

(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2005-512561**(P2005-512561A)**

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-554846 (P2003-554846)	(71) 出願人	599086582
(86) (22) 出願日	平成14年10月22日 (2002.10.22)		チルドレンズ・メディカル・センター・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月10日 (2004.5.10)		Children's Medical Center Corporation
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/033676		アメリカ合衆国、マサチューセッツ州、ボストン、ロングウッド・アベニュー 300
(87) 国際公開番号	W02003/054141		300 Longwood Avenue
(87) 国際公開日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		, Boston, Massachusetts 02115, U. S. A.
(31) 優先権主張番号	60/345,324		
(32) 優先日	平成13年10月22日 (2001.10.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精子特異的カチオンチャネル、CATSPER2およびそれらの使用法

(57) 【要約】

精子特異的 (CatSper2) であるカチオンチャネルに関して核酸とタンパク質配列が開示される。上記CatSper2タンパク質は、精子において特異的に発現されるものが示される。上記CatSper2遺伝子に関する核酸、ベクター、形質転換細胞、トランスジェニック動物、ポリペプチド、抗体が開示されている。また提供されているのは、媒介障害に関するビジネスを実施する諸方法とともに、インビトロ受精と避妊の諸方法、CatSper2活性のモジュレータを同定する諸方法、CatSper2に対する対象者の遺伝子型を判定する諸方法、不妊症を含むCatSper2媒介紹介を診断した治療する諸方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列識別番号：1 の少なくとも 10 連続ヌクレオチドと、
 (b) 配列識別番号：1 の少なくとも 12 連続ヌクレオチドと、
 (c) 配列識別番号：1 の少なくとも 14 連続ヌクレオチドと、
 (d) 配列識別番号：1 の少なくとも 16 連続ヌクレオチドと、
 (e) 配列識別番号：1 の少なくとも 18 連続ヌクレオチドと、
 (f) (a) ~ (e) の前記配列のいずれか一つに相補的な一つの配列と、
 から成る、グループから選択されたヌクレオチド配列を有する分離核酸。

【請求項 2】

- a) 配列識別番号：3 の少なくとも 10 連続ヌクレオチドと、
 (b) 配列識別番号：3 の少なくとも 12 連続ヌクレオチドと、
 (c) 配列識別番号：3 の少なくとも 14 連続ヌクレオチドと、
 (d) 配列識別番号：3 の少なくとも 16 連続ヌクレオチドと、
 (e) 配列識別番号：3 の少なくとも 18 連続ヌクレオチドと、
 (f) (a) ~ (e) の前記配列のいずれか一つに相補的な一つの配列と、
 から成る、グループから選択されたヌクレオチド配列を有する分離核酸。

【請求項 3】

- a) 配列識別番号：5 の少なくとも 10 連続ヌクレオチドと、
 (b) 配列識別番号：5 の少なくとも 12 連続ヌクレオチドと、
 (c) 配列識別番号：5 の少なくとも 14 連続ヌクレオチドと、
 (d) 配列識別番号：5 の少なくとも 16 連続ヌクレオチドと、
 (e) 配列識別番号：5 の少なくとも 18 連続ヌクレオチドと、
 (f) (a) ~ (e) の前記配列のいずれか一つに相補的な一つの配列と、
 から成る、グループから選択されたヌクレオチド配列を有する分離核酸。

【請求項 4】

- a) CatSper2 タンパク質をコードする一つの配列と、
 (b) CatSper2 タンパク質の少なくとも一つの膜貫通ドメインをコードする一つの配列と、
 (c) CatSper2 タンパク質の少なくとも一つの細胞外ループをコードする一つの配列と、
 (d) CatSper2 タンパク質の少なくとも一つのポア領域をコードする一つの配列と、
 (e) 高予測抗原性を有する CatSper2 タンパク質の少なくとも一つのエピトープをコードする一つの配列と、
 (f) (a) ~ (e) の前記配列のいずれか一つに相補的な一つの配列と、
 から成る、グループから選択されたヌクレオチド配列を有する分離核酸。

【請求項 5】

- (a) 配列識別番号：2 をコードする一つの配列と、
 (b) 配列識別番号：4 をコードする一つの配列と、
 (c) 配列識別番号：6 をコードする一つの配列と、
 (d) 配列識別番号：2 の残基 104 - 126 と，146 - 166 と，176 - 195 と，206 - 228 と，241 - 262 と，316 - 340 とから成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、
 (e) 配列識別番号：4 の残基 104 - 126 と，146 - 166 と，176 - 195 と，206 - 228 と，241 - 262 と，316 - 340 とから成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、
 (f) 配列識別番号：6 の残基 102 - 124 と，144 - 164 と，174 - 193 と，204 - 227 と，239 - 260 と，314 - 328 とから成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

10

20

30

40

50

(g) 配列識別番号：2の残基127-145と、196-205と、263-315とから成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(h) 配列識別番号：4の残基127-145と、196-205と、263-315とから成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(i) 配列識別番号：6の残基125-143と、194-203と、261-313とから成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(j) 配列識別番号：2の残基280-303から成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(k) 配列識別番号：4の残基280-303から成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(l) 配列識別番号：6の残基278-301から成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(m) 配列識別番号：2の残基266-275と、386-400と447-458と、482-494から成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(n) 配列識別番号：4の残基66-99と、266-275と394-414と、から成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(o) 配列識別番号：6の残基64-89と、262-275と562-588と、から成る一つのペプチドをコードする一つの配列と、

(p) (a) ~ (o) の前記配列のいずれか一つに相補的な一つの配列と、から成る、グループから選択された請求項43に記載されているヌクレオチド配列を有する分離核酸。

【請求項6】

a) CatSper2タンパク質と、

(b) CatSper2タンパク質の少なくとも一つの膜貫通ドメインと、

(c) CatSper2タンパク質の少なくとも一つの細胞外ループと、

(d) CatSper2タンパク質の少なくとも一つのポア領域と、

から成る、グループから選択された一つのペプチドと少なくとも80%アミノ酸配列同一性を有する一つのペプチドをコードする分離核酸。

【請求項7】

CatSper2タンパク質と、と少なくとも80%アミノ酸配列同一性を有し、CatSper2活性を発現させることができる一つの細胞におけるCatSper2活性を有する一つのペプチドをコードする分離核酸。

【請求項8】

65 にて1.0xSSCという洗浄ステップを含む条件下で配列識別番号：1、配列識別番号：3または配列識別番号：5の核酸の少なくとも一部にハイブリダイズされるヌクレオチド配列から成る分離核酸。

【請求項9】

前記核酸がCatSper2活性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする請求項8に記載されている分離核酸。

【請求項10】

核酸であって、

(i) CatSper2活性を有する一つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、前記核酸は、65 にて1.0xSSCという洗浄ステップを含む条件下で配列識別番号：1、配列識別番号：3または配列識別番号：5の核酸の少なくとも一部にハイブリダイズされる前記ヌクレオチド配列と、

(ii) 前記配列が発現されるように前記配列に操作可能に結合される異種制御領域と、から成る前記核酸。

【請求項11】

核酸であって、

10

20

30

40

50

(i) 配列識別番号： 2 , 配列識別番号： 4 , あるいは配列識別番号： 6 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % アミノ酸配列同一性を有する一つのペプチドをコードするヌクレオチド配列と、

(i i) 前記配列が発現されるように前記配列に操作可能に結合される異種制御領域と、から成る前記核酸。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一つの分離核酸と、前期分離拡散を検出する手段とから成る Cat S per 2 核酸の少なくとも一部を検出するキット。

【請求項 13】

前記分離核酸を検出するための前記手段はそれに結合している検出可能な標識から成ることを特徴とする請求項 12 に記載されているキット。 10

【請求項 14】

前記分離核酸を検出するための手段は前記分離核酸に特異的にハイブリダイズされる標識化二次核酸から成ることを特徴とする請求項 12 に記載されているキット。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一つの分離核酸から成るベクター。

【請求項 16】

請求項 4 ~ 11 のいずれか一つの核酸を発現させる遺伝子構築物から成るベクター。

【請求項 17】

前記核酸は外因性制御領域に操作可能に結合されることを特徴とする請求項 16 に記載されているベクター。 20

【請求項 18】

前記核酸は融合ベクターを形成するために異種コード配列に操作可能に結合されることを特徴とする請求項 16 に記載されているベクター。

【請求項 19】

請求項 4 ~ 11 のいずれか一つの分離核酸から成るベクター。

【請求項 20】

リポーター遺伝子に操作可能に結合される請求項 4 ~ 11 のいずれか一つの分離核酸から成るベクター。

【請求項 21】

請求項 4 ~ 11 のいずれか一つの核酸により形質転換された細胞。 30

【請求項 22】

請求項 4 ~ 11 のいずれか一つの核酸を発現させることができる遺伝子構築物により形質転換される細胞。

【請求項 23】

前記核酸は融合タンパク質をコードするために異種コード配列に操作可能に前記核酸は結合されることを特徴とする請求項 22 に記載されている細胞。

【請求項 24】

前記細胞が細菌細胞、酵母菌細胞、昆虫細胞、線形動物細胞、両生類動物細胞、げっ歯類動物細胞、ヒト細胞から成るグループから選択されることを特徴とする請求項 22 に記載されている細胞。 40

【請求項 25】

前記細胞が哺乳動物体細胞、胎性細胞、胚性幹細胞、接合体、生殖体、生殖系細胞、トランスジェニック動物細胞から成るグループから選択されることを特徴とする請求項 22 に記載されている細胞。

【請求項 26】

遺伝子構築物が前記動物またはその祖先のゲノムの中に修飾を導入したことを特徴とし、また、前記修飾が Cat S per 2 タンパク質の少なくとも一つの断片をコードする核酸の挿入と、内因性 Cat S per 2 遺伝子の不活性化と、Cat S per 2 制御エレメントに操作可能に結合されているリポーター遺伝子の相同性組み換えによる挿入とから成る 50

グループから選択されることを特徴とする非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 27】

前記修飾は Cat Sper 2 タンパク質と、Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つの膜貫通ドメインと、Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つの細胞外ループと、Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つのポア領域と、高予測抗原性を有する Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つのエピトープと、から成るグループから選択される一つのポリペプチドをコードする核酸の挿入であることを特徴とする請求項 36 に記載されている動物。

【請求項 28】

前記動物がラットと、マウスと、ハムスターと、モルモットと、ウサギと、イヌと、ネコと、ヤギと、ヒツジと、ブタと、非ヒト霊長類とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 26 に記載されている動物。

【請求項 29】

実質的に純粋なタンパク質調製剤であって、

a) Cat Sper 2 タンパク質と、

(b) Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つの膜貫通ドメインと、

(c) Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つの細胞外ループと、

(d) Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つのポア領域と、

(e) 高予測抗原性を有する Cat Sper 2 タンパク質の少なくとも一つのエピトープと、

から成るグループから選択された一つポリペプチドから成る前記実質的に純粋なタンパク質調製剤。

【請求項 30】

実質的に純粋なタンパク質調製剤であって、前記ポリペプチドは、

(a) 配列識別番号：2 と、

(b) 配列識別番号：4 と、

(c) 配列識別番号：6 と、

(d) 配列識別番号：2 の残基 104 - 126 と、146 - 166 と、176 - 195 と、206 - 228 と、241 - 262 と、316 - 340 と、

(e) 配列識別番号：4 の残基 104 - 126 と、146 - 166 と、176 - 195 と、206 - 228 と、241 - 262 と、316 - 340 と、

(f) 配列識別番号：6 の残基 102 - 124 と、144 - 164 と、174 - 193 と、204 - 227 と、239 - 260 と、314 - 328 と、

(g) 配列識別番号：2 の残基 127 - 145 と、196 - 205 と、263 - 315 と、

(h) 配列識別番号：4 の残基 127 - 145 と、196 - 205 と、263 - 315 と、

(i) 配列識別番号：6 の残基 125 - 143 と、194 - 203 と、261 - 313 と、

(j) 配列識別番号：2 の残基 280 - 303 と、

(k) 配列識別番号：4 の残基 280 - 303 と、

(l) 配列識別番号：6 の残基 278 - 301 と、

(m) 配列識別番号：2 の残基 266 - 275 と、386 - 400 と 447 - 458 と、482 - 494 と、

(n) 配列識別番号：4 の残基 66 - 99 と、266 - 275 と 394 - 414 と、

(o) 配列識別番号：6 の残基 64 - 89 と、262 - 275 と 562 - 588 と、

から成る、グループから選択されることを特徴とする請求項 29 に記載されている前記実質的に純粋なタンパク質調製剤。

【請求項 31】

a) Cat Sper 2 タンパク質と、

(b) CatSper2 タンパク質の少なくとも一つの膜貫通ドメインと、

(c) CatSper2 タンパク質の少なくとも一つの細胞外ループと、

(d) CatSper2 タンパク質の少なくとも一つのポア領域と、

から成る、グループから選択された一つのペプチドと少なくとも 80 % アミノ酸配列同一性を有する一つのペプチドから成る実質的に純粋なタンパク質調製剤。

【請求項 32】

CatSper2 タンパク質と、と少なくとも 80 % アミノ酸配列同一性を有し、CatSper2 活性を発現させることができる一つの細胞における CatSper2 活性を有する一つのペプチドから成る実質的に純粋なタンパク質調製剤。

【請求項 33】

CatSper2 エピトープに対して立ち上げた一つの抗体から成る実質的に純粋な抗体調製剤。

【請求項 34】

前記エピトープが高予測抗原性を有することを特徴とする請求項 33 に記載されている実質的に純粋な抗体調製剤。

【請求項 35】

前記エピトープは配列識別番号：2 の残基 266 - 275 と、386 - 400 と 447 - 458 と、482 - 494 と、配列識別番号：4 の残基 66 - 99 と、266 - 275 と 394 - 414 と、配列識別番号：6 の残基 64 - 89 と、262 - 275 と 562 - 588 と、

から成る、グループから選択されるアミノ酸配列内にあるアミノ酸配列から成ることを特徴とする請求項 33 に記載されている実質的に純粋な抗体調製剤。

【請求項 36】

前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 33 ~ 35 のいずれか一つに記載されている実質的に純粋な抗体調製剤。

【請求項 37】

前記抗体が Fab 断片と、F(ab')₂ 断片と、Fv 断片と、一本鎖 Fv 断片 (ScFv) とから成るグループから選択される抗体断片であることを特徴とする請求項 33 ~ 35 のいずれか一つに記載されている実質的に純粋な抗体調製剤。

【請求項 38】

請求項 33 ~ 37 のいずれか一つの抗 CatSper2 抗体と前記抗体を検出するための手段とから成る CatSper2 タンパク質の少なくとも一つのエピトープを検出するためのキット。

【請求項 39】

前記抗 CatSper2 抗体を検出するための前記手段はそれに結合される検出可能な標識から成ることを特徴とする請求項 38 に記載されているキット。

【請求項 40】

前記抗 CatSper2 抗体を検出するための前記手段は前記抗 CatSper2 抗体に特異的に結合する標識化二次抗体から成ることを特徴とする請求項 38 に記載されているキット。

【請求項 41】

CatSper2 活性の潜在的なモジュレーターを同定する方法であって、

CatSper2 タンパク質を発現させる細胞と一つの候補化合物を接触させるステップと、

前記細胞における CatSper2 活性の指標を測定するステップと、

前記候補化合物が基準値に関する前記指標における増加または減少を引き起こすかどうかを判定するステップと、

前記化合物が前記指標における増加または減少を引き起こす場合は、CatSper2 活性の潜在的なモジュレーターとして前記候補化合物を同定するステップと、

から成る前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

前記指標が前記 C a t S p e r 2 タンパク質をコードする m R N A の値の指標であることを特徴とする請求項 4 1 に記載されている方法。

【請求項 4 3】

前記指標が C a t S p e r 2 タンパク質の値の指標であることを特徴とする請求項 4 1 に記載されている方法。

【請求項 4 4】

前記指標が前記細胞の膜全体にわたるカチオンフラックスの指標であることを特徴とする請求項 4 1 に記載されている方法。

【請求項 4 5】

前記指標が前記細胞の全細胞またはチャネル電流の指標であることを特徴とする請求項 4 1 に記載されている方法。

【請求項 4 6】

前記細胞が C a t S p e r 2 タンパク質を発現させる遺伝子構築物により形質転換されたことを特徴とする請求項 4 1 ~ 4 5 のいずれか一つに記載されている方法。

【請求項 4 7】

前記細胞が成熟精細胞であり、また、前記指標が精子の運動性の測定値であることを特徴とする請求項 4 1 に記載されている方法。

【請求項 4 8】

C a t S p e r 2 活性の潜在的なモジュレータを同定する方法であって、
C a t S p e r 2 タンパク質の少なくとも一つの構造ドメインから成る C a t S p e r 2 部分と、生理学的条件下で一つの候補化合物を接触させるステップと、
何らかのものがあれば、前記候補化合物と前記 C a t S p e r 2 部分との間の結合を測定するステップと、

前記候補化合物が前記 C a t S p e r 2 部分に結合している場合に、C a t S p e r 2 活性の潜在的なモジュレータとして前記候補化合物を同定するステップと、
から成る前記方法。

【請求項 4 9】

一つの方法であって、前記 C a t S p e r 2 部分が、

(a) C a t S p e r 2 タンパク質と、

(b) C a t S p e r 2 タンパク質の少なくとも一つの膜貫通ドメインと、

(c) C a t S p e r 2 タンパク質の少なくとも一つの細胞外ループと、

(d) C a t S p e r 2 タンパク質の少なくとも一つのポア領域と、

から成る、グループから選択された一つのペプチドであることを特徴とする請求項 4 8 に記載されている前記方法。

【請求項 5 0】

C a t S p e r 2 活性を減少させる一つの化合物を前記雄（男性）に投与するステップ、
から成る雄（男性）対象者の不妊症を減少させる方法。

【請求項 5 1】

C a t S p e r 2 活性を減少させる一つの化合物を前記雄（男性）に投与するステップ、
から成る雄（男性）対象者における可逆的な避妊を引き起こす方法。

【請求項 5 2】

C a t S p e r 2 活性を減少させる一つの化合物を前記雄（男性）に投与するステップ、
から成る避妊の方法。

【請求項 5 3】

C a t S p e r 2 活性を減少させる一つの化合物を前記雌（女性）に投与するステップ、
から成る避妊の方法

【請求項 5 4】

前記化合物が注射と、経皮的パッチと、生物学的腐食可能なインプラントと、潤滑剤と、
湿潤剤と、発泡剤と、ゼリーと、スポンジとから成るグループから選択される製剤形態に

10

20

30

40

50

あることを特徴とする請求項 50～53 のいずれか一つに記載されている方法。

【請求項 55】

前記雌（女性）対象者が哺乳動物であって、また、前記化合物が前記雌（女性）の膣、子宮、輸卵管の少なくとも一つの中に投与されることを特徴とする請求項 53 に記載されている避妊の方法。

【請求項 56】

前記化合物が Cat S per 2 遺伝子の少なくとも一部に対するアンチセンスである核酸と Cat S per 2 タンパク質に対する一つの抗体とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 50～53 のいずれか一つに記載されている方法。

【請求項 57】

前記化合物が、F a b 断片と、F (a b ')₂断片と、F v 断片と、s c F v 断片とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 56 に記載されている方法。

【請求項 58】

前記対象者が哺乳動物であることを特徴とする請求項 50～53 のいずれか一つに記載されている方法。

【請求項 59】

前記哺乳動物がヒトと、イヌと、ネコと、ウシと、ヒツジと、ウマと、マウスと、ラットと、アライグマと、ホリネズミとから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 58 に記載されている方法。

【請求項 60】

前記対象がサカナと、両生類動物と、昆虫とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 58 に記載されている方法。

【請求項 61】

雄（男性）対象（者）の繁殖力を減少させるための医薬品の調製剤における Cat S per 2 活性を減少させる化合物の使用法。

【請求項 62】

雄（男性）対象（者）における繁殖力を可逆的に不妊を引き起こすための医薬品の調製剤における Cat S per 2 活性を減少させる化合物の使用法。

【請求項 63】

雄（男性）対象（者）に対して投与するための避妊薬の調製剤において Cat S per 2 活性を減少させる化合物の使用法。

【請求項 64】

雌（女性）対象（者）に対して投与するための避妊薬の調製剤において Cat S per 2 活性を減少させる化合物の使用法。

【請求項 65】

前記化合物が注射と、経皮的パッチと、生物学的浸透可能なインプラントと、潤滑剤と、湿潤剤と、発泡剤と、ゼリーと、スポンジとから成るグループから選択される製剤形態にあることを特徴とする請求項 61～64 のいずれか一つに記載されている使用法。

【請求項 66】

前記雌（女性）対象者が哺乳動物であって、また、前記化合物が前記雌（女性）の膣、子宮、輸卵管の少なくとも一つの中に投与されることを特徴とする請求項 53 に記載されている避妊の方法。

【請求項 67】

前記化合物が Cat S per 2 遺伝子の少なくとも一部に対するアンチセンスである核酸と Cat S per 2 タンパク質に対する一つの抗体とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 61～64 のいずれか一つに記載されている使用法。

【請求項 68】

前記化合物が、F a b 断片と、F (a b ')₂断片と、F v 断片と、s c F v 断片とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 67 に記載されている使用法。

【請求項 69】

10

20

30

40

50

前記対象（者）が哺乳動物であることを特徴とする請求項 6 1 ~ 6 4 のいずれか一つに記載されている使用法。

【請求項 7 0】

前記哺乳動物がヒトと、イヌと、ネコと、ウシと、ヒツジと、ウマと、マウスと、ラットと、アライグマと、ホリネズミとから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 6 9 に記載されている使用法。

【請求項 7 1】

前記対象が魚類と、両生類動物と、昆虫とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 6 9 に記載されている使用法。

【請求項 7 2】

C a t S p e r 2 活性を減少させる化合物から成る避妊調製剤の使用法。

10

【請求項 7 3】

前記化合物が C a t S p e r 2 遺伝子の少なくとも一部に対してアンチセンスである核酸と C a t S p e r 2 タンパク質に対する抗体とから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 7 2 に記載されている調製剤。

【請求項 7 4】

前記化合物が注射と、経皮的パッチと、生物学的腐食可能なインプラントと、潤滑剤と、湿潤剤と、発泡剤と、ゼリーと、スポンジとから成るグループから選択される製剤形態にあることを特徴とする請求項 7 2 に記載されている調製剤。

【請求項 7 5】

C a t S p e r 2 遺伝子における変異の有無を判定するステップから成る哺乳動物における C a t S p e r 2 関連障害を診断する方法。

20

【請求項 7 6】

C a t S p e r 2 遺伝子配列の少なくとも一部を決定するステップと、参考配列に対して前記決定された配列を比較するステップと、
から成る前記方法であって、

前記決定された配列と前期基準配列との間の差異の有無が、前記 C a t S p e r 2 遺伝子における変異の有無を示すことを特徴とする請求項 7 5 に記載されている前記方法。

【請求項 7 7】

C a t S p e r 2 遺伝子における変異の有無を判定するステップから成る C a t S p e r 2 関連障害を診断する方法。

30

【請求項 7 8】

C a t S p e r 2 遺伝子配列の少なくとも一部を決定するステップと、参考配列に対して前記決定された配列を比較するステップと、
から成る前記方法であって、

前記決定された配列と前期基準配列との間の差異の有無が、前記 C a t S p e r 2 遺伝子における変異の有無を示すことを特徴とする請求項 7 7 に記載されている前記方法。

【請求項 7 9】

前記判定が、前記 C a t S p e r 2 タンパク質の少なくとも一つの断片を、一つの変異が有無が公知のものである C a t S p e r 2 タンパク質に結合することが公知の抗体と接触させるステップと、前記抗体と前記 C a t S p e r 2 タンパク質の前記断片との間の結合を検出するステップとから成ることを特徴とする請求項 7 8 に記載されている方法。

40

【請求項 8 0】

前記細胞における C a t S p e r 2 活性の指標を測定するステップと、

基準値に対して前記測定された指標を比較するステップと、

前記指標が増加するかまたは減少する場合は、C a t S p e r 2 関連障害を診断するステップと、

から成る哺乳動物における C a t S p e r 2 関連障害を診断する方法。

【請求項 8 1】

前記指標が前記 C a t S p e r 2 タンパク質をコードする m R N A の値の指標であること

50

を特徴とする請求項 8 0 に記載されている方法。

【請求項 8 2】

前記指標が C a t S p e r 2 タンパク質の値の指標であることを特徴とする請求項 8 0 に記載されている方法。

【請求項 8 3】

前記指標が前記細胞の膜全体にわたるカチオンフラックスの指標であることを特徴とする請求項 8 0 に記載されている方法。

【請求項 8 4】

前記指標が前記細胞の全細胞またはチャネル電流の指標であることを特徴とする請求項 8 0 に記載されている方法。

10

【請求項 8 5】

前記障害が C a t S p e r 2 関連不妊症であることを特徴とする請求項 7 5 ~ 8 4 のいずれか一つに記載されている方法。

【請求項 8 6】

C a t S p e r 2 遺伝子配列の少なくとも一部を決定するステップと、参考配列に対して前記決定された配列を比較するステップと、
から成り、

前記決定された配列と前記基準配列との間の差異の有無が、前記基準配列に対応する遺伝子型の有無を示すことを特徴とする C a t S p e r 2 遺伝子に対して一つの対象（者）の遺伝子型を判定する方法。

20

【請求項 8 7】

C a t S p e r 2 タンパク質配列の少なくとも一部を決定するステップと、参考配列に対して前記決定された配列を比較するステップと、
から成り、

前記決定された配列と前記基準配列との間の差異の有無が、前記基準配列に対応する遺伝子型の有無を示すことを特徴とする C a t S p e r 2 遺伝子に対して一つの対象（者）の遺伝子型を判定する方法。

【請求項 8 8】

前記判定が、前記 C a t S p e r 2 タンパク質の少なくとも一つの断片を、一つの変異の有無が公知のものである C a t S p e r 2 タンパク質に結合することが公知の抗体と接触させるステップと、前記抗体と前記 C a t S p e r 2 タンパク質の前記断片との間の結合を検出するステップとから成ることを特徴とする請求項 8 7 に記載されている方法。

30

【請求項 8 9】

透明帯を少なくとも一つの卵子から取り除くステップと、

前記卵子を前記精子の少なくとも一つと接触させるステップと、

前記精子が前記卵子を受精させることを可能にするステップと、

から成る C a t S p e r 2 活性を減少させた精子によるインビトロでの受精の方法。

【請求項 9 0】

透明帯を少なくとも一つの卵子から取り除くステップと、

前記卵子を前記精子の少なくとも一つと接触させるステップと、

前記精子が前記卵子を受精させることを可能にするステップと、

から成る運動性を減少させた精子によるインビトロでの受精の方法。

40

【請求項 9 1】

透明帯を少なくとも一つの卵子から取り除くステップと、

前記卵子を前記精子の少なくとも一つと接触させるステップと、

前記精子が前記卵子を受精させることを可能にするステップと、

から成る透明帯を貫通する能力を減少させた精子によるインビトロでの受精の方法。

【請求項 9 2】

前記対象（者）の精子または精子前駆体を、C a t S p e r 2 タンパク質を発現させることができる遺伝子構築物により形質転換させるステップと、

50

卵子を受精させるために前記対象（者）の形質転換した精子を使用するステップと、
から成る減少CatSper2活性のために避妊により特徴付けられる対象（者）を治療
する方法。

【請求項93】

前記対象（者）の精子または精子前駆体に対してCatSper2タンパク質を投与する
ステップと、

卵子を受精させるために前記対象（者）の形質転換した精子を使用するステップと、
から成る減少CatSper2活性のために避妊により特徴付けられる対象（者）を治療
する方法。

【請求項94】

雌（女性）の尿生殖路に存在する抗体のサンプルを得るステップと、

抗体の前記サンプルを、CatSper2タンパク質の少なくとも一つの断片と接触さ
せるステップと、

抗体の前記サンプルと、CatSper2タンパク質の前記断片との間の結合を検出す
るステップと、

CatSper2タンパク質の抗体の前記サンプルと前記断片との間で結合が検出され
る場合は、抗CatSper2抗体媒介不妊症を診断するステップと、

から成る雌（女性）尿生殖路に存在している抗CatSper2抗体により引き起こされ
る抗CatSper2抗体媒介不妊症を診断する方法。

【請求項95】

前記CatSper2断片は高予測抗原性を有する前記エピトープから成ることを特徴と
する請求項94に記載されている方法。

【請求項96】

前記エピトープは配列識別番号：2の残基266 - 275と、386 - 400と447 -
458と、482 - 494と、配列識別番号：4の残基66 - 99と、266 - 275と
394 - 414と、配列識別番号：6の残基64 - 89と、262 - 275と562 - 5
88と、

から成る、グループから選択される配列内に含まれていることを特徴とする請求項95
に記載されている方法。

【請求項97】

前記抗CatSper2抗体と前記尿生殖路にある精子上に存在しているCatSper
2タンパク質との間の結合を阻害するために効果的な用量における前記抗CatSper
2抗体に特異的に結合する薬剤を前記尿生殖路の中に投与するステップから成る雌（女性
）の中に存在する抗CatSper2抗体により引き起こされる抗CatSper2抗体
媒介不妊症を治療する方法。

【請求項98】

前記薬剤が高予測抗原性を有する前記エピトープを含むCatSper2タンパク質の少
なくとも断片から成ることを特徴とする請求項97に記載されている方法。

【請求項99】

前記エピトープは配列識別番号：2の残基266 - 275と、386 - 400と447 -
458と、482 - 494と、配列識別番号：4の残基66 - 99と、266 - 275と
394 - 414と、配列識別番号：6の残基64 - 89と、262 - 275と562 - 5
88と、

から成る、グループから選択される配列内に含まれていることを特徴とする請求項98
に記載されている方法。

【請求項100】

前記薬剤は前記抗CatSper2抗体に対抗する抗イディオタイプ抗体から成ることを
特徴とする請求項98に記載されている方法。

【請求項101】

(a) CatSper2活性をアンタゴナイズする一つまたはそれ以上の薬剤を請求項4

10

20

30

40

50

1 のアッセイにより同定するステップと。

(b) ステップ(a)において同定された薬剤、あるいはその類似体が精子の運動性または卵貫通性の少なくとも一つを阻害するかどうかを判定するステップと、

(c) 一つまたはそれ以上の動物モデルにおける効き目と毒性に関して、ステップ(b)において一つの阻害剤として同定された薬剤の治療上のプロフィール作成を実施するステップと、

(d) 受け入れ可能な治療上のプロフィールを有するものとしてステップ(c)において同定される一つまたはそれ以上の薬剤を含む製薬調製剤を製剤化するステップと、から成る薬物ディスカバリービジネスを実施するための方法。

【請求項102】

販売のために製薬調製剤を配布するためのシステムを確立するステップと、任意には前記製薬調製剤を市場調査するための販売グループを確立するステップをさらに含める、請求項101に記載されている前記方法。

【請求項103】

(a) CatSper2 活性をアゴナイズする一つまたはそれ以上の薬剤を請求項41のアッセイにより同定するステップと。

(b) ステップ(a)において同定された薬剤、あるいはその類似体が精子の運動性または卵貫通性の少なくとも一つを阻害するかどうかを判定するステップと、

(c) 一つまたはそれ以上の動物モデルにおける効き目と毒性に関して、ステップ(b)において一つのアゴニストとして同定された薬剤の治療上のプロフィール作成を実施するステップと、

(d) 受け入れ可能な治療上のプロフィールを有するとしてステップ(c)において同定される一つまたはそれ以上の薬剤を含む製薬調製剤を製剤化するステップと、から成る薬物ディスカバリービジネスを実施するための方法。

【請求項104】

販売のために製薬調製剤を配布するためのシステムを確立するステップと、任意には前記製薬調製剤を市場調査するための販売グループを確立するステップをさらに含める、請求項101に記載されている前記方法。

【請求項105】

ステップ(a)は野生型 CatSper2 の活性をアゴナイズする一つまたはそれ以上の薬剤を同定することから成ることを特徴とする請求項103に記載されている前記方法。

【請求項106】

ステップ(a)は一つまたはそれ以上の変異を含む CatSper2 の活性をアゴナイズする一つまたはそれ以上の薬剤を同定することから成ることを特徴とする請求項103に記載されている前記方法。

【請求項107】

(a) 男性患者から採取された精子サンプルを調べるステップであって、そこでは前記患者は受精の問題を体験している、前記ステップと、

(b) 前記精子が運動性における減少あるいは卵貫通性の減少の少なくとも一つにより特徴付けられるかどうかを判定するステップと、

(c) 精子の運動性または卵貫通性の少なくとも一つを増加させる際に、CatSper2 アゴニストの効き目を判定するためにインピトロ分析を実施するステップと、

(d) 前記男性における精子の運動性または卵貫通性の少なくとも一つを増加させるために効果的な CatSper2 アゴニストの用量を投与することから成る治療処方確立するステップと、

から成る生殖医学ビジネスを実施する方法。

【請求項108】

さらに、受精における改善を評価するために医師により前記男性がモニターされることを特徴とするステップを含む、請求項107に記載されている前記方法。

【請求項109】

10

20

30

40

50

さらに、前記患者または上記患者の保健ケア供給者に請求書を作成するステップを含む、請求項 107 に記載されている前記方法。

【請求項 110】

(a) 請求項 41 のアッセイにより発見された製薬調製剤を提供するステップであって、そこでは前記調製剤が CatSper2 の活性を阻害する前記ステップと、

(b) CatSper2 の活性を阻害するために効果的な前記製薬調製剤の用量の投与に関して医師と保健ケア供給者に指示を供給し、そこでは前記好適な用量は妊娠を予防するのに十分であるが、前記ステップと、
から成る避妊医学ビジネスを実施する方法。

【請求項 111】

さらに、販売のために製薬調製剤を配布するためのシステムを確立するステップを含め、また任意には前記製薬調製剤を市場調査するための販売グループを確立するステップをさらに含める、請求項 110 に記載されている前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は分子生物学の分野および再生技術に関する。特に、本発明は、精細胞において特異的に発現されるカチオンチャンネルタンパク質と、上記タンパク質をコード化する核酸と、上記タンパク質を発現させるよう設計された細胞と、上記タンパク質の活動を効果的なものにする化合物に対する評価分析と、不妊症の治療あるいは因果関係におけるこうした化合物の使用法、あるいは避妊あるいは動物対照の手段としてのこうした化合物の使用法に関する。

(政府支援)

本発明は NIH 助成金 HD36022 からの支援により一部作成された。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

(関連出願)

本出願は、2001 年 10 月 22 日に出願した米国仮特許出願第 60/345,324 号の優先権の特典を主張する。

【背景技術】

【0002】

精子と卵子は脊椎動物の受精において相互に作用する (Wassarman ら (2001)、Nature Cell Biology 3: E59-E64; Yanagimachi (1994)、Knobil と Neill 編 "The Physiology of Reproduction" (Raven Press 社刊、ニューヨーク市)、pp. 189-315)。受精の部位に達するために、精子は比較的長い距離を移動しなければならず、受精能獲得ならびにその他のプロセスにより上記卵子の受精のために準備がなされる。精子が卵子の表面にいったん辿り着くと、精子は透明帯タンパク質を含む卵子外細胞マトリックス糖タンパク質と相互作用する。精子は先体反応の間、また、Ca²⁺チャンネルの開口と Ca²⁺の精子頭部への流入をおそらく含む情報伝達事象の間酸性物質を放出する (O'Toole ら、(2000)、Mol. Biol. Cell 11: 1571-84)。その TRPC2 タンパク質、推定上の Ca²⁺浸透性チャンネルは上記先体反応において最近その潜在的な重要性が示されているものである (Jungnickel ら (2001)、Nat. Cell Biol. 3: 499-502)。上記卵子の厚い外側層を通して精子が貫通するのは、卵子膜の化学的溶解および/精子の機械的な運動により達成される (Bedford (1998)、Biol. Reprod. 59: 1275-87)。卵子透明帯膜の浸潤の後に、精子膜は卵子の膜と融合する。融合の後には、卵子の中での Ca²⁺振動で始まる受精プロセスの活性化が続く (Wassarman ら、(2001)、同上、; Yanagimachi (1994)、Knobil と Neill 編 "The Physiology of Reproduction" (Raven

10

20

30

40

50

Press社刊，ニューヨーク市），pp. 189 - 315）。

【0003】

Ca²⁺と環状ヌクレオチドは精子の運動性を制御する（Tash（1990），Controls of Sperm Motility：Gagnon編“Biological and Clinical Aspects”，（CRC Press社刊，Boca Raton市），pp. 229 - 240；Darszonら（1999），Physiol. Rev. 79：481 - 510；HyneとGarbers（1979），Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76：5699 - 703）、またいくつかの電圧依存性Ca²⁺チャネル（Ca_v）mRNAと環状ヌクレオチドゲート（CNG）チャネルタンパク質は精細胞前駆体の中で検出されている（Darszonら（1999），Physiol. Rev. 79：481 - 510；Serranoら（1999），FEBS Lett. 462：171 - 6；Weyandら（1994）Nature 368：859 - 63；Wiesnerら（1998），J. Cell Biol. 142：473 - 84）。さらに、低電圧活性化でヒドロピリジン感受性「T型」チャネル（Santira（1996），Am. J. Physiol. 271：C1583 - 93；Arnoultら（1996），Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93：13004 - 9）と、薬理的に定義されたN - とR - 型電流が、精子形成細胞の中で測定されている（Wnnemuthら（2000），J. Biol. Chem. 275：21210 - 7）。しかしながら、精子形成細胞における、あるいは成熟精子機能におけるこれらのチャネルの役割は知られていない。

10

20

【0004】

最近、マウスの正常な受精のために必要とされている電圧ゲートチャネル（CarSper1）が発見されている（Renら（2001），Nature 413：603 - 9）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

一つの側面において、本発明は、一つのCatSper2遺伝子の全部あるいは一部から成る分離核酸を提供する。いくつかの実施態様では、上記分離核酸には、配列識別番号；1あるいは配列識別番号：3あるいは配列識別番号：5あるいはそれらに対して相補的な配列の少なくとも10、12、14、16あるいは18の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列が含まれる。他の実施態様では、上記核酸には、CatSper2タンパク質をコードするヌクレオチド配列、CatSper2タンパク質の少なくとも膜貫通ドメイン、CatSper2タンパク質の少なくとも細胞外ループ、CatSper2タンパク質の少なくともポア領域、高予測率の抗原性を有するCatSper2タンパク質の少なくともエピトープあるいはそれらに対して相補的な配列が含まれる。特定の実施態様では、上記核酸には、配列識別番号：1の配列と；配列識別番号：3の配列と；配列識別番号：5の配列と；配列識別番号：2の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基102 - 124、144 - 164、174 - 193、204 - 227、239 - 260、314 - 338から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：2の近接残基127 - 145、196 - 205、263 - 315から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基127 - 145、196 - 205、263 - 315から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基125 - 143、194 - 203、261 - 313から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：2の近接残基280 - 303から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基280 - 303から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基278 - 3

30

40

50

01 から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：2の近接残基266 - 275、386 - 400、447 - 458、482 - 494から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基66 - 99、266 - 275、394 - 414から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基64 - 89、262 - 275、562 - 588から成るポリペプチドをコード化する配列と；それらに対して相補的な配列とが含まれる。いくつかの実施態様では、本発明は、配列識別番号：2の近接残基266 - 275、386 - 400、447 - 458、482 - 494と；配列識別番号：4の近接残基66 - 99、266 - 275、394 - 414と；配列識別番号：6の近接残基64 - 89、264 - 275、562 - 588と；それらに対して相補的な配列とから主に構成されるポリペプチドをコード化する配列から成る核酸を提供する。

10

【0006】

もう一つの側面では、本発明はCatSper2タンパク質に対して少なくとも80%、85%、90%、あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離核酸；CatSper2タンパク質の少なくとも膜貫通ドメイン、CatSper2タンパク質の少なくとも細胞外ループ、CatSper2タンパク質の少なくともポア領域を提供する。いくつかの実施態様では、分離核酸はCatSper2タンパク質に対して少なくとも80%、85%、90%、あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドと、CatSper2活性化を発現させることができる細胞中でのCatSper2活性を有するポリペプチドをコードする。

20

【0007】

もう一つの側面では、本発明は、65 で1.0 x SSCという洗浄ステップ、0.5 x SSCという洗浄ステップ、0.2 x SSCという洗浄ステップ、あるいは0.1 x SSCという洗浄ステップを含む条件下で配列識別番号：1あるいは配列識別番号：3あるいは配列識別番号：5の核酸の少なくとも一部にハイブリダイズされる分離核酸を提供する。いくつかの実施態様では、上記分離核酸はCatSper2活性化を有するポリペプチドをコード化する。

【0008】

もう一つの側面では、本発明は、65 で1.0 x SSCという洗浄ステップ、0.5 x SSCという洗浄ステップ、0.2 x SSCという洗浄ステップ、あるいは0.1 x SSCという洗浄ステップを含む条件下で、CatSper2活性を有するポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列から成る核酸を、また配列識別番号：1あるいは配列識別番号：3あるいは配列識別番号：5の核酸の少なくとも一部にハイブリダイズされる分離核酸を、また上記配列が発現されるように異種制御領域に操作可能に結合される核酸を提供する。もう一つの実施態様では、本発明は配列識別番号：2あるいは配列識別番号：4あるいは配列識別番号：6のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列から成る核酸を、提供し、また、上記配列が発現されるように異種制御領域に操作可能に結合される。

30

【0009】

もう一つの側面では、本発明はCatSper2核酸の少なくとも一部を検出するためのキットを提供する。上記キットには、本発明の上記分離核酸と、上記単離分離核酸を検出するための手段のいずれかを含めることができる。いくつかの実施態様では、上記分離核酸を検出するための手段には、それに結合される検出可能なレベルが含まれ、また、いくつかの実施態様では、上記手段には、上記第一単離核酸に特異的にハイブリダイズされる標識化第二次核酸が含まれる。

40

【0010】

もう一つの側面では、本発明は、本発明の上記分離核酸のいずれかを含む媒体を提供する。いくつかの実施態様では、上記媒体には、本発明の上記核酸を発現させることができる遺伝子構築物が含まれる。いくつかの実施態様では、本発明の上記核酸は、外因性制御

50

領域に操作可能に結合され、また、いくつかの実施態様では、上記核酸は融合媒体を形成するために異種コード配列に操作可能に結合される。いくつかの実施態様では、上記媒体には、CatSper2制御領域が含まれ、また、いくつかの実施態様では、上記CatSper2制御領域は、異種コード配列に操作可能に結合される。

【0011】

もう一つの側面では、本発明は本発明の上記核酸により形質転換された細胞あるいは本発明の核酸を発現させることができる遺伝子構築物を提供する。いくつかの実施態様では、本発明の上記核酸は融合タンパク質をコード化するために異種コード配列に操作可能に結合される。いくつかの実施態様では、上記細胞は細菌細胞、酵母菌細胞、昆虫細胞、線形動物細胞、両生類動物細胞、げっ歯類あるいはヒト細胞である。いくつかの実施態様では、上記細胞は哺乳動物体細胞、胎性細胞、胚性幹細胞、接合体、配偶子、生殖系統細胞、トランスジェニック動物細胞である。

10

【0012】

もう一つの側面では、本発明は非ヒトトランスジェニック動物を提供する。これらの側面では、一つの遺伝子構築物が上記動物あるいは上記動物の祖先のゲノムの中に修飾を導入しており、また、上記修飾にはCatSper2タンパク質の少なくとも断片をコード化する核酸の挿入、内因性CatSper2遺伝子の不活性化、あるいはCatSper2制御エレメントに操作可能に結合されるレポータ遺伝子の同種組み換えによる挿入が含まれる。いくつかの実施態様では、上記修飾はCatSper2タンパク質をコード化する核酸の挿入、CatSper2タンパク質の少なくとも膜貫通ドメインと、CatSper2タンパク質の少なくとも細胞外ループ、CatSper2タンパク質の少なくともポア領域、あるいは高予測抗原性を有するCatSper2タンパク質のエピトープである。いくつかの実施態様では、上記動物はラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、非ヒト霊長類である。

20

【0013】

もう一つの側面では、本発明は、一つのCatSper2タンパク質；CatSper2タンパク質の少なくとも膜貫通ドメイン；CatSper2タンパク質の少なくとも細胞外ループ；CatSper2タンパク質の少なくともポア領域、高予測率の抗原性を有するCatSper2タンパク質の少なくともエピトープから選択されるポリペプチドを含む実質的に純粋なタンパク質作成物を提供する。特定の実施態様では、上記ポリペプチドは、配列識別番号：2；配列識別番号：4；配列識別番号：6；配列識別番号：2の近接残基104-126、146-166、176-195、206-228、241-262、316-340から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基104-126、146-166、176-195、206-228、241-262、316-340から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基102-124、144-164、174-193、204-227、239-260、314-338から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：2の近接残基127-145、196-205、263-315から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基127-145、196-205、265-315から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基125-143、194-203、261-313から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：2の近接残基280-303から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基280-303から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基278-301から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：2の近接残基266-275、386-400、447-458、482-494から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4の近接残基66-99、266-275、394-414から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6の近接残基64-89、262-275、562-588から成るポリペプチドをコード化する配列と；から選択される。いくつかの実施態様では、本発明は、配列識別番号：2の近接残基266-275、386-400、447-

30

40

50

458、482 - 494 から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4 の近接残基 66 - 99、266 - 275、394 - 414 から成るポリペプチドをコードする配列と；配列識別番号：6 の近接残基 64 - 89、262 - 275、562 - 588 から主に構成されるポリペプチドをコード化する配列と；から選択されるポリペプチドを含む実質的に純粋なタンパク質作成物を提供する。

【0014】

もう一つの側面では、本発明は Cat S per 2 タンパク質に対して少なくとも 80%、85%、90%、あるいは 95% アミノ酸配列の同一性を有しかつポリペプチド；Cat S per 2 タンパク質の少なくとも膜貫通ドメイン、Cat S per 2 タンパク質の少なくとも細胞外ループ、Cat S per 2 タンパク質の少なくともポア領域を提供する。いくつかの実施態様では、上記実質的に純粋なタンパク質作成物には、Cat S per 2 タンパク質に対して少なくとも 80%、85%、90%、あるいは 95% アミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドと、Cat S per 2 活性を発現させることができる細胞における Cat S per 2 活性を有するポリペプチドが含まれる。

10

【0015】

もう一つの側面では、本発明は Cat S per 2 エピトープに対して立ち上げた抗体を含む実質的に純粋な抗体作成物を提供する。いくつかの実施態様では、上記エピトープは高予測抗原性を有する。いくつかの実施態様では、上記エピトープには、配列識別番号：2 の近接残基 266 - 275、386 - 400、447 - 458、482 - 494 から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：4 の近接残基 66 - 99、266 - 275、394 - 414 から成るポリペプチドをコード化する配列と；配列識別番号：6 の近接残基 64 - 89、262 - 275、562 - 588 の内から選択されるアミノ酸配列が含まれる。いくつかの実施態様では、上記抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施態様では、上記抗体は Fab 断片、F(ab')₂ 断片、Fv 断片、あるいは一本鎖 Fv 断片である (ScFv)。

20

【0016】

もう一つの側面では、本発明は Cat S per 2 タンパク質の少なくともエピトープを検出するためのキットを提供する。上記キットには、本発明の抗 Cat S per 2 抗体と上記抗体を検出するための手段が含まれる。ある種実施態様では、上記抗 Cat S per 2 抗体を検出するための上記手段には、それに結合される検出可能な標識が含まれ、また、いくつかの実施態様では、上記抗 Cat S per 2 抗体を検出するための上記手段には、上記抗 Cat S per 2 抗体に特異的に結合する標識化二次性抗体が含まれる。

30

【0017】

もう一つの側面では、本発明は Cat S per 2 活性の潜在的なモジュレータを同定する諸方法を提供する。こうした諸方法には Cat S per 2 タンパク質を発現させる細胞と候補化合物を接触させるステップ；上記細胞における Cat S per 2 活性の指標を測定するステップ；上記候補化合物が参考基準に関する上記指標における増加あるいは減少の原因となったかどうかを判定するステップ；上記化合物が上記指標における増加あるいは減少の原因となった場合は、Cat S per 2 活性の潜在的なモジュレータとして上記候補化合物を同定するステップが含まれる。いくつかの実施態様では、上記指標とは、Cat S per 2 タンパク質をコード化する mRNA の値の指標、Cat S per 2 タンパク質の値の指標であり、上記細胞の膜にわたるカチオン流出の指標であり、あるいは上記細胞の全細胞あるいはチャネル電流の指標である。いくつかの実施態様では、上記細胞は、Cat S per 2 タンパク質を発現させることができる遺伝子構築物により形質転換されている。いくつかの実施態様では、上記細胞は成熟精細胞であって、また、上記指標は精運動性の測定値である。

40

【0018】

もう一つの側面では、本発明は、Cat S per 2 タンパク質の少なくとも構造ドメインと候補化合物を接触させるステップと、もしあれば、上記候補化合物と上記 Cat S per 2 部分の間にある結合を測定するステップと、上記結合が有意なものである場合は、

50

CatSper2 活性の潜在的なモジュレータとして上記候補化合物を同定するステップとから成る CatSper2 の潜在的なモジュレータを同定する諸方法を提供する。いくつかの実施態様では、上記 CatSper2 部分は CatSper2 タンパク質であり、CatSper2 タンパク質の少なくとも膜貫通ドメインであり、CatSper2 タンパク質の少なくとも細胞外ループどてあり、あるいは CatSper2 タンパク質の少なくともポア領域である。

【0019】

もう一つの側面では、本発明は CatSper2 活性を減少させている対象に対して一つの化合物を投与することにより男性対象の受精能を減少させる一つの方法を提供する。もう一つの側面では、本発明は CatSper2 活性を減少させている対象に対して一つの化合物を投与することにより男性対象者における可逆的な避妊を起こす一つの方法を提供する。もう一つの側面では、本発明は、CatSper2 活性を減少させる化合物が男性あるいは女性対象者に投与される避妊の一つの方法を提供する。上記実施態様のそれぞれにおいて、上記化合物は注射、経皮的パッチ、生物学的に腐食可能なインプラント、注油、加湿器、発泡剤、ゼリー、あるいはスポンジの形態で可能である。対象者が女性である場合は、上記化合物は膣、子宮、あるいは卵管の少なくとも一つの中に投与することができる。上記実施態様のそれぞれにおいて、上記化合物は CatSper2 遺伝子の少なくとも一部に対してアンチセンスであるか、あるいは Fab 断片、F(ab') 断片、Fv 断片、あるいは scFv 断片を含む CatSper2 タンパク質に対する抗体である核酸でありうる。いくつかの実施態様では、上記対象者は哺乳動物である。いくつかの実施態様では、上記対象者はヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、マウス、ラット、アライグマ、ホリネズミである。他の実施態様では、上記対象者は魚、両生類動物、あるいは昆虫である。関連した側面では、本発明は男性対象者の上記受精能を減少させる、あるいは男性対象者における可逆的な避妊を起こすための薬物の調製において、あるいは男性あるいは女性に対して投与するための避妊薬の調製において、CatSper2 を減少させる一つの化合物の使用を用意している。このように、本発明は CatSper2 遺伝子の少なくとも一部に対してアンチセンスであり、また CatSper2 タンパク質に対する抗体である核酸を含む CatSper2 活性を減少させる化合物を含む避妊薬調製を提供する。

10

20

【0020】

もう一つの側面では、本発明は CatSper2 遺伝子における変異の存在あるいは欠如を判定することにより哺乳動物における CatSper2 関連障害を診断する諸方法を提供する。いくつかの実施態様では、判定された核酸あるいはアミノ酸配列と参考配列の間の差異の存在あるいは欠如は、上記 CatSper2 遺伝子における変異の存在あるいは欠如を示す。いくつかの実施態様では、上記方法には、変異が、存在するかあるいは欠如しているかどうか知られている CatSper2 タンパク質に対して結合することが知られている交代と、上記 CatSper2 タンパク質の少なくとも断片を接触させるステップと、上記抗体と上記 CatSper2 タンパク質との間の結合を検出するステップと、が含まれる。他の実施態様では、上記方法には、一つの細胞における CatSper2 活性の指標を測定するステップと、一つの参考値に上記測定した指標とを比較するステップと、が含まれる。上記指標は CatSper2 タンパク質をコードする mRNA の値の指標であり、CatSper2 タンパク質の値の指標であり、上記細胞の膜にわたっているカチオンフラックスの指標であり、あるいは上記細胞の全細胞あるいはチャネル電流の指標である。いくつかの実施態様では、上記障害は CatSper2 関連不妊である。もう一つの側面では、本発明は CatSper2 遺伝子に関して対象者の遺伝子型を調べる諸方法を提供する。

30

40

【0021】

もう一つの側面では、本発明は、CatSper2 活性を減少させ、運動性を減少させ、透明帯を貫通する能力を減少させた精子によるインピトロにて受精能に関する一つの方法、あるいは透明帯が少なくとも一つの卵子から取り除かれ、また上記卵子を少なくとも

50

一つの精子と接触させる一つの方法を提供する。

【0022】

もう一つの側面では、減少させたCatSper2活性による不妊により特徴付けられる対象者を治療する方法が提供される。上記方法には、CatSper2タンパク質を発現させることができる遺伝子構築物により上記対象者の精子あるいは精子プロジェニターを形質転換するステップと、卵子を受精させるために上記対象者の形質転換された精子を使用するステップとが含まれる。代替的には、本方法には対象者の精子あるいは精子プロジェニターに対してCatSper2タンパク質を投与するステップが含まれる。

【0023】

もう一つの側面では、本発明は女性尿生殖路の中に存在する抗CatSper2抗体により起こる抗CatSper2抗体媒介不妊症を診断する諸方法を提供する。もう一つの側面では、女性尿生殖路の中に存在している抗CatSper2抗体により起こる抗CatSper2抗体媒介不妊症を治療する諸方法が提供される。

【0024】

もう一つの側面では、(a) CatSper2活性をアンタゴナイズする一つあるいはそれ以上の薬剤を本発明の分析により、同定するステップと、(b) ステップ(a)において同定された薬剤あるいはその類似体が、精子運動性あるいは卵貫通性の少なくとも一つを阻害するかどうかを判定するステップと、(c) 一つあるいはそれ以上の動物モデルにおける効果および毒性に対するステップ(b)における阻害剤としてどいて異された薬剤の治療プロファイル作成を実施するステップと、(d) 受け入れ可能な治療プロファイル作成を有するように上記ステップ(c)において同定された一つあるいはそれ以上の薬剤を含む製薬調製剤を調合するステップを含む薬剤発掘ビジネスを行う諸方法を提供する。いくつかの実施態様では、上記方法にはさらに、販売のための製薬調製剤を配布するためのシステムが含まれ、また、任意には上記製薬調製剤をマーケティングするための販売グループを確立することを含む確立するステップが含まれる。

【課題を解決するための手段】

【0025】

本発明は、精子の運動性と卵子を受精させるその能力において有意な役割を果たしている、テストされた他の組織においてではなく、男性の生殖細胞において発現される新規な電圧ゲートイオンチャネル(CatSper2)の同定と、分離と、特徴付けに部分的に依存している。上記タンパク質はそれが同定される精子特異的なものである第二カチオンチャネルであることを示すようにCatSper2と名付けられている。上記推定上のチャネルには、6つの膜貫通セグメント、上記電圧ゲートカリウムチャネルにさらに類似している構造が含まれているが、そのイオン選択ポアはそれがカルシウムチャネルであることを示している。上記mRNAは精子形成の減数分裂あるいは後減数分裂期の間に発現され、また、上記タンパク質は上記精子鞭毛に位置付けられており、精子運動性の制御におけるその役割と一致している。したがって、上記CatSper2タンパク質の活性のインヒビターは、男性と女性の避妊薬として使用することができる。

【0026】

本発明がなされたときに同業者には入手可能であった知識を本明細書においてはっきりと明示するために上記特許、科学および医学的公表物は参照されている。本明細書において引用されている発行された米国特許、公表され、また係属中の特許出願、また、その他の参考文献の全体的な開示が参考文献として本明細書に組み込まれている。特に、2001年10月22日に出願された米国仮特許出願第60/345,324号の全体的な開示は本明細書において参考文献として組み込まれている。

(定義)

本明細書において使用されている技術的および科学的用語は、以下に別に定義されているのでなければ、同業者により通常的に理解されるのと同じ意味を有することが意図されており、本明細書の中で採用されている技術は、同業者には明らかなものであると考えられる、そうした技術の変更例、あるいは等価な技術の代替物を含む同業者には通常的に理

10

20

30

40

50

解されている技術を言うことが意図されている。本発明のものである手段をさらに明確にまた正確に記述するために、以下の定義が、本明細書において用いられているある種の用語が用意されている。

【0027】

本明細書で使用されるとき、「CatSper2」という用語は、配列識別番号：2および配列識別番号：4に開示されているヒトCatSper2タンパク質、上記開示されているCatSper2タンパク質のヒト対立遺伝子およびスプライス変異体、これらヒトCatSper2タンパク質の非ヒト哺乳動物相同体（例えば、配列識別番号：6）、および機能的にそれらと等価なものなどの精子特異的カチオンチャネルを意味する。CatSper2タンパク質という用語は、精子から分離された自然発生的なタンパク質、CatSper2遺伝子により形質転換された細胞から組み換えにより産生されたタンパク質、およびCatSper2配列が、N末端あるいはC末端ポリペプチドに融合される融合タンパク質を言う。「CatSper2断片」という用語は、構造ドメインとエピトープなどのCatSper2タンパク質の断片を言う。CatSper2タンパク質の断片は少なくとも6つのアミノ酸残基から成る。

10

【0028】

本明細書で使用されるとき、「CatSper2遺伝子」という用語は、配列識別番号：2および配列識別番号：4に開示されているヒトCatSper2タンパク質、上記開示されているCatSper2タンパク質のヒト対立遺伝子およびスプライス変異体、これらヒトCatSper2タンパク質の非ヒト哺乳動物相同体（例えば、配列識別番号：6）、および機能的にそれらと等価なものを含むCatSper2タンパク質をコードする遺伝子を意味する。CatSper2遺伝子という用語は、ゲノムから分離された自然発生的な遺伝子、およびCatSper2コード領域が、イントロン配列によりあるいはイントロン配列なしで、および、CatSper2融合タンパク質を形成するために異種（すなわち、非CatSper2）配列をコード化することができる5'あるいは3'フランキング配列により、あるいは上記フランキング配列なしで、内因性あるいは外因性制御エレメントかのいずれかに操作可能に結合される組み換えにより産生される遺伝子を言う。遺伝子により形質転換された細胞から組み換えにより産生されたタンパク質、およびCatSper2配列が、N末端あるいはC末端ポリペプチドに融合される融合タンパク質を言う。「CatSper2断片」という用語は、構造ドメインとエピトープなどのCatSper2タンパク質の断片を言う。CatSper2遺伝子には、最小限で、CatSper2タンパク質に翻訳することができるmRNAに対する上記コード領域の転写を可能にする制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー）に操作可能に結合される上記タンパク質をコード化するコード領域が含まれる。

20

30

【0029】

本明細書で使用されるとき、「CatSper2」活性という用語は、CatSper2が正常に発現される細胞あるいは細胞型の中で発現される場合に、また、CatSper2が正常に発現される条件下で野生型CatSper2タンパク質のいずれかの正常な生物学的活性を意味する。こうした活性には、イオン電流の誘導と、cAMP誘導Ca²⁺流入の媒介と、CatSper2-/-精子において発現されるときに精子運動性の回復と、および/またはCatSper2-/-精子が発現されるときに卵を貫通する能力の回復とを含めることができる。CatSper2活性は、精細胞あるいは精母細胞において測定することができ、あるいはいずれかの必要なアクセサリ因子が存在するその他の細胞の中で測定することができる。

40

【0030】

核酸およびアミノ酸配列に関して本明細書において使用されるとき、「同定」という用語は、同定を最大のものとし、また、それが同一のヌクレオチドあるいは残基の数の関数であり、また、総ヌクレオチドあるいは残基の数であり、また、上記配列整列におけるギャップの存在および長さである、上記配列の整列に基づいて2つの配列の類似の程度を測定することを意味する。さまざまなアルゴリズムとコンピュータプログラムは、標準的な

50

パラメータを用いて配列同一性を測定するのに有用である。例えば、ギャップを付けた B L A S Tあるいは P S I - B L A S T (A l t s c h u l r a (1 9 9 7) , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2) 、 B L A S T (A l t s c h u l r a (1 9 9 0) , J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0) と、 S m i t h - W a t e r m a n (S m i t h r a (1 9 8 1) , J . M o l . B i o l . 1 4 7 : 1 9 5 - 1 9 7) である。本明細書で使用されるとき、パーセント同一性は上記 B L A S T アルゴリズムに対するデフォルト値に基づいたものである。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用されるとき、「相同性」という用語は、また、参照タンパク質との実質的、保存構造および機能的な類似に対して進化的に関連し、また、それを分かち合っているタンパク質であるが、しかし、異なる種（例えば、ヒト、ラットおよび昆虫 C a t S p e r 2 タンパク質は互いに相同体である）において天然に存在するタンパク質を意味する。

10

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用されるとき、「変異」という用語は、ある種の参考配列に関して、対応しているコードタンパク質配列における変化として発現されるかどうか、核酸配列における変化を言う。上記参考配列は「野生型」配列（すなわち、「正常」表現型に対応している一つの集団における一つあるいはそれ以上の高頻度配列）あるいはいずれかの他の配列でありうる。本明細書で使用されるとき、変異という用語は、遺伝子多型という用語と同意語であることが意図されており、また、したがって、いずれかの2つの非同一配列の間

20

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用されるとき、「外因性」あるいは「異種性」という用語は、2つあるいはそれ以上の遺伝子配列に関して、遺伝子配列が、天然においては互いに同一の物理的関係においては起こらない、および/または同一のゲノム内では天然においては起こらないことを言う。例えば、遺伝子構築物には、一つあるいはそれ以上の制御エレメントに操作可能に結合されるコード領域を含めることができ、また、そうした配列は、天然においては操作可能に結合されていない場合、および/またはそれらが天然においては同一のゲノムの中では見つからない場合は、異種性のものであるとみなされる。同様に、一つの細胞に導入される遺伝子構築物は、その細胞の中で見つからない遺伝子配列をそれが含んでいる程度にその細胞に対して異種性があると考えられる。さらに、天然発生配列に基づいている合成により産生された遺伝子配列は、その配列が改変された程度に即して、また、上記合成配列が天然においては存在しないその程度に即して上記天然に発生する配列に対して異種性があるものとなる。一つの種の一つの配列の対立遺伝子変異体は互いに異種性のものであるとはみなされない。

30

【 0 0 3 4 】

本明細書において使用されるとき、「操作可能に結合された」という用語は、上記制御エレメントの一つあるいはそれ以上に結合することができる R N A ポリメラーゼにより上記コード領域が m R N A の中に転写させることができる遺伝子制御エレメントと遺伝子コード領域の共有結合および機能的なリンケージを言う。したがって、制御エレメントを含む制御領域は、上記制御領域内にある一つのプロモーターへの結合が許容される条件下で、また、m R N A の中への上記コード領域の転写を引き起こすことが許容される条件下で R N A ポリメラーゼが可能であるときにコード領域に操作可能に結合される。この文脈においては、許容される条件には、インビトロ転写システムに関しては同業者には公知のものであるように、構成プロモーターのための標準的な細胞内条件、標準的な条件、およびリプレッサーの欠如、あるいは抑圧可能/誘導可能なプロモーターのための誘導物質の存在、適当なインビトロ条件が含まれる。

40

本明細書において使用されるとき、「発現」という用語は、一つの遺伝子の一つのコード

50

配列が、一次 mRNA 転写の中に転写され、上記一次 mRNA 転写が成熟 mRNA の中に処理して入れ、また、上記成熟 mRNA は一つのタンパク質の中に翻訳されるそのプロセスを言う。発現にはその結果生じるポリペプチドの翻訳後修飾が任意には含めることができる。

【0035】

本明細書において使用されるとき、「CatSper2 タンパク質をコード化する遺伝子構築物」という慣用句は、上記 CatSper2 タンパク質の上記アミノ酸配列をコード化する遺伝子配列、あるいはそれをコードする遺伝子配列に相補的なものであり、あるいは、それをコード化する遺伝子配列に相補的なものであり、また、上記構築物により形質転換された一つの細胞の中で発現されることが可能である遺伝子配列を含む組み換え DNA, RNA, DNA-RNA ハイブリッド、あるいは核酸類似体分子を意味する。上記構築物は一過性に上記 CatSper2 タンパク質を発現することができ、あるいは、上記細胞の上記ゲノムの中に安定的に組み込むことができ、また、条件にのっとって、あるいは構成的に上記タンパク質を発現させることができる。

10

【0036】

本明細書において使用されるとき、「ベクター」という用語は、細胞間で遺伝子配列を移動することができる、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオン、その他などのいずれかの遺伝子構築物を意味する。ベクターは複製、発現および挿入あるいは組み込みの一つあるいはそれ以上を行うことができるが、それらの能力の一つ一つを全て所持する必要はない。このように、この用語には、クローニング、発現、相同性組み換え、およびノックアウトベクターが含まれる。

20

【0037】

本明細書において使用されるとき、遺伝子工学に関して、「形質転換」という用語は、その細胞あるいは組織の中で発現されるポリペプチド配列をコードし、および/または一つの遺伝子座の発現を実施するようにその細胞あるいは組織のゲノムの中に組み込まれるその細胞あるいは組織内で複製する外因性核酸あるいは核酸類似体を細胞あるいは組織の中に導入することを意味する。「形質転換」という用語は、形質転換、トランスフェクション、形質導入、電気穿孔法、弾道的注入などとして同業者には言われている諸方法に限定手されるわけではないが、それらを含む、核酸、あるいは核酸類似体などを導入するさまざまな方法の全てを包括するのに使用される。

30

【0038】

本明細書において使用されるとき、「核酸類似体」という用語は、相補的な核酸の配列特異的順方向および逆転写を指示し、また、生体細胞内にあるコード化されたポリペプチドの配列特異的翻訳を指示する核酸に対する十分な構造的および機能的類似性を有する分子を意味する。本明細書において使用されるとき、「核酸」という用語が使用されるときはいつでも、その用語は、こうした類似体を使用するという文脈において有用である、あるいは適当であると考えられるときに、核酸類似体を包括することが意図されている。

【0039】

本明細書において使用されるとき、「リポーター遺伝子」という用語は、発現されるとき、検出可能である生化学あるいは表現型効果を有するいずれかの遺伝子配列を意味する。リポーター遺伝子はまた、「マーカー」遺伝子として同業者には公知のものである。

40

【0040】

本明細書において使用されるとき、「抗体」という用語は、天然において産生される抗体、組み換えにより産生される抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、Fv 断片、一本鎖 Fv 断片(scFv)を包括することが意図されている。

【0041】

本明細書において使用されるとき、アゴニスト、あるいはアンタゴニスト、あるいはエンハンサー、あるいはリプレッサーの「効果的な用量」という用語は、検出可能な生化学的あるいは表現型の特性の統計的に有意な変化を起こすのに十分なものである組成の活性化成分の総量を意味する。胆道で投与される個々の活性化成分に適用されるとき、その用

50

語はその単独成分を言う。一つの組み合わせに適用されるとき、上記用語は組み合わせて投与されるか、連続してか、あるいは同時にか投与されるかどうか、その効果を結果的に生じる上記活性成分の組み合わせた用量を言う。

【0042】

本明細書において使用されるとき、「実質的に純粋な」という用語は、その他の意図的に含められた化合物の重量を除く興味の対象となっている上記タンパク質の少なくとも60%(乾燥重量で)を含む調製剤を意味する。いくつかの実施態様では、上記調製剤はその他の意図的に含められた化合物の重量を除く興味の対象となっている少なくとも75%、少なくとも90%あるいは少なくとも99%タンパク質である。純度は、例えば、カラムクロマトグラフィ、ゲル電気穿孔法、アミノ酸組成分析あるいはHPLC分析などのいずれかの適当な方法により測定することができる。一つの調製剤には意図的に、本発明の二つあるいはそれ以上の異なるタンパク質が含まれており、「実質的に純粋な」調製剤は、その他の意図的に含まれている化合物の重量を除外して、総乾燥重量の少なくとも60%である。本発明の2つあるいはそれ以上のタンパク質を含有する調製剤に関しては、本発明のタンパク質の総重量は、その他の乾燥重量の少なくとも75%、少なくとも90%、あるいは少なくとも99%となるはずである。したがって、本発明の上記タンパク質が投与、安定性、保存、などの目的で一つあるいはそれ以上のその他の化合物と混合される場合(例えば、希釈剤、安定剤、洗浄剤、賦形剤、塩、砂糖、脂質)、こうしたその他の化合物の重量は上記調製剤の純度の計算においては無視される。

10

【0043】

本明細書において使用されるとき、「調節する」あるいは「影響を及ぼす」という用語は増加するかあるいは減少するかのいずれかを意味する。本明細書において使用されるとき、「増加」あるいは「減少」という用語はそれぞれ統計的に有意に増加する(すなわち、 $p > 0.1$)、また統計的に有意に減少する(すなわち、 $p < 0.1$)ことを意味する。

20

【0044】

本明細書において使用されるとき、「AをBと接触させる」という語句におけるように「接触される」という用語は、溶液の中でAとBと一緒に混合することにより、あるいは基板の上でAの溶液をBの上に注ぐことにより、分子レベルで相互作用するように十分な物理的近位にAとBはもってこられることを意味する。本明細書において使用されるとき、「AをBと接触させる」という語句は、「BをAと接触させる」と等価であることが意図されており、また、いずれかのエレメントがその他に対して相対的に固定されているか、あるいはその他に対して相対的に移動されることを暗に言うことを意図されている。

30

(数値範囲)

本明細書において使用されるとき、変数に対する数値範囲の詳説は、本発明がその範囲内にある値のいずれかに等しい変数で実施することが可能であるということを伝えることを意図されている。したがって、固有に離散している変数に関しては、その範囲のエンドポイントを含めて、数値的な範囲のそれぞれの整数値に等しくすることができる。同様に、固有に連続のものである変数に関して、上記変数は、その範囲のエンドポイントを含めて、数値範囲のそれぞれの実数に等しくすることができる。例として、0と2の間の値を有するものとして説明される変数は、固有に離散している変数に関しては0.1あるいは2でありうるし、また、0.0、0.1、0.01、0.001あるいは固有に連続している変数に関して2のいずれかのその他の実数値でありうる。

40

(または)

本明細書において使用されるとき、特にそのように示されていない限りは、「または」という言葉は、「および/または」の「包括」感覚であって、「いずれか/または」の「排除」感覚ではない場合に使用される。

(一般的な考察)

本発明は、精細胞において発現されるカチオンチャンネルタンパク質の同定、分離および特徴付けに部分的に依存しており、本発明は、テストされた他の組織においてではなく、精子の運動性と卵子を受精させるその能力において有意な役割を果たしている。上記タン

50

パク質はそれが同定される精子特異的なものである第二カチオンチャネルであることを示すようにCatSper2と名付けられている。上記タンパク質は上記精子鞭毛上に存在しており、精子運動性の制御におけるその役割と一致している。したがって、上記CatSper2タンパク質の活性の阻害剤は、一時的な、可逆的な避妊を生じる男性および/または女性による精子阻害避妊薬として使用することができる。

【0045】

予測CatSper2 ORFは、6つの膜貫通セグメントにより一つのタンパク質をコードする(図1(A)、配列識別番号:1、配列識別番号:3、配列識別番号:5)。上記配列は上記電圧ゲートカルシウムチャネルファミリー(Cav)に対する類似性を示し、また、運動性と正常受精にとって重要であることが最近見出されたもう一つの精細胞特異的推定カチオンチャネルであるCatSper1にもっとも類似している(図1(B))(Renら(2001)、同上)。したがって、CatSper2とCatSper1はイオンチャネルの新しいファミリーを定義している(Saier(2000), J. Membr. Biol. 175:165-80; Catterall(2000), Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16:521-55)。このファミリーの特徴には、セグメント全体にわたっている6つの膜を有する単一膜貫通領域と、見掛けのS4電圧センサ、電圧ゲートカルシウムとナトリウムチャネルにおける4つの膜貫通反復を有する予測カルシウム選択ポア領域と膜貫通領域の全体的な配列類似性とを組み合わせたKvとHCNチャネルにより共有されている特性の存在が含まれる。

10

20

(CatSper2核酸)

一つの側面では、本発明は、上記CatSper2タンパク質あるいはその有用な断片をコード化する核酸分子あるいは核酸類似体を提供する。上記ヒトCatSper2遺伝子の2つのDNAが同定され、また、互いの見掛けのスプライス変異体となる。これら配列は、配列識別番号:1と配列識別番号:3として、また、Genbank寄託番号AF411817とGenbank寄託番号AF411819としてそれぞれ開示されている。マウス類似体のその完全長cDNA配列は配列識別番号:5として、また、Genbank寄託番号AF411816として開示されている。

【0046】

本発明の核酸分子は、DNAあるいはRNA分子あるいはハイブリッドDNA-RNA分子でありうる。本発明の上記核酸類似体は、インビトロ翻訳あるいはアンチセンス技術において有用なものである、修飾塩基(例えば、2'-ハロゲン-2'-デオキシヌクレオチド)を含めたペプチド核酸、類似体および/または修飾インターヌクレオチドリッジ(例えば、ホスホロチオエートリッジ)を含めた類似体などの同業者には公知のものであるそうしたもののいずれかでありうる。上記核酸はCatSper2遺伝子配列の全部あるいは一部に相当するセンス分子でありうるものであり、あるいは上記核酸はCatSper2遺伝子配列の全部あるいは部分に対して相補的なものであるアンチセンス分子でありうる。上記核酸はゲノムDNAあるいはcDNAにから誘導することが可能であり、あるいはそれに相当する、あるいは上記核酸は、CatSper2タンパク質配列と上記遺伝子コード(例えば、発現系で使用されている宿主細胞においてコドン使用好適性を反映している合成核酸)に基づく合成分子でありうる。

30

40

【0047】

いくつかの実施態様では、上記CatSper2核酸は、CatSper2遺伝子の全コード領域から成る(例えば、配列識別番号:1、配列識別番号:3あるいは配列識別番号:5)。こうした核酸は、細胞の形質転換のための遺伝子構築物を産生するのに、インビトロ転写および翻訳系のための遺伝子構築物を産生するのに使用することができる。こうした核酸はまた、その他の核酸のサンプルにおいてCatSper2配列を検出するためにハイブリダイゼーション分析におけるプローブとして使用することもできる。

【0048】

他の実施態様では、上記CatSper2核酸配列のサブセットは、核酸増幅反応のためにプライマーとして、他の核酸のサンプルにおけるCatSper2配列を検出するた

50

めにハイブリダイゼーション分析におけるプローブとして、あるいは、異常あるいは変異体配列から正常あるいは野生型配列を識別するためにプローブとして使用されるように用意される。これら実施態様では、本発明の上記核酸は配列識別番号：1などのCatSper2配列から選択される少なくとも10, 12, 14, 16, 18連続ヌクレオチドから成る。適用の性質により、一意的な標的を有することになる、あるいは探索されるあるいは増幅されるサンプル内で、一意的な標的を有することが予測されるCatSper2配列を選択することが好ましいものとなりうる。したがって、例えば、より長い配列および高頻度反復エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含まない配列がいずれかの所定のサンプル内で一意的に呈示される可能性が高い。増幅反応のためのプライマーを選択する目的で、少なくとも15ヌクレオチドの配列、また典型的には18 - 25ヌクレオチドの配列が使用される。

10

【0049】

いくつかの実施態様では、CatSper2タンパク質の構造ドメインをコード化し、あるいは抗体の産生のためにエピトープとして役に立たせることができる上記タンパク質の断片をコード化する核酸が提供される。したがって、例えば、有用な核酸には、CatSper2タンパク質の膜貫通ドメインをコード化するもの（すなわち、配列識別番号：2の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340と；配列識別番号：4の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340と；配列識別番号：6の近接残基102 - 124、144 - 164、174 - 193、204 - 227、239 - 260、314 - 338と、それらの対立遺伝子変異体と類似体）、膜貫通ドメイン間にある細胞外ループをコード化するもの（すなわち、；配列識別番号：4の近接残基127 - 145、196 - 205、265 - 315、；配列識別番号：6の近接残基125 - 143、194 - 203、261 - 313、それらの対立遺伝子変異体と類似体）、あるいはポア領域をコード化するもの（すなわち、配列識別番号：2の近接残基280 - 303と、配列識別番号：4の近接残基280 - 303と、配列識別番号：6の近接残基278 - 301と、それらの対立遺伝子変異体と類似体）が含まれる。その他の有用な核酸には、以下で説明されている標準的な配列分析技術により同定されるような、上記CatSper2タンパク質の潜在的なエピトープをコード化するのが含まれる。したがって、例えば、有用な核酸には、以下のヒトCatSper2配列をコード化するもの、すなわち、配列識別番号：2の近接残基266 - 275、386 - 400、447 - 458、482 - 494、配列識別番号：4の近接残基66 - 99、266 - 275、394 - 414、配列識別番号：6の近接残基64 - 89、262 - 275、562 - 588が含まれる。その他の有用なエピトープには、こうしたエピトープの対立遺伝子と非ヒト哺乳動物類似体が含まれる。

20

30

【0050】

いくつかの実施態様では、CatSper2タンパク質の少なくとも構造ドメインに対して少なくとも80%, 85%, 90%, あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドをコード化する核酸が提供される。いくつかの実施態様では、CatSper2タンパク質の膜貫通ドメインに対して少なくとも80%, 85%, 90%, あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有するポリペプチドをコード化する核酸が提供される（例えば、すなわち、配列識別番号：2の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340；配列識別番号：4の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340；配列識別番号：6の近接残基102 - 124、144 - 164、174 - 193、204 - 227、239 - 260、314 - 338と、それらの対立遺伝子変異体と類似体）、膜貫通ドメイン間にある細胞外ループをコードするもの（すなわち、；配列識別番号：4の近接残基127 - 145、196 - 205、265 - 315と、；配列識別番号：6の近接残基125 - 143、194 - 203、261 - 313と、それらの対立遺伝子変異体と類似体）、あるいはポア領域をコードするもの（すなわち、配列

40

50

識別番号：2の近接残基280-303と、配列識別番号：4の近接残基280-303と、配列識別番号：6の近接残基278-301と、それらの対立遺伝子変異体と類似）が提供される。いくつかの実施態様では、CatSper2タンパク質に対して少なくとも80%，85%，90%，あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有し、また、CatSper2活性を有するポリペプチドをコードする核酸が提供される。CatSper2活性を示すタンパク質の能力は、CatSper2-/-変異体（例えば、CatSper2ノックアウト変異体）を補足し、また、CatSper2活性を発現させることがそうでなければできない細胞内のCatSper2+/+表現型（例えば、精子の運動性を回復させるため）を回復させる能力により測定することができる（例えば、上記CatSper2-/-変異体から得られる精細胞）。

10

【0051】

他の実施態様では、厳密な条件下でCatSper2コード配列（例えば、配列識別番号：1あるいは配列識別番号：3あるいは配列識別番号：5）の少なくとも一部にハイブリダイズされる分離核酸が提供される。こうした条件には、65で1.0xSSCという洗浄ステップとそれに等価のものが含まれる。さらに緊縮条件には、0.5xSSCという洗浄ステップ、0.2xSSCという洗浄ステップ、あるいは0.1xSSCという洗浄ステップを含めることができる。その他の等価な緊縮条件が同業者には周知のものとなっている。これについては、例えば、Ausubelら編（1989）“Current Protocols in Molecular Biology”、第I巻、John Wiley & Sons社刊、ニューヨーク市を参照のこと。いくつかの実施態様では、上記核酸は、CatSper2活性を有するポリペプチドをコード化する。

20

【0052】

もう一つの側面では、本発明は、CatSper2活性を有するポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列が、上記CatSper2配列が発現されるような異種制御領域に操作可能に結合される、細胞内で分離あるいはその中に存在しているかのいずれかである核酸を提供する。したがって、いくつかの実施態様では、異種制御領域は、それが内因性CatSper2配列に操作可能に結合される染色体の中に挿入することができる。ある種の実施態様では、上記ポリペプチドは、配列識別番号：2あるいは配列識別番号：4あるいは配列識別番号：6のアミノ酸配列に対して少なくとも80%，85%，90%，あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有する。他の実施態様では、上記ポリペプチドをコード化する上記核酸は65で1.0xSSC、0.5xSSC、0.2xSSC、あるいは0.1xSSCという洗浄ステップを含む条件下で、配列識別番号：1あるいは配列識別番号：3あるいは配列識別番号：5の核酸の少なくとも一部にハイブリダイズされる。

30

【0053】

いくつかの実施態様では、本発明の上記核酸は、長さにして少なくとも50アミノ酸残基、あるいは長さにして少なくとも100，200，あるいは300アミノ酸残基のCatSper2配列を含むポリペプチドをコード化する。これらポリペプチドには少なくとも一つの膜貫通ドメイン、少なくとも一つの細胞外ループドメイン、少なくともポア領域あるいはそれらを組み合わせたものを含むCatSper2配列が含まれ得る。いくつかの実施態様では、上記ポリペプチドはCatSper2活性を有する。こうした活性にはイオン電流の誘導、cAMP誘導Ca²⁺流入、CatSper2-/-精子において発現される場合の精子運動性の回復、および/またはCatSper2-/-精子において発現される場合に卵を受精する能力の回復が含まれ得る。

40

【0054】

もう一つの側面では、本発明はCatSper2核酸（すなわち、CatSper2ゲノムDNA，mRNA，cDNAあるいはそれらの増幅産物）の少なくとも一部を検出するためのキットを提供する。上記キットには、一つのプローブとして本発明の分離核酸と、上記プローブを検出するための手段とが含まれる。上記プローブを検出するための上記手段は、上記第一プローブを検出するための上記プローブあるいは二次核酸プローブに結

50

合された検出可能な標識でありうる（例えば、上記分離核酸に特異的にハイブリダイズされる標識化二次核酸）。

（遺伝子構築物）

もう一つの側面では、本発明はCatSper2遺伝子から選択された配列から成る遺伝子構築物を提供する。いくつかの実施態様では、上記CatSper2遺伝子配列が上記CatSper2遺伝子のコード領域から選択され、また、他の実施態様では、上記CatSper2遺伝子配列は、転写開始コドンの5'末端からおよそ1,000塩基伸長している上記CatSper2制御領域、および上記終止コドンの3'からおよそ1,000塩基伸長している上記CatSper2制御領域から選択することができる。

【0055】

実施態様の一つのシリーズにおいては、CatSper2コード（例えば、全コード領域、構造ドメインをコード化する配列、潜在のエピトープをコード化する配列、あるいは有用なプライマー、あるいはプローブをコード化する配列）は、一つの発現構築物を形成するために内因性あるいは外因性制御領域に操作可能に結合される。こうした目的のために有用な制御領域には、上記内因性CatSper2制御領域、構成プロモーター配列（例えば、CMV, SV40, EF2）、誘導可能なプロモーター配列（例えば、lacZ, tet）が含まれる。多くの有用なベクター系は商業的に入手可能である。例えば、有用な細菌ベクターには、pQE70, pQE60, pQE-9（Qiagen社、カリフォルニア州Valencia市）、pBluescript ITM（Stratagene社、カリフォルニア州La Jolla市）、およびpTRC99a, pKK223-3, pDR540およびpRIT2T（Pharmacia社、ニュージャージー州Piscataway市）、pTrc（Amanr（1988）, Gene69:301-315）およびpET11d（Studierら（1990）, Methods in Enzymol. 185:60-89）に限定されるわけではないが、それらが含まれる。酵母菌における発現のためのベクターの実施例は、pYepSec1（Baldariら（1987）, EMBO J. 6:229-234）、pMFA（Kurjanら（1982）, Cell 30:933-943）、pJRY88（Schultsら（1987）, Gene54:113-123）、およびpYES2（Invitrogen社、カリフォルニア州San Diego市）が含まれる。上記CatSper2タンパク質もまたpAcベクター（Smithら（1983）, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165）およびpVLベクター（Lucklowら（1989）, Virology 170:31-39）に限定されるわけではないが、それらを含むバキュロウイルス発現ベクターを用いる昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）において発現させることができる。哺乳動物発現ベクターの実施例には、pCDM8（Seed（1987）, Nature 329:840）およびpMT2PC（Kaufmanら（1987）, EMBO J. 6:187-195）に限定されるわけではないが、それらが含まれる。その他の有用な真核細胞ベクターには、pXT2, pSG5（Stratagene社、カリフォルニア州La Jolla市）およびpSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40（Pharmacia社、ニュージャージー州Piscataway市）に限定されるわけではなく、それらが含まれる。したがって、形質転換される宿主細胞に対する適当なベクター系を選択することが同業者にはできる。

【0056】

他の実施態様では、上記ベクターは、「ノックアウト」ベクターにおける欠損あるいは部分CatSper2配列から成る。こうしたベクターは同業者には周知のものであり、内因性遺伝子が上記内因性配列内での変異を導入する部分的に相同性外因性配列により組み合わせることにより「ノックアウト」されるトランスジェニック生体組織を産生するのに使用することができる。典型的には、上記ベクターは、興味の対象となっている遺伝子の全部あるいは部分でありうる内因性標的配列に方向付けられる。上記ベクターには、上記標的の上記5'および3'末端に対して相同性のある5'および3'フランキング配列が含まれる。上記5'および3'フランキング配列との間には上記変異を含む配列がある

10

20

30

40

50

。上記変異は終結変異、フレームシフト変異、大きな欠失、あるいは上記内因性遺伝子を破壊し、また、成功裏に相同性組み換え体を同定するためにマーカーとして働くという両方で役に立つ新しいコード配列の導入でもありうる。ノックアウトベクターはさらに以下で論議される。

【0057】

もう一つの実施態様のシリーズでは、上記CatSper2コード配列は、融合タンパク質をコード化する遺伝子構築物あるいは融合ベクターを形成するために制御領域と外因コード配列に結合させることができる。いくつかの実施態様では、上記CatSper2コード配列は、上記融合タンパク質に対して新しいまた有用な特性を付与する外因性コード配列に結合させることができる。例えば、融合ベクターと融合タンパク質は、上記CatSper2タンパク質の発現を増加させるのに、上記CatSper2タンパク質の溶解度を増加させるのに、あるいは上記CatSper2タンパク質の精製において補助するのに有用なものとして行うことができる（例えば、親和性精製のためのリガンド配列を提供することより）。上記CatSper2タンパク質を上記融合部分から容易に分離することができるようにタンパク分解性切断部位は、上記CatSper2と上記非CatSper2タンパク質配列の接合点で導入することができる。典型的な融合発現ベクターには、上記標的組み換えタンパク質に対してグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、あるいはタンパク質Aを融合するpGEX（Smithら（1988）、Gene67:31-40）、pMAL（New England Biolabs社、マサチューセッツ州Beverly市）およびpRIT5（Parma 10
20
cia社、ニュージャージー州Piscataway市）が含まれる。

【0058】

もう一つの実施態様のシリーズでは、リポーター遺伝子からの上記コード領域はCatSper2遺伝子の上記制御領域に操作可能に結合される遺伝子構築物が産生される。こうした遺伝子構築物は、上記CatSper2遺伝子の転写を促進するかあるいは退行させることによりCatSper2遺伝子発現を促進するかあるいは退行させる化合物を同定するあるいは特徴付けるためにアッセイにおいて有用である。広範なさまざまな適当なリポーター遺伝子は同業者には公知のものであり、また、商業的に入手可能である。実施例には、上記lacZ、ルシフェラーゼと緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子に限定されるわけではないが、それらが含まれる。 30

【0059】

有用なCatSper2制御エレメントには、5'直後1,000ヌクレオチドから上記CatSper2転写開始部位までで選択された少なくとも100-1,000,200-800,あるいは300-700連続ヌクレオチドに対して少なくとも80%ヌクレオチド同一性を有する配列が含まれる。有用な制御エレメントは、CatSper2遺伝子が発現される哺乳動物細胞の中のエレメントに操作可能に結合されるコード配列の転写を促進する能力を保持している。特に、有用な制御エレメントは、上記エレメントが誘導された上記CatSper2遺伝子が発現される、あるいはそのCatSper2遺伝子の類似体が発現される細胞における転写を促進する能力を保持している。

（形質転換細胞系統）

もう一つの側面では、本発明は本発明の上記核酸分子により形質転換された細胞系統を提供する。こうした細胞系統は単にこれら核酸を増殖することができ（例えば、クローニングベクターにより形質転換されるとき）あるいはこれら核酸によりコード化される上記ポリペプチドを発現することができる（例えば、発現ベクターにより形質転換されるとき）。こうした形質転換細胞系統は、本発明の上記CatSper2タンパク質とCatSper2断片を産生するのに使用することができ、あるいは、CatSper2発現あるいは活性を促進する、退行させる、アゴナイズする、あるいはアンタゴナイズする化合物に関してスクリーニングするのにアッセイにおいて使用することができる。 40

【0060】

上記形質転換細胞は、その細胞において発現されるポリペプチド配列をコードする、お 50

よび/または、遺伝子座の発現に影響を及ぼすようにその細胞のゲノムの中に組み込まれる、その細胞内で複製する外因性核酸あるいは核酸類似体を一つの細胞の中に導入することにより産生することができる。上記形質転換は、形質転換、トランスフェクション、電気穿孔法、軌道式注入などとして、同業者には言及されている標準的な諸方法のいずれかにより達成することができる。形質転換の上記方法は、形質転換されている細胞の型と上記細胞の中に導入される上記遺伝子構築物の性質に適当なものであるように選択される。

【0061】

形質転換のために有用な細胞系統には、細菌細胞（例えば、*Escherichia coli*）、酵母菌（例えば、*Saccharomyces cervisiae*）、昆虫細胞（例えば、*Drosophila melanogaster Schneider* 細胞）、線形動物細胞（例えば、*Caenorhabditis elegans*）、両生類動物細胞（例えば、*Xenopus Oocytes*）、げっ歯類動物細胞（例えば、*Mus musculus*（例えば、マウス3T3線維芽細胞）、*Rattus rattus*、チャニーズハムスター卵巣細胞（例えば、CHO-K1））、およびヒト細胞（例えば、ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト胎児性腎細胞（例えば、HEK-293細胞））が含まれる。これらとその他の多くの細胞の型が上記CatSper2タンパク質を産生する目的で形質転換することができるが、予備的な研究では、CHO-K1とHEK-293細胞の形質転換は、チャンネル電流のパッチクランプ測定により測定されるようには、検出可能なCatSper2活性を生じるという結果にはならないことが分かった。これら後者の細胞はCatSper2活性に必要とされる精子の中には存在しているコファクターあるいはアクセサリタンパク質、機能的チャンネル組織のためには必要なものとされる構造的属性、あるいは必要とされるCatSper2翻訳後処理、あるいは局在化機構を欠いているように見える。酵母菌2ハイブリッドアプローチ法と共免疫沈降のアプローチは、CatSper2活性のモジュレータを含むCatSper2アクセサリ、会合あるいは相互作用タンパク質を同定するためにライブラリーをスクリーニングするのに使用することができる。

【0062】

適当な細胞を、CatSper2タンパク質、CatSper2タンパク質の融合タンパク質、あるいはCatSper2制御領域の制御下にあるマーカートンパク質を含むCatSper2タンパク質を産生するために上述の遺伝子構築物のいずれかにより形質転換することができる。

【0063】

上記細胞は、形質転換されている上記細胞の型に適当なものであることが同業者には公知のものであるいずれかの方法により形質転換することができる。適当な諸方法には、例えば、Sambrookら（1989）、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories 刊、ニューヨーク；とDavisら（1986）、*Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier 社刊が含まれる。特定の諸方法には、カルシウムリン酸共沈降法（Grahamら（1973）、*Virology* 52: 456-467）、培養細胞への直接マイクロインジェクション（Capacci（1980）、*Cell* 22: 479-488）、電気穿孔法（Shigekawaら（1988）、*BioTechniques* 6: 742-751）、リポソーム媒介遺伝子移入、（Manninoら（1988）、*BioTechniques* 6: 682-690）、脂質媒介形質導入（Felgnerら（1987）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417）、核酸デリバリー高速微粒子銃（Keinら（1987）、*Nature* 327: 70-73）が含まれる。（トランスジェニック動物）

本発明はまた野生型、対立遺伝子変異体、キメラあるいはアンチセンスCatSper2配列が発現される、あるいは、CatSper2配列が不活性化あるいは欠失した（例えば、「ノックアウト」構築物）あるいは、リポーターあるいはマーカー遺伝子（例えば

、「ノックインリポーター」構築物)トランスジェニック非ヒト動物モデルの生産が用意されている。上記CatSper2配列は上記トランスジェニック動物に対して同種のもの(例えば、トランスジェニックマウスにおけるマウス配列)あるいは上記トランスジェニック動物に対して異種のものでありうる。こうしたトランスジェニック動物では、上記トランスジェニック配列は誘導可能に、構成的にまた、異所性に発現させることができる。発現は組織特異的なものかあるいは広範な組織的なものでありうる。CatSper2遺伝子産物を正常には含有していない組織および細胞におけるCatSper2配列の遺伝子工学的な発現は、カチオン流入の新規な改変を引き起こすことができ、また、新規な細胞あるいは組織表現型につなげることができる。CatSper2配列の発現の異所性あるいは改変レベルは細胞、組織および/または発生上の表現型を改変することができる。トランスジェニック動物は、CatSper2活性における欠陥から生じる障害のモデルとして有用である。

10

【0064】

トランスジェニック動物はまた、CatSper2活性に対するその効果に関して化合物をスクリーニングするためには有用である。リポーター構築物により形質転換されたトランスジェニック動物は、CatSper2遺伝子およびインピボにおけるタンパク質の発現に対する小さな分子あるいは薬物あるいは物理的動揺の転写効果を測定するのに使用することができる。本発明の上記トランスジェニック動物は治療的有効性に関するこうした化合物をスクリーニングするのに使用することができる。

【0065】

20

本発明の上記動物モデルに使用されるのに適当なものである動物種には、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、および非ヒト霊長類(例えば、アカゲザル、チンパンジー)に限定されるわけではないが、それらが含まれる。初期の研究に関しては、トランスジェニックげっ歯(例えば、マウス)は、維持が比較的容易であり、また寿命が短いため、使用することができる。

【0066】

本明細書の中で開示され、そうでない場合は有用なものとされる上記核酸を使用して、一つのトランスジェニック動物を作り出すいくつかの実施態様がある。このように有用な動物モデルには、(1)CatSper2遺伝子の少なくとも一つの機能的断片をコードする配列が、外因性かあるいは内因性プロモーターエレメントかあるいはいずれかの制御下で、付加的な遺伝子として、また、ミニ遺伝子(すなわち、取り除いたイントロンによるcDNAに基づいた上記CatSper2遺伝子の遺伝子構築物)あるいは大きなゲノム断片として上記動物のゲノムの中に組み換え工学的に導入されている動物、(2)CatSper2遺伝子の少なくとも一つの機能的断片をコードする配列が相同性組み換えあるいは遺伝子標的により、上記動物の内因性CatSper2遺伝子の一つあるいは両方のコピーに組み換え工学的に置換されている動物、(3)上記動物の相同性CatSper2遺伝の一つの一つあるいは両方のコピーが相同性組み換えあるいは遺伝子標的により上記ヒト相同体をコードする配列の上記部分的置換により組み換え工学的に「ヒト化」されている動物、(4)リポーター遺伝子をコードする配列により相同性組み換えにより上記内因性CatSper2遺伝子が置換されている動物、(5)上記動物のCatSper2配列の一つあるいは両方のコピーが、相同性組み換えにより一つあるいはそれ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、あるいは置換により部分的にあるいは完全に不活性化されている「ノックアウト」動物が含まれる。本発明のこうしたまたその他のトランスジェニック動物は、上記CatSper2遺伝子および/またはタンパク質における欠陥から生じる不妊あるいはその他の障害のモデルとして有用である。こうした動物はまた、上記CatSper2遺伝子および/またはタンパク質に対するその効果に関して化合物をスクリーニングするために有用である。

30

40

【0067】

動物モデル(例えば、トランスジェニックマウス)を産生するには、野生型あるいは対立遺伝子変異体CatSper2配列あるいは野生型あるいはCatSper2タンパク

50

質の少なくとも一つの機能的断片をコードする組み換え核酸の対立遺伝子変異体は、卵母細胞あるいは胚性幹細胞マイクロインジェクションあるいはこうした細胞の形質転換のその他の諸方法といった標準的な技術を使用して生殖系統あるいは幹細胞の中に挿入することができる。代替的には、成体（成人）から採取した他の細胞を用いることができる。こうしたあるいは同様のプロセスにより産生された動物はトランスジェニックと呼ばれる。同様に、それが、内因性 *CatSper2* 配列をタ活性化するあるいは置換することが所望されている場合は、卵母細胞、胚性幹、あるいはその他の細胞を用いて相同性組み換えを用いることができる。こうしたあるいは土曜のプロセスにより産生された動物は、「ノックアウト」（不活性化）あるいは「ノックイン」（置換）モデルと呼ばれる。

【0068】

卵母細胞インジェクションに関しては、本発明の上記組み換えDNA構築物の一つあるいはそれ以上のコピーを、ちょうど受精された卵母細胞の前核の中に挿入することができる。この卵母細胞はその後偽妊娠育成母の中に再び移植される。生きて生まれた動物は、標準的なDNA/mRNA分析法（例えば、子孫マウスの尾部静脈から採取）を使用して、上記挿入された組み換えトランスジェニック配列の存在に関して構成要素に関してスクリーニングされる。上記導入遺伝子は、酵母菌人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）の一部として、上記内因性プロモーターあるいは異種プロモーターかのいずれかによるcDNAとして、あるいは、最適な発現のために必要とされることが分かっている上記コード領域とその他のエレメントの全部を含むミニ遺伝子として、宿主の中に導入された完全なゲノム配列か、あるいはその他の染色体DNA断片かのいずれかでありうる。

10

20

【0069】

導入遺伝子を作り出すために、興味の対象となっている上記標的配列（例えば、*CatSper2* 配列の野生型あるいは対立遺伝子変異）は典型的には上記配列から採られたRNAの発現を制御ようになるプロモーターの下流に位置しているクローニング部位の中に結合される。上記コード配列の下流では、典型的にはポリアデニル化配列がある。導入遺伝子を作り出す一つの代替的なアプローチは、上記導入遺伝子の発現を駆動するために外因性プロモーターおよび制御配列を使用することである。最終的には、その適当な制御配列とともに、所望される全体の遺伝子を含むYACなどの大きなゲノムDNA断片を使用して導入遺伝子を作り出すことが可能である。

30

【0070】

動物モデルは、相同性組み換えに関して内因性 *CatSper2* 配列を標的にすることにより作り出すことができる。こうした標的出来事はヒトの疾患あるいはそうでない場合は一つの異常な配列（例えば、下の動物配列よりもさらにヒト配列に似ている配列）（ノックイン動物モデル）と関連しているアミノ酸変化を作り出すために、内因性配列（ノックアウト）を取り除く、あるいは上記内因性配列を改変する効果を有することができる。非常に多くのベクターが、こうした変化を達成することが有用であり、また、マウスおよびその他の動物に関するゲノムDNAの適当な資源とその他の動物は商業的に入手可能である（例えば、GenomeSystem社、ミズーリ州セントルイス市）。

【0071】

これら標的ベクター構築物の典型的な特徴はゲノムDNAの2~4kbが5'末端で選択可能なマーカー（例えば、「ネオマイシンカセット」と呼ばれるそれ自体のプロモーターエレメントの下にある細菌ネオマイシン耐性遺伝子）に結合される。興味の対象となっている遺伝子から得られた第二DNA断片はその後、上記ネオマイシンカセットの下流、第二選択可能なマーカー（例えば、チミジンキナーゼ）の上流で結合される。上記ベクターの中に含められた配列のいずれかが一つにより内因性配列の相同性置換により変異配列が上記標的動物の生殖系統の中に導入することが可能になるよう上記DNA断片が選択される。代替的には、上記配列は、上記ネオマイシンカセットを取り囲む上記ベクターの左と右腕の間に正常であれば存在すると考えられる配列の欠失を引き起こすように選択することができる。前者はノックインとして公知のものであり、また、後者はノックアウトと

40

50

して公知のものである。

【0072】

初期胚もまた、本発明の上記組み換えDNA構築物を挿入するために感染させることができる。この方法では、上記導入遺伝子（例えば、CatSper2配列の野生型あるいは対立遺伝子変異体）は、部分的にトランスジェニック動物を生成するために発生の初期段階の間に直接胚を感染させるのに使用されるウイルスあるいはレトロウイルスベクターの中に挿入される。上記部分的にトランスジェニック動物のある種のものは、生殖系統細胞の中に上記導入遺伝子を産出し、また、完全にトランスジェニック動物を産生するように育てることができる。

【0073】

代替的には、幹細胞の集団を使用した相同性組み換えにより、成功裏に形質転換体に関して上記集団のスクリーニングを準備する。一旦同定されると、こうしたものは線維芽細胞の中に注入することができ、また、上記結果的に生まれた動物の割合は、上記導入遺伝子の生殖系統伝達を示すものとなる。これらの部分的なトランスジェニック動物は、完全なトランスジェニック動物を産生するために育てることができる。

【0074】

相同性組み換えあるいは遺伝子標的のための技術だけではなくトランスジェニック動物の技術を生成する技術はいまでは広範に受け入れられ、また実施されている。上記マウス胚のマニピレーションについての実験室マニュアルは例えば、トランスジェニックマウスの産生に関する標準的な実験室技術を詳細しているものであり、入手可能である（Hoganら（1986）, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press社刊, ニューヨーク州Cold Spring Harbor市）。（CatSper2タンパク質とポリペプチド）

もう一つの側面では、本発明はCatSper2タンパク質の実質的に純粋な作成物を提供する。上記タンパク質は、本発明の抗体により免疫親和性生成などの標準的な技術を使用して、精細胞から分離することができ（以下を参照）、あるいは、そのタンパク質はさらに高いレベルで発現することができる、任意には、さらに容易に分離され、および/または生成される融合タンパク質として、本発明の上記形質転換された細胞から分離することができる。

【0075】

いくつかの実施態様では、上記CatSper2タンパク質は、上記CatSper2コード領域の全翻訳配列から成る。こうした完全長CatSper2タンパク質の実施例には、CatSper2タンパク質の対立遺伝子および非ヒト相同体とそれらの機能的等価物とともに、配列識別番号：2と配列識別番号：4として開示されている上記ヒトCatSper2タンパク質と、配列識別番号：6として開示されている上記マウス相同体が含まれる。

【0076】

他の実施態様では、上記CatSper2タンパク質はCatSper2断片である。こうした断片には、上記タンパク質の上記膜貫通、ループとポア形成領域を含む、上記CatSper2タンパク質の構造ドメインが含まれる。有用な構造ドメインには、それらの対立遺伝子変異体と非ヒト相同体とともに、上記ヒトCatSper2タンパク質の上記膜貫通ドメイン（すなわち、配列識別番号：2の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340；配列識別番号：4の近接残基104 - 126、146 - 166、176 - 195、206 - 228、241 - 262、316 - 340；配列識別番号：6の近接残基102 - 124、144 - 164、174 - 193、204 - 227、239 - 260、314 - 338）、膜貫通ドメインの間にある細胞外ループ（すなわち、配列識別番号：2の近接残基127 - 145、196 - 205、263 - 315；配列識別番号：4の近接残基127 - 145、196 - 205、263 - 315；配列識別番号：6の近接残基125 - 143、194

10

20

30

40

50

- 203、261-313)、ポア領域(すなわち、配列識別番号:2の近接残基280-303;配列識別番号:4の近接残基280-303;配列識別番号:6の近接残基278-301)が含まれる。その他のCatSper2断片には、標準的な配列分析技術により同定されるように、上記CatSper2タンパク質の潜在的に有用なエピトープが含まれる。したがって、例えば、有用なCatSper2断片には、以下のヒトCatSper2配列が含まれる。すなわち、配列識別番号:2の近接残基266-275、386-400、447-458、482-494;配列識別番号:4の近接残基66-99、266-275、394-414;配列識別番号:6の近接残基64-89、264-275、562-588;である。

いくつかの実施態様では、ポリペプチドはCatSper2タンパク質の少なくとも構造ドメインに対して少なくとも80%,85%,90%,あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有する。このように、いくつかの実施態様では、ポリペプチドはCatSper2タンパク質の少なくとも膜貫通ドメインに対して少なくとも80%,85%,90%,あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有する(例えば、配列識別番号:2の近接残基104-126、146-166、176-195、206-228、241-262、316-340;配列識別番号:4の近接残基104-126、146-166、176-195、206-228、241-262、316-340;配列識別番号:6の近接残基102-124、144-164、174-193、204-227、239-260、314-338とそれらの対立遺伝子変異体と相同体)、膜貫通ドメインの間にある細胞外ループ(例えば、配列識別番号:2の近接残基127-145、196-205、263-315;配列識別番号:4の近接残基127-145、196-205、263-315;配列識別番号:6の近接残基125-143、194-203、261-313とそれらの対立遺伝子変異体と相同体)、ポア領域(例えば、配列識別番号:2の近接残基280-303;配列識別番号:4の近接残基280-303;配列識別番号:6の近接残基278-301とそれらの対立遺伝子変異体と相同体)が含まれる。いくつかの実施態様では、CatSper2タンパク質に対して少なくとも80%,85%,90%,あるいは95%アミノ酸配列の同一性を有し、また、CatSper2活性を有するポリペプチドが提供される。CatSper2活性を示すタンパク質の能力は、CatSper2-/-変異体(例えば、CatSper2ノックアウト変異体)を補足し、また、CatSper2活性を発現させることがそうでなければできない細胞内のCatSper2+/+表現型(例えば、精子の運動性を回復させるため)を回復させるその能力により測定することができる(例えば、上記CatSper2-/-変異体から得られる精細胞)。
【0077】

いくつかの実施態様では、本発明の上記ポリペプチドは、長さにして少なくとも50アミノ酸残基、あるいは長さにして少なくとも100,200,あるいは300アミノ酸残基のCatSper2配列が含まれる。これらポリペプチドには少なくとも一つの膜貫通ドメイン、少なくとも一つの細胞外ループドメイン、少なくともポア領域あるいはそれらを組み合わせたものを含むCatSper2配列が含まれる。いくつかの実施態様では、上記ポリペプチドはCatSper2活性を有する。こうした活性には細胞(例えば、卵母細胞)の中で発現される場合にイオン電流の誘導、cAMP誘導Ca²⁺流入、CatSper2-/-精子の中で発現される場合の精子運動性の回復、および/またはCatSper2-/-精子の中で発現される場合に卵を受精する能力の回復が含まれる。
(CatSper2タンパク質とポリペプチドに対する抗体)

もう一つの側面では、本発明は、上記CatSper2タンパク質に対する抗体の実質的に純粋な作成物およびこうした抗体を作成する諸方法を提供する。上記抗体はポリクローナルあるいはモノクローナルでありうるものであり、また、同業者には周知のものである諸方法により作成することができる。特に、本発明は高い予測抗原性を有するCatSper2エピトープに対して立ち上げた抗体であって、したがってそれはそれによって、上記CatSper2タンパク質の野生型および/または変異体形態を分離するかあるいは同定するために選択的に結合する抗体を提供する。

【0078】

上記抗体は、上記完全長CatSper2タンパク質に対して、上記CatSper2タンパク質の断片に対して、あるいは上記タンパク質の特性であり、また、実質的に他のタンパク質からそれらを区別しているいずれかのCatSper2エピトープを用いて立ち上げることができる。いくつかの実施態様では、上記抗体は配列識別番号：2の近接残基266-275、386-400、447-458、482-494；配列識別番号：4の近接残基66-99、266-275、394-414、配列識別番号：6の近接残基64-89、262-275、562-588、に限定されるわけではないが、それらが含まれる。他の有用なエピトープには、それらエピトープの対立遺伝子および非ヒト相同体が含まれる。高い予測抗原性を有するエピトープは、GCGとMacVector (Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI; Accelrys社、カリフォルニア州San Diego市)を含む標準的プログラムを使用して疎水性、表面確率と、抗原指標を予測することにより同定された。

10

【0079】

CatSper2免疫原作成物は粗抽出物（例えば、上記タンパク質を発現させる細胞のミクロソーム分画）から、天然であるいは組み換え的にそれを発現する細胞から実質的に精製されたタンパク質あるいはペプチドから、あるいは小さな免疫原に関しては、化学的ペプチド合成により作り出すことができる。上記CatSper2免疫原はまた、上記非CatSper2部分は、精製を容易にする（例えば、ポリヒスチジン）そのアジュバント特性および/またはその能力に対して選択される融合タンパク質の形態にすることが可能である。

20

【0080】

本発明の上記抗体はポリクローナルあるいはモノクローナル、あるいは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(ScFv)を含む抗体断片でありうる。さらに、本発明の本方法により有用な抗体を同定した後、組み換え抗体は、非ヒト抗体から上記CatSper2タンパク質に基づくキメラおよび/またはヒト化抗体だけではなく、上記に挙げられている抗体断片のいずれかを含む組み換え抗体を生成することができる。CatSper2タンパク質だけではなく、本明細書で可能なものとなっているその他のCatSper2タンパク質の特徴付けの本開示に照らして、同業者であれば、さまざまな標準的な手段のいずれかより上述されている抗体を作り出すことができる。抗体技術の総見については、Borrebaek編“Antibody Engineering”，第2版、Oxford University Press刊，Oxford市(1955)を参照。

30

【0081】

一般的な事柄として、モノクローナル抗CatSper2抗体はまずマウス、ウサギ、ヤギあるいはその他の適当な動物に適当なキャリアーあるいは希釈剤に入れたCatSper2免疫原を注射することにより作り出すことができる。キャリアータンパク質あるいはアジュバントを使用することができ、また、追加免疫注入（例えば、8~10週にわたって週2あるいは3回投与）を必要である場合は用いることができる。体液性の反応の現像を用意した後、上記動物が犠牲にされてその脾臓が取り出され、また、適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）の中に懸濁される。上記脾臓細胞は、リンパ球の一つの資源として役立たせて、そのうちのあるもので上記適当な特異性を有する抗体を作り出すことになる。これら細胞はその後固定細胞系統（例えば、ミエローマ）と融合され、また、上記融合の産物は選択性薬物（例えば、HAT）の存在下で組織培養ウェルの中に置かれる。上記ウェルは連続的にスクリーニングされ、また、再度置きなおされ、その度に有用な抗体を作る細胞を選択する。典型的には、いくつかのスクリーニングと再戴置手順が上記ウェルが抗体産生に対して肯定的である単クローンを含むようになるまで実施される。こうしたクローンにより産生されたモノクローナル抗体は、イオン交換クロマトグラフィにより、あるいはこれら技術のさまざまなものおよびそれら技術の組み合わせにより、タン

40

50

パク質 A セファロースを使用して親和性クロマトグラフィなどの標準的諸方法により精製することができる。

【0082】

本発明の上記抗体はさまざまな適用において使用することができる。例えば、抗体は、CatSper2タンパク質の存在あるいは値を検出するのにアッセイの中でCatSper2タンパク質に関して、あるいは形質転換細胞（例えば、CatSper2発現の制御因子に対するアッセイの中で、CatSper2タンパク質を発現させる細胞を同定するウェスタンブロット法の中で、あるいはCatSper2タンパク質の細胞あるいは細胞外位置を確定する免疫細胞化学あるいは免疫蛍光技術の中で）におけるCatSper2発現の存在あるいは値を測定するアッセイの中で精製プロセスにおいて使用することができる（例えば、免疫親和性精製）。

10

【0083】

本発明の上記抗体は診断および/または治療的使用方法について、その他の化合物あるいは材料に結合される、あるいは共役させることができる。例えば、それらは、放射性核種、蛍光化合物（例えば、ローダミン）あるいは画像診断あるいは治療のための酵素などの標識に結合させることができる。上記標識は上記抗体に対して共有結合的に、あるいは非競合結合的に結合させることができる。

【0084】

もう一つの側面では、本発明はCatSper2タンパク質の少なくとも一つのエピトープを検出するためのキットを提供する。上記キットには、一つの抗CatSper2抗体と上記抗体を検出するための一つの手段が含まれる。上記抗体を検出するための上記手

20

段は、上記抗体があるいは上記抗CatSper2抗体を検出するための二次抗体かに結合される検出可能な標識でありうる（例えば、ウサギ抗CatSper2抗体を検出するための二次抗体としての標識化ヤギ抗ウサギIg抗体）。

（CatSper2発現あるいは活性のモジュレータに対するアッセイ）

もう一つの側面では、本発明は、CatSper2発現あるいは活性のモジュレータに対するアッセイを提供する。上記モジュレータは上記転写、翻訳、翻訳後処理、局在化、あるいは、CatSper2遺伝子および/またはタンパク質の活性に影響を及ぼすことができる。

【0085】

30

このようにして、実施態様の一つのシリーズにおいて、本発明の上記形質転換細胞は一つの候補化合物と接触させ、また、CatSper2の発現あるいは活性に対する上記化合物の効果が測定される。一般的な事柄として、CatSper2タンパク質を発現させる細胞と候補化合物を接触されるステップと、上記細胞においてCatSper2活性の指標を測定するステップを上記分析は必要としている。上記指標は転写（例えば、mRNA値）、翻訳（例えば、タンパク質の値）、翻訳後処理（例えば、特異的グリコシル化）、局在化（例えば、免疫組織化学）あるいは活性（例えば、ナトリウムあるいはその他の一価イオンフラックス；カルシウムあるいはその他の二価イオンフラックス）の指標でありうるものである。上記指標測定はその後に上記候補化合物は指標における増減の原因となったかどうかを測定するために一つの基準値に比較される。上記基準値は外因性（例えば、所定のベースライン値）、あるいは内因性（例えば、上記候補化合物と接触させるより前に行った同じ細胞の測定値）のものでありうる。増あるいは減が有意なものである場合は（一つあるいはそれ以上の細胞から単回かあるいは複数回読み込む）、上記候補化合物は、CatSper2活性の潜在的なモジュレータとして同定される。CatSper2活性における変化に対する分析には、その他の遺伝子に関して、同業者であれば、日常的に使用されているそうしたもののうちいずれかのものを含めることができる。例えば、CatSper2 mRNAあるいはタンパク質の存在あるいは値における変化は、CatSper2発現のエンハンサー、リプレッサーを同定するために検出することができる。代替的には、本発明のリポーター遺伝子構築物を使用する際には、上記リポーターの上記生化学、あるいは表現型変化特性が、上記候補化合物がリポーター遺伝子発現を促進するあ

40

50

るいは抑制する指標として使用することができる。他の実施態様では、上記 Cat Sper 2 タンパク質の活性における変化は、例えば、上記 Cat Sper 2 タンパク質により媒介されたカチオンの上記フラックスを測定することにより、あるいは全細胞、あるいはチャンネル電流を測定することにより、検出することができる。イオンフラックスの測定は、特異的イオンの集中により、色を変化させる発色団を使用することにより容易なものとすることができる。成熟精細胞に対する候補化合物の効果は、本発明の上記形質転換において得られた結果を確定するあるいは評価するためにテストを実施することができる。

【0086】

Cat Sper 2 に結合する化合物は、Cat Sper 2 活性を調節するための候補となる。したがって、実施態様のもう一つのシリーズでは、化合物のライブラリーは、Cat Sper 2 タンパク質、あるいはCat Sper 2 タンパク質の少なくとも構造ドメインにより候補化合物と接触させることによりCat Sper 2 活性を調節するために候補を同定するために、Cat Sper 2 に結合する化合物を同定するために、スクリーニングすることができる。これら諸方法において使用することができるCat Sper 2 構造ドメインには、膜貫通ドメイン、特に細胞外ループと、ポア領域が含まれる。こうした方法においては、上記Cat Sper 2 タンパク質あるいはCat Sper 2 構造ドメインは固定することができ（例えば、カラムあるいは微粒子）、上記候補化合物の溶液は、上記Cat Sper 2 部分と接触させることができる。代替的には、いくつかの実施態様では、上記候補化合物も上記Cat Sper 2 部分も固定されることはないが、しかしそれよりも、両方は溶液中に入れ、結合は、例えば、上記結合パートナーを帯びている粒子の凝集により検出される。結合は同業者には周知のものである諸方法により検出することができる（例えば、上記潜在的な結合対の一つの成分の放射性あるいは蛍光標識；結合のプラズモン共鳴検出；凝集分析における混濁度）。生理学的条件（例えば、精巣、精巣上体内あるいは膣、子宮、輸卵管内）下でのCat Sper 2 タンパク質に対する有意な結合（例えば、 $K_d \cdot 10 \mu M$ ）を示す化合物はCat Sper 2 活性の潜在的なモジュレータである。

（受精を調節する諸方法）

上記Cat Sper 2 遺伝子とタンパク質は潜在的な避妊薬剤として理想的な標的となっている。上記Cat Sper 2 タンパク質は精子の鞭毛において発現されるため、Cat Sper 2 の特異的なブロッカーにより、精子の運動性を阻害することができ、またしたがって、いずれの性によっても使用する際に避妊薬として効果的なものとなりうる。精子および精子形成細胞へのCat Sper 2 の局在化が制限されているということは、特異的なブロッカーはその他の組織には影響を及ぼすべきものではなく、またしたがって、副作用は低いものあるいは存在しないものであるべきであるという意味である。最終的には、新規な構造を上記チャンネルが提示するため、それは新しいチャンネルアゴニストあるいはアンタゴニストにとっては非常に良好な標的となりうる。

したがって、もう一つの側面では、本発明はCat Sper 2 遺伝子あるいはタンパク質の発現あるいは活性を減少させることにより、受精を減少させる諸方法を提供する。発現あるいは活性におけるこうした減少は、Cat Sper 2 遺伝子の発現を抑圧する小さな分子という手段により、Cat Sper 2 mRNAの翻訳を阻害するアンチセンス分子という手段により、Cat Sper 2 翻訳あるいは翻訳後処理に干渉する小さな分子という手段により、Cat Sper 2 局在化に干渉する小さな分子という手段により、イオンチャンネルとしてCat Sper 2 活性をブロックする分子という手段により、あるいはCat Sper 2 遺伝子の発現を減少させる、あるいはCat Sper 2 タンパク質壊変を促進するその他の分子により達成することができる。Cat Sper 2 タンパク質あるいはポリペプチドに特異的に結合するFab, $F(ab')_2$ あるいはFv断片および一本鎖Fv (ScFv)断片を含む抗体もまた、上記タンパク質の細胞外ドメインに結合することにより、Cat Sper 2 活性を阻害するのに使用することができ、またそれによってその活性をブロックすることができる。

【0087】

CatSper2発現あるいは活性のリプレッサーあるいはアンタゴニストは、可逆的なものであるか、あるいは単に成熟精子のみに影響を及ぼすかであるため、受精に対するこうした化合物の効果は、上記分子は長時間が経過すると体から一掃され、また、新しい精子が常に賛成されるので、可逆的なものである。したがって、CatSper2発現あるいは活性のリプレッサーあるいはアンタゴニストは、それらが可逆的に避妊を引き起こすことができるため、ヒトの避妊薬として使用することができる。こうした避妊薬は、CatSper2活性を効果的に阻害し、それによって精子の運動性あるいは上記ZPを貫通する精子の能力を減少するためにそれらが膣、子宮、あるいは輸卵管で十分な濃度に達すれば、経口的に、あるいは非経口的に女性により摂取することができる。同様に、こうした避妊薬は、それらが精巣あるいは精液においてCatSper2発現あるいは活性を効果的に阻害するように十分な濃度に達すれば男性により経口的に、あるいは非経口的に摂取することができる、またそれによって精子の運動性あるいは上記ZPを貫通する精子の能力を減少させることができる。代替的には、こうした化合物は、予防薬、頸部キャップ、あるいは避妊膣スポンジ、発泡剤、あるいはゼリーとともに使用するため潤滑剤、加湿剤、発泡剤、あるいはゼリーに製剤化することができる。

【0088】

実施態様のもう一つのシリーズでは、CatSper2遺伝子とタンパク質のリプレッサーあるいはアンタゴニストは、非ヒト哺乳動物を治療するため避妊薬として使用することができる。こうした実施態様は上記に記載されているものと同様である。こうした避妊薬はペットとして保有されている家畜化動物に対して、商業的に価値のある家畜化動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ウマ）に対して、あるいは、有害動物（例えば、マウス、ラット、アライグマ、ホリネズミ）に対して使用することができる。いくつかの実施態様では、上記避妊薬は経口的に有用であり、また、上記動物に関して食物資源の中に混合することができる。他の実施態様では、上記避妊薬は、非経口的に投与することができる（例えば、注入、経皮的パッチ、あるいは生物学的に腐食可能なインプラント）。

【0089】

上記哺乳動物CatSper2遺伝子とタンパク質と、上記CatSper2遺伝子とタンパク質の魚、両生類と昆虫相同体を実質的な配列同一性を共有する程度まで、哺乳動物CatSper2遺伝子とタンパク質のリプレッサーあるいはアンタゴニストもまた魚、両生類および有害昆虫（例えば、カ）の制御に使用することができる。さらに、上記CatSper2遺伝子の上記非哺乳動物相同体とタンパク質は、こうした相同体に対してさらに特異的であるかあるいは効果的である付加的なリプレッサーとアンタゴニストを同定するのに使用することができる。

（CatSper2遺伝子型決定およびCatSper2関連障害を診断する諸方法）

もう一つの側面では、本発明は、上記CatSper2遺伝子に関して対象者の遺伝子型を判定し、また、不妊などのCatSper2関連障害を診断するための方法を提供する。したがって、例えば、対象者の上記CatSper2核酸（あるいはその部分）は、対象者のCatSper2遺伝型に野生型に関して上記配列にある何らかの変異が含まれているかどうかを確かめるためにテストすることができる。特定の有意性のものについては、機能的CatSper2タンパク質の産生を予防する終結あるいはフレームシフト変異を導入する変異であると考えられる。しかし、減少CatSper2活性を引き起こす点変異もまた同定することができる。同様に、本発明の上記抗体はCatSper2タンパク質の存在あるいは値を測定するために対象者の精子をテストするのに使用することができる。特定の注意点については、CatSper2タンパク質の値において存在しないあるいは有意に減少していることであると考えられる。しかし、点変異はまた、不妊を引き起こすことができ

また、上記変異配列を含めるかあるいはそれら変異配列により影響を受けるエピトープに対して特異的なものである抗体により検出することができる。対象者のCatSper2遺伝子型の測定は遺伝子あるいは生殖カウンセリングを行うために、CatSper2欠陥から結果的に生じる不妊を診断するために使用することができる。

【0090】

対象者のCatSper2遺伝子型を測定するために、あるいはCatSper2関連障害を診断するために、本発明の上記核酸は、上記対象者のDNA/mRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば、アンカーPCRあるいはRACE PCR)、あるいはリガーゼ連鎖反応(LCR)増幅においてプライマーとして使用することができる。例えば、米国特許第4,683,195号と、米国特許第4,683,202号;Landegranら(1988),Science241:1077-1080;Nakazawaら(1994),Proc.Natl.Acad.Sci.USA91:360-364;Abravayaら(1995),Nucleic Acids Res.23:675-682を参照されたい。本発明の上記核酸を使用して対象者のDNA/mRNAを増幅するためのその他の有用な諸方法には、自己持続性配列複製(例えば、Guatelliら(1990),Proc.Natl.Acad.Sci.USA87:1874-1878)、転写増幅(例えば、Kwohら(1989),Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:1173-1177)、およびQ-複製をベースにした系(例えば、Lizardら(1988),Bio/Technology6:1197)が含まれる。上記結果的に生じた増幅産物の有無あるいは大きさ(例えば、Saikiら(1986),Nature324:163;Saikiら(1989),Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:6230;Gibbsら(1989),Nucleic Acids Res.17:2437-2448;Prossner(1993),Tibtech11:238;Gaspariniら(1992),Mol.Cell Probes6:1;Barany(1991),Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:189)、上記増幅産物の直接配列(例えば、MaximとGilbert(1977),Proc.Natl.Acad.Sci.USA74:560;Sanger(1977),Proc.Natl.Acad.Sci.USA74:5463)とその他の標準的な分析技術は、CatSper2遺伝子型を判定するために用いることができる。上記増幅産物はまた、以下に説明した技術の多くにおいて使用することができる。

【0091】

本発明の上記核酸もまた、対象者において相補的であり、あるいは不完全に相補的な配列を同定するためにハイブリダイゼーションおよび/またはコンホメーションをベースにしたアッセイにおいてプローブとして使用することができる。

【0092】

例えば、いくつかの実施態様では、変異は固定化された対照核酸にサンプル核酸が選択的にハイブリダイズされることにより同定することができる。上記対照はフィルターあるいはカラムに吸収させることができ、あるいは数百あるいは数千というオリゴヌクレオチドプローブを含む高い密度オーダーのアレイの中に配置することができる(例えば、Cróniら(1996),Human Mutation7:244-255;Kozalら(1996),Nature Medicine2:753-759)。

【0093】

他の実施態様では、酵素あるいは化学的切断は不適性塩基でサンプルと対照配列の二重鎖を切断するあるいは制限するのに用いることができる(例えば、Myersら(1985),Science230:1242)。例えば、RNA/DNA二重鎖は、RNase(RNA分解酵素)により処理することができ;DNA/DNAハイブリッドは不適性塩基で二重鎖を消化するようにS1ヌクレアーゼにより処理することができ;G/Tミスマッチは上記ヒトチミジンDNAグリコシル化によりTで切断される(例えば、Hsuら(1994),Carcinogenesis15:1657-1662を参照のこと)。ミスマッチの化学的切断は、例えば、ヒドロキシルアミン、四酸化オスミウムおよび/またはピペラジンを使用して用いることができる。一般的には、例えば、Cottonら(1988),Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:4397;Saleebaら(1992),Methods Enzymol.217:286-295;

および米国特許第 5, 459, 039 号を参照されたい。

【0094】

他の実施態様では、変異は制限酵素あるいはリボザイムに対する切断点として役に立つ特異的配列を作り出すあるいは破壊することができる。したがって、(増幅)サンプル DNA が少なくとも一つの制限エンドヌクレアーゼにより消化される制限断片長多型 (RFLP) 分析を用いることができ、また、その結果生じた断片の長さが部席され、制限断片の長さのパターンに影響を与える変異の有無を判定するために対照と比較される。同様に、配列特異的リボザイムは、リボザイム切断部位を作り出すあるいは破壊する変異を同定するのに使用することができる。これについては、米国特許第 5, 498, 531 号を参照されたい。

10

【0095】

他の実施態様では、変異は、一本鎖核酸としてあるいは二本鎖としてかのいずれかで、配列の電気泳動的な運動性に対するその効果により検出することができる。例えば、一本鎖コンホメーション多型 (SSCP) 分析 (Orिताら (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766; Cotton (1993), Mutat. Res. 285: 125-144; Hayashi (1992), Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79; Keenら (1991), Trends Genet. 7: 5), 変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) (Myersら (1985), Nature 313: 495), 温度勾配ゲル電気泳動 (RosenbaumとReissner (1987), Biophys. Chem. 265: 12753) は用いるこ

20

【0096】

上記 CatSper 2 遺伝子とタンパク質における変異を検出するこれらと他の諸方法は、本明細書において開示された上記核酸とタンパク質配列に基づいて同業者には明らかなものとなる。

(インビトロ受精)

もう一つの側面では、本発明は、減少させた CatSper 2 発現あるいは活性により特徴付けられた精子により卵子のインビトロ受精の方法を提供する。鞭毛における CatSper 2 の役割のため、CatSper 2 欠損性精子は、その運動性が損なわれ、またしたがって、卵子を受精させる能力もまた損なわれる。特に、適当な鞭毛機能は、受精のために透明帯 (ZP) を貫通するのに精子には必要とされるものである (Renら (2001), 同上)。したがって、本発明は、こうした男性の精子が上記 CatSper 2 欠損を克服するために治療される、あるいは上記 ZP が取り除かれた卵子と接触させられる CatSper 2 欠損男性のためのインビトロ受精の一つの方法を提供する。他の遺伝子欠損は上記 ZP を貫通することが不可能である精子を結果的に生じることができるため、この方法は、精子の運動性あるいは ZP 貫通に影響を及ぼす遺伝子欠損を有する、あるいは無傷の ZP によりインビトロ受精を以前に成功させた他の男性に敷衍することができる。

30

(CatSper 2 媒介不妊を治療する諸方法)

もう一つの側面では、本発明は、CatSper 2 発現のエンハンサー、あるいは CatSper 2 活性のアゴニストが上記対象者に投与される、CatSper 2 欠損男性において不妊を治療する諸方法を提供する。他の実施態様では、遺伝子あるいはタンパク質治療が、上記 CatSper 2 遺伝子あるいはタンパク質において欠損される精子 (あるいは精子前駆体) に上記 CatSper 2 遺伝子あるいはタンパク質を提供するために用いることができる。遺伝子治療に関しては、CatSper 2 タンパク質をコードする遺伝子構築物は、上記 CatSper 2 遺伝子あるいはタンパク質において欠損している精子あるいは精子前駆体の中にある CatSper 2 タンパク質の発現を引き起こすために用いることができる。交尾対 (例えば、ヒトのカップル) の不妊症は上記男性の精子上に存在している抗原に対して上記女性により生成された抗体から結果的に生じさせることができる。いくつかのケースでは、上記抗体は CatSper 2 タンパク質のエピトープに

40

50

対して方向付けることができる。したがって、本発明はまた、女性尿生殖路の中に存在している抗CatSper2抗体により引き起こされる抗CatSper2抗体媒介不妊を診断する諸方法を提供する。上記諸方法には、上記女性に存在している抗体のサンプルを得るステップと、CatSper2タンパク質あるいはCatSper2タンパク質の断片に上記抗体を接触させるステップとが含まれる。いくつかの実施態様では、上記CatSper2断片は、高い予測抗原性を有する上記CatSper2タンパク質のエピトープである（例えば、配列識別番号：2の近接残基266-275、386-400、447-458、482-494；配列識別番号：4の近接残基66-99、266-275、394-414；配列識別番号：6の近接残基64-89、264-275、562-588；およびそれらの対立遺伝子と哺乳動物相同体）。これら諸方法において、上記女性の抗体あるいは上記CatSper2タンパク質/断片は任意には、固定することができ、また、上記女性の抗体あるいは上記CatSper2タンパク質/断片は任意には上記抗体と上記CatSper2タンパク質/断片の間にある結合の検出を容易にするために検出可能に標識化することが可能である。

10

20

30

【0097】

これらのケースでは、上記CatSper2タンパク質のあるいは当該エピトープを含む上記CatSper2タンパク質の少なくとも断片の過剰量を投与することは、上記女性の尿生殖路に存在している上記抗CatSper2抗体の結合部位を飽和することができ、またそれによって上記抗体媒介不妊を阻害あるいは減少させる。代替的には、抗イディオタイプ抗体（すなわち、定義された特異性を備えた別の抗体の可変領域に特異的に結合する抗体）を用いることができる。すなわち、抗CatSper2抗体に特異的に結合する抗体は、上記女性の尿生殖路の中に存在している上記抗CatSper2抗体を阻害するのに用いることができ、またそれによって上記抗体媒介不妊を阻害するあるいは減少させる。同業者であれば、こうした女性の交代により認識される当該CatSper2エピトープを容易に同定することができ、また、標準的な手段により当該エピトープあるいは抗イディオタイプ抗体の実質的に純粋な作成物を産生することができる。したがって、本発明はまた、女性の尿生殖路の中に存在している抗CatSper2抗体により引き起こされる抗CatSper2抗体媒介不妊症を処理するための諸方法を提供する。上記諸方法には、当該CatSper2エピトープの分量、あるいは上記抗CatSper2抗体を阻害するのに効果的な抗イディオタイプ抗体の分量を上記女性の尿生殖路の中に投与するステップが含まれ、またそれによって上記抗体媒介不妊症を阻害するあるいは減少させる。

（CatSper2に関するビジネスの諸方法）

もう一つの側面では、本発明は本発明の上記分析により、CatSper2活性をアンタゴナイズする一つあるいはそれ以上の薬剤を同定するステップと、こうした分析で同定された薬剤あるいはこうした薬剤の類似体が精子運動性あるいは卵の貫通性の少なくとも一つを阻害するかどうかを判定するステップと、一つあるいはそれ以上の動物モデルにおける効果および毒性に関してアンタゴニストとして同定された薬剤の治療的プロフィールを実施するステップと、受け入れ可能な治療上のプロフィールを有するように同定された一つあるいはそれ以上のアンタゴニスト薬剤を含む製薬調製剤を製剤化するステップと、からなる薬剤ディスカバリービジネスを実施する一つの方法を提供する。

40

【0098】

一つの実施態様では、上記薬剤ディスカバリービジネスにはさらに、販売のために上記製薬調製剤を配布するための一つのシステムを確立するステップが含まれ、また、上記製薬調製剤の市場調査を行うための販売グループを確立することを任意に含めることができる。

【0099】

もう一つの側面では、本発明は、CatSper2活性をアゴナイズする一つあるいはそれ以上の薬剤を上記対象者分析により同定するステップと、こうした分析あるいはこうした薬剤の類似体の中で同定した薬剤が精子の運動性あるいは卵貫通性の少なくともひと

50

つを増加させるかどうかを判定するステップと、一つあるいはそれ以上の動物モデルにおける効果および毒性に関して一つのアゴニストとして同定される薬剤の治療上のプロフィールを実施するステップと、受け入れ可能な治療上のプロフィールを有するように同定された一つあるいはそれ以上の薬剤を含む製薬調製剤を製剤化するステップと、から成る薬剤ディスカバリービジネスを実施する一つの方法を提供する。

【0100】

特定の実施態様では、上記薬剤ディスカバリービジネスにはさらに販売のために上記製薬調製剤を配布するための一つのシステムを確立するステップが含まれ、また、任意には、上記製薬調製剤の市場調査を行うための販売グループを確立するステップを含めることができる。

10

【0101】

特定の実施態様では、CatSper2活性をアゴナイズする薬剤を同定するための上記分析が野生型CatSper2を使用して実施される。もう一つの実施態様では、CatSper2活性をアゴナイズする薬剤を同定するための上記分析が変異CatSper2を使用して実施される。「変異体CatSper2」は、一つあるいはそれ以上のアミノ酸挿片、欠失片、あるいは置換片を含むCatSper2ポリペプチドを意味しそこでは、上記挿入片、欠失片、あるいは置換片が野生型CatSper2と比較して上記変異体CatSper2の上記アミノ酸配列と活性を変化させる。活性におけるこうした変化には運動性、卵貫通性、あるいはカチオン輸送における変化に限定されるわけではないが、それらが含まれる。活性における変化にはまた、上記CatSper2タンパク質あるいはmRNAの適当な局在化あるいは発現における変化が含まれる。

20

【0102】

さらにもう一つの側面では、本発明は、男性患者から採取した精子サンプルを調べるステップであって、前記患者は受精問題を経験していることを特徴とし、上記精子は、運動性における減少あるいは卵の貫通性における減少のうちの少なくとも一つにより特徴付けられるかどうかを判定するステップと、精子の運動性あるいは卵の貫通性のうちの少なくともひとつを増加させる際にCatSper2アゴニストの効果を判定するためにインビトロ分析を実施するステップと、精子の運動性あるいは卵の貫通性のうちの少なくとも一つを上記男性から採取した精子により増加させるために効果的なCatSper2アゴニストの用量を投与するステップから成る治療処方確立するステップと、から成る生殖医学ビジネスを実施する一つの方法を提供する。

30

【0103】

特定の実施態様では、上記方法にはさらに、上記男性の患者が、受精能力における改善を評価するために医師によりモニターされるステップが含まれる。こうした評価には、精子の運動性あるいは卵の貫通性の一つあるいはそれ以上における改善を測定するために治療の開始の後に定間隔で精子の検査を含めることができる。上記治療している医師によるフォローアップ評価の頻度は、上記医師あるいは訓練を受けた保健ケア供給者により決定される。考慮しなければならない因子は、男性の患者が子孫をもうけることを試みている場合のその切迫度だけではなく、上記患者のスケジュールや快適さのレベルである。代表的なフォローアップのアポイントメントは、週単位で、週の半分の単位で、あるいは月単位で実施することができる。もう一つの実施態様では、上記方法にはさらに、上記患者に課金するあるいは上記患者の保険供給者に課金するステップが含まれる。上記患者の健康保険が上記受精治療の全部あるいは一部に対して支払われている場合には、上記健康保険供給者の政策がフォローアップのアポイントメントの頻度に影響を及ぼす可能性がある。

40

【0104】

さらにもう一つの側面では、本発明は、薬剤ディスカバリービジネスの上記諸方法により発見された製薬調製剤を提供するステップであって、上記調製剤は、CatSper2の活性を阻害するが、上記ステップと、CatSper2の活性を阻害するために効果的な上記製薬調製剤の用量の投与に関する医師および健康保険供給者に指示を供給するステ

50

ップであって、上記効果的な用量が妊娠を防ぐために十分なものである上記ステップと、から成る避妊医療ビジネスを実施するための一つの方法を提供する。

【0105】

一つの実施態様では、上記方法にはさらに、販売のために上記製薬調製剤を配布するための一つのシステムを確立するステップと、上記製薬調製剤の市場調査を実施するために販売グループを確立するステップが任意には含まれる。

【0106】

CatSper2はカチオンチャンネルをコード化する。カチオンチャンネルの非常に多くの型が、心臓機能の制御を含む細胞プロセス（例えば、カルシウムチャンネル）では非常に重要な役割を果たす。したがって、カチオンチャンネルの活性を増加させるかあるいは減少させるかのいずれかを行う薬剤の投与法を採用する諸方法の非常なる限定により、こうした諸方法には実質的な副作用を有する可能性がある。しかしながら、本明細書において供給された結果は精子の中でCatSper2が特異的に発現されることを示している。したがって、CatSper2の活性を選択的に増加させるかあるいは減少させる薬剤は、一般的なカチオンチャンネルアンタゴニストおよびアゴニストか、あるいは上記体の中で広範にさらに発現されるカチオンチャンネルのアンタゴニストおよびアゴニストかのいずれかに関連している副作用を引き起こさずに、患者に投与することができる。

10

【0107】

薬剤ディスカバリービジネスにより、CatSper2の活性をアンタゴナイズすることができる一つあるいはそれ以上の薬剤を同定することができる。上記活性をアンタゴナイズすることにより、CatSper2の活性を全体的にあるいは部分的に減少させるという意味である。活性におけるこうした減少は、精子の運動性、卵の貫通性、あるいはカチオンの輸送のうちの少なくとも一つを検査することにより測定することができる。減少させるという用語とアンタゴナイズという用語は、相互交換可能に使用されることになる。

20

【0108】

特定の実施態様では、当初に同定されたCatSper2アゴニストあるいはアンタゴニストは、例えば、効力と活性が維持されるが、しかし、溶解度、浸透度、バイオアベイラビリティ（生物学的利用能）、毒性、変異原性、薬理動態（例えば、吸収、分布、代謝、排出）を含む重量な薬理学的特性とのバランスをとるために、鉛化合物の構造をさらに精製するよう、さらに鉛の最適化を受けさせることができる。構造的な修飾はこうした薬理学的なパラメータに関する問題と取り組むために鉛化合物に対して行われる。しかし、こうした修飾は上記分子の効力と活性に対する考えうる効果を考慮に入れなければならない。例えば、一つの鉛化合物の溶解度が貧弱である場合は、変化は溶解度を改善する努力の中で上記分子に対して行うことができる。すなわち、これら修飾はしかしながら、上記分子の効力と活性にマイナスに影響を与えることができる。構造-活性関係（SAR）データはその後に効力と活性における変更の効果を測定するために使用される。構造的修飾とSAR（構造-活性関係）データの反復性プロセスを用いて、バランスはこれら薬理学的パラメータと、上記化合物の上記効力と活性との間で作り出される。

30

【0109】

候補アンタゴニストあるいはそれらを組み合わせたものはその後に、動物モデルにおいて効果と毒性に関してテストしなければならない。こうした治療上のプロフィール作成は製薬業界では一般的に用いられている。ヒトにおける実験的な薬剤をテストする前に、敷衍的な治療用プロフィール作成（例えば、前臨床試験）は、安全性と効果に関して初期パラメータ確立を完了しなければならない。前臨床試験はインビトロにて（すなわち、試験管、ピーカー、ペトリ皿、その他において）行われた研究調査により薬剤、その生物学的利用能、吸収、分布、代謝および排出に関する作用の機構を確立する。動物による研究調査は、所望された結果を上記薬剤が提供するかどうかを評価するのに使用される。上記実験的な薬剤のさまざまな投与量のものが上記薬剤の効果をテストするために、起こりうる有害な副作用を同定し、また、毒性を評価するために投与される。

40

50

【0110】

手短に言うと、一つの薬剤をベースとしたスクリーニングにおいてCatSper2活性をアンタゴナイズする一つの候補薬剤の同定は、一つの避妊薬として有用な製薬調製剤を開発する際の第1ステップである。成功裏に妊娠を防ぐのに（すなわち、有用な避妊薬剤として作用するように）効果的な上記製薬調製剤の用量の投与は安全でありかつ効果的であるという両方でなければならない。製薬業界では日常的に用いられる初期段階の薬剤治験は潜在的な製薬の安全性と効き目という問題に取り組む手助けをする。CatSper2アンタゴニストの特定のケースでは、上記製薬調製剤の効き目は、マウスあるいはラットモデルにおいて容易に評価することができる。手短に言うと、雄マウスにはさまざまな時間スケジュール上で上記製薬調製剤のさまざまな投与量を投与することができる。対照雄マウスはプラセボを投与することができる（例えば、キャリアーあるいは賦形剤単独で）。上記雄マウスはその後雌マウスと一緒に上記雄マウスをケージに入れることにより自由に交尾させることができ、時間に対する受精の割合を測定することができる。受胎調節の現在入手可能な形態の効き目が与えられるとすると、効果的な避妊は妊娠を防ぐのに少なくとも80%、85%、90%、95%、99%あるいは99%以上効果があつて然るべきである。

10

【0111】

一つの実施態様では、治療用プロフィール作成という上記ステップには細胞培養培地と動物において化合物の毒性テスト、薬理動態の分析と上記候補薬剤の代謝、疾患の動物モデルにおける効き目の測定が含まれる。ある特定の例では、上記方法には効き目、安全性と薬理動態プロフィールをベースにしたSAR（構造-活性関係）分析と、鉛構造最適化とを含めることができる。こうしたステップの目標は米国FDA（食品医薬品局）に関する調査段階新薬（“IND”）適用、および/またはヒト臨床治験前に同様の規制関係機関に関する同様の適用の申請につながる前臨床研究調査に対する薬剤候補の選択である。

20

【0112】

鉛最適化と治療用プロフィール作成との間にあって、上記対象とする方法の一つの目標は、最小限の副作用を有するCatSper2アゴニストあるいはアンタゴニストを開発することである。アンタゴニストの場合は、上記鉛化合物は血管拡張（すなわち、眩暈、低血圧、頭痛、のぼせ、浮腫、その他）、心筋虚血、低血圧、頻脈、一過性不全収縮期、心不全の増悪、心室不全、SA結節あるいは房室伝導障害あるいはプラズマジゴキシン値に対する臨床的に受け入れ可能な効果を有することになる。

30

【0113】

「毒性プロフィール作成」により、効果的な製薬調製剤が投与されるときに起こりうる潜在的に有害な副作用の評価が意図される。副作用は有害であるものもそうではないものもあり、また、一つの製薬調製剤に関する副作用が受け入れることが可能な副作用であるかどうかの判定は、規制承認プロセス時に行われる。受け入れ可能な副作用は（a）治療されている症状の重篤度、および（b）これら他の治療法の有用性とこれらの他の治療法と現在関連している副作用を含む因子のため、さまざまに変化する。例えば、癌という用語は、間違つて制御された細胞成長、増殖、および分化に関連している疾患の諸症状の複合的なファミリーを包摂している。癌の多くの形態は特に激しい疼痛、治療が実施された組織の機能の喪失、そして死を引き起こす荒廃した疾患である。化学療法薬剤は癌の多くの形態にとって標準的な治療法の一つの重要な部分となっている。化学療法自体は脱毛、激しい悪心、体重減少、生殖不能を含む深刻な副作用を有する可能性があるが、こうした副作用は、それらが治療しようとしている上記疾患の重篤度が分かっている場合は受け入れ可能なものであると考えられる。

40

【0114】

しかしながら、これに対して、受胎調節のもっとも現在有用な形態は有意な副作用を有してはいない。したがって、CatSper2アンタゴニストの製薬調製剤は、最小限の毒性と副作用を有するべきである。毒性試験は効果試験と平行して実施することができ、

50

また、上記製薬調製剤の効果的な投与量を投与された雄マウスは上記調製剤に対する有害な反応（副作用）に関してモニターすることができる。潜在的な副作用には、性的衝動の喪失や行動上の変化が含まれることがある。処置されたマウスから採取された血液、尿、糞便サンプルはまた、免疫、腎臓、あるいは肝臓機能における何らかの潜在的な副作用による変化を検出するためにモニターすることができる。さらに、CatSper2はカチオンチャネルであり、上記製薬調製剤を受けたマウスはまた、他のカチオンチャネルとの上記CatSper2アンタゴニストの交差反応性を示す心臓機能における何らかの変化に関してモニターするべきである。

【0115】

CatSper2活性をアンタゴナイズし、また、動物研究調査においては安全かつ効果的であると証明されている薬剤は、一つの製薬調製剤に製薬化することができる。こうした製薬調製剤はその後に避妊薬として市場調査、配布および販売することができる。

10

【0116】

CatSper2活性および受精の喪失の間の関連性がはっきりすると、雄の受精問題を治療するためにCatSper2の活性を増加する薬剤でそれが実質的に有用なものとなる。不妊症の多くの例には、上記男性に関連している問題が含まれている。こうした男性不妊症問題には、低精子数、貧弱な精子の運動性および異常な精子の形態が含まれる。現在、男性関連不妊症に対する効果的な治療法はほとんどない。

【0117】

男性不妊症に対する潜在的に成功裏に実施される治療法を開発する際の第一ステップは、CatSper2アゴニストの同定である。CatSper2アゴニストはCatSper2の活性を増加させる一つあるいはそれ以上の薬剤である。CatSper2アンタゴニストに関して上に詳細に概要されているように、上記CatSper2タンパク質のアゴニストはその他のカチオンチャネルアゴニストよりも非常に少ない潜在的な副作用を有することが予想される。

20

【0118】

CatSper2アゴニストとして作用する薬剤を同定するための諸方法は、CatSper2アンタゴニストに関して詳細に述べられているように主として行われる。しかしながら、有用なCatSper2アゴニストは、精子の運動性あるいは卵の貫通性の一つあるいはそれ以上を増加させることになる。さらに、CatSper2アゴニストを同定するときに、こうした薬剤は野生型CatSper2の活性をアゴナイズすることができる。さらに、あるいは代替的には、こうした薬剤は、変異体CatSper2の活性をアゴナイズすることができる。上記に詳細に概略されているようにこうした諸方法により同定された一つあるいはそれ以上のアゴニストはその後安全性および効き目に関してテストすることができる。動物研究調査において安全かつ効果的なものであることが示されている薬剤は製薬調製剤に製薬化される。

30

【0119】

CatSper2アゴニストは全ての男性受精の問題を治療するために効果的なものではあるとは考えられない。しかし、男性の不妊症の問題のある一定の不定のパーセンテージは、CatSper2機能のアゴニストを使用する治療法に対して適用可能である。例えば、貧弱な精子の運動性という結果を生じる男性不妊症のある一定のパーセンテージはCatSper2における変異が原因となっている可能性が高い。CatSper2が、精子において特異的に発現される場合は、こうした変異を有する男性は、ほとんどあるいは付加的な医学的な問題を有することは考えられず、また、これにより、なぜ健康な男性で不妊症がよく発見されるのかが説明される。さらに、CatSper2アゴニストは、精子の運動性を全体に改善することができ、また、したがって、他の関連性の無い原因により貧弱な精子の運動性に対して補完する手助けをする。

40

（生殖医学ビジネスを実施する）

野生型の活性あるいは変異体CatSper2をアゴナイズする一つあるいはそれ以上の薬剤を含む製薬調製剤は不妊の困難性を体験した候補男性患者に対する治療法を提供す

50

る生殖医学ビジネスを確立するのに有用なものとなりうる。男性患者により提供された精子サンプルは、上記製薬調製剤による治療に上記男性患者の不妊症が受け入れられるかどうかを判定するために調べられる。精子の運動性あるいは卵貫通性のうちの少なくとも一つを減少させたとして特徴付けられる精子の患者は治療を受けるのには適当な状態とすることができる。治療の前に、上記男性患者により提供された精子サンプルは上記男性は治療に適当であるかどうかをさらに評価するために上記製薬調製剤に関してインビトロにてテストされる。インビトロ試験というこの付加的なステップは上記C a P S p e r 2 アゴニストによりその不妊症が改善される可能性がある男性において行われる不必要な治療を軽減する手助けを行う。

【0120】

インビトロにて精子の運動性かあるいは卵貫通性を増加させることを示す精子の男性患者は一つあるいはそれ以上のC a t S p e r 2 アゴニストを含む製薬調製剤を含む受精治療には適当である。正確な治療処方患者によってさまざまであり、また、経験を積んだ医療関係者には容易に決めることができるものである。しかしながら、上記治療処方には、上記治療を受けた男性における精子の運動性あるいは卵貫通性の少なくとも一つを増加させるのに効果的である上記製薬調製剤の用量を投与することが含まれる。ある特定の実施態様では、精子の運動性あるいは卵貫通性における増加は受精率の増加という結果をもたらすことになる。

(製薬調製剤)

もう一つの側面では、本発明は一つあるいはそれ以上の製薬的に受け入れ可能なキャリアー（添加剤）および／または希釈剤と一緒に製薬化された、上述されている一つあるいはそれ以上の同定された薬剤（すなわち、アンタゴニストあるいはアゴニスト）の治療上効果的な用量から成る製薬的に受け入れ可能な調製剤を提供する。以下に詳細に説明されているように、本発明の上記製薬成分は、以下のものに適合されるそうしたものを含む固形あるいは液体の形態でと用するために特に製薬化することができる。すなわち、（１）経口投与、例えば、舌に対して塗布するための水薬（水性あるいは非水性溶液あるいは懸濁液）、錠剤、ポーラス、粉末、顆粒、ペースト；（２）非経口投与、例えば、皮下、筋内あるいは静脈内注射によるもの、滅菌溶液あるいは懸濁液として；（３）局所的な適用、例えば、皮膚に塗布されるクリーム、軟膏、スプレーとして；あるいは（４）例えば、ペッサリー、クリームあるいは発泡剤として、腔内あるいは直腸内に。しかしながら、特定の実施態様では、上記主な化合物は単に滅菌水の中に溶解するあるいは懸濁することができる。

【0121】

本明細書において使用されるとき、「治療上効果的な用量」という慣用句は、何らかの医学的治療に適用可能な理にかなった恩恵／危険性の比率で、いくつかの所望される治療上の効果を産生するために効果的である薬剤あるいは組成の用量を意味する。

【0122】

「製薬的に受け入れ可能な」という慣用句は健全な医学的判断の範囲内にあって、理にかなった恩恵／危険性の比率に見合っていて、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー性反応、あるいはその他の問題あるいは合併症は無しにヒトと動物の組織と接触して使用するのに適当であるそうした化合物、材料、組成および／または投与形態に言及するために本明細書では用いられている。

【0123】

本明細書において使用されるとき、「製薬的に受け入れ可能なキャリアー」という慣用句は、一つの器官、あるいは身体の一部からもう一つの臓器あるいは身体の一部にその目的のアンタゴニストを担体するあるいは輸送するのに関わっている液体、あるいは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、あるいはカプセル材料などの製薬的に受け入れ可能な材料、組成あるいはビーイクルを意味する。各キャリアーは、そのほかの成分と適合性があり、上記患者に対して傷害性がないという意味で「受け入れ可能」であらねばならない。製薬的に受け入れ可能なキャリアーとして役に立つことができる材料のいくつかの実施例に

10

20

30

40

50

は、(1)ラクトース、ブドウ糖およびショ糖などの糖類；(2)コーンスターチおよびポテトスターチなどの澱粉；(3)カルキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、酢酸セルロースなどセルロースおよびその誘導体；(4)粉末トラガカント；(5)麦芽；(6)ゲラチン；(7)タルク；(8)ココアバターおよび坐薬ワックスなどの賦形剤；(9)ピーナッツオイル、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブオイル、コーン油などのオイル類；(10)プロピレングリコールなどのグリコール類；(11)グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール類；(12)オレイン酸エチル、ラウリル酸エチルなどのエステル類；(13)寒天；(14)水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝薬剤；(15)アルギン酸；(16)非発熱性の水；(17)等張性生理食塩水；(18)リンゲル液；(19)エチルアルコール；(20)リン酸緩衝溶液；および(21)製剤化において用いられるその他の非毒性適合性物質が挙げられる。特定の実施態様では、上記製薬調製剤は非発熱性のものであり、すなわち、患者の体温を上昇させないものである。

10

20

30

40

50

【0124】

この点では「製薬的に受け入れ可能な塩」という慣用句は、本発明の化合物の比較的非毒性、無機および有機酸添加塩を言う。これら塩は、本発明の化合物の最終的な分離と精製時にインサイチューにて調製することができ、あるいは本発明の化合物の精製化合物を適当な有機あるいは無機酸と、その遊離塩基形態で個別に反応させ、また、そのように形成された上記塩を分離することにより調製することができる。代表的な塩には、臭化水素酸塩、塩化水素酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸、ラウリル酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシラート]、クエン酸、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシラート、グルコペプト酸塩 { *glucoheptanate* }、ラウリルスルフォネート塩などが挙げられる。(これについては *Berge* ら (1977), *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19 を参照されたい)

上記目的とする主要な薬剤の上記製薬的に受け入れ可能な塩には、例えば、非毒性有機あるいは無機酸から得られる通常の前毒性塩あるいは第四級アンモニウム塩が含まれる。例えば、こうした通常の前毒性塩には塩化水素酸塩、臭化水素酸塩、亜硫酸塩、スルファミン酸塩、リン酸塩、硝酸塩などの無機塩から取られたもの、また、酢酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、グリコール酸塩、ステアリン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸、酒石酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、パルミチン酸塩、マレイン酸塩、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸塩、グルタミン酸塩、安息香酸塩、サリチル酸塩、スルファニル酸塩、2-アセトキシ安息香酸塩、フマル酸塩、トルエンスルホン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、シュウ酸塩、イソチオン酸塩などの有機酸から作成された塩が含まれる。

【0125】

その他のケースでは、本発明の上記薬剤には、一つあるいはそれ以上の酸性官能基を含有することができ、またしたがって、製薬的に受け入れ可能な塩基により製薬的に受け入れ可能な塩を形成することが可能である。これらの例の中にみられる「製薬的に受け入れ可能な塩」という慣用句は、本発明の化合物の比較的非毒性、無機および有機の塩基添加塩を言う。これら塩は同様に、上記薬剤の最終的な分離と精製時にインサイチューにて調製することができ、製薬的に受け入れ可能な金属カチオンの酸化水素酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、適当な塩基と、アンモニア、製薬的に受け入れ可能な有機第一級、第二級、第三級アミンと、精製薬剤を、その遊離塩基形態で個別に反応させ、また、そのように形成された上記塩を分離することにより調製することができる。代表的なアルカリあるいはアルカリ土類塩には、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウム塩などが含まれる。塩基添加塩の形成に有用な代表的な有機アミンにはエチルアミン、*N*-エチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが含まれる(例えば、*Berge* ら (1977), 同上)。

【0126】

着色剤、剥離剤、塗布剤、甘味料、調味料、芳香剤、保存剤、抗酸化剤だけではなくラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの湿潤剤、乳化剤、潤滑剤もまた上記組成の中に存在させることができる。

【0127】

製薬的に受け入れ可能な抗酸化剤の実施例には、(1)アスコルビン酸、塩化水素酸システイン、二硫酸ナトリウム、メタ二硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤；(3)クエン酸、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤、が挙げられる。

10

【0128】

本発明の製剤形態には、口腔、鼻腔、局所(頬側および舌下を含む)、直腸、膣および/または経口投与に適当なそうしたものが挙げられる。上記製剤形態は、単位投与形態で都合よく表示することができ、また、薬局の同業者には周知のものであるいずれかの諸方法により調製することができる。単回投与形態を産生するためにキャリアー材料と組み合わせることができる活性成分の用量は治療される宿主、投与の特定の態様によりさまざまに変化する。単回投与形態を産生するためにキャリアー材料と組み合わせることができる活性成分の用量は一般的には治療上の効果を作り出す上記化合物の用量となる。一般的には、この用量は活性成分の約1%~約99%の範囲、約5%~約70%、あるいは約10%~約30%の範囲になる。

20

【0129】

これら製剤形態あるいは組成を調製する諸方法には、本発明の一つあるいはそれ以上の薬剤をキャリアー、任意には、一つあるいはそれ以上のアクセサリー成分と会合させるステップが含まれる。一般的には、上記製剤形態は、本発明の一つあるいはそれ以上の薬剤を液体キャリアーあるいは微細に分割した固体キャリアーあるいはその両方と均一にまた密接に会合させることにより調製され、またその後にもし必要である場合は上記製品を形状化する。

【0130】

経口投与に適している本発明の製剤形態は、カプセル、カシェ剤、ピル剤、錠剤、舐剤(芳香剤をベースに使用して、通常はショ糖とアカシア、あるいはトラガcant)、粉末、顆粒の形態でありうるが、あるいは水性液あるいは非水性液の中に入れた溶液あるいは懸濁液として、あるいは水の中に油、あるいは油の中に水を入れた液体乳化剤として、あるいはエリキシル剤あるいはシロップとして、あるいは香錠(ゲラチンおよびグリセリンあるいはショ糖およびアカシアなどの多活性塩基を使用して)および/または口腔洗浄剤などとして使用することができ、それぞれ本発明の化合物の一定所定用量を含有する。本発明の一つの薬剤はまたボラス、動物用舐剤あるいはペーストとして投与することもできる。

30

【0131】

経口投与に関する本発明の固体投与形態では(カプセル、錠剤、ピル剤、糖衣錠、粉末、顆粒など)、上記活性成分は、クエン酸ナトリウムあるいはリン酸二カルシウム、および/または以下のいずれかのものなどの一つあるいはそれ以上の製薬的に許容されうるキャリアーと混合される。すなわち、(1)澱粉、ラクトース、ショ糖、ブドウ糖、マンニトール、および/またはケイ酸などの充填剤あるいは増量剤；(2)例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゲラチン、ポリビニルピロリドン、ショ糖および/またはアカシアなどの結合剤；(3)グリセロールなどの軟釈剤；(4)寒天、炭酸カルシウム、ポテトあるいはタピオカスターチ、アルギン酸、ある種のケイ酸塩、および炭酸ナトリウムなどの壊変剤；(5)パラフィンなどの溶液緩染剤；(6)第四級化合物などの吸収促進剤；(7)セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなどの湿潤剤；(8)カオリンおよびベントナイトクレイなどの吸収剤；(9)タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナ

40

50

トリウムおよびそれらの混合物などの潤滑剤；（１０）着色剤、である。カプセル剤、錠剤、ビル剤の場合は、上記製薬調剤はまた、緩衝薬剤から成りうる。同様の型の固体組成もまた、高分子重量ポリエチレングリコールなどとともに、ラクトースあるいは乳糖などの賦形剤などを使用して柔軟および硬質充填ゲラチンカプセルの中に入れた充填剤として用いることができる。

【０１３２】

一つの錠剤は、一つあるいはそれ以上のアクセサリー成分を任意には加えて圧縮あるいは成形により作ることができる。圧縮錠剤は結合剤、（例えば、ゲラチンあるいはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、グリコール酸ナトリウムスターチ、あるいは交差カルボキシメチルセルロース）、表面活性あるいは拡散剤を使用して調製することができる。成形錠剤は適当な器械で不活性液体希釈剤により湿潤化させた粉末化合物の混合物を成形することにより作ることができる。

10

【０１３３】

糖衣錠、カプセル剤、ビル剤および顆粒剤などの本発明の上記製薬組成の上記錠剤とその他の固体投与形態は製薬化技術においては周知のものとなっている腸溶コーティングとその他のコーティングなどのコーティングおよびシェルにより切れ目を入れて、調製することが任意には可能である。それらはまた、所望される放出プロフィール、その他のポリマーマトリックス、リポソームおよび／またはマイクロスフェアを提供する割合をさまざまに変化させて、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを使用して、その中に上記活性成分の徐放性のものを提供するように製薬化することができる。それらは、例えば、細菌保持フィルターによる過によって、あるいは滅菌水の中に溶解されることができる滅菌固体組成の形態で滅菌薬剤、あるいは使用の直前に何らかの滅菌注入可能な媒体を組み込むことにより、滅菌することができる。これら組成はまた任意には不透明化剤を含有することができる、また、任意にはゆっくりとしたやり方で胃腸管のある一定の部分において上記活性成分（複数）のみをあるいは選択的に放出するそういった組成のものとすることができる。重合体物質およびワックスを含む包埋組成の実施例を使用することができる。上記活性成分はまた、適当なものであれば、一つあるいはそれ以上の叙述されている賦形剤を加えてマイクロカプセル化形態のものにすることができる。

20

【０１３４】

本発明の上記化合物の経口投与のための液体投与形態には、製薬的に許容される乳化剤、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、エリキシル剤が挙げられる。上記活性成分に加えて、上記液体投与形態には、例えば、水あるいは、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、オイル（特に綿実油、塊根植物、コーン、胚芽、オリーブ、トウゴマおよびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールとソルビタンの脂肪酸エステル、それらの混合物などのその他の溶媒、可溶化剤および乳化剤などの同業者であれば通常使用している不活性希釈剤が含まれている。

30

【０１３５】

不活性希釈剤の他に、上記経口組成にはまた、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、甘味料、調味料、着色剤、芳香剤、および保存剤などのアジュバントが含まれうる。

40

【０１３６】

上記活性化合物に加えて、懸濁液には、例えば、エトキシイソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、およびソルビタンエステル、微晶質セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天、トラガカント、およびそれらの混合物などの懸濁液が含まれうる。

【０１３７】

直腸あるいは膣投与に関する本発明の上記製薬組成の製剤形態は坐薬として提供することができる、それは、本発明の一つあるいはそれ以上の薬剤を、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐薬ワックスあるいはサリチル酸塩から成る一つあるいはそれ以

50

上の適当な非刺激性賦形剤あるいはキャリアーと混合することにより調製することができ、また、それは室温では固体であるが、体温では液体となり、したがって、直腸あるいは腔で溶け、また活性化合物を放出する。

【0138】

腔投与に適当なものである本発明の製剤形態にはまた、適当なものとするのに同業者であれば公知のものとなっているこうしたキャリアーを含むペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、発泡剤あるいはスプレー製剤を含められる。

【0139】

本発明の一つあるいはそれ以上の薬剤の局所あるいは経皮敵投与に関する投与形態には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチおよび吸入剤が含まれる。上記活性薬剤は滅菌条件下で製薬的に許容されるキャリアーと、また必要とされる場合はいずれかの保存剤、緩衝液、あるいは液体発泡剤と混合することができる。

10

【0140】

上記軟膏、ペースト、クリームおよびゲルには、本発明の活性化合物に加えて、動物性および植物性脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン樹脂、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛あるいはそれらの混合物などの賦形剤を含めることができる。

【0141】

粉末およびスプレーには、本発明の化合物に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアド粉末あるいはそうした物質の混合物などの賦形剤を含めることができる。スプレーは、ブタンおよびプロパンなどのクロロフルオロヒドロカーボンおよび揮発性未置換炭化水素などの通常の液体発泡剤を付加的に含めることができる。

20

【0142】

経皮的パッチは本発明の薬剤の制御されたデリバリーを身体に提供するというさらなる長所を有する。こうした投与形態は、適当な媒体における主な化合物を溶解し、あるいは分散させることにより作り出すことができる。吸収エンハンサーはまた、目的とする薬剤のその皮膚を越えるフラックスを増加させるのに使用することができる。こうしたフラックスの速度は、速度制御膜を供給することによるか、あるいは重合体マトリックスあるいはゲルの中に上記化合物を分散させることによるかのいずれかにより制御することができる。

30

【0143】

非経口投与のために適当なものである本発明の製薬組成は、使用直前に滅菌注入可能な溶液あるいは分散液の中に再構成することができ、上記製剤を意図されているレシピエントの血液あるいは懸濁剤あるいは増粘剤と等張性のものとする抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、溶質を含めることができる一つあるいはそれ以上の製薬的に許容されている滅菌等張性の水性あるいは非水性溶液、分散液、懸濁液、乳化液、あるいは滅菌粉末本発明の一つあるいはそれ以上の化合物から成る。

【0144】

本発明の上記製薬組成の中で用いることができる適当な水性あるいは非水性キャリアーの実施例には、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）および適当なそれらの混合物、オリーブオイルなどの野菜油およびオレイン酸エチルなどの注入可能な有機エステルを含められる。適当な流動性を、レシチンなどのコーティング材料を使用することにより、分散液の場合は必要とされる粒子サイズを維持することにより、また、界面活性剤を使用することにより、維持することができる。

40

【0145】

これらの組成にはまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含めることができる。微生物の作用を予防することは、例えば、パラベン、クロロブタノー

50

ル、フェノールソルビン酸などのさまざまな抗菌剤、抗真菌剤を封入することにより確実なものとするができる。これにはまた、糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を上記組成の中を含めることが望ましいこととなる。さらに、注入可能な製薬形態の長引かせた徐放性の吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゲラチンなどの吸収を遅らせる薬剤の封入によりもたすことができる。

【0146】

本発明の上記化合物はヒトや動物に対して製薬として投与される場合、それらはそれ自体のままでか、あるいは例えば、製薬的に許容されているキャリアーと組み合わせた活性剤の0.1～99.5%、あるいは0.5～90%を含有する製薬組成として与えることができる。

10

【本発明の最良の実施の態様】

【0147】

以下の実施例では、本発明を実施するいくつかの特定の態様を説明しているが、請求されている本発明の範囲を限定しようとすることは意図されていない。代替的な材料および方法を同様の結果を得るために使用することができる。

(実施例1)

(cDNAライブラリーの作成)

マウス129Sv/Ev成体精巣から富化精細胞分画は、Bellve(1993), Methods Enzymol. 225:84-113というユニット重力沈降方法を使用して作成された。その作成物から得られたポリA⁺RNAは上記供給者のプロトコルにより二本鎖cDNAを合成するために無作為プライマーにより逆転写された(Life Technologies/Invitrogen社、カリフォルニア州Carlsbad市)。このcDNA(2μg)は、脳、心臓、腸管、腎臓、肝臓、肺臓、骨格筋、脾臓および胃を含む9つの異なる富化組織から得られたポリA⁺RNAの等量の混合物から作成されたドライバ-cDNA(2μg)を使用して抑制減算ハイブリダイゼーション(PCRSellectTM, Clontech社、カリフォルニア州Palo Alto市)にかけられた。

20

(実施例2)

(シグナルペプチドトラップ)

A. ベクター作成。Saccharomyces cerevisiaeインベルターゼ遺伝子(シグナルペプチドと終止シグナルは無しでプロモーター、コード配列を含むGenbank寄託番号NC_001141.1,ヌクレオチド36484-37357と37448-39483)がpRB576から得られたEcoRI/SalI断片として、pBluescriptTMプラスミド(Stratagene社、カリフォルニア州La Jolla市)の中にサブクローン化されて入れられた。上記インベルターゼコード配列は細胞質酵素形態の開始メチオニンコドン、アラニンと置換させるために部位特異的変異誘発(Quickchange, Stratagene社、カリフォルニア州La Jolla市)により修飾され、また、NotIおよびSalIクロニング部位を含む人工リンカーが上記インベルターゼコード配列の開始時にHindIII-SmaI部位の中に結合されて入れられた。この修飾インベルターゼ遺伝子はpSPTIBを産生するために上記EcoRIとXhoI制限部位を使用して酵母菌シャトルベクターpYEUra3(Genbank寄託番号U02457)の中にサブクローン化されて入れられた。

30

40

【0148】

B. 酵母形質転換と選択。シグナルペプチドトラップはKleinら(1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7108-13により記載されているように基本的に実施された。手短に言うと、上記酵母菌株YT455(suc2⁻, ade2⁻101, ura3⁻52)が、酢酸リチウムを使用して上記富化精細胞cDNAライブラリーにより形質転換された。結果的に生じた形質転換体が、30で三日間最少培地/-Uraドロップアウトプレート上で選択され、またその後機能シグナルペプチドをコードしたcDNAに関して選択するためにYPSプレート(唯一の炭素資源とし

50

て2%ショ糖)上に戴置した。7日以上ショ糖上で成長したこうした酵母コロニーはcDNA挿入片に関して分析された。

C. 配列分析。プラスミドは、SDSとガラスビーズによる溶解により酵母ミニ培養培地から放出された(StratHernとHiggins(1991), Methods Enzymol. 194:319-29)。上記cDNA挿入片は上記クローニング部位に隣接しているベクター特異的プライマーを使用してPCRにより増幅された。その結果生じたPCR産物は自動シーケンスにかけられ、その後に、上記GenBankデータベース(Altschulら(1997), Nucleic Acid Res. 25:3389-3402)に対するBLAST分析にかけた。

D. CatSper2クローンの同定。富化精細胞cDNAライブラリーは、酵母系シグナルペプチド選択法(Kleinら(1996), 同上; Jacobら(1997), Gene 198:289-96)を使用してスクリーニングされた。マウス精細胞cDNAを含む 1.2×10^5 コロニーがスクリーニングされた。ショ糖上での選択の後およそ350復帰細胞酵母菌コロニーが得られた。これら選択cDNAクローンに関しては、上記技術の有効性を示す精子により特異的に発現された公知の膜/分泌タンパク質が同定された(例えば、sp56, フェルチリン、ADAM26, TPX-1)。上記電圧ゲートカリウムチャネルと同様のものであるが、カルシウム選択性によりポアを含んでいる演繹位相幾何学によりタンパク質をコードする新規なcDNA配列は同定され、またその結果として意図されていたCatSper2となった。

(実施例3)

(完全CatSper2 cDNA配列の同定)

上記クローンの上記完全コード配列は5'と3' RACE増幅に関してはcDNA断片特異的アンチセンスとセンスプライマーそれぞれを使用して測定された(Marathon Ready MouseTM 精巣cDNA, Clontech社、カリフォルニア州Palo Alto市)。無傷の完全長クローンは特異的5'と3' UTRプライマー対によりPCRを使用して産生された。その結果生じたPCR産物はサブクローン化されてpCR2.1に中に入れられ(Stratagene社、カリフォルニア州La Jolla市)、また、変異が無いことを証明するために配列決定が実施された。

【0149】

1986bpを含む完全長cDNAがRACEを使用して分離された。上記予測ORFは6つの膜貫通セグメントを備えた588アミノ酸タンパク質をコードする(図1(A))。第4膜貫通セグメントには、4番目の位置毎に間隔を置いて塩基性アミノ酸残基(K/R)、電圧ゲートイオンチャネルが含まれている。GenBankデータベースとこの配列の比較では、上記電圧ゲートカルシウムチャネルファミリー(Ca_v)に対する類似性がこの配列BLAST比較により明らかにされたるその Na_v , K_v , 環式ヌクレオチド-ゲート(CNG), 一過性受容体電位(TRP)およびポリシスチンチャネルはさらに距離的に関連性があるように見えた。上記公知のタンパク質の間では、CatSper2はもっともCatSper2に類似しており、もう一つの精子細胞特異的推定カチオンチャネルが最近運動性と正常な受精にとって重要であることがわかった(図1(B); Renら(2001), 同上)。これら2つのタンパク質は上記膜貫通領域内で21%同一性であり、40%類似性のものである。イオンチャネルの選択性は5番目(S5)と6番目(S6)膜貫通セグメントの間に位置しているポア形成残基により測定されている。図1(B)に図示されているように、上記ポア(P)領域におけるいくつかのアミノ酸残基はCatSper2, CatSper1, およびカルシウム選択性を定義している非常に重要なアスパラギン酸あるいはグルタミン酸残基を含むCaチャネルとの間に保存されている(Varadiら(1999), Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 34:181-214)。上記膜貫通領域に続くCatSper2の上記細胞質部分には付加的な潜在的機能モチーフが含まれている。上記反復配列領域には、CatSper2はマウスにおける受精能獲得時にリン酸化された上記タンパク質の一つを代表するものであると示唆している複数の候補チロシンリン酸化部位が含まれている(Visc

10

20

30

40

50

ontira (1995), Development 121: 1129-37)。上記C末端細胞質領域にはまた、残基547-568から得られる通常みられないロイシンジッパーモチーフが含まれている(Maxら(2001), J. Cell Biol. 153: 699-708)。この領域は、実際のチャネルポア複合体を形成する、あるいは精細胞の中にあるCatSper2チャネル活性を調節するタンパク質-タンパク質の相互作用を媒介することがある。

【0150】

上記マウスCatSper2配列を使用して、CatSper2と同様の予測位相幾何学を有するタンパク質をコードする3つの類似cDNA配列がヒト精巣からクローン化された。上記ヒトクローンによりコードされた上記タンパク質は、マウスCatSper2と全体として63~67%同一性がある。上記ヒトクローンの2つは528(配列識別番号: 2)と530アミノ酸の予測ORFをコードし、また、上記膜貫通領域後に2つのタンデム型セリン残基54アミノ酸残基の存在によってのみ互いに異なっている(すなわち、2つのセリン残基は配列識別番号: 2の残基392と393との間に挿入される)。上記第3ヒトクローンは上記cDNA配列にある211ヌクレオチドギャップがフレームシフトと初期終結を引き起こす、アミノ酸残基393まではその他のヒトクローンに対して同一である414アミノ酸の予測ORF(配列識別番号: 4)をコードする。3つのヒトタンパク質全ての上記膜貫通領域は同一P領域を含めて、マウスCatSper2に対して77%同一である。上記膜貫通セグメントの前の上記細胞質領域とCatSper2の上記カルボキシ末端63アミノ酸もまた上記二つのさらに長いヒト相同体の中に保存されており、それぞれ73%と90%同一となっている。

10

20

(実施例4)

(ノーザンブロット分析法)

いくつかのマウス組織から得た総RNA(15 µg)とマウス、ラットおよびヒト精巣から得たポリA⁺RNA(2 µg)が1%アガロースMOP S /ホルムアルデヒドゲル(Sambrookら(1989), 同上)の上で分離された。正に荷電されたナイロン膜への移送後に、上記プロットが、ULTRAhybTM(Ambion社、テキサス州Austin市)において10⁶ cpm/mlでcDNA配列(マウス組織プロット)のヌクレオチド113-531に対応する無作為初回刺激を受けた³²Pプローブか、あるいはヌクレオチド919-1299(交差種プロット; マウス、ラットおよびヒト)かのいずれかで42 にて一夜ハイブリダイズされた。上記プロットは0.1 x SSC / 0.2% SDS / 0.1% NaPPi (1 x 15分間室温にて、3 x 15分65 にて)により洗浄され、また、フィルムに露出させた。

30

【0151】

CatSper2 cDNAプローブによるノーザンブロット分析では、マウス精巣における一回2.1 kb転写が検出された。感受性の高いRT-PCRアッセイでもシグナルは調べられたその他の組織(脳、心臓、腸管、腎臓、肝臓、卵巣、骨格筋、脾臓、胃)では検出されなかった。この結果、上記推定開始メチオニンの上流にあるインフレーム停止コドンの存在にともなって、上記転写は完全長であることが示されている。CatSper2 mRNAもまた、ラットとヒトの両方の精巣サンプルで2.0-2.1 kb転写として同定された。

40

【0152】

精巣組織のインサイチュハイブリダイゼーションにより、減数分裂および減数分裂後細胞には、上記CatSper2転写物を含んでいたことが示されている。パラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋マウス精巣切片は、³⁵S標識化CatSper2センスあるいはアンチセンスプローブ(ヌクレオチド113-531)により調べられ、また、明視野暗視野顕微鏡により調べられた。上記アンチセンスプローブは精母細胞と精細胞の両方のわたって精細管にハイブリダイズされた。その他の細胞においては正のシグナルはなかったし、また上記センスプローブもまたいずれかの精巣細胞型へのハイブリダイゼーションには失敗した。

50

(実施例5)

(インサイチュハイブリダイゼーション)

ヌクレオチド113-531に対応している上記領域がPCRにより増幅され、また、pCR4.0-TOPO (Invitrogen社、カリフォルニア州San Diego市)の中にサブクローン化されて入れられた。放射性標識化(^{35}S)cRNAセンスとアンチセンスプローブが上記線形化プラスミド(MAXIscriptTM, Ambion社、テキサス州Austin市)から転写された。成体マウス精巣切片のインサイチュハイブリダイゼーションがSheltonら(2000), J. Lipid Res. 41:532-7により実施された。

(実施例6)

(ペプチド抗体の産生)

抗体は、N末端に添付されたシステインにより、配列識別番号:6のアミノ酸残基64-89と残基562-588に対応する合成ペプチドに対して作られた。こうしたペプチドは製造業者のプロトコルによりマレイミド活性化KLHに共役された(Pierce Chemical社、イリノイ州Rockford市)。ウサギは免疫化され(筋肉注射)、また、結果的に注射毎にKLHペプチド共役体の100 μg と定常の間隔で追加免疫された。抗ペプチド抗体はGentle BindingとElutionTM緩衝液(Pierce Chemical社、イリノイ州Rockford市)に対応しているペプチドクロマトグラフィカラム上で親和性に精製された(SulfolinkTM, Pierce Chemical社、イリノイ州Rockford市)。

(実施例7)

(免疫沈降法および免疫ブロッティング法)

免疫沈降法に関しては、サンプルは1%TX-100あるいは1%Zwittergent 3-14を含むTBS(20mMトリス-HCl, 150mM NaCl, pH7.4)で少なくとも4時間、4℃にて抽出された。上記抽出物は30分間100,000 $\times g$ で遠心分離にかけられ、また、その結果得られた上清溶液は2時間プロテインAアガロースに共有結合で結合された前免疫IgGとインキュベートされた(Seize XTM, Pierce Chemical社、イリノイ州Rockford市)。その非結合分画が回収され、また、ペプチド反応抗体($\pm 1.5\mu\text{M}$ ペプチドブレインキュベーション)/プロテインAアガロースと一夜還動させながらインキュベートされた。その結果得られた免疫複合体は5回洗浄された。SDSポリアクリルアミド電気泳動法はLaemmli(1970), Nature 227:680-5により行われた。電気泳動法により分離されたサンプルはTowbinら(1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4250-4により50Vで2時間4℃にてニトロセルロース膜に移動させた。免疫プロットはCatSper 2抗体(1:5000)あるいはCatSper 1(1:2000)抗体によりTBST/2.5%無脂肪ミルクの中で探索された。一次抗体によるインキュベーション後に、上記プロットはTBST/2.5%無脂肪ミルクで一度洗浄され、また、TBST(30分間にわたって4回変えた)。プロットはその後1時間二次ヤギ抗ウサギIgG-HRP抱合体によりインキュベートされ、TBST(30分間に3回変えた)、TBS(3回)により洗浄され、また、上記シグナルが化学発光により検出された(Pierce Chemical社、イリノイ州Rockford市)。

CatSper 2とCatSper 1の両方とも、SDSではなく清浄剤が精巣上体の精子を抽出するのに使用される場合は、比較的不溶性になる。上記タンパク質は1%TX-100あるいはZwittergent 3-14かのいずれかで上記精巣からさらに容易に可溶化された。これら清浄剤抽出物の両方から上記C末端ペプチド抗体とともにCatSper 2が免疫沈降され、CatSper 1は、可溶性分画の中に残った。CatSper 2とCatSper 1はCHAPSあるいはその他の清浄剤により可溶化することはできなかった。

(実施例8)

10

20

30

40

50

(免疫局在化(蛍光))

尾側精巢上体精細胞がガラススライド上に塗り付けられ、また、空気乾燥させた。上記細胞は固定され、また、氷冷メタノールを2分間浸透させた。上記スライドはエタノールの中で洗浄され、空気乾燥され、また、非特異的結合をブロックするために30分間CAS溶液中のPBS/10%正常ヤギ血清でインキュベートされた(Zymed Laboratory社、カリフォルニア州South San Francisco市)。上記スライドはその後ブロック溶液の中で希釈された一次抗体の中でインキュベートされた(C末端抗体(1:5000)、ポリクローナル抗体(1:1000))。一次抗体は特異的結合を評価するためにブロック溶液の中で希釈する前に20μM競合ペプチドあるいはスクランブルドペプチドかのいずれかでプレインキュベートされた。上記一次抗体インキュベーションの後、上記スライドはPBS(3x10分間)で洗浄され、また、ヤギ抗ウサギIgG-AlexaFluor-488と1時間インキュベートされた(Molecular Probes社、オレゴン州Eugene市)。PBS(3x10分間)により洗浄された後、上記スライドはFluoromount G(Fisher Scientific社、ペンシルバニア州Pittsburgh市)により観察のため取り付けられた。

10

【0153】

2つのペプチド反応抗体は、上述されているように産生された。それぞれ親和性に精製されている抗体とともにマウス精巢のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動/免疫ロットと、粗精子膜SDS抽出物が上記cDNA配列から予測されるサイズに対応している68,000Mタンパク質と同定されている。同様に、68,000Mタンパク質が、ラット精巢上体精細胞膜に検出された。間接免疫蛍光法は、C末端ペプチド抗体で標識化されているメタノール固定浸透マウス精巢上体精細胞膜において実施された。結合抗体は、位相差および側面蛍光発光顕微鏡を用いてAlexaFluor-488共役二次抗体により検出された。上記CatSper2タンパク質は鞭毛に局在化されていた。このシグナルは、スクランブルドバージョンのペプチドではなく競合ペプチドを用いたプレインキュベーションによりブロックされた。

20

(実施例9)

(蛍光インサイチューハイブリダイゼーション)

マウスゲノムクローンは、配列識別番号:5のヌクレオチド113-531に対応するcDNAプローブを用いて同定された。上記BACクローンはニクトランスレーションによりジゴキシゲニンdUTPにより標識化され、また、50%ホルムアミド、10%硫酸デキストラン、および2xSSCの中でマウス胎性線維芽細胞から得られた正常分裂中期染色体を探索するのに使用された。特異的ハイブリダイゼーションシグナルは、蛍光発光抗ジゴキシゲニン抗体とDPIにより対比染色された上記染色体により検出された。合計80の分裂中期細胞がそれぞれのケースで検出された特異的な標識により分析された(Incyte Genomics社、カリフォルニア州Palo Alto市)。

30

【0154】

上記CatSper2遺伝子はマウス染色体2E6-F1上に位置付けられている。雄の不妊症に関連して報告された変異は上記マウスゲノムのこの領域では存在していない。ヒトでは、上記ヌクレオチド値にあるCatSper2に70-75%同一性を有する2つの遺伝子が、染色体15q13のCatSper2の上記マウス染色体位置とシンテニーである領域上で同定された。上述されている3つ全てのヒト精巢クローンはこれら遺伝子のたった一つのみから転写されているように見える。

40

(実施例10)

(電気生理学)

CatSper2単独、あるいはCatSper1と一緒におよび/またはサイクリックヌクレオチドゲートチャネルサブユニット(CNG4)は、CHO-K1およびHEK-293細胞の中にトランスフェクションされて入れられた。全細胞パッチクランプ記録が先に述べられているように実施された(Renら、(2001),同上)。上記ピペッ

50

ト溶液には、pH 7.4で120 mM Cs⁺、60 mM グルタミン酸、20 mM TEA-Cl、5 mM MgCl₂、3 mM Mg-ATP、10 mM EGTA、10 mM HEPESと5 mM D-グルコースが含まれていた。上記水槽には、pH 7.4で135 mM NaCl、5 mM KCl、10 mM CaCl₂、10 mM Na-乳酸塩、10 mM Na-ピルビン酸塩、10 mM グルコースと30 mM HEPESが含まれていた。

【0155】

それぞれのケースでは、電圧、pH、浸透圧、および/またはサイクリックヌクレオチド濃度において変化により導き出された対応付け電流は検出されず、CatSper 2単独ではこれらの細胞において機能的イオンチャネルを形成しないことを示している。同様に、CatSper 1の異種発現単独、あるいはCHGチャネルサブユニットとの組み合わせでは、機能的イオンチャネルを産生することに失敗した(Renら(2001), 同上)。CatSper 1とCatSper 2は重複発現パターンを有するユニークなイオンチャネルファミリーのメンバーであり、機能的異種四量体チャネルを形成するように会合するその能力がテストされた。これら2つのタンパク質の共発現はまた機能的チャネルを産生することに失敗している。

10

(等価物)

それらの特定の実施態様に参照して本発明が特に図示されまた説明されてきたが、形態および詳細におけるさまざまな変更が、本発明の正射と範囲から逸脱することなく本明細書において行うことができることは同業者であれば理解されることであろう。同業者であれば、本明細書において特に説明されている本発明の特定の実施態様に対する多くの等価物があることは、日常的な実験より以上のものを用いることなく、認識し、あるいは確認することができる。こうした等価物は本発明の範囲の中に包摂されることが意図されている。

20

【図面の簡単な説明】

【0156】

以下の図面は本発明のいくつかの実施態様に関する説明的なものであるが、本発明の範囲を制限することが意図されているわけではない。

【図1】図1(A)はマウスCatSper 2のアミノ酸配列である。膜貫通セグメントと鉄選択P領域には下線が施されている。S4の基本的な残基は太字で強調されている。(B) CatSper 2の対様整列とCatSper 1膜貫通領域である。上記P領域は四角で囲んである。

30

【 図 1 】

A)

1 MAQEQGHFOLLRAIDAIRSKLIDTFSLIEHLQGLSQAVPRHTLRRLDPAY
51 QQKLMSGDQEQLVRFSIKPRRMGHITHSRLLSRLEVRCSRMPPLSLWAG
101 WVLDSSVFSKFIISLIFLNTFVLMVEIELMESTNTALNFWKIALLEVADWF
S1
151 ILLSFIVEILLMWLASFSFLWKDAMNVDFPVTLLSLPLVVLGVPAR
S2
201 SVWLOLLRVCRVLRSLKLFARFQIKVILLALNRLKSMFLLMLLLIFF
S3
251 YIFAVTGVIYFPRYSRSTIEGLRYNMFSDLLNSLTVFIFLTLDDHWYAV
S4 S5
P
301 LQNIWKVPRSSRVFSSIVILWMLLGSIIFFNIIIAMMVINFQIRSELS
S6
351 ERMSHLEVQYKADMFQOI IQRRQHSLSLGTSLGKVSEDI IETSDASDD
401 DDDDDDDDDDDDDDKSDATESDGEESDSSENSESENSESEKIDPRKDY
451 AKKSYPEKSHPEKSYPEKSHPEKSYPEKSHPEKSYDEQAEAKVKKESE
501 KAYFVSHSISSHGSTAADTAFLENLDWETLVHENLFGIMDMQDDRIVWP
551 EDSLRYFELLEKLQYNLEBKLRFAVQALMSFEDK

FIGURE 1

B)

Catsper 2 VL----DSSVFSKFIISLIFLNTFVLMVEIELMESTNTALNFWKIALLEVADWFILLSFTV
Catsper 1 MILSITQSLGPETVIFIVUCLNTFVLVAQ-TFTELEIRGW---YPMVLDSEIFLSIVVL
Catsper 2 EILLAWLASFSFLWKDAMNVDFPVTLLSLPLVVLGVPARSVN-LQLLRVCRVLRSL
Catsper 1 RAVLKLIALGLETFYDFWNHLEFFIMVNAVLOFVLLQINSLSYSFYNHSLERILKVPKSM
Catsper 2 KLFAFQOI-KVILLALVRLKSMYFLLMLLLIFFYIFAVTGVIYFPRYSRSTIEGLRYN
Catsper 1 RALRAIRVLRRLSILTSLEHVAGTLLGSLFSITAILTUMFTCLFLSVVLRALFQSDPK
Catsper 2 MFSDDLNSLTVFIFLTLDDHWYAVLQNIWKVPRSSRVFSSIVILWMLLGSIIFFNII
Catsper 1 R-FQNIFFTLTFLPMLTLQNSLTV--IDNRAQGAWYIIP1-LMIYIVTQYFIFLNLVI
Catsper 2 A-MM
Catsper 1 AVLW

【 配 列 表 】

2005512561000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/33676						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; C07K 1/00; C12Q 1/00; A61K 39/00 US CL : 424/185.1; 435.4; 530/852; 536/23.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/185.1; 435.4; 530/852; 536/23.5 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) Dialog, Embase, WPID, Biosis, West								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>REN et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature October 11, 2001, see entire document.</td> <td>1-111</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	REN et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature October 11, 2001, see entire document.	1-111
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
Y	REN et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature October 11, 2001, see entire document.	1-111						
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.								
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search 28 September 2003 (28.09.2003)		Date of mailing of the international search report 17 OCT 2003						
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Dalese Bell-Harris</i> Patrick J. Nolan Telephone No. 703-308-0196						

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 15/08	A 6 1 P 15/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/16	A 6 1 P 15/16	
A 6 1 P 15/18	A 6 1 P 15/16 1 7 1	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 15/18	
C 1 2 N 5/06	A 6 1 P 15/18 1 7 1	
C 1 2 N 5/10	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
C 1 2 Q 1/02	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68 A	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53 D	
// C 0 7 K 14/47	G 0 1 N 33/53 M	
C 0 7 K 16/18	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00 B	
	C 1 2 N 5/00 E	
	A 6 1 K 37/02	
	C 0 7 K 14/47	
	C 0 7 K 16/18	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (71)出願人 503163480
 ボード オブ リージェンツ ユニバーシティ オブ テキサス システム
 アメリカ合衆国, テキサス 7 8 7 0 1, オースティン, ウェスト セブンス ストリート 2 0
 1
- (74)代理人 100083932
 弁理士 廣江 武典
- (74)代理人 100121429
 弁理士 宇野 健一
- (74)代理人 100129698
 弁理士 武川 隆宣
- (72)発明者 レン, デジアン
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 0 9 6, ウィニーウッド, クローバー ヒル ロード
 9 3 7
- (72)発明者 クラファム, デイビッド, イー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 8 2, ウェルスレイ, アトウッド ストリート 3
- (72)発明者 ガーバース, デイビッド, エル.
 アメリカ合衆国 テキサス州 7 6 2 1 0, デントン, ウォーターフォード ウエイ 3 8 2 6
- (72)発明者 クイル, チモシー, エー.
 アメリカ合衆国 テキサス州 7 6 0 5 1, グレーブペイン, ハイデンベンド サークル 1 8 0
 9

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA36 FB03 FB05
4B024 AA01 AA11 BA31 BA80 CA04 CA09 CA20 DA02 DA12 EA04
GA11 HA13 HA14 HA17
4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ43
QQ53 QQ61 QQ79 QQ89 QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42
QR56 QR62 QR77 QR80 QS16 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39
QX01 QX02 QX04 QX10
4B065 AA90X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 BA30 CA24 CA43 CA44
CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 AA17 BA02 BA44 DA40 MA01
MA28 MA56 NA14 ZA811 ZA861 ZB211 ZB212 ZC412 ZC611
4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 DD62 EE01 EE05
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA86 EA20 EA50
FA71 FA74