

(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2004-508004

(P2004-508004A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A	4 B O 2 4
A O 1 K 67/02	A O 1 K 67/02		4 B O 6 5
C 1 2 N 1/04	C 1 2 N 1/04		
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	E	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2001-549490 (P2001-549490)	(71) 出願人	501315876 ユニバーシティ オブ コネチカット アメリカ合衆国 コネチカット 0603 0-6207 ファーミントン ファーミ ントン・アベニュー 263
(86) (22) 出願日	平成13年1月4日 (2001.1.4)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月28日 (2002.6.28)	(74) 代理人	100086405 弁理士 河宮 治
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/000395	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開番号	W02001/049112	(72) 発明者	シャンジョン・ヤン アメリカ合衆国06262コネチカット州 ストーズ、パーチ・ロード131番
(87) 国際公開日	平成13年7月12日 (2001.7.12)		
(31) 優先権主張番号	60/174, 383		
(32) 優先日	平成12年1月4日 (2000.1.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/174, 424		
(32) 優先日	平成12年1月4日 (2000.1.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/215, 433		
(32) 優先日	平成12年6月30日 (2000.6.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵母細胞ガラス化法

(57) 【要約】

生物学的試料を含んだガラス化溶液の小さな液滴を非常に冷たい固体表面に接触させることにより達成される、非常に速い冷却速度に基づく低温保存のための新たな方法。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物学的材料の低温保存方法であって、下記工程：

(a) 低温保護平衡化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護するに十分な濃度以下の低温保護剤（複数も可）の濃度を有する低温保護平衡化媒体に生物学的材料を懸濁し；

(b) 平衡化された生物学的材料をガラス化溶液で濯ぎ、ガラス化溶媒体は、ガラス化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護を行うに十分な低温保護剤（複数も可）の濃度を有するものであり；次いで

(c) ガラス化溶液で濯がれ、ガラス化溶液の微小液滴中にある生物学的材料を、すでに約 - 150 ないし約 - 180 まで冷却された良好な熱伝導率を有する固体表面上に滴下する

を含む方法。

## 【請求項 2】

生物学的材料が細胞である請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

生物学的材料が卵母細胞である請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

生物学的材料が胚である請求項 1 の方法。

## 【請求項 5】

ガラス化溶液中に懸濁された生物学的材料を低温保存するための改良された方法であって、該改良が、生物学的材料を含むガラス化溶液の微小液滴を、約 - 150 ないし約 - 180 の温度を有する固体表面と接触させ、該表面が良好な熱伝導率を有することを特徴とするものである方法。

## 【請求項 6】

生物学的材料が細胞である請求項 5 の方法。

## 【請求項 7】

生物学的材料が卵母細胞である請求項 5 の方法。

## 【請求項 8】

生物学的材料が胚である請求項 5 の方法。

## 【請求項 9】

ガラス化溶液中に懸濁された生物学的材料を低温保存するための改良された方法であって、該改良が、生物学的材料を含むガラス化溶液の微小液滴を、約 - 150 ないし約 - 180 の温度を有する固体表面と接触させ、該表面が 20 において約 10 W / (m · k) よりも大きい熱伝導率を有することを特徴とするものである方法。

## 【請求項 10】

卵母細胞のガラス化方法であって、下記工程：

(a) 低温保護平衡化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護するに十分な濃度以下の低温保護剤（複数も可）の濃度を有する低温保護平衡化媒体に卵母細胞を懸濁し；

(b) 平衡化された卵母細胞をガラス化溶液で濯ぎ、ガラス化溶媒体は、ガラス化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護を行うに十分な低温保護剤（複数も可）の濃度を有するものであり；次いで

(c) ガラス化溶液で濯がれ、ガラス化溶液の微小液滴中にある卵母細胞を、すでに約 - 150 ないし約 - 180 まで冷却された良好な熱伝導率を有する固体表面上に滴下する

を含む方法。

## 【請求項 11】

ドナー細胞由来の核 DNA を脱核された卵母細胞に移植するための改良された方法であって、該改良が、請求項 10 の方法によりガラス化された卵母細胞由来の脱核された卵母細胞中にドナー細胞の核材料を導入する工程を含むものである方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2】

請求項 1 0 の方法によりガラス化された卵母細胞。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 2 の卵母細胞から発生した胚。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 2 の卵母細胞から発生した胎児。

## 【請求項 1 5】

請求項 1 2 の卵母細胞から発生した動物。

## 【請求項 1 6】

請求項 1 3 の胚から発生した細胞系。

10

## 【請求項 1 7】

請求項 1 4 の胎児から発生した細胞系。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 5 の動物から発生した細胞系。

## 【請求項 1 9】

ガラス化溶液中に懸濁された卵母細胞を低温保存するための改良された方法であって、該改良が、卵母細胞を含むガラス化溶液の微小液滴を、約 - 1 5 0 ないし約 - 1 8 0 の温度を有する固体表面と接触させ、該表面が 2 0 において約 1 0 W / ( m - k ) よりも大きい熱伝導率を有することを特徴とするものである方法。

## 【請求項 2 0】

請求項 1 9 の方法によりガラス化された卵母細胞。

20

## 【請求項 2 1】

請求項 2 0 の卵母細胞から発生した胚。

## 【請求項 2 2】

請求項 2 0 の卵母細胞から発生した胎児。

## 【請求項 2 3】

請求項 2 0 の卵母細胞から発生した動物。

## 【請求項 2 4】

請求項 2 1 の胚から発生した細胞系。

## 【請求項 2 5】

請求項 2 2 の胎児から発生した細胞系。

30

## 【請求項 2 6】

請求項 2 3 の動物から発生した細胞系。

## 【請求項 2 7】

K S O M プラス B S A 培養系において培養されたガラス化卵母細胞を単為生殖的に発生させるための改良された方法であって、該改良が卵丘細胞と同時培養することを特徴とするものである方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

関連技術

40

本願は、いずれも 2 0 0 0 年 1 月 4 日出願の米国仮出願第 6 0 / 1 7 4 3 8 3 号および第 6 0 / 1 7 4 4 2 4 号、ならびに 2 0 0 0 年 1 月 3 0 日出願の米国仮出願第 6 0 / 2 1 5 4 3 3 号について優先権を主張しており、それらの開示を参照により本明細書に一体化させる。

## 【0 0 0 2】

発明の背景

## 1 . 発明の分野

一般的には、本発明は、生物学的試料の低温保存に関する。より詳細には、本発明は、非常に冷たい固体表面上に溶液の小さな液滴を接触させることにより達成される非常に早い冷却速度に基づく、溶液中の生物学的試料の低温保存方法に関する。該低温保存方法は、

50

卵母細胞および胚、特に哺乳動物の胚の低温保存において有用であることがわかった。

【0003】

## 2. 関連技術の背景

例えば、後ほど試料を特定の目的に使用したい場合など、生物学的試料を長期にわたり維持したい場合が頻繁にある。不幸なことに、当業者に認識されているように、生物学的試料の生物学的活性が有意に低下することがよくあるので、現在利用可能な方法を用いた生物学的試料の凍結、低温保存および融解は最適でないことが多い。ある種の生物学的方法の実際的な使用には、ある種の細胞を長期にわたり保存することが必要なので、かかる材料の生物学的機能性が温めた後も持続しているような、生物学的試料、特に細胞性材料の新たな保存方法に対する必要性が増大している。生物学的材料の保存に対する特別な必要性が、胚原形質、インビトロでの胚の製造および核移植において生じている。

10

【0004】

多くの動物種の卵母細胞および胚を保存するための努力が多くなっている。これらの努力は、数が減少している動物種を保存する必要性、インビトロ生殖法により動物を繁殖させて遺伝学的多様性を増大させ、生殖の問題を克服する必要性、ならびに高い経済的ポテンシャルを有する動物をクローン化する必要性（これらに限らない）を包含する、多くの人間側の必要性から生じている。卵母細胞に対する興味が増大しており、現在の生物学的保存方では多くの動物種の卵母細胞を保存するには不十分であるという認識が増大している。例えば、ウシ卵母細胞は低温に対して非常に感受性がある。多くの研究グループの努力にもかかわらず（Palasz et al., *Biotechnol. Adv.* 14: 127 - 149 (1996)によるレビュー参照）、ウシ卵母細胞の保存は困難な作業であり続けている。わずかに限られた数の刊行物には、低温保存された卵母細胞からの胚盤胞およびその後のウシの発生が報告されているが、結果は有効でないままである（Fuku et al., *Cryobiology* 29: 485 - 492 (1992); Hamano et al., *Theriogenology* 38: 1085 - 1090 (1992); Otoi et al., *Theriogenology* 38: 711 - 719 (1992); Otoi et al., *J. Reprod. Dev.* 41: 361 - 366 (1995); Suzuki et al., *Cryobiology* 33: 515 - 524 (1996); Kubota et al., *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1998); Vajta et al., *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53 - 58 (1998)）。

20

30

【0005】

低温保存剤の影響により生殖プロセスが悪影響を受けることが報告されている。多くの報告は、現在利用可能な低温保存剤は高濃度において卵母細胞に対して毒性を有し、卵母細胞および胚のその後の発生に負の影響を及ぼすと述べている（例えば、Martino et al., *Mol. Reprod. Dev.* 45: 503 - 512 (1996); Palasz et al., *Biotechnology Advances* 14: 127 - 149 (1996); Parks et al., *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992); Schellander et al., *Theriogenology* 42: 909 - 915 (1994); Vajta et al., *Embryo Transfer Newsletter* 15: 12 - 18 (1997)参照)。低温保存の冷却に関連した卵母細胞の毒性についての報告もある（Parks et al., *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992)）。例えば、低温への曝露は減衰分裂の紡錘体の脱ポリマー化を引き起こすことが知られている（Parks et al., *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992); Peura et al., *Theriogenology* 51: 211 (1999) (abstr.)）。凍結/融解された成熟卵母細胞を用いた以前の実験は、新鮮卵母細胞と比較した場合、除核率の有意な低下を示した（Kubota et al., *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1

40

50

998) )。

【0006】

現在の努力は低温保存方を改良することによる保存卵母細胞の生存率の向上に集中している。Martinoら (Martino et al., Biol. Reprod. 54: 1059 - 1069 (1996)) によれば、かかる努力は、異なる低温保存剤の比較 (Otoi et al., Theriogenology 40: 801 - 807 (1993); Dinnyes et al., Cryobiology 31: 569 - 570 (1994)) および異なる凍結方法の比較 (Lira et al., Theriogenology 35: 1225 - 1235 (1991)) あるいは関連したガラス化方法 (Otoi et al., Theriogenology 40: 801 - 807 (1993); Otoi et al., Cryobiology 37: 77 - 85 (1998)) に向けられている。

【0007】

「低温保存」は、水の凝固点以下での生物学的材料の保存を意味し、それにより材料は分解しない。「ガラス化」は、低温保存剤 (水を凍結から保護する化学物質) を用いて冷却プロセスにおける氷の形成を抑制しつつ、生物学的材料をセ氏約 -100 またはそれ以下にまで冷却する方法を意味し、その結果、生物学的材料を含有している溶液がそのガラス転移点に到達し、すなわち、分子が互いに対して運動するのを停止する。氷の形成は、材料を残存未凍結溶液の収縮しつつあるポケット中に押し込むので、生物学的材料にダメージを与えることが当該分野において認識されている。冷却を継続すると、組織体積の80%以上が氷に変化する可能性があり、細胞が破壊されて回復しなくなる。ガラス化の途中では、凍結が進んでも液体の水分子はその本来のランダムな配列を維持する。他の化学物質または細胞成分の妨害はない。うまいガラス化法は過冷却、すなわち、低温保護溶液の凝固点以下での凍結することのない冷却を利用するものである。典型的には、低温保護剤は高濃度では細胞に対して毒性がある。迅速凍結は、氷晶形成に対する保護に必要な低温保護剤の濃度を低下させることにより奏効すると考えられており、そのことにより低温保護剤の無毒な濃度において組織が保存される。

【0008】

ガラス化法の1の障害は、現在のガラス化スキームにおける卵母細胞の「不十分な」冷却速度であると考えられている (Vajta et al., Embryo Transfer Newsletter 15: 12 - 18 (1997))。この問題を克服するために、非常に少量の溶液を使用するいくつかの方法が提案されている。

【0009】

いわゆる「最小液滴ガラス化 (minimum drop vitrification)」システムは、ウシおよびブタの卵母細胞の低温保存の結果についてはブレイクスルーを可能にしている (例えば、Arav A., Vitrification of oocyte and embryos, In: Lauria A, Gandolfi F (eds.), New trends in embryo transfer, Cambridge, England: Portland Press, 255 - 264 (1992) 参照)。「最小液滴ガラス化」において、迅速に冷却される特別な低温台上に少量の溶液が置かれる。不幸なことに、この方法は、大量の卵母細胞の保存に都合が良いとは当該分野において認識されていない。

【0010】

他のガラス化法が報告されている。ガラス製毛細管中 (Dinnyes et al., Cryobiology 31: 569 - 570 (1994)) あるいはオープン・プルド・プラスチック製ストロー (open pulled plastic straws) 中 (Vajta et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 53 - 58 (1998)) に導入される数マイクロリットルのガラス化溶液を用い、次いで、液体 N<sub>2</sub> 中に迅速に投入する方法は、ウシ卵母細胞のガラス化に関しては試験が成功した。同様に、ガラス化法の成功は、卵母細胞含有ガラス化溶液を小さなループに投入すること

により達成された (Lane et al., Theriogenology 51: 167 (1999) (abstr.))。しかしながら、かかる方法は効率が高いとは認識されていない。なぜなら、おそらく、温かい対象物を液体N<sub>2</sub>に投入することは、液体の沸騰を生じさせ、短時間のうちに対象物周囲にN<sub>2</sub>気体の隔離層が形成されるからであろう。

#### 【0011】

有効なガラス化を妨げる気体隔離層発生の可能性を低下させるために、卵母細胞含有ガラス化溶液を液体N<sub>2</sub>中に直接滴下することが提案された。かかる方法は、おそらく、気体の隔離効果が除去されたことにより、従来のガラス化法よりも有効であると報告されている (Riha et al., Zivoc. Vir. 36: 113-120 (1991); Papis et al., Theriogenology 51: 173 (1999) (abstr.); Yang et al., Theriogenology 51: 178 (1999) (abstr.))。しかしながら、かかる方法はガラス化された卵母細胞の回復という問題がある。

10

#### 【0012】

いくつかのグループが、液体N<sub>2</sub>により冷却された金属表面を用いることによる生物学的材料の低温保存の改善された成功を報告している。かかる金属表面はより有効な熱伝導を提供し、最小液滴ガラス化に用いられた低温台よりも冷却速度がさらに増大するといわれている。低温金属表面上の金属格子中に置くことにより、ショウジョウバエの胚がうまく保存された (Steponkus et al., Nature 345: 170-172 (1990))。やはり、冷却された金属表面を用いる、現在利用可能な方法は大量の卵母細胞の保存に便利であるとは認識されていない。

20

#### 【0013】

現在、保存された卵母細胞の生存率に限界があり、使用される方法が煩雑である結果として、ウシにおけるインピトロでの胚の製造および核移植実験は新たに収集された卵母細胞に依存している。このことは多くの研究チームに対する大きな限定要因であり、実験の効率的計画および組織化に対する障害をもたらしている。

#### 【0014】

それゆえ、生物学的材料の改良された保存方法、特に、卵母細胞および他の壊れやすい細胞の保存に有用な方法に対する必要性がある。方法は、生物学的材料の無菌的取り扱いを可能にし、長期にわたり生物学的活性および生存可能性を保存するものでなくてはならない。

30

#### 【0015】

##### 発明の概要

本発明は、生物学的材料、特に、卵母細胞、胚、および他の細胞性材料を低温保存するための新規方法を提供する。ガラス化溶液を含む液体の非常に小さな液滴中に材料を含ませ、次いで、生物学的材料を含有するガラス化液体を、良好な熱伝導度を有する非常に冷たい表面に接触させることにより生物学的材料の低温保存を行いうることが、本発明者らにより見出された。これらの要素すべてが一緒になって非常に高い冷却速度を生じさせる。

#### 【0016】

ここに記載された発明は、上記先行技術における問題である卵母細胞の保存に関して非常に良好な結果を提供する。卵母細胞の改善された保存は、卵母細胞の生存率を向上させ、かつ核移植胚の発生を支持するための改善された能力を提供する。この改良のレベルは明らかに予期できないものであり、初期の報告 (例えば、Peura et al., Theriogenology 51: 211 (1999) (abstr.)) と比較して約10倍の効率増加を示す。

40

#### 【0017】

「固体表面ガラス化」または「SSV」法と称される本発明の方法は、微小液滴法における容器を用いないガラス化の利点と、上記の冷金属表面法の増大した熱交換とを一緒にしたものである。さらにそのうえ、きれいな金属表面は液滴の無菌的取り扱いを容易にする

50

。

## 【0018】

本発明の固体表面ガラス化法を用いて、脊椎動物および無脊椎動物種ならびに植物に由来する細胞および組織等（これらに限らない）の種々の生きた細胞および組織を低温保存することができる。好ましくは、生物学的材料の生物学的活性に悪影響を及ぼすことなく、溶液中の低温保護剤の濃度がガラス化プロセスを可能にするものである場合には、本発明方法を当業者に知られた種々の低温保護剤溶液の組み合わせとともに用いることができる。

。

## 【0019】

本発明の1の具体例において、下記工程：(1)低温保護平衡化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護するに十分な濃度以下の低温保護剤（複数も可）の濃度を有する低温保護平衡化媒体に生物学的材料を懸濁し；(2)平衡化された生物学的材料をガラス化溶液で濯ぎ、ガラス化溶媒体は、ガラス化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護を行うに十分な低温保護剤（複数も可）の濃度を有するものであり；次いで(3)ガラス化溶液で濯がれ、ガラス化溶液の微小液滴中にある生物学的材料を、すでに約-150ないし約-180まで冷却された良好な熱伝導率を有する固体表面上に滴下することを含む、生物学的材料のガラス化方法を提供する。20における好ましい熱伝導率は $>$ 約 $10\text{ W / (m - k)}$ 、より好ましくは $>$ 約 $25\text{ W / (m - k)}$ 、さらに好ましくは $>$ 約 $40\text{ W / (m - k)}$ 、さらにより好ましくは $>$ 約 $55\text{ W / (m - k)}$ である。「微小液滴」は $10\mu\text{ l}$ またはそれ以下の溶液を含む液滴を意味する。好ましい微小液滴体積は $4\mu\text{ l}$ またはそれ以下の溶液、より好ましくは $3\mu\text{ l}$ またはそれ以下の溶液、さらにより好ましくは $1\mu\text{ l}$ またはそれ以下の溶液である。

## 【0020】

本発明のもう1つの具体例において、ガラス化溶液中に懸濁された生物学的材料を低温保存するための改良された方法が提供され、改良は、生物学的材料を含むガラス化溶液の微小液滴を、約-150ないし約-180の温度を有する固体表面と接触させ、該表面は良好な熱伝導率を有することを特徴とする。本発明のもう1つの具体例において、ガラス化溶液中に懸濁された生物学的材料を低温保存するための改良された方法が提供され、改良は、生物学的材料を含むガラス化溶液の微小液滴を、約-150ないし約-180の温度を有する固体表面と接触させ、該表面は20における熱伝導率 $>$ 約 $10\text{ W / (m - k)}$ を有することを特徴とする。

## 【0021】

ガラス化した液滴を、糖類または他の浸透圧活性剤の存在下または不存在下において温かい（約39）緩衝溶液（0.3Mトレハロース溶液）中に数分間（約3分）直接置くことにより、生物学的活性に対する有意な有害効果なしに本発明のガラス化法により低温保存された試料を温めることができる。

## 【0022】

詳細には、本発明は、卵母細胞利用可能性の変動および季節的な品質の変化による障害を補填するために、研究者により使用されうる。さらにそのうえ、かかる卵母細胞のうまい低温保存により、存亡の危機に瀕した動物の保存および家畜の繁殖が容易化されうる。本発明は、少なくとも下記の態様において現存する手法を改良するものである：(1)本発明は、大部分の現存手法に使用されている容器の壁の隔離効果を除去する；(2)固体表面との直接接触により、液体低温気体、例えば $\text{N}_2$ 中に投入された試料周囲の低温気体の隔離効果が除去され、より良好な熱伝導が提供され、その結果、より効率的なガラス化が提供される。卵母細胞の保存における本発明の効率は他の公表されたいずれの方法よりも高く、実行する場合に安価であると考えられる。

## 【0023】

好ましい具体例において、ガラス化/融解された卵母細胞を体細胞核移植のためのレシピエントとしてうまく用いて高度な胚盤胞の発生を行わせることができる。この知見は核移植の研究および実用に重要な意味を持つ。

10

20

30

40

50

## 【0024】

以前、Limらは凍結融解された成熟ウシ卵母細胞のIVF後の胚盤胞段階の胚を得た(Lim et al., Theriogenology 35: 1225 - 1235 (1991))。その後、いくつかのチームがウシ卵母細胞の低温保存の可能性について調べた。しかしながら、卵母細胞の生存およびその後の胚盤胞の発生は0ないし10%の低い範囲のままであった(Fuku et al., Cryobiology 29: 485 - 492 (1992); Fuku et al., Cryobiology 29: 485 - 492 (1992); Otoi et al., Theriogenology 38: 711 - 719 (1992); Otoi et al., J. Reprod. Dev. 41: 361 - 366 (1995); Otoi et al., Theriogenology 40: 801 - 807 (1993); Dinnyes et al., Cryobiology 31: 569 - 570 (1994); Otoi et al., Cryobiology 37: 77 - 85 (1998); Lim et al., Theriogenology 37: 351 - 361 (1992); Schellander et al., Theriogenology 42: 909 - 915 (1994))。いくつかの限定された研究(Hamano et al., Theriogenology 38: 1085 - 1090 (1992); Otoi et al., Theriogenology 38: 711 - 719 (1992); Suzuki et al., Cryobiology 33: 515 - 524 (1996); Kubota et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 281 - 286 (1998); Vajta et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 53 - 58 (1998))は凍結融解されたウシ卵母細胞に由来する胚の移植後に妊娠および生誕を起こさせた。勇気付けられることに、最近のガラス化法の発達は成功率を上昇させ、ガラス化された成熟ウシ卵母細胞のIVF由来の胚盤胞について、25%にまで(Vajta et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 53 - 58 (1998))および30%にまで(Papis et al., Theriogenology 51: 173 (1999) (abstr.))であると報告されている。これらの改善された成功率は、卵母細胞ガラス化中の冷却速度の上昇によると考えられている(Vajta et al., Embryo Transfer Newsletter 15: 12 - 18 (1997))。しかしながら、本発明の方法によれば、低温保存後の形態学的に無傷な卵母細胞の割合は86%と高く、以前の結果をはるかに凌ぐものであった。

## 【0025】

本発明の好ましい具体例において、ガラス化溶液中に懸濁された卵母細胞を低温保存するための改良された方法が提供され、改良は、卵母細胞を含むガラス化溶液の微小液滴を、約-150ないし約-180の温度を有する固体表面と接触させ、該表面は良好な熱伝導率を有することを特徴とする。本発明のもう1つの具体例において、ガラス化溶液中に懸濁された卵母細胞を低温保存するための改良された方法が提供され、改良は、卵母細胞を含むガラス化溶液の微小液滴を、約-150ないし約-180の温度を有する固体表面と接触させ、該表面は20において約10W/(m-k)よりも大きい熱伝導率を有することを特徴とする。

## 【0026】

本発明のもう1つの好ましい具体例において、下記工程：(1)低温保護平衡化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護するに十分な濃度以下の低温保護剤(複数も可)の濃度を有する低温保護平衡化媒体に卵母細胞を懸濁し；(2)平衡化された卵母細胞をガラス化溶液で濯ぎ、ガラス化溶媒体は、ガラス化媒体のガラス転移温度まで氷の形成に対して保護を行うに十分な低温保護剤(複数も可)の濃度を有するものであり；次いで(3)ガラス化溶液で濯がれ、ガラス化溶液の微小液滴中にある卵母細胞を、すでに約-150ないし約-180まで冷却された良好な熱伝導率を有する固体表面上に滴下することを含む、卵母細胞のガラス化方法を提供する。ガラス化に使用される卵母細胞は、低

温保存溶液中に卵母細胞を置く前に、それらの卵丘細胞から部分的に（3～5層の内層を除く）あるいは完全に剥ぎ取られたものであってもよい。当業者は、必要に応じて融解されたガラス化卵母細胞を核移植クローニング法に使用することができる。

【0027】

本発明のもう1つの具体例において、胚盤胞の発生速度を増加させる方法が提供される。限定的なK S O M プラス B S A 培養系において、卵丘細胞との同時培養によりガラス化卵母細胞の単為生殖的発生が有意に改善されることが、本発明者らにより見出された。かかる方法を用いた単為生殖的発生が胚盤胞の発生を32%まで増大させることが、本発明者らにより見出された。

【0028】

発明の詳細な説明

本発明は、生物学的試料、特に、細胞性材料を低温保存するための新たな方法を開示し、該方法によれば、材料の生物学的機能性が温めた後も保存される。特に、本発明は、卵母細胞および胚をガラス化および融解する方法を開示する。すでにガラス化された卵母細胞中への体細胞核移植のための方法がさらに開示される。

【0029】

本発明による哺乳動物卵母細胞の低温保存は、核移植およびインビトロでの胚の製造のための安定したソースを提供する。単為生殖的活性化の研究および実施、インビトロでの生殖および核移植のための、ウシ卵母細胞を低温保存するための有効なガラス化プロトコルが本発明により提供される。

【0030】

本発明の好ましい具体例において、インビトロで成熟したウシ卵母細胞を、TCM199 プラス20%ウシ胎児血清(FBS)中4%エチレングリコール(EG)中に、39で12～15分間置き、ついで、ガラス化溶液(TCM199および20%FBS中35%EG, 5%ポリビニル-ピロリドン(PVP), 0.4Mトレハロース)に移した。前もって冷却された(-150)金属表面上で液滴中の卵母細胞をガラス化させた(固体表面ガラス化またはSSV)。ガラス化した微小液滴を液体N<sub>2</sub>中に保存し、即座に融解、あるいは保存後2～3週間またはそれ以後必要なときに融解した。

【0031】

本発明によりガラス化/融解された卵母細胞の直接の生存率は、BSAまたはFBSを含むK S O M 中で9ないし10日間培養されて処理された卵母細胞に関して77%ないし86%の間であることが、本発明者らにより見出された。核移植に関しては、ガラス化卵母細胞は、新鮮卵母細胞と同等に胚の発生を支持したことが注目された。

【0032】

いかなる理論にも限定するのではなく、本発明者らは、ウシ卵母細胞のガラス化後の比較的高い凍結-生存率、および胚の発生がいくつかの因子によるものである可能性を明らかにした。同様に、使用される固体金属表面ガラス化法は、金属表面との直接接触により、微小液滴と改善された熱交換との組み合わせによる高い冷却速度を達成する。卵母細胞を温めることは、ガラス化した試料を温かい溶液中に直接滴下する場合と同等の迅速さである。

【0033】

高い成功率はいくつかのプロセス上の修飾によるものであるかもしれず、それらのいくつかは他者により報告された最近の開発に基づいて行われた(Vajta et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 53 - 58 (1998); Martin et al., Biol. Reprod. 54: 1059 - 1069 (1996); Dinnyes et al., Cryobiology 31: 569 - 570 (1994); Otoi et al., Cryobiology 37: 77 - 85 (1998); Papis et al., Theriogenology 51: 173 (1999) (abstr.); Vincent et al., Cryo-Lett. 8: 356 - 361 (1988))。特に、本発明は、生理学的温度ま

10

20

30

40

50

たはそれに近い温度の溶液中の卵母細胞を取り扱い、その後、ガラス化温度まで急速に冷却し、ガラス化温度から温めて、冷却によりダメージを「回避」するものであった。

【0034】

ウシ卵母細胞は冷却に対して非常に感受性があることが知られており (Aman et al., Biol. Reprod. 50: 103 - 110 (1994); Martino et al., Mol. Reprod. Dev. 45: 503 - 512 (1996); Parks et al., Theriogenology 37: 59 - 73 (1992)); 未成熟卵母細胞 (GV段階) は成熟卵母細胞よりも感受性が高いことが報告されている (Fuku et al., Cryobiology 29: 485 - 492 (1992); Lim et al., Theriogenology 37: 351 - 361 (1992)). ParksおよびRuffing (Parks et al., Theriogenology 37: 59 - 73 (1999)) ならびにAmanおよびParks (Aman et al., Biol. Reprod. 50: 103 - 110 (1994)) は、わずか1分で25 と4 との間の冷却後の中期I紡錘体のダメージについて報告している。本明細書に記載のごときガラス化法は、凍結法と比べて、卵母細胞がクリティカルな冷却温度にさらされる時間を短くすることができ、かくして、慣用的な卵母細胞およびインビトロで製造された胚の凍結法 (Palasz et al., Biotechnol. Adv. 14: 127 - 149 (1996); Martino et al., Biol. Reprod. 54: 1059 - 1069 (1996); Vajta et al., Embryo Transfer Newsletter 15: 12 - 18 (1997)) よりも優れている可能性がある。

【0035】

本発明の好ましい具体例において、ウシ卵母細胞または胚の低温保存が下記のごとく行われる：

卵母細胞または胚を、20%ウシ胎児血清、またはウシ血清アルブミン、または界面活性剤効果を有する他の高分子を補足した基本培地 (TCM199または類似の溶液) 中の4% (v/v) エチレングリコールまたは中程度の濃度の他の細胞内低温保護剤からなる平衡化媒体中に、室温またはそれより高い温度、あるいは生理学的温度 (例えば39 ) で数分間懸濁する。この平衡化期間後、卵母細胞または胚の群を、基本培地および20%ウシ胎児血清または上記の他の界面活性剤化合物中の35%エチレングリコール (または高濃度の他の細胞内低温保護剤)、5%ポリビニルピロリドン (または他の高分子物質)、0.4Mトレハロース (または他の糖類) からなるガラス化溶液の小さな液滴中で少なくとも2回、数秒間濯ぎ、次いで、液体または固体窒素中あるいは他の冷却剤中に部分的に浸漬することにより約 -150 ないし -180 または類似の零下温度に冷却されているスチール製キューブ表面上または良好な熱伝導率を有する他の固体表面上に滴下する。液滴サイズは約4 $\mu$ lまたはそれ以下が好ましく、より好ましくは3 $\mu$ lまたはそれ以下、さらに好ましくは2 $\mu$ lまたはそれ以下、さらにより好ましくは1 $\mu$ lまたはそれ以下であり、そのことにより即座にガラス化が可能となる。窒素で冷却したかん子または他の道具を用いてガラス化した液滴を1mlの凍結バイアルまたは他の適当な容器中に移動させることができる。

【0036】

図1は、本開示を用いて低温保存するのに有用な固体表面ガラス化デバイス (10) の断面図を示す。金属キューブ (15) はアルミニウム箔のごとき箔 (20) で被覆されており、容器 (30) により保持されて部分的に液体N<sub>2</sub> (25) 中に浸されている。卵母細胞のごとき生物学的試料を含むガラス化溶液の微小液滴 (35) が金属キューブ (15) の冷却された上面 (40) に滴下され、即座にガラス化される。

【0037】

本発明者らは、ガラス化前における卵母細胞を囲む少量の卵丘細胞層の存在は、単為生殖的活性化後の分割および発生速度に有害な影響を及ぼさないことを見出している。卵丘細胞

胞の存在は、IVF後の高い受精率を達成するための重要因子でありうるが、核移植実験では除核前に卵丘細胞を除去することが必要である。ガラス化/融解された卵母細胞はより壊れやすいように思われ、核移植操作前の卵丘細胞除去に関して注意を払わなくてはならない。

**【0038】**

ガラス化卵母細胞の単為生殖的活性化は対照と比べて減じられるかもしれないが、培養条件を変化させることにより単為生殖的活性化を有意に改善することができる。例えば、K SOM プラス FBS 培地中での卵丘細胞との同時培養を用いることにより、ガラス化卵母細胞の単為生殖的発生がさらに促進された。

**【0039】**

窒素容器の気相中での保存中、あるいは保存前後の取り扱い中に温度の変動が起こった場合には、インピトロで受精した卵母細胞の発生もまたガラス化により減じられるかもしれない。液相保存を用いてかかる影響を減じてもよい。減じられた発生能は障害を受けた受精によるものではないことが研究により示唆されている(ウシを用いた研究である Martino et al., Theriogenology 37: 59-73 (1992) および Kubota et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 281-286 (1998) 参照、さらに凍結はマウスにおいて多精子受精に対する帯状ブロックの失敗を引き起こすようであったという Ito et al., Mol. Reprod. Dev. 54: 81-85 (1999) 参照)。

10

**【0040】**

通常には、核移植実験にはインピボまたはインピトロで成熟した卵母細胞由来のレシピエント細胞質体を用いられる。以前、本発明者らは、凍結-融解された卵母細胞を、分割球を用いる核移植に使用することができ、この方法によりウシが得られたことを示した(Kubota et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 281-286 (1998))。ウシ卵母細胞に関する本発明の低温保存法は、核移植の研究および実施に有意な利益をもたらす。なぜなら、本発明の方法は、季節的な変動ならびに屠殺および卵母細胞輸送のタイミングへの依存をなくすからである。

20

**【0041】**

今回開示した方法に従えば、大多数の卵母細胞(94%)が当該ガラス化法で生き残るであろうし(対照と相違ない生存率)、その生存率は初期の凍結実験で達成された生存率(Ito et al., Mol. Reprod. Dev. 54: 81-85 (1999) (62%) および Kubota et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 281-286 (1998) (74%)) よりもずっと高い。生き残った卵母細胞は核移植法に有効に使用でき、ガラス化-融解卵母細胞に関して除核率の低下はない。臨界温度ゾーンに曝露する時間を短縮することにより、ガラス化は有益であると仮定されている。なぜなら、卵母細胞を即座に冷却してガラス化状態にすることは紡錘体脱ポリマー化の時間を与えないからである(Vajta et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 53-58 (1998); Martino et al., Biol. Reprod. 54: 1059-1069 (1996))。

30

**【0042】**

本発明は、新鮮対照で見られる割合に匹敵する高い融合、分割および胚盤胞発生の割合をもたらす。本発明者らの知識に対して、本発明は、体細胞核ドナーのためのレシピエントとしての低温保存された卵母細胞の使用をはじめて示唆するものであり、胚盤胞発生速度が大きいことが約束されている。卵母細胞のオープン-プルドストローガラス化(open-pulled straw vitrification)を行うための初期の試みならびに分割球核移植実験は、新鮮レシピエント細胞質体と比較して、胚盤胞発生速度の有意な低下を生じさせた(それぞれ34.5%、9.1%)(Peura et al., Theriogenology 51: 211 (abstract) (1999))。

40

**【0043】**

簡単に説明すると、本発明の低温保存法は、融解後の生存率を高め、活性化後に高い分割

50

率を示すように卵母細胞を保存することができる。そのような卵母細胞は、単為生殖的活性化、インビトロ受精、次いで核移植された後、発生して形態学的に良好な品質の胚盤胞となる。ガラス化・融解されたMII卵母細胞を用いて体細胞核移植された胚について、新鮮卵母細胞を核レシピエントとした場合と比較して同様の発生速度が観察される。得られた核移植された胚を用いて子孫を得てもよい。

#### 【0044】

より明確に本発明を説明するために、使用した一般的材料および方法とともに実施例を以下に示す。下記実施例は限定的なものではなく、本発明の種々の態様および特徴の単なる典型例にすぎない。

#### 【0045】

##### 典型的な実施例

##### 材料および方法

##### 1. 卵母細胞のソース

屠殺場の卵巣からウシ卵巣を集め、成熟媒体中約37 ないし39 で19時間以内に成熟が開始した。形態に基づいて成熟した卵丘卵母細胞を選択した。次いで、成熟後20~23時間後にそれらを低温保存して、核移植、単為生殖的活性化、次いでインビトロ受精アッセイ用とした。

#### 【0046】

##### 2. ガラス化および融解

0.1%ヒアルロンダーゼ(Sigma, St Louis, MO, Cat. No. H3506)に短時間曝露し、次いでピペティングすることにより成熟卵母細胞を部分的(3~5層の内層を除く)または完全にその卵丘細胞から剥した。20%(v/v)ウシ胎児血清(FBS, Gibco, Hyclone, Cat No. 01199-41)を補足したEagle塩含有TCM199(Gibco, Paisley, Scotland, Cat. No. 04101150H)で卵母細胞を3回洗浄し、次いで、20%FBS補足TCM199中4%(v/v)エチレングリコール(EG, Sigma, Cat. No. E9129)からなる平衡化媒体中に、39 で12~15分懸濁した。平衡化後、TCM199および20%FBS中35%EG、5%ポリビニル-ピロリドン(Sigma, Cat. No. P0930)、0.4Mトレハロース(Sigma, Cat. No. T0167)からなるガラス化溶液の小さな液滴中で5 ないし10個の卵母細胞の群を25~30秒間、3回濯ぎ、次いで、トレハロース溶液中に置き(溶液毒性対照)、あるいはアルミニウム箔で覆われ、液体N<sub>2</sub>中に部分的に浸すことにより約-150 ないし-180 にまで冷却されたスチール製キューブ上に滴下した。

#### 【0047】

金属表面上に置かれた液滴のサイズは1ないし2μlであり、即座にガラス化された。窒素で冷却したかん子を用いてガラス化液滴を1mlの凍結バイアル中に移して長期(2~3週間)保存用とし、あるいは即座にそれらを39 の0.3Mトレハロース溶液に滴下し3分間おいた。その後、卵母細胞膜および透明帯の完全性に基づいて卵母細胞生存率を評価した。生き残ったガラス化・融解された卵母細胞を活性化、インビトロ受精、または核移植実験に供した。

#### 【0048】

##### 3. 卵母細胞の単為生殖的活性化

Susko-Parrishら(Susko-Parrish et al., Dev. Biol. 166: 729-739 (1994))により記載された方法を修飾し、単為生殖的活性化に使用した。合計22時間(融解後のMII卵母細胞の場合はさらに30分)インビトロ成熟培養(IVM)した後、ピペティングにより卵母細胞を完全に卵丘から剥ぎ取った。室温で5分間Ca-イオノフォアA23187(Sigma, Cat. No. C7522)に曝露し、次いで、2.5mMの6-ジメチルアミノプリン(DMAP, Sigma Cat. No. D2629)中で3.5時間培養することによ

10

20

30

40

50

り卵母細胞を活性化させた (Liu et al., Mol. Reprod. Dev. 49: 298-307 (1998))。洗浄後、処理された卵母細胞をKSOM (Liu et al., Mol. Reprod. Dev. 49: 298-307 (1998)) プラス0.1% BSA (フラクションV, Sigma, A941B) 中でさらに48時間培養した。培養環境は、39において加湿空气中5% CO<sub>2</sub>、あるいは5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、および90% N<sub>2</sub> からなっていた。形態学的生存率ならびに分割率を記録した。すべての分割胚を1% BSA補足KSOM培地中でさらに7日間培養した。

#### 【0049】

##### 4. インビトロ受精および培養

ガラス化融解された卵母細胞およびガラス化されていない新鮮対照卵母細胞を、1回射精により得られ、凍結融解されたウシ精液で受精させた。凍結融解された精子を、10mMカフェインおよび4mg/mlのBSAを補足したBrackett-Oliphant (Liu et al., Mol. Reprod. Dev. 49: 298-307 (1998)) 培地中で遠心分離することにより2回洗浄し、次いで、受精媒体 (10μg/mlのヘパリンおよび4mg/mlのBSAを補足したm-BO媒体) 中に再懸濁した。精子濃度を1×10<sup>7</sup>個/mlに調節し、次いで、100μlの受精媒体液滴に約25個の卵母細胞を添加した。精子-卵母細胞インキュベーションを6時間行った後、卵母細胞を洗浄し、加湿空气中5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、および90% N<sub>2</sub> 雰囲気下で、0.1% BSAを補足したKSOM培地中、39で48時間培養した。48時間培養後、ピペティングによりIVF卵から卵丘細胞を除去し、分割率を記録した。5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、および90% N<sub>2</sub> 雰囲気下で、1% BSA補足KSOM中で分割胚をさらに7日間培養した。培養期間中2日ごとに培地を交換した。

#### 【0050】

##### 5. 核移植

IVMで20時間後、ガラス化融解された中期IIの卵母細胞ならびに新鮮対照卵母細胞を卵丘細胞から剥し、第一極体の存在により選択した。透明帯にガラス針を刺し、極体および周囲の細胞質体を押し出すことにより脱核を行った (Kubota et al., Mol. Reprod. Dev. 51: 281-286 (1998))。押し出された核体をHoechst 33342で蛍光染色することにより脱核の成功を確認した。その後、4ないし6日間血清枯渇させた29~31代目の集密線維芽細胞を個々に脱核卵母細胞の卵空間 (細胞質体) 中に移植した。その後、ガラス化融解された卵母細胞由来の細胞質体-線維芽細胞複合体を、Zimmerman細胞融合媒体 (Zimmerman et al., J. Membrane Biol. 67: 165-182 (1982)) 中に置かれた1mmギャップの電気融合チャンパー中でBTX200 Electro Cell Manipulator (San Diego, CA) により2回DCパルス (50V/mm, 10μsec, 1秒間隔) をかけることにより融合させ、活性化させた (新鮮対照卵母細胞由来の細胞質体-線維芽細胞複合体を用いて同様に行った)。それらの細胞を、10μg/mlシクロヘキシミド (Sigma, Cat. No. C6255) および2.5μg/mlサイトカラシン-D (Sigma, Cat. No. C8273) および0.1% BSAを補足したKSOM培地中で1時間培養し、さらにシクロヘキシミド (10μg/ml) およびBSAを含有する (サイトカラシン-D不含) KSOM培地中で4時間培養した。活性化後、5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、および90% N<sub>2</sub> 雰囲気下にてKSOMおよび0.1% BSA培地中で胚をさらに48時間培養した。その後、分割胚を選択し、空气中5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、5% FBSを補足したKSOM中、卵丘細胞単層上でさらに7日間培養した。培養期間中2日ごとに培地を交換した。未分割卵を染色して未融合細胞質体-線維芽細胞複合体の割合をチェックした。形態学的に高品質の核移植胚盤胞をVS3a法 (Rall et al., J. Reprod. Fert. 101: 681-688 (1994); Dinnyes et al., Mol. Reprod. Dev. 53: 318-324 (1999)) を

10

20

30

40

50

用いてガラス化させ、将来の胚移植目的のために保存した。卵母細胞低温保存法の対照として、核移植実験に使用される、ガラス化 - 融解群からのいくつかの卵母細胞をすでに記載したようにして活性化させ (Ca - イオノフォアおよびDMAPI)、核移植胚と同様に培養した。

【0051】

6. 統計

すべての実験を少なくとも3回繰り返した。卵母細胞の発生を評価し、カイ - スクエア分析を用いて処理を比較した。

【0052】

実験例 1

ガラス化卵母細胞の単為生殖的発生

プロトコル：成熟卵母細胞をガラス化融解させ、上記のごとく単為生殖的に活性化させた。冷却しない場合のガラス化溶液の毒性を試験し、低温保存前に卵丘細胞が存在する場合、除去した場合の影響を比較した。さらに、酸素高含量 (20%) および低含量 (5%) 雰囲気における活性化卵母細胞の培養を、2つの別個の試行において試験した。

【0053】

結果：単為生殖的活性化実験の結果を表1および表2に示す。表1は卵丘細胞の存在下および不存在下でガラス化され、空气中5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養された成熟卵母細胞の単為生殖的発生の結果を示す。

【0054】

【表1】

表1

ガラス化/融解された成熟ウシ卵母細胞の、空气中5%CO<sub>2</sub>下における単為生殖的発生

処理された卵母細胞	数	卵母細胞生存率%	分割率% 2日目 <sup>a</sup>	胚盤胞(BL)% <sup>a</sup>			膨張または 孵化した BL% <sup>a</sup>
				7日目	8日目	9日目	
ガラス化 +卵丘細胞	42	86 <sup>b</sup>	64 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>
ガラス化 -卵丘細胞	68	79 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
ガラス化 させず	47	100 <sup>c</sup>	81 <sup>c</sup>	13 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 生存卵母細胞基準

<sup>b,c</sup> 同じ欄中の異なる肩文字を有するグループは有意に異なる (P<0.05)

【0055】

表2は、同様の処理を行ったが、O<sub>2</sub> 含量を減じた (5%) 雰囲気下で胚を培養した場合の発生のデータをまとめる。卵母細胞の直接の生存率 (すなわち、培養期間開始から融解後に至るまで溶解がないこと) は77%ないし86%であったが、ガラス化前の卵丘の有

10

20

30

40

50

無により相違はなかった ( $P > 0.05$ )。

【0056】

【表2】

表2

5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>および90% N<sub>2</sub>の雰囲気下で培養された、ガラス化/融解された成熟ウシ卵母細胞の単為生殖的発生

処理された卵母細胞	数	卵母細胞生存率%	分割率% 2日目 <sup>a</sup>	胚盤胞(BL)% <sup>a</sup>			膨張または 孵化した BL% <sup>a</sup>
				7日目	8日目	9日目	
ガラス化 +卵丘細胞	127	77 <sup>b</sup>	56 <sup>b</sup>	11 <sup>bc</sup>	14 <sup>bc</sup>	17 <sup>bc</sup>	14 <sup>bc</sup>
ガラス化 -卵丘細胞	118	81 <sup>b</sup>	56 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>
溶液のみ	85	94 <sup>c</sup>	69 <sup>bc</sup>	16 <sup>cd</sup>	23 <sup>cd</sup>	30 <sup>cd</sup>	25 <sup>c</sup>
ガラス化 させず	98	98 <sup>c</sup>	79 <sup>c</sup>	27 <sup>d</sup>	32 <sup>d</sup>	32 <sup>d</sup>	26 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 生存卵母細胞基準

<sup>b, c, d</sup> 同じ欄中の異なる肩文字を有するグループは有意に異なる ( $P < 0.05$ )

10

20

30

40

50

【0057】

遡及的に比較した場合、O<sub>2</sub>含量の低い雰囲気での培養は、高いO<sub>2</sub>レベル(20%)での処理よりも優れた ( $P < 0.05$ ) 胚盤胞発生を引き起こした。高いO<sub>2</sub>レベルでの実験において、活性化された未凍結対照の分割率は、ガラス化/融解された群のそれよりも有意に大きかったが ( $P < 0.05$ )、胚盤胞の発生には相違がなかった ( $P > 0.05$ )。減じられたO<sub>2</sub>での実験において、ガラス化卵母細胞の分割および胚盤胞発生は対照のそれよりも劣っていたが ( $P < 0.05$ )、融解処理だけではこれらのパラメーターは減少しなかった ( $P > 0.05$ )。卵丘細胞存在下または不存在下でガラス化された卵母細胞の発生は培養環境にかかわらず有意には異ならなかった ( $P > 0.05$ )。ガラス化され融解処理された群からの胚盤胞の形成は、新鮮対照のそれよりも約1日遅れるようであった。ガラス化された卵母細胞から発生する胚盤胞の膨張および孵化率は対照からのものよりも有意に遅かった ( $P < 0.05$ )。

【0058】

本研究において、ガラス化溶液の毒性試験(実験例1)によれば、対照と比較した場合、分割および胚盤胞発生の低下は示されなかった。我々の初期の結果は、エチレングリコールがウシ卵母細胞に対して比較的低い毒性を有することを示し(Dinnyes et al., Cryobiology 31: 569-570 (1994))、ガラス化前に低濃度の低温保護剤溶液で徐々に平衡化することが有益であることが他人により報告されている(Papis et al., Theriogenology 51: 173 (1999) (abstr.))。比較的分子量および高浸透率の低温保護剤(エチレング

リコール)、増粘性化合物(ポリビニルピロリドン)および膜保護性糖類(トレハロース)の混合物の使用は、溶液への短時間の曝露であっても卵母細胞のガラス化を引き起こすことを確実にした。同様の混合物がウシ胚のガラス化にうまく用いられた(Saha et al., Cryobiology 33: 291-299 (1996))。冷却前および融解後における高濃度のエチレングリコールへの非常に短時間の曝露はその毒性効果を減少させた。そのうえ、融解中の毒性効果は直接希釈法により最小化された。

【0059】

#### 実験例 2

##### 受精したガラス化/融解された卵母細胞のインビトロでの発生

プロトコル: 上記のようにして、ガラス化-融解された卵母細胞をインビトロで受精させた。実験例1から得られた結果に基づいて、ガラス化前に卵丘を部分的に除去しただけであった。対照卵母細胞をヒアルロニダーゼで処理し、受精前にそれらの周囲の卵丘層を同様に部分的に除去した。ガラス化卵母細胞を即座に融解し、あるいは数日または数週間液体窒素容器中に保存した。受精した接合体を、低O<sub>2</sub>含量雰囲気下でさらに培養した。

10

【0060】

結果: インビトロで受精した新鮮卵母細胞およびガラス化/融解卵母細胞の発生を表3に示す。卵母細胞の直接の生存率(対照93%に対し85%)はガラス化によりわずかに低下した。生き残った卵母細胞の分割率は有意には異ならなかったが(69%に対し58%、 $P > 0.05$ )、ガラス化卵母細胞の胚盤胞発生は対照のそれよりもわずかに低下していた(35%に対し20%)。さらにそのうえ、卵母細胞の長期にわたる保存は、さらに有意な胚盤胞発生低下を生じさせた(20%に対し11%、 $P < 0.05$ )。膨張し孵化した段階への発生はガラス化によっては有意には抑制されなかった(19%に対し12%、 $P > 0.05$ )。しかしながら、卵母細胞の低温保存は孵化率に対して負の影響を及ぼした(19%に対し6%、 $P < 0.05$ )。

20

【0061】

【表3】

表 3

インビトロでの受精後の、ガラス化／融解された成熟ウシ卵母細胞のインビトロでの発生

処理された 卵母細胞	数	卵母細胞 生存率%	分割率% 2日目 <sup>a</sup>	胚盤胞(BL)% <sup>a</sup>			膨張または 孵化した BL% <sup>a</sup>
				7日目	8日目	9日目	
ガラス化／ 融解	175	85 <sup>bc</sup>	58 <sup>b</sup>	15 <sup>c</sup>	19 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	12 <sup>bc</sup>
ガラス化／ 保存／融解	258	81 <sup>b</sup>	62 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>
ガラス化 させず	98	98 <sup>cd</sup>	69 <sup>b</sup>	24 <sup>cd</sup>	33 <sup>d</sup>	35 <sup>d</sup>	19 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 生存卵母細胞基準

<sup>b,c,d</sup> 同じ欄中の異なる肩文字を有するグループは有意に異なる (P<0.05)

10

20

## 【 0 0 6 2 】

## 実験例 3

## ガラス化／融解卵母細胞を用いてクローン化された胚の発生

プロトコル：ガラス化 - 融解された卵母細胞を脱核し、体細胞核移植のためのレシピエント細胞質体として使用した。ガラス化および新鮮卵母細胞の脱核、融合、分割および胚盤胞発生率を比較した。ガラス化および培養系の対照群として、いくつかのガラス化 - 融解された卵母細胞を単為生殖的に活性化させ、さらに培養した。接合体を、低O<sub>2</sub>含量雰囲気下で最初の2日間培養し、そして高O<sub>2</sub>含量雰囲気下で卵丘細胞と同時培養した。

30

## 【 0 0 6 3 】

結果：ガラス化および新鮮卵母細胞を細胞質体ソースとした場合の核移植実験に関するデータを表 4 に示す。

## 【 0 0 6 4 】

## 【表 4】

表 4

新鮮レシピエント卵母細胞またはガラス化／融解されたレシピエント卵母細胞からの、ウシ核移植胚のインビトロでの発生

レシピエント 卵母細胞／処理	数	融 合 率%	2 日目の 分割率 % <sup>a</sup>	胚盤胞(BL)% <sup>a</sup>			膨張または 孵化した BL% <sup>a</sup>
				7 日目	8 日目	9 日目	
ガラス化／NT	106	62 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	20 <sup>bc</sup>
新鮮／NT	106	74 <sup>b</sup>	90 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>
ガラス化／ 活性化	109	-	56 <sup>c</sup>	25 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 融合胚または活性化卵母細胞基準

<sup>b,c</sup> 同じ欄中の異なる肩文字を有するグループは有意に異なる (P<0.05)

10

20

## 【 0 0 6 5 】

大部分の卵母細胞 ( 2 5 2 個 / 2 6 9 個、 9 4 % ) がガラス化プロセス後に生き残った。新鮮卵母細胞およびガラス化卵母細胞の脱核率は異ならなかった ( それぞれ 1 2 7 個 / 1 3 9 個、 9 1 % ; 1 4 2 個 / 1 6 3 個、 8 7 % ; P > 0 . 0 5 ) 。新鮮あるいはガラス化／融解卵母細胞から得られた細胞質体との融合率 ( 6 2 % に対し 7 4 %、 P > 0 . 0 5 ) は異ならなかった。その後の分割段階 ( 8 5 % に対し 9 0 % )、胚盤胞段階 ( 2 7 % に対し 2 9 % ) あるいは孵化胚盤胞段階 ( 2 0 % に対し 2 2 % ) への胚の発生はいずれも統計学的には異ならなかった ( P > 0 . 0 5 ) 。単為生殖的に活性化されたガラス化／融解卵母細胞の分割率 ( 5 6 % ) は、核移植胚のそれより有意に低かったが ( P < 0 . 0 1 )、胚盤胞段階への発生率 ( 3 2 % ) は異ならなかった。単為生殖的活性化後に卵母細胞が膨張あるいは孵化胚盤胞段階へと到達する割合は核移植後よりも低かった ( 1 0 % ) 。

30

## 【 0 0 6 6 】

本発明を好ましい具体例に関して説明したが、当業者は、添付した特許請求の範囲の精神または範囲から離れることなく、本発明に対して種々の変更および／または修飾を行うことを容易に理解するであろう。本明細書において引用したすべての文献を本明細書に一体化させる。

## 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明の固体表面ガラス化 ( S S V ) デバイスの断面図を示す。

40

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
12 July 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/49112 A2**

- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: **A01N**
- (74) Agent: **MOORE, Steven, J.**, Cummings & Lockwood, 700 State Street, P.O. Box 1960, New Haven, CT 06509-1960 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/00395
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 4 January 2001 (04.01.2001)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
 

60/174,383	4 January 2000 (04.01.2000)	US
60/174,424	4 January 2000 (04.01.2000)	US
60/215,433	30 June 2000 (30.06.2000)	US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **UNIVERSITY OF CONNECTICUT** [US/US]; 263 Farmington Avenue, Farmington, CT 06030-6207 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **YANG, Xiangzhong** [US/US]; 131 Birch Road, Storrs, CT 06262 (US). **DINNYES, Andras** [HU/HU]; Karpát U-48, H-1133 Budapest (HU).

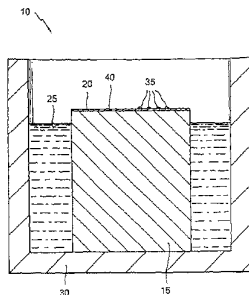
**Published:**  
— Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/49112 A2

(54) Title: OOCYTE VITRIFICATION TECHNIQUE



(57) Abstract: A new method of cryopreservation based on the very fast cooling rates achieved by the direct contact of small droplets of vitrification solution containing biological sample with a very cold solid surface.

WO 01/49112

PCT/US01/00395

**OOCYTE VITRIFICATION TECHNIQUE****RELATED ART**

This application claims priority from U.S. Provisional Patent Applications Nos. 60/174383 and 60/174424, both filed January 4, 2000, and U.S. Provisional Patent Application 60/215,433, filed June 30, 2000, the disclosures of which are incorporated by reference in their entirety herein.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**1. Field of the Invention

The present invention generally relates to a method for the cryopreservation of biological samples. More particularly, the present invention relates to a method for the cryopreservation of biological samples in solution based on very fast cooling rates achievable by contacting small droplets of the solution on a very cold solid surface. The cryopreservation method has been found to be particularly useful in the cryopreservation of oocytes and embryos, in particular mammalian embryos.

10 2. Background of Related Art

It is frequently the case that one desires to maintain biological samples for long periods of time, for example when the sample is desired to be used for a particular purpose at a later time. Unfortunately, as recognized by those of ordinary skill in the art, the freezing, cryopreservation and thawing, of biological samples using presently available techniques often is less than optimal, as biological activity of the biological sample is often significantly diminished. As the practical use of certain biological techniques dictates certain cells be stored for long periods of time, there has been a growing demand for new method of preserving biological samples, in particular cellular material, such the

biological functionality of the material is preserved after warming. A particular need for the preservation of biological materials has arisen in germ plasma, *in vitro* embryo production and nuclear transfer.

5 There has been an increasing effort to store the oocytes and embryos of many animal species. These efforts have arisen from a number of human desires including, but not limited to, the desire to preserve animal species in numerical decline, to breed animals by *in vitro* fertilization techniques to increase genetic diversity and to overcome infertility problems, and to clone animals with high economic potential. With the growing interest in oocyte preservation, there has become an increasing awareness that  
10 current biological preservation techniques are less than adequate to preserve the oocytes of many animals species. For example, it is known that cattle oocytes are very sensitive to low temperatures. Despite the efforts of numerous research groups (See review by Palasz *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 14: 127 - 149 (1996)) cattle oocyte preservation remains a difficult task. Only a limited number of publications reported blastocyst and subsequent calf  
15 development from cryopreserved oocytes and the results remain inefficient (Fuku *et al.*, *Cryobiology* 29: 485 - 492 (1992); Hamano *et al.*, *Theriogenology* 38: 1085 - 1090 (1992); Otoi *et al.*, *Theriogenology* 38: 711 - 719 (1992); Otoi *et al.*, *J. Reprod. Dev.* 41: 361 - 366 (1995); Suzuki *et al.*, *Cryobiology* 33: 515 - 524 (1996); Kubota *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1998); Vajta *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53 -58 (1998)).

20 It has been reported that the fertilization process can be compromised by the effect of cryoprotectants. A number of reports state that elevated concentrations of presently available cryoprotectants will have high toxicity with respect to oocytes and a negative effect on the subsequent development of oocytes and embryos (See, *e.g.*, Martino *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 45: 503 - 512 (1996); Palasz *et al.*, *Biotechnology Advances* 14:  
25 127 - 149 (1996); Parks *et al.*, *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992); Schellander *et al.*, *Theriogenology* 42: 909 - 915 (1994); Vajta *et al.*, *Embryo Transfer Newsletter* 15:12 - 18 (1997)). There are also reports of oocyte toxicity related to the cooling of cryopreservation (Parks *et al.*, *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992)). For example, exposure

WO 01/49112

3

PCT/US01/00395

to low temperature is known to result in de-polymerization of the meiotic spindle (Parks *et al.*, *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992); Peura *et al.*, *Theriogenology* 51: 211 (1999) (abstr.)). Previous experiments with frozen/thawed matured oocytes showed a significant reduction of enucleation rates when compared to fresh oocytes (Kubota *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1998)).

Efforts today have centered on improving the survival rates of stored oocytes by improving cryopreservation techniques. According to Martino *et al.* (Martino *et al.*, *Biol. Reprod.* 54: 1059 - 1069 (1996)), such efforts have focused on comparing different cryoprotectants (Otoi *et al.*, *Theriogenology* 40: 801-807 (1993); Dinnyes *et al.*, *Cryobiology* 31: 569 - 570 (1994)) and different freezing regimens (Lira *et al.*, *Theriogenology* 35: 1225 - 1235 (1991)); or related vitrification methods (Otoi *et al.*, *Theriogenology* 40: 801 - 807 (1993); Otoi *et al.*, *Cryobiology* 37: 77 - 85 (1998)).

By "cryopreservation" it is meant the storage of biological materials at below the freezing point of water such that the material does not decompose. By "vitrification" it is meant a process of cooling biological material, employing cryoprotectants (chemicals that protect water from freezing) to inhibit the formation of ice in the cooling process, to a temperature about -100 degrees Celsius or lower, such that the solution containing the biological material reaches its glass transition temperature, that is the molecules cease to move relative to each other. It is recognized in the art that ice formation is damaging to biological material, in that it forces the material into shrinking pockets of residual unfrozen solution. As cooling continues, more than eighty percent of tissue volume can become converted to ice, and cells crushed beyond recovery. During vitrification, liquid water molecules maintain their natural random arrangements during deep cooling. There is no disturbance of other chemicals or cell components. Successful vitrification techniques make use of supercooling, that is cooling below the freezing point of the cryoprotection solution without freezing. Cryoprotectants are typically toxic to cells at high concentrations. Rapid freezing is believed to work by decreasing the concentration

WO 01/49112

PCT/US01/00395

4

of cryoprotectant necessary to protect against ice crystal formation, thereby preserving the tissue at non-toxic concentrations of cryoprotectants.

It is believed that one of the bottlenecks of vitrification technology is the "insufficient" cooling rate of oocytes in current vitrification schemes (Vajta *et al.*, *Embryo Transfer Newsletter* 15: 12 - 18 (1997)). In order to overcome this problem, several methods have been proposed which use very small amounts of solution.

So-called "minimum drop vitrification" systems have allowed breakthrough results with bovine and porcine oocyte cryopreservation (See, *e.g.*, Arav A., *Vitrification of oocyte and embryos*, In: Lauria A, Gandolfi F (eds.), New trends in embryo transfer, Cambridge, England: Portland Press, 255 - 264 (1992)). In "minimum drop vitrification" small amounts of solution are placed on a special cryo-stage which is cooled down quickly. This method, unfortunately, has not been found by the art to be convenient for preserving large numbers of oocytes.

Other vitrification techniques have been reported. Methods utilizing few microliters of vitrification solution loaded into glass capillaries (Dinnyes *et al.*, *Cryobiology* 31: 569 - 570 (1994)), or into open pulled plastic straws (Vajta *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53 - 58 (1998)) and then plunged quickly into liquid N<sub>2</sub> were successfully tested for bovine oocyte vitrification. Similarly vitrification success was achieved by plunging oocyte-containing vitrification solutions with a small loop (Lane *et al.*, *Theriogenology* 51: 167 (1999) (abstr.)). However, such techniques have not been found highly efficient presumably because plunging a warm object into liquid N<sub>2</sub> results in the boiling of the liquid and for a short time creates an isolating layer of N<sub>2</sub> vapor around the object.

In order to reduce the possibility of an isolating layer of vapor interfering with efficient vitrification, it has been proposed that oocyte-containing vitrification solution be dropped directly into liquid N<sub>2</sub>. Such technique has been reported to be more

WO 01/49112

5

PCT/US01/00395

effective than prior art vitrification techniques. (Riha *et al.*, *Zivoc. Vir.* 36: 113 - 120 (1991); Papis *et al.*, *Theriogenology* 51: 173 (1999) (abstr.); Yang *et al.*, *Theriogenology* 51: 178 (1999) (abstr.)), presumably by eliminating the insulation effect of the vapor. However, such technique suffers from the problem of vitrified oocyte retrieval.

5           Some groups have reported improved success of the cryopreservation of biological materials by using metal surfaces cooled down with the aid of liquid N<sub>2</sub>. Such metal surfaces are asserted to provide a more efficient heat transfer and to increase further the cooling rates than the cryo-stages used in minimum drop vitrification. *Drosophila* embryos were successfully preserved by placing them in a metal grid on a cold metal surface (Steponkus *et al.*, *Nature* 345: 170 - 172 (1990)). Again, presently available  
10 techniques employing cooled metal surfaces have not been found convenient for preserving large numbers of oocytes.

          Currently, as a consequence of the limited survival of preserved oocytes, and the cumbersome techniques available, *in vitro* embryo production and nuclear transfer  
15 experiments in cattle rely on freshly collected oocytes. This is a major limitation to numerous research teams and presents an obstacle to efficient planning and organizing of experiments.

          There is a need therefore for improved biological material preservation methods, particularly those useful for preserving oocytes and other fragile cells. The  
20 method should permit the sterile handling of the biological material and preserve biological activity and viability for long periods of time.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

          The present invention provides a novel method for cryopreserving biological materials, particularly oocytes, embryos, and other cellular materials. It has  
25 been discovered by the present inventors that cryopreservation of biological materials may be accomplished by incorporating the material into very small droplets of a fluid

WO 01/49112

6

PCT/US01/00395

comprising a vitrification solution and then directly contacting the biological material-containing vitrification fluid with a very cold surface having good heat conductivity. All of these elements together result in a very high cooling rate.

The presently described invention provides extremely good results with respect to oocyte preservation, a problem that has plagued the prior art as discussed above. Improved preservation of oocytes provides both improved survival of the oocyte and a very improved ability to support the development of nuclear transfer embryos. The level of this improvement is clearly unanticipated, representing a ten fold increase in efficiency as compared to earlier reports (*See, e.g., Peura et al., Theriogenology* 51: 211 (1999) (abstr.))

The method of the present invention, referred to as the "solid surface vitrification" or "SSV" method, combines the advantages of the containerless vitrification in microdrops techniques, and the increased heat exchange of the cold metal surface techniques, described above. Furthermore, the clean metal surface facilitates the sterile handling of the droplets.

The solid surface vitrification method of the present invention may be used to cryopreserve various kind of living cells and tissues, including, but not limited to, cells and tissues from vertebrate and non-vertebrate animal species, as well as, plants. The method can be used with various combinations of cryoprotectant solutions, as known to those of ordinary skill in the art, when the concentration of cryoprotectant in the solution allows the vitrification process to take place, preferably without adversely affecting the biological activity of the biological material.

In one embodiment of the present invention, there is provided a method for the vitrification of biological materials, said method comprising the steps of: (1) suspending the biological material in a cryoprotective equilibration medium, having a concentration of cryoprotectant(s) below that sufficient to protect against ice formation to the glass transition temperature of the cryoprotective equilibration medium; (2) rinsing

WO 01/49112

PCT/US01/00395

7

the equilibrated biological material with a vitrification solution, the vitrification medium having a concentration of cryoprotectant(s) sufficient to protect against ice formation to the glass transition temperature of the vitrification medium; and (3) dropping the vitrification solution-rinsed biological material in microdroplets of vitrification solution  
5 onto a solid surface with good heat conductivity having been previously cooled down to about  $-150^{\circ}\text{C}$  to about  $-180^{\circ}\text{C}$ . By "good heat conductivity" it is meant a heat conductivity about that of a metal. A preferred thermal conductivity at  $20^{\circ}\text{C}$  is  $>$  about  $10 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{k})$ , more preferably  $>$  about  $25 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{k})$ , more preferably  $>$  about  $40 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{k})$ , and yet more preferably  $>$  about  $55 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{k})$ . By "microdroplet" it is meant a droplet containing  $10 \mu\text{l}$   
10 or less of solution. A preferred microdroplet volume is  $4 \mu\text{l}$  or less of solution, more preferably  $3 \mu\text{l}$  or less of solution, and yet more preferably  $1 \mu\text{l}$  or less of solution.

In another embodiment of the present invention there is provided an improved method for cryopreserving biological material suspended in a vitrification solution, wherein the improvement comprises contacting microdroplets of the vitrification  
15 solution containing the biological material with a solid surface having a temperature of about  $-150^{\circ}\text{C}$  to about  $-180^{\circ}\text{C}$ , said surface having a good heat conductivity. In another embodiment of the present invention there is provided an improved method for cryopreserving biological material suspended in a vitrification solution, wherein the improvement comprises contacting microdroplets of the vitrification solution containing  
20 the biological material with a solid surface having a temperature of about  $-150^{\circ}\text{C}$  to about  $-180^{\circ}\text{C}$ , said surface having a thermal conductivity at  $20^{\circ}\text{C}$  of  $>$  about  $10 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{k})$ .

Samples that are cryopreserved by the present vitrification technique can be warmed without significant deleterious effect of biological activity by placing the vitrified droplets directly into warm (about  $39^{\circ}\text{C}$ ) buffered solution (0.3 M prehalose solution) for  
25 several minutes (about 3 minutes) with or without added sugars or other osmotically active agents.

The present invention may in particular be used by researchers to compensate for the obstacles faced through fluctuations in oocyte availability and seasonal quality variations. Furthermore, preservation of endangered animals and farm animal breeds could be facilitated by the successful cryostorage of such oocytes. The present invention improves upon the existing technology in at least the following aspects: (1) it eliminates the isolating effect of the container's walls used in most of the existing techniques; (2) the direct contact with a solid surface eliminates the isolating effect of the low temperature gas around samples plunged into liquid low temperature gas, e.g., N<sub>2</sub>, and provides a better heat transfer and subsequently a more efficient vitrification. The efficacy of the present invention in preserving oocytes is higher than any other documented method, and it is believed to be cheaper to perform.

In a preferred embodiment, vitrified/thawed oocytes can be used successfully as recipients for somatic-cell nuclear transfer with high blastocyst development. This finding has important implications for nuclear transfer research and practice.

Previously, Lim *et al.* (Lim *et al.*, *Theriogenology* 35: 1225 - 1235 (1991)) obtained blastocyst stage embryos following IVF of frozen-thawed matured bovine oocytes. Since then several teams have investigated the possibility of cryopreservation for bovine oocytes. Oocyte survival and subsequent blastocyst development, however, remained low ranging from 0 to 10% (Fuku *et al.*, *Cryobiology* 29: 485 - 492 (1992); Otoi *et al.*, *Theriogenology* 38: 711 -719 (1992); Otoi *et al.*, *J. Reprod. Dev.* 41: 361 - 366 (1995); Otoi *et al.*, *Theriogenology* 40: 801 -807 (1993); Dinnyes *et al.*, *Cryobiology* 31: 569 - 570 (1994); Otoi *et al.*, *Cryobiology* 37: 77 - 85 (1998); Lim *et al.*, *Theriogenology* 37: 351 - 361 (1992); Schellander *et al.*, *Theriogenology* 42: 909 - 915 (1994)). Few limited studies (Hamano *et al.*, *Theriogenology* 38: 1085 - 1090 (1992); Otoi *et al.*, *Theriogenology* 38: 711 - 719 (1992); Suzuki *et al.*, *Cryobiology* 33: 515 -524 (1996); Kubota *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1998); Vajta *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53 - 58 (1998)) have resulted in pregnancies or births following transfer of embryos

WO 01/49112

9

PCT/US01/00395

originating from frozen-thawed bovine oocytes. Encouragingly, recent development of vitrification methods substantially increased the success rates, reportedly up to 25% (Vajta *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53 - 58 (1998)); and 30% (Papis *et al.*, *Theriogenology* 51: 173 (1999) (abstr.)) blastocysts derived from IVF of vitrified matured bovine oocytes.

5 These improved success rates were believed to be attributed to the increased cooling rate during oocyte vitrification (Vajta *et al.*, *Embryo Transfer Newsletter* 15: 12 - 18 (1997)). Following the present methods of the present invention, however, following cryopreservation the rate of morphologically intact oocytes was as high as 86%, far exceeding that previously obtained.

10 In a preferred embodiment of the present invention there is provided an improved method for cryopreserving oocytes suspended in a vitrification solution, wherein the improvement comprises contacting microdroplets of the vitrification solution containing the oocytes with a solid surface having a temperature of about -150°C to about -180°C, said surface having a good heat conductivity. In another embodiment of the  
15 present invention there is provided an improved method for cryopreserving oocytes suspended in a vitrification solution, wherein the improvement comprises contacting microdroplets of the vitrification solution containing the oocytes with a solid surface having a temperature of about -150°C to about -180°C, said surface having a thermal conductivity at 20°C of > than about 10 W/(m-k).

20 In another preferred embodiment of the present invention, there is provided a method for the vitrification of oocytes, said method comprising the steps of: (1) suspending the biological material in a cryoprotective equilibration medium, having a concentration of cryoprotectant(s) below that sufficient to protect against ice formation to the glass transition temperature of the cryoprotective equilibration medium; (2) rinsing  
25 the equilibrated oocytes with a vitrification solution, the vitrification medium having a concentration of cryoprotectant(s) sufficient to protect against ice formation to the glass transition temperature of the vitrification medium; and (3) dropping the vitrification solution-rinsed oocytes in microdroplets of vitrification solution onto a solid surface with

WO 01/49112

10

PCT/US01/00395

good heat conductivity having been previously cooled down to about -150°C to about -180°C. The oocytes used for vitrification may be partially (except for the 3 - 5 inner layers) or fully stripped of their cumulus cells prior to placing the oocytes in the cryopreservation solution. The thawed vitrified oocytes can be used as required by the artisan, as for example, in nuclear transfer cloning techniques.

In another embodiment of the present invention there is provided a method for increasing blastocyst development rates. It has been discovered by the present inventors that parthenogenetic development of vitrified oocytes in a defined KSOM plus BSA culture system may be significantly improved by co-culturing with cumulus-cells. It has been discovered by the present inventors that parthenogenetic development using such technique can increase blastocyst development to 32%.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

*Fig. 1* illustrates a cross-sectional view of a solid surface vitrification (SSV) device of the present invention.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The present invention discloses a new method for cryopreserving biological samples, in particular cellular material, such that the biological functionality of the material is preserved after warming. In particular, the present invention discloses a method for vitrifying and thawing oocytes and embryos. Further disclosed is a method for somatic-nuclear transfer into previously vitrified oocytes.

Cryopreservation of mammalian oocytes by the present invention may provide a steady source of materials for nuclear transfer and *in vitro* embryo production. There is provided by the present invention an effective vitrification protocol to cryopreserve bovine oocytes for research and practice of parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization and nuclear transfer.

In a preferred embodiment of the present invention, *in vitro* matured bovine oocytes were placed in 4% ethylene glycol (EG) in TCM 199 plus 20% fetal bovine serum (FBS) at 39°C for 12-15 min, and then transferred to vitrification solution (35% EG, 5% polyvinyl-pyrrolidone (PVP), 0.4 M trehalose in TCM 199 and 20% FBS). Oocytes were vitrified in microdrops on a pre-cooled (-150°C) metal surface (solid surface vitrification or SSV). The vitrified microdrops were stored in liquid N<sub>2</sub> and thawed immediately or following storage for 2 - 3 weeks or longer as needed.

It has been seen by the present inventors that the immediate survival of vitrified/thawed oocytes according to the present invention varies between 77% and 86% for treated oocytes cultured in KSOM containing BSA or FBS for 9 to 10 days. For nuclear transfer it was noted that vitrified oocytes supported embryonic development equally well as fresh oocytes.

While not limiting themselves to any particular theory, the present inventors have opened that the relatively high rates of cryo-survival, and embryo development following vitrification of bovine oocytes can be contributed to several factors. The solid metal surface vitrification method used likely achieves a high cooling rate by the combination of microdrops and improved heat exchange by direct contact with a metal surface. The warming of the oocytes is equally as fast by directly dropping the vitrified samples into a warm solution.

The high success rates may also be attributable to some procedural modifications, some of which were made based on recent development reported by others (Vajta *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53 - 58 (1998); Martino *et al.*, *Biol. Reprod.* 54: 1059 - 1069 (1996); Dinnyes *et al.*, *Cryobiology* 31: 569 - 570 (1994); Otoi *et al.*, *Cryobiology* 37: 77 - 85 (1998); Papis *et al.*, *Theriogenology* 51: 173 (1999) (abstr.); Vincent *et al.*, *Cryo-Lett.* 8: 356 - 361 (1988)). Specifically, the present invention handled oocytes in solutions at or close to physiological temperatures followed by quick cooling and warming to/from vitrification temperature in order to "outrun" the chilling damages.

Bovine oocytes are known to be very sensitive to chilling (Aman *et al.*, *Biol. Reprod.* 50: 103 - 110 (1994); Martino *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 45: 503 - 512 (1996); Parks *et al.*, *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992); and immature oocytes (GV stage) have been reported to be more sensitive than matured oocytes (Fuku *et al.*, *Cryobiology* 29: 485 - 492 (1992); Lim *et al.*, *Theriogenology* 37: 351 - 361 (1992)). Parks and Ruffing (Parks *et al.*, *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1999)) and Aman and Parks (Aman *et al.*, *Biol. Reprod.* 50: 103 - 110 (1994)) have reported damage of the metaphase II spindles following cooling to temperatures between 25°C and 4°C for only 1 min. Vitrification techniques, such as that described in the present invention, may allow reduction of the time while the oocytes are exposed to critical chilling temperatures compared to freezing methods and thus might be superior to the conventional freezing method for oocytes and *in vitro* produced embryos (Palasz *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 14: 127 - 149 (1996); Martino *et al.*, *Biol. Reprod.* 54: 1059 - 1069 (1996); Vajta *et al.*, *Embryo Transfer Newsletter* 15: 12 - 18 (1997)).

15 In a preferred embodiment of the present invention, cryopreservation of cattle oocytes or embryos is performed as follows:

Oocytes or embryos are suspended in an equilibration medium consisting of 4% (v/v) ethylene glycol or other intracellular cryoprotective agent in moderate concentration, in a base medium (TCM 199 or similar solutions) supplemented with 20% fetal bovine serum, or bovine serum albumin, or any other macromolecules with surfactant effects at room temperature, or higher, physiological temperatures (39°C for example) for several minutes. Following this equilibration period, groups of oocytes or embryos are rinsed at least two times in small drops of vitrification solution consisting of 35% ethylene glycol (or other intracellular cryoprotectants in high concentration), 5% polyvinyl-pyrrolidone (or other macromolecules), 0.4 M trehalose (or other sugars) in base medium and 20% fetal bovine serum, or other surfactant compounds, as described above, for a few seconds and dropped on the surface of a steel cube, or other solid surface with good heat conductivity, which is cooled down to around -150°C to -180°C or similar subzero

temperatures by partially immersing it into liquid or solid nitrogen or into other cooling agents. It is preferred that the drop size be about 4  $\mu\text{l}$  or smaller, more preferably 3  $\mu\text{l}$  or smaller, and yet more preferably 2  $\mu\text{l}$  or smaller, and yet more preferably 1  $\mu\text{l}$  or smaller, which allows instantaneous vitrification. The vitrified droplets can be moved with a nitrogen-cooled forceps or other tool into 1-ml cryovials or other suitable containers.

*Fig. 1* illustrates a cross-sectional view of a solid surface vitrification device (10) useful for cryopreserving using the present disclosure. A metal cube (15) is covered with a foil (20), such as an aluminum foil, and partially submerged into liquid  $\text{N}_2$  (25) held by container (30). Microdrops of vitrification solution (35), containing the biological sample, such as an oocyte, are dropped on the cold upper surface (40) of metal cube (15) and vitrified instantaneously.

The present inventors have found that the presence of a few cumulus-cell layers surrounding the oocytes prior to vitrification had no harmful effect on the cleavage and developmental rates following parthenogenetic activation. The presence of the cumulus cells can be an important factor to achieving high fertilization rates following IVF, although nuclear transfer experiments require the removal of the cumulus cells before enucleation. The vitrified/thawed oocytes seemed to be more fragile, and care must be taken for the removal of the cumulus cells prior to nuclear transfer manipulation.

While the parthenogenetic activation of vitrified oocytes may be reduced compared to the controls, parthenogenetic activation may be significantly improved by changing the culture conditions. For example, the parthenogenetic development of vitrified oocytes was further increased (up to 32% blastocyst) by using cumulus-cell co-culture with KSOM plus FBS media.

Development of *in vitro* fertilized oocytes may also be reduced by vitrification if temperature fluctuations occur during storage in the gas-phase of the nitrogen container, or during handling before/after storage. Liquid-phase storage may be used to reduce such effects. Studies suggest that any reduced developmental competence

is not due to impaired fertilization (in accord, Martino *et al.*, *Theriogenology* 37: 59 - 73 (1992) and Kubota *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1998), studies involving cattle; but see, in contrast, Ito *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 54: 81- 85 (1999) wherein freezing was seen to result in a failure of the zona block to polyspermy in mice).

5 Nuclear transfer experiments normally utilize recipient cytoplasts from *in vivo* or *in vitro* matured oocytes. Previously, the present inventors have demonstrated that frozen-thawed oocytes can be used for nuclear transfer with embryo-derived blastomeres, and calves were produced by this procedure (Kubota *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1998)). The present cryopreservation procedure for bovine oocytes benefits nuclear  
10 transfer research and practice significantly because it eliminates seasonal fluctuations, and the dependence on timing of slaughtering and oocyte shipping.

Following the presently disclosed methods a vast majority of oocytes (about 94%) will survive the vitrification process (a rate that is not different from controls), a rate which is much higher than that achieved in earlier freezing experiments by  
15 Ito *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 54: 81- 85 (1999) (62%) and Kubota *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 281 - 286 (1998) (74%). The surviving oocytes can effectively be used in nuclear transfer procedures, with no reduction detected in the enucleation rates for the vitrified-thawed oocytes. Vitrification has been hypothesized beneficial by reducing the exposure time to the critical temperature zone, as cooling the oocytes instantaneously into a vitrified  
20 state allows no time for spindle depolymerization (Vajta *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53 - 58 (1998); Martino *et al.*, *Biol. Reprod.* 54: 1059 - 1069 (1996)).

The present invention may render high fusion, cleavage and blastocyst development rates, comparable to the rates seen with fresh controls. To the present inventors' knowledge, the present invention is the first to suggest the use of cryopreserved  
25 oocytes as recipients for somatic-cell nuclear donors with promising blastocyst development rate. Earlier attempts for open-pulled straw vitrification of cytoplasts and use of them in blastomere-nuclear transfer experiments resulted in a significant reduction in

WO 01/49112

15

PCT/US01/00395

blastocyst development rates compared to fresh recipient cytoplasts (9.1% vs. 34.5%, respectively) (Peura *et al.*, *Theriogenology* 51: 211 (abstract) (1999)).

In short, the cryopreservation methods of the present invention are capable of preserving oocytes such that a high percentage will survive thawing, and demonstrate high cleavage rates upon activation. Such oocytes are capable of development into morphologically good quality blastocysts following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and nuclear transfer. Similar rates of development are observed among the somatic-cell nuclear transferred embryos using vitrified-thawed MII oocytes vs. control fresh oocytes as nuclear recipients. The nuclear transferred embryos produced may be used to produce progeny.

In order to more clearly describe the subject invention, the following examples are set forth along with the common materials and methods used to undertake the same. The examples below are non-limiting and are merely representative of various aspects and features of the present invention.

15

#### **Representative Examples**

##### **Materials and Methods**

###### **1. Source of Oocytes**

Bovine ovaries were collected from slaughterhouse ovaries and in maturation medium at about 37°C to 39°C within 19 hours of start of maturation. Matured cumulus oocyte complexes were selected based on their morphology. They were then cryopreserved at 20 - 23 h post-maturation for nuclear transfer, parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization assays.

###### **2. Vitrification and Thawing**

Matured oocytes were partially (except for the 3-5 inner layers), or fully stripped of their cumulus cells by a short exposure to 0.1% hyaluronidase (Sigma, St Louis, MO, Cat. No. H3506) followed by pipetting. Oocytes were washed three times in TCM 199 with Earle's salt (Gibco, Paisley, Scotland, Cat. No. 041 01150H) supplemented with 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco, Hyclone, Cat No. 10099-41) and then suspended in an equilibration medium consisting of 4% (v/v) ethylene glycol (EG, Sigma, Cat. No. E9129) in TCM 199 supplemented with 20% FBS at 39°C for 12 - 15 min. Following equilibration, groups of 5 to 10 oocytes were rinsed three times in small drops of vitrification solution consisting of 35% EG, 5% polyvinyl-pyrrolidone (Sigma, Cat. No. P0930), 0.4 M trehalose (Sigma, Cat. No. T0167) in TCM 199 and 20% FBS, for 25 - 30 seconds, and placed into trehalose solution (solution toxicity control), or dropped on the surface of a steel cube, which was covered with aluminum foil and cooled down to around -150°C to -180°C by partially immersing it into liquid N<sub>2</sub>.

The drops placed on the metal surface varied in size between 1 and 2 µl, and were vitrified instantaneously. The vitrified droplets were moved with a nitrogen-cooled forceps into 1-ml cryovials for long term storage (2 - 3 weeks), or thawed immediately by dropping them into 39°C 0.3 M trehalose solution for 3 minutes. Oocyte survival was then evaluated based on the integrity of the oocyte membrane and the zona pellucida. The surviving vitrified-thawed oocytes were subjected to activation, in vitro fertilization, or nuclear transfer experiments.

### 3. Parthenogenetic Activation of Oocytes

The methods described by Susko-Parrish *et al.* (Susko-Parrish *et al.*, *Dev. Biol.* 166: 729 - 739 (1994)) was modified and employed for parthenogenetic activation. After a total of 22 hours, in *in vitro* maturation culture ("IVM") (30 min additional culture for MII oocytes after thawing), oocytes were fully denuded of cumulus cells by pipetting. Oocytes were activated by a 5-minute exposure to Ca-ionophore A23187 (Sigma, Cat. No. C7522) at room temperature followed by culture in 2.5 mM 6-dimethylaminopurine

(DMAP, Sigma Cat. No. D2629) for 3.5 hours (Liu *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 49: 298 - 307 (1998)). Following washing the treated oocytes were cultured in KSOM (Liu *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 49: 298 - 307 (1998)) plus 0.1% BSA (fraction V, Sigma, A941B) for an additional 48 hours. The culture environment consisted of 5% CO<sub>2</sub> in humidified air, or  
5 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub> at 39°C. Morphological survival as well as cleavage rates were recorded. All cleaved embryos were cultured further in KSOM medium supplemented with 1% BSA for 7 days.

#### 4. In Vitro Fertilization and Culture

Vitrified-thawed oocytes and non-vitrified fresh control oocytes were  
10 fertilized with frozen-thawed bull semen from a single ejaculate. Frozen-thawed sperm were washed twice by centrifugation in modified Brackett-Oliphant (Liu *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 49: 298 - 307 (1998)) medium supplemented with 10 mM caffeine and 4 mg/ml BSA and then re-suspended in the fertilization medium (m-BO medium supplemented with 10 µg/ml heparin and 4 mg/ml BSA). Sperm concentration was  
15 adjusted to 1 x 10<sup>7</sup>/ml, and then about 25 oocytes were added to 100 µl fertilization-medium droplets. After 6-hours sperm-oocyte incubation, the oocytes were washed and cultured in KSOM medium supplemented with 0.1% BSA for 48 hours at 39°C, in a humidified atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub>. After 48-hours in culture, the IVF  
20 eggs were freed of cumulus cells by pipetting and cleavage rates were recorded. The cleaved embryos were cultured further in KSOM supplemented with 1% BSA in an atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub> for another 7 days. Medium was changed every two days throughout the culture period.

#### 5. Nuclear Transfer

After IVM for 20 hours, vitrified-thawed oocytes in metaphase II as well as  
25 fresh control oocytes were denuded from cumulus cells and selected by the presence of the first polar body. Enucleation was achieved by piercing the zona pellucida with a glass

needle and pushing out the polar body and the surrounding cytoplasm (Kubota *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.*; 51: 281 - 286 (1998)). Successful enucleation was confirmed by Hoechst 33342 fluorescent staining of the pushed-out karyoplasts. Confluent fibroblast cells at passage 29 - 31, serum starved for 4 to 6 days, were then transferred individually into the perivitelline space of the enucleated oocyte (cytoplast). Cytoplast-fibroblast complexes derived from the vitrified-thawed oocytes vs. fresh control oocytes were then fused and activated with two DC-pulses (50 V/mm, 10  $\mu$ -sec, 1 sec apart) in Zimmerman cell fusion medium (Zimmermann *et al.*, *J. Membrane. Biol.* 67: 165 - 182 (1982)) in a 1-mm gap electrofusion chamber by a BTX200 Electro Cell Manipulator (San Diego, CA). They were then cultured in KSOM medium supplemented with 10  $\mu$ g/ml cycloheximide (Sigma, Cat. No. C6255) and 2.5  $\mu$ g/ml cytochalasin-D (Sigma, Cat. No. C8273) and 0.1% BSA for 1 hour, and for an additional 4 hours in KSOM medium with cycloheximide (10  $\mu$ g/ml) and BSA without cytochalasin-D. After activation, embryos were cultured further in KSOM and 0.1% BSA medium for 48 hours in an atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub>. The cleaved embryos were then selected and cultured further for 7 days in KSOM supplemented with 5% FBS on cumulus-cell monolayers in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Medium was changed every two days throughout the culture period. Non-cleaved eggs were stained to check the rate of non-fused cytoplast-fibroblast complexes. Morphologically high quality nuclear transfer blastocysts were vitrified with the VS3a method (Rall *et al.*, *J. Reprod. Fertil.* 101: 681 - 688 (1994); Dinnyes *et al.*, *Mol. Reprod. Der.* 53: 318 - 324 (1999)) and stored for future embryo transfer purposes. As a control for the oocyte cryopreservation process, some oocytes from the vitrified-thawed groups used for nuclear transfer experiments were activated as described earlier (Ca-ionophore and DMAP), and cultured the same way as the nuclear transfer embryos.

#### 6. Statistics

All experiments were repeated at least three times. Development of oocytes was evaluated and treatments were compared using Chi-square analyses.

Experiment 1Parthenogenetic development of vitrified oocytes

- 5 **Protocol:** Matured oocytes were vitrified-thawed and activated parthenogenetically as described above. The toxicity of the vitrification solution, without cooling was tested and the effect of the presence vs. removal of the cumulus cells prior to cryopreservation was compared. Furthermore, culture of activated oocytes in high (20%) vs. low (5%) O<sub>2</sub>-content atmosphere was tested in two separate trials.
- 10 **Results:** Results of the parthenogenetic activation experiments are presented in Table 1 and 2. Table 1 presents the results of parthenogenetic development of matured oocytes vitrified with vs. without cumulus cells and cultured in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

Table 1

- 15 Parthenogenetic development of vitrified/thawed matured bovine oocytes cultured under 5% CO<sub>2</sub> in air

Oocytes treated	n	% oocytes survived	% cleaved Day 2 <sup>a</sup>	% blastocyst (BL) <sup>a</sup>			% expanded or hatched BL <sup>a</sup>
				Day 7	Day 8	Day 9	
Vitrified+ cumulus	42	86 <sup>b</sup>	64 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>
Vitrified- cumulus	68	79 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
Non-vitrified	47	100 <sup>c</sup>	81 <sup>c</sup>	13 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Based on surviving oocytes

<sup>b,c</sup> Groups with different superscripts within the same columns are significantly different (P<0.05)

WO 01/49112

20

PCT/US01/00395

Table 2 summarizes the developmental data following similar treatments but with embryos cultured in a reduced O<sub>2</sub>-content (5%) atmosphere. Immediate survival of the oocytes (i.e. no lysis after thawing through the start of the culture period) varied between 77% and 86%, but were not different between oocytes with or without cumulus prior to vitrification (P>0.05).

Table 2

Parthenogenetic development of vitrified/thawed matured bovine oocytes cultured under an atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>

Oocytes treated	n	% oocytes survived	% cleaved		% blastocyst (BL) <sup>a</sup>			% expanded or hatched BL <sup>a</sup>
			Day 2 <sup>a</sup>	Day 7	Day 8	Day 9		
Vitrified + cumulus	127	77 <sup>b</sup>	56 <sup>b</sup>	11 <sup>bc</sup>	14 <sup>bc</sup>	17 <sup>bc</sup>	14 <sup>bc</sup>	
Vitrified - cumulus	118	81 <sup>b</sup>	56 <sup>c</sup>	3 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	
Solution alone	85	94 <sup>c</sup>	69 <sup>bc</sup>	16 <sup>cd</sup>	23 <sup>cd</sup>	30 <sup>cd</sup>	25 <sup>c</sup>	
Non-vitrified	98	98 <sup>c</sup>	79 <sup>c</sup>	27 <sup>d</sup>	32 <sup>d</sup>	32 <sup>d</sup>	26 <sup>c</sup>	

10

<sup>a</sup> Based on surviving oocytes

<sup>b, c, d</sup> Groups with different superscripts within the same columns are significantly different (P<0.05)

15 When compared retrospectively, low O<sub>2</sub> atmosphere culture resulted in superior (P<0.05) blastocyst development compared to the high O<sub>2</sub> level tension (20%) treatment. In the high O<sub>2</sub> experiment, cleavage rates of activated non-frozen controls were significantly higher than those of the vitrified/thawed groups (P<0.05), but blastocyst development was not different (P>0.05). In the reduced O<sub>2</sub> experiment cleavage and blastocyst development

of vitrified oocytes was lower than that of the controls ( $P < 0.05$ ), however, the solution treatment alone caused no reduction in those parameters ( $P > 0.05$ ). The development of oocytes vitrified with or without cumulus cells was not significantly different ( $P > 0.05$ ) regardless of the culture environment. The blastocyst formation from the vitrified and solution treatment groups appeared approximately 1 day later compared to that of the fresh controls. The rate of expanded and hatched blastocysts developing from vitrified oocytes was significantly lower than from the controls ( $P < 0.05$ ).

In the present study, toxicity test of the vitrification solution (Experiment 1) showed no reduction in cleavage and blastocyst development compared to that of the controls. Our earlier results showed that ethylene glycol has a relatively low toxicity for bovine oocytes (Dinnyes *et al.*, *Cryobiology* 31: 569 - 570 (1994)), and the gradual equilibration in a low concentration cryoprotectant solution prior to vitrification was reported beneficial by others (Papis *et al.*, *Theriogenology* 51: 173 (1999) (abstr.)). The use of a mixture of a relatively low molecular weight and high penetration-rate cryoprotectant (ethylene glycol), a viscosity-increasing compound (polyvinyl-pyrrolidone), and a membrane-protective sugar (trehalose) assured that even a short exposure to the solution would result in the vitrification of the oocytes. A similar mixture was used successfully for bovine embryo vitrification (Saha *et al.*, *Cryobiology* 33: 291 - 299 (1996)). The very short exposure to high concentration of ethylene glycol before cooling and after thawing reduced its toxic effects. Moreover, toxic effects during thawing were minimized by the direct dilution method.

#### Experiment 2

##### *In vitro development of fertilized vitrified/thawed oocytes*

Protocol: Vitrified-thawed oocytes were fertilized in vitro as described above. Based on the results from Experiment 1, cumulus was only partially removed prior to vitrification. The control oocytes were treated with hyaluronidase, and their surrounding cumulus layers were similarly partially removed before fertilization. Vitrified oocytes

WO 01/49112

22

PCT/US01/00395

were either immediately thawed, or stored in liquid nitrogen containers for several days or weeks. Fertilized zygotes were cultured further in low O<sub>2</sub>-content atmosphere.

**Results:** Development of in vitro fertilized fresh vs. vitrified/thawed oocytes is presented in Table 3. Immediate survival of the oocytes (85% vs. 93% for controls) was slightly reduced by vitrification. Cleavage rates of the surviving oocytes did not differ significantly (58% vs. 69%, P > 0.05), however blastocyst development of vitrified oocytes was significantly lower than that of the controls (20% vs. 35%, P < 0.05). Furthermore, prolonged storage of the oocytes resulted in a further, significant reduction in blastocyst development (11% vs. 20%, P < 0.05). Development to expanded and hatched stages was not significantly reduced by vitrification (12% vs. 19%, P > 0.05). Cryostorage of oocytes, however, negatively affected the hatching rate (6% vs. 19%, P < 0.05).

Table 3

In vitro development of vitrified/thawed matured bovine oocytes following in vitro fertilization

15

Oocyte treatment	n	% oocytes survived	% cleaved on Day 2 <sup>a</sup>	% blastocyst (BL) <sup>a</sup>			% expanded or hatched BL <sup>a</sup>
				Day 7	Day 8	Day 9	
Vitrified/thawed	175	85 <sup>bc</sup>	58 <sup>b</sup>	15 <sup>c</sup>	19 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	12 <sup>bc</sup>
Vitrified/stored/ thawed	258	81 <sup>b</sup>	62 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>
Non-vitrified	98	98 <sup>cd</sup>	69 <sup>b</sup>	24 <sup>cd</sup>	33 <sup>d</sup>	35 <sup>d</sup>	19 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Based on surviving oocytes.

<sup>bc,d</sup> Groups with different superscripts within the same columns are significantly different (P < 0.05).

WO 01/49112

23

PCT/US01/00395

Experiment 3Development of cloned embryos with vitrified/thawed oocytes

5 Protocol: Vitrified-thawed oocytes were enucleated, and used as recipient cytoplasts for somatic-cell nuclear transfer. The enucleation, fusion, cleavage and blastocyst development rates of vitrified vs. fresh cytoplasts were compared. As a control group for the vitrification and culture system some of the vitrified-thawed oocytes were parthenogenetically activated and cultured further. The zygotes were cultured in a low O<sub>2</sub> atmosphere for the first two days, then for an additional 7 days co-cultured-with cumulus-cells in a high O<sub>2</sub>-content atmosphere.

10 Results: The data on nuclear transfer experiments using vitrified vs. fresh oocytes as a source of cytoplasts are presented in Table 4.

Table 4

15 In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from fresh or vitrified/  
thawed recipient oocytes

Recipient oocyte/treatment	n	% fused	% cleaved on Day 2 <sup>a</sup>	% blastocyst (BL) <sup>a</sup>			% expanded or hatched BL <sup>a</sup>
				Day 7	Day 8	Day 9	
Vitrified/NT	106	62 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	20 <sup>bc</sup>
Fresh/NT	106	74 <sup>b</sup>	90 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>
Vitrified/activated	109	-	56 <sup>c</sup>	25 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>. Based on fused embryos or activated oocytes

20 <sup>b, c</sup> Groups with different superscripts within the same columns are significantly different (P<0.05).

WO 01/49112

24

PCT/US01/00395

Most of the oocytes (252/269, 94%) survived the vitrification process. Enucleation rate of fresh vs. vitrified oocytes did not differ (142/163, 87% vs. 127/139, 91%, respectively;  $P > 0.05$ ). Fusion rates with cytoplasts obtained from fresh or vitrified/thawed oocytes (74% vs. 62%,  $P > 0.05$ ) did not differ. Subsequent development of embryos to cleavage (90% vs. 85%), blastocyst (29% vs. 27%) or hatched blastocyst stage (22% vs. 20%) did not differ statistically either ( $P > 0.05$ ). Cleavage rates of parthenogenetically activated vitrified/thawed oocytes (56%) was significantly lower than that of nuclear transfer embryos ( $P < 0.01$ ), however, development rates to blastocyst stage (32%) were not different. The rate of oocytes reaching expanded or hatched blastocyst stages following parthenogenetic activation was lower (10%) than after nuclear transfer.

While the invention has been described with respect to preferred embodiments, those skilled in the art will readily appreciate that various changes and/or modifications can be made to the invention without departing from the spirit or scope of the invention as defined by the appended claims. All documents cited herein are incorporated in their entirety herein.

## 1 WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. A method for the vitrification of biological materials, said method comprising the  
2 steps of:
- 3 (a) suspending the biological material in a cryoprotective equilibration medium,  
4 having a concentration of cryoprotectant(s) below that sufficient to protect against  
5 ice formation to the glass transition temperature of the cryoprotective equilibration  
6 medium;
- 7 (b) rinsing the equilibrated biological material with a vitrification solution, the  
8 vitrification medium having a concentration of cryoprotectant(s) sufficient to  
9 protect against ice formation to the glass transition temperature of the vitrification  
10 medium; and
- 11 (c) dropping the vitrification solution-rinsed biological material in microdroplets  
12 of vitrification solution onto a solid surface with good heat conductivity having  
13 been previously cooled down to about -150°C to about -180°C.
- 1 2. The method of claim 1 wherein the biological material is a cell.
- 1 3. The method of claim 1 wherein the biological material is an oocyte.
- 1 4. The method of claim 1 wherein the biological material is an embryo.
- 1 5. An improved method for cryopreserving biological material suspended in a  
2 vitrification solution, wherein the improvement comprises contacting microdroplets of the  
3 vitrification solution containing the biological material with a solid surface having a  
4 temperature of about -150°C to about -180°C, said surface having a good heat  
5 conductivity.
- 1 6. The method of claim 5 wherein the biological material is a cell.
- 1 7. The method of claim 5 wherein the biological material is an oocyte.

- 1 8. The method of claim 5 wherein the biological material is an embryo.
- 1 9. An improved method for cryopreserving biological material suspended in a  
2 vitrification solution, wherein the improvement comprises contacting microdroplets of the  
3 vitrification solution containing the biological material with a solid surface having a  
4 temperature of about -150°C to about -180°C, said surface having a thermal conductivity at  
5 20°C of greater than about 10 W/(m-k).
- 1 10. A method for the vitrification of oocytes, said method comprising the steps of:  
2 (a) suspending the oocytes in a cryoprotective equilibration medium, having a  
3 concentration of cryoprotectant(s) below that sufficient to protect against ice  
4 formation to the glass transition temperature of the cryoprotective equilibration  
5 medium;  
6 (b) rinsing the equilibrated oocytes with a vitrification solution, the vitrification  
7 medium having a concentration of cryoprotectant(s) sufficient to protect against ice  
8 formation to the glass transition temperature of the vitrification medium; and  
9 (c) dropping the vitrification solution-rinsed oocytes in microdroplets of  
10 vitrification solution onto a solid surface with good heat conductivity having been  
11 previous cooled down to about -150°C to about -180°C.
- 1 11. An improved method of transferring nuclear DNA from a donor cell to an  
2 enucleated oocyte, said improvement comprising the step of introducing the nuclear  
3 material of the donor cell into an enucleated oocyte derived from an oocyte vitrified by the  
4 method of claim 10.
- 1 12. An oocyte vitrified by the method of claim 10.
- 1 13. An embryo developed from the oocyte of claim 12.
- 1 14. A fetus developed from the oocyte of claim 12.
- 1 15. An animal developed from the oocyte of claim 12.

- 1 16. A cell line developed from the embryo of claim 13.
- 1 17. A cell line developed from the fetus of claim 14.
- 1 18. A cell line developed from the animal of claim 15.
- 1 19. An improved method for cryopreserving oocytes suspended in a vitrification  
2 solution, wherein the improvement comprises contacting microdroplets of the vitrification  
3 solution containing the oocytes with a solid surface having a temperature of about -150°C  
4 to about -180°C, said surface having a thermal conductivity 20°C of greater than about 10  
5 W/(m-k).
- 1 20. An oocyte vitrified by the method of claim 19.
- 1 21. An embryo developed from the oocyte of claim 20.
- 1 22. A fetus developed from the oocyte of claim 20.
- 1 23. An animal developed from the oocyte of claim 20.
- 1 24. A cell line developed from the embryo of claim 21.
- 1 25. A cell line developed from the fetus of claim 22.
- 1 26. A cell line developed from the animal of claim 23.
- 1 27. An improved method for the parthenogenetic development of vitrified oocytes  
2 cultured in a KSOM plus BSA culture system, the improvement comprising co-culturing  
3 with cumulus-cells.

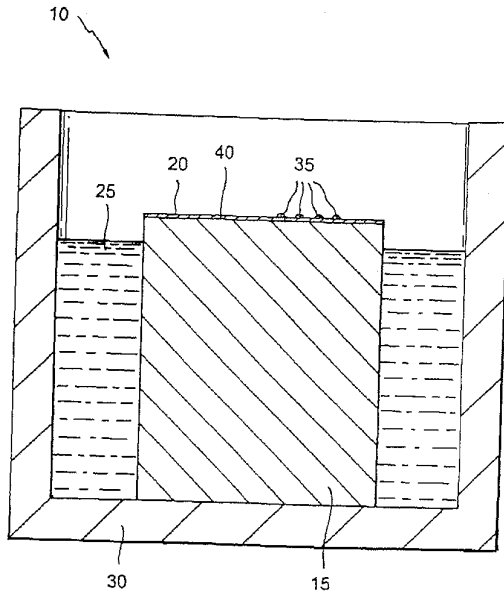


FIG. 1

## 【 国際公開パンフレット ( コレクション ) 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
12 July 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/49112 A3

- (51) International Patent Classification: A01N 1/00, C12M 1/00, C12N 5/00, A01K 67/00 (74) Agent: MOORE, Steven, J., Cummings & Lockwood, 700 State Street, P.O. Box 1960, New Haven, CT 06509-1960 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/00395 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 4 January 2001 (04.01.2001) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/174,383 4 January 2000 (04.01.2000) US  
60/174,424 4 January 2000 (04.01.2000) US  
60/215,433 30 June 2000 (30.06.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF CONNECTICUT [US/US]; 263 Farmington Avenue, Farmington, CT 06030-6207 (US).  
Published:  
— with international search report
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): YANG, Xiangzhong [US/US]; 131 Birch Road, Storrs, CT 06262 (US); DINYES, Andras [HU/HU]; Karpat U-48, H-1133 Budapest (HU).  
(88) Date of publication of the international search report:  
25 April 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/49112 A3

(54) Title: OOCYTE VITRIFICATION TECHNIQUE

(57) Abstract: A new method of cryopreservation based on the very fast cooling rates achieved by the direct contact of small droplets of vitrification solution containing biological sample with a very cold solid surface.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/00395																								
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A01N 1/00; C12M 1/00; C12N 5/00; A01K 67/00 US CL : 435/1.1, 283.1, 925; 800/8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/1.1, 283.1, 925; 800/8 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST; STN(MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS)																										
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																										
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X ---	US 5,171,660 A (CARPENTER et al) 15 December 1992, entire patent, summarized in abstract.	1-18, 20-26																								
Y		19, 27																								
X ---	US 5,817,453 A (BRINSTER) 06 October 1998, entire reference.	1-18, 20-26																								
Y		19, 27																								
X	US 5,780,295 A (LIVESEY et al.) 14 July 1998, entire reference.	1-27																								
X	STEPONKUS, P.L. et al. Cryopreservation of Drosophila melanogaster embryos. Nature. 10 May 1990, Vol. 45, pages 170-172, especially materials and methods sections.	1-27																								
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> <td>**</td> </tr> <tr> <td>*A*</td> <td>Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>*B*</td> <td>earlier document published on or after the international filing date</td> <td>*X*</td> </tr> <tr> <td>*L*</td> <td>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)</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>*O*</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>**</td> </tr> <tr> <td>*P*</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>*Z*</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		**	*A*	Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	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	*B*	earlier document published on or after the international filing date	*X*	*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)	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	*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	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			*Z*			document member of the same patent family
* Special categories of cited documents:		**																								
*A*	Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	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																								
*B*	earlier document published on or after the international filing date	*X*																								
*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)	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																								
*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	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																								
		*Z*																								
		document member of the same patent family																								
Date of the actual completion of the international search 23 JULY 2001		Date of mailing of the international search report 15 AUG 2001																								
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-9250		Authorized officer: <i>Joseph W. Woitach</i> JOSEPH W. WOITACH Telephone No. (703) 305-0198																								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/00896
C (Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTINO, A. et al. Development into Blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. <i>Biology of Reproduction</i> . May 1996, Vol. 54, pages 1059-1069, especially methods section.	1-27
X	MAZUR, P. et al. Contributions of cooling and warming rate and developmental stage to the survival of drosophila embryos cooled to -205C. <i>Cryobiology</i> , February 1993, Vol. 3, No. 1, pages 45-73, summarized in abstract.	1-15, 19-23, 27

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S,G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 アンドラス・ディンニェス

ハンガリー、ハー - 1 1 3 3 ブダペスト、カルパト・ウツァ - 4 8 番

Fターム(参考) 4B024 AA20 DA02 GA11 HA17

4B065 AA90X AB01 BA01 BD09