

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-523355

(P2021-523355A)

(43) 公表日 令和3年9月2日(2021.9.2)

(51) Int.Cl.

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

Y

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁)

(21) 出願番号 特願2020-561056 (P2020-561056)
 (86) (22) 出願日 令和1年5月2日 (2019.5.2)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年12月29日 (2020.12.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/030372
 (87) 国際公開番号 W02019/213379
 (87) 国際公開日 令和1年11月7日 (2019.11.7)
 (31) 優先権主張番号 62/665,870
 (32) 優先日 平成30年5月2日 (2018.5.2)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 518222620
 アンドロヴィア ライフサイエンス、
 エルエルシー
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
 092, マウンテンサイド, ミル
 レーン 187
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 男性の生殖能力状態を決定するための方法およびテストキット

(57) 【要約】

本開示は、男性の生殖能力状態、およびそれと、回帰モデルを使用して計算されるような、妊娠を引き起こす確率との関連性を決定する方法を提供する。方法は、精子受精能獲得を誘発した後の G_{M1} 局在パターンを決定すること、様々なパターンのパーセンテージ、特に $[(A + APM) / G_{M1} \text{局在パターンの合計数}]$ の比を特定すること、および誘発された受精能獲得にตอบสนองする特定の G_{MI} 局在パターンのパーセンテージが変化しているか決定することを含む。誘発された受精能獲得にตอบสนองする特定のパターンの局在パターンのパーセンテージに生じた変化に基づき、単独でまたはその他の精子特性と組み合わせて、男性の生殖能力状態が特定され得る。

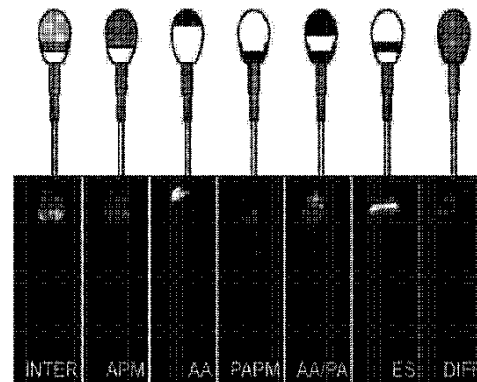


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a. 男性に由来する精子試料の一部を、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露し、これにより受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、
- b. 前記受精能を獲得した精子試料を、固定剤を用いて固定し、これにより固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、
- c. 前記固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子であって、検出可能な標識を有する標識分子で処理し、これにより標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、
- d. 前記標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む複数の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップと、
- e. 前記 AA G_{M1} 局在パターンおよび前記 APM G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップと、
- f. 前記縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てるステップと、
- g. 1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、前記精子試料から得られたデータに適用することにより、前記男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、前記精子試料から得られた前記データが、(i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比 (例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比) を含むステップとを含む、方法。

10

20

【請求項 2】

前記精子試料から得られた前記データが、(i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 3】

前記精子試料から得られた前記データが、

i. 前記精子試料の体積、

ii. 前記精子試料中の精子の濃度、

iii. 前記精子試料中の精子の運動性、ならびに

iv. (a) (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 前記精子試料の体積、(c) 前記精子試料中の精子の濃度、および (d) 前記精子試料中の精子の運動性のうちの任意の 2 つの、演算による組合せからなる群より選択される 1つまたは複数のデータ項目を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 4】

前記精子試料から得られた前記データが、

a. (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、

b. 前記精子試料の体積、ならびに

c. (a) (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、および (b) 前記精子試料の体積、の積からなる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

50

前記 1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、非線形回帰モデルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、ロジスティック回帰モデル（例えば、

【数 10】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

の形態のモデルであって、式中、

10

a . $f(X)$ が、生殖能力の尺度であり、

b . i が、正の整数であり、

c . α が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

d . $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

e . $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j が、前記精子試料から得られた前記データ内のデータ項目である

モデル)である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

20

前記受精能獲得条件が、前記精子試料の前記一部分を、重炭酸イオン、カルシウムイオン、およびステロール流出のメディエーターのうちの 1 つまたは複数の曝露することを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリン、メチル - β - シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質、またはリボソームを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリンを含む、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記固定剤が、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはその組合せを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

G_{M1} 局在パターンに対する前記標識分子が、蛍光的に標識されたコレラ毒素 b サブユニットを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記特定するステップが、前記曝露するステップの 2 ~ 24 時間後に実施される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記曝露するステップの前に、前記精子試料の前記一部分の粘度を減少させるために、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して、前記精子試料の前記一部分を処理するステップを更に含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

a . *in vitro* での受精能獲得条件に曝露されており、固定剤内で固定されており、および G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で染色されている、男性に由来する精子試料の一部分について、その第 1 の部分を得るステップであって、前記標識分子が検出可能な標識を有する、ステップと、

50

b. 前記標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部（AA） G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜（APM） G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む複数の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップと、

c. 前記AA G_{M1} 局在パターンおよび前記APM G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップと、

d. 前記縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てるステップと、

e. 1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、前記精子試料から得られたデータに適用することにより、前記男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、前記精子試料から得られた前記データが、(i)前記AA G_{M1} 局在パターンと前記APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せの間の比（例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比）を含むステップと、

を含む、方法。

【請求項15】

前記精子試料から得られた前記データが、(i)前記AA G_{M1} 局在パターンと前記APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記精子試料から得られた前記データが、

a. 前記精子試料の体積、

b. 前記精子試料中の精子の濃度、

c. 前記精子試料中の精子の運動性、ならびに

d. (a)(i)前記AA G_{M1} 局在パターンと前記APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b)前記精子試料の体積、(c)前記精子試料中の精子の濃度、および(d)前記精子試料中の精子の運動性のうちの任意の2つの、演算による組合せからなる群より選択される1つまたは複数のデータ項目を更に含む、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記精子試料から得られた前記データが、

a. (i)前記AA G_{M1} 局在パターンと前記APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、

b. 前記精子試料の体積、ならびに

c. (a)(i)前記AA G_{M1} 局在パターンと前記APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、および(b)前記精子試料の体積、の積からなる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器が、非線形回帰モデルである、請求項14～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器が、ロジスティック回帰モデル（例えば、

【数11】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

10

20

30

40

50

の形態のモデルであって、式中、

a. $f(X)$ が、生殖能力の尺度であり、

b. i が、正の整数であり、

c. α が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

d. $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

e. $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j が、前記精子試料から得られた前記データ内のデータ項目である

モデル)である、請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記受精能獲得条件が、前記精子試料の前記一部分を、重炭酸イオン、カルシウムイオン、およびステロール流出のメディエーターのうちの 1 つまたは複数に曝露することを含む、請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリン、メチル - β - シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リボタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質、またはリボソームを含む、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリンを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記固定剤が、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはその組合せを含む、請求項 14 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

G_{M1} 局在パターンに対する前記標識分子が、蛍光的に標識されたコレラ毒素 b サブユニットを含む、請求項 14 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記特定するステップが、前記曝露するステップの 2 ~ 24 時間後に実施される、請求項 14 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記得るステップの前に、前記精子試料の前記一部分の粘度を減少させるために、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して、前記精子試料の前記一部分を処理するステップを更に含む、請求項 14 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

a. 精子試料を得るステップであって、前記精子試料の少なくとも一部分が、*in vitro* で受精能を獲得した精子を得るために、*in vitro* で受精能獲得条件に曝露されており、固定剤に曝露されており、および G_{M1} について染色されており、これにより標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料を形成する、ステップと、

40

b. 前記標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料の Cap - Score を、1 つまたは複数の G_{M1} 標識された局在パターンに基づき決定するステップであって、前記 G_{M1} 標識された局在パターンが、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体後方原形質膜 (Post-Acrosomal PlasmaMembrane) (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンである、ステップと、

c. 1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、前記精子試料から得られたデータに適用することにより、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、前記

50

データが、(i) 前記 A A G_{M 1} 局在パターンと前記 A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての前記 G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比（例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比）を含む、ステップとを含む、方法。

【請求項 28】

前記精子試料から得られた前記データが、(i) 前記 A A G_{M 1} 局在パターンと前記 A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての前記 G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記精子試料から得られた前記データが、

- a . 前記精子試料の体積、
- b . 前記精子試料中の精子の濃度、
- c . 前記精子試料中の精子の運動性、ならびに

d . (a) (i) 前記 A A G_{M 1} 局在パターンと前記 A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての前記 G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 前記精子試料の体積、(c) 前記精子試料中の精子の濃度、および (d) 前記精子試料中の精子の運動性のうちの任意の 2 つの、演算による組合せ

からなる群より選択される 1 つまたは複数のデータ項目を更に含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記精子試料から得られた前記データが、

- a . (i) 前記 A A G_{M 1} 局在パターンと前記 A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての前記 G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、
 - b . 前記精子試料の体積、ならびに
 - c . (a) (i) 前記 A A G_{M 1} 局在パターンと前記 A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての前記 G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、および (b) 前記精子試料の体積、の積、
- からなる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、非線形回帰モデルである、請求項 27 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記 1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、ロジスティック回帰モデル（例えば、

【数 12】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

の形態のモデルであって、式中、

v . f (X) が、生殖能力の尺度であり、

v i . i が、正の整数であり、

v i i . α が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

v i i i . β₀ , β₁ , . . . , β_i が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

i x . { X₁ , . . . , X_i } 内の各 X_j が、前記精子試料から得られた前記データ内のデータ項目である

モデル) である、請求項 27 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

前記得るステップの前に、前記精子試料の前記一部分の粘度を減少させるために、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して、前記精子試料の前記一部分を処理するステップを更に含む、請求項 27 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

a. 1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、男性に由来する精子試料から得られたデータに適用することにより、前記男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、前記データが、前記精子試料の、処理された一部分において、(i) 先体頂部(AA) G_{M1} 局在パターンと先体原形質膜(APM) G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比を含む、ステップを含む方法であって、

10

b. (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比が、

a. 前記男性に由来する前記精子試料の一部分を、in vitro で受精能獲得条件に曝露し、これにより受精能を獲得した精子試料を形成すること、

b. 固定剤を用いて前記受精能を獲得した精子試料を固定し、これにより固定され、in vitro で受精能を獲得した精子試料を形成すること、

c. 前記固定され、in vitro で受精能を獲得した精子試料を、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子であって、検出可能な標識を有する標識分子で処理し、これにより標識され、固定され、in vitro で受精能を獲得した精子試料を形成すること、

20

d. 前記標識され、固定され、in vitro で受精能を獲得した精子試料について、AA G_{M1} 局在パターン、APM G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む複数の G_{M1} 標識された局在パターンを特定すること、

e. 前記 AA G_{M1} 局在パターンおよび前記 APM G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てること、

f. 前記縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てること、ならびに

g. (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せを、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せと比較することにより決定される、方法。

30

【請求項 35】

前記精子試料から得られた前記データが、(i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記精子試料から得られた前記データが、

a. 前記精子試料の体積、

b. 前記精子試料中の精子の濃度、

c. 前記精子試料中の精子の運動性、ならびに

40

d. (a) (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 前記精子試料の体積、(c) 前記精子試料中の精子の濃度、および (d) 前記精子試料中の精子の運動性のうちの任意の 2 つの、演算による組合せ

からなる群より選択される 1 つまたは複数のデータ項目を更に含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

前記精子試料から得られた前記データが、

a. (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの

50

組合せと、(i i) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、

b . 前記精子試料の体積、ならびに

c . (a) (i) 前記 $A A_{G_{M1}}$ 局在パターンと前記 $A P M_{G_{M1}}$ 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、および (b) 前記精子試料の体積、の積からなる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記 1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、非線形回帰モデルである、請求項 34 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記 1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、ロジスティック回帰分析モデル (例えば、

【数 13】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

の形態のモデルであって、式中、

a . $f(X)$ が、生殖能力の尺度であり、

b . i が、正の整数であり、

c . α が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、
および

d . $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ が、前記事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

e . $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j が、前記精子試料から得られた前記データ内のデータ項目である

モデル)である、請求項 34 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記受精能獲得条件が、前記精子試料の前記一部分を、重炭酸イオン、カルシウムイオン、およびステロール流出のメディエーターのうちの 1 つまたは複数の曝露することを含んだ、請求項 34 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリン、メチル - β - シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質、またはリボソームを含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリンを含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

前記固定剤が、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはその組合せを含む、請求項 34 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

G_{M1} 局在パターンに対する前記標識分子が、蛍光的に標識されたコレラ毒素 b サブユニットを含む、請求項 34 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記特定するステップが、前記曝露するステップの 2 ~ 24 時間後に実施された、請求項 34 ~ 44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

前記曝露するステップの前に、前記精子試料の前記一部分の粘度を減少させるために、前記精子試料の前記一部分が、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、

10

20

30

40

50

かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理された、請求項 34 ~ 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

男性の生殖能力状態を特徴付ける生殖能力分類器を訓練するためのシステムであって、

a . 少なくとも 1 つのプロセッサ、および前記少なくとも 1 つのプロセッサによりアドレス可能なメモリを含み、前記メモリが前記少なくとも 1 つのプロセッサにより実行される少なくとも 1 つのプログラムを記憶し、前記少なくとも 1 つのプログラムが、

i . 生殖補助（例えば、子宮内人工授精（IUI））における試みについての既知の転帰と関連付けられた複数の男性に由来する精子試料に由来するデータを含む訓練セットであって、各個別の精液試料に由来する前記データが、前記個別の精液試料中の精子の、(x) AA G_{M1} 局在パターンと APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(y) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比（例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比）を含む、訓練セットを得るための命令、および

ii . 前記生殖補助の試みの転帰と、各個別の精液試料中の精子の、(i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の対応する比との間の少なくとも 1 つの対応に基づき、1 つまたは複数の生殖能力分類器を訓練するための命令を含む、システム。

【請求項 48】

前記複数の男性に由来する各個別の精子試料について、精子の、(i) 前記先体頂部（AA） G_{M1} 局在パターンと前記先体原形質膜（APM） G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンとの組合せとの間の比が、

a . 前記複数の男性内の個別の男性に由来する前記精子試料の一部分を、受精能獲得条件に *in vitro* で曝露し、これにより受精能を獲得した精子試料を形成するステップ、

b . 固定剤を用いて前記受精能を獲得した精子試料を固定し、これにより固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料を形成するステップ、

c . 前記固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料を、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子であって、検出可能な標識を有する標識分子で処理し、これにより標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料を形成するステップ、

d . 前記標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料について、AA G_{M1} 局在パターン、APM G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む複数の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップ、

e . 前記 AA G_{M1} 局在パターンおよび前記 APM G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップ、

f . 前記縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てるステップ、ならびに

g . 精子の、(i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せを、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せと比較するステップ、

を含む方法により決定された、請求項 47 に記載のシステム。

【請求項 49】

前記受精能獲得条件が、前記精子試料の前記一部分を、重炭酸イオン、カルシウムイオン、およびステロール流出のメディエーターのうちの 1 つまたは複数に曝露することを含む、請求項 48 に記載のシステム。

【請求項 50】

10

20

30

40

50

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリン、メチル - β - シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質、またはリボソームを含む、請求項 49 に記載のシステム。

【請求項 51】

前記ステロール流出のメディエーターが、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリンを含む、請求項 49 に記載のシステム。

【請求項 52】

前記固定剤が、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはその組合せを含む、請求項 48 ~ 51 のいずれか一項に記載のシステム。

10

【請求項 53】

G_{M1} 局在パターンに対する前記標識分子が、蛍光的に標識されたコレラ毒素 b サブユニットを含む、請求項 48 ~ 52 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 54】

前記特定するステップが、前記曝露するステップの 2 ~ 24 時間後に実施される、請求項 48 ~ 53 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 55】

各個別の精液試料について、精子の、(i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比を決定するのに使用される前記方法が、得るステップの前に、前記精子試料の粘度を減少させるために、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して、前記精子試料の前記一部分を処理するステップを更に含んだ、請求項 48 ~ 54 のいずれか一項に記載のシステム。

20

【請求項 56】

前記 1 つまたは複数の生殖能力分類器を訓練するのに使用されるデータが、前記複数の男性に由来する各個別の精液試料に由来する、(i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) 前記 G_{M1} 標識された局在パターンのすべての組合せとの間の比からなる、請求項 47 ~ 55 のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項 57】

前記生殖能力分類器を訓練するのに使用されるデータが、前記複数の男性に由来する各個別の精液試料に由来する、

- a . 前記精子試料の体積、
- b . 前記精子試料中の精子の濃度、
- c . 前記精子試料中の精子の運動性、ならびに

d . (a) (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 前記精子試料の体積、(c) 前記精子試料中の精子の濃度、および (d) 前記精子試料中の精子の運動性のうちの任意の 2 つの、演算による組合せからなる群より選択される 1 つまたは複数のデータ項目を更に含む、請求項 47 ~ 55 のいずれか一項に記載のシステム。

40

【請求項 58】

前記生殖能力分類器を訓練するのに使用されるデータが、前記複数の男性に由来する各個別の精子試料に由来する、

a . (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の個別の比

- b . 前記精子試料の体積、ならびに

c . (a) (i) 前記 AA G_{M1} 局在パターンと前記 APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての前記 G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の

50

比、および (b) 前記精子試料の体積、の積からなる、請求項 57 に記載のシステム。

【請求項 59】

前記 1 つまたは複数の生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、非線形回帰モデルである、請求項 47 ~ 58 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 60】

前記 1 つまたは複数の生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器が、ロジスティック回帰分析モデル (例えば、

【数 14】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

10

の形態のモデルであって、式中、

a. $f(X)$ が、生殖能力の尺度であり、

b. i が、正の整数であり、

c. α が、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

d. $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ が、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

20

e. $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j が、前記精子試料から得られた前記データ内のデータ項目である

モデル) である、請求項 47 ~ 58 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 61】

a. 請求項 6 に記載の方法を使用して妊娠のパーセント可能性を決定するステップ、および

b. ステップ a において特定された数値に基づき、適切な生殖アプローチを決定するステップ

を含む、生殖アプローチを特定するための方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、男性の生殖能力の分野、より具体的には、精子受精能獲得が誘発された後の、 G_{M1} ガングリオシド分布パターンに基づき、男性の生殖能力状態を決定することと一般的に関連する。

【背景技術】

【0002】

米国では、10%のカップルが不妊症と関連する予約診療を受診しており、不妊症の40%は男性において生じたものである。世界的には、これは7300万組を超える不妊カップルに相当する。代表的な男性の生殖健康診断では、精子数、外観、および運動性が評価される。残念ながら、不妊男性の半数は、これらの記述的基準について正常なパラメーターに適合する精子を有し、また自然妊娠および生殖補助、例えば子宮内人工授精 (IUI) 等の技術の両方において失敗を繰り返した後、「特発性不妊症」を有するとして特定されるにすぎない。サイクルが失敗する毎に、身体的、精神的、および経済的に大きな負担をカップルに負わせ、また米国の健康管理システムにとって、毎年50億ドルを超えるコストとなるので、精子機能の実用的なテストに対してきわめて大きな必要性が存在する。精子機能に関するデータがあれば、臨床医は、その患者に、最良の妊娠機会を患者にもたらす生殖補助技術を指示することができる。

40

【0003】

女性器に進入した際、精子は卵子を速やかに受精させることができるわけではない。む

50

しろ、精子は「受精能獲得」として知られている機能的成熟プロセスを経なければならない。このプロセスは、精子の細胞膜において特異的な変化を有することにより特異的な刺激に応答するその能力、すなわち受精能を獲得するための刺激への曝露に応答して、ガングリオシド G_{M1} の分布パターンに変化が生ずる能力に立脚する。

【0004】

様々な G_{M1} 局在パターンが特定され、また受精能獲得または非受精能獲得に関連付けられている。特に、先体頂部 (Apical Acrosome) (AA) G_{M1} 局在パターンおよび先体原形質膜 (Acrosomal Plasma Membrane) (APM) G_{M1} 局在パターンが、ウシおよびヒトの精子において受精能獲得に関連付けられている。精子の受精能獲得は、Cap - Score (商標) 精子機能テストまたは Cap - Score (商標) 男性生殖能力アッセイ (「Cap - Score (商標) テスト」または「Cap - Score (商標)」) により生成される Cap - Score (商標) 値として定量的に表現可能であり、それは ([先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターンの数 + 先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターンの数] / G_{M1} 標識された局在パターンの合計数) として定義されるが、その場合、各局在パターンの数が測定され、次に最終的にパーセンテージスコアに変換される。APM G_{M1} 局在パターンおよび AA G_{M1} 局在パターンに加えて、その他の標識された局在パターンとして、縞状細胞 (Lined - Cell) G_{M1} 局在パターン、中間 (INTER) G_{M1} 局在パターン、先体後方原形質膜 (post acrosomal plasma membrane) (PAPM) G_{M1} 局在パターン、先体頂部 / 先体後方 (AA / PA) G_{M1} 局在パターン、赤道セグメント (ES) G_{M1} 局在パターン、および拡散性 (DIFF) G_{M1} 局在パターンが含まれた (Travis et al., "Impacts of common semen handling methods on Sperm function," The Journal of Urology, 195 (4), e909 (2016))。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Travisら、The Journal of Urology (2016) 195 (4) e909

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の一実施形態では、男性の生殖能力状態を決定するための方法およびキットが本明細書において開示される。一実施形態では、本開示は、少なくとも1つの受精能獲得刺激に応答して、特定の G_{M1} 局在パターンの数に生じた変化に基づき、男性の生殖能力状態を特定するための方法について記載する。

本明細書に開示される実施形態は、男性の生殖能力状態を決定するための方法である。一実施形態では、方法は下記のステップを含む：受精能獲得刺激に曝露された精子細胞の試料は、蛍光標識で処理される。そのような精子細胞の1つまたは複数の蛍光画像が得られるが、該画像は1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンを呈する。先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターンおよび先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターンを発現する精子細胞は、受精能獲得状態にそれぞれ割り当てられ、そしてすべてのその他の蛍光標識された G_{M1} 局在パターンは、非受精能獲得状態に割り当てられる。受精能を獲得していない G_{M1} 局在パターンとして、INTER、PAPM (先体後方原形質膜)、AA / PA (先体頂部 / 先体後方)、ES (赤道セグメント) DIFF (拡散性)、および縞状細胞が挙げられる。[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージが計算される。一実施形態では、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージと関連する生殖能力閾値が決定されるが、その場合、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差

下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示し；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示し；参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊であることを示す。一実施形態では、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA)G_{M1} \text{局在パターン} + APM)G_{M1} \text{局在パターン}] / \text{総}G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージは、 $[(AA)G_{M1} \text{局在パターン} + APM)G_{M1} \text{局在パターン}] / \text{総}G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

【0007】

別の実施形態では、 $[(AA)G_{M1} \text{局在パターン} + APM)G_{M1} \text{局在パターン}] / \text{総}G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値が決定されるが、その場合、 $[(AA)G_{M1} \text{局在パターン} + APM)G_{M1} \text{局在パターン}] / \text{総}G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性生殖能力を示し；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性生殖能力を示す。標識され、固定され、受精能を獲得した精子試料についての $[(AA)G_{M1} \text{局在パターン} + APM)G_{M1} \text{局在パターン}] / \text{総}G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージが、 $[(AA)G_{M1} \text{局在パターン} + APM)G_{M1} \text{局在パターン}] / \text{総}G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

【0008】

本明細書に開示される別の実施形態は、男性の生殖能力状態を決定するための方法である。一実施形態では、方法は、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料を得るために、男性に由来する精子試料の第1の部分に非受精能獲得条件に曝露するステップ；*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を得るために、精子試料の第2の部分に受精能獲得条件に曝露するステップ；*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を固定剤で、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間、または24時間の期間にわたって固定するステップ；固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で処理するステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、2つ以上の標識された G_{M1} 局在パターンを特定するステップであって、前記 G_{M1} 標識された局在パターンが、先体頂部 $(AA)G_{M1}$ 局在パターン、先体原形質膜 $(APM)G_{M1}$ 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンであるステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンを、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンと比較するステップ；比較に基づき、先体頂部 $(AA)G_{M1}$ 局在パターンと先体原形質膜 $(APM)G_{M1}$ 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップ、および縞状細胞 G_{M1} 局在パターンとすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを非受精能獲得状態に割り当てるステップ；ならびに標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、特定され、 G_{M1} 標識された局在パターンに基づき、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップを含む。一実施形態では、特徴付けるステップは、下記のステップを含む：標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA)G_{M1} \text{局在パターン} + APM)G_{M1} \text{局在パターン}] / \text{総}G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテ

ジと関連する生殖能力閾値を決定するステップ；ただし、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + AP \text{ } M \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示し；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示し；参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、不妊を示す。標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + AP \text{ } M \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージは、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + AP \text{ } M \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

10

【0009】

別の実施形態では、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + AP \text{ } M \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値が決定されるが、ただし、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + AP \text{ } M \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性生殖能力を示し；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性生殖能力を示す。標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + AP \text{ } M \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージは、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + AP \text{ } M \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

20

【0010】

一実施形態では、曝露するステップの前に、精液粘度を減少させるために、精液試料は、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される、精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理される。いくつかのそのような実施形態では、膜損傷性試薬は、(i)プロテアーゼ；(ii)ヌクレアーゼ、(iii)粘液溶解剤；(iv)リパーゼ；(v)エステラーゼ、および(vi)グリコシドヒドロラーゼを潜在的に含みうる。一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数が実質的に一定になるまで繰り返される。そのような一実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数を、該数が標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満となるまで；または標識された細胞の合計数の1%~5%、2~5%の範囲に収まるまで決定する。別のそのような実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数を、該数が標識された細胞の合計数の25%、20%、15%、もしくは10%未満となるまで；または標識された細胞の合計数の2%~25%、2%~20%、2~15%、2~10%、2~5%の範囲に収まるまで決定される。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージ、または14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1mm、1.2mm、または1.4mmのオリフィスサイズを有する。

30

40

【0011】

別のそのような実施形態では、特徴付けるステップは下記のステップをさらに含む：事前に決定された数の、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターン数を決定するステップ；事前に決定された数の、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターン数を決定するステップ；標識され、固定され、

50

*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料について、 $AA-G_{M1}$ 局在パターンの数と $APM-G_{M1}$ 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップ；および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、 $AA-G_{M1}$ 局在パターンの数と $APM-G_{M1}$ 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップ。

【0012】

本明細書に開示される一実施形態では、方法は下記のステップをさらに含む：標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子の比を、生殖能力状態が既知である、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子の比と比較するステップ；および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子の比を、生殖能力状態が既知である、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子の比と比較するステップ。

10

【0013】

本明細書に開示されるさらに別の実施形態は、男性の生殖能力状態を決定するための方法である。一実施形態では、方法は下記のステップを含む：*in vitro*での非受精能獲得条件に曝露され、固定剤中で少なくとも1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、18時間、または24時間固定され、および G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で処理された、男性に由来する精子試料の第1の部分を得るステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップ；*in vitro*での受精能獲得条件に曝露され、固定剤中で固定され、および G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で処理された精子試料の第2の部分を得るステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部(AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜(APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンである2つ以上の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンを、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンと比較するステップ；比較に基づき、先体頂部(AA) G_{M1} 局在パターンと先体原形質膜(APM) G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップ、および縞状細胞 G_{M1} 局在パターンとすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを非受精能獲得状態に割り当てるステップ；ならびに標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、特定され、 G_{M1} 標識された局在パターンに基づき、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップ。そのような一実施形態では、特徴付けるステップは下記のステップを含む：標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、 $[(AA-G_{M1}局在パターン + APM-G_{M1}局在パターン) / 総G_{M1}局在パターン]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値を決定するステップであって、 $[(AA-G_{M1}局在パターン + APM-G_{M1}局在パターン) / 総G_{M1}局在パターン]$ の参照パーセンテージが、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示し、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示し、参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊を示す、ステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA-G_{M1}局在パターン + APM-G_{M1}局在パターン) / 総G_{M1}局在パターン]$ のパーセンテージを、 $[(AA-G_{M1}局在パターン + APM-G_{M1}局在パターン) / 総G_{M1}局在パターン]$ の参照パーセンテージと比較するステップ、ならびに比較に基づき生殖能力閾値を特定するステップ。

20

30

40

50

【0014】

別の実施形態では、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値が決定されるが、その場合、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性生殖能力を示し；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な生殖能力を示す。標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージが、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

10

【0015】

一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン の数が実質的に一定になるまで繰り返される。そのような一実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン の数を、該数が標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満となるまで；または標識された細胞の合計数の1%～5%、2～5%の範囲に収まるまで決定する。別のそのような実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン の数を、該数が標識された細胞の合計数の25%、20%、15%、もしくは10%未満となるまで；または標識された細胞の合計数の2%～25%、2%～20%、2～15%、2～10%、2～5%の範囲に収まるまで決定する。

20

【0016】

そのような方法の一実施形態では、方法は下記のステップをさらに含む：事前に決定された数の、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターン の数を決定するステップ、ならびに標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料それぞれについて、 $AA \text{ } G_{M1}$ 局在パターン の数と $APM \text{ } G_{M1}$ 局在パターン の数の和の、 G_{M1} 局在パターン の合計数の和に対する比を計算するステップ。

30

【0017】

別の実施形態では、特徴付けるステップは、生殖能力状態が既知である男性について、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料の比を、*in vitro*で受精能を獲得した精子の G_{M1} 局在パターン の比と比較するステップ；および生殖能力状態が既知である男性について、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料の比を、*in vitro*で受精能を獲得していない精子の G_{M1} 局在パターン の比と比較するステップをさらに含む。

40

【0018】

本明細書に開示されるさらにいっそう別の実施形態は、男性の生殖能力状態を決定するための方法である。一実施形態では、方法は下記のステップを含む：男性に由来する精子試料を、受精能獲得条件に *in vitro*で曝露するステップ；受精能を獲得した精子試料を、固定剤で少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間、または24時間固定するステップ； G_{M1} 局在パターン に対する標識分子で固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を処理するステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンで

50

ある2つ以上の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップ；先体頂部（AA） G_{M1} 局在パターンと先体原形質膜（APM） G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップ、および縞状細胞 G_{M1} 局在パターンとすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを非受精能獲得状態に割り当てるステップ；ならびに男性の生殖能力状態を特徴付けるステップ。一実施形態では、特徴付けるステップは下記のステップを含む：標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料について、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値を決定するステップ；その場合、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示し、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示し、参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊を示す；標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージを、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較するステップ、ならびに比較に基づき生殖能力閾値を特定するステップ。

【0019】

別の実施形態では、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値が決定されるが、その場合、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性生殖能力を示し；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性生殖能力を示す。標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージが、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

【0020】

一実施形態では、曝露するステップの前に、精液粘度を減少させるために、精液試料は、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される、精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理される。一部の実施形態では、膜損傷性試薬は、(i) プロテアーゼ、(ii) ヌクレアーゼ、(iii) 粘液溶解剤、(iv) リパーゼ、(v) エステラーゼ、および (vi) グリコシドヒドロラーゼからなる群より潜在的に選択されうる。一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数が実質的に一定になるまで繰り返される。そのような一実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満となるまで；または標識された細胞の合計数の1%～5%、2～5%の範囲に収まるまで決定する。別のそのような実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が標識された細胞の合計数の25%、20%、15%、もしくは10%未満となるまで；または標識された細胞の合計数の2%～25%、2%～20%、2～15%、2～10%、2～5%の範囲に収まるまで決定する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージ、または14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1mm、1.2mm、または

1. 4 mmのオリフィスサイズを有する。

【0021】

そのような方法の一実施形態では、方法は、 G_{M1} 局在パターンの比を、生殖能力状態が既知である男性に関する G_{M1} 局在パターンの比と比較するステップをさらに含む。そのような一実施形態では、比較するステップは下記のステップを含む：事前に決定された数の、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターンの数を決定するステップ、および AA G_{M1} 局在パターンの数と APM G_{M1} 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップ。

【0022】

本明細書に開示される別の実施形態は、男性の生殖能力状態を決定するための方法である。一実施形態では、方法は下記のステップを含む：*in vitro*での受精能獲得条件に曝露され、固定剤中で、少なくとも1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、18時間、または24時間固定され、および G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で染色された、男性に由来する精子試料の第1の部分を得るステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部(AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜(APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンである2つ以上の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップ；先体頂部(AA) G_{M1} 局在パターンと先体原形質膜(APM) G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップ、および縞状細胞 G_{M1} 局在パターンとすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを非受精能獲得状態に割り当てるステップ；ならびに男性の生殖能力状態を特徴付けるステップ。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値を決定するステップであって、その場合、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示し、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示し、参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊を示す、ステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージを、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較するステップ、ならびに比較に基づき生殖能力閾値を特定するステップを含む。

【0023】

別の実施形態では、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値が決定され、その場合、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性生殖能力を示す；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性生殖能力を示す。標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージが、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

【0024】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を実質的に一定となるまで繰り返される。そのような一実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数を、該数が標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満となる、または標識された細胞の合計数の1%~5%、2~5%の範囲に収まるまで決定する。別のそのような実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数を、該数が標識された細胞の合計数の25%、20%、15%、もしくは10%未満となるまで、または標識された細胞の合計数の2%~25%、2%~20%、2~15%、2~10%、2~5%の範囲に収まるまで決定する。

10

【0025】

そのような方法の一実施形態では、方法は、 G_{M1} 局在パターンの比を、生殖能力状態が既知である男性に関する G_{M1} 局在パターンの比と比較するステップをさらに含む。そのような一実施形態では、比較するステップは、事前に決定された数の、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターン数を決定するステップ、および AA G_{M1} 局在パターン数と APM G_{M1} 局在パターン数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップを含む。

【0026】

本明細書に開示される別の実施形態は、男性の生殖能力状態を決定するための方法である。一実施形態では、方法は下記のステップを含む：精子試料を得るステップであって、*in vitro*で受精能を獲得した精子を得るために、精子試料の少なくとも一部分が *in vitro*での受精能獲得条件に曝露されており、固定剤に少なくとも1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、18時間、または24時間曝露されており、および G_{M1} について染色されているステップ；精子試料の1つまたは複数の精液パラメータに関する数値を得るステップ；1つまたは複数の G_{M1} 標識された局在パターンに基づき、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料の *Cap-Score* を決定するステップであって、前記 G_{M1} 標識された局在パターンが先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体後方原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンであるステップ；ならびに決定された *Cap-Score* および1つまたは複数の得られた精液パラメータに基づき、男性の男性生殖能力指数 (male fertility index) (MFI) 値を計算するステップ。一実施形態では、精子試料の1つまたは複数の精液パラメータは、元の精子試料の体積、精子の濃度、精子の運動性、および精子の形態からなる群より選択される。一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数が実質的に一定となるまで繰り返される。

20

30

【0027】

そのような一実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数を、該数が標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満となるまで、または標識された細胞の合計数の1%~5%、2~5%の範囲に収まるまで決定する。別のそのような実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン数を、該数が標識された細胞の合計数の25%、20%、15%、もしくは10%未満となるまで、または標識された細胞の合計数の2%~25%、2%~20%、2~15%、2~10%、2~5%の範囲に収まるまで決定する。

40

【0028】

本明細書に記載される本方法の様々な実施形態では、 G_{M1} 標識された局在パターンのうちの2つ以上は、 AA G_{M1} 局在パターン、 APM G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、中間 ($INTER$) G_{M1} 局在パターン、先体後方原形質膜 (PA

50

PM) G_{M1} 局在パターン、先体頂部 / 先体後方 (AA / PA) G_{M1} 局在パターン、赤道セグメント (ES) G_{M1} 局在パターン、および拡散性 (DIFF) G_{M1} 局在パターンを含む。

【0029】

一実施形態では、精子試料の第1の部分を受精能獲得条件に曝露するステップ、および精子試料の第2の部分を受精能獲得条件に曝露するステップが同時に行われる。

【0030】

一実施形態では、受精能を獲得した精子の1つまたは複数の G_{M1} 局在パターン、および受精能を獲得していない精子の1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンを説明する図であって、受精能を獲得した精子の前記 G_{M1} 局在パターンおよび受精能を獲得していない精子の前記 G_{M1} 局在パターンが既知の生殖能力状態を反映する図；精子膜の剪断を防止するのに十分な直径サイズのオリフィスを有する広いオリフィスのピペット；下記のうちの1つまたは複数：受精能獲得培地、非受精能獲得培地、固定剤組成物、 G_{M1} 局在パターンを決定するための標識試薬（ただし、固定剤組成物は精子膜に損傷を与えず、受精能獲得培地および非受精能獲得培地は、*in vitro* で精子細胞に適用されたとき、図に反映されるような、受精能を獲得した精子を示す G_{M1} 局在パターン、および受精能を獲得していない精子を示すパターンを生成する）を含む、男性の生殖能力状態を特定するためのキットが本明細書に開示される。一実施形態では、キットは、精子膜への損傷を回避するために、精子を取り扱うための指示を備える。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージ、または14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1mm、1.2mm、または1.4mmのオリフィスサイズを有する。

【0031】

本明細書に記載されるある特定の実施形態では、*in vitro* での受精能獲得条件は、重炭酸イオン、カルシウムイオン、およびステロール流出のメディエーターのうちの1つまたは複数への曝露を含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、メチル-β-シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質、またはリボソームである。一実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンである。

【0032】

一実施形態では、非受精能獲得条件は、重炭酸イオン、カルシウムイオン、およびステロール流出のメディエーターのうちの1つまたは複数への曝露の欠如を含む。

【0033】

本明細書に記載されるある特定の実施形態では、固定剤はアルデヒド固定剤である。一実施形態では、固定剤として、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはその組合せが挙げられる。ある特定の実施形態では、 G_{M1} に対する親和性分子は蛍光標識されたコレラ毒素bサブユニットである。

【0034】

本明細書に記載されるある特定の実施形態では、方法は、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、精子試料から得られたデータに適用することにより、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップを含むが、その場合、該精子試料から得られたデータは、(i) AA G_{M1} 局在パターンとAPM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比（例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比）を含むことが記載される。

【0035】

本明細書に記載される本発明のある特定の実施形態では、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの分類器は、ロジスティック回帰モデル（例えば、

【数 1】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

の形態のモデルであって、式中、

$f(X)$ が、生殖能力の尺度であり、

i が、正の整数であり、

α が、該事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

$\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ が、該事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、および

$\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j が、該精子試料から得られたデータ内のデータ項目である、

モデル)である。

【0036】

ある特定の実施形態では、男性の生殖能力状態を特徴付けるための生殖能力分類器を訓練するためのシステムが記載される。一実施形態では、システムは、少なくとも1つのプロセッサおよび該少なくとも1つのプロセッサによりアドレス可能なメモリを含み、該メモリは、該少なくとも1つのプロセッサにより実行するための少なくとも1つのプログラムを記憶し、該少なくとも1つのプログラムは、

A) 生殖補助(例えば、子宮内人工授精(IUI))における試みについての既知の転帰と関連付けられた複数の男性に由来する精子試料から得られたデータを含む訓練セットであって、各個別の精液試料に由来するデータが、該個別の精液試料中の精子の、(i) 該AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべての該G_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の比(例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比)を含む、訓練セットを得るための命令、および

B) 該生殖補助の試みの転帰と、各個別の精液試料中の精子の、(i) 該AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべての該G_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の対応する比との間の少なくとも1つの対応に基づき、1つまたは複数の生殖能力分類器を訓練するための命令を含む。

【0037】

ある特定の実施形態では、生殖アプローチを特定するための方法が記載される。一実施形態では、方法は、本発明にしたがうCap-Scoreを決定するステップ、本発明に記載されるようなロジスティック回帰モデルを使用して、子宮腔内授精を3回試みたうちに自然受胎し、3ヶ月以内に妊娠する可能性を決定するステップ、および前記数値に基づき、生殖アプローチが妊娠を達成したか決定するステップを含む。

【0038】

男性の生殖能力状態を決定するための方法およびキットの実施形態に関する前述の概要および後述する詳細な説明は、添付の図面と併せて読むと、より良く理解されるであろう。しかし、本発明は、示されている正確な構成および手段に限定されないことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、非受精能獲得条件または受精能獲得条件下での、正常ヒト精子および不妊男性に由来する精子におけるG_{M1}のINTER、APM、AA、PAPM、AA/PA、ESおよびDIFF局在パターンを示す。

【0040】

【図2】図2Aは、非受精能獲得条件下での正常ヒト精子におけるG_{M1}のINTER、APM、AA、PAPM、AA/PA、ESおよびDIFF局在パターンの相対分布を示す。

10

20

30

40

50

【0041】

図2Bは、受精能獲得条件下での正常ヒト精子における G_{M1} のINTER、APM、AA、PAPM、AA/PA、ESおよびDIFF局在パターンの相対分布を示す。

【0042】

図2Cは、受精能獲得条件下での、不妊男性に由来するヒト精子における G_{M1} のINTER、APM、AA、PAPM、AA/PA、ESおよびDIFF局在パターンの相対分布を示す。

【0043】

【図3】図3は、受精能獲得条件および非受精能獲得条件下での、正常男性群に関するヒト精子および不妊男性群に関するヒト精子におけるインキュベーション時間の関数としての、組み合わせたAPMおよびAA局在パターンの相対数、ならびに各男性群に関する臨床転帰を示す。

10

【0044】

【図4】図4は、受精能獲得を促進する刺激と共にインキュベートされた、既知の生殖能力があるドナーに由来する精子におけるAAおよびAPM局在パターンのパーセンテージを示す。

【0045】

【図5】図5は、生殖能力が低い(sub-fertile)/不妊であると疑われるドナーに由来する精子におけるAAおよびAPM局在パターンのパーセンテージの、生殖能力がある男性の統計的閾値との比較を示す。

20

【0046】

【図6】図6A、6B、6Cおよび6Dは、受精能獲得条件下での、不妊男性に由来する精子における G_{M1} の縞状細胞 G_{M1} 局在パターンを示す。

【0047】

【図7】図7は、実施例7に記載されている複数クリニック生殖補助転帰訓練セットに基づく、男性の生殖能力のロジスティック回帰モデルを説明する。

【0048】

【図8-1】図8A、8B、8Cおよび8Dは、Cap-Score(商標)と、3回以内の子宮内人工授精の試みで妊娠を生じる確率(PGP)との間の強い関係性を実証するための、ロジスティック回帰の使用を示す。図8Aは、実施例7のデータを示す、 $PGP = 1 / [1 + \exp[-[-2.863 + 0.0776 * \text{Cap-Score}]]]$; $n = 124$; $p < 0.01$ 。モデルのフィットを検査するため、合計 $n = 252$ のために追加的な128個のデータ点が追加された。図8Bは、実施例8のデータを示す、 $PGP = 1 / [1 + \exp[-[-2.263 + 0.0593 * \text{Cap-Score}]]]$; $p < 0.001$ 。いずれのCap-Score(商標)についても、ごく僅かな平均変化が観察され(平均2.6%)、モデルのフィットが改善された。図8Cおよび8Dは、PGP、対、3回以内の子宮内人工授精の試みで観察された妊娠の結果を説明する。

30

【図8-2】同上。

【図8-3】同上。

【発明を実施するための形態】

40

【0049】

添付図面を参照しながら、本発明の様々な実施形態が、以下により完全に記載されている。本発明のすべてではないが、その一部の実施形態を示す。実際、本発明の様々な実施形態は、多くの異なる形態で具体化されうるが、明示的に記載されている実施形態に対する限定として解釈すべきでない。明確化を目的として、端折りながら本発明の明確な理解にとって重要な要素に焦点を当てるために、本発明の図および説明の少なくともいくつかは単純化されているが、当業者が理解するその他の要素も、本発明の一部を占めうるものと理解される。しかしながら、そのような要素は当技術分野において周知されているので、またそれらは本発明のより良い理解を必ずしも促進しないので、そのような要素の説明は本明細書に提示されない。

50

【0050】

本明細書において特定された参考資料のいずれもみな、参照によりその全体が組み込まれている。

【0051】

本明細書において特に記載する場合を除き、用語「a」、「an」、および「the」は、1つの要素に限定されず、むしろ「少なくとも1つの」という意味として読み取られるべきである。

【0052】

「約」は、参照された数値の $\pm 10\%$ の範囲を意味するものと理解される。しかしながら、数値と関連して「約」が使用されても、参照された数値そのものの可能性を除外しない。例えば、「約1時間」は、「54分」、「1時間」および「66分」を十分に支持するものと理解される。

10

【0053】

本開示は、特定の G_{M1} 局在パターンは男性の生殖能力状態に関する情報を提供しうる、という観察に基づく。 G_{M1} 局在パターンの決定は、米国特許第7,160,676号、同第7,670,763号、および同第8,367,313号に記載されており、その開示は本明細書において参照により組み込まれている。本開示は、男性の生殖能力状態を決定するための方法およびキットを提供する。ある特定の実施形態では、方法は、*in vitro*で受精能獲得刺激に曝露された際に、特定の G_{M1} 局在パターンのパーセンテージにおける変化に基づく。他の実施形態では、方法は、*in vitro*での受精能獲得刺激に曝露された際の縞状細胞 G_{M1} 局在パターンのパーセンテージにおける変化に特に基づく。

20

【0054】

一実施形態では、男性の生殖能力状態を決定するための方法が、本明細書に開示される。一実施形態では、方法は、個体から得られた精子試料を*in vitro*での受精能獲得条件および*in vitro*での非受精能獲得条件に付すこと、*in vitro*での受精能獲得条件に曝露された際の特定の G_{M1} 局在パターンのパーセンテージにおける変化を決定すること、および変化のレベルに基づき、生殖能力状態を特定することを含む。

【0055】

用語「*in vitro*で受精能を獲得した」精子とは、受精能獲得プロセスを促進する条件下でインキュベートされた精子を指す。一実施形態では、受精能獲得条件として、重炭酸イオン、カルシウムイオン、およびステロール受容体、例えば血清アルブミン、またはシクロデキストリンのうちの1つまたは複数が培地中に存在することが挙げられる。一実施形態では、*in vitro*での受精能獲得条件として、培地中での重炭酸およびカルシウムイオンの存在、およびステロール受容体の存在が挙げられる。一実施形態では、ステロール受容体は、ステロール流出のメディエーターである。受精能を獲得した精子は、先体エキソサイトーシスを起こす能力を取得しており、また過剰に活性化したパターンの運動性を取得している。用語「*in vitro*で受精能を獲得していない」精子とは、受精能獲得のための上記刺激のうちの1つまたは複数と共にインキュベートされていない精子を指す。一実施形態では、非受精能獲得条件として、受精能獲得条件が存在しないことが挙げられる。別の実施形態では、非受精能獲得条件として、受精能獲得に必要とされる刺激のうちの1つまたは複数が存在しないことが挙げられる。受精能を獲得していない精子は、生理学的リガンド、例えば透明帯、透明帯に由来する可溶化されたタンパク質、またはプロゲステロン等により誘発された先体エキソサイトーシスを起こさない。さらに、非受精能獲得条件下でインキュベートされた精子も、過剰に活性化した運動性を示さない。

30

40

【0056】

一実施形態では、受精能獲得は、外部刺激、例えば重炭酸、およびカルシウムイオン等、ならびにステロール流出のメディエーター、例えば2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リボタンバ

50

ク質、リン脂質小胞、リボソーム等への曝露により、*in vitro*で誘発されうる。ある特定の実施形態では、精子が、これらの刺激のうちの1つまたは複数に*in vitro*で曝露されるとき、 G_{M1} 局在パターンにおける特定可能な変化が観察される。

【0057】

一実施形態では、収集後、精液試料は、液化、洗浄、および/または富化のうちの1つまたは複数を含む、いくつかの方法で一般的に処理される。一部の実施形態では、液化は、試料が、室温または37（またはその間の任意の温度）で、様々な期間（10～60分の範囲であるが、一般的には15～20分）において液化するのを可能にすることと関係する。液化は、精漿がゲルからより流体/液体のコンシステンシーに変換するプロセスである。精漿は、何らかの操作をしなくても一般的に液化するが、しかし特に粘稠試料の場合、またはプロセスを速めたい、もしくは一貫した液化プロトコールを作成し、そのプロトコールによりすべての試料が取り扱われるようにしたい要望が存在する場合には、個体は液化を実現するために試料を操作しうる。ある特定の実施形態では、精液試料は、精液粘度を減少させるために、金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用することにより操作される。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージ、または14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1mm、1.2mm、または1.4mmのオリフィスサイズを有する。ある特定の実施形態では、精子膜に損傷を与えない様々な試薬を添加することにより、液化を実現することもできる。避けるべき試薬として、精子膜に損傷を与える試薬が挙げられる。精子は、遠心分離および再懸濁により洗浄可能であり、またそれを精液分析に付すことができ、ならびに/あるいは下記を含む1つまたは複数の選択プロセスに付すことができる：試料最上部における積層化および密度勾配による遠心分離；試料最上部における積層化および密度勾配による遠心分離、それに続く精子富化画分の収集、その後の再懸濁および洗浄；試料最上部における積層化および密度勾配による遠心分離、それに続く精子富化画分の収集、およびその最上部へのより低密度の培地（運動精子がその中に泳動する）の重層；または試料最上部へのより低密度の培地の重層、および運動精子がその中に泳動するのを可能にすること。

【0058】

最初の処理の後に、精子を数えることができ、次に所望の最終濃度を実現するために、所定数の精子を、*in vitro*非受精能獲得培地または*in vitro*受精能獲得培地を含有する容器（チューブ等）中に配置可能である。一実施形態では、代表的な最終精子濃度は、1,000,000/mlである（最終濃度範囲は、250,000/ml～250,000,000/mlで変化する）。

【0059】

*in vitro*非受精能獲得性および受精能獲得性*in vitro*条件下で精子をインキュベートするためのベース培地は、生理学的緩衝溶液、例えば、ヒト卵管液（HTF）；修飾されたヒト卵管液（mHTF）；Whitten培地；修飾されたWhitten培地；KSOM；リン酸緩衝食塩水；HEPES緩衝食塩水；トリス緩衝食塩水；HamのF-10；Tyrode培地；修飾されたTyrode培地；TES-トリス（TEST）卵黄緩衝液；またはBiggers、Whitten、およびWhittingham（BWW）培地等でありうるが、ただしこれらに限定されない。ベース培地は、生存能力を促進するために、または受精能獲得を誘発するのに十分役立つ濃度において、タンパク質、およびそれに添加されるその他の因子の1つもしくは複数の定義された、または複合した供給源（胎児臍帯血清限外濾過液、プラスマネート、卵黄、スキムミルク、アルブミン、リボタンパク質、または脂肪酸結合タンパク質を含む）を有しうる。受精能獲得のための代表的な刺激として、下記のうちの1つまたは複数が挙げられる：重炭酸塩（5～50mMの範囲、一般的に20～25mM）、カルシウム（0.1～10mMの範囲、一般的に1～2mM）、および/またはシクロデキストリン（0.1～20mMの範囲、一般的に1～3mM）。シクロデキストリンは、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンおよび/またはメチル-β-シクロデキストリンを含み得る。インキュベ-

ション温度は、一般的に37（30～38の範囲）であり、またインキュベーション時間は、一般的に1～4時間（30分～18時間の範囲）であるが、ただしベースライン試料がインキュベーション期間の開始時（「時間ゼロ」）に取得可能である。

【0060】

一実施形態では、 G_{M1} のパターンを生成するために、精子が標準的なベース培地（例えば、リン酸緩衝食塩水、修飾されたWhittem培地、またはその他の類似した培地）で洗浄され、そして G_{M1} に対する標識分子（検出可能な標識をその上に有する）と共にインキュベートされる。 G_{M1} は、エプトープとして機能することができる細胞外糖残基を有するので、細胞を固定し、透過性にすることなく可視化可能である。しかしながら、細胞を固定すれば、パターン形成に寄与しつつ、検体の保存がより良好になり、可視化はより容易になり（泳動精子におけるパターン識別と比較して）、またより長時間の可視化が可能となる。精子（spermatozoa）の組織学的試験において公知の様々な固定剤は、当業者の理解の範囲内にある。好適な固定剤として、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ブアン固定液、およびカコジル酸ナトリウム、塩化カルシウム、ピクリン酸、タンニン酸等を含む固定剤が挙げられる。一実施形態では、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはその組合せが使用される。

10

【0061】

固定条件は、約0.004%（重量/体積）のパラホルムアルデヒド～約4%（重量/体積）のパラホルムアルデヒドの範囲でありうるが、ただし約0.01%～約1%（重量/体積）のパラホルムアルデヒドが一般的に使用される。一実施形態では、約0.005%（重量/体積）のパラホルムアルデヒド～約1%（重量/体積）のパラホルムアルデヒドが使用可能である。一実施形態では、リン酸緩衝食塩水中の約4%のパラホルムアルデヒド（重量/体積）、約0.1%のグルタルアルデヒド（重量/体積）、および約5 mMの $CaCl_2$ が使用可能である。

20

【0062】

精子試料が固定剤中で固定される期間は変化する。一実施形態では、精子試料は、固定剤中で約5時間またはそれより短い期間固定される。一実施形態では、精子試料は、固定剤中で約5時間より長い期間固定される。別の実施形態では、精子試料は、固定剤中で、約0.5時間、約1時間、約1.5時間、約2時間、約2.5時間、約3時間、約3.5時間、約4時間、約4.5時間、約5時間、約5.5時間、約6時間、約6.5時間、約7時間、約7.5時間、約8時間、約8.5時間、約9時間、約9.5時間、約10時間、約10.5時間、約11時間、約11.5時間、約12時間、約12.5時間、約13時間、約13.5時間、約14時間、約14.5時間、約15時間、約15.5時間、約16時間、約16.5時間、約17時間、約17.5時間、約18時間、約18.5時間、約19時間、約19.5時間、約20時間、約20.5時間、約21時間、約21.5時間、約22時間、約22.5時間、約23時間、約23.5時間、約24時間、約24.5時間、約25時間、約25.5時間、約26時間、約26.5時間、約27時間、約27.5時間、約28時間、約28.5時間、約29時間、約29.5時間、約30、または上記時間から決定可能な任意の範囲（例えば、約26時間～約28時間、または約3時間～約5時間）固定される。

30

40

【0063】

生存精子または固定済みの精子における G_{M1} の局在パターンは、標識結合技術を使用することにより得ることが可能である。 G_{M1} ガングリオシドに対して特異的親和性を有する分子が使用可能である。標識分子は、検出可能な標識（フルオロフォア等）と直接連結可能であり、または検出可能な標識をその上に有する第2の標識分子により検出される。例えば、コレラ毒素のbサブユニットは、 G_{M1} に特異的に結合することが公知である。したがって、標識された（例えば、蛍光標識された）コレラ毒素bサブユニットが、 G_{M1} の分布パターンを得るのに使用可能である。一実施形態では、フルオロフォアと連結したコレラ毒素のbサブユニットの最終濃度は、約10 $\mu g/ml$ ～約15 $\mu g/ml$ である。別の実施形態では、フルオロフォアと連結したコレラ毒素のbサブユニットの最

50

終濃度は、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ~ 約 $50 \mu\text{g/ml}$ である。あるいは、 G_{M1} に対する標識抗体が使用可能である。さらに別の代替法では、コレラ毒素bサブユニットに対する標識抗体が、 G_{M1} 染色パターンを視覚化するのに使用可能である。そしてさらに別の代替法では、 G_{M1} に直接結合する一次抗体、またはコレラ毒素のbサブユニットに結合する一次抗体と結合する、標識された二次抗体が使用される。用語「 G_{M1} 染色」もしくは「 G_{M1} の染色」、または「標識」、または関連する用語は、本明細書で使用される場合、 G_{M1} に対する標識された親和性分子の結合に起因して、細胞上でまたは細胞内で認められる染色を意味する。例えば、蛍光タグがついた/蛍光標識されたコレラ毒素bサブユニットが、 G_{M1} の限局化 (localization) で使用されるとき、シグナルまたは染色はコレラ毒素bサブユニットに由来するが、しかし G_{M1} の場所を示す。用語「シグナル」および「染色」および「標識」は交換可能に使用される。検出可能な標識は、検出可能なシグナルを生成する能力を有するようなものである。そのような標識として、放射性核種、酵素、蛍光剤、または発色団が挙げられる。精子内の G_{M1} 分布の標識 (または染色) および可視化は、標準的な技術により実施される。コレラ毒素のbサブユニット以外の標識分子も使用可能である。これには、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体が含まれる。 G_{M1} ガングリオシドに対する特異的抗体は、ルーチンの免疫化プロトコールにより生成可能である、または商業的に購入可能である (例えば、Matreya, Inc.、State College、PA)。抗体は G_{M1} に対して生じうる、または G_{M1} 分子の関連するエピトープのペプチド模倣体を使用することにより生成可能である。ペプチド模倣体の同定および生成は当業者にとって周知である。さらに、コレラ毒素へのbサブユニットの結合は小分子により模倣される。所定の試薬に類似した結合特性を有する小分子の特定は当業者にとって周知である。

【0064】

ヒト精子の場合、精子が *in vitro* での受精能獲得条件に置かれたとき、8つの異なる局在パターン (下記実施例1の詳細を参照) が認められた。これらのパターンは、INTER、APM、AA、PAPM、AA/PA、ES、DIFF、および縞状細胞と命名されている。INTER、APM、AA、PAPM、AA/PA、ES、およびDIFFパターンを図1に示し、また縞状細胞パターンを図6A、図6B、図6C、および図6Dに示し、そのそれぞれを以下でさらに記載する：

- ・INTER：大多数の蛍光は、赤道セグメントを取り巻くバンド内にあり、先体を覆う原形質膜に若干のシグナルが認められる。シグナルの勾配が通常存在し、大半が赤道セグメントに位置し、そして先端部に向かって徐々に少なくなる。赤道セグメント全体にわたるバンドにおいて、シグナル強度の増加が精子頭部の縁に多くの場合認められる。
- ・APM (先体原形質膜)：INTERと比較して、赤道シグナルと頂部先端部に向かって移動するシグナルとの間で、このパターンでは、その相違はそれほど大きくない。すなわち、先体を覆う原形質膜内のシグナルはより均等に分布している。APMシグナルが、先端部に向かって頂部側に移動する明るい赤道INTERバンドから認められる、またはAAを伴う連続体であるので、先端部に向かってさらに開始することができ、またより小さい領域に見出される。
- ・AA (先体頂部)：このパターンでは、蛍光は、頂部先端部に向かって徐々に濃縮され、輝度が増加し、そしてシグナルを有するエリアでは減少する。
- ・PAPM (先体後方原形質膜)：シグナルは先体後方原形質膜に限定される。
- ・AA/PA (先体頂部/先体後方)：シグナルは、先体を覆う原形質膜および先体後方原形質膜の両方において認められる。シグナルは、赤道セグメントからは失われる。
- ・ES (赤道セグメント)：明るいシグナルが赤道セグメントのみに認められる。赤道領域全体にわたり精子頭部の肥厚を伴う場合がある。
- ・DIFF (拡散性)：拡散性のシグナルが精子頭部全体にわたり認められる。
- ・縞状細胞：シグナルが、先体後方領域の最上部および先体を覆う原形質膜、ならびに赤道セグメントの底部において認められる (すなわち、先体後方/赤道帯)。シグナルは、赤道セグメント周辺で失われている。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

用語「 G_{M1} 局在パターン」は、「パターン」または「局在パターン」と交換可能に使用される。

【 0 0 6 6 】

図 6 A、図 6 B、図 6 C、および図 6 D は、受精能獲得条件に置かれた不妊男性に由来する精子内の G_{M1} について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンを示す。特に、図 6 A は、シグナルが先体後方 / 赤道帯および先体を覆う原形質膜において均等に分布している縞状細胞 G_{M1} 局在パターンを示す。図 6 B は、先体を覆う原形質膜におけるシグナルが、先体後方 / 赤道帯におけるシグナルよりも明るい縞状細胞 G_{M1} 局在パターンを示す。図 6 C および図 6 D は、先体を覆う原形質膜におけるシグナルよりも明るい、先体後方 / 赤道帯におけるシグナルを示す。

10

【 0 0 6 7 】

INTER、AA、APM パターン、およびこれらのパターンの組合せは、正常な精子膜構造、したがって生殖能力を有する生存精子と正に相関するが、PAPM、AA / PA、ES、DIFF、および縞状細胞パターンは、生存能力、正常な膜構造、および生殖能力と正に相関しないことが観察された。非受精能獲得条件下でインキュベートした場合、正常な膜構造を有する生存精子の大部分は INTER パターンを示すが、同パターンは、標識の大部分が赤道セグメント近傍に位置し、残りは先体を覆う原形質膜まで延在することにより特徴付けられる。さらに、受精能獲得のための刺激に曝露すると、APM および AA パターンの数の増加が認められる。APM パターンは、先体を覆う原形質膜においてより均一なシグナルを示す一方、AA パターンは、先体頂部である精子頭部の吻側部分においてシグナルの強度増加、および赤道セグメントに向かって尾部側に移動するシグナルの低下を示す。不妊の個体において、*in vitro*での非受精能獲得条件下でインキュベートした精子は、正常な個体において、*in vitro*での非受精能獲得条件下でインキュベートした精子の G_{M1} 局在パターンと類似した G_{M1} 局在パターンを有する。

20

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、男性の生殖能力状態を決定するための方法が本明細書に開示される。
一実施形態では、方法は、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料を得るために、男性に由来する精子試料の第 1 の部分を非受精能獲得条件に曝露するステップ；*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を得るために、精子試料の第 2 の部分を受精能獲得条件に曝露するステップ；*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料および *in vitro*で受精能を獲得した精子試料を、固定剤で少なくとも 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、10 時間、11 時間、12 時間、18 時間、または 24 時間の期間にわたって固定するステップ；固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料および固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で処理するステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、2 つ以上の標識された G_{M1} 局在パターンを特定するステップであって、前記 G_{M1} 標識された局在パターンが、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンであるステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンを、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンと比較するステップ；比較に基づき、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターンと先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターンを受精能獲得状態に割り当て、および縞状細胞 G_{M1} 局在パターンとすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを非受精能獲得状態に割り当てるステップ；ならびに、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料、および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、特定され、 G_{M1} 標識さ

30

40

50

れた局在パターンに基づき、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップを含む。一実施形態では、特徴付けるステップは、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値を決定するステップであって、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージが、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示し、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示し、参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊を示す、ステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージを、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較するステップ；および比較に基づき生殖能力閾値を特定するステップを含む。

10

【0069】

別の実施形態では、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージと関連する生殖能力閾値が決定され、その場合、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、下記に対応する既知の生殖能力がある集団の分布統計学に基づく：参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性生殖能力を示し、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性生殖能力を示す。標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージが、 $[(AA \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン} + APM \text{ } G_{M1} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値が比較に基づき特定される。

20

【0070】

一実施形態では、曝露するステップの前に、精液試料は、精液粘度を減少させるために、非金属材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される、精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理される。一部の実施形態では、膜損傷試薬は、(i)プロテアーゼ、(ii)ヌクレアーゼ、(iii)粘液溶解剤、(iv)リパーゼ、(v)エステラーゼ、および(vi)グリコシドヒドロラーゼからなる群より選択される。一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数が実質的に一定となるまで繰り返される。そのような一実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満となるまで、または標識された細胞の合計数の1%~5%、2~5%の範囲に収まるまで決定する。別のそのような実施形態では、特定するステップが実施された後、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が標識された細胞の合計数の25%、20%、15%、もしくは10%未満となるまで、または標識された細胞の合計数の2%~25%、2%~20%、2~15%、2~10%、2~5%の範囲に収まるまで決定する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージ、または14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1mm、1.2mm、または1.4mmのオリフィスサイズを有する。

30

40

【0071】

そのような一実施形態では、特徴付けるステップは下記のステップを含みうる：事前に

50

決定された数の、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターンを決定するステップ；事前に決定された数の、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターンを決定するステップ；標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料について、 $AA_{G_{M1}}$ 局在パターンの数と $APM_{G_{M1}}$ 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップ；ならびに標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、 $AA_{G_{M1}}$ 局在パターンの数と $APM_{G_{M1}}$ 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップ。

10

【0072】

そのような一実施形態では、方法は下記のステップをさらに含む：標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子の比を、既知の生殖能力状態を有する、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子の比と比較するステップ；および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子の比を、既知の生殖能力状態を有する標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子の比と比較するステップ。

【0073】

一実施形態では、男性の生殖能力状態を決定するための方法が、本明細書に開示されている。一実施形態では、方法は、*in vitro*で非受精能獲得条件に曝露され、固定剤中で少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間または24時間固定され、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で処理された、男性に由来する精子試料の第1の部分を得るステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップと、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露され、固定剤中で固定され、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で処理された、精子試料の第2の部分を得るステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンである2つ以上の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンを、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての標識された G_{M1} 局在パターンと比較するステップと、比較に基づき、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターンおよび先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターンを受精能獲得状態に割り当て、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを非受精能獲得状態に割り当てるステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子試料および標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての特定された G_{M1} 標識された局在パターンに基づき、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップとを含む。一実施形態では、特徴付けるステップは、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての、 $[(AA_{G_{M1}} \text{局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ のパーセンテージに関連する生殖能力閾値を決定するステップであって、既知の生殖能力がある集団の分布統計に基づく $[(AA_{G_{M1}} \text{局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージが、参照平均パーセンテージを下回る標準偏差であるパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示す；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示す；参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊を示すことに対応する、ステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA_{G_{M1}}$

20

30

40

50

G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージを、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージと比較するステップと、比較に基づき生殖能力閾値を特定するステップとを含む。

【0074】

別の実施形態では、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージに関連する生殖能力閾値が決定され、既知の生殖能力がある集団の分布統計に基づく [(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージは、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性の生殖能力を示す；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性の生殖能力を示すことに対応する。標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料についての [(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージは、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値は、比較に基づき特定される。

【0075】

一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数が実質的に一定になるまで反復される。斯かる一実施形態では、特定するステップが行われた後に、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が、標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満；または標識された細胞の合計数の1%~5%、2~5%の範囲になるまで決定する。別の斯かる実施形態では、特定するステップが行われた後に、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が、標識された細胞の合計数の25%、20%、15%もしくは10%未満；または標識された細胞の合計数の2%~25%；2%~20%；2~15%；2~10%；2~5%の範囲になるまで決定する。

【0076】

斯かる方法の一実施形態では、方法は、所定の数の標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得していない精子試料および標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターンの数を決定するステップと、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得していない精子試料および標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料のそれぞれについて、AA G_{M1} 局在パターンの数およびAPM G_{M1} 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップとをさらに含む。

【0077】

斯かる一実施形態では、特徴付けるステップは、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料の比を、既知の生殖能力状態を有する男性についての *in vitro* で受精能を獲得した精子の G_{M1} 局在パターンの比と比較するステップと、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得していない精子試料の比を、既知の生殖能力状態を有する男性についての *in vitro* で受精能を獲得していない精子の G_{M1} 局在パターンの比と比較するステップとをさらに含むことができる。

【0078】

一実施形態では、男性の生殖能力状態を決定するための方法が、本明細書に開示されている。一実施形態では、方法は、*in vitro* で、男性に由来する精子試料を受精能獲得条件に曝露するステップと、受精能を獲得した精子試料を、固定剤を用いて少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間または24時間固定するステップと、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料を、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で処理するステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップと、標識され、

固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部（AA） G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜（APM） G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンである2つ以上の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップと、先体頂部（AA） G_{M1} 局在パターンおよび先体原形質膜（APM） G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当て、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てるステップと、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップとを含む。一実施形態では、特徴付けるステップは、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、 $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ のパーセンテージに関連する生殖能力閾値を決定するステップであって、既知の生殖能力がある集団の分布統計に基づく $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージが、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示す；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示す；参照平均パーセンテージを2標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊を示すことに対応する、ステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ のパーセンテージを、 $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較するステップと、比較に基づき生殖能力閾値を特定するステップとを含む。

【0079】

別の実施形態では、 $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ のパーセンテージに関連する生殖能力閾値が決定され、既知の生殖能力がある集団の分布統計に基づく $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性の生殖能力を示す；参照平均パーセンテージを1標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性の生殖能力を示すことに対応する。標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ のパーセンテージは、 $[(AA\ G_{M1}\text{局在パターン} + APM\ G_{M1}\text{局在パターン}) / \text{総}\ G_{M1}\text{局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値は、比較に基づき特定される。

【0080】

一実施形態では、曝露するステップの前に、精液試料は、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理して、精液粘度を減少させる。一部の実施形態では、膜損傷試薬は、(i)プロテアーゼ；(ii)ヌクレアーゼ；(iii)粘液溶解剤；(iv)リパーゼ；(v)エステラーゼおよび(vi)グリコシドヒドロラーゼからなる群より選択される。一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数が実質的に一定になるまで反復される。斯かる一実施形態では、特定するステップが行われた後に、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が、標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満；または標識された細胞の合計数の1%~5%、2~5%の範囲になるまで決定する。別の斯かる実施形態では、特定するステップが行われた後に、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が、標識された細胞の合計数の25%、20%、15%もしくは10%未満；または標識された細胞の合計数の2%~25%；2%~20%；2~15%；2~10%；2~5%の範囲になるまで決定する。一部の実施形態では、広い

オリフィスのピペットは、少なくとも 1.8 ゲージ、1.6 ゲージまたは 1.4 ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも 1 mm、1.2 mm または 1.4 mm のオリフィスサイズを有する。

【0081】

斯かる方法の一実施形態では、方法は、 G_{M1} 局在パターン₁の比を、既知の生殖能力状態を有する男性についての G_{M1} 局在パターン₁の比と比較するステップをさらに含むことができる。一実施形態では、既知の生殖能力状態は、生殖能力がある男性に対応する。別の実施形態では、既知の生殖能力状態は、不妊男性に対応する。斯かる一実施形態では、比較するステップは、所定の数の標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターン₁の数を決定するステップと、 $A_{G_{M1}}$ 局在パターン₁の数および $APM_{G_{M1}}$ 局在パターン₁の数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターン₁の合計数の和に対する比を計算するステップとを含む。

10

【0082】

一実施形態では、男性の生殖能力状態を決定するための方法が、本明細書に開示されている。一実施形態では、方法は、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露されており、固定剤中で少なくとも 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、10 時間、11 時間、12 時間、18 時間または 24 時間固定されており、 G_{M1} 局在パターン₁に対する標識分子で染色されている、男性に由来する精子試料の第 1 の部分を得るステップであって、標識分子が検出可能な標識を有する、ステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部 ($AA_{G_{M1}}$) G_{M1} 局在パターン₁、先体原形質膜 ($APM_{G_{M1}}$) G_{M1} 局在パターン₁、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン₁、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターン₁である 2 つ以上の G_{M1} 標識された局在パターン₁を特定するステップと、先体頂部 ($AA_{G_{M1}}$) G_{M1} 局在パターン₁および先体原形質膜 ($APM_{G_{M1}}$) G_{M1} 局在パターン₁を受精能獲得状態に割り当て、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン₁およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターン₁を非受精能獲得状態に割り当てるステップと、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップとを含む。一実施形態では、特徴付けるステップは、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、 $[(AA_{G_{M1}} \text{ 局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージに関連する生殖能力閾値を決定するステップであって、既知の生殖能力がある集団の分布統計に基づく $[(AA_{G_{M1}} \text{ 局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージが、参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力があることを示す；参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージに満たないこと、かつ参照平均パーセンテージを 2 標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、生殖能力が低いことを示す；参照平均パーセンテージを 2 標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、不妊を示すことに対応する、ステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA_{G_{M1}} \text{ 局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージを、 $[(AA_{G_{M1}} \text{ 局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージと比較するステップと、比較に基づき生殖能力閾値を特定するステップとを含む。

20

30

40

【0083】

別の実施形態では、 $[(AA_{G_{M1}} \text{ 局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ のパーセンテージに関連する生殖能力閾値が決定され、既知の生殖能力がある集団の分布統計に基づく $[(AA_{G_{M1}} \text{ 局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$ の参照パーセンテージは、参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性の生殖能力を示す；参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な男性の生殖能力を示すことに対応する。標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料についての $[(AA_{G_{M1}} \text{ 局在パターン} + APM_{G_{M1}} \text{ 局在パターン}) / \text{総 } G_{M1} \text{ 局在パターン}]$

50

）／総 G_{M1} 局在パターン］のパーセンテージは、[（ $AA_{G_{M1}}$ 局在パターン＋ $APM_{G_{M1}}$ 局在パターン）／総 G_{M1} 局在パターン］の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値は、比較に基づき特定される。

【0084】

一部の実施形態では、特定するステップは、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数が実質的に一定になるまで反復される。斯かる一実施形態では、特定するステップが行われた後に、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が、標識された細胞の合計数の5%未満、3%未満；または標識された細胞の合計数の1%～5%、2～5%の範囲になるまで決定する。別の斯かる実施形態では、特定するステップが行われた後に、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得していない精子について、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンの数を、該数が、標識された細胞の合計数の25%、20%、15%または10%未満；または標識された細胞の合計数の2%～25%；2%～20%；2～15%；2～10%；2%～5%の範囲になるまで決定する。

10

【0085】

斯かる方法の一実施形態では、方法は、 G_{M1} 局在パターンの比を、既知の生殖能力状態を有する男性についての G_{M1} 局在パターンの比と比較するステップをさらに含むことができる。一実施形態では、既知の生殖能力状態は、生殖能力がある男性に対応する。別の実施形態では、既知の生殖能力状態は、不妊男性に対応する。斯かる一実施形態では、比較するステップは、所定の数の標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料について、各 G_{M1} 標識された局在パターンの数を決定するステップと、 $AA_{G_{M1}}$ 局在パターンの数および $APM_{G_{M1}}$ 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算するステップとを含む。

20

【0086】

一実施形態では、男性の生殖能力状態を決定するための方法が、本明細書に開示されている。一実施形態では、方法は、精子試料を得るステップであって、精子試料の少なくとも一部分が、*in vitro* で受精能を獲得した精子を得るために *in vitro* で受精能獲得条件に曝露されており、固定剤に少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間または24時間曝露されており、 G_{M1} について染色されている、ステップと、精子試料の1つまたは複数の精液パラメーターの値を得るステップと、標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料の *Cap-Score* を、1つまたは複数の G_{M1} 標識された局在パターンに基づき決定するステップであって、前記 G_{M1} 標識された局在パターンが、先体頂部 ($AA_{G_{M1}}$) 局在パターン、先体後方原形質膜 ($APM_{G_{M1}}$) 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンである、ステップと、決定された *CAP score* および1つまたは複数の得られた精液パラメーターに基づき、男性の男性生殖能力指数 (*MFI*) 値を計算するステップとを含む。一実施形態では、精子試料の1つまたは複数の精液パラメーターは、元の精子試料の体積、精子の濃度、精子の運動性、および精子の形態からなる群より選択される。

30

40

【0087】

本明細書に開示されている1つの実施形態は、男性の生殖能力状態を決定するための方法である。一実施形態では、方法は、次のステップを含む。*in vitro* で受精能を獲得した精子細胞の試料が、蛍光標識で処理される。1つまたは複数の受精能を獲得した蛍光画像が得られ、画像は、蛍光標識された *in vitro* で受精能を獲得した精子細胞に関連する1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンを呈する。先体頂部 ($AA_{G_{M1}}$) 局在パターンおよび先体原形質膜 ($APM_{G_{M1}}$) 局在パターンはそれぞれ、受精能獲得状態に割り当てられ、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンは、非受精能獲得状態に割り当てられ、それぞれ、*cap*-蛍光画像において示される。 G_{M1} 局在パターンの数が測定され、パターンは、[（ $AA_{G_{M1}}$ 局在

50

パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージを決定するための受精能を獲得した蛍光画像において示される、蛍光標識された *in vitro* で受精能を獲得した精子細胞についての AA G_{M1} 局在パターン、APM G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む。[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージに関連する生殖能力閾値が決定され、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージは、参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージを超えることは、生殖能力があることを示す；参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージに満たず、かつ参照平均パーセンテージを 2 標準偏差下回るパーセンテージを超えることは、生殖能力が低いことを示す；参照平均パーセンテージを 2 標準偏差下回るパーセンテージに満たないことは、不妊を示すことに対応する。[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージは、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値は、比較に基づき特定される。

10

【0088】

別の実施形態では、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージに関連する生殖能力閾値が決定され、既知の生殖能力がある集団の分布統計に基づく[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージは、参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージを超えることが、正常な男性の生殖能力を示す；参照平均パーセンテージを 1 標準偏差下回るパーセンテージに満たないことが、異常な生殖能力を示すことに対応する。標識され、固定され、*in vitro* で受精能を獲得した精子試料についての[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] のパーセンテージは、[(AA G_{M1} 局在パターン + APM G_{M1} 局在パターン) / 総 G_{M1} 局在パターン] の参照パーセンテージと比較される。生殖能力閾値は、比較に基づき特定される。

20

【0089】

斯かる一実施形態では、特定するステップはまた、次のうちの 1 つまたは複数に基づく：患者人口動態、女性パートナーの生殖状態、精子濃度、総運動性、直進運動性 (progressive motility)、精液体積、精液 pH、精液粘度および / または精子形態、ならびにそれらの組合せ。

30

【0090】

本明細書に記載されている方法の様々な実施形態では、精子細胞は、*in vitro* で、受精能獲得条件で、少なくとも 1 時間；少なくとも 2 時間；少なくとも 3 時間；少なくとも 12 時間；少なくとも 18 時間；少なくとも 24 時間の受精能獲得期間にわたり、0.5 時間 ~ 3 時間；3 時間 ~ 12 時間；6 時間 ~ 12 時間；3 時間 ~ 24 時間；12 時間 ~ 24 時間；または 18 時間 ~ 24 時間の間の範囲の受精能獲得期間にわたり処理される。

【0091】

本明細書に記載されている方法の様々な実施形態では、*in vitro* で受精能を獲得した精子細胞は、固定剤で、少なくとも 0.5 時間；少なくとも 3 時間；少なくとも 12 時間；少なくとも 18 時間；少なくとも 24 時間；少なくとも 30 時間；少なくとも 36 時間；または少なくとも 48 時間の固定期間にわたり、0.5 時間 ~ 3 時間；3 時間 ~ 12 時間；6 時間 ~ 12 時間；3 時間 ~ 18 時間；6 ~ 18 時間；6 ~ 24 時間；12 時間 ~ 24 時間；18 時間 ~ 24 時間；18 ~ 30 時間；18 ~ 36 時間；24 ~ 30 時間；24 ~ 26 時間；18 ~ 48 時間；24 ~ 48 時間；または 36 ~ 48 時間の間の範囲の固定期間にわたり処理される。

40

【0092】

本明細書に記載されている方法の様々な実施形態では、 G_{M1} 標識された局在パターン

50

のうちの2種以上は、AA G_{M1}局在パターン、APM G_{M1}局在パターン、縞状細胞 G_{M1}局在パターン、中間 (intermediate) (INTER) G_{M1}局在パターン、先体後方原形質膜 (PAPM) G_{M1}局在パターン、先体頂部 / 先体後方 (AA / PA) G_{M1}局在パターン、赤道 (equatorial) セグメント (ES) G_{M1}局在パターン、および拡散 (DIFF) G_{M1}局在パターンを含む。

【0093】

一実施形態では、精子試料の第1の部分を受精能獲得条件に曝露するステップと、精子試料の第2の部分を受精能獲得条件に曝露するステップは、同時に行われる。

【0094】

男性個体は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。非ヒト動物の場合、生殖能力状態と関連したパターンの特定は、本明細書に提供される教示に基づき実行することができる。非ヒト動物は、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、シカ、ウサギ、ニワトリ、シチメンチョウ、様々な種の魚類、および様々な動物学的な種を含む。

【0095】

一実施形態では、本開示の方法は、男性を不妊の可能性があると指定するための方法であって、受精能獲得および非受精能獲得条件下でインキュベートされ、必要に応じて固定された、個体由来および正常対照に由来する精子における G_{M1} 局在パターン (例えば、縞状細胞、AA、APM およびすべてのその他の G_{M1} 局在パターンのうちの1つまたは複数) を得るステップと、G_{M1} 局在パターンを比較するステップとを含む方法を提供する。正常対照において、ある特定の局在パターンを呈する精子のパーセンテージの統計的に有意な変化が観察され得る。被験個体に由来する精子において同じ変化が観察されない場合には、個体は、異常な生殖能力状態を有すると指定される。一実施形態では、正常および異常な生殖能力状態の情報的な価値があるパターンは、局在パターンの縞状細胞、INTER、AA および / または APM である。よって、正常な生殖能力状態を有することが既知の個体に由来する試料 (対照として使用することができる) において、in vitro で受精能獲得条件への曝露の際に、in vitro で非受精能獲得条件に曝露された精子と比較して、AA および / または APM 局在パターンを示す精子がより高いパーセンテージで、縞状細胞および / または INTER 局在パターンを示す精子がより低いパーセンテージで存在する。in vitro で受精能獲得条件への曝露の際に、精子が in vitro で非受精能獲得条件に曝露された場合と比較して、これらの局在パターンのうちの1つまたは複数のパーセンテージに差も有意差も観察されない場合には、個体は、生殖能力の問題を有すると指定される。上述の実施形態の変形形態では、対照は、不妊であるまたは生殖能力が低いことが既知の個体に由来する場合がある。本実施形態では、縞状細胞、INTER、AA および / または APM 局在パターンにおける in vitro 受精能獲得の際の被験個体に由来する G_{M1} パターンの変化が、対照と同じである場合には、個体は、生殖能力が低いまたは不妊であるとみなすことができる。

【0096】

上述の実施形態のさらに別の変形形態では、被験個体に由来する試料は、対照と比較せずに評価することができる。in vitro で受精能獲得条件への曝露の際に、縞状細胞、INTER、AA および / または APM パターンの数に変化も有意な変化も観察されない場合には、個体は、異常とみなすことができ、さらなる検査に指定することができる。一方、縞状細胞および / または INTER が減少する、AA が増加する、および / または APM が増加するような変化が観察される場合には、個体は、正常な生殖能力を有すると指定することができる。

【0097】

一実施形態では、方法は、in vitro で受精能獲得条件に曝露された精子における AA および APM パターンの数を特定するための、G_{M1} 局在パターンの解析を含む。数は、総計と比べた G_{M1} 分布パターンのうちの1つまたは複数のパーセンテージとして表現することができる。一実施形態では、生殖能力は、所定の生殖能力閾値、例えば、不妊および生殖能力が低いと分類された個体の間の閾値 (すなわち、カットオフ) レベル、

または生殖能力が低いと分類された個体および生殖能力があると分類された個体の間の閾値レベルに対する、AAおよび/またはAPM局在パターンの数の比較に基づき予測される。

【0098】

他の実施形態では、生殖能力閾値は、生殖能力が既知の男性集団に由来する精子において見出されるパターンの統計解析によって決定することができる。ある実施形態では、男性が、自然受胎または3もしくはそれよりも少ないサイクルの子宮内人工授精のいずれかを使用して、3年以内に妊娠したパートナーを有するまたは子供の父親になった場合、男性は、生殖能力があると考慮されるまたは正常な男性の生殖能力を有する。ある実施形態では、男性が、避妊を使用せずに6～12ヶ月以内の妊娠の達成に失敗し、妊娠を達成するために3を超えるサイクルの子宮内人工授精を要求した場合、男性は、生殖能力が低いと考慮される。ある実施形態では、男性が、避妊を使用せずに1年以内の妊娠の達成に失敗し、反復したサイクルの子宮内人工授精を使用して妊娠の達成に失敗した場合、男性は、不妊と考慮される。ある実施形態では、異常な男性の生殖能力は、生殖能力が低いおよび不妊の男性を含む。

10

【0099】

図4に示す通り、生殖能力があることが既知の24名の男性から73種の精液試料を得た。その精子を、受精能獲得のための刺激、この場合は、4mM 2-ヒドロキシ-プロピル-βシクロデキストリンと共にインキュベートし、0.01%パラホルムアルデヒド（最終濃度）を用いて固定した。受精能を獲得したことを示すパターン（例えば、AA + APM）を有する細胞のパーセンテージを評価した。AAおよびAPMパターンを有する精子の平均パーセンテージは、41%であり、平均から2標準偏差は、27%および55%として計算した。

20

【0100】

その生殖能力状態の医学的評価を求める14名の男性に由来する14種の試料における G_{M1} 局在パターンを解析した。AA + APM局在パターンを有する精子の相対的パーセンテージを、既知の生殖能力がある男性の集団から特定された統計的閾値に対して比較した（図5）。ベースライン（非刺激的、非受精能獲得条件）下でインキュベートした試料において観察される差はなかった。しかし、14名の男性のうちの5名が、4mM 2-ヒドロキシ-プロピル-βシクロデキストリンと共にインキュベートした場合に、AA + APMパターンを有する低パーセンテージの精子を示した試料を生じた。これら5種の試料はすべて、平均から2標準偏差下回っていた。受胎に困難があるカップルのおよそ30～50%が、男性側要因の成分を有することが考えられる。これらのデータは、予想される範囲内に収まる。

30

【0101】

一実施形態では、本開示は、男性の生殖能力状態の決定のためのキットを提供する。キットは、次のうちの1つまたは複数を含む：精子膜の剪断を防止するのに十分な直径サイズのオリフィスを有するピペット、in vitro受精能獲得のための刺激として作用し得る薬剤、受精能獲得培地、非受精能獲得培地、固定剤、 G_{M1} 局在パターンを決定するための標識試薬、受精能を獲得した精子の1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンおよび受精能を獲得していない精子の1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンを説明する図表。斯かる、受精能を獲得した精子の G_{M1} 局在パターンおよび受精能を獲得していない精子の G_{M1} 局在パターンは、既知の生殖能力状態を反映する。斯かるキット実施形態では、固定剤組成物は、精子膜に損傷を与えるべきではない。斯かる実施形態では、精子膜に損傷を与え得る試薬は、精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される。一部の実施形態では、膜損傷試薬は、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、粘液溶解剤、リパーゼ、エステラーゼおよびグリコシドヒドロラーゼのうちの1つまたは複数を含む。別のキット実施形態では、受精能獲得培地および非受精能獲得培地は、精子細胞にin vitroで適用されると、図表に反映される通り、受精能を獲得した精子を示す G_{M1} 局在パターンおよび受精能を獲得していない精子を示すパターンを生じる。

40

50

【0102】

一実施形態では、キットは、受精能獲得を刺激するための4%シクロデキストリンを有する薬剤を含む。

【0103】

一実施形態では、受精能獲得培地は、3 mM最終濃度を得るように2-ヒドロキシ-プロピル-β-シクロデキストリンが添加された、改変されたヒト卵管液(tubal fluid)を含み；非受精能獲得培地は、改変されたヒト卵管液を含み；固定剤は、1%パラホルムアルデヒドであり；G_{M1}パターンを決定するための試薬は、コレラ毒素のbサブユニット(15 μg/ml最終濃度)である。他の実施形態では、パラホルムアルデヒドの最終濃度は、0.01%である。

10

【0104】

例示的なキットは、HEPESで緩衝されたゲンタマイシンを有する改変されたHTF培地を含む(Irvine Scientific、参照90126)。重炭酸塩緩衝培地が使用されたかHEPES緩衝培地が使用されたかにかかわらず、G_{M1}局在パターン、生存度または精子回収、および受精能獲得に差は観察されなかった。したがって、重炭酸塩緩衝培地を使用することもできる。HEPES緩衝液の使用は、CO₂インキュベーターのみと適合性である場合とは対照的に、エアインキュベーターまたはウォーターバスを使用して、クリニックでアッセイが行われることを可能にする。同様に、市販のもの(HTF-SSSTM、Irvine Scientificまたはプラスマネート)であれ、粉末アルブミンであれ、補足的タンパク質の添加は、回収または生存度を変更せず、受精能獲得状態を有利に増強する。

20

【0105】

例示的なキットは、細胞単離培地(たとえば、Enhance S-Plus細胞単離培地、90%、Vitrolife製、参照：15232 ESP-100-90%)をさらに含むことができる。例示的な試薬、消耗品および手順は、ヒト精子におけるG_{M1}の有利な標識を生じることが実証された。

【0106】

例示的なキットは、広いオリフィスのピペットチップ(200 μlラージオリフィスチップ、USA scientific、1011-8400)をさらに含むことができる。例示的なキットは、広いオリフィスのトランスファーピペット(多目的トランスファーピペット、標準バルブ参照番号：202-20S、VWRカタログ番号14670-147)をさらに含むことができる。一実施形態では、ピペットは、非金属性である。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージまたは14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1 mm、1.2 mmまたは1.4 mmのオリフィスサイズを有する。

30

【0107】

例示的なキットは、1.5 mlチューブ(処理キャップ(Treatment cap)、ノンキャップ(noncap)、CD)(USA Scientific 14159700)をさらに含むことができ、そのうちの1つは、受精能獲得を刺激するための粉末形態のシクロデキストリンを含有し、もう1つは、培地単独の非受精能獲得条件のために空である。一部の実施形態では、シクロデキストリンが、別々のチューブに見出されることが可能であり、そこに培地が添加して、それ自体が受精能獲得チューブに添加されることになるストック溶液を作製する。

40

【0108】

精漿から精子を単離する場合、ヒト男性学研究室にとって、密度勾配を使用して精子を収集することが一般的である。例示的なキットは、密度勾配から精漿を除去し、次いで未使用のトランスファーピペットを使用して、ペレットになった精子を収集するための、密度勾配材料および/または指示をさらに含むことができる。

【0109】

例示的なキットは、固定剤(0.1% PFA等)をさらに含むことができ、必要に応じ

50

て、輸送、貯蔵または規制目的に有用な、情報書式（患者要求書式等）、標識および容器／バッグ／パウチ等を含む。例えば、キットは、ホイルパウチ、患者試料を郵送するための吸収剤を有するバイオハザードバッグ、吸収剤を有する再封可能なバッグ、および発泡体のチューブ設置ホルダーを含有することができる。

【0110】

例示的なキットは、本明細書に開示されている方法のいずれかについて記載する指示をさらに含むことができる。

【0111】

別の態様では、男性個体の生殖能力を測定するための方法が提供される。 G_{M1} 局在アッセイは、精子が受精能を獲得することができるか否か、したがって、卵に受精する能力を有するようになるか否かを示すことができる。上述の通り、アッセイは、精子頭部における G_{M1} 局在の特異的パターンを有する形態学的に正常な精子のパーセンテージとしてスコア化され得る。APMおよびAAパターンは、精子が受精能獲得のための刺激に応答するにつれて増加する。カットオフを使用して、射精液の相対的生殖能力を区別し、精液試料を男性の生殖能力に基づく群へと分けることができる（例えば、生殖能力がある男性を生殖能力が低い男性と不妊男性から区別する）。しかし、精子数、運動性および形態もまた、男性の生殖能力に影響し得るため、本開示は、Cap-Scoreおよび1つまたは複数の関連する精液パラメーター（例えば、数、運動性および形態等）を包含する、男性の生殖能力の指数（「男性生殖能力指数」または「MFI」）を作成するための方法を提供する。Cap-Score（ G_{M1} スコアとも称される）は、1つまたは複数の G_{M1} パターンの数である。例えば、Cap-Scoreは、縞状細胞、INTER、AAおよびAPMのうちの1つまたは複数の数であり得る。特異的精液パラメーターを強調する、異なる指数を生成することができる。例えば、本開示に従った指数は：

- ・ Cap-Score × %直進運動性あり × 絶対数；
- ・ Cap-Score × %形態学的に正常な精子 × 絶対数；
- ・ Cap-Score × %総運動性 × 絶対数 × %形態学的に正常な精子；ならびに
- ・ 他の変形形態、またはCap-Scoreおよびこれらのパラメーターの組合せ、またはVSL（直線速度）；STR（直線性）；LIN（直進性（linearity））；VCL（曲線速度）；VAP（平均パス速度（velocity average path））；%運動性；運動性の持続時間；LHA（側方頭部振幅（lateral head amplitude））；WOB（ゆらぎ）；PROG（前進）；およびBCF（頭部振動数（Beat cross number））等のCASA（コンピューター支援精子解析）を使用して得られるパラメーターを含む他の特異的パラメーターを含む。例えば、WorldHealth Organization, "WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Sperm," (Fifth Ed. 2010)を参照されたい。

【0112】

男性生殖能力指数は、男性個体の生殖能力状態を測定するための方法として具体化することができる。精子試料が得られ、精子試料は、測定されている個体に由来し、上述の通り、精子試料の少なくとも一部分は、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露されており、固定剤に曝露されており、 G_{M1} に対して染色されている。例えば、個体に由来する元の試料の体積、ならびに／または試料の精子の濃度、運動性および／もしくは形態等、精子試料について1つまたは複数の精液パラメーターの値が得られる。MFIは、1つまたは複数の G_{M1} パターン（例えば、CAP-Score（商標））の数、および1つまたは複数の得られた精液パラメーター値から決定される。本明細書で使用される例では、Cap-Score（商標）は、受精能獲得条件下での3時間目の1つまたは複数の G_{M1} パターンのパーセンテージであるが、Cap-Scoreの他の変種は、本開示の観点から明らかとなるであろう（例えば、他の時間間隔での数、受精能を獲得していない状態から受精能を獲得した状態における G_{M1} パターンの数の変化等）。

【0113】

一実施形態では、男性生殖能力指数スコアは、次の方程式に従って、男性の試料について計算することができる：男性生殖能力指数 / 生殖能力群 = $a + b_1 * x_1 + b_2 * x_2$

+ . . . + $b_m * x_m$ (式中、 a は定数であり、 $b_1 \sim b_m$ は回帰係数であり、 $x_1 \sim x_m$ は、Cap - Score、運動性、形態、体積および濃度等の男性の生殖能力変数である)。判別関数解析を使用して、いずれの生殖能力変数が、2つまたはそれよりも多い天然に存在する群の間を識別するか決定することができる。例えば、個体が、生殖能力がある群、生殖能力が低い群または不妊群になるか決定するため、データは、精子機能および精液の質について記載する多数の生殖能力変数について収集され得る。次いで、判別解析を使用して、いずれの変数(複数可)が、生殖能力群の最良の予測因子であるか、また、各生殖能力変数を相対的にどの程度加重するべきか決定することができる。

【0114】

男性生殖能力指数は、 G_{M1} 局在アッセイを解読する研究室によって生成することができる。研究室は、1つまたは複数の施設(例えば、生殖能力クリニック、精子バンク等)から、精子試料および精子試料に対応する精液解析を得ることができる。精液解析情報は、 G_{M1} 局在アッセイキットに添えられたカードに含まれる、研究室に電子的に送られる、および/または他の仕方提供され得る。別の例示的な実施形態では、研究室は、精子試料のCap - Scoreを得、精子試料についての精液解析情報も得る。一実施形態では、研究室は、得られたCap - Scoreおよび得られた精液解析データに基づき男性生殖能力指数を計算する。

【0115】

男性の生殖能力状態を特定するための例示的な方法は、個体に由来する精子試料を、*in vitro*で非受精能獲得条件および*in vitro*で受精能獲得条件に曝露するステップを含む。精子が固定され、固定された精子における選択された G_{M1} パターンのパーセンテージが決定される。*in vitro*で非受精能獲得条件および*in vitro*で受精能獲得条件に曝露された精子における異なる G_{M1} パターンのパーセンテージが比較される。*in vitro*で非受精能獲得条件に曝露された精子に対する、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露された精子における1つまたは複数の選択された G_{M1} パターンのパーセンテージにおける変化は、個体の生殖能力状態を示す。選択された G_{M1} パターンは、縞状細胞、INTER、AAおよび/またはAPMであり得る。一実施形態では、個体の生殖能力状態は、受精能を獲得した精子について、AA G_{M1} 局在パターンの数およびAPM G_{M1} 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算することにより決定される。

【0116】

男性の生殖能力状態を特定するための例示的な方法は、個体に由来する精子試料を*in vitro*で受精能獲得条件に曝露するステップを含む。精子が固定され、固定された精子における選択された G_{M1} パターンのパーセンテージが決定される。異なる G_{M1} パターンのパーセンテージが、対照に由来するパーセンテージと比較され、対照精子試料は、同じ*in vitro*での受精能獲得条件および同じ固定剤に曝露されている。対照における変化と比べた、1つまたは複数の選択された G_{M1} パターンのパーセンテージにおける変化は、対照の生殖能力状態とは異なる個体の生殖能力状態を示す。 G_{M1} パターンは、縞状細胞、INTER、AAおよび/またはAPMであり得る。一実施形態では、個体の生殖能力状態は、受精能を獲得した精子について、AA G_{M1} 局在パターンの数およびAPM G_{M1} 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算することにより決定される。一実施形態では、曝露するステップの前に、精液試料は、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理して、精液粘度を減少させる。一部の実施形態では、膜損傷試薬は、(i)プロテアーゼ；(ii)ヌクレアーゼ；(iii)粘液溶解剤；(iv)リパーゼ；(v)エステラーゼおよび(vi)グリコシドヒドロラーゼからなる群より選択される。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージまたは14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1mm、1.2mmまたは1.4mmのオリフィスサイズを有する。

【0117】

例示的な方法では、対照は、正常な生殖能力状態を有することが既知の個体、または異常な生殖能力状態を有することが既知の個体に由来する精子試料であり得る。対照は、複数の個体を含むデータセット、例えば、少なくとも50名の個体を含むデータセットから得られる値であり得る。

【0118】

男性の生殖能力状態を、不妊である、生殖能力が低いまたは生殖能力があると特定するための例示的な方法は、個体に由来する精子試料を *in vitro* で受精能獲得条件に曝露するステップを含む。試料における G_{M1} パターンが決定される。1つまたは複数の G_{M1} パターンのパーセンテージが、生殖能力閾値と比較され、生殖能力閾値に満たないパーセンテージは、生殖能力の問題を示す。例えば、生殖能力閾値に満たないパーセンテージは、不妊のまたは生殖能力が低い生殖能力状態を示すことができる。 G_{M1} パターンは、縞状細胞、INTER、AAおよび/またはAPMであり得る。一実施形態では、個体の生殖能力状態は、受精能を獲得した精子について、AA G_{M1} 局在パターンの数およびAPM G_{M1} 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算することにより決定される。一実施形態では、曝露するステップの前に、精液試料は、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理して、精液粘度を減少させる。一部の実施形態では、膜損傷試薬は、(i) プロテアーゼ；(ii) ヌクレアーゼ；(iii) 粘液溶解剤；(iv) リパーゼ；(v) エステラーゼおよび(vi) グリコシドヒドロラーゼからなる群より選択される。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも18ゲージ、16ゲージまたは14ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも1mm、1.2mmまたは1.4mmのオリフィスサイズを有する。

10

20

30

【0119】

例示的な方法における *in vitro* での受精能獲得条件は、i) 重炭酸イオンおよびカルシウムイオン、ならびにii) 2-ヒドロキシ-プロピル-β-シクロデキストリン、メチル-β-シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質またはリボソーム等のステロール流出のメディエーターへの曝露を含むことができる。例示的な方法では、受精能獲得条件または非受精能獲得条件への対照の曝露は、被験試料と並行して行うことができる。

30

【0120】

男性の生殖能力状態を、不妊である、生殖能力が低いまたは生殖能力があると特定するための例示的な方法は、個体に由来する精子試料を、受精能獲得条件に曝露するステップを含む。試料における各 G_{M1} パターンのパーセンテージが決定される。1つまたは複数の G_{M1} パターンのパーセンテージは、不妊閾値と比較され、不妊閾値に満たないパーセンテージは、生殖能力の問題を示す。例示的な方法における受精能獲得条件は、i) 重炭酸イオンおよびカルシウムイオン、ならびにii) 2-ヒドロキシ-プロピル-β-シクロデキストリン、メチル-β-シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質またはリボソーム等のステロール流出のメディエーターへの曝露を含むことができる。1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンは、縞状細胞、INTER、AAおよび/またはAPMであり得る。一実施形態では、個体の生殖能力状態は、受精能を獲得した精子について、AA G_{M1} 局在パターンの数およびAPM G_{M1} 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算することにより決定される。一実施形態では、曝露するステップの前に、精液試料は、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、精液粘度を減少させるために使用される様々な試薬から選択される精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理して、精液粘度を減少させる。一部の実施形態では、膜損傷試薬は、(i) プロテアーゼ；(ii) ヌクレアーゼ；(iii) 粘液溶解剤；(iv) リパーゼ；(v) エステラーゼおよび(vi) グリコシドヒドロラーゼからなる群より選

40

50

択される。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも 18 ゲージ、16 ゲージまたは 14 ゲージのゲージサイズを有する。一部の実施形態では、広いオリフィスのピペットは、少なくとも 1 mm、1.2 mm または 1.4 mm のオリフィスサイズを有する。

【0121】

例示的な方法における生殖能力閾値は、集団の生殖能力が実質的な増加を止める AA + APM パターンパーセンテージであり得る。例えば、生殖能力閾値は、集団の 50 % よりも多くに生殖能力がある AA + APM のレベル；集団の 60 ~ 85 % よりも多くに生殖能力がある AA + APM のレベル；または 35 ~ 40 (総 G_{M1} パターンの相対的パーセンテージ) の両端を含む範囲の AA + APM のレベルであり得る。生殖能力閾値は、38、38.5、39 または 39.5 % AA + APM (総 G_{M1} パターンと比べて) であり得る。

10

【0122】

例示的な方法は、1 つまたは複数の G_{M1} パターンのパーセンテージを不妊閾値と比較するステップをさらに含むことができ、不妊閾値に満たないパーセンテージは、不妊を示す。例えば、不妊閾値は、集団の生殖能力が実質的に増加し始める AA + APM パターンパーセンテージ；集団の 50 % 未満に生殖能力がある AA + APM のレベル；集団の 60 ~ 85 % よりも多くに生殖能力がある AA + APM のレベル；または 14 ~ 18 (総 G_{M1} パターンの相対的パーセンテージ) の両端を含む範囲の AA + APM のレベルであり得る。不妊閾値は、14、14.5、15 または 15.5 % AA + APM (総 G_{M1} パターンと比べて) であり得る。

20

【0123】

男性の生殖能力状態を特定するための例示的な方法は、精子試料を得るステップを含み、精子試料は、個体に由来し、精子試料は、非受精能獲得条件または受精能獲得条件に曝露され、固定され、 G_{M1} について染色されている。精子における選択された G_{M1} パターンの数が決定される。in vitro で非受精能獲得条件および in vitro で受精能獲得条件に曝露された精子における異なる G_{M1} パターンのパーセンテージが比較される。in vitro で非受精能獲得条件に曝露された精子に対する、in vitro で受精能獲得条件に曝露された精子における 1 つまたは複数の選択された G_{M1} パターンのパーセンテージにおける変化は、個体の生殖能力状態を示す。 G_{M1} パターンは、AA、APM、INTER、縞状細胞、およびそれらの組合せからなる群より選択することができる。一実施形態では、個体の生殖能力状態は、受精能を獲得した精子について、AA G_{M1} 局在パターンの数および APM G_{M1} 局在パターンの数の和の、 G_{M1} 標識された局在パターンの合計数の和に対する比を計算することにより決定される。

30

【0124】

男性個体の生殖能力状態を特定するための例示的な方法は、精子試料を得るステップを含み、精子試料は、個体に由来し、精子試料は、in vitro で受精能獲得条件に曝露されており、固定されており、 G_{M1} の存在について染色されている。精子における選択された G_{M1} パターンの数が決定される。1 つまたは複数の異なる G_{M1} パターンのパーセンテージは、対照に由来するパターンのパーセンテージまたは所定の判断基準と比較される。対照精子試料は、同じ in vitro で受精能獲得条件および同じ固定剤に曝露されている。対照における変化と比べた、1 つまたは複数の選択された G_{M1} パターンのパーセンテージにおける変化は、対照の生殖能力状態とは異なる個体の生殖能力状態を示す。

40

【0125】

男性個体の生殖能力状態を特定するための例示的な方法は、精子試料を得るステップを含み、精子試料は、個体に由来し、精子試料は、in vitro で受精能獲得条件に曝露されており、固定されており、 G_{M1} パターンについて染色されている。試料における G_{M1} 局在パターンが決定される。1 つまたは複数の G_{M1} パターンのパーセンテージは、不妊閾値と比較され、不妊閾値に満たないパーセンテージは、生殖能力の問題を示す。

50

【 0 1 2 6 】

男性個体の生殖能力状態を測定するための例示的な方法は、精子試料を得るステップを含み、精子試料は、個体に由来し、精子試料は、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露されており、固定剤に曝露されており、 G_{M1} について染色されている。元の試料の体積、ならびに元の試料における精子の濃度、運動性および形態のうちの1つまたは複数について値が得られる。精子試料のCap - Scoreは、試料における1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンのパーセンテージとして決定される。個体の男性生殖能力指数(MFI)値は、決定されたCap - Score、ならびに1つまたは複数の得られた体積、濃度、運動性および形態に基づき計算される。例えば、MFI値は、Cap - Score(商標)、体積、濃度、運動性値および形態値を掛けることにより計算することができる。運動性は、運動性がある精子のパーセンテージであり得る。形態は、形態学的に正常な精子のパーセンテージであり得る。

10

【 0 1 2 7 】

男性個体の生殖能力状態を測定するための例示的な方法は、試料における1つまたは複数の G_{M1} 局在パターンのパーセンテージとして、個体の精子試料のCap - Score(商標)を得るステップを含む。元の試料の体積、ならびに元の試料における精子の濃度、運動性および形態のうちの1つまたは複数について値が得られる。個体の男性生殖能力指数(MFI)値は、決定されたCap - Score、ならびに1つまたは複数の得られた体積、濃度、運動性および形態に基づき計算される。

20

【 0 1 2 8 】

回帰およびコンピューター学習モデル化

一部の態様では、本開示は、当業者にとって公知の広範囲の分類方法のうちの1つまたは複数を使用して、男性の生殖能力状態を特徴付けるための(例えば、自然条件下で、または子宮内人工授精(IUI)等の生殖補助方法下で、例えば、男性の精子の使用が妊娠を生じる確率(PGP)を予測する)、方法、システムおよびコンピューター可読媒体(例えば、非一過性コンピューター可読媒体)を提供する。一部の態様では、本開示はまた、男性の生殖能力状態を特徴付けるための生殖能力分類器を訓練するための(例えば、自然条件下で、または子宮内人工授精(IUI)等の生殖補助方法下で、妊娠を生じる確率を予測することは、例えば、妊娠をもたらすであろう)、方法、システムおよびコンピューター可読媒体(例えば、非一過性コンピューター可読媒体)を提供する。

30

【 0 1 2 9 】

分類方法

一部の実施形態では、モデル214は、機械学習技法または方法を使用して訓練される。機械学習方法は、コンピューターシステムが、特異的な適用分野(例えば、ドメイン)に属する事実データのセット(例えば、生殖補助方法を使用して妊娠を試みたカップルの男性の精液試料に由来する特色の訓練セット)から、自動(例えば、ソフトウェアプログラムによる)学習を行うことを可能にする。斯かる訓練セットを仮定すると、機械学習方法は、データそれ自体からパターンおよび関係性を抽出することができる。機械学習方法およびその適用に関する広範な考察は、それぞれこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Mitchell, 1997, Machine Learning, McGraw-Hillおよび米国特許第8,843,482号に見出すことができる。周知の機械学習方法は、決定木、相関ルール、ニューラルネットワークおよびベイジアン方法を含む。

40

【 0 1 3 0 】

学習されたパターンおよび関係性は、機械学習方法によって、使用される機械学習技法に応じて異なる形態を取り得る形式的定量的モデルにおいてコードされる。モデルの形態の例は、論理ルール、数学的方程式および数学的グラフを含む。機械学習方法の目標は、データの表現としてのモデル、例えば、男性の生殖能力を表すためのモデルを得るための、データ内のパターンおよびデータ間の関係性のより良い理解および定量化である。

【 0 1 3 1 】

一部の実施形態では、モデルは、訓練セットにわたる単一の特色(例えば、IUI等の

50

生殖補助方法を使用して、妊娠が達成されたか否か)に対して訓練される。一部の実施形態では、この単一の第2の特色は、カテゴリー的である(例えば、妊娠したまたは妊娠しなかった)。一部の実施形態では、この単一の第2の特色は、数値的である(例えば、妊娠の前に行われた生殖補助のラウンド数)。一部の実施形態では、モデルは、訓練セットにわたる単一の特色の組合せに対して訓練される。一部の実施形態では、訓練セットにおける第2の特色の値は、モデルの訓練に使用されない。一部の実施形態では、カーネル変換技法および/または主成分解析技法は、後述する一部の詳細な実施形態に関して開示される通り、第1の特色のセット(例えば、パラメーター $\{\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i\}$)を特定するために使用される。そのようなものとして、一部の実施形態では、第1の特色のセット $\{\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i\}$ が、主成分の形態にあり、これが、本明細書に記載されている男性の生殖能力モデルのいずれかの訓練に使用される主成分であることが認められるであろう。他の実施形態では、主成分の形態でない第1の特色のセット $\{\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i\}$ それ自体の測定値は、本明細書に記載されているモデルのいずれかの訓練に使用される。

10

【0132】

一部の実施形態では、男性の生殖能力モデルは、教師あり回帰モデルであり、訓練されたモデルは、単一の第2の特色(例えば、妊娠を達成する前に生殖補助のラウンドが何回必要とされるかに関する予測)の実際の値の予測をもたらす。斯かるアプローチは、標的第2の特色(例えば、妊娠までの時間)が連続した数として測定される、有用な実例である。

20

【0133】

一部の実施形態では、男性の生殖能力モデルは、教師あり分類モデルであり、訓練されたモデルは、単一の第2の特色(例えば、生殖補助技法を使用してカップルが妊娠する機会に関する予測)の分類の予測をもたらす。斯かるアプローチは、標的第2の特色(例えば、妊娠)が別個の標識として測定される、有用な実例である。

【0134】

一部の実施形態では、モデル214は、教師なしクラスタリングモデルまたは最近隣探索モデルである。斯かる教師なしアプローチにおいて、モデルは、参照実体の間の全体的対応を定量化する。

30

【0135】

一部の実施形態では、モデルのアンサンブル(2つまたはそれよりも多く)が使用される。一部の実施形態では、AdaBoost等のブースト技法を、多くの他の種類の学習アルゴリズムと併せて使用して、それらの性能を改善する。このアプローチにおいて、本明細書に開示されているモデルのいずれかまたはその等価物の出力は、ブーストされた分類器の最終出力を表す加重和へと組み合わせられる。これにより参照により本明細書に組み込まれる、Freund, 1997, "A decision-theoretic generalization of on-line learning and an application to boosting," Journal of Computer and System Sciences 55, p. 119を参照されたい。

【0136】

一部の実施形態では、訓練された男性の生殖能力モデルは、非線形回帰モデルである。非線形回帰アプローチにおいて、 $\{X_1, \dots, X_i\}$ における各 X_j は、非線形関数 $f(x, \beta)$ によって得られる平均による、ランダム変数としてモデル化される。これにより参照により本明細書に組み込まれる、Seber and Wild, 1989, Nonlinear Regression, New York: John Wiley and Sons, ISBN 0471617601を参照されたい。

40

【0137】

一実施形態では、訓練された男性の生殖能力モデルは、ロジスティック回帰モデル、例えば、

【数 2】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

(式中、 $f(X)$ は、生殖能力の尺度であり、 i は、正の整数であり、 α は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j は、精子試料から得られたデータ(例えば、 $(i)AA$ GM1局在パターンとAPM GM1局在パターンとの組合せと、 (ii) すべてのGM1標識された局在パターンの組合せとの間の比、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、精子試料中の精子の運動性、それらの相互作用項、そのデータ項目の変換、そのデータ項目の基底展開、および2つまたはそれよりも多いそのデータの線形成分として表現される主成分のうちの1つまたは複数を含む)内のデータ項目である)の形態のモデルである。それぞれこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, pp. 42-49; およびJolliffe, 1982, "A note on the Use of Principal Components in Regression," Journal of the Royal Statistical Society, Series C. 31 (3), pp. 300-303を参照されたい。

【0138】

第1のデータ項目の変換の例は、対数、平方根、平方または一般に、データ項目の値の累乗を含むがこれらに限定されない。データ項目の基底展開の例は、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, Chapter 5に記述されている通り、多項式、区分的多項式または平滑化スプラインとしてのデータ項目の表現を含むがこれらに限定されない。2つまたはそれよりも多いデータ項目の間の相互作用の例は、 $X_1 \cdot X_2$ である。

【0139】

一部の実施形態では、訓練された男性の生殖能力分類モデルは、

【数 3】

$$f(X) = \beta_0 + \sum_{j=1}^t X_j \beta_j$$

(式中、 t は、正の整数であり、 $f(X)$ は、男性の生殖能力の尺度であり、 $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_t$ は、モデルの訓練によって決定されたパラメーターであり、 $\{X_1, \dots, X_t\}$ 内の各 X_j は、精子試料から得られたデータ(例えば、 $(i)AA$ GM1局在パターンとAPM GM1局在パターンとの組合せと、 (ii) すべてのGM1標識された局在パターンの組合せとの間の比、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、精子試料中の精子の運動性、それらの相互作用項、そのデータ項目の変換、そのデータ項目の基底展開、および2つまたはそれよりも多いそのデータの線形成分として表現される主成分のうちの1つまたは複数を含む)内のデータ項目である)の形態の線形回帰モデルである。それぞれこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, pp. 42-49; およびJolliffe, 1982, "A note on the Use of Principal Components in Regression," Journal of the Royal Statistical Society, Series C. 31 (3), pp. 300-303を参照されたい。

【0140】

一部の実施形態では、訓練された男性の生殖能力分類モデルは、サポートベクトルマシン(SVM)である。斯かる実施形態では、SVMは、訓練セットにわたる精子試料データ $\{X_1, \dots, X_i\}$ の測定値、および訓練セットにわたる転帰(例えば、妊娠および/または妊娠までの時間)の測定値を使用して、それぞれの実体を分類するように訓練される。SVMは、それぞれ全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Cristianini and Shawe-Taylor, 2000, "An Introduction to Support Vector Machines," Cambridge University Press, Cambridge; Boser et al., 1992, "A training algorithm for

optimal margin classifiers," in Proceedings of the 5th Annual ACM Workshop on Computational Learning Theory, ACM Press, Pittsburgh, Pa., pp. 142-152; Vapnik, 1998, Statistical Learning Theory, Wiley, New York; Mount, 2001, Bioinformatics: sequence and genome analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Duda, Pattern Classification, Second Edition, 2001, John Wiley & Sons, Inc., pp. 259, 262-265; および Hastie, 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer, New York; および Furey et al., 2000, Bioinformatics 16, 906-914 に記載されている。分類に使用される場合、SVM は、標識されたデータから最大限に離れた超平面により、バイナリー標識されたデータ訓練セットの所与のセットに分ける（例えば、標的転帰は、標的転帰を保有すること（例えば、妊娠）または標的転帰を保有しないこと（例えば、妊娠に失敗）のいずれかのバイナリー標識を与えられる）。線形分離が不可能な場合、SVM は、特色空間への非線形マッピングを自動で実現する「カーネル」の技法と組み合わせて機能することができる。特色空間における SVM によって見出される超平面は、入力空間における非線形決定境界に対応する。

10

20

30

40

50

【0141】

一部の実施形態では、訓練された男性の生殖能力分類モデルは、主成分解析（PCA）モデルである。標識（例えば、妊娠または非妊娠）を識別する決定ルールを構築するために、PCA を使用して、訓練セットの精子試料特徴データを解析することができる。PCA は、訓練セットの精子試料特徴データを、訓練セットの特色を要約する変数（主成分）の新しいセットに変換することにより、訓練セット 206 の次元数を低減させる。例えば、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Jolliffe, 1986, Principal Component Analysis, Springer, New York を参照されたい。PCA は、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Draghici, 2003, Data Analysis Tools for DNA Microarrays, Chapman & Hall/CRC にも記載されている。

【0142】

主成分（PC）は、無相関であり、第 k の PC が、PC の間で k 番目に大きい分散を有するように順序付けされる。第 k の PC は、最初の $k - 1$ PC に対して直交性となるように、データ点の投射の変動を最大化する方向として解釈され得る。最初のいくつかの PC は、訓練セットにおける変動の大部分を捕捉する。対照的に、最後のいくつかの PC は、多くの場合、訓練セットにおける残留「ノイズ」のみを捕捉すると仮定される。そのようなものとして、PCA を使用して、本開示に従ったモデルを作成することもできる。斯かるアプローチにおいて、表中の各行が構築され、訓練セットの特定の参照実体に由来する精子試料特徴データのための測定値を表し、ベクトルと考慮され得る。そのようなものとして、訓練セットにおけるデータは、ベクトルの行列として考えることができ、各ベクトルは、それぞれの参照実体を表し、訓練セットにおけるそれぞれの男性に由来する精子試料特徴データのための測定値を含む。一部の実施形態では、この行列は、モノマーの定性的バイナリー記述のフリー-ウィルソン方法において表され（Kubinyi, 1990, 3D QSAR in drug design theory methods and applications, Pergamon Press, Oxford, pp 589-638）、行列における全分散情報が考慮されるまで、第 1 の主成分（PC）が、可能な最大の分散情報を捕捉し、第 2 の主成分（PC）が、2 番目に大きい量の全分散情報を捕捉するように等々、PCA を使用して最大限に圧縮された空間において分布される。次いで、ベクトルのそれぞれ（各ベクトルが、訓練セットの参照実体を表す場合）がプロットされる。

【0143】

特色選択方法

一部の実施形態では、本明細書に記載されている通りに使用および/または訓練される生殖能力分類方法は、特色選択方法、例えば、最小角回帰（least angle regression）または段階的回帰を使用して選択される精子試料の特色に基づく。特色選択方法は、訓練セットにわたり存在する多数の変数（例えば、Cap-Score、精子数（例えば、濃度）、精子運動性、精子形態、VSL（直線速度）、STR（直線性）、LIN（直進性）

、V C L (曲線速度) 、 V A P (平均パス速度) 、 % 運動性、運動性の持続時間、L H A (側方頭部振幅) 、 W O B (ゆらぎ) 、 P R O G (前進) および B C F (頭部振動数) 等の他の精子運動測定基準、ならびに年齢、体重等の男性被験体に由来する他の生体測定基準データ、等)の中から、いずれの特色が、所与の転帰に重要な因果効果を有するか(例えば、いずれの精子特徴が、低い男性の生殖能力および/または高い男性の生殖能力に因果関係があるか)特定する際に特に有利である。特色選択技法は、例えば、それぞれこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Saeys et al., 2007, "A Review of Feature Selection Techniques in Bioinformatics," Bioinformatics 23, 2507-2517およびTibshirani, 1996, "Regression and Shrinkage and Selection via the Lasso," J. R. Statist. Soc. B, pp. 267-288に記載されている。

10

【0144】

一部の実施形態では、特色選択方法は、予測精度を改善するための、訓練セットにわたる正則化を含む(例えば、Lasso、最小角回帰またはエラスティックネット(Elastic net)である)。Lassoは、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, pp. 64-65に記載されている。最小角回帰は、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Efron et al., 2004, "Least Angle Regression," The Annals of Statistics, pp. 407-499に記載されている。リッジ回帰を包含するエラスティックネットは、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Hastie, 2005, "Regularization and Variable Selection via the Elastic Net," Journal of the Royal Statistical Society, Series B: pp. 301-320に記載されている。

20

【0145】

一部の実施形態では、特色選択方法は、訓練セットへの決定木の適用を含む。決定木は、一般に、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Duda, 2001, Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 395-396によって記載されている。木に基づく方法は、特色空間を長方形のセットに区分化し、次いで、それぞれのセットにおいてモデル(定数等)をフィットさせる。一部の実施形態では、決定木は、ランダムフォレスト回帰である。使用することができる特異的なアルゴリズムの1つは、分類および回帰木(CART)である。他の特異的な決定木アルゴリズムは、ID3、C4.5、MARTおよびランダムフォレストを含むがこれらに限定されない。CART、ID3およびC4.5は、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Duda, 2001, Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 396-408 and pp. 411-412に記載されている。CART、MARTおよびC4.5は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer-Verlag, New York, Chapter 9に記載されている。ランダムフォレストは、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Breiman, 1999, "Random Forests - Random Features," Technical Report 567, Statistics Department, U.C. Berkeley, September 1999に記載されている。

30

【0146】

本開示のシステムおよび方法において使用することができる別の特色選択方法は、多変量適応回帰スプライン(MARS)である。MARSは、回帰のための適応手順であり、本開示が取り組む高次元問題に良く適している。MARSは、回帰設定におけるCARTの性能を改善するための、段階的線形回帰の一般化またはCART方法の改変として考慮することができる。MARSは、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer-Verlag, New York, pp. 283-295に記載されている。

40

【0147】

一部の実施形態では、特色選択方法は、訓練セットへのガウス過程回帰の適用を含む。ガウス過程回帰は、これにより参照により本明細書に組み込まれる、Ebden, August 2008, arXiv:1505.02965v2 (29 Aug 2015), "Gaussian Processes for Dimensionality Reduction: A Quick Introduction,"に開示されている。

50

【0148】

例示的な分類方法、システムおよびコンピューター可読媒体

そこで、本開示の様々な実施形態で使用される異なる分類モデルおよび特色選択モデルの概要を概説してきたが、具体的なモデルおよびモデル訓練についてさらなる詳細を提示する。

【0149】

一態様では、本開示は、男性の生殖能力状態を特徴付けるための方法であって、男性に由来する精子試料の一部分を、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露し、これにより受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、受精能を獲得した精子試料を、固定剤を用いて固定し、これにより固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子であって、検出可能な標識を有する標識分子で処理し、これにより標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部(AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜(APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む複数の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップと、AA G_{M1} 局在パターンおよびAPM G_{M1} 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップと、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てるステップと、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、精子試料から得られたデータに適用することにより、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、精子試料から得られたデータが、(i)AA G_{M1} 局在パターンとAPM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比(例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比)を含む、ステップとを含む方法を提供する。

【0150】

一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(i)AA G_{M1} 局在パターンとAPM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(A)精子試料の体積、(B)精子試料中の精子の濃度、(C)精子試料中の精子の運動性、ならびに(D)(a)(i)AA G_{M1} 局在パターンとAPM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b)精子試料の体積、(c)精子試料中の精子の濃度、および(d)精子試料中の精子の運動性のうちの任意の2つの、演算による組合せ(例えば、相互作用項)からなる群より選択される1つまたは複数のデータ項目をさらに含む。一部の実施形態では、演算による組合せは、任意の2つのデータ尺度の和、差、積または比である。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(A)(i)AA G_{M1} 局在パターンとAPM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(B)精子試料の体積、ならびに(C)(a)(i)AA G_{M1} 局在パターンとAPM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii)すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比および(b)精子試料の体積、の積からなる。

【0151】

一部の実施形態では、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、非線形回帰モデルである。一部の実施形態では、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、ロジスティック回帰モデル、例えば、

【数4】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

(式中、 $f(X)$ は、生殖能力の尺度であり、 i は、正の整数であり、 α は、事前訓練

された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j は、精子試料から得られたデータ（例えば、 $(i) AA \text{ } G_{M1}$ 局在パターンと $APM \text{ } G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、 (ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、精子試料中の精子の運動性、およびそれらの相互作用項のうちの1つまたは複数を含む）内のデータ項目である）

の形態のモデルである。

【0152】

一部の実施形態では、受精能獲得条件は、精子試料の一部分の、重炭酸イオン、カルシウムイオンおよびステロール流出のメディエーターのうちの1つまたは複数への曝露を含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2-ヒドロキシ-プロピル- β -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質またはリポソームを含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2-ヒドロキシ-プロピル- β -シクロデキストリンを含む。

10

【0153】

一部の実施形態では、固定剤は、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはそれらの組合せを含む。

【0154】

一部の実施形態では、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子は、蛍光的に標識されたコレラ毒素bサブユニットを含む。

20

【0155】

一部の実施形態では、特定するステップは、曝露するステップの2～24時間後に実施される。

【0156】

一部の実施形態では、方法は、曝露するステップの前に、精子試料の一部分の粘度を減少させるために、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して、精子試料の一部分を処理するステップをさらに含む。

【0157】

一態様では、本開示は、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露されており、固定剤中で固定されており、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子で染色されている、男性に由来する精子試料の一部分の第1の部分を得るステップであって、標識分子が、検出可能な標識を有する、ステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む複数の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップと、 $AA \text{ } G_{M1}$ 局在パターンおよび $APM \text{ } G_{M1}$ 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップと、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てるステップと、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、精子試料から得られたデータに適用することにより、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、精子試料から得られたデータが、 $(i) AA \text{ } G_{M1}$ 局在パターンと $APM \text{ } G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、 $(ii) G_{M1}$ 標識された局在パターンの組合せとの間の比（例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比）を含む、ステップとを含む方法を提供する。

30

40

【0158】

一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、 $(i) AA \text{ } G_{M1}$ 局在パターンと $APM \text{ } G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、 (ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、 (A) 精子試料の体積、 (B) 精子試料中の精子の濃度、 (C) 精子試料中の精子

50

の運動性、ならびに (D) (a) (i) A A G_{M 1} 局在パターンと A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 精子試料の体積、(c) 精子試料中の精子の濃度、および (d) 精子試料中の精子の運動性のうちの任意の 2 つの、演算による組合せからなる群より選択される 1 つまたは複数のデータ項目をさらに含む。一部の実施形態では、演算による組合せは、任意の 2 つのデータ尺度の和、差、積または比である。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(A) (i) A A G_{M 1} 局在パターンと A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(B) 精子試料の体積、ならびに (C) (a) (i) A A G_{M 1} 局在パターンと A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比および (b) 精子試料の体積、の積からなる。

【0159】

一部の実施形態では、1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器は、非線形回帰モデルである。一部の実施形態では、1 つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの 1 つの分類器は、ロジスティック回帰モデル、例えば、

【数 5】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

(式中、f (X) は、生殖能力の尺度であり、i は、正の整数であり、α は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、β₀, β₁, . . . , β_i は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、{X₁, . . . , X_i} 内の各 X_j は、精子試料から得られたデータ (例えば、(i) A A G_{M 1} 局在パターンと A P M G_{M 1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G_{M 1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、精子試料中の精子の運動性、およびそれらの相互作用項のうちの 1 つまたは複数を含む) 内のデータ項目である)

の形態のモデルである。

【0160】

一部の実施形態では、受精能獲得条件は、精子試料の一部分の、重炭酸イオン、カルシウムイオンおよびステロール流出のメディエーターのうちの 1 つまたは複数への曝露を含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリン、メチル - β - シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質またはリポソームを含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリンを含む。

【0161】

一部の実施形態では、固定剤は、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはそれらの組合せを含む。

【0162】

一部の実施形態では、G_{M 1} 局在パターンに対する標識分子は、蛍光的に標識されたコレラ毒素 b サブユニットを含む。

【0163】

一部の実施形態では、特定するステップは、曝露するステップの 2 ~ 24 時間後に実施される。

【0164】

一部の実施形態では、方法は、得るステップの前に、精子試料の一部分の粘度を減少させるために、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して、精子試料の一部分を処理するステップをさらに含む。

【0165】

10

20

30

40

50

一態様では、本開示は、精子試料を得るステップであって、精子試料の少なくとも一部分が、*in vitro*で受精能獲得条件に曝露されており、固定剤に曝露されており、 G_{M1} について染色されている、*in vitro*で受精能を獲得した精子を得て、これにより標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料の *Cap-Score*を、1つまたは複数の G_{M1} 標識された局在パターンに基づき決定するステップであって、前記 G_{M1} 標識された局在パターンが、先体頂部 (AA) G_{M1} 局在パターン、先体後方原形質膜 (APM) G_{M1} 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンである、ステップと、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、精子試料から得られたデータに適用することにより、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、データが、(i) AA G_{M1} 局在パターンと APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比 (例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比) を含む、ステップとを含む方法を提供する。

10

20

30

【0166】

一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(i) AA G_{M1} 局在パターンと APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(A) 精子試料の体積、(B) 精子試料中の精子の濃度、(C) 精子試料中の精子の運動性、ならびに (D) (a) (i) AA G_{M1} 局在パターンと APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 精子試料の体積、(c) 精子試料中の精子の濃度、および (d) 精子試料中の精子の運動性のうちの任意の2つの、演算による組合せからなる群より選択される1つまたは複数のデータ項目をさらに含む。一部の実施形態では、演算による組合せは、任意の2つのデータ尺度の和、差、積または比である。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(A) (i) AA G_{M1} 局在パターンと APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(B) 精子試料の体積、ならびに (C) (a) (i) AA G_{M1} 局在パターンと APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比および (b) 精子試料の体積、の積からなる。

【0167】

一部の実施形態では、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、非線形回帰モデルである。一部の実施形態では、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、ロジスティック回帰モデル、例えば、

【数6】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

(式中、 $f(X)$ は、生殖能力の尺度であり、 i は、正の整数であり、 α は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j は、精子試料から得られたデータ (例えば、(i) AA G_{M1} 局在パターンと APM G_{M1} 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、精子試料中の精子の運動性、およびそれらの相互作用項のうちの1つまたは複数を含む) 内のデータ項目である)

の形態のモデルである。

【0168】

一部の実施形態では、方法は、得るステップの前に、精子試料の一部分の粘度を減少させるために、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損

40

50

傷を与えない試薬を使用して、精子試料の一部分を処理するステップをさらに含む。

【0169】

一態様では、本開示は、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器を、男性に由来する精子試料から得られるデータに適用することにより、男性の生殖能力状態を特徴付けるステップであって、データが、精子試料の処理された部分における、(i) 先体頂部(AA) G_{M1}局在パターンと先体原形質膜(APM) G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべてのG_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の比を含み、(i) AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべてのG_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の比が：男性に由来する精子試料の一部分をin vitroで受精能獲得条件に曝露し、これにより受精能を獲得した精子試料を形成すること、受精能を獲得した精子試料を、固定剤を用いて固定し、これにより固定され、in vitroで受精能を獲得した精子試料を形成すること、固定され、in vitroで受精能を獲得した精子試料を、G_{M1}局在パターンに対する標識分子で処理し、標識分子が、検出可能な標識を有し、これにより標識され、固定され、in vitroで受精能を獲得した精子試料を形成すること、標識され、固定され、in vitroで受精能を獲得した精子試料について、AA G_{M1}局在パターン、APM G_{M1}局在パターン、縞状細胞G_{M1}局在パターン、およびすべてのその他の標識されたG_{M1}局在パターンを含む複数のG_{M1}標識された局在パターンを特定すること、AA G_{M1}局在パターンおよびAPM G_{M1}局在パターンを受精能獲得状態に割り当てること、縞状細胞G_{M1}局在パターンおよびすべてのその他の標識されたG_{M1}局在パターンを非受精能獲得状態に割り当てること、ならびに(i) AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せを、(ii) すべてのG_{M1}標識された局在パターンの組合せと比較することにより決定される、ステップを含む方法を提供する。

10

20

【0170】

一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(i) AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべてのG_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の比からなる。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(A) 精子試料の体積、(B) 精子試料中の精子の濃度、(C) 精子試料中の精子の運動性、ならびに(D) (a) (i) AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべてのG_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 精子試料の体積、(c) 精子試料中の精子の濃度、および(d) 精子試料中の精子の運動性のうちの任意の2つの、演算による組合せからなる群より選択される1つまたは複数のデータ項目をさらに含む。一部の実施形態では、精子試料から得られたデータは、(A) (i) AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべてのG_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の比、(B) 精子試料の体積、ならびに(C) (a) (i) AA G_{M1}局在パターンとAPM G_{M1}局在パターンとの組合せと、(ii) すべてのG_{M1}標識された局在パターンの組合せとの間の比および(b) 精子試料の体積、の積からなる。

30

【0171】

一部の実施形態では、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、非線形回帰モデルである。一部の実施形態では、1つまたは複数の事前訓練された生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、ロジスティック回帰モデル(例えば、

40

【数7】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

(式中、f(X)は、生殖能力の尺度であり、iは、正の整数であり、αは、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、β₀, β₁, ..., β_iは、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、{X₁, ..., X_i}内の各X_jは、精子試料から得られたデータ(例えば、(i) AA G_{M1}局在パター

50

ンと A P M G M 1 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G M 1 標識された局在パターンの組合せとの間の比、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、精子試料中の精子の運動性、およびそれらの相互作用項のうちの 1 つまたは複数を含む) 内のデータ項目である) の形態のモデルである。

【 0 1 7 2 】

一部の実施形態では、受精能獲得条件は、精子試料の一部分の、重炭酸イオン、カルシウムイオンおよびステロール流出のメディエーターのうちの 1 つまたは複数への曝露を含んだ。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリン、メチル - β - シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質またはリポソームを含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2 - ヒドロキシ - プロピル - β - シクロデキストリンを含む。

10

【 0 1 7 3 】

一部の実施形態では、固定剤は、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはそれらの組合せを含む。

【 0 1 7 4 】

一部の実施形態では、G M 1 局在パターンに対する標識分子は、蛍光的に標識されたコレラ毒素 b サブユニットを含む。

【 0 1 7 5 】

一部の実施形態では、特定するステップは、曝露するステップの 2 ~ 2 4 時間後に実施された。

20

【 0 1 7 6 】

一部の実施形態では、曝露するステップの前に、精子試料の一部分の粘度を減少させるために、精子試料の一部分は、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して処理された。

【 0 1 7 7 】

一部の実施形態では、本開示は、少なくとも 1 つのプロセッサと、少なくとも 1 つのプロセッサによってアドレス可能なメモリーとを含む、男性の生殖能力状態を特徴付けるために生殖能力分類器を訓練するためのシステムであって、メモリーが、少なくとも 1 つのプロセッサにより実行される少なくとも 1 つのプログラムを記憶し、少なくとも 1 つのプログラムが、A) 生殖補助 (例えば、子宮内人工授精 (I U I)) における試みについての既知の転帰と関連付けられた複数の男性に由来する精子試料から得られたデータを含む訓練セットであって、各個別の精液試料に由来するデータが、個別の精液試料中の精子の (i) A A G M 1 局在パターンと A P M G M 1 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G M 1 標識された局在パターンの組合せとの間の比 (例えば、受精能獲得状態を呈する精子の、割り当てられた精子の合計数に対する比) を含む、訓練セットを得るための命令、および B) 生殖補助の試みの転帰と、各個別の精液試料中の精子の (i) A A G M 1 局在パターンと A P M G M 1 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G M 1 標識された局在パターンの組合せとの間の対応する比との間の少なくとも 1 つの対応に基づき、1 つまたは複数の生殖能力分類器を訓練するための命令を含む、システムを提供する。

30

40

【 0 1 7 8 】

一部の実施形態では、複数の男性に由来する各個別の精子試料について、精子の (i) 先体頂部 (A A) G M 1 局在パターンと先体原形質膜 (A P M) G M 1 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G M 1 標識された局在パターンの組合せとの間の比は、複数の男性における個別の男性に由来する精子試料の一部分を、受精能獲得条件に i n v i t r o で曝露し、これにより受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、受精能を獲得した精子試料を、固定剤を用いて固定し、これにより固定され、i n v i t r o で受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、固定され、i n v i t r o で受精能を獲得した精子試料を、G M 1 局在パターンに対する標識分子であって、検出可能な標識

50

を有する標識分子で処理し、これにより標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料を形成するステップと、標識され、固定され、*in vitro*で受精能を獲得した精子試料について、 $AA\ G_{M1}$ 局在パターン、 $APM\ G_{M1}$ 局在パターン、縞状細胞 G_{M1} 局在パターン、およびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを含む複数の G_{M1} 標識された局在パターンを特定するステップと、 $AA\ G_{M1}$ 局在パターンおよび $APM\ G_{M1}$ 局在パターンを、受精能獲得状態に割り当てるステップと、縞状細胞 G_{M1} 局在パターンおよびすべてのその他の標識された G_{M1} 局在パターンを、非受精能獲得状態に割り当てるステップと、精子の (i) $AA\ G_{M1}$ 局在パターンと $APM\ G_{M1}$ 局在パターンとの組合せを、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せと比較するステップとを含む方法によって決定された。

10

【0179】

一部の実施形態では、受精能獲得条件は、精子試料の一部分の、重炭酸イオン、カルシウムイオンおよびステロール流出のメディエーターのうちの1つまたは複数への曝露を含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2-ヒドロキシ-プロピル-β-シクロデキストリン、メチル-β-シクロデキストリン、血清アルブミン、高密度リポタンパク質、リン脂質小胞、胎児臍帯血清限外濾過液、脂肪酸結合タンパク質またはリポソームを含む。一部の実施形態では、ステロール流出のメディエーターは、2-ヒドロキシ-プロピル-β-シクロデキストリンを含む。

【0180】

一部の実施形態では、固定剤は、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、またはそれらの組合せを含む。

20

【0181】

一部の実施形態では、 G_{M1} 局在パターンに対する標識分子は、蛍光的に標識されたコレラ毒素bサブユニットを含む。

【0182】

一部の実施形態では、特定するステップは、曝露するステップの2~24時間後に実施される。

【0183】

一部の実施形態では、各個別の精液試料について、精子の (i) $AA\ G_{M1}$ 局在パターンと $APM\ G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比を決定するのに使用される方法は、得るステップの前に、精子試料の粘度を減少させるために、非金属性材料からなる広いオリフィスのピペットを使用し、かつ精子膜に損傷を与えない試薬を使用して、精子試料の一部分を処理するステップをさらに含んだ。

30

【0184】

一部の実施形態では、1つまたは複数の生殖能力分類器を訓練するのに使用されるデータは、複数の男性に由来する各個別の精液試料に由来する (i) $AA\ G_{M1}$ 局在パターンと $APM\ G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、(ii) G_{M1} 標識された局在パターンのすべての組合せとの間の比からなる。一部の実施形態では、生殖能力分類器を訓練するのに使用されるデータは、複数の男性に由来する各個別の精液試料に由来する、(A) 精子試料の体積、(B) 精子試料中の精子の濃度、(C) 精子試料中の精子の運動性、ならびに (D) (a) (i) $AA\ G_{M1}$ 局在パターンと $APM\ G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、(b) 精子試料の体積、(c) 精子試料中の精子の濃度、および (d) 精子試料中の精子の運動性のうちの任意の2つの、演算による組合せからなる群より選択される1つまたは複数のデータ項目をさらに含む。一部の実施形態では、生殖能力分類器を訓練するのに使用されるデータは、複数の男性に由来する各個別の精子試料に由来する：(A) (i) $AA\ G_{M1}$ 局在パターンと $APM\ G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、(ii) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の個別の比、(B) 精子試料の体積、ならびに (C) (a) (i) $AA\ G_{M1}$ 局在パターンと $APM\ G_{M1}$ 局在パターンとの組合せと、

40

50

(i i) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比および (b) 精子試料の体積、の積からなる。

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態では、1つまたは複数の生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、非線形回帰モデルである。一部の実施形態では、1つまたは複数の生殖能力分類器のうちの1つの分類器は、ロジスティック回帰モデル、例えば、

【 数 8 】

$$f(X) = \frac{1}{1 + \exp(-(\beta_0 + \sum_{j=1}^i \beta_j X_j))}$$

10

(式中、 $f(X)$ は、生殖能力の尺度であり、 i は、正の整数であり、 α は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i$ は、事前訓練された分類器の訓練中に決定されたパラメーターであり、 $\{X_1, \dots, X_i\}$ 内の各 X_j は、精子試料から得られたデータ (例えば、(i) AA_{GM1} 局在パターンと APM_{GM1} 局在パターンとの組合せと、(i i) すべての G_{M1} 標識された局在パターンの組合せとの間の比、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、精子試料中の精子の運動性、およびそれらの相互作用項のうちの1つまたは複数を含む) 内のデータ項目である) の形態のモデルである。

【 0 1 8 6 】

本発明のある実施形態では、正常で生殖能力がある男性についての平均 $Cap - Score$ (商標) は、約 30 ~ 約 40 またはそれよりも多い。ある実施形態では、平均 $Cap - Score$ (商標) は、約 32 ~ 約 38 である。ある実施形態では、平均 $Cap - Score$ (商標) は、約 34 ~ 約 36 である。ある実施形態では、平均 $Cap - Score$ (商標) は、約 35 . 3 である。

20

【 0 1 8 7 】

本発明のある実施形態では、平均の妊娠の可能性パーセント (または妊娠確率) は、約 35 % ~ 約 50 % である。ある実施形態では、平均妊娠確率は、約 37 % ~ 約 48 % である。本発明のある実施形態では、平均妊娠確率は、約 39 % ~ 約 46 % である。ある実施形態では、平均妊娠確率は、約 41 % ~ 約 44 % である。本発明のある実施形態では、平均妊娠確率は、約 43 % である。

30

【 0 1 8 8 】

ある実施形態では、本開示は、妊娠を達成しようと試みるカップルのための生殖アプローチを特定するための方法を提供する。ある実施形態では、方法は、上に示す通りに個体についての $Cap - Score$ を得るステップと、上に記述されているロジスティック回帰解析により $Cap - Score$ を実行して、自然受胎により受胎しようと試みてから最初の3ヶ月間以内に、または子宮内人工授精 (IUI) の3ラウンド以内に、男性からの妊娠の可能性パーセントの見込みを得るステップとを含む。この値は、医師および患者に、最も効果的かつ効率的な生殖療法の過程を伝え、最終的に、患者、医者および保険会社の時間、金銭および労力を節約するであろう。例えば、ロジスティック回帰解析により $Cap - Score$ を実行した後に、高い $Cap - Score$ を有する男性 (男性 1) は、自然受胎により受胎しようと試みた最初の3ヶ月間以内に、または IUI の3ラウンド以内に、低い $Cap - Score$ を有する男性 (男性 2) よりも高いパーセントの妊娠達成可能性を有するであろう。したがって、医師は、男性 1 のパートナーに生殖能力刺激薬を与え、男性 1 とそのパートナーに、自然な受胎を試みるよう指示することを選ぶことができる一方、男性 2 に対し、医師は、例えば、体外受精または精子ドナー等、より厳密な形態の生殖療法を推奨することができる。

40

【 0 1 8 9 】

米国特許出願公開第 2017 - 0184605 号、同第 2017 - 0234857 号および同第 2017 - 0248584 号の開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0190】

制限的と解釈されるべきではない次の例示的な実施例により、本発明はさらに記載される。

【実施例】

【0191】

(実施例1)

本実施例は、ヒト精子により得られる G_{M1} 局在パターンの実証を提供する。男性ドナーから射精された精子を収集し、20分間37℃で液化させ、次いで、体積、初期計数、運動性および形態評価を行った。1mlの精液試料を、15mlコニカルチューブ内の1mlの密度勾配(90% Enhance-S; Vitrolife, San Diego, California, USA)の上に重層した。チューブを300×gで10分間遠心分離した。下の1ml画分を新しい15mlチューブに移し、次いで、4mlのmHTFに再懸濁した。これを600×gで10分間遠心分離した。上清を除去し、精子のペレットを0.5mlのmHTFに再懸濁した。次いで、洗浄した精子を、濃度および運動性について評価した。次いで、各チューブの最終体積が300μlになり、精子の最終濃度が1,000,000/mlになるように、等しい体積の精子を2本のチューブに添加した。第1のチューブは、mHTF(非受精能獲得条件)を含有し、第2のチューブは、mHTFプラス最終濃度3mMの2-ヒドロキシ-プロピル-β-シクロデキストリン(受精能獲得条件)を含有した。精子は、変動する長さの時間でインキュベートしたが、3時間を典型的に使用した。これらのインキュベーションは、37℃で行った。

【0192】

インキュベーション期間の終わりに、各チューブの内容物を穏やかに混合し、各チューブから18μlを取り出し、別々の微量遠心分離チューブに移した。2μlの1%(重量/体積)パラホルムアルデヒドを添加して、0.1%の最終濃度を達成した。別の実施形態では、0.1%(重量/体積)パラホルムアルデヒドを添加して、0.01%の最終濃度を達成した。これらのチューブを穏やかに混合し、室温で15分間インキュベートし、この時点で、0.3μlの1mg/mlコレラ毒素bサブユニットを添加した。2本のチューブの内容物を再び穏やかに混合し、さらに5分間室温でインキュベートした。各チューブから、5μlを取り出し、蛍光顕微鏡による評価のためにスライドガラス上に置いた。対比染色、焦点面の高速(speeding)決定および蛍光シグナルの寿命増加をもたらすために、3μlのDAPI/退色防止剤(Antifade)を添加する場合もあった。

【0193】

図2に示す通り、正常ヒト精子における G_{M1} の局在パターンは、受精能獲得条件に対する応答を反映する。完全応答は、正常な生殖能力を有する男性のみで見られた；子宮内人工授精(IUI)または体外受精(IVF)における以前の試みに失敗した未解明の不妊の男性において、応答性パターンは大部分が低減したまたは存在しなかった。図1は、ヒト精子における G_{M1} パターンを示す。しかし、診断アッセイの目的のため、PAPM、AA/PA、ESおよびDIFF等、異常を反映するパターンは、解析をし易くするために群分けすることができる。図2A~2Cは、非受精能獲得条件(NC; 図2A)または受精能獲得条件(CAP; 図2B)下でインキュベートした正常精液における異なるパターンの相対分布を示す。INTERパターンの低減が、CAPへの曝露後の正常精液に見られる(図2C)一方、AAパターンおよびAPMパターンの大幅な増加も見られる。これらの正常データとの比較において、未解明の不妊であることが既知の男性の群に由来する精子も、 G_{M1} アッセイに供した。これらの精子において、受精能獲得条件下でAAパターンまたはAPMパターンの増加はほぼなかった。

【0194】

(実施例2)

本実施例では、34名の患者の臨床歴を調べて、妊娠の今までに達成した臨床エビデンス歴と比べたその G_{M1} アッセイスコアの綿密な解析を行った。患者カップルが、3またはそれよりも少ないサイクル以内に受精/臨床妊娠(生化学的エビデンスまたは超音波検

査で心拍がない囊に限定される場合であっても)のいくつかのエビデンスを達成した場合、男性患者は、「生殖能力がある」と定義した。

【0195】

これらの34名の患者のデータの解析は、3時間の時点で受精能を獲得した試料のスコアに対し40%(APM+AA)のカットオフを適用した場合には、「合格した」(39.5%またはそれを超えるスコアを有する)7/8名が、「生殖能力がある」と指定されていたことが見出された(87.5%)ことを明らかにした。「不合格の」(39.4またはそれ未満のスコアを有する)26名のうちの、3/26名のみが、臨床妊娠のエビデンスを有していた(11.5%)(下の表1を参照)。

【0196】

カットオフを低減させた場合、より多くの臨床的に生殖能力が低い人が、合格スコアを得て、アッセイに合格し3サイクル以内に生殖能力がある者のパーセンテージが下落することが予測されるであろう。興味深いことに、結果は、生殖能力(3サイクル判断基準によって定義される)に関して平滑な勾配または連続した曲線ではなかった。すなわち、40において定義されるアッセイに合格しなかったか、または35において定義されるアッセイに合格しなかったかは、生殖能力の見込みのいかなる顕著な変化とも相関せず、これは常に低かった(11.5~14.3%の間)。逆に、35対40におけるアッセイに合格することは、生殖能力の見込みにおける非常に大きい差に対応した(それぞれ53.8~87.5%の範囲である)。この点を強調して繰り返すと、組み合わせたAPM+AAパーセンテージの5%の変化は、生殖成功歴(history of fertility)の30%を超える変化に対応した。

【0197】

これらの結果は、男性の生殖能力が、男性の生殖能力(臨床妊娠を達成する見込み)のそれ相応に小さいが連続した変化と同一視するスコアの小さい変化よりもむしろ、男性の生殖能力アッセイのスコアの範囲が「生殖能力がある」、「生殖能力が低い」または「不妊」のカテゴリー化に対応する、「ステップ関数」に似ていることを示す。これらのデータは、およそ38.5~40のスコアが、「生殖能力が低い」または「生殖能力がある」の指定の間のカットオフとなるであろうことを強く示す。データのさらなる検査は、<14.5%のカットオフを「不妊」の可能性の指定として使用することができることを示す。

【表6-1】

カットオフ	</=3サイクル以内の受胎において定義された生殖能力あり	
39.5	合格	8 (7/8 生殖能力あり = 87.5%)
	失敗	26 (3/26 生殖能力あり= 11.5%)
38.5	合格	8 (7/8 生殖能力あり = 87.5%)
	失敗	26 (3/26 生殖能力あり= 11.5%)

【表 6 - 2】

37.5	合格	11 (7/11生殖能力あり = 63.6%)
	失敗	23 (3/23生殖能力あり = 13.0%)
36.5	合格	11 (7/11生殖能力あり = 63.6%)
	失敗	23 (3/23生殖能力あり = 13.0%)
35.5	合格	13 (7/13 生殖能力あり= 53.8%)
	失敗	21 (3/21 生殖能力あり= 14.3%)

10

【 0 1 9 8 】

平均精液パラメータの観点からすべて同様であるこれらの男性のデータを要約すると、次の範囲が示唆される（絶対的スコアに基づく）：不妊：＜ 1 4 . 5、生殖能力が低い： 1 4 . 5 ~ 3 8 . 4、生殖能力がある： 3 8 . 5。

【 0 1 9 9 】

あるいは、受精能獲得条件下のインキュベーション時間にわたり、または非受精能獲得条件下で観察される相対数に対し、A P Mおよび / またはA A パターンの相対数の変化を比較することにより、試料の生殖能力を評価することができる。例えば、受精能獲得条件下における3時間のインキュベーション後のA P M + A A 相対数を、インキュベーション開始時のそれらのパターンの相対数と比較することができる。さらに別の実施形態では、A P Mおよび / またはA A 頻度の変化を、逐次的な時点（1、2および3時間等）から得られる結果と比較することができる。実際には、相対的頻度をY軸に、時点をX軸にプロットし、非受精能獲得および受精能獲得条件下におけるI N T E R、A P Mおよび / またはA A 試料のうちの1つまたは複数の増加する数の変化の傾きまたは比率を評価することができる。63名の患者の群において解析に対するこのアプローチが行われた場合、1、2および3時間のインキュベーションにわたる、それぞれ非受精能獲得培地における17% ~ 22% ~ 28%および受精能獲得培地における26% ~ 31% ~ 38%のベースラインG_{M1}パターンにより、正常参照群にマッチするスコアを有する31名の男性を特定した（図3を参照）。非受精能獲得培地における15% ~ 20% ~ 24%および受精能獲得培地における20% ~ 25% ~ 29%の参照値を下回る32名の男性を特定した。数、運動性およびパーセント正常形態の精液解析パラメータ（厳格なWHO判断基準を使用）は、2群の間で同程度であった。正常範囲G_{M1}パターンを有する集団は、45.2%の子宮内人工授精（IUI）妊娠率を有し（14 / 31）、そのうちの8名（25.8%）は、少なくとも1つの胎児の心拍を得た。この群における3組の追加的なカップルは、自然に妊娠した。参照を下回るG_{M1}パターンを有する男性について、IUI臨床妊娠率は、僅かに6.3%（2 / 32；P = 0.03）であった。このコホートにおいて、13名がICSIを受け、6名が妊娠した（46.2%）。

20

30

40

【 0 2 0 0 】

（実施例3）

精子細胞は、固定剤中で24時間インキュベートした以外は、実施例1に記載されている通りに処理した。次いで、標識された精子細胞を蛍光顕微鏡により評価した。図6A、6B、6Cおよび6Dに説明される通り、新しいG_{M1}局在パターンである縞状細胞を特定した。縞状細胞において、図6Aに説明される通り、赤道セグメントの底部 / 先体後方領域の頂部におよび先体を覆う原形質膜にG_{M1}シグナルが存在する。シグナルは、先体後方 / 赤道領域および先体を覆う原形質膜に均等に分布する。シグナルを欠く赤道セグメントにおける帯も存在する。図6Bに説明される通り、先体を覆う原形質膜におけるシグ

50

ナルは、先体後方 / 赤道帯におけるシグナルよりも明るい。図 6 C および図 6 D に説明される通り、先体後方 / 赤道帯に見出されるシグナルが、先体を覆う原形質膜におけるシグナルよりも明るい。

【 0 2 0 1 】

単一ドナーに由来する精子細胞を洗浄し、受精能獲得（刺激（Stim））および非受精能獲得（非刺激（Non-Stim））条件下の両方でインキュベートし、次いで、0日目（固定液（fix）中におよそ5時間維持）および1日目（固定液中におよそ27.5時間維持）の両方でスコア化した。刺激処理について、0日目から1日目にかけて縞状細胞のパーセンテージに変化は殆どなかった。対照的に、非刺激処理について、0日目から1日目にかけて縞状細胞のパーセントは、3から22%に増加した。この変化と併せて、INTERには76から51%へのその後の減少があった。これらのデータは、0日目にinterパターンを有する細胞からの1日目に発生する縞状細胞パターンと一致する。

表1

【表1】

	% AA	% APM	% Inter	% 縞状細胞	% その他
非刺激0日目	0	16	76	3	6
刺激0日目	7	19	62	4	8
非刺激1日目	4	14	51	22	10
刺激1日目	4	24	53	3	16

【 0 2 0 2 】

（実施例4）

単一ドナーに由来する細胞を洗浄し、受精能獲得（刺激）および非受精能獲得（非刺激）条件下の両方でインキュベートし、次いで、0日目（固定液中におよそ4時間維持）および1日目（固定液中におよそ25時間維持）の両方でスコア化した。0日目に縞状細胞は殆ど観察されなかったため、Cap-Scoreを決定するために縞状細胞の数を含めてまたは含めず、0日目に同様のCap-Scoreが得られた。しかし、1日目に縞状細胞の出現により、縞状細胞がどのように解釈されたかに応じて、異なるCap-Score（商標）値を得ることができた。例えば、縞状細胞が、受精能を獲得していないとして処理された場合、刺激および非刺激処理の両方で同様のCap-Score（商標）が得られた。しかし、縞状細胞が、受精能を獲得したとして処理され、Cap-Score（商標）計算から分離または除去された場合、非刺激処理で、刺激処理よりも大きいCap-Scoreが得られた。これらの精子細胞は基本条件下でインキュベートされ、よって、受精能獲得に関連するGM₁パターンを示していなかったため、非刺激処理でより大きいCap-Score（商標）値を有することには意味がない。これらの観察は、縞状細胞が、非受精能獲得状態を表し、Cap-Score（商標）を計算する際に、そのようなものとして処理されるべきであることのさらなる補完的エビデンスをもたらす。

表2

【表2】

	下記によりコンピューター処理されたCap-Score(商標):			
	受精能を獲得していない状態としての縞状細胞	受精能を獲得した状態としての縞状細胞	分離された縞状細胞	除去された縞状細胞
非刺激0日目	18	20	20	19
刺激0日目	28	31	30	29
非刺激1日目	35	52	52	42
刺激1日目	36	39	38	37

【0203】

(実施例5)

18名の特有のドナーに由来する40種の異なる精液試料を洗浄し、精子を受精能獲得（刺激）および非受精能獲得（非刺激）条件下の両方でインキュベートし、次いで、0日目および1日目の両方でスコア化した。縞状細胞が、受精能を獲得していないとして処理される場合、0日目および1日目に得られる刺激Cap - Score（商標）値の間に顕著な相関が観察される（ $r = 0.32$ ； $n = 40$ ； $p < 0.05$ ）。対照的に、縞状細胞が、受精能を獲得したとして処理され、 G_{M1} 局在パターンに基づき受精能を獲得したもしくは受精能を獲得していないピンのいずれかへと分けられる、またはCap - Score（商標）から単純に除去される場合、0日目および1日目の間に相関は観察されない。これらの観察は、縞状細胞局在パターンが、精子が一晩維持されると発達し、0日目に、これらの精子が、inter / 受精能を獲得していないパターンを示すという考えを支持する。受精能を獲得していない細胞としての縞状細胞の処理は、経時的にCap - Score（商標）を安定化し、不妊である細胞を反映するこのパターンと一致する。その上、これらのデータは、受精能を獲得していない細胞としての縞状細胞の解釈が、集団に適用可能であることを実証する。そうであるにもかかわらず、1日目の縞状細胞の出現は、ドナー依存性である。これは、これらの縞状細胞の観察から、これらのドナー、およびドナーの精子の受精能力に関する追加的な情報を提供し得る可能性が生じる。

10

【0204】

(実施例6)

単一生殖能力クリニックにおいて、子宮内人工授精（IUI）を使用して、そのパートナーと妊娠するように試みた56名の男性被験体から収集された精子試料（すなわち、精液試料）に由来するデータを、様々な生殖能力パターン認識分類器のための訓練セットとして使用した。各データ入力は、IUIを使用してカップルが妊娠したか否か、Cap - Score（商標）、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、および精子試料中の精子の運動性を含んだ。

20

【0205】

第1の試みにおいて、ロジスティック回帰を使用して、男性の生殖能力を特徴付けするための分類器を構築した。ロジスティック回帰は、カテゴリーの確率が、所与の変数のセットにおける線形モデルの変換によって決定されると仮定することによりカテゴリー的データをモデル化する技法である。妊娠した / 妊娠しなかった二分法等のバイナリーデータのため、変数において線形であると仮定されるものは、成功確率のロジットである：

30

【数9】

$$\text{ロジット}(p) = \log\left(\frac{p}{1-p}\right) = Ax$$

（式中、 x は、変数のあるベクトルであり、 A は、それぞれが各変数に対する係数のセットである）。4つの変数は、Cap - Score、運動性、濃度および体積であった。線形判別解析（LDA）のため、これらの変数を中心に置き縮尺調整したが、モデルは、元の値を使用した。

40

4つの変数のすべての組合せを使用したモデル（15種のモデル）および相互作用モデルは、段階的変数選択により選択した。2つの最良のモデルは、一方は、Cap - Score単独に基づき、他方は、Cap - Scoreおよび体積を使用した。Cap - Score単独により、妊娠転帰を予測した（ $p = 0.05$ ；妊娠を生じる確率（PGP）範囲：6.97～58.7%）。

【0206】

モデルがデータをどの程度十分に説明するかに関する1つの尺度である逸脱は、より複雑なモデル（例えば、Cap - Scoreおよび体積を使用する）が、Cap - Score単独に基づくモデルよりも僅かに優れたモデルであることを示唆する。しかし、より複雑なモデルは、単純により柔軟であるため、より低い逸脱を有する傾向がある。

50

【 0 2 0 7 】

より複雑なモデルが、実際により情報的な価値があるか、またはより柔軟であるため、より情報的な価値があると単に思われるか評価するために、A I C は、モデル複雑性を考慮に入れる。A I C は、C a p - S c o r e 単独を使用したモデルが、複雑なモデル（例えば、C a p - S c o r e、体積および両者の積である相互作用項を使用する）よりも僅かに優れていることを示唆する。

【 0 2 0 8 】

逸脱および A I C 尺度は、ある 1 つのモデルを他のモデルよりも明らかに好むわけではない。しかし、C a p - S c o r e 単独に基づくモデルを使用することは、少なくとも 3 つの理由から有利である。第 1 に、C a p - S c o r e 単独に基づくモデルは、より単純であり、より単純なモデルは、より頑強になる傾向がある。第 2 に、体積は、医学的見地から問題になる。中等度の値について、増加した体積は、増加した生殖能力に関連するが、大きい値は、減少した生殖能力に関連する。第 3 に、ロジスティックモデルの出力は、下でさらに記述される通り、成功の確率として直接的に解釈可能である。

【 0 2 0 9 】

変数（相互作用項を除外）の全 1 5 通りの組合せに関する統計的尺度を、下の表 3 に示す。上述の通り、C a p - S c o r e 単独を使用したモデルは、より低い逸脱を伴うより複雑なモデルを含む、あらゆる他のモデルよりも低い A I C を伴った。

表3. 単一UIクリニックに由来する男性の生殖能力のロジスティック回帰モデルのためのフィットの統計的尺度

【表 3 - 1】

モデル	単一クリニック	
	逸脱	AIC
Cap-Score	61.71	65.71
運動性	63.50	67.50
濃度	64.45	68.45
体積	65.17	69.17
Cap-Score+運動性	60.59	66.59
Cap-Score+濃度	60.45	66.45
Cap-Score+体積	60.06	66.06
運動性+濃度	63.24	69.24
運動性+体積	62.76	68.76
濃度+体積	64.29	70.29
Cap-Score+運動性+濃度	60.07	68.07

【表 3 - 2】

Cap-Score+運動性+体積	58.82	66.82
Cap-Score+濃度+体積	59.46	67.46
濃度+運動性+体積	62.72	70.72
Cap-Score+濃度+運動性+体積	58.76	68.76

上述の L D A モデルが使用して、妊娠した（P）および妊娠しなかった（NP）の 2 つの経験的累積分布関数（E C D F）をコンピューター処理し、最大の差の点を見出すことにより設定された閾値により、高い、中程度の、および低い妊娠確率のセットへの男性の生殖能力の単純細分化をもたらした。L D A モデルを上回るロジスティック回帰モデルの重要な利点は、ロジスティックモデルが、トリアージカテゴリーをもたらすのではなく、

個体の受胎確率を推定することである。ロジスティックモデルを使用して、同様にトリアージカテゴリーを作成することができるが、これは、上述よりも情報的な価値がある。LDAにより、判別の個々の値の単刀直入な解釈は存在しない。

トリアージ閾値は、統計的手順の結果であり、異なる試料が存在していた場合、それらの閾値によって定義される区間は、集団の異なるパーセンテージを有するであろう。それらのパーセンテージの不確実性は、元の集団から置き換えによりサンプリングして、新しい集団の効果をシミュレートするブートストラップを使用することにより計算された。本発明者らは、閾値のパーセンテージが、約9%の標準偏差を有することを発見した。すなわち、本発明者らは、39%として与えられるパーセンテージが、21%~57%の間であるとだけ、自信を持って言うことができる。これは、LDA解析またはロジスティック回帰のいずれかから計算されるトリアージパーセンテージに当てはまる。

上に参照される個々の確率も、確率的シミュレーションによって評価することができる不確実性を有し、それらの可変性は同じ桁のものである。本データにより、いずれの解析から得られる数量 (figure) も、小数第1位を越えて正確さが保証されない。

機械学習に基づく他のモデルも考慮されたが、上に概要を述べるロジスティック回帰アプローチほど成功しなかった。例えば、上述の単一施設試験において測定される4つの変数 (例えば、Cap - Score (商標)、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、および精子試料中の精子の運動性) に基づきニューラルネットワークを構築する試みは、収束に失敗した。同様に、教師なし方法は、k - 平均をコールし、クラスタリングは、1つのクラスターにおけるデータの中心的大部分をコールし、端の周囲のごく小さいクラスターを打ち切った。

【0210】

2つの他の統計的方法、ランダムフォレストおよび最近傍分類が、実行に成功した。しかし、これらの方法は、ロジスティック回帰モデルと比較して、不十分に機能した。単一クリニックデータにおいて訓練されたランダムフォレストモデルは、妊娠していない症例の58.8%を正確に分類したが、妊娠した症例の22.7%のみを正確に分類した。最近傍分類は、妊娠していない症例の59%を正確に特定したが、妊娠した症例の35.3%のみを正確に分類した。2つの技法は、主に、データの全体を一度に「見る」ことができないローカルな技法であるため、劣った予測を生成する。2つの方法は、相当に異なっているが、非常に同様の結果を生じた：大部分の症例について、推量よりもごく僅かに優れているだけであった。より大きいデータセットは、ロジスティック回帰または線形判別解析の精度を少なくともより良く決定するであろう；これらの技法の場合、より多くの試料における訓練により、これらがより優れた成績を収めることを予想する理由はない。

【0211】

上述のモデルを使用して、訓練セットから除外された自然妊娠の17症例を予測することができるかについても考慮した。LDAモデルを使用して、17症例のうちの7症例のみが、当該解析によって定義される「高い」カテゴリーにスコア化された一方、4症例が、「中程度の」とスコア化され、6症例が、「低い」とスコア化された。ロジスティック回帰モデルにより、妊娠の予測中央値は、僅かに34%であり、3症例のみが、50%を上回る予測を有し、最も高い予測は56%であった。自然妊娠データが、IUI妊娠データ「に似てい」ないことが明らかである。

【0212】

(実施例7)

単一ロジスティック回帰モデルが、複数の生殖能力クリニックで得たデータをフィットさせることができるか決定するために、5つの異なるクリニックにわたり、子宮内人工授精 (IUI) を使用した124名の男性被験体に由来する精子試料 (すなわち、精液試料) からデータを収集した。各データ入力は、IUIを使用してカップルが妊娠したか否か、Cap - Score (商標)、精子試料の体積、精子試料中の精子の濃度、および精子試料中の精子の運動性を含んだ。

段階的変数選択により選択された4つの変数のすべての組合せ (15種のモデル) およ

10

20

30

40

50

び相互作用モデルについて、実施例 5 の通りにロジスティック回帰モデルを計算した。変数（相互作用項を除外）の全 15 通りの組合せに関する統計的尺度を、下の表 4 に示す。

表 4. 5つのIUIクリニックに由来する男性の生殖能力のロジスティック回帰モデルのためのフィットの統計的尺度

【表 4】

モデル	複数クリニック	
	逸脱	AIC
Cap-Score	148.56	152.56
運動性	157.67	161.67
濃度	158.54	162.54
体積	159.41	163.41
Cap-Score+運動性	147.47	153.47
Cap-Score+濃度	147.75	153.75
Cap-Score+体積	148.55	154.55
運動性+濃度	157.47	163.47
運動性+体積	157.57	163.57
濃度+体積	158.19	164.19
Cap-Score+ 運動性+濃度	147.22	155.22
Cap-Score+運動性+体積	147.46	155.46
Cap-Score+ 濃度+体積	147.72	155.72
濃度+運動性+体積	157.25	165.25
Cap-Score+濃度+運動性+体積	147.21	157.21

10

20

30

40

50

【0213】

単一クリニックデータについて報告される通り、Cap-Score 単独を使用したロジスティック回帰モデル（図 7 に表す）は、あらゆる他のモデルよりも低い AIC を伴った。Cap-Score 単独は、妊娠転帰を予測した（ $p < 0.001$ 、PGP 範囲 6.97 ~ 80.7%）。複数拠点に由来するデータの取込みは、モデルの質の尺度の非常に僅かな降下をもたらし、おそらく、異なる施設の間で使用された方法における何らかの不均一性を示す。しかし、その結果得られるモデルは、それらのいずれかを説明するのに適切であり、5つのクリニックのいずれかに由来する単一クリニックデータのみに基づき計算されたモデルと比較して、低減した不確実性を有する。実施例 6 に記載されているブートストラップ演習（bootstrapping exercise）を複数クリニックデータのために反復して、その結果得られる確率予測の不確実性を決定した。不確実性が、約 9% の以前の標準偏差（単一クリニック試験における）から 4%（複数クリニック試験のため）まで降下したことが見出された。予測される通り、追加的なデータは、予測推定値の誤差を低減させる。

【0214】

（実施例 8）

精子の受精能力に関する情報を提供する機能検査を欠き、濃度、運動性、形態および体積等の精子および精液のより記述的な特徴のみに着目するため、精液解析は、男性側要因生殖能力の多くの症例の診断に失敗する。Cap-Score（商標）は、低いおよび正常な生殖能力「カットオフ」点を使用して、男性の生殖能力と強い相関を有することが以前に示されている。しかし、男性の生殖能力は連続的なものであり、本発明者らは、ロジスティック回帰を使用して、Cap-Score（商標）が、妊娠を生じる確率にどのように関係するかを示すことを意図した。そこで、予測された妊娠を生じる確率および実際の

I U I 転帰の間の関係性を検査した。

【0215】

6つのクリニックから、292名の男性被験体のCap - Score（商標）および転帰を得た。292名の被験体のうちの、128名が処置を完了した（すなわち、3サイクル以内に子宮内人工授精（I U I）により妊娠した、または妊娠を生じることなく3回の試みを完了した）。PGPモデルは、2つの仕方で検査した。検査1：新しい転帰を実施例7の先の124個の転帰に加え、モデルを再実行して、変化を決定した。検査2：128個の転帰をおよそ等しいサイズの順位序列付けされた群へと分け、本明細書に記載されている線形回帰アプローチを使用して、各群内の妊娠を生じること成功した個体の割合を、当該群内の平均予測PGPと比較した。

10

【0216】

検査1結果。128個の新しいデータ点が、実施例7に由来する以前の124個のデータ点に加えられ、新しいロジスティック回帰モデルが生成された場合に、ごく僅かな平均変化が観察された。変化の大部分は、データ点が最も少ない、曲線の末端から生じた。124個のデータ点についての回帰方程式は、 $p < 0.01$ のp値による、 $PGP = 1 / [1 + \exp[-[-2.86 + 0.08 * \text{Cap - Score（商標）}]]]$ であり、252個のデータ点（124 + 128）に由来する回帰方程式は、 $P < 0.001$ のp値による、 $PGP = 1 / [1 + \exp[-[-2.26 + 0.06 * \text{Cap - Score（商標）}]]]$ であった。図8Aおよび8Bは、それぞれ $n = 124$ 群および $n = 252$ 群についての、Cap - Score（商標）およびPGPの間の関係性を説明する。両方の群について、本明細書に開示されているロジスティック回帰モデルを使用して、Cap - Score（商標）およびPGPの間の強い関連が観察され、図8Bに示す通り、より多くのデータ点を用いて、モデルのフィットが改善した。

20

【0217】

検査2結果。128個の転帰を5つの群へと分け、各群についてPGPを計算した；転帰をまた、6つの群へと分け、各群についてPGPを計算した。予測されるPGPを、観察された妊娠と比較した場合に、異なる群について有意な線形関係性が見られた。 $n = 5$ 群について、 $y = 0.81x + 0.10$ ； $R^2 = 0.84$ ； $p = 0.03$ であり、 $n = 6$ 群について、 $y = 0.69x + 0.14$ ； $R^2 = 0.86$ ； $p < 0.01$ であった。傾きは、1と有意に異ならず、切片は、0と有意に異ならなかった（t検定における、 $p > 0.05$ ）。図8Cおよび8Dは、それぞれ $n = 5$ および $n = 6$ 群について、観察された妊娠の回帰を示す。両方の群について、関係性は、群内の平均PGPが、当該群について、観察された妊娠を生じる割合と効果的に等しかったことを示す。

30

これらの結果は、Cap - Score（商標）、精子機能 / 受精能力、および妊娠を生じる能力の間の強い関連の実証をさらに支持する。

【0218】

（実施例9）

精子受精能獲得の欠損は、自身の生殖能力に関する疑問のために生殖能力検査を受けている男性に高度に蔓延しており、これは、それらの検査が、男性が正常精子である（すなわち、世界保健機関（WHO）判断基準に従って、体積、濃度および運動性の精液解析が正常である）と決定した場合であっても当てはまる。本実施例では、精液解析測定基準、Cap - Score（商標）および3サイクル以内に妊娠を生じる確率（PGP）を解析した。これは、相関試験であった - 1610名の男性のCap - Score（商標）、PGPおよび精液解析測定基準を、76名の男性の既知の生殖能力がある集団（妊娠したパートナーがいるまたは最近父親になったとして特定）の結果と比較した。

40

【0219】

潜在的生殖能力問題に懸念がある男性患者から精液を収集した。試料は、9つの異なるクリニックから、約2.5年間の期間にわたって収集した。試料における精液体積、濃度および精子運動性を評価した。試料の一部分を固定し、そのプロトコールに従ってAndrovia Life Sciencesに送り、Cap - Score（商標）およびPGP

50

Pについて解析した。

【0220】

自身の生殖能力に疑問を抱く男性におけるCap-Score（商標）およびその関連するPGPの分布を評価するために、PGPを、19%、20～29%、30～39%、40～49%、50～59%および60%のビンへと分割し、76名の生殖能力が既知の男性の集団の結果に対し、1610名の男性についてCap-Score（商標）およびPGPの分布を比較した。生殖能力が既知の男性において分布に基づき予想されるよりも大幅に多い、自身の生殖能力に疑問を抱く男性が、19%、20～29%および30～39%のPGPビンに見出された（ $p < 0.001$ ）。自身の生殖能力に疑問を抱き精液解析を行った男性の59パーセント（59%；948/1610）が、体積、濃度および運動性に関して正常精子であると見出された。そのうちの、65%（616/948）が、より低い生殖能力状態を示す31未満のまたはこれに等しいCap-Score（商標）、およびより低いPGP（39%未満）を有した。生殖能力がある男性の分布から予想されるよりも少ない、自身の生殖能力に疑問を抱く男性が、32またはそれを超えるCap-Score（商標）を有した。これらの結果は、正常精子精液測定基準を有する男性の高い蔓延が、生殖能力検査を求める男性集団における受精能獲得および/または受精能力を低減させたことを明らかにした。さらに、精子機能の欠損は、任意の単一または複数の精子解析測定基準の合格に関係なく等しく蔓延していた；患者の異なる群の間でPGPに差はなかった：全患者、単一の正常精液解析測定基準（WHOに従う）を有する患者、2つ以上の正常精液解析測定基準（WHOに従う）を有する患者、または総計1千万個を超える運動性細胞を有する患者（ $p = 0.990$ ）。生殖能力がある群と比較して、自身の生殖能力に疑問を抱く正常精子男性の65%（616/948）が、31またはそれ未満のCap-Score（商標）を有し、39%またはそれ未満の妊娠確率を有した一方、既知の生殖能力がある群の25%のみ（19/76）が、この範囲内のCap-Score（商標）を有した。逆に、生殖能力検査を求める正常精子の男性の35%のみ（322/948）が、32またはそれを超えるCap-Score（商標）を有し、40%またはそれよりも多い妊娠確率を有した一方、既知の生殖能力がある群の75%が、この範囲内のCap-Score（商標）を有した。これらのデータは、伝統的な精液解析が、潜在的な男性の生殖能力問題の特定において十分ではなく、よって、特発性不妊と診断されている男性の高いパーセンテージに寄与するという結論を支持する。これらのデータは、精子受精能獲得の検査（すなわち、Cap-Score解析）が、特発性不妊と診断された男性のパーセンテージを低減させ得、精子受精能獲得を改善し、よって、PGPを改善するであろう潜在的介入を特定し得ることを支持する。

表5: 実施例9研究の結果

【表5】

Cap-Score (%)	PGP (%)	生殖能力検査を受けているすべての男性の%	%生殖能力検査を受けている正常精子の男性	%生殖能力検査を受けている男性 >10M TMC	%生殖能力がある男性
≤ 18	≤ 19	8 (133/1,610)	6 (58/948)	7 (110/1,489)	1 (1/76)
19 - 25	20 - 29	28 (456/1,610)	27 (255/948)	28 (412/1,489)	9 (7/76)
26 - 31	30 - 39	32 (513/1,610)	32 (303/948)	32 (482/1,489)	14 (11/76)
32 - 36	40 - 49	17 (271/1,610)	19 (181/948)	18 (262/1,489)	36 (27/76)
37 - 42	50 - 59	9 (144/1,610)	10 (93/948)	9 (135/1,489)	24 (18/76)
> 42	≥ 60	6 (93/1,610)	6 (58/948)	6 (88/1,489)	16 (12/76)

【 0 2 2 1 】

1つまたは複数の特定の実施形態に関して本開示を記載してきたが、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、本開示の他の実施形態を為すことができ、斯かる他の実施形態が、本開示の範囲内にあると意図されることが理解されるであろう。

【 図 1 】

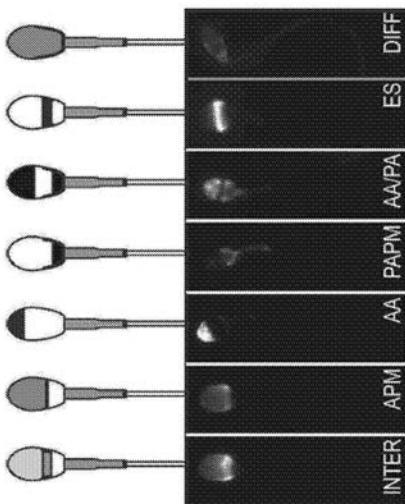


FIG. 1

【 図 2 】

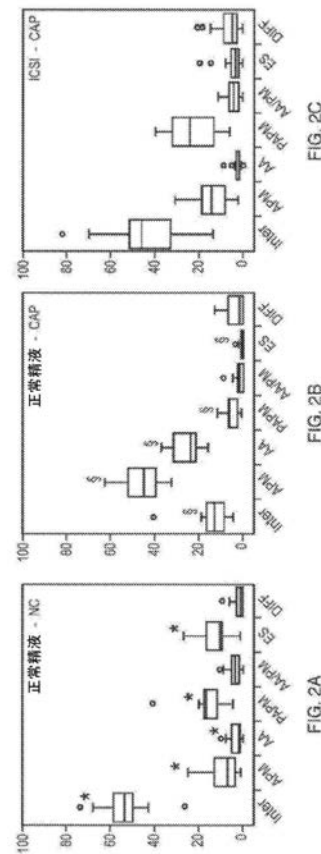


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

【 図 3 】

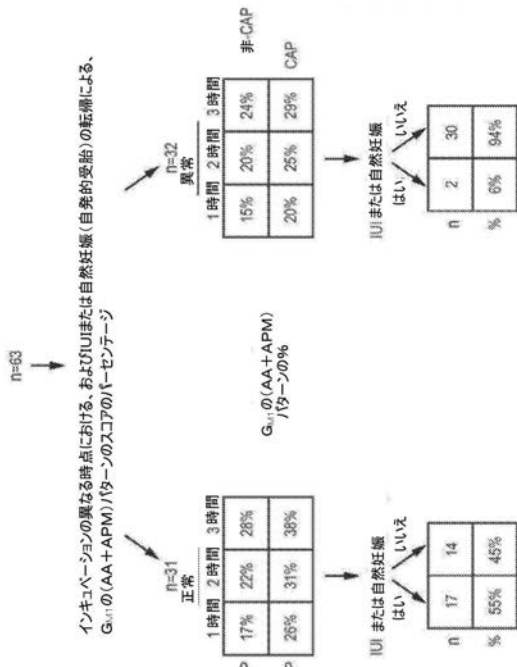


FIG. 3

【 図 4 】

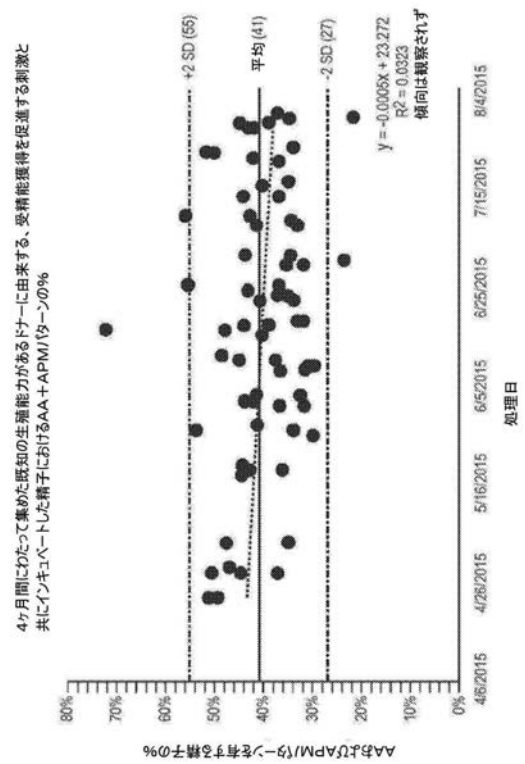


FIG. 4

【 図 5 】

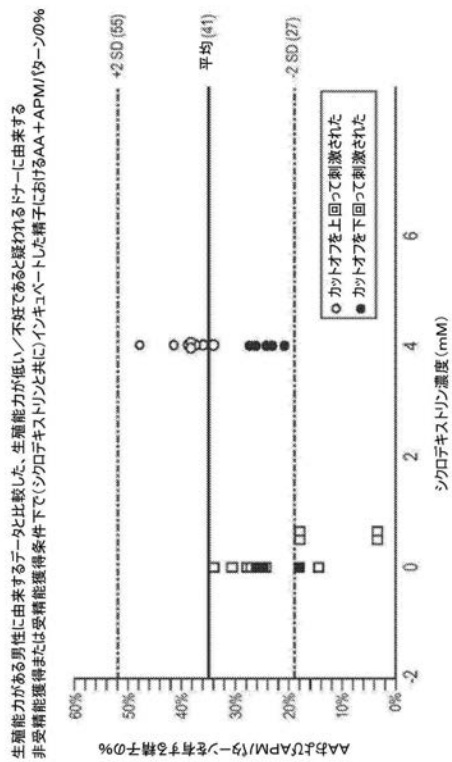
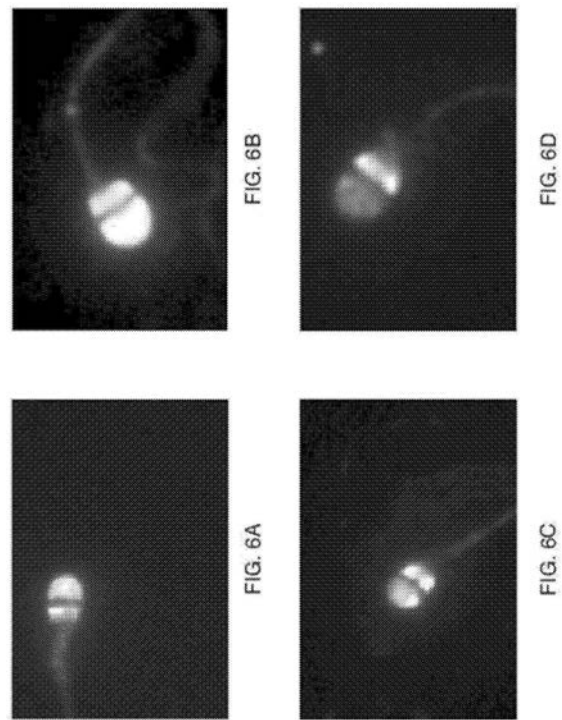


FIG. 5

【 図 6 】



【 図 7 】

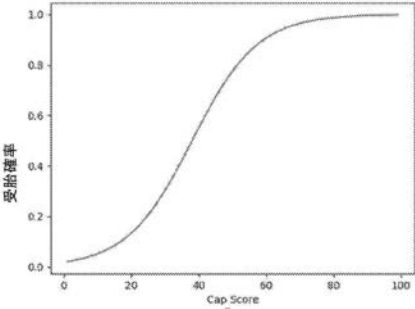


FIG. 7

【 図 8 - 2 】

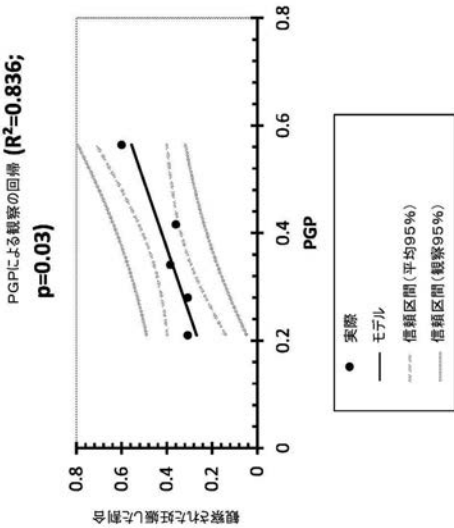
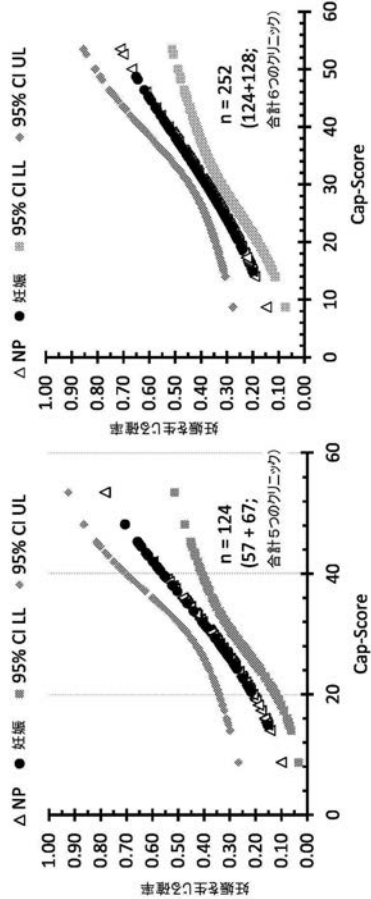


FIG. 8C

【 図 8 - 1 】



【 図 8 - 3 】

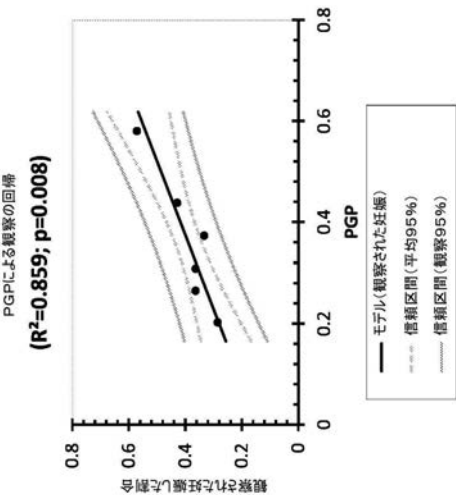


FIG. 8D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 19/30372
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/50 (2019.01) CPC - G01N 1/30, G01N 21/6428, G01N 33/5091, G01N 2800/367		
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)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 20170234857 A1 (Androvia Life Sciences LLC) 17 August 2017 (17.08.2017) entire document (especially abstract, para [0075]-[0076], [0089], [0093], [0133]-[0135]).	1-6, 14-19, 27-32, 34-39, 47-52, and 61
Y	US 2004/0122708 A1 (Avinash et al.) 24 June 2004 (24.06.2004) (para [0183]-[0184], [0367], [0374], [0418])	1-6, 14-19, 27-32, 34-39, 47-52, and 61
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 but 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 09 July 2019		Date of mailing of the international search report 29 JUL 2019
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. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/30372

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-13, 20-26, 33, 40-46, 53-60
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 トラヴィス , アレクサンダー ジェイ .

アメリカ合衆国 ニューヨーク 14850 , イサカ , ケイユーガ ハイツ ロード 1044

(72)発明者 クック , ジョン ディー .

アメリカ合衆国 テキサス 77070 , ヒューストン , オークロフト ドライブ 11911