

(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2021-505191

(P2021-505191A)

(43) 公表日 令和3年2月18日(2021.2.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z N A D	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/076 (2010.01)	C 1 2 N 5/076	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/075 (2010.01)	C 1 2 N 5/075	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/073 (2010.01)	C 1 2 N 5/073	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-547256 (P2020-547256)	(71) 出願人	520196254
(86) (22) 出願日	平成30年12月3日 (2018.12.3)		クロモキシオン プロプライエタリー リ
(85) 翻訳文提出日	令和2年8月3日 (2020.8.3)		ミティド
(86) 国際出願番号	PCT/AU2018/000243		オーストラリア国, クイーンズランド 4
(87) 国際公開番号	W02019/109123		3 0 6, カラナ ダウンズ, タラルック
(87) 国際公開日	令和1年6月13日 (2019.6.13)		コート 1 4
(31) 優先権主張番号	62/594, 124	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成29年12月4日 (2017.12.4)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
(31) 優先権主張番号	62/594, 153	(74) 代理人	100117019
(32) 優先日	平成29年12月4日 (2017.12.4)		弁理士 渡辺 陽一
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 雄雌選択を含む材料および方法

(57) 【要約】

1. 随意に精子を処置工程へと供する工程; 2. 工程 1 の精子を、目的の雌性または雄性精子のいずれかを選択するように雌雄選択工程に供する工程; 3. 工程 2 の目的の精子を使って受精工程を実施し、少なくとも 1 つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を産生する工程; 4. 工程 3 の少なくとも 1 つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を、少なくとも 1 つの溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質を選択的に放出するように、精子の存在下で選択的に溶解させる工程; および 5. 前記放出された細胞性物質を少なくとも 1 つの下流用途において使用する工程を含む方法。

【選択図】 図 B - 4 B

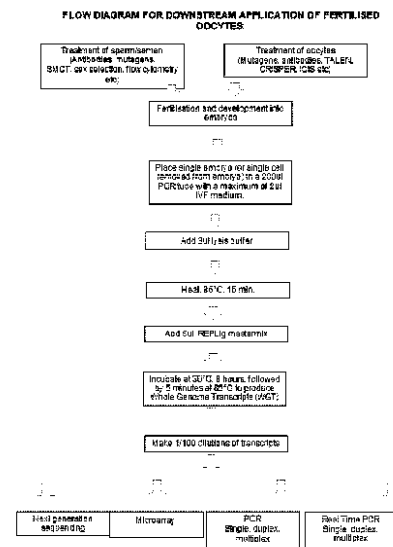


Figure 4B

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

次の工程：

- 1．随意に精子を処置工程へと供する工程；
- 2．工程 1 の前記精子を、目的の雌性または雄性精子のいずれかを選択するように雌雄選択工程に供する工程；
- 3．工程 2 の目的の前記精子を使って受精工程を実施し、少なくとも 1 つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を産生する工程；
- 4．少なくとも 1 つの溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質を選択的に放出するように、工程 3 の前記少なくとも 1 つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を、精子の存在下で選択的に溶解させる工程；および
- 5．前記放出された細胞性物質を少なくとも 1 つの下流用途において使用する工程を含む方法。

10

【請求項 2】

前記工程 1 が、前記精子を実験技術に供し；前記精子を突然変異原または疑いのある突然変異原に供し；前記精子を組換え技術により操作し；前記精子を抗体などの分子に供し；または前記精子を放射線に暴露することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

随意に、工程 3 の前記少なくとも 1 つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を、工程 1 に記載の処置工程に供することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

工程 2 が、雄性精子に特異的に結合する抗体を使って実施される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体が、哺乳動物の雄性精子（雄精子細胞）の表面タンパク質に特異的に結合するおよび／またはそれに対して惹起されるモノクローナル抗体またはその断片である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体が雄性精子細胞の表面タンパク質 D E A D / D B Y に特異的に結合し；前記抗体が次の D B Y のエピトープ：S F F F F E M E S H（配列番号 3 5 3）、F S I F N R D G V（配列番号 3 5 4）または S L N I F L D R W（配列番号 3 5 5）の 1 つに特異的に結合し；前記抗体が C D R 1（配列番号 3 6 3）、C D R 2（配列番号 3 6 4）および C D R 3（配列番号 3 6 5）のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含みそして／または前記抗体が C D R 1（配列番号 3 6 0）、C D R 2（配列番号 3 6 1）および C D R 3（配列番号 3 6 2）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含み；前記抗体が本明細書中に記載の R E 5 であり；前記抗体が配列番号 3 5 2 および 8 4 ～ 1 5 9 のいずれか 1 つまたはその部分に対して惹起され；または前記抗体が配列番号 3 4 7 のアミノ酸配列に対して惹起される、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

工程 2 が、哺乳動物の精子を含む精液を、前記抗体が前記精液の雄性精子に特異的に結合するようなモノクローナル抗体またはその断片に供することを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8】

工程 3 が、少なくとも 1 つの卵母細胞を、本質的に同一の培地において（1）洗浄、（2）採取、（3）培養、（4）受精、随意に（5）洗浄、および随意に（6）培養する連続の工程を含み（ただし培地の組成は、工程（1）～（6）の 1 つ以上において少なくとも 1 つのサプリメントで選択的に補足されることによって段階的に変更される）、それにより前記少なくとも 1 つの受精卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚の生産を改善する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

50

工程 4 が、卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚が溶解されそして前記卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質が放出されるが、精子は溶解されないような溶解溶液に、卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を供することを含む請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記下流用途が、ポリメラーゼ酵素を使って溶解緩衝液内の放出された物質を選択的に複製することを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

遺伝子の変化または遺伝子型に対する変化を特徴づけるために用いられる；または突然変異原を同定するために用いられる；または診断目的に用いられる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 12】

哺乳動物雄精子（雄精子細胞）の表面タンパク質に特異的に結合するおよび／またはそれに対して惹起される、モノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 13】

前記雄精子細胞の表面タンパク質が D E A D / D B Y である、請求項 12 に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 14】

前記抗体またはその断片が、次の D B Y のエピトープ：S F F F F E M E S H（配列番号 3 5 3）、F S I F N R D G V（配列番号 3 5 4）または S L N I F L D R W（配列番号 3 5 5）の 1 つに特異的に結合する、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

20

【請求項 15】

前記抗体またはその断片の重鎖可変ドメインが、C D R 1（配列番号 3 6 3）、C D R 2（配列番号 3 6 4）および C D R 3（配列番号 3 6 5）のアミノ酸配列を含み、そして／または前記抗体またはその断片の軽鎖可変ドメインが C D R 1（配列番号 3 6 0）、C D R 2（配列番号 3 6 1）および C D R 3（配列番号 3 6 2）のアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 16】

前記抗体またはその断片の重鎖可変ドメインが配列番号 3 5 0 のアミノ酸配列を含むか、またはその重鎖可変ドメインが配列番号 3 5 0 により示されるアミノ酸配列の 1 個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により誘導され、それが配列番号 3 5 0 と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の同一性を有し、そして前記抗体またはその断片が表面タンパク質と特異的に結合する活性を有する、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

30

【請求項 17】

前記抗体またはその断片の軽鎖可変ドメインが配列番号 3 5 1 のアミノ酸配列を含むか、またはその軽鎖可変ドメインが配列番号 3 5 1 により示されるアミノ酸配列の 1 個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により誘導され、それが配列番号 3 5 1 と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の同一性を有し、そして前記抗体またはその断片が表面タンパク質と特異的に結合する活性を有する、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体。

40

【請求項 18】

前記抗体またはその断片が、ウシおよびブタ種を含む異なる哺乳動物種の D E A D / D B Y に結合することができる、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項 19】

請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその断片の有効量と、許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む組成物。

【請求項 20】

医薬組成物の形態、獣医学用途の組成物の形態、または研究目的のための形態である、

50

請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記許容される担体、希釈剤または賦形剤が精液増量剤である、請求項 19 または 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物を含む、試薬、キットまたはチップ。

【請求項 23】

診断薬、試薬または道具として請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくは断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

10

【請求項 24】

前記モノクローナル抗体またはその断片が検出目的のために標識され、またはビーズのような固形担体と結合することができる、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

哺乳動物精子（「精子細胞」）の処置方法であって、抗体が精液の雄性精子（「雄精子細胞」）に特異的に結合するように、精子を含む哺乳動物精液を請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物を供する工程を含む方法。

【請求項 26】

生産される雌子孫の確率を高めるための哺乳動物精子（「精子細胞」）の処置方法であって、抗体またはその断片が雄性精子に特異的に結合するように、哺乳動物の精子を請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物と接触させる工程を含む方法。

20

【請求項 27】

哺乳動物の精液の雌雄鑑別方法であって、抗体またはその断片が精液の雄性精子に特異的に結合するように、精液の精子を請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物と接触させる工程を含む方法。

【請求項 28】

請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物で処置した精液または精子を含有する組成物。

30

【請求項 29】

生産される雌子孫の確率を高めるために哺乳動物を人工受精させる方法であって、該哺乳動物に、

(i) 請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片の有効量；

(ii) 請求項 19 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物の有効量；または

(iii) 請求項 21 に記載の組成物の有効量

を投与し、それにより前記哺乳動物を人工受精させる工程を含む方法。

40

【請求項 30】

請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物と雄性精子（「雄精子細胞」）とのコンジュゲート。

【請求項 31】

請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片と雄性精子とのコンジュゲート、または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物と雄性精子とのコンジュゲートを含む処置された精子または処置された精液。

【請求項 32】

雄性精子（「雄精子細胞」）選択のための請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノ

50

ノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物の使用であって、前記雄性精子選択が場合により大量の精液において実施される使用。

【請求項 33】

哺乳動物の精液または精子を雌雄鑑別するための、請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその断片または請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 34】

精子の量を定量し、次いで雄精子細胞への抗体の結合を最適化するように適当量のモノクローナル抗体またはその断片を添加する工程を含む、請求項 25、26、27 および 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を含むハイブリドーマ細胞。

【請求項 36】

(i) 請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメイン；

(ii) 請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメイン；

(iii) 請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインの CDR1 (配列番号 363)、CDR2 (配列番号 364) および CDR3 (配列番号 365)；および / または

(iv) 請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメインの CDR1 (配列番号 361)、CDR2 (配列番号 362) および CDR3 (配列番号 363)

をコードする、1 または複数の単離、精製または組み換え核酸。

【請求項 37】

配列番号 347 のアミノ酸配列に対して惹起された、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 38】

少なくとも 1 つの受精卵母細胞、着床前胚または胚盤胞の生産方法であって、少なくとも 1 つの卵母細胞を、本質的に同一の培地において (1) 洗浄、(2) 採取、(3) 培養、(4) 受精、随意に (5) 洗浄、および随意に (6) 培養する連続の工程を含み (ただし培地の組成は、工程 (1) ~ (6) の 1 つ以上において少なくとも 1 つのサプリメントで選択的に補足されることによって段階的に変更される)、それにより前記少なくとも 1 つの受精卵母細胞または着床前胚または胚盤胞の生産を改善する、方法。

【請求項 39】

少なくとも 1 つの受精卵母細胞、着床前胚または胚盤胞の生産方法であって、次の連続工程：(1) 卵丘・卵母細胞複合体 (COC) を洗浄して該 COC から少なくとも 1 つの卵母細胞を放出させる工程、(2) 工程 (1) の少なくとも 1 つの卵母細胞を採取する工程、(3) 工程 (2) の少なくとも 1 つの卵母細胞を培養する工程、(4) 工程 (3) の少なくとも 1 つの卵母細胞を精子で受精させ、少なくとも 1 つの受精卵母細胞、胚または胚盤胞を生産する工程、随意に (5) 少なくとも 1 つの受精卵母細胞または胚を洗浄する工程、および随意に (6) 更なる胚の発達のために工程 (5) からの少なくとも 1 つの受精卵母細胞または胚を培養する工程を含み、ここで工程 (1) ~ (6) において本質的に同じ培地が使用され (ただし培地の組成は、工程 (1) ~ (6) の 1 つ以上において少なくとも 1 つのサプリメントで選択的に補足されることによって段階的に変更される)、それにより前記少なくとも 1 つの受精卵母細胞、着床前胚または胚盤胞の生産を改善する、方法。

【請求項 40】

少なくとも 1 つの受精卵母細胞、着床前胚、または胚盤胞の生産方法であって、次の工程：

10

20

30

40

50

- (1) 卵丘・卵母細胞複合体(COS)の調製物を培地で2回、そして培地+サプリメント1で1回洗浄し、該COSから少なくとも1つの卵母細胞を放出させる工程；
- (2) 工程(1)の前記少なくとも1つの卵母細胞を回収し、そしてその少なくとも1つの卵母細胞を培地+サプリメント1の中で所定の時間に渡り培養する工程；
- (3) 工程(2)の前記少なくとも1つの卵母細胞を培地+サプリメント2の中で所定の時間に渡り培養する工程；
- (4) 工程(3)の前記少なくとも1つの卵母細胞を、培地+サプリメント3の中で所定の期間に渡り精子で受精させて少なくとも1つの受精卵母細胞を生産する工程；随意に
- (5) 前記少なくとも1つの受精卵母細胞または産生した胚を、培地+サプリメント4で洗浄する工程；および随意に
- (6) 工程(5)からの前記少なくとも1つの受精卵母細胞または胚を、更なる胚の発達のために培地+サプリメント4中で培養する工程
- を含み、ここで工程(1)～(6)の各工程で本質的に同じ培地が使用される方法。

10

【請求項41】

請求項38、39または40の方法により生産させた、少なくとも1つの受精卵母細胞、胚盤胞または着床前胚。

【請求項42】

請求項38、39または40に記載の、または請求項38、39または40の方法で使用する培地もしくは培地+サプリメント。

20

【請求項43】

請求項38～41のいずれか一項に記載の少なくとも1つの着床前受精卵母細胞、胚盤胞または胚を生産するためのハイスルーブットインビトロ生産(IVP)法。

【請求項44】

精子の存在下で卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させる方法であって、

卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚が溶解され、前記卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質が溶解されるが、精子は溶解されないように、卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を溶解溶液に供する工程を含む方法。

【請求項45】

請求項44の方法により生産された、放出された細胞性物質。

30

【請求項46】

溶解溶液により溶解されない精子の存在下で卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させるため、かつ前記溶解された卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質を選択的に放出させるための溶解溶液であって、前記細胞性物質と溶解溶液とが下流用途に適合するような溶解溶液。

【請求項47】

精子の存在下で卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させる方法であって、溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚からの遺伝物質がポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製可能であり、前記方法が

40

(1) 卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を、その卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚が溶解されそして前記卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から遺伝物質が放出されるが、精子は溶解されないような溶解溶液に供する工程；および

(2) 前記溶解緩衝液中の放出された遺伝物質を、ポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製する工程を含む方法。

【請求項48】

請求項47の方法により生産された、放出された遺伝物質。

【請求項49】

溶解溶液により溶解されない精子の存在下で卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させるため、かつ溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から

50

遺伝物質を選択的に放出させるための溶解溶液であって、前記溶解緩衝液内に放出された遺伝物質はポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製することが可能である、溶解溶液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔関連出願〕

本出願は、ともに2017年12月4日出願の米国特許出願第62/594124号および同第62/594153号の優先権を主張し、それらの出願の全内容が相互参照により本明細書中に組み込まれる。

標題 1

生殖方法

〔技術分野 1〕

【0002】

本発明は一般に、介助生殖技術に関する。一態様では、本発明は、ブタにおける少なくとも1つの受精卵母細胞、着床前の胚または胚盤胞、好ましくは着床前の受精卵母細胞、着床前の胚または胚盤胞の生産方法に関する。

〔背景技術 1〕

【背景技術】

【0003】

過去30年間の間、再生生理学を研究するためでなく他のバイオテクノロジー的および生物医学的研究の一部として、例えばトランスジェニックブタの生産のために、ブタの体外胚生産(IVP)を改良することがかなり着目されている(Gil他、2010; Vajta & Callesen, 2012; Liu他、2011; Lopes他、2007; Li他、2013)。幾つかの研究所で許容可能レベル(30 - 35%)の胚盤胞生産が達成されているが(Kim他、2008; Somfai他、2005)、例えばウシに比較してブタのIVPの変動性と脆弱性は、鍵となる要因を依然として解決すべきであることを明白に表している。

【0004】

適切な卵母細胞成熟は、受精の成功の必要条件であり、減数分裂による成熟の一時的中断が最適な細胞質成熟を引き出し、より大きい生産量とその後の胚発生を促進する(Fouladi-Nashta他、1998)。体外受精(IVF)用に新鮮な精液と凍結・融解後の精液との間の差異を減少させるために鋭意努力がなされているが、IVFの効率は多くのIVF研究所において40~50%に留まり(Li他、2003; Alminana他、2005)、精液の最適量はまだ分かっていない。異なるタイプの培地サプリメントおよび培地条件を使用してIVP法を改善しようとする試みにもかかわらず、成功率はまだ最適以下のままである。伝統的なIVP法は、卵母細胞の採集から胚培養に至るまで数種類の培地を使用し、それがおそらくその方法の変動性と再現性の欠如を引き起こし得るのであろう。

【0005】

異なる研究所により使用されるIVPプロトコル間に一貫性がないため、最適化されたIVPシステムが実現されるにはまだほど遠い。

【発明の概要】

【0006】

〔発明の概要 1〕

本発明の一観点では、本発明者らは受精卵母細胞、着床前の胚または胚盤胞の改良生産のための培養技術を開発した。

【0007】

別の態様では、本発明者らは、受精卵母細胞、着床前胚または胚盤胞の改良生産のための、本質的に単一の培地を使用することによる、簡略化されたIVP法を開発した。

【0008】

別の態様では、この改善された胚培養培地および方法は、変動が少なく、高い再現性をもたらし、異なる研究所間を超えて標準として使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

別の態様では、本発明者らの I V P 法の簡易性は、胚発生および品質を損なうことなくハイスループット（高生産性）を促進し、更なる用途、例えば生物医学研究における用途の可能性がある。

【 0 0 1 0 】

本発明の第一の態様によれば、少なくとも 1 つの受精卵母細胞、着床前胚または胚盤胞の産生方法であって、次の連続工程：（ 1 ）洗浄、（ 2 ）採集、（ 3 ）培養、（ 4 ）受精、随意に（ 5 ）洗浄、および（ 6 ）培養を含み、ただし、工程（ 1 ）～（ 6 ）の 1 つ以上において少なくとも 1 つのサプリメントを選択的に補足することによって、培地の組成が工程的に変更され、それにより前記少なくとも 1 つの受精卵母細胞または着床前胚もしくは胚盤胞の生産を改善する方法が提供される。

10

【 0 0 1 1 】

好ましくは、次の連続工程：（ 1 ）卵丘・卵母細胞複合体（COC）を洗浄してCOCから少なくとも 1 つの卵母細胞を遊離させる工程、（ 2 ）工程（ 1 ）の少なくとも 1 つの卵母細胞を採取する工程、（ 3 ）工程（ 2 ）の少なくとも 1 つの卵母細胞を培養する工程、（ 4 ）工程（ 3 ）の少なくとも 1 つの卵母細胞を精子で受精させ、少なくとも 1 つの受精卵母細胞、胚または胚盤胞を生産する工程、随意に（ 5 ）少なくとも 1 つの受精卵母細胞または胚を洗浄する工程、および随意に（ 6 ）更なる胚発生のために工程（ 5 ）からの少なくとも 1 つの受精卵母細胞または胚を培養する工程を含み、ただし、工程（ 1 ）～（ 6 ）の 1 つ以上において少なくとも 1 つのサプリメントを選択的に補足することによって、培地の組成が工程的に変更され、それにより前記少なくとも 1 つの受精卵母細胞または着床前胚もしくは胚盤胞の生産を改善する方法が提供される。

20

【 0 0 1 2 】

本発明の第二の態様によれば、少なくとも 1 つの受精卵母細胞、着床前の胚、または胚盤胞の産生方法であって、次の工程：

（ 1 ）卵丘・卵母細胞複合体（COS）の調製物を培地で 2 回、そして培地 + サプリメント 1 で 1 回洗浄し、COSから少なくとも 1 つの卵母細胞を遊離させる工程；

（ 2 ）工程（ 1 ）の少なくとも 1 つの卵母細胞を回収し、そして少なくとも 1 つの卵母細胞を培地 + サプリメント 1 の中で所定の時間に渡り培養する工程；

（ 3 ）工程（ 2 ）の少なくとも 1 つの卵母細胞を培地 + サプリメント 2 の中で所定の時間に渡り培養する工程；

30

（ 4 ）工程（ 3 ）の少なくとも 1 つの卵母細胞を、培地 + サプリメント 3 の中で所定の期間に渡り精子で受精させる工程；随意に

（ 5 ）少なくとも 1 つの受精卵母細胞または産生した胚を、培地 + サプリメント 4 で洗浄する工程；および随意に

（ 6 ）工程（ 5 ）からの少なくとも 1 つの受精卵母細胞または胚を、更なる胚の発達のために培地 + サプリメント 4 中で培養する工程を含む方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

本発明の第三の態様によれば、第一または第二の態様の方法により産生させた時の少なくとも 1 つの受精卵母細胞、胚盤胞または着床前胚が提供される。

40

【 0 0 1 4 】

本発明の第四の態様によれば、本発明の第一または第二の態様において記載された培地または培地 + サプリメント（ 1、2、3 または 4 ）が提供される。

【 0 0 1 5 】

本発明の第五の態様によれば、本発明の前の態様のいずれか 1 つに従って記載された少なくとも 1 つの着床前の受精卵母細胞、胚盤胞または胚を生産するハイスループットインビトロ産生（IVP）法が提供される。

【 0 0 1 6 】

卵母細胞はヒトまたは任意の適当な動物のタイプから供給され得る。動物は哺乳動物で

50

あり得る。動物は、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジまたはヤギのような家禽でありうる。動物はコンパニオンアニマル、例えばイヌまたはネコであり得る。動物は実験動物、例えばウサギ、マウスまたはラットでありうる。好ましくは卵母細胞はブタに由来する。

【0017】

好ましくは複数の受精卵母細胞、胚または胚盤胞が上述の本発明の種々の態様により算出される。より好ましくは、多数の受精卵母細胞、胚盤胞または胚が一度におよび同時に生産される。

【0018】

任意の適当なタイプの培地を使用できる。本発明者らは体外成熟（IVM）培地M-199が、本発明の第一、第二および第四の態様に特に好適に培地であることを発見したが、M-199に類似した性質を有する任意の培地を使用できる。

10

【0019】

培地は次のタイプの成分の1つ以上を含むことができる：栄養またはエネルギー（例えばグルコース、タンパク質、アミノ酸）；ミネラル類（例えば塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二水素ナトリウム一水和物、硫酸マグネシウム七水和物、炭酸水素ナトリウム、乳酸ナトリウム、乳酸カルシウム、硝酸鉄九水和物）；ビタミン類（例えばビタミンA、チアミン、リボフラビン、ピリドキシン、ピリドキサルHCl、PABA、ナイアシンアミド、ナイアシン、アスコルビン酸、ピオチン、D-パントテン酸カルシウム、塩化コリン、エルゴカルシフェロール、葉酸、i-イノシトール、メナジオン）；pH指示薬（例えばフェノールレッド）；抗菌剤（例えばペニシリンG、ストレプトマイシン）；酸化防止剤（例えばグルタチオン）；および他の適当なサプリメント（例えばブタ卵胞液（PFF）、最小必須培地、ウシ胎児血清、妊馬血清ゴナドトロピン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ピルビン酸ナトリウムおよびカフェイン）。

20

【0020】

典型的には、M-199は下の表1Aに示す性質を有するだろう。

【0021】

表1A. M-199の性質

【表 1 - 1】

成分	分子量	濃度 (mg/L)	mM
アミノ酸			
グリシン	75.0	50.0	0.6666667
L-アラニン	89.0	25.0	0.28089887
L-アルギニン塩酸塩	211.0	70.0	0.33175355
L-アスパラギン酸	133.0	30.0	0.22556391
L-システイン塩酸塩-H ₂ O	176.0	0.1	5.681818E-4
L-システイン 2 HCl	240.0	26.0	0.108333334
L-グルタミン酸	147.0	75.0	0.5102041
L-グルタミン	146.0	100.0	0.6849315
L-ヒスチジン塩酸塩-H ₂ O	210.0	21.88	0.10419047
L-ヒドロキシプロリン	131.0	10.0	0.07633588

10

20

【表 1 - 2】

L-イソロイシン	131.0	40.0	0.3053435
L-ロイシン	131.0	60.0	0.45801526
L-リシン塩酸塩	183.0	70.0	0.38251367
L-メチオニン	149.0	15.0	0.10067114
L-フェニルアラニン	165.0	25.0	0.15151516
L-プロリン	115.0	40.0	0.3478261
L-セリン	105.0	25.0	0.23809524
L-トレオニン	119.0	30.0	0.25210086
L-トリプトファン	204.0	10.0	0.04901961
L-チロシンニナトリウム塩二水和物	261.0	58.0	0.22222222
L-バリン	117.0	25.0	0.21367522
ビタミン			
アスコルビン酸	176.0	0.05	2.840909E-4
ビオチン	244.0	0.01	4.0983607E-5
塩化コリン	140.0	0.5	0.0035714286
D-パントテン酸カルシウム	477.0	0.01	2.096436E-5
葉酸	441.0	0.01	2.2675737E-5
メナジオン(ビタミン K3)	172.0	0.01	5.8139532E-5
ナイアシンアミド	122.0	0.025	2.0491803E-4
ニコチン酸 (ナイアシン)	123.0	0.025	2.0325204E-4
p-アミノ安息香酸	137.0	0.05	3.6496352E-4
塩酸ピリドキサル	204.0	0.025	1.2254903E-4

10

20

30

【表 1 - 3】

塩酸ピリドキシン	206.0	0.025	1.21359226E-4
リボフラビン	376.0	0.01	2.6595744E-5
チアミン塩酸塩	337.0	0.01	2.967359E-5
ビタミン A (酢酸塩)	328.0	0.1	3.0487805E-4
ビタミン D2 (カルシフェロール)	397.0	0.1	2.5188917E-4
α -トコフェロール・リン酸 Na 塩	554.7	0.01	1.8027762E-5
i-イノシトール	180.0	0.05	2.7777778E-4
無機塩			
塩化カルシウム (CaCl ₂) (無水)	111.0	200.0	1.8018018
硝酸鉄(Fe(NO ₃)-9H ₂ O)	404.0	0.7	0.0017326733
硫酸マグネシウム(MgSO ₄) (無水)	120.0	97.67	0.8139166
塩化カリウム(KCl)	75.0	400.0	5.3333335
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	84.0	2200.0	26.190475
塩化ナトリウム(NaCl)	58.0	6800.0	117.24138
リン酸二水素ナトリウム (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	138.0	140.0	1.0144928
その他の成分			
2-デオキシ-D-リボース	134.0	0.5	0.0037313432
硫酸アデニン	404.0	10.0	0.024752475
アデノシン 5'-リン酸	347.0	0.2	5.763689E-4
アデノシン 5'-三リン酸	605.0	1.0	0.0016528926
コレステロール	387.0	0.2	5.1679584E-4

10

20

30

40

【表 1 - 4】

D-グルコース (ブドウ糖)	180.0	1000.0	5.5555553
グルタチオン(還元型)	307.0	0.05	1.6286645E-4
グアニン塩酸塩	188.0	0.3	0.0015957447
ヒポキサンチン Na	136.0	0.4	0.0029411765
フェノールレッド	376.4	20.0	0.053134963
リポース	150.0	0.5	0.0033333334
酢酸ナトリウム	82.0	50.0	0.6097561
チミン	126.0	0.3	0.0023809525
Tween 80®		20.0	無限
ウラシル	112.0	0.3	0.0026785715
キサンチン-Na	152.0	0.34	0.0022368422

10

20

【 0 0 2 2 】

参考文献： Morgan, J.F. & Campbell, M.E. (1955) J. Natl. Cancer Inst., 16:557; Morgan, J.F., Morton, H.J. & Parker R.C. (1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73:1。

【 0 0 2 3 】

他の好適な培地 すなわち、M - 1 9 9 に類似した性質を有する任意培地 は、下の表 2 A に示す一般的性質を有すると特徴づけることができる。

【 0 0 2 4 】

表 2 A . M - 1 9 9 以外の好適な培地の一般的性質。

30

【表 2】

成分のタイプ	濃度範囲	具体例と濃度範囲
栄養素:		
エネルギー源: ブドウ糖	2.5-10.5 mM	5.5 mM
タンパク源/アミノ酸源: シスチン、グルタミン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシ L-プロリン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン	0.049-0.684 mM	表 1 A 参照
ミネラル源: 塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二水素ナトリウム一水和物、硫酸マグネシウム七水和物、重炭酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、乳酸カルシウム、硝酸鉄九水和物	0.001-117.24 mM	表 1 A 参照
ビタミン源: ビタミン A、チアミン、リボフラビン、ピリドキシン、ピリドキサル HCl、PABA、ナイアシンアミド、ナイアシン、アスコルビン酸、ビオチン、D-パントテン酸カルシウム、塩化コリン、エルゴカルシフェロール、葉酸、i-イノシトール、メナジオン	0.003-6.81 mM	表 1 A 参照
pH 指示薬: フェノールレッド	0.02-0.08mM	0.053 mM
抗菌剤: ペニシリン G ストレプトマイシン	50-150 IU/ml 25-100 IU/ml	100 IU/ml 50 IU/ml
酸化防止剤: グルタチオン	0.8-2.0 mM	1.62M

【0025】

任意の好適なタイプのサプリメントを使用できる。好ましくは、各サプリメントは、補足した培地が、卵母細胞を入手した卵管環境を模倣もしくは模擬するようにするまたは化学的により類似するようにするのを助ける。1 以上のサプリメントは、ホルモン、成長促進因子および/またはエネルギー供給物質（例えば cAMP）を含むことができる。卵母細胞がブタに由来する場合、ブタ由来分子を使用できるが、これは必ずしも必要な条件ではない。幾つかの場合、ブタに適合する分子（合成のものまたは別の種に由来する分子）を使用できる。

【0026】

例えば、洗浄工程のサプリメントはホルモンまたは成長促進因子を含むことができ、回収工程のサプリメントはホルモン、成長促進因子およびエネルギー供給物質を含むことができ、培養工程のサプリメントは成長促進因子を含むことができ、受精工程のサブリン

10

20

30

40

50

トは成長促進因子を含むことができ、そして/または培養工程のサプリメントは成長促進因子を含むことができる。

【 0 0 2 7 】

本明細書中で言及される「+サプリメント」の更に好ましい性質が下記の表 3 A に示される。

表 3 A . +サプリメントの性質。

【 表 3 】

+ サプリメント 1		
成分の種類	濃度範囲	具体例と濃度範囲
ブタ卵胞液 (PFF)	5-25% v/v	10-15% v/v
妊馬血清性ゴナドトロピン(PMSG)	10-60 IU/ml	20-30 IU/ml
ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hGC)	5-30 IU/ml	10-15 IU/ml
cAMP (卵母細胞が未経産雌ブタより得られた場合のオプション)	5-30 IU/ml 0.1-10 mM	1 mM
+ サプリメント 2		
ブタ卵胞液 (PFF)	5-30% v/v	10-15% v/v
cAMP (卵母細胞が未経産雌ブタより得られた場合のオプション)	0.1-10 mM	1-2 mM
+ サプリメント 3		
成分の種類	濃度範囲	具体例と濃度範囲
ビルビン酸ナトリウム	1-10% v/v	2-3% v/v
カフェイン	0.1-10 mM	2-3 mM
グルコース	2.5-10.5 mM	5.5mM
CaCl ₂	2-10 mM	5-7 mM
NaHCO ₃	15-30 mM	25-27 mM
BSA	0.1-0.5 %	0.1-0.2 %
+ サプリメント 4		
成分の種類	濃度範囲	具体例と濃度範囲
ブタ卵胞液(PFF)	5-30% v/v	10-15% v/v
ウシ血清アルブミン(BSA)	0.2-0.9 %	0.3-0.4 %

【 0 0 2 8 】

参考文献: Eagle, H. (1959) Science 130:432。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

工程 (1) では、C O C の調製物は任意の適当な形態であり得る。好ましくは、均一な卵細胞質と、密集した細胞塊の少なくとも 2 層を有する C O C が用いられる。

【 0 0 3 0 】

工程 (1) では、少なくとも 1 つの卵母細胞を得るための C O C の洗浄は任意の好適な方法で実施できる。好ましくは、C O C は培地 + サプリメント 1 の中で 2 回洗浄される。培地 + サプリメント 1 は、表中に記載の通りであり得る。好ましくは、サプリメント 1 は 1 5 % (v / v) ブタ卵胞液 (P F F)、1 5 I U / m L のヒト絨毛性ゴナドトロピン (h C G) および 3 0 I U / m L の妊馬血清性ゴナドトロピン (P M S G) を含む。

【 0 0 3 1 】

P F F は直径約 3 ~ 6 m m の表層性濾胞から回収することができる。回収された P F F は 0 . 2 0 μ m のシリンジフィルターを使つてろ過し、使用まで - 2 0 で保存することができる。

【 0 0 3 2 】

この方法は、工程 (1) の前に卵巣を回収する工程を含み得る。卵巣は、解体した未経産雌ブタおよび雌ブタから任意の適当な手法で回収することができる。

【 0 0 3 3 】

卵巣は塩溶液中、例えば 3 0 ~ 3 8 の約 0 . 9 % N a C l 溶液中で、工程 (1) による処理まで保存することができる。

【 0 0 3 4 】

工程 (2) を実施する前に、C O C を直径約 3 ~ 8 m m の濾胞から吸引し、そして 3 8 にて数分間静置して沈殿させることができる。

【 0 0 3 5 】

工程 (2) において、少なくとも 1 つの卵母細胞を任意の好適な方法で回収することができる。典型的には、これはピペット型注入器を必要とし、顕微鏡の助けを借りて回収が行われる。

【 0 0 3 6 】

工程 (2) において、任意の適当な数の卵母細胞を培養のために回収することができる。好ましくは 5 ~ 2 0 0 個の卵母細胞、より好ましくは約 1 0 ~ 7 0 個の卵母細胞、更により好ましくは約 2 5 ~ 3 0 個の卵母細胞が培養のために回収される。

【 0 0 3 7 】

培地 + サプリメント 1 は、表中に記載の通りであり得る。好ましくは、サプリメント 2 は 1 5 % (v / v) ブタ卵胞液 (P F F)、1 5 I U / m L のヒト絨毛性ゴナドトロピン (h C G)、および 3 0 I U / m L の妊馬血清性ゴナドトロピン (P M S G) を含有する。

【 0 0 3 8 】

未経産雌ブタより回収された卵母細胞には、約 1 m M の濃度で I V M 培地に c A M P (エネルギー供給用) を添加することができる。

【 0 0 3 9 】

工程 (2) において、少なくとも 1 つの卵母細胞を任意の好適な方法で培養することができる。典型的には、これは 3 8 のインキュベーター、例えば二酸化炭素インキュベーター中で少なくとも 1 つの卵母細胞を培養することを必要とするだろう。これは、少なくとも 1 つの卵母細胞を少量の培地 + サプリメント 1 中に置き、そして蒸発を防ぐためにそれを加温したパラフィン油のようなオイルで覆うことを含み得る。

【 0 0 4 0 】

工程 (2) において、少なくとも 1 つの卵母細胞を任意の適当な時間に渡り培養することができる。好ましくは、所定の時間は約 2 2 時間であるが、所定の時間は約 1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 または 3 0 時間 (または更に短くても長くてもよい) であり得る。

10

20

30

40

50

【0041】

工程(2)の後、培地+サプリメント1を除去し、それを培地+サプリメント2で置換し、それにより2種のゴナドトロピンを除去することができる。未経産雌ブタより回収された卵母細胞には、cAMPを1mMの濃度でIVM培地に添加することができる。

【0042】

培地+サプリメント2は表に記載の通りであり得る。好ましくは、サプリメント2は1mM cAMPおよび15%(v/v)ブタ卵胞液(PFF)を含む。

【0043】

工程(3)において、少なくとも1つの卵母細胞を任意の好適な方法で培養することができる。典型的には、これは工程(2)について記載したような所定の時間に渡り、工程(2)について記載した通りに少なくとも1つの卵母細胞を培養することを伴うだろう。

【0044】

工程(4)において、少なくとも1つの卵母細胞を任意の好適な方法で精液/精子により受精させ、少なくとも1つの受精卵母細胞、胚盤胞または胚を産生することができる。

【0045】

工程(4)において、少なくとも1つの卵母細胞を任意の好適な時間に渡り精子と共にインキュベートし、少なくとも1つの受精卵母細胞、胚盤胞または胚を産生させることができる。好ましくは、所定の時間は約3.5~4時間であるが、所定の時間は約0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5または8時間(または更に短くても長くてもよい)でありうる。

【0046】

培地+サプリメント3は、表に記載の通りであり得る。好ましくは、サプリメント3は2mMピルビン酸ナトリウム、2mMカフェイン、6mM CaCl_2 、13mM NaHCO_3 、0.1%BSAおよび5.5mMグルコースを含み得る。未経産雌ブタより回収された卵母細胞には、cAMPを1mMの濃度で含めることができる。

【0047】

当該方法は、工程(4)に受精用精液を調製する工程を含むことができる。回収された精液または回収された希釈精液をチューブ中で遠心分離(例えば1500rpmで5分間)して上清を取り除く。得られた精子ペレットを随意リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、そして再遠心することができる。得られた精子ペレットを随意、表に記載のような培地+サプリメント3で洗浄することができる。上清を取り除いた後、精子ペレットを培地+サプリメント3中に再懸濁することができる。チューブをインキュベーター中に45度の角度に30分間入れた後、精子を使用する。精子濃度は血球計を使って測定することができる。

【0048】

任意の適切な数の精子/精子細胞を工程(4)で使用できる。これは、卵母細胞の総数に依存する。好ましくは、約20~30個の卵母細胞を受精させるのに約60,000個の精子を使用することができ、これは約3000:1の比である。

【0049】

この方法は、少なくとも1つの卵母細胞を裸出(露出)させる工程を含み、これは任意の適当な方法で実施できる。例えば、卵母細胞を少量の培地中で穏やかに繰り返しピペティングすることにより裸出させることができる。裸出は培養工程(3)の後、例えばIVF工程(4)前の成熟培養の約44時間後に実施することができる。

【0050】

工程(5)において、少なくとも1つの受精卵母細胞(または産出された胚盤胞または胚)の洗浄は、任意の適当な方法で実施できる。好ましくは、少なくとも1つの受精卵母細胞を培地+サプリメント4の中で洗浄する。培地+サプリメント4は、表に記載の通りであり得る。好ましくは、サプリメント4は15%(v/v)ブタ卵胞液(PFF)および0.4%BSAを含む。例えば、受精卵母細胞は培地+サプリメント4で2回洗浄することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

工程（５）において、少なくとも１つの受精卵母細胞（または胚）を任意の適当な方法で培養することができる。典型的には、これは少なくとも１個の卵母細胞を３７ または３８．５ のインキュベーター中で、例えば二酸化炭素インキュベーター中で培養することを伴うだろう。これは、少なくとも１つの受精卵母細胞を、表に記載のような培地＋サプリメント４中に置くことを含み得る。

【 0 0 5 2 】

工程（５）において、少なくとも１つの受精卵母細胞（または胚）を任意の好適な時間に渡り培養することができる。好ましくは、所定の時間は約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５日間（または更により長くても短くてもよい）であり得る。好ましくは、所定の時間は約５～９日間、より好ましくは７日間である。

10

【 0 0 5 3 】

幾つかの実施形態では、胚は、CO₂ インキュベーター中で、培地＋サプリメント４の中で３８．５ で約７日間、１滴あたり約２５～３０個の集団にて培養することができる。受精卵母細胞の卵割と胚盤胞形成は、それぞれ培養の開始後２日目および７日目に検査することができる。２、４、８個またはそれ以上の細胞に発達した胚を、更なる下流プロセスに使用することができる。

【 0 0 5 4 】

卵母細胞の回収、体外成熟、精液の調製、体外受精および体外培養のための一般技術および方法論は、次の参考文献中に見つけることができ、その各々の全内容が相互参照によって本明細書中に組み込まれる(Bagg他、2006; Gil他、2008; Tanihara 他、2013; Hossain他、2007; Nagai, 1996)。

20

【 0 0 5 5 】

本明細書中に記載の特徴のいずれも、本発明の範囲内で本明細書中に記載の他の特徴のいずれか１つまたは複数と任意の組み合わせで組み合わせることができる。

【 0 0 5 6 】

本明細書中の任意の従来技術への参照は、その従来技術が通常の一般知識の一部を構成するという承認としてまたは任意の形の示唆として解釈すべきではない。

〔 図面の簡単な説明 １ 〕

30

【 0 0 5 7 】

本発明の好ましい特徴、実施形態および変形は、次の詳細な説明から明らかであり、この記載は当業者が本発明を実施するのに十分な情報を提供する。この詳細な説明は、決して前述の「発明の概要」の範囲を限定すると見なしてはならない。詳細な説明は次の図面の番号に参照される：

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 8 】

【 図 A - 1 A 】 図 1 A は、本発明の一実施形態に従う、本質的に単一の培地（M - 199）を使用する単純化されたハイスループット IVP システムの略図である。

【 図 B - 1 B 】（本明細書の図 1 B（Figure 1B）の説明文を参照。）

40

【 図 B - 2 B 】（本明細書の図 2 B（Figure 2B）の説明文を参照。）

【 図 B - 3 B 】（本明細書の図 3 B（Figure 3B）の説明文を参照。）

【 図 B - 4 B 】（本明細書の図 4 B（Figure 4B）の説明文を参照。）

【 図 C - 1 C 】（本明細書の図 1 C（Figure 1C）の説明文を参照。）

【 図 C - 2 C 】（本明細書の図 2 C（Figure 2C）の説明文を参照。）

【 図 C - 3 C 】（本明細書の図 3 C（Figure 3C）の説明文を参照。）

【 図 C - 4 C 】（本明細書の図 4 C（Figure 4C）の説明文を参照。）

【 図 C - 5 C 】（本明細書の図 5 C（Figure 5C）の説明文を参照。）

【 図 C - 6 C 】（本明細書の図 6 C（Figure 6C）の説明文を参照。）

【 図 C - 7 C 】（本明細書の図 7 C（Figure 7C）の説明文を参照。）

50

【図 C - 8 C】(本明細書の図 8 C (Figure 8C) の説明文を参照。)

【図 C - 9 C】(本明細書の図 9 C (Figure 9C) の説明文を参照。)

【0059】

〔実施形態の詳細な説明 1〕

実施例 1 - ブタ胚の改良生産に本質的に単一の培地を用いる単純化された I V P 法

【0060】

本実施例は、ハイスループット I V P 法における使用に適した着床前の体外ブタ胚発生の単純化方法を記載する。

【0061】

材料と方法

【0062】

全ての化学薬品は、他に指摘しない限り、Thermo Fisher Scientific 社より購入した。全ての体外培養物は、各培養ウェル中で $400\ \mu\text{L}$ のミネラルオイルの層で表面を覆った。本実施例で使用する基本培地は、M - 199 であった。1950 年代、Morgan は、初めて動物製品および / または組織抽出物を使用しない細胞培養用の既知組成の栄養源を提唱した。この培地を使用する利点は、それが卵子および胚の発生を支持するその成分の適用範囲が多岐に渡る点である。

【0063】

卵母細胞回収と体外成熟

【0064】

近隣の食肉処理場 (Highchester Meats Pty Ltd, オーストラリア国グレニーグル) より、解体した思春期前の未経産雌ブタおよび雌ブタから卵巣を回収し、そして $0.9\% \text{ NaCl}$ 溶液中で $30 \sim 38^\circ\text{C}$ にて研究所に輸送した。直径 $2 \sim 8\ \text{mm}$ の卵胞から卵丘・卵母細胞複合体 (COC) を吸引し、 38°C にて数分間静置して沈降させた。均一の卵細胞質を有しかつ密集した細胞塊の少なくとも 2 層を有する COC を、体外成熟 (IVM) 培地 (M - 199) 中で 2 回洗浄し、次に $15\% (v/v)$ ブタ卵胞液 (PFF)、 $1\ \text{mM}$ cAMP、 $15\ \text{IU/mL}$ のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) (Intervet, オランダ) および $30\ \text{IU/mL}$ の妊馬血清性ゴナドトロピン (PMSG) (Intervet, オランダ) が補足された M - 199 培地中で 1 回洗浄した。直径 $3 \sim 6\ \text{mm}$ の表在性ブタ卵胞から PFF を回収した。その後、 $0.2\ \mu\text{m}$ シリンジフィルターを使って PFF をろ過し、そして使用まで -20°C で保存した。約 $25 \sim 30$ 個の卵母細胞を、ペトリ皿中に $400\ \mu\text{L}$ の IVM 培地の各液滴として入れ、加温したパラフィン油で表面を覆い、 CO_2 インキュベーター中で 38°C にて 22 時間培養した。22 時間培養後、培地を除去し、2 種類のゴナドトロピンを含む新鮮な IVM 培地で置換し、次いで更に 22 時間培養した。未経産雌ブタより回収した卵母細胞については、cAMP を $1\ \text{mM}$ の濃度で IVM 培地に添加した。

【0065】

精液の調製および体外受精

【0066】

近隣の AI 会社 (Premier Genetics, オーストラリア国ワコール) より希釈精液を収得し、断熱箱の中に入れ約 38°C にて即座に研究室に輸送した。精液を $2\ \text{mL}$ の遠心管の最上部のすぐ下の高さまで注入した後、 $1500\ \text{rpm}$ で 5 分間遠心分離して上清を除去した。次いで精子を $2\ \text{mL}$ の IVF 培地 ($2\ \text{mM}$ カフェイン、 $2\ \text{mM}$ ビルビン酸 Na、 $505\ \text{mM}$ グルコース、 0.1% BSA、 $6\ \text{mM}$ CaCl_2 および $26\ \text{mM}$ NaHCO_3 が補足された M - 199 培地) 中に再懸濁し、そして上記と同様に遠心分離により洗浄した。上清を除去した後、精子ペレットを IVM 培地中に再懸濁した。次いでその試験管を、精子を使用する前に 30 分間、インキュベーター中に 45° の角度を付けて静置した。Neubauer 血球計を使って精子の濃度を測定した。合計 $60,000$ 個の精子を用いて 1 滴中の卵母細胞 $20 \sim 30$ 個を受精させ、そして 4 ~ 6 時間同時インキュベートして受精を完成させた。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

体外培養

【 0 0 6 8 】

I V F の完了後、受精卵母細胞を体外培養（I V C）培地（15%ブタ卵胞液が補足されたM - 199培地）で2回洗浄した。胚を1滴あたり25～30個の群として、ペトリ皿中で400 μ Lの培地中38.5のCO₂インキュベーター中で7日間培養した。卵母細胞の卵割と胚盤胞形成をそれぞれ培養の開始後2日目と7日目に調査した。2、4、8またはそれ以上の細胞に発達した胚を、更なる処理のために2 μ Lの容量で直接200 μ LのPCRチューブに移した。

【 0 0 6 9 】

結果

【 0 0 7 0 】

着床前胚発生に対する単純化された培地（単一の基本I V M培地、M - 199）の影響を表4 A中に示す。

【 0 0 7 1 】

表4 A．サプリメントと共に単純化I V P法を使った体外雌ブタおよび未経産雌ブタの段階的（step by step）平均発達。

【表4】

卵母細胞の源	卵母細胞の数	卵割(卵母細胞の%)	8-細胞以上(卵母細胞の%)	胚盤胞(卵母細胞の%)
雌ブタ	545	382 (70.0)	299 (54.8)	224 (41.1)
未経産雌ブタ	463	247 (53.3)	131 (28.29)	ND
IVF 培地中の NaHCO ₃ , CaCl ₂ および BSA レベルを調整した後、変化した胚生産				
未経産雌ブタ	1240	834 (67.2)	425 (34.3)	ND
平均	2248	1463 (65.0)	855 (38.0)	ND

【 0 0 7 2 】

雌ブタと未経産雌ブタの両方において有意なレベルの胚発生が観察され、平均卵割率は65%であった。I V F 培地中のNaHCO₃、CaCl₂およびBSAレベルの調整により、胚生産が変化した。卵割率は平均62%から67%に変化した。卵割率は雌ブタに比較して未経産雌ブタの方が低く、結果として胚盤胞発達の速度は未経産雌ブタの方がずっと低かった。しかし、大部分の場合、胚は胚盤胞期までは評価されなかった。相当数の胚、平均で～38%が、全ての実験において8細胞期を超えることが観察された。平均胚盤胞発生は～41%であり、これは分割した胚の数と一致し、8細胞期を通過していた。

【 0 0 7 3 】

I V F 培地へのCaCl₂、NaHCO₃およびBSAの添加は、高い卵割率をもたらし、かつ全体的な胚生産をより安定なものにするその後の発達を誘導した。

【 0 0 7 4 】

体外成熟（I V M）培地に一般的に用いられる化学組成を表5 Aに与える。

【 0 0 7 5 】

表5 A．ブタの様々な体外成熟培地の化学組成の比較。

【表 5 - 1】

成分	IVM 培地 (mM)			
	M-199	TCM-199	NCSU-23	mWM
NaCl	117.24	116.36	108.73	68.49
KCl	5.33	5.36	4.78	4.78
CaCl ₂	1.80	1.80	1.70	-
Fe (NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.001	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	1.19	1.19
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.014	-	-	-

【表 5 - 2】

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.81	0.81	1.19	1.19
NaHCO ₃	26.19	26.19	25.07	25.07
グルコース	5.55	5.55	5.55	5.56
グルタチオン (還元型)	1.62	-	-	-
フェノールレッド, Na	0.053	-	-	-
乳酸ナトリウム	-	-	-	25.20
ビルビン酸ナトリウム	-	-	-	0.33
乳酸カルシウム	-	-	-	1.71
グルタミン	0.684	0.68	1.0	-
タウリン	-	-	7.0	-
ヒポタウリン	-	-	5.0	-
ペニシリン G (IU/mL)	-	100	100	100
ストレプトマイシン (IU/mL)	-	50	50	50
PFF (% v/v)	-	10	10	10
BSA (mg/mL)	-	-	-	-
シスチン	0.108	0.57	0.57	0.57
アスコルビン酸	2.84	-	-	-
ビオチン	4.09	-	-	-
D-パントテン酸カルシウム	2.09	-	-	-
塩化コリン	0.003	-	-	-
エルゴカルシフェロール	2.51	-	-	-
葉酸	2.26	-	-	-
i-イノシトール	2.77	-	-	-
メナジオン	5.81	-	-	-
ナイアシン	2.03	-	-	-
ナイアシンアミド	2.04	-	-	-
PABA	3.649	-	-	-
ピリドキサール HCl	1.225	-	-	-
ピリドキシン HCl	1.213	-	-	-
リボフラビン	2.659	-	-	-
チアミン HCl	2.967	-	-	-
ビタミン A 酢酸塩	3.048	-	-	-
L-アラニン	0.280	-	-	-

10

20

30

40

【表 5 - 3】

L-アルギニン	0.331	-	-	-
L-アスパラギン酸	0.225	-	-	-
L-グルタミン酸	0.510	-	-	-
グリシン	0.666	-	-	-
L-ヒスチジン	0.104	-	-	-
ヒドロキシ L-プロリン	0.347	-	-	-
L-イソロイシン	0.305	-	-	-
L-ロイシン	0.458	-	-	-
L-リジン	0.382	-	-	-
L-メチオニン	0.100	-	-	-
L-フェニルアラニン	0.151	-	-	-
L-セリン	0.238	-	-	-
L-トレオニン	0.252	-	-	-
L-トリプトファン	0.049	-	-	-
L-チロシン	0.222	-	-	-
L-バリン	0.213	-	-	-

10

20

【0076】

考察

【0077】

本実施例の主な所見は表 4 A に与えられ、得られた胚盤胞率が ~ 4 1 % であり、変動性
 がかなり低かった。卵母細胞の起源に関係なく、胚の卵割率は他の研究所の平均 (~ 5 0
 %) よりも相当高かった (~ 6 5 %)。この結果は、主な効果として各培養工程に単一の
 基本的な共通培地を使用することによる、本手順の段階的調整のためであると考えられる
 。本研究は、使用する I V M 培地 (異なるサプリメントを含む M - 1 9 9) および本研究
 で従う手順が、雌ブタ胚並びに未経産雌ブタの I V P に理想的に適することも立証した。
 しかしながら、未経産雌ブタの場合には更に細かい微調整が必要かもしれない。未経産雌
 ブタの 1 つの可能なオプションは、卵母細胞 I V M 培地に c A M P を補足することである
 。成体雌ブタから得た卵母細胞は、未経産雌ブタから得たものよりも高い c A M P 含量を
 有する (B a g g 他、2 0 0 6) ので、c A M P 処置は、それらの c A M P 含量を一時的
 に上昇させることにより未経産雌ブタの卵母細胞の発達能力を増強させる。卵母細胞の処
 置時間の間、精子と卵母細胞の両方が P O S を生産するが、重炭酸塩の添加はそれを相殺
 することができる。I V F 培地に更に重炭酸塩、カルシウムおよび B S A を補足した場合
 、卵割率とその後の胚生産がかなり増加した。

30

【0078】

多数の様々な特殊培地 (T C M - 1 9 9、N C S U - 2 3、P Z M - 3、S O F) がブ
 タ胚の操作に利用可能であるが、それらのほとんどは一貫した結果をもたらさず、よって
 再現性がない。ブタ胚は通常、大部分の研究所では 4 ないし 5 種類の培地中で処理されて
 いるので、本発明者らはこれが卵母細胞 / 胚にストレスを引き起こし (変化する化学的環
 境に対して調整する際に)、一貫性のない貧弱な収率を生じると仮定した。他方で、M -
 1 9 9 培地は広範に利用されている細胞培養培地であるが、今日では哺乳動物の胚培養、
 特にブタにおいて限定された用途を有する。

40

【0079】

結論として、本研究に用いるブタ I V P 法は、商業生産および将来のブタ胚研究におい
 て重要な役割を果たし得る。提唱される本法の簡易性は、ハイスループット I V F 法にお

50

けるその適用および I V P 研究の標準としての適用を促進することができる。

【 0 0 8 0 】

参考文献 1

【 0 0 8 1 】

Alminana, C., Gil, M.A., Cuello, C., Roca, J., Vazquez, J.M., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E.A., 2005. "Adjustments in IVF system for individual boars: value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation." *Theriogenology* 64:1783-1796.

【 0 0 8 2 】

Bagg, M.A., Nottle, M.B., Grupen, C.G., Armstrong, D.T., 2006. "Effect of dibutyrylcAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes." *Mol Reprod Dev* 73: 1326-1332.

【 0 0 8 3 】

Fouladi-Nashta, A.A., Waddington, D., Campbell, K.H.S., 1998, "Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro. A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods." *Biol Reprod* 59: 255-262.

【 0 0 8 4 】

Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J.M., Roca, J., Martinez, E.A., 2008. "Advances in swine in vitro embryo production technologies." *Reprod Dom Anim* 45: 40-48.

【 0 0 8 5 】

Kim, J.S., Cho, Y.S., Song, B.S., Wee, G., Park, J.S., Choo, Y.K., Yu, K., Lee, K.K., Han, Y.M., Koo, D.B., 2008. "Exogenous dibutyrylcAMP affects meiotic maturation via protein kinase A activation; it stimulates further embryonic development including blastocyst quality in pigs." *Theriogenology* 69: 290-301.

【 0 0 8 6 】

Li, R., Liu, Y., Pedersen, H.S., Kragh, P.M., Callesen, H., 2013. "Development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos after removal of zona pellucida." *Theriogenology* 80:58-64.

【 0 0 8 7 】

Liu, Y., Ostrup, O., Li, J., Vajta, G., Kragh, P.M., Purup, S., Callesen, H., 2011. "Cell colony formation induced by *Xenopus* egg extract as a marker for improvement of cloned blastocyst formation in the pig." *Cell Reprogram* 13:521-526.

【 0 0 8 8 】

Lopes, A.S., Wrenzycki, C., Ramsing, N.B., Herrmann, D., Niemann, H., Lovendahl, P., Greve, T., Callesen, H., 2007. "Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts." *Theriogenology* 68:223-236.

【 0 0 8 9 】

Somfai, T., Kikuchi, K., Onishi, A., Iwamoto, M., Fuchimoto, D., Papp, A.B. 他, 2003. "Meiotic arrest maintained by cAMP during the initiation of maturation enhances meiotic potential and developmental competence and reduces polyspermy of IVM/IVF porcine oocytes." *Zygote* 11: 199-206.

【 0 0 9 0 】

Tanihara, F., Nakai, M., Kaneko, H., Noguchi, J., Otoi, T., Kikuchi, K., 2013. "Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs." *J Reprod Dev*. doi.org/10.1262/jrd.2013-021.

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

Hossain, M.S., Tareq, K.M.A., Hamano, K. & Tsujii, H. (2007): "The effect of the fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction." *Reproductive Medicine and Biology* 6, 235-239.

【 0 0 9 2 】

Nagai T., 1996. "In vitro maturation and fertilization of pig oocytes." *Anim Reprod Sci*, 42: 153-163.

【 0 0 9 3 】

Vajta, G., Callesen, H., 2012. "Establishment of an efficient somatic cell nuclear transfer system for production of transgenic pigs." *Theriogenology* 77:1263-1274.

10

標題 2

溶解方法

〔技術分野 2〕

【 0 0 9 4 】

本発明は一般に、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させることに関する。好ましい実施形態では、本発明は、遺伝物質および他の細胞成分が、精子を無傷に維持しながら、溶解された卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚からのみ放出されるように、精子の存在下で卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させることに関する。

20

背景技術 2

【 0 0 9 5 】

卵母細胞または胚の遺伝子構造に生じる変化は、様々な源に起因し、それらの変化を同定し特徴づけることができることが望ましい。例えば、遺伝子編集などの技術（Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) および Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)）を用いて卵母細胞／胚のゲノムを意図的に改変するために使用することができ、意図した遺伝子編集だけが達成されたことを確認することができることが望ましい。精液処置を用いて胚に対する化学薬品の変異誘発効果を調べることができ、ゲノムに起こったあらゆる変化を同定することができることが望ましい。精液の雌雄選択処置（フローサイトメトリー、マイクロ流体装置、抗体処置など）並びに受精卵母細胞／胚の雌雄選択処置は、潜在的に受精卵母細胞／胚の遺伝子組換えを引き起こし得るので、ゲノムに生じたあらゆる変化を同定することができることが望ましい。

30

【 0 0 9 6 】

ポリメラーゼ酵素、より特定のにはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術は、胚の遺伝子組換えを同定し特徴づけるために利用されている。しかしながら、この技術はその目的で使用する時には問題点がある。例えば、該技術が高感度であるために、非胚由来DNA汚染物（例えば精子由来または上皮細胞由来）の存在が誤った結果を容易に引き起こしうる。例えば、卵母細胞／胚のための洗浄溶液、溶解溶液および懸濁溶媒は、PCR技術の性能を悪化させたり、完全な阻害を引き起こすことがあり、または汚染遺伝物質の混入を引き起こすことがある。例えば、卵母細胞／胚の過剰操作／多工程操作は、最適以下の（suboptimal）PCR増幅用遺伝物質をもたらす。

40

【 0 0 9 7 】

上述した通り、胚のゲノムに対する潜在的变化を同定し特徴づける時、誤った結果（偽陰性／偽陽性）の確率を注意深く除外する必要がある。例えば、誤った結果は、混入したDNA、卵子の受精後に持ち越し（キャリアー・オーバー）得る、低レベルの精子DNAまたは雄体細胞DNAに起因しうる。

【 0 0 9 8 】

DNAの汚染／持ち越し（キャリアー・オーバー）を減少させる従来技術は、卵母細胞を6ないし7回まで洗浄することにより透明体（Zona Pellucida；ZP）を除去することを伴う（Pomp, 1995）。初回の洗浄は Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含有のダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）中で行われる。卵母細胞をタイロート液（137mM NaCl、

50

2.7 mM KCl、1 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂、0.2 mM Na₂HPO₄、12 mM NaHCO₃、5.5 mM D-グルコース)に移し、続いてCa²⁺およびMg²⁺不含有のDPBS中で4回以上洗浄する。次いで卵母細胞をこの工程で保存する。PCR技術での使用前に、卵母細胞をプロテイナーゼKで一晩消化し、次いでプロテイナーゼKを98℃で10分間失活させる(Tor 2013)。

【0099】

この多工程従来技術の欠点は、卵母細胞を実体顕微鏡下で細いピペットを使って繰り返しピペティングし、続いて適当な洗浄溶液中に入れなければならない等々という点で該技術が面倒であることである。この従来技術は、それ自体がハイスループットアッセイの開発に役立つものではない。(好適なハイスループットアッセイは、できるかぎり少ない工程を必要とし、その上同時にロバスト(頑健)でかつ一貫性のある結果をもたらすものである。)

10

【0100】

選択的溶解は、混入したDNAがPCR増幅されないようにするための別の選択肢である。選択的溶解法は、新しいものではないが、犠牲者(上皮細胞)と精子(加害者の細胞)とを鑑別する必要がある、性的暴行サンプルで主に利用されている(Norris, 2007)。現在利用されている好ましい方法は、Gill(1985)およびYoshida(1995)により開発された手法の変形である。サンプルをまず溶解溶液(TNE緩衝液: 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、10 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、100 mM NaCl、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および100 pg/mLのプロテイナーゼKを含む)中で70℃にて1~3時間処理して上皮細胞を溶解させる。これを数回繰り返し、例えば綿棒のような基材から上皮を遊離させる。次の工程は、0.04%ジチオトレイトール(DTT)が添加された同溶解溶液を使用して、振盪湯浴中56℃にて8時間超に渡り精子を溶解させることである。

20

【0101】

この方法をハイスループット体外受精(HT IVF)システムで使用する問題点は、卵母細胞を選択的に溶解できる一方で、上皮細胞用のTNE溶解緩衝液はPCR阻害剤を含有することである(Rossen他、1992)。それらの阻害剤は、フェノール抽出と、3 M酢酸ナトリウムと氷冷無水エタノールを使ったDNA沈澱によって後で除去する必要がある。更に、この溶解方法は1~4時間かかることがある。

30

【0102】

Qiagen社からのSingle-cell REPLIG(登録商標)キットがPCRによる予備増幅に使用されている。その溶解緩衝液はキットに含まれているが、それはDTTとKOH(両成分ともPCR阻害性でない)を含み、随伴する精子の望ましくない溶解を引き起こす。Qiagenプロトコルは65℃で10分間のインキュベーション後に停止溶液の添加を必要とする。この工程は、停止溶液を導入するために試験管を開封するという追加の処理を必要とするので、汚染(コンタミネーション)する危険性がある。

【0103】

遺伝的局面とは別に、何故精子または体細胞の存在下で卵母細胞を選択的に溶解させることが望ましいかに関して別の理由がある。その理由は、卵母細胞が目的の別の細胞性物質を含有するからである[例えば下流用途、特に“オミクス(Omics)”：ゲノミクス、トランスクリプトミクス、エピゲノミクスおよびプロテオミクスの総称のための物質[Wang & Bodovitz, Trends Biotechnol. 2010 June; 28 (6): 281-290を参照されたい]]。上皮細胞は精子または卵母細胞と比較して非常に多い。体細胞と上皮細胞の溶解に用いられる比較的穏和な条件は、卵母細胞を溶解させるには適さない。

40

【発明の概要2】

【0104】

本発明の一態様では、本発明者らは、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させるためおよび溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子

50

、胚細胞または胚からのみ細胞性物質を選択的に遊離させるための溶解溶液を開発した。

【0105】

本発明の別の態様では、本発明者らは、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させるためおよび溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚のみから細胞性物質を選択的に放出させるための溶解溶液であって、溶解溶液内部の放出された細胞性物質が下流用途に適合するものである、溶解溶液を開発した。

【0106】

本発明の更に別の観点では、本発明者らは、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させる方法であって、溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚からの細胞性物質と溶解溶液とが下流用途に適合するものである方法を開発した。

10

【0107】

本発明の第1態様によれば、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させる方法であって、次の工程：

【0108】

卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚が溶解されそしてその卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質が放出されるが、精子は溶解されないように、卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を溶解溶液に供する工程を含む方法が提供される。

20

【0109】

本発明の第2態様によれば、第1態様の方法によって生産させた時の放出された細胞性物質が提供される。

【0110】

本発明の第3態様によれば、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させるため、かつ溶解された卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質を選択的に溶解させるための溶解溶液であって、精子は該溶解溶液によって溶解されず、前記細胞性物質および溶解溶液が下流用途に適合するような溶解溶液が提供される。

30

【0111】

好ましくは、「細胞性物質」は、溶解しなければ他の方法では放出されないであろう実質的に細胞内にある物質である。「細胞性物質」という用語は、他の方法では膜に結合した形で保持されるだろう物質も包含する。

【0112】

「細胞性物質」は、その範囲内に遺伝物質（核酸、ポリヌクレオチドおよびより具体的にはゲノム、遺伝子、遺伝子転写物、遺伝子産物およびRNAをはじめとする、そのあらゆる形態）、タンパク様物質（ポリペプチド、タンパク質、ペプチドおよびアミノ酸をはじめとするそのあらゆる形態）、脂質物質（脂肪および脂質をはじめとするそのあらゆる形態）および炭水化物（そのあらゆる形態）を包含する。

40

【0113】

「細胞性物質」は、その範囲内に、細胞系の中の構成成分または構造体の全てを包含する。

【0114】

下流用途は、あらゆる分子ベースの方法と手順を包含する。そのような方法と手順は定量的、定性的、選択的特徴付け、修飾、単離または増幅などのためであり得る。下流用途は、卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞、胚または精子の細胞性物質に対する任意の変化を同定または確証するための、スクリーニング試験または診断試験であり得る。

【0115】

下流用途は、細胞性物質を、少なくとも1つの外来的に添加された酵素、例えばタンバ

50

ク質ベースの酵素またはRNAベースの酵素の作用に供することを含み得る。

【0116】

下流用途は、例えば、遺伝子（ゲノミクスおよびエピゲノミクス）、転写産物（トランスクリプトミクス）、タンパク質（プロテオミクス）、代謝産物（メタボロミクス）、脂質（リポミクス）または相互作用（インタラクトミクス）の研究のためであり得る。

【0117】

細胞性物質の可能な下流用途は、Wang & Bodovitz, Trends Biotechnol. 2010 June; 28 (6): 281-290中に記載されており、その全内容が相互参照により本明細書中に組み込まれる。別の可能な下流用途は、本明細書中の他の箇所に記載される。

【0118】

「下流用途に適合する」という用語は、好ましくは、下流用途が当該溶解溶液それ自体の中で実施されうることを、または当該溶解溶液の最小の改変を伴って実施されうることを意味する。この用語は、好ましくは、当該溶解溶液が、下流用途に使用される1以上の酵素の機能に対して阻害性でないことを意味する。

【0119】

本発明の別の態様では、本発明者らは、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させるため、および溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から遺伝物質を選択的に放出させるための溶解溶液であって、該溶解溶液内に放出された遺伝物質をポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製させることができる溶解溶液を開発した。

【0120】

本発明の更に別の態様では、本発明者らは、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させる方法であって、溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚からの遺伝物質を溶解溶液中でポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製させることができる方法を開発した。

【0121】

本発明の別の態様では、本発明者らは、卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞または胚の操作と洗浄をほとんど必要とせず、かつポリメラーゼ酵素による複製を施すことができる方法を開発した。これは、精子を無傷のまま維持しながら、精子の存在下で卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を差次的に溶解させることにより達成される。単一の溶解した卵母細胞、胚盤胞、胚細胞または胚からのDNAは、次いで例えば下流用途において複製させることができ、多種多様な下流用途のための十分な量の全ゲノムDNAを生成させることができる。幾つかの実施形態では、当該方法は、ロバストで、一貫性があり、高感度であり、全ゲノム増幅、qPCR、マイクロアレイまたはシーケンシングなどの下流用途に対して非阻害性である。

【0122】

本発明の第4態様によれば、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解する方法であって、溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚からの遺伝物質がポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製可能であり、前記方法が

【0123】

(1) 前記卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚が溶解されそして前記卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から遺伝物質が放出されるが、精子は溶解されないような溶解溶液に供する工程；および

【0124】

(2) 前記溶解緩衝液中の放出された遺伝物質を、ポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製する工程を含む方法が提供される。

【0125】

本発明の第5態様によれば、第1態様の方法により生産された、放出された遺伝物質が

10

20

30

40

50

提供される。

【0126】

本発明の第6態様によれば、精子の存在下で卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を選択的に溶解させるためのおよび溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から遺伝物質を選択的に放出させるための溶解溶液であり、精子は該溶解溶液により溶解されず、前記溶解緩衝液内に放出された遺伝物質をポリメラーゼ酵素を使って選択的に複製することが可能である、溶解溶液が提供される。

【0127】

卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞、胚または精子は、以前に（故意にまたは知らないうちに）遺伝子操作または突然変異を生じさせていてもいなくてもよい。

10

【0128】

当該方法は、卵母細胞、未分化胚芽/胚盤胞、卵子、胚細胞、胚または精子の遺伝物質に対する任意の変化を同定または確認するために、下流用途のスクリーニング試験または診断試験として利用することができる。

【0129】

可能な用途としては、体外受精からまたは胚の雌雄鑑別から得られるトランスジェニック動物または受精卵の遺伝子型を変更する、試験レジメンまたは処置法の能力を決定することが挙げられる。検出することが可能な遺伝子としては、SRY、染色体I、12S、GAPDH、ACTB、染色体Y、または治療薬を高価な動物試験へと進める前の任意の所望の遺伝子産物が挙げられる。全ゲノム解析（例えばマイクロアレイ）および集団調査などの下流用途を本方法を使って実施することができる。

20

【0130】

遺伝子産物の変化または欠損は、CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats 遺伝子編集技術); SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer) (Rodrigues 2013); TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases); 精子上のドッキング部位をブロックする抗体; 卵母細胞上のドッキング部位をブロックする抗体; 日焼け止め、洗剤、タルク等の任意の化学薬品; および変異誘発効果を有しうる化学薬品で処理することによって引き起こすことができる。

【0131】

下流用途に関しては、任意の適当な種類のポリメラーゼ酵素を使用することができる。好ましくは、DNAポリメラーゼ酵素が用いられるが、RNAポリメラーゼ酵素も場合により使用可能である。適当なDNAポリメラーゼ酵素の例としては、以下が挙げられる:

30

29 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、耐熱性Taqポリメラーゼ (テルミス・アクアティクス *Thermis aquaticus* 由来) (生来または組換え型)、高忠実度のPfu DNAポリメラーゼ (ピロコッカス・フリオサス *Pyrococcus furiosus* 由来)、2組以上のプライマーを用いる場合に非特異的な生成物増幅を抑制するためのホットスタートDNAポリメラーゼ、ブルーフリーディング活性を有する高忠実度ポリメラーゼ (Hi-Fi)。プライマーは、ポリT (真核RNAを標的とする場合)、ランダムヘキサマー、ランダムペンタマーまたはランダムオキサマーを含み得る。プライマーは、エキソヌクレアーゼ耐性またはエンドヌクレアーゼ耐性といった特異的な特性を有するように選択することもできる。

40

【0132】

使用する実際のポリメラーゼ酵素は、遺伝物質を複製すべきである理由、すなわち後続の下流用途に依存するだろう。更に、後続の下流用途は、次世代シーケンシング、マイクロアレイ、一重鎖、二重鎖もしくは多重鎖PCR、またはリアルタイム一重鎖、二重鎖もしくは多重鎖PCRでありうる。多種多様な後続の下流用途のために、遺伝物質を予備増幅させて多量の完全ゲノムDNAを産生することができる。

【0133】

当該方法を用いて、PCRまたはリアルタイムPCR (qPCR) 用にDNAを溶解させ増幅させ、単一の未受精または受精卵から2、4、8、16細胞またはそれ以上の細胞

50

胞期に発達した胚へと増幅させることができる。好ましくは、該方法はロバストであり、一貫性があり、高感度であり、多重置換増幅（MDA）、全ゲノム増幅（WGA）、qPCR、マイクロアレイ、またはシーケンシングのような下流用途に対して阻害性でない。

【0134】

溶解した卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から遊離される遺伝子物質は、好ましくはゲノムのデオキシ核酸（DNA）であるが、他の型のポリヌクレオチド／核酸、例えばリボ核酸（RNA）も同様に遊離させることができる。

【0135】

当該方法は、卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞、胚または精子を、溶解溶液に適用する前にそれを遺伝子組み換えする工程を含み得る。この方法は、受精前に精子／精液を突然変異原のような化学薬品に暴露する工程を含むことができる。当該方法は、卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞、胚または精子をIVF技術に供する工程を含み、潜在的に遺伝物質の改変を引き起こすことができる。

【0136】

卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞、胚または精子は、例えば、遺伝子編集技術であるクリスパー技術（CRISPER；Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats）およびタレン技術（TALEN；Transcription Activator-Like Effector Nucleases）を使って遺伝子操作することができる。例えば、精子／精液は、既知のまたは疑いのある突然変異原などの化学薬品に暴露することができる。精子の雌雄選択処置並びに胚の雌雄選択処置は、潜在的に受精卵母細胞、胚盤胞、卵子または胚の遺伝子組換えをもたらし得る。

【0137】

幾つかの実施形態では、当該方法は下記に要約される通り、ハイスループット体外受精（HT-IVF）に用いることができる：

- ・ブタ（または他の）卵巣からの卵母細胞を新たに開発した培地（IVPを処置するための培地は本明細書の第一セクションに記載）で処置する。
- ・新鮮な放出されたブタ（または他の）精液で受精させる。
- ・8～16細胞成熟期に発達させる 新しい方法では卵母細胞の＞65％が成熟し成長する（工業標準は約40％）。
- ・新規溶解溶液を用いて卵母細胞と残りの精液を差次的に溶解させ、卵母細胞DNAを抽出させて精子を無傷なまま維持するようにする。
- ・REPLIG キットのSCポリメラーゼ（Qiagen製）によりqPCRを使って卵母細胞DNAを増幅させる。
- ・DNAを希釈し、リアルタイムPCR（qPCR）による一定範囲の遺伝子型形質を検出する。
- ・下記による精子および／または卵母細胞の処置により、遺伝子産物の変化または欠損を引き起こすことができる：

CRISPR（Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats gene editing）

SMGT（Sperm-Mediated Gene Transfer）（Rodriques 2013）

TALEN（Transcription Activator-Like Effector Nucleases）

精子上のドッキング部位をブロックする抗体

卵母細胞上のドッキング部位をブロックする抗体

日焼け止め、洗剤、タルク等の任意の化学薬品

変異原性効果を有しうる化学薬品

・用途：

遺伝子型を変更させる試験計画または処置の能力を決定する

トランスジェニック動物

体外受精

胚の雌雄鑑別。

【 0 1 3 8 】

処置方法を高価な動物実験に進める前に、検出される遺伝子または遺伝子領域：S R Y、染色体 I、1 2 S、G A P D H、A C T B、染色体 Y、任意の所望の遺伝子産物。この方法を用いて、全ゲノム解析（例えばマイクロアレイ）および集団調査を実施することができる。

【 0 1 3 9 】

卵母細胞、未分化胚芽／胚盤胞、卵子、胚細胞または胚は、ヒトまたは任意の適当な動物種に由来することができる。動物はブタ、ウシ、ウマ、ヒツジまたはヤギなどの家禽であり得る。動物はイヌまたはネコのようなコンパニオンアニマル（ペット動物）であり得る。動物はウサギ、マウスまたはラットなどの実験動物であり得る。

10

【 0 1 4 0 】

任意の適当な種類の溶解溶液を使用できる。適当な溶解溶液は下記成分の種類の 1 以上を含むことができる：塩；溶解酵素；不安定化剤；金属キレート剤；還元剤；界面活性剤；緩衝液；および p H 調整剤。適当な溶解溶液の一般的性質を下記の表 1 B に示す。

【 0 1 4 1 】

表 1 B . 適当な溶解溶液の性質。

【表 6】

成分の種類	濃度範囲(%w/v または mM 範囲)	具体例および濃度範囲
塩	10-200 mM NaCl	50 mM NaCl,
他の成分 糖類, EDTA, SDS, プロテイナーゼ K, ジチオトレイトール(DTT), デオキシコール酸塩 (胆汁酸塩), トリプシナーゼ, NaOH, KOH, リゾチーム, NaOH, KOH, ウシ血清アルブミン(BSA)	0.1-1 mM EDTA, 100 pg/mL-0.5 mg/mL プロテイナーゼ K, ショ糖 5-250 mM, DTT 10-40 mM, 胆汁酸塩 1.5-5 mM, 5 µg/mL, NaOH 5-50 mM, KOH 5-50 mM, リゾチーム 1-3 mg/mL, BSA (0.1 – 5%)	ショ糖 100mM
界面活性剤	0.001-10% NP40, 非イオン性 0.001-10% Tween 20, 非イオン性 0.001-10% SDS, アニオン性 CHAPS 両イオン性 CTAB 0.001-0.01% 両イオン性 TRITON X-100 0.001-10% 非イオン性	0.12% TRITON X-100
緩衝液	1-250 mM Tris-HCL 10 mM クエン酸緩衝液 50mM HEPES, RIPA	10 mM Tris-HCL
pH	5.4-8.3	7.5

【0142】

典型的には、溶解溶液は下の表 2 B に示される性質を有するだろう。

【0143】

表 2 B . 好ましい溶解溶液の性質。

10

20

30

40

50

【表 7】

成分の種類	濃度範囲 (%w/v または mM 範囲)	特定例および濃度範囲
塩類	50-150 mM NaCl, KCl, (NaH ₄) ₂ SO ₄	50mM NaCl
溶解酵素	プロテアーゼ K 100 pg/mL-20 mg/mL. リゾチーム 1-3 mg/mL ヒアルロニダーゼ 100 pg/mL-0.5 mg/mL. トリプシン-EDTA 0.00005-50%	ヒアルロニダーゼ 10 µg/ml プロテイナーゼ K 20 mg/mL. トリプシン-EDTA 0.0005%
不安定化剤	1.5-25% 糖類 0.1-5% BSA	シヨ糖 100mM
金属キレート剤	0.1-2 mM EDTA 0.1-2 mM EGTA	
還元剤	1-10 mM for all ジチオトレイトール (DTT) DTE 2-メルカプトエタノール	
界面活性剤	0.2-2% NP40, 非イオン性 2-10% Tween 20, 非イオン性 0.1-2% SDS, 陰イオン性 CHAPS 両イオン性 CTAB 0.001-0.01% 両イオン性 TRITON X-100 0.1-5%, 非イオン性	Triton X-100 0.12%
緩衝液	10-150 mM Tris-HCL 10 mM クエン酸緩衝液 50mM HEPES, RIPA	100 mM Tris-HCL
pH	5.4-8.3	7.5

【 0 1 4 4 】

一般的な参考文献：ALCARAZ, C., DE DIEGO, M., PASTOR, M. J. & ESCRIBANO, J. M. 1990. "Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus." J Vet Diagn Invest, 2, 191-6を参照のこと。

【 0 1 4 5 】

卵母細胞、未分化胚芽 / 胚盤胞、卵子、胚細胞または胚は、溶解溶液の前に任意の適当な種類の溶液中に懸濁させることができる。幾つかの実施形態では、卵母細胞、未分化胚芽 / 胚盤胞、卵子、胚細胞または胚は、M - 199、水、PBSのような培地または本明

10

20

30

40

50

細書中の「生殖方法」という表題のセクション 1 において別に記載されるような培地中に懸濁させることができる。それは任意の適当な容量で懸濁させることができるが、その容量は典型的にはマイクロリットル範囲であるだろう。

【0146】

工程(1)または本明細書に記載の他の同様な方法工程において、溶解は任意の適当な時間に渡りおよび任意の適当な温度にて行われ得る。例えば、適当な時間は5秒から5時間までの間のいずれかであり得る。例えば、適当な温度は14 と100 の間のいずれかであり得るが、好ましくは約38 で10分間、55 で10分間、および95 で5分間であり得る。

【0147】

該方法は、工程(1)または本明細書中に記載の他の同様な方法工程の混合物を、該混合物中に存在する酵素を選択的に活性化および不活性化するような高温に加熱することを含み得る。適当な温度は14 と100 の間のいずれかであり得る。好ましくは温度は約85 である。好ましくは工程(1)または本明細書中に記載の他の同様な方法工程の混合物は、約38 で10分間、55 で10分間および95 で5分間加熱される。

【0148】

工程(1)または本明細書中に記載の他の同様な方法工程では、溶解および不活性化後、工程(2)または本明細書中に記載の他の同様な方法工程が行われるまで、混合物を氷上で冷却することができる。

【0149】

工程(2)または本明細書中に記載の他の同様な方法工程では、条件は目的の1または複数のポリメラーゼ技術 - すなわち後続の1または複数の下流用途に依存するだろう。例えば、下流用途は次世代シーケンシング、マイクロアレイ、一重鎖、二重鎖もしくは多重鎖PCR、またはリアルタイム一重鎖、二重鎖もしくは多重鎖PCRでありうる。遺伝物質は予備増幅させて多様な下流用途のために大量の全ゲノムDNAを産生することができる。

【0150】

工程(2)または本明細書中に記載の他の同様な方法工程は、単一の未受精または受精卵子から2、4、8、16またはそれ以上の細胞期へと発達した胚まで、PCRまたはリアルタイムPCR(qPCR)用にDNAを溶解させそして増幅させるために用いることができる。

【0151】

卵母細胞の取り扱い、精子の取り扱い、体外受精、胚の取り扱いのための一般技術および方法論は、次の参考文献中に見つけることができ、その全内容が相互参照として本明細書中に組み込まれる：Flechon他、2003；Bahnak他、1988；Mao他、2013；Garcia-Vazquez他、2016；Garcia-Vazquez他、2015；Hennekens他、2013；Rodriguez-Martines、2016；R Omar他、2016；Broekhuijse他、2012；Lopez Rodriguez他、2017；Briedbacka他、1995；Wieczorek他、2015。

【0152】

着目の適当なポリメラーゼ技術の一般的技術と方法論は、次の参考文献中に見つけることができ、その各々の全内容が相互参照により本明細書中に組み込まれる：Jiang他、2005；Chen & Kuo、2011；Martin他、2009；Khamlor他、2014；Li他、2011；Bredbacka他、1995；Hirayama他、2004；Kirkpatrick & Monson、1993；Pomp他、1995；およびTorner他、2013。

【0153】

本明細書に記載の特徴のいずれも、本発明の範囲内で本明細書中に記載の他の特徴のいずれか1つ以上との任意組み合わせにおいて組み合わせることができる。

【0154】

本明細書中の任意の先行技術への参照は、先行技術が一般的な技術常識の部分形成するという承認またはいずれかの形の示唆として解釈されないし、解釈すべきでもない。

10

20

30

40

50

〔図面の簡単な説明 2〕

【0155】

本発明の好ましい特徴、実施形態および変形は、本発明を実施するのに十分な情報を当業者に提供する下記の詳細な説明から理解されるだろう。この詳細な説明は先の発明の概要の範囲を限定するものと見なしてはならない。詳細な説明は次の通り幾つかの図面を参照にする。

【0156】

図1B。染色体Yの増幅プロット。閾値と染色体Yアンプリコンを含むウェルを示す。

【0157】

図2B。染色体12Sの増幅プロット。閾値と染色体12Sアンプリコンを有するウェルを示す。

10

【0158】

図3B。染色体12SとChr Yの組み合わせた増幅プロット。閾値と染色体12SおよびChr Yアンプリコンを有するウェルを示す。

〔実施形態の詳細な説明 2〕

【0159】

実施例1 - ポリメラーゼ酵素増幅のための、精子または精液の存在下での胚または卵子の差次的溶解。

【0160】

本実施例は、精子または精液の存在下での胚または卵子の差次的溶解のための新規溶解緩衝液/溶液の、PCR増幅への使用を記載する。単一の溶解した胚または卵子由来のDNAは、次いでPCRにより予備増殖させて様々な下流用途のための大量の全ゲノムDNAを生産させることができる。

20

【0161】

本例に記載するハイスループット法は、精子の存在下で卵母細胞を選択的に溶解させるのに十分なほど精巧な、25分の迅速なワンチューブ法であり、かつ同時に、2、4、8、16またはそれ以上の細胞期へと発達した単一の未受精卵子および胚からDNAを溶解させ予備増幅させるのに十分なほど高感度である。更に、予備増幅または下流用途にとって阻害性となりうる物質は1つも導入されない。当該方法は単細胞REPLIGキット並びに更なるqPCR用途にも適合する。

30

【0162】

材料と方法：

【0163】

予備増幅

【0164】

2 μ Lの容量での単一の受精胚(2細胞期以上)含有培地を、200 μ LのPCRチューブに移した。表2Bに示される溶解溶液/緩衝液(4 μ L)は、100 mM Tris-HCl pH 7.5中の50 mM NaCl、10 μ g/mLヒアルロニダーゼ、0.0005%トリプシン-EDTA、20 mg/mLプロテイナーゼK、100 mMショ糖、0.12% Triton X-100からなり、その溶液を前記チューブに添加し、38 $^{\circ}$ Cで10分間、次いで55 $^{\circ}$ Cで10分間、次いで95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、そして氷上で冷却した。7.25 μ LのREPLIG sc反応緩衝液と0.5 μ LのREPLIG scポリメラーゼから成るREPLIG マスターミックス(7.75 μ L)を、同じチューブ中の溶解細胞に直接添加した。チューブを十分に渦動攪拌し、スピンドウンしてチューブの底に全ての物質を回収し、30 $^{\circ}$ Cで8時間、次いで65 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートしてscポリメラーゼを変性させた。各回の実験の対照は、未受精の卵子、鑄型なしの対照、1 μ Lの精液、および試薬なしの対照を含んだ。

40

【0165】

予備増殖した全ゲノムDNAは、この時点で様々な用途、例えばPCR、qPCRまたはマイクロアレイに用いることができる。

50

【0166】

溶解した卵母細胞およびゲノム物質は、PCR、リアルタイムPCRのための鋳型として直接利用することもできる。9 μ Lのマスターミックス〔2 \times TaqMan（登録商標）Gene Expression Master Mix（Life Technologies社製）、各々0.4 μ Mの染色体Yの正方向および逆方向プライマー、0.25 μ Mの染色体YのFAMプローブ、各々0.4 μ Mの染色体12Sまたは染色体1の正方向および逆方向プライマー、並びに0.25 μ Mの染色体1または染色体12S（Martin 2009）VICプローブから成る〕を、全量の溶解物に添加した。染色体12Sは内部標準として使用した。アッセイは、次の条件を使って実施した：50 で2：00分の保持期間、続いて95 で10：00分の加熱、次いで95 で15秒と60 で60秒の40サイクル。予備増幅のための対照ウェル（未受精卵子、鋳型なし対照（NTC）、1 μ Lの精液、および試薬なし対照）とは別に、更なるゲノムDNA（gDNA）およびNTCを加えた。表3Bを参照のこと。

10

【0167】

リアルタイムPCR（qPCR）

【0168】

予備増幅からのscDNAを1/100希釈し、そして1 μ Lを鋳型として10 μ LのPCR反応液中で使用した。マスターミックスは2 \times TaqMan Gene Expression Master Mix（Life Technologies製）、各々0.4 μ Mの染色体Y正方向および逆方向プライマー、0.25 μ Mの染色体YのFAMプローブ、各々0.4 μ Mの染色体12Sまたは染色体1の正方向および逆方向プライマー、並びに0.25 μ Mの染色体1または染色体12S（Martin 2009）VICプローブを含んだ。染色体12Sは内部標準として使用した。アッセイは次の条件を使って行った：50 で2：00分間に続いて95 で10：00分間の維持、次いで95 で15秒と60 で60秒の40サイクル。予備増幅のための対照ウェル（未受精の卵子、鋳型なしの対照（NTC）、1 μ Lの精液、および試薬なしの対照）とは別に、更にゲノムDNA（gDNA）およびNTCを加えた。表3B参照。

20

【0169】

表3B．PCRプライマー／プローブ

【表 8】

12S				
	配列	Tm	GC%	アンプリコン
正方向プライマー (配列番号 366)	CACCCTCCTCAAGCATGTAGTAATAA	59	42	86 bp
逆方向プライマー (配列番号 367)	GCTTACCTTGTTACGACTTGTCCTTC	59	44	
プローブ (配列番号 368)	CTATATTCAATTACACAACCATG	69	30	
染色体 1				
	配列	Tm	GC%	アンプリコン
正方向プライマー1 (配列番号 369)	TGCCACACAAGGCATATTCTG	58	48	64 bp
逆方向プライマー1 (配列番号 370)	CAACTCCAAACGTGCTCTACTTCA	59	46	
プローブ 1	ATCCGCCTCCTCC	68	69	
染色体 Y				
	配列	Tm	GC%	アンプリコン
正方向プライマー2 (配列番号 371)	AATCCACCATACCTCATGGACC	70	50	
逆方向プライマー2 (配列番号 372)	GCAGGAGGATACAGGAGAAA			
プローブ 2 (配列番号 373)	ACTTTCTTGGGAGAGCAC			

【0170】

結果：

【0171】

正しい結果として受け入れることのできるアッセイ結果では、未受精の卵子が、Chr 1 または 12S に関して陽性シグナルを有し、Chr Y シグナルを欠いているはずである。精液対照、鑄型なし対照および試薬なし対照については、陰性反応（Chr 1、12S または Chr Y シグナルなし）が予想される。ゲノム DNA は、Chr Y と Chr 1 または 12S との両者に関して陽性であるだろう。35.5 未満の Ct 値（< 35.5）は、陽性に見なされ、そして Ct 値が 35.5 より大きい場合は（> 35.5）結果は陰性として棄却された。チューブ中にアンプリコンがない場合、または 12S が非存在で Chr Y が存在する場合は、複製が不成功であることを示した。

【0172】

図 1 B は染色体 Y の増幅プロットを示し、閾値と染色体 Y アンプリコンを有するウェルを示す。図 2 B は、12S の増幅プロットを示し、閾値と染色体 12S が陽性であるウェ

10

20

30

40

50

ルを示す。図 3 B は、染色体 12 S と染色体 Y を組み合わせた増幅プロットを示し、閾値および染色体 12 S と Chr Y アンプリコンを有するウェルを示す。

【 0 1 7 3 】

処置済の精液で受精させた卵母細胞からのデータを、表 4 B に与える。標的遺伝子は、受精卵母細胞を効率的に雌雄鑑別する 12 S と Chr Y であった。対照 (n = 8) は 58 % 雌および 42 % 雄であり ; チューブの上層からの精液で受精させた卵母細胞 (n = 16) は 84 % 雌および 16 % 雄であった。チューブの下層からの精液で受精させた卵母細胞 (n = 8) は、75 % 雌および 25 % 雄であった。

【 0 1 7 4 】

表 4 B . 処置済みの精液で受精させた卵母細胞からのデータ例。

10

2 つの遺伝子、12 S (内部標準) および Chr Y が検出された。2 つの結果の組み合わせを用いて胚の性別を決定した。

【表 9 - 1】

ウェル	サンプル名	標的名	12S	ChrY
A1	gDNA	12S	1	1
A1	gDNA	Chr Y		
B1	NTC	12S	0	0
B1	NTC	Chr Y		
C1	精液	12S	0	0
C1	精液	Chr Y		
D1	UFO	12S	1	0
D1	UFO	Chr Y		
E1	NTCrep	12S	0	0
E1	NTCrep	Chr Y		
F1	C1	12S	1	0
F1	C1	Chr Y		
G1	C2	12S	1	1
G1	C2	Chr Y		
H1	C3	12S	1	1

20

30

【表 9 - 2】

H1	C3	Chr Y		
A2	C4	12S	1	1
A2	C4	Chr Y		
B2	C5	12S	1	1
B2	C5	Chr Y		
C2	C6	12S	1	0
C2	C6	Chr Y		
D2	C7	12S	1	0
D2	C7	Chr Y		
E2	C8	12S	0	1
E2	C8	Chr Y		
			7	5
			%雌	%雄
		对照	58.33333	41.66667
F2	T1	12S	1	0
F2	T1	Chr Y		
G2	T2	12S	1	0
G2	T2	Chr Y		
H2	T3	12S	1	0
H2	T3	Chr Y		
A3	T4	12S	1	0
A3	T4	Chr Y		
B3	T5	12S	1	0
B3	T5	Chr Y		
C3	T6	12S	1	1
C3	T6	Chr Y		
D3	T7	12S	1	0
D3	T7	Chr Y		
E3	T8	12S	1	0
E3	T8	Chr Y		
F3	T9	12S	1	1
F3	T9	Chr Y		
G3	T10	12S	1	0

10

20

30

40

【表 9 - 3】

G3	T10	Chr Y		
H3	T11	12S	1	0
H3	T11	Chr Y		
A4	T12	12S	1	0
A4	T12	Chr Y		
B4	T13	12S	1	0
B4	T13	Chr Y		
C4	T14	12S	1	1
C4	T14	Chr Y		
D4	T15	12S	1	0
D4	T15	Chr Y		
E4	T16	12S	1	0
E4	T16	Chr Y		
			16	3
			%雌	%雄
		上層	84.21053	15.78947
F4	B1	12S	1	1
F4	B1	Chr Y		
G4	B2	12S	1	1
G4	B2	Chr Y		
H4	B3	12S	1	0
H4	B3	Chr Y		
A5	B4	12S	0	0
A5	B4	Chr Y		
B5	B5	12S	1	0
B5	B5	Chr Y		
C5	B6	12S	0	0
C5	B6	Chr Y		
D5	B7	12S	1	0
D5	B7	Chr Y		
E5	B8	12S	1	0
E5	B8	Chr Y		
F5	希釈剤	12S	0	0

10

20

30

40

【表 9 - 4】

F5	希釈剤	Chr Y		
			6	2
			%雌	%雄
		下層	75	25

【 0 1 7 5 】

考察

10

【 0 1 7 6 】

Chr 1または12Sは、未受精卵子のみからシグナルが検出された。精液に対する陰性反応（Chr 1、12SまたはChr Yシグナル無し）は、精液サンプルから全く溶解が起こらないことを示し、従って受精卵子ウェルにおいて任意の可能性ある残留精子から全く遺伝子構成物が抽出されないことを示した。Chr 1と12Sは内部標準（コントロール）であり、Chr Yアンプリコンの存在下であっても、このアンプリコンの不在は、増幅の不成功として無視した。

【 0 1 7 7 】

ゲノムDNAは12SとChr Yについて溶液であったが、一方でNTC、精液およびREPLIGからのNTCは、いずれのアンプリコンも不在であることによって明白であるように、全くDNAが検出されなかった。未受精の卵母細胞対照（UFO）は、ブタゲノム物質から予想される通り、12Sについて陽性であるが、偶発的に溶解された精液からもたらされた可能性があるChr Yは全く検出されなかった。この結果は「雌性」として解釈された。

20

【 0 1 7 8 】

このハイスルーブット体外受精（HT IVF）法は、様々な用途を有するだろう。図4Bを参照のこと。卵子は、SMGT（Sperm-Mediated Gene Transfer）（Rodriques 2013）、フローサイトメトリー、抗体または任意の化学薬品、例えば日焼け止め、洗剤、タルク、または既知のもしくは疑いのある突然変異原により処理された精液によって受精させることができる。受精が行われる時に導入することができる精液に対する処置の効果は、本実施例でのChr Yのような、単一遺伝子に関して試験することができる。当該方法は全ゲノム複製を用いるため、精液の処置の効果は、子孫の全ゲノムに対して決定することができる。更に、多数の卵母細胞が同時処置を受けることができるため、子孫の全集団に対する効果を調べることができる。

30

【 0 1 7 9 】

同効果について、未処置の精液を、クリスパー（CRISPR ; Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats）（遺伝子編集）またはタレン（TALEN ; Transcription Activator-Like Effector Nucleases）のような技術により遺伝子操作されている卵子に対して使用することができる。抗体または日焼け止め、洗剤、タルク、または既知のもしくは疑いのある突然変異原のような化学薬品の卵子への添加の影響を、単一の胚または胚の集団に対して試験することができる。

40

【 0 1 8 0 】

引用文献 2

【 0 1 8 1 】

米国特許出願公開US 20160222375 A1 : "Method, apparatus and kit for human identification using polymer filter means for separation of sperm cells from biological samples that include other cell types."

【 0 1 8 2 】

欧州特許出願公開EP 2 284 256 A2 : "Sperm cell insemination samples having selectively controlled sperm cell fertility characteristics produced through entrainment

50

in a fluid stream having correspondingly selectably adjustable flow characteristics and methods of assessing comparative of sperm cell insemination sample fertility."

【 0 1 8 3 】

米国特許US 6,548,741 B2 : "DEVELOPMENTAL COMPETENCE FOR ASSISTED REPRODUCTION AND NUCLEAR TRANSFER IN PIGS"

【 0 1 8 4 】

米国特許出願公開US 20150232917 A1 "Differential lysis with aid of Alkali and pressure"

【 0 1 8 5 】

Gill, Peter, Jeffreys, Alec J & Werrett, David J. (1985) "Forensic application of DNA 'fingerprints' ." Nature 第318巻、第6046号、577-579頁。

【 0 1 8 6 】

Mao, Shihong, Goodrich, Robert J., Hauser, Russ, Schrader, Steven M., Chen, Zhen & Krawetz, Stephen A. (2013) "Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling." Systems biology in reproductive medicine. 第59巻、第5号、287-295頁。

【 0 1 8 7 】

Martin, Irene, Garcia, Teresa, Fajardo, Violeta, Rojas, Maria, Pegels, Nicolette, Hernandez, Pablo E, Gonzalez, Isabel & Martin, Rosario. (2009) "SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs." Meat Science 第82巻、第2号、252-259頁。

【 0 1 8 8 】

Norris, Jessica V., Manning, Kate, Linke, Sarah J., Ferrance, Jerome P. & Landers, James P. Year: (2007) "Expedited, Chemically Enhanced Sperm Cell Recovery from Cotton Swabs for Rape Kit Analysis." Journal of Forensic Sciences 第52巻、第4号、800-805頁。

【 0 1 8 9 】

Pomp, D, Good, B A, Geisert, R D, Corbin, C J & Conley, A J. (1995) "Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. Journal of animal science." 第73巻、第5号、1408-1415頁。

【 0 1 9 0 】

Rodriguez-Martinez, Heriberto. (2013) "Sperm biotechnologies in domestic species : state of the art." Animal Reproduction 第10巻、268-276頁。

【 0 1 9 1 】

Rossen, Lone, Norskov, Pernille, Holmstrom, Kim & Rasmussen, Ole F. (1992) "Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA -extraction solutions." International Journal of Food Microbiology. 第17巻、第1号、37-45頁。

【 0 1 9 2 】

Torner, Eva, Bussalleu, Eva, Briz, M. Dolores, Gutierrez-Adan, Alfonso and Bonet, Sergi. (2013) "Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences." Reproduction, Fertility and Development. 第25巻、第2号、417-425頁。

【 0 1 9 3 】

Yoshida, Kanako, Sekiguchi, Kazumasa, Mizuno, Natsuko, Kasai, Kentaro, Sakai, Ikuko, Sato, Hajime & Seta, Sueshige (1995); "The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen." Forensic Science International, 第72巻、第1号、25-33頁。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 4 】

BAHNAK, B. R., WU, Q. Y., COULOMBEL, L., DROUET, L., KERBIRIOU-NABIAS, D. & MEYER, D. 1988. "A simple and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm." *Nucleic Acids Research*, 16, 1208-1208.

【 0 1 9 5 】

BREDBACKA, P., KANKAANPAA, A. & PEIPPO, J. 1995. "PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol." *Theriogenology*, 44, 167-176.

【 0 1 9 6 】

BROEKHUIJSE, M. L. W. J., FEITSMA, H. & GADELLA, B. M. 2012. "Artificial insemination in pigs: predicting male fertility." *Veterinary Quarterly*, 32, 151-157.

【 0 1 9 7 】

CHEN, Y.-H. & KUO, Y.-H. 2011. "Evaluation of different lysis buffers for improving resolution in proteomic analysis of porcine spermatozoa" Yu-Hui Chen, You-Hai Kuo (2), Meng-Ting Chung, Yu-Fang Chiu (and San-Yuan Huang). *J. Chin. Soc. Anim. Sci*, 40, 183-189.

【 0 1 9 8 】

FLECHON, J. E., DEGROUARD, J., KOPECNY, V., PIVKO, J., PAVLOK, A. & MOTLIK, J. 2003. "The extracellular matrix of porcine mature oocytes: Origin, composition and presumptive roles." *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 1, 124-124.

【 0 1 9 9 】

GARCIA-VAZQUEZ, F. A., GADEA, J., MATAS, C. & HOLT, W. V. 2016. "Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals." *Asian J Androl*, 18, 844-850.

【 0 2 0 0 】

GARCIA-VAZQUEZ, F. A., HERNANDEZ-CARAVACA, I., MATAS, C., SORIANO-UBEDA, C., ABRIL-SANCHEZ, S. & IZQUIERDO-RICO, M. J. 2015. "Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract." *J Reprod Dev*, 61, 407-13.

【 0 2 0 1 】

GILL, P., JEFFREYS, A. J. & WERRETT, D. J. 1985. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318, 577-579.

【 0 2 0 2 】

HENNEKENS, C. M., COOPER, E. S., COTTON, R. W. & GRGICAK, C. M. 2013. The effects of differential extraction conditions on the premature lysis of spermatozoa. *J Forensic Sci*, 58, 744-52.

【 0 2 0 3 】

HIRAYAMA, H., KAGEYAMA, S., MORIYASU, S., SAWAI, K., ONOE, S., TAKAHASHI, Y., KATAGIRI, S., TOEN, K., WATANABE, K., NOTOMI, T., YAMASHINA, H., MATSUZAKI, S. & MINAMIHASHI, A. 2004. "Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification." *Theriogenology*, 62, 887-896.

【 0 2 0 4 】

JIANG, Z., ZHANG, X., DEKA, R. & JIN, L. 2005. "Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification." *Nucleic Acids Research*, 33, e91-e91.

【 0 2 0 5 】

KHAMLOR, T., PONGPIACHAN, P., SANGSRITAVONG, S. & CHOKESAJJAWATEE, N. 2014. "Determination of Sperm Sex Ratio in Bovine Semen Using Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction." *Asian-Australas J Anim Sci*, 27, 1411-6.

【 0 2 0 6 】

KIRKPATRICK, B. W. & MONSON, R. L. 1993. "Sensitive sex determination assay appl

10

20

30

40

50

icable to bovine embryos derived from IVM and IVF." Journal of Reproduction and Fertility, 98, 335-340.

【 0 2 0 7 】

LI, C., SUN, Y., YI, K., LI, C., ZHU, X., CHEN, L. & ZHOU, X. 2011. "Detection of the SRY Transcript and Protein in Bovine Ejaculated Spermatozoa." Asian-Australian Journal of Animal Sciences, 24, 1358-1364.

【 0 2 0 8 】

LOPEZ RODRIGUEZ, A., VAN SOOM, A., ARSENAKIS, I. & MAES, D. 2017. "Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen." Porcine Health Management, 3, 15.

10

【 0 2 0 9 】

MAO, S., GOODRICH, R. J., HAUSER, R., SCHRADER, S. M., CHEN, Z. & KRAWETZ, S. A. 2013. "Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling." Systems biology in reproductive medicine, 59, 287-295.

【 0 2 1 0 】

MARTIN, I., GARCIA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., PEGELS, N., HERNANDEZ, P. E., GONZALEZ, I. & MARTIN, R. 2009. "SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs." Meat Science, 82, 252-259.

20

【 0 2 1 1 】

POMP, D., GOOD, B. A., GEISERT, R. D., CORBIN, C. J. & CONLEY, A. J. 1995. "Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos." Journal of animal science, 73, 1408-1415.

【 0 2 1 2 】

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2013. "Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art." Anim Reprod, 10, 268-276.

【 0 2 1 3 】

ROMAR, R., FUNAHASHI, H. & COY, P. 2016. "In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years." Theriogenology, 85, 125-34.

30

【 0 2 1 4 】

TORNER, E., BUSSALLEU, E., BRIZ, M. D., GUTIERREZ-ADAN, A. & BONET, S. 2013. "Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences." Reproduction, Fertility and Development, 25, 417-425.

【 0 2 1 5 】

TRIANA, L. R., BABCOCK, D. F., LORTON, S. P., FIRST, N. L. & LARDY, H. A. 1980. "Release of Acrosomal Hyaluronidase Follows Increased Membrane Permeability to Calcium in the Presumptive Capacitation Sequence for Spermatozoa of the Bovine and Other Mammalian Species1." Biology of Reproduction, 23, 47-59.

40

【 0 2 1 6 】

WIECZOREK, J., KOSENIUK, J., MANDRYK, I. & PONIEDZIALEK-KEMPNY, K. 2015. "Piglets born after intrauterine laparoscopic embryo transfer." Pol J Vet Sci, 18, 425-31.

標題 3

雌雄選別のためのモノクローナル抗体

〔 発明の分野 3 〕

【 0 2 1 7 】

本発明は、Y染色体を保有する精子に特異的に結合するモノクローナル抗体、並びに性

50

別特異的精子選択のために該抗体を使用する方法に関する。一実施形態では、本発明は、雄性精子細胞の精子表面タンパク質 D B Y / D E A D に特異的に結合するモノクローナル抗体に関する。別の実施形態では、本発明は、雌子孫を獲得する尤度（確率）を高めるために、人工受精前に精子を含有する精液を回収しそして処理する方法に関する。

〔発明の背景 3〕

【0218】

哺乳動物の子孫の性別は、精子細胞によって決定される。X 染色体を有する精子（「雌性精子細胞」）は、受精すると、雌（X X）の子孫になり、一方で Y 染色体を有する精子（「雄性精子」）は、受精すると、雄（X Y）の子孫になる。

【0219】

受精は、雄性または雌性精子細胞が卵子に貫通することで起こる。卵子との結合は、主として精子の表面タンパク質によって媒介される。それらのタンパク質は独特で、細胞特異的であり、免疫原性であり、抗体に接近しやすい。雌性と雄性の精子細胞は、表面タンパク質のレパートリーの点で異なっている。雄性精子細胞にユニークである表面タンパク質には、M E A 1、M E A 2、S R Y、T S P Y および D B Y / D E A D がある。例えば、国際公開 W O 2008/067651 号および米国特許出願公開 U S 2009/0208977 号明細書を参照のこと。これらは本明細書中に参考により援用される。

【0220】

「雌雄選択」は、雄または雌の子孫について意図的に選択する能力であり、それは長年に渡り畜産において熱心に追求されてきた。特に、雌のブタおよびウシ子孫を選択する能力が追求されており、様々なタイプの技術が提唱されている。以前に提唱された技術の幾つかを下記で取り扱うが、それらは哺乳動物の精子（「精子細胞」）の表面上の性別特異的エピトープに対する抗体（ポリクローナル、モノクローナルまたは部分）が標的とされている。

【0221】

米国特許第 3,687,806 号明細書は、雄性または雌性のいずれかの精子細胞と反応する抗体の使用を記載しており、未反応の抗体から結合した抗体を分離する凝集工程を使用している。

【0222】

米国特許第 4,191,749 号明細書は、雄性精子細胞を選択的に結合する一方で、雌性精子細胞を未結合のまま維持する固相免疫吸着材に連結された雄特異的抗体の使用を記載している。

【0223】

米国特許第 5,021,244 号明細書は、雄性または雌性精子細胞に富んだ集団を生産させるための特異的膜タンパク質に向けられた抗体の使用を記載している。

【0224】

米国特許第 6,153,373 号と同第 6,489,092 号明細書は、雄性および雌性精子の分離のための磁気粒子に結合された抗体の使用を記載している。

【0225】

米国特許出願公開第 2018/0201667 号明細書は、フローサイトメトリーに供する時に雄性および雌性精子細胞を分離する、ウシ精子に対する抗体を記載している。

【0226】

カナダ国特許出願第 C A 2610295 号明細書は、雄性および雌性ウシ精子細胞を浮遊（swim-up）およびフローサイトメトリーにより分離する、ポリクローナルウサギ抗体を記載している。

【0227】

しかしながら、それらの技術は各々、適切な再現性のある雌雄選択結果をもたらすことができない等といった欠点を有している。

〔発明の詳細な説明 3〕

【0228】

10

20

30

40

50

本発明者らは、雄性精子細胞（精子）に選択的に結合することのできる抗体を開発した。本発明者らは、精子を処置しそして雌性精子細胞から雄性精子細胞を分離する方法を開発した。本発明者らは、その抗体で処置後、生存可能な雌性精子細胞を見出し、それを哺乳動物での人工授精に使用し、雌子孫を産出できることを見出した。よって、当該方法は、該抗体で処置した精子を使った人工授精により、所望の性別の哺乳動物子孫を産生する確率を増大させる。

【0229】

一般的方法は、雄ドナー（例えば実証済みの人工授精牝牛または雄ブタ）から精液を回収し、該精液（すなわち「処置済みの精液」）中のまたは該精液から、望ましくない雄性精子細胞を所有する精子の不活性化、凝集、除去または致死を可能にするような比率で、抗体を精子に添加する工程を含む。次いで哺乳動物をその処置済みの精液で人工授精させて雌性子孫を産生させることができる。

10

【0230】

本発明の第一態様によれば、哺乳動物の雄性精子（雄精子）の表面タンパク質に特異的に結合するおよび／または該表面タンパク質に対して惹起される、モノクローナル抗体またはその断片が提供される。

【0231】

抗体は非天然型のものである。抗体は組換え手段により作製される。抗体は任意の適当な形態、例えば単離された形、精製された形、または実質的に純粋な形であり得る。

20

【0232】

本明細書中で用いる場合の「モノクローナル抗体（単数）」及び「モノクローナル抗体（複数）」なる用語は、単一分子組成の抗体の製剤を指す。モノクローナル抗体は、単一の結合特異性を示し、かつ標的抗原の特定のエピトープに対する特異性を示す。

【0233】

本明細書中の「抗体」は、必要な特異性を持つ結合ドメインを有する任意の特異的結合因子を包含するものと解釈すべきである。従って、この用語は、相同抗体セグメント、誘導体およびそのヒト化抗体、並びに抗体の機能的等価体および相同体を包含し、そして天然または合成のいずれかの抗原結合ドメインを有する任意のポリペプチドも包含する。抗体の例は、免疫グロブリンサブタイプ（例えばIgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA）並びにそのサブタイプおよびサブクラスであり；それは更に、抗原結合ドメイン、例えばFab、scFv、Fv、dAbおよびFdといった抗原結合ドメインを含むセグメント；およびダイアボディであってもよい。

30

【0234】

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、一価または一本鎖抗体、二本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、並びに前記抗体の誘導体、機能的等価体および相同体であってよく、抗体セグメントおよび抗原結合ドメインを含む任意のポリペプチドも更に包含する。

【0235】

抗体は、様々な方法を通して改変することができ、そしてDNA組換え技術を利用して元の抗体の特異性を保持している別の抗体またはキメラ分子を作製することができる。この技術は、抗体の免疫グロブリン可変ドメインまたはCDRをコードするDNAを、異なる免疫グロブリンの定常ドメインまたは定常ドメイン＋フレームワーク領域中に導入することができる。遺伝子の突然変異または他の変更は、抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞に対して実施でき、それは産生される抗体の結合特異性を変更しても変更しなくてもよい。

40

【0236】

重鎖および軽鎖中の超可変ドメインCDR1、CDR2およびCDR3並びにリンカー配列以外の、本発明のモノクローナル抗体の残りの部分はフレームワーク領域である。フレームワーク領域は、結合に必要とされる三次元構造に影響を与えない限りにおいて、別の配列によって置き換えることが可能である。抗体の特異性の分子基盤は、主にその超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3から来るものであり、それらは抗原と結合する

50

のに重要な位置である。好ましい結合特異性を維持するために、C D R 配列はできる限り保持されるべきである。しかしながら、結合特異性を最適化するために幾つかのアミノ酸を変更する必要があるかもしれない。当業者は、標準的技法を通してこの目的を達成することができる。

【 0 2 3 7 】

標的抗体はヒト化されてもよい。一般的に言えば、ヒト化抗体は、親抗体のフレームワーク領域中にアミノ酸置換を行うことによって修飾された抗体であり、親抗体と比較すると、ヒト化抗体は免疫原性が低い。抗体は、当業界で周知の多数の技術を使ってヒト化することができる。一般的に言えば、そのようなヒト化方法は、同一の抗原を結合することができる抗体配列を比較することを通して適当な位置を同定すること、および類似アミノ酸の同一部位で、異なるアミノ酸によって前記部位上のアミノ酸を置換することを含む。これらの方法によれば、親抗体のアミノ酸配列が別の関連抗体と比較され（例えば配列アラインメント）、それによって変化に寛容な位置が同定される。親抗体の変ドメインのアミノ酸配列は、典型的にはヒト抗体データベース中のアミノ酸配列と比較され、そして親抗体に類似したアミノ酸配列を有するヒト化抗体が選択される。親抗体の配列とヒト化抗体との配列が比較され（例えば配列アラインメント）、そして親抗体の1つ以上の変化に寛容性の位置のアミノ酸が、ヒト化抗体中の対応する位置のアミノ酸によって置換される。

10

【 0 2 3 8 】

上記に考察した、変化に寛容な位置の置換法は、任意の既知のヒト化法と容易に組み合わせることができ、そしてC D Rを含むヒト化抗体の作出に容易に適用することができ、前記抗体のC D Rは親抗体のC D Rに対する忠実性を維持しながら改変される。従って、本発明は更に、親抗体の改変形由来の複数のC D Rを含むヒト化モノクローナル抗体を提供する。

20

【 0 2 3 9 】

抗体は様々な方法を通して改変することができ、D N A 組換え技術を利用して、元の抗体の特異性を保持している別の抗体またはキメラ抗体を作出することができる。この技術は、抗体の免疫グロブリン可変ドメインまたはC D RをコードするD N Aを、異なる免疫グロブリンの定常ドメインまたは定常ドメイン+フレームワーク領域中に導入することができる。遺伝子突然変異または他の変更は、抗体を産生するハイブリドーマまたは別の細胞に実施することができるが、それが結果として産生される抗体の結合特異性を変更しても変更しなくてもよい。

30

【 0 2 4 0 】

本発明において用いられるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法を使って調製することもできる。本発明に係るヒト化抗体をコードするD N A 配列は、当業者に既知の常用手段を通して、例えば本発明に公表されたアミノ酸配列の人工合成またはP C R 増幅によって得ることができ、従って、前記配列は組換えD N A 法を用いておよび多数の当業界で既知の方法を用いて適当な発現キャリア中に連結させることもできる。最終的に、本発明に係る抗体の発現に適した条件下で、得られた宿主細胞を培養し形質転換させ、次いで当業者は周知の従来の分離・精製手段を使用して、本発明のモノクローナル抗体を精製することができる。

40

【 0 2 4 1 】

モノクローナル抗体を調製する場合、免疫グロブリン分子を精製するための当業界で既知の任意方法を用いて、例えばクロマトグラフィー（例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、特にプロテインAを通した特異抗原のためのアフィニティークロマトグラフィー、および他のカラムクロマトグラフィー）により、遠心分離、溶解度の差、またはタンパク質を精製するための他の任意の標準技術を用いて、それを精製することができる。多くの実施形態では、抗体は細胞から培地中に分泌され、培地を回収し精製することを通して抗体が得られる。

【 0 2 4 2 】

50

用語「抗体」または「免疫グロブリン」は本明細書中で互換的に用いることができる。それらの用語は当業者に周知であり、具体的には、抗原と特異的に結合することのできる1または複数のポリペプチドから成るタンパク質を指す。抗体の1形態は、四量体である抗体の基本的構造単位を構成する。それは完全に同一の2対の抗体鎖から成り、その各対は軽鎖と重鎖を有する。抗体鎖の各対において、軽鎖と重鎖の可変ドメインが一緒に連結されて抗原との結合を担い、一方で定常ドメインは抗体のエフェクター機能を担う。

【0243】

現在既知の免疫グロブリンポリペプチドは、 および 軽鎖、並びに 、 (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、 、 および μ 重鎖、またはその他の等価体を有する。免疫グロブリン「軽鎖」(約25 kDaまたは約214アミノ酸)はその全長において、NH₂末端の約110アミノ酸からなる可変ドメインと、COOH末端の または 定常ドメインとを含む。同様に、免疫グロブリン「重鎖」(約50 kDaまたは約446アミノ酸)はその全長において可変ドメイン(約116アミノ酸)および重鎖定常ドメインの1つ、例えば (約330アミノ酸)を含む。

10

【0244】

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、任意のアイソフォーム抗体または免疫グロブリン、または抗原との特異的結合能をまだ保持している抗体セグメント、例えば限定されないが、F a b、F v、s c F v および F d セグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、並びに抗体の抗原結合部分を有する融合タンパク質および非抗体タンパク質を包含する。前記用語は更にF a b'、F v、F (a b')₂ および / または他の抗体セグメント並びに抗原と特異的に結合することができるモノクローナル抗体を包含する。

20

【0245】

抗体は、様々な形態で、例えばF v、F a b および (F a b')₂、並びに二価性ハイブリッド抗体(例えばLanzavecchia他、Eur. J. Immunol, 1987; 17, 105)並びに一本鎖の形態(例えばHuston他、Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 1988; 85, 5879 およびBird他、Science, 1988; 242, 423, これは本明細書中に参考文献として引用される)で存在することもできる。免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の可変ドメインは、3つの超可変領域(「相補性決定領域」またはCDRとも呼ばれる)から成る。それらの超可変領域は、フレームワーク領域(FR)により隔てられて置かれる。FRおよびCDRの範囲は以前に定義されている("Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat他、U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照のこと)。本明細書中で論じられる全ての抗体のアミノ酸配列は、K a b a t システムを参照することによって分類される。同一種の異なる軽鎖と重鎖のFR配列は比較的保存されている。抗体FRはCDRの位置決定およびキャリブレーションに用いられる。CDRは主に抗原エピトープとの結合を担っている。

30

【0246】

キメラ抗体は、構築された重鎖と軽鎖遺伝子を有する抗体、特に、遺伝子操作されておりかつ異なる種に属する可変ドメインと定常ドメイン遺伝子を有する抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体遺伝子の可変ドメインセグメントは、ヒト抗体の定常ドメインセグメント、例えば 1 および 3 に連結される。キメラ抗体は別の哺乳動物種由来の遺伝子を使用することもできる。

40

【0247】

用語「ヒト化抗体」と「ヒト化免疫グロブリン」は同じ意味を有する。抗体の非ヒト化形と比較して、そのヒト化抗体は典型的にはヒト宿主において免疫反応を低減させる。

【0248】

本発明に従って設計され作出された抗体は、幾つかの保存的アミノ酸で置換することが可能である。該保存的アミノ酸は、抗体の抗原結合性または別の機能に実質的に全く影響を及ぼさない。言い換えれば、アミノ酸はg l y および a l a ; v a l , i l e および l e u ; a s p および g l u ; a s n および g l n ; s e r および t h r ; l y s および a r g ; p h e および t y r の組み合わせで相互に置換することができる。同じ群にない

50

アミノ酸は「実質的に異なる」アミノ酸である。

【0249】

幾つかの実施形態では、抗体とその標的スポットとの間の親和性は、 K_d （解離定数）によって表され、それは $10^{-6} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ 未満、または約 $10^{-12} M$ 未満である。

【0250】

抗体の重鎖または軽鎖の「可変ドメイン」は、前記鎖のN末端に位置する成熟領域である。全てのドメイン、CDRs および残基番号は、配列アラインメントを通しておよび現存の構造知見に基づいて定められる。FRおよびCDR残基の決定および番号付け法は、Chothia他が記載したもの（Chothia, Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. J Mol Biol. 1998; 278, 457）に基づく。

10

【0251】

VHは抗体重鎖の可変ドメインである。VLは抗体軽鎖の可変ドメインであり、それはおよびアイソタイプを含み得る。K-1抗体には-1アイソタイプがあり、一方でK-2抗体には-2アイソタイプがあり、そしてVは可変軽鎖である。

【0252】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書中では互換的に用いることができる。それらのいずれも任意長さの重合アミノ酸を指し、コードアミノ酸と非コードアミノ酸、化学的にもしくは生化学的に修飾または誘導化されたアミノ酸、および修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを包含しうる。前記用語には、融合タンパク質、例えば限定されないが、非相同アミノ酸配列を有する融合タンパク質、N末端メチオニン残基を有するかまたは持たない、非相同および相同リーダー配列を有する融合タンパク質；免疫学的タグ（ラベル）を有するタンパク質；検出可能な融合パートナーを有する融合タンパク質、例えば融合パートナーとして機能しうる融合タンパク質、例えば蛍光タンパク質、-ガラクトシダーゼ、フルオレセイン等を含む融合タンパク質が含まれる。一例として、融合パートナーアミノ酸配列は、単離された融合タンパク質の検出および/または精製を助けることができる。非限定例として、金属結合（例えばポリヒスチジン）融合パートナー、マルトース結合タンパク質（MBP）、プロテインA、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、蛍光タンパク質配列（例えばGFP）、myc、FLAGおよび血球凝集素タグなどのエピトープタグが挙げられる。

20

30

【0253】

この点については、当業者は、タンパク質の化学修飾に関するより広範囲の方法論に関して、Colign他編のCURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCEの第15章（John Wiley & Sons NY 1995-2008）を参照することができる。

【0254】

ポリペプチドは任意の長さのものであることができ、「ペプチド」という用語は8～50残基（例えば8～20残基）の長さのポリペプチドを指す。

【0255】

「対応するアミノ酸」は、2以上のアミノ酸配列を比較した時に同じ位置にある（すなわちそれらが互いに一致する）アミノ酸残基を言う。抗体配列の比較および番号付け法は、Chothia（上記参照）、Kabatt（上記参照）、その他により詳細に記載されている。当業者は、場合により1、2もしくは3個のギャップを作出し、そして/または1、2、3もしくは4個の残基または最大で約15個の残基（特にL3およびH3 CDR中に）を1または2個のアミノ酸中に挿入し、それによって比較を完成させることができることを知っている（例えば、Kabatt 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, DHHS, Washington, DCを参照のこと）。

40

【0256】

「置換可能な位置」とは、抗体の結合活性を有意に減少させることなく、異なるアミノ酸により置換することができる抗体の特定の位置を指す。置換可能な位置を決定する方法およびそれらをいかにして置換できるかは、下記により詳細に記載することにする。置換

50

可能な位置は「変化に寛容な位置」とも称されることがある。

【0257】

抗原性タンパク質もしくはペプチドおよび／またはその任意断片、変異体もしくは誘導体は、当業界で既知の任意手段により、例えば限定されないが、化学的（ペプチド）合成、組換えDNA技術およびペプチド断片を生成するタンパク質分解開裂によって作出することができる。

【0258】

化学合成は、固相および液相ペプチド合成を包含する。そのような方法は当業界で周知であるが、Nicholson編のSYNTHETIC VACCINESの第9章（Blackwell Scientific Publications）およびColigan他編のCURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCEの第15章（John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008）に提供されるような化学合成技術の例が参照される。これに関して、国際公開第WO 99/02550号および国際公開第WO 97/45444号も参照される。

10

【0259】

組換え抗原性タンパク質またはペプチドは、例えば、Sambrook他、MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989)、特に16節と17節；Ausubel他編のCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)、特に第10章と第16章；およびColigan他編のCURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)、特に第1章、第5章および第6章に記載されるような、標準プロトコルを使って当業者により好都合に調製することができる。

20

【0260】

雄性精子細胞の表面タンパク質は、任意の適当な種類の表面タンパク質であり得る。例えば、表面タンパク質はDBY/DEAD (Asp - Glu - Ala - Asp) ボックスポリペプチド3（「DEAD」）、雄強化抗原（「MEA」）1およびMEA 2、性別決定領域Y（「SRY」）。雄性精子細胞に特異的な更なる抗原の非限定例は、WO 2008/067651およびUS 2009/0208977に見出すことができ、それらは本明細書中に参照により組み込まれる。

【0261】

抗体は表面タンパク質の任意の適当な位置に結合しそして／またはそれに対して惹起させることができる。適当な配列の例は表1Cに示される。

30

【0262】

表1C．抗原DBY/DEAD、MEA 1、MEA 2およびSRYに基づいたまたはそれから誘導されたペプチド配列。

【表 10 - 1】

抗原	抗原性ペプチド配列：配列番号 1～346（連続的に順序付け）
MEA1	配列番号 1: PTEGTGDWISEEPEEEQTETG
	配列番号 2: PTEGTQDWYREEPEEEQEETG
	配列番号 3: PHEGTGDWSNEEPEEEMFETG
	配列番号 4: PTEGIGLWSSEEPEEEYEMTG
	配列番号 5: PTEGRGDWSWEEKHEQSEPG
	配列番号 6: FTEETGDWSSEEPRTAEETR
	配列番号 7: PMEGTGYHSSEEPHIEIMETG
	配列番号 8: PHEITGDWSWAEPEECQEQTG
	配列番号 9: PQEGTGDRNVNLP EEGEAPM

10

20

【表 10 - 2】

	配列番号 10: LQRRLEEFEGERERLQRMADSAA	10
	配列番号 11: PDEGTGDWSSSTYPEREVESTG	
	配列番号 12: PTHGTGWISSAEPSENQAETM	
	配列番号 13: TTIDTGAWVLEEPTELQNYNG	
	配列番号 14: PREDGFDCSSEETAYEQEVTG	
	配列番号 15: WHGYTGPWSSLEKALELVEPW	
	配列番号 16: PHPTTGDWGRRQPILLTEELG	
	配列番号 17: GTCGTGANYSQYRLCQVEYY	
	配列番号 18: PSKATQTHNTEGWREEMHESC	
	配列番号 19: FEICMGVGSCEEPETEAETE	20
	配列番号 20: CTCAEGVWVVHTPEEHQGETM	
	配列番号 21: PNEFELDWWSAHEVEEASCRD	
	配列番号 22: ATDLTGNWMEEAEHELQMTIM	
	配列番号 23: CYGGGQDITIFRYILYQEAIG	
	配列番号 24: AMEPTGMAESMPISEVQKMGD	
	配列番号 25: FDAEFQDASETCNEIVQCEDM	30
	配列番号 26: FTCGHITGPSNEPERMQMCMG	
	配列番号 27: ITAGPADFSLHPHNAKMNEYY	
	配列番号 28: PKEKGGVVKLDNFMNNQWENI	
	配列番号 29: GVFFTKRQENESRRKQHQPTA	
	配列番号 30: PKMVCMIESERETEEMNCCHV	40
	配列番号 31: PDTGRWDWSHEGVDEYSRKIR	

【表 10 - 3】

	配列番号 32: PTQGNCARSLTDLNIKQSELK	10
	配列番号 33: PGAGCPPASSEYEGEQEEFG	
	配列番号 34: PHEVDGQGSSCWDEEWSTEGT	
	配列番号 35: PTAGTGDWSSEEPEEEQEETG	
	配列番号 36: PDLINADLSTELQALAAEKTG	
	配列番号 37: PSFGLGDINSGNPKEEVEWWA	
	配列番号 38: PIAPLRDSSIIEDMEEYEAHG	
	配列番号 39: PTQWIPQMEEDENMREQCKAG	
	配列番号 40: PIELTRKCVWGSNDEWQEKPK	20
	配列番号 41: PLLGPVPWSQNEPPDEVEAFQ	
	配列番号 42: PTKTCGDPQGIEPQMERYSTV	
	配列番号 43: PKYKYTVWMLQEHIFVQNAMD	
	配列番号 44: PVAMTRDWKRGDMMEDAEEDG	
	配列番号 45: PTFRTFDWIFEPAADYGFIE	
	配列番号 46: PCERMGVWSSEEPEELQNEYS	
	配列番号 47: PTRDEVMPSSSTDPEEEHWKTS	30
	配列番号 48: PTMGGGGLSSEEHGWEVEKFM	
	配列番号 49: PIECTVDMCCESPEGWQEETG	
	配列番号 50: PTEVCGDMSSLEPKEVAEETP	
	配列番号 51: PHESDNQRSSESPEEEQRSTG	
	配列番号 52: HVRQRDEWVGRFEILDFRYIVKC	40
	配列番号 53: FVELNTEPEDEAMMLIVEMDYHM	

【表 10 - 4】

	配列番号 54: QVRRVEYLCGHCEDLQRFASFIA	10
	配列番号 55: AMRRSKEGWNEEYRVQRMSKSAM	
	配列番号 56: LARPCSWSYCWRERLVRMAKCDP	
	配列番号 57: TQTILFEFSGEHHRLIRSSKMVR	
	配列番号 58: CDRRVFKEEGCEHTYQDMNRDKP	
	配列番号 59: LRLMTNLIPGMTTKLSRAAKIAA	
	配列番号 60: LMRTFEESEGERPEDQRTAMSGN	
	配列番号 61: LQRLLEEFHWAVNSVQFFNDCAM	
	配列番号 62: LQRRLEYAKCERFRLVRDDDYEA	
	配列番号 63: WHIPLSENNGCRERLGREAVRCL	20
	配列番号 64: GQRRLECFCDTRLRGYCMWDSAA	
	配列番号 65: LQRHSEQTHGKQEHLKRHADDMC	
	配列番号 66: LQRFMEEHSGDRERLPSMNVS KA	
	配列番号 67: EQKSLPEQKGERARLQRM RDSAG	
	配列番号 68: LQRRMEESEREHEFLQRM ADSAA	
	配列番号 69: GQERLTEREGEFERQERM HDGRA	30
	配列番号 70: LARFLEETEGKEENLQRR ADSIK	
	配列番号 71: LQKDREEFEKTRHRLMKMT DHWA	
	配列番号 72: LQNSPEEFAGYRQRCQRM ADA AAA	
	配列番号 73: LQRRLEEWN GERHRLHRMEDIMV	
	配列番号 74: WQRRLSEFR REREETWRMAYSAA	40
	配列番号 75: TQRKLEEFEGE RERCSKMAVSVA	

【表 10 - 5】

	配列番号 76: LQRRLEDFDWSLQRLQRMADSAA	10
	配列番号 77: LQRRLEEFEWERHRLGMMACSGA	
	配列番号 78: LQRRLELFEGEYERLQVMALSAA	
	配列番号 79: LIRRLEEFEGERERLQRPADSGA	
	配列番号 80: LQKRDEEFEGERERLQRMADTAA	
	配列番号 81: LQRRLEEFEGERERLQRMATSDA	
	配列番号 82: LARRLEEFEGERERLQRMADSAA	
	配列番号 83: NELYGEEAADESENAQRFQDTAH	
DBY (DEAD と しても知ら れる)	配列番号 84: EMSSHIMTQAGVQWPDLSLEV	20
	配列番号 85: EMESHSVRQAVVQWWDCGSLEV	
	配列番号 86: ENESHSVTIAGEQWPDMGRLEV	
	配列番号 87: EMESWSVPQAGVQVPFVGSLED	
	配列番号 88: EMETHSDLQALQQWGDHGSLEV	
	配列番号 89: EMFSHSQTQLNTQWPDLGTHEV	
	配列番号 90: ESESRSVTQDRRVWPFLGSLEP	30
	配列番号 91: EMASYSVVQAGVQWPSFGDNEF	
	配列番号 92: ELESMEVITGGVQWPSWYKLWV	
	配列番号 93: EMESHSCMQPGHHWNDRGLNPQ	
	配列番号 94: EHFEQSVTQAGHGWSDWGSMEE	40
	配列番号 95: ESVSTAVTQAGISWPELFEGGR	
	配列番号 96: EMYIHSVTCNGDQRRCLGSGDQ	
	配列番号 97: EMVSFWVRFIYVMWPVLMSCSY	

【表 10 - 6】

	配列番号 98: EHEYYSVCQAGVVPWDSGLREV	10
	配列番号 99: EMESTMVNGRPWQWYKLCHLEI	
	配列番号 100: EMESHSVTQAGVQWPDLSLEV	
	配列番号 101: EMSCHYVKQSPNSWDDASYEV	
	配列番号 102: EMGGHSVQLQAGVQSENLLCWLS	
	配列番号 103: EMEHLLQRFCYPQFLDTNSHID	
	配列番号 104: EMDSCDVCEQGLRWKDAGSLTR	
	配列番号 105: EFERCHVTAAGEHKCDACSLEN	
	配列番号 106: EMCQHKVHDGCVQRCKLAHV RV	
	配列番号 107: EFPTTIVGQAMRQIMMTQCLNP	20
	配列番号 108: EAAVVSVHCICVKLPDRQQKCV	
	配列番号 109: ESCKHTQNQSAYTWSPHWGEV	
	配列番号 110: EMNLPSMNL MCVSCLDPCSIGV	
	配列番号 111: EMDEHSNTVALMQEFKSWIYTA	
	配列番号 112: EMCFHCGRQTGGQM QSQLSLEV	
	配列番号 113: ECGYRSVTPFWEQEMNHCSLHG	
	配列番号 114: ECISAPQMRVYGQQPFAYNLEE	
	配列番号 115: EMTSIIWMCSWAQM KDDMDLSV	
	配列番号 116: ENGNCENSKSGQQDSWVQQLEL	30
	配列番号 117: ETYPVYLVQRQSNIEDLVQVLQ	
	配列番号 118: EMPSFRPTMYRVRESVYRAANK	
	配列番号 119: EGNNPKLTFAIVQWPHDESTRW	
		40

【表 10 - 7】

	配列番号 120: EMKQIQVQEFGKCWQRATSHPV	10
	配列番号 121: EKVPVMATYTGAVWMRGGKEIV	
	配列番号 122: ESEFHEVEQAVKKCGFVATLSV	
	配列番号 123: NMSAAVTFASWQTPFRAPFPG	
	配列番号 124: EMESHSVTQAGVQMPDLGILEV	
	配列番号 125: YLHSCVVNQEWNLFYLTLLY	
	配列番号 126: TYEAHGVQTEYCRSNISQWDRD	
	配列番号 127: LCEHKVTGDEETDASNGTCAEP	
	配列番号 128: IMDSFSIKITDWVSPDSDEVKN	20
	配列番号 129: NQWAWFVPVSSQPSYLEYRKEV	
	配列番号 130: EWQQYSVFSLGWMLGVDWGLRR	
	配列番号 131: THYQISVCDLKYPIDFDYNVV	
	配列番号 132: FDWSHSGFHAGSQMVQCFLWLG	
	配列番号 133: GMLSQAHEAYVWMMKPYFNLN	
	配列番号 134: EMVCWPRTEAIVIKYGVFSREE	30
	配列番号 135: WADCQDVTQVYVDGYDHKSWIR	
	配列番号 136: MTASQSQTPLCKQVWDLCEHKL	
	配列番号 137: HHESWSCMPAEVMKTGLAKGAS	
	配列番号 138: IMDATCVTNVGYQDHDEQMINV	
	配列番号 139: RMECHCTGEMGVRVIFIGGTEE	40
	配列番号 140: PTTEHTPTDTGYFKHHNASLEH	
	配列番号 141: RLQSLYATQQGYRDPWTGHEEV	

【表 10 - 8】

	配列番号 142: EMESQKMFDCRMQGPVVVGEEV	10
	配列番号 143: PGESHSQFRNYDLVRYTILQEV	
	配列番号 144: CMMNHSLTAILQGMRKHELDW	
	配列番号 145: EMFCQSESQACVAIPQTGCHLV	
	配列番号 146: TMHKSNVNKVSVPWCDRGSLTV	
	配列番号 147: EMHCHPYYGARVQYPKLYSDEV	
	配列番号 148: EMEDTWETQLPVRWHDLPDYMV	
	配列番号 149: SMECHSCCQKLMMWRALRSLEA	
	配列番号 150: DMTSMMTRQAFFQWPLPGWADV	
	配列番号 151: YKEYHSVYSPTVVEPPLVSLEW	20
	配列番号 152: VCTSQQVLI AVLQMSADIQLEV	
	配列番号 153: IQLSPSVTQAGFVMPDLGSREV	
	配列番号 154: EMEHHSWPLFDVQWHHLNPLEG	
	配列番号 155: DMLEHIITQADVQIPDVGSLEF	
	配列番号 156: EGLSHGFTQAIQWPD LGSMWV	30
	配列番号 157: HMESH SVHQGGVQR PRLGWEEC	
	配列番号 158: MMESH SVASAGVQW KKNPTLIV	
	配列番号 159: EMESH SVAQHGVQW SGNSSMGV	
MEA2	配列番号 160: LQRHLEEFEGEGERERLQRMADSAA	40
	配列番号 161: LQRRLEEFEGEGERERLQRVADSKA	
	配列番号 162: LDRRLEEFEGEGERGRLQRMADSNA	
	配列番号 163: LQRRCEE FHGEYERLQPMADSAA	

【表 10 - 9】

配列番号 164: LERRFEFWGERVRLQRMADSAL	
配列番号 165: LQRRLEMFEHGGERLQRYADFAA	
配列番号 166: LPRRTEEPVGERERLQRCMDSAA	
配列番号 167: LQKRDAGFEGERERFQRMASAA	
配列番号 168: LQRRGEEQEGERERLQRVSDSSS	10
配列番号 169: LQRRGHEFEMERRRLQRMAYHAF	
配列番号 170: LLNELQVFEFERFHLQRMADSIA	
配列番号 171: LQGRVNEFNRRERLDRMIRFAG	
配列番号 172: LQRYQEEVMNEDERVQEMEDSAH	
配列番号 173: LERVLEEFYTERHKAPKMAHTFA	20
配列番号 174: LQRCLEEFEDTRCRLGHMPISDA	
配列番号 175: LIAHLEKFCYERTILMDMIKSAA	
配列番号 176: LQYCLERFRGLRERWGRSKDSYH	
配列番号 177: LQRTLMMFEGNRKLMSVMAMYTA	
配列番号 178: LCRFLKEGKGDREVVVRGAMSKQ	30
配列番号 179: LARLLEEGEWVILRLWELRTGFA	
配列番号 180: LFRYLKEQNAEPECVVSFYTHAA	
配列番号 181: LQHRLAEFELYIEERQDPAKRWC	
配列番号 182: LPRIIAEFEGLEMAGRMANSRP	
配列番号 183: LTRFYHYFDGMGYRATWYQYGMA	
配列番号 184: LERRKECTQGDRFPYLMMAQVC	40
配列番号 185: LRRHLTEIPGHNAECQDFKWWKW	

【表 10 - 10】

	配列番号 186: LQMRLEWKKHMRNKLVIPDPECA	10
	配列番号 187: LHTNCMVEEQIAEPLYAKADYNG	
	配列番号 188: LFRSWWILDTEDASGSVTPAMT	
	配列番号 189: LFRMTEGGYDCPWHLARTGDSGD	
	配列番号 190: LIRWRYPDDEGMRTQAAAMAFQGI	
	配列番号 191: LNTLSVMDEVKGYNMQWEATSAA	
	配列番号 192: QEIRLSVPEMTEVRMSRCTDMAD	
	配列番号 193: CWRPSWECEGLHHGAVRSDHTWT	
	配列番号 194: KQRNGAEFEGFPEQLWRPADYVV	
	配列番号 195: MSPRLWETLVELETTQRCSLTRH	20
	配列番号 196: EAGRTFTYKYSLWRGYTFSDSAN	
	配列番号 197: LQRRLEEFEGERERLQRMADSAA	
	配列番号 198: SNGLEEEPFVRVGHTRCFDIAA	
	配列番号 199: DGCRLDEVEGEFRKISPWKDVLA	
	配列番号 200: LFERLAMFEHWYHDKFKAKDSDA	
	配列番号 201: TPRRHNFYHQKERLQDNGDFMA	
	配列番号 202: LQPLLPIWEGERMRELRLMYDSEA	
	配列番号 203: LQLNLEGFCGECPRPVRMAKSAY	
	配列番号 204: HQRRLSFFEVRILNKHRYAHSCA	
	配列番号 205: LSRRLTEQEGTFERSQKFFDMQA	40
	配列番号 206: SQMRRKHFIHEREYLYRMLDSIQ	
	配列番号 207: LQRHMEDEEDKRDQVQRMADTAA	

【表 10 - 11】

	配列番号 208: KYRNHEEFEGENIRYQVWADHKH	10
	配列番号 209: LCRGLEREEGEREEFHRMATQAI	
	配列番号 210: YMRKLEEWHGHIRRHQPLADFAA	
	配列番号 211: TLVGREEFEGEGQMLQRMADSAD	
	配列番号 212: LQRRFENFEGGRERLIRMADFAA	
	配列番号 213: FVRFREEFEGWRERLQRMAPSAA	
	配列番号 214: LQRRVAHFEGERARLQRMADSAA	
	配列番号 215: KQRRLEEFEGECEQLQRIAPSAK	
	配列番号 216: LQRRLEEFEGERYALSRMAASEA	
	配列番号 217: MQRVLAEFEGERQRLQRMADSAA	
	配列番号 218: LQRILEEFEGERERLQREADSAA	
	配列番号 219: LQRRLEEFEDERERLQRMAQSAA	
	配列番号 220: LQRRLEEFFGERERLQRMADSAA	
MEA2	配列番号 221: RKWLEEQLKQYRVKVQQERSSQ	30
	配列番号 222: RAWLEKQLKQYRVKRQQERSSQ	
	配列番号 223: RSWLEEQLKQMRAKRQQERSSQ	
	配列番号 224: RKWSEEQLKQYRVKRQQEWSSR	
	配列番号 225: RKALEQQLKQYRVKRQQSRSSQ	
	配列番号 226: RKWLEEWLKSIRKHRQQERSAQ	
	配列番号 227: RKWSEEQLKGYYSKRQQERMSQ	
	配列番号 228: RRFLEKELKQYRHGRQQERSSR	40

【表 1 0 - 1 2】

配列番号 229: RDWLETQLKQCIVKRNQNSSMQ	
配列番号 230: RKWLEGVLKGYLVKSQLESSSG	
配列番号 231: RFWLKEQLKQYRVKGTVELSRQ	
配列番号 232: RDWHIEELKQFRVKIQGTRSSN	
配列番号 233: RKWCEEQLIQFRVFEQGSRYRQ	10
配列番号 234: RKWLEMALKHFKMSRQSEISSQ	
配列番号 235: RKNLEDQMKGLRVFPGDCGSAQ	
配列番号 236: RKWLEEQLKQYRVKRQQERSSQ	
配列番号 237: RKWRDYCLKQYDFDISLERLVR	
配列番号 238: RKWKGMHDSL YRVKYQGEMNSG	20
配列番号 239: RIWLYWQIKQWFVLGHQKRSSE	
配列番号 240: RKIIIEINML YMKKRIDEHSSQ	
配列番号 241: RKWVEEMLRDGFVK NARWFGPD	
配列番号 242: RVWEALRRKGERYSAQQHSSSE	
配列番号 243: RILAIERKGRYDDKTQQQDYFT	30
配列番号 244: RKHRSMCLPQNRCLMGSEDIQQ	
配列番号 245: RHYCFEIGKQCQHKMANASCPM	
配列番号 246: RSDIEPHFSAYDFTDKDNCSHQ	
配列番号 247: RECLERFMVDYDMCDHQARSGQ	
配列番号 248: RKYLIEILKLFRPWAQQCRHHL	
配列番号 249: RIYTLDCIKQQRQFTQWGMSQA	40
配列番号 250: RGRDCCAINQKHNNFNVEPCSS	

【表 10 - 13】

	配列番号 251: RELLEAQVNQHDKYKYLQQSFQ	10
	配列番号 252: RKELRSWSAWYKPEEEQSRSCI	
	配列番号 253: RGQQMEHLRRCLPIRQAEYCDA	
	配列番号 254: HIKCEPMPKQCMVKASMRYSN	
	配列番号 255: DFGVWEWGKQTPYKRQQWPLDD	
	配列番号 256: TRWSEGQAKFWLNQIVQEWSST	
	配列番号 257: GKWAGITGDPERVESQADFFVP	
	配列番号 258: RKTfEGWLYPYNTKIFEERSQG	
	配列番号 259: NKWLMMIGYNYDLCEYHECNDR	
	配列番号 260: QKWWEYLTQEDVGRWQKASYW	20
	配列番号 261: QKWSEYQHHVYEGPRYEMFFQR	
	配列番号 262: FFMLEVKLETMRAGHQPEDETW	
	配列番号 263: MKVLGEEVFQYRVINGQQCSYT	
	配列番号 264: GTWGPEQGKMYRGKFRQNASYQ	
	配列番号 265: MKWDIAQLKTKCVDHGTNPCSN	
	配列番号 266: SAWLTEQLVQYRVKGQAEKSSQ	30
	配列番号 267: LCWHEEYLKQCRVKRQICNSLP	
	配列番号 268: RCWGEEQDKQLAVSRQDEIMQQ	
	配列番号 269: EKQLEKETHQLSVKRQQPRLNF	
	配列番号 270: EKKEENQLKMNPAKRQPERSVR	
	配列番号 271: HKTTEEWLKQYWVKVQQERRSQ	40
	配列番号 272: TDWFNEQLKVYREKRQQERTHQ	

【表 10 - 14】

	配列番号 273: RKQAEDQLAQYRVKRWQERSAI	
	配列番号 274: VKFP EEQQGMYRWKRQFERSSQ	
	配列番号 275: GKWLEEDFKITRVKRTQERSSQ	
	配列番号 276: RKWLEEQQQLYRVTRGQGRSSQ	
	配列番号 277: RKWLEEQQGYRVERQQEWSSQ	10
	配列番号 278: RKWLEEQLLWHEVKRQQERSSQ	
	配列番号 279: RKWLEEQLKSYKVKRQQERSHQ	
	配列番号 280: RKWLELQLKQYRVKRQQERYSQ	
	配列番号 281: RKWLEEQLKQYRVHRQQERSSQ	
		20
SRY	配列番号 282: RDQRRKMVLENPRMRNSEISKQ	
	配列番号 283: RDQRRQMALENIRMRNSEISKQ	
	配列番号 284: RDQRRMALENPRMRWSNISKQ	
	配列番号 285: RDQRRKMRLLENPRMGNSEISWY	
	配列番号 286: RDQRRKVLREPPMRNSEISKQ	
	配列番号 287: RDQRSKFCLECPMRNNSCISKR	30
	配列番号 288: RDQRRLMAFENPRMKNHEL SKA	
	配列番号 289: RMDRIKMAKEHPQSRNSEISKQ	
	配列番号 290: RDQRGKMTEENPCMRNFEISKW	
	配列番号 291: RDQYRKMRLENIFRRMSEIQKI	
	配列番号 292: RNQRRGQAPENYYMRNSDISDQ	40
	配列番号 293: RPQRSEQSLENPRMRYDEGSKW	

【表 10 - 15】

	配列番号 294: RDTRKTDALHPRMRNREGSRQ	10
	配列番号 295: RNHRRKMRLLNPRMRMSEIQGA	
	配列番号 296: RDYRTKMSLIVPRQRYYEIWKM	
	配列番号 297: RMKRRFCDVENMRMRGYLISEI	
	配列番号 298: RIMRYSGAHKNPHMWRSEYSNQ	
	配列番号 299: RGQMRRTWCENWQTRSSRIRPQ	20
	配列番号 300: RDNRRMMALTYPPGRNKWKLDK	
	配列番号 301: RPQHDEMLIINPIMRDSNLTKQ	
	配列番号 302: RDKRRKMPNVNEQCQDAQISLL	
	配列番号 303: RDQKAEQDNENPKMRMVECHGQ	
	配列番号 304: RDEGDKVLDLCNRMMNSRKMIQ	30
	配列番号 305: RDVRMKMTRPHCRRRCGEASVV	
	配列番号 306: RKQHYSPLENKCARKTCQSKI	
	配列番号 307: RLIRCLFCLEMPRIYIPEIHWL	
	配列番号 308: RLIRCLFCLEMPRIYIPEIHWL	
	配列番号 309: RCNWRKCNEEPPNYMHSMFGCQ	40
	配列番号 310: RDQRRKMALENPRMRNSEISKQ	
	配列番号 311: RQCRKRWRDNNNPMACSYIRKQ	
	配列番号 312: REQRPVDVETDFTLRTPHKKK	
	配列番号 313: RHQKVPDAIENPRMRWNGWDTA	
	配列番号 314: RIFRRKVYLERNRSGDWIWTR	40
	配列番号 315: RKQGRPMDCMYPNMHRGYHMHHP	

【表 10 - 16】

	配列番号 316: RYKSPMTLINRGQIRDTPCSDR	10
	配列番号 317: CRQDDIKLLHEGEMEKGRLWKH	
	配列番号 318: RDARCWWTTHGYHHGNCEWYLK	
	配列番号 319: DDQDRKMYTDAPINRLRKALKQ	
	配列番号 320: CRADSWKAKEYPENRPSEIPIQ	
	配列番号 321: RDAYRPVAVHNCMMRMGMIWAE	
	配列番号 322: HTQRNFCFIENTQYWNLEDSWT	
	配列番号 323: HDQRRDHRVGVPRMERGTPAKK	
	配列番号 324: RMFCRHVAYDLPRMRFSYISVQ	
	配列番号 325: RDMIREQAQEKPRRLSHRWKQ	20
	配列番号 326: YDPRINYPLEHIRMSNPEIAKE	
	配列番号 327: EDARVNMALELARPKSFRMSH	
	配列番号 328: FKQRRFMAMEEPLSRLSERHSC	
	配列番号 329: VTERRKMALKFPPDDAVQISHQ	
	配列番号 330: RPQRRYTGEYNVFRCEEISHA	
	配列番号 331: TKQTFKMAVGNGTSRNVEINKA	30
	配列番号 332: RDQRRVVALVKANHYASLIAKG	
	配列番号 333: RKQKNKMAKENPRMRHSETNKP	
	配列番号 334: RDQRQPMNLWPAAMRNSRIYRQ	
	配列番号 335: RDQQRKKALENPRHRNSAKHTK	
	配列番号 336: NDQRRKFAWGPPMRNEPISSE	40
	配列番号 337: RRQRRKMAWEQPRMQTSVIWRD	

【表 10 - 17】

配列番号 338: SDQRMHMALENARWRNSYIWKQ
配列番号 339: RDQGRKMCLNPRQRNKPIKKQ
配列番号 340: RDQRMLMTLENPRMRNRAYSQ
配列番号 341: RDQTRAAALENPRMRYSEISKY
配列番号 342: RDQRRKNALEPPMRHSECSKQ
配列番号 343: RDQRRKMGLEQPRMRNSEIMKQ
配列番号 344: RDQRRKMALENPKMSNSEISMQ
配列番号 345: RDQRRKMALENPKMSNSEISMQ
配列番号 346: RDQRRKMAKENPRMRNSEISKQ

10

【0263】

20

幾つかの実施形態では、表面タンパク質は D B Y / D E A D である。

【0264】

幾つかの実施形態では、抗体は D B Y / D E A D に特異的に結合する。

【0265】

幾つかの実施形態では、抗体は D B Y / D E A D またはその抗原性部分に対して惹起される。

【0266】

幾つかの実施形態では、抗体は配列番号 347、352 および 84 ~ 159 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその一部分に対して惹起される。

【0267】

30

幾つかの実施形態では、抗体は配列番号 347、352、353、354、355 および 84 ~ 159 のいずれか 1 つのアミノ酸配列のエピトープに結合する。

【0268】

幾つかの実施形態では、抗体は配列番号 353、354 および 355 のいずれか 1 つ、好ましくは配列番号 353 のアミノ酸配列のエピトープに結合する。

【0269】

幾つかの実施形態では、抗体は配列番号 353、354 および 355 のいずれか 1 つのアミノ酸配列のエピトープに、または 1 もしくは複数のアミノ酸置換を有するエピトープに結合する。

【0270】

40

幾つかの実施形態では、抗体は、コア配列 E M E S H (配列番号 353 由来) を有するエピトープ、または 1 もしくは複数のアミノ酸置換を有するエピトープに結合する。

【0271】

幾つかの実施形態では、抗体重鎖可変ドメインは、C D R 1 (配列番号 363)、C D R 2 (配列番号 364) および C D R 3 (配列番号 365) のアミノ酸配列を含む。

【0272】

幾つかの実施形態では、抗体軽鎖可変ドメインは、C D R 1 (配列番号 360)、C D R 2 (配列番号 361) および C D R 3 (配列番号 362) のアミノ酸配列を含む。

【0273】

幾つかの実施形態では、抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 350 のアミノ酸配列を含

50

み、その重鎖可変ドメインは配列番号 350 に示されるアミノ酸配列の 1 個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により誘導される。それは配列番号 350 と少なくとも 95%、96%、97%、98% または 99% の同一性を有し、そして前記抗体は表面タンパク質と特異的に結合する活性を有する。

【0274】

幾つかの実施形態において、抗体重鎖可変ドメインは配列番号 348 のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0275】

幾つかの実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、配列番号 351 のアミノ酸配列を含み、またはその軽鎖可変ドメインは配列番号 351 に示されるアミノ酸配列の 1 個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失または付加により誘導され、それは配列番号 351 と少なくとも 95%、96%、97%、98% または 99% の同一性を有し、前記抗体は表面タンパク質と特異的に結合する活性を有する。

10

【0276】

幾つかの実施形態では、抗体軽鎖可変ドメインは配列番号 349 のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0277】

DBY/DEAD はヒト起源であるが、それは異なる哺乳動物種を超えて高度に保存されているタンパク質であるため、抗体はウシおよびブタ種をはじめとする異なる哺乳動物種の DBY/DEAD に結合することができる。

20

【0278】

用語「哺乳動物」には、限定されないが、ヒト、家禽、家禽類、実験動物、コンパニオンアニマル、およびペットが含まれる。この用語には、限定されないが、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、イルカ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット、イヌおよびネコが含まれる。好ましくは哺乳動物はブタまたはウシである。

【0279】

本発明の第 2 態様によれば、有効量の第 1 態様のモノクローナル抗体と許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む組成物が提供される。

【0280】

組成物は、例えば、医薬組成物の形態、獣医用途の組成物の形態、または研究目的のための形態（例えば試薬または研究ツール）であり得る。

30

【0281】

許容される担体、希釈剤または賦形剤は、精液に有害であったり害を与えたりするものではない。許容される担体、希釈剤および賦形剤を記載している有用な参考文献は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991) であり、それは参考により本明細書中に組み込まれる。

【0282】

幾つかの実施形態では、許容される担体、希釈剤または賦形剤は精液増量剤である。精液増量剤または希釈剤は、典型的には、哺乳動物の射精液の量を増加させるために用いられる水溶液である。精液増量剤は典型的には、精子細胞の代謝維持のための栄養素を供給する（例えばグルコース）、冷感刺激に対する保護を提供する（例えば BSA）、培地の pH（例えば重炭酸塩、Tris、HEPES）および浸透圧（例えば NaCl、KCl）を維持する、および微生物の繁殖を抑制する（例えば抗生物質）だろう。精液増量剤は、当業界で既知であるもののいずれか、例えば市販の精液増量剤（例えば Minitube 社製の Androstar Boar Semen Extender (BSE)）を含み得る。精液増量剤は典型的には、精子の由来である特定の種に適するようにまたは適合するように処方される。

40

【0283】

本発明の第 3 態様によれば、第 1 態様のモノクローナル抗体または第 2 態様の組成物を含有する試薬、キットまたはチップが提供される。

50

【0284】

前記試薬、キットまたはチップは次の1または複数を含むことができる：モノクローナル抗体、前記抗体をコードする核酸、前記抗体を含有する真核細胞、原核細胞およびウイルス。

【0285】

試薬、キットまたはチップの別のオプション成分は、抗体活性アッセイの実験を行うための、制限エンドヌクレアーゼ、プライマーおよびプラスミド、緩衝液等を含む。前記試薬、キットまたはチップの核酸は、非ウサギ抗体核酸との連結のために、制限エンドヌクレアーゼ部位、多重クローニング部位、プライマー部位等を更に含んでもよい。前記試薬、キットまたはチップの全ての構成成分は、別々の容器中に個別に保管することができ、あるいは必要であれば単一容器中に事前に統合してもよい。

10

【0286】

本発明の第4態様によれば、診断剤、診断試薬または道具としての第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物の使用が提供される。

【0287】

これに関して、モノクローナル抗体は、例えば放射性同位体、検出可能な物質を生成することのできる酵素、蛍光タンパク質およびビオチンにより、標識しそして検出することができる。更に、モノクローナル抗体は、固相担体、例えば限定されないが、(ポリスチレン)プレートまたはビーズと結合することができる。

20

【0288】

本発明の第5態様によれば、哺乳動物の精子(「精子細胞」)を処置する方法であって、精子を含む哺乳動物の精液を、該抗体が精液の雄性精子(「雄性精子細胞」)に特異的に結合するように、第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物と接触させる工程を含む方法が提供される。

【0289】

精液をモノクローナル抗体と接触させると、「処置済みの精液」、「処置済みの精子」または「処置済みの精子細胞」を生成する。

【0290】

本発明の第6態様によれば、産生される雌子孫の確率を増加させるために哺乳動物の精子(「精子細胞」)を処置する方法であって、抗体が雄性精子に特異的に結合するように哺乳動物の精子を第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物と接触させる工程を含む方法が提供される。

30

【0291】

本発明の第7態様によれば、哺乳動物の精液の雌雄鑑別方法が提供され、抗体が精液の雄性精子に特異的に結合するように精子を第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物と接触させる工程を含む。

【0292】

本発明の第8態様によれば、第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物で処置した時の精液または精子を含む組成物が提供される。

【0293】

本発明の第9態様によれば、産まれる雌子孫の確率を高めるために哺乳動物を人工授精させる方法であって、該哺乳動物に以下：

40

【0294】

(i) 有効量の第1態様のモノクローナル抗体；

【0295】

(ii) 有効量の第2態様の組成物；または

【0296】

(iii) 有効量の第8態様の組成物

【0297】

を投与し、それにより前記哺乳動物を人工受精させる方法が提供される。

50

【0298】

本発明の第10態様によれば、第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物と雄性精子（「雄性精子細胞」）とのコンジュゲートが提供される。

【0299】

本発明の第11態様によれば、第1態様のモノクローナル抗体と雄性精子とのコンジュゲートまたは第2態様の組成物と雄性精子とのコンジュゲートを含む、処置済みの精子または処置済みの精液が提供される。

【0300】

本発明の第12態様によれば、雄性精子（「雄性精子細胞」）選択のための第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物の使用であって、前記雄性精子選択が場合により大量の精液中で実施される使用が提供される。

【0301】

本発明の第13態様によれば、哺乳動物の精液または精子を雌雄鑑別するための、第1態様のモノクローナル抗体または第2態様の組成物の使用が提供される。

【0302】

精子または精液は、モノクローナル抗体または組成物と複数の雄性精子細胞との間でコンジュゲートを形成させるのに十分な時間に渡り、モノクローナル抗体または組成物と接触させた後、得られた前記処置済みの精子または処置済みの精液を用いて1または複数の雌対象を人工授精させる。説明の目的上、5～600分の範囲が言及されるが、受精前の接触時間はより短時間、例えば1、2、3もしくは4分であるか、またはより長時間、例えば700、800、900もしくは1000分間であり得る。5～600分の範囲は、もちろん、6、7、8分並びに5～600の間の全1分増分を包含する。

【0303】

精液または精子は、新しく収得されたものであるかまたは以前に凍結され続いて解凍されたものであるかいずれでもよい。好ましくは、精液または精子は新しく収得されたものである。

【0304】

典型的には、排他的でないけれども、精液または精子はモノクローナル抗体または組成物と接触させる前に洗浄されていない。

【0305】

当該方法または使用は、モノクローナル抗体または組成物と処置すべき精液とを、前記精液とモノクローナル抗体または組成物との間で1または複数のコンジュゲートを形成させるのに十分な接触時間を確保するように、精液サンプル中で体外（インビトロ）的にまたは雌動物の生殖器官へ体内（インビボ）的にいずれかで、同時もしくは連続的に導入することにより実施することができる。

【0306】

上述した本発明の態様の幾つかの実施形態では、モノクローナル抗体および/または組成物が雄性精子の運動性および/または活性を低下させるまたは阻害する。これを達成するには任意の適当な方法が使用できる。適当な方法としては、磁気ビーズ分離、凝集、ろ過およびサイトメトリーが挙げられる。好ましくは、そのような方法は、残った雌性精子の運動性、生存力および/または活性を低下させたり阻害したりしない。

【0307】

本明細書中で雄性精子細胞の運動性および/または活性を記載するために用いられる用語「低下させる」および「阻害する」とは、対照サンプルまたは被験体からの別の生物学的サンプルに比較した場合に、そのような運動性および/または活性の量および/またはレベルの減少を指す。幾つかの実施形態では、雄性精子細胞の運動性および/または活性のレベルが約95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%または10%未満に減少する場合に、その雄性精子細胞の運動性および/または活性が低下し、または対照サンプルまたは被験体からの別の生物学的サンプルにおける雄性精子細胞の運動性および/または活性のレベルの約5%、4%、3%、2%、1%、0.5%

10

20

30

40

50

、0.1%、0.01%、0.001%または0.0001%未満にさえも低下する。

【0308】

精子の運動性および/または活性の測定は、当業界で既知の任意方法またはその組み合わせを含み得る。そのような方法の非限定例としては、光学顕微鏡法、位相差顕微鏡法、コンピューター支援精子分析法（例えばHobson精子トラッカー）、スィムアップ法および遊走/沈降チャンバー法が挙げられる。これに関して、精子の運動性の尺度は定量的または定性的尺度であり得る。

【0309】

上記の本発明の態様の幾つかの実施形態では、方法または使用は、処置済みの精液または精子から、抗体に結合した雄性精子を除去することを含む。抗体に結合した雄性精子を取り除くためには任意の適当な方法が使用できる。適当な例としては、磁気ビーズ分離、凝集、ろ過およびフローサイトメトリーが挙げられる。好ましくは、そのような方法は、残りの雌性精子の運動性、生存力および/または活性を低下させたり変更したりしない。

【0310】

幾つかの実施形態では、フローサイトメトリー、体外受精、定量的PCR（qPCR）アッセイ、蛍光抗体、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）および/またはプロテインG被覆磁気ビーズを使用して、処置済みの精液を抗体結合した雄性精子について確認することができ、または処置済みの精液が、抗体結合した雄性精子を含まないかまたはほとんど含まないかどうか、または処置済みの精液が雌性精子に富んでいるかどうかを調べることができる。

【0311】

雌性精子の選択または精液の雌雄鑑別は、大量に実施することができる。上記方法または使用の幾つかの実施形態では、種のタイプや産生される精液の量に対する制限はない。例えば、ブタ、イルカおよびウマは250mLから数リットルまでに及ぶ大量/多量の精液を産生するが、イヌ、ネコおよび他の反芻動物はミリリットル量を産生する。

【0312】

特定の実施形態では、モノクローナル抗体または組成物は、収集された精子もしくは精液におよび/または受精させる予定の雌動物の生殖器官に、場合により雄性精子細胞を標的とする1もしくは複数の抗体または薬剤と共に、直接添加することのできる処置溶液の中に含めることができる。

【0313】

加えて、第1態様のモノクローナル抗体は、例えば、コーティング収集装置、保管装置および他の人工授精装置により、体外で使用することができる。

【0314】

適切には、精液製剤は、哺乳動物の人工授精にとって生物学的許容濃度および/または生存度で複数の精液を含む。当業者により認識される通り、これは例えば、人工授精させようとする哺乳動物の年齢および/または種によってかなり変動しうる。この濃度は、複数の精子の形態学および/または運動性に従って、使用者により変更可能である。

【0315】

(i)の文脈において、「有効量」とは、複数の精子に対して所望の薬理的、生理学および/または治療的効果を惹起させ、前記哺乳動物の人工授精の際に産まれる雌子孫の確率を増加させるのに十分な位の、上記に記載のモノクローナル抗体および/または組成物の量または濃度を意味する。よって、実質的に純粋な抗体または組成物の有効量は、精子中の多数の雌精子細胞上にある関連表面タンパク質に結合しかつそれに対して阻害効果、例えば結合した雄精子の活性、機能および/または運動性に対して阻害効果を付与し、それにより処置済みの精子/処置済みの精液の人工授精から産生される雌子孫の確率の増加を促進するのに十分な量である。(ii)の文脈において、「有効量」とは、雌哺乳動物の人工授精によって子孫を生産するのに十分である精液製剤の量または濃度を意味する。

【0316】

有効量は、哺乳動物の年齢、品種、種、体重、生殖能力および一般的健康状態、精子の状態、並びにモノクローナル抗体、組成物および／または精液製剤を投与する方法といった因子に依存して異なり得る。

【0317】

適切には、モノクローナル抗体および／または組成物と複数の精子とは、同時にまたは連続して添加される。この点に関しては、モノクローナル抗体および／または組成物が最初に哺乳動物に投与され、続いて複数の精子が投与される。あるいは、複数の精子が哺乳動物に投与された後、モノクローナル抗体および／または組成物が投与されてもよい。

【0318】

適切には、モノクローナル抗体および／または組成物と複数の精子は、a) 安全である；b) 生殖能力を害さない；c) いかなる催奇形効果も引き起こさない；およびd) 雌の健康に有害でないような量で雌に投与される。

10

【0319】

使用される複数の精子は、新しく収穫されたものであるか、または以前に凍結されその後解凍されたものでもよいことは理解されるだろう。好ましくは、精子は新しく収得されたものである。

【0320】

人工授精は、精子／精液が雄の哺乳動物から採取され、続いて適切な時期に、器具の助けを借りて雌の哺乳動物の生殖器官中に導入される技術であることは十分理解されている。本発明の方法に関して、モノクローナル抗体および／または組成物と精子とは、当業界で既知の任意の人工授精方法によって哺乳類に投与することができる。典型的には、モノクローナル抗体および／または組成物と、精子／精液または処置済みの精子／処置済みの精液とは、その一部を機械的方法により、適当な時期（例えば雌哺乳動物が発情期にある時）に、衛生状況の下で、子宮頸部および／または子宮中に導入することにより、雌哺乳動物へ受精させる。

20

【0321】

上記方法または使用の幾つかの実施形態では、精子細胞選択または精液の雌雄鑑別は、大量に実施することができる。上記方法または使用の幾つかの実施形態では、生産される精液の量および種のタイプに制限はない。例えば、ブタ、イルカおよびウマは、250 mLから数リットルに及ぶ大量／多量の精液を生産するが、一方でイヌ、ネコおよび他の反芻動物はミリリットル量を生産する。本発明の幾つかの実施形態はその両方のシナリオに適用することができる。

30

【0322】

本発明の第14態様によれば、第1態様のモノクローナル抗体を含むハイブリドーマ細胞が提供される。

【0323】

本発明の第15態様によれば、次のものをコードする、1または複数の単離された核酸、精製された核酸または組換え核酸が提供される：

【0324】

(i) 第1態様のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメイン；

40

【0325】

(ii) 第1態様のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメイン；

【0326】

(iii) 第1態様のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインのCDR1（配列番号363）、CDR2（配列番号364）およびCDR3（配列番号365）；および／または

【0327】

(iv) 第1態様のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメインのCDR1（配列番号360）、CDR2（配列番号361）およびCDR3（配列番号362）。

【0328】

50

本発明の第 17 態様によれば、配列番号 347 のアミノ酸配列に対して惹起されたモノクローナル抗体が提供される。

【0329】

本明細書中に記載の特徴のいずれも、本発明の範囲内で、本明細書中に記載の別の特徴の 1 つまたは複数と任意の組み合わせで組み合わせることができる。

【0330】

明細書全体を通して、本発明の好ましい実施形態を、いずれか 1 つの実施態様または特別な特徴の集合体に限定することなく記載することを目指してきた。従って、本開示に照らして、特定の実施形態に様々な改良および変更を成し得ることは当業者により理解されるだろう。

【0331】

本発明をより容易に理解できかつ実用的効果を得るように、当業者は次の非限定例を参考にする。

〔図面の簡単な説明 3〕

【0332】

図 1 C。モノクローナル抗体 S d W 1 R E 5 . B 7 . F 9 b (「クローン R E 5」または「R E 5 抗体」とも称される)の、フレームワーク (F W R) および相補性決定領域 (C D R) を示す注釈付き V H および V L アミノ酸配列。

【0333】

図 2 C。抗体 m A b 7 3 5 (P D B 3 w b d) を鋳型として使用しそして R E 5 抗体を標的として使用して構築した相同性モデル。

【0334】

図 3 C。抗体 R E 5 の推定 3 D 構造。C D R ループは、構造の中で円で囲まれた部分である。

【0335】

図 4 C。N / C 末端に従って着色した D B Y 表面タンパク質 (雄性精子細胞上) の推定 3 D 構造。N 末端領域は青色で、そして C 末端領域は赤色で示される。22mer のペプチドが白色で示される。

【0336】

図 5 C。R E 5 抗体の C D R 領域の周辺の 3 つの代表的な基 (ベンゼン、酢酸イオンおよび M g u a) の M C S S M i n i m a の分布。

【0337】

図 6 C。官能基とその対応するアミノ酸 (括弧内) を示す M C S S m i n i m a の分布: B E N Z (P h e)、P H E N (T Y R)、I M I A (H i s)、A C E T (G L U / A S P)、および M G U A (A R G)。

【0338】

図 7 C。オレンジ色に着色した推定結合ペプチドと共に示す、R E 5 抗体と D B Y タンパク質の複合体構造。抗体は白色で表面に示される。R E 5 抗体を作出するのに使用したペプチドは青色で示される。

【0339】

図 8 C。モノクローナル抗体 R E 5 についての 3 つの推定ペプチドバインダー / エピトープ / ドッキング部位が下線で示される。

【0340】

図 9 C。モノクローナル抗体の産生、選択および特徴付けのための方法を示す流れ図。このプロセスは、次の工程を含む: 1. 抗体の産生; 2. 凝集、蛍光二次抗体、F I S H または磁気ビーズ技術による精子に対する抗体の効果の評価; 3. ハイスループット体外受精 (H T I V F) または選択的溶解と q P C R を使った、精子に対する抗体の効果の検定; および 4. シーケンシング、3 D 構造の構築およびエピトープの決定による、抗体の特徴づけ。

【0341】

10

20

30

40

50

表 2 C . 配列番号の一覧表。

【表 1 1 - 1】

配列 番号	簡単な説明	配列
1-346	抗原DBY/DEAD、 MEA 1、MEA 2 およびSRYに結合 するそして／また	表 1 C 参照

【表 1 1 - 2】

	はそれから誘導される抗体	
347	抗原SdW1a (遊離ペプチド)	EMESHSVTQAGVQWPDLGSLV
348	モノクローナル抗体クローン RE5の重鎖可変領域(VH) (ヌクレオチド配列)	GAAGTGAAGGTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTG GTGCAACCTGGGGGATCCATGAAAATCTCCTGTG TTGCCTCTGGATTCACTTTCAAGAACTACTGGAT GAACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTT GAGTGGGTGCTGAAATTAGATCGAAATCTAATA ATAATGAAAAACATTATGCGGAGTCTGTGAAAG GGAGGTTCAACCATCTCAAGAGATGATTTTAAAAG TAGTGTGTACCTGCAAATGAACAACCTTAAGAACT GAAGACACTGGCATTATTTACTGTACGGGGGGGA CCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCA
350	モノクローナル抗体クローン RE5の重鎖可変領域(VH) (アミノ酸配列)	EVKVEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFKNYWM NWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSNNNEKHVAESVKG RFTISRDDFKSSVYLQMNNLRTEDTGIYYCTGGTFD YWGQGTTTLTVSS
351	モノクローナル抗体クローン RE5の軽鎖(κ) 可変領域(VH) (アミノ酸配列)	DVVVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSHSLVHSDGNT YLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQT THVPPYTFGGGTQLEIK
352	DBY (ホモサピエンス). NIHからの遺伝子ID G49469 のアミノ酸配列	DBYIDKVVVPAVLALVLVAEAAA AVVEVVTATAEDL VEVMLIFLLGRAFCFSFFFFFEMESHSVTQAGVQWP DLGSLEV TLLPQPPKVGLQVGGNMPSSFFSIFNRDG VSPCWPGWSLPPDLMIHTPWPEVLGLQAATVPGL GSLFFLRVLFKFAFIGEIFLRDTKSNSRFLLLVLCSTE

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

		KKGINELNFSLNIFLDRWLWRLQWIWRKLLPGGL VGQLN
353	モノクローナル抗体RE5により認識される、DBYの実際のペプチドバインダー／エピトープ／ドッキング部位	SFFFFEMESH
354	モノクローナル抗体に対する、DBY上の推定上の最適ペプチドバインダー／エピトープ／ドッキング部位	FSIFNRDGV
355	モノクローナル抗体に対する、DBY上の推定上の最適ペプチドバインダー／エピトープ／ドッキング部位	SLNIFLDRW
356	染色体 1 に特異的な正方向プライマー	GTTGCACTTTCACGGACGCAGC
357	染色体 1 に特異的な逆方向プライマー	CTAGCCCATTGCTCGCCATAGC
358	染色体 Y に特異的な正方向プライマー	AATCCACCATAACCTCATGGACC
359	染色体 Y に特異的な逆方向プライマー	TTTCTCCTGTATCCTCCTGC
360	モノクローナル抗体クローンRE5の軽鎖可変領域(VH) CDR1 (アミノ酸配列)	HSLVHSDGNTY

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

361	モノクローナル抗体クローンRE5の軽鎖可変領域(VH) CDR2 (アミノ酸配列)	KVS
362	モノクローナル抗体クローンRE5の軽鎖可変領域(VH) CDR3 (アミノ酸配列)	SQTTHVPPYT
363	モノクローナル抗体クローンRE5の重鎖(κ)可変領域(VH) CDR1 (アミノ酸配列)	GFTEKKNYW
364	モノクローナル抗体クローンRE5の重鎖(κ)可変領域(VH) CDR2 (アミノ酸配列)	IRSKSNNNEK
365	モノクローナル抗体クローンRE5の重鎖(κ)可変領域(VH) CDR3 (アミノ酸配列)	TGGTFDY
336-373	PCRプライマー&プローブ	表3B参照

10

20

30

〔実施形態の説明3〕

【0342】

本発明の好ましい特徴、実施形態および変形は、この実施形態の記載から理解されるだろう。それは本発明を実施するのに十分な情報を当業者に提供する。この実施形態の記載は先行する本発明の詳細な説明の範囲をいかなる形でも限定するものと見なしてはならない。

【0343】

抗原の調製

【0344】

幾つかのペプチドを定法により合成し、キーホールリンペット・ヘモシアニン(KHL-ペプチド)に結合させた。KLHは、キーホールリンペット(Megathura crenulata; アオガイ)の血リンパ中に見つかる金属タンパク質である。このタンパク質は大型で、複数のサブユニットにより酸素を担持し、そのためペプチドの理想的なキャリアになる。

40

【0345】

モノクローナル抗体の作製

【0346】

免疫処置および血清力価：2体のロバートソンマウスを、皮下経路により50 μgの抗原(配列番号347)とメチル化CpGと共に免疫アジュバント(Sigma-Aldrich社、カタログNo. S6322)の組み合わせを用いて2週間間隔で3回免疫処置

50

した。血清サンプルを免疫処置マウスから収集し、1 : 2 5 0 と 1 : 1 2 5 0 の希釈度で E L I S A により抗原に対する反応性を調べ、それを免疫処置前サンプルと比較した。両動物とも陽性の抗体価を示し、融合用を選択した。

【0347】

ハイブリドーマ融合：ハイブリドーマ細胞を作製するために、マウス脾臓を切除し、単細胞懸濁液中に解離させ、ポリエチレングリコールを使って S P 2 / 0 - A g 1 4 ミエローマ細胞に融合させた。生じたハイブリドーマ細胞を 2 0 × 9 6 ウェルの組織培養プレート中のアザセリン・ヒポキサンチン含有培地中で増殖させた。

【0348】

スクリーニング：ハイブリドーマ細胞を 1 0 日間増殖させ、その時点で陽性のハイブリドーマコロニーの数を計測し、さらに 3 日間のインキュベーション後、抗体上清のアリコートを手スクリーニング用に採取した。その上清を、抗原 S d W 1 a (遊離ペプチド 配列番号 3 4 7) および S d W 1 b (K L H - ペプチド) に対する反応性についてアッセイし、最初に I g G 特異的二次抗体を使った抗原マイクロアレイ法により、次に上清の E L I S A によりアッセイし、陽性の抗体産生クローンを確認した。

10

【0349】

繁殖と凍結：次に最大反応性の E L I S A 陽性クローンを 2 4 ウェルの組織培養プレート中で 3 ~ 4 日間増殖させ、その時点でそれらを 6 ウェルの組織培養プレートに拡大した。細胞は 1 : 5 (上清ウェル) および 1 : 2 5 (細胞ウェル) の比で播種した。細胞が 8 0 % 密集度に達したら、細胞を収集し、1 0 % D M S O 中で凍結保存し、液体窒素中で保存した。各クローンからの上清も収得し、- 2 0 で凍結した。

20

【0350】

サブクロニング：E L I S A 陽性クローンの 1 つである、S d W 1 R E 5 , B 7 , F 9 b (「クローン R E 5」) をサブクロニング用を選択し、それを 2 ラウンドの工程希釈に供した。各希釈工程の後、細胞を 4 ~ 5 日間増殖させ、抗原に対して陽性の抗体を産生する単一のコロニーを上清 E L I S A により決定し、そして上位 2 クローンを更なるラウンドにより増殖させた。最終のモノクローナル細胞系を 6 ウェルの細胞培養プレート中に 4 ~ 5 日間増殖させ、上清を抽出し、細胞と一緒に凍結させた。

【0351】

アイソタイプ決定：サブクロニングした細胞系の上清を、市販のアッセイキットにより試験し、産生されているモノクローナル抗体のアイソタイプを決定した。5 種の抗体アイソタイプのうち、最も一般的な 2 種は I g G と I g M である。I g G m A b の中には、5 つの考えられ得るサブクラス (I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c および I g G 3) が存在する。更に、各 m A b は カッパ () または ラムダ () 軽鎖のいずれかを有する。クローン R E 5 と命名された特定の目的のモノクローナル抗体は、アイソタイプマウス I g G 2 a , (I g G 2 a K) を有した。

30

【0352】

モノクローナル抗体クローン R E 5 '、アイソタイプ：マウス I g G 2 a , の配列決定

【0353】

モノクローナル抗体クローン R E 5 ' の重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) を配列決定した。簡単に言えば、抗体シーケンシング (配列決定) は次の工程を含んだ：細胞系の細胞を増殖させる工程；それらの細胞から全 R N A を精製する工程；メッセンジャー R N A を全 R N A から更に精製する工程；V H および V L 遺伝子特異的反応を使って c D N A 合成を実施する工程；c D N A の d G T P テール付加 (t a i l i n g) を実施する工程；V H および V L c D N A 生産物を P C R 増幅させる工程；P C R 生産物をゲル精製しそして p C R ^{T M} 2 . 1 中にクローニングする工程；コロニースクリーニングを P C R を使って行う工程；目的の P C R 生産物またはプラスミドを D N A シーケンシングに供する工程；および。D N A シーケンシング結果を分析する工程。

40

【0354】

モノクローナル抗体クローン R E 5 の重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 3 4 8 のヌク

50

レオチド配列を有する。

【 0 3 5 5 】

モノクローナル抗体クローン R E 5 の軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 3 4 9 のヌクレオチド配列を有する。

【 0 3 5 6 】

モノクローナル抗体クローン R E 5 の重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 3 5 0 のポリペプチド配列を有する。

【 0 3 5 7 】

モノクローナル抗体クローン R E 5 の軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 3 5 1 のポリペプチド配列を有する。

【 0 3 5 8 】

モノクローナル抗体クローン R E 5 の重鎖可変領域 (V H) の C D R は、それぞれ配列番号 3 6 3、3 6 4 および 3 6 5 のポリペプチド配列を有する。

【 0 3 5 9 】

モノクローナル抗体クローン R E 5 の軽鎖可変領域 (V L) の C D R は、それぞれ配列番号 3 6 0、3 6 1 および 3 6 2 のポリペプチド配列を有する。

【 0 3 6 0 】

重鎖および軽鎖抗体可変領域遺伝子配列の分析は、I M G T / V - Q u e s t プログラム (The International Immunogenetics Information System; http://www.imgt.org/IMG_T_vquest) を使って実施した。(未整列の) 生殖細胞系列マウス抗体遺伝子に対するクローン R E 5 の V H および V L 配列の類似性は下記の表 3 C に示される。

【 0 3 6 1 】

表 3 C . 未整列の生殖細胞系列マウス抗体配列に対するクローン R E 5 V H および V L の類似性 (I M G T / V - Q u e s t プログラムを使用) 。 N / A = 不適用。

【表 1 2】

	V 遺伝子および 対立遺伝子 (nt 一致)	J 遺伝子および 対立遺伝子 (nt 一致)	D 領域および 対立遺伝子
VL (κ)	<u>Musmus</u> IGKV1- 110*01 F (97.96%)	<u>Musmus</u> IGKJ2*01 F (94.74%)	N/A
VH	<u>Musmus</u> IGHV6- 6*02 F (95.58%)	<u>Musmus</u> IGHJ2*01 F (91.67%)	<u>Musmus</u> IGHD3- 3*01 F

【 0 3 6 2 】

フレームワーク領域 (F W R) および相補性決定領域 (C D R) を示す抗体 R E 5 の注釈付き V H および V L アミノ酸配列が、図 1 C に示される。

【 0 3 6 3 】

抗体 R E 5 の 3 D 構造

【 0 3 6 4 】

抗体 R E (標的) の配列に基づいて、図 2 C に示される通り、鋳型として抗体 m A b 7 3 5 (P D B 3 w b d) を使って相同性モデルを構築した。

【 0 3 6 5 】

抗体 R E 5 の 3 D 構造

【0366】

抗体 R E 5 の 3 D 構造は、図 3 C に示される通り好結果に構築された。注記：標的の配列は鋳型とはわずかに異なり、そして R E 5 抗体の正確な 3 D 構造は、様々なアミノ酸の側鎖を手動で作製することにより構築された。

【0367】

抗体への D B Y のエピトープの結合の推定

【0368】

R E 5 V H および V L 領域の配列を特徴づけた後、タンパク質 D B Y への抗体の結合領域を決定した。抗体と結合する抗原のエピトープは、(Zhang, W, Zeng, X, Zhang, L, Peng, H, Jiao, Y, Zeng, J, Treutlein, HR, (2013) "Computational identification of epitopes in the glycoproteins of novel bunyavirus (SFTS virus) recognized by a human monoclonal antibody (Mab 4-5)", J. Comput. Aided Mol. Des. 27:539-550) 中に発表された方法を使って決定した。

10

【0369】

簡単に言えば、次の工程を用いて D B Y の潜在的結合領域 / エピトープを同定した。

【0370】

1) R E 5 モノクローナル抗体配列を解いた。その配列を使って、抗体の相同性モデルを作製した。

【0371】

2) D B Y タンパク質の 3 D 構造をモデル化した。

20

【0372】

3) 抗体上の官能基の M C S S マッピングを実行した。

【0373】

4) M C S S m i n i m a からの結合ペプチド配列パターンを同定し、タンパク質 D B Y の配列全体のパターンを検索し、該タンパク質の抗体への結合領域を同定した。

【0374】

5) D B Y タンパク質への抗体の結合を実施した。

【0375】

6) 水中での抗体 - D B Y 複合体の分子動力学シミュレーションを推定した。

30

【0376】

D B Y タンパク質 - タンパク質の 3 D 構造

【0377】

タンパク質 D B Y (D B Y 2 Human male Homo sapiens SFTS genomic, sequence tagged site; 689 bp ゲノム DNA。性別：雄。Clone__lib: Humane male; 受入番号：G49469.1; GI: 5114028)。NIHからのヌクレオチド配列 (Gene ID G49469) を使って、配列番号 352 に見られる通り、それをまずタンパク質配列へと翻訳した。

【0378】

D B Y は本質的に高度に保存されている。そのアミノ酸配列は、ヒト、ウシおよびブタ種を含む異なる哺乳動物種間で高度に保存されている。結果として、モノクローナル抗体 R E 5 は、全てではないが大部分の哺乳動物種の D B Y に結合すると予測される。

40

【0379】

D B Y のタンパク質配列に基づいて、I n F o l d アルゴリズムを使って、タンパク質構造のモデル化を実施した [McGuffin, L.J., Shuid, A.M., Kempster, R., Maghrabi, A.H.A., Nealon J.O., Salehe, B.R., Atkins, J.D. & Roche, D.B. (2017) "Accurate Template Based Modelling in CASP12 using the IntFOLD4-TS, ModFOLD6 and ReFOLD methods." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 86 Suppl 1, 335-344, doi: 10.1002/prot.25360; McGuffin, L.J., Atkins, J., Salehe, B.R., Shuid, A.N. & Roche, D.B. (2015) "IntFOLD: an integrated server for modelling protein structure

50

s and functions from amino acid sequences." Nucleic Acids Research, 43, W169-73; Buenavista, M. T., Roche, D. B. & McGuffin, L. J. (2012) "Improvement of 3D protein models using multiple templates guided by single-template model quality assessment." Bioinformatics, 28, 1851-1857; Zhang, W, Zeng, X, Zhang, L, Peng, H, Jiao, Y, Zeng, J, Treutlein, HR, (2013) "Computational identification of epitopes in the glycoproteins of novel bunyavirus (SFTS virus) recognized by a human monoclonal antibody (Mab 4-5)", J. Comput. Aided Mol. Des. 27:539-550).

【0380】

図4Cは、DBYタンパク質の結果として得られた3D構造を示す。

【0381】

RE5抗体の表面上のMCSS minima

【0382】

図5Cは、RE5抗体のCDR領域の周辺の3つの代表的基(ベンゼン、酢酸イオンおよびMgua)のMCSS minimaの分布を示す。MCSS minimaの分布全体が更に図6Cに示される。アミノ酸Pheの側鎖に相当するBENZ minimaは、B1にのみ存在する。同様な特徴は基MGUA(Arg)およびPHEN(Tyr)についても認められた。アミノ酸ASPまたはGLUの側鎖に相当する、負に帯電した基ACETについて、2つのクラスターがB1およびB2のそれぞれにおいて同定された。官能基IMIA(His)についても同様な特徴が認められた。部位B1とB2の間に深い空洞があり、MCSS minimaの大部分が認められることに注目すべきである。この空洞は、おそらく抗体の相同性モデル化によるアーチファクトであると考えられ、よってこの空洞の内側のminimaは無視した。

【0383】

RE5抗体へのDBYのペプチドの結合

【0384】

MCSS minimaに基づいて、X-Zの配列パターンを用いてDBYタンパク質の配列を検索した。ここでX=R、Y=F、H、D/EおよびZ=Y、D/Eとした。図7Cは、抗体とDBYとのドッキングしたコンホメーションにおいて、DBY中ペプチドバインダー(オレンジ色)およびそれらの位置を示す。

【0385】

モノクローナル抗体RE5についての3つの推定ペプチドバインダー/エピトープ/ドッキング部位が図8C中の下線部分および配列番号353~355に示される。実際の結合部位/エピトープはSFFFEEMESH(配列番号353)である。他の2つのエピトープ(配列番号354および355)は、更なる抗体産生のための最有力候補である。

【0386】

抗体の検証

【0387】

モノクローナル抗体クローンを産生した後、凝集またはその欠損を調べるための位相差顕微鏡法、蛍光二次抗体染色、FISHおよび磁気ビーズ分離を使うことにより精子に対する抗体の効果を調べた。

【0388】

精液に対するIgGの滴定

【0389】

精製済みIgGまたは培養上清を、Androstar Boar Semen Extender(BSE)を使って25mg/mLの標準値に希釈した。抗体を更に10倍希釈し、ELISAプレート中のウェルに各希釈液につき100μL容量を加えた。BSE中の新鮮な(5日齢以内)の雄ブタ精液の標準量(200μL)を10⁷細胞/mLの密度(1回量あたり10⁹細胞に等しい)の密度で抗体希釈液に添加し、37℃で維持した。各サンプルを、30分から4時間の期間に渡り、倍率100×で視覚的に確認し、次いでクランピングの比率を決定した。精子の凝集0(凝集なし)、1+(<50%)、2

10

20

30

40

50

+ (5 0 %) および 3 + (1 0 0 %) の主観的スコアを開発した。

【 0 3 9 0 】

蛍光抗体試験

【 0 3 9 1 】

抗体が精子に結合したことを証明するために、蛍光 (A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8) ヤギ抗マウス二次抗体 (J a c k s o n I m m u n o l o g i c a l s 製) を使って一次抗体を追跡した。一次抗体での処置後、精液を P B S で 3 回洗浄した。二次抗体を 1 / 2 0 希釈率で添加し、37 で 6 0 分間インキュベートし、続いて P B S で 3 回洗浄した。T u c s o n カメラとソフトウェア (S c o p e S c i e n t i f i c , B r i s b a n e) を使って、日光と蛍光の両条件の下で精子を計数した。蛍光精子数対精子の総数の比を用いて、各処置についての Y - C C S P (雄精子) および X - C C S P (雌精子) の % を算出した。可能であれば、各サンプルについて合計 7 5 0 個の精子を計数した。

【 0 3 9 2 】

蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H)

【 0 3 9 3 】

F I S H を用いて蛍光抗体結果を確認し、蛍光精子が Y 染色体を有していることを証明した (雄精子細胞) 。この方法は P a r i l l a 他、2 0 0 3 により記載された方法の変形であった。手短に言うと、ブタ筋肉、血液および精子から D N A を抽出した。P C R を用いて、それぞれ 2 4 4 b p と 3 7 7 b p の染色体 I と染色体 Y に相当する 2 つの生成物を増幅させた。プライマー配列は表 4 C および配列表中に見つかる。

【 0 3 9 4 】

表 4 C . 染色体 1 および染色体 Y のプライミングオリゴヌクレオチド配列

【 表 1 3 】

標的	方向	配列
染色体 1	正 (Forward)	5'-GTTGCACTTTCACGGACGCAGC-3' (配列番号 356)
染色体 1	逆 (Reverse)	5'-CTAGCCCATTGCTCGCCATAGC-3' (配列番号 357)
染色体 Y	正 (Forward)	5'-AATCCACCATACCTCATGGACC-3' (配列番号 358)
染色体 Y	逆 (Reverse)	5'-TTTCTCCTGTATCCTCCTGC-3' (配列番号 359)

【 0 3 9 5 】

P C R 反応用のマスターミックスは、0 . 4 μ L の 4 種の d N T P の混合物 (d A T P 、 d G T P 、 d C T P 、 d T T P 各々 2 ミリモル / L) 、それぞれ染色体 1 および Y のための 2 . 5 μ L (1 原液あたり 1 0 ピコモル μ l から) のプライマー、5 0 - 5 0 0 n g のブタ D N A 、5 μ L の 1 0 × P C R 緩衝液 (1 0 0 ミリモルの T r i s - H C L 1 / 1 、p H 8 . 3 、5 0 0 ミリモルの K C L 1 - 1 、1 5 ミリモルの M g C l 2 1

- 1、0.01% (w/v) ゼラチン) および 0.5 μ L の 5 U Taq DNA ポリメラーゼ μ L / 1 から成った。反応液の総容量を DNアーゼ不含有の水で 50 μ L に調整した。95 で 5 分間の初期変性の後、3 工程の増幅、続いて変性 (95 で 15 秒)、アニーリング (60 で 1 分) および伸長 (72 で 15 秒) の 35 サイクルを実施した。最後に、伸長工程 (72 で 7 分) でそのサイクルを終えた。

【0396】

PCR 生成物をプールし、PicoPure (登録商標) PCR カラム (Qiagen 製) を使って清澄化し、DNA 濃度を決定し、ニクトランスレーションに使用した。Abbot ニクトランスレーションキットを使用して、PCR 生成物中に修飾デオキシウリジン三リン酸 (dUTP) を取り込んだ。SpectrumGreenTM dUTP を用いて染色体 1 プローブを標識し、そして SpectrumRedTM dUTP を染色体 Y プローブ中に取り込んだ。これは、染色体 1 に緑色蛍光シグナルを付与し、そして染色体 Y に赤色蛍光シグナルを付与した。各成分をニクトランスレーションについて列挙した順序でチューブに加え、その後、そのチューブを手短に遠心分離し、渦動撹拌した後、酵素 (最終成分): すなわち (17.5 - x) μ L のヌクレアーゼフリーの水; x μ L の 1 μ g 抽出 DNA; 2.5 μ L の 0.2 mM SpectrumGreen、SpectrumOrange または SpectrumRed dUTP; 5 μ L の 0.1 mM dTTP; 10 μ L の dNTP ミックス; 5 μ L の 10x ニクトランスレーション緩衝液; 10 μ L のニクトランスレーション酵素を加え、全量 50 μ L にした。

10

20

【0397】

サンプルを 15 で一晩インキュベートした。10 分間の 80 工程が反応を停止させた。生成物をもう一度 PicoPure PCR カラム (Qiagen 製) を使って清澄化し、ここで最終溶出緩衝液は 5 μ L の Tris-EDTA (0.2 ミリモル l / l) および 5 μ L の FISH ハイブリダイゼーション緩衝液から成った。

【0398】

FISH 用の精液サンプルを KCl (75 mM) で 2 回洗浄し、次いで Tris-EDTA (1 M) で 1 回洗浄した。3 μ L の精液懸濁液を、透明なスライドガラス上にカーバイドペンシルで描いた直径 7 mm の円の中に塗布した。そのスライドを風乾し、氷冷メタノール: 氷酢酸 (3:1) 中で固定した。ハイブリダイゼーション前に、スライドを 2x 生理食塩水 - クエン酸ナトリウム (SSC) 緩衝液中に浸漬することにより、余分な固定液を除去し、次いでそれを一連のエタノール浴 (70%、80% および 100%) に通すことにより脱水し、そして風乾した。スライドを 1 M NaOH 溶液に 3 分間浸水し、2x SSC で洗浄し、脱水し、風乾した。各々の円の上に 2 μ L のハイブリダイゼーション緩衝液 (Vysis、Abbot) を滴下することにより変性を行い、カバーガラスで覆い、75 で 5 分間インキュベートした。

30

【0399】

プローブ混合物は、等量での緑 (染色体 1)、赤 (染色体 Y) およびハイブリダイゼーション緩衝液から成った。これを 75 で 5 分間変性させた。スライドガラスを 2x 食塩水 - クエン酸ナトリウム (SSC) 緩衝液中での浸漬により再洗浄し、それを一連のエタノール浴 (70%、80% および 100%) 中に通すことにより脱水し、風乾した。変性したプローブ混合物を加え (サンプルあたり 1.2 μ L)、カバーガラスで覆い、縁をゴムセメントで密封して乾燥を防いだ。そのスライドを再び 75 で 5 分間加熱し、その後それを暗い湿潤容器の中で 37 にて一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、スライドを 0.4x SSC + 0.1% NP-40 溶液中で 75 で 2 分間洗浄し、次いで 2x SSC + (0.3% NP-40) 中で室温にて洗浄した。連続エタノール浴を通した脱水と風乾により、この工程を終了した。スライドを 5 μ L の 4', 6'-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) 褪色防止溶液 (Vysis) で対比染色し、3 枚のフィルターを装備した蛍光顕微鏡下で検査した。(キューブ形で搭載する、DAPI、FITC およびテキサスレッド用に最適化した Brightline 多重バンドフィルタ

40

50

ー式セット)。全ての細胞は染色体1の存在を示す緑色シグネチャーを含んだ。これをポジティブコントロール(陽性対照)として使用した。追加の赤色(染色体Yに対する)シグナルを含む細胞は、Y-CCSP(雄性精子細胞)と見なした。緑色シグナルのみを含む細胞はX-CCSP(雌性精子細胞)と見なした。

【0400】

精液サンプルを抗体と混合し、雄精子を沈降させた。凝集した精子を底部に沈降させた時、上部の自由に遊泳している精子を回収し、それを処理して個々の精子の性別を決定した。各サンプルにつき、平均750細胞が計測された。

【0401】

抗体の特異性を評価するための磁気ビーズの使用

10

【0402】

プロテインG磁気ビーズは、小スケールでの抗体の単離と精製のための親和性母材である。当該抗体は、抗ウマまたはマウス蛍光抗体により検出すると精子の50%に結合したことが分かった。本試験の目的は、磁気ビーズの助けをかりて抗体が結合した精子を単離すること、および異なるモノクローナル抗体クローンの雄型特異性を決定することであった。磁気ビーズ上に保持された抗体処置精子に対してFISHを実施し、雌精子よりも雄精子の方がより磁気ビーズにより取り除かれる(捕捉される)かどうかを調べた。

【0403】

手順は次の工程を含んだ:

【0404】

20

1. 2体の雄ブタより新鮮な精液を回収する。

【0405】

2. 精子の数を計数し、添加すべき抗体の量を決定する。

【0406】

3. 2 mLの精液に抗体を添加し、37℃で1時間インキュベートする。

【0407】

4. 精液をPBSで3回洗浄し、未結合の抗体を除去する。

【0408】

5. 50 µLのビーズ懸濁液を500 µLの結合緩衝液と混合する。渦動攪拌し、磁気ビーズを添加し、上清を除去し、この手順を再び繰り返す。

30

【0409】

6. 50 µLの洗浄済精液に160 µLの結合緩衝液を添加する。

【0410】

7. 4℃で30分間混合し保持する。

【0411】

8. 磁石をあて、上清を取り除く。

【0412】

9. 500 µLの結合緩衝液を加え、十分混合し、上清を取り除く; この手順を2回繰り返す。

【0413】

40

10. サンプルの半量をFISH分析用のものとして保存する。

【0414】

11. サンプルの残り半量について、抗体/精液結合を次の方法で破壊することにより精液を素体にする: 11番のビーズペレットに、100 µLの溶出緩衝液を加え、渦動攪拌し、4℃で5分間インキュベートする。磁石を用いて、精子を新しいチューブへと移し、この手順を繰り返し、溶出させた精液をプールする。40 µLの1M トリス-HCl (pH 9)を加えた後、翌朝回収した精液にFISHを続行する。

【0415】

クローンRE5についての精液処理後の性比の歪度に対する抗体の効果を評価するためのHT IVFの使用

50

【0416】

合計828個の卵母細胞を受精させた(対照群の数=376および処理群の数=452)。胚を溶解させ、各々の性別を決定した。

【0417】

精液に添加すべき抗体の量の計算

【0418】

精液1用量あたりの精子と抗体の正確な比を決定するためのやり方を開発した。ドナー動物の1回射精量は運動性、生存力および容量あたりの精子の総数に関して異なるので、Y精子の凝集を最適化するために1用量あたりの精液量を標準化する方法を開発する必要があった。

10

【0419】

抗体対精液の最適比は、次の式を使って確立した：用量あたりの精子の総数を、1または0.1または0.09、または0.08または0.075または0.06または0.05または0.045または0.03または0.025または0.015または0.01の因数で割り、用量あたりの抗体のmgを求めた。次いでこれを量/mL/用量に直した。必要量を22または23または25または27または30または32または33または35または37または38.5または39にて精子に添加した。この温度で精液を5~240分間維持した後、ゆっくり室温に放冷し、ろ過し、包装し、農場(受精のため)に15~17で輸送した。

20

【0420】

上述のことを念頭に入ると、本発明を実際に実施できる方法の一例は次の通りであると理解されるだろう。

【0421】

雄ブタでの試験

【0422】

精子の50%を凝集させる抗体対精子の比を用いて、雄ブタを受精させた。異なる数の精子量/1容量(1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 および 4×10^9)を試行した。雄ブタ精液を採取し、即座に予熱した(22または23または25または27または30または32または33または35または37または38.5または39)Androstar雄ブタ精液増量剤と混合した。精液を更にAndrostar Boar Semen Extender中に予め希釈しておいた抗体と混合し、全て22または23または25または27または30または32または33または35または37または38.5または39で維持した。抗体と精液を22または23または25または27または30または32または33または35または37または38.5または39で5~240分間反応させておいた。精液を80mL量に分割し、室温に放置して22または23または25または27または30または32または33または35または37または38.5または39からゆっくり放冷した。サンプルを15で農場に輸送し、そこで雄ブタ1匹当たり2回分量を投与した。精液サンプルは収集後5日以内に使用した。

30

【0423】

磁気ビーズ

【0424】

異なるクローン(モノクローナル抗体の)は磁気ビーズに対する親和性が異なる。ビーズ上に保持されたサンプルの74.5%~30.5%が、試験したクローンに依存して雄であった。精子の性別はFISHを使って決定した。13クローンについての結果を表5Cに示す。

40

【0425】

表5C、2種の異なる雄ブタ精液サンプルを各クローンからの抗体で処理した後に磁気ビーズにより捕捉された雄性精子の割合。

【表 1 4】

サンプルNo	保持サンプル中の雄の% (磁気ビーズ)						
	感度						
Mab	雄ブタ 1	雄ブタ 2	平均 2				
RF6	72	77	74.5				
RF3	72	68	70				
RC6	72	66	69				
RF4	67	68	67.5				
RE6	67	68	67.5				
RE5	65	66	65.5				
RB2	67	61	64				
RC5	67	60	63.5				
RG3	60	65	62.5				
RA6	58	63	60.5				
RA1	59	59	59				
RF2	54	57	55.5				
RE3	23	38	30.5				

【0 4 2 6】

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

【0 4 2 7】

各精子の性別の決定は、FISHによって行った。雄は赤色 (Y染色体) および緑色 (染色体 1) マーカーを有した。雌は緑色マーカーのみを有し、Y染色体を欠いていた。凝集している蛍光精子は、ほとんどが雄精子を示した (緑色 + 赤色シグナル)。精液を様々な抗体で処理した後の上清中の雌精子の割合を、表 6 C に示す。

【0 4 2 8】

表 6 C . 精液を異なるクローンに由来する抗体で処理した後の上清中の雌精子の割合。各精子の性別の決定は FISH により行った。

【表 1 5】

抗体クローン	%雌
RB2	66
RF4	63
RE5	63
RE6	58
RC5	56
RA6	54
RF6	53.3
RE3	52
RG3	52
RF2	52
RF3	46
RA1	45
RC6	39

【0 4 2 9】

ハイスルーブット体外受精

【 0 4 3 0 】

25の卵母細胞群についての処置群の雌精子の割合：対照群の雌精子の割合を表7Cに与える（総数＝828、対照群の数＝376、処置群の数＝452）。処置あたりの雌の平均％は71％であり、対照の雌の平均％は45％であった。対照からの平均シフトは25％であった。処置群の95％CIは0.64～0.78であり、対照群のそれは0.17～0.32であった。

【 0 4 3 1 】

表7C、25種の卵母細胞群についての処置群のIVFで産生した雌胚の割合：対照群での雌胚の割合。受精前に抗体を添加した精子を用いて、処置群の卵母細胞を受精させた。対照群は受精前にPBSを添加した。変化率（％）は、対照群と処置群の間の雌への％増加を示す。

【表16】

処置群の番号	処置群の雌の％	対照群の雌の％	対照からの変化％
1	25	13	12
2	40	13	27
3	50	17	33
4	52	14	38
5	67	67	0
6	73	67	6
7	77	44	33
8	50	17	33
9	78	58	20
10	80	80	0
11	82	40	42
12	86	25	61
13	90	75	15
14	100	94	6
15	100	94	6
16	72	54	18
17	22	0	22
18	54	7	47
19	78	25	53
21	77	20	57
22	59	45	14
23	72	54	18
24	91	91	0
25	87	43	44

標題 4

雌雄選択を含む材料と方法

10

20

30

40

50

〔 発明の分野 4 〕

【 0 4 3 2 】

本発明は、他の事物の中でも特に、前のセクション（ 標題 1 ～ 3 のセクションの発明 ）に記載された材料と方法を（ 互いに組み合わせることを含む ）、精子の雌雄鑑別、雌雄選択、H T - I V F のために、生まれた子孫を遺伝子学的に特徴づけるためにおよび / または所望の子孫を取得する尤度を増加させるために利用することに関する。

〔 発明の背景 4 〕

【 0 4 3 3 】

従来の精子の雌雄鑑別への免疫学的アプローチの批判の 1 つは、「一貫性の欠如」である。事実、精子の雌雄鑑別、雌雄選択（産み分け）、H I T - I V F、生まれた子孫の遺伝子学的特徴付けおよび / または所望の子孫を取得する尤度の増加のための既知技術には、多数の課題が存在している。

10

〔 発明の詳細な説明 4 〕

【 0 4 3 4 】

今から上述した課題の少なくとも 1 つを最小にするための新たに開発した材料と方法を説明することにする。

【 0 4 3 5 】

本発明の一態様によれば、次の工程を含む方法が提供される：

【 0 4 3 6 】

1 . 随意に精子を処置工程へと供する工程；

20

【 0 4 3 7 】

2 . 工程 1 の精子を、目的の雌性または雄性精子のいずれかを選択するように性別選択工程に供する工程；

【 0 4 3 8 】

3 . 工程 2 の着目の精子を使って受精工程を実施し、少なくとも 1 つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を産生する工程；

【 0 4 3 9 】

4 . 工程 3 の少なくとも 1 つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を、少なくとも 1 つの溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質を選択的に放出するように、精子の存在下で選択的に溶解させる工程；および

30

【 0 4 4 0 】

5 . 少なくとも 1 つの下流用途において前記放出された細胞性物質を使用する工程。

【 0 4 4 1 】

精子は任意の適当な精製された形、半精製された形または未精製の形であり得る。例えば、精子は精液の中にあってもよく、または精液から部分的にもしくは完全に分離されてもよい。精子または精液は、例えば精液増量剤と混合することができる。精子は本特許明細書の別のセクションに記載された通りであり得る。

【 0 4 4 2 】

工程 1 は、例えば、処置工程に供しても供さなくてもよい。工程 1 は、精子が必ずしも処置される必要はないという点で任意選択的である。幾つかの実施形態では、工程 1 の未処置の精子に由来する放出された細胞性物質が、少なくとも 1 つの下流用途 例 えば 遺 伝 子 変 異 について確認すること を用いて特徴づけられる。

40

【 0 4 4 3 】

任意の適当な処置工程または処置工程の組み合わせを工程 1 で使用することができる。

【 0 4 4 4 】

幾つかの実施形態では、処置は、フローサイトメトリー、冷蔵、凍結、長期保存などの実験技術に精子を供することを含み得る。すなわち、そのような処置を受けた精子は、遺伝子学的にまたは他の形で変化する可能性があり、それらの変化は下流用途を使って確認または特徴づけることができる。

【 0 4 4 5 】

50

幾つかの実施形態では、処置は、性質が化学的であるか非化学的であるかどうかに関係なく、突然変異原または疑わしい突然変異原に精子を供することを含み得る。幾つかの実施形態では、突然変異原または潜在的突然変異原は、化学薬品、例えば日焼け止め、洗剤、タルク等、あるいは変異誘発作用を有するかまたは変異誘発作用を有する疑いのある他の任意の化学薬品であり得る。

【0446】

幾つかの実施形態では、処置工程が、C R I S P R (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats 遺伝子編集)技術、SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer)技術、T A L E N (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) 技術または他の組換え技術を使って精子を遺伝子操作すること、または精子を生物学的分子、特に結合分子、例えば抗体に供することを含み得る。

10

【0447】

幾つかの実施形態では、処置工程は、精子を1つ以上の形態の放射線、例えば紫外線放射線、マイクロ波放射線または熱に暴露することを含み得る。

【0448】

処置工程は、本特許明細書の他の任意のセクションに記載された通りであり得ることは理解すべきである。

【0449】

本方法は場合により、工程3の少なくとも1つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を処置工程に供する工程を含む。処置工程は工程1について記載したのと同じであるかまたは工程1について記載したものと異なってもよい。

20

【0450】

工程2の雌雄選択工程は、任意の適当な方法で実施することができる。幾つかの実施形態では、精子特異的抗体を使用できる。例えば、本特許明細書の別のセクションに記載したような抗体を雌雄選択に使用できる。同様に、本特許明細書の別のセクションに記載した雌雄選択法を使用できる。

【0451】

工程2は、雄性精子または雌性精子のいずれかを選択するために用いることができる。好ましくは、雄特異的抗体は、本特許明細書の別のセクションに記載の通り、雄性精子細胞に結合させそれを不活性化するために用いられる。

30

【0452】

受精工程3は、任意の適当な方法で実施できる。好ましくは、工程3は、本特許明細書の別のセクションに記載されたようにH T - I V Fを使って実施できる。この工程は、必要であれば、本特許明細書の別のセクションに記載されたように受精細胞を培養することを含む。

【0453】

工程4の少なくとも1つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を精子の存在下で選択的に溶解させてその少なくとも1つの溶解した卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性物質を選択的に放出させることは、任意の適当な方法で実施することができる。好ましくは、工程4は、本特許出願の別のセクションにおいて記載したような溶解緩衝液と方法論を使って実施される。

40

【0454】

本明細書中の他の箇所に言及した通り、「細胞性物質」は、好ましくは、溶解しなければ他の方法で放出されなかったであろう実質的に細胞内にある物質である。「細胞性物質」という用語は、他の方法では膜に結合したままである物質も包含する。

【0455】

本明細書中の他の箇所に言及した通り、「細胞性物質」はその遺伝物質(核酸、ポリヌクレオチドおよび更に具体的にはゲノム、遺伝子、遺伝子転写物、遺伝子産物およびRNAをはじめとする、そのあらゆる形態)、タンパク様物質(ポリペプチド、タンパク質、ペプチドおよびアミノ酸をはじめとするそのあらゆる形態)、および炭水化物物質(そ

50

れのあらゆる形態)、脂質物質(脂肪および脂質をはじめとするそのあらゆる形態)をその範囲内に包含する。本明細書中の他の箇所に言及した通り、「細胞性物質」はその範囲内に細胞系のあらゆる成分または構造体を包含する。

【0456】

工程5において、任意の好適な下流用途を用いることができる。本明細書中の他の箇所に言及した通り、下流用途はあらゆる分子ベースの方法と手順を包含する。そのような方法および手順は定量的、定性的、選択的な特性決定、修飾、単離または増幅などのためであり得る。下流用途は、卵母細胞、未分化胚芽細胞/胚盤胞、卵子、胚細胞、胚または精子の細胞性物質への何らかの変化を同定または検証するための、スクリーニング試験または診断試験であり得る。

10

【0457】

下流用途は、前記細胞性物質に、少なくとも1つの外来的に添加された酵素、例えばタンパク質ベースの酵素またはRNAベースの酵素の作用を受けさせることを含み得る。

【0458】

下流用途は、例えば、いずれも1または複数の、遺伝子(ゲノミクスおよびエピゲノミクス)、転写産物(トランスクリプトミクス)、タンパク質(プロテオミクス)、代謝産物(メタボロミクス)、脂質(リポドミクス)または相互作用(インタラクトミクス)の研究であり得る。

【0459】

細胞材料についての可能な下流用途は、Wang & Bodovitz, Trends Biotechnol. 2010 June; 28 (6): 281-290中に記載されており、その全内容が相互参照により本明細書中に組み込まれる。別の可能な下流用途は本明細書中の他の箇所に記載される。

20

【0460】

本発明の第二の観点によれば、遺伝的変異を特徴づける方法であって、次の工程：

【0461】

1. 随意に精子を処置工程に供する工程；

【0462】

2. 工程1の精子を、目的の雌または雄精子について選択するための雌雄選択工程に供する工程；

【0463】

3. 工程2の精子を使って受精工程を実施し、少なくとも1つの卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を産生する工程；

30

【0464】

4. 工程3の卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚を精子の存在下で選択的に溶解させ、その少なくとも1つの溶解された卵母細胞、胚盤胞、卵子、胚細胞または胚から細胞性遺伝物質を選択的に放出させる工程；および

【0465】

5. 遺伝的変異を特徴づけるために、前記放出された細胞性遺伝物質に関して少なくとも1つの下流用途を使用する工程。

【0466】

本発明の第一態様について言及した通り、第二態様の特徴は、本特許明細書の任意の他の部分から収集することができる。

40

【0467】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、任意のヒトまたは非ヒト動物または哺乳動物に適用可能であり、ここでMEA 1、MEA 2、SRY、DBY/DEADおよび/またはTSPYがそのY染色体精子により選択的にまたは特異的に発現されうる。特定の実施形態では、用語「哺乳動物」は、限定されないが、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、イヌおよびネコを含む。好ましくは、哺乳動物の種はブタまたはウシである。

【0468】

上記方法または用途の幾つかの実施形態では、精子細胞選択または精子の雌雄鑑別を大

50

量に実施することができる。

【0469】

上述の方法または用途の幾つかの実施形態では、種のタイプおよび産生される精液の量に全く限界がない。例えば、ブタ、イルカおよびウマは250mLから数リットルまでの大量の精液を生産し、一方でイヌ、畜牛および他の反芻動物は数ミリリットル量を産生する。

【0470】

本発明の幾つかの好ましい実施形態は、本明細書のパート2の図4Bに例示される。

【0471】

幾つかの実施形態では、当該方法は、下記に要約するように、ハイスループット体外受精（HT-IVF）に利用することができる；

【0472】

ブタ（または他の）卵子からの卵母細胞を、新規に開発した培地（IVPを処置するための本明細書の別のセクションに記載の通り）中で処理して成熟を増強する。

【0473】

新鮮な放出されたブタ（または他種）精液で受精させる。

【0474】

8～16細胞に増殖させる 卵母細胞の 70%が新規手法で成熟し成長する。業界の標準は約40%である。

【0475】

新規溶解溶液を用いて卵母細胞および残余の精液を差次的に溶解させ、卵母細胞DNAを抽出し、精子を完全な状態に残す。

【0476】

REPLI gキットSCポリメラーゼ（Qiagen製）によりqPCRを使って卵母細胞DNAを増幅させる。

【0477】

DNAを希釈し、リアルタイムPCR（qPCR）によりある範囲の遺伝子型形質を検出する。

【0478】

以下の方法による精子および/または卵母細胞の処理により、遺伝子産物の変化または欠損を引き起こすことができる；

【0479】

CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats遺伝子編集)；

【0480】

SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer) (Rodriques 2013)；TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)；

【0481】

精子上のドッキング部位をブロックする抗体；卵母細胞上のドッキング部位をブロックする抗体；

【0482】

日焼け止め、洗剤、タルク等の任意の化学薬品；または

【0483】

変異誘発効果を有しうる化学薬品。

【0484】

用途；

【0485】

遺伝子型を変化させる試験計画または処置の能力を決定する；

【0486】

トランスジェニック動物；

10

20

30

40

50

【 0 4 8 7 】

体外受精；または

【 0 4 8 8 】

胚の雌雄鑑別。

【 0 4 8 9 】

本明細書全体を通して「一実施形態」または「実施形態」への言及は、その実施形態との関連で記載される特定の特徴、構造または性質が、本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。よって、本明細書全体の様々な箇所において「一実施形態では」または「ある実施形態では」という表現は、必ずしも全てその実施形態に関するものであるわけではない。更に、特定の特徴、構造または性質は１または複数の組み合わせで任意の適当な様式で組み合わせることが可能である。

10

【 0 4 9 0 】

法規に従い、本発明を構造または方法上の特徴に多かれ少なかれ特別な言語で説明してきた。本明細書中に記載される意味は本発明を効果的に利用する好ましい形態を含むため、表示または記載された特定の特徴に限定されないと理解すべきである。従って、本発明は、当業者により適切に解釈される、添付の特許請求の範囲の適切な範囲の中でその形態または変形のいずれかで主張される。

【 0 4 9 1 】

先行技術の刊行物が本明細書中に引用される場合、この引用は、その刊行物がオーストラリア国または任意の他国において当業界の一般的知識の部分を形成するという承認には

20

。

【 0 4 9 2 】

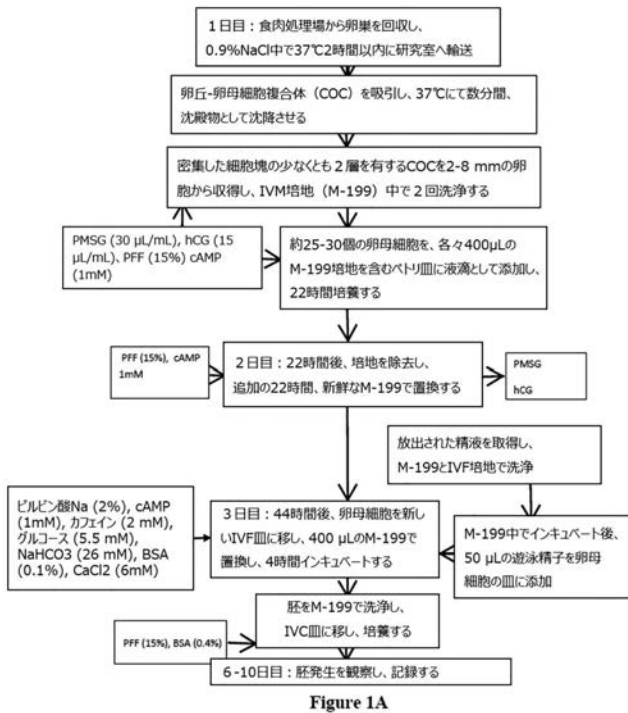
本明細書中で用いる場合、文脈が別のものを要求する場合を除き、「含む」という用語およびその用語の変形、例えば「含んでいる」、「含む」および「含まれる」は、言及されていない１または複数の更なる要素、成分、整数または工程を除外するつもりではなく、言及されていない１または複数の更なる要素、成分、整数または工程を含み得る。

【 0 4 9 3 】

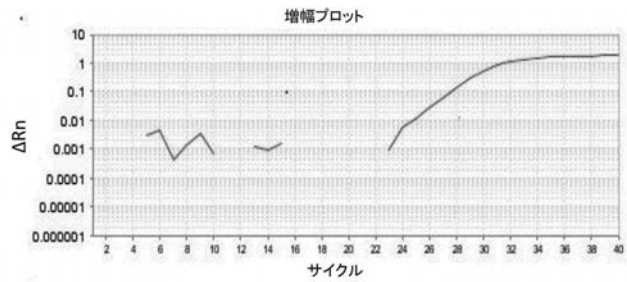
第１節から第４節の本発明の好ましい実施形態が、下記の特許請求の範囲に定義される。

30

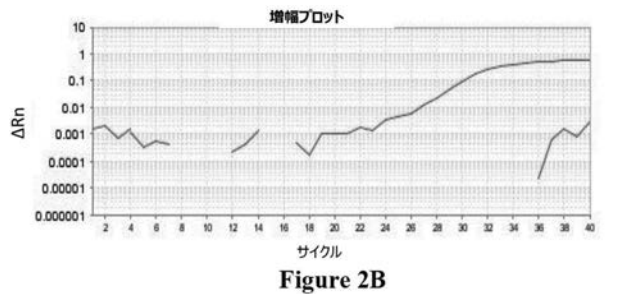
【図 A - 1 A】



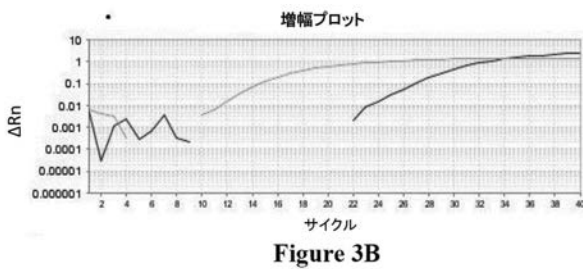
【図 B - 1 B】



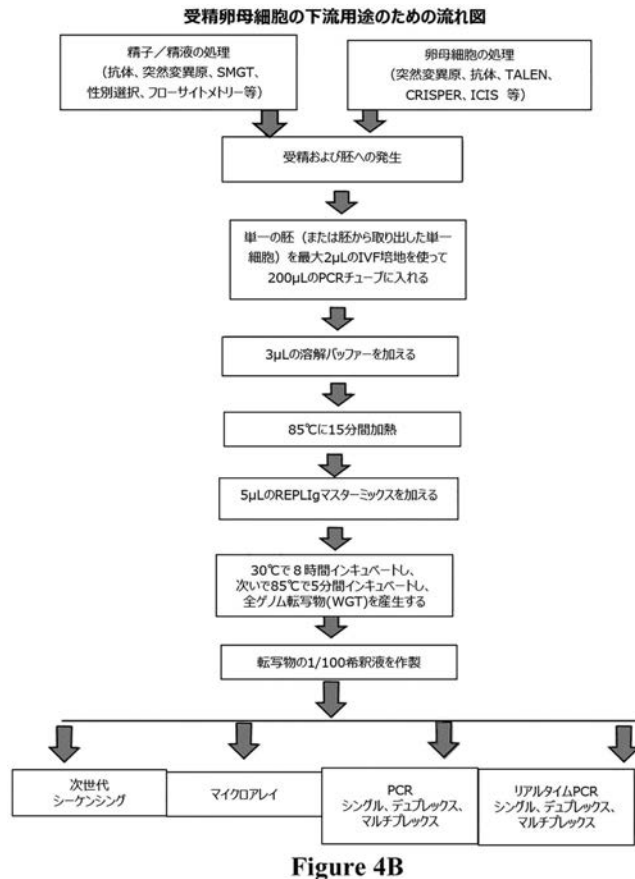
【図 B - 2 B】



【図 B - 3 B】



【図 B - 4 B】



【図 C - 1 C】

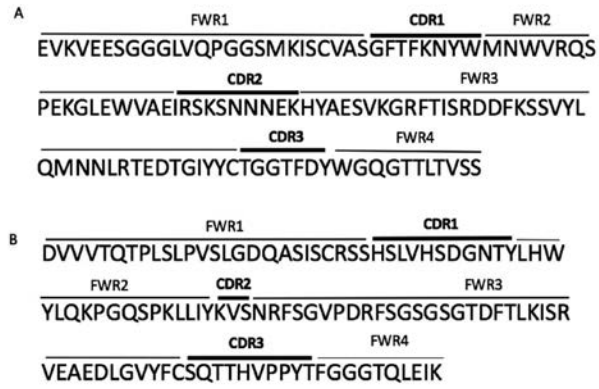


Figure 1C

【図 C - 2 C】

標的 DVVVVTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSHS LVHSDGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVKARFSGSGTDFTLKI
3wbd.1.A DVVVVTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSHS LVHSDGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDR FSGSGTDFTLKI

標的 SSLTTEDLGVYFCSTTHVPPFAFGGGTQLEIK-----EVKVEESPATLVQPGGSMKISCVASGFVSNNY
3wbd.1.A SRVEAEDLG VYFCSTTHV- PYTFGGGTLEIKGGGGSGGGSGGGGSIQLQSGPELVPRPGASVKISCKASGYTFTDY

標的 WNVVRQSPKGLEWVAEIRSKSNNEKHYESVKGRFTISRDDFKSDFTLQMNNLRTEDTGIYYCT-GGR--PDWGGG
3wbd.1.A YIHWVKQRPGEGLWIGWIPGSGNTK--YNEKFKGKATLVDTSSSTAYNQLSSLTSED SAVYFCARGGKFAMDYWGOG

標的 TTLELS
3wbd.1.A TSVTVS

Figure 2C

【図 C - 3 C】

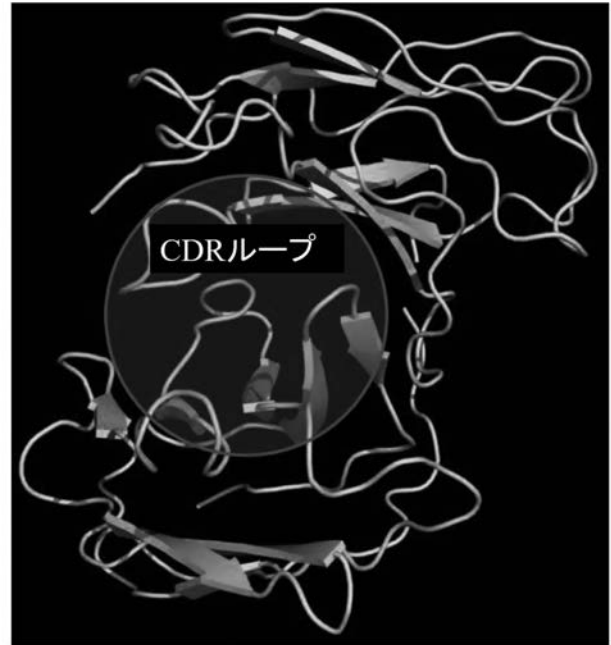


Figure 3C

【図 C - 4 C】

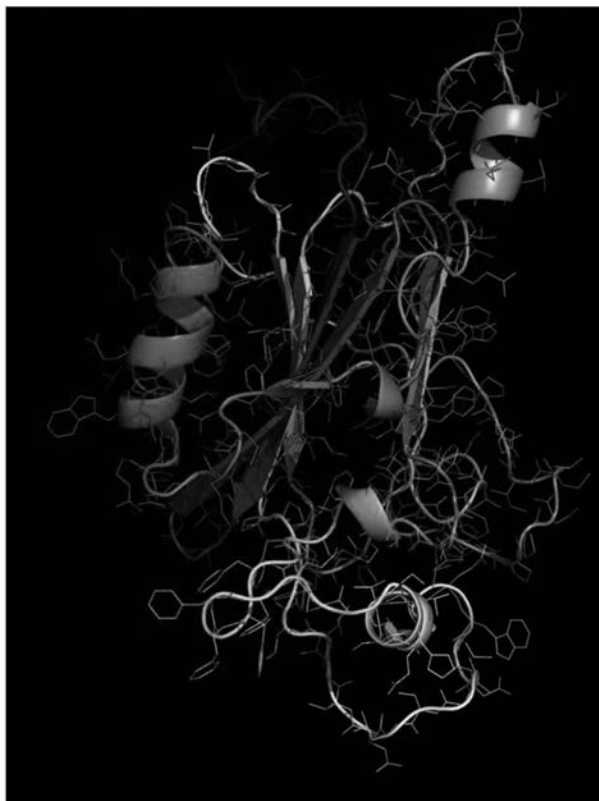


Figure 4C

【図 C - 5 C】

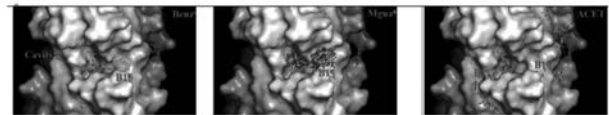


Figure 5C

【図 C - 6 C】

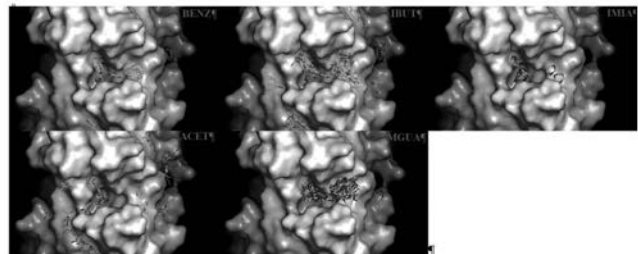


Figure 6C

【図 C - 7 C】

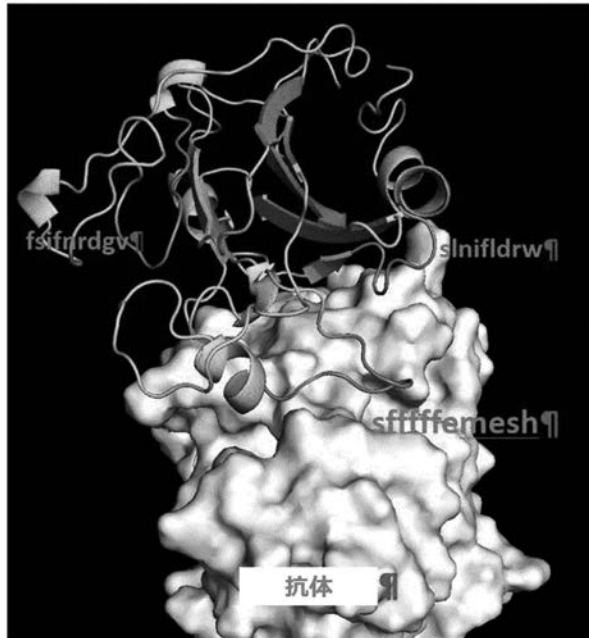


Figure 7C

【図 C - 8 C】

IDKVVVPAVLALVLVAEAAA VVEVVTATAEDLVEVMLIFLLGRAFCFSFFFFEMESHSVTQA
 GVQWPDLSLEVTLLPQPPKVGLQVGGNMPSSFFSIFNRDGVSPCWPGWSLPPDLMIHTPWPE
 VLGLQAATVPGLGSLFFLRVLFKFAFIGEIFLRDTKSNSRFLLLVLCSTEKKGINELNFSSLNIFLDR
WLWRLLQWIWRKLLPGGLVGQLN

Figure 8C

【図 C - 9 C】

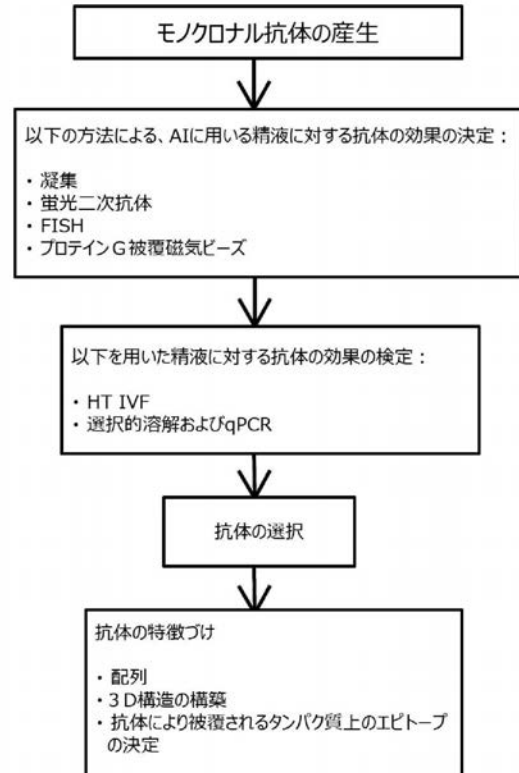


Figure 9C

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2018/000243
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/076 (2010.01) G01N 33/50 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01) G01N 33/50 (2006.01)		
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)		
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)		
EPODOC, WPIAP, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, Google: sperm, sex, selection, fertilization, lysing, embryo, selective, contamination, and like terms, inventor names		
IPC/CPC: C12N5/0612, G01N33/689		
Espacenet: Chromoxyion		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 13 March 2019		Date of mailing of the international search report 13 March 2019
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Felix White AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832565

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2018/000243
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Trigal, B. et al "Comparative study of PCR-sexing procedures using bovine embryos fertilized with sex-sorted spermatozoa" Spanish Journal of Agricultural Research, 2012, vol. 10, pp. 353-359 Whole document, in particular abstract, Table 1, Figure 1	1-11
X	WO 2005/054808 A2 (VICAM, L.P.) 16 June 2005 Example 12	1-11
A	Bredbacka, P. "Recent developments in embryo sexing and its field application" Reproduction Nutrition Development, 1998, vol. 38, pp. 605-613 Section 3.2 "Lysis"	1-11
A	WO 2008/127356 A2 (PROMEGA CORPORATION) 23 October 2008 Whole document	1-11
<p>Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (revised January 2019)</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2018/000243

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

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

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-11

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2018/000243
Supplemental Box	
<p>Continuation of: Box III The application does not comply with the requirement for unity of invention.</p> <p>The description is structured as four separate disclosures directed to four distinct concepts.</p> <p>Concept 1 - Section 1 – Single culture medium for IVP. This relates to independent claims 38, 39, 40.</p> <p>Concept 2 - Section 2 – Selective lysis medium. This relates to independent claims 46, 47, 49</p> <p>Concept 3 - Section 3 – Sex selection antibody. This relates to independent claims 18 and 37. Furthermore, antibodies to DBY are already known (commercially available see https://www.biorbyt.com/ddx3y-antibody-orb156561.html) so in principle each antibody generated to each male spermatozoon epitope would be a separate invention.</p> <p>Concept 4 - Section 4 - Sex selection and selective lysis of fertilized oocytes. This relates to independent claim 1.</p> <p>These concepts are generally related to sex selection, which is a well known concept and cannot provide unity of invention. Although these concepts could be used in combination, they are not specifically suitable for use together (e.g. lock and key). Therefore these concepts lack unity <i>a priori</i>.</p> <p>Each of these concepts would require different search considerations.</p> <p>For the fee already paid, the ISA carried out a search on concept 4 (claim 1). The ISA notes that various claims dependent from claim 1 directly correspond to concepts 1-3. Therefore comment on those dependent claims has been limited to the extent that they have been searched.</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (revised January 2019)</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2018/000243	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2005/054808 A2	16 June 2005	WO 2005054808 A2	16 Jun 2005
		AU 2004295675 A1	16 Jun 2005
		CA 2546886 A1	16 Jun 2005
		EP 1695059 A2	30 Aug 2006
		JP 2007521800 A	09 Aug 2007
		US 2005114915 A1	26 May 2005
WO 2008/127356 A2	23 October 2008	WO 2008127356 A2	23 Oct 2008
		BR PI0718231 A2	12 Nov 2013
		CN 101548005 A	30 Sep 2009
		EP 2054501 A2	06 May 2009
		JP 2010505425 A	25 Feb 2010
		US 2010143878 A1	10 Jun 2010
End of Annex			

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

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 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844	Z
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 5/20 (2006.01)	C 1 2 N 5/20	
A 0 1 K 67/02 (2006.01)	A 0 1 K 67/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100197169

弁理士 柴田 潤二

(72) 発明者 シャロン キャサリン デ ウェット

オーストラリア国, クイーンズランド 4 3 0 6, カラナ ダウンズ, タラルック コート 1 4

(72) 発明者 エムディー シャロアレ ホサイン

オーストラリア国, クイーンズランド 4 3 0 0, グッドナ, ベルビュー ロード 4 3

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QR08 QR42 QR55 QR62 QS24 QX01

4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 DA11 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 BA16 CA25 CA43

CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA05 EA54 FA74