

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020 년 10 월 22 일 (22.10.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2020/213789 A1

(51) 국제특허분류:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/075 (2010.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/008861

(22) 국제출원일:

2019 년 7 월 18 일 (18.07.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0045801 2019 년 4 월 19 일 (19.04.2019) KR

(71) 출원인:

주식회사

엠케이바이오텍

(MKBIOTECH.CO.LTD) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, 207호, Daejeon (KR). 충남대학교산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김민규 (KIM, MinKyu); 34127 대전시 유성구 죽동로 321, 102동 2401호, Daejeon (KR). 남윤석 (NAM, Yoon Seok); 33019 충청남도 논산시 가야곡면 가야로201번길 81-12, Chungcheongnam-do (KR). 박강선 (PARK, Kang Sun); 30098 세종시 보듬2로 43, Sejong-si (KR). 지국빈 (JI, Gook Bin); 21948 인천시 연수구 한진로 68-1, 5동 101호, Incheon (KR). 이지혜 (LEE, Ji Hye); 34073 대전시 유성구 지족로 240, 504동 703호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 원대규 (WON, Dae Gyu); 08505 서울시 금천구 디지털로 121, 509호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): 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, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: METHOD FOR VITRIFIED FREEZING AND THAWING OF CANINE OVA, AND OVA FROZEN AND THAWED ACCORDING TO SAME

(54) 발명의 명칭: 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법 및 그에 따른 동결해동난자

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the vitrified freezing and thawing of canine ova for somatic cell replication, and more particularly, to: a method for the vitrified freezing and thawing of canine ova; and ova frozen and thawed according to same. Conventional techniques for producing vitrified canine ova are difficult to synchronize due to differences in estrus cycles. Conversely, a method for the vitrified freezing and thawing of canine ova, and ova frozen and thawed according to same, according to the present invention enable collected ova to be synchronized with experiment schedules through a vitrified freezing technique, even when estruses occur on different dates, and thus exhibit a high nuclear transfer and fertilization effect.

(57) 요약서: 본 발명은 체세포복제를 위한 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법 및 그에 따른 동결해동난자에 관한 것이다. 종래의 기술이 개 유리화 동결난자 생산기술은 발정주기가 달라 동기화시키기 어려운 상황인 반면, 본 발명에 따른 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법 및 그에 따른 동결해동난자는 다른 날짜가 발정이 오더라도, 채취한 난자를 유리화 동결기술을 통해 실험 일정을 동기화하는 것이 가능하여 높은 핵이식 및 수정의 효과가 나타나게 된다.



WO 2020/213789 A1

명세서

발명의 명칭: 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법 및 그에 따른 동결해동난자

기술분야

- [1] 본 발명은 체세포복제를 위한 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법 및 그에 따른 동결해동난자에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 체세포복제란 난자의 핵을 제거한 뒤 복제하고자 하는 체세포의 핵을 이식하여 체세포와 동일한 유전정보를 가진 복제생물을 만드는 것을 말한다. 체세포복제는 난자와 정자가 결합하는 수정 과정 없이도 체세포 핵 이식을 통해 생명체를 탄생시킬 수 있는 획기적인 기술이다. 현재, 체세포복제기술은 유용동물 생산, 고가의 약제 생산용 형질전환동물생산, 멸종위기 동물 종 복제, 반려동물 복제 및 재생의학 등에 현실적으로 다양하게 이용되고 있다.
- [3] 체세포복제는 공여란으로부터 핵을 제거하는 탈핵 (enucleation) 과정, 체세포를 탈핵된 공여란에 이식하는 핵이식 (nuclear transfer) 과정, 체세포와 공여란의 세포융합 (cell fusion) 과정, 세포 융합된 공여란의 세포질 활성을 유도하는 난활성 (ovum activation) 과정 및 모든 과정이 처리된 체세포복제수정란의 배양 (culture) 과정 등 체외에서 장시간 미세조작기를 이용한 정교한 기계적 기술과 화학적 처리가 요구된다. 여기에는 기본 재료로 공여난자와 복제하고자 하는 유전정보를 가진 체세포가 필요하다. 체세포복제동물 생산은 1997년 영국의 Wilmot 등이 면양에서 최초로 보고한 이래 생쥐 (Wakayama 등, 1998), 염소 (Baguisi 등, 1999), 돼지 (Polejaeva 등, 2000), 토끼 (Chesne 등, 2002), 고양이 (Shin 등, 2002) 등 다양한 종에서 연구 결과가 보고되었으며, 복제소 생산의 경우 1998년 Kato 등과 Cibelli 등에 의해 연구 결과가 보고된 바 있고, 우리나라에서도 Im 등 (2001)과 Kim 등 (2010) 이 한우 복제소 생산에 대하여 보고한 바 있다. 그러나 체세포복제동물 생산 효율은 5% 미만으로 매우 적은 것으로 알려져 있다 (Heyman 등, 2002; Yang 등 2008).
- [4] 체세포복제를 위해 체세포는 미리 동결보존만 해두면 필요 시에 융해하여 언제든지 사용할 수 있으며 증식과정을 통해 다수의 세포를 획득할 수 있어 일부 손실이 되더라도 복제에 활용하는 데에 문제가 없다. 체세포동결 방법은 이미 보편화되어 있고 생존율이 높아 체세포복제에 사용될 세포 수 확보에 어려움이 없기 때문이다.
- [5] 반면에, 공여란 난자는 도축 시 획득하는 난소에서만 회수할 수 있으므로 구제역과 같은 갑작스런 자연 재해가 발생하는 경우 또는 도축이 어려워 난소를 공급받지 못하는 경우에는 신선한 난자를 얻을 수 없으므로 체세포복제에

이용할 수 없게 된다. 따라서 난자의 지속적인 공급을 위하여 미수정 난자를 동결 보존 해둘 필요가 있다. 또한 환경오염 또는 자연파괴로 인한 멸종위기의 동물들 또는 번식력이 저하되고 있는 동물들을 보호하고 되살리고자 하는 노력이 전세계적으로 이루어지고 있는바, 양질의 난자를 미리 선별해 보관해둔다면 체세포복제 연구 뿐 만 아니라 난자가 필요한 다른 연구들에도 언제든지 유용하게 이용될 수 있다는 장점이 있다.

- [6] 이러한 동결보존의 핵심 기술은 세포 내에 약 90%를 차지하는 물의 처리이다. 물은 동결과정에서 날카로운 얼음 결정을 형성하게 되고, 이로 인해 세포막이 상처를 받아 해동 후 세포들이 죽게 된다. 일반 체세포나 정자와 비교해서 포유류의 난자는 그 크기가 약 120~150 μm 정도로 약 5만 배 이상이고, 다른 세포들에 비해 세포 내에 많은 물을 가지고 있을 뿐 아니라, 특히 성숙한 난자의 경우 염색체와 이를 분리하는 염색체 분열기구가 세포질내에 직접 노출되어 있어 동결보존이 어렵다. 따라서 동결과정을 거치더라도 난자를 안전하게 보호할 수 있는 기술이 요구되며 추가적으로 동결 및 융해 후에도 난자의 생존률을 높일 수 있는 기술 또한 요구된다.

- [7] 특히 개과 동물인 개는 포유류와 다르게, 미성숙 난자를 배란하여 난관에서 2~3일 뒤에 성숙한 뒤 수정이 되는 특이한 번식 생리시스템을 가지고 있으며, 체내 난자의 채취 시기가 실험을 성과를 좌우한다. 이에 따라, 같은 시기 발정이 오는 실험견을 확보하지 못할 경우에는 유리화 동결을 통해 충분한 수량의 난자를 확보하는 기술이 필요하지만 현재는 이러한 실험 결과 및 기술이 매우 미비한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 개과 동물인 개는 포유류와 다르게, 미성숙 난자를 배란하여 난관에서 2~3일 뒤에 성숙한 뒤 수정이 되는 특이한 번식 생리시스템을 가지고 있으며, 체내 난자의 채취 시기가 실험을 성과를 좌우한다. 이에 따라, 같은 시기 발정이 오는 실험견을 확보하지 못할 경우에는 유리화 동결을 통해 충분한 수량의 난자를 확보하는 기술이 필요하지만 현재는 이러한 실험 결과 및 기술이 매우 미비한 상황이다.
- [9] 더불어 현재까지 개의 미성숙 난자 동결이 시도되었으나, 아직까지 체외성숙시스템이 미비하여 성숙난자의 유리화 동결기술로서의 활용가치가 현저히 떨어진 상황이어서 개의 체세포복제의 활용성이 미흡한 실정이다.
- [10] 따라서 본 발명은 개의 성숙한 난자를 채취하여 유리화 동결을 할 수 있는 개과 동물의 유리화 동결난자 생산 방법을 제공하고 또한 이와 같은 생산 방법에 따른 동결난자를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 상기한 목적 및 요구를 해결하기 위하여,

- [12] 개과 동물의 성숙난자를 채취하는 과정(1과정),
- [13] 상기에서 채취한 난자를 유리화동결과정을 수행하되,(2과정)
- [14] 혼합액, 평형용액, 유리화 용액을 준비하는 과정(2과정-1),
- [15] 상기의 혼합액은 10~30% SSS(Serum Substitute Supplement) 100중량부에 mHTF(Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin) 300~1000중량부를 혼합한 것이고,
- [16] 상기한 평형용액은 6.5~8.5%(v/v) 에틸렌글리콜 (Ethylene glycol), 6.5~8.5%(v/v) 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 10~30% 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement) 그리고 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)를 포함하는 HEPES 완충용액으로 구성되고,
- [17] 상기한 유리화용액(Vitrification Solution)은 5~25%(v/v) 에틸렌글리콜 (Ethylene glycol), 5~25%(v/v) 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 10~30% 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 0.3~0.6M 수크로즈(Sucrose), 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염 gentamicin sulfate을 포함하는 HEPES 완충용액으로 구성되고,
- [18] 상기에서 회수한 난자들의 난구세포 제거과정을 거치는(denuding) 과정(2과정-2),
- [19] 상기의 난구세포를 제거한 성숙된 난자를 실온으로 평형시킨 혼합액에 처리하는 과정(2과정-3),
- [20] 상기의 난자가 포함되어 있는 혼합액에 평형용액을 추가하고 처리한 후 다시 평형용액을 더 추가하여 처리하는 과정(2과정-4),
- [21] 상기의 처리를 거친 난자를 다시 평형용액으로 처리하는 과정(2과정-5),
- [22] 처리한 난자를 유리화용액으로 옮겨 처리하는 과정(2과정-6),
- [23] 난자를 난자 동결 도구에 올리고 유리화용액을 제거 후 바로 액체질소에 침지해서 보관하는 과정(2과정-7),
- [24] 을 포함하는 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법을 제공한다.
- [25] 또한 본 발명은 유리화 동결난자에 대하여 용해하는 과정(3과정)을 수행하되,
- [26] 해동용액, 희석용액, 세척용액, 회복배양액을 준비하는 과정을 수행하되(3과정-1),
- [27] 해동용액(Thawing Solution)은 0.5~1.5M 수크로즈(Sucrose), 10~30% 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement) 그리고 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)를 포함하는 HEPES 완충용액으로 구성되고,
- [28] 희석용액 (Dilution Solution)은 0.3~0.7M 수크로즈(Sucrose), 10~30% Dextran Serum Supplement 그리고 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)를 포함하는 HEPES 완충용액으로 구성되고,
- [29] 회복배양액(Recovery medium)은 HEPES 완충용액, 피루브산나트륨(Sodium pyruvate), 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate), FBS(Fetal Bovine Serum)를 혼합한 것으로 구성되고,

- [30] 용해용액(Thawing Solution)을 인큐베이터에서 35~40°C로 가온시키는 과정(3과정-2),
- [31] 회복배양액(Recovery medium)을 인큐베이터에서 35~40°C로 기온시키는 과정(3과정-3),
- [32] 액체질소에 보관된 난자 동결 도구(CryoTop)를 꺼내어 가온한 용해 용액에 넣고 난자 동결 도구(CryoTop)에 부착되어있는 난자를 분리하여 처리하는 과정(3과정-4),
- [33] 상기의 분리된 난자를 상온에 평형시킨 희석용액에 옮겨 처리하는 과정(3과정-5),
- [34] 상기의 처리된 난자를 상온에 평형시킨 세척용액 2개에 옮겨 순차적으로 처리하는 과정(3과정-6),
- [35] 상기한 과정 후 회복배양을 위해 상기의 가온된 회복배양액에서 배양하는 과정(3과정-7),
- [36] 을 포함하는 것을 특징으로 하는 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법을 제공한다.
- [37] 또한 본 발명은 상기한 바와 같은 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법으로 형성된 동결해동난자를 제공한다.

발명의 효과

- [38] 본 발명에 따른 개과 동물의 난자를 유리화 동결하는 방법은 혼합액, 평형용액, 유리화 용액의 기술적 특성 및 유리화 동결방법으로 인하여 동결과정 중 난자 내의 얼음결정형성이 방지되고 세포 내의 물이 상당부분 제거되며 또한 액체질소에 바로 넣어 동결시키는 초급속 냉동법인 것으로써 얼음결정이 방지되어 세포벽과 막이 보호되며 독성이 현저히 줄어들어 생존율이 현저히 높아지는 효과가 나타난다.
- [39] 또한 본 발명에 따른 개과 동물의 난자를 해동하는 방법은 해동용액, 희석용액, 세척용액, 회복배양액의 기술적 특징 및 해동방법의 특징으로 인하여 동결해동난자의 생존성이 현저히 높아지는 효과가 있고, 그에 따라 본 발명에 따른 동결해동난자는 높은 핵이식 배양 효과가 나타나게 된다.
- [40] 또한 종래의 기술이 개 유리화 동결난자 생산기술은 발정주기가 달라 동기화 시키기 어려운 상황인 반면, 본 발명에 따른 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법 및 그에 따른 동결해동난자는 다른 날짜가 발정이 오더라도, 채취한 난자를 유리화 동결기술을 통해 실험 일정을 동기화하는 것이 가능하여 높은 핵이식 및 수정의 효과가 나타나게 된다.

도면의 간단한 설명

- [41] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 난자 동결 도구인 CryoTop(Kitazato, Japan)에 관한 것이다.
- [42] 도 2는 개의 성숙 난자를 유리화 동결하고 해동하는 과정에서의 성숙 난자의

상태에 관한 사진이다.

[43] 도 3은 개의 성숙 난자를 유리화 동결하고 해동하는 과정에서의 성숙 난자의 상태에 관한 사진이다.

[44] 도 4는 개의 성숙 난자를 유리화 동결하고 해동하는 과정에서의 성숙 난자의 상태에 관한 사진이다.

[45] 도 5는 개의 성숙 난자를 유리화 동결하고 해동하는 과정에서의 성숙 난자의 상태에 관한 사진이다.

[46] 도 6은 개의 성숙 난자를 유리화 동결하고 해동하는 과정에서의 성숙 난자의 상태에 관한 사진이다.

[47] 도 7은 개의 성숙 난자를 유리화 동결하고 해동하는 과정에서의 성숙 난자의 상태에 관한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] 본 발명은 개과 동물의 성숙난자를 채취하는 과정(1과정), 상기에서 채취한 난자를 유리화동결과정을 수행하되,(2과정) 혼합액, 평형용액, 유리화 용액을 준비하는 과정(2과정-1), 상기에서 회수한 난자의 난구세포를 제거하는 과정(denuding)(2과정-2), 상기의 난구세포를 제거한 성숙된 난자를 실온으로 평형시킨 혼합액에 처리하는 과정(2과정-3), 상기의 난자가 포함되어 있는 혼합액에 평형용액을 추가하고 처리한 후 다시 평형용액을 더 추가하여 처리하는 과정(2과정-4), 상기의 처리를 거친 난자를 다시 평형용액으로 처리하는 과정(2과정-5), 처리한 난자를 유리화용액으로 옮겨 처리하는 과정(2과정-6) 및 난자를 난자 동결 도구에 올리고 유리화용액을 제거 후 바로 액체질소에 침지해서 보관하는 과정(2과정-7)을 포함하는 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[49] 이하 본 발명을 도면을 참고하여 상세히 설명하고자 한다.

[50] 본 발명은 개과 동물의 유리화 동결난자 생산 방법 및 이러한 유리화 동결난자 생산 방법에 따른 개과 동물의 동결난자를 제공한다.

[51] 본 발명은 먼저 개과 동물의 성숙난자를 채취하는 과정을 수행한다(1과정).

[52] 본 발명에서 개과 동물은 여우·너구리·늑대·들개·축견(畜犬) 등을 의미하며 대표적으로 개를 의미한다.

[53] 본 발명은 1~5년령의 잡종 발정견으로부터 수술적인 방법으로 성숙된 난자를 회수하는 방법을 수행한다.

[54] 특히, 본 발명은 발정이 관찰된 날로부터 매일 채혈하여 Vetchroma(Anivet, Korea)을 이용하여 혈청 내 프로게스테론(P4)을 측정하였다. 프로게스테론 농도가 10ng/ml 이상되는 날을 배란일로 잡고 그 후 72시간 후에 외과적 수술을 통하여 체내에서 성숙된 수핵 난자를 회수(채취)한다.

[55] 수핵 난자를 채취하는 과정은 발정견을 5~7mg/ml 바람직하게는 6mg/ml

- 케타민(ketamine)으로 마취한 후, 1.5~2.5% 바람직하게는 2% 아이소플루란(isoflurane)으로 마취를 유지하며 수술을 진행한다.
- [56] 개복하여 자궁을 꺼내고 고정시킨후, 난소를 쌓고 있는 버사의 슬릿을 통해 난관개시부에 플러싱 니들(flushing needle)을 장착한다. 난관접합부에 인접한 난관에 혈관내튜브카테터(IV catheter)를 삽입하고 플러싱 배지를 사용해 성숙된 난자를 회수한다.
- [57] 본 발명은 상기에서 채취한 난자를 유리화동결과정을 수행한다(2과정).
- [58] 본 발명의 채취한 난자를 유리화동결과정은 아래의 세부 과정으로 수행되게 된다.
- [59] 본 발명의 기술적 특징은 아래의 유리화 동결과정에 사용되는 혼합액, 평형용액, 유리화 용액의 구성에 있다.
- [60] 본 발명은 상기한 혼합액, 평형용액, 유리화 용액에 기술적 특징이 있으며, 이와 같은 혼합액, 평형용액, 유리화 용액을 사용하여 유리화한 동결난자는 동결과정 중 난자 내의 얼음결정형성이 방지되고 세포 내의 물이 상당부분 제거되며 세포벽과 막이 보호되며 독성이 현저히 줄어들어 생존율이 현저히 높아지는 효과가 나타난다.
- [61] 본 발명은 유리화 동결과정을 수행하기 전에 혼합액, 평형용액, 유리화 용액을 준비하는 과정을 수행한다(2과정-1).
- [62] 본 발명의 혼합액은 SSS(Serum Substitute Supplement), mHTF(Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin)를 혼합하여 조성한 액을 의미한다.
- [63] 본 발명의 혼합액은 10~30% SSS(Serum Substitute Supplement) 100 중량부에 mHTF (Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin) 300~1000중량부를 혼합한 것이 좋다.
- [64] 바람직하게는 20% SSS(Serum Substitute Supplement)에 mHTF(Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin)를 혼합한 혼합액을 준비한다.
- [65] 본 발명의 평형용액(Equilibration Solution)은 에틸렌글리콜(Ethylene glycol), 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement) 및 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 조성한다.
- [66] 본 발명은 유리화 동결과정을 수행하기 전에 혼합액, 평형용액, 유리화 용액을 준비하는 과정을 수행한다(2과정-1).
- [67] 본 발명의 혼합액은 SSS(Serum Substitute Supplement), mHTF(Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin)를 혼합하여 조성한 액을 의미한다.
- [68] 본 발명의 혼합액은 10~30% SSS(Serum Substitute Supplement) 100중량부에 mHTF (Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin) 300~1000중량부를 혼합한 것이 좋다.
- [69] 바람직하게는 20% SSS(Serum Substitute Supplement)에 mHTF(Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin)를 혼합한 혼합액을 준비한다.

- [70] 본 발명의 평형용액(Equilibration Solution)은 에틸렌글리콜(Ethylene glycol), 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement) 및 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 조성한다.
- [71] 본 발명은 6.5~8.5%(v/v) 에틸렌글리콜 (Ethylene glycol), 6.5~8.5%(v/v) 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 10~30% 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된 평형용액(Equilibration Solution)을 준비하여 평형화시키는 과정을 수행한다.
- [72] 본 발명에서 상기한 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액은 TCM199(상품명)라는 명칭으로 통용되고 있는 것을 사용할 수 있다.
- [73] 본 발명은 더욱 바람직하게는 7.5%(v/v) 에틸렌글리콜 (Ethylene glycol), 7.5%(v/v) 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 20% 텍스트란 혈청보충제(Dextran Serum Supplement), 35 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액(TCM199, 상품명)으로 구성된 평형용액(Equilibration Solution)을 준비하여 평형시킨다.
- [74] 본 발명은 에틸렌글리콜 (Ethylene glycol), 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide), 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 수크로즈(Sucrose), 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된 유리화용액(Vitrification Solution)을 준비하여 상온에 평형시키는 과정을 수행한다.
- [75] 본 발명은 5~25%(v/v) 에틸렌글리콜 (Ethylene glycol), 5~25%(v/v) 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 10~30% 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 0.3~0.6M 수크로즈(Sucrose), 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된 유리화용액(Vitrification Solution)을 준비하여 상온에 0.5~2시간 평형시키는 과정을 수행한다.
- [76] 바람직하게는 15%(v/v) 에틸렌글리콜 (Ethylene glycol), 15%(v/v) 디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide), 20% 텍스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement) 0.5M 수크로즈(Sucrose), 35 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액 (TCM199)으로 구성된 유리화용액(Vitrification Solution)을 준비하여 상온에 0.5~2시간 평형시키는 과정을 수행한다.
- [77] 상기의 평형시킨다는 의미는 혼합시약이 상온에서 사용할 수 있도록 농도가 균일하게 되고 상온 상태와 유사하게 되도록 놓아두는 것을 의미한다.
- [78] 본 발명은 상기에서 회수한 난자를 hyaluronidase를 이용하여 난구세포 제거과정(denuding)을 거치는 과정을 수행한다(2과정-2).
- [79] 본 발명은 상기에서 회수한 난자를 0.01~0.2% hyaluronidase를 이용하여

- 난구세포 제거과정(denuding)을 거치는 과정을 수행한다.
- [80] 바람직하게는 0.1% hyaluronidase를 이용하여 난구세포 제거과정을 거치는(denuding) 과정을 수행하면서 난자의 성숙여부를 검사하여 성숙된 난자를 사용할 수 있도록 한다.
- [81] 본 발명은 상기의 난구세포를 제거한 성숙된 난자를 실온으로 평형시킨 혼합액 10~30 μ l drop에 0.5~2분간 처리하는 과정을 수행한다(2과정-3).
- [82] 본 발명에서 사용되는 drop(드랍)은 물방울 형태의 액적을 의미한다.
- [83] 바람직하게는 상기의 난구세포를 제거한 성숙된 난자를 실온으로 평형시킨 혼합액(20%SSS가 포함된 mHTF 용액) 20 μ l drop에 1분간 처리하는 과정을 수행한다.
- [84] 본 발명은 상기의 난자가 포함되어 있는 혼합액에 평형용액 10~30 μ l drop을 추가하고 1~3분 처리후 다시 평형용액 10~30 μ l drop을 추가하고 1~3분 더 처리하는 과정을 실시한다(2과정-4).
- [85] 바람직하게는 난자가 포함되어 있는 혼합액에 평형용액 20 μ l drop을 추가하고 2분 처리(총40 μ l)후 평형용액 20 μ l drop을 추가하고 2분 처리(총60 μ l)하는 과정을 실시한다.
- [86] 본 발명은 상기의 처리를 거친 난자를 다시 평형용액으로 5~7분 처리하는 과정을 수행한다(2과정-5).
- [87] 바람직하게는 상기의 처리를 거친 난자를 평형용액 20 μ l drop으로 6분 처리한다.
- [88] 도 2는 난자의 유리화 동결 전의 사진이고, 도 3은 평형용액으로 처리한 난자의 사진을 보여준다.
- [89] 본 발명은 상기에서 처리한 난자를 유리화용액으로 옮겨 0.5~3분 처리하는 과정을 수행한다(2과정-6).
- [90] 바람직하게는 상기에서 처리한 난자를 유리화용액 50 μ l drop으로 옮겨 1분 처리한다.
- [91] 도 4는 유리화용액으로 처리한 난자의 사진을 보여준다.
- [92] 본 발명은 상기한 과정 후에 난자를 난자 동결 도구에 올리고 유리화용액을 최소한으로 제거 후 바로 액체질소에 침지해서 보관하는 과정을 수행한다(2과정-7).
- [93] 본 발명에서 난자를 난자 동결 도구에 올리고 유리화용액을 최소한으로 제거한다는 의미는 난자주변의 유리화용액을 적절히 제거한다는 것을 의미한다.
- [94] 상기한 난자 동결 도구는 끝 부분에 난자를 올려서 액체질소에 침지하여 동결하게 하는 도구를 의미하며 난자 동결 도구로 CryoTop(Kitazato, Japan)을 사용할 수 있다.
- [95] 도 1에서 보는 바와 같이 CryoTop(Kitazato, Japan)은 난자를 동결시키기 위해 사용하는 도구를 의미한다.

- [96] 본 발명은 상기한 바와 같은 방법으로 수행한 유리화 동결난자에 대하여 용해하는 과정을 수행한다(3과정).
- [97] 본 발명에서 용해하는 과정은 해동하는 과정을 의미한다.
- [98] 본 발명은 해동용액, 희석용액, 세척용액, 회복배양액을 준비하는 과정을 수행한다(3과정-1).
- [99] 본 발명은 상기한 해동용액, 희석용액, 세척용액, 회복배양액에 기술적 특징이 있으며, 이와 같은 해동용액, 희석용액, 세척용액, 회복배양액을 사용하여 해동한 유리화 동결난자(동결해동난자)의 생존성이 현저히 높아지는 효과가 있고, 그에 따라 본 발명에 따른 동결해동난자는 높은 핵이식 배양 효과가 나타나게 된다.
- [100] 본 발명의 해동용액(Thawing Solution)은 수크로즈(Sucrose), 덱스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 젠타마이신 황산염(gentamicinsulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성되어 있다.
- [101] 본 발명의 해동용액(Thawing Solution)은 0.5~1.5M 수크로즈(Sucrose), 10~30% 덱스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성되어 있다.
- [102] 바람직하게는 해동용액(Thawing Solution)은 1.0M 수크로즈(Sucrose), 20% 덱스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 35 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된 것이 효과적이다.
- [103] 본 발명의 희석용액 (Dilution Solution)은 수크로즈(Sucrose), 덱스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함되어 있는 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된다.
- [104] 본 발명의 희석용액 (Dilution Solution)은 0.3~0.7M 수크로즈(Sucrose), 10~30% Dextran Serum Supplement, 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함되어 있는 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된다.
- [105] 바람직하게는 희석용액 (Dilution Solution)은 0.5M 수크로즈(Sucrose), 20% Dextran Serum Supplement 그리고 35 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된 것이 효율적이다.
- [106] 본 발명의 세척용액(Washing Solution)은 덱스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된다.
- [107] 본 발명의 세척용액(Washing Solution)은 15~25% 덱스트란 혈청 보충제(Dextran Serum Supplement), 25~45 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicinsulfate)이 포함된 HEPES 완충용액을 포함하여 구성된다.
- [108] 바람직하게는 세척용액(Washing Solution)은 20% Dextran Serum Supplement, 35 μ g/ml 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate)이 포함된 HEPES 완충용액(상품명 TCM199)을 포함하여 구성된 것이 효과적이다.

- [109] 본 발명의 회복배양액(Recovery medium)은 HEPES 완충용액, 피루브산나트륨(Sodium pyruvate), 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate), FBS(Fetal Bovine Serum)이 혼합되어 조성된다.
- [110] 바람직하게는 회복배양액(Recovery medium)은 HEPES 완충용액 100중량부에 피루브산나트륨(Sodium pyruvate) 0.5~2중량부, 젠타마이신 황산염(gentamicin sulfate) 0.5~2중량부, FBS(Fetal Bovine Serum) 2~10중량부를 혼합하여 제조한다.
- [111] 본 발명은 용해용액(Thawing Solution)을 25~45mm디쉬에 넣어 인큐베이터에서 35~40°C로 가온시키는 과정을 수행한다(3과정-2).
- [112] 바람직하게는 용해용액(Thawing Solution)은 35mm디쉬에 넣어 인큐베이터에서 37~38°C로 2~5ml의 양으로 가온시키는 과정을 수행한다.
- [113] 본 발명은 회복배양액(Recovery medium)을 인큐베이터에서 가온시키는 과정을 수행한다(3과정-3).
- [114] 바람직하게는 회복배양액(Recovery medium)을 4well 디쉬에 분주하여 인큐베이터에서 37~38도씨로 20~40분 정도로 가온시킨다.
- [115] 본 발명은 액체질소에 보관된 상기한 난자 동결 도구(CryoTop)를 꺼내어 가온한 용해용액에 넣고 난자 동결 도구(CryoTop)에 부착되어있는 난자를 분리하고 1분간 처리하는 과정을 수행한다(3과정-4).
- [116] 바람직하게는 액체질소에 보관된 난자 동결 도구인 CryoTop을 꺼내어 가온한 용해용액에 넣고 CryoTop에 부착되어있는 난자를 분리하고 1분간 처리한다.
- [117] 본 발명은 상기의 분리된 난자를 상온에 평형시킨 희석용액 30~50 μ l drop에 옮겨 3~5분 처리하는 과정을 수행한다(3과정-5).
- [118] 바람직하게는 상기의 분리된 난자를 상온에 평형시킨 희석용액 40 μ l drop에 옮겨 4분 처리한다.
- [119] 본 발명은 상기의 처리된 난자를 상온에 평형시킨 세척용액 2개 30~50 μ l drop에 옮겨 순차적으로 3~5분씩 처리하는 과정을 수행한다(3과정-6).
- [120] 바람직하게는 처리된 난자를 상온에 평형시킨 세척용액 2개 40 μ l drop에 옮겨 순차적으로 4분씩 각각 처리한다.
- [121] 본 발명은 상기한 용해과정 후 회복배양을 위해 상기의 가온된 회복 배양액에서 1~3시간 배양하는 과정을 수행한다(3과정-7).
- [122] 바람직하게는 상기의 용해과정 후 회복배양을 위해 회복배양액에서 2시간 배양하는 것이 좋다.
- [123] 도 5는 용해용액으로 난자를 처리한 것을 보여주는 사진이다.
- [124] 도 6은 희석용액으로 처리한 것을 보여주는 사진이다.
- [125] 도 7은 세척용액으로 난자를 처리한 것을 보여주는 사진이다.
- [126] 본 발명은 상기한 과정으로 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법으로 처리된 동결해동난자에 대하여 생존성 검사(동결해동난자의 생존성 검사)를 시행하였으며, 아래의 [표 1]과 같은 결과를 얻었다.
- [127]

[표1]

유리화 동결 난자 수	융해 후 난자 생존율	회복배양 후 난자 생존율
59	56(95%)	53(90%)

[128] 총 유리화 동결 난자에서 융해 후 난자 생존율은 95% 정도로 매우 높음을 알 수가 있으며, 특히 회복 배양 후 난자 생존율도 90%가 넘어 생존율이 현저히 높은 효과를 보여주고 있다.

[129] 또한 회복배양이후, 실험이 사용에 가능한 90% 가량의 성숙난자(동결해동난자)와 신선난자를 대비하는 체세포 핵이식 실험을 통해 [표 2]에서 보는 바와 같이 효율성을 비교하였다.

[130] [표2]

대조군	배양	분할(%)	8세포(%)	16세포(%)	배반포(%)
신선난자	115	101(87.8)	77(67.0)	51(44.4)	9(7.8)
융해 후 난자	50	29(58.0)	23(46.0)	19(38.0)	3(6.0)

[131] [신선난자와 융해 후 난자(동결해동난자)의 핵이식 실험을 통한 효율성 비교]

[132] 상기한 바와 같이 본 발명에 따른 동결해동난자는 신선난자를 이용한 결과와 비교하였을 때 실험과정에서 중대한 결함은 발견되지 않았으며, 신선난자의 결과 와 비슷한 연구결과를 도출하였는바 본 발명에 따른 동결해동난자는 현저히 높은 핵이식 배양 효과가 있음을 알 수가 있다.

[133] 즉, 배반포 단계에서 신선난자와 본 발명에 따른 동결해동난자의 생존 (%) 비율이 비슷한 연구결과를 도출하였는바 본 발명에 따른 동결해동난자는 현저히 높은 핵이식 배양 효과가 있음을 알 수가 있는 것이다.

[134] 본 발명은 상기한 기능과 효과로 이루어진 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법 및 그에 따른 동결해동난자를 제공한다.

산업상 이용가능성

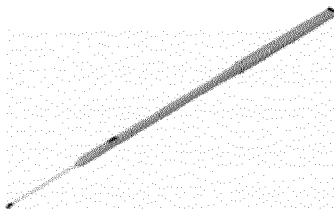
[135] 본 발명은 체세포복제를 위한 동물의 난자를 생산, 제조, 판매, 유통, 연구하는 산업에 매우 유용하다.

[136] 특히 본 발명은 체세포복제를 위한 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 기술과 장치에 대한 생산, 제조, 판매, 유통, 연구하는 산업에 매우 유용하다.

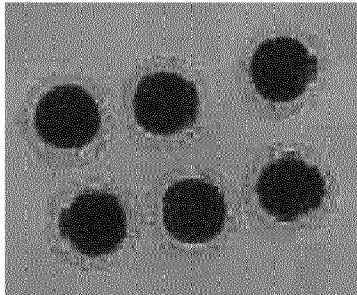
청구범위

- [청구항 1] 개과 동물의 성숙난자를 채취하는 과정(1과정),
 상기에서 채취한 난자를 유리화동결과정을 수행하되,(2과정)
 혼합액, 평형용액, 유리화 용액을 준비하는 과정(2과정-1),
 상기에서 회수한 난자의 난구세포를 제거하는 과정(denuding)(2과정-2),
 상기의 난구세포를 제거한 성숙된 난자를 실온으로 평형시킨 혼합액에
 처리하는 과정(2과정-3),
 상기의 난자가 포함되어 있는 혼합액에 평형용액을 추가하고 처리한 후
 다시 평형용액을 더 추가하여 처리하는 과정(2과정-4),
 상기의 처리를 거친 난자를 다시 평형용액으로 처리하는 과정(2과정-5),
 처리한 난자를 유리화용액으로 옮겨 처리하는 과정(2과정-6) 및
 난자를 난자 동결 도구에 올리고 유리화용액을 제거 후 바로 액체질소에
 침지해서 보관하는 과정(2과정-7)을 포함하는
 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 유리화 동결난자에 대하여 융해하는 과정(3과정)을 수행하되,
 해동용액, 회석용액, 세척용액, 회복배양액을 준비하는 과정(3과정-1),
 융해용액(Thawing Solution)을 인큐베이터에서 35~40°C로 가온시키는
 과정(3 과정-2),
 회복배양액(Recovery medium)을 인큐베이터에서 35~40°C로 기온시키는
 과정(3과정-3),
 액체질소에 보관된 난자 동결 도구(CryoTop)를 꺼내어 가온한
 융해용액에 넣고 난자 동결 도구에 부착되어있는 난자를 분리하여
 처리하는 과정(3과정-4),
 상기의 분리된 난자를 상온에 평형시킨 회석용액에 옮겨 처리하는
 과정(3과정-5),
 상기의 처리된 난자를 상온에 평형시킨 세척용액 2개에 옮겨 순차적으로
 처리하는 과정(3과정-6), 및
 상기한 과정 후 회복배양을 위해 상기의 전배양한 회복배양액에서
 배양하는 과정(3과정-7)을 포함하는 것을 특징으로 하는
 개과 동물의 난자를 유리화 동결하고 해동하는 방법.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 의한 방법으로 형성된 동결해동난자.

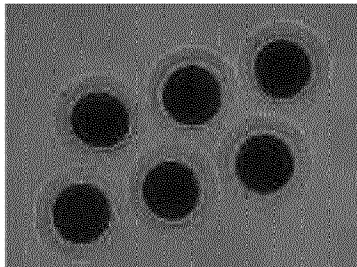
[도1]



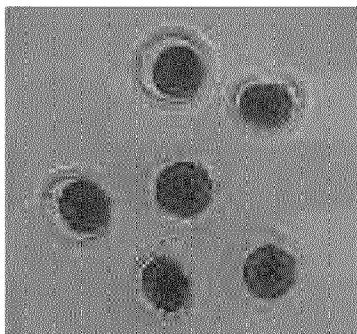
[도2]



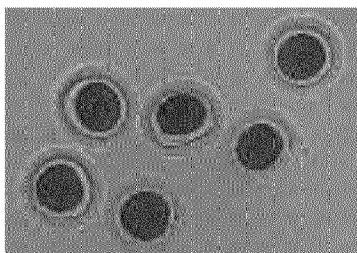
[도3]



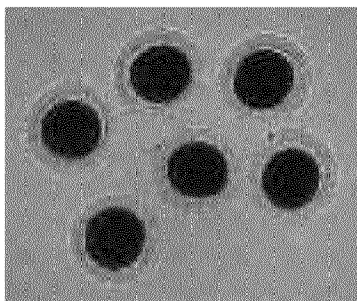
[도4]



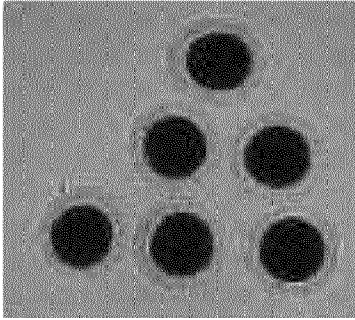
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 1/02(2006.01)i, C12N 5/075(2010.01)i

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)

A01N 1/02; A01K 67/02; C12N 1/04; C12N 5/06; C12N 5/071; C12N 5/075

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cryopreservation, thawing, ovum, vitrification

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	박상훈 등. 개 미숙난자의 Vitrification 동결 후 체외수정에 관한 연구. 한국수정란이식 학회지. 2002, vol. 17, no. 2, pages 117-121 (PARK, Sanghun et al. Studies on In Vitro Fertilization after Vitrification Freezing of Immatured Canine Oocytes. Journal of Embryo Transfer.) See abstract; page 118.	3
Y		1-2
Y	KR 10-2015-0029191 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 18 March 2015 See paragraphs [0058], [0113].	1-2
Y	JP 2007-126471 A (FOREST, K. T. et al.) 24 May 2007 See paragraph [0011]; figure 1.	2
Y	JP 2000-189155 A (LIVESTOCK IMPROVEMENT ASSOCIATION OF JAPAN INC.) 11 July 2000 See claims 1-9; paragraphs [0027]-[0032].	2
Y	JP 2009-005584 A (MIYAZAKI PREFECTURE) 15 January 2009 See claims 6-8; paragraphs [0039]-[0041]; figure 1.	2



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

17 JANUARY 2020 (17.01.2020)

Date of mailing of the international search report

17 JANUARY 2020 (17.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/008861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0029191 A	18/03/2015	KR 10-1510946 B1	10/04/2015
JP 2007-126471 A	24/05/2007	AT 254845 T	15/12/2003
		AU 1999-64247 A1	01/05/2000
		CA 2347242 A1	20/04/2000
		CA 2347242 C	25/03/2008
		CN 1255025 C	10/05/2006
		CN 1342043 A	27/03/2002
		CN 1934940 A	28/03/2007
		DE 69913186 T2	09/09/2004
		DK 1121015 T3	05/04/2004
		EP 1121015 A1	08/08/2001
		EP 1121015 B2	08/02/2012
		ES 2212641 T3	16/07/2004
		HK 1045437 A1	27/10/2006
		JP 2002-543041 A	17/12/2002
		JP 4294682 B2	15/07/2009
		JP 4318861 B2	26/08/2009
		TR 200101464 T2	21/05/2002
		TR 200202344 T2	23/12/2002
		US 2002-0115054 A1	22/08/2002
		US 2003-0113706 A1	19/06/2003
		US 2006-0234204 A1	19/10/2006
		US 6500608 B2	31/12/2002
		US 7087370 B2	08/08/2006
		WO 00-21365 A1	20/04/2000
JP 2000-189155 A	11/07/2000	None	
JP 2009-005584 A	15/01/2009	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 1/02(2006.01)i, C12N 5/075(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01N 1/02; A01K 67/02; C12N 1/04; C12N 5/06; C12N 5/071; C12N 5/075

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 동결보존(cryopreservation), 해동(thawing), 난자(ovum), 유리화(vitrification)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	박상훈 등, '개 미숙난자의 Vitrification 동결 후 체외수정에 관한 연구', 한국수정란이식학회지, 2002, 17권, 2호, 페이지 117-121 초록; 페이지 118	3
Y		1-2
Y	KR 10-2015-0029191 A (경상대학교산학협력단) 2015.03.18 단락 [0058], [0113]	1-2
Y	JP 2007-126471 A (FOREST, K. T. 등) 2007.05.24 단락 [0011]; 도면 1	2
Y	JP 2000-189155 A (LIVESTOCK IMPROVEMENT ASSOCIATION OF JAPAN INC.) 2000.07.11 청구항 1-9; 단락 [0027]-[0032]	2
Y	JP 2009-005584 A (MIYAZAKI PREFECTURE) 2009.01.15 청구항 6-8; 단락 [0039]-[0041]; 도면 1	2

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 01월 17일 (17.01.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 01월 17일 (17.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



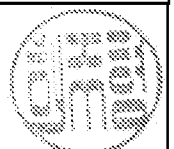
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0029191 A	2015/03/18	KR 10-1510946 B1	2015/04/10
JP 2007-126471 A	2007/05/24	AT 254845 T	2003/12/15
		AU 1999-64247 A1	2000/05/01
		CA 2347242 A1	2000/04/20
		CA 2347242 C	2008/03/25
		CN 1255025 C	2006/05/10
		CN 1342043 A	2002/03/27
		CN 1934940 A	2007/03/28
		DE 69913186 T2	2004/09/09
		DK 1121015 T3	2004/04/05
		EP 1121015 A1	2001/08/08
		EP 1121015 B2	2012/02/08
		ES 2212641 T3	2004/07/16
		HK 1045437 A1	2006/10/27
		JP 2002-543041 A	2002/12/17
		JP 4294682 B2	2009/07/15
		JP 4318861 B2	2009/08/26
		TR 200101464 T2	2002/05/21
		TR 200202344 T2	2002/12/23
		US 2002-0115054 A1	2002/08/22
		US 2003-0113706 A1	2003/06/19
		US 2006-0234204 A1	2006/10/19
		US 6500608 B2	2002/12/31
		US 7087370 B2	2006/08/08
		WO 00-21365 A1	2000/04/20
JP 2000-189155 A	2000/07/11	없음	
JP 2009-005584 A	2009/01/15	없음	