって、14-3-3タンパク質は、DNA損傷を調節し得る。38213 この群の最高の等級分けは、血小板、マスト細胞の活性化及びアポトーシスを調節する14-3-3z/dであった。このタンパク質は、同時活性化したPBMC(Geo)において増加した(6倍)CDC25A/B/C細胞分裂周期プロモーターを標的とする。アイソ-14-3-3イプシロンタンパク質は、ウイルス複製及びアポトーシスを調節する。38217。14-3-3テータは、含まれた神経変性である。全体的なPIFのターゲティング及びもしかしたら調節している14-3-3タンパク質は、細胞機能の大きなかつ多様な全部におけるPIFの役割に対する信頼性を付与する。それゆえ、本発明者らは、PIFがこれらの標的へ結合するかどうか、及びPIFが当該標的の発現も調節することができるかどうかを検討した。ピメンチンは、PIFが標的とする最高の等級分けタンパク質であった。マクロファージにおいて、このタンパク質は、酸化ストレスを調節し、敗血症に対する応答において主要な役割を担っている。ピメンチン発現は、PBMC同時活性化の4時間後に低下した(2.2倍)。さらなる標的は、細胞ストレス機能障害を低下させるタンパク質ジイソメラーゼ/チオレドキシン(thorodoxin)(PDI)であった。PIFは、この群の主要なタンパク質である2つのタンパク質PDI及びPDI A4を標的とする。PDI分子は、4つのチオレドキシンドメインを含有する。PIFのRIKP活性部位は、PDI及びHSPを標的とする。

20

30

【0247】

PIFは、熱ショックタンパク質及び14-3-3タンパク質を標的とし及び調節する：タンパク質ミスフォールディング及び細胞生存を調節する上での役割

40

適切なタンパク質の折りたたみ及び細胞保護は、細胞機能に対して決定的である。PIFは、タンパク質のHSPクラスター、すなわち、この重要な過程を制御するHSP90B-O、HSP90B1、アイソ2-HSPA、及びHSP70A5を標的とする。同時活性化したPBMCにおいてのみ、HSP90/B遺伝子が上方調節されるのに対し、ストレス応答発現に関与するHSP70は減少した。

【0248】

群内で識別した最多数のPIF結合標的は、14-3-3タンパク質であり、当該タンパク質は、識別した標的すべての約10%であった。当該タンパク質は、細胞シグナル伝達、ストレスシグナル伝達に対する応答、ならびにアポトーシス促進性シグナルBad及びBaxを遮断する上で重要な役割を担っている多機能性足場であるホスホセリン/ホス

50

ホトレオニン結合タンパク質である。当該タンパク質は、いくつかのタンパク質、酵素及びペプチドを同様に標的とする。当該タンパク質のうちで最高と等級分けされるのは14-3-3z/dであった。14-3-3z/dタンパク質は、血小板、マスト細胞活性化、及びアポトーシスを調節する。したがって、14-3-3は、DNA損傷を制御することに関与することができた。PIFは、未処置のPBMCにおいて発現を高めた(2.8倍)。アイソ14-3-3イプシロンは、ウイルス複製及びアポトーシスを調節する。対照的に、14-3-3エータ発現は、同時活性化後に低下した(-2.4倍)。14-3-3ガンマは、グルコース代謝に関与するインスリン様成長因子受容体へ結合する。データは、PIFが、この群のメンバーをほとんどすべて調節及び標的とすることを示し、細胞生存及び機能に及ぼす複雑な調節効果をあきらかにしている。

10

【0249】

本発明者らは、PIFが、ジスルフィドイソメラーゼ/チオレドキシシン(PDI)及びPDI A4を胚だけでなく免疫細胞においても標的とすることを発見した。これらのタンパク質は、シャペロンとしてタンパク質の凝集、ならびに異常な折りたたみ及び酸化ストレスに対する(チオレドキシシンを通じての)保護を防止するシャペロンとして作用する。このPDI機能を補充するため、PIFは、ただ保護することだけでなく細胞ストレス、タンパク質ミスフォールディングも低下させ、細胞生存に必要とされる決定的な機能を有する熱ショックタンパク質(HSP、HSP 90B-O、HSP 90B1、アイソ2-HSPA、及びHSP70A5)も標的とする。HSP関連遺伝子も、PIFによって同様に調節される。免疫活性化後、HSP90群の遺伝子は増加したのに対し、HSP70は減少して、起こり得る保護的自己調節を示唆した。総合的なPIFターゲティングは、保護的な役割を支持する。

20

【0250】

PIFは、ミオシン9及びチモシン-アルファ-1を標的とする：マクロファージ及び好中球の活性化における役割

最高と等級分けされたタンパク質標的は、ミオシン9であった。ミオシン9は、同様にPIF標的であるカルモジュリンと相互作用するマクロファージの膜の突出及び走化性に関与する。PIFは、チモシン-アルファ1も標的とする。チモシン-アルファ1は、ヒストンH4(PIF標的)と相互作用し、日和見感染及びウイルス感染に対する抵抗性の発達を支援する。PIFは、S100A8を標的とし、それは白血球及びマクロファージの両方を活性化する。対応するEFハンドカルシウム結合ドメインが24時間(-8.8倍)及び48時間(-2.2倍)で、未処理PBMCにおいて下方調節された。リンパ球特異的タンパク質1型は、好中球の活性化及び走化性に関与する。

30

【0251】

PIFは、ミオシン9及びチモシン-アルファ-1を標的とする：マクロファージ及び好中球の活性化における役割

保護のほかに、生得的免疫活性化は、ホメオスタシスを維持するはずである。PIFは、活性化型マクロファージを標的とする。この群において、最高と等級分けされたタンパク質標的は、本データからもPIF標的と識別されるカルモジュリンと相互作用するマクロファージの膜の突出及び走化性に関与するミオシン9であった。PIFは、日和見感染及びウイルス感染に対する抵抗性の発達を支援するヒストンH4(PIF標的)と相互作用するチモシン-アルファ1も標的とする。PIFは、白血球及びマクロファージの両方を活性化するタンパク質S100A8を標的とする。リンパ球特異的タンパク質1型は、好中球の活性化及び走化性に関与する。したがって、識別したタンパク質標的は、生得的免疫制御に必要とされるマクロファージ及び好中球の両方を制御する。

40

【0252】

PIFは、細胞骨格タンパク質を標的とする：細胞及び膜アーキテクチャにおける役割

細胞移動において主要な役割を有するアクチンは、PIF結合試験において識別した最高と等級分けされたタンパク質のうちの1つであった。識別した他のPIF結合タンパク質は、アクチンの安定化において主要な役割を担っているトロポミオシンアルファ1、3

50

、4、ならびにアクチンを調節し及び膜の構造を維持することに関与するトロポモジュリンであった。PIF標的は、細胞移動における主要な役割を担っているアクチン1を最高と等級分けした。本データと関連しているのは、PIFが、アクチンの安定化における主要な役割を担っておりかつタリン1と相互作用もするトロポミオシンアルファ1、3、及び4へも結合することである。タリン1は、トロポモジュリン(PIFによってこれも標的とされる)とともに、膜構造の完全性を支持するよう作用する細胞膜へ細胞骨格を結合させることに関与する。顕著なことに、これらのデータは、免疫細胞の完全性を維持する上で重要な役割を担っているPIFを明確に示している。

【0253】

PIFは、CD4細胞及びCD8細胞における限定された数の標的へ結合する：凝固における役割

PIFが未刺激のT細胞の約5%を標的とすることを実証したので、本発明者らはさらに、これら2つの系列におけるタンパク質標的を検討した。T細胞活性化を有しないPIF結合が低いという事実を認識して、本発明者らは、各CD4またはCD8のPIF標的分析のために全単位の血液を用いた。PBM由来の2名の異なるドナーを用いて、CD4陽性細胞またはCD8陽性細胞を分離及び抽出した。この後、PIFベースのアフィニティークロマトグラフィー及び質量分析を実施した。本発明者らは、両T細胞部分系列における標的数が、識別したCD14+標的に関して観察した数と比較して30%未満と非常に低いことを発見した(表16~表18)。ほとんどのタンパク質標的95%超は、3つの細胞調製物(CD14、CD4、CD8)すべてにおいて符合した。CD4及びCD8におけるタンパク質標的を比較すると、21/24例において、当該タンパク質標的は符合した(表19)。これらの結果は、異なる対象における分離及び方法分析の再現性を支持している。

【表16】

表16

PIFはPDI及びHSP関連タンパク質を標的とし及び調節する

タンパク質	未処置	活性化型
タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ		-3.6
タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A4		
HSP 90-アルファ(アイソ2)+		
HSP 90-ベータ		2.8
HSP 70A5		
ビメンチン		-2.2
PDI (P5) (遺伝子)		3.6
チオレドキシシン		-2.8
HSP 90/B (遺伝子)		4.8
HSP D1 (遺伝子)		2.2
HSP 70A1A (遺伝子)		-2.2
HSP 701B(遺伝子)		-2.6
HSP 40 (遺伝子)		-2.8
HSP 70 B (遺伝子)		-3

【表 17】

表17

PIFは14-3-3足場タンパク質を標的とし及び調節する

タンパク質	未処置	活性化型
14-3-3 タンパク質エータ		
14-3-3 タンパク質ガンマ		
14-3-3 タンパク質テータ		
14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ		2.8
14-3-3 タンパク質ベータ/アルファ(アイソ)		
14-3-3 タンパク質イプシロン(アイソ)		-2.4

10

【表 18】

表18

PIFは、同時活性化したPBMCにおける炎症を調節する

遺伝子	上方調節 または 下方調節	名称	機能
<i>酸化ストレスの制御</i>			
HADHA	7	ミトコンドリア研和タンパク質のアルファサブユニット	長鎖脂肪酸を酸化
PRDX3	3	ペルオキシレドキシシン	酸化ストレスに対する防護
LLT1	2	C型レクチンドメイン	NK 仲介溶解から標的細胞を防護
TRX	-2.8	チオレドキシシン	酸素遊離基形成を調節
ALOX5	-4	リポキシゲナーゼ	ロイコトリエンを合成
<i>血小板の活性化の制御</i>			
PECAM 1	-2.4	血小板内皮細胞接着分子	白血球の内皮貫通移動に必要なとされる細胞接着分子
ANXA5	2	アネキシシン 5	胎盤抗凝固タンパク質。トロンボプラスチンの間接的な阻害薬として作用
ベータ-トロンボグロブリン (PPBP)	-2.8	血小板前駆細胞塩基性タンパク質	強力な化学誘引物質及び好中球活性化因子
CD41B (ITGA2B)	-3.2	インテグリン	フィブリノーゲン形成 PF4-2-2 血小板因子 4 ITGB3 インテグリン B3-2,2 に重要

20

30

40

【表 19】

表19

MS/MS試料名	アルファベット分類した タンパク質名	タンパク質 分子量(Da)	タンパク質 識別確率	独特な ペプチドの数
151061-CD-14 (青色)ヒト	14-3-3 タンパク質ガンマ	28,303.10	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	27,745.90	100.00%	4
151088-CD-8 (赤色)ヒト	14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	28,037.30	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	27,745.90	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	60S リボソームタンパク質 L6 (断片)	32,729.30	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	78 kDa グルコース調節性タンパク質	72,334.70	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質 32 ファミリーメンバーA	28,586.10	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質 32 ファミリーメンバーA	28,586.10	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質 32 ファミリーメンバーA	28,586.10	93.20%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	アクチン, 細胞質 1 型	41,737.80	99.80%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	アクチン, 細胞質 1 型	41,737.80	100.00%	14
151088-CD-8 (赤色)ヒト	アクチン, 細胞質 1 型	41,737.80	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	アルファエノラーゼ	47,170.20	100.00%	2
15J06J-CD-14 (青色)ヒト	アポリポタンパク質 B 受容体	114,816.50	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	カルモジュリン	16,838.00	100.00%	5
151088-CD-8 (Red) Human	カルモジュリン	16,838.00	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	カルモジュリン	16,838.00	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	カルレティキュリン	48,142.90	100.00%	4
151088-CD-8 (赤色)ヒト	カルレティキュリン	48,142.90	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	カルレティキュリン	48,142.90	100.00%	4
151088-CD-8 (赤色)ヒト	軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質	77,211.80	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質	79,694.20	100.00%	10

10

20

30

40

151061-CD-14 (青色)ヒト	コフィリン 1	18,503.20	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	コフィリン 1	18,503.20	93.50%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	コフィリン 1	18,503.20	93.20%	1
151061-CD-14 (青色)ヒト	フィラミン A	280,008.70	100.00%	16
151061-CD-14 (青色)ヒト	グルコシダーゼ 2 サブユニット トペータ	59,425.80	100.00%	6
151088-CD-4 (緑色)ヒト	グルコシダーゼ 2 サブユニット トペータ	59,425.80	99.20%	1
151061-CD-14 (青色)ヒト	肝細胞癌由来成長因子	26,788.60	99.90%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	肝細胞癌由来成長因子	22,964.00	93.50%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	肝細胞癌由来成長因子	26,788.60	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	ヒストン H2A タイプ 1-B/E	14,108.10	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	ヒストン H2A タイプ 1-B/E	14,136.10	99.80%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	ピンキュリンのアイソフォーム 1 型	123,801.30	100.00%	5
151088-CD-4 (緑色)ヒト	タイチンのアイソフォーム 11 型	0	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	アデニルシクラーゼ結合タンパク質のアイソフォーム 2 型	51,901.60	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	熱ショックタンパク質 HSP 90- アルファのアイソフォーム 2 型	98,165.10	89.70%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	熱ショックタンパク質 HSP 90- アルファのアイソフォーム 2 型	84,663.20	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	熱ショックタンパク質 HSP 90- アルファのアイソフォーム 2 型	84,663.20	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	インテグリンアルファ-IIb のア イソフォーム 2 型	113,376.70	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	ポリピリミジン路結合タンパク質 1 型のアイソフォーム 2 型	57,222.50	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	32,103.30	100.00%	4
151088-CD-8 (赤色)ヒト	タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	32,103.30	98.90%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	32,103.30	100.00%	3

10

20

30

40

151061-CD-14 (青色)ヒト	Ras 抑制因子タンパク質 1 型 のアイソフォーム 2 型	31,542.20	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	潜在型形質転換成長因子 ベータ結合タンパク質 1 型 のアイソフォーム 4 型	186,787.30	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	Isoform Short of 14-3-3 タンパ ク質ベータ/アルファのアイソ フォーム短型	27,850.80	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	リゾチーム C	16,536.90	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	骨髄系細胞核分化抗原	45,837.00	100.00%	5
151061-CD-14 (青色)ヒト	ミオシン調節軽鎖 12A	19,795.30	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	ミオシン 9	226,537.50	100.00%	36
151061-CD-14 (青色)ヒト	神経芽細胞分化関連タンパ ク質 AHNAK	629,104.40	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	ヌクレアーゼ感受性エレメン ト結合タンパク質 1 (断片)	42,015.90	100.00%	4
151088-CD-8 (赤色)ヒト	ヌクレアーゼ感受性エレメン ト結合タンパク質 1 (断片)	35,923.80	93.50%	1
151061-CD-14 (青色)ヒト	ヌクレオリン	76,615.90	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	ヌクレオリン	76,615.90	93.50%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	ヌクレオリン	76,615.90	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	ペリリピン-3 (断片)	45,802.10	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	血小板因子 4	10,845.50	100.00%	5
151061-CD-14 (青色)ヒト	プロテアソーム活性化因子 複合体サブユニット 1 型	28,723.90	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	タンパク質 S100-A8	10,835.00	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	ピルビン酸キナーゼアイソ ザイム M1/M2	57,937.50	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプ ライジング因子 1 型	28,329.70	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプ ライジング因子 1 型	27,745.10	99.80%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプ ライジング因子 1 型	28,329.70	93.50%	1
151061-CD-14 (青色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプ ライジング因子 2 型	25,477.10	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプ ライジング因子 2 型	25,477.10	93.20%	1
151061-CD-14 (青色)ヒト	血清アルブミン	69,366.90	99.80%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	血清アルブミン	69,366.90	100.00%	3

10

20

30

40

151088-CD-4 (緑色)ヒト	血清アルブミン	69,366.90	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	血清除去応答タンパク質	47,172.90	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	血清除去応答タンパク質	47,172.90	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	血清除去応答タンパク質	47,172.90	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	タリン 1	269,765.10	100.00%	27
151088-CD-8 (赤色)ヒト	タリン 1	269,765.10	97.80%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロンビン軽鎖	65,408.20	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	トロンボスポンジン 1	129,381.70	100.00%	8
151088-CD-8 (赤色)ヒト	トロンボスポンジン 1	129,381.70	100.00%	7
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロンボスポンジン 1	129,381.70	100.00%	6
151088-CD-8 (赤色)ヒト	トロンボスポンジン 4	96,005.30	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロンボスポンジン 4	96,005.30	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	チモシンアルファ 1	12,073.40	100.00%	6
151088-CD-8 (赤色)ヒト	チモシンアルファ 1	12,073.40	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	チモシンアルファ 1	12,073.40	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	トロポミオシンアルファ 3 鎖	29,033.30	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	トロポミオシンアルファ 4 鎖	28,522.40	100.00%	7
151088-CD-8 (赤色)ヒト	トロポミオシンアルファ 4 鎖	28,522.40	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロポミオシンアルファ 4 鎖	28,522.40	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	チューブリンアルファ 1C 鎖	50,135.70	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	チューブリンアルファ 1C 鎖	50,135.70	93.50%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	チューブリンアルファ 1C 鎖	50,135.70	99.80%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	腫瘍タンパク質 D52 様 2 型, アイソフォーム CRAe	22,237.90	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	ビメンチン	49,654.40	100.00%	12
MS/MS 試料名	ペプチドの独特な番号によ って選別されるタンパク質名	タンパク質 分子量(Da)	タンパク質 識別確率	独特な ペプチドの数
151061-CD-14 (青色)ヒト	ミオシン 9	226,537.50	100.00%	36
151061-CD-14 (青色)ヒト	タリン 1	269,765.10	100.00%	27
151061-CD-14 (青色)ヒト	フィラミン A	280,008.70	100.00%	16
151061-CD-14 (青色)ヒト	アクチン, 細胞質 1 型	41,737.80	100.00%	14
151061-CD-14 (青色)ヒト	ビメンチン	49,654.40	100.00%	12
151088-CD-4 (緑色)ヒト	軟骨オリゴマーマトリックス タンパク質	79,694.20	100.00%	10
151061-CD-14 (青色)ヒト	トロンボスポンジン 1	129,381.70	100.00%	8
151088-CD-8 (赤色)ヒト	トロンボスポンジン 1	129,381.70	100.00%	7
151061-CD-14 (青色)ヒト	トロポミオシンアルファ 4 鎖	28,522.40	100.00%	7
151061-CD-14 (青色)ヒト	グルコシダーゼ 2 サブユニッ トベータ	59,425.80	100.00%	6
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロンボスポンジン 1	129,381.70	100.00%	6

10

20

30

40

151061-CD-14 (青色)ヒト	チモシンアルファ 1	12,073.40	100.00%	6
151061-CD-14 (青色)ヒト	カルモジュリン	16,838.00	100.00%	5
151061-CD-14 (青色)ヒト	ビンキュリンのアイソフォーム 1 型	123,801.30	100.00%	5
151061-CD-14 (青色)ヒト	骨髄系細胞核分化抗原	45,837.00	100.00%	5
151061-CD-14 (青色)ヒト	血小板因子 4 型	10,845.50	100.00%	5
151061-CD-14 (青色)ヒト	14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	27,745.90	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	78 kDa グルコース調節性タンパク質	72,334.70	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	カルレティキュリン	48,142.90	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	カルレティキュリン	48,142.90	100.00%	4
151088-CD-8 (赤色)ヒト	軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質	77,211.80	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	熱ショックタンパク質 HSP 90 アルファのアイソフォーム 2 型	84,663.20	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	32,103.30	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	潜在型形質転換成長因子ベータ結合タンパク質 1 のアイソフォーム 4 型	186,787.30	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	リゾチーム C	16,536.90	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト 151061-CD-14 (青色) ヒト	ミオシン調節軽鎖 12A 型	19,795.30	100.00%	4
	ヌクレアーゼ感受性エレメント結合タンパク質 1 型 (断片)	42,015.90	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	ピルビン酸キナーゼアイソザイム M1/M2	57,937.50	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	血清アルブミン	69,366.90	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	チモシンアルファ 1	12,073.40	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロポミオシンアルファ 4 鎖	28,522.40	100.00%	4
151061-CD-14 (青色)ヒト	腫瘍タンパク質 D52 様 2 型, アイソフォーム CRA_e	22,237.90	100.00%	4
151088-CD-4 (緑色)ヒト	14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	27,745.90	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	60S リボソームタンパク質 L6 (断片)	32,729.30	100.00%	3

10

20

30

40

151061-CD-14 (青色)ヒト	酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質 32 ファミリーメンバーA	28,586.10	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	アクチン, 細胞質 1 型	41,737.80	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト 151088-CD-4 (緑色) ヒト	アポリポタンパク質 B 受容体	114,816.50	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	カルモジュリン	16,838.00	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	コフィリン 1	18,503.20	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	肝細胞癌由来成長因子	26,788.60	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	アデニルシクラーゼ結合タンパク質 1 型のアイソフォーム 2 型	51,901.60	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	ポリピリミジン路結合タンパク質 1 型のアイソフォーム 2 型	57,222.50	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	32,103.30	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	Ras 抑制因子タンパク質 1 型のアイソフォーム 2 型	31,542.20	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	ヌクレオリン	76,615.90	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	セリンアルギニンリッチスプライシング因子 2 型	25,477.10	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト 151061-CD-14 (青色) ヒト	血清アルブミン	69,366.90	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	血清除去応答タンパク質	47,172.90	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロンビン軽鎖	65,408.20	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	トロンボスポンジン 4	96,005.30	100.00%	3
151088-CD-4 (緑色)ヒト	トロンボスポンジン 4	96,005.30	100.00%	3
151088-CD-8 (赤色)ヒト	トロポミオシンアルファ 4 鎖	28,522.40	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	チューブリンアルファ IC 鎖	50,135.70	100.00%	3
151061-CD-14 (青色)ヒト	14-3-3 タンパク質ガンマ	28,303.10	100.00%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ	28,037.30	99.80%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質 32 ファミリーメンバーA	28,586.10	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	アクチン, 細胞質 1 型	41,737.80	99.80%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	アルファエノラーゼ	47,170.20	100.00%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	カルモジュリン	16,838.00	99.80%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	カルレティキュリン	48,142.90	99.80%	2

10

20

30

40

151061-CD-14 (青色)ヒト	肝細胞癌由来成長因子	26,788.60	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	ヒストン H2A タイプ 1-B/E	14,108.10	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	ヒストン H2A タイプ 1-B/E	14,136.10	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	タイチンのアイソフォーム 11 型	0	100.00%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	熱ショックタンパク質 HSP 90 アルファのアイソフォーム 2 型	84,663.20	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	インテグリンアルファ IIb のアイソフォーム 2 型	113,376.70	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	14-3-3 タンパク質ベータ/アルファのアイソフォーム短型	27,850.80	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	神経芽細胞分化関連タンパク質 AHNAK	629,104.40	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	ヌクレオリン	76,615.90	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	ペリリピン 3 (断片)	45,802.10	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	プロテアソーム活性化因子複合体サブユニット 1 型	28,723.90	99.90%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	タンパク質 S100-A8	10,835.00	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 1 型	28,329.70	100.00%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	血清アルブミン	69,366.90	99.80%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	血清除去応答タンパク質	47,172.90	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	血清除去応答タンパク質	47,172.90	99.90%	2
151088-CD-8 (赤色)ヒト	チモシンアルファ 1	12,073.40	99.80%	2
151061-CD-14 (青色)ヒト	トロポミオシンアルファ 3 鎖	29,033.30	100.00%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	チューブリンアルファ 1C 鎖	50,135.70	99.80%	2
151088-CD-4 (緑色)ヒト	酸性ロイシンリッチ核リンタンパク質 32 ファミリーメンバー A	28,586.10	93.20%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	コフィリン 1	18,503.20	93.50%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	コフィリン 1	18,503.20	93.20%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	グルコシダーゼ 2 型サブユニットベータ	59,425.80	99.20%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	肝細胞癌由来成長因子	22,964.00	93.50%	1
151061-CD-14 (青色)ヒト	熱ショックタンパク質 HSP 90 アルファのアイソフォーム 2 型	98,165.10	89.70%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	タンパク質 SET のアイソフォーム 2 型	32,103.30	98.90%	1

10

20

30

40

151088-CD-8 (赤色)ヒト	ヌクレアーゼ感受性エレメント結合タンパク質 1 型(断片)	35,923.80	93.50%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	ヌクレオリン	76,615.90	93.50%	1
151061-CD-14 (青色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 1 型	27,745.10	99.80%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 1 型	28,329.70	93.50%	1
151088-CD-4 (緑色)ヒト	セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 2 型	25,477.10	93.20%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	タリン 1	269,765.10	97.80%	1
151088-CD-8 (赤色)ヒト	チューブリンアルファ 1C 鎖	50,135.70	93.50%	1

10

【 0 2 5 4 】

本結果は、同数の P B M C を単離したすべての場合においてデータの再現性を確認するために非常に重要である。このことは、未刺激の T 細胞において存在する少ない結合による少ない検出に関する何らかの可能性を回避した。C D 4 細胞及び C D 8 細胞に対して共通の軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質は、C D 1 4 細胞において認められなかった。細胞外の場所に、そのみではないが、主に存在するこのタンパク質は、関節炎に關与し、トロンボスポンジンファミリーの一部としてであり、同様に、トロンボスポンジン 4 も、C D 4 細胞及び C D 8 細胞においてのみ認められた。トロンピン軽鎖は、C D 4 細胞においてのみ確認された。トロンピン軽鎖は、フィブリノーゲンからフィブリンへの転換において主要な役割を有しており、凝固カスケードにおけるいくつかの因子の活性化に關与している。プレ m R N A スプライシングと關連したセリン/アルギニンリッチスプライシング因子 2 は、C D 1 4 + 及び C D 4 + の系列にとって共通である。細胞骨格を細胞膜と關連させるタリン 1 細胞骨格タンパク質は、C D 1 4 + 細胞及び C D 8 + 細胞に共通であった。このタンパク質は、好中球の回転に關与している。本データは、ほとんどの P I F 標的が C D 1 4、C D 8、C D 4 系列によって共有されていることを含意する。

20

【 0 2 5 5 】

P I F は、インビボでの全身免疫を標的とする

インビトロで培養した P I F は、ヒト免疫系を標的とする。しかしながら、このことがインビボでも生じるかどうかは、これまで確立されていない。P I F が未処置のマウスにおける免疫系を標的とすることを判定するために、F I T C - P I F を皮下注射 (I V) または腹腔内注射 (I P) した後、5 分後及び 3 0 分後にそれぞれ屠殺した。体内の P I F の全体的な分布を、撮像を通じて分析した。データは、5 分以内で、標識した P I F の主な取り込みが、脾臓及び骨髄内で確認されることを明らかにした (図 1 2 A 及び 図 1 2 B)。標識したペプチドの主要な蓄積が、腎臓において観察され、迅速なクリアランスを反映していた。I P 注射後、取り込み及びクリアランスは、予期したように、I V 投与後よりも緩徐であった。このことは、腎臓が P I F クリアランスの主要部位であることを示す。

30

40

【 0 2 5 6 】

F I T C - P I F は、循環 C D 4 5 + 免疫細胞へ結合する

P I F が、インビボでの免疫系を直接標的とすることをさらに確認するために、本発明者らは、未処置のマウスにおける循環 C D 4 5 + 細胞との F I T C - P I F 相互作用を検討した。これらは、T 細胞及び B 細胞の抗原受容体シグナル伝達の調節因子である。2 色フローサイトメトリーを用いて、本発明者らは、1 2 . 5 ~ 5 0 μ g / m L の F I T C - P I F へ曝露した場合、単離した循環マウス白血球とともにインキュベートした F I T C - s P I F が、当該細胞の最多 2 5 % を結合しており、検査したペプチド濃度 2 3 ~ 2 5 % においてそれぞれ差は認められなかったことを発見した。このことは、未処置のマウスにおいて、免疫が活性化される場合に観察されるものとは対照的に、P I F 標的が限定さ

50

れていることを示している。直接的な P I F - 脾臓と免疫細胞との相互作用は、インビトロの試験においてさらに確認した (図 1 2 C) 。 エクスピボでの C D 4 5 細胞に対する結合も確認した (図 1 2 D) 。 このことは、 P I F がその短い循環半減期にもかかわらず、全身免疫を標的とすることを確認した。

【 0 2 5 7 】

P I F は、 1 4 - 3 - 3 エータタンパク質バイオインフォマティクス立体配座を標的とする

1 4 - 3 - 3 タンパク質は、当該タンパク質の足場構造及び可撓性により、多数の標的と相互作用することが公知である。これらのタンパク質と P I F の間の起こり得る密接な相互作用をさらに定義するために、本発明者らは、バイオインフォマティクスを用いて、当該タンパク質と異なるタンパク質との相互作用を検討した。本データは、 p I F と有意に相互作用している群のうちの唯一のメンバーが 1 4 - 3 - 3 エータであることを明らかにした (図 1 3) 。 興味深いことに、有意な結合は、当該タンパク質がペプチド 2 B T P と複合体形成する場合にのみ存在していた。他の 1 4 - 3 - 3 タンパク質に対する結合の分析は、あまり有意ではなかった。このことは、 1 4 - 3 - 3 タンパク質が、当該タンパク質の複数の結合パートナーにより、免疫応答を調節するために P I F と相互作用し得ることを含意する。

【 0 2 5 8 】

S P R 分析： L P S 、 C D 1 4 または下流の T L R 4 - M D 2 と係合せずに P B M C に及ぼす P I F の直接的な作用についてのエビデンス

本発明者らは、 P I F がマクロファージによる L P S (リポポリ多糖細菌抗原) 誘導性一酸化窒素 (N O) 産生を防止することを既に観察している。 1 7 , 1 8 2 6 0 それゆえ、このことは、当該阻害作用が直接的なペプチド - L P S 相互作用によるかどうかに対して重要である P I F と粗面 L P S (R a L P S) と滑面 L P S (O 5 5 : B 5 L P S) の間の結合を、 P I F 結合センサー上を通過させることによって、表面プラズモン共鳴 (S P R) を用いて検討した (図 7 A 及び図 7 B) 。 L P S (リガンド) と P I F - センサーとの相互作用は、検査した濃度すべてにおいて観察された。それゆえ、本発明者らは、 P I F が C D 1 4 受容体またはそのすぐ下流にある T L R 4 - M D 2 リガンドを標的にするかどうかを検討した。 S P R 系分析は、高濃度で検査した場合でさえ、 P I F が受容体も、すぐ下流にある仲介因子も標的としないことを示した (図 8 A) 。 高濃度 (0 . 5 m M) の P I F における T L R 4 - M D 2 表面との相互作用がないことも確認した (図 8 B) 。 P I F はそれゆえ、活性化因子との二次的相互作用を通じてよりもむしろ、特異的標的を包含する同族の細胞過程を通じて作用する。

【 0 2 5 9 】

P I F の効果は、 T L R 4 下流タンパク質に依存する可能性が高い

本発明者らは、 P I F が T L R 4 と結合しないが、 T L R 4 s i R N A がペプチド効果を遮断したことを既に示した。 T L R 4 は、 C D 1 4 + 細胞によって大部分が発現し、それゆえ P I F 標的は、 T L R 4 効果の伝達に関与するタンパク質を検討することが可能なこれらの細胞において識別される (図 1 6) 。 本データは、 P I F によって標的とされる 3 つの主要タンパク質、すなわち免疫活性化に関与するミオシン 9 、 チモシン a 1 、 ならびに T L R 4 作用に有意な 1 4 - 3 - 3 エータを示した。それゆえ、 T L R 4 阻害薬による当該シグナル伝達タンパク質のいずれの破壊も、炎症応答を制御する P I F の能力を損ない得る。

【 0 2 6 0 】

免疫細胞ターゲティングにおける追加の役割： C D 4 + 細胞及び 2 8 1 個の C D 8 + 細胞における P I F 標的は、 C D 1 4 + 標的と非常に相関している

C D 1 4 + 標的と比較して、 C D 4 + 及び C D 8 + (未刺激) のリンパ球部分系列におけるタンパク質標的を検討することは重要であった。全体として、両 T 細胞部分系列における標的の数は非常に少なかった (C D 1 4 + 標的と比較して 3 0 % 未満) (表 1 2 及び表 1 3) 。 P I F が標的とするタンパク質のほとんどは、 3 つの細胞調製物 (C D 1 4 +

10

20

30

40

50

、CD4+、CD8+)すべてにおいて95%超の符合で非常に保存されていた。識別したタンパク質と符合する21/24例におけるCD4+標的及びCD8+標的は同一であった。このことは、分離及び方法分析が異なる対象において再現性があり、その理由として、すべての場合において、同数のPBM Cが単離されたからであるという強い支持を提供する。このことは、未刺激のT細胞に存在する少ない結合による限定された検出に関するあらゆる可能性を回避した。タンパク質識別の方法の頑強性も確認した。しかしながら、データが示すように、当該系列におけるタンパク質発現が非常に少ないが、これらの系列において識別されるいくつかの決定的なタンパク質が以下に説明するCD14細胞においてみられない。

【0261】

考察

免疫系は複雑で、曝露される筋書きへの定常的な適応を必要とする。PIFは、先天免疫及び適応免疫の両方を調節することが示されており、いくつかの多種多様な前臨床的免疫障害におけるインビボでの効能を示した。PIF相互作用は、直接的、特異的及び複数標的化していなければならない。上述の実験は、PIFが免疫系を直接標的とし、免疫監視に必要とされる調節性T細胞FoxP3+と相互作用することを示している。加えて、PIFは、CD4細胞及びCD8細胞によって大部分が共有される未刺激のCD14細胞におけるいくつかのタンパク質を標的とする。酸化ストレス及びタンパク質ミスフォールディングに対する保護におけるPIFの役割に則して、PIFは、ビメンチン、PDI/チオレドキシン、HSPと、及び興味深いことに、免疫機能における決定的な役割を有するいくつかの14-3-3タンパク質と相互作用する。さらに、PIFとミオシン9及びチモシン-アルファ1との相互作用は、免疫応答の調節を支持する。いくつかの細胞骨格タンパク質への結合は、細胞運動性及び膜アーキテクチャにおける関与を示す。最後に、インビボでのデータは、注射直後にPIFが免疫系によって迅速に取り込まれることを確認している。全体として、インビトロ及びインビボでの両データは、直接的かつ標的とされるPIF-免疫系相互作用を支持する。

【0262】

免疫応答における鍵となる要素は、調節因子が免疫系にいかに関与するかを理解することである。本発明者らは、この問題に対処するためのアプローチ、すなわち、無細胞の、細胞ベースの、相互作用標的の識別、及びインビボでの証拠を使用した。

【0263】

LPSは、細胞に対する複雑な作用を有する細菌に由来する免疫系の主要活性化因子である。LPSは主として、CD受容体と相互作用し、当該受容体はさらに、TLR4-MD2下流効果を通じてリガンド誘導性活性を伝達する。しかしながら、LPSは、細胞に入って、おそらくインフラマソームを活性化する、TLR4非依存性作用も有する。PIFは、LPS誘導性免疫機能をインビトロ及びインビボの両方で調節するが、PIFの作用は、リガンドに対する結合とは無関係であり、したがって、明確な細胞ベースの作用を支持する。PIFは、LPSが主として結合する未刺激の細胞におけるCD14+細胞を標的とするので、当該ペプチドは、受容体へもその中間的な下流経路へも結合しない。このようなデータは、LPS作用との干渉が、おそらくTLR-4経路における下流の、免疫細胞自体内に存在する標的によって発揮されなければならないPIF細胞ベースの作用についての見解を支持する。

【0264】

養子性免疫系とのPIFの相互作用を、非刺激条件下で検討した。当該未処置細胞に対するPIF結合が約5%であることを認識すると、胚が小さな抗原である妊娠最初期において免疫系の活性化を強制的にもたらすことはないであろうということから、この相互作用の性質を判定することは重要であった。しかしながら、これは事実ではないらしく、その理由は、すでに移植前に免疫寛容原性促進性調節性T細胞(CD4/CD25/FoxP3+)の増加があるからである。本発明者らのデータは、結合が少ないにもかかわらず、PIFが、FoxP3活性化マーカーを特異的に発現する当該細胞を標的とするという

10

20

30

40

50

考えを支持する。そのようなデータは、PIFが、受精直後に当該細胞のマーカの発現を亢進する上で役立ち得ることを示す。PIFは、生育可能な胚によって分泌され、受精直後及び着床前に母体循環において検出される。このデータは、PIFの作用が、非妊娠設定におけるこの特定の決定的な細胞タイプとの相互作用を包含し得、したがって、妊娠の最初期の母体の認識に寄与し得るといふ考えも支持する。

【0265】

PIFがCD14+細胞及びT細胞の両方を直接標的とすることを示す本データは、関与する特定の標的の検討を促した。検証したPIFベースのアフィニティークロマトグラフィー法に続いて、本発明者らは、PIFの可撓性構造により、PIFは、複数のタンパク質と相互作用することを発見した。興味深いことに、3つの系列において識別される標的はほとんど符合したが、CD14は、標的の3倍以上の数を有していた。このことは、細胞が3個体の異なるドナーに由来したので注目すべきである。PIFの作用に即して、酸化ストレスに關与するいくつかのタンパク質を、とりわけ、ピメンチン及びPDI/チオレドキシンとともに識別した。PDI/チオレドキシンは、酸化ストレスに対する保護に決定的であり、これまで若年性糖尿病モデルにおける膵臓におけるPIFによってインピボで上方調節されることが示されている。細胞ストレスに対する保護におけるPDIの作用を大いに補完するHSPを標的とすることのほか、14-3-3タンパク質も、PIF-挿入剤の主要なタンパク質群として識別された。この群は、PIF標的すべての10%を表し、このクラスのタンパク質のメンバーをすべて実質的に網羅した。

10

【0266】

ミオシン9及びチモシン-アルファ1のようなタンパク質との相互作用は、PIFが保護にだけでなく、免疫調節及び活性化にも關与するという見解を支持する。

20

【0267】

細胞骨格は、細胞の機能及び生存において決定的な役割を担っている。細胞骨格は、細胞のアーキテクチャ及び膜の完全性を維持し、細胞運動性を可能にする。これらの多種多様なタンパク質と相互作用することによって、PIFは、細胞移動を制御するのを支援する。

【0268】

全体として、PIFタンパク質結合候補の多様性は、免疫系とのPIFの相互作用が頑強であり、ある特定の場においてPIFは、同じ遺伝子へ結合するだけでなく当該遺伝子の発現も調節するという証拠を提供している。したがって、PIFは、同じ遺伝子への結合と作用の間のループを閉鎖する。このことが、直接的なフィードバックを通じて発揮されるのかまたはそれに代わるものとして間接的な機序によって発揮されるのかは不確かである。

30

【0269】

上述の試験に利用したPIFアフィニティークロマトグラフィー法に続いて、半定量質量分析を行った。この方法は、マウス胚抽出物の選択的画分に対して結合するピオチン-PIFを、PIFベースのアフィニティークロマトグラフィーの結果と比較した。本データは、高い一致を示し、これに続いて、PDI及びHSPの結合部位を標的にするものとしてPIFペプチドのRIKP活性部位を識別することを行った。2つの異なる組織と種の間で標的に關して63%の一致があったので、これらの観察の検証を強く支持する。成体と胚の間のタンパク質の等級分けの差はさらに、得られたデータの妥当性を確認する。

40

【0270】

インピトロでの観察は、インピボでの確認を必要とする。この場合、PIFが投与の数分以内に全身免疫系によって直接取り込まれることを実証することは、關連するネズミモデルにおけるPIF-免疫細胞相互作用を確認した。脾臓及び骨髓へ結合していないPIFの一部が腎臓に迅速に到達することも示した。PIFは、脳へ到達して、ミクログリアを標的にするが、その時まですでに循環から除去されてしまっている。このことは、非常に高濃度（臨床試験について計画したものよりも4000倍高い）でのマウス及びイヌの両方へのPIFの注射が、確証されたLC/MS/MS法を用いて分析した場合、循環

50

から2時間以内に除去されたので、さらに支持されている。

【0271】

上述のデータは、多重ターゲティングによって、PIFが、細胞保護から免疫活性化及び細胞構造までに及ぶ免疫応答を調節するという見解を支持している。

【0272】

母子免疫は、環境性の病原体へ持続的に曝露され、抑制された状態は、宿主及び後代の両方を害するであろう。逆説的に言えば、いくつかの自己免疫障害は、疾患が重症でない限り、妊娠中に改善することがあるが、先行の貧弱な妊娠結果は、その後の疾患に寄与する。したがって、胎児は、相乗作用で相互作用しなければならず、適応免疫CD3+細胞とのPIF相互作用は、妊娠中に亢進する。

【0273】

CD3細胞及びCD45細胞に対するFITC-PIF結合は子宮内膜症血清によって影響される

子宮内膜症は免疫障害であるので、本発明者らは、これらの患者由来の血清が適切なFITC-PIF相互作用に影響するかどうかを判定することを目的とした(図14A~図14D)。本発明者らは、CD3+細胞及びCD45+細胞の両方に対するPIFの結合が、対照血清と比較した場合(図14C及び図14D)、子宮内膜症血清の存在下で変化する(図14A及び図14B)ことを発見した。そのようなデータは、PIF結合が、患者が子宮内膜症に罹患しているかどうかを判断するための感度のある指数を提供し得るとい証拠を提供するので、どの因子(複数可)が結合の変化をもたらし得るのかを識別するための基礎として機能するであろう。

【0274】

ウマ妊娠初期におけるPIF検出

受精後、妊娠12日後の雌ウマを、血清試料を用いた抗PIFベースのモノクローナル抗体ベースのアッセイを用いるPIFベースのELISAを用いて検査した。PIF-タグ1nmol(ステリフォーム高結合活性)は、プレート上を被覆したプレートへ密に結合する。プレートは、シーブロック/トゥインでブロッキングし、洗浄した。PIF-タグ及びプレートは、5ug/mlのビオチン抗PIF-Mab+PIF(0.78ng~100)ng/ml+血清/緩衝液1:4または緩衝液と事前に混合して、1時間インキュベーションした。100ulの混合物、対照及び試料をプレートへ添加した。ストレプトアビジン+HRPを添加し、45分間インキュベートした。結果は、ELISAプレートリーダーを用いて450nmで読み取った。妊娠集団(n=19)における平均レベルを非妊娠患者(n=10)におけるしよと比較した。図19は、非妊娠集団と比較した場合にPIFのODレベルが妊娠個体において有意であることを示す。P<0.003。また、標準偏差曲線は、当該アッセイが線形であることを実証したのを示す。

【0275】

妊娠雌ウマに対するPIF結合

方法：妊娠ウマ(n=4)及び非妊娠ウマ(n=8)の頸静脈から全血をヘパリンリチウムバキュテナーへと収集した。全血をヒストパック(Sigma)密度勾配上へ層状化させ、勾配を通じて赤血球を定着させ、先の白血球の多い血漿層を残した。細胞を滅菌PBS中で2回洗浄し、いかなる残留RBCも0.16M塩化アンモニウム溶液で溶解した。免疫細胞を1、5または10ug/mlのFITC-PIFまたはFITC-PIFscrとともに室温で1時間インキュベートした後、3回洗浄して、結合していないペプチドを除去し、フローサイトメリーのために固定した。細胞タイプは、それらの散乱特徴を基に分離した。データは、FITC結合が、単球において最も明白であり、それとともに他の群に対する最低限の結合が確認されることを示した。また、妊娠ウマと非妊娠ウマの間に差は認められなかった。図20及び表20は、妊娠ウマ及び非妊娠ウマの両方における平均±平均の標準誤差(SEM)を示し、FITC-PIFと対照の間の有意差を示す結合特徴を示す(P<0.001)。

【表 20】

表 20

ウマの免疫細胞に対する FITC-PIF の結合

妊娠/非妊娠

非妊娠ウマ		リンパ球		顆粒球		単球	
		PIF	PIFscr	PIF	PIFscr	PIF	PIFscr
1 ug/ml (n=8)	平均	0.08	0.27	0.15	0.26	14.41	1.10
	SEM	0.02	0.08	0.05	0.13	2.61	0.38
5 ug/ml(n=8)	平均	0.83	1.08	1.91	1.78	47.16	5.20
	SEM	0.12	0.21	0.59	0.75	1.15	1.17
10 ug/ml (n=7)	平均	1.67	2.04	4.15	3.89	56.73	12.39
	SEM	0.24	0.37	1.59	1.63	2.92	2.84
妊娠ウマ		リンパ球		顆粒球		単球	
		PIF	PIFscr	PIF	PIFscr	PIF	PIFscr
1 ug/ml (n=4)	平均	0.03	0.12	0.06	0.09	10.44	0.78
	SEM	0.01	0.03	0.01	0.03	2.31	0.23
5 ug/ml(n=4)	平均	0.43	0.78	0.56	0.93	48.23	6.36
	SEM	0.08	0.21	0.10	0.36	6.51	2.05
10 ug/ml (n=4)	平均	1.38	2.84	1.94	4.51	61.77	31.07
	SEM	0.21	0.67	0.71	1.44	3.80	6.43

FITC-PIFは、妊娠状態にもかかわらず、未処置の単球の集団へ選択的に結合した ($P < 0.0001$)。この効果は、FITC-PIFscrを用いて複製されることはなかった。

【0276】

以下の表 21 は、非妊娠 CD4+/CD25+、CD8+/CD25+、CD4+/CD45+ に対する FITC-PIF の結合、対妊娠 CD4+/CD45+ 結合の比較を示す。平均 ± 標準偏差 (SD)、2SD。

【表 21】

表 21

非妊娠

CD4+/CD25+

CD25+ 16.1±1.6SD, SD2 = 3.2 CD4+ 3.9±0.2 SD, SD2= 0.4

CD8+/CD25+

CD25+ 14.8±1.9SD, SD2=3.8 CD8+ 4.7±1.3SD SD2=2.6

非妊娠 CD4+/CD45+

CD4+ 9.2±0.3 SD SD2= 0.6 CD25+ 20±4.3 SD SD2= 4.6

妊娠 CD4+/CD45+

CD4+ 4.6±2.3 SD SD2= 4.6 CD25+ 16.9±5SD SD2= 10

【0277】

非妊娠および妊娠集団における PBM C 部分集団に対する FITC-PIF 結合種々の T 細胞集団に対する PIF の結合を、2色フローサイトメトリー及び特異的抗 CD4+ 抗体、抗 CD8+ 抗体、抗 CD25+ 抗体、抗 CD45+ 抗体を用いて検討した。結果は、平均 ± SD 及び SD2 として表した。

【0278】

NFAT1 評価：ヒト対象材料成人末梢血の使用は、IRB 治験実施計画書「造血幹細胞能力」の下での収集を包含しており、(IRB09-90-195, クリーブランド大学病院)によって認可された。本試験の実施方法は、認可された指針に従っている。

【0279】

フローサイトメトリー試験：Millenova Immunology Laboratoriesで妊孕性治療中の非妊娠不妊患者及び妊娠3か月患者が、標準的なインフォームドコンセント(CARI, Institute, シカゴ市)に署名した。実験はすべて、CARI, Instituteの指針及び規制に従って、かつ2006年3月にイリノイ大学シカゴ校の治験審査委員会からの認可を得て実施した。血液は、識別子を有さない過剰量の検体の使用で精密検査過程の一部として採取した。本発明者らは、妊娠患者及び非妊娠患者の両方におけるCD14+細胞及びCD3+細胞に対するFITC-PIF結合に関して報告した。本発明者らは、抗CD45抗体及び陰性対照としてのアイソタイプ抗体(BD Pharmingen, カリフォルニア州サンノゼ市)を用いて同じ患者集団におけるCD45+細胞に対する結合も検討した。CD45標的は免疫寛容について関連性のある平型(pan)白血球のマーカースとして公知である。加えて、白血球細胞または脾細胞をC57BL/6雌性マウス(8~11週齢)から収集し、異なる濃度のFITC-PIFへ氷上で1時間曝露した。細胞を洗浄し1mLのFACS緩衝液(Becton-Dickinson, ニュージャージー州フランクリンレイク地区)中に再懸濁し、FITC-PIF結合細胞の百分率を測定した。結合特異性を実証するために、脾細胞を100倍高い濃度の標識していないPIFへも曝露した後、フローサイトメトリー分析を行った。循環ネズミ免疫細胞へ結合したPIFと関連する細胞タイプの識別を調査した。免疫細胞を、マウス屠殺後に収集した。収集した細胞は、FITC-PIF、(12.5~50µg/ml)、+抗CD45(BD Pharmingen, カリフォルニア州サンノゼ市)とともにインキュベートした。アイソタイプ対照は、陰性対照として機能した。2色染色を、従来技術を用いて行った。蛍光測定(試料に付き20,000~50,000ゲート開閉事象)は、データ獲得及び分析用のシステムIIソフトウェアを用いて、Coulter(登録商標)Epics(登録商標)XL(商標)フローサイトメトリーにおいて実施した(Beckman Coulter, Inc., フロリダ州マイアミ市)。

10

20

【0280】

統計分析：タンパク質の蓋然性を、Protein Prophetアルゴリズムソフトウェアを用いて分析した。タンパク質標的のクラスター化及び相互作用は、String第9.1版ソフトウェアを用いて判定した。遺伝子経路分析は、付与された経路における最多数の遺伝子によって等級分けするIngenuity System Inc.(カリフォルニア州レッドウッド市)を用いて実施した。

30

【0281】

PIFはCD4+細胞におけるNFAT1発現を下方調節する

本発明者らは、PIFがPBMCにおける早期のCa++流動に影響しないことを報告した。しかしながら、先行遺伝子データ及び本クラスター分析は、PIFがカルモジュリン及びカルレチキュリンを含むいくつかのカルシウム調節タンパク質を標的とすることを実証した。NFAT1は、下流の標的であり、NFAT1はPIFがPBMCにおいて調節することがすでに実証されたIL2分泌を調節する。それゆえ、このシグナル伝達経路を関連させるために、抗CD3/CD28抗体によって刺激される単離したCD4+細胞(95%超の純度)に及ぼすPIFの効果は、NFAT1発現(ウェスタンブロット)を評価して判定した。ヒト対象材料成人末梢血の使用は、(IRB09-90-195, クリーブランド大学病院)によって認可されたIRBプロトコル「造血幹細胞能力」の下での収集を包含する。本試験の実施方法は、認可された指針に従っている。血液は、健康なヒトドナーから得、フィコール・ブランクPBMC分離後のMACSによるCD14-/4+選別を介して精製した。細胞は、RPMI+10%FBS+1%L-グルタミン中で(未刺激)、またはNFAT1(NFATc2)発現に及ぼすPIF効果を検査する5µg/mlの可溶性抗CD28を含有する1µg/mlの接着性抗CD3とともに、24時間培養した。3×10⁵個のCD4+細胞と等価のタンパク質抽出物をレーン当たり負荷し、抗NFAT1抗体(Transduction Laboratories)及び

40

50

抗アクチン抗体 (Invitrogen) の組み合わせを用いたウェスタンブロットによって分析した。図 18 A は、NFAT1 の発現に及ぼす同時活性化の効果及び誘導した細胞に及ぼすPIFの効果のグラフ提示である。図 18 B は、アクチンのバンドを用いて各レーンについて標準化した相対的なNFAT1発現に関するウェスタンブロット平均定量化、及び各ゲルに関して最も濃いNFAT1バンドに関する相対的な百分率として算出した各NFAT1バンドの強度である。最も濃いバンドは、100%に任意に設定し、次に、相対的な百分率を平均化及びグラフ化した。データは、同時活性化後にNFAT1が1.7倍増加することを示した。しかしながら、培養物に対するPIFの転嫁は、当該発現における大きな27倍の減少をもたらした。このことは、識別したタンパク質標的を、顆粒の転写因子調節と関連させた。

10

【0282】

FITC-PIFは循環CD45+免疫細胞へ結合する

どの免疫細胞系統PIFがインビボで直接標的とするかを判定するために、未刺激のFITC-PIFと単離した脾細胞との相互作用の下で、フローサイトメトリーを用いて白血球を検討した。PIF濃度の上昇は、リガンドとのPIF結合の上昇をもたらした。脾細胞に対するPIF結合特異性を実証するために、FITC-PIFへ曝露した細胞を、±100倍濃度の標識していないPIFへ添加した。フローサイトメトリーを用いて、データは、PIFの存在下で、95%超低下することを示し、それにより結合特異性を実証した。どの細胞タイプがPIFとの相互作用に関与するのかを判定するために、健常マウスにおける循環CD45+細胞に対する結合を検討した。これらの細胞は、平型白血球シグナル伝達マーカーとみなす。本発明者らは、2色フローサイトメトリーを用いて、単離した循環マウス白血球とともにインキュベートしたFITC-PIF(12.5~50µg/ml)が当該細胞の最多25%を結合することを発見した。

20

【0283】

CD45+細胞に対するFITC-PIF結合は妊娠中に低下する

本発明者らは、CD14+細胞に対するFITC-PIF結合が、非妊娠女性において最大であり、それゆえ妊娠中に検査した場合、変化しないことを報告した。対照的に、CD3+細胞に対する結合は、妊娠前は低い、妊娠中に有意に亢進する。報告したのと同じ患者において、本発明者らは、CD45+細胞に対する結合も比較した。本データは、妊娠対象においてフローサイトメトリーによって分析したPBMCへのFITC-PIFの結合が非妊娠患者と比較して有意に低下することを示した(n=4/群)。平均±標準偏差(27%±6.1対17.25%±1.7)、P<0.01。このデータは、PIF結合が動的であり、対象の機能的状態(すなわち、妊娠)とともに変化することをさらに実証している。

30

【0284】

これらのデータは、全身の器官及び特定の器官の両方に指示されるPIF標的化を統合する。妊娠対象におけるCD45+細胞に対するFITC-PIF結合の低下は、PIFの公知の寛容促進効果と関連し得る。CD45-ライゲーションは、PIFによって調節されるNFAT1発現の亢進を通じて、T調節性細胞-樹状細胞相互作用を促進する。インビトロでの脾細胞及び免疫細胞の両方とのPIFの相互作用は、結合と相互作用の特異性を確認した。このことは、前臨床モデルにおいてPIFを用いて観察される全体的な保護への重要な見解を提供しており、薬物動態的效果よりもむしろ薬力学的効果を反映している。これらは、進行中の臨床移行試験をもたらした。全体として、本発明者らは、保護、免疫活性化及び細胞構造に関与する未処理の免疫細胞に関するPIFの直接的、特異的及び相乗的な標的化を実証した。本発明者らはさらに、PIFが、インビボでの迅速な除去と関連した全身免疫を標的とすることを確認している。結果的に、PIFは、免疫障害に罹患している患者の治療へと現に移行中である。

40

【0285】

ネズミの妊娠中の循環サイトカインに及ぼすPIF効果

正常マウスに及ぼす効果を以下の表22における妊娠14日後のLPS処置したもの及

50

び L P S + P I F と比較する。

【表 2 2】

表 22

培地 (pg/ml)	血清			
	対照	PIF	LPS	LPS+PIF
TNFアルファ	6,6±0,4	5,6±1,1	8,6±0,9*	7,7±1,0
IFNガンマ	3,16±0,2	3,39±1,4	16,6±1,6*	5,92±1,1§
IL1ベータ	3,4±1	2,5±1,1	5,2±1,3*	4±1,3
IL18	266±65	150±25*	369±26*	268±64§
GMCSF	6,4±1	5,3±0,7	11,06±1,6*	8,2±1,5§
GRO	15,26±1,8	18,06±2,2	24,9±2,9*	17,07±1,2§
IL-4	2,53±0,48	1,74±0,9	7,72±0,2*	3,95±0,3*§
IL-5	3,98±0,5	2,66±0,4*	13,7±0,11*	6,8±0,5*§
IL12p70	1,36±0,49	0,94±0,7*	3,14±1,73*	2,07±1,2*§
IL17a	5,52±0,06	4±0,7	13,6±0,54*	10,4±0,12*
IL22	35,89±2,1	15,9±27*	47,3±5,6*	36,2±2,6§
IL23	36,29±8,6	21,6±2,3*	66,9±3,2*	50,9±5,2
IL27	22,7±1,1	13,4±1,08*	54,5±2,7*	38,7±3,1§
MCPI	47,04±3,3	34,1±2,7*	49,01±1,9	41,8±3,9
MIP 1ベータ	3,95±0,3	1,9±0,7*	6,4±0,4*	3,6±0,8§

10

20

30

【 0 2 8 6】

対照及び L P S 処置したものの胎盤比較におけるサイトカインレベルに及ぼす P I F 効果ならびに L P S 処理したマウスに及ぼす P I F 効果を以下の表 2 3 に示す。

【表 2 3】

表 23
胎盤

	対照	PIF	LPS	LPS+PIF
TNF アルファ	9,6±1	8,2±0,9	14,4±0,8*	12,1±1*§
IL1 ベータ	4,7±0,5	2,8±0,4*	5,2±0,3	4,5±1,2
IL18	203±23,2	290±21,6*	335±20,4*	223±24,4
GRO	1060±159	1255±218*	1686±401*	1335±550
IL5	2,3±0,73	4,41±0,5*	5,2±1,2*	4,05±0,9
IL12p70	0,13±0,06	0,82±0,7*	0,35±0,54	0,2±0,12
IL23	279,7±58,8	96,7±28,3*	208,7±48,7	204,7±61,8

§ LPSに対するP<0, 05; *CTRIに対するP<0, 05

10

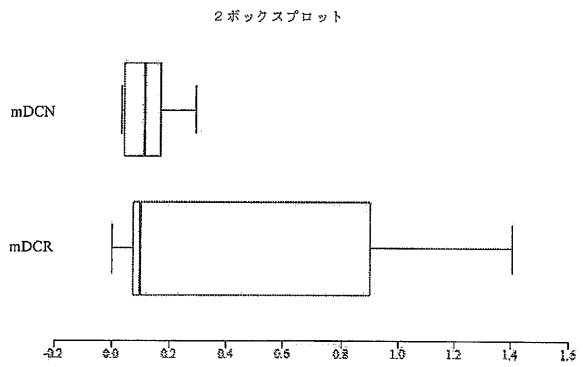
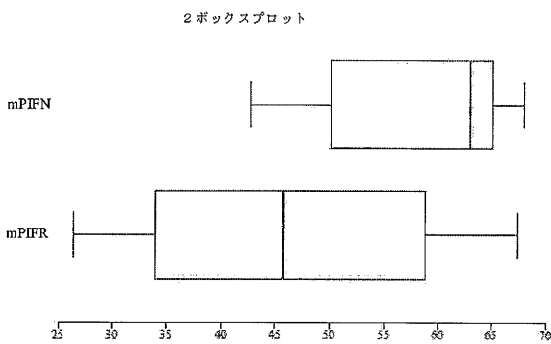
【 0 2 8 7】

20

このデータは、PIFが、血清中及び胎盤中の両方におけるいくつかのサイトカインを調節することを示している。留意すべきは、妊娠を改善するために、PIFは、胎児の体重も促進し、及び図 2 1 に示すように、自然発生的なLPS誘導性妊娠中断の割合も低下させる。

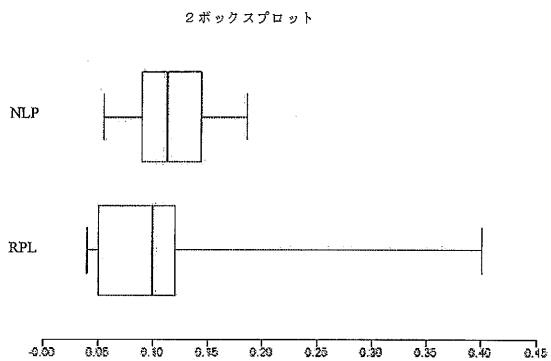
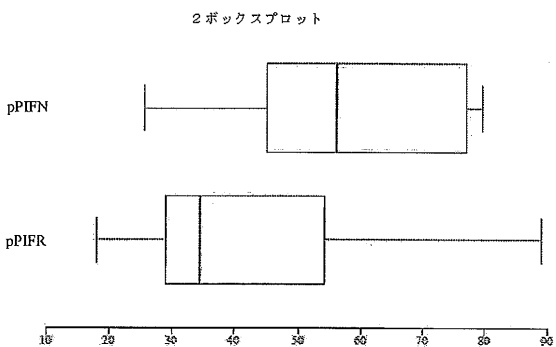
【 図 1 A】

【 図 1 C】



【 図 1 B】

【 図 1 D】



【 図 2 】

PIFは、妊娠開始に先立って免疫適合性を識別する

免疫細胞に対するPIFの結合 - RFL患者における変化

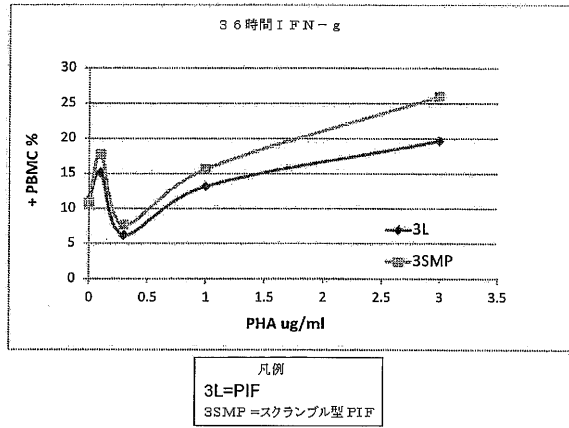
CD-14⁺細胞に対する結合・低RFL対照

検体	PHA	%CD14 ⁺	%CD14 ⁺ PIF ⁺ CD14 ⁺ 内
患者 (女性)	-	3.1	97.1
患者	+	2.9	97.5
対照 (男性)	-	7.9	87.5
対照	+	4.8	87.9

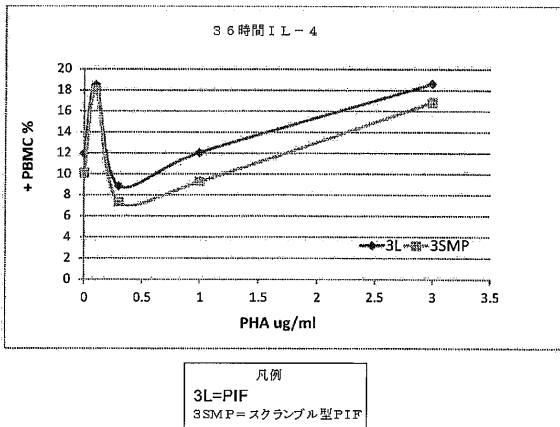
リンパ球に対するPIFの結合は誘導後低下する。

検体	PHA	PIF ⁺ CD4 ⁺ CD4 ⁺	PIF ⁺ CD8 ⁺ CD8 ⁺	PIF ⁺ CD19 ⁺ CD19 ⁺
対照	+	22.1	24.5	46.2
患者	+	16.2(-27%)	16.3(-33%)	48.2

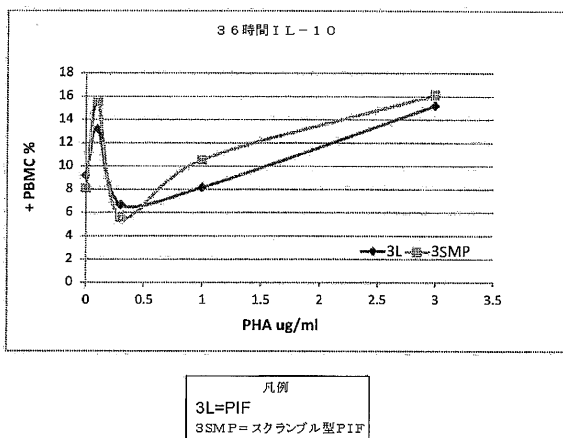
【 図 3 - 1 】



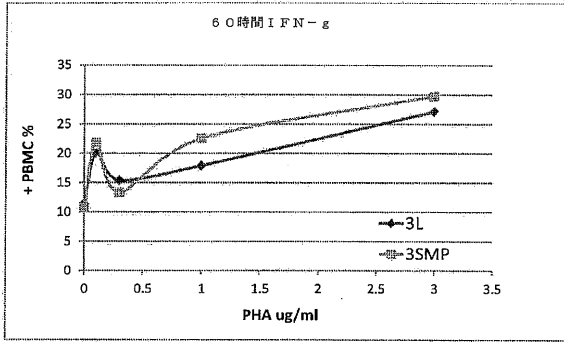
【 図 3 - 2 】



【 図 3 - 3 】

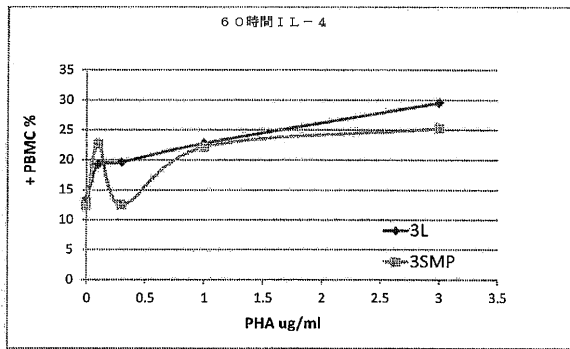


【 図 3 - 4 】



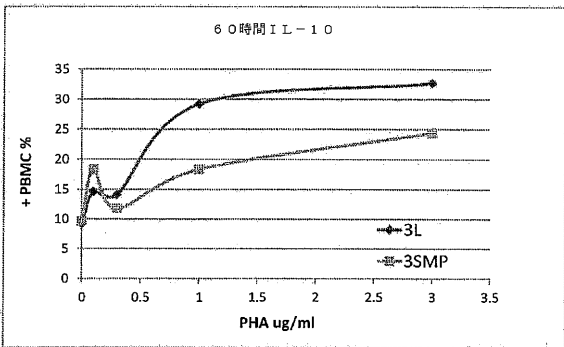
凡例
3L=PIF
3SMP = スクランブル型 PIF

【 図 3 - 5 】



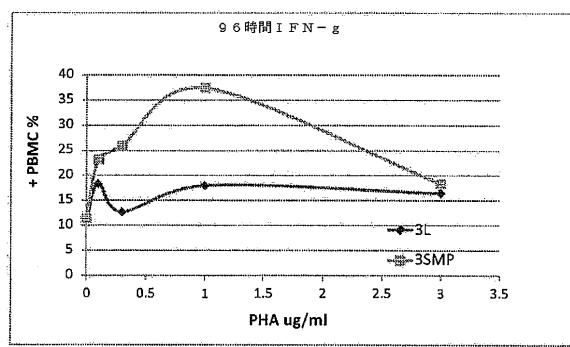
凡例
3L=PIF
3SMP = スクランブル型 PIF

【 図 3 - 6 】



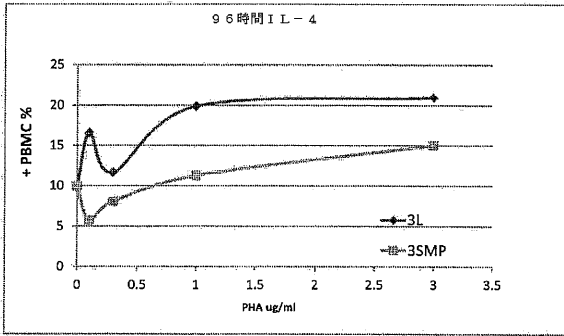
凡例
3L=PIF
3SMP = スクランブル型 PIF

【 図 3 - 7 】



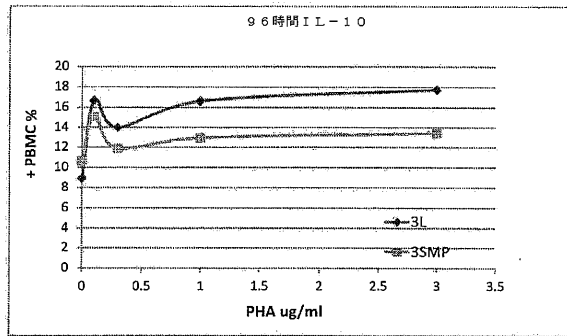
凡例
3L=PIF
3SMP = スクランブル型 PIF

【 図 3 - 8 】



凡例
 3L=PIF
 3SMP = スクランブル型 PIF

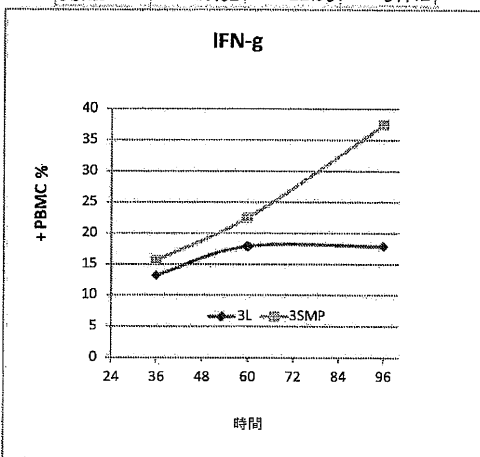
【 図 3 - 9 】



凡例
 3L=PIF
 3SMP = スクランブル型 PIF

【 図 4 - 1 】

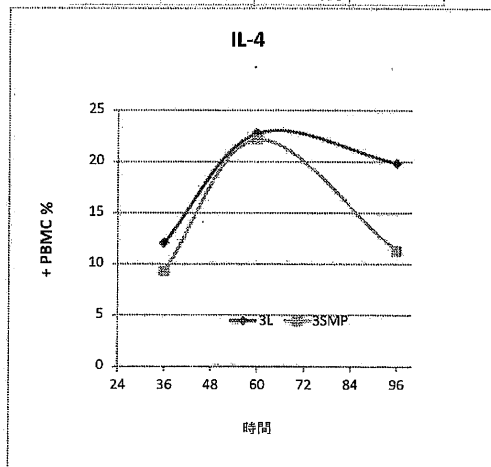
	36	60	96
3L	13.16	17.9	17.92
3SMP	15.62	22.53	37.42



凡例
 3L=PIF
 3SMP = スクランブル型 PIF

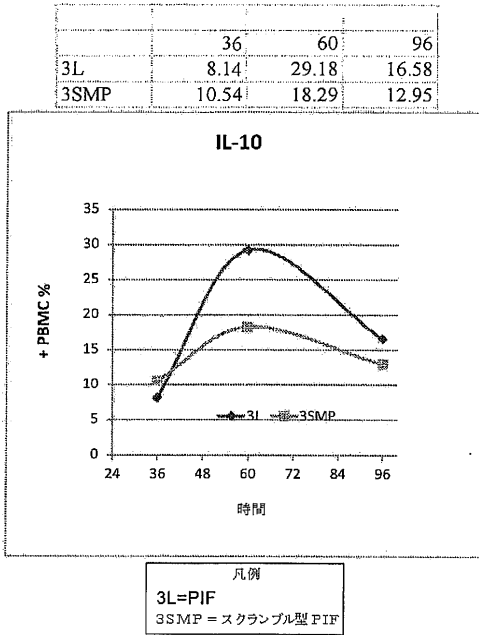
【 図 4 - 2 】

	36	60	96
3L	12.05	22.73	19.85
3SMP	9.26	22.13	11.26

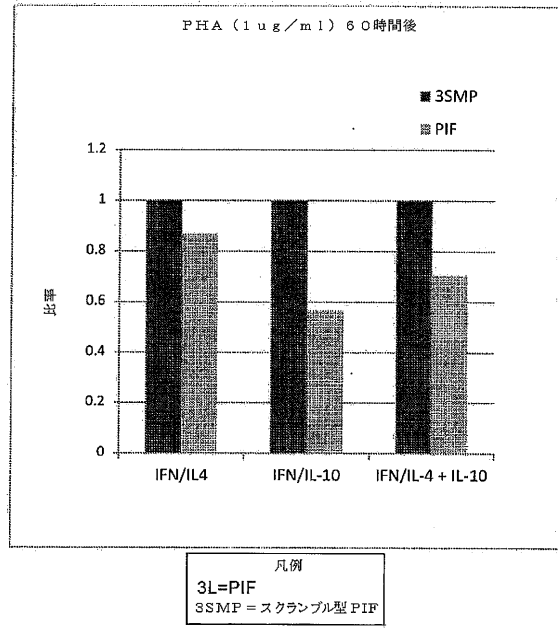


凡例
 3L=PIF
 3SMP = スクランブル型 PIF

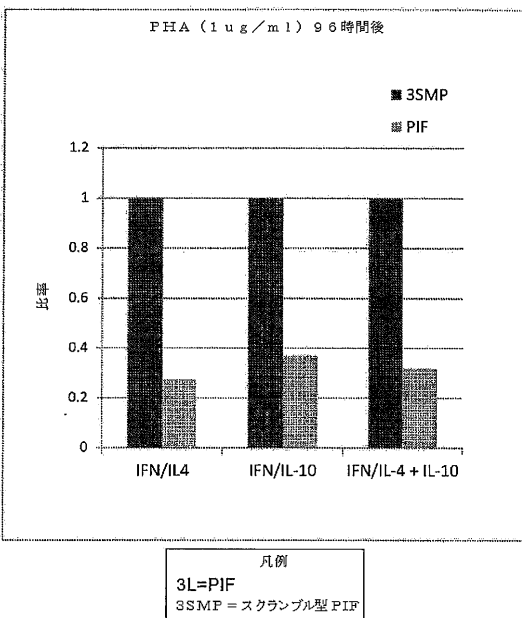
【 図 4 - 3 】



【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】



【 図 6 】

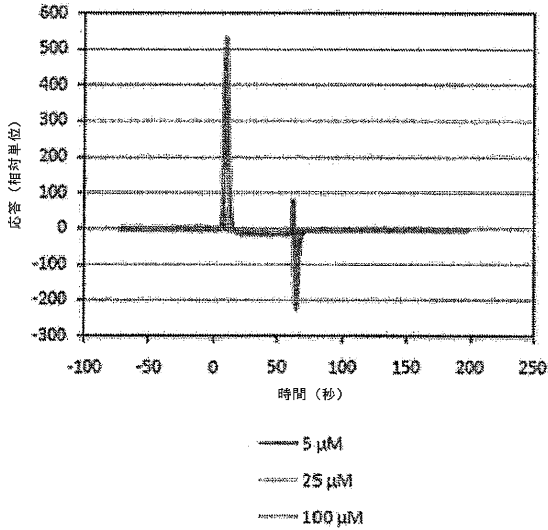
PIFは、妊娠開始に先立って免疫適合性を識別する

TH1/TH2サイトカイン特性 - RPLにおける変化

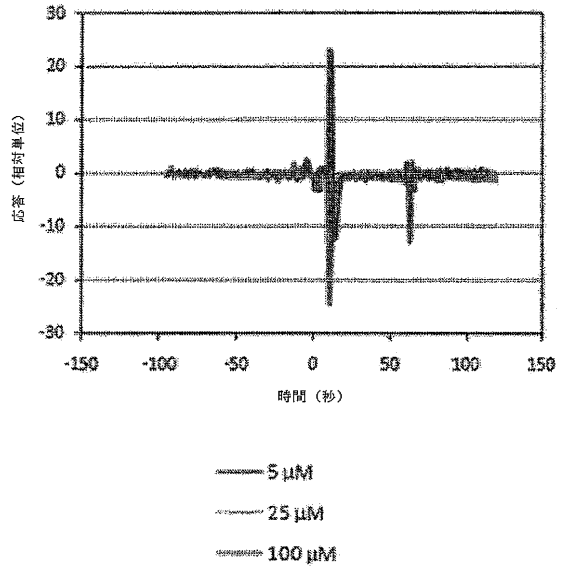
検体	PHA	PIF	TNFα*	IL-10*	TNFα/IL10	IFNγ*	IL-4*	IFNγ/IL-4
患者	-	-	7.98	7.77	1.03	10.8	8.4	1.28
患者	+	-	14.23	24.76	0.57	14.3	8.5	1.68
患者	+	+	18.32	24.32	0.75 (32%)	9.6 (35%)	6.9 (26%)	1.39 (17%)
対照	-	-	4.76	4.71	0.99	3.42	3.2	1.07
対照	+	-	17.43	25.72	0.68	15.6	13.2	1.19
対照	+	+	15.46	28.18	0.55 (36%)	6.6 (34%)	6.7	0.99 (17%)

18例の説明されない流産を経験した患者
サイトカインの数はすべて、散乱ゲートにおける総PBMCの%である (リンパ球のみ)

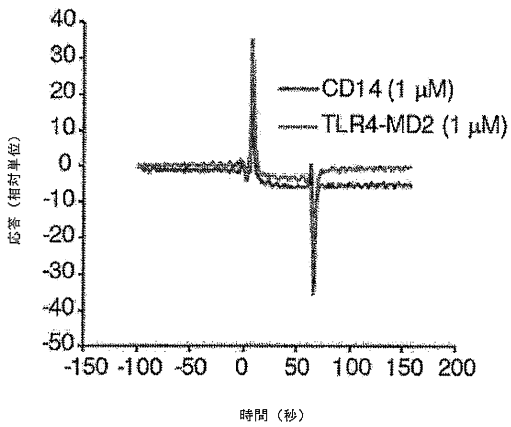
【 図 7 A 】



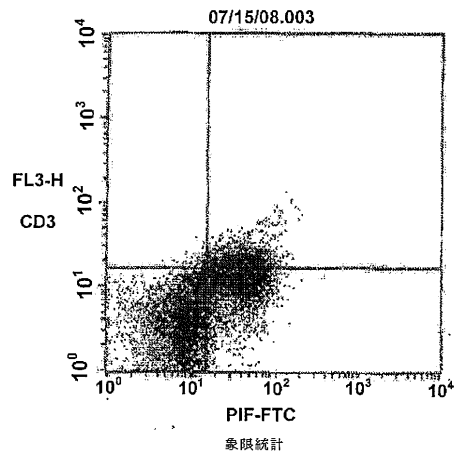
【 図 7 B 】



【 図 8 A 】



【 図 9 A - 1 】

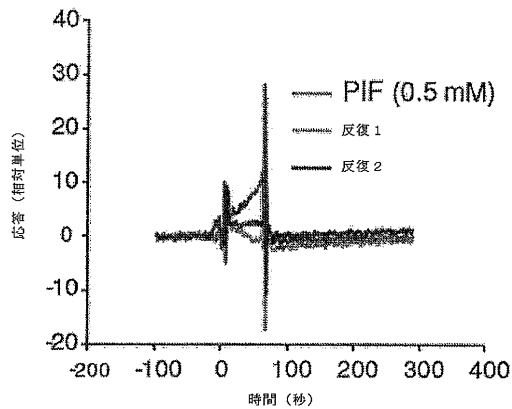


ファイル: 07/15/08.003
試料 ID: PTA 6.25 μ g/ml
試験管: 試験管 # 3
ゲート: G 2
総事象: 17707

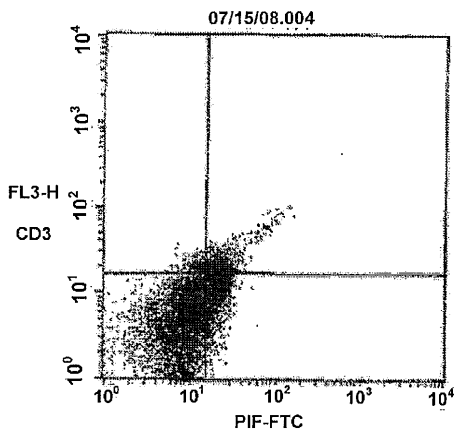
対数データ単位: 線形値
患者 ID:
獲得日: 2008年7月15日
ゲート事象: 8851

象限	事象	ゲート処理済み%	総計%
左上	64	0.95	0.47
右上	1123	12.69	6.34
左下	4730	63.24	26.71
右下	2914	32.92	16.46

【 図 8 B 】



【 図 9 A - 2 】



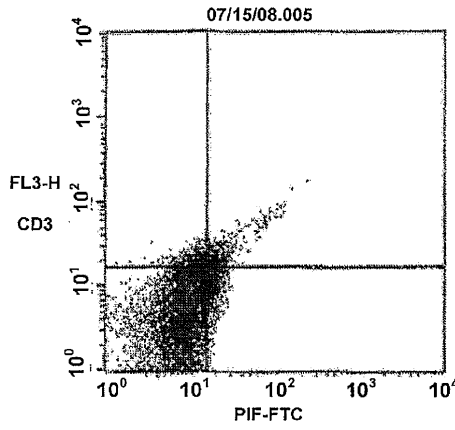
象限統計

ファイル：07/15/08.004
 検体ID：PTA1.6ug/ml
 試験管：試験管#4
 ゲート：G2
 総事象：15253

対数データ単位：線形値
 患者ID：
 獲得日：2008年7月15日
 ゲート事象：8910

象限	事象	ゲート処理済み%	総計%
左上	857	4.01	2.34
右上	891	10.00	5.84
左下	879	62.30	32.67
右下	1871	21.00	12.27

【 図 9 B 】



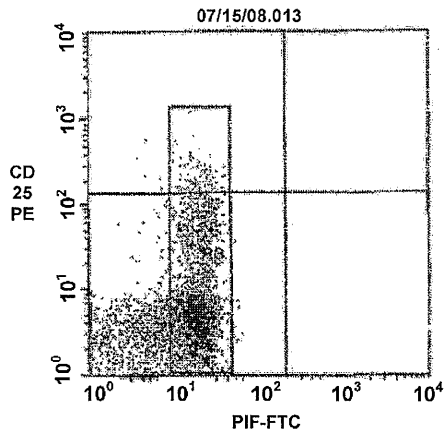
象限統計

ファイル：07/15/08.005
 検体ID：PTA0.21ug/ml
 試験管：試験管#5
 ゲート：G2
 総事象：15267

対数データ単位：線形値
 患者ID：
 獲得日：2008年7月15日
 ゲート事象：9312

象限	事象	ゲート処理済み%	総計%
左上	700	7.52	4.59
右上	671	7.21	4.40
左下	6856	73.63	44.91
右下	1085	11.65	7.11

【 図 9 C - 1 】



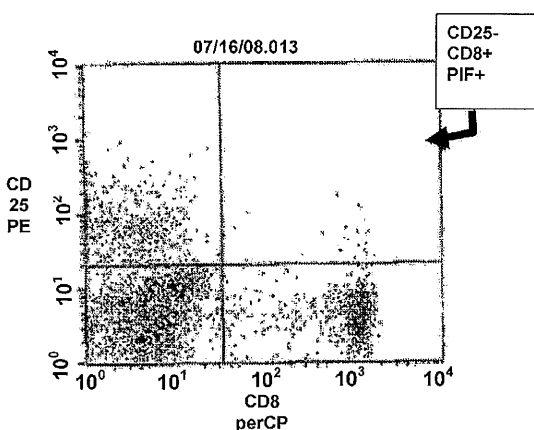
象限統計

ファイル：07/16/08.013
 検体ID：APIF/25PE/8PerCP
 試験管：試験管#4
 ゲート：G2
 総事象：11554

対数データ単位：線形値
 患者ID：
 獲得日：2008年7月16日
 ゲート事象：2964

象限	事象	ゲート処理済み%	総計%
左上	31	3.07	0.29
右上	0	0.00	0.00
左下	267	66.90	24.66
右下	1	0.03	0.01

【 図 9 C - 2 】



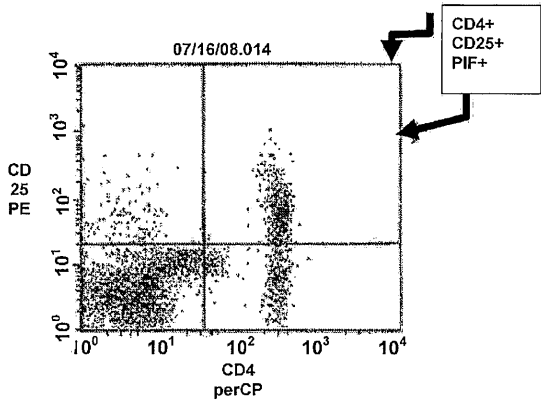
象限統計

ファイル：07/16/08.013
 検体ID：APIF/25PE/8PerCP
 試験管：試験管#4
 ゲート：G3
 総事象：11554

対数データ単位：線形値
 患者ID：
 獲得日：2008年7月16日
 ゲート事象：2817

象限	事象	ゲート処理済み%	総計%
左上	563	19.99	2.87
右上	28	0.99	0.24
左下	1489	52.86	12.89
右下	737	26.16	6.38

【図9C-3】

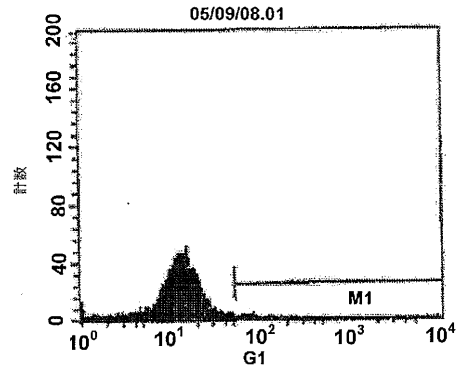


象限統計

ファイル: 07/16/08.014 対数データ単位: 線形値
 検体ID: A P I F / 2 5 P E / 4 P e r C P 患者ID:
 試験管: 試験管#5 獲得日: 2008年7月16日
 ゲート: G3 ゲート事象: 2862
 総事象: 11584

象限	事象	ゲート処理済み%	総計%
左上	35	0.30	0.17
右上	490	17.12	4.23
左下	601	63.28	15.63
右下	425	14.85	3.67

【図9D-1】

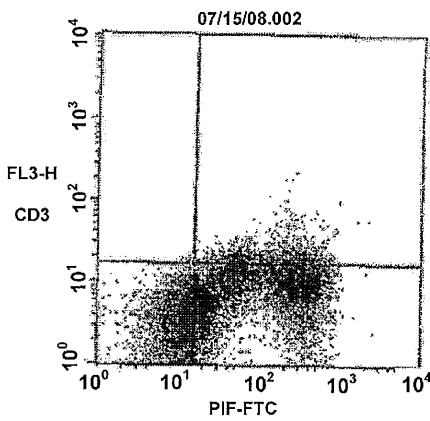


ヒストグラム統計

ファイル: 05/09/08.01 対数データ単位: 線形値
 検体ID: N P I S O 患者ID:
 試験管: 試験管#1 獲得日: 2008年5月9日
 ゲート: G2 ゲート事象: 4179
 総事象: 12213

事象	ゲート処理済み%	ピーク変化
4179	100.00	121
41	0.98	74

【図9D-2】

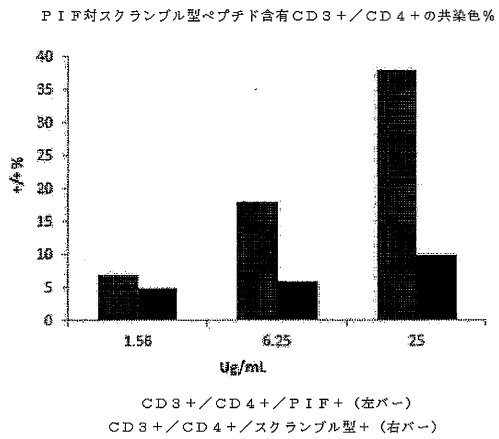


象限統計

ファイル: 07/15/08.002 対数データ単位: 線形値
 検体ID: P T A 2 5 u g / m l 患者ID:
 試験管: 試験管#2 獲得日: 2008年7月15日
 ゲート: G2 ゲート事象: 9808
 総事象: 18217

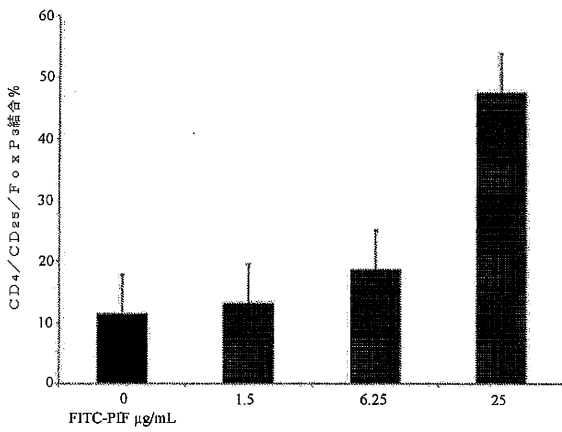
象限	事象	ゲート処理済み%	総計%
左上	10	0.10	0.05
右上	1011	10.31	5.55
左下	3093	31.59	17.01
右下	5689	58.00	31.23

【図10A】

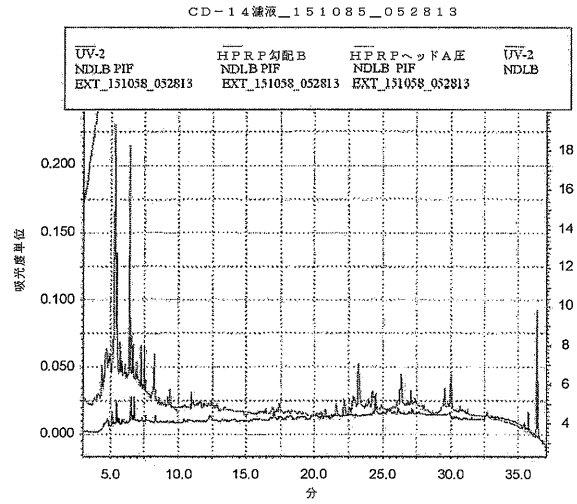


【図10B】

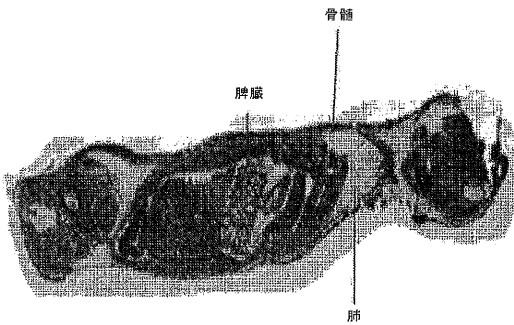
非妊娠P BMCへの結合



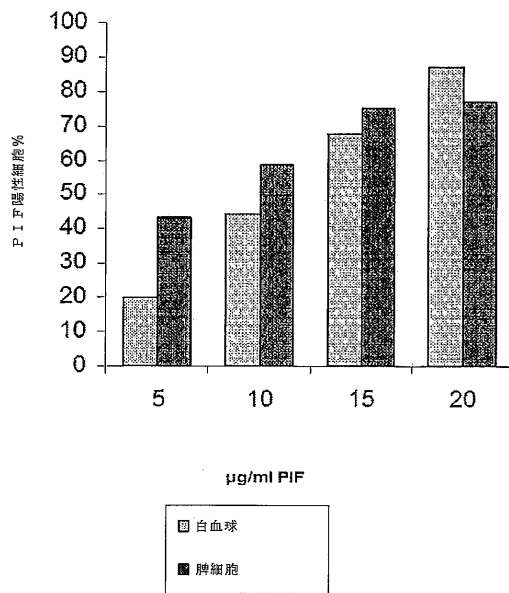
【図11】



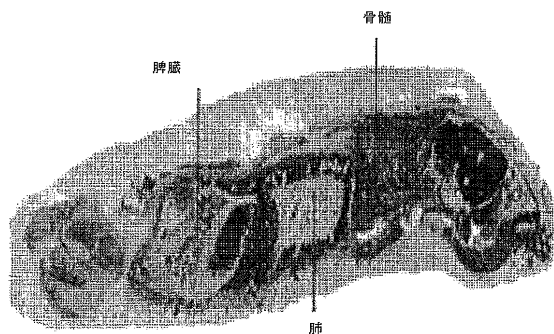
【図12A】



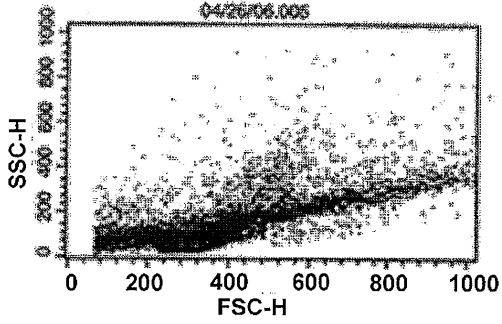
【図12C】



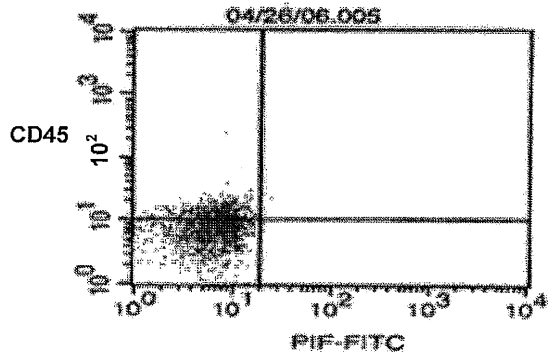
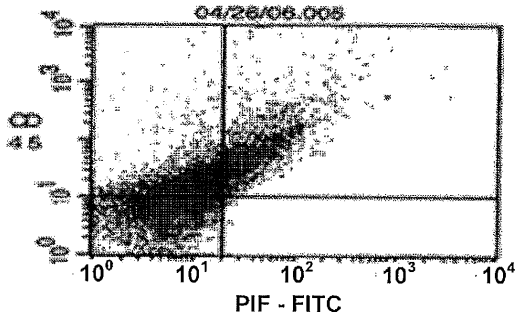
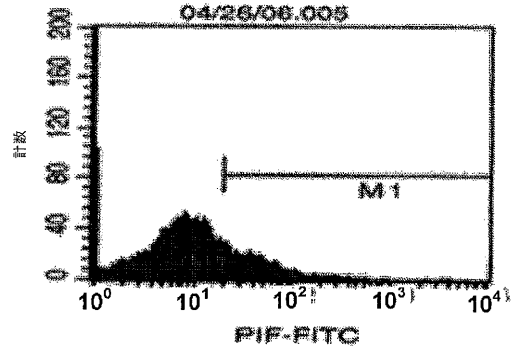
【図12B】



【図 1 2 D - 1】

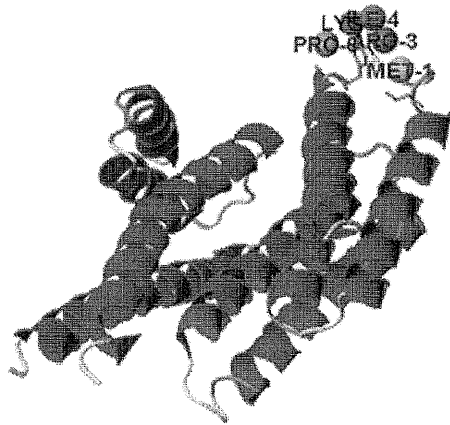


【図 1 2 D - 2】



【図 1 3 - 1】

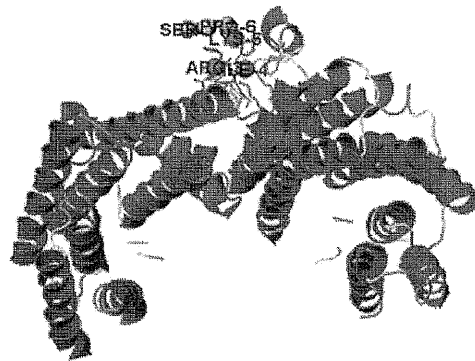
2. 標的構造 2 : 2. 8 オングストローム解像度における 1 4 - 3 - 3 - シグマの結晶構造



確率 0.07, 有意ではない

【図 1 3 - 2】

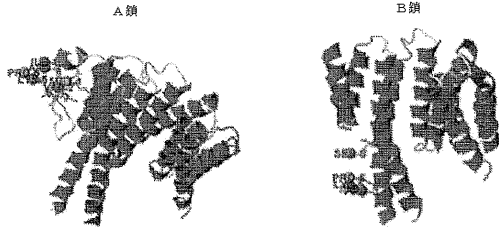
4. ペプチド 2 BTP と複合体形成した標的 1 4 - 3 - 3 タンパク質シータ (ヒト)



順位	p 値	H
1	0.00255	8
2	0.08721	6
3	0.09759	5
4	0.1039	6
5	0.1281	6
6	0.1711	5
7	0.2149	5
8	0.2159	5
9	0.2162	5
10	0.2173	5

【 図 1 3 - 3 】

ペプチド複合体シータサブユニットへの結合は有意である。A (p=0.1451) または B (p=0.7662) のような一本鎖のみを標的とした場合、ほとんどまたは全く有意ではない結合が推定され、PIFが特定のサブユニット(シータ)への結合時にのみ、かつ当該サブユニットがそれと自体の特定相互作用因子へ結合した場合にのみ作用することを示唆する。



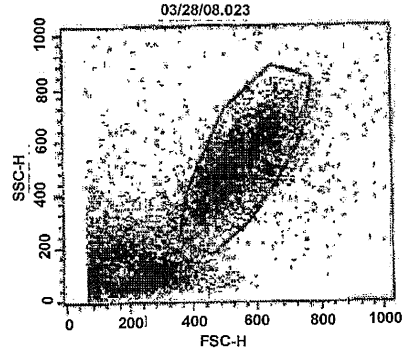
A 鎖 :

順位	p 値	H
1	0.1451	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
2	0.1539	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
3	0.2463	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
4	0.2474	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
5	0.2481	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6

B 鎖

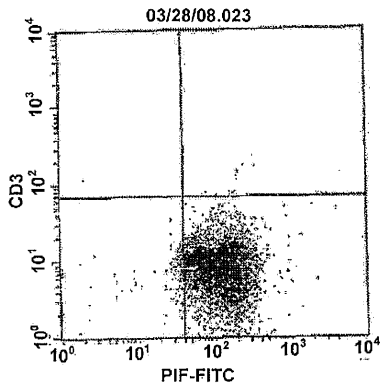
順位	p 値	H
1	0.7662	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
2	0.8431	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
3	0.8663	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
4	0.8842	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6
5	0.9221	0 mol-1 val-2 arg-3 ile-4 tyr-5 pro-6

【 図 1 4 A - 1 】



- 対照に類似
- 正常血清

【 図 1 4 A - 2 】



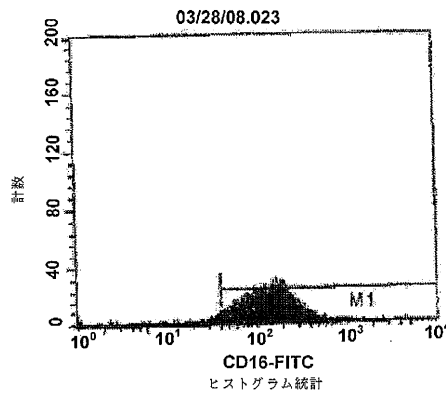
ENDO-3
象限統計

ファイル : 03/28/08.023
検体 I D : E 3 添加
試験管 : 試験管 # 5
ゲート : G 2
総事象 : 9804

対数データ単位 : 線形値
患者 I D :
獲得日 : 2008年3月28日
ゲート事象 : 3622

象限	ゲート処理		総計%
	事象	済み%	
左上	0	0.00	0.00
右上	11	0.30	0.12
左下	144	5.98	1.55
右下	3467	95.72	37.26

【 図 1 4 A - 3 】



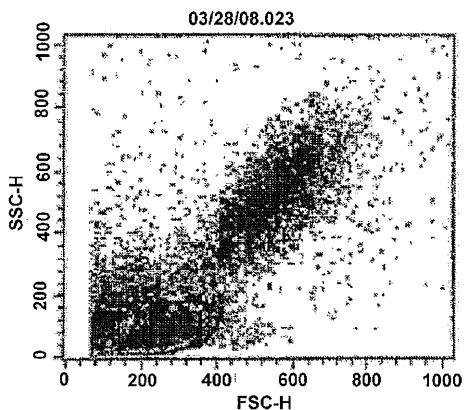
ヒストグラム統計

ファイル : 03/28/08.023
検体 I D : E 3 添加
試験管 : 試験管 # 5
ゲート : G 2
総事象 : 9304

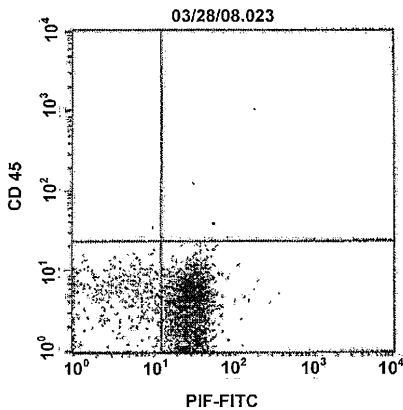
対数データ単位 : 線形値
患者 I D :
獲得日 : 2008年3月28日
ゲート事象 : 3622

事象	ゲート処理	
	済み%	ピーク変化
3622	100.00	163
3505	96.77	153

【 図 1 4 B - 1 】



【 図 1 4 B - 2 】



添加ENDO PAT. - 3
非ENDO PAT.

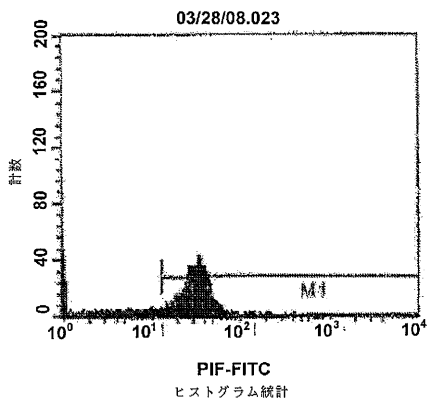
象限統計

ファイル : 03/28/08.023
 検体 I D : E 3 添加
 試験管 : 試験管 # 5
 ゲート : G 2
 総事象 : 9304

対数データ単位 : 線形値
 患者 I D :
 獲得日 : 2 0 0 8 年 3 月 2 8 日
 ゲート事象 : 3092

象限	事象	ゲート処理 済み%	総計%
左上	2	0.05	0.02
右上	7	0.23	0.08
左下	404	13.07	4.34
右下	2679	66.64	28.79

【 図 1 4 B - 3 】



ヒストグラム統計

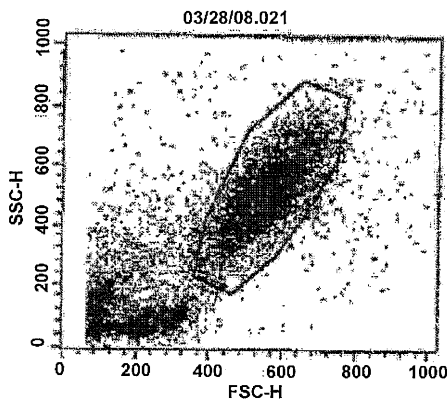
ファイル : 03/28/08.023
 検体 I D : E 3 添加
 試験管 : 試験管 # 5
 ゲート : G 2
 総事象 : 9304

対数データ単位 : 線形値
 患者 I D :
 獲得日 : 2 0 0 8 年 3 月 2 8 日
 ゲート事象 : 3092

事象	ゲート処理 済み%	ピーク変化
3092	66.10	1
2881	86.71	32

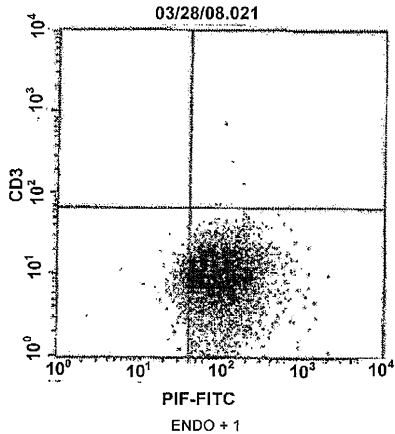
また対照に類似

【 図 1 4 C - 1 】



ほとんど結合していない - 「平板化」

【 図 1 4 C - 2 】



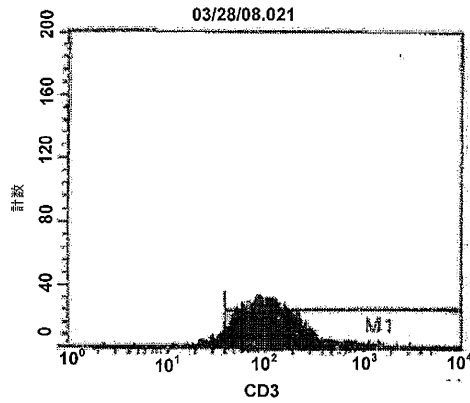
象限統計

ファイル : 03/28/08.023
 検体 I D : E 1 添加
 試験管 : 試験管 # 3
 ゲート : G 2
 総事象 : 9417

対数データ単位 : 線形値
 患者 I D :
 獲得日 : 2008年3月28日
 ゲート事象 : 4256

象限	事象	ゲート処理	
		済み%	総計%
左上	0	0.00	0.00
右上	10	0.23	0.11
左下	250	5.87	2.65
右下	3995	93.88	42.43

【 図 1 4 C - 3 】



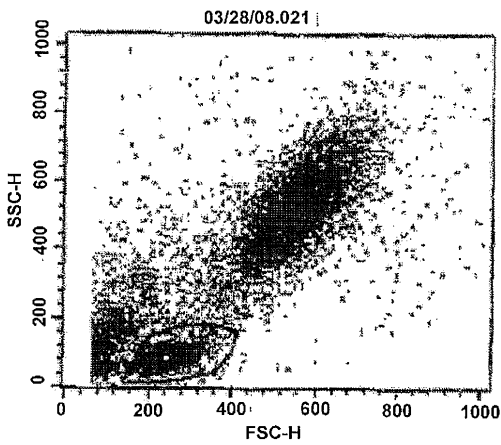
ヒストグラム統計

ファイル : 03/28/08.023
 検体 I D : E 1 添加
 試験管 : 試験管 # 3
 ゲート : G 2
 総事象 : 9407

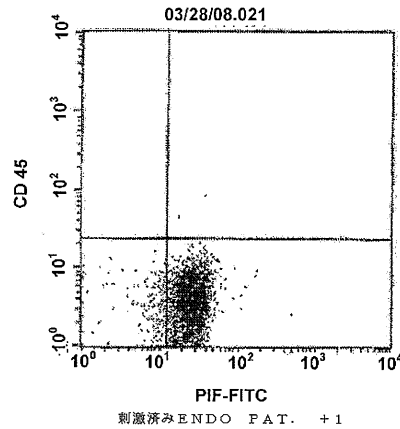
対数データ単位 : 線形値
 患者 I D :
 獲得日 : 2008年3月28日
 ゲート事象 : 4256

事象	ゲート処理	
	済み%	ピーク変化
4256	100.00	79.11
4054	95.25	79

【 図 1 4 D - 1 】



【 図 1 4 D - 2 】



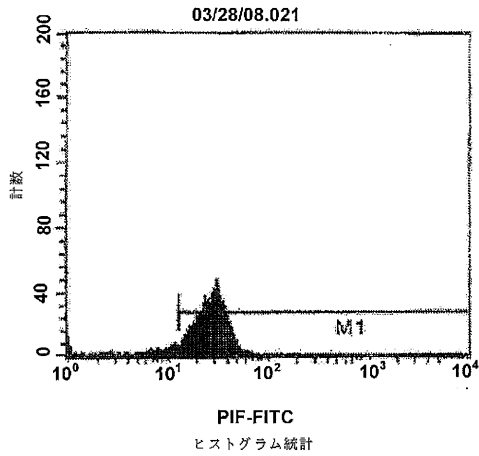
象限統計

ファイル : 03/28/08.021
 検体 I D : E 1 添加
 試験管 : 試験管 # 3
 ゲート : G 2
 総事象 : 9417

対数データ単位 : 線形値
 患者 I D :
 獲得日 : 2008年3月28日
 ゲート事象 : 3056

象限	事象	ゲート処理	
		済み%	総計%
左上	0	0.00	0.00
右上	2	0.07	0.02
左下	191	6.25	2.00
右下	2863	93.68	30.40

【 図 1 4 D - 3 】

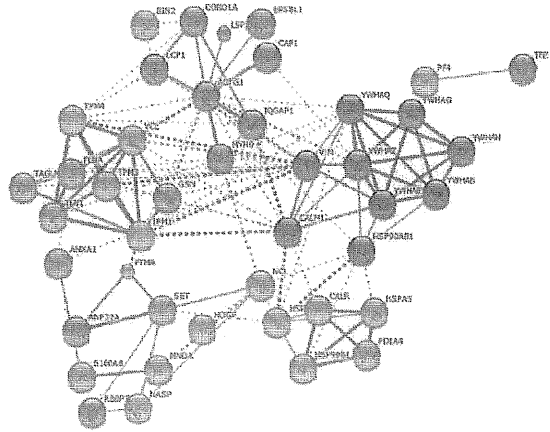


ファイル: 03/28/08.021
 検体ID: E1 添加
 チューブ: チューブ#3
 ゲート: G2
 総事象: 9417

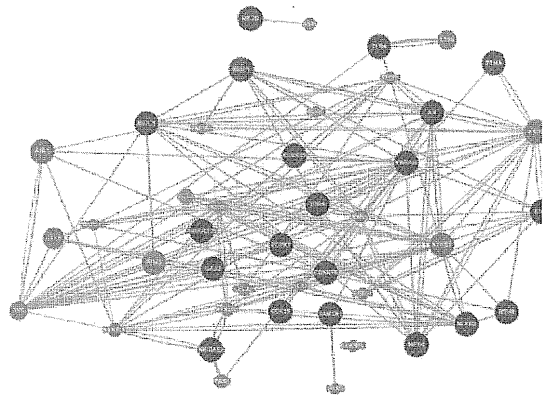
対数データ単位: 線形値
 患者ID:
 獲得日: 2008年3月28日
 ゲート事象: 3056

事象	ゲート処理済み%	ピーク変化
3056	93.46	29
2856	93.46	29

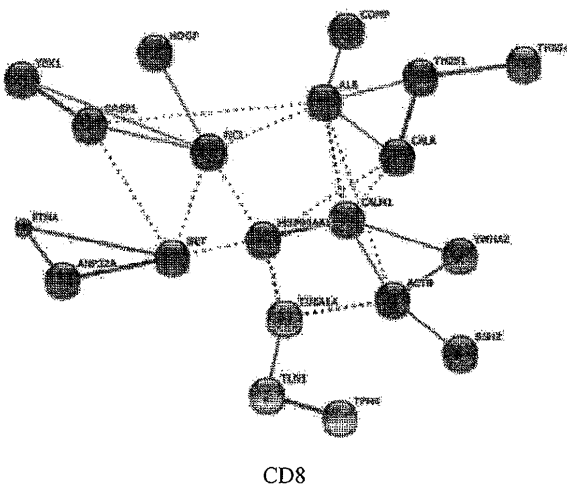
【 図 1 5 】



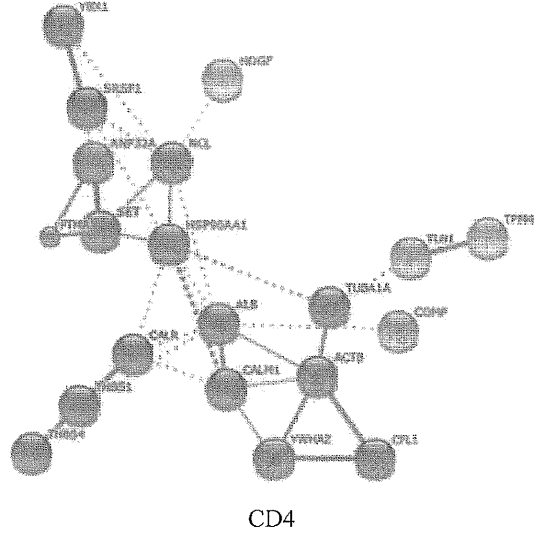
【 図 1 6 】



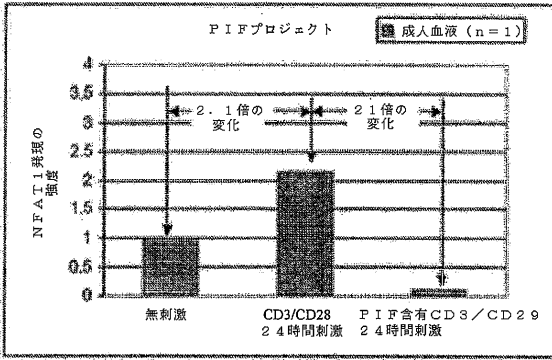
【 図 1 7 A 】



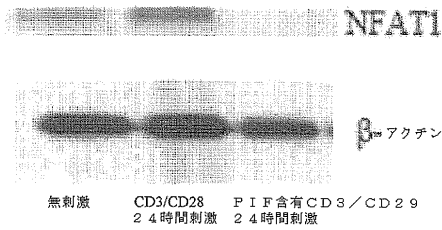
【 図 1 7 B 】



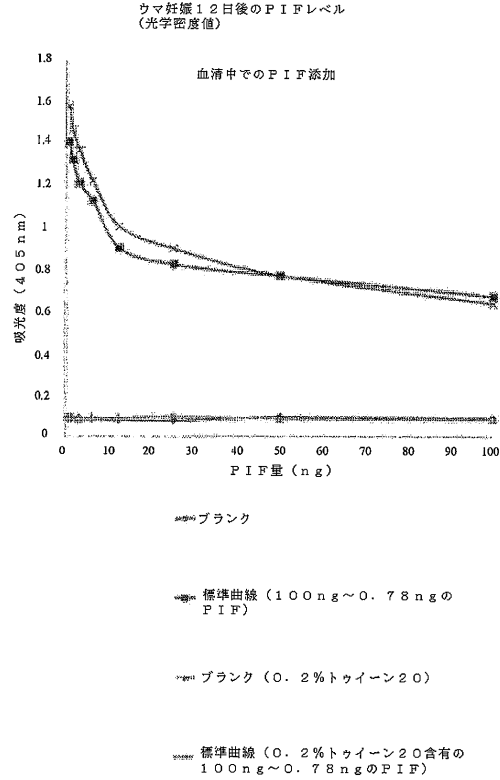
【 図 1 8 A 】



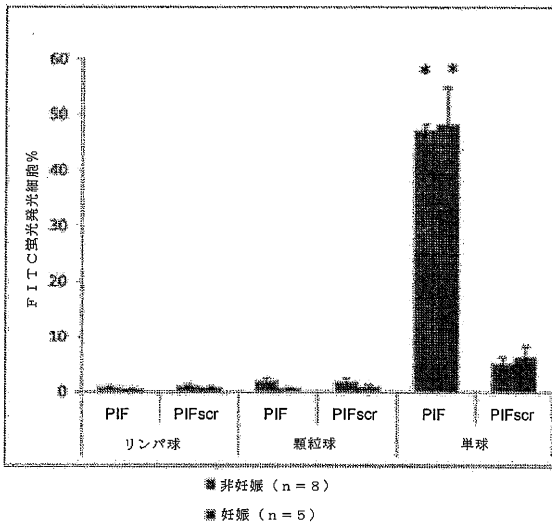
【 図 1 8 B 】



【 図 1 9 】

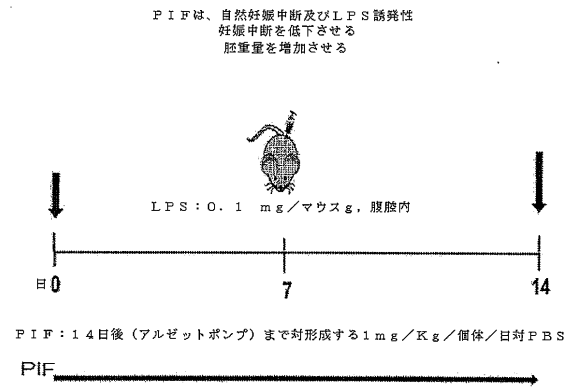


【 図 2 0 】

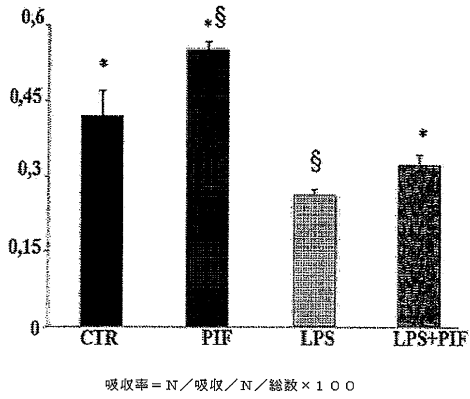
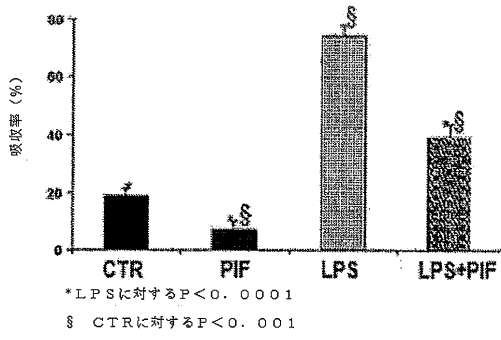


非刺激ウマ単球の集団へ結合したFITC-PIF (5μg/ml)。
 *は、有意差 (P<0.0001) を示す。

【 図 2 1 - 1 】



【図 2 1 - 2】



【配列表】

2017535794000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/58877
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - G01N 33/567, G01N 33/68, C07K 7/08, G01N 33/564 (2016.01) CPC - G01N 2800/368, G01N 33/689, G01N 2800/367, G01N 33/564 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) IPC(B) - G01N 33/567, G01N 33/68, C07K 7/08, G01N 33/564 (2016.01) CPC - G01N 2800/368, G01N 33/689, G01N 2800/367, G01N 33/564 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/7.21, 436/501 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: reimplantation factor, PIF, recurrent pregnancy loss, recurrent miscarriage, habitual abortion, endometriosis, binding, T cell, B cell, T-cell, B-cell, lymphocyte, neutrophil, eosinophil, basophil, monocyte, white blood cell, immune cell, PBMC, database, protein		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2009/0081225 A1 (BARNEA) 26 March 2009 (26.03.2009) para [0017], [0022], [0070], [0071], [0074], [0080], [0091], [0094]; Table 3; SEQ ID NO: 13	1-3, 18-20, 35-37, 52-54, 69-71, 73-75, 77-79, 81-83, 85, 86, (87-88)/(89-71, 73-75, 77-79), 89, 90/(69-71, 73-75, 77-79)
Y	US 2007/0136003 A1 (CHOI et al.) 14 June 2007 (14.06.2007) para [0016], [0017], [0047]	84
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (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" document 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 March 2016		Date of mailing of the international search report 13 APR 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/58877

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4-17, 21-34, 38-51, and 55-68
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-----please see extra sheet-----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
Group I: 1-3, 18-20, 35-37, 52-54
Group II+ (limited to SEQ ID NO:1): 69-71, 73-75, 77-79, (81-90) (in part), limited to SEQ ID NO: 1
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/58877

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, 18-20, 35-37, 52-54, drawn to methods of identifying a female subject with recurrent pregnancy loss (RPL) or endometriosis, and identifying a female subject likely to suffer from RPL or endometriosis.

Group II+: Claims 69-71, 73-75, 77-79, 81-89, 90(in part), drawn to method of detecting a level of immune dysregulation by detecting or quantifying a number of immune cells that bind to immobilized PIF. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The methods may be searched for an additional fee and election as such, for example, to the extent that the immobilized PIF encompasses an amino acid sequence with identity to SEQ ID NO: 1, i.e. claims 69-71, 73-75, 77-79, (81-90) (in part), limited to SEQ ID NO: 1. Additional PIF amino acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected PIF amino acid sequence(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be an immobilized PIF comprising an amino acid sequence with identity to SEQ ID NO: 2, i.e. claims 69-71, 73-75, 77-79, 81-89, 90(in part), limited to SEQ ID NO: 2.

Group III: Claims 72, 76, 80, 90 (in part), drawn to methods of treating a subject having immune dysregulation.

The inventions listed as Groups I, II+, III, do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires identifying a female subject with recurrent pregnancy loss (RPL) or endometriosis, and identifying a female subject likely to suffer from RPL or endometriosis, not required by Groups II+, III.

The technical feature of each of the inventions listed as Group II+ is the specific PIF amino acid sequence recited therein. Each invention requires a PIF amino acid sequence, not required by any of the other inventions and not required by Groups I, III. Further, Group II+ requires a solid support comprising RPL, not required by Groups I, III.

Group III requires treating a subject having immune dysregulation, not required by Groups I, II+.

Common Technical Features

The feature shared by Group I, II+, and III is pregnancy loss (RPL) caused by immune dysregulation.

The feature shared by Group I, II+, and III is endometriosis caused by immune dysregulation.

Another feature shared by Groups I and II+ is preimplantation factor (PIF), more specifically, a method comprising the steps of exposing preimplantation factor (PIF) or an analog thereof to a sample from the subject comprising one or a plurality of immune cells and analyzing binding of immune cells to the PIF or analog thereof.

Another feature shared by Groups II+ and III is the method step of diagnosing the subject as having a level of immune dysregulation if the number of immune cells in the sample from the subject is about twenty percent greater than a reference number of immune cells

Another feature shared by the inventions listed as Group II+ is (claims 69, 73, 77) a method of detecting a level of immune dysregulation comprising: exposing a sample from a subject diagnosed with or suspected of having immune dysregulation to a solid support comprising PIF or an analog thereof; quantifying a number of immune cells that bind to the immobilized PIF or the analog thereof; comparing the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof to a number of immune cells that bind to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation; and classifying the subject as having immune dysregulation if the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof is about twenty percent greater than the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof from the sample of subject that does not have known immune dysregulation.

Another feature shared by the inventions listed as Group II+ is (claims 70, 74, 78) a method of detecting a level of immune dysregulation of a subject comprising: detecting or quantifying a number of immune cells that bind to PIF or an analog thereof; comparing the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof to a number of immune cells that bind to PIF from a sample of subject that does not have known immune dysregulation; and classifying the subject as having immune dysregulation if the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof is about twenty percent greater than the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation.

-----please see continuation on next extra sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/58877

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Another feature shared by the inventions listed as Group II+ is [claims 71, 75, 79] a method of detecting a level of immune dysregulation of a subject comprising: detecting or quantifying a number of immune cells that bind to immobilized PIF or an analog thereof; comparing the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof to a number of immune cells that bind to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation; and classifying the subject as having immune dysregulation if the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof is about twenty percent greater than the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are anticipated by US 2009/0081225 A1 to Barnea (hereinafter "Barnea").

Barnea discloses pregnancy loss (RPL) caused by immune dysregulation (para [0017] "synthetic PIF, sPIF-1.sub.15"; section entitled "PIF Identifies Abnormal Immune Response of a Patient with Recurrent Pregnancy Loss"; para [0091] "sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) effect was tested on a patient with over 14 miscarriages and no live birth"; para [0094] "The results obtained with this illustrative clinical case indicate that changes in the immune system of patients with poor obstetric history can be identified prior pregnancy by using PIFs as an embryo surrogate. Such testing can allow for pre-pregnancy identification of patients with poor ability to mount an immune change or tolerance to initiate and maintain pregnancy. Such an insight could help in screening patients at risk of miscarriage").

Barnea further discloses endometriosis caused by immune dysregulation (para [0045] "The PIF assay, as disclosed in U.S. Pat. No. 5,646,003 to Barnea et al., entitled "Preimplantation Factor" issued Jul. 9, 1997 ... the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entirety, may be used to measure the response of the immune system to pregnancy specific preimplantation factors", incorporating by reference US 5,646,003 A, teaching that endometriosis is marked by immune dysregulation, see col 3, ln 16-20 "Patients suffering from immune system disorders, especially autoimmune diseases, e.g., endometriosis, may show a positive titre of PIF in their body fluids, enhancing the diagnosis and treatment of the disease")

Barnea further discloses an assay method comprising exposing preimplantation factor (PIF) or an analog thereof to a sample from the subject comprising one or a plurality of immune cells and analyzing binding of immune cells to the PIF or analog thereof (para [0017] "synthetic PIF, sPIF-1.sub.15"; section entitled "PIF Identifies Abnormal Immune Response of a Patient with Recurrent Pregnancy Loss"; para [0091] "sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) effect was tested on a patient with over 14 miscarriages and no live birth. Her immune cells were examined in the non-pregnant state, by exposure to sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) using PBMC [immune cell] preparations. Induction of PIF receptor expression, and binding to lymphocytes were used to characterize the treated cells"; para [0094] "The results obtained with this illustrative clinical case indicate that changes in the immune system of patients with poor obstetric history can be identified prior pregnancy by using PIFs as an embryo surrogate. Such testing can allow for pre-pregnancy identification of patients with poor ability to mount an immune change or tolerance to initiate and maintain pregnancy. Such an insight could help in screening patients at risk of miscarriage"; para [0022] "PIF peptides and their receptors could be used beyond pregnancy for diagnostic and therapeutic uses. As a diagnostic, monitoring changes in the PIF receptor that are present on immune cells as well as elsewhere in the body. PIF receptor also could serve as an assay for PIF, where PIF would bind the receptor when present in biologic fluids to determine pregnancy and viability").

Barnea further discloses the method step of diagnosing the subject as having a level of immune dysregulation associated with RPL by contacting immune cells with PIF or analogs thereof (para [0017] "synthetic PIF, sPIF-1.sub.15"; section entitled "PIF Identifies Abnormal Immune Response of a Patient with Recurrent Pregnancy Loss"; para [0091] "sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) effect was tested on a patient with over 14 miscarriages and no live birth. Her immune cells were examined in the non-pregnant state, by exposure to sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) using PBMC [immune cell] preparations. Induction of PIF receptor expression, and binding to lymphocytes were used to characterize the treated cells"), but does not specify that the diagnosis is made if the number of immune cells in the sample from the subject is about twenty percent greater than a reference number of immune cells. However, Barnea does teach that immune dysregulation as seen with RPL is marked by an inability of the patient to mount an immune change or tolerance to the embryo to initiate and maintain pregnancy (para [0094] "The results obtained with this illustrative clinical case indicate that changes in the immune system of patients with poor obstetric history can be identified prior pregnancy by using PIFs as an embryo surrogate. Such testing can allow for pre-pregnancy identification of patients with poor ability to mount an immune change or tolerance to initiate and maintain pregnancy. Such an insight could help in screening patients at risk of miscarriage"), thus indicating that patients having the immune dysregulation are unable to reduce their immune response to an embryo during pregnancy and therefore exhibit a greater number of immune cells as compared to that found in normal controls. Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the number of immune cells in the sample from the subject is greater than a reference number of immune cells. Furthermore, although Barnea does not expressly teach a difference of about twenty percent between the sample and the reference, assay parameters such as a percentage cut-off is a parameter that a person of ordinary skill in the art would routinely optimize. Optimization of parameters is a routine practice that would be obvious for a person of ordinary skill in the art to employ. It therefore would have been customary for an artisan of ordinary skill to determine the optimal percentage cut-off to for diagnosis. Thus, absent some demonstration of unexpected results from the claimed parameters, the optimization of time would have been obvious at the time of applicant's invention.

-----please see continuation on next extra sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/6877

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Barnea further makes obvious [claims 69, 73, 77] a method of detecting a level of immune dysregulation by teaching: exposing a sample from a subject diagnosed with or suspected of having immune dysregulation to a solid support comprising PIF or an analog thereof (para [0017] "synthetic PIF, sPIF-1.sub.15"; section entitled "PIF Identifies Abnormal Immune Response of a Patient with Recurrent Pregnancy Loss "; para [0091] "sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) effect was tested on a patient with over 14 miscarriages and no live birth. Her immune cells were examined in the non-pregnant state, by exposure to sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) using PBMC [immune cell] preparations. Induction of PIF receptor expression, and binding to lymphocytes were used to characterize the treated cells"; para [0068] "Preimplantation factor peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis ... Peptides were labeled on their N-termini with fluorescein isothiocyanate (FITC) in the solid phase").

Barnea does not specifically teach the further steps of: quantifying a number of immune cells that bind to the immobilized PIF or the analog thereof; comparing the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof to a number of immune cells that bind to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation; and classifying the subject as having immune dysregulation if the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof is about twenty percent greater than the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof from the sample of subject that does not have known immune dysregulation. However, Barnea does teach that immune dysregulation as seen with RPL is marked by an inability of the patient to mount an immune change or tolerance to the embryo to initiate and maintain pregnancy (para [0094] "The results obtained with this illustrative clinical case indicate that changes in the immune system of patients with poor obstetric history can be identified prior pregnancy by using PIFs as an embryo surrogate. Such testing can allow for pre-pregnancy identification of patients with poor ability to mount an immune change or tolerance to initiate and maintain pregnancy. Such an insight could help in screening patients at risk of miscarriage"), thus indicating that patients having the immune dysregulation are unable to reduce their immune response to an embryo during pregnancy and therefore exhibit a greater number of immune cells as compared to that found in normal controls. Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious to quantify and compare the number of immune cells in the sample to an immune dysregulation-free control, wherein if the number of immune cells in the sample from the subject is greater than a reference number of immune cells, then the sample is classified as having an immune dysregulation. Furthermore, although Barnea does not expressly teach a difference of about twenty percent between the sample and the reference, assay parameters such as a percentage cut-off is a parameter that a person of ordinary skill in the art would routinely optimize. Optimization of parameters is a routine practice that would be obvious for a person of ordinary skill in the art to employ. It therefore would have been customary for an artisan of ordinary skill to determine the optimal percentage cut off to for diagnosis. Thus, absent some demonstration of unexpected results from the claimed parameters, the optimization of time would have been obvious at the time of applicant's invention.

Barnea further makes obvious [claims 70, 74, 78] a method of detecting a level of immune dysregulation of a subject by teaching: detecting a number of immune cells that bind to PIF or an analog thereof (para [0017] "synthetic PIF, sPIF-1.sub.15"; section entitled "PIF Identifies Abnormal Immune Response of a Patient with Recurrent Pregnancy Loss "; para [0091] "sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) effect was tested on a patient with over 14 miscarriages and no live birth. Her immune cells were examined in the non-pregnant state, by exposure to sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) using PBMC [immune cell] preparations. Induction of PIF receptor expression, and binding to lymphocytes were used to characterize the treated cells"; para [0068] "Preimplantation factor peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis ... Peptides were labeled on their N-termini with fluorescein isothiocyanate (FITC) in the solid phase").

Barnea does not specifically teach the further steps of: creating a binding profile of the subject; comparing the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof to a number of immune cells that bind to PIF from a sample of subject that does not have known immune dysregulation; and classifying the subject as having immune dysregulation if the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof is about twenty percent greater than the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation. However, Barnea does teach that immune dysregulation as seen with RPL is marked by an inability of the patient to mount an immune change or tolerance to the embryo to initiate and maintain pregnancy (para [0094] "The results obtained with this illustrative clinical case indicate that changes in the immune system of patients with poor obstetric history can be identified prior pregnancy by using PIFs as an embryo surrogate. Such testing can allow for pre-pregnancy identification of patients with poor ability to mount an immune change or tolerance to initiate and maintain pregnancy. Such an insight could help in screening patients at risk of miscarriage"), thus indicating that patients having the immune dysregulation are unable to reduce their immune response to an embryo during pregnancy and therefore exhibit a greater number of immune cells as compared to that found in normal controls. Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious to create a binding profile to compare the number of immune cells in the sample to an immune dysregulation-free control, wherein if the number of immune cells in the sample from the subject is greater than a reference number of immune cells, then the sample is classified as having an immune dysregulation. Furthermore, although Barnea does not expressly teach a difference of about twenty percent between the sample and the reference, assay parameters such as a percentage cut-off is a parameter that a person of ordinary skill in the art would routinely optimize. Optimization of parameters is a routine practice that would be obvious for a person of ordinary skill in the art to employ. It therefore would have been customary for an artisan of ordinary skill to determine the optimal percentage cut-off to for diagnosis. Thus, absent some demonstration of unexpected results from the claimed parameters, the optimization of time would have been obvious at the time of applicant's invention.

-----please see continuation on next extra sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/58877

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Barnea further makes obvious [claims 71, 75, 79] a method of detecting a level of immune dysregulation of a subject by teaching: detecting a number of immune cells that bind to immobilized PIF or an analog thereof (para [0017] "synthetic PIF, sPIF-1.sub.15"; section entitled "PIF Identifies Abnormal Immune Response of a Patient with Recurrent Pregnancy Loss"; para [0091] "sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) effect was tested on a patient with over 14 miscarriages and no live birth. Her immune cells were examined in the non-pregnant state, by exposure to sPIF-1.sub.15 (SEQ ID NO:13) using PBMC [immune cell] preparations. Induction of PIF receptor expression, and binding to lymphocytes were used to characterize the treated cells"; para [0068] "Preimplantation factor peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis ... Peptides were labeled on their N-termini with fluorescein isothiocyanate (FITC) in the solid phase").

Barnea does not specifically teach the further steps of: comparing the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof to a number of immune cells that bind to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation; and classifying the subject as having immune dysregulation if the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof is about twenty percent greater than the number of immune cells bound to PIF or the analog thereof from a sample of subject that does not have known immune dysregulation. However, Barnea does teach that immune dysregulation as seen with RPL is marked by an inability of the patient to mount an immune change or tolerance to the embryo to initiate and maintain pregnancy (para [0094] "The results obtained with this illustrative clinical case indicate that changes in the immune system of patients with poor obstetric history can be identified prior pregnancy by using PIFs as an embryo surrogate. Such testing can allow for pre-pregnancy identification of patients with poor ability to mount an immune change or tolerance to initiate and maintain pregnancy. Such an insight could help in screening patients at risk of miscarriage"), thus indicating that patients having the immune dysregulation are unable to reduce their immune response to an embryo during pregnancy and therefore exhibit a greater number of immune cells as compared to that found in normal controls. Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious to quantify and compare the number of immune cells in the sample to an immune dysregulation-free control, wherein if the number of immune cells in the sample from the subject is greater than a reference number of immune cells, then the sample is classified as having an immune dysregulation. Furthermore, although Barnea does not expressly teach a difference of about twenty percent between the sample and the reference, assay parameters such as a percentage cut-off is a parameter that a person of ordinary skill in the art would routinely optimize. Optimization of parameters is a routine practice that would be obvious for a person of ordinary skill in the art to employ. It therefore would have been customary for an artisan of ordinary skill to determine the optimal percentage cut-off for diagnosis. Thus, absent some demonstration of unexpected results from the claimed parameters, the optimization of time would have been obvious at the time of applicant's invention.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I, II, III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

NOTES:

Claim 81 is objected to for lack of antecedent basis. As drafted, claim 81 is a multiple dependent claim that depends from claim 80, but claim 80 does not recite a "step of quantifying". For the purposes of this ISA Search and Written Opinion, claim 81 is construed as though depending from claim 79 (i.e. multiply dependent on claims 69, 60, 71, 73, 74, 75, 77, 78, 79).

Claim 83 is objected to for lack of antecedent basis. As drafted, claim 83 is a multiple dependent claim that depends from claim 80, but claim 80 does not recite "correlating a level of immune dysregulation". For the purposes of this ISA Search and Written Opinion, claim 83 is construed as though depending from claim 79 (i.e. multiply dependent on claims 69, 60, 71, 73, 74, 75, 77, 78, 79).

Claim 85 is objected to for lack of antecedent basis. As drafted, claim 85 is a multiple dependent claim that depends from claim 80, but claim 80 does not recite a "step of detecting or quantifying". For the purposes of this ISA Search and Written Opinion, claim 85 is construed as though depending from claim 79 (i.e. multiply dependent on claims 69, 60, 71, 73, 74, 75, 77, 78, 79).

Claims 87 and 88 are objected to for lack of antecedent basis. As drafted, claims 87 and 88 are multiple dependent claims that depend from claim 80, but claim 80 does not recite "the number of immune cells bound to PIF". For the purposes of this ISA Search and Written Opinion, claims 87 and 88 are construed as though depending from claim 79 (i.e. claims 69-79).

Item 4 (continued)

Claims 4-17, 21-34, 38-51, and 55-68 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/567 (2006.01)		G 0 1 N	33/536	D
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		G 0 1 N	33/567	
		C 1 2 Q	1/02	Z N A

(31) 優先権主張番号 PCT/US2015/050532

(32) 優先日 平成27年9月16日(2015.9.16)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

专利名称(译)	PIF结合作为免疫失调的标志物		
公开(公告)号	JP2017535794A	公开(公告)日	2017-11-30
申请号	JP2017543287	申请日	2015-11-03
[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)	生物Incept , LLC		
[标]发明人	バルネアエイタンアール		
发明人	バルネア,エイタン アール.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/536 G01N33/567 C12Q1/02		
CPC分类号	A61K38/179 A61K45/06 A61K2300/00 A61P15/00 G01N33/564 G01N33/56972 G01N33/6863 G01N33/689 G01N33/6893 G01N2800/364 G01N2800/368 G01N2800/52 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/543.525.U G01N33/543.525.E G01N33/48.M G01N33/483.C G01N33/536.D G01N33/567 C12Q1/02.ZNA		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA29 2G045/FA37 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	62/074384 2014-11-03 US 62/113298 2015-02-06 US 62/211660 2015-08-28 US PCT/US2015/050532 2015-09-16 WO		
其他公开文献	JP2017535794A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

实施方案涉及检查与受试者的循环免疫细胞结合的植入前因子 (PIF) 作为免疫失调标记的方法。一些实施方案涉及检测足以引起复发性妊娠丢失 (RPL) 的免疫失调水平的方法，检测足以引起子宫内膜异位症的免疫功能障碍水平的方法，以及检测免疫功能障碍水平的方法，包括施用有效量PIF或其类似物，检测其与循环免疫细胞的结合。在这些方法中，PIF与受试者的循环免疫细胞结合的约20%的变化表明免疫功能障碍的水平。

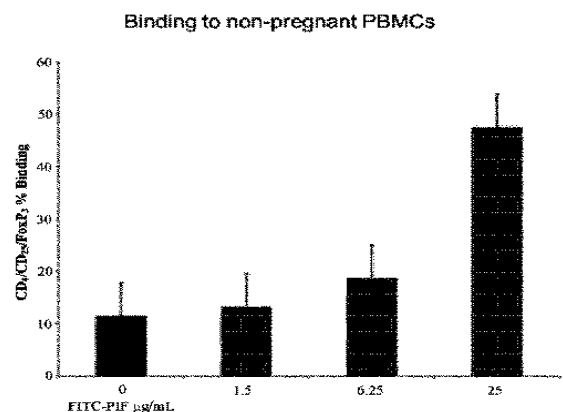


FIG. 10B