



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0031210
(43) 공개일자 2021년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/073 (2010.01) A61K 35/48 (2015.01)
A61K 35/545 (2014.01) A61P 15/00 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0604 (2013.01)
A61K 35/48 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0112899

(22) 출원일자 2019년09월11일
심사청구일자 2019년09월11일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

강은주
서울특별시 중구 다산로 32, 8동 1606호(신당동, 남산타운)
이연미
서울특별시 강동구 구천면로17길 25, 401호(천호동, 리체빌)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

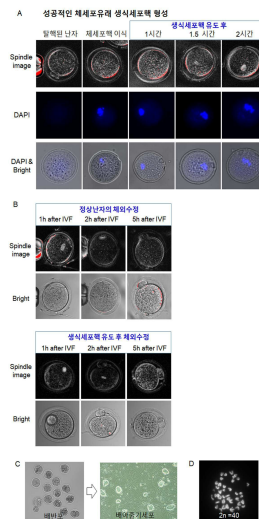
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 돌연변이 미토콘드리아 유전자를 가지고 있거나, 난자 생성 장애를 가진 여성이 자신의 유전자를 갖는 자녀를 가질 수 있도록 이들 여성의 이수체 체세포로부터 유래된 반수체 염색체를 포함하는 생식세포 및 이의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 생식세포를 이용한 체외 수정란의 제조방법, 이로부터 제조된 체외 수정란, 배반포 및 배아줄기세포, 상기 체외 수정란을 포함하는 불임 또는 난임 치료용 세포치료제를 제공하며, 또한 상기 생식세포를 이용한 동형배아줄기세포 및 이의 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 35/545 (2013.01)

A61P 15/00 (2018.01)

C12N 5/0606 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1A2B3001244
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구사업
연구과제명	마우스에서 난자를 이용한 체세포의 생식세포핵화 기전규명과 활용기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2018.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법:

- (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입한 후 배양하는 단계; 및
- (c) 정자와의 체외 수정 또는 활성화 물질의 처리를 통해 상기 배양된 공여난자를 활성화하여 상기 체세포핵의 염색체를 반수체화하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 공여난자는 제2 감수분열 단계의 성숙난자인, 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 체세포는 세포주기 G0/G1의 체세포핵을 포함하는, 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 공여난자에서 체세포 유래의 핵 주변에 방추사가 형성되면서 성숙 난자로 재건될 때까지 배양하는 것인, 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 활성화 물질은 염화스트론튬(strontium chloride)인, 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 생식세포.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 체외 수정란의 제조방법:

- (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입한 후 배양하는 단계;
- (c) 체세포핵이 주입된 공여난자를 정자와 체외 수정하는 단계; 및
- (d) 상기 (c) 단계에서 수득된 수정란을 배양하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 공여난자는 제2 감수분열 단계의 성숙난자인, 체외 수정란의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (b) 단계의 체세포는 세포주기 G0/G1의 체세포핵을 포함하는, 체외 수정란의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 공여난자에서 체세포 유래의 핵 주변에 방추사가 형성되면서 성숙 난자로 재건될 때까지 배양하는 것인, 체외 수정란의 제조방법.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되는 체외 수정란.

청구항 12

제11항의 체외 수정란으로부터 생성된 배반포.

청구항 13

제12항의 배반포로부터 생성된 배아줄기세포.

청구항 14

제11항의 체외 수정란 또는 이로부터 발생된 할구를 포함하는 불임 또는 난임 치료용 세포치료제.

청구항 15

다음의 단계를 포함하는 동형배아줄기세포(homozygous NT-ESC)의 제조방법:

- (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입하는 단계;
- (c) 화학적 활성화를 통해 반수체화를 유도하는 단계; 및
- (d) 상기 (c) 단계에서 수득된 난자를 배양하여 동형배아줄기세포를 수득하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (a) 단계의 공여난자는 제2 감수분열 단계의 성숙난자인, 동형배아줄기세포의 제조방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 (b) 단계의 체세포는 세포주기 G0/G1의 체세포핵을 포함하는, 동형배아줄기세포의 제조방법.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 (c) 단계의 화학적 활성화는 염화스트론튬(strontium chloride)을 처리하여 이루어지는, 동형배아줄기세포의 제조방법.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 동형배아줄기세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 돌연변이 미토콘드리아 유전자를 가지고 있거나, 난자 생성 장애를 가진 여성이 자신의 유전자를 갖는 자녀를 가질 수 있도록 여성의 이수체 체세포로부터 유래된 반수체 염색체를 포함하는 생식세포 및 이의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 생식세포를 이용한 체외 수정란의 제조방법, 이로부터 제조된 체외 수정란, 배반포 및 배아줄기세포, 상기 체외 수정란을 포함하는 불임 또는 난임 치료용 세포치료제를 제공하며, 또한 상기 생식세포를 이용한 동형배아줄기세포 및 이의 제조방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 늦은 결혼, 사회적 스트레스, 환경오염, 유전질환 소아암 등 다양한 원인으로 인해 20%가 넘는 부부가 난임 또

는 불임으로 고통받고 있으며, 난임 또는 불임 부부의 비율은 계속해서 증가하고 있다. 특히, 질병, 항암치료, 노화로 인해 난자 생성에 장애가 있는 여성 또는 모계 유래 돌연변이 미토콘드리아 유전자(mtDNA)를 가진 여성들은 자신의 유전자를 가진 아이를 가지기 쉽지 않다.

[0003] 따라서, 이러한 여성의 체세포로부터 생식세포핵을 형성하게 하고, 정자 핵과 수정하여 자신의 유전자를 가진 자녀를 출산할 수 있다면 보조생식술 분야에 새로운 패러다임이 될 수 있을 것이다.

[0004] 또한, 염색체가 가지는 이형(heterozygous) 특성이 유전 질환 연구나 세포 치료제 개발에 방해 요인으로 작용하는데, 이와 같은 이형접합 염색체를 동형접합 상태로 전환할 수 있다면, 유전 질환의 연구에서 동물 모델을 이용하는 간접적 오류를 줄일 수 있고, 처녀 생식 배아줄기세포와 유사한 동형 HLA 타입을 가지는 체세포복제 배아줄기세포를 개발할 수 있다.

[0005] 이수체 염색체가 반수체가 되는 과정은 유일하게 생식세포가 성숙하는 제1 감수분열에서 일어나고 제2 감수분열에서는 염색분체가 나누어지게 된다. 따라서 제1 감수분열이 일어나기 전인 미성숙 난자를 탈핵한 후 체세포를 주입하게 되면, 미성숙 난자가 제1 감수분열을 일으키는 본연의 힘에 의해 체세포의 핵분열을 유도할 수 있다. 그러나 체세포핵 이식 후 성숙 난자로의 발달을 위해 체외 성숙 과정이 필요하고, 이러한 성숙 난자로부터의 배아 발달 및 배아줄기세포, 산자 생산 등에 관한 검증은 이루어지지 않은 상태이다.

[0006] 미국 등록특허 US 8,551,705호에는 여성 유래 반수체 세포를 획득하는 방법 중 하나로, 이수체 세포핵을 미성숙 난모세포(immature oocyte)에 삽입하여 염색체를 두 개의 반수체 핵으로 분리하는 방법을 제시하고 있으나, 이 방법에 사용된 미성숙 난모세포는 상술한 제1 감수분열이 일어나기 전의 미성숙 난자이므로, 상술한 문제점을 동반하게 된다.

[0007] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 제2 감수분열이 이루어지는 성숙 난자(MII)를 이용하여 별도의 체외 성숙 과정이 필요하지 않은 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법을 개발하고자 하였고, 제2 감수분열이 이루어지는 성숙 난자(MII)에 세포주기 G0/G1 체세포핵을 주입한 후 정자와의 수정 또는 인위적인 활성을 통해 유사 2차 극체 방출을 유도하는 경우 반수체 염색체를 포함하는 생식세포가 생성됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포를 이용한 체외 수정란 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 전술한 체외 수정란으로부터 생성된 배반포 및 배아줄기세포를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 전술한 체외 수정란을 포함하는 불임 또는 난임 치료용 세포치료를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 동형배아줄기세포(homozygous NT-ESC) 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법을 제공한다:

[0014] (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;

[0015] (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입한 후 배양하는 단계; 및

[0016] (c) 정자와의 체외 수정 또는 활성화 물질의 처리를 통해 상기 배양된 공여난자를 활성화하여 상기 암컷 포유동물의 체세포의 염색체를 반수체화하는 단계.

[0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 공여난자는 제2 감수분열 단계의 성숙난자일 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계의 체세포는 세포주기 G0/G1의 체세포핵을 포함할

수 있다.

- [0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계의 배양은 공여난자에서 체세포 유래의 핵 주변에 방추사가 형성되면서 성숙 난자로 재건될 때까지 배양하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (c) 단계의 활성화 물질은 염화스트론튬(strontium chloride)을 처리하여 이루어질 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한, 전술한 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법으로 제조된 생식세포를 제공한다.
- [0022] 추가로, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 체외 수정란의 제조방법을 제공한다:
- [0023] (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- [0024] (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입한 후 배양하는 단계;
- [0025] (c) 체세포핵이 주입된 공여난자를 정자와 체외 수정하는 단계; 및
- [0026] (d) 상기 (c) 단계에서 수득된 수정란을 배양하는 단계.
- [0027] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 공여난자는 제2 감수분열 단계의 성숙난자일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계의 체세포는 세포주기 G0/G1의 체세포핵을 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계의 배양은 난자에 방추사가 형성되어 성숙 난자로 재건될 때까지 배양하는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명은 또한, 전술한 체외 수정란의 제조방법으로 제조된 체외 수정란, 배반포 및 배아줄기세포를 제공한다.
- [0031] 추가로, 본 발명은 전술한 체외 수정란 또는 이로부터 발생된 할구를 포함하는 불임 또는 난임 치료용 세포치료를 제공한다.
- [0032] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 동형배아줄기세포(homozygous NT-ESC)의 제조방법을 제공한다:
- [0033] (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- [0034] (b) 암컷 포유동물의 체세포핵을 탈핵된 공여난자에 주입하는 단계;
- [0035] (c) 화학적 활성화를 통해 반수체화를 유도하는 단계; 및
- [0036] (d) 상기 (c) 단계에서 수득된 난자를 배양하여 동형배아줄기세포를 수득하는 단계.
- [0037] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 공여난자는 제2 감수분열 단계의 성숙난자일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계의 체세포는 세포주기 G0/G1의 체세포핵을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (c) 단계의 화학적 활성화는 염화스트론튬(strontium chloride)을 처리하여 이루어질 수 있다.
- [0040] 추가로, 본 발명은 전술한 동형배아줄기세포의 제조방법으로 제조되는 동형배아줄기세포를 제공한다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포 및 이의 제조방법은 제2 감수분열이 이루어지는 성숙 난자(MII)를 이용하여 별도의 체외 성숙 과정이 필요하지 않다는 이점이 있다. 또한, 난자 생성에 장애가 있는 여성 또는 모계 유래 돌연변이 미토콘드리아 유전자(mtDNA)를 가진 여성도 그들의 자신의 유전자를 가진 자녀를 출산할 수 있는 방법을 제공한다는 점에서, 난임 또는 불임 치료에 매우 유용하게 활용될 수 있고, 처녀 생식 배아줄기세포와 유사한 동형 HLA 타입을 가지는 체세포복제 배아줄기세포의 개발을 가능하게 하여 유전 질환 연구 또는 세포치료제 개발에도 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 본 발명에 따른 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 연구개발 이용에 대한 예시를 개략도로 나타낸 것이다.
- 도 2는 감수분열과 체세포분열의 차이점 및 이를 응용하여 체세포 유래 반수체를 수립하는 과정을 개략도로 나타낸 것이다.
- 도 3은 체세포 염색체의 반수체화 기전을 나타낸 개략도이다.
- 도 4는 탈핵 공여난자(MII)에 세포주기 G0/G1 체세포핵을 주입한 후의 생식세포핵 형성 확인(A), 체외 수정 후 유사전핵 형성(B), 체외 수정 후 발단한 배반포와 배아줄기세포(C) 및 배아줄기세포의 핵형(D)을 확인한 결과를 이미지로 나타낸 것이다.
- 도 5는 체세포 생식세포핵 유도 후 체외 수정 시기에 따른 발달율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 체세포(2n) 유래 반수체(n) 배아의 발달 과정 및 동형배아줄기세포(homozygous NT-ESC) 수립을 확인한 결과로, (A)는 체세포 유래 생식세포핵 유도 후 화학적 활성화에 의해 제2 유사 극체(PPB)가 방출되고, 1개의 유사 전핵(PPN)이 형성되었음을 확인한 것이고, (B)는 배아 및 배반포 단계를 거쳐 배아줄기세포가 수립되었음을 확인한 것이며, (c)는 반수체(n) 배아줄기세포가 이수체화를 거쳐 이수체(2n) 배아줄기세포로 전환되었음을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 상술한 바와 같이, 종래의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법은 상술한 제1 감수분열이 일어나기 전의 미성숙 난자에 이수체 체세포핵을 주입하는 방식으로 이루어졌으나, 이러한 방법은 체세포핵 이식 후 성숙 난자로의 발달을 위해 체외 성숙 과정이 필요하고, 이러한 성숙 난자로부터의 배아 발달 및 배아줄기세포, 산자 생산 등에 관한 검증이 이루어지지 않았다는 문제가 있다.
- [0044] 이에, 본 발명자들은 제2 감수분열이 이루어지는 성숙 난자(MII)를 이용하여 별도의 체외 성숙 과정이 필요하지 않은 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법을 개발함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다.
- [0045] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0046] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0047] 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법에 관한 것이다:
- [0048] (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- [0049] (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입한 후 배양하는 단계; 및
- [0050] (c) 정자와의 체외 수정 또는 활성화 물질의 처리를 통해 상기 배양된 공여난자를 활성화하여 상기 체세포핵의 염색체를 반수체화하는 단계.
- [0051] 본 발명에서 용어 "이수체 체세포"는 예를 들어, 이배체 DNA 함량을 갖는 체세포를 의미한다. 마우스에서 이수체 체세포는 40개의 염색체를 가지고, 20개 염색체의 한 세트는 각각의 부모로부터 기원한다. 인간에서 이배체 체세포는 46개 염색체를 가지고, 23개 염색체의 한세트는 각각의 부모로부터 기원한다.
- [0052] 본 발명에서 용어 "반수체 염색체를 포함하는 생식세포"는, 예를 들어, 반수체 DNA 함량, 즉 염색체의 반수체 수(1n)을 갖는 생식세포를 의미하며, 이때, 반수체 DNA는 여성 또는 암컷 동물로부터 유래된 것이다. "반수체 DNA"는 포유동물, 예를 들어 여성 인간 기원의 23개 염색체를 지칭한다. 마우스에서, 반수체 DNA는 20개 염색체를 지칭한다.
- [0053] 본 발명의 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 공여난자는 제2 감수분열 단계의 성숙난자(MII)인 것이 바람직하며, 공여난자의 핵을 제거하는 단계는 당해 기술분야에 공지된 방법으로 수행될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법에 있어서, 상기

(b) 단계의 포유동물은 인간, 마카카속(예: 마카카 과시쿨라리스, 마카카 물라타) 등의 비-인간 영장류 또는 칼리트릭스속(예: 칼리트릭스 자쿠스) 또는 유인원과(예: 고릴라, 침팬지 및 오랑우탄), 마우스, 랫트, 염소, 돼지, 말, 소, 고양이, 개, 양 또는 낙타이다.

- [0055] 상기 (b) 단계는 암컷 포유동물의 체세포 자체를 탈핵된 공여난자에 주입함으로써 수행되며, 이는 "핵 전달" 또는 "핵 이식"으로 지칭된다. 용어 "핵 전달" 또는 "핵 이식"은 공여체 세포의 핵을 탈핵된 난자에 이식하는 클로닝 방법을 말하며, 이는 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0056] 본 발명의 일실시예에서는, 상기 암컷 포유동물의 체세포 자체를 탈핵된 난자에 주입함으로써 공여체 세포의 핵을 전달하였다. 상기 암컷 포유동물의 체세포는 세포주기 G0/G1의 체세포 핵을 포함할 수 있다.
- [0057] 구체적으로, 상기 (b) 단계의 체세포는 단일 세포화된 다음 세포의 융합을 유도하는 매개체에 일정 시간 노출시킨 후 회수한 것을 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일실시예에서는 세포의 융합을 유도하는 매개체로 센다이 바이러스 추출물을 사용하였으나, 동일한 기능을 수행하는 공지된 다른 물질을 사용할 수 있다.
- [0058] 상기 (b) 단계에서 체세포가 탈핵된 공여난자에 주입된 후에는 난자에 방추사가 형성되어 성숙 난자로 재건될 때까지 배양하며, 당해 기술분야에 공지된 배지, 예를 들어, KSOM 배지 또는 M16배지에 0.5 내지 3시간 동안 배양할 수 있다.
- [0059] 이어서, 성숙된 난자는 정자와의 체외 수정 또는 활성화 물질의 처리를 통해 활성화되는 (c) 단계를 거친다.
- [0060] 본 발명에서 용어 "활성화"는 미수정 성숙 난자가 2차 극체를 방출하는 과정이 발생하는 것을 지칭하며, 이러한 활성화는 정자와의 체외 수정 또는 활성화 물질의 처리를 통해 이루어진다. 상기 (c) 단계에서 활성화된 성숙 난자는 유사 2차 극체의 방출을 유도하여 체세포핵의 염색체가 반수체화되는 현상이 발생한다.
- [0061] 정자와 체외 수정되는 경우, 체외 수정 과정은 당해 기술분야에 공지된 배지 및 배양 조건에서 이루어지며, 예를 들어, 스크립타이드가 첨가된 HTF 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 가장 적절한 체외수정 시기는 체세포 생식세포핵 유도 후 1시간 내지 3시간, 바람직하게는 1.5시간 내지 2시간일 수 있다.
- [0062] 활성화 물질이 처리되는 경우, 상기 활성화 물질은 염화스트론튬일 수 있다. 예를 들어, 5 내지 15 mM, 바람직하게는 8 내지 12 mM 농도의 염화스트론튬에 4 내지 7 시간, 바람직하게는 5 내지 6 시간 노출시킴으로써 활성화시킬 수 있다.
- [0063] 활성화된 난자는 세포분열 중기의 난자 세포질에 의하여 PCC(premature chromatin condensation)가 발생하게 되고 상동염색체가 분열하는 과정을 거쳐 반수체 염색체를 포함하는 난자가 유도된다. 정자와의 체외 수정을 통해 반수체화된 난자(n)는 정자(n)와의 수정 및 배아 발달이 추가로 발생할 수 있다.
- [0064] 본 발명은 또한, 전술한 암컷 포유동물의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법을 통해 제조된 생식세포를 제공하며, 이는 의도한 바에 따라 난임 또는 불임 치료를 위한 세포치료제 또는 상동염색체 동형배아줄기세포를 수립하는데 활용될 수 있다.
- [0065] 추가로, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 체외 수정란의 제조방법을 제공한다:
- [0066] (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- [0067] (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입한 후 배양하는 단계;
- [0068] (c) 체세포핵이 주입된 공여난자를 정자와 체외 수정하는 단계; 및
- [0069] (d) 상기 (c) 단계에서 수득된 수정란을 배양하는 단계.
- [0070] 상기 체외 수정란의 제조방법의 (a) 및 (b) 단계는 전술한 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법과 동일하므로, 그 기재 생략한다.
- [0071] 본 발명의 체외 수정란 제조방법에 있어서, 상기 (c) 단계는 재건된 성숙 난자와 정자를 체외 수정하는 단계로, 본 발명의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법의 (c) 단계에서 재건된 성숙 난자를 정자와의 체외 수정을 통해 활성화시키는 것에 상응한다.
- [0072] 상기 (c) 단계에서 수득된 수정란은 목적하는 바에 따라 적절한 조건에서 배양되며, 이러한 조건은 통상의 기술자의 기술상식에 따라 조절 가능하다.

- [0073] 본 발명은 전술한 체외 수정란 제조방법을 통해 제조된 체외 수정란 및 이로부터 생성된 배반포 및 배아줄기세포를 제공한다.
- [0074] 본 발명에서 용어 "배반포"는 상실배 형성 후의 포유동물 발달의 초기 배아이다. 이는 내부 세포괴(ICM) 또는 배아모체를 갖고, 이는 후속적으로 배 및 세포의 외층 또는 이후에 태반을 형성하는 영양막을 형성한다. 내부 세포괴는 본 발명의 배아 줄기 세포를 위한 하나의 공급원이고, 영양막은 또 다른 공급원이다. 영양막은 내부 세포괴 및, 포배강 또는 배반포 체강으로 알려진 유체-충진된 배반포 체강을 둘러싸고 있다. 배반포 형성은, 포배강이 상실배에서 개방되는 경우, 인간에서 수정후 약 5일에 개시한다. 따라서, 용어 "내부 세포괴"는 태아 조직으로 발달하는 배의 내부를 지칭한다.
- [0075] 본 발명에서 용어 "배아줄기세포"는 상실배 또는 배반포로부터 단리된 배아줄기세포를 의미하고, 바람직하게는 포유동물의 특징을 갖는 세포를 지칭한다. 배아 줄기 세포는 고도의 핵-대-세포질 비, 현저한 핵소체를 갖고, 무기한으로 증식할 수 있으며, 생물의 대부분 또는 모든 특성화된 세포형, 예를 들면, 3개의 배아 생식세포층, 모든 체세포 계통 및 바람직하게는 생식세포 계열로도 분화할 수 있다. 생물의 모든 특성화된 세포형으로 분화할 수 있고 생식세포 계열에 관여할 수 있는 배아 줄기 세포는 전능성이다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "배아 줄기 세포"는 단리된 배아 줄기 세포, 1차 배아 줄기 세포 또는 이들의 모집단 또는 세포주로부터 확립된 세포주를 포함한다. 이는 배아 줄기 세포를 이들의 미분화 형태 또는 이들의 분화 형태를 포함한다.
- [0076] 본 발명은 또한, 전술한 체외 수정란 또는 이로부터 발생된 할구를 포함하는 불임 또는 난임 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [0077] 본 발명의 세포 치료제에 있어서, 용어 "할구"는 체외 수정란에서 난할에 의하여 생긴 세포로서, 주로 2세포기에서 포배기까지의 세포를 말한다. 자궁 내벽에 안정적으로 착상이 이루어지기 위해서는 할구가 포배기에 도달하기 전에 착상하는 것이 바람직하다.
- [0078] 본 발명은 추가로 다음의 단계를 포함하는 동형배아줄기세포(homozygous NT-ESC)의 제조방법을 제공한다:
- [0079] (a) 공여난자의 핵을 제거하는 단계;
- [0080] (b) 암컷 포유동물의 체세포를 탈핵된 공여난자에 주입하는 단계;
- [0081] (c) 화학적 활성화를 통해 반수체화를 유도하는 단계; 및
- [0082] (d) 상기 (c) 단계에서 수득된 난자를 배양하여 동형배아줄기세포(homozygous NT-ESC)를 수득하는 단계.
- [0083] 상기 동형배아줄기세포 제조방법의 (a) 및 (b) 단계는 전술한 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법과 동일하므로, 그 기재 생략한다.
- [0084] 본 발명의 동형배아줄기세포 제조방법에 있어서, 상기 (c) 단계는 재건된 성숙 난자를 화학적으로 활성화하는 단계로, 본 발명의 이수체 체세포 유래 반수체 염색체를 포함하는 생식세포의 제조방법의 (c) 단계에서 재건된 성숙 난자를 활성화 물질을 통해 활성화시키는 것이 상응한다.
- [0085] 상기 (c) 단계는 처녀생식 활성화라고도 하며, 이를 통해 반수체 염색체를 포함하는 난자를 수득할 수 있다.
- [0086] 상기 (c) 단계에서 수득된 난자는 (d) 단계에서 목적하는 바에 따라 적절한 조건으로 배양되며, 이러한 조건은 통상의 기술자의 기술상식에 따라 조절 가능하다. 상기 (d) 단계에서 반수체 염색체를 포함하는 난자는 상실배, 배반포를 거쳐 동형배아줄기세포로 발달한다.
- [0087] 상기 (d) 단계에서 반수체(n) 배아줄기세포는 지속적인 배양의 결과로 이수체화를 거쳐 최종적으로 이수체(2n) 동형배아줄기세포로 전환되며, 이수체화되는 과정의 배양 조건은 통상의 기술자의 기술상식에 따라 조절 가능하다.
- [0088] 본 발명의 동형배아줄기세포 제조방법에 따라 수득된 이수체 동형배아줄기세포는 유전질환의 연구에 활용함으로써 동물모델에 대한 실험결과의 간접적 오류를 줄일 수 있고, 처녀생식 배아줄기세포와 유사한 동형 HLA 타입을 가지는 체세포복제 배아줄기세포 개발에 활용될 수 있다.
- [0089] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0090] 1-1. 동물의 사용

[0091] 난자 공여 마우스는 B6D2F1 종으로 8-9주령 (20-24 g)의 암컷을 사용한다. 모든 시설과 과정은 서울아산병원 아산생명과학연구원 실험동물연구실의 실험동물보호 규정에 따라 진행되었다. 모든 실시예는 서울아산병원 아산생명과학연구원 실험동물연구실에 의해 개시된 실험동물의 관리와 이용에 대한 지침에 따라 수행되었다.

[0092] 1-2. 공여난자의 준비

[0093] 난자 공여 마우스에 5 IU의 PMSG를 복강 주사하고, 48-50 시간 후 5 IU의 hCG를 복강 주사하였다. hCG 주사 12-14시간 이후 마우스를 안락사시키고, 복강에서 난관을 꺼낸 다음, 난관에서 성숙 난자를 채취하였다.

[0094] 1-3. 공여난자의 탈핵

[0095] 상기 실시예 1-2에서 채취된 성숙 난자를 미세 조작 디쉬 내의 드랍으로 옮긴 후 미세 조작기 (micromanipulator), 방추사 이미징 시스템 (Oosight™ Imaging System) 및 레이저 시스템이 장착된 현미경 위에 놓았다. 성숙 난자를 난자 고정 피펫 (holding pipette)에 배치하고, 난자의 투명대를 레이저 시스템을 이용하여 뚫었다. 핵 제거 피펫(enucleation pipette)을 레이저로 뚫린 투명대 부분으로 넣어 핵을 성숙 난자로부터 제거하였다.

[0096] 1-4. 체세포의 준비

[0097] 체세포를 단일 세포화 한 다음 센다이 바이러스 (Sendai virus) 추출물 (GenomONE-CF-EX SeV-E(HVJ-E), Cosmo Bio)에 핵 제거 피펫 (enucleation pipette)을 사용하여 노출시켰다. 노출 후, 핵 제거 피펫으로 다시 회수하였고, 이후 탈핵된 공여 난자에 주입하는데 사용하였다.

실시예 2

[0098] 포유동물 이수체 체세포 염색체의 생식세포 유사 반수체화

[0099] 본 실시예에서는 상기 실시예 1-3에서 제조된 탈핵 공여난자와 실시예 1-4에서 준비된 체세포를 이용하여 체세포 유래 생식세포핵을 형성하고, 이를 유도한 후 정자와 체외 수정하여 배아줄기세포를 제조하였다.

[0100] 구체적으로, 1.25 mM 카페인, 5 µg/ml 사이토칼라신 B가 포함된 FHM 배지를 이용하여 미세 조작 디쉬(Glass-bottom dish)에 미세조작을 위한 드랍(droplet)을 만들고, 드랍을 미네랄 오일로 덮었다. 상기 실시예 1-3에서 제조된 탈핵 공여난자의 세포질에 상기 실시예 1-4에서 제조된 센다이 바이러스 추출물 (GenomONE-CF-EX SeV-E(HVJ-E), Cosmo Bio)에 노출된 체세포를 핵 제거 피펫을 사용하여 주입한 후, KSOM 배지(Millipore)에서 37℃, 5% CO₂ 조건에서 1.5-2 시간 배양하였다.

[0101] 이후 성숙 난자의 중기 방추사 (핵)는 Oosight™ Imaging System을 사용하여 시각화하였다. 구체적으로, 각 단계별 난자를 3.7% 포름알데하이드를 이용하여 고정시킨 후, 5 mg/ml 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) 용액을 사용하여 핵을 염색하였다. 형광현미경을 이용하여 DAPI 염색이 된 핵을 관찰하였으며, 광학 시야 (Bright field)에서도 관찰하여 DAPI 염색이 된 이미지와 병합하여 핵이 어디에 분포하는지도 관찰하였다. 그 결과, 도 4(A)에 나타난 바와 같이 체세포가 주입된 난자는 방추사가 다시 형성되어 성숙 난자로 재건되었음을 확인하였다.

[0102] 다음으로, 수컷 마우스의 부정소를 분리한 후, HTF 배지(Millipore) 드랍을 만든 후 드랍 안에서 부정소로부터 정자를 분리하였고, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 30분 동안 배양한 후 드랍 가장자리에서 활동성 있게 움직이는 정자를 체외 배양에 사용하였다. 재건된 성숙 난자와 HTF 배지에서 분리된 활동성 있는 정자를 이용하여 250 nM 스크립타이드 (scriptaid)가 첨가된 HTF 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건에서 체외 수정시켰다. 도 4(B)에 나타난 바와 같이 수정 1-2 시간 이후, 제 2 극체가 방출되었고, 2시간 쯤에 방추사가 약하게 보이다가 5시간 쯤에 방추사가 완전히 사라지는 것을 방추사 이미지 (spindle image)로 확인하였고 광학 시야 (Bright field)에서 유사전핵이 형성됨을 확인하였다.

[0103] 수정 5시간 이후, 250nM 스크립타이드가 첨가된 KSOM 배지로 수정된 배아를 옮기고, 37℃, 5% CO₂, 5% O₂ 조건에서 14-16시간 이후 일반 KSOM 배지로 배아를 옮겼다. 배반포가 형성될 때까지 37℃, 5% CO₂, 5% O₂ 조건에서 배

양하였다. 배반포는 투명대를 제거한 뒤 마우스 배아 섬유아세포가 배양되고 있는 배양 디쉬에서 10-14일 배양함으로써 배반포 내의 내세포집단 (inner cell mass)로부터 배아줄기세포를 수립하였다. 상기 마우스 배아 섬유아세포는 마우스를 교배한 후 임신 12.56-14일에 모체를 안락사시킨 다음, 태아가 들어있는 자궁을 적출하여, 태아의 피부 조직을 효소를 이용하여 단일 세포화 함으로써 수득하였다. 도 4(C)는 상기 과정으로 제조된 배반포와 배아줄기세포를 보여준다.

[0104] 추가로, 배아줄기세포의 핵형을 관찰하기 위해, 배아줄기세포에 KaryoMAX 콜세미드 (Life Technologies)를 처리하여 세포주기 중기로 동기화 한 후, 저장액 처리 및 고정 과정을 실시하였다. 고정된 세포들을 슬라이드 글라스에 떨어뜨려 세포에서 터져 나온 염색체를 5 mg/ml 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) 용액을 사용하여 핵을 염색하여 형광현미경에서 관찰하였다. 그 결과, 도 4(D)에 나타난 바와 같이 상기 과정으로 수립된 배아줄기세포는 정상 핵형 (2n=40)을 가짐을 확인하였다.

실시예 3

[0105] **체세포 생식세포핵 유도 후 체외수정 시기에 따른 발달을 확인**

[0106] 본 실시예에서는 체세포 생식세포핵 유도 후 체외수정 시기를 결정하기 위하여, 생식핵 형성 시간을 1시간, 1.5시간 또는 2시간으로 나눈 후, 체외 수정을 수행하였고, 이에 따른 배아 발달율을 분석하였다.

[0107] 그 결과, 도 5(A)에 나타난 바와 같이 2시간째에 완전한 유사 감수분열 중기에 이르렀고, 이 시기에 체외 수정을 한 경우, 배반포 발달률이 가장 좋았다 (63%).

[0108] 이러한 결과를 바탕으로 2시간 후 정상 난자와 핵을 제거한 난자에 체외수정을 하였고(NT-IVF 실험군), 이를 일반 체외 수정을 한 대조군(control IVF) 및 탈핵 난자에 공여세포 없이 체외 수정한 군(enucleation IVF; 핵제거 IVF)과 비교하였다. 도 5(B)에서 확인되는 바와 같이 정상 난자의 배반포 발달률이 가장 좋았으며, 핵을 제거한 난자는 13%만이 배반포로 발달하였다. NT-IVF 실험군의 경우, 대조군 보다는 다소 낮은 배반포 발달율을 보였으나, 탈핵 난자에 공여세포 없이 체외 수정한 군(enucleation IVF) 보다는 높은 발달율을 보였다. NT-IVF 실험군과 핵제거 IVF군(enucleation IVF) 사이의 현저한 배반포 발달율의 차이는 NT-IVF 실험군이 배아 정자의 영향만으로 발달하는 것이 아님을 의미한다.

실시예 4

[0109] **체세포를 이용한 상동염색체 동형배아줄기세포 수립**

[0110] 본 실시예에서는 상기 실시예 1-3에서 제조된 탈핵 공여난자 및 실시예 1-4에서 준비된 체세포를 이용하여 상동염색체 동형배아줄기세포를 수립한다.

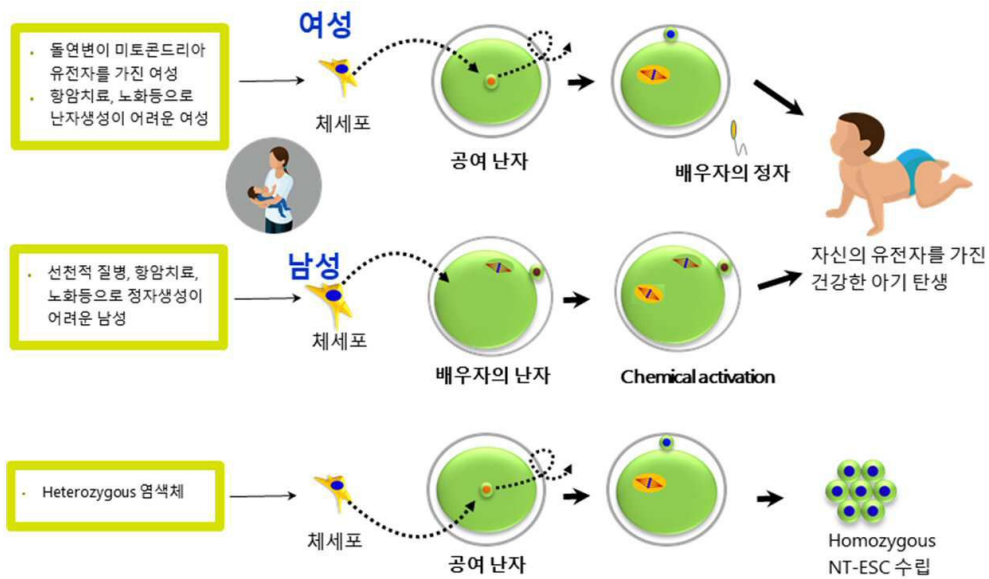
[0111] 구체적으로, 1.25 mM 카페인, 5 µg/ml 사이토칼라신 B가 포함된 FHM 배지를 이용하여 미세 조작 디쉬(Glass-bottom dish)에 미세조작을 위한 드랍(droplet)을 만들고, 드랍을 미네랄 오일로 덮었다. 상기 실시예 1-3에서 제조된 탈핵 공여난자의 세포질에 상기 실시예 1-4에서 제조된 센다이 바이러스 추출물 (GenomONE-CF-EX SeV-E(HVJ-E), Cosmo Bio)에 노출된 체세포를 핵 제거 피펫을 사용하여 주입한 후, KSOM 배지(Millipore)에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2 시간 배양하였다. 배양 후 10 mM 염화스트론튬(strontium chloride)이 첨가된 활성화 배지에서 인위적인 활성화를 유도하였다. 활성화 5시간 이후, 250nM 스크립타이드가 첨가된 KSOM 배지로 수정된 배아를 옮기고, 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ 조건에서 14-16시간 이후 일반 KSOM 배지로 배아를 옮겼다. 배반포가 형성될 때까지 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ 조건에서 배양하였다. 배반포는 투명대를 제거한 뒤 마우스 배아 섬유아세포가 배양되고 있는 배양 디쉬에서 10-14일 배양함으로써 배반포 내의 내세포집단 (inner cell mass)로부터 배아줄기세포를 수립하였다.

[0112] 그 결과, 도 6(A)에서 확인되는 바와 같이 방추사 관찰 이미지 시스템 (spindle imaging system)을 통해 체세포 유래 생식세포핵이 유도되었고, 화학적 난자 활성화에 의해 제2차 유사 극체(PPB)가 방출되며 1개의 유사 전핵 (PPN)이 형성되었다. 이는 활성화된 난자이기 때문에 반수체 (n, haploid)임을 확인할 수 있는 지표이다. 난자는 2세포기 및 8세포기를 거쳐 상실배기로 발달하였다.

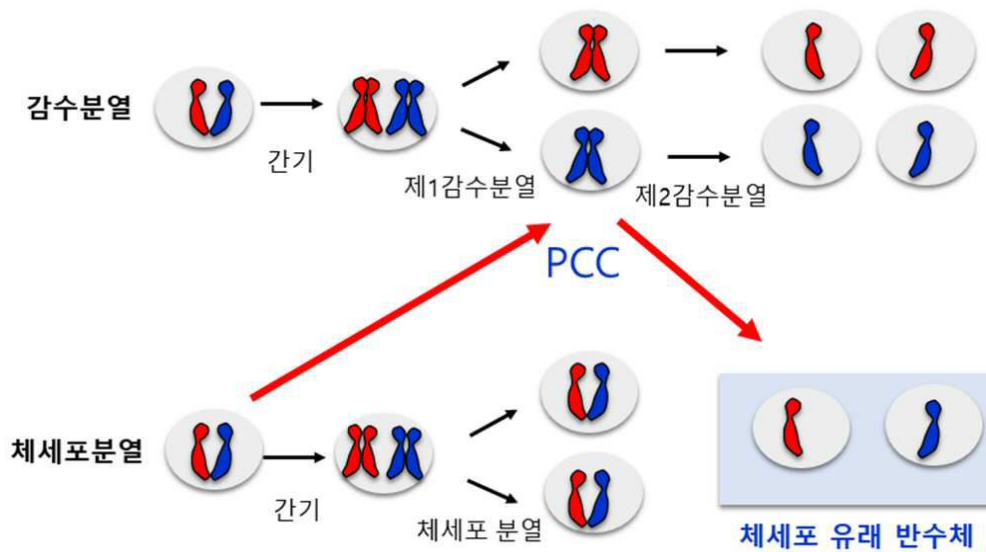
[0113] 또한, 도 6(B) 및 (C)에 나타난 바와 같이 배아에서 배반포까지 배아가 잘 발달되었고 반수체(n) 배아줄기세포가 수립되었으며, 염색체 분석을 통해 반수체(n) 배아줄기세포가 지속적인 배양의 결과로 이수체화를 거쳐 최종적으로 이수체(2n) 동형배아줄기세포로 전환되었음을 확인하였다.

도면

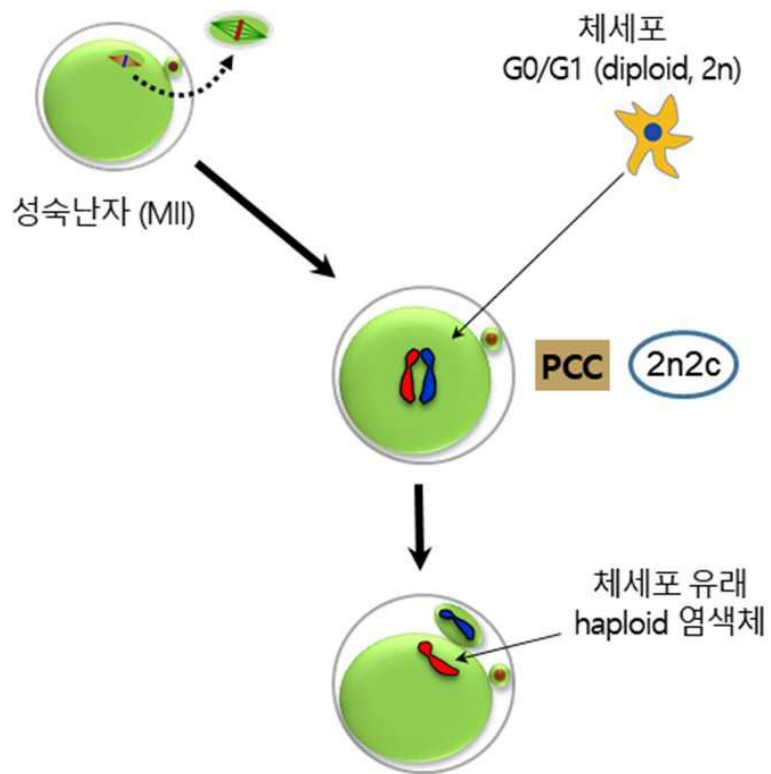
도면1



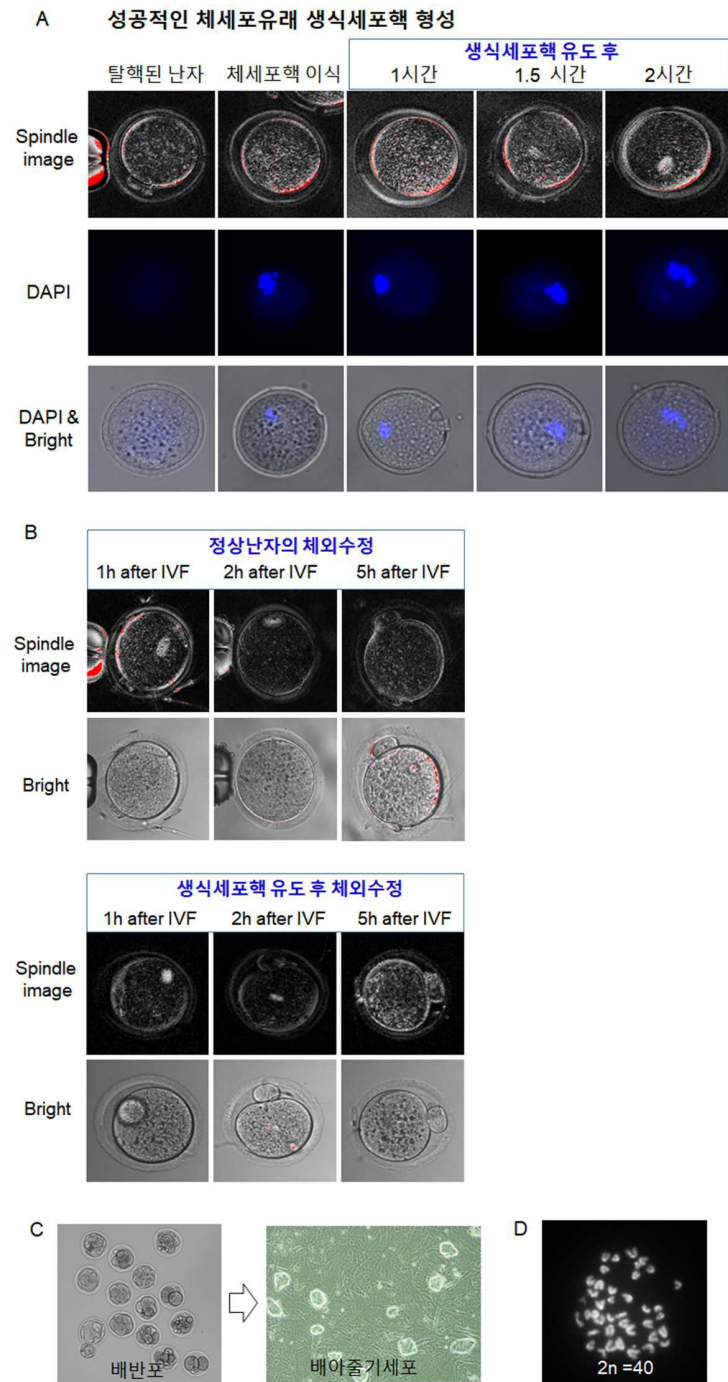
도면2



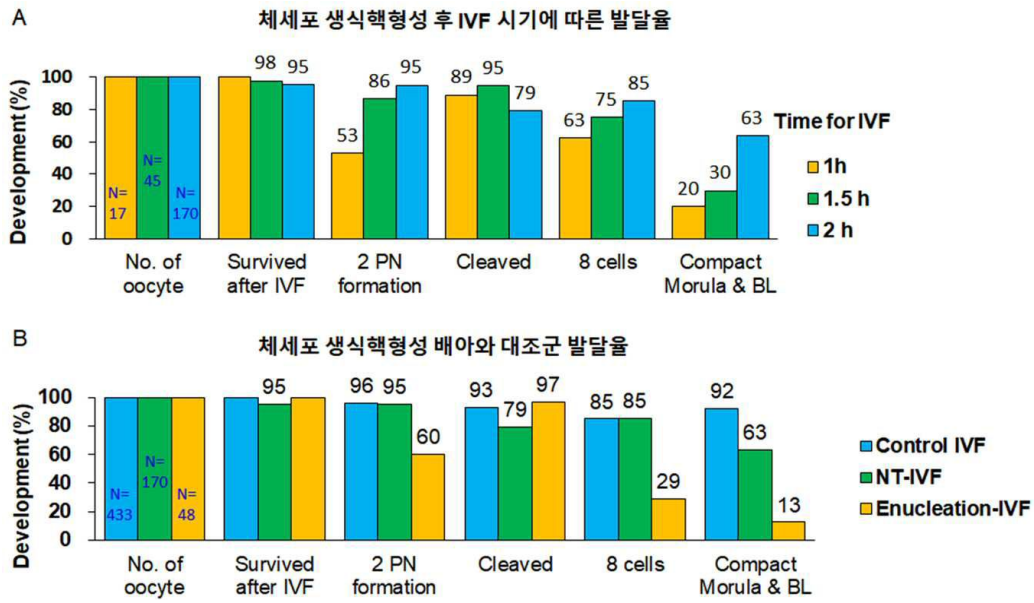
도면3



도면4

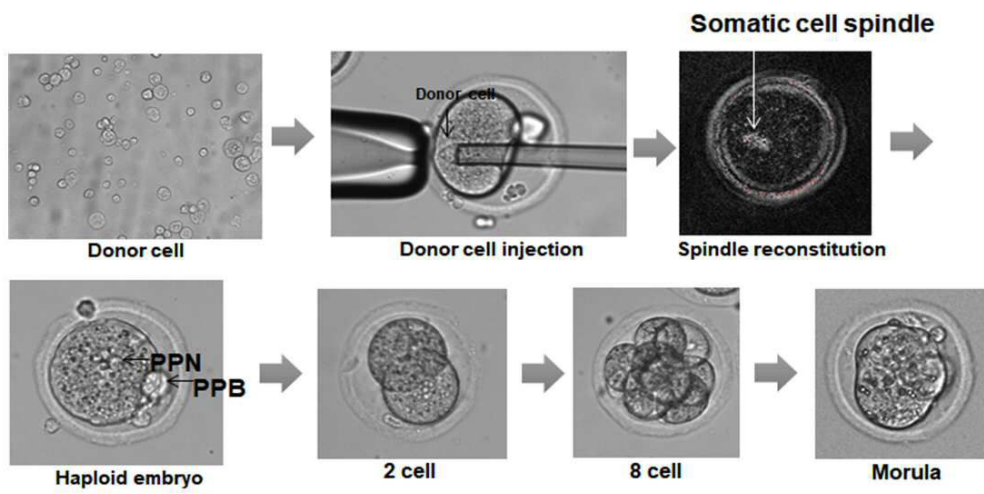


도면5

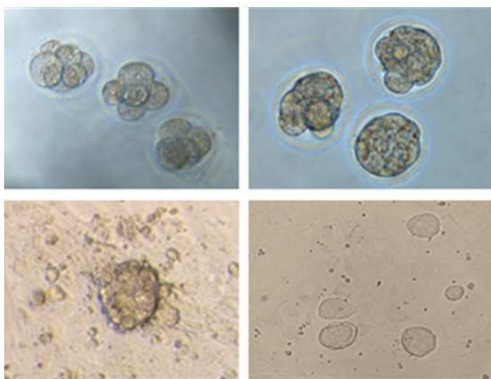


도면6

A



B



C

