（由本局填寫）

承辦人代碼：	A6 B6
大　　類：	
ＩＰＣ分類：	

本案已向：

美

國（地區）　申請專利，申請日期：1998,2,19　案號：60/075,079，☑有　☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（1）

發明領域

本發明是有關於男性不育症的測試方法，及重組型人類透明帶蛋白質在臨床研究和實際應用的用法。

相關文獻之說明

受精是來自女性(卵)和男性(精子)的個別配子結合，產生受精卵的過程，其遺傳配對與父母親不相同。精子和卵的交互作用需要有透明帶蛋白質3(ZP3)，同時作為精子和卵母細胞結合的配體和頂體反應的誘導物。

在未知病因的不育男性病人，常常看到精子和卵之間不正常的精子和透明帶的交互作用。這種不正常情況伴隨著減少的精子生育能力，而可能被認為是很多不育症情況的部份。男性不育症是目前很大的問題，大約30-40%不育症病例是因為男性生殖方面的異常。因此，基本上需要更深入瞭解人類精子和卵母細胞在透明帶層次的交互作用。對這些問題的瞭解更多，可給予這些病人更好及更生理-病理層次的直接治療。

許多時候的不育是由於卵與精子的結合成受精卵發生問題。在這個過程中，精子結合卵透明帶是受精過程決定性的認知事件。深入研究老鼠的生育系統，確認並分離了透明帶蛋白質3("ZP3")，作為精子在透明帶內的初級受器，參考Bleil and Wassarman, *Dev. Biol.* 76: 185-202 (1980)。ZP3是一種糖多肽，在受精期內扮演決定性的角色。ZP3在生物角色的一部份是，暴露於精蟲後30分鐘之內，結合精蟲，發生頂體反應。此生物活性

五、發明說明（2）

包含二個部份。第一部份是ZP3結合精蟲。第二部份是在精蟲內引發頂體反應。此二部份可用許多方法偵測，這是熟練的技術人員已知的。

目前的證據顯示，如老鼠模型顯示，ZP3參予受精必須的二個部份。第一，ZP3作為精子結合透明帶的初級受器，參考Saling, *Oxf. Rec. Reprod. Biol.* 11: 339-388 (1989)。第二，ZP3為引發頂體反應所必須，參考Saling, *Biol. Rep.* 44: 246-251 (1991)。大多數這方面的研究都使用其他動物取得的天然ZP3。由人類ZP3糖多肽類的報告顯示，這些蛋白質的分子量為約60到100kD，其中大約一半是碳水化合物。

ZP3碳水化合物在生育力的生物角色曾被推測過，但是沒有得到種屬間差異性確定的結論。在一個最近的實驗中，老鼠胚胎的癌細胞以mZP3轉染，其中之表現序列7中所含五個絲胺酸殘基基團，Ser-329，Ser-331，Ser-332，Ser-333和Ser-334，以位置指向的遺傳突變轉化為小的非羥基胺基酸。該突變的ZP3被合成並分泌為非活性形態，而失去其結合精子的能力，如Chen等人在 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6193-97 (1998)的說明。然而，這個工作並不足以確定種屬間ZP3可能的差異，且不足以確認五個不同的絲胺酸之間的不同。而且，黏蛋白形態糖多肽中的碳水化合物GalNAc聯結於某些絲胺酸和酥胺酸殘基支鏈的UDP-GalNAc多肽類N-乙醯基半乳氨糖轉移酶族的特定性目前仍然是未知的。然而，從

五、發明說明 (3)

已知的哺乳類動物肽序列已經得到的實驗數據可用來高可靠性地預測特定序列糖基化可能性，如Denmark Center生物序列分析的報導。參考例如，該中心的網址www.cbs.dru.dk/services/NetOGlyc-2.0，(此後稱為"NetOglyc website")。O-糖基化蛋白質的資料庫可在Hansen等人在*Nucl. Acids Res.*, 25: 278-282 (1997)找到，以序列預測糖基化位置的推算法可在Hansen等人在*Glyco. J.*, 15: 115-130 (1998)找到。

進一步的分子生物學顯示ZP3蛋白質和其相關基因的新資訊。人類ZP3全長度的cDNA殖株已經被單離出，而此基因的基因位置已經由Chamberlin和Dean在*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 6014-6018 (1990)說明定性。老鼠基因的序列已經得到了，該蛋白質羧端序列編碼的表現序列7可用Kinloch等人在*Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 85: 6409-13 (1988)的已知方法得到。從，例如老鼠，組織培養株，得到包含從老鼠ZP3基因序列資訊的殖株表現了可用量的重組型ZP3 rZP3)。然而，不幸地，重組型人類ZP3 rhZP3)的製造充滿了技術性的困難，至少rhZP3表現時常造成通常不穩定的蛋白質。參考Chapman和Barratt在*Mole. Human Repro.* 3: 646. 648 (1997)。而且，適度糖基化的hZP3以前未曾被純化過，因此，有關於這物質的資訊是間接地測定。

ZP3的視分子量因為它的來源而稍有差異。例如，Beebe等人在*Dev. Biol.* 151: 48-54 (1992)，測定轉染的中

五、發明說明（4）

國倉鼠卵巢("CHO")細胞衍生的重組型老鼠ZP3("rmZP3")為約60-70kDa，不同於天然ZP3的平均分子量83 kDa。這些研究者將這些不一致性歸因於不同的糖基化圖譜。

不管推斷的糖基化差異性，rmZP3顯示在同種的(老鼠)精子透明帶對抗競爭檢定的生物活性，而且，rmZP3可以如Beebe在上述文獻說明的，在適合的老鼠血清內啟動頂體胞吐作用。然而，當在人類系統試驗，以半帶檢定條件，rmZP3只呈現部份的競爭性效果，而不作為頂體反應促效劑。參考Chamberlin and Dean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6014-18 (1990)。

另一個接著發表的文獻說明，可能由具有生物活性CHO的細胞製造rhZP3。參考Van Duin等人在*Biol. Repro.* 51: 607-17 (1994)。然而，Van Duin等作者的報告並未證實得到的rhZP3具有結合精子的能力。而且，rhZP3在觀察到有意義的頂體反應之前，需要在rhZP3極高的10-20μg/ml濃度與精蟲接觸至少三個小時，該ZP3不能說具有真正的生物活性。由此得到的結論是，事實上，該生物活性是精蟲與ZP3蛋白質特定的結合(也就是，在低的濃度發生)，同時也發生快的頂體反應。特定的結合和快的反應需要經由透明帶引導精母細胞進入。在更自然的生物條件下，ZP3的濃度是低於Van Duin所報導的至少100倍，同時生物頂體反應該在30分鐘內發生，不是至少幾個小時。

五、發明說明（5）

試驗生物反應的一個方法是半帶檢定(HZA)法。HZA測試作為精子與透明帶緊密結合的評估，引起生理頂體反應得到受精和早期胚胎發育的關鍵性步驟。

因為得到可用於這種試驗合適rhZP3的困難，大部份的工作是以其他種屬的基因進行。問題是現在已經知道的人類ZP3如同老鼠ZP3，包含大約50%碳水化合物，(也就是，在40%到60%之間重量比碳水化合物)，而424個胺基酸長的多肽類與老鼠序列有約三分之一不相同。通常也瞭解不同的寄主細胞形態可能對hZP3發生不同的糖基化。然而，“是否這些不同會改變rhZP3的生物活性是不確定的”，如最近的摘要。(參考上述文獻第648頁)。

需要大量有生物活性的hZP3用於臨床應用，研究精子結合透明帶的關鍵問題，診斷臨床情況。例如，一個標準化的和內部控制的“半帶檢定”試驗評估人類精蟲與人類透明帶的結合能力，如Burkman等人在*Fertil. Steril.* 49: 688-693 (1988)和Oehninger等人在*Andrologia* 24: 307-321 (1992)的說明。不幸地，這些都不能使用動物來源，或目前已有的rhZP3。因此，需要一個可以得到可重複大量製造，具有hZP3一個或更多個生物性質品質的物質，和需要一種全活性的蛋白質作為研究用及診斷用試驗及藥物。

發明摘要說明

本發明的一個目標是提供具有一個或更多個hZP3生物性質的糖多肽。另外一個目標是提供單離的，和具有

五、發明說明（6）

生物功能性的rhZP3蛋白質。然而另外一個目標是提供結合人類精子及具有有關於人類生育力診斷和治療用法的rhZP3糖多肽。另外一個目的是提供測試男性不育症的方法，該方法是以生物活性hZP3與臨床樣品結合引發頂體反應。另外一個目的是提供高層次，品質一致的生物活性hZP3，用於臨床和研究化學。

為了達到這些和其他目標，本發明提供一種重組型糖多肽，大約65kd到大約100kd，其中包含大約50%重量比的碳水化合物，可結合人類精蟲，並引發頂體反應。本發明也提供一種重組型糖多肽，大約65kd到大約100kd，其中包含大約50%重量比的碳水化合物，可結合人類精蟲並引發頂體反應，其中該糖多肽圖譜以具有類似於卵母細胞的糖基化機構的細胞製造。本發明更提供一種製造具有hZP3蛋白質生物活性糖多肽的方法，其中包含下面的步驟：以編碼hZP3多肽的基因轉染卵巢細胞株的細胞；培養細胞，取得製造hZP3細胞的培養基；和單離該糖多肽。

本發明也包括一種從精液樣品檢測男性不育症的方法，其中包含下面步驟：大約65kd到大約100kd，含有大約50%重量比碳水化合物，可結合人類精子，引發頂體反應之重組型糖多肽與樣品精蟲溶液混合，形成混合物；檢測混合物中頂體反應和頂體溶胞；比較頂體的溶胞與參考值的量。本發明更提供含有rhZP3基因轉變的人類卵巢細胞株的細胞。

五、發明說明（7）

本發明另外一個實例是一個具有較佳結合人類精子的活性部份(也就是，糖基化胺基酸序列區域)的突變糖多肽，其中該活性部份含有的多肽小於25kDa，該糖多肽的胺基酸序列超過54%與序列辨識編號:1相同，並在從羧端第五位置呈現預測的O-糖基化位置。而另外一個實例是一種由精蟲樣品檢測男性不育症的方法，其中包含下面步驟：(a)含有較佳結合人類精子活性部份的突變糖多肽，該活性部份之多肽小於25kDa，該糖多肽的胺基酸序列超過54%與序列辨識編號:1同系，並在羧端第五位置呈現預測的O-糖基化位置，與該樣品中的精蟲混合，得到混合物；及(b)檢測該混合物中該精蟲的生物活性；及(c)與參考值比較生物活性。另外一個實例是可用於製造糖多肽的核酸載體，該糖多肽特定的結合於人類精子，其中該載體胺基酸序列編碼超過54%與序列辨識編號:1同系。另外一個實例是含有核酸載體的人類細胞，該核酸載體可用於製造長度少於200個胺基酸的糖多肽，其中的糖多肽可特定地結合於人類精子，而載體的胺基酸序列編碼超過75%與序列辨識編號:1相同。

圖式之簡要說明

第1圖為人類ZP3之308至348殘基的胺基酸序列。

第2圖為人類ZP3之308-348胺基酸區域的O-糖基化位置代表性的預測摘要。

第3圖為老鼠ZP3之308-348胺基酸區域O-糖基化位置代表性的預測摘要。

五、發明說明（8）

較佳實例之詳細說明

本發明者發現組織特定的和種屬特定的hZP3蛋白質糖基化圖譜的差異性，尤其是308到348殘基的角色，大大地影響此蛋白質的生物活性。由此發現，本發明者發明一種使用卵巢糖基化機構，適當地將hZP3糖基化的細胞表現系統。本發明者也發展了結合人類精子的糖多肽。在本文中，“適當地糖基化，”意思是得到類似於人類卵母細胞(“人類功能的”)的糖基化圖譜，使得該糖多肽具有人類精子的生物活性(也就是，特定的結合卵母細胞)。使用本系統，本發明者第一次單離的rhZP3，不像以前的rhZP3，是有全生物活性的，並含有較以前已知的rhZP3更接近人類卵母細胞蛋白質的碳水化合物。本發明者也發展了一種使用生物活性重組型糖多肽，以診斷男性不育症原因的測試方法。而且，本發明者發現rhZP3和小於rhZP3的rhZP3糖多肽的治療用途，這是以前不知道的。

以hZP3的308到348殘基在特定人類卵母細胞葡糖化中角色的瞭解為基礎，本發明者發現其它生物功能性的糖多肽，可模擬結合人類卵母細胞於人類精子。“生物功能的糖多肽”一詞在本文中的意思是，包含至少具有序列辨識編號:1序列胺基酸片段的多肽，結合於人類精子比較老鼠精子佳。較佳的，該多肽更包含在多肽合成時，由人類細胞加入的碳水化合物。更佳地，該人類細胞是來自卵巢或卵泡細胞株。在一個實例中，該細胞株為非

五、發明說明（9）

卵巢的哺乳類動物(及較佳的是人類)細胞株，以基因的改變作為卵母細胞糖基化酵素的誘引及/或刺激。在本文中，大量製造具有序列辨識編號:1序列確定性超過54%，較佳的超過75%，少於200胺基酸的小糖多肽作為新的用途，例如，避孕法，其中糖多肽干擾正常的受精。

本發明者發現rhZP3的生物特定性主要來自hZP3這一部份的碳水化合物部份。更特別地，本發明者發現非人類卵巢的細胞株，如CHO細胞株，製造的人類rZP3，雖然具有如人類ZP3相同的胺基酸序列，但是由於它們的碳水化合物組成份，對人類卵是沒有活性的。例如，以葡糖化酵素將hZP3除去碳水化合物，會去掉hZP3的生物活性。糖基化精確的差異性可用先製得含有全生物活性的hZP3來測定。然後，部份改變或除去糖多肽的碳水化合物部份。改變之後，測試該糖多肽是否他仍然與人類卵保有全活性。

本發明者在人類和老鼠ZP3之間精密的生化差異的知識，直接作為此蛋白質的種屬間差異性，提供新的工具和技術，創新並使用糖基化糖多肽作為有關於人類生育力的診斷和治療。更特別地，ZP3的一級序列，不同於許多已有的認知，引導不同的糖基化，與在人類卵母細胞中相關的和獨一的種屬特定的和組織特定的糖基化機構，提供獨一的人類卵母細胞糖基化圖譜。因此，本發明的一個觀點是發現在人類卵母細胞中人類特定的卵母細胞的葡糖化作用，的確是與表現ZP3蛋白質有關。

五、發明說明（10）

本發明另外一個觀點是，ZP3之308至348殘基內的胺基酸序列，它會影響並引導人類特定的卵母細胞糖基化，是種屬特定的。然而本發明另外一個觀點是，可用演算法預測的方式特別設計，尋求在該序列內O-糖基化的可能性序列的影響，得到特定的序列的改變。

hZP3內種屬特定的結合區域的發現，提供了增進模擬hZP3一個或更多個生物活性之糖多肽強度的能力。因此，本發明另外一個觀點是，包含少於400胺基酸的小糖多肽，以在人類功能性圖譜內糖基化活性區域的存在(也就是，與適合種屬特定的功能與人類精蟲似人類碳水化合物)可表現具有人類ZP3結合能力。可用於本文，特定的似人類碳水化合物，例如，Clark等人在*Human Reproduction* 11: 467-473 (1996)；Clark等人在*Molecular Human Reproduction* 2: 513-517 (1996)；Patankar等人在*Molecular Human Reproduction* 3: 501-505 (1997)；及Ozgur 等人在*Molecular Human Reproduction* 4(4): 318-324 (1998)等文獻中確認和解釋。

在更進一步的實例中，糖多肽的胺基酸長度在41到400之間。當主要作為種屬特定的結合反應時，糖多肽必須是較小的，如胺基酸長度在41到300，50到200，50到150，甚至在50到100之間，使得一定量的物質有較大的結合位置。結合反應最好是糖多肽與序列辨識編號:1至少有54%序列相同性，特別是大於75%序列相同性，而最特別的是大於80%序列確定性，那是胺基酸長度在41到

五、發明說明（11）

65之間。

糖基化最好由表現人類細胞(也就是，表現人類糖基化酵素的細胞)進行，特別是在表現人類卵泡細胞株或卵巢細胞株，如PA-1，進行。在其他的實例中，包含顯示於序列辨識編號:1區域的糖多肽，可以小至41個胺基酸長度。然而，最好是高達200個、400個或甚至更多個胺基酸長度的大型糖多肽，或可以由顯示於序列辨識編號:1的結合部份重複製造者。

在使用種屬特定的區域的本文中，本發明者發現了3個參數。一，ZP3的308到348殘基包含種屬間資訊，和包含人類ZP3的308到348殘基的核酸載體特別有用於製造具有人類特定的糖基化的多肽。二，如序列辨識編號:1顯示的308到348殘基編碼的胺基酸，與其他種屬發現的ZP3不同，特別在絲胺酸以細胞機構變成O-糖基化的能力。三，與N-糖基化相反的，含有該序列的肽或該肽中由殘基308到348羧基末端絲胺酸之片段的預期O-糖基化的圖譜大大影響該多肽實際上的糖基化。

本發明者發現，有一個絲胺酸344殘基的人類ZP3序列是最可能糖基化的。相反地，另外一個種屬(例如，老鼠)的相對的序列顯示大大的不同的預測O-糖基化的可能性。例如，老鼠同系的殘基(345絲胺酸)有極少的預測糖基化，而332絲胺酸反而是最可能糖基化的。因此，這個發現的技術可以用來區分，並預測那一個序列和序列的改變，可提供在人類細胞內糖基化適當的人類序列，

五、發明說明（12）

尤其是人類卵巢或卵泡細胞株的細胞。第2圖和3顯示個別的預測O-糖基化參數。如在這些圖中所見，相對於閾值，可能值越高，胺基酸與N-乙醯基半乳氨糖轉移酶反應的機會越大。更特別的，“可能”值是設計的殘基是否被O-糖基化的相對測定值。“閾”值是與糖基化機會相反的測定值。

本發明者指出第2圖和3顯示反應由其他非卵巢細胞發現的蛋白質得到的實驗知識，是相對的測定值。此分析清楚地顯示，以其他系統中，序列對糖基化的影響為基礎，人類ZP3的308到348殘基的糖基化主要是在344位置，而相對的老鼠序列糖基化在絲胺酸殘基胺端的13位置。而且，以除去O-糖基化計算傾向的方式改變人類序列也會減少人類精子表面糖基化多肽的親合性。此處使用的分析方法可用於推算如本發明的預期其他序列。特別地，可在列於表1中位置的殘基做到胺基酸取代，保留了本發明糖多肽人類種屬特定獨一的糖基化。這一個表列舉代表性的胺基酸，依照這個方法可被取代，而又維持人類獨一性的糖基化圖譜。

對大部份的位置而言，以位置326為例，可得到守恆性胺基酸取代。“守恆性”取代的意思是以另外一個生物的及/或化學相似的胺基酸殘基取代，如，一個疏水性殘基取代另外一個，或一個極性殘基取代另外一個。這種取代可包含各種組合，如Gly、Ala；Val、Ile、Leu；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；及Phe、Tyr。較

五、發明說明（13）

佳地，要實質模擬序列辨識編號:1肽序列的部份與序列辨識編號:1的差異要少於50%，除非可能加另外的胺基酸到各個末端。

這方面很多的工作提供用於這些改變的推算法。例如，可考慮胺基酸的水療法指數(hydropathic index)。蛋白質生物功能相互作用有關的水療法胺基酸指數的重要性已在U.S. No. 5,703,057文獻中瞭解。通常接受，胺基酸相關的水療法特性給予得到的肽二級結構，然後確定肽與其他分子的交互作用(例如，受器、DNA、葡糖化酵素等等)。各胺基酸以其疏水性和荷電特性訂定其水療法指數，它們是：異白胺酸(+4.5)；纈胺酸(+4.2)；白胺酸(+3.8)；苯丙胺酸(+2.8)；半胱胺酸/胱胺酸(+2.5)；甲硫胺酸(+1.9)；丙胺酸(+1.8)；甘胺酸(-0.4)；酥胺酸(-0.7)；絲胺酸(-0.8)；色胺酸(-0.9)；酪胺酸(-1.3)；脯胺酸(-1.6)；組胺酸(-3.2)；麩胺酸(-3.5)；離胺酸(-3.9)；及精胺酸(-4.5)。

文獻中已知某些胺基酸可被其他具有相似水療法指數或係數的胺基酸取代，而仍可得到相似生物活性的肽，也就是說，仍然得到生物功能性相當的肽。在做這些改變時，取代水療法指數在±2之內的胺基酸是較佳的，在±1之內的是特別佳的，而在±0.5之內的是更特別佳的。同時從文獻中也瞭解，類似的胺基酸的取代也可以以親水性有效地得到。參考，例如，U.S. Pat. No. 4,554.101說明最大蛋白質局部平均親水性，如受鄰近胺

五、發明說明（14）

基酸親水性影響，有關於蛋白質的生物性質。如U.S. Pat. No. 4,554,101的詳細說明下面的胺基酸片段親水性值訂定為：精胺酸(+3.0)；離胺酸(+3.0)；天冬胺酸(+3.0±1)；麩胺酸(+3.0±1)；絲胺酸(+3.0)；天冬醯胺酸(+0.2)；麩醯胺酸(+0.2)；甘胺酸(0)；酥胺酸(-0.4)；脯胺酸(-0.5±1)；丙胺酸(-0.5)；組胺酸(-0.5)；半胱胺酸(-1.0)；甲硫胺酸(-1.3)；纈胺酸(-1.5)；白胺酸(-1.8)；異白胺酸(-1.8)；酪胺酸(-2.3)；苯丙胺酸(-2.5)；色胺酸(-3.4)。

一般而言，胺基酸可以另外一個具有相似親水性值者取代，而仍然得到生物性相等的肽。在這些改變中，取代的胺基酸親水性值在±2之內是較佳的，在±1之內者是特別佳的，而在±0.5之內者是更特別佳的。如上述的綱要，胺基酸的取代通常是基於胺基酸支鏈取代基的相似性，例如，其疏水性、親水性、荷電數、體積等等。考慮前述特性，舉例式的取代如文獻已知的，包括：精胺酸和離胺酸；麩胺酸和天冬胺酸；絲胺酸和酥胺酸；麩醯胺酸和天冬醯胺酸；及纈胺酸、白胺酸和異白胺酸。在這種情形下，本發明者發現，除了表1取代之外，序列辨識編號:1的絲胺酸因為它在糖基化的角色而不能被取代。

“生物功能性的”糖多肽或rhZP3，在本發明本文中的意思是多肽(包含最少308至348的胺基酸，和其功能性的衍生物)或ZP3(如果合成全蛋白質)在濃度低於1 μg/ml時結合精蟲，並在結合後大約一個小時之內引發頂體反

五、發明說明（15）

應。較佳的是rhZP3在濃度低於0.1 μg/ml結合，最好是在濃度0.01 μg/ml到0.1 μg/ml。頂體反應的時間可以少於1小時或甚至少於30分鐘。此種ZP3蛋白質與精蟲的結合是種屬特定的，也可以用來檢測精蟲的缺陷，那可能造成男性不育症。

“卵巢細胞株”一詞在這裡的意思是從人類卵巢組織取得的細胞株，該細胞株可產生具有卵母細胞糖多肽碳水化合物特性的糖多肽。似卵母細胞的糖多肽碳水化合物圖譜與非似卵母細胞糖多肽圖譜可由熟練的技術人員用任何已知的技術比較。

本文中用於上述比較糖多肽圖譜的方法包括，例如，使用單株抗體，如Barbosa說明用以檢測HLA糖多肽碳水化合物部份之變化的方法，以寡核苷酸引導的遺傳突變，基因移轉技術(Barbosa等人發表於*J. Exp. Med.* 166: 1329-50 (1987)) 和更新的生化方法直接評估碳水化合物的含量。

另外一個可用來直接比較是否重組型糖多肽具有正確的糖基化圖譜的方法是，以“半帶檢定法檢測糖多肽是否可阻斷精子結合天然卵母細胞。”在正常的條件下沒有糖多肽，精子結合卵母細胞。然而，當含有適當卵母細胞糖基化的糖多肽與精子培養，糖多肽會先與精子結合，阻斷精子再與卵母細胞結合或反應。相反的，如果糖多肽沒有正確的糖基化圖譜，糖多肽不會阻斷精子與卵母細胞的結合。

五、發明說明（16）

然而，另外一個測定糖多肽是否含有正確糖基化圖譜的方法是，以肽N-葡糖化酵素F和O-葡糖化酵素，由糖多肽除去碳水化合物支鏈，然後將反應產物與精子培養。如果糖多肽製品在消化之前可阻斷精子結合人類卵母細胞，而在消化之後不可阻斷，則未消化的製品擁有正確的糖基化圖譜。

“重組型人類透明帶蛋白質3”的意思是，一種突變的蛋白質(或突變控制元素控制下的天然蛋白質)，包含至少hZP3基因部份，而保有實質地所有hZP3糖多肽活性。“實質地所有”意思是，當與精蟲共存於水性溶液中，其濃度少於大約1 μg/ml (如1 μg/ml)，特別是少於大約0.1 μg/m l(如0.1 μg/ml)，在大約1小時之內(如1小時)的時間內，特別是少於大約30分鐘(如30分鐘)，蛋白質呈現結合活性和頂體反應刺激。

可用於全hZP3突變的蛋白質表現的DNA序列是有經驗的技術人員已知的，衍生自已知的hZP3的424個胺基酸序列，說明於Chamberlin and Dean, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 6014-6018 (1990)。卵巢細胞株以這些序列經由已知的方法有效的轉導細胞。通常，使用DNA架構使包含需要的蛋白質序列編碼結構基因的促進劑上游。適當的促進劑說明於，例如，U.S. patent No. 5,618,698。依照本實例，將rhZP3結構基因和控制基因調節性元素二者轉導至寄主細胞。

如本發明另外一個實例，來自卵巢細胞株的細胞以

五、發明說明（17）

包含促進劑和可與細胞核內內生基因聯結並功能化(也就是打開或增加表現)同源DNA(但不是完整的結構基因)的DNA體外轉導。在此實例中，包含有調控序列，表現序列和接合授器的DNA以同源的重組被引入細胞，進入在細胞之染色體組預選的位置。引入此DNA得到一個新的轉錄單元，其中的調控序列，表現序列和接合授器位置是可操作地聯結於內生的基因。

“可操作地聯結”一詞是指第一序列被放置於足夠近於第二序列，使得第一序列可影響第二序列或第二序列控制的區域。例如，調控序列可操作地聯結於一個促進劑，而此序列強化促進劑轉錄的能力。在這情況下，調控序列通常是在促進劑的5’位置。調控序列和促進劑可再可操作地聯結基因，使得該基因在調控序列/促進劑組合的控制下表現，這通常是基因的5’位置。

DNA的引入通常接著細胞的選擇，該細胞已在需要的位置，打開接受促進劑所要的基因。可應用的選擇方法說明於，例如，U.S. patent Nos. 5,641,670和5,272,071。選擇的技術也由Mansour等人在*Nature* 136: 348, 349 (1988)說明。選擇之後，培養表現所要基因的細胞，得到表現的基因產物。

如較佳實例，可用於hZP3突變表現的DNA序列編碼較短蛋白質(多肽)分子，(也就是，小於25 kDa的多肽，特別是小於10 kDa，更特別的是小於5 kDa的多肽)。這些較佳的蛋白質序列包括如序列辨識編號:1顯示的核心

五、發明說明（18）

區域。本發明者瞭解序列辨識編號:1是對ZP3種屬間糖基化圖譜最重要的測定物，有此序列一定質量的小蛋白質會特別的強力結合精子。此序列辨識編號:1與老鼠相關ZP3序列的54%同源。“同源的”的意思是，當二序列比較，54%胺基酸是相同的。不管同系物，老鼠ZP3小量結合人類精子，雖然這親合性是少於人類ZP3觀察到的十分之一，通常少於百分之一的層次。此處所用“可強力結合人類精蟲”意思是結合強度至少大約10倍(如10倍)於老鼠ZP3莫耳當量的強度。實際上，此定性測定方法是，在結合檢定法培養不同濃度的物質，以競爭方式直接或間接地測定結合。這種結合檢定法在這裡的實施例中做舉例式的說明，都是有經驗的技術人員已知的。因此，一個不同於人類 ZP3高達46%的肽序列保留有若干人類精子結合活性，該結合活性強於老鼠ZP3莫耳當量的結合力。所以，如一個實例的肽超過46%要與序列辨識編號:1人類ZP3序列相同。而且，較佳的是任何序列的改變要限制於3、8、13、16、17、19、21-23、25、27、28、30、32-35、38和39位置，(列於第1圖的位置)，因為未列出的位置是更要守恆性。

在另外一個實例中，序列與第1圖說明部份的羧端最後的11個胺基酸相同。這是因為此序列中間的絲胺酸在人類特定的糖基化是特別重要的。

本發明另外一個實例是包含序列辨識編號:1編碼的DNA序列的核酸劑載體。這個載體是傳遞ZP3結合活性

五、發明說明（19）

表現的基因序列的載劑。在一個實例中，該載體包含308至348殘基，但沒有其它的ZP3編碼基因。這種載劑的結構是熟練的技術人員所已知的，說明於，如此處附註的參考資料。如這個最後的實例，可用於結合精子和人類生育力效果，診斷的和藥學的糖基化多肽，可預期以相關包含人類308至348個殘基或其它序列辨識編號:1編碼DNA的載體製備。

“rhZP3類似物”一詞是指hZP3突變種和化學改變的衍生物，具有上述天然rhZP3的生化和生物性質。特別的，本發明是預期hZP3胺基酸序列的改變。hZP3可改變DNA編碼蛋白質而變化。較佳的，只變化以相同或相似性質胺基酸保存的胺基酸，而不改變糖基化認知位置，如上述說明。

另外，hZP3的其它變種和衍生種屬可用於本發明。變種包括可維持結合精蟲的能力，並引發頂體反應之hZP3類似物、同系物、衍生物、突變物和模擬物。hZP3片段有關hZP3胺基酸序列的部份也維持其能力。變種和片段可以用化學修飾、蛋白分解酵素消化，或此等之組合的方法而直接從hZP3得到。另外，可用非卵巢細胞株基因工程改變其蛋白質糖基化機構，而與卵母細胞競爭得到非卵母細胞細胞中hZP3蛋白質的表現。

rhZP3的變種和片段(也就是，類似物)也可用基因或cDNA無性生殖的方法等重組型技術得到。可以使用位置特定的和區域指向的遺傳突變技術。參考CURRENT

五、發明說明（20）

PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY vol. 1, ch. 8 (Ausubel et al. Eds., J. Wiley & Sons 1989 & Supp. 1990-93)；PROTEIN ENGINEERING (Oxender & Fox Eds., A. Liss, Inc. 1987)。另外，結合子-掃瞄和PCR-調節的技術可以用來進行遺傳突變。參考PCR TECHNOLOGY (Erlich Ed., Stockton Press 1989)；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, vols., 1 & 2，如前述。上述所有蛋白質序列，結構和模型計畫技術的用法都揭示於PROTEIN ENGINEERING, *loc. cir.* 和 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, vols, 1 & 2, supra。本文中一個較佳的變種是，在胺基末端加有六個組胺酸胺基酸的hrZP3 424胺基酸序列。加入的部份使合成的蛋白質更方便以Ni-NTA親合樹脂來親合性純化。

如本發明培養細胞方法得到的重組型hZP3蛋白質可用許多有經驗技術人員已知的技術純化。較佳的方法是收集製造rhZP3蛋白質細胞的細胞培養基，然後以親合層析法純化蛋白質。外源凝集素管柱，特別是麥芽凝集素管柱，是較佳的親合層析法。也使用Ni-NTA親合樹脂，並在低pH由樹脂沖提出蛋白質和rhZP3類似物，使其如上述的含有多組胺酸部份。

本發明以重組型DNA方法可以大量的生物活性表現的hZP3糖多肽。糖多肽可以用已知的重組型方法得到游離的形態。本文中"游離的"的意思是蛋白質的純化度為

五、發明說明（21）

hZP3沒有其他天然的hZP3的人類蛋白質。游離的蛋白質較佳的是均勻形態，也就是，可使蛋白質排序於氣態定序器的形態，是製造商如Applied Biosystems, Inc.提供的。重組製造後可得到這種均勻度的技術包括SDS-PAGE、等電聚焦法、電泳層析法、離子交換層析法、矽膠擠出層析法、親合層析法、免疫沈澱法以及此等方法之組合。

純化的意思是高於游離的分離程度。"純化的"蛋白質要沒有其他物質，使得任何雜質不會影響蛋白質的生物性質或引起其他不好的結果。

本發明純的或部份純化的蛋白質可作為很多研究和臨床目的之用。一個較佳的用途是生育力試驗。在這個情況下，rhZP3與精蟲樣品混合。將該重組型hZP3結合精蟲，發生頂體反應，然後檢測反應。反應精蟲部份可檢測得到的差異顯示男性生育力或不育症。可育男性精蟲會較不育男性精蟲以較高的速率成功地進行頂體反應。

較佳的方法是，病人的精液和已知的含有適當功能的精子的對照精液，在室溫液化。該液體與緩衝蛋白質溶液混合，然後離心，培養數分鐘使精蟲游出，除去上液體部份，選出各液體樣品中活動的精蟲。活動性的精子最好暴露在1-100 ng/ml rhZP3，更佳的是5-10 ng/ml rhZP3至少5分鐘。這段時間之後，以有經驗技術人員已知的許多方法中的一種技術，比較對照精子和病人試驗

五、發明說明（22）

精子，檢測頂體的狀態。

結合和頂體反應二者都可用來檢測rhZP3的生物活性。在結合試驗中，rhZP3是用來檢測精子和透明帶結合的起始階段。在其他實例中，精子樣品與hrZP3的認定和結合是直接在溶液中，或將hrZP3固定於固體支撐物，如Sephadex ™或瓊脂糖樹脂來測定。這些功能性的試驗可用(a)rhZP3共軛顆粒(固體相)或，(b)似ELISA的試驗部份，rhZP3游離於溶液(液體相)評估精子結合能力。在後面的情況，rhZP3較佳的是共軛結合於另外一個可形成檢定訊號的部份。不育男性個體的精子，和缺少ZP3結合活性者不會結合於rhZP3，因此，可診斷並確認。

頂體反應試驗通常是以一個男性不育症因子與沒有能力的精子聯結進行頂體反應，這是精子穿入卵的重要階段。一個本文中較佳的實例是，以hrZP3處理後，用差別染色和視覺計算總細胞和頂體減少的細胞。由病人的精子rhZP3處理後是否有反應，可測定病人病因學。此反應可以，例如，有經驗技術人員已知的免疫螢光技術檢測。

在另外一個實例中，本發明是有關於變性的人類卵巢細胞株，該細胞包含DNA編碼轉染ZP3。適當的細胞形態包括但不限制於，下面形態的細胞：EB2 (人類卵巢細胞，ATCC)、CaoV-3、CaoV-4、OVCAR-3、SK-OV-3、SW 626 (人類卵巢細胞，ATCC)。這些細胞說明於，例如，Cell Line Catalog of the American Type Culture

五、發明說明（23）

Collection (ATCC)。基因移轉入哺乳類動物細胞，得到"轉染"細胞株的方法說明於下列文獻。參考，例如，Ausubel et al.，*Introduction of DNA Into Mammalian Cells*，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, SECTIONS 9.5.1-9.5.6 (John Wiley & Sons, Inc. 1995)。

在另外一個實例中，本發明提供rhZP3作為子宮內的受精治療法("IUI")"啟動精子刺激劑"的治療用法。在這方法中，以上游方法製備精子。本發明者發現在上游步驟之前，以rhZP3培養這些精子，會在一些精子激發頂體反應，而因此得到啟動效果的精子樣品。這種啟動效果使得處理的精子在女性生殖道內產生更有效對應活動性和頂體反應的調控器。

在這治療的實例中，精子用以前顯示的產生中等頂體反應刺激劑量的rhZP3培養。本文中中等刺激的意思是指定樣品中大約百分之10-15的精子被刺激得到的反應。培養步驟較佳的是至少30分鐘，然後再經過洗滌步驟和上游步驟。

在另外一個治療的應用中，rhZP3被用於胞體漿內精子注射法(ICSI)治療之前刺激頂體反應。在這種情況下使用rhZP3可利於受精，例如以增加成功受精的速率。較佳地，rhZP3加到精子懸浮液，然後在精蟲進入卵母細胞之前，從這懸浮液洗出。在這種情況下，使用高濃度rhZP3，確定使最大部份的處理精子進行頂體反應。

五、發明說明（24）

本發明更以參考下面說明性的實施例進一步說明，它不是限制本發明的範圍。

實施例1：hZP3 cDNA逆相轉錄酶聚合酶鏈反應

由已報告的ZP3序列設計一對引子(A和B引子)。Chamberlin and Dean supra。引子A位於hZP3 cDNA的5'端，從鹼基8-29為5'ACCATGGAGCTGAGCTATAGG3'，引子B位於hZP3 cDNA的3'端，從鹼基1256-1282為5'TTCTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGATGATCGGAAGCAGACACAGGGTGGGAGGCAGT3'。在Xhol限制位置(CTCGAG)的序列和6組胺酸殘基編碼的序列加到引子B的3'端，將cDNA次選殖進入至表現載體，以及由培養基來純化hZP3。

從人類卵巢組織單離總RNA萃取物。進行RT-PCR，RT-PCR使用Perkin-Elmer Cenus (Foster City，CA)說明的"標準方法"。從卵巢mRNA第一株cDNA，以PCR擴大法，得到1315鹼基對DNA片段，其中包含有6個組胺酸尾端和一個Xhol限制位置的全長度hZP3 cDNA。

實施例2：將hZP3 cDNA次選殖進入pcDNA 3.1(+)表現載體

實施例1得到的RT-PCR產物以瓊脂糖膠電泳法分離，切斷1315 bp DNA產物後，以Geneclean II kit (BLO 101，Vista，CA)純化。純化的RT-PCT DNA片段插植入哺乳類動物表現的載體，pcDNA 3.1(+) (Invitrogen，San Diego，CA)，該載體在哺乳類動物細胞內可表現高層次

五、發明說明（25）

的重組型蛋白質，也包含選擇的抗新黴素基因。有hZP3 cDNA的pcDNA 3.1(+)載體變性進入大腸桿菌細胞。正殖株以限制比圖法，南方點漬染色分析法和DNA序列法確認。

由hZP3 cDNA的DNA序列分析知道，hZP3 cDNA序列與Chamberlin和Dean在*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6014-6018 (1990)發表者相同。為了測定hZP3 cDNA是否可轉譯至全長度重組型hZP3，進行體外轉譯(Promega，Madison，WI)。從體外轉譯產物的SDS PAGE分析知道hZP3 cDNA產物是一個只有47kd的蛋白質。這47kd測定代表了重組型hZP3的全長度形態。

實施例3：以rhZP3穩定轉染PA-1細胞

以磷酸鈣方法，將hZP3/pcDNA 3.1(+)結構引入卵巢細胞株"PA-1"細胞。以200mM新黴素(Sigma, St. Louis, MO)選擇具有穩定同化外生基因的細胞。以PCR和南方點漬染色法確認hZP3同化進入寄主細胞基因的DNA。在PCR分析中，hZP3/pcDNA 3.1(+)結構的同化是以位於pcDNA 3.1(+)載體 (T7引子，Invitrogen)的特定的引子和位於hZP3的3'邊的引子B確認。只有在穩定轉染細胞得到預期的產物，而未轉染PA-1細胞不會得到，這表示成功地同化進入PA-1細胞染色體。

重組型hZP3的表現以RT-PCR和西方點漬分析法檢測。RT-PCR分析引子A和B穩定轉染PA-1細胞和非轉染PA-1細胞的mRNA知道，只有在穩定轉染細胞觀察到

五、發明說明（26）

PCR擴大產物。由二細胞群收集培養基，以快速真空濃縮，並以SDS PAGE分析。樣品點到硝化纖維素，混雜入兔子多株型抗體(Ab5a)，它能辨認hZP3保留區域。只有在轉染PA-1細胞和溶解的對照蛋白質看到雜交的信號，表示穩定變性的細胞有rhZP3表現。細胞保存於液態氮中。

實驗4：穩定轉染PA-1細胞之細胞培養

從液態氮取出貯存的細胞樣品1ml，在37°C水浴融化二分鐘。細胞懸浮於5ml的10%FBS和MEM溶液，以1000xg離心5分鐘。細胞團塊再懸浮於10ml的10%FBS，MEM和200μM新黴素溶液，然後培養於100mm培養平皿。到達90%細胞群之後，以胰蛋白酶-EDTA (Sigma, St. Louis, MO)從培養皿移去細胞，以無血清MEM培養基洗滌。細胞團塊再懸浮於60 ml的10%FBS，MEM和200μM新黴素溶液，培養於三個150 mm培養平皿。到達50%細胞群之後，培養基由MEM/10% FBS移到無蛋白質雜腫瘤培養基。每24小時收集一次培養基，加入蛋白酶抑制劑(EDTA、亮肽素、胃酶抑素、PMSF)以避免蛋白質的蛋白分解的消化。收集的培養基保存於-20℃，直到使用。

實驗5：以親合層析法純化重組型hZP3

收集的培養基在37℃融化，通過WGA親合管柱(2x4 cm)純化糖多肽。以每小時3管柱容積速率，將培養基通過管柱兩次之後，以10mM PBS, 0.15M NaCl, pH 7.2-7.5洗滌WGA管柱，直到流出物在280 nm的吸收度低於

五、發明說明（27）

0.01。糖多肽以40 mM磷酸鹽和0.15 M NaCl在pH 3.0-3.1沖提，其中含有0.5 M的N-乙醯基-D-葡糖胺。

從WGA親合層析法部份純化的蛋白質在pH 8.0，4℃下，以50 mM磷酸鈉、10 mM咪唑和300 mM NaCl透析過夜，然後以每小時3-4管柱容積放入Ni-NTA管柱(Qiagen, Valencia, CA)。該管柱以50mM磷酸鈉、300mMNaCl、10%甘油在pH 7.8-8.0洗至沖提物在280 nm的吸收度降到0.01以下。然後hZP3以200 mM磷酸鈉、300 mM NaCl在pH 6.6沖提。沖提的蛋白質以10 mM磷酸鈉、pH 7.5，4℃透析過夜。透析的蛋白質以hZP3抗體、SDS PAGE西方點漬方法進行研究。在65kd到100kd看到帶，顯示hZP3異型物的存在。

實驗6：<u>rhZP3純化至80%純度</u>

第一步驟，以瓊脂糖-小麥芽凝集素(WGA)(Vectoe Laboratories, Inc. Burlingame, CA)層析法從細胞培養基單離糖蛋白質。瓊脂糖-小麥芽凝集素以10倍樹脂容積的WGA結合緩衝液(10 mM PBS，pH 7.4，0.15 M NaCl)平衡之。收集的上清液，在4℃冷房中，以每小時3倍樹脂容積之流速流經WGA樹脂。樹脂以WGA結合緩衝液洗至流出物在280 nm的吸收度小於0.01。結合於WGA樹脂的糖蛋白質以沖提緩衝液A (10 mM PBS，pH 7.4，0.15 M NaCl，500 mM N-乙醯基-D-葡糖胺(Sigma))和沖提緩衝液B (10 mM PBS，pH 7.4，0.15 M NaCl，500 mM N-乙醯基-D-葡糖胺)分離為二個沖提峰。糖蛋白質從樹脂沖

五、發明說明（28）

提出之後，樹脂以WGA結合緩衝液洗滌，直到流出物在280 nm的吸收度小於0.01，然後再以5倍樹脂容積的WGA貯存緩衝液(10 mM PBS，pH 7.4，0.15 M NaCl，20 mM N-乙醯基-D-葡糖胺，0.08%疊氮化鈉(Sigma))洗滌。沖提出的糖蛋白質樣品以Ni-NTA結合緩衝液(50 mM PBS，pH 8.0，300 mM NaCl)透析，於Ni-NTA親合純化。

組胺酸聯結的糖蛋白質(rhZP3)由糖蛋白質部份純化，以WGA親合層析法，以Ni-NTA(氰基-三-醋酸)樹脂(Qiagen)，由細胞培養基單離。含有一個或更多個6xHis親合聯結的蛋白質，位於蛋白質胺端或羧端，以親合(Kd=1013，pH 8.0)結合於Ni-NTA樹脂，遠大於大多數抗體和抗原的親合力，或酵素基質懸浮的50% Ni-NTA樹脂泥狀物移到管柱。二毫升樹脂完全再懸浮，然後以5倍樹脂容積的H_2O洗滌。樹脂以10倍樹脂容積的Ni-NTA結合緩衝液平衡。以Ni-NTA結合緩衝液透析的WGA單離的糖蛋白質樣品流經含有1 ml樹脂的平衡Ni-NTA管柱，其中。流速調整為每小時3-4倍樹脂容積。糖蛋白質樣品流過Ni-NTA管柱之後，樹脂以10倍Ni-NTA結合緩衝液樹脂管柱，該緩衝液包含tween 20 (Fisher)和2-硫化乙醇，洗滌，再以Ni-NTA洗滌緩衝液(50mM PBS，pH 6.6，300 mM NaCl)洗至流出物在280 nm的吸收度小於0.01。His-聯結的糖蛋白質以包含有40mM咪唑(Sigma)的Ni-NTA洗滌緩衝液從樹脂沖提出。

以centricon 50過濾，從Ni-NTA純化的糖蛋白質樣

五、發明說明（29）

品，除去分子量小於50kD的共純化蛋白質。rhZP3糖蛋白質是80%純度，以考馬斯藍染色蛋白質電泳膠法比重掃瞄法評估。

實驗7：精子生物活性之半帶檢定("HZA")

卵母細胞之製備：人類未成熟(prophase I)卵母細胞貯存於過滲透壓溶液，其中含有1.5 M $MgCl_2$及40 mM Hepes緩衝液，pH 7.3和0.1%聚乙烯吡咯酮。卵母細胞在4℃可貯存高達90天，而不影響其HZA檢定的操作性。在切斷之前，卵母細胞以Ham's F-10 (Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y.) 培養基洗過。以架於逆相-反逆相顯微鏡(Nikon Diaphot, Garden City, N.Y.)的Narishige micromanipulators (Tokyo, Japan)將卵母細胞切為二半，稱為半帶。

精子之製備及暴露於30ηg/ml rhZP3：一部份精液以2倍容積添加5%的人類血清球蛋白(HSA)的Ham's F-10洗過。精子懸浮物在400 x g離心8分鐘。重複此洗滌操作。最後的團塊放置於500 μl Ham's F-10/5%HSA，在37°C、5%CO_2存在下培養一個小時。移去HSA精子懸浮物，分為二部份。一部份用為對照精子(5%CO_2，37°C 4小時)。第二部份在相同的條件培養，但有30 ng/ml rhZP3的存在。移去含有可動精蟲的上清液，各取一滴100μl分別置於培養皿，浸於礦油中。

半帶精子培養：一個半帶移到對照滴，相對的半帶放入rhZP3處理的液滴。配子在37°C、5% CO_2培養4小

五、發明說明（30）

時。半帶培養基浸潤，用細玻璃滴管取出鬆黏的精子。

結果。緊黏接於各半帶凸表面的精蟲數量，以逆相顯微鏡，200 xg以視覺測定。各樣品"半帶指數"以rhZP3-處理的精子結合數目與未處理對照精子結合數目的百分比計算。不育病人的缺陷精子會得到較正常的精子低的半帶指數，臨床上可用這個方法檢測。

實驗8：頂體反應免疫螢光檢定

精液由正常的捐贈者得到，在室溫液化30-60分鐘。精液分成0.5 ml部份，置於15 ml塑膠管底部。各部份以2倍容積Ham's F-10 (Sigma)和5%人類血清蛋白素洗滌。精子懸浮物在400 xg離心8分鐘。重複一次洗滌。最後的團塊以置於500ml Ham's F-10和5%人類血清蛋白素。管子鬆鬆地加蓋，於30°角，37°C，5%二氧化碳培養一個小時，使精子從精液游入培養基。

使用螢光素異硫氰酸酯共軛之Pisum Satvum凝集素(PSA, Vector Lab, Burlingame, CA)探頭評估在染色的玻片上精蟲頂體的狀況。相同的玻片以Hoescht stain複染，DNA-特定的點在死亡精蟲核膜，得到螢光複染。使用epifluorescent顯微鏡，以400 X倍率讀取染色的玻片。重複三個玻片作為檢定。從顯微鏡目鏡10個任意範圍，每一個染色的玻片評估至少100個細胞。兩組研究者讀取其結果，求其平均值。其結果以頂體反應的精蟲在總分配的百分比表示。含有hZP3實驗4細胞培養基處理的精子比對照(無hZP3蛋白質)培養基處理的精蟲形成更有意

五、發明說明（31）

義的頂體反應。

此處附註的所有的著作(包括網內網址位置)和專利文獻全部作為參考資料。

表 1

位置 No.	較佳胺基酸	其它代表性胺基酸
310	phe	tyr
315	pro	
320	gln	asp
323	asn	gln
324	lys	
326	asp	asn, glu, gln, ile, pro, phe, cys
328	gly	ala, ile
329	thr	ser
330	pro	
332	his	lys
334	arg	lys
335	arg	lys
337	pro	met
339	val	iso, met
341	ser	thr
342	gln	asn
345	arg	lys

表 1

位置 No.	較佳胺基酸	其它代表性胺基酸
310	phe	tyr
315	pro	
320	gln	asp
323	asn	gln
324	lys	
326	asp	asn, glu, gln, ile, pro, phe, cys
328	gly	ala, ile
329	thr	ser
330	pro	
332	his	lys
334	arg	lys
335	arg	lys
337	pro	met
339	val	iso, met
341	ser	thr
342	gln	asn
345	arg	lys

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：用來試驗男性生育力之具有生物活性的重組型人類透明帶蛋白質3(hZP3)）

本發明是有關於用於製造具有結合至人類精蟲之生物活性的重組型人類透明帶蛋白質("rhZP3")和糖基化肽的方法。一種人類卵巢細胞株被用於製造具有全生物活性所需的糖基化圖譜之rhZP3。本案揭示具有與人類精子結合之活性的有用肽類之測定方法及合成方法，以及這些肽類和蛋白質於治療和診斷上的用法。

英文發明摘要（發明之名稱：RECOMBINANT, BIOLOGICALLY ACTIVE HUMAN ZONA PELLUCIDA PROTEIN 3 (hZP3) TO TEST MALE FERTILITY）

This invention relates to methods for producing recombinant human zona pellucida protein ("rhZP3") and glycosylated peptide having biological activity of binding to human spermatozoa. A human ovarian cell line is used to produce rhZP3 having a glycosylation pattern required for full biological activity. Methods of determining useful peptides with binding activity for human sperm and their synthesis, as well as using such peptides and proteins in therapeutics and diagnostics are disclosed.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

第2圖

: 人類 Length: 41

SWFPVQGPADICQCCNKGDCGTPSHSRRQPHVMSQWSRSVS

. . . . . .

名稱	殘段號	No.	可能值	閾值
人類	Thr	22	0.0285	0.4982

名稱	殘段號	No.	可能值	閾值
人類	Ser	1	0.0629	0.5132
人類	Ser	24	0.0104	0.5253
人類	Ser	26	0.0265	0.5309
人類	Ser	34	0.0033	0.6267
人類	Ser	37	0.4498	0.5825
人類	Ser	39	0.0009	0.5126
人類	Ser	41	0.0082	0.5022

第 3 圖

名稱：老　鼠　　長度：　41

SWLPVQGDADICDCCSHGNCSNSSSSQFQIHGPRQWSKLVS

. . . . . .

名　稱	殘段號	No.	可能值	閾值
名　稱	殘段號	No.	可能值	閾值
老　鼠		1	0.0116	0.5078
老　鼠		16	0.0002	0.5747
老　鼠		21	0.0403	0.5845
老　鼠		23	0.0074	0.5310
老　鼠		24	0.1625	0.5397
老　鼠		25	0.0167	0.5585
老　鼠		26	0.0003	0.5656
老　鼠		37	0.0024	0.5627
老　鼠		41	0.0005	0.5127

申請日期	88.4.23
案號	88102445
類別	C07K14/435, C12N5/22, 15/11, G01N33/53

修正 補充 年 月 日 93.4.30

A4 C4

公告本

（以上各欄由本局填註）

第88102445號 發明 專利說明書 修正本 修正日期：93年4月

一、發明名稱	中文	用來試驗男性生育力之具有生物活性的重組型人類透明帶蛋白質3(hZP3)
	英文	RECOMBINANT, BIOLOGICALLY ACTIVE HUMAN ZONA PELLUCIDA PROTEIN 3(hZP3) TO TEST MALE FERTILITY
二、發明人	姓名	(1)東柯溫 (2)塞吉歐・歐尼喬 (3)威廉E.吉朋斯
	國籍	美國
	住、居所	(1)美國維吉尼亞州乞沙比克・森林湖圓環1115號 (2)美國維吉尼亞州・諾佛克市加德納道6823號 (3)美國維吉尼亞州・諾佛克市南威克環街1413號
三、申請人	姓名（名稱）	美商・東方維吉尼亞醫學院
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國維吉尼亞州・諾佛克市寇利大道601號
	代表人姓名	大衛E.辛爾

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

I229085 修正補充 93.9.21
公告本

六、申請專利範圍

第088102445號專利再審查案申請專利範圍修正本

修正日期：93年9月

1. 一種65kd至100kd之重組型人類透明帶蛋白質3(hZP3)，其可以在低於1μg/ml之濃度下結合人類精蟲，並於結合一小時內引發頂體反應，其中該hZP3包含有一包含下述胺基酸序列之糖多肽：

Ser Trp Phe Pro Val Glu Gly Pro Ala Asp Ile Cys Gln Cys Cys Asn Lys Gly
308 318
Asp Cys Gly Thr Pro Ser His Ser Arg Arg Gln Pro His Val Met Ser Gln Trp
328 338
Ser Arg Ser Ala Ser
348。

2. 如申請專利範圍第1項之重組型人類透明帶蛋白質3(hZP3)，其中該糖多肽係由人類卵巢細胞株所製造。

3. 一種用於製造申請專利範圍第1項之重組型人類透明帶蛋白質3(hZP3)的方法，其包含下列步驟：

(a) 將一編碼有如申請專利範圍第1項之重組型人類透明帶蛋白質3(hZP3)之聚核苷酸轉導至一來自一人類卵巢細胞株的細胞中；

(b) 建立一經穩定轉染之細胞培養物以製造該糖多肽；及

(c) 從該細胞培養物分離出該糖多肽。

4. 如申請專利範圍第3項之方法，其中該卵巢細胞株為PA-1。

5. 如申請專利範圍第3項之方法，其中該聚核苷酸編碼一含有一人類透明帶蛋白質3(hZP3)序列之多肽。

六、申請專利範圍

6. 如申請專利範圍第 1 項之重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)，其中該糖多肽具有 41 個到 300 個之間的胺基酸。

7. 如申請專利範圍第 1 項之重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)，其中該糖多肽具有 41 個到 200 個之間的胺基酸。

8. 如申請專利範圍第 1 項之重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)，其中該糖多肽具有 41 個到 100 個之間的胺基酸。

9. 如申請專利範圍第 1 項之重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)，其中該糖多肽具有 41 個到 65 個之間的胺基酸。

10. 一種於體外從人類精蟲樣品檢測男性不育症的方法，其包含下面步驟：

(a) 令申請專利範圍第 1 項的重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)與該樣品中的精蟲混合以形成一混合物，；

(b) 檢測該混合物中精蟲的生物活性；及

(c) 以一參考值來比較該生物活性。

11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中步驟(b)更包含添加 *Pisum Satvum* 凝集素於該混合物中。

12. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)被固著於一個固體相上。

13. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)是由人類卵巢細胞株之表現而被

六、申請專利範圍

製備者。

14. 如申請專利範圍第 13 項之方法，其中該人類卵巢細胞株為 PA-1。

15. 一種由一核酸載體所轉形的人類卵巢細胞，該核酸載體可用於製造申請專利範圍第 1 項的重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)。

16. 一種 65kd 至 100kd 之重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)，其可以在低於 1μg/ml 之濃度下結合人類精蟲，並於結合一小時內引發頂體反應，其包含有一包含下述胺基酸序列之糖多肽：

Ser Trp Phe Pro Val Glu Gly Pro Ala Asp Ile Cys Gln Cys Cys Asn Lys Gly
308 318
Asp Cys Gly Thr Pro Ser His Ser Arg Arg Gln Pro His Val Met Ser Gln Trp
328 338
Ser Arg Ser Ala Ser
348

或是其守恆性取代的胺基酸序列，該等保留地取代係位於胺基酸位置數 310、315、320、323、324、326、328、329、330、332、334、335、337、339、340、341、342、345 及 346 之至少一者，其中該糖多肽以結合強度至少 10 倍於老鼠 ZP3 莫耳當量的強度結合至人類精子。

17. 一種 65kd 至 100kd 之重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)，其可以在低於 1μg/ml 之濃度下結合人類精蟲，並於結合一小時內引發頂體反應，其包含有一包含下述胺基酸序列之糖多肽：

六、申請專利範圍

Ser-Trp-A-Pro-Val-Glu-Gly-Pro-Ala-Asp-Ile-Cys-B-Cys-Cys-C-Lys-Gly-D-Cys-E-F-Pro-Ser-G-Ser-H-I-Gln-J-His-K-Met-L-M-Trp-Ser-N-Ser-Ala-Ser， 其中

A 係選自 Phe 及 Tyr 所構成的群組；

B 係選自 Gln 及 Asp 所構成的群組；

C 係選自 Asn 及 Gln 所構成的群組；

D 係選自 Asp、Asn、Glu、Gln、Ile、Pro、Phe 及 Cys 所構成的群組；

E 係選自 Gly、Ala 及 Ile 所構成的群組；

F 係選自 Thr 及 Ser 所構成的群組；

G 係選自 His 及 Lys 所構成的群組；

H 係選自 Arg 及 Lys 所構成的群組；

I 係選自 Arg 及 Lys 所構成的群組；

J 係選自 Pro 及 Met 所構成的群組；

K 係選自 Val、Iso 及 Met 所構成的群組；

L 係選自 Ser 及 Thr 所構成的群組；

M 係選自 Gln 及 Asn 所構成的群組；以及

N 係選自 Arg 及 Lys 所構成的群組。

18. 一種 65kd 至 100kd 之糖基化的重組型人類透明帶蛋白質 3 (hZP3)，其可以在低於 1 μg/ml 之濃度下結合人類精蟲，並於結合一小時內引發頂體反應，其包含有如下所述之胺基酸序列：，

Ser Trp Phe Pro Val Glu Gly Pro Ala Asp Ile Cys Gln Cys Cys Asn Lys Gly
308 318
Asp Cys Gly Thr Pro Ser His Ser Arg Arg Gln Pro His Val Met Ser Gln Trp

六、申請專利範圍

328 338
Ser Arg Ser Ala Ser
348

其係以人類卵巢細胞表現，具有精子結合以及頂體反應誘發活性。

19. 如申請專利範圍第 18 項之蛋白質，其中該卵巢細胞係擇自由下列所構成的群組：PA-1、EB_2、CaoV-3、CaoV-4、OVCAR-3、SKOV-3 以及 SW 626。

20. 如申請專利範圍第 18 項之蛋白質，其中該卵巢細胞係 PA-1。

I229085 修正
年 月 日
93. 4. 30 補充

第 088102445 號專利再審查案圖示修正頁
修正日期：93 年 4 月

第 1 圖

Ser Trp Phe Pro Val Glu Gly Pro Ala Asp Ile Cys Gln Cys Cys Asn Lys Gly
308 318
Asp Cys Gly Thr Pro Ser His Ser Arg Arg Gln Pro His Val Met Ser Gln Trp
328 338
Ser Arg Ser Ala Ser
348