

(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2006-518193

(P2006-518193A)

(43) 公表日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-501011 (P2006-501011)	(71) 出願人	501149684 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
(86) (22) 出願日	平成16年1月16日 (2004.1.16)		アメリカ合衆国22902バージニア州シ ャーロットビル、スウィート300、ウエ スト・メイン・ストリート250番
(85) 翻訳文提出日	平成17年9月15日 (2005.9.15)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/001240	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開番号	W02004/064740	(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃
(87) 国際公開日	平成16年8月5日 (2004.8.5)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(31) 優先権主張番号	60/440,585	(74) 代理人	100127638 弁理士 志賀 美苗
(32) 優先日	平成15年1月16日 (2003.1.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 精子特異的リゾチーム様タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、リゾチーム C タンパク質と高い配列同一性を共有する精巢特異的タンパク質 (S L L P) のファミリーに関する。本願は、S L L P タンパク質、S L L P ポリペプチドについて特異的な抗体を含む組成物、S L L P ポリペプチドの使用および避妊薬剤としてかかるペプチドに関する抗体を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精子と卵母細胞との結合を阻害するための組成物であって、

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、およびかかる配列の生物活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、
組成物。

【請求項 2】

該ポリペプチドが、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および配列番号：21からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1記載の組成物。

10

【請求項 3】

該ポリペプチドが、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および配列番号：21からなる群から選択されるアミノ酸配列のペプチドフラグメントからなる、請求項1記載の組成物。

【請求項 4】

該ポリペプチドが、配列番号：2、配列番号：16、または配列番号：2の生物活性フラグメントである、請求項1記載の組成物。

【請求項 5】

配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12およびかかる配列の生物活性フラグメントからなる群から選択される第二のアミノ酸配列をさらに含む、請求項4記載の組成物。

20

【請求項 6】

医薬的に許容し得る担体をさらに含む、請求項1-5のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

該ポリペプチドが、検出し得る標識によって直接的または間接的に標識されている、請求項1-5のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

プロピレングリコール、2~4個の炭素原子を有する一価アルコール、乳酸、チオグリコール、脂肪酸グリセリド、およびソルビタン脂肪酸エステルからなる群から選択される化合物をさらに含む、請求項1-5のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 9】

配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 10】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項9記載の抗体。

【請求項 11】

該抗体が検出し得る標識によって直接的または間接的に標識されている、請求項9または10記載の抗体。

【請求項 12】

請求項11の抗体および医薬的に許容し得る担体を含む、組成物。

40

【請求項 13】

SLLPポリペプチドの天然リガンドを同定するための方法であって、

下記工程：

ヒトSLLPポリペプチドを、生理学的条件下で、卵母細胞から単離された化合物と接触すること、ここで該SLLPポリペプチドは配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12およびかかる配列の生物活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

ヒトSLLPポリペプチドを、非結合および非特異的な結合物質を除去するために洗浄すること、

50

ヒトSLLPポリペプチドとの結合を維持している化合物を単離すること、を含む、方法。

【請求項14】

卵母細胞から単離された化合物が、哺乳類の卵母細胞から抽出されたタンパク質を含む、請求項13記載の方法。

【請求項15】

該ヒトSLLPポリペプチドが固体表面上に固定されている、請求項14記載の方法。

【請求項16】

哺乳類精子細胞と哺乳類卵母細胞との結合を低下させる方法であって、哺乳類の配偶子をSLLP活性の阻害剤を含む組成物と接触させる工程を含む、方法。

10

【請求項17】

該投与された組成物がSLLPポリペプチドに特異的に結合する抗体を含む、請求項16記載の方法。

【請求項18】

投与された組成物が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12およびかかる配列の生物活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項16記載の方法。

【請求項19】

投与された組成物が配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、およびかかる配列の生物活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項18記載の方法。

20

【請求項20】

投与された組成物が、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20および配列番号：21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項19記載の方法。

【請求項21】

配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9および配列番号：11からなる群から選択される核酸配列に作動可能に結合された非天然プロモーターを含む、組換え体ヒトSLLP遺伝子構築体。

【請求項22】

請求項21記載の構築体を含む、トランスジェニック細胞。

30

【請求項23】

哺乳類における個体の受精能力を低下させる免疫応答を誘導するための組成物であって、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12からなる群から選択されるSLLPポリペプチドのエピトープおよび医薬的に許容し得る担体を含む、組成物。

【請求項24】

アジュバンドをさらに含む、請求項23記載の組成物。

【請求項25】

哺乳類の受精能力を低下させる方法であって、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるSLLPポリペプチドのエピトープを含む組成物を該哺乳類に投与することによって、哺乳類における免疫応答を誘導する工程を含む、方法。

40

【請求項26】

個体の受精能力を調節するための組成物であって、配列番号：2および配列番号：4からなる群から選択されるアミノ酸配列のペプチドフラグメントを含む、組成物。

【請求項27】

配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12の8～15個のアミノ酸配列と同一である8～15個のアミノ酸配列を含む、請求項26記載の組成物。

【請求項28】

該ペプチドフラグメントが脂肪酸と結合する、請求項26または27記載の組成物。

【請求項29】

50

イン・ピボでの卵母細胞を画像化するための方法であって、

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む組成物を雌に投与する工程を含み、

該アミノ酸配列が検出し得る標識によって直接的または間接的に標識されている、方法。

【請求項30】

該組成物が膣投与される、請求項29記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

米国政府の権利

本発明は、国立健康研究所によって授与された、助成金番号HD38353およびU5429099のもとに、米国政府の援助によりなされたものである。米国政府は本発明に関して一定の権利を持つ。

【0002】

関連出願

本願は、35 USC § 119(e)の下で、2003年1月16日に出願した米国仮特許出願60/440,585号の優先権を主張するものである。なお、該出願の開示内容は、出典開示により本明細書の一部とする。

【0003】

背景技術

哺乳動物における受精において、受精能を獲得した精子は、まず、卵母細胞の周囲を囲んでいる大量の卵丘細胞、次いで透明帯の厚い細胞外マトリックスを通過していかねばならない。透明帯に到達し、結合する精子は、アクロソーム反応を受けるためのシグナルを受容し、透明帯から受精チャンネルの加水分解を促進するように作用する酵素を放出する。受精チャンネルから出現によって、アクロソーム反応性精子が囲卵腔を横切り、卵膜と融合する。アクロソーム反応性精子のみが卵黄付近のマトリックスで見出されており、アクロソーム反応性精子だけが、結合および融合事象を媒介すると現在考えられる赤道部とオーバーレイする細胞膜ドメインと融合性である。すなわち、受精は、精子と卵母細胞表面タンパク質との間で直接的な相互作用によって完了される。配偶子リガンドおよびレセプターおよびこれらの事象に重要な分子相互作用は、大きな研究努力の主題である。

【0004】

本明細書の一部とした開示物である、国際出願番号PCT/US01/01716に記載のように、ヒト・アクロソームに存在する2つの新規c型リゾチーム様タンパク質(hSLLP1 & hSLLP2)は以前に発見されていた。さらに、この遺伝子ファミリーの4つのメンバーが、現在単離されている(hSLLP3-6)。各SLLPファミリーメンバーの発現は、精巢に限定されており、ここで記載したように精子および卵母細胞膜の結合および融合において機能することがわかった。従って、本発明の一つの態様は、避妊薬を単離するための標的として、これらのタンパク質の使用に関する。

【0005】

本発明の多様な実施態様の要約

本発明は、SLLP1、SLLP2、SLLP3(先に報告されたC19、C23およびC24)、SLLP4、SLLP5、SLLP6と称する6つの精子-特異的リゾチーム様タンパク質、それらのタンパク質をコードしている核酸配列、および該タンパク質に対して生成される抗体に関する。本来のSLLP1、SLLP2、SLLP3、SLLP4、SLLP5およびSLLP6ペプチドを含む組成物は、避妊薬製剤に使用され得る。さらに、SLLP1、SLLP2、SLLP3、SLLP4、SLLP5およびSLLP6に対して生成した抗体は、診断薬として使用され得るか、精子細胞と卵母細胞との結合を干渉するために使用される組成物に処方されうる。

【0006】

10

20

30

40

50

定義

本発明の説明および請求項において、下記技術用語は、下記の定義に従って使用される。

【0007】

本明細書中で用いるとき、用語「精製した」および同様の語は、元の環境において分子または化合物と通常付随する他成分に比して、分子または化合物が豊富になることに関連する。該用語「精製した」は、特定分子の完全な純度が該過程で達成されていることを必ずしも意味するものではない。本明細書中で用いるときに、「高度に精製した」化合物は、90%以上純粋である化合物を示す。

【0008】

本明細書中で用いるとき、用語「医薬的に許容し得る担体」は、あらゆる標準的な医薬的担体、例えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水型または水/油型などのエマルジョン、および種々の型の湿潤剤を包含する。該用語は、米国連邦政府の管理機関によりヒトを包含する動物に使用するために使用を認可されたあらゆる薬剤や、米国局方に列挙されたあらゆる剤を包含する。

10

【0009】

ポリリンカーは、連続した3つ以上の接近した位置にある制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む核酸配列である。

「作動可能に結合した」は、該成分がそれらの通常の機能を行うように配置された並置を示す。すなわち、コード化配列に作動可能に結合したコントロール配列またはプロモーターは、コード化配列の発現を有効にし得る。

20

【0010】

本明細書中で用いるとき、「核酸」「DNA」および同様の語は、核酸アナログ、すなわちホスホジエステル以外のバックボーンを有するアナログを包含する。例えば、当分野では既知であり、バックボーン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いわゆる「ペプチド核酸」は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0011】

用語「ペプチド」は、3以上のアミノ酸の配列を包含し、この場合、当該アミノ酸は、天然または合成の(非天然)アミノ酸である。ペプチド擬態は1以上の下記の修飾を有するペプチドを包含する：

30

【0012】

1. 1以上のペプチジル-C(O)NR-結合が、例えばCH₂カルバメート結合(-CH₂OC(O)NR-)、ホスホン酸塩結合、CH₂スルホンアミド(-CH₂S(O)₂NR-)結合、尿素(-NHCO)NH-)結合、-CH₂-二次アミン結合のような非ペプチジル結合によって置換されるか、またはアルキル化ペプチジル結合(-C(O)NR-)(式中、RはC₁-C₄アルキルである)によって置換されている、ペプチド、

【0013】

2. N末端が、-NRR₁基、-NRC(O)R基、-NRC(O)OR基、-NRS(O)₂R基、-NHCO)NHR基、式中、RおよびR₁は水素またはC₁-C₄アルキルであるが、但しRおよびR₁両方が水素ではない、に誘導されているペプチド；

40

【0014】

3. C末端が、-C(O)R₂(式中、R₂はC₁-C₄アルコキシからなる群から選択される)、NR₃R₄(式中、R₃およびR₄は、水素およびC₁-C₄アルキルからなる群から独立して選択される)に誘導されているペプチド。

【0015】

ペプチド中の天然アミノ酸残基は、下記のように、IUPAC IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨されているとおり略される：フェニルアラニンはPheまたはFである；ロイシンはLeuまたはLである；イソロイシンはIleまたはIである；メチオニンはMetまたはMである；ノルロイシンはNleである；バリンはValまたはVである；セリンはSerまたはSである；プロリンはProまたはPであ

50

る；スレオニンはThrまたはTである；アラニンはAlaまたはAである；チロシンはTyrまたはYである；ヒスチジンはHisまたはHである；グルタミンはGlnまたはQである；アスパラギンはAsnまたはNである；リシンはLysまたはKである；アスパラギン酸はAspまたはDである；グルタミン酸はGluまたはEである；システインはCysまたはCである；トリプトファンはTrpまたはWである；アルギニンはArgまたはRである；グリシンはGlyまたはGである、そしてXは任意のアミノ酸である。他の天然アミノ酸は、実施例の方法では、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリシンおよび類似物を包含する。

【0016】

合成または非天然アミノ酸は、イン・ピボで天然に存在しないアミノ酸のことをいうが、いうまでもなく、本明細書に記載のペプチド構造に導入され得るアミノ酸である。得られる「合成ペプチド」は、ペプチドの1、2またはそれ以上の位置でアミノ酸を遺伝的にコードした、20個の天然アミノ酸以外のアミノ酸を含有する。例えば、ナフチルアラニンはトリプトファン(tryptophan)に置換されて、合成を促進し得る。ペプチド内で置換され得る他の合成アミノ酸は、L-ヒドロキシプロピル、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニル、 α -アミノ酸、例えばL- α -ヒドロキシリシル(hydroxylysyl)およびD- α -メチルアラニル、L- β -メチルアラニル、 β -アミノ酸およびイソキノリルを包含する。D-アミノ酸および非天然合成アミノ酸もまた、ペプチドに導入され得る。他の誘導体は、20個の遺伝的にコードされたアミノ酸(または、あらゆるLまたはD-アミノ酸)の天然側鎖と別の側鎖との置換を包含する。

10

20

【0017】

本明細書中で用いるとき、用語「保存アミノ酸置換」は、下記5つの群のうちの1つの中のアミノ酸交換として、本明細書中に定義される：

I．小分子脂肪族(small aliphatic)、非極性または弱い極性残基：

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II．極性、陰性荷電残基およびそれらのアミド：

Asp、Asn、Glu、Gln；

III．極性、陽性荷電残基：

His、Arg、Lys；

IV．大分子脂肪族、非極性残基：

Met、Leu、Ile、Val、Cys

V．大分子芳香族基：

Phe、Tyr、Trp

30

【0018】

本明細書中で用いるとき、用語「抗体」は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体またはその結合フラグメント、例えばFab、F(ab')₂およびFvフラグメントをいう。

本明細書中で用いるとき、用語「SLLPポリペプチド」は、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および配列番号：21からなる群から選択される配列を含むアミノ酸配列をいう。

40

【0019】

本明細書中で用いるとき、用語「SLLP抗体」は、配列番号：2、配列番号4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10または配列番号：12からなる群から選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体をいう。

【0020】

本明細書中で用いるとき、SLLPポリペプチドの「生物学的に活性なフラグメント」または「生物活性フラグメント」なる用語は、それらの天然リガンドに特異的に結合し得る天然または合成の一部の完全長タンパク質を包含する。

【0021】

本明細書中で用いるとき、用語「非天然プロモーター」は、コード化配列およびプロモ

50

ーターが天然に関連していない(すなわち、組換え体プロモーター/コード化配列構築体)コード化配列に作動可能に結合したあらゆるプロモーターをいう。

【0022】

本明細書中で用いるとき、トランスジェニック細胞は、導入された核酸配列によりコードされた遺伝子の発現を可能にする様式で、該細胞に導入された核酸配列を含む、あらゆる細胞である。

【0023】

本明細書中で用いるとき、用語「処置する」は、特定の異常または病状に関連する徴候を緩和すること、および/または該徴候を予防または除去することを包含する。例えば、癌を処置することは、癌細胞の増殖および/または分裂を予防または遅延させること、さらに癌細胞を死滅させることを包含する。

10

【0024】

実施態様

精巢に特異的であり、リゾチームCのパラログであると思われる6つのヒト精子タンパク質(SLLP1-6)が近年単離された。これらのタンパク質は、別のリゾチームCにおいて見出された重要なアミノ酸を高度に保存していることから、リゾチームのパラログと分類される。しかし、それらは、既知のヒトのリゾチームCとは核酸およびアミノ酸配列において大きく異なり、それらの遺伝子は異なる染色体上に位置づけられる。

【0025】

全ての既知のリゾチームCの配列(>75)のうち、20個のアミノ酸残基は不変である。SLLP1は、それらの不変アミノ酸の2つ(E35T、D52N)以外の全てを含有している。該アミノ酸35-Eは、触媒機能(すなわち、N-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸との間の多糖結合を解裂する)について重要なアミノ酸であると考えられている。SLLP2は、20個の保存アミノ酸の1つ(D52E)以外の全てを含有する。ヒトにおけるアミノ酸53-Lは、触媒機能に重要なアミノ酸であると考えられている；しかし、g型リゾチームは対応する位置にDを持たない。また、SLLP1およびSLLP2の相同遺伝子は、他の哺乳類(例えば、マウス)から、我々によって単離され、これらの遺伝子の触媒残基において同様の変異を含有している。

20

【0026】

SLLP1およびSLLP2タンパク質は、5.2および5.9のpIを各々有し、15kDaである。該タンパク質は、後に解裂されるN末端シグナルペプチドを伴って発現される。SLLP1およびSLLP2の完全長および成熟形態は、各々配列番号：2と16および配列番号：4と17として提供される。両タンパク質は、既知のヒトのリゾチームCと配列のホモロジーを有する；しかし、SLLP1およびSLLP2は、染色体17およびX-染色体に各々位置づけられている、すなわちこれらの2つの遺伝子は、新規のヒトのリゾチーム様遺伝子である。

30

【0027】

組換えSLLP1およびSLLP2を、E.coliおよび酵母中で発現させた。酵母で発現したタンパク質は、培地中に分泌される形で生成され、そして培地から精製し、リゾチーム活性について試験するためのアッセイに使用した。Pichia pastoris由来のSLLP1およびSLLP2の単離された推定処理形態(SLLP2は組成物として得た)は、リゾチーム基質としてMicrococcus lysodeikticusを用いると、SLLP1およびSLLP2はリゾチーム活性を持たないことが明らかとなった。詳細には、Micrococcus lysodeikticusを、ペトリ皿上でコンフルエントになるまで増殖させ、該細胞を、330UのヒトのリゾチームC(ポジティブコントロールとして)、試薬ブランク(ネガティブコントロールとして)および1650Uの精製した可溶性SLLP1タンパク質(yrSLLP1)と接触させた。リゾチーム活性は、導入サンプルのまわりの阻止円によりヒトのリゾチームC(ポジティブコントロール)部分で観察されたが、yrSLLP1またはyrSLLP2について活性は検出されなかった。同様に、リゾチーム活性はE.coli合成SLLP1またはSLLP2について検出されなかった。

40

50

【0028】

同様に、E.coli系からの発現を基にしたSLLP3は、リゾチーム活性を欠くことがわかった。SLLP3は、5.4のpIを有し、15.0kDaであり、染色体17上の座17q11.2に位置づけられる。SLLP3は、後に解裂されるN末端シグナルペプチドを伴って発現される。SLLP3の完全長および成熟形態は、各々配列番号：6と18として提供される。SLLP3は、ヒトのリゾチームと44%；SLLP1と45%；SLLP2と47%のアミノ酸配列ホモロジーを共有し、両方の触媒性アミノ酸を包含する全ての保存性アミノ酸20個を含有する。組換えSLLP1、SLLP2およびSLLP3は、本アッセイにおいてリゾチーム活性を示さなかったが、これらの化合物は、未知のメカニズムにより抗菌性/抗ウイルス活性を依然示し得る。

10

【0029】

SLLP4は、8.4のpIを有し、14.8kDaであり、染色体10上の座10p12.1に位置づけられる。SLLP4は、後に解裂されるN末端シグナルペプチドを伴って発現される。SLLP4の完全長および成熟形態は、各々配列番号：8と19として提供される。SLLP4は、ヒトのリゾチームと48%；hSLLP1と2と47%；hSLLP3と42%のアミノ酸配列ホモロジーを共有し、両方の触媒性アミノ酸を包含する全ての20個の保存性アミノ酸を含有する。SLLP5は、8.4のpIを有し、14.8kDaであり、染色体10上の座10p11.23に位置づけられる。SLLP5は、後に解裂されるN末端シグナルペプチドを伴って発現される。SLLP5の完全長および成熟形態は、各々配列番号：10&20として提供される。SLLP5は、ヒトのリゾチームと48%；hSLLP1と46%；hSLLP2と47%；hSLLP3と43%；hSLLP4と97%のアミノ酸配列ホモロジーを共有し、両方の触媒性アミノ酸を包含する全ての20個の保存性アミノ酸を含有する。SLLP6は、8.4のpIを有し、14.6kDaであり、染色体3上の座3p21.33に位置づけられる。SLLP6は、後に解裂されるN末端シグナルペプチドを伴って発現される。SLLP6の完全長および成熟形態は、各々配列番号：12&21として提供される。SLLP6は、ヒトのリゾチームと40%；SLLP1と49%；SLLP2と40%；SLLP3と48%；SLLP4と41%；SLLP5と42%のアミノ酸配列ホモロジーを共有し、この2つの触媒アミノ酸の1つのみを包含する20個のうちの16個のアミノ酸を含有する。SLLP4、SLLP5およびSLLP6は、リゾチーム活性について試験されていない。

20

30

【0030】

本発明の一つの実施態様に従って、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10または配列番号：12のアミノ酸配列、あるいは1以上の保存アミノ酸置換により、それらのいずれの配列とも異なるアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチドが提供される。別の実施態様に従って、精製ポリペプチドは、5より少ない保存アミノ酸置換により、またさらなる実施態様において、2より少ない保存アミノ酸置換により、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10または配列番号：12とは異なるアミノ酸配列を含む。本発明の一つの実施態様に従って、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20または配列番号：21のアミノ酸配列、または配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20または配列番号：21のフラグメント、あるいは1~10個の保存アミノ酸置換により配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20または配列番号：21とは異なるアミノ酸配列からなる精製ポリペプチドが提供される。

40

【0031】

本発明のポリペプチドは、組換え的に産生されたポリペプチドの安定化および/または精製を促進するよう別のアミノ酸配列を包含してもよい。これらの追加配列は、当業者には既知の細胞間または細胞内の標的化ペプチドまたは様々なペプチドタグを包含し得る。一つの実施態様において、精製ポリペプチドは、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12およびペプチドタグ（該ペプチドタグはSLLPペプチド配列に結合する）からなる群から選択されるアミノ酸を含む。かかる融合タンパク質を発現する適当な発現ベクターおよび適当なペプチドタグは、当

50

業者には知られており、市販購入し得る。一つの実施態様において、該タグはHisタグを含む。

【0032】

別の実施態様において、本発明は、SLLPポリペプチドのアミノ酸フラグメントを含む精製ポリペプチドに関する。より具体的には、該SLLPポリペプチドフラグメントは、配列番号：6、列番号8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択される完全長の天然または合成部分のポリペプチドからなり、これはそれらの天然リガンドと特異的に結合し得る。一方、該フラグメントは、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるポリペプチドの抗原フラグメントを含み得る。

10

【0033】

一つの実施態様において、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21およびそれらの生物活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドが提供され、該アミノ酸配列は疎水性化合物と結合される。一つの実施態様において、該疎水性化合物は、脂肪酸グリセリドおよびソルビタン脂肪酸エステルからなる群から選択される。一つの実施態様において、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21のアミノ酸配列またはそれらの生物活性フラグメントは、グリセロールのモノまたはジエステルあるいは6～12個の炭素原子を有する脂肪酸と結合する。かかるグリセロールおよび脂肪酸の具体的な例示は、カプロン酸のモノまたはジグリセリド、カプリル酸のモノまたはジグリセリド、カプリン酸のモノまたはジグリセリド、およびラウリン酸のモノまたはジグリセリドである。

20

【0034】

一つの実施態様に従って、組成物はSLLPポリペプチドに対して免疫応答を誘導するために提供される。一つの実施態様において、該組成物は、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12およびそれらの配列の抗原性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列からなる精製ペプチドを含む。一つの実施態様において、該ペプチドは、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20および配列番号：21の群から選択される配列からなる。該組成物は、医薬的に許容し得る担体またはアジュバンドと組合せられ、哺乳類に投与されて、免疫応答を誘導し得る。

30

【0035】

本発明は、ヒトSLLPをコードする核酸配列も包含する。一つの実施態様において、核酸配列は、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11の配列またはそれらのフラグメントを含む核酸配列が提供される。別の実施態様において、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9および配列番号：11からなる群から選択される精製核酸配列が提供される。

【0036】

本発明は、組換え体ヒトSLLP遺伝子構築体に関する。一つの実施態様において、該組換え体遺伝子構築体は、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11またはそれらのフラグメントからなる群から選択される核酸配列に作動可能に結合する非天然プロモーターを含む。別の実施態様において、非天然プロモーターは、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9および配列番号：11からなる群から選択される核酸配列に作動可能に結合される。非天然プロモーターは、予め決定された宿主細胞において発現を可能にする強力な構成的プロモーターが好ましい。これらの組換え体遺伝子構築体は、SLLP遺伝子生成物を合成するトランスジェニック細胞系を生成する宿主細胞に導入され得る。宿主細胞は、広範で多様な真核生物および原核生物から選択されてよく、2つの好ましい宿主細胞は、E.coliおよび酵母細胞である。

40

【0037】

一つの実施態様に従って、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9および配列番号：11からなる群から選択される核酸配列は、遺伝子配列を適切な調節配列に作動可能に結合する様式で真核生物または原核生物発現ベクター中に挿入され、ヒトSLLPは、真

50

核生物または原核生物宿主細胞中で発現される。適当な真核生物宿主細胞およびベクターは、当業者には知られている。パキユロウイルス系は、トランスジェニック細胞を産生し、本発明のSLLP遺伝子を合成するのに適当でもある。本発明の一態様は、ヒトSLLPおよびヒトSLLPコード化配列のフラグメントを発現する組換え体遺伝子を含有するトランスジェニック細胞系に関する。本明細書中で使用する場合、トランスジェニック細胞は外来導入された核酸配列を含むあらゆる細胞である。

【0038】

一つの実施態様において、導入された核酸は、トランスジェニック細胞において十分に安定であり、後代細胞に伝搬される(すなわち、細胞ゲノムに導入されるか、あるいは高複製プラスミド中に存在する)。該細胞は、標準的細胞培養方法を用いるか、別の実施態様において、イン・ビトロで伝搬され得る。該宿主細胞は真核生物細胞であり、植物または動物(例えば、トランスジェニック動物を包含する)の部分として増殖される。一つの実施態様において、該トランスジェニック細胞は、ヒトの細胞であり、配列番号: 5、配列番号: 7、配列番号: 9および配列番号: 11からなる群から選択される核酸配列を含む。本発明は、1以上の細胞のトランスジェニック生物体が発現する組換え体遺伝子を含む非ヒトトランスジェニック生物体も包含する。

10

【0039】

本発明は、ヒトSLLPを産生する方法を包含する。該方法は、配列番号: 1、配列番号: 3、配列番号: 5、配列番号: 7、配列番号: 9および配列番号: 11からなる群から選択される配列と作動可能に結合されたプロモーターを含む核酸配列を宿主細胞に導入し、該宿主細胞を、導入されたヒトSLLP遺伝子の発現を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程を含む。一つの実施態様において、該プロモーターは、条件的または誘導性プロモーターであり、一方該プロモーターは、組織特異性または暫定的に制限されたプロモーター(すなわち、作動可能に結合された遺伝子は、特異的組織または特定時間においてのみ発現する)であってよい。合成されたSLLPは、標準的技術を用いて精製されるし、SLLP活性の阻害剤を識別するために高処理量スクリーニング(high throughput screens)で使用され得る。あるいは、一つの実施態様において、組換え産生されたSLLPポリペプチドまたはそれらのフラグメントを使用して、SLLPポリペプチドに対する抗体を生成する。組換え産生されたSLLPタンパク質は、結晶構造を得るために使用され得る。かかる構造は、SLLP機能を阻害するための特異的な薬剤の設計へと導く結晶学的分析を可能にする。

20

30

【0040】

好ましくは、SLLPをコードしている核酸配列は、予め選択された宿主細胞中における発現に適切な調節配列と遺伝子配列を作動可能に結合する様式で適当な発現ベクターに挿入される。適当な宿主細胞、ベクターおよびDNA構築体を細胞に導入する方法は、当業者には知られている。特に、SLLPタンパク質をコードしている核酸配列は、例えば、リポソーム、ウイルスベクターまたはマイクロ注入などの送達メカニズムを用いて、細胞またはイン・ビトロまたはイン・ビボの細胞に添加され得る。

【0041】

本発明の別の実施態様は、1以上の哺乳類SLLPに特異的な抗体に関する。ヒトSLLPに対する抗体は、当業者にはよく知られている方法を用いて生成され得る。一つの実施態様によれば、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10および配列番号: 12からなる群から選択されるポリペプチドに結合する抗体が提供される。一つの実施態様において、該抗体は、ポリペプチドの配列番号: 8および配列番号: 10に特異的に結合する。一つの実施態様において、該抗体は、配列番号: 6のペプチド配列に特異的に結合する。一つの実施態様において、該抗体は、配列番号: 8のペプチド配列に特異的に結合する。一つの実施態様において、該抗体は、配列番号: 10のペプチド配列に特異的に結合する。一つの実施態様において、該抗体は、配列番号: 12のペプチド配列に特異的に結合する。一つの実施態様において、該抗体はモノクローナル抗体である。該抗体は、修飾して用いるか、または修飾せずに使用され、共有結合または非共有結合のいずれかでレポー

40

50

ター分子とそれらを結合することによって標識され得る。さらに、該抗体は、標準的担体を用いて処方され、所望により治療用または診断用組成物を調製するために標識される。

【0042】

本発明の抗体または抗体フラグメントは、担体または希釈剤と組み合わせて、組成物を形成し得る。一つの実施態様において、該担体は、医薬的に許容し得る担体である。かかる担体および希釈剤は、界面活性剤の添加を伴うか、または添加を伴わないこともあり、滅菌液体、例えば水および油、および他の薬学的かつ生理学的に許容し得る担体、例えばアジュバンド、賦形剤または安定剤を包含する。例示的な油としては、石油、動物、植物または合成の起源のもの、例えばピーナツ油、ダイズ油、または鉱油がある。一般的には、水、生理食塩水、水性デキストロース、関連の糖溶液、およびグリコール、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどが液体担体として、特に注射可能溶液として好まれる。

10

【0043】

本発明は、ヒトSLLPの存在を検出するための方法も提供する。該方法は、サンプルをヒトSLLPに特異的に結合する標識抗体と接触させ、非結合物質および非特異的結合物質を除去し、そして標識抗体の存在を検出する工程を含む。一つの実施態様において、標識化合物は、直接的または間接的(すなわち、標識された二次抗体を介して)に標識されている抗体を含む。特に、本発明のSLLP抗体は、SLLPの発現さらにその細胞局在性を確認するために使用され、または、避妊手段としてSLLP阻害剤組成物が投与される個体のSLLPレベルをモニターするアッセイにおいて使用される。

20

【0044】

SLLP1および2のノーザン・ブロット分析は、精巣において独占的に産生されないとしても、これらのタンパク質は精巣に非常に豊富であることを示した。SLLP1およびSLLP2の発現をさらに特性分析すると、抗体がSLLP1およびSLLP2に対して生成されていた。それらの抗体は、標的ペプチドに特異的であり、各々他のリゾチーム様タンパク質各々と交差反応しない。SLLP1免疫蛍光およびSLLP1およびSLLP2EM局在試験は、SLLP1およびSLLP2タンパク質の発現が、精子アクロソームに局在することを示す。さらに、ESTデータを基にすると、SLLP3-6は、精巣中で主に発現されることもわかる。より具体的には、SLLPアミノ酸配列のブラスト探査により、EST配列は主に精巣に存在することがわかった(すなわち、SLLP3につ

30

【0045】

SLLPポリペプチドは精子に特別な機能を有すると予測され、すなわち、それらは避妊薬組成物における用途をもたらし、および/または避妊薬剤を生み出す標的として役立つこと考えられる。一つの実施態様において、SLLPポリペプチドまたはフラグメントを含む組成物は、直接的または免疫応答の誘導を介してのいずれかにより避妊薬効果を与えるように投与される。例えば、一つの実施態様によれば、1以上の個々のSLLPポリペプチドまたはそれらの抗原性フラグメントを含む組成物は、能動免疫応答を誘起させるために対象に送達される。該抗原組成物に対する応答において生じた免疫応答は、本発明のSLLPタンパク質機能に関する一過的および可逆的アンタゴニストとして作用する。かかるワクチンは、対象の能動免疫化に使用され、抗体応答をおこして、卵細胞膜抗原への精子の接近を一時的に阻害する。本発明の一態様において、SLLPエピトープは、月の一定期間、例えば雌対象の排卵中に投与し、受精を妨害し得る。一方、避妊法は、1以上のSLLPポリペプチドについて特異的な抗体を含む組成物の投与によって受動免疫を通じて効果をもたらし得る。

40

【0046】

50

本発明の別の態様において、S L L Pポリペプチド(別々にまたは組み合わせて)は、オトリテック(othoritic)効果を有し、不可逆的不妊方法として有用な、卵細胞または精子に対するT細胞媒介アタックを誘起するために使用され得る。T細胞特異的応答を発生させる方法、例えば、養子免疫治療のための方法は、当業者にはよく知られている(例えば、Vaccine Design, Michael F. Powell and Mark J. Newman Eds., Plenum Press, New York, 1995, pp 847-867を参照されたい)。このような技術は、単回用量の予防接種が望まれる獣医用避妊薬または不妊目的のためには特に有用であり得る。

【0047】

本発明は、S L L P機能の小分子阻害剤および避妊薬剤としてのそれらの使用を包含する。本発明の一態様によれば、該S L L Pファミリーは、新規薬物の開発のための標的として使用され、一つの実施態様においては、それらの天然のリガンドへの結合からS L L Pを特異的に阻害する化合物である。高処理量スクリーニングと組み合わせた組合化学方法を用いた小分子ライブラリー生成の分野における進歩は、理想的な細胞透過性阻害剤についての探索を促進してきた。さらに、結晶学的方法を用いる構造ベースの設計により、リガンド設計のために活用しうるリガンド-タンパク質相互作用部位を詳細に特徴分析する能力が改良された。

10

【0048】

一つの実施態様において、本発明は、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12またはそれらの生物活性フラグメントからなる群から選択される配列を含むポリペプチドと相互作用する、薬剤、小分子またはタンパク質をスクリーニングする方法を提供する。別の実施態様において、本発明は、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21またはかかる配列の生物活性フラグメントからなる群からなる配列を含むポリペプチドと相互作用する、薬剤、小分子またはタンパク質スクリーニングする方法を提供する。本明細書中で使用する場合、用語「生物学的に活性なフラグメント」または「生物活性フラグメント」は、各々の天然のS L L Pポリペプチドの少なくとも1つの天然リガンドに特異的に結合し得る天然ペプチドの天然または合成部分を包含する。本発明は、S L L Pに結合するか、S L L Pの活性を調節し、そのようにして受精能力に対する治療上または診断用のマーカーとして有用である小分子、化合物、組換えタンパク質、ペプチド、核酸、抗体などをスクリーンするためのイン・ピボおよびイン・ビトロアッセイの両方を包含する。本明細書中で使用する場合、S L L Pの活性を調節することは、S L L Pリガンド結合特性を干渉するかまたは変化させることを包含する。

20

30

【0049】

本発明の一つの実施態様において、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、および配列番号：12からなる群から選択されるS L L Pポリペプチドを用いて、生理学的条件下でS L L Pタンパク質に結合するリガンドを単離するのに使用される。スクリーニング方法は、生理学的条件下で、S L L Pポリペプチドと化合物の混合物と接触させ、非結合物質および非特異的結合物質を除去し、そしてS L L Pポリペプチドへの結合を維持している化合物を単離する工程を含む。一般的に、該S L L Pポリペプチドは、標準的技術を用いて固体支持体に結合され、迅速な化合物のスクリーニングに可能にする。該固体支持体は、生物学的化合物を固定するのに使用されてきたあらゆる表面から選択され得る。該固体支持体は、ポリスチレン、アガロース、シリカまたはニトロセルロースを包含するが、これに限定するものではない。一つの実施態様において、該固体表面は、機能修飾されたシリカまたはアガロースビーズを含む。かかる化合物のためのスクリーニングは、医薬薬剤のライブラリーおよび当業者には既知の標準的技術を用いて達成され得る。

40

【0050】

次いで、S L L Pポリペプチドに結合するリガンドは、実施例2および実施例3に記載した結合および融合アッセイを用いて、それらが精子/卵母細胞結合と干渉するかどうかを決定するために、さらに分析され得る。S L L P活性の阻害剤は、避妊薬剤として使用される可能性を有する。かかる阻害剤は、医薬組成物として処方され得るし、精子/卵母細胞結合および融合を遮断するために対象に投与され、そうして避妊のための手段を提供す

50

ることができる。

【0051】

本発明の一つの実施態様によれば、哺乳類卵母細胞への哺乳類精子の結合および融合を低下させる方法が提供され、ここで、SLLPタンパク質の活性が、例えばそれらの天然リガンドを有するSLLPの結合活性を含めて、阻害される。一つの実施態様において、哺乳動物はヒトであり、医薬組成物はSLLP活性の阻害剤を含む。該阻害剤は、抗体、小分子、アンタゴニスト、またはSLLPポリペプチドそれ自体、さらにSLLPポリペプチドの発現を阻害する化合物またはヌクレオチド構築体（転写ファクター阻害剤、アンチセンスおよびリボザイム分子、または遺伝子または調節配列置換構築体を包含するが、これに限定するものではない）を含み得る。

10

【0052】

一つの実施態様において、動物におけるSLLP遺伝子の発現を防止するか中断させるアンチセンスまたは干渉RNAを含み、精子/卵細胞結合および/または融合を阻害する組成物が提供される。哺乳類系中の干渉RNAには、19-22 ntの二本鎖RNA分子からなる短い干渉RNA (siRNA)、またはループ配列と結合される19-29 ntのパリンドローム配列からなるshRNAの存在が包含される。遺伝子発現のダウンレギュレーションは、相同なsiRNAと標的RNAとの対を形成することにより、配列特異的手法で達成される。siRNAまたはshRNAの安定な発現のための系は、トランスジェニック動物を作成するのに利用され (Hasuwa et al. FEBS Lett 532, 227-30 (2002), Rubinson et al. Nat Genet 33, 401-6 (2003) および Carmell et al. Nat Struct Biol 10, 91-2 (2003))、そして受精能力が制御され得る動物を作成するために本発明に従って使用され得る。条件的RNA i ベース形質転換系は、該動物の生存中に与えられるどのような段階でも、遺伝子発現のレベルを制御し得るさらなる価値を提供する。

20

【0053】

別の実施態様において、1以上のSLLPに対する抗体を含む、精子/卵細胞結合および/または融合を阻害する組成物が提供される。一つの実施態様によると、6つ全てのSLLPポリペプチドに特異的に結合する抗体が提供される。一方、該組成物は、1または2つの個体のSLLPポリペプチドに特異的である抗体を含み得る。一方、一つの実施態様において、SLLP1またはSLLP2（すなわち、配列番号：2および4のアミノ酸配列）以外のSLLP3、SLLP4、SLLP5およびSLLP6ポリペプチド（すなわち、配列番号：6、8、10および12のアミノ酸配列）に特異的に結合する抗体が提供される。別の実施態様によれば、SLLP4およびSLLP5に特異的に結合する抗体が提供される。別の実施態様において、SLLP3に特異的に結合する抗体が提供される。別の実施態様において、SLLP6に特異的に結合する抗体が提供される。一つの実施態様において、SLLP3、SLLP4、SLLP5またはSLLP6のポリペプチド、それらのフラグメント、または他の誘導體、またはそれらのアナログは、免疫特異的に結合する抗体を生成するための免疫原として使用される。本発明の一つの実施態様において、抗原化合物は、抗体を生成するために提供され、該化合物は、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12（またはそれらの抗原フラグメント）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。生成された抗体は、標準的担体と共に処方され、また所望により治療用または診断用組成物を調製するために標識される。

30

40

【0054】

SLLPポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対する抗体は、当業者にはよく知られた方法を用いて生成され得る。抗体生成のために、様々な宿主動物（ここで、ウサギ、マウス、ラットなどを包含するが、これに限定するものではない）は、SLLPポリペプチドまたはそれらのペプチドフラグメントによる注射によって免疫され得る。様々なアジュバンドは、宿主種により、免疫学的応答を増加させるために使用され、アジュバンドは、フロイントのアジュバンド（完全なおよび不完全な）、無機ゲル、例えばアルミニウム水酸化物、界面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、スカシ貝ヘモシアニン、ジニトロフェノールおよ

50

び潜在的に有用なヒトアジュバンド、例えば B C G (bacille Calmette-Guerin) および *corynebacterium parvum*. を包含するが、これに限定するものではない。

【 0 0 5 5 】

モノクローナル抗体の製造のために、培養のセルライン系によって抗体分子の生成のためのあらゆる技術が用いられ得る。例えば、ハイブリドーマ技術は、ヒトモノクローナル抗体を産生するために、当初、Kohler and Milstein (1975, Nature 256:495-497) によって開発され、さらにトリオーマ (trioma) 技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72) および E B V - ハイブリドーマ技術 (Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) により開発され、ヒトモノクローナル抗体を生成する。本発明のさらなる実施態様において、モノクローナル抗体は、最近の技術 (P C T / U S 9 0 / 0 2 5 4 5) を利用して無菌動物中で産生され得る。本発明に従って、ヒト抗体を用いて、ヒトハイブリドーマ (Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030) を用いるか、ヒト B 細胞を E B V ウイルスを用いて (Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibody and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96) イン・ビトロで形質転換することによって得られる。実際、本発明によれば、S L L P ポリペプチドのエピトープに特異的なマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒にスプライシングすることによって「キメラ抗体」を産生するために開発された技術 (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) を用い得る；例えば「ヒト化」抗体は本発明の範囲内である。

10

20

【 0 0 5 6 】

本発明によれば、1本鎖抗体の製造のために記載された技術 (米国特許番号 4 9 4 6 7 7 8) は、S L L P タンパク質に特異的な1本鎖抗体を生成するために適用し得る。本発明のさらなる実施態様は、F a b 発現ライブラリーの構築体のために記載された技術を利用し (Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281)、卵細胞表面タンパク質、誘導体、またはアナログに対する所望の特異性を有するモノクローナル F a b フラグメントの迅速かつ簡単な同定を可能にする。

【 0 0 5 7 】

分子の遺伝子型を含有する抗体フラグメントは、既知の技術によって生成され得る。例えば、かかるフラグメントは、抗体分子のペプシン消化によって製造され得る F (a b ')₂ フラグメント；F (a b ')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得る F a b ' フラグメント、抗体分子をパインおよび還元剤によって処理することによって生成され得る F a b フラグメントおよび F v フラグメントを包含するが、これに限定するものではない。

30

【 0 0 5 8 】

抗体の生成において、所望の抗体についてのスクリーニングは、当業者には既知の技術、例えば、E L I S A (酵素-結合免疫吸着剤アッセイ) によって達成され得る。前述の抗体は、本発明の S L L P ポリペプチドの局在性および活性に関連する当業者には既知の方法、例えばこれらのタンパク質を画像化し、適切な生理学的サンプル中のレベルの測定、診断方法などに使用され得る。

40

【 0 0 5 9 】

本発明に従って生成された抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ (すなわち、「ヒト化」抗体)、一本鎖 (組換え体)、F a b フラグメントおよび F a b 発現ライブラリーによって産生されるフラグメントを包含し得るが、これに限定されない。これらの抗体は、S L L P ポリペプチドの発現または過剰発現によって特徴付けられる症状または疾患を診断するための診断剤として、または S L L P ポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤の有効性をモニターするためのアッセイにおいて使用され得る。診断目的のための有用な抗体は、治療のために上記と同じ方法で調製され得る。該抗体は、修飾するかまたは修飾しないで使用され、そしてレポーター分子と、共有結合ま

50

たは非共有結合のいずれかで、それらを結合することによって標識され得る。

【0060】

一つの実施態様において、SLLPポリペプチドに対する抗体は、精子細胞と卵細胞との結合を防止する避妊薬剤として使用される。SLLP1およびSLLP2に対する抗体が、ヒト精子の卵に結合する(実施例2を参照されたい)能力と干渉するかどうかを決定するために実験を行った。該アッセイを、イン・ビトロでヒトの精子とハムスターの卵を用いて行った。SLLP1およびSLLP2は、アクロソーム膜上に存在し、アクロソームの透過化処理時に唯一暴露される。精子の約1/3のみが、イン・ビトロでのアクロソーム反応を受ける。実施例2に示されるように、SLLP1に対する抗体は、ハムスターの卵細胞に結合する精子細胞と有意に干渉される。SLLP2に対して生成された抗体につ

10

【0061】

組換え体ヒトSLLP1は、酵母およびE.coliで発現しており、該組換えタンパク質は、マウスおよびハムスターの卵細胞両方の卵細胞マトリックス付近に結合することがわかった。組換え体ヒトのリゾチームは、E.coliで発現されるが、このタンパク質はマウスの卵細胞に結合できない。従って、卵細胞に結合しているSLLP1は、透明帯の物理的除去後であっても残存する特異的な相互作用が存在するようである。推定基質結合残基の保持を包含する類似のcリゾチーム様配列および組織を有するヒト精子のアクロソーム

20

30

【0062】

本発明の一つの実施態様は、SLLPポリペプチドまたはこれらタンパク質の天然リガンド/レセプターの機能を阻害するために(すなわち、SLLP1、SLLP2、SLLP3、SLLP4、SLLP5、SLLP6タンパク質の発現を阻害するか、または該タンパク質の機能と干渉する)、精子または卵母細胞と接触する場所に置かれ得る組成物、に関する。一つの実施態様において、該SLLP阻害化組成物は、SLLPポリペプチドのペプチドフラグメントまたは精子または卵細胞によって取り込まれるそれらのアナログを含み、SLLPポリペプチドの天然リガンドとの結合に競合する。一つの実施態様は、外来的に加えられたSLLPペプチドは、天然のSLLPと精子および卵細胞の結合および融合に干渉する。従って、SLLPポリペプチド阻害剤を含む組成物は、個体の受精能力を調節するのに使用し得るし、一つの実施態様において、該阻害剤は、男性避妊医薬として機能する。一つの実施態様において、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10または配列番号：12からなる群から選択される配列の8~15個の連続するアミノ酸配列と同一の8~15個のアミノ酸配列、および医薬的に許容し得る担体を含む組成物が提供される。

40

【0063】

一つの実施態様において、該組成物は、精子の卵母細胞への結合を阻害するために処方され、該組成物は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、およびかかる配列の生物活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。より具体的には、該組成物は、哺乳類

50

精子の哺乳類卵細胞への結合を阻害し、一つの実施態様において、該組成物を使用して、ヒト精子のヒト卵細胞への結合を阻害する。

【0064】

一つの実施態様において、精子/卵細胞干渉組成物は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるアミノ酸配列のペプチドフラグメントを含むか、または一つの実施態様において、該組成物は、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20および配列番号：21からなる群から選択されるアミノ酸配列のペプチドフラグメントからなる。例えば、該ペプチドフラグメントは、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるアミノ酸配列内に含まれる連続する配列と同一の、約50～約100、約4～約40、約5～約20、約6～約15または約8～12個のアミノ酸長範囲のアミノ酸配列を示し得る。本明細書中で使用する場合、該用語「ペプチドフラグメント」は、親ポリペプチドの酵素的フラグメント、合成された組換え体ペプチドフラグメント、または化学的に合成されたポリアミノ酸のいずれか製造された親ポリペプチドのアミノ酸サブセットを包含すると意図される。一つの実施態様において、該組成物は、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20または配列番号：21のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む。別の実施態様において、該組成物は、配列番号：2、配列番号：16のアミノ酸配列、または配列番号：2の生物活性フラグメントからなるポリペプチドを含む。配列番号：2のアミノ酸配列またはそれらのフラグメントを含む該組成物は、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21および配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21のペプチドフラグメントからなる群から選択される第二ポリペプチドと、さらに組み合わされ得る。

【0065】

該精子/卵細胞干渉組成物は、通常、医薬的に許容し得る担体を包含する。さらに、該組成物はまた、安定化剤およびペプチド送達を促進する薬剤も包含し得る。一つの実施態様において、該SLLPポリペプチドまたはそれらのペプチドフラグメントは、経皮的に送達されるように製剤され得る。かかる製剤において、該SLLP組成物は、ポリエチレングリコール、2～4個の炭素原子を有する一価アルコール、乳酸、チオグリコール、脂肪酸グリセリド、およびソルビタン脂肪酸エステルからなる群から選択される化合物を含み得る。かかる阻害剤ペプチドは、精子細胞および/または卵細胞膜を通過する際に該ペプチドをアシストするために脂肪酸側鎖を包含するように修飾され得る。

【0066】

本発明の経皮投与の医薬組成物は、一般的に、懸濁液またはゲルを製造するために非毒性の医薬的に許容し得る液体基材中に、薬学的に活性な物質および他の成分を分散することによって製造される。経皮製剤を製造するための技術は、米国特許番号6106856および4637930（出典明示により、本明細書の一部とする）に記載されているように、当業者には既知である。一つの実施態様において、該SLLPポリペプチド/ペプチドは、ポリエチレングリコール、cisオレイン酸、ジメチルイソソルバイド（dimethylisoborbide）およびプロピレングリコールからなる群から選択される化合物と組合される。各成分の比率は、0.1～98mole分画%の間で変化され得る。一つの実施態様において、該処方は、ポリエチレングリコール中に分散された1～10mole%のcis-オレイン酸および1～10mole%のジメチルイソソルビタンを包含する。

【0067】

別の実施態様において、SLLPポリペプチド/ペプチドおよびプロピレングリコール、2～4個の炭素原子を有する一価アルコール、乳酸、チオグリコール、中鎖脂肪酸グリセリド、およびソルビタン中鎖脂肪酸エステルおよび尿素からなる群から選択される化合物を含む経皮製剤が調製され、該液体は経皮製剤状態において存在する。本発明における使用のための、2～4個の炭素原子を有する一価アルコールの例は、エタノール、プロパノール、イソプロパノールなどである。本発明における使用のための、中鎖脂肪酸グリセ

リドの例は、グリセロールのモノまたはジエステルおよび6～12個の炭素原子を有する脂肪酸である。かかるグリセロールおよび脂肪酸の特定の例は、カプロン酸モノまたはジグリセリド、カプリル酸モノまたはジグリセリド、カプリン酸モノまたはジグリセリド、およびラウリン酸モノまたはジグリセリドである。これらの物質は、単に、2以上の物質の混合物として使用され得る。例えば、54.3%のカプリル酸モノグリセリドおよび37%カプリル酸ジグリセリドの混合物は、商標名「Nikkol MGK」(Nikko Chemicals Co.製造)として市販購入でき、また85%以上のカプリル酸モノグリセリドを含有する製品は商標名「Sunsoft No. 700p-2」(Taiyo Kagaku K.K.製造)として市販購入し得る。本発明において使用するための、ソルビタン中鎖脂肪酸エステルとして、ソルビトールのモノまたはジエステルおよび6～12個の炭素原子の脂肪酸が存在する。これらのエステルの特定の例は、ソルビタンモノカプロン酸エステル、ソルビタンジカプロン酸エステル、ソルビタンモノカプリル酸エステル、ソルビタンジカプリル酸エステル、ソルビタンモノラウリン酸エステル、ソルビタンジカプリン酸エステル、ソルビタンモノラウリン酸エステル、およびソルビタンジラウリン酸エステルである。それらは、単独でまたはそれらの混合物として使用され得る。

10

20

30

40

50

【0068】

SLLP含有組成物は、直接膣に投与されるように処方されてもよい。一つの実施態様に従って、子宮頸または膣への局所的全身投与のためにSLLPポリペプチドを含む自己投与し得る避妊組成物が提供される。該組成物は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6および配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるアミノ酸配列、および堅くない医薬的に許容し得る粘性ゲル、クリーム、泡沫または起沸性型座薬ビヒクルを含む。適当なゲル、クリーム、泡沫および座薬送達ビヒクルは、当業者にはよく知られており、本発明の局所的な避妊組成物を調製するのに使用され得る。

【0069】

本発明の別の実施態様において、SLLPポリペプチドの特異的卵細胞結合特性は、それらを、イン・ビボで卵巣および卵母細胞を画像化するための使用を可能にする。一つの実施態様において、画像化組成物(イメージング組成物)は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10および配列番号：12からなる群から選択されるアミノ酸配列、またはそれらの生物活性フラグメントを含んでおり、このアミノ酸配列は、検出し得る標識により直接または間接的のいずれかで標識される。本明細書中で使用する場合、該用語「標識」は、検出し得る(好ましくは、定量し得る)「シグナル」を提供するのに使用され、タンパク質に結合され得るあらゆる原子または分子をさす。標識は、蛍光、放射活性、比色形、重量測定、X線回析または吸収、磁力、酵素活性などによって検出し得る「シグナル」を提供し得る。本発明は、非侵襲性手段の使用によりイン・ビボで検出し得る標識を必要とするほかは、任意の特定の検出系や標識に限定するという意図はない。かかる標識および検出系は、当業者には既知である。例えば、該ポリペプチドは、金属イオン源、例えば、三塩化ガドリニウム、三塩化ジスプロシウムまたはテクネチウム(technicium)またはインジウム誘導体で標識され得る。

【0070】

一つの実施態様によれば、標識SLLPポリペプチドの使用による卵母細胞の画像化は、雌の卵巣に存在する卵母細胞の数を定量化するのに使用されるか、または別の実施態様において、卵巣癌を検出するために使用され得る。卵母細胞の画像化は、早発閉経に罹患する患者を同定するための重要な診断用ツールであり得る、すなわち、全ての卵母細胞を消失する前の処置を可能にする。一つの実施態様によれば、イン・ビボでの卵母細胞画像化の非侵襲的方法は、雌患者に標識SLLPポリペプチドを含む組成物を投与し、次いで該組成物の投与後に予め決められた期間の後に該標識を検出する工程を含む。一つの実施態様によれば、該組成物は局所薬剤として膣に投与されるが、直接注射または、卵巣または経皮投与に近接する注射を含む他の投与経路が当業者には知られており、該組成物の投与に使用され得る。

【0071】

本発明の別の態様において、SLLP5およびSLLP6に対応するESTが腫瘍組織において検出されるので、これらのタンパク質の体腔発現は、新生物疾病のマーカーとして機能し得る。従って、本発明の一つの実施態様は、新生物疾病、例えば癌についての診断用マーカーとして、SLLP、特にSLLP5およびSLLP6の使用に関する。該方法は、体腔組織におけるSLLPの発現を包含するSLLPの高レベルのまたは適切な発現についてスクリーニングする工程を含む。かかるスクリーンは、SLLPポリペプチドについて特異的な抗体を用いて行い得る。一方、SLLPポリペプチドに対する抗体は、治療効果をモニターするために、抗癌治療に処置されている患者をモニターするためのアッセイに使用され得る。

10

【0072】

実施例1

SLLP1およびSLLP2タンパク質の単離

材料および方法

ヒト精子タンパク質の可溶化および電気泳動

精子試料の調製および精子タンパク質の可溶化を、文献のとおり実施した(Naaby-Hansen et al, Biol Reprod 1997; 56:771787)。分析的二次元電気泳動のために、洗剤/尿素抽出タンパク質を、二次元ゲル電気泳動(SDS-PAGE)の前にアクリルアミドチューブゲルで等電点(IEF)により分離した。これは、Protean II xi Multi-Cell 装置(Bio-Rad, Richmond, CA)で行うか、またはこれらは分画用2Dゲル電気泳動にも用いられる大きなフォーマットゲル上(23 x 23 cm) (Investigator 2-D Electrophoresis System, ESA)で行った。ニトロセルロース膜への電氣的転写、続く金染色によるタンパク質の視覚化を前記したとおりに完了し(Naaby-Hansen et al, 1997)、Matsudaira (1987)の転写緩衝液組成物(10 mM 3-[シクロヘキシルアミノ]-1-プロパンスルホン酸、10% メタノール、pH 11)を用いてPVD膜(0.2 mm孔サイズ, Pierce)への電氣的転写をHenzelら(1993)によって記載されたとおりに実施した。該固定化タンパク質を、0.1% Comma sie R250、40% メタノールおよび0.1% 酢酸を含有する溶液で1分間染色し、次いで10% 酢酸および50% メタノールの溶液で3分間3回脱染色することによって視覚化した。

20

【0073】

SLLP1およびSLLP2タンパク質の微量配列決定

SLLP1およびSLLP2染色タンパク質スポットを、1.5 mm厚の2D SDS-ポリアクリルアミドゲルから抜き取り、小片に断片化した。該タンパク質を、メタノールで脱染色し、10 mM ジチ雄レイトールで還元し、0.1 M 二酸化アンモニウム中の50 mM ヨウ化アセトアミドでアルキル化した。該試薬の除去後、該ゲル片を50 mM 二酸化炭素アンモニウム中の12.5 ng/ml トリプシン溶液と共に、終夜37°Cでインキュベートした。ペプチドをゲル片から5% 蟻酸中50% アセトニトリルに抽出し、バージニア大学の生体分子研究施設で、タンデム質量分析およびエドマン分解により微量配列決定した。配列中のロイシンおよびイソロイシンの区別を、HPLC単離ペプチドのエドマン分解の配列決定によって決定した。縮重デオキシイノシン含有プライマーを用いて、微量配列決定データを基にして、PCR技術を用いてSLLP1およびSLLP2 cDNAクローンを単離した。

30

40

【0074】

ノーザンおよびドット・プロット分析

8つの選択されたヒト組織由来の2 mgのポリ(A)⁺ RNAを含有するノーザン・プロットをClontechから得た。ノーザン・プロットを、³²P-標識したSLLP1 cDNAまたは³²P-標識したSLLP2 cDNAでプローブした。プローブを、ランダムオリゴヌクレオチド・プライム標識によって調製した(Feinberg and Vogelstein, 1983)。ハイブリダイゼーションを、Express Hyb溶液(Clontech)中で68°C 1時間行い、その後2 x SSC、0.05% SDSにおいて室温3回洗浄し、0.1 x SSC、0.1% SDSにお

50

いて20分間50 で2回洗浄した。

【0075】

50個の異なるヒト組織由来の89~514 ngのmRNAを含有する標準化RNAドット・プロットを、Clontechから得て、³²P-標識したSLLP1 cDNAまたは³²P-標識したSLLP2 cDNAでプローブした。グリッド上に存在する標準化したポリ-(A)+mRNA(100-500 ng)を、次の組織を含む多様な組織源から単離した：全脳、骨髄へん桃核、尾状核、小脳、大脳皮質、前頭葉、海馬、延髄、後頭葉、被殻、黒質、側頭葉、視床、視床下核、脊髄、心臓、大動脈、骨格筋肉、結腸、膀胱、子宮、前立腺、胃、精巣、卵巣、膵臓、脳下垂体、副腎、甲状腺、唾液腺、乳腺、腎臓、肝臓、小腸、脾臓、胸腺、末梢白血球、リンパ節、骨髄、虫垂、肺、気管、胎盤、胎児の脳、胎児の心臓、胎児の腎臓、胎児の肝臓、胎児の脾臓、胎児の胸腺、胎児の肺、および100 ng 酵母全RNA、100 ng 酵母tRNA、100 ng E.coli rRNA、100 ng E.coli DNA、100 ng ポリr(A)、100 ng Cot1ヒトDNA、100 ng ヒトDNA、500 ng ヒトDNA。該プロットを、サケ精子DNAおよびヒト胎盤Cot-1 DNAを含有するExpressHyb 溶液 (Clontech)中、終夜65 でハイブリダイズした。次いでプロットを、2xSSC、1% SDS中、65 で3回洗浄し、次いで該フィルターをX線フィルムに暴露する前に55 で0.1xSSC、0.5% SDSでさらに2回洗浄した。ハイブリダイゼーションは、精巣のRNAドット中で唯一検出された。

10

【0076】

実施例2

透明帯不含ハムスター卵を用いるヒト精子結合および融合アッセイ

精子調製：

運動性ヒト精子をBronson and Fusi(1990)のスィム・アップ方法によって収集した。簡単にいうと、精子サンプル(500 ml)を、5 mg/ml HSAを含有するBWW培地(2 ml)に下においた。精子を1.5-2時間泳がせた。泳ぎきった精子を回収し、BWW+5 mg/ml HSA(8 ml)を添加した。該組成物を、8分間室温で600 xg回転させ、該上清を除去し、培地(8 ml)をペレットに添加した。該再懸濁ペレットを、8分間室温で600 xg回転させた。該上清を除去し、HSA(30 mg/ml)を含有するBWW(50 ml)をペレットに添加した。全精子細胞を計測し、次いで 2.0×10^6 精子/mlの濃度でBWW+30 mg/ml HSAにおいて終夜インキュベートした。

20

30

【0077】

卵細胞収集：

雌ハムスターを、30 IU PMSG、続いて72時間後30 IU hCGのi.p.注射を与えた。hCG注射の14-16時間後、ハムスターを屠殺し、卵管を5 mg/ml HSA含有BWW培地中に回収した。卵丘細胞を1 mg/mlのヒアルロニダーゼを用いて除去し、卵細胞を洗浄し、透明帯を1 mg/mlトリプシンにより除去した。次いで、該卵細胞を完全に洗浄し、インキュベーター内で休ませた。

【0078】

精子/抗体インキュベーション：

精子を、 2.0×10^6 精子/mlに希釈し、パラフィン油被覆微小液滴中で1時間、前免疫性(はじめに、血清の1:10および1:50希釈を試験した)または免疫性血清の適切な希釈物と共にインキュベートした。

40

【0079】

ハムスターの卵を、精子+抗体を含有する該液滴に添加した。次いで、該配偶子を3時間共インキュベーションした。

【0080】

結合および融合の評価：

卵細胞を、5(50 ml)洗浄滴を通して連続的通過により結合していない、また弱い結合の精子を洗い流した。同じピペットを、個々の実験で洗浄した全ての卵細胞に用いた。次いで、卵細胞を、BSA/BWW(30 mg/ml)中1 mMアクリジンオレンジ-3% DMS

50

Oへの短時間(5-15秒)の暴露によって染色し、4(50ml)洗浄滴によって洗浄し、22x22mmのカバースリップ下に埋めた。UV照射下、卵膜-付着精子の膨張していない頭部を計測した、卵細胞質を通過した精子は膨張した緑色頭部を示した。全ての実験を3回反復した。

【0081】

結果

	hSLLP1抗体の1:10希釈		
	卵細胞あたりに結合した精子の数		
前免疫性	38.2	免疫性	21.8
	P値 = 7.78 x 10 ⁻⁶		
	卵細胞あたりに融合した精子の数		
前免疫性	3.2	免疫性	2.9
	P値 = 0.6		
	hSLLP2抗体の1:10希釈		
	卵細胞あたりに結合した精子の数		
前免疫性	28.7	免疫性	27.4
	P値 = 0.79		
	卵細胞あたりに融合した精子の数		
前免疫性	1.8	免疫性の	1.6
	P値 = 0.71		

10

20

【0082】

実施例3

hSLLP1のマウス・オルトログの単離

受精においてcリゾチーム様SLLPタンパク質の機能を分析するために、マウスSLLPオルトログを単離し、マウス受精実験を行った。該新規アクロソーム中のcリゾチーム様タンパク質hSLLP1は、両方の触媒残基を欠いていたが8つのシステイン全てを包含するcリゾチームの20個の不変残基のうち17個を有する。しかし、cリゾチームにおける基質結合に必要な候補残基のほとんどがhSLLP1中に残っている。hSLLP1(mSLLP1)のネズミ・オルトログはクローンされ、アクロソーム反応前後の雄配偶子に局在していた。イン・ピトロの受精アッセイを、recmSLLP1だけでなくmSLLP1 30

30

に対する単一特異的抗体の存在下で実施した。さらに、mSLLP1について相補的な結合部位を、マウスの雌配偶子について同定した。

【0083】

材料および方法

mSLLP1のクローニングおよび発現

ブラスト検索ツール(Altschul et al. 1990)を用て、ヒトSLLP1のマウス・オルトログを、the NCBI GenBank データベースで探求し、候補遺伝子を同定した。各々NcoIおよびXhoI制限部位を有する1つの遺伝子特異的フォワード(5'CATGCCATGGCC AAGGTC TTC AGT CGC TGT GAG CTG; 配列番号: 14)およびリバー(5'CCGCTC GAG GAA GTC ACA GCC ATC 40

CAC CCA GTC; 配列番号: 15)プライマーを設計して、マウスSLLP1の推定処理形態(94~221の128アミノ酸)を増幅した。プライマーをInvitrogenから得た(Carlsbad, CA)。マウス精巢cDNAライブラリーから、cDNAをPCRによって増幅した(Clontech, Palo Alto, CA)。用いたサイクルパラメーター、94 で2分間; 94 で30秒; 51 で1分; そして68 で1.5分を、40サイクル行った。PCR反応生成物をアガロースゲル上で分離し、~400bpのバンドを単離し、再度増幅し、PCR 2.1 TOPOベクター中でサブクローニングした(Invitrogen)。多重cDNAクローンを、Perkin-Elmer Applied Biosystems DNA シークエンサー(Biomolecular Research Facility, Univ. of Virginia Health System, VA)でベクター誘導プライマーを用いて、両方向で配列決定した。次いで、挿入部を制限消化し、ゲル精製し、予め消化した 50

50

p E T 2 8 b + ベクター中にライゲートし、コンピータント B L 2 1 D E 3 細胞 (Novagen, Madison) を使用して形質転換した。最終構築体には、N 末端で 2 つのアミノ酸残基、および 6 つのヒスチジンタグを包含している 8 残基を C 末端で加えた。

【 0 0 8 4 】

シングルコロニーからの 2 L の培養物を、50 μ g/ml のカナマイシン存在下 Luria broth (LB) 中で、37 $^{\circ}$ C で、光学密度 \sim 0.8 になるまで培養した。イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) (Sigma, St. Louis, MO) を 1 mM までの終濃度で添加し、発現を誘導した。3 時間の誘導後、細菌を遠心分離によって回収した。該組換えタンパク質を E. coli の可溶性分画から単離し、8 M 尿素の結合緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM イミダゾールおよび 0.5 M NaCl) 中に溶解し、製品の使用法を修飾して His 結合 Ni²⁺ キレート化親和性樹脂カラム上で精製した (Novagen, Madison, WI)。次いで、該溶出物を、PBS を 3 回取り替えて終夜透析した。透析したタンパク質を、使用するまで -20 $^{\circ}$ C で貯蔵した。タンパク質濃度を、牛血清アルブミン (BSA) を標準として用い、Coomassie Plus-200 によって決定した (Pierce, Rockford, IL)。

10

【 0 0 8 5 】

ポリクローナル抗体生成物およびウェスタン・ブロット分析

5 匹の成体の未出産雌モルモットを、精製 recmS L L P 1 に対する抗体生成に用いた。前免疫性血清を、心臓穿刺により回収し、続いて各動物を完全なフロイントのアジュバンド中の精製 recmS L L P 1 (200 μ g) を注射し、不完全なフロイントのアジュバンド中の同量のタンパク質を用いて 14 日のインターバルで 2 回ブーストした。全ての免疫化について、半量の抗原エマルジョンを脚に筋肉内注射し、半量を背の 2 箇所皮下注射した。次いで、全ての動物を、最終免疫後 9 日目に心臓穿刺によって全採血し、血液を血清分離チューブに回収した (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。遠心分離 (1750 g, 10 分) した後、該血清を取り出して分注し、必要になるまで凍結させておく。

20

【 0 0 8 6 】

抗血清の特異性を recmS L L P 1 に対して試験し、マウス精子を 1 D S D S - P A G E ウェスタンブロッティングの後に抽出した。RecmS L L P 1 (0.1 μ g/レーン) または精巢上体尾部マウス精子 (10 μ g/レーン) を Laemmli 緩衝液 (2x) に可溶化し、タンパク質を 15% SDS-PAGE ゲルで分解し、20 mA で分離した。次いで、タンパク質をニトロセルロースにブロッティングし、ボンソー染色した。全てのブロットを、30 分間室温で 0.05% Tween 20 (PBS-T) を有する PBS 中で 5% 無脂肪乾燥乳を用いて遮断した。recmS L L P 1 精製タンパク質のイムノブロッティングについて、抗 recmS L L P 1 モルモット血清の 1:15000 または 1:30000 希釈物を試験したが、マウス精子タンパク質については、血清の 1:5000 または 1:10000 希釈物を使用した。次いで、該ブロットを PBS-T で 3 回 10 分洗浄し、1:5000 希釈のペルオキシダーゼ結合ヤギ抗モルモット IgG 二次抗体を用いて 1 時間インキュベートし、2 回 10 分 PBS-T で洗浄した。該ブロットを ECL 試薬 (Amersham, Corp., Buckinghamshire, UK)、次いで TMB ペルオキシダーゼ基質 (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) で顕色させた。

30

40

【 0 0 8 7 】

イン・ビトロ受精アッセイのための培地および試薬

イン・ビトロ受精アッセイのために使用した培地は 3% BSA を添加した Whittingham's 培地 (Fraser and Drury, 1975) の Fraser's 修飾であり、培養等級の H₂O と分析等級の試薬とを用いて調製した。TYH 培地 (Toyoda et al., 1971) を、精子-卵膜 (oolemma) 結合アッセイのために使用した。妊娠した雌の血清性腺刺激ホルモン (PM SG)、ヒト絨毛膜性腺刺激ホルモン (hCG)、BSA、培養等級の H₂O、ヒアルロニダーゼ、キモトリプシン、Hoeschst dye 33342 および全ての他の試薬を Sigma から得た。

【 0 0 8 8 】

イン・ビトロアッセイのための配偶子調製

50

ハイブリッドF1マウス(CB57BL/6J×CBA)を、全ての実験で使用した。性的に成熟した雄マウス由来の精巢上体の精子の懸濁液を、単離された卵母細胞の授精のために調製した。過剰排卵した28日令の雌から得た卵母細胞を、10 IU PMSGおよび10 IU hCGを用いて48時間別に腹腔内注射した。この雌をhCG注射16時間後に屠殺し、両方の卵管を、直ちに除去し、鉱油に置いた。

【0089】

イン・ビトロでの卵丘-卵母細胞複合体との受精

卵丘のインタクトな卵母細胞を用いるイン・ビトロでの受精を、パラフィン油下で受精培地液滴中(200 μl)に5分おいた精巢上体尾部から分散された精子を用いて行った。該精子懸濁液を、200 μlの容量中10⁶精子/mlの濃度に希釈し、次いで給湿した組織培養インキュベーター(37℃、空气中5%CO₂)中で120分間インキュベートして受精能を与えた。recmSLLP1血清を試験した実験では、精子を、受精能獲得後の最後の45分間、脱補体化(decomplemented)免疫性または前免疫性の血清濃度を変えてインキュベートした。recmSLLP1を評価した実験において、精子を標準的な受精能獲得条件下でインキュベートした。

10

【0090】

卵丘塊体を、パラフィン油下で135 μlの液滴の受精培地(1滴あたり1集団)に置き、免疫または前免疫性血清と共に45分、授精前にrecmSLLP1の存在または非存在中でインキュベートした。次いで、精子懸濁液(終濃度:10⁵精子/ml)(15 μl)を、各卵丘塊体の液滴に添加した。すなわち、血清または組換えタンパク質は、配偶子相互作用の間、インキュベーション液滴中で存在した。6時間後の授精卵母細胞を、鉱油下で受精培地の液滴(100 μl)に移した。終夜インキュベーション後に、卵細胞を、10 μg/mlのHoeschst染料中で10分染色し、受精培地で3回洗浄した。次いで、該卵細胞を、顕微鏡スライドと上部のカバースリップとの間に受精培地液滴(5 μl)に置いて、光学と蛍光顕微鏡を用いて(Zeiss Axioplan)160xで可視化した。2つの細胞胚を受精したとして評点し、一方、1つの細胞した卵母細胞を非受精と評点した。

20

【0091】

帯不含卵を用いるイン・ビトロ受精

精子-卵膜結合アッセイのために、2つの精巢上体尾部を、パラフィン油下で液滴(900 μl)の受精培地に置き、濃縮した精子の塊を3時間自由に流した。卵丘卵母細胞複合体を、パラフィン油下でTYH培地液滴(200 μl)においた。卵丘細胞を、1 mg/mlのヒアルロニダーゼのTYH培地中で3分間卵母細胞を処置することによって除去し、次いで50 μlの液滴で8回洗浄した。透明帯を、1分間TYH培地中の10 μg/mlのキモトリプシンで卵母細胞を処置することによってばらばらにし、ばらばらになった透明帯を吸引パストールピペットで機械的攪拌により取り出した。次いで、該卵母細胞を10回洗浄し、TYH培地で3時間インキュベーションすることによってキモトリプシン処置から回復に供し、続いてそれらを10 μg/mlのHoeschst染料で10分染色して、穏やかに洗浄した。

30

【0092】

抗recmSLLP1血清を試験した実験で、精子を、受精能獲得の最後の30分に脱補体化免疫性または前免疫性血清の濃度を変えてインキュベートした。次いで、無処置卵母細胞を、終濃度2.5×10⁴精子/mlを有する処理精子を含有するインキュベーション液滴に添加した。recmSLLP1またはリゾチームのいずれかを評価したこれらの実験において、標準的受精能獲得条件下で精子をインキュベートした。卵母細胞を、recmSLLP1(0.1~200 μg/ml)またはトリまたはヒトのリゾチーム(50 μg/ml、100 μg/ml)を用いて、45分間授精前にプレインキュベートした。次いで、非処理精子を、終濃度2.5×10⁴精子/mlを有する処理卵を含有するインキュベーション液滴に加えた。このように行った、全ての実験で血清、組換えタンパク質またはリゾチームは、配偶子相互作用中のインキュベーション液滴中に添加した。配偶子の共インキュベーション30分後、卵母細胞を、TYH培地中で5回穏やかに洗浄し、顕微鏡スライドと上部のカバースリップ

40

50

の間に置き 160x で可視化した。卵母細胞への結合を、位相差を用いて卵母細胞あたり結合精子の全数を計測することによって評点した。卵細胞との融合を、蛍光顕微鏡を用いて各卵母細胞内の非縮合精子頭部の数を計測することによって評点した。

【0093】

マウス精子および卵母細胞の間接的免疫蛍光試験

固定化精子上の標識化：

精巣上体尾部マウスの精子を、カルシウム(PBS; pH=7.4)を含まないリン酸緩衝生理食塩水液滴(0.9 ml)(液滴あたり2つのepididymidies)におき、5% CO₂の大気中5分間37℃でインキュベートした。アクトソーム反応を誘導するために、精子を、TYH培地中で90分間インキュベートし、5 μMのカルシウムイオン透過担体 A23187を添加してさらに15分インキュベートした。次いで、各液滴を回収し、10分500gで遠心分離し、PBSに再懸濁した；この洗浄方法を3回繰り返した。PBS中のマウス精子の最終懸濁液の塗抹標本を、顕微鏡スライド上で室温空気乾燥し、PBS中2% w/v パラホルムアルデヒド中に10分固定した。PBSで6回洗浄後、精子を30分37℃で、正常ヤギ血清(NGS)(PBS中5% v/v)と共にインキュベートし、次いでモルモット(200 μg/ml)からの抗recmSLLP1 IgGと共に1時間インキュベートした。該スライドを、PBSで3回洗浄し、精子をロバ由来のテキサス・レッド結合ポリクローナル抗体(1:200, Jackson Laboratories)と1時間37℃でインキュベートした。次いで、スライドを洗浄し、ピーナツ凝集素レクチン(PNA)(1:50) (Molecular Probes)と共に室温で30分インキュベートし、洗浄し、Slowfade^(登録商標) (Molecular Probes)にマウントし、Zeiss 標準 18 紫外顕微鏡下で可視化した。画像をMrGrab (Carl Zeiss Vision GmbH, Germany)を用いて捕捉した。

10

20

【0094】

卵細胞標識化：

分裂中期IIの卵細胞を、文献に記載したとおりに得て(Coonrod et al, 1999)、5% NGS / 培地を用いて30分インキュベートした。卵母細胞を5回TYH培地で洗浄し、100 μg/mlのrecmSLLP1または100 μg/ml リゾチームと、45分37℃および5% CO₂でインキュベートした。卵母細胞を5回洗浄し、5% NGS / 培地においてモルモット抗recmSLLP1 ポリクローナル抗体(1:50)、ヒツジ抗ヒトのリゾチーム(1:25)またはウサギ抗-チキン リゾチーム(1:400)と1時間37℃および5% CO₂でインキュベートした。卵母細胞を5回洗浄し、5% NGS / 培地中でロバ抗モルモット/Texas Red 抗体(1:200)またはヤギ抗モルモット/FITC 抗血清(1:200)、ロバ抗ヒツジおよびヤギ抗ウサギFITC - 標識した二次抗体(1:200) (Jackson ImmunoResearch)を各々用いて、1時間、37℃でおよび5% CO₂でインキュベートした。卵母細胞を洗浄し、ガラススライド上で培地中にマウントし、Zeiss 標準的 18 紫外顕微鏡下で可視化した。画像をMrGrab 1.0 (Carl Zeiss Vision GmbH, Germany)を用いて捕捉した。

30

【0095】

共焦顕微鏡走査

卵細胞標識化：

免疫蛍光試験に用いた分裂中期II卵を、PBS + 1% BSA (PBS / BSA)で3回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドのPBS-ポリビニルアルコール(PVA)に、20分間室温で固定した。固定後、卵をPBS / BSAで5回洗浄し、次いで20分間室温でPBS中0.5% Triton X-100を用いて透過性にした。次いで卵細胞をPBS / BSAで5回洗浄し、PBS / BSA中0.4 mg/ml RNase中に30分おき、次いで20 nM Sytox (Molecular Probes, Eugene, OR)で10分間染色した。次いで、卵細胞を十分洗浄し、おおよそ1分間スロー・フェード(slow fade) (Molecular Probes, Eugene, OR)平衡化培地におき、次いでスロー・フェード・マウント培地中のスライド上にマウントした。画像をZeiss 410 Axiovert 100 microsystems LSM 共焦顕微鏡上で得た。各パネルに対して、アテニュエーション、コントラスト、明度およびピンホール開口は一定のままであ

40

50

る。各パネルに対して、4秒のスキャンを、2つの倍率を備えた63×油レンズを用いてラインあたり4回平均した。

【0096】

分裂中期IIの卵細胞への結合中の精子標識化：

イン・ビトロの受精試験に用いた受精能獲得精子により授精した帯不含マウスの卵細胞を、2%パラホルムアルデヒド中10分室温で固定した。配偶子をPBS-BSAで洗浄し、5%NGS/PBS-BSAを用いて30分37℃でインキュベートし、次いでrecmSLLP1 IgG (200 µg/ml)と共に1時間インキュベートした。該スライドを3回PBSで洗浄し、配偶子を1時間37℃でロバ抗モルモット・テキサス・レッド結合ポリクローナル抗体(1:200, Jackson Laboratories)と共にインキュベートした。次いで、配偶子を5回PBS/BSAで洗浄し、RNase (0.4 mg/ml) PBS/BSAに30分間おき、次いで20 nM Sytox (Molecular Probes, Eugene, OR)で10分染色した。配偶子を十分洗浄し、スロー・フェード(Molecular Probes, Eugene OR)平衡化培地におおよそ1分間おき、次いでスロー・フェード・マウント培地中スライド上にマウントした。画像を、上記のZeiss 410 Axiovert 100 microsystems LSM 共焦顕微鏡で得た。

10

【0097】

結果

マウスSLLP1は、hSLLP1の真のオルトログであり、類似特性をcリゾチームと共有する

mSLLP1の完全な推定アミノ酸配列を、配列番号：13として提供する。mSLLP1のN末端は、推定された膜内外ドメインを含有し、そのすぐ後にアラニン93とリジン94結合間のプロテアーゼ解裂候補部位まで続く。Accelrys Gap (Seq/Web version 2)アルゴリズムを用いる完全長hSLLP1およびmSLLP1配列の比較により、mSLLP1がhSLLP1の64.2%の類似性および58.8%の同一性であることがわかった。プロテアーゼ解裂部位(128 aa)直後に始まるmSLLP1の推定処理形態は、hSLLP1の処理形態と、82.8%の同一性および75.8%同一性を共有する。導き出されたmSLLP1配列は、3つの偽ミリスチル化部位、カゼインキナーゼII(S97)およびプロテインキナーゼC(S66、S90、S152およびS153)に対する潜在的リン酸化部位および-ラクトアルブミン/リゾチームCファミリーとしての特徴配列を含有する。さらに、成熟mSLLP1の推定分子量(14 kDa)およびpI(5.2)はhSLLP1に類似する。

20

30

【0098】

さらに、the GenBank databaseにおけるブラスト検索および選択された成熟cリゾチームの複数アラインメントにより、成熟mSLLP1が、各々マウス、ヒトおよびニワトリのリゾチームと46%、48%および50%の同一性があることが明らかになった。これらの3つのcリゾチームと共にmSLLP1の成熟形態のアラインメントにより、44個の同一残基の存在が明らかとなったが、リゾチームの主な触媒残基(E35およびD52)はmSLLP1ではT35およびN52で置換された。リゾチームの6つの潜在的基質-結合残基(37位置、63位置、64位置、102位置、109位置および115位置の残基)の中の5つは、mSLLP1中に保存されていたことから、mSLLP1がcリゾチームと密接に関係され得ることが示唆される。

40

【0099】

mSLLP1の発現および抗体の特異性

6つのHisN末端タグを有するが、残基94~201(シグナルペプチドおよび推定膜貫通ドメインを欠いている)を処理した成熟mSLLP1タンパク質をコードしているcDNA配列を、E.coliで発現させ、Ni⁺⁺アフィニティー精製後に~15 kDaの組換えタンパク質を得た。recmSLLP1調製物の純度を評価するために、精製タンパク質のアリコートをして1-D電気泳動によって分離し、ゲルを銀染色し、抗his抗体でブロッティングした。約15 kDaの顕著なバンドとおおよそ30 kDaで非常にわずかな偽ダイマーに注目した。これらの結果は、この試験に使用したrecmSLLP1調製物が精製されたこ

50

とを示した。

【0100】

recmS L L P 1 に対してモルモットにおいて生成した抗体の特異性を、組換え体免疫原およびマウス精子タンパク質の両方に対するウェスタンブロッティングによって試験した。該免疫性血清は、15 kDa 組換えS L L P 1 を認識し、さらに偽30 kDa ダイマーは、調製物中に見出され、一方該前免疫性血清、さらにアジュバンド単独により注射されたモルモットから該血清は、recS L L P 1 と免疫反応性を示さなかった。マウス精子抽出物において、該免疫性血清は、おおよそ15 kDa バンドにのみ反応し、一方さらにアジュバンド単独により注射されたモルモットからの血清、さらに前免疫性血清は、反応性を示さなかった。これらの結果は、特異的免疫試薬が精子タンパク質抽出物に対して1本鎖バンドを与えるrecmS L L P 1 に生じたことを示しており、少量はE.coliで発現中に生じるが、mS L L P 1 ダイマー化は精子中で生じないことを示唆した。また、アフィニティー精製および再折りたたみ後にE.coliで発現したmS L L P 1 は、元々のmS L L P 1 と抗体交差反応を生じさせるに十分な数の免疫原エピトープを含有していることを示した。

【0101】

マウス精子アクロソームおよび赤道部と関連するマウスS L L P 1

recmS L L P 1 に対するモルモットIgGを用いて固定したマウス精子の間接免疫蛍光分析では、受精能を獲得していない精子の前方のアクロソームに主にmS L L P 1 が局在した。しかし、21.5%の受精能を獲得していない精子は、mS L L P 1 の赤道部近傍に分布を示し、2.5%は染色しなかった。PNAレクチンのアクロソームにおいて蛍光の欠如によって決定されたアクロソーム反応精子は、recmS L L P 1 との赤道近傍部の反応性を示した。しかし、19%のアクロソーム反応精子は、mS L L P 1 の前方のアクロソーム染色分布を保持し、5%が染色しなかった。その結果、アクロソーム前方における染色の消失は、受精能獲得およびアクロソーム反応がおきてから赤道部における染色の顕性と一致することがわかった。これは、赤道近傍部のS L L P 1 が、アクロソームのインタクトな精子においてマスクされるか、前方アクロソームから赤道部への再分布の後にイオン透過担体誘導性アクロソーム反応をうけるかのいずれかを示唆し得る。重要なことには、共焦分析は、マウスの卵に結合するマウス受精能獲得した精子においてmS L L P 1 の透明な赤道部の局在性を示し、このタンパク質は精子卵膜の結合と関係し得るという考えを強調するものである。

【0102】

RecmS L L P 1 および抗recmS L L P 1 血清は、マウスの卵丘インタクトな卵の受精を阻害する

受精中のmS L L P 1 の役割を決定するために、精子および卵丘のインタクトな卵母細胞の両方を、授精45分前に抗recmS L L P 1 血清または前免疫性血清とプレインキュベートした。受精を該抗体の存在下で行った。6時間後の卵を、受精培地の液滴(100 μl)にうつし、終夜インキュベートした。1:10または1:50希釈の免疫性血清により処置した群において、2つの細胞胚の%は有意に減少した(各々61%および17%の阻害)。しかし、有意な効果は1:100希釈(表1A)では観察されなかった。

【0103】

次いで、卵丘のインタクトな卵母細胞を、受精過程に存在した2つの濃度のrecmS L L P 1 を用いてインキュベートした。recmS L L P 1 (200 μg/ml) による卵丘-卵母細胞複合体の処置は、コントロール群において45%、recmS L L P 1 処置群において12%に受精率を減少し、一方、コントロールと50 μg/ml組換えタンパク質によって処置された群の間の受精%について低下を示したが、有意な相違は観察されなかった。さらに、recePAD (200 μg/ml) の存在下でプレインキュベートされた卵母細胞、コントロールの組換えタンパク質として使用された卵細胞質タンパク質は、受精において低下しないことを示した(表1B)。まとめて考えると、これらの結果は、mS L L P 1 が受精において機能し、配偶子融合の用量範囲試験を刺激することを示唆した。表1Aおよび1Bに示したデータについて、血清または組換えタンパク質は受精中に存在する。2つの細胞胚を

10

20

30

40

50

、24時間後受精されたとして評点した。(*) $P \leq 0.05$ (Anova test:分散分析検定)。抗recmSLLP1血清およびrecmSLLP1の両方は、マウスにおけるイン・ビトロ受精を有意に阻害した。

【0104】

【表1】

表1A

受精を低下させるSLLP1に対する抗体

処置	実験数	卵細胞全数	2細胞胚の数	非受精卵	受精%
PI 1:100	3	20	15	5	75
I 1:100	3	20	14	6	70
PI 1:50	3	38	27	11	71
I 1:50	3	46	27	19	59*
PI 1:10	6	64	43	21	67
I 1:10	6	80	21	59	26*

10

20

表1A：種々の濃度のrecmSLLP1 (PI) または免疫 (I) 血清を授精45分前に両方の配偶子に添加した。

【0105】

【表2】

表1B

受精を低下させる組換え体SLLP1競合剤

処置	実験数	卵細胞全数	2細胞胚の数	非受精卵数	受精%
コントロール	3	20	11	9	55
recmSLLP1 50 µg/ml	3	52	25	27	48
コントロール	3	29	13	16	45
recmSLLP1 200 µg/ml	3	64	8	56	12*
recePAD 200 µg/ml	3	24	16	8	67

30

40

表1B：種々の濃度のrecmSLLP1またはPBSを、無処理の受精能獲得マウス精子と共に授精45分前に卵母細胞に添加した。いくつかの場合において、卵母細胞を、200 µg/mlの細胞質性卵母細胞タンパク質、recePAD (ネガティブコントロール)の存在下で45分、ブレインキュベートした。

【0106】

精子-卵細胞結合における役割を持つマウスSLLP1

50

卵丘-卵細胞複合体を用いて、recmS L L P 1 タンパク質、さらにrecmS L L P 1 に対する抗体による受精の有意な阻害を示すために、我々は、mS L L P 1 はその効果を発揮した受精カスケードの段階での決定に注目した。それ故に、我々は、抗recmS L L P 1 血清およびrecmS L L P 1 タンパク質が、受精能を獲得したマウス精子によって、透明帯不含マウス卵における精子-卵細胞結合を遮断するかまたは融合するかどうかを試験した。

1 : 1 0 および 1 : 5 0 希釈の抗recmS L L P 1 免疫性血清の存在下で両配偶子が共インキュベーションされた場合に観察された。

融合ではないが(図2を参照されたい)、結合に対して有意な阻害(図1を参照されたい)を観察したが、1 : 1 0 0 希釈は有意な効果を示さなかった。種々の濃度のrecmS L L P 1 (0.1 - 200 μ g/ml)と透明帯不含マウス卵をインキュベートし、次いで無処理の受精能獲得マウス精子と授精した場合に最も強い効果を観察した。卵母細胞とrecmS L L P 1 とのインキュベーションは、1 μ g/mlで観察された有意な効果および50 μ g/mlでの100%阻害を有し、精子結合(図3を参照されたい)または卵細胞に対する融合(図4を参照されたい)の%における濃度依存性の低下を生じた。透明帯不含マウス卵母細胞は、コントロールとして使用したrecmS L L P 1 非存在下または200 μ g/mlでrecePADの存在下でインキュベートした。recePADを200 μ g/mlで試験した場合に阻害は検出されなかった。卵の結合につづいて融合するが、抗recmS L L P 1 またはrecmS L L P 1 タンパク質が影響しなかったということを示唆するコントロールと比較して運動性のある精子の%において違いは観察されなかった。まとめると、これらの結果は、受精前にマウス卵表面での結合事象においてmS L L P 1 の関与を支持する。

10

20

【0107】

受精しなかった卵母細胞と受精した卵母細胞に対する相補的な結合部位を有するマウスS L L P 1

卵細胞表面上のmS L L P 1 -結合部位の可能な局在性を試験するために、受精していない卵母細胞と前核段階でイン・ビトロ受精卵母細胞とを一緒に、精製した組換えタンパク質mS L L P 1 と45分インキュベートし、洗浄し、次いで抗recmS L L P 1 に暴露した。未受精の卵母細胞は、囲卵腔内に、また多くの卵母細胞表面上で蛍光標識を示した。しかし、蛍光の全くないエリアを一貫して検出した。Hoesch染色は、このネガティブ領域が、分裂中期板の上にある卵母細胞膜のエリアと常に関連することが明らかになった。こうして、mS L L P 1 -結合部位は卵細胞の膜融合(fusogenic)領域に限定され、精子-卵細胞結合の際にmS L L P 1 相互作用のための一つの役割をさらに示唆した。対照的に、イン・ビトロで受精した透明帯を有する卵母細胞あるいは有さない卵母細胞は、卵細胞表面全体に局在する強力な蛍光を示した。3つの異なる処置に供した卵母細胞をコントロールとして用い、そして、それらは、抗recmS L L P 1 に暴露しただけでrecmS L L P 1 への暴露を欠いた卵母細胞も含めて、蛍光の証拠を示すものは全くなかった。卵母細胞をrecmS L L P 1 と共にインキュベートし、次いで前免疫性血清に暴露し、卵母細胞をrecePADとインキュベートし、次いで各特異的抗体とインキュベートした。

30

【0108】

共焦分析を実施し、mS L L P 1 結合部位の局在性を細かく区別した。受精していない卵母細胞の断面の評価は、mS L L P 1 -結合部位が囲卵腔に優性的に局在したことを示した。弱い蛍光標識を卵細胞の透明帯で観察したが、我々はこの弱い蛍光が特異的な結合によるかどうかを確定することはできなかった。ウェスタン・プロット分析による帯結合アッセイは、この問題解明の助けとなる。対照的に、蛍光は受精した卵の囲卵腔内では検出されなかったが、該卵膜のいたるところにある斑点パターンは明確な特性であった。

40

【0109】

cリゾチームは、配偶子融合を遮断しないか、マウス卵細胞に結合しない

マウスS L L P 1 は、6つの基質結合残基のなかの5つを包含するcリゾチームのほとんどの特性を共有するリゾチーム様タンパク質である。精子-卵細胞結合のcリゾチームの結合特性を評価するために、我々は、ヒトおよびニワトリのリゾチームが受精能を獲得したマウス精子によって透明帯不含マウスの卵の結合を遮断するかどうかを試験した。結

50

合または融合に対する有意な効果を50または100 µg/mlの天然タンパク質で観察しなかった。この機能アッセイに従って、マウス卵母細胞は、ヒトまたはニワトリのリゾチームおよびそれらの各々の抗体とインキュベートした場合、ポジティブな蛍光染色を示さなかった。

【0110】

考察

この試験の結果は、mSLLP1がhSLLP1真のオルトログであり、リゾチームファミリーと類似特性を共有することを示した。マウスSLLP1オルトログは、タンパク質の処理領域において、ヒトSLLP1に対して82.8%類似性および75.8%同一性を共有し、N-アセチルグルコサミンに対して重要な基質結合残基の保存を包含するいくつかの特性を共有し、2つの突然変異した重要な残基を保存することを示した。マウスゲノムデータベースの探索は、さらにhSLLP1に対してより大きなホモロジーを持つ遺伝子を全く示さなかった。これらの考察をあわせて、ヒトSLLP1の真のネズミ・オルトログを同定したという結論を支持するものである。

10

【0111】

哺乳類の受精において、透明帯を通過した全ての精子はアクロソーム反応性であり、アクロソームのインタクトな精子は卵膜と融合しない(Yanagamachi, R. Adv. Biophys, Vol 37:49-89, 2003)。精子細胞膜と卵細胞膜との融合は、赤道近傍部の上にある細胞膜ドメインとともに開始する。この特異的ドメインが膜融合性となる分子的メカニズムは現在未知であるが、仮定的経路が提案された(R. Yanagimachi 1994 Frontiers in Endocrinology Vol 8, p15)。これはアクロソーム反応中に放出されたアクロソーマルマトリックスの内容物を、赤道近傍部に再分配するという仮定を包含するものである。マウスSLLP1は、主にアクロソーム・インタクト・マウス精子の前方のアクロソームに局在化し、イオン透過担体に誘導されたアクロソーム反応の後に赤道部に再配置する。我々は、この再配置が、mSLLP1が内部と外部アクロソーマル膜の間の裂け目に暴露される赤道近傍のマトリックスへの再分布を包含するか、細胞膜の上部または両方に再分配するどうかはまだ判らない。従って、卵の細胞膜に対して受精能を獲得し、結合した精子は、mSLLP1タンパク質を保持しており、膜結合においてmSLLP1に対する機能を示唆するものである。

20

【0112】

卵丘のインタクトな卵母細胞を用いて、受精過程中、recmSLLP1に対する抗血清によって配偶子の両方をインキュベートした場合に、イン・ビトロでの受精が遮断された。recmSLLP1が受精過程中に存在した場合に受精が遮断されたというイン・ビトロの受精試験とは別の重要な知見は、mSLLP1が受精に関係することを示唆するものである。recmSLLP1がPBSに対して透析したので、PBSがコントロール卵母細胞に添加されたことに注目されたい。結果として、PBS群について得られた受精%は予測よりも低かった(50%対75%)。

30

【0113】

透明帯不含精子-卵細胞結合および融合アッセイは、recmSLLP1に対する抗体が精子と透明帯不含マウス卵との融合ではなく、結合を有意に阻害することを示した。さらに、recmSLLP1の存在下でインキュベートされた卵母細胞は、濃度依存様式で卵に結合する精子を阻害した。この試験の最も重要な知見は、両方の配偶子を50 µg/ml recmSLLP1とインキュベートしたときに、精子-卵細胞結合について100%の阻害が観察されたことである。我々の実験条件下において、観察したrecmSLLP1の融合過程に対する効果は、結合し得る精子がどこで卵膜に融合し得るかであるため、融合レベルではなく結合レベルであった。考えあわせると、該イン・ビトロのデータは、精子-卵細胞結合事象の間に少なくとも一つのmSLLP1が受精において影響することを示唆する。

40

【0114】

精子-卵細胞の相互作用のための多数の可能候補結合パートナーが記載されてきたが、これらの分子の正確な役割は、明確には確立されていなかった。それ故、配偶子相互作用

50

に關係する別の分子、特にアクロソーム反応後に保持される分子の同定は、受精に関する理解を大きく増強させ得るであろう。S L L P 1は、この基に対する魅力的な付加であり、我々の知見から、mS L L P 1結合部位は卵膜上に存在することを示した。結合部位は、減数分裂紡錘体の上にある細胞膜の領域、融合がまれに起こる領域と一致するネガティブ領域以外の、囲卵腔および受精していないマウスの卵母細胞の全表面に局在した。この一致は、受精卵母細胞上のネガティブ領域の蛍光消失によって支持される。さらに、受精した卵母細胞上の卵細胞全表面で蛍光標識の離散斑点を観察した。

【0115】

実施例4

哺乳類精子/卵細胞結合に対する交差種S L L Pポリペプチドの効果

出願人は、様々な哺乳類の精子細胞がハムスター卵細胞に結合し得ることを示した。より具体的には、ハムスター精子に加えてマウス精子はイン・ビトロ実験中にハムスター卵細胞に結合し得る。組換え体ヒトS L L P 1を、酵母およびE.coli発現系の両方を用いて作成し、合成タンパク質を使用して、哺乳類の卵に結合し得るかし得ないかを調査した。両方の組換え的に作成したヒトS L L P 1タンパク質は、組換えS L L P 1(100 μg/ml)および実施例3に記載の方法を用いて、透明帯不含および透明帯含有のインタクトなマウスの卵細胞に結合し、さらに透明帯不含および透明帯含有のインタクトなハムスターの卵細胞に結合することを見出した。さらに、コントロールとして、出願人は、ヒトのリゾチームがS L L P 1結合実験に使用したものと同様の条件下でマウスの卵に細胞に結合できないことを示した。

【0116】

次いで、実施例3に記載の方法を用いて、マウス精子卵細胞結合および融合に対する組換えS L L P 1タンパク質を発現したE.coliの効果調べた。簡単には、S L L P 1遺伝子を担持する組換え体細胞を、IPTGにより誘導した。封入体を、尿素またはグアニジン-HCl中に回収し、可溶化した。次いで、タンパク質を、His結合樹脂上でアフィニティー精製した。該樹脂をイミダゾールで洗浄した。3~6時間のグラジエント溶出を用いて、カラムから尿素/グアニジンの完全除去を達成した。折りたたまれた(可溶性)タンパク質の溶出を尿素非存在下でイミダゾールによって達成した。次いで、溶出培地を、溶出したタンパク質に適当な緩衝液を用いて交換した。図5および6に示したように、ヒト組換えS L L P 1(hrS L L P 1)は、用量依存様式においてマウス精子-卵細胞の結合および融合を阻害した。従って、S L L P ポリペプチドは、交差様式において、精子-卵細胞結合および融合と干渉し、活性な避妊薬剤の投与に適当であるこれらのタンパク質自体を作成し得ることがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】図1は、実施例3に記載のマウス精子-卵細胞結合実験から得られるデータを示す棒グラフである。成熟マウスの卵細胞からの透明帯は、キモトリプシンでの短いインキュベーション後の機械的剪断によって取り出した。種々の濃度の抗recmS L L P 1血清とブレインキュベートした受精能を獲得したマウス精子は、帯不含マウスの卵細胞と共インキュベートし、卵細胞と結合する精子細胞の数が決定された。

【0118】

【図2】図2は、実施例3に記載のマウス精子-卵細胞融合実験から得たデータを示す棒グラフである。成熟マウス卵細胞からの透明帯を、キモトリプシンの短いインキュベーション後の機械的剪断によって取り出した。受精能を獲得したマウス精子、種々の濃度の抗recmS L L P 1血清とブレインキュベートした受精能を獲得したマウス精子は、帯不含マウスの卵細胞と共インキュベートし、卵細胞と結合する精子細胞の数が決定された。

【0119】

【図3】図3は、マウス精子-卵細胞結合に対するマウス組換えS L L P 1の効果を試験する実験(実施例3を参照されたい)から得たデータを示す棒グラフである。帯不含マウスの卵をS L L P 1タンパク質の提示濃度とブレインキュベートし、次いで受精能を獲得し

10

20

30

40

50

たマウス精子と授精された。全ての場合で、血清または組換えタンパク質は、配偶子相互作用の間存在していた。卵細胞を処理し、精子結合について分析した。データは、3つの異なる実験からの平均±SEを示す。 $(*) P \leq 0.05$ 、 $(**) P \leq 0.01$ (スチューデントT検定)。コントロール：前免疫血清または非タンパク質またはrecePAD (細胞質卵細胞タンパク質)。

【0120】

【図4】図4は、組換えSLLP1のマウス精子-卵細胞融合に対する効果を試験する実験(実施例3を参照されたい)から得たデータを示す棒グラフである。帯不含マウスの卵を、recmSLLP1タンパク質の提示濃度とプレインキュベートし、次いで受精能を獲得したマウス精子と授精した。全ての場合で、血清または組換えタンパク質は、配偶子相互作用の間存在していた。卵細胞を処理し、精子融合について分析した。データは、3つの異なる実験からの平均±SEを示す。 $(*) P \leq 0.05$ 、 $(**) P \leq 0.01$ (スチューデントT検定)。コントロール：前免疫血清または非タンパク質またはrecePAD (細胞質性卵細胞タンパク質)。

10

【0121】

【図5】図5は、ヒト組換えSLLP1のマウス精子-卵細胞結合に対する効果を試験する実験から得たデータを示す棒グラフである(実施例4を参照されたい)。帯不含卵を、rechSLLP1タンパク質の提示濃度とプレインキュベートし、次いで受精能を獲得したマウス精子と授精した。全ての場合で、血清または組換えタンパク質は、配偶子相互作用の間存在していた。卵細胞を処理し、精子結合について分析した。データは、3つの異なる実験からの平均±SEを示す。 $(*) P \leq 0.05$ 、 $(**) P \leq 0.01$ (スチューデントT検定)。コントロール：前免疫血清または非タンパク質またはrecePAD (細胞質性卵細胞タンパク質)。

20

【0122】

【図6】図6は、ヒト組換えSLLP1のマウス精子-卵細胞結合に対する効果を試験する実験から得たデータを示す棒グラフである(実施例4を参照されたい)。帯不含マウスの卵細胞を、recmSLLP1タンパク質の提示された濃度とプレインキュベートし、次いで受精能を獲得したマウス精子と授精された。全ての場合で、血清または組換えタンパク質は、配偶子相互作用の間存在していた。卵細胞を処理し、精子融合について分析した。データは、3つの異なる実験からの平均±SEを示す。 $(*) P \leq 0.05$ 、 $(**) P \leq 0.01$ (スチューデントT検定)。コントロール：前免疫血清または非タンパク質またはrecePAD (細胞質性卵細胞タンパク質)。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

5 <110> The University of Virginia Patent Foundation
 Herr, John
 Herrero, Maria
 Mandal, Arabinda
 Digilio, Laura

10 <120> Sperm Specific Lysozyme Like Proteins
 <130> 00857-02

15 <150> 60/440,585
 <151> 2003-01-16 10
 <160> 21

20 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 820
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

25 <400> 1
 gccctggcaa ggttgtggg gacatcttga gctgaagcag ggttttgagc cactgctgct 60
 gctgccattg tcaccatggt ctccagctctg cggggagcac ccctgatcag ggtgcactca 120
 30 agccctgttt cttctccttc tgtgagtgga ccacggaggo tggtagctg cctgtcatcc 180 20
 caaagctcag ctctgagcca gagtgggtgt ggctccacct ctgccccgg catagaagcc 240
 35 aggagcaggg ctctcagaag gcggtgtgic ccagctggga tcatgttgtt ggcctggtc 300
 tgtctgctca gctgcctgct accctccagt gaggccaago tctacggtcg ttgtgaactg 360
 gcoagagtgc tacatgactt cgggctggac ggataccggg gatacagcct ggctgactgg 420
 40 gtctgccttg cttattteac aagcggtttc aacgcagctg ctttggacta cgaggctgat 480
 gggagcaccg acaacgggat cttocagatc aacagccgga ggtggtgcag caacctcacc 540
 45 ccgaacgtcc ccaacgtgtg ccggatgtac tgctcagatt tgttgaatcc taatctcaag 600
 gataccgtta tctgtgccat gaagataacc caagagcctc aggttctggg ttactgggag 660 30
 gcctggagge atcaactgcca gggaaaagac ctcaactgaat gggtaggatgg ctgtgacttc 720
 50 taggatggac ggaacatgc acagcaggct gggaaatgtg gtttggttcc tgacctagge 780
 ttgggaagac aagccagcga ataaaggatg gttgaacggt 820

55

<210> 2
 <211> 215
 5 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 2

10 Met Val Ser Ala Leu Arg Gly Ala Pro Leu Ile Arg Val His Ser Ser
 1 5 10 15

15 Pro Val Ser Ser Pro Ser Val Ser Gly Pro Arg Arg Leu Val Ser Cys
 20 25 30

20 Leu Ser Ser Gln Ser Ser Ala Leu Ser Gln Ser Gly Gly Gly Ser Thr
 35 40 45

25 Ser Ala Ala Gly Ile Glu Ala Arg Ser Arg Ala Leu Arg Arg Arg Trp
 50 55 60

30 Cys Pro Ala Gly Ile Met Leu Leu Ala Leu Val Cys Leu Leu Ser Cys
 65 70 75 80

35 Leu Leu Pro Ser Ser Glu Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Cys Glu Leu Ala
 85 90 95

40 Arg Val Leu His Asp Phe Gly Leu Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu
 100 105 110

45 Ala Asp Trp Val Cys Leu Ala Tyr Phe Thr Ser Gly Phe Asn Ala Ala
 115 120 125

50 Ala Leu Asp Tyr Glu Ala Asp Gly Ser Thr Asp Asn Gly Ile Phe Gln
 130 135 140

55 Ile Asn Ser Arg Arg Trp Cys Ser Asn Leu Thr Pro Asn Val Pro Asn
 145 150 155 160

60 Val Cys Arg Met Tyr Cys Ser Asp Leu Leu Asn Pro Asn Leu Lys Asp
 165 170 175

65 Thr Val Ile Cys Ala Met Lys Ile Thr Gln Glu Pro Gln Gly Leu Gly
 180 185 190

70 Tyr Trp Glu Ala Trp Arg His His Cys Gln Gly Lys Asp Leu Thr Glu
 195 200 205

Trp Val Asp Gly Cys Asp Phe
 210 215
 5

<210> 3
 <211> 588
 10 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 3
 15 ctgggagggc ttacaggtgc cataatgaag gcctggggca ctgtggtagt gaccttggcc 60
 acgctgatgg ttgtcactgt ggatgccaag atctatgaac gctgcgagct ggcggcaaga 120 10
 ctggagagag cagggctgaa cggctacaag ggctacggcg ttggagactg gctgtgcatg 180
 20 gctcattatg agagtggctt tgacaccgcc ttcgtggacc acaatcctga tggcagcagt 240
 gaatatggca ttttccaact gaattctgcc tgggtggtgtg acaatggcat tacaccacc 300
 25 aagaacctct gccacatgga ttgtcatgac ctgctcaato gccatattct ggatgacatc 360
 aggtgtgcca agcagattgt gtctcacag aatgggcttt ctgcctggac ttcttgagg 420
 ctacactgtt ctggccatga tttatctgaa tggtcaagg ggtgtgatat gcatgtgaaa 480
 30 attgatocaa aaattcatcc atgactcaga ttcgaagaga cagattttat cttcctttca 540
 tttctttctc ttgtgcattt aataaaggat ggtatctata aacaatgc 588 20

35
 <210> 4
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

40 <400> 4

Met Lys Ala Trp Gly Thr Val Val Val Thr Leu Ala Thr Leu Met Val
 1 5 10 15
 45

Val Thr Val Asp Ala Lys Ile Tyr Glu Arg Cys Glu Leu Ala Ala Arg
 20 25 30 30 30
 50

Leu Glu Arg Ala Gly Leu Asn Gly Tyr Lys Gly Tyr Gly Val Gly Asp
 35 40 45

55 Trp Leu Cys Met Ala His Tyr Glu Ser Gly Phe Asp Thr Ala Phe Val
 50 55 60

60 Asp His Asn Pro Asp Gly Ser Ser Glu Tyr Gly Ile Phe Gln Leu Asn
 65 70 75 80

5 Ser Ala Trp Trp Cys Asp Asn Gly Ile Thr Pro Thr Lys Asn Leu Cys
 85 90 95

10 His Met Asp Cys His Asp Leu Leu Asn Arg His Ile Leu Asp Asp Ile
 100 105 110

15 Arg Cys Ala Lys Gln Ile Val Ser Ser Gln Asn Gly Leu Ser Ala Trp
 115 120 125

20 Thr Ser Trp Arg Leu His Cys Ser Gly His Asp Leu Ser Glu Trp Leu 10
 130 135 140

25 Lys Gly Cys Asp Met His Val Lys Ile Asp Pro Lys Ile His Pro
 145 150 155

25 <210> 5
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

30 <400> 5
 agcctcatca gtcgctgtga cttggcccag gtgctgcagc tggaggactt ggatggggtt 60
 gagggttact ccctgagtga ctggctgtgc ctggcttttg tggaaagcaa gttcaacata 120
 35 tcaaagataa atgaaaatgc agatggaagc tttgactatg gcctcttcca gatcaacagc 180
 cactactggt gcaacgatta taagagttac tcggaaaacc tttgccacgt agactgtcaa 240
 gatctgctga atcccaacct tcttgcaggc atccactgcg caaaaaggat tgtgtccgga 300
 40 gcacggggga tgaacaactg ggtagaatgg aggttgcaact gttcaggccg gccactcttc 360
 tactggctga caggatgccg octgaga 387

45
 <210> 6
 <211> 148
 <212> PRT
 50 <213> homo sapiens
 <400> 6

55 Met Thr Lys Ala Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ser Phe Leu Ala Leu
 1 5 10 15

60 Asn Gln Ala Ser Leu Ile Ser Arg Cys Asp Leu Ala Gln Val Leu Gln
 20 25 30

Leu Glu Asp Leu Asp Gly Phe Glu Gly Tyr Ser Leu Ser Asp Trp Leu
 35 40 45
 5
 Cys Leu Ala Phe Val Glu Ser Lys Phe Asn Ile Ser Lys Ile Asn Glu
 50 55 60
 10
 Asn Ala Asp Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Leu Phe Gln Ile Asn Ser His
 65 70 75 80
 15 Tyr Trp Cys Asn Asp Tyr Lys Ser Tyr Ser Glu Asn Leu Cys His Val
 85 90 95 10
 20 Asp Cys Gln Asp Leu Leu Asn Pro Asn Leu Leu Ala Gly Ile His Cys
 100 105 110
 Ala Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Arg Gly Met Asn Asn Trp Val Glu
 115 120 125
 25 Trp Arg Leu His Cys Ser Gly Arg Pro Leu Phe Tyr Trp Leu Thr Gly
 130 135 140
 30 Cys Arg Leu Arg
 145 20
 35 <210> 7
 <211> 790
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 40 <400> 7
 agaatcagac atggcttcag gggatgcagg acgctcccct gagctgcctg tcacogacta 60
 ggtggagcag tgtttcttcc gcagactcaa ctgagaagtc agcctctggg gcaggcacca 120
 45 ggaatctgcc ttttoagtcc tgtctccggc aggccttgag gatgaaggct gcgggcattc 180
 tgaccctcat tggctgcctg gtcacaggcg ccgagtccaa aatctacact cgttgcaaac 240
 50 tggcaaaaat attctcgagg gctggcctgg acaattactg gggcttcagc cttggaaact 300
 ggatctgcat ggcataattat gagagcggct acaacaccac agccccgacg gtctctggatg 360
 acggcagcat cgactatggc atcttccaga tcaacagctt cgcgtggtgc agacgcggaa 420
 55 agctgaagga gaacaaccac tgccatgtcg cctgctcagc cttgatcact gatgacctca 480
 cagatgcaat tatctgtgcc aggaaaattg ttaaagagac acaaggaatg aactattggc 540
 aaggctggaa gaaacattgt gagggcagag acctgtccga gtggaaaaaa ggctgtgagg 600
 60 30

tttcctaac tggaaactgga cccaggatgc ttgacagcaa cgccttagga ttgacagtga 660
 5 atgtccaaat gectgtgtca tttgtcccg tttcctccca atattccttc tcaaacttgg 720
 agagggaaaa ttaagctata cttttaagaa aataaatatt tccatttaaa tgtcaaaaaa 780
 aaaaaaaaaa 790
 10
 <210> 8
 <211> 194
 <212> PRT
 15 <213> homo sapiens 10
 <400> 8
 Met Gln Asp Ala Pro Leu Ser Cys Leu Ser Pro Thr Arg Trp Ser Ser
 20 1 5 10 15
 Val Ser Ser Ala Asp Ser Thr Glu Lys Ser Ala Ser Gly Ala Gly Thr
 25 20 25 30
 Arg Asn Leu Pro Phe Gln Phe Cys Leu Arg Gln Ala Leu Arg Met Lys
 30 35 40 45
 Ala Ala Gly Ile Leu Thr Leu Ile Gly Cys Leu Val Thr Gly Ala Glu
 50 55 60 20
 Ser Lys Ile Tyr Thr Arg Cys Lys Leu Ala Lys Ile Phe Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Gly Leu Asp Asn Tyr Trp Gly Phe Ser Leu Gly Asn Trp Ile Cys Met
 40 85 90 95
 Ala Tyr Tyr Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Thr Ala Pro Thr Val Leu Asp
 45 100 105 110
 Asp Gly Ser Ile Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Phe Ala Trp
 115 120 125 30
 50 Cys Arg Arg Gly Lys Leu Lys Glu Asn Asn His Cys His Val Ala Cys
 130 135 140
 55 Ser Ala Leu Ile Thr Asp Asp Leu Thr Asp Ala Ile Ile Cys Ala Arg
 145 150 155 160
 60 Lys Ile Val Lys Glu Thr Gln Gly Met Asn Tyr Trp Gln Gly Trp Lys
 165 170 175

Lys His Cys Glu Gly Arg Asp Leu Ser Glu Trp Lys Lys Gly Cys Glu
 180 185 190

5

Val Ser

10 <210> 9
 <211> 758
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

15 <400> 9
 cgctcccctg agctgcctgt cacgcactag gtggagcagt gtttcttcog cagactcaac 60 10
 tgagaagtca gcctctgggg caggcaccag gaatctgcct ttcagttct gtctccggca 120
 20 ggctttgagg atgaaggctg cgggcattct gacctcatt ggetgcctgg tcacaggcgc 180
 cgagtccaaa atctacactc gttgcaact ggcaaaaata ttctcgaggg ctggcctgga 240
 caattactgg gcttcagcc ttgaaactg gatctgcatg gcgtattatg agagcggcta 300
 25 caacaccaca gccagacgg tcttgatga cggcagcacc gactacggca tcttcagat 360
 caacagcttc gcgtggtgca gacgcggaaa gctgaaggag aacaaccact gccacgtcgc 420
 30 ctgctcagcc ttggtcactg atgacctcac agatgcgatt atctgtgcca agaaaattgt 480
 taaagagaca caaggaatga actattggca aggctggaag aaacctgtg aggggagaga 540 20
 cctgtccgac tggaaaaaag gctgtgaggt ttctaaact ggaactggac ccaggatgct 600
 35 ttgcagcaac gccctaggat ttgcagtga tgtccaaatg cctgtgtcat ctgtcccg 660
 ttctcccaa tattcttct caaacttga gagggaaat taagctatac ttttaagaaa 720
 40 ataaatattt ccatttaaat gtcaaaaaaa aaaaaaaa 758

<210> 10
 <211> 148
 45 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 10 30

50 Met Lys Ala Ala Gly Ile Leu Thr Leu Ile Gly Cys Leu Val Thr Gly
 1 5 10 15

55 Ala Glu Ser Lys Ile Tyr Thr Arg Cys Lys Leu Ala Lys Ile Phe Ser
 20 25 30

60 Arg Ala Gly Leu Asp Asn Tyr Trp Gly Phe Ser Leu Gly Asn Trp Ile
 35 40 45

Cys Met Ala Tyr Tyr Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Thr Ala Gln Thr Val
 5 50 55 60

Leu Asp Asp Gly Ser Ile Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Phe
 65 70 75 80

10 Ala Trp Cys Arg Arg Gly Lys Leu Lys Glu Asn Asn His Cys His Val
 85 90 95

15 Ala Cys Ser Ala Leu Val Thr Asp Asp Leu Thr Asp Ala Ile Ile Cys
 100 105 110 10

20 Ala Lys Lys Ile Val Lys Glu Thr Gln Gly Met Asn Tyr Trp Gln Gly
 115 120 125

25 Trp Lys Lys His Cys Glu Gly Arg Asp Leu Ser Asp Trp Lys Lys Gly
 130 135 140

Cys Glu Val Ser
 145

30 <210> 11
 <211> 886
 <212> DNA
 <213> homo sapiens 20

35 <400> 11
 agtggatgat taatgaagta gcatctgaaa aacccaagga accaaatgta ggtggagcaa 60
 40 cttccctgca acacacgtcg aagetgctgc agtggctgtt cttccctcc ccttgaaag 120
 gcacaaaag ccagcctttg gaaggctgg tggactgtgc ccttcttcc cttcagagaa 180
 ccagtgtccc tgtgactcca cccactcacc tggccaccgt tgccctgacc tgccaggagc 240
 45 ctggagaaga tgaaggcacc cgtggttctc tocctccttg gctacctggt ggttccaagt 300
 ggtgcttaca tcttggggcg ttgcacagtg gctaagaaac tccacgatgg aggcctggat 360
 50 tattttgagg gctatagcct tgagaactgg gtgtgcctgg cctacttoga gagcaagttc 420
 aaccccatgg ccatctacga gaacacacgt gagggctaca ctggccttgg cctctttcag 480
 atgcgtggca gtgactggtg tggcgaccat ggcaggaacc gctgccatat gtcatttcc 540
 55 gctttactga atcctaattt agagaagaca attaaatgtg ccaagaccat tgtaaaagga 600
 aaagaaggga tgggagcatg gccacactgg tcccgtact gccagtactc cgataccctg 660
 60 gcacgggtggc tggatggttg caagctgtag ccgctgcat ggcccctgca gcactcacca 720

30

```

gttgcatctt gtgaatgaag gtgcttttct gcttgctgct tcagtcaatc cttttgatga 780
5 tctcaccact ttaagagttc cagatggaaa aagacaaaag tttgcttcat ccggggatgc 840
aggatgcaga ataaaccaa ctagtcttct aaaaaaaaaa aaaaaa 886

10 <210> 12
    <211> 146
    <212> PRT
    <213> homo sapiens

15 <400> 12
Met Lys Ala Ser Val Val Leu Ser Leu Leu Gly Tyr Leu Val Val Pro
1 5 10 15
.
20 Ser Gly Ala Tyr Ile Leu Gly Arg Cys Thr Val Ala Lys Lys Leu His
20 25 30
.
25 Asp Gly Gly Leu Asp Tyr Phe Glu Gly Tyr Ser Leu Glu Asn Trp Val
35 40 45
.
30 Cys Leu Ala Tyr Phe Glu Ser Lys Phe Asn Pro Met Ala Ile Tyr Glu
50 55 60
.
35 Asn Thr Arg Glu Gly Tyr Thr Gly Phe Gly Leu Phe Gln Met Arg Gly
65 70 75 80
.
40 Ser Asp Trp Cys Gly Asp His Gly Arg Asn Arg Cys His Met Ser Cys
85 90 95
.
45 Ser Ala Leu Leu Asn Pro Asn Leu Glu Lys Thr Ile Lys Cys Ala Lys
100 105 110
.
50 Thr Ile Val Lys Gly Lys Glu Gly Met Gly Ala Trp Pro Thr Trp Ser
115 120 125
.
55 Arg Tyr Cys Gln Tyr Ser Asp Thr Leu Ala Arg Trp Leu Asp Gly Cys
130 135 140
.
Lys Leu
145
60 <210> 13
    <211> 221
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

```

10

20

30

<400> 13

5
Met Gly Ile Cys Met Ser Met Tyr Thr Gln Val Leu Val Pro Val Asp
1 5 10 15

10 Ala Asp Gly Asp His His Ile Leu Trp Ser Arg Phe Tyr Glu Arg Trp
20 25 30

15 Gly Ser Cys Phe Asn Pro Cys Ala Gly Leu Val Asn Cys Leu Pro Pro
35 40 45

20 His Ser Ser Ala Leu Tyr Leu Cys His Arg Met Glu Pro Arg Ser Arg
50 55 60

Ala Ser Ile Arg Gln Leu Cys Pro Pro Gly Ile Thr Trp Leu Ala Leu
65 70 75 80

25 Ala Tyr Leu Leu Ser Cys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala Lys Val Phe
85 90 95

30 Ser Arg Cys Glu Leu Ala Lys Glu Met His Asp Phe Gly Leu Asp Gly
100 105 110

35 Tyr Arg Gly Tyr Asn Leu Ala Asp Trp Val Cys Leu Ala Tyr Tyr Thr
115 120 125

40 Ser Gly Phe Asn Thr Asn Ala Val Asp His Glu Ala Asp Gly Ser Thr
130 135 140

45 Asn Asn Gly Ile Phe Gln Ile Ser Ser Arg Arg Trp Cys Arg Thr Leu
145 150 155 160

Ala Ser Asn Gly Pro Asn Leu Cys Arg Ile Tyr Cys Thr Asp Leu Leu
165 170 175

50 Asn Asn Asp Leu Lys Asp Ser Ile Val Cys Ala Met Lys Ile Val Gln
180 185 190

55 Glu Pro Leu Gly Leu Gly Tyr Trp Glu Ala Trp Arg His His Cys Gln
195 200 205

60 Gly Arg Asp Leu Ser Asp Trp Val Asp Gly Cys Asp Phe
210 215 220

10

20

30

5 <210> 14
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Primer for PCR cloning of mSLLP1

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(36)
 <223>

15 <400> 14
 catgccatgg ccaaggtctt cagtcgctgt gagctg 36 10

20 <210> 15
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> Primer for PCR cloning of mSLLP1

<220>
 <221> primer_bind
 30 <222> (1)..(33)
 <223>

<400> 15
 ccgctcgagg aagtcacagc catccacca gtc 33 20

35 <210> 16
 <211> 128
 <212> PRT
 40 <213> homo sapiens

<400> 16

45 Lys Leu Tyr Gly Arg Cys Glu Leu Ala Arg Val Leu His Asp Phe Gly
 1 5 10 15

Leu Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Ala Asp Trp Val Cys Leu Ala
 20 25 30 30

50 Tyr Phe Thr Ser Gly Phe Asn Ala Ala Ala Leu Asp Tyr Glu Ala Asp
 35 40 45

55 Gly Ser Thr Asp Asn Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg Arg Trp Cys
 50 55 60

60

Ser Asn Leu Thr Pro Asn Val Pro Asn Val Cys Arg Met Tyr Cys Ser
 65 70 75 80
 5

Asp Leu Leu Asn Pro Asn Leu Lys Asp Thr Val Ile Cys Ala Met Lys
 85 90 95

10
 Ile Thr Gln Glu Pro Gln Gly Leu Gly Tyr Trp Glu Ala Trp Arg His
 100 105 110

15 His Cys Gln Gly Lys Asp Leu Thr Glu Trp Val Asp Gly Cys Asp Phe
 115 120 125 10

<210> 17
 20 <211> 138
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 17
 25 Lys Ile Tyr Glu Arg Cys Glu Leu Ala Ala Arg Leu Glu Arg Ala Gly
 1 5 10 15

30 Leu Asn Gly Tyr Lys Gly Tyr Gly Val Gly Asp Trp Leu Cys Met Ala
 20 25 30 20

35 His Tyr Glu Ser Gly Phe Asp Thr Ala Phe Val Asp His Asn Pro Asp
 35 40 45

Gly Ser Ser Glu Tyr Gly Ile Phe Gln Leu Asn Ser Ala Trp Trp Cys
 50 55 60

40 Asp Asn Gly Ile Thr Pro Thr Lys Asn Leu Cys His Met Asp Cys His
 65 70 75 80

45 Asp Leu Leu Asn Arg His Ile Leu Asp Asp Ile Arg Cys Ala Lys Gln
 85 90 95 30

50 Ile Val Ser Ser Gln Asn Gly Leu Ser Ala Trp Thr Ser Trp Arg Leu
 100 105 110

55 His Cys Ser Gly His Asp Leu Ser Glu Trp Leu Lys Gly Cys Asp Met
 115 120 125

60 His Val Lys Ile Asp Pro Lys Ile His Pro
 130 135

<210> 18
 <211> 129
 5 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 18
 10 Ser Leu Ile Ser Arg Cys Asp Leu Ala Gln Val Leu Gln Leu Glu Asp
 1 5 10 15

 15 Leu Asp Gly Phe Glu Gly Tyr Ser Leu Ser Asp Trp Leu Cys Leu Ala
 20 25 30

 20 Phe Val Glu Ser Lys Phe Asn Ile Ser Lys Ile Asn Glu Asn Ala Asp
 35 40 45

 Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Leu Phe Gln Ile Asn Ser His Tyr Trp Cys
 50 55 60

 25 Asn Asp Tyr Lys Ser Tyr Ser Glu Asn Leu Cys His Val Asp Cys Gln
 65 70 75 80

 30 Asp Leu Leu Asn Pro Asn Leu Leu Ala Gly Ile His Cys Ala Lys Arg
 85 90 95

 35 Ile Val Ser Gly Ala Arg Gly Met Asn Asn Trp Val Glu Trp Arg Leu
 100 105 110

 His Cys Ser Gly Arg Pro Leu Phe Tyr Trp Leu Thr Gly Cys Arg Leu
 115 120 125
 40
 Arg

 45 <210> 19
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 50 <400> 19

 Lys Ile Tyr Thr Arg Cys Lys Leu Ala Lys Ile Phe Ser Arg Ala Gly
 1 5 10 15

 55 Leu Asp Asn Tyr Trp Gly Phe Ser Leu Gly Asn Trp Ile Cys Met Ala
 20 25 30

 60

10

20

30

Tyr Tyr Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Thr Ala Pro Thr Val Leu Asp Asp
 5 35 40 45
 Gly Ser Ile Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Phe Ala Trp Cys
 10 50 55 60
 Arg Arg Gly Lys Leu Lys Glu Asn Asn His Cys His Val Ala Cys Ser
 15 65 70 75 80
 Ala Leu Ile Thr Asp Asp Leu Thr Asp Ala Ile Ile Cys Ala Arg Lys
 20 85 90 95 10
 Ile Val Lys Glu Thr Gln Gly Met Asn Tyr Trp Gln Gly Trp Lys Lys
 25 100 105 110
 His Cys Glu Gly Arg Asp Leu Ser Glu Trp Lys Lys Gly Cys Glu Val
 30 115 120 125
 Ser
 35
 <210> 20 20
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 20
 Lys Ile Tyr Thr Arg Cys Lys Leu Ala Lys Ile Phe Ser Arg Ala Gly
 40 1 5 10 15
 Leu Asp Asn Tyr Trp Gly Phe Ser Leu Gly Asn Trp Ile Cys Met Ala
 45 20 25 30
 Tyr Tyr Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Thr Ala Gln Thr Val Leu Asp Asp
 50 35 40 45 30
 Gly Ser Ile Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Phe Ala Trp Cys
 55 50 55 60
 Arg Arg Gly Lys Leu Lys Glu Asn Asn His Cys His Val Ala Cys Ser
 60 65 70 75 80
 Ala Leu Val Thr Asp Asp Leu Thr Asp Ala Ile Ile Cys Ala Lys Lys
 85 90 95

Ile Val Lys Glu Thr Gln Gly Met Asn Tyr Trp Gln Gly Trp Lys Lys
 100 105 110
 5
 His Cys Glu Gly Arg Asp Leu Ser Asp Trp Lys Lys Gly Cys Glu Val
 115 120 125
 10
 Ser
 15
 <210> 21
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 20
 <400> 21
 Tyr Ile Leu Gly Arg Cys Thr Val Ala Lys Lys Leu His Asp Gly Gly
 1 5 10 15
 25
 Leu Asp Tyr Phe Glu Gly Tyr Ser Leu Glu Asn Trp Val Cys Leu Ala
 20 25 30
 30
 Tyr Phe Glu Ser Lys Phe Asn Pro Met Ala Ile Tyr Glu Asn Thr Arg
 35 40 45
 35
 Glu Gly Tyr Thr Gly Phe Gly Leu Phe Gln Met Arg Gly Ser Asp Trp
 50 55 60
 40
 Cys Gly Asp His Gly Arg Asn Arg Cys His Met Ser Cys Ser Ala Leu
 65 70 75 80
 45
 Leu Asn Pro Asn Leu Glu Lys Thr Ile Lys Cys Ala Lys Thr Ile Val
 85 90 95
 50
 Lys Gly Lys Glu Gly Met Gly Ala Trp Pro Thr Trp Ser Arg Tyr Cys
 100 105 110
 50
 Gln Tyr Ser Asp Thr Leu Ala Arg Trp Leu Asp Gly Cys Lys Leu
 115 120 125

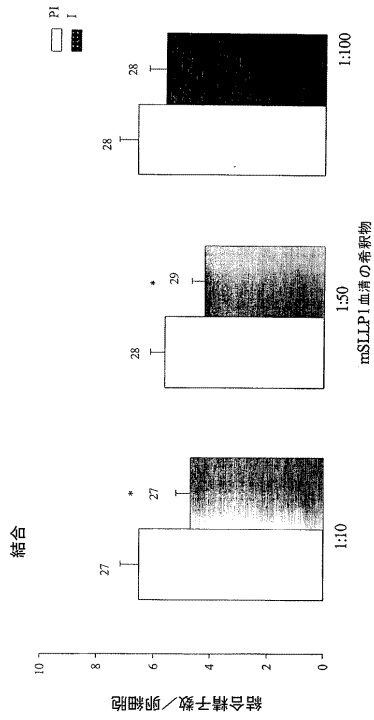
10

20

30

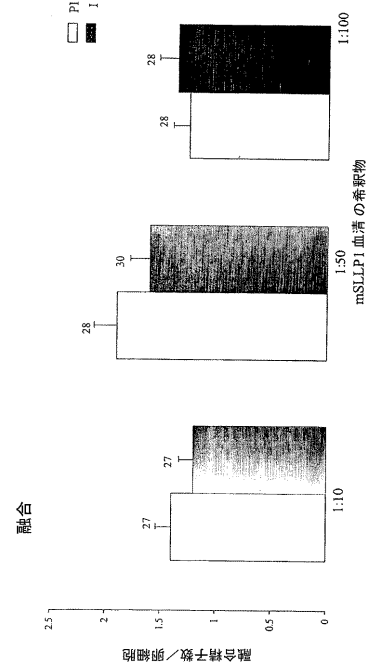
【 図 1 】

Fig. 1



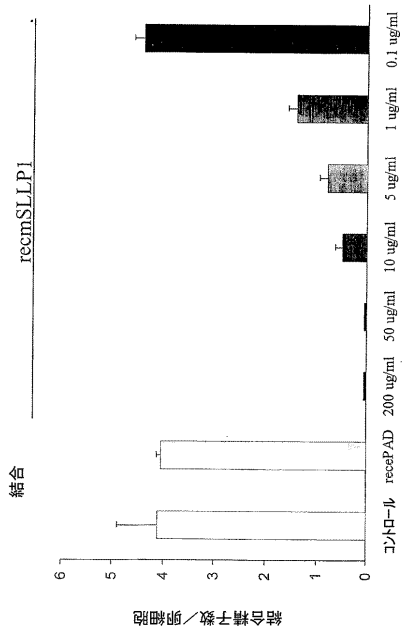
【 図 2 】

Fig. 2



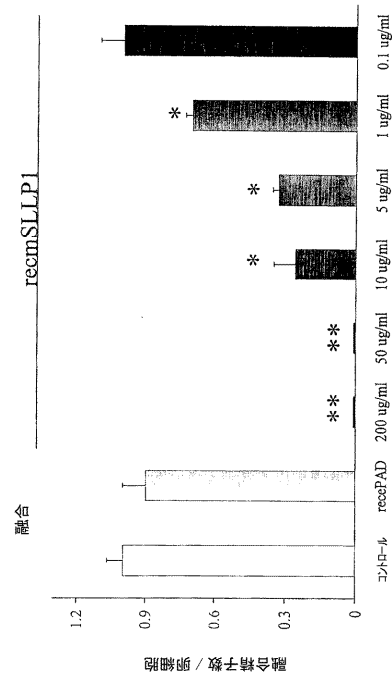
【 図 3 】

Fig. 3



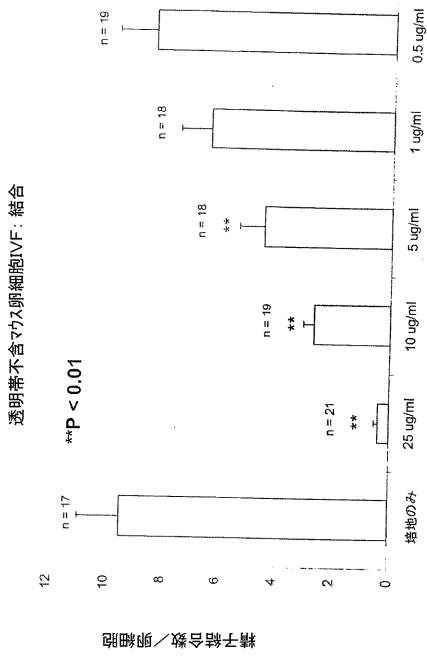
【 図 4 】

Fig. 4



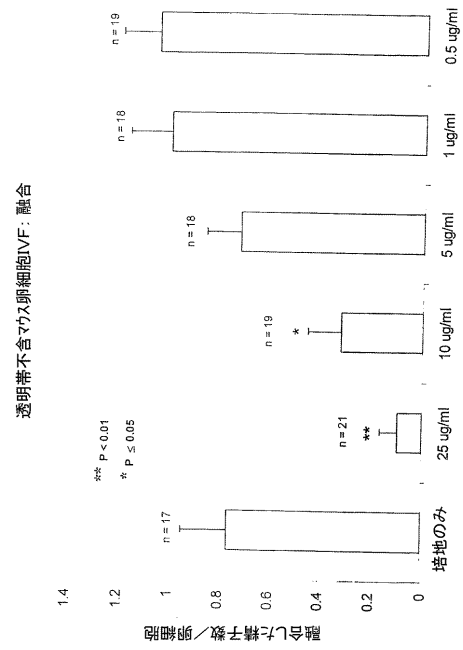
【 図 5 】

Fig. 5



【 図 6 】

Fig. 6



【 手続 補正 書 】

【 提出日 】 平成 17 年 9 月 15 日 (2005.9.15)

【 手続 補正 1 】

【 補正 対象 書類 名 】 明 細 書

【 補正 対象 項目 名 】 配 列 表

【 補正 方法 】 変 更

【 補正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2006518193000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/01240
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 435/7.1 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. : 435/7.1 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) West/Sequence Search/STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y Y A	WO 01/53487 A2 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 26 July 2001 (26.07.01), entire reference. US 6,436,688 B1 (YU et al.) 20 August 2002 (20.08.2002), SEQ ID NO 4, Abstract, cols. 1-2, 10. MAMMALIAN GENE COLLECTION (MGC) PROGRAM TEAM. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, PNAS, 24 December 2002, Vol. 99, No. 26, pages 16899-16903, especially page 16899.	1-8, 16-18, 26, 28-30 ----- 9-15, 19, 23-24 9-15, 19, 23-24 21-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"&" document member of the same patent family	
"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		
Date of the actual completion of the international search 08 September 2004 (08.09.2004)	Date of mailing of the international search report 05 NOV 2004	
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. (703) 305-3230	Authorized officer Jennifer Ione Harle <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 15/18 (2006.01)	A 6 1 P 15/18	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
	C 1 2 P 21/08	

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

(74) 代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72) 発明者 ジョン・シー・ハー

アメリカ合衆国 2 2 9 0 1 バージニア州シャーロットビル、オールド・バラード・ロード 8 9 5 番

(72) 発明者 マリア・ベレン・エレロ

アメリカ合衆国 2 2 3 1 0 バージニア州アレキサンドリア、イースト・ハイデイル・サークル 5 9 3 5 番

(72) 発明者 アラビンダ・マンダル

アメリカ合衆国 2 2 9 0 3 バージニア州シャーロットビル、ミモザ・コート 1 4 8 番

(72) 発明者 ローラ・クレイトン・ディジリオ

アメリカ合衆国 2 2 9 3 2 バージニア州クローゼット、ホワイトホール・ロード 2 6 4 5 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA04 DA02 DA06 EA04 GA11 HA03
 4B064 AG27 CA10 CA20 DA01
 4B065 AA26X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45 CA46
 4C084 AA02 AA17 BA01 BA07 BA08 BA22 BA31 CA18 DC50 MA56
 MA70 NA14 ZA81
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 EE01 EE06 GG10
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA26 EA28 EA31
 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	精子特异性溶菌酶样蛋白		
公开(公告)号	JP2006518193A	公开(公告)日	2006-08-10
申请号	JP2006501011	申请日	2004-01-16
[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	ジョンシーハー マリアベレンエレロ アラビンダマンダル ローラクレイトンディジリオ		
发明人	ジョン・シー・ハー マリア・ベレン・エレロ アラビンダ・マンダル ローラ・クレイトン・ディジリオ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K45/00 A61P15/18 A61K39/395 A61K38/00 A61K39/39 A61K39/00 C07K14/47 C12P21/08 A61K A61K38/17 A61K49/00 C07K14/705 C07K16/40 C12N9/36 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K38/47 A61K49/0002 A61P15/18 C07K14/705 C07K16/40 C12N9/2462 G01N33/689 G01N2500/02 G01N2800/367		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K45/00 A61P15/18 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K37/02 A61K39/39 A61K39/00.Z C07K14/47 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065 /CA46 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA07 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA31 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/MA56 4C084/MA70 4C084/NA14 4C084/ZA81 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA26 4H045 /EA28 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 小島 一晃 櫻井洋子		
优先权	60/440585 2003-01-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与溶菌酶-C蛋白具有高度序列同一性的睾丸特异性蛋白 (SLLP) 家族。 本申请涵盖了包含SLLP蛋白，对SLLP多肽具有特异性的抗体以及SLLP多肽的用途和针对此类肽的抗体作为避孕剂的组合物。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B064
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C084
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C085
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 49 頁) 最終頁!

(21) 出願番号	特願2006-501011 (P2006-501011)	(71) 出願人	501149684
(86) (22) 出願日	平成16年1月16日 (2004. 1. 16)		ユニバーシティ オブ バージニア
(85) 翻訳文提出日	平成17年9月15日 (2005. 9. 15)		ント ファウンデーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/001240		アメリカ合衆国22902バージニア
(87) 国際公開番号	W02004/064740		ヤーロツビル、スウィート300、
(87) 国際公開日	平成16年8月5日 (2004. 8. 5)		スト・メイン・ストリート250番
(31) 優先権主張番号	60/440, 585	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成15年1月16日 (2003. 1. 16)		弁護士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100072730
			弁護士 小島 一晃
		(74) 代理人	100106518
			弁護士 松谷 道子
		(74) 代理人	100127638
			弁護士 志賀 美苗