

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 10월 19일 (19.10.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/179933 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004038
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 14일 (14.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0045642 2016년 4월 14일 (14.04.2016) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 구승엽 (KU, Seung Yup); 06762 서울시 서초구 바우피로 9길 57, Seoul (KR). 김윤영 (KIM, Yoon Young); 05501 서울시 송파구 올림픽로 99 108 동 2404호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한일국제특허사무소, 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, 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).

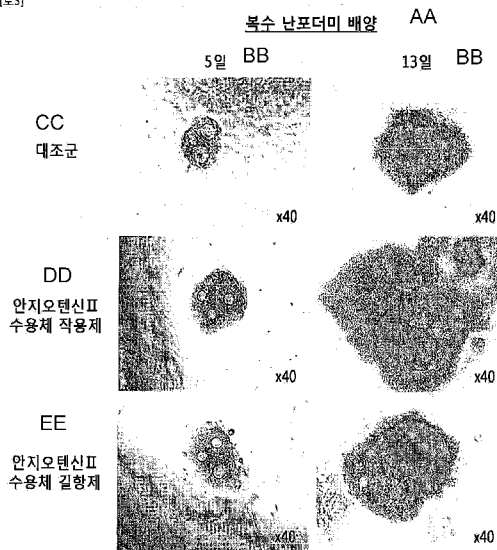
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR CULTURING MULTIPLE OVARIAN FOLLICLES BY USING ANGIOTENSIN II RECEPTOR AGONIST

(54) 발명의 명칭: 안지오텐신 II 수용체 작용제를 이용한 복수 난포 배양 방법

[도3]



AA ... Culturing of multiple ovarian follicles
BB ... Days
CC ... Control group
DD ... Angiotensin II receptor agonist
EE ... Angiotensin II receptor antagonist

(57) Abstract: The present invention relates to a method for culturing multiple ovarian follicles by using an angiotensin II receptor agonist and, specifically, to: a method for culturing ovarian follicles, comprising a first culturing step of culturing separated multiple ovarian follicles in a medium, and a second culturing step of culturing the multiple ovarian follicles, which are cultured in the culturing step, in a medium containing an angiotensin II receptor agonist; and a composition for culturing multiple ovarian follicles, containing an angiotensin II receptor agonist. Since multiple ovarian follicles can be cultured by using the method for culturing multiple ovarian follicles, of the present invention, a large quantity of egg cells can be produced, and thus egg cells obtained thereby can be used for external fertilization, infertility studies, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 안지오텐신 II 수용체 작용제를 이용한 복수 난포 배양 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 분리된 복수 난포 더미를 배지에서 배양하는 제 1 배양 단계 및 상기 배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미를 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에서 배양하는 제 2 배양 단계를 포함하는 난포 배양 방법, 및 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 복수 난포 더미 배양용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 복수 난포 더미 배양 방법을 이용하면, 복수의 난포 배양이 가능하여 난자를 대량으로 생산할 수 있으므로, 이로부터 수득된 난자는 체외수정 및 불임 연구 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

WO 2017/179933 A1

명세서

발명의 명칭: 안지오텐신 II 수용체 작용제를 이용한 복수 난포 배양 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 안지오텐신 II 수용체 작용제를 이용한 복수 난포 배양 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 분리된 복수 난포 더미를 배지에서 배양하는 제1배양 단계 및 상기 배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미를 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에서 배양하는 제2배양 단계를 포함하는 난포 배양 방법, 및 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 복수 난포 더미 배양용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현대사회에서 환경오염, 생활습관 변화 등 다양한 요인에 의해서 불임이 증가하는 추세에 있으며, 사회적으로도 중요한 문제가 되고 있다. 이러한 불임 문제를 해결하고자 다양한 불임시술과 보조생식술이 개발되고 있으며, 현재 가장 많이 활용되는 시술로는 인공수정(intrauterine insemination, IU, 자궁내 정자 주입), 시험관 아기와 배아 시술(In vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET, 체외수정) 등이 있다.
- [4] 불임을 치료하는 방법 중 시험관 아기와 배아 시술, 즉 체외수정의 경우에는 자연적인 배란 또는 과배란 주사를 통해 얻어진 난자와 정자를 체외에서 수정하여 자궁으로 이식시켜주는 방법으로 이루어진다. 다만, 과배란 주사의 부작용에 대한 문제가 있어 체외에서 난포를 배양하여 난자를 얻을 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.
- [5]
- [6] 난포의 체외배양은 여러 다른 단계의 난자발달을 조절하는 인자를 연구하기 위한 중요한 생체공학적 방법이며 가임력 보존을 위한 대안이기도 하다. 그러나 현재 대부분의 연구자에 의하여 사용되고 있는 난포의 체외배양 방법은 한 개의 난포를 채취하여 시험관 내에 심어주는 단일난포배양법으로서 노동집약적이고 효율이 낮다. 또한, 난소 조직은 적출 후 빠르게 조직이 변성되기 때문에, 현미경을 보면서 바늘을 이용하여 잘라낸 난포 더미로부터 한 개의 난포만을 채취하는 것은 고도의 기술이 필요하다.
- [7] 또한, 체내에서 난포가 배란을 위해 성장하는 기간에는 보통 한 개의 우성(dominant) 난포가 선택되어 배란되는데, 일반적으로 우성난포는 주변의 난포 성장을 억제하는 국소분비물질을 배출하게 된다(Reprod Fertil Dev., 23(3):444-67). 이러한 현상에 기반하여 현재까지는 단일 난포의 체외배양만이 가능하였으며, 복수 난포의 체외배양은 어려운 실정이다. 만약 이러한

우성난포의 주변난포 억제작용을 극복할 수 있다면 복수 난포의 체외배양도 가능하게 될 것이며, 이는 단일난포 배양에 비하여 다량의 난자를 얻을 수 있는 생체공학의 유망한 방법이 될 수 있다.

[8]

[9] 한편, 안지오텐신 II는 난포의 초기성숙과 퇴화, 배란 과정에서 역할을 하며(Med Princ Pract., 22(5):475-9), 난소에 존재하는 안지오텐신 수용체를 통하여 작용하는 국소분비인자로 알려져 있다. 그러나 안지오텐신 II가 복수 난포 더미를 이용한 체외배양 용도로 이용될 수 있는지에 대해서는 현재까지 연구된 바 없다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 난포의 체외배양시 다량의 난포를 얻을 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 안지오텐신 II 수용체 작용제가 다수의 난포가 접합된 상태로 이루어진 복수 난포 더미에 특이적으로 작용하여 모든 난포들을 동시에 성숙 및 성장시키고, 상기 난포로부터 획득된 성숙 난자를 이용하여 정자와 수정시킬 경우에도, 기존의 단일 난포 배양을 통해 수득한 성숙난포를 이용하여 수정시킬 경우와 유사한 수정율이 나타나고, 유사하게 수정란의 난할이 진행됨을 확인하였다. 이에, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에서 복수 난포 더미를 배양하여 다량의 난자를 얻을 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 하나의 목적은 분리된 복수 난포 더미를 배지에서 배양하는 제1배양 단계 및 상기 배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미를 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에서 배양하는 제2배양 단계를 포함하는 난포 배양 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 하나의 목적은 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 복수 난포 더미 배양용 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 안지오텐신 II 수용체 작용제를 복수 난포 더미 배양 용도를 제공하는 것이다.

[16]

발명의 효과

[17] 본 발명의 복수 난포 더미 배양 방법을 이용하면, 복수의 난포 배양이 가능하여 난자를 대량으로 생산할 수 있으므로, 이로부터 수득된 난자는 체외수정 및 불임 연구 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[18]

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 단일 난포 배양(single follicle culture)시 안지오텐신 II 수용체 작용제(Angiotensin II receptor agonist) 및 안지오텐신 II 수용체 길항제(Angiotensin II receptor antagonist) 처리에 따른 난포의 성장 및 성숙을 확인한 사진이다.
- [20] 도 2는 단일 난포 배양시 안지오텐신 II 수용체 작용제 및 안지오텐신 II 수용체 길항제 처리에 따른 난포의 배란율을 확인한 그래프이다.
- [21] 도 3은 복수 난포 더미 배양(multi-follicle cluster culture)시 안지오텐신 II 수용체 작용제 및 안지오텐신 II 수용체 길항제 처리에 따른 난포의 성장을 확인한 사진이다.
- [22] 도 4는 복수 난포 더미 배양시 안지오텐신 II 수용체 작용제 및 안지오텐신 II 수용체 길항제 처리에 따른 난포의 성숙률을 확인한 그래프이다.
- [23] 도 5는 단일 난포 배양 및 복수 난포 더미 배양시 안지오텐신 II 수용체 작용제 처리에 따른 난포의 성숙률을 비교한 그래프이다.
- [24] 도 6은 단일 난포 배양 및 복수 난포 더미 배양시 안지오텐신 II 수용체 작용제 처리에 따른 난포의 수정률을 비교한 그래프이다.
- [25] 도 7은 단일 난포 배양 및 복수 난포 더미 배양을 통해 수득한 성숙난포의 수정시 배아의 난할이 진행됨을 나타낸 사진이다.
- [26] 도 7의 (a)는 단일 난포 배양으로부터 얻어진 성숙 난자를 나타내는 사진이다.
- [27] 도 7의 (b)는 복수 난포 더미 배양으로부터 얻어진 성숙 난자를 나타내는 사진이다.
- [28] 도 7의 (c)는 단일 난포 배양으로부터 얻어진 수정된 배아를 나타내는 사진이다.
- [29] 도 7의 (d)는 복수 난포 더미 배양으로부터 얻어진 수정된 배아를 나타내는 사진이다.
- [30] 도 8은 복수의 단일 난포 배양 및 복수 난포 더미 배양을 통해 수득한 난포의 성장 및 성숙을 확인한 사진이다.

[31]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [32] 본 발명자들은 난포의 체외배양시 대량의 난포를 얻을 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 안지오텐신 II 수용체 작용제가 2개 내지 4개의 난포가 접합된 상태로 이루어진 복수 난포 더미에 특이적으로 작용하여 모든 난포들을 동시에 성숙 및 성장시킴을 확인하였다. 또한, 상기 난포의 성숙난포를 이용하여 수정시킬 경우에도, 기존의 단일 난포의 성숙난포를 이용하여 수정시킬 경우와 유사한 수정율이 나타나고 유사하게 수정란의 난할이 진행됨을 확인하였다. 따라서, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에서 복수 난포 더미를 배양하는 방법을 통해서 대량의 난포를 얻을 수

있음을 알 수 있었다.

- [33] 또한, 복수의 난포를 단일 난포 형태로 배양하는 경우에 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하더라도 모든 난포들의 성장 및 성숙이 동시에 일어나지 않는 반면, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에 복수 난포 더미를 배양하는 방법을 이용하면 복수 난포 더미에 존재하는 대부분의 난포들의 성장 및 성숙을 촉진시킨다는 점에서 본 발명이 가지는 의의는 크다고 할 수 있다.

[34]

- [35] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[36]

- [37] 상기 과제를 해결하기 위하여 하나의 양태로서, 본 발명은 분리된 복수 난포 더미를 배지에서 배양하는 제1배양 단계 및 상기 제1배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미를 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에서 배양하는 제2배양 단계를 포함하는 난포 배양 방법을 제공한다.

[38]

- [39] 본 발명에서 사용된 용어 "난포 배양"은 조절된 조건 하에서 인공적으로 체외에서 살아있는 난포를 키우는 과정을 의미한다. 본 발명에서 제공하는 필수적인 기술적 사상을 제외하고, 상기 난포를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 제한없이 수행될 수 있다.

- [40] 본 발명의 난포 배양 방법은 특히, 복수의 난포를 체외에서 배양할 수 있다는 장점이 있다. 이하, 상기 배양방법의 각 단계를 상세히 설명한다.

[41]

- [42] 상기 제1배양 단계는 분리된 복수 난포 더미를 체외에서 사전 배양하는 단계이다. 제1배양 단계를 통해 생체 내 존재하고 있던 난포가 생체 외 조건에서 성장 및 성숙할 수 있도록 적용할 수 있다.

- [43] 본 발명에서 사용된 용어 "복수 난포 더미(multi-follicle cluster)"는 복수의 난포가 접합된 상태로 이루어진 더미를 의미한다. 난포는 난소에서 생리시작일로부터 배란전까지 성장하며, 이 기간 동안 난포는 원시난포(primordial follicle), 전동난포(pre-antral follicle), 동난포(antral follicle) 및 성숙난포의 과정을 거치며 자라게 되는데, 본 발명에 있어서, 상기 복수 난포 더미는 전동 난포로 상태인 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 복수 난포 더미는 구체적으로 2 내지 4개의 전동 난포가 접합된 상태로 이루어진 것일 수 있으나, 그 이상의 난포가 접합된 상태로 존재하는 한, 이에 제한되지 않는다.

- [44] 본 발명에 있어서, 상기 난포는 포유동물 유래일 수 있다. 구체적으로, 인간, 소, 양, 돼지, 말, 토끼, 염소, 마우스, 햄스터 및 랫트 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [45] 본 발명에 있어서, 복수 난포 더미의 분리는 분리된 난소에서 직접 이루어지는 것일 수 있고 또는 생체 내 난소에서 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 당업계에 공지된 난포 분리 방법을 제한 없이 모두 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.
- [46] 본 발명의 일 실시예에서는 분리된 난소를 HBSS(Hank's balanced salt solution) 넣어둔 후, 28-게이지(28-gauge) 주사기 바늘을 이용하여 발달 초기의 2 내지 4개의 전동 난포가 접합된 상태로 이루어진 복수 난포 더미를 분리하였다.
- [47] 본 발명에서 사용된 용어 "배지"는 인 비트로(in vitro)에서 난포 세포를 비롯한 세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함할 수 있다. 배양에 사용되는 기본 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), Opti-MEM, BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, α MEM(α Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 배지에는 난포의 성장 및 성숙을 유도하기 위해 추가적으로 인슐린, 소혈청, 제조합 여포 자극 호르몬(recombinant follicle stimulating hormone) 및 제조합 황체 형성 호르몬(recombinant luteinizing hormone) 등을 포함시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 또한, 본 발명의 배지에는 난포 세포의 배양 및 유지에 도움을 주는 성장인자, 호르몬, 폴리펩타이드 및 무기물질을 추가로 더 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 성장인자, 호르몬, 폴리펩타이드 및 무기물질은 보빈 뇌하수체 추출물(Bovine Pituitary Extract), 상피세포 성장 인자(Epidermal Growth Factor), 인슐린, 하이드로코르티손, 트랜스페린, 에피네프린, CaCl_2 및 암포테리신 B로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것일 수 있다. 또한 상기 배지는 세균 감염을 방지하기 위해 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin) 또는 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [49] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 인슐린, 소혈청, 제조합 여포 자극 호르몬, 제조합 황체 형성 호르몬을 포함하는 배양액을 이용하여 배양접시에 배양점적을 만든 후 각각의 점적에 수집된 단일 전동 난포 또는 복수 난포 더미 1개씩을 시딩하고 37 °C, 5 % CO_2 배양기에서 약 2주동안 배양하였다.
- [50] 상기 제1배양 단계는 구체적으로 2일 내지 6일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51]
- [52] 상기 제2배양 단계는 상기 제1배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미를 안지오텐신 II 수용체 작용제가 포함된 배지에서 배양하여 난포를 성장 및 성숙시키는 단계이다.
- [53] 본 발명에 사용된 용어 "안지오텐신 II(angiotensin II)"는 혈압증진 및 알도스테론 분비의 주요 조절자로서, 심혈관계질환에서 혈압 및 혈액량을

조절하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 호르몬이다. 상기 안지오텐신 II는 안지오텐신 II 수용체 타입 1(angiotensin II receptor type 1) 및 안지오텐신 II 수용체 타입 2(angiotensin II receptor type 2)로 불리는 두 수용체를 통해 작용할 수 있다.

- [54] 본 발명에 사용된 용어 "작용제(agonist)"는 수용체와 결합되어 수용체를 활성화시킴으로써 신호전달경로와 같은 생물학적 반응을 활성화시키는 모든 화합물을 의미한다. 따라서, 상기 안지오텐신 II 수용체 작용제는 안지오텐신 II 수용체에 결합하여 안지오텐신 II로 유도되는 신호전달경로를 활성화시키는 모든 화합물을 의미할 수 있다.
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 안지오텐신 II 수용체 작용제는 예컨대 안지오텐신 II, CGP-42112 및 노보키닌 트리플루오로아세테이트 염 (Novokinin trifluoroacetate salt)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 안지오텐신 II 수용체에 결합하여 안지오텐신 II로 유도되는 신호전달경로를 활성화시키는 한, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다.
- [56] 본 발명의 난포 배양 방법에 있어서 어떠한 안지오텐신 II 수용체 작용제를 선택하는데 따라 사용 농도 및 배양기간 등에 다른 차이가 있을 수 있으나, 본 발명의 기술적 사상이 변경되지 않는 범위 내에서 그 처리에 의해 복수 난포 더미의 배양이 가능한 안지오텐신 II 수용체 작용제라면 모두 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 보아야 한다.
- [57] 일례로, 안지오텐신 II 수용체 작용제로서 CGP-42112의 농도는 배지 내에서 5 ug/mL 내지 20 ug/mL일 수 있고, 구체적으로, 배지 내에서 5 ug/mL 내지 15 ug/mL일 수 있으며, 보다 구체적으로, 배지 내에서 10 ug/mL일 수 있으나, 상기 CGP-42112가 복수 난포 더미에 처리되어 복수 난포 더미 내 모든 난포들을 성장 및 성숙시키는 효과를 나타내는 한, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 안지오텐신 II 수용체 작용제로 CGP-42112를 사용하였고, 5일째부터 배지 내 농도가 10 ug/mL이 되도록 처리하였다.
- [59] 본 발명에서 사용된 용어 "안지오텐신 II 수용체 길항제(angiotensin II receptor antagonist)"는 수용체와 결합되어 신경전달물질이나 호르몬 기능을 저해하는 약물을 의미한다.
- [60] 본 발명에서 사용된 용어 "성장"은 난포를 구성하는 세포들이 증식하여 난포의 전체적인 크기가 커지는 것을 의미한다.
- [61] 본 발명에서 사용된 용어 "성숙"은 난포가 발달하는 것을 의미한다.
- [62] 추가적으로 본 발명의 복수 난포 배양 방법을 통해서 난포를 성장 및 성숙시킬 수 있다.
- [63] 상기 제2배양 단계는 구체적으로 5 내지 20일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [64]

- [65] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 아무것도 처리하지 않거나, 안지오텐신 II 수용체 작용제 및 안지오텐신 II 길항제를 처리하여 단일 난포 배양하는 경우, 단일 난포의 성장 및 성숙에 아무 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 1 내지 도 2). 또한, 아무것도 처리하지 않거나, 안지오텐신 II 수용체 길항제를 처리하여 복수 난포 더미 배양하는 경우, 복수 난포 더미의 일부 난포들이 성장이 진행되지 않거나 세포사멸에 빠지는 현상이 나타남을 확인하였다(도 3). 반면, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하여 복수 난포 더미 배양하는 경우, 복수 난포 더미의 모든 난포들이 동시에 성장이 촉진됨을 확인하였다(도 3).
- [66] 한편, 아무것도 처리하지 않거나, 안지오텐신 II 수용체 길항제 또는 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하여 복수 난포 더미 배양하는 경우, 살아있는 난포의 성숙률이 유사한 수준으로 나타남을 확인하였다(도 4). 따라서, 안지오텐신 II 수용체 작용제는 복수 난포 더미 배양에 있어서 난포의 성장을 촉진시키는 역할을 하므로, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리함으로써 복수의 난포를 동시에 배양시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [67] 본 발명의 구체적인 다른 일 실시예에서는 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하여 복수 난포 더미를 배양하는 경우, 모든 난포들은 동일한 조건으로 단일 난포 배양된 난포와 유사한 수준으로 성장 및 성숙이 촉진되고(도 5), 상기 난포를 이용하여 얻어진 성숙난포를 이용하여 정자와 수정시켰을 경우도 단일 난포 배양된 성숙난포를 이용하여 정자와 수정시켰을 경우와 비교하여 유사한 수준으로 배아의 난할이 진행됨을 알 수 있었다(도 6 및 도 7). 따라서, 본 발명의 방법을 이용할 경우, 복수의 난포 배양을 통해 난자를 대량으로 생산할 수 있으므로, 체외수정에 필요한 난자를 효율적으로 시험관 내에서 생산할 수 있고, 또한 불임과 관련된 다양한 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [68] 본 발명의 구체적인 또 다른 일 실시예에서는 복수의 난포를 단일 난포 형태로 배양하는 경우, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하더라도 모든 난포들의 성장 및 성숙이 동시에 일어나지 않는 반면, 본 발명의 복수 난포 더미 배양 방법으로 배양하는 경우, 대부분의 난포들의 성장 및 성숙이 촉진됨을 확인하였다(도 8). 따라서, 안지오텐신 II 수용체 작용제는 복수 난포 더미 배양시에 특이적으로 작용하여 모든 난포들을 건강하게 성장 및 성숙시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [69]
- [70] 본 발명의 난포 배양 방법은 상기 제2배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미에 배란을 유도하여 난자를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [71] 상기 배란 유도는 성숙 난포로부터 난자를 배출할 수 있도록 유도하는 과정을 의미한다. 상기 배란 유도에 쓰이는 물질은 인간 융모막 성장 호르몬(rhCG), 인간 표피 성장 인자(hEGF), 인간 폐경 성선 자극 호르몬(hMG), 난포 자극 호르몬(FSH)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [72] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 배란을 유도하기 위하여 재조합 인간

용모막 성장 호르몬 및 인간 표피 성장인자를 처리하여 배란을 유도하였다.

[73]

[74] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 복수 난포 더미 배양용 조성물을 제공한다.

[75] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 안지오텐신 II 수용체 작용제의 복수 난포 더미 배양 용도를 제공한다.

[76] 상기 안지오텐신 II, 안지오텐신 II 수용체 작용제 및 복수 난포 더미는 상기 설명한 바와 같다.

[77] 본 발명에 있어서, 상기 안지오텐신 II 수용체 작용제를 복수 난포 더미에 처리하여 모든 난포들을 동시에 성숙 및 성장시키고, 상기 난포의 성숙난포를 이용하여 정자와 수정시킬 경우에도, 기존의 단일 난포의 성숙난포를 이용하여 정자와 수정시킬 경우와 비교하여 유사한 수정율이 나타나고 유사하게 배아의 난할이 진행됨을 확인하였으므로, 상기 안지오텐신 II 수용체 작용제를 복수 난포 더미 배양용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[78]

발명의 실시를 위한 형태

[79] 이하, 하기 실시예들을 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[80]

[81] 실시예 1. 마우스로부터 전동 난포(pre-antral)의 분리

[82]

[83] 실험에 사용될 전동 난포를 분리하기 위하여, 암컷 C57BL6 마우스를 이용하였다. 이때, 상기 마우스는 12시간씩 명암기간을 주고 물과 먹이는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[84] 구체적으로, 14일령된 마우스로부터 난소를 분리하여 10 % 소혈청이 함유된 HBSS(Hank's balanced salt solution)에 넣어 둔 후 28-게이지(28-gauge) 주사기 바늘을 이용하여 발달 초기 전동 난포를 기계적으로 분리하였다. 이때, 퇴화된 전동 난포를 제거하고 건강한 모양의 전동 난포를 전동 난포 배양에 이용하였다. 1개의 분리된 전동 난포를 단일 난포배양(single follicle culture)에 사용하였고, 2 내지 4개의 전동 난포가 접합된 상태로 이루어진 더미는 복수 난포 더미 배양(multi-follicle cluster culture)에 이용하였다.

[85]

[86] 실시예 2. 분리된 전동 난포의 체외배양

[87] 분리된 전동 난포를 체외 배양하기 위하여, 하기의 방법을 수행하였다.

[88] 배양접시(Falcon 3000, BD Biosciences, 60 x 15 mm)에 20 μ l의 배양액 점적을 25개씩 만든 후 각각의 점적에 상기 수집된 단일 전동 난포 또는 2내지 4개의

전동 난포가 접합된 상태로 이루어진 복수 난포 더미 1개씩을 시딩(seeding)하고 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 약 2주동안 배양하였다. 이때 사용된 배양액은 10 mg/mL의 인슐린과 5 % 소혈청, 그리고 재조합 여포 자극 호르몬(recombinant follicle stimulating hormone, FSH, Gonadotropin, Merck Serono, 0.2 IU/mL)과 재조합 황체 형성 호르몬(recombinant luteinizing hormone, LH, Luveris®, Merck Serono, 0.1 IU/mL)이 포함된 Opti-MEM 배지(Invitrogen)를 사용하였고, 이틀마다 새 배지로 절반씩 갈아주었다. 배양과정에서 난포 형태는 역위현미경(TE-2000; Nikon)을 이용하여 관찰하였다.

[89]

[90] **실시예 3. 안지오텐신 II 수용체(Angiotensin II receptor)의 조절**

[91] 안지오텐신 II 수용체 조절에 따른 난포 배양 효과를 확인하기 위하여, 대조군, 안지오텐신 II 수용체 작용제(Angiotensin II receptor agonist, CGP-42112, Sigma) 처리군 및 안지오텐신 II 수용체 길항제(Angiotensin II receptor antagonist, Saralasin, Sigma) 처리군으로 나누어 비교분석하였다. 구체적으로, 안지오텐신 II 수용체 작용제 또는 안지오텐신 II 수용체 길항제를 배양 5일째부터 10 ug/mL 농도가 되도록 처리하였다.

[92]

[93] **실시예 4. 배란 유도**

[94] 배양 12일 째 전동난포에서 동난포(antral follicle)로 성숙된 것을 확인한 후, 배란을 유도하기 위하여, 1.5 IU/mL의 재조합 인간 융모막 성장 호르몬(recombinant human chorionic growth hormone, rhCG, Ovidrel®, Merck Serono)과 5 ng/mL의 인간 표피 성장인자(human epidermal growth factor, hEGF)를 처리하여 배란을 유도하였다. 배란 유도한 후 16-18시간이 되었을 때, 배란율과 성숙률을 확인하였다.

[95] 구체적으로 상기 배란율은 시딩(seeding)한 난포 중 인간 융모막 성장 호르몬 및 인간 표피 성장인자를 투여한 후 배란된 난포의 수를 세어 계산하였고, 성숙률은 배란된 난자의 수 중 MII 시기의 난자의 수를 세어 계산하였다.

[96]

[97] **실시예 5. 체외수정 및 배아 확인**

[98] 배란을 유도하여 수득한 난자의 수정률을 평가하기 위하여 체외수정을 실시하였다. 구체적으로 37 °C, 5 % CO₂ 배양기 내 HTF(human tubal fluid) 배지에서 배란된 성숙난포에 8주령 수컷 C57BL6 마우스로부터 채취한 정자를 수정시켰다. 세포분열이 일어나거나 또는 두 개의 전핵이 보이면서 제 2극체가 관찰되면 수정된 것으로 간주하였다.

[99]

[100] **실험예 1. 단일 난포 배양시 안지오텐신 II의 효과 확인**

[101]

[102] 단일 난포 배양시 안지오텐신 II의 효과를 확인하기 위하여, 안지오텐신 II

수용체 작용제 또는 안지오텐신 II 수용체 길항제 처리에 따른 난포의 성장 및 성숙도를 확인하고자 하였다. 이를 위해, 실시예 1 내지 실시예 4의 방법으로 안지오텐신 II 수용체 작용제 또는 안지오텐신 II 수용체 길항제를 단일 난포에 처리하여 배양하면서 난포의 성장을 관찰하고, 배양된 난포에 배란을 유도하여 배란율을 확인하였다.

[103] 실험결과, 5일 쯤 난포와 13일 쯤 난포의 성장을 비교하였을 때, 안지오텐신 II 수용체 작용제(AT II receptor agonist) 또는 안지오텐신 II 수용체 길항제(AT II receptor antagonist)를 처리한 단일 난포는 아무것도 처리하지 않은 단일 난포(대조군, CTL)와 유사한 수준으로 성장하는 것을 확인할 수 있었다(도 1). 또한, 안지오텐신 II 수용체 작용제 또는 안지오텐신 II 수용체 길항제를 처리한 단일 난포의 배란율도 아무것도 처리하지 않은 단일 난포와 비교하여 큰 차이가 없었다(도 2).

[104] 결론적으로 단일 난포 배양시에는 안지오텐신 II가 난포의 성장 및 성숙에 아무 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[105]

[106] **실험예 2. 복수 난포 더미 배양시 안지오텐신 II의 효과 확인**

[107] 다음으로, 2 내지 4개의 난포가 접합된 상태로 이루어진 복수 난포 더미를 배양시 안지오텐신 II의 효과를 확인하고자 하였다. 이를 위해, 실시예 1 내지 실시예 4의 방법으로 안지오텐신 II 수용체 작용제 또는 안지오텐신 II 수용체 길항제를 복수 난포 더미에 처리하여 배양하면서 난포의 성장을 관찰하고, 각 복수 난포 더미의 살아있는 난포를 기준으로 성숙률을 확인하였다.

[108] 실험결과, 5일째 복수 난포 더미와 13일째 복수 난포 더미를 비교하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 대조군에서는 복수 난포 더미의 일부 난포들은 성장이 진행되지 않고 난포 내 난포액이 거의 축적되지 않음을 확인하였다. 그러나 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리한 복수 난포 더미에서는 모든 난포들의 성장이 현저히 촉진되었고, 난포 내 난포액 축적이 증가됨을 확인하였다. 반면, 안지오텐신 II 수용체 길항제를 처리한 복수 난포 더미의 일부 난포들은 동시에 자라지 않고 발달 도중에 세포사멸에 빠지는 현상을 확인하였다(도 3).

[109] 한편, 복수 난포 더미 배양시 살아있는 난포의 성숙률을 확인한 결과, 안지오텐신 II 수용체 작용제(AT II receptor agonist) 또는 안지오텐신 II 수용체 길항제(AT II receptor antagonist)를 처리한 복수 난포 더미는 아무것도 처리하지 않은 단일 난포(대조군, CTL)와 유사한 수준으로 성숙률이 나타난 것을 확인하였다(도 4). 따라서, 난포의 성숙률과 안지오텐신 II는 상관관계가 있는 것은 아니라는 것을 알 수 있었다.

[110] 결론적으로, 대조군인 아무것도 처리하지 않은 복수 난포 더미 및 안지오텐신 II 수용체 길항제를 처리한 복수 난포 더미의 일부 난포들은 성장이 진행되지 않았으나, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리한 복수 난포 더미의 모든 난포들은 성장이 촉진되므로, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하면 복수의

난포를 동시에 배양시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[111]

[112] 실험예 3. 단일 난포 배양 및 복수 난포 더미 배양시 난포의 성숙률 및 수정률 비교

[113] 복수 난포 더미 배양시 안지오텐신 II의 효과를 추가적으로 확인하기 위하여, 배양된 난포의 성숙률 및 수정률을 확인하고자 하였다. 실시예 1 내지 5의 방법으로, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하여 배양시키고 배란을 유도한 후 배란된 성숙난포에 정자를 수정시켰다.

[114] 실험결과, 복수 더미 배양시 다수의 난포를 동시에 배양하여 성숙 난포를 얻었으며 성숙률(26.8 %)은 단일 난포의 성숙률(11 %)과 유의한 수치임을 확인하였다(도 5). 또한, 상기 성숙된 난포를 수정시킨 결과, 단일 난포 배양 및 복수 난포 더미 배양은 수정률에 있어 서로 큰 차이가 나타나지 않았고(도 6), 수정된 배아의 난할이 진행됨을 확인하였다(도 7).

[115] 결론적으로, 안지오텐신 II 수용체 작용제를 첨가하여 복수 난포 더미를 배양하는 경우, 모든 난포들은 동일한 조건으로 단일 난포 배양된 난포와 유사한 수준으로 성장 및 성숙이 촉진되고, 상기 난포를 이용하여 얻어진 난자를 정자와 수정시켰을 때도 유사한 수준으로 수정이 일어남을 알 수 있었다. 이에, 본 발명에서 확립된 복수 난포 더미 배양 방법은 복수의 난포 배양이 가능하므로, 난자를 대량으로 생산할 수 있어, 체외수정에 필요한 난자를 효율적으로 시험관 내에서 생산할 수 있으며, 또한 불임과 관련된 다양한 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[116]

[117] 실험예 4. 복수의 단일 난포와 복수 난포 더미 배양시 난포의 성숙도 비교

[118] 본 발명에서 확립된 복수 난포 더미 배양 방법의 효과를 더 규명하기 위하여, 복수의 단일 난포를 배양하는 경우와 비교하고자 하였다. 이를 위해, 실시예 1 내지 4의 방법으로 안지오텐신 II 수용체 작용제를 복수의 단일 난포 또는 복수 난포 더미에 처리하여 배양하면서 난포의 성장을 관찰하고, 배양된 난포에 배란을 유도하여 난포의 성숙도를 확인하였다.

[119] 실험결과, 복수의 단일 난포에 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하는 경우, 모든 난포들의 성장이 촉진되지 않고 발달 도중에 세포사멸에 빠지는 현상이 나타남을 확인하였고, 또한, 난포 내 난포액 축적이 거의 없어 성숙도 촉진되지 않음을 확인하였다(도 8의 하단).

[120] 반면, 복수 난포 더미에 안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리한 경우, 복수 난포 더미에 존재하는 모든 난포들이 현저하게 성장이 촉진됨을 확인하였다(도 8의 상단). 또한, 복수 난포 더미에 존재하는 모든 난포들은 난포 내 난포액 축적(흰색 화살표)과 건강한 모양의 성숙난포(노란색 화살표)가 뚜렷이 관찰됨을 확인하였다(도 8의 상단).

[121] 따라서, 상기 결과는 복수의 난포를 단일 난포 형태로 배양하는 경우에는

안지오텐신 II 수용체 작용제를 처리하더라도 모든 난포들의 성장 및 성숙이 동시에 일어나지 일어나지 않으며, 더 나아가 복수의 단일 난포 배양은 불가능하다는 것을 확인한 것이다. 반면에, 본 발명의 복수 난포 더미 배양 방법은 대부분의 난포들의 성장 및 성숙이 촉진되므로, 안지오텐신 II 수용체 작용제는 복수 난포 더미 배양시에 특이적으로 작용하여 모든 난포들을 건강하게 성장 및 성숙시킬 수 있음을 알 수 있었다.

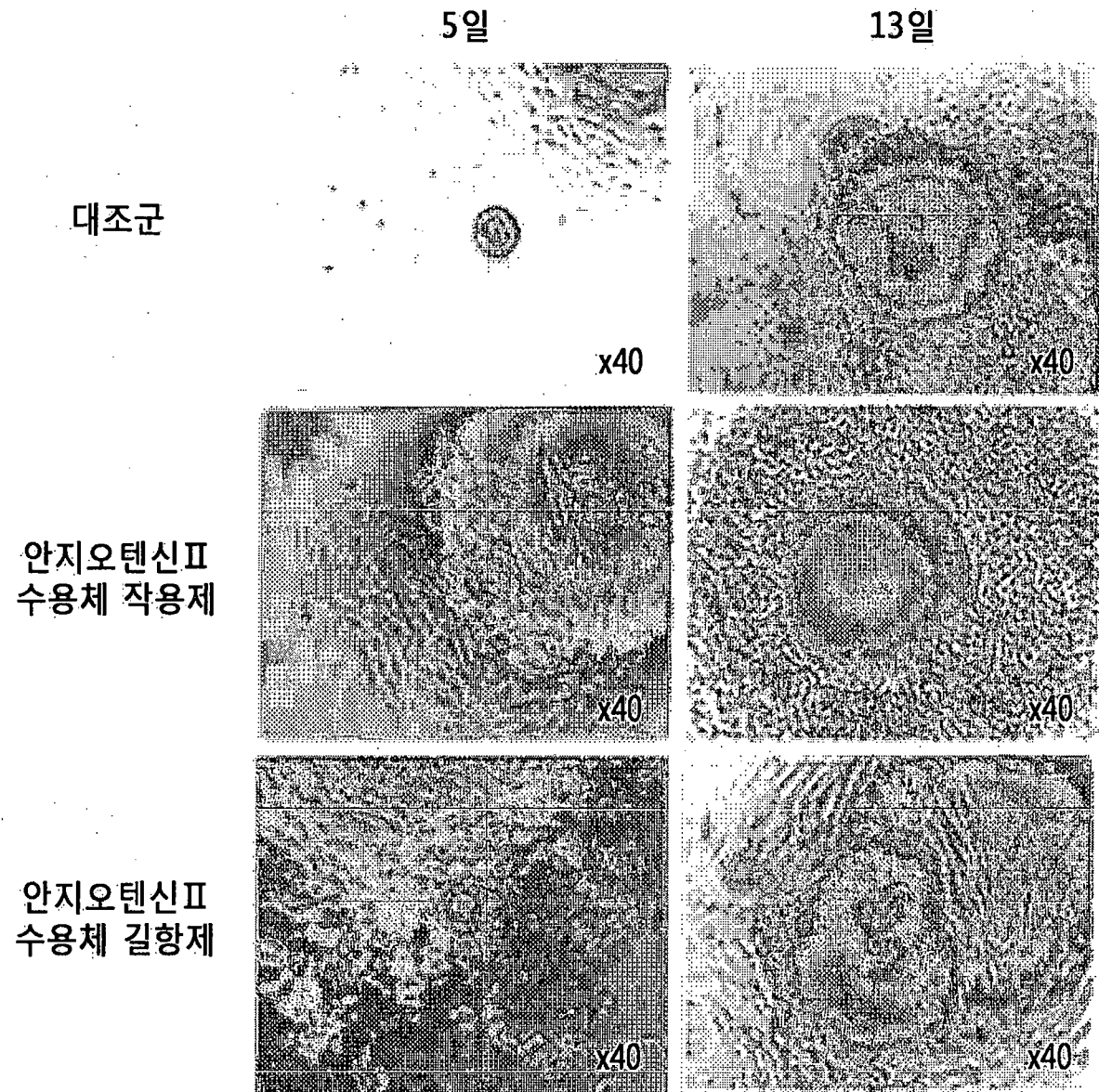
- [122] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

청구범위

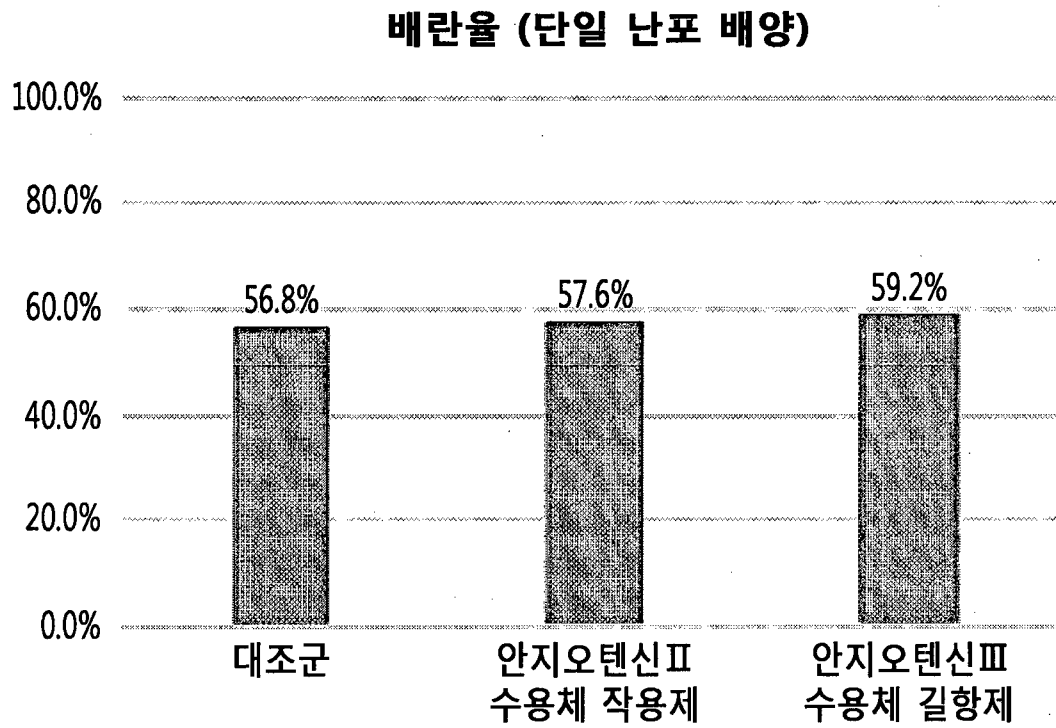
- [청구항 1] (a) 분리된 복수 난포 더미를 배지에서 배양하는 제1배양 단계; 및
(b) 제1배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미를 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 배지에서 배양하는 제2배양 단계를 포함하는, 난포 배양 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 분리된 복수 난포 더미는 전동 난포(pre-antral follicle) 상태인, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 복수 난포 더미는 2 내지 4개의 전동 난포가 서로 접합된 상태인, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 안지오텐신 II 수용체 작용제는 안지오텐신 II, CGP-42112 및 노보키닌 트리플루오로아세테이트 염(Novokinin trifluoroacetate salt)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 CGP-42112의 농도는 배지 내에서 5 ug/mL 내지 20 ug/mL인 것인, 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 제1배양단계는 2일 내지 6일 동안 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 제2배양단계는 5 내지 20일 동안 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 제2배양 단계에서 배양된 복수 난포 더미에 배란을 유도하여 난자를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 9] 안지오텐신 II 수용체 작용제를 포함하는 복수 난포 더미 배양용 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 복수 난포 더미는 2 내지 4개의 전동 난포가 서로 접합된 상태인 것인, 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 안지오텐신 II 수용체 작용제는 안지오텐신 II, CGP-42112 및 노보키닌 트리플루오로아세테이트 염(Novokinin trifluoroacetate salt)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 조성물.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 CGP-42112의 농도는 상기 조성물 내 5 ug/mL 내지 20 ug/mL인 것인, 조성물.

[도1]

단일 난포 배양

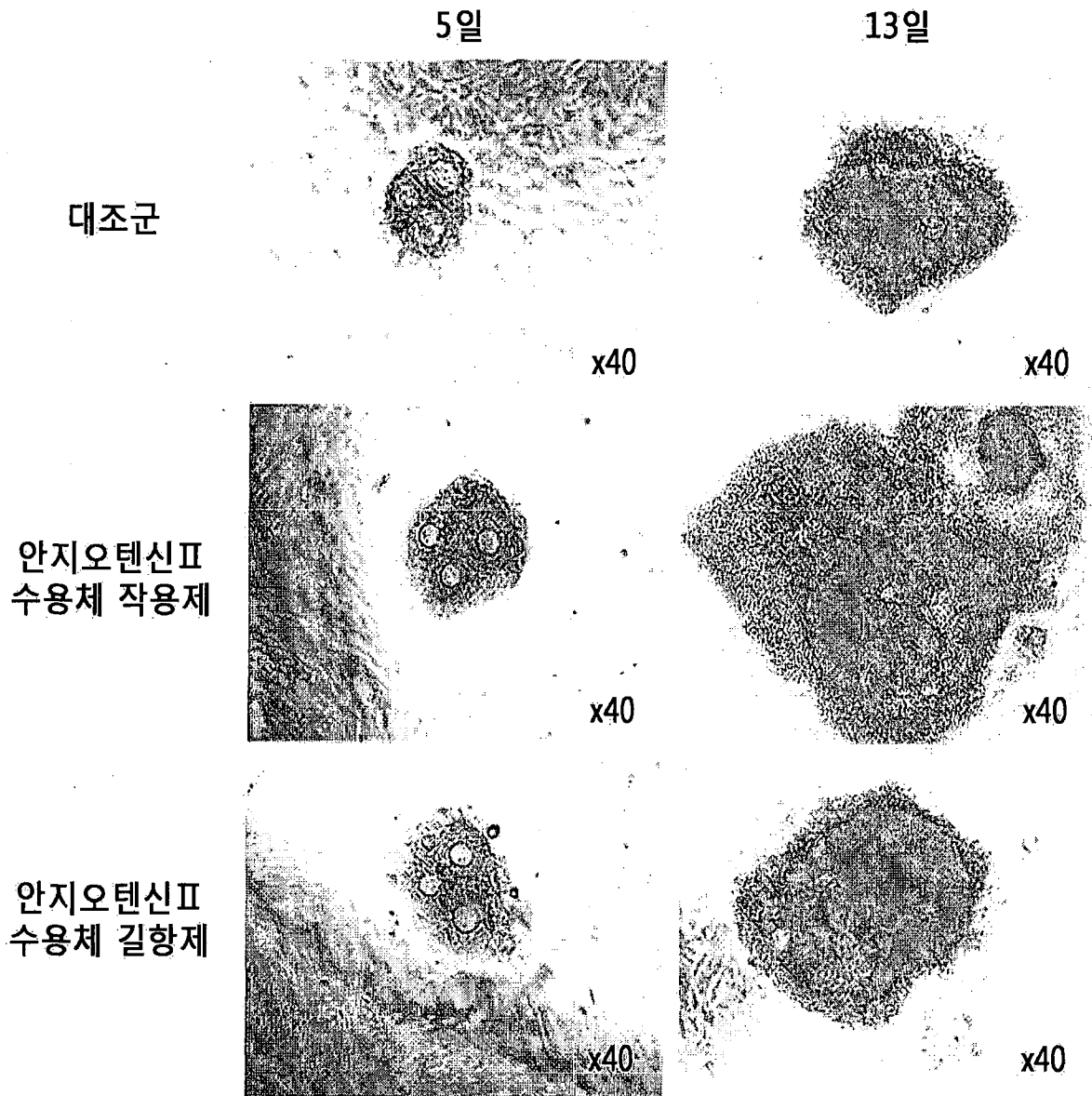


[도2]

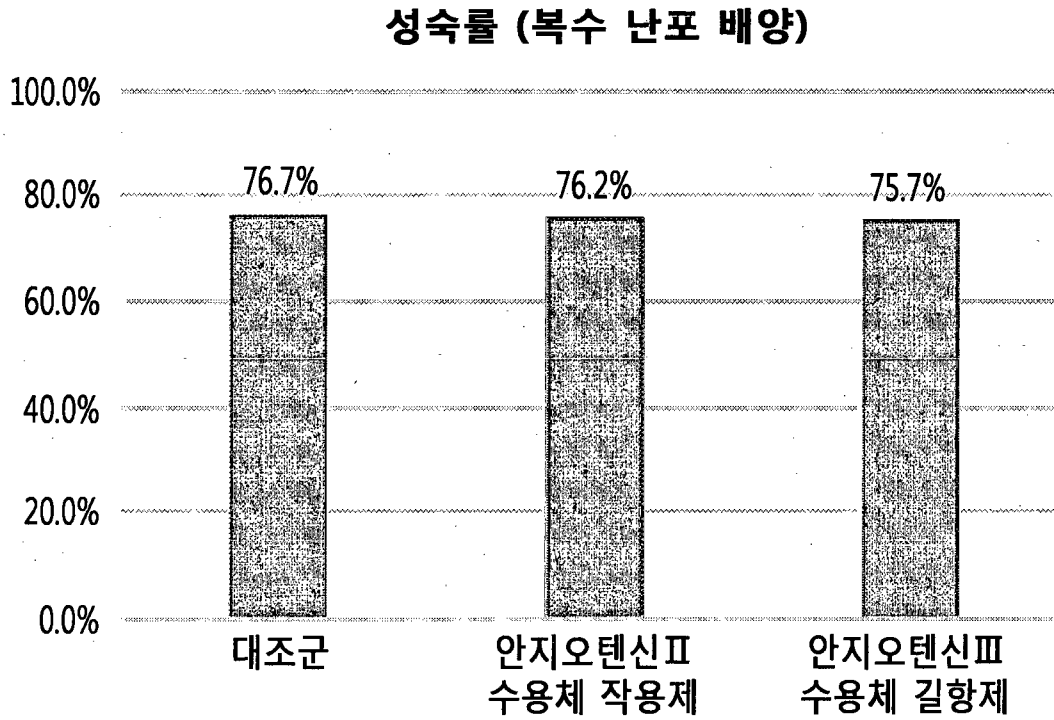


[도3]

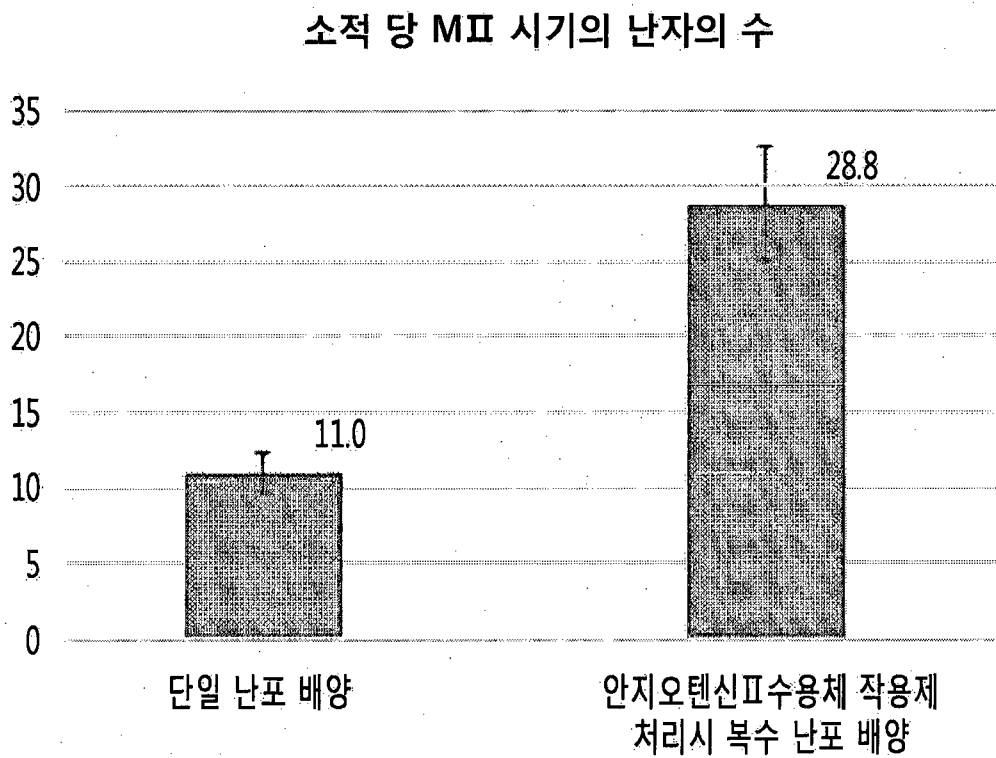
복수 난포더미 배양



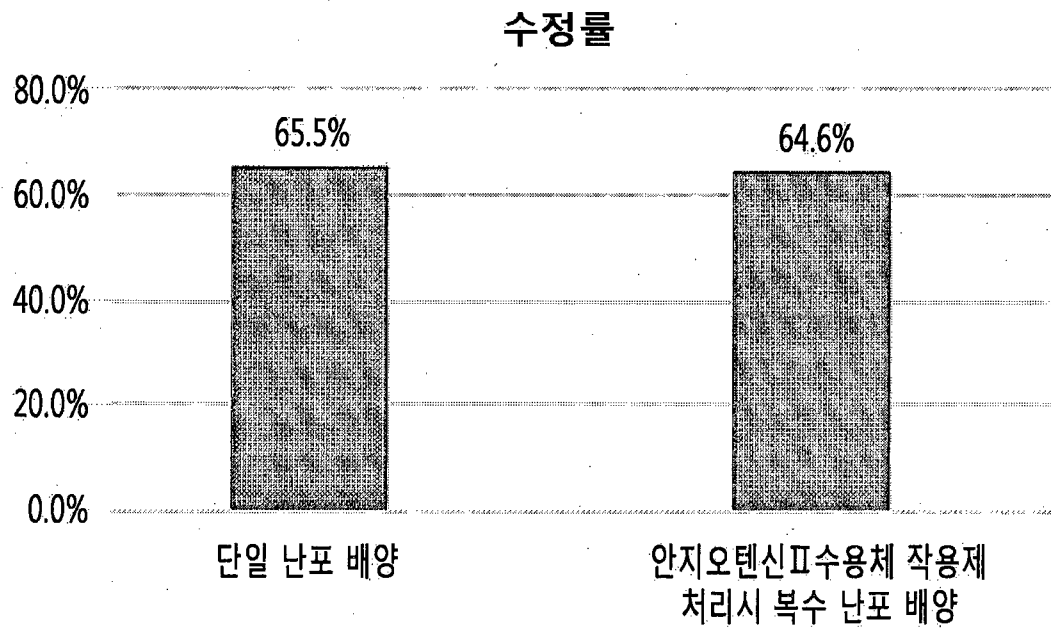
[도4]



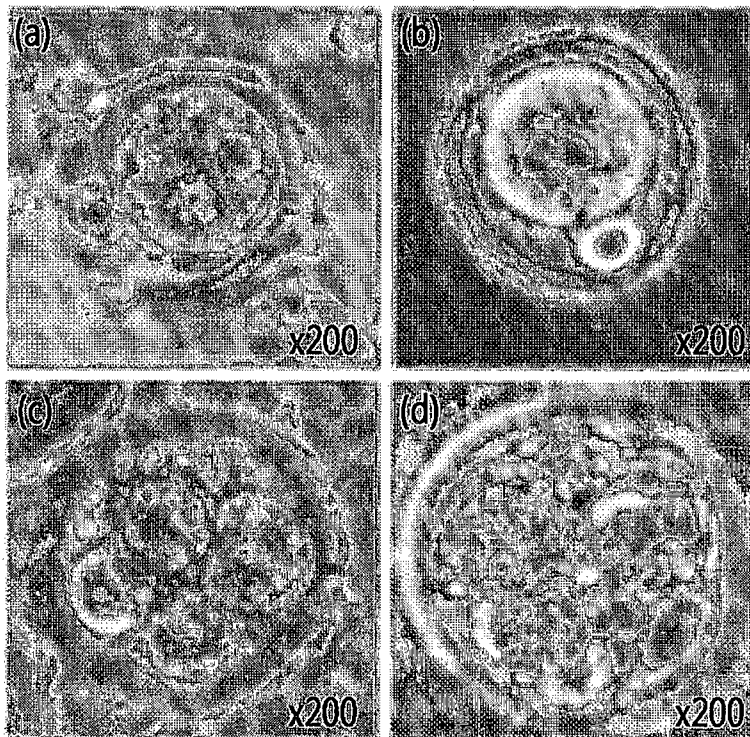
[도5]



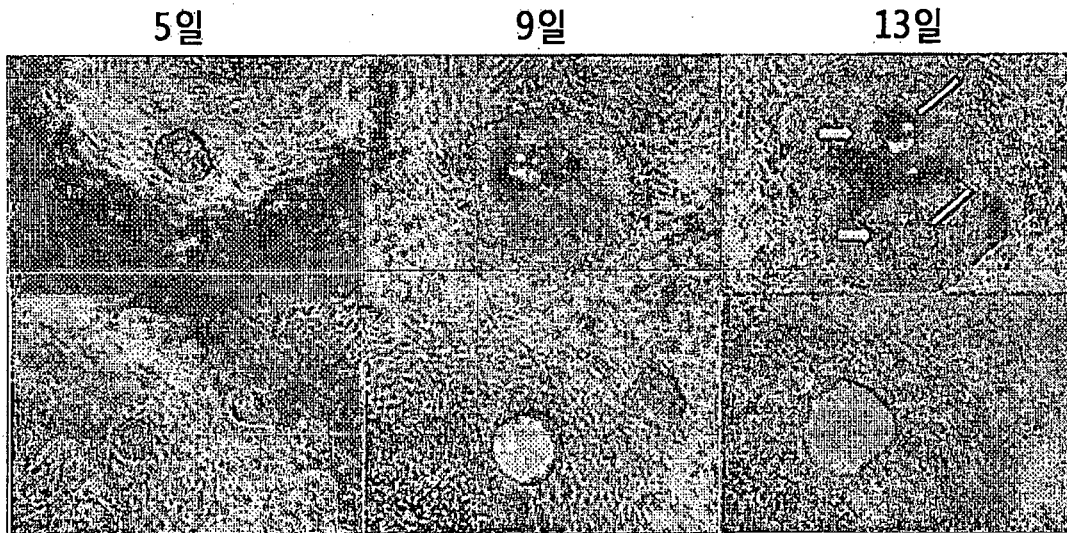
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(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)

C12N 5/071; C12N 5/075; C12N 5/02

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: multi-follicle cluster, cultivation, angiotensin II receptor agent

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GONCALVES, Paulo Bayard et al., "Role of Angiotensin in Ovarian Follicular Development and Ovulation in Mammals: A Review of Recent Advances", Reproduction, 2012, vol. 143, pages 11-20 See abstract; figure 1.	1-12
Y	SHUTTLEWORTH, G. et al., "In vitro Development of Pig Preantral Follicles Cultured in a Serum-free Medium and the Effect of Angiotensin II", Reproduction, 2002, vol. 123, pages 807-818 See abstract.	1-12
A	KR 10-2008-0085426 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) 24 September 2008 See claims 1-4.	1-12
A	KR 10-2003-0081350 A (VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL) 17 October 2003 See claim 1; figure 1.	1-12
PX	KIM, Yong Jin et al., "Induction of Multiple Ovulation via Modulation of Angiotensin II Receptors in in vitro Ovarian Follicle Culture Models", Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, (E-pub.) 02 November 2016, chapters 1-11 See abstract; third chapter, left column, second paragraph-fourth paragraph; figures 1 and 5.	1-12



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

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

Date of mailing of the international search report

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
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/KR2017/004038

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0085426 A	24/09/2008	NONE	
KR 10-2003-0081350 A	17/10/2003	AT 408668 T	15/10/2008
		AU 2002-224669 B2	01/02/2007
		AU 2466902 A	24/06/2002
		CA 2429401 A1	20/06/2002
		CN 100489089 C	20/05/2009
		CN 1481437 A	10/03/2004
		CN 1916165 A	21/02/2007
		CZ 20031607 A3	12/11/2003
		DK 1341901 T3	26/01/2009
		EP 1215280 A1	19/06/2002
		EP 1341901 A1	10/09/2003
		EP 1341901 B1	17/09/2008
		EP 1341901 B8	24/12/2008
		HU 0302600 A2	28/11/2003
		HU 0302600 A3	28/10/2004
		IL 156375 A	04/01/2004
		JP 2004-514458 A	20/05/2004
		NZ 525925 A	23/12/2005
		PL 362063 A1	18/10/2004
		RU 2286384 C2	27/10/2006
		US 2004-0053407 A1	18/03/2004
		WO 02-48316 A1	20/06/2002
		ZA 200303864 B	05/04/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/071; C12N 5/075; C12N 5/02

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:복수 난포 더미, 배양, 안지오텐신 II 수용체 작용제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	GONCALVES, PAULO BAYARD 등, 'Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances', Reproduction, 2012, 제143권, 11-20 페이지 초록; 도면 1 참조.	1-12
Y	SHUTTLEWORTH, G. 등, 'In vitro development of pig preantral follicles cultured in a serum-free medium and the effect of angiotensin II', Reproduction, 2002, 제123권, 807-818 페이지 초록 참조.	1-12
A	KR 10-2008-0085426 A (충남대학교산학협력단) 2008.09.24 청구항 1-4 참조.	1-12
A	KR 10-2003-0081350 A (브리제 유니버시티아이트 브루셀) 2003.10.17 청구항 1; 도면 1 참조.	1-12
PX	KIM, YONG JIN 등, 'Induction of multiple ovulation via modulation of angiotensin II receptors in in vitro ovarian follicle culture models', Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, (전자공개)2016.11.02, 1-11장 초록; 세 번째장, 좌컬럼, 두 번째 단락-네 번째 단락; 도면 1 및 5 참조.	1-12

☐ 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

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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 08월 08일 (08.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 08일 (08.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2008-0085426 A	2008/09/24	없음	
KR 10-2003-0081350 A	2003/10/17	AT 408668 T	2008/10/15
		AU 2002-224669 B2	2007/02/01
		AU 2466902 A	2002/06/24
		CA 2429401 A1	2002/06/20
		CN 100489089 C	2009/05/20
		CN 1481437 A	2004/03/10
		CN 1916165 A	2007/02/21
		CZ 20031607 A3	2003/11/12
		DK 1341901 T3	2009/01/26
		EP 1215280 A1	2002/06/19
		EP 1341901 A1	2003/09/10
		EP 1341901 B1	2008/09/17
		EP 1341901 B8	2008/12/24
		HU 0302600 A2	2003/11/28
		HU 0302600 A3	2004/10/28
		IL 156375 A	2004/01/04
		JP 2004-514458 A	2004/05/20
		NZ 525925 A	2005/12/23
		PL 362063 A1	2004/10/18
		RU 2286384 C2	2006/10/27
		US 2004-0053407 A1	2004/03/18
		WO 02-48316 A1	2002/06/20
		ZA 200303864 B	2004/04/05