

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 539223

(P2002 - 539223A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 K 7/00	ZNA	C 0 7 K 7/00	ZNA 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 4
39/00		39/395	N 4 C 0 8 5
39/395		A 6 1 P 15/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/08		15/16	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 68数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 606062(P2000 - 606062)

(86)(22)出願日 平成12年3月22日(2000.3.22)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月21日(2001.9.21)

(86)国際出願番号 PCT/US00/07686

(87)国際公開番号 W000/56144

(87)国際公開日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(31)優先権主張番号 60/125,504

(32)優先日 平成11年3月23日(1999.3.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ オブ バージニア パテ
ント ファウンデーション
アメリカ合衆国,バージニア 22903 - 2442
,シャルロツツビル,スイート 1 - 110,ウエ
スト メイン ストリート 1224

(72)発明者 ヘア, ジョン シー .
アメリカ合衆国 バージニア 22901, シ
ャルロツツビル, シーダー リッジ レー
ン 2545

(72)発明者 ナーバイ - ハンセン, ゴーレン
イギリス国 エヌダブリュー7 1ディーイ
ー ロンドン, グランツ クローズ 70

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト精子表面抗原

(57)【要約】

本発明は、精子表面タンパク質および哺乳動物種における受精能を調節するためのそのようなタンパク質の使用に関する。より詳細には、本発明は、精製された精子特異的表面ペプチドエピトープならびにそれらのタンパク質エピトープの誘導体およびそれらのタンパク質エピトープに対する抗体に関する。本発明は、不妊に関連する手順における治療組成物および診断組成物ならびにそれらの組成物を用いる方法に関する。本発明の組成物は、不妊の雄性および雌性の血清において存在する抗精子抗体によって認識される精子細胞表面抗原を含む。本発明はさらに、治療組成物ならびに診断および治療の方法に関する。これらには、不妊を調節する(すなわち、阻害または促進する)組成物および方法が含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1から配列番号22、および配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたかまたは組換えのポリペプチド。

【請求項2】 前記アミノ酸配列が、配列番号1、配列番号2、配列番号18から配列番号22、および配列番号23からなる群より選択される、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 以下の工程を包含する、免疫学的な不妊を診断する方法：

個体から血清サンプルを得る工程；

該サンプルを精子の表面抗原を含有している組成物と接触させる工程；および抗原/抗体反応についてスクリーニングする工程。

【請求項4】 前記抗原/抗体反応についてスクリーニングする工程が、標識された二次抗体の使用を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記精子の表面抗原が、固体基板に結合されている、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記精子の表面抗原が、不妊患者から単離された血清によって認識されるタンパク質であり、そしてここで、該タンパク質は、妊性の患者に由来する血清によっては認識されない、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記精子の表面抗原が、配列番号1～配列番号22、および配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項5に記載の方法。

【請求項8】 ペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物であって、該ペプチドが、配列番号1から配列番号22、および配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、薬学的組成物。

【請求項9】 アジュバントをさらに含む、請求項8に記載の薬学的組成物。

【請求項10】 哺乳動物種に対して、薬学的に受容可能なキャリア、ならびに配列番号1から配列番号22、および配列番号23からなる群より選択される治療有効量のアミノ酸配列を含有している組成物を投与する工程を包含する、哺乳動物種において受精能を調節するための方法。

【請求項11】 前記組成物が、さらにアジュバントを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記組成物が、静脈内注射によって投与される、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 配列番号1から配列番号22、および配列番号23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項14】 請求項13に記載の抗体および薬学的なキャリアを含有している、避妊用組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(米国政府の権利)

本発明は、米国政府の支援で、米国国立衛生研究所による表彰を受けた助成金番号HD-29099、P30-28934およびD543-TW00654のもとで行われた。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、精子細胞表面抗原に関する。この抗原は、不妊の雄性および雌性の血清において存在する抗精子抗体によって認識される。より詳細には、本発明は、精子特異的表面タンパク質/ペプチドのエピトープならびにそれらのタンパク質のエピトープに対して指向される誘導体および抗体に関する。

【0003】

(発明の背景)

抗精子抗体(ASA)と、説明されない不妊のいくつかの症例との相関は、受精をブロックするにおけるこれらの抗体についての役割を示唆する。不妊のカップルにおける精子に対する免疫性の発生は、9~36%であると見積られる。対照的に、ASAの一般集団における伝播は、およそ0~2%である。抗精子抗体は、精子運動性、子宮頸粘液の精子浸透、受精能獲得または先体を阻害することによって受精能を欠損させると考えられ、または抗精子抗体は、補体カスケードを惹起して、精子の溶解をもたらす得る。

【0004】

免疫学的不妊の背後の機構の完全な理解ならびに改善された診断および処置は、機能的に関連する精子抗体の産生を惹起し得る特定の精子抗原の同定の知識に依存する。例えば、組換え精子表面抗原が入手可能である場合、その抗原は、不妊を媒介する特定の抗体の存在を検出する、患者血清の免疫アッセイについての標的として働き得る。さらに、抗精子抗体およびその同族抗体は、産児制限ワクチンの形態で、不妊の免疫学的制御についての基礎を提供し得る。

【0005】

いくつかの研究は、免疫ブロット技術を用いて、不妊個体からの、全身性および/または局所性の自己抗体およびイソ抗体 (i s o a n t i b o d y) によって認識される精子抗原の同定を報告した。しかし、ほとんどの場合、精子抗原と、妊性個体からの制御血清との反応が記載されておらず、これらの抗体の受精能における機能的関連性は、不明なままである。さらに、より初期の報告のほとんどは、精子タンパク質の分離について一次元ゲル電気泳動を使用していた。

【0006】

本発明は、高解像度の2D電気泳動によって同定されたタンパク質に関する。この精子抗原は、等電点フォーカシングまたは非平衡pH勾配電気泳動のいずれかによって第一次元で分離し(酸性および塩基性のタンパク質をスクリーニングする)続いてPAGEおよび感受性ウェスタンブロット法を行う。さらに、検体血清は、免疫ビーズ試験 (I B T、Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D., Jagiello G and Vogel H (編), Bioregulators of reproduction, academic press, New York 1981:521-527に記載されるとおり) によって抗精子抗体の存在について最初にスクリーニングし、そして抗精子抗体の存在について有意な反応性を示す血清のみを利用して、免疫優性抗原を同定した。さらに、不妊患者に独特な精子抗原を、2D免疫ブロットのコンピュータ比較を用いて臨床的に不妊の被験体からの血清によって認識される抗原を除外することによって同定した。銀染されたタンパク質の2Dゲル画像のデータベース(精子プロテオーム)およびベクトル的に標識された精子表面タンパク質のデータベース(精子表面インデックス、Biol Reprod 1997;56:771-787)は、抗体媒介性の不妊に関連する、精子表面抗原のサブセットの定義を可能にした。

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、不妊に関連する手順における治療組成物および診断組成物ならびにそれらの組成物を用いる方法に関する。本発明の組成物は、不妊の雄性および雌性の血清において存在する抗精子抗体によって認識される精子細胞表面抗原を含

む。本発明はさらに、治療組成物ならびに診断および治療の方法に関する。これらには、不妊を調節する（すなわち、阻害または促進する）組成物および方法が含まれる。

【0008】

（発明の詳細な説明）

本発明を説明および請求するにおいて、以下の用語を、以下に示す定義に従って用いる。

【0009】

本明細書において用いられる「核酸」、「DNA」および類似の用語はまた、核酸アナログ（すなわち、ホスホジエステル骨格以外のものを有するアナログ）を包含する。例えば、いわゆる「ペプチド核酸」（これは、当該分野において知られ、そして骨格にホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を有する）は、本発明の範囲内にあるとみなす。

【0010】

本明細書において用いられる「有効量」とは、選択された効果を生成するに十分な量を意味する。例えば、精子表面タンパク質の有効免疫量とは、ワクチン調製物が投与される宿主において免疫応答が誘発されるに十分な量である。

【0011】

本明細書において記載される用語「薬学的に受容可能な」とは、連邦政府もしくは国の政府の規制当局によって承認されるか、または米国薬局方もしくは動物における（より詳細にはヒト）における使用について他の一般に認識される薬局方に記載されることを意味する。

【0012】

本明細書において用いられる用語「キャリア」とは、希釈剤、アジュバント、賦型剤またはビヒクルであって、それとともに治療剤が投与されるものをいう。

【0013】

本発明は、不妊患者から単離された血清によって認識されるが、臨床的に妊性被験体から単離された血清によっては認識されない精子表面抗原に関する。本発明の精子抗原は、不妊患者に独特であり、そしてコンピュータ生成された、2D

免疫プロットの比較を用いて、臨床的に不妊被験体からの血清によって認識された抗原を除外することによって同定された。銀染されたタンパク質の2Dゲル画像のデータベース(精子プロテオーム)およびベクトル的に標識された精子表面タンパク質のデータベース(精子表面インデックス、*Biol Reprod* 1997; 56: 771-787)は、抗体媒介性の不妊に関連する、精子表面抗原のサブセットの定義を可能にした。これらの同定された精子表面タンパク質を、本明細書において、SSPと遺伝子的に称し、そして単離された天然のタンパク質およびそのフラグメントならびにネイティブタンパク質の組換え誘導体および合成アナログを包含する。

【0014】

SSPタンパク質、そのポリペプチドおよびペプチドフラグメントは、種々の用途のために調製され得る。例えば、そのような分子は、抗体の生成のため、診断および治療アッセイにおいて使用するため、精子運動性に関する他の精子遺伝子産物の同定のため、または精子運動性を調節する化合物の同定のために使用され得る。

【0015】

本発明の1つの実施形態は、精子表面ペプチドエピトープおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物に関する。この薬学的キャリアは、滅菌液体(例えば、水および油(石油、動物、植物または合成起源の油(例えば、ピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など)ならびに緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、滅菌等張性水性緩衝液を含む)ならびにそれらの組合せ)であり得る。水は、その薬学的組成物が静脈内に投与されるときには好ましいキャリアである。生理食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、液体キャリアとして、特に注射可能な溶液のために使用され得る。

【0016】

本発明の組成物において使用するための適切な薬学的賦型剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク(chalk)、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、一ステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピ

レン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望される場合、その組成物はまた、微量の湿潤剤または乳化剤、あるいはpH緩衝化剤を含み得る。これらの組成物は、溶液、懸濁物、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、散剤、徐放性処方物などの形態を採り得る。この組成物は、伝統的な結合材およびキャリア（例えば、トリグリセリド）とともに、坐剤として処方され得る。経口処方物としては、以下のような標準的なキャリアが挙げられ得る：薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど。適切な薬学的キャリアの例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」E. W. Martin編に記載される。そのような組成物は、治療的有効量の治療剤（好ましくは精製形態の）を、適切な量のキャリアとともに含み、その結果、その患者へ適切な投与のための形態を提供する。その処方物は、投与形態に適切であるべきである。

【0017】

1つの実施形態に従って、本発明の組成物を含むSSPを使用して、哺乳動物種における受精能を調節する。この方法は、治療的有効量のSSP抗原を含む組成物を投与する工程を包含する。1つの好ましい実施形態において、その組成物は、1つ以上のSSP（またはSSPタンパク質フラグメントあるいはそれらのアナログ）を含む避妊ワクチンとして処方され、そして哺乳動物種へ投与されて免疫応答を惹起する。

【0018】

1つの実施形態において、SSP含有組成物を使用して、有効量の精子表面タンパク質もしくはそのフラグメントを投与することによって、受精能関連障害について被験体を処置する。特に、本発明のSSP組成物は、免疫学的不妊を処置するための方法において使用され得る。この方法は、免疫学的不妊を示す個体から血清サンプルを入手する工程、その個体血清に存在する抗体によって標的化される精子表面タンパク質を決定する工程、およびその個体の抗体によって標的化される、1つ以上のペプチド（またはペプチド誘導體もしくはペプチド模倣物）を含む組成物を投与する工程を包含する。1つの実施形態において、その組成物

は、雌性に局所的に投与されて、その個体の抗精子抗体に結合し、そして従って、その雌性の受精能を増強する。

【0019】

別の実施形態に従って、本発明のSSPを使用して、表面タンパク質に結合する分子を含む、精子表面タンパク質と相互作用する分子についてスクリーニングし得る。この方法は、1つ以上の分子と、その精子特異的タンパク質/ペプチドとを、その精子特異的タンパク質/ペプチドとその分子との間の複合体形成を実施可能な条件下で接触させる工程、ならびにその精子表面タンパク質/ペプチドに特異的に結合する分子を回収する工程を包含する。

【0020】

1つの実施形態に従って、本発明は、ポリペプチドならびにそのそれぞれのフラグメントおよびアナログであって、少なくとも以下の1つの活性を有するものを提供する：精子が卵と受精する能力を調節し得ること、精子マーカーとして機能すること、不妊個体から単離された血清と結合する能力を有すること、および免疫原性であること。1つの好ましい実施形態において、精子表面タンパク質は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むヒトタンパク質である：

I l e A s n S e r G l n T r p V a l V a l P r o L e u
A r g (配列番号1) ;

L e u A s n S e r G l n T r p V a l V a l P r o L e u
A r g (配列番号2) ;

M e t V a l A s n I l e M e t I l e I l e I l e A r g (配列番号3) ;

M e t V a l A s n L e u M e t I l e I l e I l e A r g (配列番号4) ;

M e t V a l A s n I l e M e t L e u I l e I l e A r g (配列番号5) ;

M e t V a l A s n I l e M e t I l e L e u I l e A r g (配列番号6) ;

M e t V a l A s n I l e M e t I l e I l e L e u A r g (

配列番号7) ;

Met Val Asn Ile Met Ile Leu Leu Arg (

配列番号8) ;

Met Val Asn Ile Met Leu Leu Ile Arg (

配列番号9) ;

Met Val Asn Ile Met Leu Ile Leu Arg (

配列番号10) ;

Met Val Asn Leu Met Leu Ile Ile Arg (

配列番号11) ;

Met Val Asn Leu Met Leu Ile Ile Arg (

配列番号12) ;

Met Val Asn Leu Met Ile Leu Ile Arg (

配列番号13) ;

Met Val Asn Leu Met Ile Ile Leu Arg (

配列番号14) ;

Met Val Asn Leu Met Ile Leu Leu Arg (

配列番号15) ;

Met Val Asn Leu Met Leu Leu Ile Arg (

配列番号16) ;

Met Val Asn Leu Met Leu Ile Leu Arg (

配列番号17) ;

Met Ile Pro Val Ile Glu (配列番号18) ;

Met Leu Pro Val Ile Glu (配列番号19) ;

Met Ile Pro Val Leu Glu (配列番号20) ;

Met Leu Pro Val Ile Glu (配列番号21) ;

His Gly Gln Ser Ala Glu Tyr Glu Phe (

配列番号22) ; および

Phe Gln Gln Asp Gly Gly Ala Ser (配列番号

23)。

【0021】

本発明の1つの局面において、本発明の精子表面ペプチドエピトープを含む組成物は、避妊ワクチン処方物として投与される。より詳細には、その精子表面ペプチドエピトープは、配列番号1～23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたかまたは組み換えのポリペプチドである。1つの実施形態において、そのエピトープは、配列番号1～23から選択される配列からなるペプチドである。

【0022】

1つの実施形態に従って、本発明は、哺乳動物種における受精能を調節するための方法を提供する。この方法は、単離されたかまたは組み換えのポリペプチドの治療有効量を含む組成物を投与する工程であって、そのポリペプチドは、配列番号1～23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、工程を包含する。

【0023】

あるいは、その組成物は、そのポリペプチドのフラグメントまたはそのポリペプチドを含み得る。このポリペプチドは、配列番号1～23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。1つの実施形態において、その組成物は、配列番号1～23からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる配列を有するペプチドを含む。

【0024】

1つの実施形態において、哺乳動物種における受精能を調節するための組成物は、ポリペプチド抗原を含む。このポリペプチド抗原は、配列番号1および2からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、この組成物は、ポリペプチド抗原を含む。このポリペプチドは、配列番号3～17からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、その組成物は、ポリペプチド抗原を含む。このポリペプチドは、配列番号18～21からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、その組成物は、ポリペプチド抗原を含む。このポリペプチドは、配列番号22のアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、その組成物は、ポリペプチド抗原を含む。このポリペプチドは、配列番号23のアミノ酸配列を含む。

【0025】

本発明はまた、配列番号1～23によって表されるペプチド配列をコードする核酸配列を包含する。これらのペプチドをコードする核酸配列は、当業者に公知の標準的な技術を用いて合成され得る。さらに、これらのアミノ酸配列を含む、全長ポリペプチドをコードする遺伝子配列は、当業者に公知の標準的な技術を用いて哺乳動物ゲノムを含む真核生物ゲノムから単離され得る。好ましい実施形態において、そのSSPをコードする核酸配列は、ヒトゲノムに由来する。

【0026】

本発明のSSPは、天然のタンパク質の誘導体を表すタンパク質（すなわち、上記のアミノ酸配列（配列番号1～23を含む）内および/もしくは隣接するアミノ酸残基の、内部欠失を含む欠失、融合タンパク質を生じる付加を含む付加、または置換（「サイレント」変化を生じ、その変化が機能的に等価なペプチドを生成する））を含むタンパク質）を含み得る。アミノ酸置換は、関連する残基の、極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性の性質における類似性に基いて作製され得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、以下が挙げられる：アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニン；極性中性アミノ酸としては以下が挙げられる：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミン；正に荷電した（塩基性）アミノ酸としては以下が挙げられる：アルギニン、リジンおよびヒスチジン；ならびに負に荷電した（酸性の）アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。

【0027】

あるいは、機能の変更が所望される場合、欠失または非保存的変更がそのSSPをコードする核酸配列中に操作されて、変更されたSSP遺伝子産物を生成し得る。さらに、そのような変更は、選択された宿主細胞における、発現、規模拡大などのためによりよく適合した産物を生成するために選択され得る。例えば、1つの実施形態において、システイン残基が欠失または別のアミノ酸残基に置換されて、ジスルフィド架橋を除去し得る。別の実施形態において、チロシン残基が欠失または別のアミノ酸残基に置換されて、チロシンリン酸化を除去し得る。

【0028】

SSPタンパク質またはSSPタンパク質の一部（例えば、配列番号1～23のアミノ酸配列）が無関連のタンパク質に融合された融合タンパク質もまた、本発明の範囲内にある。そのようなタンパク質およびペプチドは、配列番号1～23のアミノ酸配列をコードする合成ヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。融合タンパク質としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：SSPタンパク質もしくはペプチドを安定化させ、そしてインビボでの半減期を増強するIgFc融合物；またはその融合タンパク質が細胞膜に固定されること可能にする任意のアミノ酸配列に対する融合物；あるいは酵素、蛍光タンパク質、発光タンパク質またはフラグエピトープタンパク質もしくはペプチドであってマーカー機能を提供するものに対する、SSPタンパク質もしくはペプチドの融合物。

【0029】

本発明のSSPポリペプチドはさらに、以下を含むがそれらに限定されない翻訳後改変を包含し得る：ステアリル化、ミリスチル化、パルミチン化、グリコシル化、アセチル化、およびリン酸化。ネイティブのSSPは、そのような改変を可能にする認識モチーフを有しない場合、当業者は、SSP遺伝子産物を生成するように酵素認識シグナルのようなモチーフをコードするSSP遺伝子ヌクレオチド配列を導入することは、当業者にとって慣用的である。

【0030】

本発明はまた、本明細書において開示されるネイティブタンパク質およびペプチドの配列のペプチドおよびペプチドアナログの合成を包含する。そのようなペプチドまたはそのアナログは、ペプチドおよびペプチドアナログの調製について実質的に任意の当該分野において公知の技術を用いて調製され得る。例えば、そのペプチドは、従来の溶液または固相のペプチド合成を用いて直鎖形態で調製され得、そしてその樹脂から切断され得、続いて精製手順を行う（Creighton, 1983, Protein Structures And Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y.）。本明細書において記載されるペプチドを合成するための適切な手順は当該分野において周知である。合成ペプチドの組成物は、配列決定のアミノ酸

分析によって確認され得る（例えば、エドマン分解手順および質量分析）。

【0031】

さらに、そのペプチドのアナログおよび誘導体は、化学的に合成され得る。本発明のペプチドの各アミノ酸の間の連結は、アミド、置換アミドまたはアミドの等電子配置物であり得る。非古典的アミノ酸またはアミノ酸の化学的アナログがその配列への置換または付加として導入され得る。非古典的なアミノ酸としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：一般的なアミノ酸のD異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 β -Abu、 γ -Abu、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オリニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、(3-アラニン、フルオロ-アミノ酸、デザイナ- (designer) アミノ酸（例えば、 α -メチルアミノ酸、C β -メチルアミノ酸、N α -メチルアミノ酸、およびアミノ酸アナログ一般）。そのアミノ酸は、D（右旋性）またはL（左旋性）であり得る。

【0032】

環化ペプチドは、直鎖状ペプチドの末端へのCys残基の付加によって形成され得る。ジスルフィド結合の形成は、所望される場合、一般的に、緩和な酸化剤の存在下で行われる。化学的酸化剤が使用され得るか、またはその化合物は、これらの結合をもたらすように雰囲気酸素へ単に暴露され得る。種々の方法が公知であり、これらには、例えば、以下によって記載されるものが含まれる：Tam, J. P. ら、1979, Synthesis 955-957; Stewart ら、1984、Solid Phase Peptide Synthesis, 第2巻, Pierce Chemical Company Rockford, IL; Ahmed ら、1975, J. Biol. Chem. 250: 8477-8482; and Pennington ら、1991 Peptides 1990 164-166, Giralt および Andreu, Eds., ESCOM Leiden, The Netherlands。さらなる代替は、以下により記載される：Kamber ら、1980, Helv Chim-

Acta 63:899-915。固体支持体において行われる方法は、以下により記載される: Albericio, 1985, Int. - J. Peptide Protein Res. 26:92-97。これらの任意の方法が、本発明のペプチドにおけるジスルフィド結合を形成するために使用され得る。

【0033】

そのペプチドが遺伝子コードされるアミノ酸(例えば、配列番号1~23)の全体が構成されるか、またはその部分がそのように構成される場合、そのペプチドもしくはその関連部分は、従来の組み換え遺伝子操作技術を用いて合成され得る。組み換え産生のために、そのペプチドの直鎖状形態をコードするポリヌクレオチド配列が合成され得、そして適切な発現ビヒクル(すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳について必要なエレメントを含むベクター、またはRNAウイルスベクターの場合、複製および翻訳に必要なエレメントを含むベクター)中へと挿入され得る。次いで、その発現ビヒクルは、適切な標的細胞へとトランスフェクトされる。この細胞は、そのペプチドを発現する。次いで、使用される発現系に依存して、その発現ペプチドは、当該分野において十分に確立された手順によって単離される。組み換えタンパク質およびペプチドの産生のための方法は、当該分野において周知である(例えば、以下を参照のこと: Maniatisら, 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; および Ausubelら, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY)。本明細書における開示に基づくアンタゴニスト性ペプチドをコードさせるために、ネイティブ配列に対してコドン置換を導入するための方法は、当業者に周知である。SSP遺伝子産物、そのペプチドフラグメントおよびその融合タンパク質は、当該分野における周知の技術を用いた組み換えDNA技術によって産生され得る。

【0034】

1つの実施形態に従って、本発明のSSPは、精子表面タンパク質に対して指

向される抗体の存在に関連する受精能に関連する障害の存在、またはその障害を発症することについての素因について、診断またはスクリーニングする方法において使用される。より詳細には、1つの実施形態において、その方法を使用して、配列番号1～23から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対する抗体の存在を検出することによって免疫学的な不妊について、診断またはスクリーニングする。この方法は、個体から血液サンプルを入手する工程、その血清を単離する工程、その血清サンプルに、精子表面抗原を含む組成物を接触させる工程、ならびにその精子表面抗原に特異的に結合する、血清サンプルにおける抗体の存在を決定する工程を包含する。そのような抗体の存在は、受精能に関連する障害の素因の存在を示す。

【0035】

精子表面抗原に対して特異的に結合する血清サンプルにおける抗体の検出は、当業者に公知の標準的な技術（例えば、移動度シフトアッセイおよび標識された成分の使用）を用いて実施され得る。例えば、そのSSPは、不活性の固体支持体に共有結合され得、そしてそのサンプル血清に接触され得る。次いで、そのSSPを洗浄して任意の未結合および非特異的に結合した血清成分を除去する。次いで、そのSSPに、その血清サンプルを提供した生物の抗体に対して特異的な標識された二次抗体（すなわち、その血清サンプルがヒトである場合、その表紙期された二次抗体は、抗ヒト抗体である）を接触させる。

【0036】

SSPは、種々の固体支持体（例えば、アガロース、Sephacrose、ポリスチレンまたは他のクロマトグラフィービーズ）に、当業者に利用可能なプロトコルを用いて結合され得る。例えば、一級アミンが、NHS、シアノゲンブロミド活性化樹脂またはマレイミド活性化樹脂に結合され得る。これらの樹脂の多くは、市販されている（例えば、Pharmacia Corporationの活性化Sephacrose）。あるいは、SSPは、そのカルボン酸残基を通じて、例えば、市販の樹脂Pharmacia EAH-活性化Sephacroseによって連結される。

【0037】

本発明の1つの実施形態に従って、本発明の精子表面タンパク質は、ヒトおよび非ヒト動物におけるワクチンとして使用される。より詳細には、本発明は、避妊のためのSSPベースのワクチンの使用を含む。本発明の1つの局面において、SSPは、被験体に対して送達されて、能動的免疫応答を惹起し、受胎の一時的または反転のアンタゴニストとして作用し得る。例えば、そのようなワクチンは、被験体の能動的免疫のために使用されて、卵への精子の運動性もしくはアクセスを一過的にブロックする抗体応答を惹起し得る。本発明の1つの局面において、抗原は、月の特定の期間で、例えば、排卵期の間に投与されて、雌性被験体の抗精子抗体力価を惹起して受精能をブロックし得る。

【0038】

本発明の別の実施形態において、SSPは、被験体の恒久的不妊化のためのワクチンとして有用である。そのようなワクチンを使用して、不可逆的不妊化のための方法として有用である、精子細胞に対するT細胞媒介性攻撃を惹起し得る。T細胞特異的応答を生成するための方法（例えば、養子免疫治療）は、当該分野において周知である（例えば、以下を参照のこと：Vaccine Design, Michael F. Powell and Mark J. Newman Eds., Plenum Press, New York, 1995, pp 847 - 867）。そのような技術は、獣医学的避妊または不妊化の目的のために特に有用であり得る。この場合、単回投与ワクチン接種が所望され得る。

【0039】

精子表面タンパク質抗原は、大量に生産され得、そしてワクチン調製物における使用のために精製され得る。本発明のその精子表面タンパク質はまた、免疫アッセイにおける以下の有用性を有する：例えば、その抗原のための抗体の存在を、ワクチン接種された被験体からの体液のサンプルにおいて検出もしくは測定すること、ならびに従って、その被験体の免疫応答を診断および/またはモニターすること、続いてワクチン接種をすること。免疫原性ポリペプチドを、活性成分として含むワクチンの調製物は、当業者に公知である（例えば、以下を参照のこと：Vaccine Design, Michael F. Powell and Mark J. Newman Eds., Plenum Press, Ne

w York, 1995, pp 821-902)。

【0040】

精子表面タンパク質抗原の免疫賦活性は、免疫後の試験動物における免疫応答を精子表面タンパク質抗原を用いてモニターすること、または当該分野において公知の任意の免疫アッセイの使用によって、決定され得る。体液性(抗体)応答の生成および/または細胞媒介製糶液の生成は、免疫応答の指標として採用され得る。試験動物としては、マウス、ハムスター、イヌ、ネコ、サル、ウサギ、チンパンジー等が挙げられ得、そして最終的にヒト被験体であり得る。

【0041】

ワクチンを導入する方法は、経口、腔内、皮内(intradennal)、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻内、および乱切を介すること(皮膚の上層を通すようにひっかくこと(例えば、分岐(bifurcated)針を用いる)、あるいは任意の他の標準的な免疫の標準的な経路を含み得る。試験被験体の免疫応答は、以下のような種々のアプローチによって分析され得る: 卵タンパク質抗原に対する得られた免疫血清の応答性(これは、以下の公知の技術によってアッセイされる: 例えば、免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫プロット、放射性免疫沈降など、または卵タンパク質抗原が抗原性もしくは免疫原性を提示する場合、免役された宿主における受精能に対する免役された宿主の保護による)。

【0042】

精子表面タンパク質ワクチンの適切な動物試験の一例として、本発明のワクチンは、精子表面タンパク質抗原に対する抗体応答を惹起する能力についてウサギにおいて試験され得る。雄性特異的病原体皮含有(SPF)若年成体New Zealand Whiteウサギが使用され得る。この試験群は各々、固定された濃度のワクチンを受ける。コントロール群は、精子表面タンパク質抗原のない1 mM Tris-HCl pH 9.0の注射を受ける。

【0043】

血液サンプルは、1または2週間ごとにそのウサギから採取され得、そして血清が精子表面タンパク質に対する抗体について分析され得る。この抗原に対して特異的な抗体の存在は、例えば、ELISAを用いてアッセイされ得る。本発明

のワクチンの有効用量（免疫量）は、動物モデル試験系に由来する用量応答曲線から外挿され得る。

【0044】

そのようなワクチンの適切な調製物としては、注射可能物（液体溶液または懸濁物のいずれかとして）；注射内の液体、その中の懸濁物またはその前の液体に適切な固体形態もまた、調製され得る。この調製物はまた、乳化され得るか、またはそのポリペプチドは、リポソーム中にカプセル化され得る。活性な免疫原性成分は、しばしば、賦型剤と混合される。この賦型剤は、活性成分に対して薬学的に受容可能かつ適合性である。適切な賦型剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどおよびそれらの組合せである。さらに、所望される場合、そのワクチン調製物はまた、微量の補助物質（例えば、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝化剤、および/またはアジュバントであって、ワクチンの効力を増強するもの）を含み得る。

【0045】

有効であり得るアジュバントの例としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：水酸化アルミニウム、N - アセチル - ムラミル - L - スレオニル - D - イソグルタミン (t h r、M D P)、N - アセチル - ノル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - アラニン - 2 - (1 ' - 2 ' - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ) - エチルアミン、ならびにリゾレシチン、プルロニックポリオールのような表面活性化物質；ポリアニオン；ペプチド；油エマルジョン；ミョウバン；およびM D P。アジュバントの抗力は、卵表面タンパク質ポリペプチドエピトープを含む免疫原性ポリペプチドに対して指向される抗体の誘導を測定することによって決定され得る。この抗体は、ワクチンにおけるこのポリペプチドの投与から生じる。このワクチンはまた、種々のアジュバントから構成される。

【0046】

この免疫原は、配列番号1～23のアミノ酸配列を含む1つ以上のポリペプチ

ドを含み得る。さらに、その免疫原はまたリポソーム中へと取り込まれ得、またはワクチン処方物中における使用のためのポリサッカリドおよび/もしくは他のポリマーと結合体化され得る。組み換え抗原がハプテン(すなわち、同族抗体に選択的に反応し得るということにおいて抗原性であるが、それが免疫応答を惹起し得ないという点で免疫原性ではない分子)である場合において、そのハプテンは、キャリアに共有結合され得るか、または免疫原性分子であり得る;例えば、血清アルブミンのような大タンパク質は、それに対して結合したハプテンに対する免疫原性を付与する。ハプテンキャリアは、ワクチンとしての使用について処方され得る。

【0047】

そのポリペプチドは、中性または塩の血清へと処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、以下が挙げられる:酸付加塩(ペプチドの有利アミノ基とともに形成される)、および無機酸(例えば、塩酸もしくはリン酸)または有機酸(例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、リンゴ酸など)と形成される酸付加塩。遊離カルボキシ基と形成される塩はまた、無機塩基(例えば、リン酸ナトリウム、アンモニウム、カルシウム、または塩化鉄(III))、および有機塩基(例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど)に由来し得る。

【0048】

本発明のワクチンは、多価または一価であり得る。多価ワクチンは、1つを超える抗原の発現を指向させる組み換えウイルスから作製される。そのワクチンが投与される患者は、好ましくは、哺乳動物であり、そして好ましくはヒトであるが、以下を含むがそれらに限定されない非ヒト動物でもあり得る:ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、鳥類(例えば、ニワトリ)、ヤギ、ネコ、イヌ、ハムスター、マウスおよびラット。

【0049】

本発明のワクチン処方物は、有効免疫量の精子表面タンパク質および薬学的に受容可能なキャリアを含む。ワクチン調製物は、有効免疫量の1つ以上の抗原および薬学的に受容可能なキャリアを含む。このキャリアは、好ましくは無菌であ

る。その組成物はまた、所望される場合、微量の湿潤剤または乳化剤、あるいはpH緩衝化剤を含み得る。この組成物は、液体溶液、懸濁物、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性処方物または散剤であり得る。経口処方物は、標準的なキャリア（例えば、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど）を含み得る。その処方物は、投与形態に適切であるべきである。

【0050】

一般に、その成分は、単位投薬量形態（例えば、活性薬剤の量を示すアンプルまたはサシェのような密封封入された容器中の乾燥凍結乾燥粉末または無水濃縮物）で別個にまたはともに混合されるかのいずれかで供給される。その組成物が注射で投与される場合、滅菌希釈物のアンプルが提供され得、その結果、その内容物は、投与の前に混合され得る。本発明はまた、本発明のワクチン処方物の1つ以上の成分を含む1つ以上の容器を含む、薬学的パックまたはキットを提供する。

【0051】

本発明の1つの局面は、SSPに結合する抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）に関する。特に、配列番号1～23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに免疫特異的に結合するこれらの抗体。1つの好ましい実施形態においてこの抗体は、モノクローナル抗体である。本発明のSSP抗原に対して生成された抗体は、授精に対するワクチン接種、不妊、診断免疫アッセイ、受動免疫アッセイおよび抗イデオタイプ抗体の生成における潜在的使用を有する。従って、本発明は、薬学的に受容可能なキャリアおよび抗精子表面タンパク質抗体の、授精を阻害するに十分な量を含む薬学的組成物を包含する。免疫手順において、しようされる免疫減の量および免疫スケジュールは、当業者によって決定され、そして被験体の免疫応答および抗体力価を参酌することによって投与される。

【0052】

1つの実施形態に従って、避妊抗血清を調製するための方法が提供される。ここで、この抗血清は、精子表面抗原に対する抗体を含む。好ましい実施形態にお

いて、その精子表面抗原は、雄性配偶子、より詳細には精子に特有のタンパク質である。この方法は、精子表面タンパク質またはその免疫原性フラグメントで動物を免疫する工程、その免疫された動物から血清サンプルを入手する工程、血清表面タンパク質（またはその免疫原性フラグメント）に結合する能力についてその血清をスクリーニングする工程、およびその精子表面タンパク質に結合するその能力に基づいて血清を回収する工程、を包含する。得られる血清は、ポリクローナル抗体を含み得、または1つ以上のモノクローナル抗体を含み得る。あるいは、抗体スクリーニング細胞は、免疫された動物から入手され得、そしてそれらの細胞は、不死化され得、そして標準的な技術を用いて精子表面タンパク質に結合する抗体を分泌する細胞についてスクリーニングされ得る。精子表面タンパク質に結合する抗体を分泌する細胞が単離され得、そしてこれを用いて抗体を産生し得る。

【0053】

生成された抗体は、当該分野において公知の標準的な技術（例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィー、遠心分離、沈降など）によって単離され得、そして診断免疫アッセイにおいて用いられ得る。これらの抗体を用いて処置および/または疾患進行をモニターし得る。当該分野において公知の免疫アッセイ系は、以下を含むがそれらに限定されないこの目的のために用いられ得る：以下のような技術を用いる競合性アッセイおよび非競合性アッセイ：放射免疫アッセイ、ELISA（酵素連結免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、沈降素反応、ゲル核酸沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射測定アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイおよび免疫電気泳動アッセイ。

【0054】

本発明のワクチン処方物はまた、受動免疫治療における使用のための抗体を産生するために用いられ得る。ここで、宿主の短期保護は、異種生物に対して思考される予備形成された抗体の投与によって達成され得る。

【0055】

本発明のワクチン処方物によって産生された抗体はまた、抗イディオタイプ抗

体の産生において使用され得る。次いで、この抗イテオタイプ抗体は、免疫のために使用されて、病原体微生物の初期抗原に結合する抗体亜集団を産生し得る (Jerne, 1974, Ann Immunol. (paris) 125c : 373; Jerne, ら, 1982, EMBO J. 1: 234)。

【0056】

種々の送達系が公知であり、そしてそれを使用して本発明の治療剤を投与し得る (例えば、リポソーム、微粒子、微小カプセル中へのカプセル化、その治療剤を発現し得る組換え細胞、レトロウイルスもしくは他のベクターの部分としての治療剤核酸の構築物など)。導入の方法は以下を含むがそれらに限定されない：皮内、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外、および経口の経路。この化合物は、例えば、注射またはポラス注射により、上皮裏打ちまたは粘膜裏打ち (例えば、経口粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など) を通じた吸収により、任意の簡便な経路によって投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤とともに投与され得る。投与は、全身性または局所性であり得る。肺投与もまた、吸入器またはネブライザ、およびエアゾール化剤を有する処方物の使用によって、用いられ得る

特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物を処置が必要な領域に局所的に投与することが所望され得る。これは、例えば、限定ではなく、局所塗布、注射、カテーテルの手段、坐剤の手段、またはインプラントの手段によって達成され得る。このインプラントは、多孔性、非多孔性またはゼラチン性材料であり、これには、膜 (例えば、シアル性 (sialastic) 膜) または繊維が含まれる。

【0057】

別の実施形態において、その治療剤は、ベシクル、特にリポソーム中で送達され得る (以下を参照のこと: Langer, Science 249: 1527 - 1533 (1990); Treatら, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (編), Liss, New York, pp. 353 - 365 (1989); Lopez -

Berestein, 同上、pp. 317 - 327 ; 一般的に、同上を参照のこと)。

【0058】

さらに別の実施形態において、その治療剤は、制御された放出系で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが使用され得る(以下を参照のこと:Langer, 前出; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwaldら, Surgery 88:507(1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574(1989))。別の実施形態において、重合性材料が使用され得る(以下を参照のこと: Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(編), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen およびBall(編), Wiley, New York(1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61(1983); 以下もまた参照のこと: Levyら, Science 228:190(1985); Duringら, Ann. Neurol. 25:351(1989); Howardら, J. Neurosurg. 71:105(1989))。さらに別の実施形態において、制御された放出系が、治療標的の近傍、すなわち精巣に配置され得る。従って、全身性容量の一部のみが必要となる(例えば、以下を参照のこと: Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, 前出, vol. 2, pp. 115 - 138)。

【0059】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、治療有効量の治療剤、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。好ましい実施形態において、その組成物は、ヒトへの静脈投与のために適合された薬学的組成物として

、慣用手段に従って処方される。代表的に、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張性水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、この組成物はまた、可溶化剤および局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含んで、その注射の部位での疼痛を緩和する。一般に、成分は、別個または単位投薬量形態（例えば、活性薬剤の量を示す、アンプルまたはサシェのような密封封入容器中の乾燥凍結乾燥粉末または無水濃縮物）と一緒に混合して供給される。その組成物が注入により投与されるべきとき、滅菌薬学的等級の水または生理食塩水を含む注入瓶を用いて分配され得る。その組成物が注射によって投与される場合、注射のための滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得、その結果、その成分は、投与前に混合され得る。

【0060】

特定の処置または状態において有効である本発明の治療剤の量は、その障害または状態の性質に依存する。そして、それは、標準的な臨床的技術によって決定され得る。さらに、インビトロアッセイが、必要に応じて使用されて、最適な投薬量範囲が同定されるに役立ち得る。処方物において使用されるべき正確な用量は、投与の経路に依存し、そして担当医の判断および各患者の環境に従って判定されるべきである。しかし、静脈投与のための適切な投薬量範囲は、一般に、1 kg 体重あたり、20 ~ 500 μ g の活性成分である。坐剤は一般に、0.5 重量% ~ 10 重量% の範囲内の活性成分を含む；経口処方物は、好ましくは10% ~ 95% の活性成分を含む。鼻内投与のための適切な投薬量範囲は、約0.01 μ g / kg 体重 ~ 1 mg / kg 体重である。有効用量は、インビトロまたは動物モデルの試験系から誘導される用量応答曲線から外挿され得る。

【0061】

（実施例1）

（材料）

（ヒト血清）

血清を、「説明がつかない」不妊を有する不妊の男性および女性から得た。不妊の被験体は彼らの不妊について、以前に診断されたホルモン性、感染性、または理学的な原因を何ら有しなかった。男性被験体は、精管切除を受けていなかった。

た。

【0062】

(免疫ビーズ結合)

不妊女性患者の血清における抗精子抗体を、以下に記載されるように、間接的な免疫ビーズ結合によって検出した: Manual of clinical laboratory immunology, 第4版, American society for microbiology, Washington, D. C. 1992; 1013 - 1017。男性患者の精子に結合した抗精子抗体を、直接免疫ビーズ結合によって検出した。すべての血清および血清サンプルを、IgG、IgMおよびIgA特異的な抗精子抗体の存在について試験し、そして18人の不妊男性被験体、9人の不妊女性被験体、5人の妊性男性被験体および5人の妊性女性被験体を含ませた。

【0063】

(ウェスタンブロット分析のための血清を選択するための基準)

高IBTスコア(すなわち、60%を超える精子がビーズに結合することが観察され、これは、IgGおよび/またはIgM特異的な抗精子抗体の指標である)に基づいてさらなる研究のための血清を選択した。選択されたすべての血清は、精子ヘッドまたは精子全体に対して指向される抗体を含んでいた。ウェスタンブロット分析のために合計15の精子サンプルを不妊男性について選択し、6つの血清サンプルを不妊女性から選択した。

【0064】

(精子抗原の調製)

精液検体を、正常な精子品質を有する妊性ドナーから得た。正常な精液特性を有する射精液のみを、本研究で用いた。精液の液化の後、成熟した精子を精漿(seminal plasma)、未熟な生殖系細胞および非精子細胞(主に白血球および上皮細胞)からPercoll(Pharrnacia Biotech, Uppsala, Sweden)密度遠心分離(以下により記載される: Naaby-Hansenら(Biol Reprod 1997; 56: 771 - 787))によって分離した。最後の遠心分離の前に、その細胞を計数し、

そしてすべてのサンプルは、90%を超える運動性を示した。8~12の個体から得られた精子をプールし、そしてさらなる使用まで即座に凍結した。すべてのサンプルを、University of Virginia Human Investigation Committeeによって承認された形式を用いてインフォームドコンセントのもとに入手した。

【0065】

(放射性ヨウ素化)

放射性ヨウ素化を、Naaby-Hansenら、(Biol Reprod 1997; 56: 771-787)によって適合させられそして標準化された手順に従って行った。パーコール(percoll)で精製した精子を、 20×10^6 個/mlの最終濃度に、Ham's F-10培地中に懸濁した。洗浄したヨウ素ビーズ(Pierce Chemical Co., Rockford, IL) (8×10^6 個の精子あたりに1個のビーズ)およびキャリアを有さない $^{125}\text{I}-\text{Na}$ ($10 \mu\text{Ci} / 10^6$ 個の精子)を、サンプルに添加した。放射性標識は、サンプルを振盪しているテーブル上で20で10分間、インキュベートすることによって行った。細胞を、ピペティングによってヨウ素-ビーズから取り除き、そしてすぐに第2回目のパーコール密度勾配遠心分離に供した。その後、Ham's F-10培地中で3回洗浄した。本明細書中で研究した「表面」タンパク質は、主に、射精された精子上の外部標識に接近可能である、血漿膜タンパク質である。これらは、使用する調製方法に従って、アクロソーム反応を受けないほぼ完全な細胞から構成される。細胞を、最後の洗浄の前に計数し、そして得られたペレットを精子タンパク質の抽出のために使用した。オートラジオグラフィを、以下の順で成分のサンドイッチを使用して行った：増感スクリーン、プロット、2層のフィルム、および増感スクリーン。X線フィルムは、通常3週間暴露した。

【0066】

(可溶化手順)

精子を、100mMのジチオスレイトール(DTT)、尿素(9.8M)、およびプロテアーゼインヒビター(2mMのPMSF、5mMのヨードアセトアミ

ド、5 mMのEDTA、3 mg/mlのL-1-クロル-3-(4-トシルアミド)-7-アミノ-2-ヘプタノン-ハイドロクロライド(TLCK)、1.46 mMのペプスタチンA、および2.1 mMのロイペプチン)を含有している2%のオクチル-β-D-グルコ-ピラノシド(OBG)を含有している溶解緩衝液中に可溶化させた。1 mlあたり 5×10^8 個の細胞を、4℃で45分間絶えず振盪することによって可溶化させた。不溶性の物質を、 $10,000 \times g$ で2分間の遠心分離によって除去し、そして上清を、一次元電気泳動に供した。

【0067】

(電気泳動)

等電点電気泳動を、以前に記載されているようなゲル組成物(Naaby-Hansenら、*Biol Reprod* 1997;56:771-787)を使用して行った。キャリアアンホリン(ampholine)組成物は、20%のpH5~7、20%のpH7~9、および60%のpH3.5~10であった。65 μlの精子抽出物(約0.15 mgのタンパク質)を、1本のロッド当りに適用した。チューブを、5%のNP-40、1%のアンホリン(pH3.5~10)、8 Mの尿素、および100 mMのDTTを含有している緩衝液を用いてサンプルを穏やかに重層することによって満たした。等電点電気泳動を、段階的な電圧を使用して全部で17,700ボルト-hで行った: 200 vで2時間、500 vで5時間、800 vで11時間、そして2000ボルトで3時間。

【0068】

非平衡pH勾配電気泳動(NEPHGE)を、Celisら、*Electrophoresis*、1992;13:893-959)およびNaaby-Hansenら(*Biol Reprod* 1997;56:771-787)によって記載されているゲル組成物を使用して、14×0.15 cmのアクリルアミドロッド中で行った。キャリアアンホリン組成物は、13% pH3.5~10、37% pH5~8、13% pH6.5~9、そして37% pH8~10.5であった。55 μl(約0.13 mgのタンパク質)の精子抽出物を1つのロッド当りに適用した。電気泳動を、400ボルトで5時間、そして550ボルトで3時間を使用する、全部で8600ボルト-hで行った。

【0069】

二次元SDS-PAGEを、0.15cmの厚みの、16×16cmのスラブゲル中で、Protean II xi Multi-cell装置(Bio-Rad、Richmond, CA)(Biol Reprod 1997;56:771-787)中で直線状の勾配ゲルを使用して行った(T=9~15%; T=ゲル中のアクリルアミドの濃度)。ニトロセルロース膜への電気的な移動を、Biol Reprod 1997;56:771-787に記載されているように行った。

【0070】

(イムノブロットング分析)

2-Dで分離したポリペプチドの電気的な移動の後、膜をPBS(pH7.4)中で5分間、2回リンスし、そして過剰な結合部位を、5%の粉ミルクおよび0.05%のTween20を含有しているPBS(pH7.4)中で室温で1時間インキュベーションすることによってブロックした。プロットを、絶えずゆっくりとした振盪下で、4℃で一晩、1:2000希釈の血清とともにインキュベートした。いくつかの場合においては、所定のプロットを、1つ以上の血清とともにインキュベートした。これらの例においては、プロットを、第1の血清との4℃で一晩のインキュベーション後に、0.05%のTween20を含有しているPBS(pH7.4)中で洗浄し、そして上記と同じ条件下で別の血清とともにインキュベートした。不妊男性に由来する15個の血清を分析し、そして不妊女性に由来する6個の血清を分析した。これらは、IBTによって示されているような抗精子抗体を含んだ。二次酵素結合抗体(Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA)(ヤギ抗ヒトIgG+IgM)を、0.05%のTween20を含有しているPBS中で1:5000に希釈し、そしてプロットを20℃で1時間インキュベートした。二次抗体は単独では、プロットされたヒトの精子タンパク質に結合しなかった(データは示さない)。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を、製造業者のプロトコール(Amersham Corp., U.K.)を使用して増強された化学発光(ECL)によって可視化した。

【0071】

(スキャンおよびコンピューター分析)

化学発光調製物によるX線フィルムおよび放射性ヨウ素化実験によるオートラジオグラムを、Kodakカメラ(Eastman Kodak, Rochester, NY)を用いてスキャンした。得られた2-D画像を、Bio Image「2D分析装置」バージョン6.1(Bio Image, Ann Arbor, MI)を使用して分析した。このソフトウェアは、2Dゲルによって分離されたタンパク質のスポットの同定、定量、および比較を自動的に行う。両方の性別の妊性の被験体によって認識された凝集タンパク質のスポットを示している複合画像を、参照点または「アンカー」としてそれぞれの画像について共通であるタンパク質のスポットを使用することによって、妊性の男性および女性の個体に対応する、ECLプロットのコンピュータースキャン画像を適合させた後に得た。アンカーは、電気泳動の移動度、タンパク質のスポットの座位、およびスポットの形状に基づいて選択した。不妊の被験体によって認識されたタンパク質のスポットから妊性の被験体によって認識されたタンパク質のスポットを引き算するために、分離されたタンパク質のスポットの得られた複合画像を比較し、そして不妊の男性および女性のグループに対応する画像と適合させた。このようにして、不妊の被験体によって特有に認識される主要な自己抗原およびイソ抗原を同定する。

【0072】

精子の表面タンパク質(精子の表面のエンサイクロペディア)のデータベースを、表面の放射性ヨウ素化後に得られたオートラジオグラムの適合に従って作製した。一貫して標識されたこれらのスポットのみを含むように、注意を払った。自己抗原およびイソ抗原を含むコンピューターによって作製された画像を、表面の自己抗原およびイソ抗原を同定するために、精子の表面のエンサイクロペディアと適合させた。

【0073】

(結果)

実験した全ての不妊の血清(15人の男性および6人の女性)は、IgGおよ

び/またはI g M抗精子抗体を含み、I B T中で60%より多くの精子がビーズに結合した。妊性の個体(5人の男性および5人の女性)に由来する使用したコントロール血清は、I B Tについては陰性であり、10%未満の精子が免疫ビーズによって結合された。

【0074】

非イオン性界面活性剤/尿素で可溶化したヒトの精子のタンパク質の銀染色2-Dゲル(16×15cm)によって、I E F / P A G EおよびN E P H G E / P A G Eによる1300より多くのタンパク質のスポットが決定された。これらのゲルは、10人の個体の精子のプールから得られたタンパク質のスポットのレパートリーを示す。タンパク質のパターンは、再現性が高いが、ドナーの間の少ないバリエーションが、相対的な豊富さおよび同じタンパク質の電荷に関して観察された(これらは、個々のサンプルをコンピューター分析によって比較した場合に、変化することが見出された)。主要なタンパク質のスポットのいくつかの同一性を、個々のスポットを微量配列決定することによって、または特異的なタンパク質に対する抗血清を用いたイムノプロットングによって、同定した。例えば、異なる熱ショックタンパク質のファミリーのメンバーを決定した。これらのタンパク質は、精子の膜上で豊富である。P H - 20(精子のヒアルロニダーゼ)は、膜結合タンパク質であり、3個の53kDaのイソ型によって提示される。主要な細胞質性のタンパク質である、 α -チューブリンおよび β -チューブリンをもまた、ヒトの精子のカルレティキュリンであるとして検出した。

【0075】

I E FまたはN E P H G Eによって決定した精子タンパク質の2Dウェスタンプロットを、妊性の男性被験体に由来する血清を用いて、または不妊男性被験体に由来する血清を用いて、プローブした。不妊の被験体に由来する血清は、妊性の被験体よりもいくつかのスポットに対してより強力な免疫反応性を示したが、強度におけるこのような差異の重要性は、現在は理解されていない。さらに、酸性タンパク質および塩基性タンパク質の両方の中の多数の抗原性スポットが、不妊の血清と反応性であったが、妊性の血清とは反応性ではなかった。同様に、不妊女性の血清でプローブしたウェスタンプロットを妊性の女性の血清と反応性で

あるものと比較することによって、免疫学的な反応性における差異が注目された；不妊の被験体の血清は、より多くの抗原性のスポットを認識し、そしてまた、妊性の女性に由来する血清よりもいくつかのスポットに対して強力な反応性を示した。

【0076】

(酸性抗原の分析)

個々の不妊の血清の分析は、認識された特異的タンパク質の範囲における顕著な可変性を示したが、いくつかの抗原が種々の個体について共通であることもまた実証した。認識された精子抗原の範囲のこの観察は、ヒトの男性における抗精子抗体のレパートリーにおける相当な多様性を暗に意味する。一方、特定の精子抗原についての免疫反応性のパターンにおける類似性にしばしば注目した。コンピューターによる分析、ならびに不妊および妊性の血清と反応したプロットの比較により、約60kDaで4個のタンパク質のスポットが、妊性の被験体によっては認識されないタンパク質のサブセットに属する両方の不妊の個体によって認識されたことを示された。

【0077】

両方の性別に由来する妊性および不妊の血清によって認識された免疫反応性の精子タンパク質のレパートリーの広範囲の外観を、各々のグループの被験体に由来する5個の血清とともに、プロットを連続してインキュベートすることによって得た(図1Aから1D)。不妊の被験体に由来する血清を、それらの高い免疫反応性、免疫反応性における不均質性、および血清の個々のウェスタンプロット分析後の特定のタンパク質スポットの特有の認識に基づいて選択した。図1Aおよび1Bは、5人の妊性の男性(A)および5人の妊性の女性(B)の被験体に由来する血清によって結合された精子タンパク質のレパートリーを示す。妊性の男性(A)および妊性の女性(B)の被験体によって認識された精子抗原の比較によって、2つの性別の間でのレパートリーにおける顕著な全体的な類似性を明らかにしたが、妊性の男性の血清は、妊性の女性の血清よりも多数の抗原を認識した。図1Cおよび1Dは、それぞれ、5人の不妊男性(C)および5人の不妊女性被験体(D)に由来する血清で連続してプローブしたウェスタンプロットを

示す。妊性の患者の血清でプローブしたウェスタンブロットと不妊患者の血清でプローブしたウェスタンブロット(図1のA+B対C+D)の比較は、いくつかの異なる精子抗原が、不妊患者によって認識されたことを示す(矢印)。男性患者によって特有に認識された顕著なタンパク質スポットの分子量は、34 kDa (pI 4.2)、42 kDa (pI 4.3)、88.5 kDa (pI 4.0)、106 kDa (pI 4.2)、41.8 kDa (pI 5.3、pI 5.4、pI 5.5)、61.5 kDa (pI 5.62)、60.4 kDa (pI 5.75)、ならびに60 kDa (pI 6.6および6.7)である。不妊女性によって認識される主要なイソ抗原は、60 kDa (pI 6.2、pI 6.4、pI 5.82、pI 5.88)、32.3 kDa (pI 6.7、pI 6.8、pI 6.85)、および41.2 kDa (pI 5.1)の分子量である。

【0078】

(男性患者の血清と女性患者の血清との間での免疫反応性における変化)

イムノブロットのコンピューター画像分析は、不妊男性患者の血清によっては、全部で310個の抗原が認識され、一方、205個の抗原が不妊女性患者の血清によって認識されたことを示した。この結果は、不妊男性によって示された精子抗原に対する免疫反応性が、おそらく、不妊女性のものよりも高いことを示唆する。さらに、免疫反応性のパターンにおける異なる変化が2つの性別の間で識別可能であり、これらのグループのそれぞれが、タンパク質の異なるセットに対する特異性を示し(図1Cおよび1D)、なお、両方の被験体のグループに対して共通であるタンパク質が注目された。

【0079】

不妊男性のグループによって認識された抗原の全体のレパートリーからの、男性および女性の両方の妊性の被験体によって認識された抗原の、コンピューターを援用する引き算により、86個のタンパク質抗原が明らかとなった。これらは、妊性の被験体と比較して、不妊男性被験体(図2A)だけによって認識された。不妊男性患者だけによって認識されたこれらの86個の抗原のうち、72個が、不妊男性患者の血清に対してのみ特異的であり、そしてこれらは、不妊女性の

血清によっては認識されなかった。2-Dプロットの同様のコンピューターを援用する分析により、不妊女性被験体について特有である26個のタンパク質スポットが生じた(図2B)。これらの抗原のうちの12個が、不妊女性患者に対してのみ特異的であり、そして不妊男性患者によっては認識されなかった。不妊患者の血清(男性および女性の両方)によってのみ認識された精子抗原の中で、14個の抗原が、男性および女性の両方の患者の血清によって共通して認識された(矢印)。

【0080】

(ASA陽性患者によってのみ認識される精子の表面抗原)

図3は、ベクトルによって(vectorially)ヨウ素化した精子タンパク質の2D IEF-PAGEによって得たオートラジオグラムのコンピューターによるスキャンの後で得た、ヒトの精子の表面タンパク質のコンピューターによって作製した複合画像を示す(Biol Reprod 1997;56:771-787)。103個のタンパク質を、この方法によって精子の表面上で同定した。精子の表面タンパク質の複合画像を用いる、精子の自己抗原およびイソ抗原のコンピューターを援用する適合によって、精子表面の自己抗原およびイソ抗原のサブセットの同定を提供した。6個の精子の表面の自己抗原およびイソ抗原の位置を、図3に示す(矢印)。顕著なものは、6.2および6.4のpIを有する2つの60kDaのタンパク質であり、これらは、2つの不妊女性の血清によって認識された。不妊男性の血清によって認識された精子抗原の中の2つの血清は、4.0のpIを有する88.2kDaの精子の表面タンパク質を認識した。2つの血清はまた、両方とも4.2のpIの34kDaおよび38kDaの分子量の2つの精子の表面タンパク質を認識した。表1は、精子表面のイソ抗原および自己抗原の質量およびpIを列挙する。

【0081】

【表1】

表1. 精子表面の自己抗原および異種抗原は同種の患者の血清のIBT結果と相関した。

スポット 番号	型	質量	PI	同種の患者の血清のIBTパターン	
				イソ型特異性	精子/結合/位置の%
1	自己	34.0	4.2	IgG	100%, 全体の精子の表面
2	自己	38.0	4.3	IgG	100%, 全体の精子の表面
3	イ/自己	60.0	6.2	IgG	>90%, 精子の頭部
4	イ/自己	60.0	6.4	IgG	>90%, 精子の頭部
5	自己	88.2	4.0	IgG & IgM	>85%, 精子の頭部
6	自己	140.0	4.2	IgG	100%, 全体の精子の表面

(ウェスタンブロットの結果とIBTの結果との相関関係)

種々の表面ドメインに対する結合についての免疫ビーズ試験において高いスコアを生じたこれらの血清が、ウェスタンブロット上の精子の表面タンパク質を認識するための、2D分析において示された抗体を含んだことに注目することは、興味深かった。表1にはまた、これらの被験体の血清の免疫ビーズパターンをも記載した。これらの血清の各々が、IgGおよび/またはIgM特異的抗体に対するIBT反応性を示した。抗体は、精子の頭部または全体の表面に対して指向された。

【0082】

(考察)

特異的な精子タンパク質が、抗精子抗体陽性の不妊の被験体に由来する血清によって、2-Dゲル上で認識され、そして同定された。これらの抗原はおそらく、免疫不妊を生じることにおいて有意な役割を果たし、そして受精のカスケードの事象において役割を果たし得る。一次元ゲルのウェスタンブロッティングを使用して過去に行われた多くの研究は、抗精子抗体を含有している精子によって認識される精子の抗原の分子量に関して種々の結果を生じた。これらの研究のほとんどは、不妊の個体について行われ、そして妊性のコントロール血清を用いる精

子抗原の反応は、しばしば評価されなかった。さらに、反応性の精子の抗原の分子量に関する矛盾した報告は、精子の抽出手順における変化に起因し得る。本発明においては、二次元電気泳動を、一次元での個々のタンパク質の等電点に基づくタンパク質の分離のため、および二次元での分子量に基づくタンパク質の分離のために使用した。これによって、タンパク質のより良好な解析を提供し得、そしてこれは、微量配列決定に対する前置きとして作用し得る。

【0083】

高解像度の2-Dゲル技術(これは、精子タンパク質の分離に最適である)は、抗精子抗体に対する血清のスクリーニングに適切である。IBTによる精子の表面抗体の存在についての不妊患者に由来する血清の最初のスクリーニングによって、抗精子抗体を含有している血清に対して注意を向けることによって、さらなる焦点を提供した。これらは、凝集、細胞毒性、または精子表面におけるブロッキングの、抗体媒介の事象に関連し、そして従って、不妊に機能的に関連する。

【0084】

個々の血清のイムノプロット分析は、抗精子イムノグロブリンのレパートリーにおいて相当の多様性が存在することを暗に意味する。多くの患者が同じセットの抗原を認識しなかったという本研究における知見は、精子の構築の複雑さおよび自己免疫応答に関連する抗原の多様性に、一部起因し得る。これらの患者における不妊の機構およびパターンが異なり得ることもまた、おそらく示唆される。異なる精子の表面タンパク質を認識する抗体は、不妊プロセスの異なる段階で作用することによって受精に対する精子の能力に影響を与え得る。抗体のレパートリーにおける差異はまた、免疫化の態様における差異にも関連し得る。以前の研究は、抗精子IgA抗体のサブクラスが、精子に対する自己免疫を有するヒトにおいて変化することを示した(Bronsonら、Human sperm antibodies and their detection: Manual of clinical laboratory immunology、第4版、American society for microbiology, Washington, D.C. 1992; 1013-1017)。

【0085】

ウェスタンブロットのデータ(図1Aおよび1Bを参照のこと)は、妊性の個体および不妊の個体の両方の高い割合において、精子の自己抗体の存在を確認するが、妊性の個体は、ずっと少ない精子抗原を認識し、そして相対的な反応性の強度は、不妊の個体と比較してより弱かった。これらのデータは、これらの血清のそれぞれが免疫ビーズ試験において抗精子抗体について陰性であったので、妊性の血清によって認識される精子抗原のほとんどが、内性であることを暗に意味する。これらの細胞内抗原のいくつかは、微量配列決定されており、そして線維鞘および外部の密度の高い線維のような精子の特異的な構造の成分として同定されている。本発明においては、これらの抗原のサブセットの系統的な同定は、精子抗原(これは、機能的に関連するおよび/または無関係な抗体の産生を誘発し、そしてこの抗体は、再生機能の損傷において役割を有し得る)の同定を補助する。

【0086】

コンピューターによる分析と組合せたイムノブロットィングのための血清の連続的なインキュベーションは、不妊患者に対して特有の主要な自己抗原およびイソ抗原についての情報を提供することに成功した。男性の血清は、女性の血清よりも多くの抗原を認識した(310対205)が、より多い数の女性被験体由来のサンプルを用いた広範囲の評価が、結果を統計学的に有効にするためには必要とされる。男性患者の中の免疫システムに対する精子タンパク質のより長い一定の暴露は、男性の中でのより高い反応性を説明し得る。さらに、男性患者と女性患者との間での免疫反応性のパターンにおける明らかな差異は、識別可能であった。男性患者の血清は、いくつかの酸性のタンパク質に対して反応性であり(pI 4.0から5.0)、これらは、女性に由来する分析された血清のいずれによっても認識されなかった(図1Cおよび1Dを参照のこと)。逆に、6.0から7.5のpIの範囲で女性のタンパク質によって認識された主要なイソ抗原は、男性患者に由来する血清に対する反応性が低かった(図1Cおよび1D)。

【0087】

精子の抗原に関連する妊性を同定するための合理的な基準は、細胞の表面上に

存在するこれらの抗原の同定による。従って、精子の表面抗原に対する免疫性と精子の内部抗原に対する免疫性の間を区別することが特に重要である。この理由のために、固定された精子の精子表面タンパク質（これは、損傷した膜を有し、それによって内部タンパク質の標識を可能にする）を標識するよりもむしろ、生存している精子の表面タンパク質を標識した。精子の表面タンパク質を、 ^{125}I で放射標識し、続いてIEF/PAGE、ならびにNEPHGE/PAGE分離を行った（Naaby-Hansenら、*Biol Reprod* 1997; 56: 771-787を参照のこと）。コンピューター分析を利用して、IEF/PAGEゲル中の103個の表面の標識されたタンパク質から構成される複合画像を得た。このコンピューター画像は、免疫不妊において役割を果たし得る6個の精子の表面抗原のサブセットを分類することが可能であった。これらの抗原のうちの1つは、2人の男性の不妊患者によって認識された、4.0のpIで88.2 kDaのタンパク質である。Naaby-Hansenら（*Biol Reprod* 1997; 56: 771-787）は、チロシン残基でリン酸化された精子の表面タンパク質であるとしてこのタンパク質を、以前に示した。興味深いことに、2人の女性の血清は、免疫反応性において著しい類似性を示し、これらは6.2および6.4のpIで60 kDaの同じタンパク質のスポットを認識した。これらの精子タンパク質の両方は、放射活性な ^{125}I を有する精子の表面の標識によって実証されるように、精子の表面上に存在することが見出された。さらに、両方の血清が、免疫ビーズ試験によって示されるように、精子の頭部に対して指向されたIgG抗体を含んだ。このことによって、これらの抗原が、精子の表面上に曝されていること、おそらく精子の頭部に配置されることが確認された。2人の男性患者の血清は、精子の表面上で同定された34 kDaおよび38 kDaの2つのタンパク質のスポットを強く認識した。

【0088】

精子に対する免疫性を診断するためのIBTおよびウェスタンブロッティングの両方に基づく血清の現在の分析は、抗精子抗体の存在を検出することおよび精子の表面上の同種抗原を同定することが可能であるが、これらの抗体が指向するエピトープの同定は、この分析の信頼度を改善するはずである。妊性において潜

在的な役割を有するようである複数の抗原の認識は、共通のエピトープに起因して生じ得る。

【0089】

以前の報告は、同じイソ型であるが精子の頭部に存在する異なる抗原に対して指向されたモノクローナル抗体が、透明帯または有精卵 (sperm-egg) の膜融合体に対する精子の接着をブロックし得ることを、示した。さらに、同じ精子の表面抗原の異なるエピトープに対して指向された抗体もまた、異なる方法で精子の受精能力に影響を与え得る。

【0090】

表面標識された精子タンパク質の2-Dゲルパターンについての情報のコンピューターによるデジタル化は、抗精子抗体の診断における新しいツールの可能性、および抗体媒介の不妊の処置の可能性を開く。精子のプロテオーム (proteome) および精子の表面タンパク質の指標に基づいて、患者の血清での2-Dイムノプロットは、ここでは、細胞表面で接近可能なタンパク質抗原に対する抗体を有するそのような患者をつきとめるため、それによって、自己抗体もしくはイソ抗体の患者のレパートリーについてのより特異的な情報を得るために使用され得る。これらのデータベースが、さらなる自己抗原またはイソ抗原の同定を用いて拡大し、そして微細な配列情報およびクローニングに基づく微細な配列が、関連するタンパク質の特徴を提供するので、定義された天然または組換えの精子抗原を使用する、抗体媒介の不妊の免疫治療のための合理的な基準についての可能性が、明らかになり得る。さらに、抗体媒介の不妊の診断は、患者の血清での2-Dイムノプロットを使用して、そして表面抗原のデータベースについての結果を参照することによって、単純化され得る。

【0091】

(実施例2)

2つの2Dゲルバンドの配列分析。ヒアルロン酸結合タンパク質(ペプチド番号1、表1)の同定

(方法:)

上部および下部のバンドは、4.4のpIで約36kDaで移動した。バンド

を、過剰なポリアクリルアミドを可能な限り最少にするように接近してゲルから切りだし、多数のより小さい断片に分け、そして洗浄し、そして500 μ Lの50%メタノール中で一晩脱色した。ゲルの断片を、アセトニトリル中で脱水し、50 μ Lの0.1Mの重炭酸アンモニウム中の10mMのジチオスレイトール中で再水和し、そして55 $^{\circ}$ Cで1時間還元した。DTT溶液を除去し、そしてサンプルを、50 μ Lの50mMのヨードアセトアミド/0.1Mの重炭酸アンモニウム中で、室温の暗所で1時間アルキル化した。試薬を除去し、そしてゲルの断片を、100 μ Lの0.1Mの重炭酸アンモニウムで洗浄し、そして100 μ Lのアセトニトリル中で5分間脱水した。アセトニトリルを除去し、そしてゲルの断片を、100 μ Lの0.1Mの重炭酸アンモニウム中で再水和した。断片を、100 μ Lのアセトニトリル中で再水和し、アセトニトリルを除去し、そして断片を、減圧遠心分離によって完全に乾燥させた。ゲルの断片を、50mMの重炭酸アンモニウム中の12.5 ng/ μ Lのトリプシン中で再水和し、そして氷上で45分間インキュベートした。全ての過剰のトリプシン溶液を除去し、そして20 μ Lの50mMの重炭酸アンモニウムを添加した。サンプルを、37 $^{\circ}$ Cで一晩消化し、そして形成されたペプチドを、2つの200 μ Lの50%のアセトニトリル/5%のギ酸中のポリアクリルアミドから抽出した。これらの抽出物を混合し、そしてLC-MS分析のために<20 μ Lまで蒸発させた。

【0092】

LC-MSシステムは、10cm \times 75 μ mのid POROS 10 RC 逆相キャピラリーカラムに接続された電子噴霧イオン供給源を備えた、Finnigan-MAT TSQ7000システムから構成された。1 μ Lの容量の抽出物を注射し、そしてペプチドを、アセトニトリル/0.1%の酢酸勾配によって、0.6 μ L/分の流速でカラムから溶出した。電子噴霧イオン供給源を、70%のメタノール/30%の水/0.125%の酢酸の、1.2 μ L/分の同軸の鞘の液体流 (sheath liquid flow)、および最適な感受性のために必要とされる場合に調節された、同軸の窒素流 (nitrogen flow) を用いて、4.5 kVで操作した。消化物を、消化物中に存在するペプチドの分子量を測定するために、キャピラリーLC電子噴霧質量スペクトル分析

によって分析した。検出したペプチドについてのペプチド配列を、衝突ガスとしてアルゴンを用いる、LC-電子噴霧直列型質量スペクトル分析を使用して、衝突して活性化した解離によって決定した。

【0093】

(結果：)

これらの2つの消化物の、LC-MS分析によって決定した分子量、およびペプチドのLC-直列型MSによって決定したアミノ酸配列を、表2に示す。6個のペプチドを、より暗く染色されたバンドLB3-83-2(Anne、下部)において検出し、そして4個のこれらの同じペプチド(ペプチド#2、3、4、および5)を、より明るく染色されたバンドLB-3-83-1(Anne、上部)において検出した。配列情報を、6個のペプチドのうちの5個について得た。CADスペクトルの情報を使用するデータベース検索(SEQUEST)および部分的なペプチド配列を使用するデータベース検索(BLAST)によって、ヒトのヒアルロン酸結合タンパク質のデータベース配列中の2つのペプチドを同定し、3および4と番号付けした(NCBI nr. 6.8.97登録番号730772、計算したMW = 31.4 kDa、計算したpI = 4.3)。他のペプチドは、このデータベース配列においても、任意の他のデータベース配列においても見出せなかった。

【0094】

まとめると、両方のバンドは、同様の系列のペプチドを生じる。両方のバンドが2つのペプチドを含み、これらは、ヒトのヒアルロン酸結合タンパク質のデータベース配列に適合する。両方のバンドがさらなるペプチドを含み、これらは、任意のデータベースのペプチドに対して適合し得ず、従ってこれらは、第2の未知のタンパク質に由来するようである。

【0095】

【表2】

表2. 2個の2Dゲルのバンド¹によるペプチド配列 (LB3-83-1 及び LB3-83-2)

ペプチド 番号	測定した 分子量 (M+H ⁺ , Da)	CAD ¹ によるペプチド配列 (計算した MW, M+H ⁺ , Da)	データベースによる ペプチド配列 (計算した MW, M+H ⁺ , Da)
1	759.6	SVXXSXK (760.0)	
2	1478.1	__ VYTS g---R (b2=248) (Moを含む)	
3	1639.4	__ GGWEXEXNGTEAK (b2=235, MoS)	SGGWELELNGTEAK 配列番号 40 (1638.8)
4	1698.8	AFVDFXSDEXKEER	AFVDFLSDEIKEER SEQ 配列番号 38 (1698.9)
5	2089.2	+3 識別不可能	
6	2355.4	---D__ VESVER (Δ=155)	

¹Xは、IまたはLを示す。これらは、低エネルギーのCADによっては識別し得ない。Moは、酸化されたMを示す。小文字は、試験的な割り当てを示す。__は、単一の未知のアミノ酸を示す、---は、未知の数の未知のアミノ酸を示す。略号は、以下の通りである：「X」= IleまたはLeu；

SVXXSXKは、以下のアミノ酸配列を示す：

Ser Val Ile Leu Ser Leu Lys (配列番号24)、
 Ser Val Leu Ile Ser Leu Lys (配列番号25)、
 Ser Val Leu Leu Ser Ile Lys (配列番号26)、
 Ser Val Ile Ile Ser Leu Lys (配列番号27)、
 Ser Val Ile Ile Ser Ile Lys (配列番号28)、
 Ser Val Ile Leu Ser Ile Lys (配列番号29)、
 および

Ser Val Leu Leu Ser Leu Lys (配列番号30)；

VYTSは、以下のアミノ酸配列を示す：

Val Tyr Thr Ser (配列番号31) ;

GGWEXEXNGTEAKは、以下のアミノ酸配列を示す ;

Gly Gly Trp Glu Ile Glu Ile Asn Gly

Thr Glu Ala Lys (配列番号32)、

Gly Gly Trp Glu Ile Glu Leu Asn Gly

Thr Glu Ala Lys (配列番号33)、

Gly Gly Trp Glu Leu Glu Ile Asn Gly

Thr Glu Ala Lys (配列番号34)、および

Gly Gly Trp Glu Leu Glu Leu Asn Gly

Thr Glu Ala Lys (配列番号35) ;

AFVDFXSDEXKEERは、以下のアミノ酸配列を示す

Ala Phe Val Asp Phe Ile Ser Asp Glu

Ile Lys Glu Glu Arg (配列番号36)、

Ala Phe Val Asp Phe Ile Ser Asp Glu

Leu Lys Glu Glu Arg (配列番号37)、

Ala Phe Val Asp Phe Leu Ser Asp Glu

Ile Lys Glu Glu Arg (配列番号38)、および

Ala Phe Val Asp Phe Leu Ser Asp Glu

Leu Lys Glu Glu Arg (配列番号39) ; ならびに

SGGWELELNGTEAKは、以下のアミノ酸配列を示す ;

Ser Gly Gly Trp Glu Leu Glu Leu Asn

Gly Thr Glu Ala Lys (配列番号40)。

【0096】

(実施例3)

3つのCM染色した2Dゲルのバンドの配列分析(ペプチド番号2、表1)

(方法:)

ゲルの断片を、シリコナイズしたチューブに移し、そして洗浄し、そして200 μ Lの50%のメタノール中で一晩脱色した。ゲルの断片を、アセトニトリル中で脱水し、0.1Mの重炭酸アンモニウム中の30 μ Lの10mMのジチオス

レイトール中で再水和し、そして0.5時間室温で還元した。DTT溶液を除去し、そしてサンプルを、0.1Mの重炭酸アンモニウム中の30 μ Lの50mMのヨードアセトアミド中で、0.5時間室温でアルキル化した。試薬を除去し、そしてゲルの断片を、100 μ Lのアセトニトリル中で脱水した。アセトニトリルを除去し、そしてゲルの断片を、100 μ Lの0.1Mの重炭酸アンモニウム中で再水和した。断片を100 μ Lのアセトニトリル中で脱水し、アセトニトリルを除去し、そして断片を、減圧遠心分離によって完全に乾燥させた。ゲルの断片を、50mMの重炭酸アンモニウム中の20ng/ μ Lのトリプシン中で、氷上で10分間再水和した。任意の過剰のトリプシン溶液を除去し、そして20 μ Lの50mMの重炭酸アンモニウムを添加した。サンプルを37 $^{\circ}$ Cで一晩消化し、そして形成したペプチドを、2つの30 μ Lの50%のアセトニトリル/5%のギ酸のアリコート中のポリアクリルアミドから抽出した。これらの抽出物を混合し、そしてLC-MS分析のために25 μ Lまで蒸発させた。

【0097】

LC-MSシステムは、自己梱包された(self-packed)8cm \times 75 μ mのid Phenomenex Jupiter 10 μ m C18逆相キャピラリーカラムに接続されたProtanaナノスプレーイオン供給源を備えた、Finnigan LCQイオントラップ質量スペクトル分析システムから構成された。0.5~5 μ Lの容量の抽出物を注射し、そしてペプチドを、アセトニトリル/0.1%の酢酸勾配によって、0.25 μ L/分の流速でカラムから溶出した。ナノスプレーイオン供給源を、2.8kVで操作した。消化物を、ペプチドの分子量を測定するためのフルスキャン質量スペクトルおよび連続的なスキャンの中のアミノ酸配列を測定するための生成物イオンスペクトルを取得する機器の、2倍の実行能力を使用して分析した。分析のこの態様によって、数桁の大きさを超える量の範囲で、約400のCADスペクトルのイオンを生じる。必ずしも全てのCADスペクトルが、ペプチドに由来するわけではない。

【0098】

データを、SEQUEST検索アルゴリズムを使用してデータベース検索によって分析した。このアルゴリズムによっては適合しなかったペプチドを、手作業

によって解釈し、そしてSEQUESTアルゴリズムを使用してESTデータベースに対して検索した。

【0099】

(結果：)

表3に示すペプチドを、バンドC48中で検出した。これらのペプチドのいずれもが、任意のタンパク質またはEST項目と適合しなかった。このペプチドは、完全に新規のものであるようである。

【0100】

【表3】

表3. バンドC48によるペプチド配列 (LB6-52-3)

ペプチド番号	測定した分子量 (M+H ⁺ , Da)	CAD ¹ によるペプチド配列
1	627.1 +2	YM__K
2	956.7 +2	XX---R
3	1051.4 +2	---XQQT, Q=K 可能
4	1211.9 +2	XNSQWVVPLR
5	1316.6 +2	___MVNXMXXXR, b2=215
6	1584.7 +2	---V---

¹IおよびLは、低エネルギーのCADによっては識別不可能であるが、データベース配列によって推測される。M(o)は、酸化されたMを示す。Cは、C^a(アクリルアミド)として記載されていない限りは、カルバミドメチルで改変されている。__は、単一の未知の残基を示す。---は、未知の数の未知の残基を示す。略号は、以下の通りである：「X」=IleまたはLeu；

XQQTは、以下のアミノ酸配列を示す；

Ile Gln Gln Thr (配列番号41) および

Leu Gln Gln Thr (配列番号42)；

XNSQWVVPLRは、以下のアミノ酸配列を示す；

I l e A s n S e r G l n T r p V a l V a l P r o L e u
A r g (配列番号1) ; および

L e u A s n S e r G l n T r p V a l V a l P r o L e u
A r g (配列番号2) ;

M V N X M X X X R は、以下のアミノ酸配列を示す ;

M e t V a l A s n I l e M e t I l e I l e I l e A r g (配列番号3)、

M e t V a l A s n L e u M e t I l e I l e I l e A r g (配列番号4)、

M e t V a l A s n I l e M e t L e u I l e I l e A r g (配列番号5)、

M e t V a l A s n I l e M e t I l e L e u I l e A r g (配列番号6)、

M e t V a l A s n I l e M e t I l e I l e L e u A r g (配列番号7)、

M e t V a l A s n I l e M e t I l e L e u L e u A r g (配列番号8)、

M e t V a l A s n I l e M e t L e u L e u I l e A r g (配列番号9)、

M e t V a l A s n I l e M e t L e u I l e L e u A r g (配列番号10)、

M e t V a l A s n L e u M e t L e u I l e I l e A r g (配列番号11)、

M e t V a l A s n L e u M e t L e u I l e I l e A r g (配列番号12)、

M e t V a l A s n L e u M e t I l e L e u I l e A r g (配列番号13)、

M e t V a l A s n L e u M e t I l e I l e L e u A r g (配列番号14)、

Met Val Asn Leu Met Ile Leu Leu Arg (配列番号15)、

Met Val Asn Leu Met Leu Leu Ile Arg (配列番号16)、

Met Val Asn Leu Met Leu Ile Leu Arg (配列番号17)。

【0101】

(実施例4)

バンド2によるペプチドを、実施例3および4に記載するように単離した。表4に示すペプチドを、バンド2消化物中で検出した。そしてこれは、任意のデータベース配列とは適合し得なかった。ペプチドは、あまり豊富ではなく、そして消化物は、多数のより豊富なペプチドを含み、これらの全てがケラチン配列と適合した。

【0102】

【表4】

表4. バンド2によるペプチド配列 (LBS-83-10)

ペプチド番号	測定した分子量 (M+H ⁺ , Da)	CAD ¹ によるペプチド配列 (計算した MW, M+H ⁺ , Da) ²
1	1392.7 +3	---PXSS---
2	1505.0 +2	MXPVXE---K
3	1512.1 +3	HGQSAEYEF---
4	1941.2 +2	__FQQDGGAS---b2 = 245
5	2121.7 +3	__TXX---b2 = 169

¹IおよびLは、低エネルギーのCADによっては識別不可能であるが、データベース配列によって推測される。Moは、酸化されたMを示す。Cは、特に記載

されていない限りは、カルバミドメチルで改変されている。_は、単一の未知の残基を示す。- - - は、未知の数の未知の残基を示す。²⁺ 2 イオンについての分子量は、単一同位体 (monoisotopic) の分子量であり、³⁺ 3 イオンの分子量については平均の分子量である。略号は、以下の通りである：「X」= Ile または Leu；

PXSSは、以下のアミノ酸配列を示す：

Pro Ile Ser Ser (配列番号43)、および

Pro Leu Ser Ser (配列番号44)；

MXPVXEは、以下のアミノ酸配列を示す：

Met Ile Pro Val Ile Glu (配列番号18)

Met Leu Pro Val Ile Glu (配列番号19)

Met Ile Pro Val Leu Glu (配列番号20)、および

Met Leu Pro Val Ile Glu (配列番号21)；

HGQSAEYEFは、以下のアミノ酸配列を示す：

His Gly Gln Ser Ala Glu Tyr Glu Phe (配列番号22)。

【0103】

FQQDGGASは、以下のアミノ酸配列を示す：

Phe Gln Gln Asp Gly Gly Ala Ser (配列番号23)。

【0104】

バンド3。表5に示すペプチドを、バンド3消化物中で検出した。このデータの分析は、消化したタンパク質があまり豊富ではなかったので複雑であった。ペプチド4および6を、ヒトのB7タンパク質のデータベース配列中で同定した (NCBI.nr.01.04.99登録番号1732415、計算したMW=36.1kDa、計算したpI=5.0)。ペプチド3を、bacillus I型のシグナルペプチダーゼのデータベース配列中で同定した (NCBI.nr.01.04.99登録番号126186、計算したMW=21.0kDa、計算したpI=9.4)。任意の他のペプチドについて適合するデータベースは見出

せず、そしてこれらのペプチドの全てが、ESTデータベースと適合し得なかった。発明者らはまた、バンド3中のペプチド8および9のいずれもが、バンド2中のペプチド2および3と同じであることに注目し得る。

【0105】

【表5】

表5. バンド3によるペプチド配列 (LB5-83-10)

ペプチド 番号	測定した分子量 (M+H ⁺ , Da)	CAD ² によるペプチド配列 (計算した= MW, M+H ⁺ , Da) ²	
1	695.2 +2	XX---K	
2	803.2 +2	H---YK	
3	899.8 +2	YIGEFDR (899.4)	B
4	1007.0 +2	SLQYLNLR (1006.6)	A
5	1237.3 +3	---CGA---	
6	1353.0 +2	DNQIDTSLGFSR (1352.6)	A
7	1425.4 +3	識別不可能	
8	1505.0 +2	MXPVXE---K	
9	1512.1 +3	HGQSAEYEF---	
10	2122.9 +3	---XDN---	

¹ IおよびLは、低エネルギーのCADによっては識別不可能であるが、データベース配列によって推測される。Moは、酸化されたMを示す。Cは、特に記載されていない限りは、カルバミドメチルで改変されている。_は、単一の未知の残基を示す。---は、未知の数の未知の残基を示す。² + 2イオンについての分子量は単一同位体の分子量であり、> + 3イオンの分子量については平均の分子量である。略号は、以下の通りである：「X」= IleまたはLeu；

YIGEFDRは、以下のアミノ酸配列を示す；

Tyr Ile Gly Glu Phe Asp Arg (配列番号45)；

SLQYLNLRは、以下のアミノ酸配列を示す；

Ser Leu Gln Tyr Leu Asn Leu Arg (配列番号
46)；

DNQIDTSLGFSRは、以下のアミノ酸配列を示す；

Asp Asn Gln Ile Asp Thr Ser Leu Gly
Phe Ser Arg (配列番号47)；

MXPVXEは、以下のアミノ酸配列を示す；

Met Ile Pro Val Ile Glu (配列番号18)、
Met Leu Pro Val Ile Glu (配列番号19)、
Met Ile Pro Val Leu Glu (配列番号20)、および
Met Leu Pro Val Ile Glu (配列番号21)；

HGQSAEYEFは、以下のアミノ酸配列を示す；

His Gly Gln Ser Ala Glu Tyr Glu Phe (配列番号22)。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Herr, John

<120> Human Sperm Surface Antigens

<130> Herr-Proteom

<140>

<141>

<160> 47

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Asn Ser Gln Trp Val Val Pro Leu Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Asn Ser Gln Trp Val Val Pro Leu Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Val Asn Ile Met Ile Ile Ile Arg
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Val Asn Leu Met Ile Ile Ile Arg
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Val Asn Ile Met Leu Ile Ile Arg
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Val Asn Ile Met Ile Leu Ile Arg
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Met Val Asn Ile Met Ile Ile Leu Arg
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Val Asn Ile Met Ile Leu Leu Arg
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Val Asn Ile Met Leu Leu Ile Arg
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Met Val Asn Ile Met Leu Ile Leu Arg
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Met Val Asn Leu Met Leu Ile Ile Arg
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Met Val Asn Leu Met Leu Ile Ile Arg
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Met Val Asn Leu Met Ile Leu Ile Arg
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Met Val Asn Leu Met Ile Ile Leu Arg
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Met Val Asn Leu Met Ile Leu Leu Arg
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Met Val Asn Leu Met Leu Leu Ile Arg
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Met Val Asn Leu Met Leu Ile Leu Arg
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Met Ile Pro Val Ile Glu
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Met Leu Pro Val Ile Glu
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Ile Pro Val Leu Glu
1 5

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Met Leu Pro Val Ile Glu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
His Gly Gln Ser Ala Glu Tyr Glu Phe
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Phe Gln Gln Asp Gly Gly Ala Ser
1 5

<210> 24
<211> 7

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Ser Val Ile Leu Ser Leu Lys
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Ser Val Leu Ile Ser Leu Lys
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ser Val Leu Leu Ser Ile Lys
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Ser Val Ile Ile Ser Leu Lys
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Ser Val Ile Ile Ser Ile Lys
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Ser Val Ile Leu Ser Ile Lys
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Ser Val Leu Leu Ser Leu Lys
1 5

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Val Tyr Thr Ser
1

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Gly Gly Trp Glu Ile Glu Ile Asn Gly Thr Glu Ala Lys
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Gly Gly Trp Glu Ile Glu Leu Asn Gly Thr Glu Ala Lys
1 5 10

<210> 34
<211> 13
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Gly Trp Glu Leu Glu Ile Asn Gly Thr Glu Ala Lys
 1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Gly Trp Glu Leu Glu Leu Asn Gly Thr Glu Ala Lys
 1 5 10

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Phe Val Asp Phe Ile Ser Asp Glu Ile Lys Glu Glu Arg
 1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ala Phe Val Asp Phe Ile Ser Asp Glu Leu Lys Glu Glu Arg
 1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Phe Val Asp Phe Leu Ser Asp Glu Ile Lys Glu Glu Arg
 1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Phe Val Asp Phe Leu Ser Asp Glu Leu Lys Glu Glu Arg
 1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ser Gly Gly Trp Glu Leu Glu Leu Asn Gly Thr Glu Ala Lys
 1 5 10

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ile Gln Gln Thr
 1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Leu Gln Gln Thr
 1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Pro Ile Ser Ser
 1

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

```

<400> 44
Pro Leu Ser Ser
  1

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Tyr Ile Gly Glu Phe Asp Arg
  1                               5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Ser Leu Gln Tyr Leu Asn Leu Arg
  1                               5

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Asp Asn Gln Ile Asp Thr Ser Leu Gly Phe Ser Arg
  1                               5                               10

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 A ~ 1 Dは、妊性雄性（図1 A）および妊性雌性（図1 B）からの5つの血清を、5つの不妊雄性（図1 C）および不妊雌性（図1 D）と比較した、単純プロットの系列インキュベーションによるウェスタンブロット分析（希釈率1：2000）を表す。主要な自己抗原およびイソ抗原（矢印）であって、不妊被験体によって特有に認識されるものが認められる。

【図2】

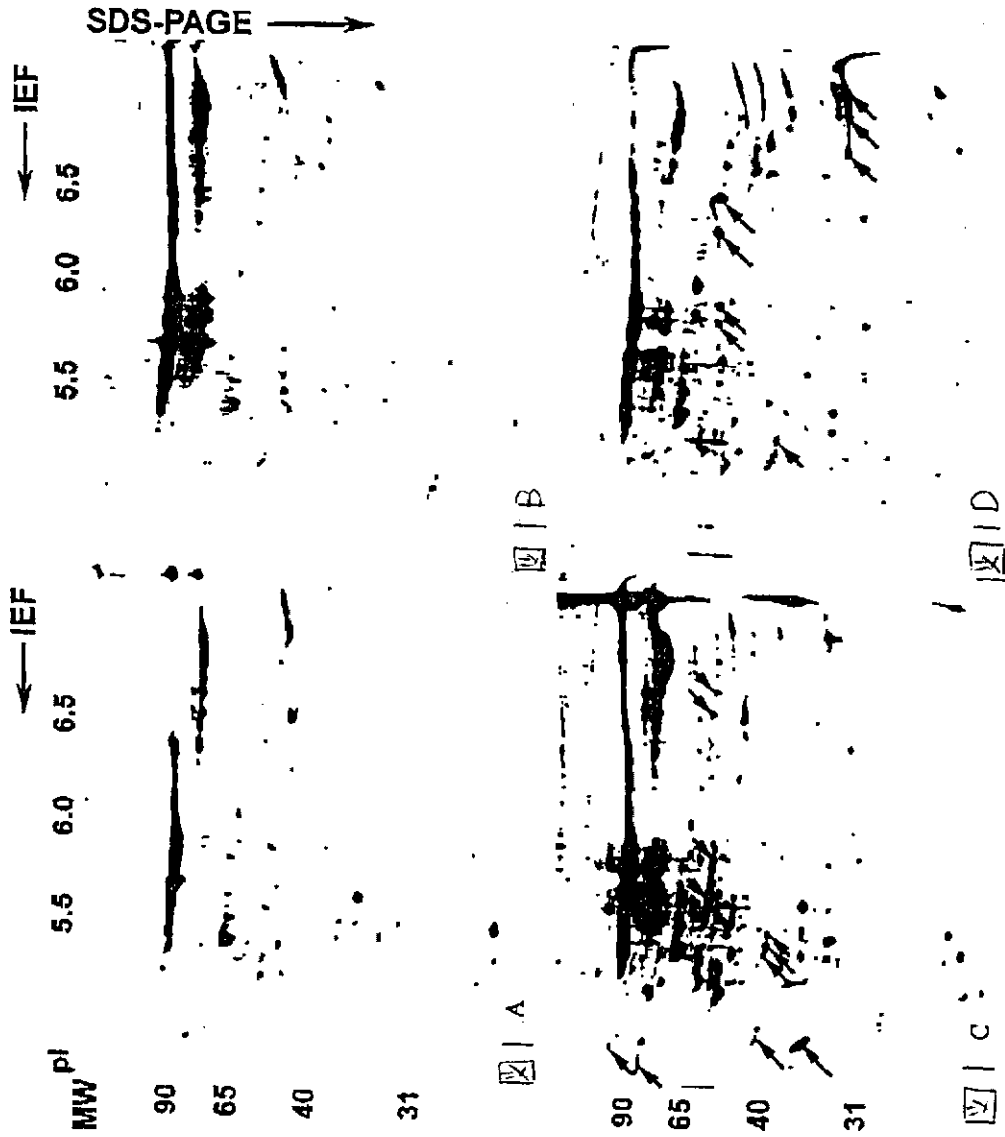
図2 A ~ 2 Bは、不妊血清によって認識される、主要な自己抗原（図2 A）およびイソ抗原（図2 B）を示すコンピュータ生成画像を表す。ウェスタンブロットのコンピュータ走査画像を、アンカーとして2つの画像にわたり共通するタンパク質スポットを用いて妊性群と不妊群とを比較した。妊性被験体（雄性および雌性の両方）血清によって認識されるタンパク質スポットを、不妊の雄性および雌性の被験体を表す画像から引き、そして不妊雄性（図2 A）および不妊雌性（

図2B)によって特有に認識されるすべての抗原を表す画像を生成した。イソ抗原よりも多くの自己抗原が存在すること、および異なるパターンの免疫反応性が性間で存在することが認められる。矢印は、雄性および雌性の両方の被験体によって認識されるタンパク質スポットを示す。

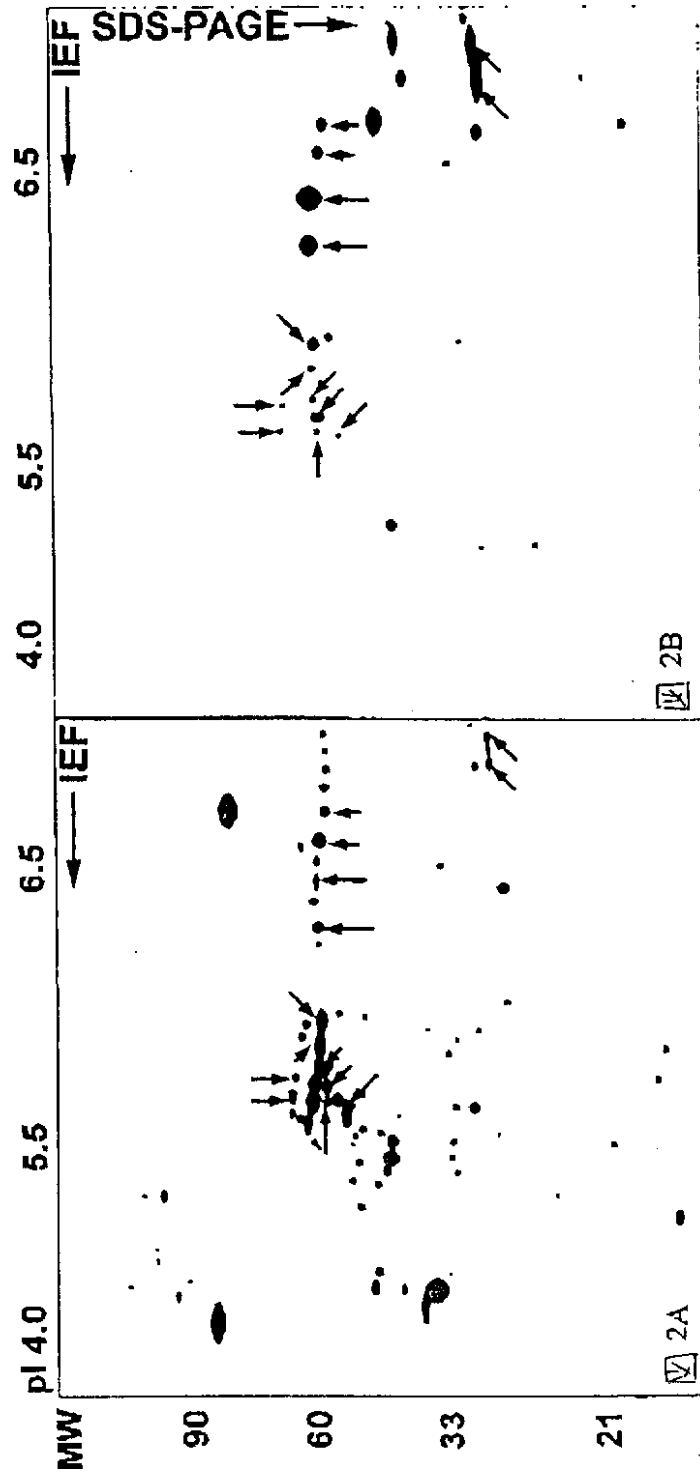
【図3】

図3は、二次元IEF/PAGEのベクトル的にヨウ素化したヒト精子タンパク質のコンピュータ生成複合画像を表す。この精子を、実施例1に記載されるように、放射標識し、そして溶解し、そしてIEF/PAGEによる二次元電気泳動によって分離した。この複合画像は、ニトロセルロース膜に固定した表面タンパク質の自己放射線画像を走査し、そして自己抗原およびイソ抗原の位置に対してその画像を比較した後に生成した(図1)。矢印は、免疫優性表面の自己抗原およびイソ抗原の位置を示す。

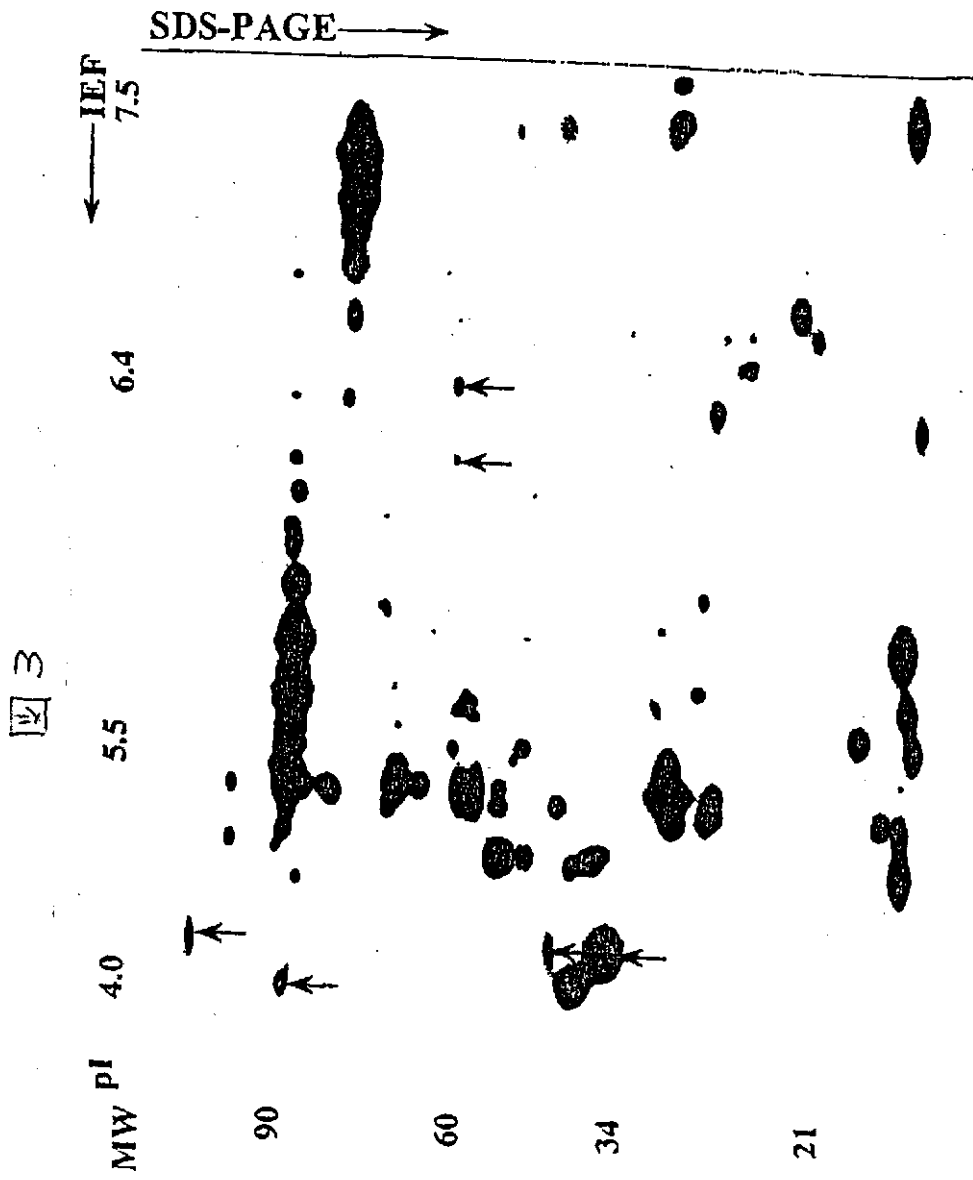
【図1】



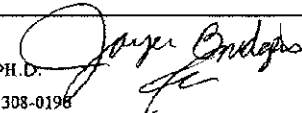
【図2】



【图3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/07686
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST search terms: (contracepti\$3 near\$5 vaccin\$6) and (sperm\$6 near\$3 antigen)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	AITKEN et al. Analysis of the Surface Labelling Characteristics of Human Spermatozoa and the Interaction with Anti-Sperm Antibodies. J. Reprod. Fert. 1987, Vol. 80, pages 473-485, see entire document.	1-8, 13-14 -----
Y		9-12
X ---	LEE et al. Analysis of Sperm Antigens by Sodium Dodecyl Sulfate Gel/Protein Blot Radioimmunobinding Method. Analytical Biochemistry. 1982, Vol. 123, pages 14-22, see entire document.	1-8, 13-14 -----
Y		9-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt 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 "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 JUNE 2000		Date of mailing of the international search report 24 JUL 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JAMES L. GRUN, PH.D.  Telephone No. (703) 308-0198

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/07686

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAJI et al. Identification and Characterization of a Human Sperm Antigen Corresponding to Sperm-Immobilizing Antibodies. American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology. August 1988, Vol. 17, No. 4, pages 128-133, especially page 129, column 2.	3-8, 13-14
Y	US 5,227,160 A (NUDELMAN et al.) 13 July 1993, see entire document.	1-14
Y	US 5,830,472 A (HERR et al.) 03 November 1998, see entire document.	8-14
X --- A	NAABY-HANSEN et al. Two-Dimensional Gel Electrophoretic Analysis of Vectorially Labeled Surface Proteins of Human Spermatozoa. Biology of Reproduction. 1997, Vol. 56, pages 771-787, see entire document.	1-2 ----- 3-14
A	HERR, J.C. Update on the Center for Recombinant Gamete Contraceptive Vaccinogens. American Journal of Reproductive Immunology. March 1996, Vol. 35, No. 3, pages 184-189, see entire document.	1-14
X	LU et al. The Genes Encoding the P39 and CG30 Proteins of Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus. Journal of General Virology. 1996, Vol. 77, pages 3135-3143, especially page 3138, Fig. 2B, amino acid residues 30-35.	1-2
X	KLENK et al. The Complete Genome Sequence of the Hyperthermophilic, Sulphate-Reducing Archaeon Archaeoglobus fulgidus. Nature. November 1997, Vol. 390, pages 364-370, especially insert, protein AF1232.	1-2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/07686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

A01N 1/00; A61K 35/52, 38/04, 38/08, 39/385, 39/395; C07K 7/06, 14/705, 16/28; G01N 33/543, 33/68

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

424/139.1, 152.1, 172.1, 185.1, 93.7, 561; 435/2, 7.21, 7.92, 7.94, 7.95, 331, 332; 436/518; 514/2, 15, 16; 530/300, 328, 329, 387.9, 403

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

424/139.1, 152.1, 172.1, 185.1, 93.7, 561, 811; 435/2, 7.21, 7.92, 7.94, 7.95, 331, 332, 806; 436/518, 519, 906; 514/2, 15, 16; 530/300, 328, 329, 387.9, 388.2, 389.1, 403, 806, 810, 852

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	15/16	A 6 1 P	15/18	
	15/18	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/28	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	J
	33/50			Z
	33/53		33/53	D
	33/543		33/543	5 0 1 A
// C 0 7 K	14/705	C 0 7 K	14/705	
		A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C U , C Z , D E , D K , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 ナーバイ - ハンセン , ゴーレン
イギリス国 エヌダブリュー7 1ディー
イー ロンドン , グランツ クローズ
70

(72)発明者 フリッキンガー , チャールズ ジェイ .
アメリカ合衆国 バージニア 22903 ,
シャルロットビル , メドウブルック ロ
ード 2009

(72)発明者 シェッティ , ジャガスパラ
アメリカ合衆国 バージニア 22903 ,
シャルロットビル , ペイトン コート
287

Fターム(参考) 2G045 AA27 AA40 CA25 CA26 DA36
FB03 FB07
4C084 AA02 BA17 CA36 MA66 NA14
ZA81
4C085 AA03 AA14 BB11 CC13 DD32
DD62 EE01 EE06 FF24 GG02
4H045 AA11 AA30 BA14 BA15 CA40
DA75 DA86 EA20 EA54 FA74

专利名称(译)	人精子表面抗原		
公开(公告)号	JP2002539223A	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2000606062	申请日	2000-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚大学专利基金会		
申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚专利大学基金会		
[标]发明人	ヘアジョンシー ナーバイハンセンゾーレン フリッキンガーチャールズジェイ シェッティジャガスパラ		
发明人	ヘア, ジョン シー, ナーバイ-ハンセン, ゾーレン フリッキンガー, チャールズ ジェイ, シェッティ, ジャガスパラ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P15/00 A61P15/08 A61P15/16 A61P15/18 C07K7/00 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P15/00 A61P15/08 A61P15/16 A61P15/18 C07K14/705 C07K16/28		
FI分类号	C07K7/00.ZNA A61K39/00.H A61K39/395.N A61P15/08 A61P15/16 A61P15/18 C07K16/28 G01N33/15.Z G01N33/50.J G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/543.501.A C07K14/705 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA27 2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4C084/AA02 4C084/BA17 4C084/CA36 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA81 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC13 4C085/DD32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA54 4H045/FA74		
优先权	60/125504 1999-03-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及精子表面蛋白及其在调节哺乳动物物种繁殖力中的用途。更具体地，本发明涉及纯化的精子特异性表面肽表位以及那些蛋白质表位的衍生物和针对那些蛋白质表位的抗体。本发明涉及不育相关程序中的治疗和诊断组合物以及使用这些组合物的方法。本发明的组合物包含被存在于不育男性和女性血清中的抗精子抗体识别的精子细胞表面抗原。本发明进一步涉及治疗组合物以及诊断和治疗方法。这些包括调节（即抑制或促进）不育的组合物和方法。

不 外 番 号	型	質 量	PI	同種ノ患者ノ血清ノIBTパターン	
				I型 特異性	精子/結合/位置の%
1	自己	34.0	4.2	IgG	100% 全体の精子の表面
2	自己	38.0	4.3	IgG	100% 全体の精子の表面
3	1/配	60.0	6.2	IgG	>90% 精子の頭部
4	1/配	60.0	6.4	IgG	>90% 精子の頭部
5	自己	88.2	4.0	IgG & IgM	>85% 精子の頭部
6	自己	140.0	4.2	IgG	100% 全体の精子の表面