



공개특허 10-2020-0092344



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0092344
(43) 공개일자 2020년08월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/076 (2010.01) *A01K 67/02* (2014.01)
A61K 35/52 (2015.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/075* (2010.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/061 (2013.01)
A01K 67/02 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7017027
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월03일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년06월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2018/000243
- (87) 국제공개번호 WO 2019/109123
국제공개일자 2019년06월13일
- (30) 우선권주장
62/594,124 2017년12월04일 미국(US)
62/594,153 2017년12월04일 미국(US)

(71) 출원인
크로모시온 피티와이 엘티디
오스트레일리아 퀸즐랜드 4306 카라나 다운스 탈
라루크 코트 14

(72) 발명자
드 웃, 샤론, 캐서린
오스트레일리아 퀸즐랜드 4306 카라나 다운스 탈
라루크 코트 14

호사인, 미들, 샤로아레
오스트레일리아 퀸즐랜드 4300 굿나 벨레뷰 로드
43

(74) 대리인
특허법인한성

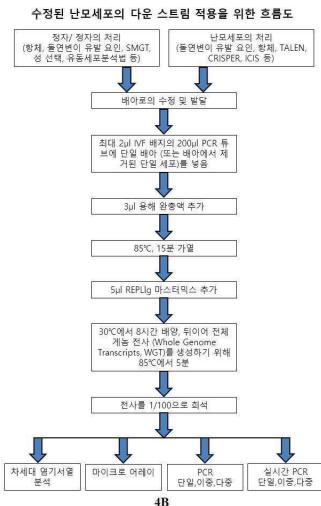
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 성 선택을 포함하는 물질 및 방법

(57) 요약

다음 단계를 포함하는 방법 :

1. 임의로 정자 처리 단계에 적용시키는 단계;
2. 관심 있는 암컷 또는 수컷 정자를 선택하기 위해 단계 1의 정자를 성 선택 단계에 적용하는 단계;
3. 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 생성하기 위해 단계 2의 관심 있는 정자를 사용하여 수정 단계를 수행하는 단계;
4. 정자 존재 하에서 단계 3의 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시켜 적어도 하나의 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 세포 물질을 선택적으로 방출시키는 단계; 및
5. 적어도 하나의 다운스트림 적용에서 방출된 세포 물질을 사용하는 단계.

대 표 도 - 도4b

(52) CPC특허분류

A61K 35/52 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C12N 5/0609 (2013.01)
G01N 33/689 (2013.01)
A01K 2227/108 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
C12N 2509/10 (2013.01)
G01N 2800/367 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 방법:

1. 임의로 정자를 처리 단계에 적용하는 단계;
2. 관심있는 암컷 또는 수컷 정자를 선택하기 위해 단계 1의 정자를 성 선택 단계에 적용하는 단계;
3. 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 생성하기 위해 단계 2의 관심있는 정자를 사용하여 수정 단계를 수행하는 단계;
4. 적어도 하나의 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 세포 물질을 선택적으로 방출하기 위해 정자의 존재 하에서 단계 3의 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는 단계; 및
5. 적어도 하나의 다운스트림 적용에서 방출된 세포 물질을 사용하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 1은 다음을 포함하는 방법: 정자에 실험 기술을 적용하는 단계; 정자에 돌연변이 유발 요인 또는 의심되는 돌연변이 유발 요인을 적용하는 단계; 재조합 기술로 정자를 조작하는 단계; 정자에 분자, 예컨대 항체를 적용시키는 단계; 또는 정자를 방사선에 노출시키는 단계.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 3의 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 단계 1에 기재된 처리 단계에 적용하는 단계를 임의로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 2는 수컷 정자에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 수행되는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 항체가 포유 동물 수컷 정자 (수컷 정자 세포)의 표면 단백질에 특이적으로 결합하고/하거나 인식되는 단일클론 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 항체가 수컷 정자 세포의 표면 단백질 DEAD/DBY에 특이적으로 결합하고; 항체는 다음 DBY의 에피토프 중 하나에 특이적으로 결합하고: SFFFFEMESH (서열 식별번호: 353), FSIFNRDGV (서열 식별번호: 354) 또는 SLNIFLDRW (서열 식별번호: 355); 항체는 CDR1 (서열 식별번호 363), CDR2 (서열 식별번호 364) 및 CDR3 (서열 식별번호 365)의 아미노산 서열을 포함하는 중사를 가변 도메인을 포함하고/하거나 항체는 CDR1 (서열 식별번호 360), CDR2 (서열 식별번호 361) 및 CDR3 (서열 식별번호 362)의 아미노산 서열을 포함하는 경사를 가변 도메인을 포함하고; 항체는 본원에 기재된 RE5이고; 항체는 서열 식별번호 352 및 84 내지 159 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 이의 일부에 대해 인식되고; 또는 항체는 서열 식별번호 347의 아미노산 서열에 대해 인식되는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 2는 정자가 포함된 포유 동물 정액에 단일 클론 항체 또는 이의 단편을 적용하여 항체가 정액의 수컷 정자에 특이적으로 결합하도록 하는 것을 포함하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 3은 적어도 하나의 보충제로 단계 (1) 내지 (6) 중 하나 이상에서 선택적으로 보충됨으로써 배양 배지의 조성이 단계적으로 변경되는 것을 제외하고, 본질적으로 동일한 배양 배지에서 적어도 하나의 난모세포를 (1) 세척, (2) 수집, (3) 배양, (4) 수정, 임의로 (5) 세척, 및 임의로 (6) 배양하는 순차적인 단계를 포함함으로써, 상기 적어도 하나의 수정된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아의 생산을 개선시키는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항에 있어서, 단계 4는 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 용해 용액에 적용하여 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 용해시키고, 세포 물질은 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아에서 방출되지만, 정자는 용해되지 않는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 다운스트림 적용은 폴리미라아제 효소를 사용하여 용해 완충액 내에서 방출된 물질을 선택적으로 복제하는 것을 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적 변화 또는 유전자형의 변화를 특징짓는 데 사용되거나; 돌연변이 유발 요인을 확인하는 데 사용되거나; 또는 진단 목적으로 사용될 때의 방법.

청구항 12

포유동물의 수컷 정자 (수컷 정자 세포)의 표면 단백질에 특이적으로 결합하고/하거나 인식되는 단일 클론 항체 또는 이의 단편.

청구항 13

제12항에 있어서, 수컷 정자 세포의 표면 단백질이 DEAD/DBY인 단일 클론 항체 또는 이의 단편.

청구항 14

제13항에 있어서, 다음 DBY의 에피토프 중 어느 하나에 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체 또는 이의 단편: SFFFFEMESH (서열 식별번호: 353), FSIFNRDGV (서열 식별번호: 354) 또는 SLNIFLDRW (서열 식별번호: 355).

청구항 15

제13항에 있어서, 중사슬 가변 도메인의 항체 또는 이의 단편이 CDR1 (서열 식별번호: 363), CDR2 (서열 식별번호: 364) 및 CDR3 (서열 식별번호: 365)의 아미노산 서열을 포함하고/또는 경사슬 가변 도메인의 항체 또는 이의 단편은 CDR1 (서열 식별번호: 360), CDR2 (서열 식별번호: 361) 및 CDR3 (서열 식별번호: 362)의 아미노산 서열을 포함하는 단일 클론 항체 또는 이의 단편.

청구항 16

제13항에 있어서, 중사슬 가변 도메인의 항체 또는 이의 단편이 서열 식별번호: 350의 아미노산 서열을 포함하거나 이의 중사슬 가변 도메인은 서열 식별번호: 350으로 표시되는 아미노산 서열의 하나 또는 여러 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 유도되고, 서열 식별번호: 350과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖고, 상기 항체 또는 이의 단편은 표면 단백질과 특이적으로 결합하는 활성을 갖는 단일 클론 항체 또는 이의 단편.

청구항 17

제13항에 있어서, 경사슬 가변 도메인의 항체 또는 이의 단편은 서열 식별번호: 351의 아미노산 서열을 포함하거나 이의 경사슬 가변 도메인은 서열 식별번호: 351로 표시되는 아미노산 서열의 하나 또는 여러 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 유도되고, 서열 식별번호: 351과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖고, 상기 항체 또는 이의 단편은 표면 단백질과 특이적으로 결합하는 활성을 갖는 단일 클론 항체 또는 이의 단편.

단편.

청구항 18

제13항에 있어서, 소 및 돼지 종을 포함하는 상이한 포유동물 종의 DEAD/DBY에 결합할 수 있는 단일 클론 항체 또는 이의 단편.

청구항 19

유효량의 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 및 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 약학 조성물의 형태, 수의학용 조성물의 형태, 또는 연구 목적의 형태인 조성물.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제가 정액 증량제인 조성물.

청구항 22

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 시약, 키트 또는 칩.

청구항 23

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물의 진단제, 시약 또는 도구로서의 용도.

청구항 24

제23항에 있어서 단일 클론 항체 또는 이의 단편이 검출 목적으로 표지되거나 고체 담체, 예를 들어 비드와 결합할 수 있는 용도.

청구항 25

정자가 포함된 포유동물 정액에 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물을 적용하여 항체가 정액의 수컷 정자 ("수컷 정자 세포")에 특이적으로 결합하도록 하는 단계를 포함하는, 포유동물의 정자 ("정자 세포")를 처리하는 방법.

청구항 26

포유동물의 정자를 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물과 접촉시켜 항체 또는 이의 단편이 수컷 정자에 특이적으로 결합하도록 하는 단계를 포함하는, 암컷에서 새끼의 생산 확률을 높이기 위해 포유동물의 정자 ("정자 세포")를 처리하는 방법.

청구항 27

정액의 정자를 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물과 접촉시켜 항체 또는 이의 단편이 정액의 수컷 정자에 특이적으로 결합하도록 하는 단계를 포함하는, 포유동물의 정액을 성 감별하는 방법.

청구항 28

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물로 처리될 때 정액 또는 정자를 포함하는 조성물.

청구항 29

암컷에서 새끼의 생산 확률을 높이기 위해, 포유 동물을 인공적으로 수정시키는 방법으로서,

- (i) 유효량의 제 11 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편;
- (ii) 유효량의 제 19 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항의 조성물; 또는
- (iii) 유효량의 제 21 항의 조성물을 투여하여 상기 포유 동물을 인공적으로 수정시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 30

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물 및 수컷 정자 ("수컷 정자 세포")의 접합체.

청구항 31

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물 및 수컷 정자의 접합체를 포함하는 처리된 정자 또는 처리된 정액.

청구항 32

수컷 정자 선택이 임의로 대량 정액으로 수행되는, 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물의 상기 수컷 정자 ("수컷 정자 세포") 선택을 위한 용도.

청구항 33

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체 또는 이의 단편 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물의 포유동물의 정액 또는 정자를 성 감별하기 위한 용도.

청구항 34

제25항, 제26항, 제27항 및 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 정자의 양을 정량화한 다음 적절한 양의 단일 클론 항체 또는 이의 단편을 첨가하여 수컷 정자 세포에 항체의 결합을 최적화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체를 포함하는 하이브리도마 세포.

청구항 36

다음을 코딩하는 하나 이상의 단리, 정제 또는 재조합 핵산:

- (i) 제11항 내지 18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체의 중사슬 가변 도메인;
- (ii) 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체의 경사슬 가변 도메인;
- (iii) 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체의 중사슬 가변 도메인의 CDR1 (서열 식별번호: 363), CDR2 (서열 식별번호: 364) 및 CDR3 (서열 식별번호: 365); 및/또는
- (iv) 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단일 클론 항체의 경사슬 가변 도메인의 CDR1 (서열 식별번호: 361), CDR2 (서열 식별번호: 362) 및 CDR3 (서열 식별번호: 363).

청구항 37

서열 식별번호: 347의 아미노산 서열에 인식될 때, 단리된 단일 클론 항체.

청구항 38

적어도 하나의 보충제로 단계 (1) 내지 (6) 중 하나 이상에서 선택적으로 보충됨으로써 배양 배지의 조성이 단계적으로 변경되는 것을 제외하고, 본질적으로 동일한 배양 배지에서 적어도 하나의 난모세포를 (1) 세척, (2) 수집, (3) 배양, (4) 수정, 임의로 (5) 세척, 및 임의로 (6) 배양하는 순차적인 단계를 포함함으로써, 상기 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 미리 이식된 배아 또는 배반포의 생산을 개선시키는, 적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포를 생산하는 방법.

청구항 39

적어도 하나의 보충제로 단계 (1) 내지 (6) 중 하나 이상에서 선택적으로 보충됨으로써 배양 배지의 조성이 단계적으로 변경되는 것을 제외하고 본질적으로 동일한 배양 배지가 단계 (1) 내지 (6)에서 사용되는, (1) COC로부터 적어도 하나의 난모세포를 방출시키기 위해 축적-난모세포 복합체(COC)를 세척하는 단계, (2) 단계 (1)의 적어도 하나의 난모세포를 수집하는 단계, (3) 단계 (2)의 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 단계, (4) 단계 (3)의 적어도 하나의 난모세포를 정자와 수정하여 적어도 하나의 수정된 난모세포, 배아 또는 배반포를 생성하는 단계, 임의로 (5) 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 배아를 세척하는 단계, 및 임의로 (6) 추가 배아 발생을 위해 단계 (5)로부터 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 배아를 배양하는 단계의 순차적인 단계를 포함함으로써, 상기 적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포의 생산을 개선시키는, 적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포를 생산하는 방법.

청구항 40

적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포를 생산하는 방법으로서,

- (1) COC로부터 적어도 하나의 난모세포를 방출하기 위해 축적-난모세포 복합체 (COC)의 제제를 배양배지로 두 번 및 배양 배지 + 보충제 1로 한번 세척하는 단계;
- (2) 단계 (1)의 적어도 하나의 난모세포를 수집하고, 예정된 시간 동안 배양 배지 + 보충제 1에서 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 단계;
- (3) 예정된 시간 동안 배양 배지 + 보충제 2에서 단계 (2)의 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 단계;
- (4) 적어도 하나의 수정된 난모세포를 생성하기 위해 예정된 시간 동안 배양 배지 + 보충제 3에서 단계 (3)의 적어도 하나의 난모세포와 정자를 수정하는 단계; 임의로
- (5) 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 그 결과로 생긴 배아를 배양 배지 + 보충제 4로 세척하는 단계; 및 임의로
- (6) 추가 배아 발생을 위해 배양 배지 + 보충제 4에서 단계 (5)로부터의 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 배아를 배양하는 단계를 포함하고,

여기서 본질적으로 동일한 배양 배지가 단계 (1) 내지 (6) 각각에서 사용되는 방법.

청구항 41

제38항, 제39항 또는 제40항의 방법에 의해 생성될 때의, 적어도 하나의 수정된 난모세포, 배반포 또는 미리 이식된 배아.

청구항 42

제38항, 제39항 또는 제40항에 기재되거나 제38항, 제39항 또는 제40항의 방법에 사용될 때의, 배양 배지 또는 배양 배지 + 보충제.

청구항 43

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따라 기재된 적어도 하나의 미리 이식된 수정된 난모세포, 배반포 또는 배아를 생산하기 위한 고 생산성 시험관 내 생산 (IVP) 방법.

청구항 44

정자의 존재하에 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는, 하기 단계를 포함하는 방법:

난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 용해 용액에 적용시켜 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배반포를 용해시키고 세포 물질이 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배반포로부터 방출되지만, 정자는 용해되지 않는 단계.

청구항 45

제44항의 방법에 의해 생성될 때의, 방출된 세포 물질.

청구항 46

용해 용액에 의해 용해되지 않는 정자의 존재하에서 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키고, 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 세포 물질을 선택적으로 방출시켜서 세포물질 및 용해 용액이 다운스트림 적용과 호환되도록 하기 위한 용해 용액.

청구항 47

다음 단계를 포함하는, 정자의 존재하에서 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시켜 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 유전 물질이 폴리미라아제 효소를 사용하여 선택적으로 복제 될 수 있도록 하는 방법:

(1) 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 용해 용액에 적용시켜 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 용해시키고 유전 물질이 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 방출되나, 정자는 용해되지 않는 단계; 및

(2) 폴리미라아제 효소를 사용하여 용해 완충액 내에서 방출된 유전 물질을 선택적으로 복제하는 단계.

청구항 48

제47항의 방법에 의해 생성될 때의, 방출된 유전 물질.

청구항 49

용해 용액에 의해 용해되지 않는 정자의 존재하에서 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키고, 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 유전 물질을 선택적으로 방출해서 용해 완충액 내에서 유전 물질이 폴리미라아제 효소를 사용하여 선택적으로 복제될 수 있도록 하기 위한 용해 용액.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원

[0002] 본 출원은 2017년 12월 4일에 출원된 미국 특허 출원 번호 62/594124 및 62/594153의 우선권을 주장하며, 이의 전체 내용은 상호 참조를 위해 각각 본원에 포함된다.

[0003] 표제 1

[0004] 생식 방법론

[0005] 본 발명은 일반적으로 보조 생식 방법론에 관한 것이다. 일 측면에서, 본 발명은 돼지에서 하나 이상의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포, 바람직하게는 미리 이식된 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 지난 30 년 동안 생식 생리학 연구뿐만 아니라 예를 들어, 유전자 도입 돼지의 생산에 관한 다른 생명공학 및 생체의학 연구의 일부로서 돼지의 시험관 내 생산 (*in vitro* production, IVP)을 개선하는 데 상당한 관심이 있었다 (Gil et al., 2010; Vajta and Callesen, 2012; Liu et al., 2011; Lopes et al., 2007; Li et al., 2013). 일부 실험실에서 배반포 생산의 허용 수준 (30-35%)이 얻어졌지만 (Kim et al., 2008; Somfai et al., 2005), 예를 들어, 소와 비교하여, 돼지 IVP 시스템의 변화 및 취약성은 핵심 요소가 여전히 해결되어야 한다는 것을 분명히 보여준다.

[0007] 적절한 난모세포 성숙은 성공적인 수정의 전제 조건이며, 감수 분열 성숙의 일시적 차단은 최적의 세포질 성숙을 가능하게하여, 더 큰 용량 및 이후 배아 발달을 촉진시킨다 (Fouladi-Nashta et al., 1998). 시험관 내 수정 (*in vitro* fertilization, IVF) 결과에 대한 신선 및 냉동 해동된 정액 사이의 변동을 감소 시키려고 노력했

지만, IVF의 효율은 여전히 대부분의 IVF 실험실에서 40~50%로 유지되고 (Li et al., 2003; Alminana et al., 2005), 정액의 최적의 양은 여전히 이해되지 않는다. IVP 시스템을 개선하기 위해 다양한 유형의 배지 보충제 및 배지 조건을 사용하려는 시도에도 불구하고, 성공률은 여전히 최적이 아니다. 전통적인 IVP 시스템은 난모세포 수집에서 배아 배양에 이르기까지 여러 배지를 사용하며, 이는 시스템의 변화 및 재현성의 부족을 초래할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

다른 실험실에 의해 이용되는 IVP 프로토콜 간 일관성이 없기 때문에, 최적화된 IVP 시스템은 실현될 수 없을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009]

본 발명의 일 측면에서, 본 발명자들은 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포의 시험관 내 생산(IPV)을 개선하기 위한 배양 시스템을 개발하였다.

[0010]

또 다른 측면에서, 본 발명자들은 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포의 개선된 생산을 위해, 본질적으로 단일 배양 배지를 사용함으로써 단순화된 IVP 방법을 개발하였다.

[0011]

또 다른 측면에서, 이 개선된 배아 배양 배지 및 방법은 변형이 적은 상이한 실험실에서 표준으로서 사용될 수 있어, 높은 재현성을 제공한다.

[0012]

또 다른 측면에서, 본 발명자의 IPV 시스템의 단순성은 예를 들어 생의학 연구에서, 추가 적용의 가능성으로 배아 발달 및 품질을 손상시키지 않으면서 고 생산성을 용이하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0013]

본 발명의 바람직한 특징, 구체예 및 변형은 이 기술분야의 당업자가 본 발명을 수행하기에 충분한 정보를 제공하는 다음의 상세한 설명으로부터 알 수 있다. 상세한 설명은 어떠한 방식으로든 본 발명의 요약의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 상세한 설명은 다음과 같이 다수의 도면을 참조 할 것이다:

도 1A는 본 발명의 일 구체예에 따라, 본질적으로 단일 배양 배지 (M-199)를 이용하는 단순화된 고 생산성 IPV 시스템의 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

본 발명의 제1측면에 따르면, 적어도 하나의 보충제로 단계 (1) 내지 (6) 중 하나 이상에서 선택적으로 보충됨으로써 배양 배지의 조성물이 단계적으로 변경되는 것을 제외하고, 이에 의해 상기 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 미리 이식된 배아 또는 배반포의 생산을 개선시키고, (1) 세척, (2) 수집, (3) 배양, (4) 수정, 임의적으로 (5) 세척, 및 임의적으로 (6) 본질적으로 동일한 배양 배지에서 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 순차적인 단계를 포함하는, 적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포를 생산하는 방법이 제공된다.

[0015]

바람직하게는, (1) COC로부터 적어도 하나의 난모세포를 방출하는 축적-난모세포 복합체(COC)의 세척하는 단계, (2) 단계 (1)의 적어도 하나의 난모세포를 수집하는 단계, (3) 단계 (2)의 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 단계, (4) 적어도 하나의 수정된 난모세포, 배아 또는 배반포를 생산하기 위해 단계 (3)의 적어도 하나의 난모세포를 정자와 수정하는 단계, 임의로 (5) 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 배아를 세척하는 단계, 및 임의로 (6) 추가 배아 발생을 위해 단계 (5)로부터 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 배아를 배양하는 단계의 순차적인 단계를 포함하고, 여기서 본질적으로 동일한 배양 배지가 단계 (1) 내지 (6)에서 사용되고, 적어도 하나의 보충제로 단계 (1) 내지 (6) 중 하나 이상에서 선택적으로 보충됨으로써 배양 배지의 조성물이 단계적으로 변경되는 것을 제외하고, 이에 의해 상기 적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포의 생산을 개선시키는, 적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포를 생산하는 방법이 제공된다.

[0016]

본 발명의 제2측면에 따르면, 적어도 하나의 수정된 난모세포, 미리 이식된 배아 또는 배반포를 생산하는 방법으로서,

- [0017] (1) COC로부터 적어도 하나의 난모세포를 방출하기 위해 축적-난모세포 복합체 (COC)의 제제를 배양배지로 두 번 및 배양 배지 + 보충제 1로 한번 세척하는 단계;
- [0018] (2) 단계 (1)의 적어도 하나의 난모세포를 수집하고, 예정된 시간 동안 배양 배지 + 보충제 1에서 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 단계;
- [0019] (3) 예정된 시간 동안 배양 배지 + 보충제 2에서 단계 (2)의 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 단계;
- [0020] (4) 적어도 하나의 수정된 난모세포를 생성하기 위해 예정된 시간 동안 배양 배지 + 보충제 3에서 단계 (3)의 적어도 하나의 난모세포와 정자를 수정하는 단계; 임의로
- [0021] (5) 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 그 결과로 생긴 배아를 배양 배지 + 보충제 4로 세척하는 단계; 및 임의로
- [0022] (6) 추가 배아 발생을 위해 배양 배지 + 보충제 4에서 단계 (5)로부터의 적어도 하나의 수정된 난모세포 또는 배아를 배양하는 단계를 포함하고, 여기서 본질적으로 동일한 배양 배지가 단계 (1) 내지 (6) 각각에서 사용되는 방법이 제공된다.
- [0023] 본 발명의 제3측면에 따르면, 제 1 또는 제 2 측면의 방법에 의해 생산될 때 적어도 하나의 수정된 난모세포, 배반포 또는 미리 이식된 배아가 제공된다.
- [0024] 본 발명의 제4측면에 따르면, 본 발명의 제 1 또는 제 2 측면에 기재된 바와 같이 배양 배지 또는 배양 배지 + 보충제 (1, 2, 3 또는 4)가 제공된다.
- [0025] 본 발명의 제5측면에 따르면, 본 발명의 앞선 측면 중 어느 하나에 따라 기재된 바와 같이 적어도 하나의 미리 이식된 수정된 난모세포, 배반포 또는 배아를 생산하기 위한 고 생산성 시험관 내 생산 (IVP) 방법이 제공된다.
- [0026] 난모세포는 인간 또는 임의의 적합한 유형의 동물로부터 공급될 수 있다. 동물은 포유 동물 일 수 있다. 동물은 돼지, 소, 말, 양 또는 염소와 같은 농장 동물 일 수 있다. 동물은 개 또는 고양이와 같은 반려 동물 일 수 있다. 동물은 토끼, 마우스 또는 쥐와 같은 실험실 동물 일 수 있다. 바람직하게는, 난모세포는 돼지로부터 공급된다.
- [0027] 바람직하게는, 하나 이상의 수정된 난모세포, 배아 또는 배반포가 상기 기재된 본 발명의 상이한 측면에 의해 생성된다. 더욱 바람직하게는, 많은 수정된 난모세포, 배반포 또는 배아가 동시에 생성된다.
- [0028] 임의의 적합한 유형의 배양 배지가 사용될 수 있다. 발명자들은 시험관 내 성숙 (*in vitro* maturation, IVM) 배지 M-199가 본 발명의 제1, 제2 및 제4측면에 특히 적합한 배지인 것으로 밝혀졌지만, M-199와 유사한 특성을 갖는 임의의 매체가 사용될 수 있다.
- [0029] 배양 배지는 다음 유형의 성분 중 하나 이상을 가질 수 있다: 영양 또는 에너지 (예: 포도당, 단백질, 아미노산); 미네랄 (예: 염화나트륨, 염화칼슘, 염화칼륨, 제일인산칼륨, 인산이수소나트륨일수화물, 황산마그네슘칠수화물, 탄산수소나트륨, 락트산나트륨, 락트산칼슘, 질산철구수화물); 비타민 (예: 비타민 A, 티아민, 리보플라빈, 피리독신, 염산 피리독살, PABA, 니아신마이드, 니아신, 아스코르빈산, 비오틴, 판토텐산D-칼슘, 염화콜린, 에르고칼시페롤, 엽산, i-이노시톨, 메나디온); pH 지시약 (예: 페놀레드); 항균제 (예: 페니실린 G, 스트렙토마이신); 항산화제 (예: 글루타티온); 및 기타 적합한 보충제 (예: 돼지 난포액 (Porcine follicular fluid, PFF), 최소필수영양배지, 태아송아지혈청 (Foetal calf serum), 임마 혈청 성선 자극 호르몬 (Pregnant mare serum gonadotrophin), 인간 융모성 생식선 자극호르몬 (Human chorionic gonadotrophin), 피루브산나트륨 및 카페인).
- [0030] 전형적으로, M-199는 하기 표 1A에 나타낸 특성을 가질 것이다.

표 1**표 1A. M-199의 특성**

구성요소	분자량	농도 (mg/L)	mM
아미노산			
글리신	75.0	50.0	0.6666667
L-알라닌	89.0	25.0	0.28089887
L-아르기닌 염산염hydrochloride	211.0	70.0	0.33175355

L-아스파르트산	133.0	30.0	0.22556391
L-시스테인 염산염-H ₂ O	176.0	0.1	5.681818E-4
L-시스테인 2HC1	240.0	26.0	0.108333334
L-글루탐산	147.0	75.0	0.5102041
L-글루타민	146.0	100.0	0.6849315
L-히스티딘 염산염-H ₂ O	210.0	21.88	0.10419047
L-히드록시프롤린	131.0	10.0	0.07633588
L-아이소류신	131.0	40.0	0.3053435
L-류신	131.0	60.0	0.45801526
L-라이신 염산염	183.0	70.0	0.38251367
L-메티오닌	149.0	15.0	0.10067114
L-페닐알라닌	165.0	25.0	0.15151516
L-프롤린	115.0	40.0	0.3478261
L-세린	105.0	25.0	0.23809524
L-트레오닌	119.0	30.0	0.25210086
L-트립토판	204.0	10.0	0.04901961
L-타이로신 디소디움 염 디히드레이트	261.0	58.0	0.22222222
L-발린	117.0	25.0	0.21367522

비타민

아스코르브산	176.0	0.05	2.840909E-4
비오텐	244.0	0.01	4.0983607E-5
염화 콜린	140.0	0.5	0.0035714286
D-칼슘 판토텐산염	477.0	0.01	2.096436E-5
엽산	441.0	0.01	2.2675737E-5
메나디온 (비타민 K3)	172.0	0.01	5.8139532E-5
니아신아미드	122.0	0.025	2.0491803E-4
니코틴산 (니아신)	123.0	0.025	2.0325204E-4
파라-아미노벤조산	137.0	0.05	3.6496352E-4
파리독살 염산염	204.0	0.025	1.2254903E-4
파리독신 염산염	206.0	0.025	1.21359226E-4
리보플라빈	376.0	0.01	2.6595744E-5
티아민 염산염	337.0	0.01	2.967359E-5
비타민 A (아세테이트)	328.0	0.1	3.0487805E-4
비타민 D2 (칼시페롤)	397.0	0.1	2.5188917E-4
알파 토코페롤 인산염 나트륨 염	554.7	0.01	1.8027762E-5
i-아노시톨	180.0	0.05	2.7777778E-4

무기염류

염화 칼슘(CaCl ₂) (anhyd.)	111.0	200.0	1.8018018
질산제이철(Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404.0	0.7	0.0017326733
황산 마그네슘(MgSO ₄) (anhyd.)	120.0	97.67	0.8139166
염화 칼륨(KCl)	75.0	400.0	5.3333335
중탄산 나트륨(NaHCO ₃)	84.0	2200.0	26.190475
염화 나트륨(NaCl)	58.0	6800.0	117.24138
인산이수소나트륨 (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138.0	140.0	1.0144928

기타 구성요소

2-디옥시-D-리보오스	134.0	0.5	0.0037313432
아데닌황산염	404.0	10.0	0.024752475
아데노신 5'-인산염	347.0	0.2	5.763689E-4
아데노신 5'-삼인산염	605.0	1.0	0.0016528926
콜레스테롤	387.0	0.2	5.1679584E-4
D-글루코오스 (텍스트로오스)	180.0	1000.0	5.5555553
글루타티온 (화원된)	307.0	0.05	1.6286645E-4
구아닌 염산염	188.0	0.3	0.0015957447
하이포잔틴 나트륨	136.0	0.4	0.0029411765
페놀 레드	376.4	20.0	0.053134963
리보오스	150.0	0.5	0.0033333334

아세트산나트륨	82.0	50.0	0.6097561
티민	126.0	0.3	0.0023809525
트윈 80®		20.0	Infinity
우라실	112.0	0.3	0.0026785715
잔틴-나트륨	152.0	0.34	0.0022368422

[0032] 참조: Morgan, J.F. and Campbell, M.E. (1955) J. Natl. Cancer Inst., 16:557; Morgan, J.F., Morton, H.J. and Parker R.C. (1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73:1

[0033] 다른 적합한 배지, 즉 M-199와 유사한 특성을 갖는 임의의 배지는 하기 표 2A에 나타낸 일반적인 특성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

표 2

표 2A. M-199 이외의 적합한 배양 배지의 일반적인 특성.

성분 유형	농도 범위	구체적인 예 및 농도 범위
영양소:		
에너지원:포도당	2.5-10.5 mM	5.5 mM
단백질/아미노산 원: 시스틴, 글루타민, 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 히드록시 L-프롤린, 아이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신, 발린	0.049-0.684 mM	Table 1A 참고
미네랄 원: 염화나트륨, 염화칼슘, 염화칼륨, 인산칼륨, 인산이수소나트륨일수화물, 황산마그네슘칠수화물, 탄산수소나트륨, 락트산나트륨, 락트산칼슘, 질산칠후수화물	0.001-117.24 mM	Table 1A 참고
비타민 원: 비타민 A, 티아민, 리보플라빈, 피리독신, 염산 피리독살, PABA, 니아신마이드, 니아신, 아스코르빈산, 비오텐, 판토텐산D-칼슘, 염화콜린, 에르고칼시페롤, 엽산, i-이노시톨, 메나디온	0.003-6.81 mM	Table 1A 참고
pH 지시약: 페놀레드	0.02-0.08mM	0.053 mM
항균제: 페니실린 G 스트렙토마이신	50-150 IU/ml 25-100 IU/ml	100 IU/ml 50 IU/ml
항산화제: 글루타티온	0.8-2.0 mM	1.62 M

[0035] 임의의 적합한 유형의 보충제가 사용될 수 있다. 바람직하게는, 각각의 보충제는 보충된 배양 배지가 난모세포가 수득된 난관 (oviduct) 환경과 유사하거나 모방되거나 보다 더 화학적으로 유사하도록 돋는다. 보충제 중 하나 이상은 호르몬, 성장 촉진제 및/또는 에너지 공급자 (예:cAMP)를 포함할 수 있다. 난모세포가 돼지로부터 공급된다면, 돼지-유래된 분자가 사용될 수 있지만, 반드시 그러한 것은 아니다. 일부 경우에, 돼지-호환성 분자 (합성 또는 다른 종으로부터 유래된)가 사용될 수 있다.

[0036] 예를 들어, 세척 단계의 보충제는 호르몬 및 성장 촉진제를 포함할 수 있고, 수집 단계의 보충제는 호르몬, 성장 촉진제 및 에너지 공급자를 포함할 수 있으며, 배양 단계의 보충제는 성장 촉진제를 포함할 수 있고, 수정 단계의 보충제는 에너지 공급자를 포함할 수 있고, 세척 단계의 보충제는 성장 촉진제를 포함할 수 있고, 및/또는 배양 단계의 보충제는 성장 촉진제를 포함할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 언급된 + 보충제의 추가 바람직한 특성은 하기 표 3A에 도시되어있다.

표 3

[0038]

표 3A. +보충제의 특성.

+ 보충제 1		
성분 유형	농도 범위	구체적인 예 및 농도 범위
돼지 난포액 (PFF)	5-25% v/v	10-15% v/v
임마 혈청 성선 자극 호르몬 (PMSG) 인간 융모성 생식선 자극호르몬 (hGC) cAMP (암퇘지 (gilt)로부터 얻은 난모세포인 경우 선택사항)	10-60 IU/ml 5-30 IU/ml 5-30 IU/ml 0.1-10 mM	20-30 IU/ml 10-15 IU/ml 1 mM
+ 보충제 2		
돼지 난포액 (PFF)	5-30% v/v	10-15% v/v
cAMP (암퇘지 (gilt)로부터 얻은 난모세포인 경우 선택사항)	0.1-10 mM	1-2 mM
+ 보충제 3		
성분 유형	농도 범위	구체적인 예 및 농도 범위
파루브산나트륨 카페인 글루코오스	1-10% v/v 0.1-10 mM 2.5-10.5 mM	2-3% v/v 2-3 mM 5.5mM
CaCl ₂ NaHCO ₃ BSA	2-10 mM 15-30 mM 0.1-0.5 %	5-7 mM 25-27 mM 0.1-0.2 %
+ 보충제 4		
성분 유형	농도 범위	구체적인 예 및 농도 범위
돼지 난포액(PFF)	5-30% v/v	10-15% v/v
소혈청 알부민 (Bovine serum albumin, BSA)	0.2-0.9 %	0.3-0.4 %

[0039]

참조: Eagle, H. (1959) Science 130:432.

[0040]

단계 (1)에서, COC의 제제는 임의의 적합한 형태 일 수 있다. 바람직하게는, 균일한 난모세포질 및 적어도 2개의 층의 컴팩트한 세포 덩어리를 갖는 COC가 사용된다. 바람직하게는, 돼지 COC가 사용된다.

[0041]

단계 (1)에서, 적어도 하나의 난모세포를 얻기 위해 COC를 세척하는 것은 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 바람직하게는, COC는 배양 배지 + 보충제 1에서 2 회 세척된다. 배양 배지 + 보충제 1은 표에 기재된 바와 같을 수 있다. 바람직하게는 보충제 1은 15% (v/v) 돼지 난포액 (PFF), 15 IU/ml 인간 융모성 생식선 자극호르몬 (hCG) 및 30 IU/ml 임마 혈청 성선 자극 호르몬 (PMSG)을 포함한다.

[0042]

PFF는 직경이 대략 3-6 mm인 표면 여포로부터 수집될 수 있다. 수집된 PFF는 0.20 μm 시린지 필터를 사용하여 여과하고 사용할 때까지 -20° C에서 저장할 수 있다.

[0043]

상기 방법은 단계 (1) 이전에 난소를 수집하는 단계를 포함할 수 있다. 난소는 도축된 성장기 이전의 암퇘지 (gilt)와 암퇘지 (sow)에서 적절한 방법으로 수집할 수 있다.

[0044]

난소는 단계 (1)에 따라 처리 될 때까지 예를 들어, 30-38° C에서 약 0.9% NaCl 용액에 저장될 수 있다.

[0045]

단계 (2)를 수행하기 전에, COC는 약 3-8mm 직경의 난포 (follicle)로부터 흡인 될 수 있고, 38° C에서 몇 분 동안 침전물로서 침전될 수 있다.

[0046]

단계 (2)에서, 적어도 하나의 난모세포가 임의의 적합한 방식으로 수집될 수 있다. 일반적으로 이것은 현미경의 도움으로 수행되는 수집으로 이동식 피펫을 포함한다.

- [0047] 단계 (2)에서, 배양을 위해 임의의 적합한 수의 난모세포가 수집될 수 있다. 바람직하게는 약 5 내지 200개의 난모세포, 더 바람직하게는 약 10 내지 7개의 난모세포, 더욱 더 바람직하게는 약 25 내지 30개의 난모세포가 배양을 위해 수집된다.
- [0048] 배양 배지 + 보충제 1은 표에 기재된 바와 같을 수 있다. 바람직하게는 보충제 2는 15% (v/v) 돼지 난포액 (PFF), 15 IU/ml 인간 융모성 생식선 자극호르몬 (hCG) 및 30 IU/ml 임마 혈청 성선 자극 호르몬 (PMSG)을 포함한다.
- [0049] 암퇘지 (gilt)로부터 회수된 난모세포의 경우, (에너지를 위한) cAMP가 약 1 mM의 농도로 IVM 배지에 첨가될 수 있다.
- [0050] 단계 (2)에서, 적어도 하나의 난모세포는 임의의 적합한 방식으로 배양될 수 있다. 전형적으로, 이는 이산화탄소 인큐베이터에서와 같이, 38° C의 인큐베이터에서 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 것을 포함 할 것이다. 이는 소량의 배양 배지 + 보충제 1에 적어도 하나의 난모세포를 넣고 중발을 막기 위해 따뜻한 파라핀 오일과 같은 오일로 덮을 수 있다.
- [0051] 단계 (2)에서, 적어도 하나의 난모세포가 임의의 적합한 시간 동안 배양될 수 있다. 바람직하게는 예정된 시간은 대략 22 시간이지만, 예정된 시간은 대략 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 시간 (또는 더 짧거나 더 긴)일 수 있다.
- [0052] 단계 (2) 후에, 배양 배지 + 보충제 1을 제거하고 배양 배지 + 보충제 2로 대체하여, 2개의 생식선 자극 호르몬을 제거 할 수 있다. 암퇘지 (gilt)에서 회수된 난모세포의 경우, cAMP가 1 mM의 농도로 IVM 배지에 첨가될 수 있다.
- [0053] 배양 배지 + 보충제 2는 표에 기재된 바와 같을 수 있다. 바람직하게는 보충제 2는 1 mM cAMP 및 15% (v/v) 돼지 난포액 (PFF)을 포함한다.
- [0054] 단계 (3)에서, 적어도 하나의 난모세포가 임의의 적합한 방식으로 배양될 수 있다. 전형적으로 이것은 단계 (2)에 대해 기술 된 바와 같이 예정된 시간 동안, 단계 (2)에 대해 기술 된 바와 같이 적어도 하나의 난모세포를 배양하는 것을 포함 할 것이다.
- [0055] 단계 (4)에서, 적어도 하나의 난모세포는 적어도 하나의 수정된 난모세포, 배반포 또는 배아를 생성하기 위해 임의의 적절한 방식으로 정자 (sperm)/정자 (spermatozoa)와 수정될 수 있다.
- [0056] 단계 (4)에서, 적어도 하나의 난모세포는 적어도 하나의 수정된 난모세포, 배반포 또는 배아를 생성하기 위해 임의의 적절한 시간 동안 정자와 배양될 수 있다. 바람직하게는 예정된 시간은 대략 3.5 내지 4시간이지만, 예정된 기간은 대략 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 또는 8 시간 (또는 더 짧거나 더 긴) 일 수 있다.
- [0057] 배양 배지 + 보충제 3은 표에 기재된 바와 같을 수 있다. 바람직하게는 보충제 3은 2mM 피루브산 나트륨, 2mM 카페인, 6mM CaCl₂, 13mM NaHCO₃, 0.1 % BSA 및 5.5mM 포도당을 포함한다. 암퇘지 (gilt)에서 회수된 난모세포의 경우, cAMP는 1mM의 농도로 포함될 수 있다.
- [0058] 상기 방법은 단계 (4)에서 수정을 위해 정자를 준비하는 단계를 포함할 수 있다. 수집된 정액 또는 수집된 희석된 정액을 튜브에서 원심 분리하여 (예를 들어, 5 분 동안 1500 rpm으로) 상청액을 제거할 수 있다. 그 결과로 생긴 정자 펠렛 (pellet)은 임의로 인산염-완충 식염수 (PBS)로 세척하고 재-원심 분리 될 수 있다. 그 결과로 생긴 정자 펠렛은 표에 기술 된 바와 같이 배양 배지 + 보충제 3으로 임의로 세척 될 수 있다. 상청액을 제거한 후, 정자 펠렛은 배양 배지 + 보충제 3에 재-현탁 될 수 있다. 그런 다음 정자를 사용하기 전에 30분 동안 인큐베이터에서 튜브를 45° 각도로 놓을 수 있다. 정자 농도는 혈구계 (haemocytometer)를 사용하여 결정할 수 있다.
- [0059] 임의의 적합한 수의 정자/정자는 단계 4에서 사용될 수 있다. 이는 난모세포의 총 수에 의존 할 수 있다. 바람직하게, 대략 60,000 개의 정자는 약 3000:1의 비인 대략 20-30 개의 난모세포를 수정시키는 데 사용될 수 있다.
- [0060] 상기 방법은 적어도 하나의 난모세포를 노출시키는 (denude) 단계를 포함 할 수 있으며, 이는 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 소량의 배양 배지에서 난모세포를 반복적으로 부드럽게 퍼랫팅함으로써 난모세포를 노출시킬 수 있다. 배양 단계 (3) 후에, 예를 들어, IVF 단계 (4) 전에 약 44 시간의 성숙 배양 후,

노출이 수행될 수 있다.

- [0061] 단계 (5)에서, 적어도 하나의 수정된 난모세포 (또는 그 결과로 생긴 배반포 또는 배아)의 세척은 임의의 적절한 방식으로 수행 될 수 있다. 바람직하게는 적어도 하나의 수정된 난모세포는 배양 배지 + 보충제 4에서 세척된다. 배양 배지 + 보충제 4는 표에 기재된 바와 같을 수 있다. 바람직하게는 보충제 4는 15 % (v/v) 돼지 난포액 (PFF) 및 0.4 % BSA를 포함한다. 예를 들어, 수정된 난모세포는 배양 배지 + 보충제 4로 2회 세척할 수 있다.
- [0062] 단계 (5)에서, 적어도 하나의 수정된 난모세포 (또는 배아)는 임의의 적합한 방식으로 배양 될 수 있다. 전형적으로 이는 37° C 또는 38.5° C의 인큐베이터, 예컨대 이산화탄소 인큐베이터에서 적어도 하나의 수정된 난모세포를 배양하는 것을 포함 할 것이다. 이는 표에 기술 된 바와 같이 배양 배지 + 보충제 4에 적어도 하나의 수정된 난모세포를 배치하는 것을 포함 할 수 있다.
- [0063] 단계 (5)에서, 적어도 하나의 수정된 난모세포 (또는 배아)는 임의의 적합한 시간 동안 배양 될 수 있다. 바람직하게는 예정된 시간은 대략 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15일 (또는 훨씬 더 길거나 더 짧음)이다. 바람직하게는 예정된 기간은 대략 5 내지 9 일, 더욱 바람직하게는 7 일이다.
- [0064] 일부 구체예에서, 배아는 CO₂ 인큐베이터 내 38.5° C에서 약 7일 동안 배양 배지 + 보충제 4 중 방울 (droplet)당 약 25-30 개의 그룹으로 배양 될 수 있다. 수정된 난모세포의 분열 및 배반포 형성을 배양 시작 후 2 일 및 7 일에 각각 검사 할 수 있다. 2, 4, 8 개 이상의 세포로 발달한 배아는 추가 다운스트림 처리에 사용될 수 있다.
- [0065] 난모세포 회수 (recovery), 시험관 내 성숙, 정자 제조, 시험관 내 수정 및 시험관 내 배양을 위한 일반적인 기술 및 방법론은 하기 참고 문헌에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 상호 참조에 의해 본 명세서에 전체적으로 포함된다 (Bagg et al., 2006; Gil et al., 2008; Tanihara et al., 2013; Hossain et al., 2007; Nagai, 1996):
- [0066] 본 명세서에 기재된 임의의 특징은 본 발명의 범위 내에서 본 명세서에 기재된 다른 특징 중 임의의 하나 이상과 임의의 조합으로 조합 될 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서 임의의 종래 기술에 대한 언급은 종래 기술이 공통의 일반적인 지식의 일부를 형성한다는 인정 또는 어떠한 형태의 제안으로 간주되어서는 안된다.
- [0068] **실시예 1 - 돼지 배아의 개선된 생산을 위해 단일 배양 배지를 본질적으로 사용하는 단순화된 IVP 방법**
- [0069] 이 실시예는 고 생산성 IVP 시스템에 사용하기에 적합한 미리 이식된 시험관 내 돼지 배아 발달의 단순화된 방법을 기술한다.
- [0070] **물질 및 방법**
- [0071] 달리 표시된 것을 제외하고, 모든 화학 물질은 Thermo Fisher Scientific으로부터 구입하였다. 모든 시험관 내 배양은 각 배양 웰에서 400 μl 미네랄 오일의 오버레이로 이루어졌다. 이 실시예에서 사용된 기본 배양 배지는 M-199였다. 1950 년에 Morgan은 먼저 동물성 제품 및/또는 조직 추출물을 사용하지 않고 세포 배양을 위한 화학적으로 정의된 영양 공급원을 제안했다. 이 배지를 사용하는 이점은 다른 발달 단계에서 난모세포 및 배아 발달을 지원하는 다양한 성분의 범위이다.
- [0072] **난모세포 회수 (recovery) 및 시험관 내 성숙**
- [0073] 난소는 도축된 성장기 이전의 암퇘지 (gilt)와 인근 도축장 (Highchester Meats Pty Ltd, Gleneagle, Australia)으로부터 암퇘지 (sow)에서 수집 되고, 30-38° C에서 0.9% NaCl 용액 내 실험실로 옮겨졌다. 축적-난모세포 복합체 (COC)는 2-8 mm 직경의 여포 (follicle)에서 흡인되었고 38° C에서 몇 분 동안 침전물로 침전되었다. 균일한 난모세포질 및 적어도 2개의 총의 컴팩트한 세포 덩어리를 갖는 COC를 시험관 내 성숙 (IVM) 배지 (M-199)에서 2 회 및 15 % (v/v) 돼지 난포액 (PFF), 15 IU/ml 인간 융모성 생식선 자극호르몬 (hCG) (Intervet, Holland) 및 30 IU/ml 임마 혈청 성선 자극 호르몬 (PMSG) (Intervet, Holland)으로 보충된 M-199에서 1 회 세척하였다. PFF는 직경 3-6mm의 표면 돼지 여포로부터 수집되었다. 그 후, PFF는 0.20 μm 시린지 필터를 사용하여 여과되고, 사용할 때까지 -20° C에서 저장되었다. 약 25-30개의 난모세포를 페트리 접시에서 400 μl IVM 배지의 각 방울 (droplet)에 넣고 따뜻한 파라핀 오일로 덮고 CO₂ 인큐베이터에서 38° C에서 22 시간 동안 배양 하였다. 22 시간 배양 후, 배지를 제거하고 2 개의 생식선 자극 호르몬을 함유하는 새로운 IVM

배지로 교체 한 후, 추가로 22 시간 동안 배양 하였다. 암퇘지 (gilt)로부터 회수된 난모세포의 경우, cAMP를 1 mM의 농도로 IVM 배지에 첨가 하였다.

[0074] 정자 제조 및 시험관 내 수정

회석된 정액은 근처의 AI 회사 (Premier Genetics, Wacol, Australia)로부터 수집되어 대략 38° C 의 단열된 상자에서 즉시 실험실로 이동되었다. 정자를 부드럽게 혼합하고, 상청액을 제거하기 위해 1500 rpm에서 5 분 동안 원심 분리하기 전 투브 상단 바로 아래에서 2-mL 원심 분리 투브에 부었다. 이어서, 정자를 2 mL IVF 배지 (2 mM 카페인, 2 mM 피루브산 나트륨, 505 mM 포도당, 0.1% BSA, 6mM CaCl₂ 및 26 mM NaHCO₃로 보충된 M-199)에 재현탁시키고, 전과 같이 원심 분리로 2회 세척하였다. 상청액을 제거한 후, 정자 팰럿을 IVF 배지에 재현탁시켰다. 이어서, 정자를 사용하기 전 30분 동안 인큐베이터에서 투브를 45° 각도로 두었다. 정자 농도는 Neubauer 혈구계를 사용하여 측정되었다. 한 방울 (droplet)에 20-30개의 난모세포를 수정시키기 위해 총 60,000개의 정자가 사용되었고, 4-6 시간 동안 함께 배양하여 수정을 완료했다.

[0076] 시험관 내 배양

IVF의 완료 후, 수정된 난모세포는 시험관 내 배양 (IVC) 배지 (15% 돼지 난포액으로 보충된 M-199)로 2회 세척되었다. 배아를 CO₂ 인큐베이터 내 38.5° C에서 7 일 동안 400 μl 배양 배지 내 페트리 접시에서 방울당 25-30 개의 그룹으로 배양 하였다. 난모세포의 분열 및 배반포 형성은 배양 시작 후 2 일 및 7 일에 각각 검사하였다. 2, 4, 8 개 이상의 세포로 발달한 배아는 추가 처리를 위해 200 μl PCR 투브에 2 μl 부피로 직접 옮겨졌다.

[0078] 결과

미리 이식된 배아 발달에 대한 단순화된 (하나의 기본 IVM 배지, M-199)의 영향을 표 4A에 나타내었다.

표 4

표 4A. 보충제와 함께 단순화된 IVP 시스템을 사용하여 시험관 내 암퇘지 (sow) 및 암퇘지 (gilt) 배아의 단계별 평균 발달.

난모세포 공급원	난모세포의 수	절단된(Cleaved) (난모세포의 %)	8-세포 이상 (난모세포의 %)	배반포 (난모세포의 %)
암퇘지 (Sow)	545	382 (70.0)	299 (54.8)	224 (41.1)
암퇘지 (Gilt)	463	247 (53.3)	131 (28.29)	ND
<i>IVF 배지에서 NaHCO₃, CaCl₂ 및 BSA 수준을 조정한 후, 배아 생산이 변경됨</i>				
암퇘지 (Gilt)	1240	834 (67.2)	425 (34.3)	ND
평균 (mean)	2248	1463 (65.0)	855 (38.0)	ND

암퇘지 (sow)와 암퇘지 (gilt) 모두에서 유의한 수준의 배아 발생이 발견되었고, 평균 분열 속도는 65%였다. IVF 배지 내 NaHCO₃, CaCl₂ 및 BSA 수준의 조정으로 배아 생산이 변경되었다. 분열 속도는 평균 62%에서 67%로 변경되었다. 암퇘지 (sow)와 비교하여 암퇘지 (gilt)에서 분열 속도는 더 낮았으며, 결과적으로 배반포 발생 속도는 암퇘지 (gilt)에서 훨씬 더 낮았지만, 대부분의 경우 배아는 배반포 단계까지 평가되지 않았다. 상당한 수의 배아가 모든 실험에서 8-세포 단계를 넘어 평균 ~38%인 것으로 관찰되었다. 평균 배반포 발생은 ~41%였으며, 이는 여전히 분열되고 8-세포 단계를 지난 배아의 수와 일치한다.

IVF 배지 내 CaCl₂, NaHCO₃ 및 BSA의 추가는 더 높은 분열 속도 및 그 다음의 발생을 초래하여 전체 배아 생산을 보다 안정적으로 만들었다.

일반적으로 사용되는 시험관 내 성숙 (IVM) 배지의 화학 조성물이 표 5A에 제시되어 있다.

표 5

표 5A. 돼지에 대한 다른 시험관 내 성숙 배지의 화학 조성물의 비교

성분	IVM 배지 (in mM)			
	M-199	TCM-199	NCSU-23	mWM
NaCl	117.24	116.36	108.73	68.49

KCl	5.33	5.36	4.78	4.78
CaCl ₂	1.80	1.80	1.70	-
Fe (NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.001	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	1.19	1.19
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.014	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.81	0.81	1.19	1.19
NaHCO ₃	26.19	26.19	25.07	25.07
포도당	5.55	5.55	5.55	5.56
글루타티온 (환원된)	1.62	-	-	-
페놀 레드, 나트륨	0.053	-	-	-
락트산나트륨	-	-	-	25.20
피루브산나트륨	-	-	-	0.33
락트산칼슘	-	-	-	1.71
글루타민	0.684	0.68	1.0	-
타우린	-	-	7.0	-
하이포타우린	-	-	5.0	-
페니실린 G (IU/ml)	-	100	100	100
스트렙토마이신 (IU/ml)	-	50	50	50
PFF (% v/v)	-	10	10	10
BSA (mg/ml)	-	-	-	-
시스틴	0.108	0.57	0.57	0.57
아스코르빈산	2.84	-	-	-
비오틴	4.09	-	-	-
판톤텐산D-칼슘	2.09	-	-	-
염화콜린	0.003	-	-	-
에르고칼시페롤	2.51	-	-	-
엽산	2.26	-	-	-
i-아노시톨	2.77	-	-	-
메나디온	5.81	-	-	-
니아신	2.03	-	-	-
니아신아미드	2.04	-	-	-
PABA	3.649	-	-	-
파리독살 염산염	1.225	-	-	-
파리독신 염산염	1.213	-	-	-
리보플라빈	2.659	-	-	-
티아민 염산염	2.967	-	-	-
비타민 A 아세테이트	3.048	-	-	-
L-알라닌	0.280	-	-	-
L-아르기닌	0.331	-	-	-
L-아스파르트산	0.225	-	-	-
L-글루탐산	0.510	-	-	-
글리신	0.666	-	-	-
L-히스티딘	0.104	-	-	-
히드록시 L-프롤린	0.347	-	-	-
L-아이소류신	0.305	-	-	-
L-류신	0.458	-	-	-
L-라이신	0.382	-	-	-
L-메티오닌	0.100	-	-	-
L-페닐알라닌	0.151	-	-	-
L-세린	0.238	-	-	-
L-트레오닌	0.252	-	-	-
L-트립토판	0.049	-	-	-
L-타이로신	0.222	-	-	-
L-발린	0.213	-	-	-

[0085] 논의

이 실시예의 주요 발견은 표 4A에 제시되며, 여기서 결과로 초래된 배반포 속도는 ~ 41%이며, 상당히 낮은 변동이 있다. 난모세포의 공급원에 관계없이, 배아의 분열 속도는 다른 실험실의 평균 (~ 50%)보다 훨씬 높았다 (~65 %). 우리는 이 결과가 주요 효과로서 모든 배양 단계에 대한 단일 기본 공통 배지를 사용하여 절차의 단계적 조정으로 인한 것이라고 생각한다. 본 연구는 또한 사용된 IVM 배양 배지 (서로 다른 보충제를 가진 M-199)와 본 연구에서 따르는 절차가 암퇘지 (sow) 배아의 IV에 이상적으로 적합함을 보여주었다; 뿐만 아니라 암퇘지 (gilt)에서도, 그러나 암퇘지 (gilt)에 대해서는 추가 미세 조정이 필요할 수 있다. 암퇘지 (gilt)에 대한 한가지 가능한 옵션은 난모세포 IVM 배지에서 cAMP를 보충하는 것이다. 다 자란 암퇘지 (sow)에서 유래된 난모세포는 암퇘지 (gilt)에서 얻은 것보다 높은 cAMP 함량을 가지고 있으며 (Bagg et al., 2006), cAMP 처리는 cAMP 함량을 일시적으로 높여서 암퇘지 (gilt) 난모세포의 발달 능력을 향상시킨다. 난모세포 처리시 정자와 난모세포 모두 ROS를 생성하며, 중탄산염의 첨가는 이를 보완 할 수 있다. IVF 배지에 중탄산염, 칼슘 및 BSA가 추가로 보충되었을 때, 분열 속도 및 그 다음의 배아 발생이 유의하게 증가함을 관찰 하였다.

[0087] 돼지 배아 조작을 위해 많은 상이한 특수 배양 배지 (TCM-199, NCSU-23, PZM-3, SOF)가 이용 가능하지만, 그들 중 일부는 일관된 결과를 생성하여 재현 할 수 없다. 돼지 배아는 보통 4 개 또는 5 개의 다른 배지에서 대부분의 실험실에 의해 처리되기 때문에, 이는 난모세포/배아에 스트레스를 유발하고 (변화하는 화학 환경에 적응 할 때) 수율이 좋지 않아 일관성이 없는 것으로 가정한다. 한편, M-199 배지는 널리 사용되는 세포 배양 배지 이지만, 현재는 포유 동물 배아 배양, 특히 돼지에서 사용이 제한되어있다.

[0088] 결론적으로, 본 연구에 사용된 돼지 IVF 방법은 상업적 생산 및 향후 돼지 배아 연구에서 결정적인 역할을 할 수 있다. 제안된 방법의 단순성으로 인해 고 생산성의 IVF 시스템에서 IVF 실험실의 표준으로 쉽게 적용 할 수 있다.

[0089] 참조 1

[0090] Alminana, C., Gil, M.A., Cuello, C., Roca, J., Vazquez, J.M., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E.A., 2005. Adjustments in IVF system for individual boars: value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation. Theriogenology 64:1783-1796.

[0091] Bagg, M.A., Nottle, M.B., Grupen, C.G., Armstrong, D.T., 2006. Effect of dibutyrylcAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes. Mol Reprod Dev 73: 1326-1332.

[0092] Fouladi-Nashta, A.A., Waddington, D., Campbell, K.H.S., 1998. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro. A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. Biol Reprod 59: 255-262.

[0093] Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J.M., Roca, J., Martinez, E.A., 2008. Advances in swine in vitro embryo production technologies. Reprod Dom Anim 45: 40-48.

[0094] Kim, J.S., Cho, Y.S., Song, B.S., Wee, G., Park, J.S., Choo, Y.K., Yu, K., Lee, K.K., Han, Y.M., Koo, D.B., 2008. Exogenous dibutyrylcAMP affects meiotic maturation via protein kinase A activation; it stimulates further embryonic development including blastocyst quality in pigs. Theriogenology 69: 290-301.

[0095] Li, R., Liu, Y., Pedersen, H.S., Kragh, P.M., Callesen, H., 2013. Development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos after removal of zonapellucida. Theriogenology 80:58-64.

[0096] Liu, Y., Østrup, O., Li, J., Vajta, G., Kragh, P.M., Purup, S., Callesen, H., 2011. Cell colony formation induced by Xenopus egg extract as a marker for improvement of cloned blastocyst formation in the pig. Cell Reprogram. 13:521-526.

[0097] Lopes, A.S., Wrenzycki, C., Ramsing, N.B., Herrmann, D., Niemann, H., Løvendahl, P., Greve, T., Callesen, H., 2007. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. Theriogenology 68:223-236.

[0098] Somfai, T., Kikuchi, K., Onishi, A., Iwamoto, M., Fuchimoto, D., Papp, A.B., et al., 2003. Meiotic

arrest maintained by cAMP during the initiation of maturation enhances meiotic potential and developmental competence and reduces polyspermy of IVM/IVF porcine oocytes. Zygote 11: 199–206.

[0099] Tanihara, F., Nakai, M., Kaneko, H., Noguchi, J., Otoi, T., Kikuchi, K., 2013. Evaluation of zonapellucidafunction for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs.J Reprod Dev. doi.org/10.1262/jrd.2013-021.

[0100] Hossain, M.S., Tareq, K.M.A., Hamano, K. and Tsujii, H. (2007): The effect of the fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. Reproductive Medicine and Biology 6, 235–239.

[0101] Nagai T., 1996. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. Anim Reprod Sci, 42: 153–163.

[0102] Vajta, G., Callesen, H., 2012. Establishment of an efficient somatic cell nuclear transfer system for production of transgenic pigs. Theriogenology 77:1263–1274.

표제 2

세포용해 방법

기술분야 2

[0106] 본 발명은 일반적으로 정자의 존재하에서 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는 것에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 정자의 존재하에서 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시켜, 정자를 그대로 유지하면서, 유전 물질 및 다른 세포 내용물이 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아 단독으로부터 방출되도록 하는 것에 관한 것이다.

배경기술 2

[0108] 난모세포 또는 배아의 유전적 구성에 대한 변화는 다양한 공급원으로부터 올 수 있으며, 이러한 변화를 확인하고 특징 지을 수 있는 것이 바람직하다. 예를 들어, 유전자 편집 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 및 탈렌 (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN)과 같은 기술을 사용하여 난모세포/배아 계놈을 의도적으로 수정할 수 있으며, 의도된 유전자 편집만이 이루어졌다는 것을 확인할 수 있는 것이 바람직하다. 정액 처리는 배아에 대한 화학 물질의 돌연변이 유발 효과를 테스트하는 데 사용될 수 있으며, 계놈에 대한 모든 변화를 확인할 수 있는 것이 바람직하다. 수정된 난모세포/배아의 성 선택 치료뿐만 아니라 정액 (유동 세포 분석법, 미세 유체 장치, 항체 처리 등)의 성 선택 치료는 수정된 난모세포/배아의 유전자 변형을 잠재적으로 유발할 수 있으며, 계놈에 대한 모든 변화를 확인할 수 있는 것이 바람직하다.

[0109] 폴리머라아제 효소, 및 특히 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 기술은 배아에 대한 유전자 변형을 확인하고 특징 짓기 위해 사용되어왔다. 그러나 이 기술을 이 용도로 사용하면 기술에 어려움이 있다. 예를 들어, 기술의 높은 감도로 인해, 비-배아 DNA 오염물 (정자 또는 상피 세포 등)의 존재는 쉽게 잘못된 결과를 초래 할 수 있다. 예를 들어, 난모세포/배아를 위한 세척액, 용해 용액 및 혼탁 배지는 성능 저하 또는 PCR 기술의 완전한 억제, 또는 오염성 유전 물질의 도입으로 이어질 수 있다. 예를 들어, 난모세포/배아의 과도한 처리/다단계 처리는 PCR 증폭을 위한 최선이 아닌 유전 물질로 이어질 수 있다.

[0110] 위에서 언급 한 바와 같이, 배아의 계놈에 대한 잠재적 변화를 확인하고 특징 지을 때, 잘못된 결과의 가능성에 신중하게 배제될 필요가 있다. 예를 들어, 난자를 수정 한 후 수행 될 수 있는 낮은 수준의 정자 DNA 또는 수컷 체세포 DNA에서 DNA를 오염 시키면 잘못된 결과가 발생할 수 있다.

[0111] DNA 오염/결과 감소시키는 종래의 기술은 난모세포를 최대 6 회 또는 7 회 세척함으로써 투명대 (Zona Pellucida, ZP)를 완전히 제거하는 것을 포함한다 (Pomp, 1995). 첫 번째 세척은 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 유리 Dulbecco의 인산-완충 생리식염수 (DPBS)로 한다. 난모세포를 Tyrodes 용액 (137mM NaCl , 2.7mM KC1 , 1mM MgCl_2 , 1.8mM CaCl_2 , $0.2\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, 12mM NaHCO_3 , 5.5mM D-글루코스)로 끓긴 다음 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 유리 DPBS에서 4 회 이상 세척 한다. 그 후 난모세포가 이 단계에서 저장된다. PCR 기술에 사용하기 전에, 난모세포를 밤새 프로테이나아제 K로 소화시킨 다음, 98°C 에서 10 분 동안 프로테이나아제 K를 불활성화한다 (Tor 2013).

[0112] 이 다단계 종래 기술의 단점은 난모세포가 입체 현미경 하에서 미세 피펫을 사용하여 반복적으로 핀업되고 후속

의 적절한 세척액 등에 두어야한다는 점에서 지루하다는 점이다. 이러한 종래의 기술은 그 자체가 고 생산성 분석으로 개발되는 것은 아니다. (고 생산성 분석은 가능한 한 적은 단계가 필요하지만, 동시에 강력하고 일관된 결과를 생성하는 분석이다.)

[0113] 선택적 용해는 오염 DNA가 PCR 증폭되는 것을 방지하기 위한 또 다른 옵션이다. 선택적 용해 방법은 새로운 것이 아니며, 피해자 (상피 세포)와 정자 (가해자 세포)를 구별할 필요가 있는 성폭행 샘플에 주로 사용되어왔다 (Norris, 2007). 현재 이용되는 바람직한 방법은 Gill (1985) 및 Yoshida (1995)에 의해 개발된 절차의 변형이다. 샘플은 상피 세포를 용해시키기 위해 70°C에서 1-3 시간 동안 먼저 용해 용액 (TNE 완충액: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM 에틸렌 디아민 테트라-아세테이트 (EDTA), 100 mM NaCl 및 1% 도데실 황산 나트륨 (SDS) 및 100 pg/ml 단백질 분해 효소 K)에 의해 처리된다. 예를 들어 면봉과 같은 매트릭스에서 상피를 방출하기 위해 이를 여러 번 반복한다. 다음 단계는 진동형 수조 내 56°C에서 8 시간 이상 동안 정자를 용해시키기 위해 0.04M 디티오티레이톨 (DTT)이 첨가된 동일한 용해 완충제를 사용하는 것이다.

[0114] 고 생산성의 시험관 내 수정 (HT IVF) 시스템에서 이 절차를 이용하는 데 있어서의 문제점은 난모세포를 선택적으로 용해 할 수 있지만, 상피 세포용 TNE 용해 완충제가 PCR 억제제를 함유한다는 것이다 (Rossen, et al 1992). 이들은 폐놀 추출 및 3M 아세트산나트륨 및 얼음처럼 차가운 절대 에탄올로 DNA의 침전에 의해 그 다음으로 제거될 필요가 있다. 또한, 용해 절차는 1-4 시간이 소요될 수 있다.

[0115] Qiagen의 단일 세포 REPLIg 키트는 PCR에 의한 사전 증폭에 이용되었다. 그러나, 키트에 포함된 용해 완충액은 DTT 및 KOH를 함유하지만, 두 성분 모두 PCR 억제는 아니지만 수반되는 정자의 원하지 않는 용해를 유발한다. Qiagen 프로토콜은 10 분 65°C 배양 후 정지 용액을 추가해야한다. 이 단계에서는 오염이 발생할 위험이 있는 정지 용액을 도입하기 위해 튜브를 열어서 추가 처리가 필요하다.

[0116] 유전적 측면 이외에, 정자 또는 체세포의 존재 하에서 난모세포를 선택적으로 용해시키는 것이 바람직한 다른 이유가 있다. 난모세포에는 다른 관심 대상의 세포 물질이 포함되어 있기 때문이다 (예: 다운 스트림 적용에 대한, 특히 "Omics": 유전체학, 전사체학, 전성학 및 단백질학 [Wang and Bodovitz, Trends Biotechnol. 2010 June; 28 (6): 281-290 참조]). 상피 세포는 정자 또는 난모세포와 비교하여 잘 부서지기 쉽다. 체세포 및 상피 세포의 용해에 사용되는 비교적 온화한 조건은 난모 세포 용해에 적합하지 않다.

발명의 요약 2

[0118] 본 발명의 일 측면에서, 발명자들은 정자의 존재하에서 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키기 위한 및 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아에서만 세포 물질을 선택적으로 방출하기 위한 용해 용액을 개발하였다.

[0119] 본 발명의 다른 측면에서, 발명자들은 정자의 존재하에서 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키기 위한 및 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아에서만 세포 물질을 선택적으로 방출하기 위한 용해 용액을 개발 하였고, 용해 용액 내에서 방출된 세포 물질이 다운스트림 적용과 호환된다.

[0120] 본 발명의 또 다른 측면에서, 발명자들은 정자의 존재하에서 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는 방법을 개발하였고, 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터의 세포 물질 및 용해 용액은 다운스트림 적용과 호환 가능하다.

[0121] 본 발명의 제1측면에 따르면, 정자의 존재 하에서 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:

[0122] 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 용해 용액에 적용하여 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아가 용해되고, 세포 물질은 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아에서 방출되지만, 정자는 방출되지 않는 단계.

[0123] 본 발명의 제2측면에 따르면, 제1측면의 방법에 의해 제조 될 때 방출된 세포 물질이 제공된다.

[0124] 본 발명의 제3측면에 따르면, 용해 용액에 의해 용해되지 않은 정자 존재 하에서 난 모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키기위한 및 세포 물질 및 용해 용액이 다운 스트림 적용과 호환 될 수 있도록 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 세포 물질을 선택적으로 방출시키기 위한 용해 용액이 제공된다.

- [0125] 바람직하게는 "세포 물질"은 용해없이 방출되지 않은 실질적으로 세포 내 물질이다. "세포 물질" 용어는 또한 막 결합된 상태로 남아있을 물질을 포함한다.
- [0126] "세포 물질"은 그 범위 내에 유전 물질 (핵산, 폴리 뉴클레오타이드 및 보다 구체적으로 게놈, 유전자, 유전자 전사체, 유전자 산물 및 RNA를 포함한 이의 모든 형태), 단백질성 물질 (폴리 웨პ타이드, 단백질, 웨პ타이드 및 아미노산을 포함한 이의 모든 형태), 지질 물질 (지방 및 지질을 포함하는 이의 모든 형태) 및 탄수화물 물질 (이의 모든 형태)을 포함한다.
- [0127] "세포 물질"은 그 범위 내에 세포 시스템의 모든 구성 요소 또는 구조를 포함한다.
- [0128] 다운스트림 적용은 임의의 및 모든 문자-기반 방법 및 절차를 포함한다. 이러한 방법 및 절차는 선택적 특성화, 변형, 단리 또는 증폭 등을 위해 정량적, 정성적일 수 있다. 다운스트림 적용은 스크리닝 테스트 또는 진단 테스트 일 수 있으며, 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포, 배아 또는 정자의 세포 물질에 대한 변화를 식별하거나 확인 할 수 있다.
- [0129] 다운스트림 적용은 세포 물질이 단백질-기반 효소 또는 RNA 기반 효소와 같은 적어도 하나의 외인성으로 첨가된 효소의 작용을 받는 것을 포함 할 수 있다.
- [0130] 다운 스트림 적용은, 예를 들어 유전자 (유전체학 및 후성 유전학), 전사체 (전사체학), 단백질 (단백질학), 대사 산물 (대사체학), 지질 (지질체학) 또는 상호 작용 (상호작용체학)의 연구를 위한 것일 수 있다.
- [0131] 세포 물질에 대한 잠재적 다운스트림 적용은 Wangs and Bodovitz, Trends Biotechnol, 2010 June; 28 (6): 281-290에 기술되어있고, 이의 전체 내용은 본원에 상호 참조에 포함된다. 다른 잠재적 다운스트림 적용은 이 명세서의 다른 곳에 설명되어 있다.
- [0132] 용어 "다운스트림 적용과 호환할 수 있는"은 바람직하게는 다운스트림 적용이 용해 용액 자체에서 또는 용해 용액의 최소 변형으로 수행 될 수 있음을 의미한다. 상기 용어는 바람직하게는 용해 용액이 다운스트림 적용에 사용되는 하나 이상의 효소의 기능을 저해하지 않음을 의미한다.
- [0133] 본 발명의 또 다른 측면에서, 발명자들은 용해 완충액 내에서 방출된 유전 물질이 폴리머라아제 효소를 사용하여 선택적으로 복제 될 수 있도록 정자의 존재 하에서 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키기 위한 및 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아에서만 유전 물질을 선택적으로 방출하기위한 용해 용액을 개발하였다.
- [0134] 본 발명의 또 다른 측면에서, 발명자들은 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터의 유전 물질이 용해 용액 내에서 폴리머라아제 효소를 사용하여 선택적으로 복제될 수 있도록 정자의 존재하에 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는 방법을 개발하였다.
- [0135] 본 발명의 또 다른 측면에서, 발명자들은 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아의 조작 및 세척이 거의 필요하지 않고 폴리머라아제 효소에 의한 복제할 수 있는 방법을 개발하였다. 이것은 정자를 그대로 유지하면서, 정자의 존재 하에서 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 별도로 용해시킴으로써 달성된다. 단일 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터의 DNA는 예를 들어, 다양한 추가의 다운스트림 적용을 위한 충분한 전체 게놈 DNA를 생성하기 위해, 다운스트림 적용에서 복제 될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 전체 게놈 증폭, qPCR, 마이크로 어레이 또는 시퀀싱같은 다운스트림 적용에 대해 강력하고, 일관성 있고, 민감하며 비억제 적이다.
- [0136] 본 발명의 제4측면에 따르면, 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아는 폴리머라아제 효소를 사용하여 선택적으로 복제될 수 있도록 정자의 존재하에 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0137] (1) 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 용해 용액에 적용하여 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아가 용해되고, 유전자 물질은 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아에서 방출되지만, 정자는 방출되지 않는 단계; 및
- [0138] (2) 폴리머라아제 효소를 사용하여 용해 완충액 내에서 방출된 유전자 물질을 선택적으로 복제하는 단계.
- [0139] 본 발명의 제5측면에 따르면, 제1측면의 방법에 의해 제조될 때 방출된 유전자 물질이 제공된다.

- [0140] 본 발명의 제6측면에 따르면, 용해 완충액 내에서 방출된 유전자 물질이 폴리머라아제 효소를 사용하여 선택적으로 복제 될 수 있도록 용해 용액에 의해 용해되지 않은 정자 존재 하에서 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키기 위한 및 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 유전자 물질을 선택적으로 방출하기 위한 용해 용액이 제공된다.
- [0141] 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포, 배아 또는 정자는 이전에 (공지적으로 또는 비공지적으로) 유전적으로 조작되었거나 변이되었을 수 있다.
- [0142] 상기 방법은 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포, 배아 또는 정자의 유전 물질에 대한 임의의 변화를 식별하거나 확인하기 위해, 다운스트림 적용 스크리닝 테스트 또는 진단 테스트로서 사용될 수 있다.
- [0143] 잠재적 용도는 시험관 내 수정 또는 배아의 성 감별로 인한 유전자 도입 동물 또는 수정된 난자의 유전자형을 변화시키는 시험 요법 또는 처리의 능력을 결정하는 것을 포함한다. 검출 될 수 있는 유전자는 SRY, 염색체 I, 12S, GAPDH, ACTB, 염색체 Y, 또는 고가의 동물 트레일로 처리를 진행시키기 전에 임의의 바람직한 유전자 생성물을 포함한다. 전체 게놈 분석 (예: 마이크로 어레이) 및 개체군 (population) 연구와 같은 다운 스트림 적용은 이 방법을 사용하여 수행 할 수 있다.
- [0144] 유전자 산물의 변화 또는 부재는 크리스퍼 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats gene editing); SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer) (Rodrígues 2013); 탈렌 (Transcription Activator-Like Effector Nucleases); 정자상의 도킹 부위를 차단하는 항체; 난모세포상의 도킹 부위를 차단하는 항체; 자외선 차단제, 세제, 활석 (talc) 등과 같은 화학 물질; 및 돌연변이 유발 효과가 있을 수 있는 화학 물질에 의한 정자 및/또는 난모세포의 처리에 의해 야기될 수 있다.
- [0145] 다운스트림 적용과 관련하여, 임의의 적합한 유형의 폴리머라아제 효소가 사용될 수 있다. RNA 폴리머라아제 효소가 일부 경우에 사용될 수 있지만 바람직하게는 DNA 폴리머라아제 효소가 사용된다. 적합한 DNA 폴리머라아제 효소의 예는 다음을 포함한다: $\Phi 29$ DNA 폴리머라아제, T7 DNA 폴리머라아제, 내열성의 Taq 폴리머라아제 (*Thermis aquaticus*로부터) (본래 또는 재조합), 고충실도를 위한 Pfu DNA 폴리머라아제 (*Pyrococcus furiosus*로부터), 하나 이상의 프라이머 세트가 사용될 때 비특이적 생성물 증폭을 억제하기 위한 Hot-start DNA 폴리머라아제, 교정 활동 (proofreading activity)을 갖는 고충실도 (High-fidelity) 폴리머라아제 (Hi-Fi). 프라이머는 폴리 T (진핵 생물 RNA가 표적화되는 경우), 랜덤 헥사머 (random hexamer), 랜덤 펜타머 (random pentamer) 또는 랜덤 옥타 머 (random octamer)를 포함 할 수 있다. 프라이머는 또한 엑소뉴클레아제-내성 (exonuclease-resistance) 또는 엔도뉴클레아제-내성 (endonuclease resistance) 과 같은 특정 속성을 갖도록 선택 될 수 있다.
- [0146] 사용되는 실제 폴리머라아제 효소는 유전 물질이 복제되는 이유 - 즉, 추가 다운 스트림 적용에 의존할 것이다. 예를 들어, 추가의 다운스트림 적용은 다음 세대 시퀀싱, 마이크로 어레이, 단일, 이중 또는 다중 PCR, 또는 실시간 단일, 이중 또는 다중 PCR 일 수 있다. 유전 물질은 다양한 추가 다운스트림 적용을 위해 충분한 전체 게놈 DNA를 생성하기 위해 사전 증폭 될 수 있다.
- [0147] 상기 방법은 단일 비수정된 또는 수정된 난자에서 2, 4, 8, 16 개 이상의 세포로 발달한 배아까지 PCR 또는 실시간 PCR (qPCR)을 위한 DNA를 용해 및 증폭시키는 데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 본 방법은 다중 변위 증폭 (MDA), 전체 게놈 증폭 (WGA), qPCR, 마이크로 어레이 또는 시퀀싱과 같은 다운스트림 적용에 대해 강력하고, 일관성 있고, 민감성이거나 억제성이 없다.
- [0148] 용해된 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 방출되는 유전자 물질은 바람직하게는 게놈의 데옥시핵산 (DNA)이지만 예를 들어, 리보 핵산 (RNA)과 같은 다른 유형의 폴리 뉴클레오파이드/핵산도 또한 방출 될 수 있다.
- [0149] 상기 방법은 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포, 배아 또는 정자를 용해 용액에 적용하기 전에 유전자 조작하는 단계를 포함 할 수 있다. 상기 방법은 수정 전에 정자/정액을 돌연변이 유발요인과 같은 화학 물질에 노출시키는 단계를 포함 할 수 있다. 상기 방법은 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포, 배아 또는 정자에 IVF 기술을 적용하여 잠재적으로 유전 물질의 변형을 야기 할 수 있는 단계를 포함 할 수 있다.
- [0150] 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포, 배아 또는 정자는 예를 들어, 유전자 편집 기술, 크리스퍼 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) 및 탈렌 (Transcription Activator-Like Effector

Nucleases)을 이용하여 조작될 수 있다. 예를 들어, 정자/정액은 알려진 또는 의심되는 돌연변이 유발 요인과 같은 화학 물질에 노출 될 수 있다. 배아의 성 선택 처리 뿐만 아니라 정액의 성 선택 처리는 수정된 난모세포, 배반포, 난자 또는 배아의 유전자 변형을 잠재적으로 유발할 수 있다.

- [0151] 일부 구체예에서, 본 방법은 아래에 요약된 바와 같이 고 생산성 시험관 내 수정 (high-throughput in vitro fertilisation, HT-IVF)에 사용될 수 있다:
- 돼지 (또는 다른) 난소로부터 난모세포를 처리하여 새로 개발된 배지에서 성숙을 향상 (IVP와 관련하여 본 명세서의 첫 번째 섹션에 설명 된대로).
- [0152] [0153] ● 신선하고 확장된 돼지 (또는 다른) 정액으로 수정.
- [0154] ● 난모세포의 65% 이상이 8-16 개 세포로 성장하여 새로운 절차로 성장 (산업 표준 약 40%).
- [0155] ● 새로운 용해 용액으로 난모세포와 남은 정액을 다르게 용해하여 난모세포 DNA를 추출하여 정자를 그대로 유지.
- [0156] ● REPLI g 키트 SC 폴리미라아제 (Qiagen)에 의해 qPCR을 사용하여 난모세포 DNA를 증폭.
- [0157] ● 실시간 PCR (qPCR)을 통해 다양한 유전자형 특성을 탐지하는 DNA 희석.
- [0158] ● 정자 및/또는 난모세포를 다음과 같이 처리하면 유전자 산물의 변화 또는 부재가 발생할 수 있다:
- 크리스퍼 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats gene editing)
 - SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer) (Rodrigues 2013)
 - 탈렌 (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
 - 정자상의 도킹 부위를 차단하는 항체
 - 난모세포상의 도킹 부위를 차단하는 항체
 - 자외선 차단제, 세제, 활성 등과 같은 화학 물질
 - 돌연변이 유발 효과가 있을 수 있는 화학 물질
- [0166] ● 용도 :
- 유전자형을 변화시키는 시험 요법 또는 처리 능력을 결정.
 - 유전자 도입 동물
 - 시험관 내 수정
 - 배아의 성 감별
- [0171] 검출된 유전자 또는 유전자 영역: 고가의 동물 트레일로 처리를 진행시키기 전에 SRY, 염색체 I, 12S, GAPDH, ACTB, 염색체 Y, 임의의 바람직한 유전자 생성물. 이 방법을 사용하여 전체 게놈 분석 (예: 마이크로 어레이) 및 개체군 연구를 수행 할 수 있다.
- [0172] 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아는 인간 또는 임의의 적합한 유형의 동물로부터 공급 될 수 있다. 동물은 포유 동물 일 수 있다. 동물은 돼지, 소, 말, 양 또는 염소와 같은 농장 동물 일 수 있다. 동물은 개 또는 고양이와 같은 반려 동물 일 수 있다. 동물은 토끼, 쥐 또는 래트 (rat)와 같은 실험실 동물 일 수 있다.
- [0173] 임의의 적합한 유형의 용해 용액이 사용될 수 있다. 적합한 용해 용액은 다음 유형의 성분 중 하나 이상을 가질 수 있다: 염; 용해 효소; 불안정제; 금속 퀼 레이터; 환원제; 세정제; 완충제; 및 pH 조절제. 적합한 용해 용액의 일반적인 특성은 하기 표 1B에 제시되어있다.

표 6

[0174]

표 1B. 적합한 용해 용액의 특성.

성분 유형	농도 범위 (%w/v or mM 범위)	구체적인 예 및 농도 범위
염	10-200mM NaCl	50mM NaCl,
다른 성분	0.1-1mM EDTA, 100pg/ml-0.5mg/ml 프로테이나아제 K, 수크로오스 5-250mM, DTT 10-40 mM, bile salts 1.5-5mM, 5 µg/ml, NaOH 5-50mM, KOH 5-50mM, lysozyme 1-3mg/ml, BSA (0.1 - 5%)	수크로오스 100mM
세정제	0.001-10% NP40, Nonionic 0.001-10% Tween 20, Nonionic 0.001-10% SDS, anionic CHAPS Zwitterionic CTAB 0.001-0.01% Zwitterionic TRITON X-100 0.001-10% Nonionic	0.12% TRITON X-100
완충제	1-250 mM Tris-HCL 10 mM citrate buffer 50mM HEPES, RIPA	10 mM Tris-HCL
pH	5.4-8.3	7.5

[0175] 전형적으로, 용해 용액은 하기 표 2B에 나타낸 특성을 가질 것이다.

표 7

표 2B. 바람직한 용해 용액의 특성.

성분 유형	농도 범위 (%w/v or mM 범위)	구체적인 예 및 농도 범위
염	50-150 mM NaCl, KC1, (NaH ₄) ₂ SO ₄	50mM NaCl
용해 효소	프로테이나아제 K 100pg/ml-20mg/ml. lysozyme 1-3mg/ml, 히알루로니다아제 100pg/ml-0.5mg/ml. 트립신-EDTA 0.00005-50%	히알루로니다아제 10 µg/ml 프로테이나아제 K 20 mg/ml. 트립신-EDTA 0.0005%
불안정제	1.5-25% sugar 0.1-5% BSA	수크로오스 100mM
금속 퀼레이터	0.1-2mM EDTA 0.1-2mM EGTA	
환원제	1-10mM for all 디티오트레이톨 (DTT) DTE 2-머캅토에탄올	
세정제	0.2-2% NP40, Nonionic 2-10% Tween 20, Nonionic 0.1-2% SDS, anionic CHAPS Zwitterionic CTAB 0.001-0.01% Zwitterionic TRITON X-100 0.1-5%, Nonionic	Triton X-100 0.12%
완충제	10-150 mM Tris-HCL 10 mM citrate buffer 50mM HEPES, RIPA	100 mM Tris-HCL

pH	5.4-8.3	7.5
----	---------	-----

- [0177] 일반적인 참조: ALCARAZ, C., DE DIEGO, M., PASTOR, M. J. & ESCRIBANO, J. M. 1990. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. *J Vet Diagn Invest*, 2, 191-6.
- [0178] 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포 또는 배아는 용해 용액 전에 임의의 적합한 유형의 용액에 혼탁 될 수 있다. 일부 구체예에서, 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아는 M-199, 물, PBS 또는 "생식 방법론"이라는 제목의 본 명세서의 섹션 1에 달리 기재된 바와 같은 배양 배지에서 혼탁 될 수 있다. 그것은 적당한 부피로 혼탁 될 수 있지만 그 부피는 전형적으로 마이크로 리터 범위에 있을 것이다.
- [0179] 본원에 기술된 단계 (1) 또는 다른 유사한 방법 단계에서, 용해는 임의의 적절한 시간 동안 및 임의의 적합한 온도에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 적절한 시간은 5 초에서 5 시간 사이 일 수 있다. 예를 들어, 적합한 온도는 14° C 내지 100° C 사이 일 수 있지만, 바람직하게는 10 분 동안 약 38° C, 10 분 동안 55° C, 및 5 분 동안 95° C이다.
- [0180] 상기 방법은 혼합물에 존재하는 효소를 선택적으로 활성화 및 불활성화시키기 위해 본원에 기술된 단계 (1) 또는 다른 유사한 방법 단계의 혼합물을 승온으로 가열하는 단계를 포함 할 수 있다. 적합한 온도는 14° C 내지 100° C 사이 일 수 있다. 바람직하게는 온도는 약 85° C이다. 바람직하게는 본원에 기술된 단계 (1) 또는 다른 유사한 방법 단계의 혼합물은 약 38° C에서 10 분 동안, 55° C에서 10 분 동안 및 95° C에서 5 분 동안 가열된다.
- [0181] 본원에 기재된 단계 (1) 또는 다른 유사한 방법 단계에서, 용해 및 불활성화 후, 혼합물은 단계 (2) 또는 본원에 기재된 다른 유사한 방법 단계가 착수될 때까지 얼음 위에서 냉각 될 수 있다.
- [0182] 본원에 기술된 단계 (2) 또는 다른 유사한 방법 단계에서, 조건은 폴리미라아제 기술 또는 관심 기술 - 즉, 추가 다운스트림 적용 또는 애플리케이션에 의존 할 것이다. 예를 들어, 다운 스트림 적용은 다음 세대 시퀀싱, 마이크로 어레이, 단일, 이중 또는 다중 PCR, 또는 실시간 단일, 이중 또는 다중 PCR 일 수 있다. 유전 물질은 다양한 다운스트림 적용을 위한 충분한 전체 게놈 DNA를 생성하기 위해 사전 증폭 될 수 있다.
- [0183] 본원에 기술된 단계 (2) 또는 다른 유사한 방법 단계는 단일 비수정된 또는 수정된 난자에서 2, 4, 8, 16 개 이상의 세포로 발달한 배아에 대한 PCR 또는 실시간 PCR (qPCR)을 위한 DNA를 용해 및 증폭시키는 데 사용될 수 있다.
- [0184] 난모세포 처리, 정자 처리, 시험관 내 수정, 배아 처리를 위한 일반적인 기술 및 방법론은 하기 참고 문헌에서 찾을 수 있으며, 이를 각각은 상호 참조에 의해 본 명세서에 전체적으로 포함된다: Flechon et al., 2003, Bahnak et al., 1988, Mao et al., 2013, Garcia-Vazquez et al., 2016, Garcia-Vazquez et al., 2015, Hennekens et al., 2013, Rodriguez-Martinez, 2013, Romar et al., 2016, Broekhuijse et al., 2012, Lopez Rodriguez et al., 2017, Bredbacka et al., 1995, and Wieczorek et al., 2015.
- [0185] 적합한 관심 있는 폴리미라아제 기술에 대한 일반적인 기술 및 방법론은 하기 참고 문헌에서 찾을 수 있으며, 이를 각각은 상호 참조를 통해 본 명세서에 전체적으로 포함된다: Jiang et al., 2005, Chen and Kuo, 2011, Martin et al., 2009, Khamlor et al., 2014, Li et al., 2011, Bredbacka et al., 1995, Hirayama et al., 2004, Kirkpatrick and Monson, 1993, Pomp et al., 1995, and Torner et al., 2013.
- [0186] 본원에 기술된 임의의 특징은 본 발명의 범위 내에서 본원에 기술된 다른 특징 중 임의의 하나 이상과 임의의 조합으로 조합 될 수 있다.
- [0187] 본 명세서에서 임의의 종래 기술에 대한 언급은 종래 기술이 공통의 일반적인 지식의 일부를 형성한다는 인정 또는 임의의 형태의 제안으로 간주되어서는 안된다.
- [0188] 도면의 간단한 설명 2
- [0189] 본 발명의 바람직한 특징, 구체예 및 변형은 이 기술분야의 당업자가 본 발명을 수행하기에 충분한 정보를 제공하는 다음의 상세한 설명으로부터 이해할 수 있다. 상세한 설명은 어떠한 방식으로든 본 발명의 요약의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 상세한 설명은 다음과 같이 다수의 도면을 참조 할 것이다:

- [0190] 도 1B. 염색체 Y 앰플리콘 (amplicon)과 임계값 (Threshold) 및 웰 (well)을 나타내는 염색체 Y에 대한 증폭 플롯.
- [0191] 도 2B. 염색체 12S 앰플리콘 (amplicon)과 임계값 (Threshold) 및 웰 (well)을 나타내는 염색체 12S에 대한 증폭 플롯.
- [0192] 도 3B. 염색체 12S 및 염색체Y 앰플리콘 (amplicon)과 임계값 (Threshold) 및 웰 (well)을 나타내는 염색체 12S 및 염색체Y에 대한 증폭 플롯.
- [0193] 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 2
- [0194] 실시예 1 - 폴리머라아제 효소 증폭을 위해 정자 또는 정액의 존재 하에서 배아 또는 난자의 차등 용해.
- [0195] 이 실시예는 PCR 증폭을 위한 정자 또는 정액의 존재하에 배아 또는 난자의 차등 용해를 위한 신 한 용해 완충액/용액의 용도를 기술한다. 단일 용해된 배아 또는 난자로부터의 DNA는 PCR에 의해 사전 증폭되어 다양한 다운스트림 적용을 위한 충분한 전체 게놈 DNA를 생성 할 수 있다.
- [0196] 본원에 기재된 고 생산성 방법은 정자 존재 하에서 선택적으로 난모세포를 용해시키기에 충분히 민감한 빠른25분의 1-튜브 절차이며, 동시에 단일 수정되지 않은 난자 및 2, 4, 8, 16 개 이상의 세포로 발달한 배아로부터 DNA를 용해 및 사전 증폭시키기에 충분히 민감하다. 또한, 사전 증폭 또는 다운스트림 적용을 저해 할 수 있는 물질이 도입되지 않았다. 이 방법은 단일-셀 REPLIg 키트 및 추가 qPCR 적용과도 호환된다.
- [0197] 재료 및 방법:
- [0198] 사전 증폭
- [0199] 2 μ l 부피 내에 단일, 수정된 배아 (2개 이상의 세포 단계) + 배지를 200 μ l PCR 튜브로 옮겼다. 하기 표 2B에 나타낸 바와 같이 50mM NaCl, 10 μ g/ml 히알루로니다이아제, 0.0005% 트립신-EDTA, 20mg/ml 프로테이나아제 K, 100mM 수크로오스, 0.12% 트리톤 X-100 in 100mM 트리스-HCl pH 7.5로 구성된 용해 용액/완충제 (4 μ l)을 첨가하고, 10 분 동안 38° C, 10 분 동안 55° C 및 5분 동안 95° C에서 가열한 다음, 얼음위에서 냉각시켰다. 7.25 μ l 의 REPLIg sc 반응 완충액 및 0.5 μ l 의 REPLIg sc 폴리머라아제로 구성된 REPLIg 마스터 믹스 (7.75 μ l)를 동일한 튜브 내에 용해된 세포에 직접 첨가 하였다. 튜브를 잘 불택싱 (voltex)하고, 회전시켜 튜브의 바닥에 모든 물질을 수집하고, 30° C에서 8 시간 동안 배양한 후, 65° C에서 3 분 동안 sc 폴리머라아제를 변성시켰다. 각 실행에 대한 대조군에는 수정되지 않은 난자, 주형 대조군 없음, 정액 1 μ l 및 시약 대조군 없음이 포함되었다.
- [0200] 사전 증폭된 전체 게놈 DNA는 이 시점에서 PCR, qPCR 또는 마이크로 어레이와 같은 다양한 응용에 사용될 수 있다.
- [0201] 용해된 난모세포 및 게놈 물질은 또한 PCR, 실시간 PCR의 주형으로서 직접 사용될 수 있다. 9 μ l의 마스터믹스, (2XTaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies)로 구성), 0.4 μ M의 각 염색체 Y 포워드 및 리버스 프라이머, 0.25 μ M의 염색체 Y FAM 프로브, 0.4 μ M의 각 염색체 12S 또는 염색체 1 포워드 및 리버스 프라이머 및 0.25 μ M 염색체 1 또는 염색체 12S (Martin 2009) VIC 프로브(를 총 부피의 용해물에 첨가하였다. 염색체 12S를 내부 대조군으로 사용 하였다. 다음 조건을 사용하여 분석을 수행 하였다: 유지 시간은 50° C, 2 분 동안, 뒤이어 95° C, 10 분 동안, 그런 다음 15 초 동안 95° C 및 60초 동안 60° C의 40사이클. 사전 증폭 (비수정된 난자, 주형 대조군 (NTC) 없음, 정액 1 μ l 및 시약 대조군 없음)에 대한 대조군 웰 이외에, 추가의 게놈 DNA (gDNA) 및 NTC를 첨가 하였다. 표 3B를 참조하시오.
- [0202] 실시간 PCR (qPCR)
- [0203] 사전 증폭으로부터의 scDNA를 1/100로 희석하고, 1 μ l를 10 μ l PCR 반응에서 주형으로서 사용하였다. 2XTaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 0.4 μ M의 각 염색체 Y 포워드 및 리버스 프라이머, 0.25 μ M 염색체 Y FAM 프로브, 0.4 μ M의 각 염색체 12S 또는 염색체 1 포워드 및 리버스 프라이머 및 0.25 μ M 염색체 또는 염색체 12S (Martin 2009) VIC 프로브로 구성된 마스터 믹스. 염색체 12S를 내부 대조군으로 사용하였다. 다음 조건을 사용하여 분석을 수행하였다: 유지 기간은 50° C에서 2 분 동안, 이어서 95° C에서 10 분 동안, 그런 다음 95° C에서 15 초 동안, 및 60° C에서 60 초 동안의 40 사이클. 사전 증폭 (비수정된 난자, 주형 대조군 (NTC) 없음, 정액 1 μ l 및 시약 대조군 없음)에 대한 대조군 웰 이외에, 추가의 게놈 DNA (gDNA) 및 NTC를 첨가 하였다. 표 3B를 참조하시오.

표 8

표 3B. PCR 프라이머/ 프로브

12S	서열	Tm	GC%	앰플리콘
포워드 프라이머 (서열 식별 번호 366)	CACCCCTCCTCAAGCATGTAGTAATAA	59	42	86 bp
리버스 프라이머 (서열 식별 번호 367)	GCTTACCTTGTTACGACTTGTCTCTTC	59	44	
프로브 (probe) (서열 식별 번호 368)	CTATATTCAATTACACAACCATG	69	30	
염색체 1				
포워드 프라이머 1 (서열 식별 번호 369)	TGCCACACAAGGCATATTCTG	58	48	64 bp
리버스 프라이머 1 (서열 식별 번호 370)	CAACTCCAAACGTGCTCTACTTCA	59	46	
검출 1	ATCCGCCTCCTCC	68	69	
염색체 Y	서열	Tm	GC%	앰플리콘
포워드 프라이머 2 (서열 식별 번호 371)	AATCCACCATACTCATGGACC	70	50	
리버스 프라이머 2 (서열 식별 번호 372)	GCAGGAGGATACAGGAGAAA			
검출 2 (서열 식별 번호 373)	ACTTTCTTGGGAGAGCAC			

결과:

[0205] 분석 결과가 정확한 것으로 받아 들여지려면, 수정되지 않은 난자는 염색체 Y 신호가 없는 염색체 1 또는 12S에 대해 양성 (positive) 신호를 가져야 한다. 정액에 대한 음성 (negative) 반응 (염색체 1, 12S 또는 염색체 Y 신호 없음), 주형 없음 및 시약 대조군 없음이 예상된다. 게놈 DNA는 염색체 Y 및 염색체 1 또는 12S 모두에 양성이어야한다. Ct 값 <35.5는 양의 값으로 간주되었고, Ct 값이 > 35.5 인 경우 결과는 음의 값으로 무시되었다. 튜브에 앰플리콘인 없거나 12S가 없고 염색체 Y가 존재하면 증폭 실패를 나타낸다.

[0206] 도 1B는 염색체 Y 앰플리콘을 갖는 임계값 (Threshold) 및 웰 (well)을 나타내는, 염색체 Y에 대한 증폭 플롯을 도시한다. 도 2B는 염색체 12S에 대한 임계값 및 웰을 나타내는, 12S에 대한 증폭 플롯을 도시한다. 도 3B는 염색체 12S 및 염색체 Y 앰플리콘을 갖는 임계값 및 웰을 나타내는, 염색체 12S 및 염색체 Y 조합에 대한 증폭 플롯을 도시한다.

[0207] 처리된 정액으로 수정된 난모세포로부터의 데이터가 표 4B에 나타난다. 표적 유전자는 12S 및 염색체 Y였으며, 수정된 난모세포를 효과적으로 성 감별하였다. 대조군 ($n=8$)은 58% 암컷 대 42% 암컷을 가졌다; 튜브 상단으로부터 정액으로 수정된 난모세포 ($n=16$)는 84% 암컷 및 16% 수컷을 가졌다. 튜브 바닥으로부터 정액으로 수정된 난모세포 ($n=8$)는 75%의 암컷과 25%의 수컷을 가졌다.

표 9

표 4B. 처리된 정액으로 수정된 난모세포로부터의 데이터의 실시례. 2 개의 유전자, 12S 및 내부 대조군 및 염색체 Y가 검출되었다. 두 결과의 조합을 사용하여 배아의 성별을 결정했다.

웰(Well)	샘플명	타겟명	12S	ChrY
A1	gDNA	12S	1	1
A1	gDNA	Chr Y		
B1	NTC	12S	0	0

B1	NTC	Chr Y		
C1	Semen	12S	0	0
C1	Semen	Chr Y		
D1	UFO	12S	1	0
D1	UFO	Chr Y		
E1	NTCrep	12S	0	0
E1	NTCrep	Chr Y		
F1	C1	12S	1	0
F1	C1	Chr Y		
G1	C2	12S	1	1
G1	C2	Chr Y		
H1	C3	12S	1	1
H1	C3	Chr Y		
A2	C4	12S	1	1
A2	C4	Chr Y		
B2	C5	12S	1	1
B2	C5	Chr Y		
C2	C6	12S	1	0
C2	C6	Chr Y		
D2	C7	12S	1	0
D2	C7	Chr Y		
E2	C8	12S	0	1
E2	C8	Chr Y		
			7	5
			% 암컷	% 수컷
	대조군		58.33333	41.66667
F2	T1	12S	1	0
F2	T1	Chr Y		
G2	T2	12S	1	0
G2	T2	Chr Y		
H2	T3	12S	1	0
H2	T3	Chr Y		
A3	T4	12S	1	0
A3	T4	Chr Y		
B3	T5	12S	1	0
B3	T5	Chr Y		
C3	T6	12S	1	1
C3	T6	Chr Y		
D3	T7	12S	1	0
D3	T7	Chr Y		
E3	T8	12S	1	0
E3	T8	Chr Y		
F3	T9	12S	1	1
F3	T9	Chr Y		
G3	T10	12S	1	0
G3	T10	Chr Y		
H3	T11	12S	1	0
H3	T11	Chr Y		
A4	T12	12S	1	0
A4	T12	Chr Y		
B4	T13	12S	1	0
B4	T13	Chr Y		
C4	T14	12S	1	1
C4	T14	Chr Y		
D4	T15	12S	1	0
D4	T15	Chr Y		
E4	T16	12S	1	0
E4	T16	Chr Y		

			16	3
			% 암컷	% 수컷
		상위	84.21053	15.78947
F4	B1	12S	1	1
F4	B1	Chr Y		
G4	B2	12S	1	1
G4	B2	Chr Y		
H4	B3	12S	1	0
H4	B3	Chr Y		
A5	B4	12S	0	0
A5	B4	Chr Y		
B5	B5	12S	1	0
B5	B5	Chr Y		
C5	B6	12S	0	0
C5	B6	Chr Y		
D5	B7	12S	1	0
D5	B7	Chr Y		
E5	B8	12S	1	0
E5	B8	Chr Y		
F5	Diluent	12S	0	0
F5	Diluent	Chr Y		
			6	2
			% 암컷	% 수컷
		하위	75	25

[0210]

논의

[0211]

염색체 1 또는 12S의 검출은 수정되지 않은 난자 단독으로부터의 신호를 나타낸다. 정액에 대한 음성 반응 (염색체 1, 12S 또는 염색체 Y 신호 없음)은 정액 샘플에서 용해가 없으므로 수정된 난자 웨 (well) 내에 가능한 남은 정액으로부터 유전자 기여가 예상되지 않음을 나타냅니다. 염색체 1 및 12S는 내부 대조군이고, 염색체 Y 앰플리콘의 존재 하에서도 이 앰플리콘의 부재는 증폭 실패로 간주되지 않는다.

[0212]

게놈 DNA는 12S 및 염색체 Y 모두에 대해 양성인 반면, 정액 및 REPLIG로부터의 NTC는 어떠한 앰플리콘의 부재에 의해서도 DNA가 검출되지 않았다. 수정되지 않은 난모세포 대조군 (UFO)은 폐지 게놈 물질로부터 예상되는 바와 같이, 12S에 대해 양성이었지만, 우연히 용해된 정액으로부터 기여할 수 있는 염색체 Y는 검출되지 않았다. 이 결과는 "암컷"으로 해석되었다.

[0213]

이 고 생산성 시험관 내 수정 (HT IVF) 방법은 다양한 응용을 가질 수 있다. 도 4B를 참조하시오. 난자는 SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer) (Rodrigues 2013), 유동 세포 분석법, 항체 또는 자외선 차단제, 세정제, 탈크 또는 의심되거나 알려진 돌연변이 유발요인과 같은 화학 물질의 첨가로 처리되는 정액에 의해 수정 될 수 있다. 수정이 일어날 때 전달 될 수 있는 정액에 대한 처리의 효과는 이 실시예에서 염색체 Y와 같은 단일 유전자에서 테스트 될 수 있다. 이 방법은 전체 게놈 증폭을 사용하므로, 정액 처리의 효과는 새끼의 전체 게놈에 대해 결정될 수 있다. 또한, 다수의 난모세포가 동일한 처리를 받을 수 있으므로, 새끼의 전체 개체군에 대한 영향을 결정할 수 있다.

[0214]

동일한 효과를 위해, 처리되지 않은 정액은 크리스퍼 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (유전자 편집) 또는 탈렌 (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)과 같은 기술에 의해 유전적으로 조작된 난소에서 사용될 수 있다. 난자의 항체 또는 자외선 차단제, 세정제, 탈크 또는 의심되거나 알려진 돌연변이 유발요인과 같은 화학 물질에 대한 첨가의 효과는 배아의 단일 및 개체군에서 테스트 할 수 있다.

[0215]

참조 2

[0216]

Patent US 20160222375 A1 Method, apparatus and kit for human identification using polymer filter means for separation of sperm cells from biological samples that include other cell types.

- [0217] Patent EP 2 284 256 A2 Sperm cell insemination samples having selectively controlled sperm cell fertility characteristics produced through entrainment in a fluid stream having correspondingly selectively adjustable flow characteristics and methods of assessing comparative of sperm cell insemination sample fertility.
- [0218] Patent US 6,548,741 B2 DEVELOPMENTAL COMPETENCE FOR ASSISTED REPRODUCTION AND NUCLEAR TRANSFER IN PIGS
- [0219] Patent US20150232917A1 Differential lysis with aid of Alkali and pressure
- [0220] Gill, Peter, Jeffreys, Alec J and Werrett, David J. (1985) Forensic application of DNA ‘fingerprints’ . Nature Volume: 318 Issue: 6046 Pages: 577-579
- [0221] Mao, Shihong, Goodrich, Robert J., Hauser, Russ, Schrader, Steven M., Chen, Zhen and Krawetz, Stephen A. (2013) Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. Systems biology in reproductive medicine. Volume: 59 Issue: 5 Pages: 287-295
- [0222] Martin, Irene, Garcia, Teresa, Fajardo, Violeta, Rojas, Maria, Pegels, Nicolette, Hernandez, Pablo E, Gonzalez, Isabel and Martin, Rosario. (2009) SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. Meat Science Volume: 82 Issue: 2 Pages: 252-259
- [0223] Norris, Jessica V., Manning, Kate, Linke, Sarah J., Ferrance, Jerome P. and Landers, James P. Year: (2007) Expedited, Chemically Enhanced Sperm Cell Recovery from Cotton Swabs for Rape Kit Analysis. Journal of Forensic Sciences Volume: 52 Issue: 4 Pages: 800-805
- [0224] Pomp, D, Good, B A, Geisert, R D, Corbin, C J and Conley, A J. (1995) Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. Journal of animal science. Volume: 73 Issue: 5 Pages: 1408-1415
- [0225] Rodriguez-Martinez, Heriberto. (2013) Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art. Animal Reproduction Volume: 10 Pages: 268-276
- [0226] Rossen, Lone, Nørskov, Pernille, Holmstrøm, Kim and Rasmussen, Ole F. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. International Journal of Food Microbiology. Volume: 17 Issue: 1 Pages: 37-45
- [0227] Torner, Eva, Bussalleu, Eva, Briz, M. Dolors, Gutierrez-Adan, Alfonso and Bonet, Sergi. (2013) Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences. Reproduction, Fertility and Development. Volume: 25 Issue: 2 Pages: 417-425
- [0228] Yoshida, Kanako, Sekiguchi, Kazumasa, Mizuno, Natsuko, Kasai, Kentaro, Sakai, Ikuko, Sato, Hajime and Seta, Sueshige (1995); The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. Forensic Science International, Volume: 72, Issue 1, Pages 25-33
- [0229] BAHNAK, B. R., WU, Q. Y., COULOMBEL, L., DROUET, L., KERBIRIOU-NABIAS, D. & MEYER, D. 1988. A simple and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm. Nucleic Acids Research, 16, 1208-1208.
- [0230] BREDBACKA, P., KANKAANPAA, A. & PEIPPO, J. 1995. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. Theriogenology, 44, 167-176.
- [0231] BROEKHUIJSE, M. L. W. J., FEITSMA, H. & GADELLA, B. M. 2012. Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. Veterinary Quarterly, 32, 151-157.
- [0232] CHEN, Y.-H. & KUO, Y.-H. 2011. Evaluation of different lysis buffers for improving resolution in proteomic analysis of porcine spermatozoa Yu-Hui Chen (, You-Hai Kuo (2), Meng-Ting Chung (, Yu-Fang Chiu (and San-Yuan Huang. J. Chin. Soc. Anim. Sci, 40, 183-189.

- [0233] FLECHON, J. E., DEGROUARD, J., KOPECNY, V., PIVKO, J., PAVLOK, A. & MOTLIK, J. 2003. The extracellular matrix of porcine mature oocytes: Origin, composition and presumptive roles. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E, 1, 124-124.
- [0234] GARCIA-VAZQUEZ, F. A., GADEA, J., MATAS, C. & HOLT, W. V. 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J Androl*, 18, 844-850.
- [0235] GARCIA-VAZQUEZ, F. A., HERNANDEZ-CARAVACA, I., MATAS, C., SORIANO-UBEDA, C., ABRIL-SANCHEZ, S. & IZQUIERDO-RICO, M. J. 2015. Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *J Reprod Dev*, 61, 407-13.
- [0236] GILL, P., JEFFREYS, A. J. & WERRETT, D. J. 1985. Forensic application of DNA ‘fingerprints’ . *Nature*, 318, 577-579.
- [0237] HENNEKENS, C. M., COOPER, E. S., COTTON, R. W. & GRGICAK, C. M. 2013. The effects of differential extraction conditions on the premature lysis of spermatozoa. *J Forensic Sci*, 58, 744-52.
- [0238] HIRAYAMA, H., KAGEYAMA, S., MORIYASU, S., SAWAI, K., ONOE, S., TAKAHASHI, Y., KATAGIRI, S., TOEN, K., WATANABE, K., NOTOMI, T., YAMASHINA, H., MATSUZAKI, S. & MINAMIHASHI, A. 2004. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 62, 887-896.
- [0239] JIANG, Z., ZHANG, X., DEKA, R. & JIN, L. 2005. Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Research*, 33, e91-e91.
- [0240] KHAMLOR, T., PONGPIACHAN, P., SANGSRITAVONG, S. & CHOKESAJJAWATEE, N. 2014. Determination of Sperm Sex Ratio in Bovine Semen Using Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction. *Asian-Australas J Anim Sci*, 27, 1411-6.
- [0241] KIRKPATRICK, B. W. & MONSON, R. L. 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, 335-340.
- [0242] LI, C., SUN, Y., YI, K., LI, C., ZHU, X., CHEN, L. & ZHOU, X. 2011. Detection of the SRY Transcript and Protein in Bovine Ejaculated Spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 1358-1364.
- [0243] LOPEZ RODRIGUEZ, A., VAN SOOM, A., ARSENAKIS, I. & MAES, D. 2017. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management*, 3, 15.
- [0244] MAO, S., GOODRICH, R. J., HAUSER, R., SCHRADER, S. M., CHEN, Z. & KRAWETZ, S. A. 2013. Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. *Systems biology in reproductive medicine*, 59, 287-295.
- [0245] MARTIN, I., GARCIA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., PEGELS, N., HERNANDEZ, P. E., GONZALEZ, I. & MARTIN, R. 2009. SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252-259.
- [0246] POMP, D., GOOD, B. A., GEISERT, R. D., CORBIN, C. J. & CONLEY, A. J. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *Journal of animal science*, 73, 1408-1415.
- [0247] RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2013. Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art. *Anim Reprod*, 10, 268-276.
- [0248] ROMAR, R., FUNAHASHI, H. & COY, P. 2016. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology*, 85, 125-34.
- [0249] TORNER, E., BUSSALLEU, E., BRIZ, M. D., GUTIERREZ-ADAN, A. & BONET, S. 2013. Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 417-425.

[0250] TRIANA, L. R., BABCOCK, D. F., LORTON, S. P., FIRST, N. L. & LARDY, H. A. 1980. Release of Acrosomal Hyaluronidase Follows Increased Membrane Permeability to Calcium in the Presumptive Capacitation Sequence for Spermatozoa of the Bovine and Other Mammalian Species1. Biology of Reproduction, 23, 47-59.

[0251] WIECZOREK, J., KOSENIUK, J., MANDRYK, I. & PONIEDZIALEK-KEMPNY, K. 2015. Piglets born after intrauterine laparoscopic embryo transfer. Pol J Vet Sci, 18, 425-31.

표제 3

성 선택을 위한 단일 클론 항체

기술분야 3

[0255] 본 발명은 Y염색체를 갖는 정자와 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체뿐만 아니라 성-특이적 정자 선택을 위한 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 본 발명은 수컷 정자 세포의 정자 표면 단백질 DBY/DEAD에 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체에 관한 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인공 수정 전에 정자를 함유하는 정액을 수집 및 처리하여 암컷 새끼를 얻을 가능성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술 3

[0257] 포유 동물 새끼의 성별은 정자 (정액) 세포에 의해 결정된다. X 염색체 ('암컷 정자 세포')를 갖는 정자는 수정시 암컷 (XX) 새끼로 이어지고, Y 염색체 ('수컷 정자 세포')를 갖는 정자는 수정시 수컷 (XY) 새끼로 이어진다.

[0258] 수컷 또는 암컷 정자 세포가 난자를 관통 할 때 수정이 일어난다. 난자와의 접촉은 주로 정자 표면 단백질에 의해 매개된다. 이들 단백질은 고유하고, 세포 특이적이며, 면역성이 있고, 항체에 접근 가능하다. 암컷 및 수컷 정자 세포는 표면 단백질의 레퍼토리가 다르다. 수컷 정자 세포에 고유한 표면 단백질은 MEA 1, MEA 2, SRY, TSPY 및 DBY/DEAD를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 WO 2008/067651 및 US 2009/0208977을 참조하시오.

[0259] 수년 동안 축산 산업에서 수컷 또는 암컷 새끼를 자발적으로 선택할 수 있는 '성 선택 (Sex selection)' 이 인기를 끌고 있다. 특히, 암컷 돼지 및 소의 새끼를 선택할 수 있는 능력이 추구되었고, 여러 가지의 유형의 기술이 제안되었다. 이전에 제안된 기술 중 일부는 아래에서 다루어지며, 이들은 포유류 정자 표면의 성-특이성 에피토프 ('정자 세포')에 대한 항체 (다클론성, 단일클론성 또는 부분)가 표적화되었다는 점에서 공통점이 있다.

[0260] 미국 특허 제 3,687,806 호는 수컷 또는 암컷 정자 세포와 반응하고 응집 단계를 이용하여 영향받지 않은 항체로부터 결합된 항체를 분리하는 항체의 용도를 기술한다.

[0261] 미국 특허 제 4,191,749 호는 암컷 정자 세포는 결합되지 않은 채로 유지시키는 반면, 수컷 정자 세포를 선택적으로 결합시키기 위한 고체상 면역 흡수제 (immunoabsorbant) 물질에 결합된 수컷-특이적 항체의 용도를 기술한다.

[0262] 미국 특허 제5,021,244호는 수컷 또는 암컷 정자 세포가 풍부한 하위 집단을 생성하기 위한 특정 막 단백질에 관한 항체의 용도를 기술한다.

[0263] 미국 특허 제6,153,373호 및 제6,489,092호는 수컷 및 암컷 정자 세포의 분리를 위해 자성 입자에 연결된 항체의 용도를 기술한다.

[0264] 미국 특허 출원 제 2018/0201667호는 유동 세포 분석법에 적용될 때 수컷 및 암컷 정자 세포를 분리하는 소 정액에 대한 항체를 기술한다.

[0265] 캐나다 특허 출원 제2610295호는 스윔업 (swim-up) 및 유동 세포 분석법에 의해 수컷 및 암컷 수퇘지 정자 세포를 분리하는 다클론 토끼 항체를 기술한다.

[0266] 그러나, 이들 기술들 각각은 적절한 재현 가능한 성 선택 결과를 생성할 수 없는 능력을 포함하여 난점을 겪고 있다.

발명의 구체적인 내용 3

- [0268] 본 발명자들은 수컷 정자 세포 (정자)에 선택적으로 결합 할 수 있는 항체를 개발 하였다. 본 발명자들은 정자를 처리하고 암컷 정자 세포로부터 수컷 정자 세포를 분리하는 방법을 개발 하였다. 본 발명자들은 항체로 처리 한 후, 생존 가능한 암컷 정자 세포가 포유 동물에서 인공 수정에 사용될 수 있고 암컷 새끼를 생산할 수 있음을 발견하였다. 따라서, 상기 방법은 항체-처리된 정액을 이용한 인공 수정에 의해 원하는 성별의 포유 동물 새끼를 생산할 확률을 증가시킨다.
- [0269] 일반적인 방법은 수컷 공여자로부터 정액을 수집하는 단계 (예를 들어, 입증된 인공 수정 수컷 코끼리 (bull) 또는 수퇘지 (boar)), 및 정액 내에 또는 정액 (즉, '처리된 정액')으로부터 원치 않는 수컷 정자 세포를 전달하는 정자의 불활성화, 응집, 제거 또는 사망을 가능하게 하기 위해 비율로 정액에 항체를 첨가하는 단계를 포함한다. 포유 동물은 처리된 정액으로 인공 수정되어 암컷 새끼를 생산할 수 있다.
- [0270] 본 발명의 제1측면에 따르면, 포유 동물 수컷 정자 (수컷 정자)의 표면 단백질에 특이적으로 결합하고/하거나 이에 인식하는 단일 클론 항체 또는 이의 단편이 제공된다.
- [0271] 항체는 비-자연적으로 발생한다. 항체는 재조합 수단에 의해 생성된다. 항체는 임의의 적합한 형태, 예를 들어 단리된, 경제된 또는 실질적으로 정제된 형태일 수 있다.
- [0272] 본원에 사용된 용어 "단일 클론 항체" 및 "단일 클론 항체들"은 단일 문자 조성물의 항체의 제조를 지칭한다. 단일 클론 항체는 표적 항원의 특정 애피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다.
- [0273] 본원의 "항체"는 필요한 특이성을 갖는 결합 도메인을 갖는 임의의 특이적 결합 인자를 포함하는 것으로 해석되어야한다. 따라서, 이 용어는 균질한 항체 세그먼트, 유도체, 및 인간화된 그의 항체, 뿐만 아니라 항체의 기능적 동등물 (equivalent) 및 상동물 (homologue)를 포함하고, 천연 또는 합성의 항원 결합 도메인을 갖는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 항체의 예는 면역 글로불린 서브 타입 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA) 및 그의 서브 타입 및 서브 클래스이다; Fab, scFv, Fv, dAb 및 Fd와 같은 항원 결합 도메인 및 디아 바디를 포함하는 세그먼트 일 수 있다. 다른 폴리펩티드에 융합되고 항원 결합 도메인 또는 이의 동등물을 포함하는 키메라 (chimeric) 문자가 또한 포함된다.
- [0274] 본 발명에 따른 단일 클론 항체는, 예를 들어 1가 (monovalent) 또는 단일 가닥 항체, 이중 가닥 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체 및 유도체, 상기 항체의 기능적 동등물 및 상동물 일 수 있으며, 추가로 항체 세그먼트 및 항원 결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0275] 항체는 다양한 방식으로 변형 될 수 있고, DNA 재조합 기술을 사용하여 원래 항체의 특이성을 보유하는 다른 항체 또는 키메라 문자를 생성 할 수 있다. 이 기술은 항체의 면역 글로불린 가변 도메인 또는 CDR을 코딩하는 DNA를 불변 도메인 또는 불변 도메인 플러스 상이한 면역 글로불린의 골격 (framework) 영역에 도입 할 수 있다. 유전자 돌연변이 또는 다른 변화는 하이브리도마 또는 항체를 생산하는 다른 세포에서 수행 될 수 있으며, 이는 생성된 항체의 결합 특이성을 변화 시키거나 변화시키지 않을 수 있다.
- [0276] 중사슬 및 경사슬에서 매우 가변적인 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 링커 서열 이외에, 본 발명에 따른 단일 클론 항체의 나머지 부분은 골격 (framework) 영역이다. 결합에 의해 요구되는 3 차원 구조가 영향을 받지 않는다면, 골격 (framework) 영역은 다른 서열로 대체 될 수 있다. 항체의 특이성의 문자 기초는 주로 항원과 결합하는 주요 위치인 매우 가변적인 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3으로부터 온다. 바람직한 결합 특이성을 유지하기 위해, CDR 서열은 가능한 한 많이 유지되어야한다. 그러나 결합 특이성을 최적화하기 위해 일부 아미노산을 변경해야 할 수도 있다. 당업자는 표준 관행을 통해 이 목표를 달성 할 수 있다.
- [0277] 표적 항체는 인간화 될 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 모 항체의 골격 영역에서 아미노산 치환을 수행하여 변형된 항체이며, 모 항체와 비교하여, 인간화된 항체는 면역성이 낮다. 항체는 당 업계에 잘 알려진 많은 기술로 인간화 될 수 있다. 일반적으로, 이러한 인간화 방법은 동일한 항원에 결합할 수 있는 항체 서열을 비교하여 적절한 부위를 확인하고, 상기 부위의 아미노산을 유사한 아미노산의 동일한 부위에서 상이한 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 이를 방법에 따르면, 모 항체의 아미노산 서열은 변이 내성 위치를 식별하면서, 다른 관련 항체와 비교된다 (예를 들어, 서열 정렬). 모 항체의 가변 도메인의 아미노산 서열은 전형적으로 인간 항체 데이터베이스에서 아미노산 서열과 비교되고, 모 항체와 유사한 아미노산 서열을 갖는 인간화된 항체가 선택된다. 모 항체 및 인간화된 항체의 서열을 비교하고 (예를 들어, 서열 정렬), 모 항체의 하나 이상의 변이 내성 위치의 아미노산은 인간화된 항체 내 상응하는 위치의에 아미노산에 의해 치환된다.
- [0278] 상기 논의된 변이 내성 위치의 치환 방법은 임의의 공지된 인간화 방법과 쉽게 조합 될 수 있고, CDR을 포함하

는 인간화된 항체의 생산에 쉽게 적용될 수 있고, 상기 항체의 CDR은 모 항체의 CDR에 충실하면서 변형된다. 따라서, 본 발명은 추가로 모 항체의 변형된 버전으로부터 복수의 CDR을 포함하는 인간화된 단일 클론 항체를 제공한다.

[0279] 항체는 다양한 방식으로 변형 될 수 있고, DNA 재조합 기술을 사용하여 원래 항체의 특이성을 유지하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생성 할 수 있다. 이 기술은 항체의 면역 글로불린 가변 도메인 또는 CDR을 코딩하는 DNA를 불변 도메인 또는 불변 도메인 플러스 상이한 면역 글로불린의 골격 영역으로 도입 할 수 있다. 유전자 돌연변이 또는 다른 변화는 또한 하이브리도마 또는 항체를 생산하는 다른 세포에서 수행 될 수 있으며, 이는 생성된 항체의 결합 특이성을 변화 시키거나 변화시키지 않을 수 있다.

[0280] 본 발명에 사용된 단일 클론 항체는 또한 하이브리도마 방법으로 제조 될 수 있다. 본 발명에 따른 인간화된 항체를 코딩하는 DNA 서열은 본 발명에서 공개된 아미노산 서열의 인공 합성 또는 PCR 증폭과 같은 당업자에게 공지된 통상적인 수단을 통해 수득 될 수 있기 때문에, 서열은 또한 재조합 DNA 방법 및 당업계에 공지된 다양한 방법으로 적절한 발현 담체에 연결될 수 있다. 마지막으로, 본 발명에 따른 항체의 발현에 적합한 조건 하에서, 수득된 숙주 세포를 배양 및 형질 전환시킨 후, 당업자는 본 발명에 따른 단일 클론 항체를 정제하기 위해 공지된 통상적인 분리 및 정제 수단을 사용한다.

[0281] 단일 클론 항체가 제조 될 때, 면역 글로불린 분자를 정제하기 위해 당업계에 공지된 방법으로 정제 할 수 있다; 예를 들어, 크로마토 그래피 (예를 들어, 이온 교환 크로마토 그래피, 친화성 크로마토 그래피, 특히 단백질 A를 관통하여 특정 항원에 대한 친화성 크로마토 그래피 및 다른 컬럼 크로마토그래피), 원심 분리, 용해도 차이 또는 단백질 정제를 위한 기타 표준 기술 를 정제하기 위해. 단백질 A 및 기타 컬럼 크로마토 그래피). 많은 구체예에서, 항체는 세포로부터 배양 배지로 분비되고, 항체는 배양 배지를 수집하고 정제하여 수득된다.

[0282] 용어 "항체" 및 "면역 글로불린"은 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 이들 용어는 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 구체적으로 항원과 특이적으로 결합 할 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드로 구성된 단백질을 지칭한다. 항체의 한 형태는 항체의 기본 구조 단위, 즉 4량체 (tetramer)를 구성한다. 그것은 완전히 동일한 항체 사슬의 두 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 경사슬과 중사슬을 가지고 있다. 각각의 한 쌍의 항체 사슬에서, 경사슬 및 중사슬의 가변 도메인은 항원과의 결합을 담당하기 위해 함께 결합되는 반면, 불변 도메인은 항체의 이펙터 기능 (effector function)을 담당한다.

[0283] 현재 공지된 면역 글로불린 폴리펩티드는 κ 및 λ 경사슬, 및 α, γ (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), δ, ε 및 μ 중사슬 또는 그의 다른 동등물을 포함한다. 전체 길이에서 면역 글로불린 "경사슬" (약 25kDa 또는 약 214개 아미노산)은 NH₂- 말단에서 약 110 개의 아미노산으로 구성된 가변 도메인 및 COOH- 말단에서 κ 또는 λ 불변 도메인을 포함한다. 유사하게, 전체 길이에서 면역 글로불린 "중사슬" (약 50kDa 또는 약 446개 아미노산)은 가변 도메인 (약 116 개 아미노산) 및 γ (약 330 개 아미노산)와 같은 중사슬 불변 도메인 중 하나를 포함한다.

[0284] 용어 "항체" 및 "면역 글로불린"은 임의의 이소형 (isoform) 항체 또는 면역 글로불린, 또는 Fab, Fv, scFv 및 Fd 세그먼트, 키메라 항체, 인간화된 항체, 단일 가닥 항체, 뿐만 아니라 항체 및 비-항체 단백질의 항원 결합 부분을 갖는 융합 단백질을 포함 하나 이에 제한되지 않는 항원에 여전히 특이적으로 결합된 항체 세그먼트를 포함한다. 상기 용어는 Fab', Fv, F(ab')2 및/또는 다른 항체 세그먼트 및 항원과 특이적으로 결합 할 수 있는 단일 클론 항체를 추가로 포함한다.

[0285] 항체는 또한 예를 들어 Fv, Fab 및 (Fab')2뿐만 아니라 두 기능을 가진 하이브리드 항체 (예를 들어, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol., 1987; 17)를 포함하는 다양한 형태 및 단일 가닥의 형태 (예를 들어, Huston et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988; 85, 5879 및 Bird et al., Science, 1988; 242, 423) 이들은 본원에서 참조로 인용됨)로 존재할 수 있다. 면역 글로불린의 중사슬 또는 경사슬의 가변 도메인은 3개의 초 가변 도메인 ("상보성 결정 영역" 또는 CDR이라고도 함)으로 구성된다. 이러한 초 가변 도메인은 골격 영역 (FR)에 의해 이격되어있다. FR 및 CDR의 범위는 정확하게 정의되어있다 ("면역학적 관심 단백질의 서열", E. Kabat 등, 미국 보건복지부, 1991 참조). 본원에 논의된 모든 항체의 아미노산 서열은 카바트 (Kabat) 시스템을 참조하여 분류된다. 동일한 종의 상이한 경사슬 및 중사슬 FR 서열이 비교적 보존된다. 항체 FR은 CDR의 위치 및 캘리브레이션 (calibrate)에 사용된다. CDR은 주로 항원 에피토프와의 결합을 담당한다.

[0286] 키메라 항체는 특히 유전적으로 조작되고 상이한 종에 속하는 가변 도메인 및 불변 도메인 유전자를 갖는 항체를 갖는 구축된 중사슬 및 경사슬 유전자를 갖는 항체이다. 예를 들어, 마우스 단일 클론 항체 유전자의 가변

도메인 세그먼트는 인간 항체의 불변 도메인 세그먼트, 예컨대 γ1 및 γ3에 연결된다. 키메라 항체는 또한 다른 포유 동물 종으로부터의 유전자를 사용할 수 있다.

[0287] 용어 "인간화된 항체" 및 "인간화된 면역 글로불린"은 동일한 의미를 갖는다. 비-인간화된 형태의 항체와 비교하여, 그의 인간화된 항체는 전형적으로 인간 숙주에서 면역 반응을 감소시킨다.

[0288] 본 발명에 따라 설계되고 생산된 항체는 항체의 항원 결합 또는 다른 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 일부 보존적 아미노산을 대체 할 수 있음을 이해해야한다. 다시 말해, 아미노산은 gly 및 ala; val, ile 및 leu; asp 및 glu; asn 및 gln; ser 및 thr; lys 및 arg; phe 및 tyr 의 조합으로 서로 치환 될 수 있다. 동일한 그룹에 속하지 않은 아미노산은 "실질적으로 다른" 아미노산이다.

[0289] 일부 실시예에서, 항체와 이의 표적 스팟 사이의 친화성은 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 약 10^{-12} M 이하보다 낮은 Kd (해리 상수)로 표시된다.

[0290] 항체의 중사슬 또는 경사슬의 "가변 도메인"은 상기 사슬의 N 말단의 성숙 영역이다. 모든 도메인, CDR 및 잔기 수는 서열 정렬을 통해 그리고 기존의 구조적 지식에 기초하여 정의된다. FR 및 CDR 잔기의 결정 및 넘버링은 Chothia 및 다른 것이 기술 한 것에 기초한다 (Chothia, 면역 글로불린 가변 도메인의 서열에서 구조적 결정 인자. J Mol Biol. 1998; 278, 457).

[0291] VH는 항체의 중사슬의 가변 도메인이다. VL은 κ 및 λ 이소타입을 포함 할 수 있는 항체의 경사슬의 가변 도메인이다. K-1 항체는 κ-1 이소타입을 갖는 반면, K-2 항체는 κ-2 이소 타입을 가지며, Vλ는 가변 λ 경사슬이다.

[0292] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 이들 모두는 임의의 길이의 중합된 아미노산을 말하며, 이는 암호화 또는 비-암호화 아미노산, 화학적 또는 생화학적으로 변형되거나 유도된 아미노산 및 변형 된 펩티드 골격을 갖는 폴리펩티드를 포함 할 수 있다. 상기 용어는 이종 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질; N-말단 메티오닌 잔기를 갖거나 갖지 않는 이종 및 동종 리더 서열을 갖는 융합 단백질; 면역 학적 태그를 갖는 단백질; 검출 가능한 융합 파트너를 갖는 융합 단백질, 예를 들어 형광 단백질, β-갈락토시다아제, 플루오레세인 등을 포함하는 융합 파트너로서 기능 할 수 있는 융합 단백질을 포함하지만 이에 제한되지 않는 융합 단백질을 포함한다. 예로서, 융합 파트너 아미노산 서열은 단리된 융합 단백질의 검출 및/또는 정제를 도울 수 있다. 비제한적 예는 금속-결합 (예: 폴리히스티딘) 융합 파트너, 말토오스 결합 단백질 (MBP), 단백질 A, 글루타티온 S-전달효소 (GST), 형광 단백질 서열 (예: GFP), 예컨대 myc, FLAG 및 해마글루터닌 태그와 같은 에피토프 태그를 포함한다.

[0293] 이와 관련하여, 숙련가는 단백질의 화학적 변형과 관련된 보다 광범위한 방법론에 대한 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2008)의 15장을 참조한다.

[0294] 폴리펩티드는 임의의 길이 일 수 있으며, 용어 "펩티드"는 8 내지 50 개 잔기의 길이 (예를 들어, 8 내지 20 개 잔기)의 폴리펩티드를 지칭한다.

[0295] "대응 아미노산"은 2 개 이상의 아미노산 서열이 비교 될 때 동일한 위치 (즉, 그들은 서로 상응함)의 아미노산 잔기를 지칭한다. 항체 서열의 비교 및 넘버링 방법은 Chothia (상기 참조), Kabat (상기 참조) 및 기타에 의해 상세하게 기술되어있다. 당업자에게 공지되어 있으며 (예를 들어, Kabat 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, DHHS, Washington, DC 참조) 때때로 1, 2 또는 3 개의 캡이 형성 될 수 있고/있거나 1, 2, 3 또는 4 개의 잔기 또는 최대 약 15 개의 잔기 (특히 L3 및 H3 CDR)가 항체의 하나 또는 두개의 아미노산에 삽입되어 비교를 완료 할 수 있다.

[0296] "치환 가능한 위치"는 항체의 결합 활성을 상당히 감소시키지 않으면서 상이한 아미노산으로 치환 될 수 있는 항체의 특정 위치를 지칭한다. 치환 가능한 위치를 결정하는 방법 및 이들을 치환 할 수 있는 방법은 하기에 보다 상세히 기술 될 것이다. 치환 가능한 위치는 또한 "변이 허용 위치"라고 지칭 될 수 있다.

[0297] 항원성 단백질 또는 펩티드 및/또는 임의의 단편, 변이체 또는 이의 유도체는 펩티드 단편을 생성하는 화학적 (펩티드) 합성, 재조합 DNA 기술 및 단백질 분해 분열을 포함하나 이에 제한되지 않는 당 업계에 공지된 임의의 수단에 의해 생성 될 수 있다.

[0298] 화학 합성은 고체상 및 용액상 펩티드 합성을 포함한다. 이러한 방법은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있지만, SYNTHETIC VACCINES Ed. Nicholson (Blackwell Scientific Publications)의 9 장 및 CURRENT PROTOCOLS

IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008)의 15장에 제공된 것과 같이 화학 합성 기술의 예를 참조한다. 이와 관련하여, 국제 공개 WO 99/02550 및 국제 공개 WO 97/45444도 참조된다.

- [0299] 제조합 항원성 단백질 또는 펩티드는 예를 들어 Sambrook et al., MOLECULAR CLONING에 기재된 것과 같이 표준 프로토콜을 사용하여 당업자에 의해 편리하게 제조 될 수 있다. 실험실 매뉴얼 (Cold Spring Harbor Press, 1989), 특히 섹션 16 및 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 특히 10 장 및 16 장; 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 특히 1 장, 5 장 및 6 장.
- [0300] 수컷 정자 세포의 표면 단백질은 임의의 적합한 유형의 표면 단백질 일 수 있다. 예를 들어, 표면 단백질은 DBY/DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 박스 폴리펩티드 3 ('DEAD'), 수컷 강화 항원 (MEA') 1 및 MEA 2, 성별 결정 영역 Y ('SRY') 일 수 있다. 수컷 정자 세포에 특이적인 추가 항원의 비제한적 예는 WO 2008/067651 및 US 2009/0208977에서 찾을 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.
- [0301] 항체는 표면 단백질의 임의의 적합한 부분에 결합 할 수 있고/있거나 상승될 수 있다. 적합한 서열의 예는 표 1C에 제시되어있다.

표 10

표 1C. 항원 DBY/DEAD, MEA 1, MEA 2 및 SRY에 기반하거나 또는 유래된 펩티드 서열.

항원	항원 펩타이드 서열 - 서열 식별 번호: 1-346 (연속적으로 정렬됨)	
----	--	--

MEA1	서열 식별 번호: 1: PTEGTGDWISEEPEEQTETG	
	서열 식별 번호: 2: PTEGTQDWYREEPEEQEETG	
	서열 식별 번호: 3: PHEGTGDWSNEEPEEMFETG	
	서열 식별 번호: 4: PTEGIGLWSSEEPEEYEMTG	
	서열 식별 번호: 5: PTEGRGDWSWEEPKHEQSEPG	
	서열 식별 번호: 6: FTEETGDWSSEEPRTAEETR	
	서열 식별 번호: 7: PMEGTGYHSSEEPPIEIMETG	
	서열 식별 번호: 8: PHEITGDWSWAEPPEECQEQTG	
	서열 식별 번호: 9: PQEGTGDRNVNLPEEEQEAPM	
	서열 식별 번호: 10: LQRRLLEEFEGERERLQRMADSAA	
	서열 식별 번호: 11: PDEGTGDWSSTYPEREVESTG	
	서열 식별 번호: 12: PTHGTGWISSAEPSENQAETM	
	서열 식별 번호: 13: TTIDTGAJVLEEPTELQNYNG	
	서열 식별 번호: 14: PREDGFDSCSSEETAYEQEVVTG	
	서열 식별 번호: 15: WHGYTGPWSSSLKALELVEPWR	
	서열 식별 번호: 16: PHPTTGDWGRQPILLTEELG	
	서열 식별 번호: 17: GTCGTGANYSQYRLCQVEYY	
	서열 식별 번호: 18: PSKATQTHNTEGWREEMHESC	
	서열 식별 번호: 19: FEICMGVGSCEEPETEAETYET	
	서열 식별 번호: 20: CTCAEGVWVHTPEEHQGETM	
	서열 식별 번호: 21: PNEFELDWWSAHEVEEASCRD	
	서열 식별 번호: 22: ATDLTGNWMEEAEHELQMTIM	
	서열 식별 번호: 23: CYGGGQDITIFRYIILYQEAIG	
	서열 식별 번호: 24: AMEPTGMAESMPISEVQKMD	
	서열 식별 번호: 25: FDAEFQDASETCNEIVQCEDM	
	서열 식별 번호: 26: FTCGHITGPSNEPERMQMCMG	
	서열 식별 번호: 27: ITAGPADFLHPHNAKMNEY	
	서열 식별 번호: 28: PKEKGGVVKLDNFMMNNQWENI	
	서열 식별 번호: 29: GVFTKQRQENESRRKQHQPTA	
	서열 식별 번호: 30: PKMVCMIIESERETEEMNCCHV	
	서열 식별 번호: 31: PDTGRWDWSHEGVDEYSRKIR	
	서열 식별 번호: 32: PTQGNCARSLTDLNKQSELK	
	서열 식별 번호: 33: PGAGCPPASSEEEYEGEQEEFG	
	서열 식별 번호: 34: PHEVDGQGSSCWDEEWSTEGT	
	서열 식별 번호: 35: PTAGTGDWSSEEPPEEQEETG	
	서열 식별 번호: 36: PDLINADLSTELQALAAEKTG	
	서열 식별 번호: 37: PSFGLGDINSGNPKEEVEWWA	
	서열 식별 번호: 38: PIAPLRDSSIIEDMEEYEAHG	
	서열 식별 번호: 39: PTQWIPQMEEDENMREQCKAG	
	서열 식별 번호: 40: PIELTRKCVWGSNDEWQEKPK	
	서열 식별 번호: 41: PLLGPVPWSQNEPPDEVEAFQ	
	서열 식별 번호: 42: PTKTCGDPQGIEPQMERYSTV	
	서열 식별 번호: 43: PKYKYTVWMLQEHIFVQNAMD	
	서열 식별 번호: 44: PVAMTRDWKRGDGMEMEDAEDG	
	서열 식별 번호: 45: PTFRTFDWIFEPAADYGFIE	
	서열 식별 번호: 46: PCERMGVWSSEEPEELQNEYS	
	서열 식별 번호: 47: PTRDEVMPSSSTDPEEEHWKTS	
	서열 식별 번호: 48: PTMGGGLSSEEHGWEVEKFM	
	서열 식별 번호: 49: PIECTVDMCCESPEGWQEETG	
	서열 식별 번호: 50: PTEVCGDMSLLEPKVAEETP	
	서열 식별 번호: 51: PHESDNQRSSESPEEEQRSTG	
	서열 식별 번호: 52: HVRQRDEWGRFEILDFRYIVKC	
	서열 식별 번호: 53: FVELNTEPEDEAMMLIVEMDYHM	
	서열 식별 번호: 54: QVRRVEYLCGHCEDLQRFAFSIA	
	서열 식별 번호: 55: AMRRSKEGWNEEYRVQRMKSAM	
	서열 식별 번호: 56: LARPCSWSYCWRLVRMAKCDP	

서열 식별 번호: 57: TQTILFEFSGEHHRLIRSSKMVR	
서열 식별 번호: 58: CDRRVFKEEGCEHTYQDMNRDKP	
서열 식별 번호: 59: LRLMTNLIPGMTTKLSRAAKIAA	
서열 식별 번호: 60: LMRTFEESEGERPEDQRTAMSGN	
서열 식별 번호: 61: LQRLEEFHWAVNSVQFFNDCAM	
서열 식별 번호: 62: LQRRLLEYAKCERFRLVRDDDYEA	
서열 식별 번호: 63: WHIPLSENNNGCRERLGREAVRCL	
서열 식별 번호: 64: GQRRECFCDTRLRGYCMWDSAA	
서열 식별 번호: 65: LQRHSEQTHGKQEHLKRHADDMC	
서열 식별 번호: 66: LQRFMEEHSGDRERLPSMNVSKA	
서열 식별 번호: 67: EQKSLPEQKGERARLQRMRSAG	
서열 식별 번호: 68: LQRRMEESEEREHEFLORMADSAA	
서열 식별 번호: 69: GQERLTTEREGEFERQERMHDGRA	
서열 식별 번호: 70: LARFLEETEGKEENLQRRADEIK	
서열 식별 번호: 71: LQKDREEFEKTRHRLMKMTDHWA	
서열 식별 번호: 72: LQNSPEEFAGYRQRCQRMADAAA	
서열 식별 번호: 73: LQRRLEEWNGERHRLHRMEDIMV	
서열 식별 번호: 74: WQRRRLSEFRREREETWRMAYSAA	
서열 식별 번호: 75: TQRKLEEFEGERERCSKMAVSVA	
서열 식별 번호: 76: LQRRLEDFDWSLQRLORMADSAA	
서열 식별 번호: 77: LQRRLEEFEWERHRLGMMACSGA	
서열 식별 번호: 78: LQRRLELFEGEYERLQVMALSA	
서열 식별 번호: 79: LIRRLEEFEGERERLQRPADSGA	
서열 식별 번호: 80: LQKRDEEFEGERERLQRMADTA	
서열 식별 번호: 81: LQRRLEEFEGERERLQRMATSDA	
서열 식별 번호: 82: LARRLEEFEGERERLQRMADSAA	
서열 식별 번호: 83: NELYGEEADESENAQRFQDTAH	

DBY이지만 라고도 함	DEAD	서열 식별 번호: 84: EMSSHIMTQAGVQWPDLGSLEV	
		서열 식별 번호: 85: EMESHSVRQAVQQWWDCGSLEV	
		서열 식별 번호: 86: ENESHSVTIAGEQWPDMGRLEV	
		서열 식별 번호: 87: EMESWSVPQAGVQVPFVGSLLED	
		서열 식별 번호: 88: EMETHSDLQALQQWGDHGSLEV	
		서열 식별 번호: 89: EMFSHSQTQLNTQWPDLGTHEV	
		서열 식별 번호: 90: ESESRSVTQDRRVWPFLGSLEP	
		서열 식별 번호: 91: EMASYSVVQAGVQWPSFGDNEF	
		서열 식별 번호: 92: ELESMEVITGGVQWPSPWYKLWV	
		서열 식별 번호: 93: EMESHSCMOPGHWNDRGLNPQ	
		서열 식별 번호: 94: EHFEQSVTQAGHGWSDWGSMEE	
		서열 식별 번호: 95: ESVSTAVTQAGISWPFLFEGGR	
		서열 식별 번호: 96: EMYIHSVTCNGDQRRCLGSGDQ	
		서열 식별 번호: 97: EMVSFWVRFIYVMWPVLMSCSY	
		서열 식별 번호: 98: EHEYYSVCQAGVVPWDGLREV	
		서열 식별 번호: 99: EMESTMVNCRPWQWYKLCHLEI	
		서열 식별 번호: 100: EMESHSVTQAGVQWPDLGSLEV	
		서열 식별 번호: 101: EMSCHYVKQSPNSWDDASYEV	
		서열 식별 번호: 102: EMGGHSVLLQAGVQSENLLCWLS	
		서열 식별 번호: 103: EMEHLLQRFCYCPOFLDTNSHID	
		서열 식별 번호: 104: EMDSCDVCEQGLRWKDAGSLTR	
		서열 식별 번호: 105: EFERCHVTAAGEHKCDACSLEN	
		서열 식별 번호: 106: EMCQHKVHDGCVQRCKLAHVRV	
		서열 식별 번호: 107: EFPTTIVGQAMRQIMMTQCLNP	
		서열 식별 번호: 108: EAAAVSVHC1CVKLPDRQQKCV	
		서열 식별 번호: 109: ESCKHTQNQSAWTWPSPHWGEV	
		서열 식별 번호: 110: EMNLPSMNLMCVSCLDPCSIGV	
		서열 식별 번호: 111: EMDEHSNTVALMQEFKSWIYTA	
		서열 식별 번호: 112: EMCFHCGRQTGGQMQLSQLSLEV	
		서열 식별 번호: 113: ECGYRSVTPFWEQEMNHCSLHG	
		서열 식별 번호: 114: ECISAPQMRVYQQQPAYNLEE	
		서열 식별 번호: 115: EMTSIIWMCWSWAQMCKDDMDLSV	
		서열 식별 번호: 116: ENGNCEENSKSGQQQDSWVQQLEL	
		서열 식별 번호: 117: ETYPVYLVQRQSNIEDLVQVLQ	
		서열 식별 번호: 118: EMPMSFRPTMYRVRESVYRAANK	
		서열 식별 번호: 119: EGNNPKLTFAIVQWPHESTRW	
		서열 식별 번호: 120: EMKQIQVQEFGKCWQRATSHPV	
		서열 식별 번호: 121: EKVPVMATYTGAUVMRGKGIEIV	
		서열 식별 번호: 122: ESEFHVEQEAVKKCGFVATLSV	
		서열 식별 번호: 123: NMSAAVTFSASWQTPFRAPFPFG	
		서열 식별 번호: 124: EMESHSVTQAGVQMPDLGILEV	
		서열 식별 번호: 125: YLHSCVVNQEWNQLFYLTLLY	
		서열 식별 번호: 126: TYEAHGVQTEYCRSNISQWDRD	
		서열 식별 번호: 127: LCEHKVTGDEETDASNGTCAEP	
		서열 식별 번호: 128: IMDSFSIKITDWPSPDSDEVKN	
		서열 식별 번호: 129: NQWAWFVPVSSQPSYLEYRKEV	
		서열 식별 번호: 130: EWQQYSVFSLGLWMLGVDWGLRR	
		서열 식별 번호: 131: THYQISVCDLKYPPIYDFDYNVV	
		서열 식별 번호: 132: FDWSHSGFHAGSQMVQCFLWG	
		서열 식별 번호: 133: GMLSQAHHEAYVWMKPYFNLM	
		서열 식별 번호: 134: EMVCWPRTEAIVIKYGVFSREE	
		서열 식별 번호: 135: WADCQDVTQVYVDGYDHKSIR	
		서열 식별 번호: 136: MTASQSQTPLCKQVWDLCEHKL	
		서열 식별 번호: 137: HHESWSCMPAEVMKTGLAKGAS	

서열 식별 번호: 138: IMDATCVNVGYQDHDEQMINV	
서열 식별 번호: 139: RMECHCTGEMGVRFFIGGTEE	
서열 식별 번호: 140: PTTEHTPTDTGYFKHHNASLEH	
서열 식별 번호: 141: RLQSLYATQQGYRDPWTGHEEV	
서열 식별 번호: 142: EMESQKMFDCRMQGPVVGEEV	
서열 식별 번호: 143: PGESHQSFRNYDLVRYTILQEV	
서열 식별 번호: 144: CMMNHSLSLAIILQGMRKHELDW	
서열 식별 번호: 145: EMFCQSESQACVAIPQTGCHLV	
서열 식별 번호: 146: TMHKSNNVKVSVPWCDRGSLT	
서열 식별 번호: 147: EMHCHPYGARVQYPKLYSDEV	
서열 식별 번호: 148: EMEDTWETQLPVRWHDLPDYM	
서열 식별 번호: 149: SMECHSCCQKLMMWRALRSLEA	
서열 식별 번호: 150: DMTSMMTRQAFFQWPLPGWADV	
서열 식별 번호: 151: YKEYHSVYSPTVVEPPLVSLEW	
서열 식별 번호: 152: VCTSQQVLIAVLQMSADIQLEV	
서열 식별 번호: 153: IQLSPSVTQAGFVMPDLGSREV	
서열 식별 번호: 154: EMEHHSWPLFDVQWHHLNPLEG	
서열 식별 번호: 155: DMLEHIITQADVQIPDVGSLEF	
서열 식별 번호: 156: EGLSHGFTQAIIQWPDLGSMWV	
서열 식별 번호: 157: HMESHHSVHQGVQRPRLGWEEC	
서열 식별 번호: 158: MMESHVASAGVQWKKNPTLIV	
서열 식별 번호: 159: EMESHSAQHGVQWSGNSSMGV	

MEA2	서열 식별 번호: 160: LQRHLEEFEGERERLQRMADSAA	
	서열 식별 번호: 161: LQRRLEEFEGERERLQRVADSKA	
	서열 식별 번호: 162: LDERRLEEFEGERGRLQRMADSNA	
	서열 식별 번호: 163: LQRCCEFHFGEYERLQPMADSAA	
	서열 식별 번호: 164: LERRFEFWGERVRLQRMADSAL	
	서열 식별 번호: 165: LQRRLLEMFEHGGERLQRYADFAA	
	서열 식별 번호: 166: LPRRTEEPVGERERLQRCMDSAA	
	서열 식별 번호: 167: LQKRDAGFEGERERFQRMASSAA	
	서열 식별 번호: 168: LQRRGEEQEGERERLQRVSDSSS	
	서열 식별 번호: 169: LQRRGHEFEMERRRLQRMAYHAF	
	서열 식별 번호: 170: LLNELQVFEBERFHLLQRMADSIA	
	서열 식별 번호: 171: LQGRVNENFGNRRERLDRMIRFAG	
	서열 식별 번호: 172: LQRYQEEVMNEDERVQEMEDSAH	
	서열 식별 번호: 173: LERVLEEFYTERHKAPKMAHTFA	
	서열 식별 번호: 174: LQRCLEEFEDTRCRLGHMPISDA	
	서열 식별 번호: 175: LIAHLEKFCYERTILMDMIKSAA	
	서열 식별 번호: 176: LQYCLERFRGLRERWGRSKDSYH	
	서열 식별 번호: 177: LQRTLMMFEGNRKLMMSVAMYTA	
	서열 식별 번호: 178: LCRLFKEGKGDRREVVRGAMSKQ	
	서열 식별 번호: 179: LARLLEEWEVILRLWELRTGFA	
	서열 식별 번호: 180: LFRYLKEQNAEPECGVSYTHAA	
	서열 식별 번호: 181: LQHRLAEFELYIEERQDPAKRWC	
	서열 식별 번호: 182: LPRIIAEFEGLREMAGRMANSRP	
	서열 식별 번호: 183: LTRFYHYFDGMGYRATWYQYGM	
	서열 식별 번호: 184: LERRKECTQGDRCFPYLMMAQVC	
	서열 식별 번호: 185: LRRHLTEIPGHNAECQDFKWWKW	
	서열 식별 번호: 186: LQMRLEWKHMNRNLVIPDPECA	
	서열 식별 번호: 187: LHTNCMVEEQIAEPLYAKADYNG	
	서열 식별 번호: 188: LFRSWWILDTEDEASGSVTPAMT	
	서열 식별 번호: 189: LFRMTEGGYDCPWHLARTGDSDG	
	서열 식별 번호: 190: LIRWRYPDEGMRTQAAMAFQGI	
	서열 식별 번호: 191: LNTLSVMDEVKGYNMQWEATSAA	
	서열 식별 번호: 192: QEIRLSVPEMTEVRMSRCTDMAD	
	서열 식별 번호: 193: CWRPSWECEGLHHGAVRSDDHTWT	
	서열 식별 번호: 194: KQRNGAEFEGFPEQLWRPADYVV	
	서열 식별 번호: 195: MSPLWLTELVELETTQRCSDLTRH	
	서열 식별 번호: 196: EAGRTFTYKYSLWRGYTFSDSAN	
	서열 식별 번호: 197: LQRRLEEFEGERERLQRMADSAA	
	서열 식별 번호: 198: SNGLEEPFRVRGHTRECFCIAA	
	서열 식별 번호: 199: DGCRLLDEVEGEFRKISPWKDVLA	
	서열 식별 번호: 200: LFERLAMFEHWYHDKFKAQDSDA	
	서열 식별 번호: 201: TPRRHNFYHQKERLQDNGDFMA	
	서열 식별 번호: 202: LQPLLPIWEGERMRELRYMDSEA	
	서열 식별 번호: 203: LQLNLEGFCGECPRPVRMAKSAY	
	서열 식별 번호: 204: HQRRLSFFEVRILNKHRYAHSCA	
	서열 식별 번호: 205: LSRRLTEQEGTFERSQKFFDMAQ	
	서열 식별 번호: 206: SQMRRKHF1HEREYLYRMLDSIQ	
	서열 식별 번호: 207: LQRHMEDEEDKRDQVQRMADTA	
	서열 식별 번호: 208: KYRNHEEFEGENIRYQWADHKH	
	서열 식별 번호: 209: LCRLEREEGEREEFHRMATQAI	
	서열 식별 번호: 210: YMVKLEEWHGEIRRHQPLADFAA	
	서열 식별 번호: 211: TLVGREEFEGEQGQMLQRMADSAD	
	서열 식별 번호: 212: LQRRFENFEGGRERL1RMADFAA	
	서열 식별 번호: 213: FVRFREEFEGWRERLQRMAPSAA	

서열 식별 번호: 214: LQRRVAHFEGERARLORMADSAA	
서열 식별 번호: 215: KQRRLEEFEGECEQLORIAPSAK	
서열 식별 번호: 216: LQRRLEEFEGERYALSRMAASEA	
서열 식별 번호: 217: MQRVLAEEFEGERQRLORMADSAA	
서열 식별 번호: 218: LQRILEEFEGERERLQREADSAA	
서열 식별 번호: 219: LQRRLEEFEDERERLQRMQAQSAA	
서열 식별 번호: 220: LQRRLEEFFGERERLORMADSAA	

MEA2	서열 식별 번호: 221: RKWLEEQLKQYRVKVQQERSSQ	
	서열 식별 번호: 222: RAWLEKQLQYRVKRQQERSSQ	
	서열 식별 번호: 223: RSWLEEQLKQMRAKROQQERSSQ	
	서열 식별 번호: 224: RKWSEEQLKQYRVKRQQEWSSR	
	서열 식별 번호: 225: RKALEQQLKQYRVKRQQSRSSQ	
	서열 식별 번호: 226: RKWLEEWLKSYSRKHRQQERSAQ	
	서열 식별 번호: 227: RKWSEEQLKGYYSKRQQERMSQ	
	서열 식별 번호: 228: RRFLEKELKQYRHRQQERSSR	
	서열 식별 번호: 229: RDWLETQLKQCIVKRQNQNSMQ	
	서열 식별 번호: 230: RKWLEGVLKGYLVKSQLESSSG	
	서열 식별 번호: 231: RFWLKEQLKQYRVKGTVLSRQ	
	서열 식별 번호: 232: RDWHLIELKQFRVKI0GTRSSN	
	서열 식별 번호: 233: RKWCCEEQLIQFRVFEQGSRYRQ	
	서열 식별 번호: 234: RKWLEMALKHFKMSROSEISSQ	
	서열 식별 번호: 235: RKNLEDQMKGRLRVFPGDCGSAQ	
	서열 식별 번호: 236: RKWLEEQLKQYRVKRQQERSSQ	
	서열 식별 번호: 237: RKWRDYCLKQYDFDISLERLVR	
	서열 식별 번호: 238: RKWKGMHDLSLYRVKYQGEMNSG	
	서열 식별 번호: 239: RIWLWQ1KQWFVLGHQKRSSE	
	서열 식별 번호: 240: RKIIIEEINMLYMKKRIDEHSSQ	
	서열 식별 번호: 241: RKWVEEMLRDGFVKNARWFGPD	
	서열 식별 번호: 242: RVWEALRRKGERYSAQQHSSE	
	서열 식별 번호: 243: RILAIERKGRYDDKTQQQDYFT	
	서열 식별 번호: 244: RKHRSMCLPQNRCLMGSEDIQQ	
	서열 식별 번호: 245: RHYCFEIGKQCQHKMANASCPM	
	서열 식별 번호: 246: RSDIEPHFSAYDFTDKDNCSHQ	
	서열 식별 번호: 247: RECLERFMVDYDMCDHQARSGQ	
	서열 식별 번호: 248: RKYLIEILKLFRPWAQQCRHHL	
	서열 식별 번호: 249: RIYTLDCIKQQRQFTQWGMSSQA	
	서열 식별 번호: 250: RGRDCCA1NQKHNNFNEPCSS	
	서열 식별 번호: 251: RELLEAQVNQHDYKYLQQQSFO	
	서열 식별 번호: 252: RKELRSWSAWYKPEEEQSRSCI	
	서열 식별 번호: 253: RGQQMEHLRRCLPIRQAECYDA	
	서열 식별 번호: 254: HIKCEPMPKQCMVKASMRRYSN	
	서열 식별 번호: 255: DFGVWEWGKQTPYKRQQWPLDD	
	서열 식별 번호: 256: TRWSEGQAKFWLNQIVQEWSST	
	서열 식별 번호: 257: GKWAGITGDPERVESQADFFVP	
	서열 식별 번호: 258: RKTATEGWLYPYNTKIFEERSQG	
	서열 식별 번호: 259: NKWLMMIGNYDLCEYHECNDR	
	서열 식별 번호: 260: QKWWEEYLTQEDVGRWQKASYW	
	서열 식별 번호: 261: QKWSEYQHHVYEGPRYEMFFQR	
	서열 식별 번호: 262: FFMLEVVKLETMRAGHQPEDET	
	서열 식별 번호: 263: MKVLGEEVFQYRVINGQQCSYT	
	서열 식별 번호: 264: GTWGPEQGKMYRGKFRQNASYQ	
	서열 식별 번호: 265: MKWDIAQLTKCVDHGTPCSN	
	서열 식별 번호: 266: SAWLTEQLVQYRVKGQAEKSSQ	
	서열 식별 번호: 267: LCWHEEYLKQCRVKRQICNSLP	
	서열 식별 번호: 268: RCWGEEQDKQLAVSRQDEIMQQ	
	서열 식별 번호: 269: EKQLEKETHQLSVKRQQPRLNF	
	서열 식별 번호: 270: EKKEENQLKMNP4KROPERSVR	
	서열 식별 번호: 271: HKTTEEWLKQYWVKVQQERRSQ	
	서열 식별 번호: 272: TDWFNEQLKVYREKRQQERTHQ	
	서열 식별 번호: 273: RKQAEDQLAQQYRVKRQFERSAI	
	서열 식별 번호: 274: VKFPEEQQGMYRWKRQFERSSQ	
	서열 식별 번호: 275: GKWLEEDFKITRVKRTQERSSQ	

서열 식별 번호: 276: RKWLEEQQQLYRVTRGQGRSSQ	
서열 식별 번호: 277: RKWLEEQGQGYRVERQQEWSSQ	
서열 식별 번호: 278: RKWLEEQLLWHEVKRQQERSSQ	
서열 식별 번호: 279: RKWLEEQLKSYKVKRQQERSHQ	
서열 식별 번호: 280: RKWLELQLKQYRVKRQQERYSQ	
서열 식별 번호: 281: RKWLEEQLKQYRVHRQQERSSQ	

SRY	서열 식별 번호: 282: RDQRRKMVLENPRMRNSEISKQ	
	서열 식별 번호: 283: RDQRRQMALENIRMRNSEISKQ	
	서열 식별 번호: 284: RDQRRRMALENPRMRWSNISKQ	
	서열 식별 번호: 285: RDQRRKMRLENPRMGNSEISWY	
	서열 식별 번호: 286: RDQRRKVLREPPRMRNSEISKQ	
	서열 식별 번호: 287: RDQRSKFCLECPMRNSCISKR	
	서열 식별 번호: 288: RDQRRLMAFENPRMKNHELSKA	
	서열 식별 번호: 289: RMDRIKMAKEHPQSRNSEISKQ	
	서열 식별 번호: 290: RDQRGKMTEENPCMRNFEISKW	
	서열 식별 번호: 291: RDQYRKMRLENIFRRMSEIQKI	
	서열 식별 번호: 292: RNQRRGQAPENYYMRNSDISDQ	
	서열 식별 번호: 293: RPQRSEQSLENPRMRYDEGSKW	
	서열 식별 번호: 294: RDTRKTDALEHPRMRNREGSRQ	
	서열 식별 번호: 295: RNHRRKMRLLNPRMRMSEIQGA	
	서열 식별 번호: 296: RDYRTKMSLIVPRQRYYEIWKW	
	서열 식별 번호: 297: RMKRRFCDVENMRRMRCYLISEI	
	서열 식별 번호: 298: RIMRYSGAHKNPHMWRSEYSNQ	
	서열 식별 번호: 299: RGQMRRTWCENWQTRSSRIRPQ	
	서열 식별 번호: 300: RDNNRMMALTYPPGRNKWKLDK	
	서열 식별 번호: 301: RPQHDEMLIINPIMRDSNLTKQ	
	서열 식별 번호: 302: RDKRRKMPNVNEQCQDAQISLL	
	서열 식별 번호: 303: RDQKAEQDNENPKMRMVECHGQ	
	서열 식별 번호: 304: RDEGDVKLDLCNRMMNSRKMIQ	
	서열 식별 번호: 305: RDVRMKMTRPHCRRRCGEASVV	
	서열 식별 번호: 306: RKQHYSPLLENKCARHTCQSKI	
	서열 식별 번호: 307: RLIRCLFCLEMPRIYIPEIHWL	
	서열 식별 번호: 308: RLIRCLFCLEMPRIYIPEIHWL	
	서열 식별 번호: 309: RCNWRKCNEEPPNYMHSMFGCQ	
	서열 식별 번호: 310: RDQRRKMALENPRMRNSEISKQ	
	서열 식별 번호: 311: RQCRKRWRDNNNPMACSYIRKQ	
	서열 식별 번호: 312: REQKRPVDVETDFTLRTPHKKK	
	서열 식별 번호: 313: RHQKVPDAIENPRMRWNGWDTA	
	서열 식별 번호: 314: RIFRRKVYLERNSYRGDWIWTR	
	서열 식별 번호: 315: RKQGRPMDCMYPNMHRGYHMHP	
	서열 식별 번호: 316: RYKSPMTLINRGQIRDTPCSDR	
	서열 식별 번호: 317: CRQDDIKLLHEGEMEKGRWLKH	
	서열 식별 번호: 318: RDARCWTTTHGYHHGNCEWYLK	
	서열 식별 번호: 319: DDQDRKMYTDAPINRLRKALKQ	
	서열 식별 번호: 320: CRADSWKAKEYPENRPSEIPIQ	
	서열 식별 번호: 321: RDAYRPVAVHNCMRMGMWIWAE	
	서열 식별 번호: 322: HTQRNFCFIENTQYWNLED SWT	
	서열 식별 번호: 323: HDQRRDHGVGVPVPRMERGTPAKK	
	서열 식별 번호: 324: RMFCRHVAYDLPRMRFSYISVQ	
	서열 식별 번호: 325: RDMIREQAQEKPRLRLSHRWKQ	
	서열 식별 번호: 326: YDPRINYPLEHIRMSNPEIAKE	
	서열 식별 번호: 327: EDARVNMALELARPRKSFRMSH	
	서열 식별 번호: 328: FKQRRFMAMEEPLSRLSERHSC	
	서열 식별 번호: 329: VTERRKMALKFPPDDAVQISHQ	
	서열 식별 번호: 330: RPQRRYTGEYNVRFRCEEISHA	
	서열 식별 번호: 331: TKQTFKMAVGNGTSRNEINKA	
	서열 식별 번호: 332: RDQRRVVALVKANHYASLIAKG	
	서열 식별 번호: 333: RKQKNKMAKENPRMRHSETNKP	
	서열 식별 번호: 334: RDQRQPMLWPAAMRNSRIYRQ	
	서열 식별 번호: 335: RDQQRKKALENPRHRNSAKHTK	
	서열 식별 번호: 336: NDQRRKFAWGPPRMRNEPISSE	
	서열 식별 번호: 337: RRQRRKMAWEQPRMQTSVIWRD	

서열 식별 번호: 338: SDQRMHMALENARWRNSYIWKQ
서열 식별 번호: 339: RDQGRKMCLENPRQRNPKIKKQ
서열 식별 번호: 340: RDQRMLMTLENPRMRNRAYSWQ
서열 식별 번호: 341: RDQTRAALENPRMRYSEISKY
서열 식별 번호: 342: RDQRRKNALEPPRMRHSECSKQ
서열 식별 번호: 343: RDQRRKMGLEQPRMRNSEIMKQ
서열 식별 번호: 344: RDQRRKMALENPKMSNSEISMQ
서열 식별 번호: 345: RDQRRKMALENPKMSNSEISMQ
서열 식별 번호: 346: RDQRRKMAKENPRMRNSEISKQ

- [0303] 일부 구체예에서, 표면 단백질은 DBY/DEAD이다.
- [0304] 일부 구체예에서, 항체는 DBY/DEAD에 특이적으로 결합한다.
- [0305] 일부 구체예에서, 항체는 DBY/DEAD 또는 이의 항원 부분에 대해 생성된다.
- [0306] 일부 구체예에서, 항체는 서열 식별 번호: 347, 352, 및 84 내지 159 또는 이의 일부 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대해 생성된다.
- [0307] 일부 구체예에서, 항체는 서열 식별 번호: 347, 352, 353, 354, 355 및 84 내지 159 중 어느 하나의 아미노산 서열의 에피토프에 결합한다.
- [0308] 일부 구체예에서, 항체는 서열 식별 번호: 353, 354 및 355, 그러나 바람직 하게는 353 중 어느 하나의 에피토프에 결합한다.
- [0309] 일부 구체예에서, 항체는 서열 식별 번호: 353, 354, 및 355 중 어느 하나의 에피토프에 결합하거나, 에피토프는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다.
- [0310] 일부 구체예에서, 항체는 코어 서열 EMESH (서열 식별 번호: 353에서 유래됨)를 갖는 에피토프에 결합하거나, 에피토프는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다.
- [0311] 일부 구체예에서, 항체 중사슬 가변 도메인은 CDR1 (서열 식별 번호: 363), CDR2 (서열 식별 번호: 364) 및 CDR3 (서열 식별 번호: 365)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0312] 일부 구체예에서, 항체 경사슬 가변 도메인은 CDR1 (서열 식별 번호: 360), CDR2 (서열 식별 번호: 361) 및 CDR3 (서열 식별 번호: 362)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0313] 일부 구체예에서, 항체 중사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호: 350의 아미노산 서열을 포함하거나 이의 중사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호: 350과 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열 식별 번호: 350으로 표시되는 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 유도되고, 상기 항체는 표면 단백질과 특이적으로 결합하는 활성을 갖는다.
- [0314] 일부 구체예에서, 항체 중사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호: 348의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.
- [0315] 일부 구체예에서, 항체 경사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호: 351의 아미노산 서열을 포함하거나, 이의 경사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호: 351과 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열 식별 번호: 351로 표시되는 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 유도되고, 상기 항체는 표면 단백질과 특이적으로 결합하는 활성을 갖는다.
- [0316] 일부 구체예에서, 항체 경사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호: 349의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.
- [0317] DBY/DEAD는 인간 기원이지만, 상이한 포유 동물 종에 걸쳐 고도로 보존된 단백질이기 때문에, 항체는 소 및 돼지 종을 포함하는 상이한 포유 동물 종의 DBY/DEAD에 결합 할 수 있다.
- [0318] 용어 "포유 동물"은 인간, 농장 동물, 가축, 실험실 동물, 반려 동물 및 애완 동물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 이 용어는 돼지, 소, 말, 당나귀, 돌고래, 기니피그, 햄스터, 마우스, 래트, 개 및 고양이를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 포유 동물을 돼지 또는 소이다.
- [0319] 본 발명의 제2측면에 따르면, 제1측면의 유효량의 단일 클론 항체 및 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

- [0320] 조성물은 예를 들어, 약제학적 조성물의 형태, 수의학적 용도의 조성물의 형태, 또는 연구 목적의 형태 (예를 들어, 시약 또는 연구 도구) 일 수 있다.
- [0321] 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제는 정자에 유해하거나 해롭지 않다. 허용가능한 담체, 희석제 및 부형제를 설명하는 유용한 참고 문헌은 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)이며, 이는 본원에 참조로 포함된다.
- [0322] 일부 구체예에서, 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제는 정액 증량제이다. 정액 증량제 또는 희석제는 전형적으로 포유 동물 사정액의 부피를 증가시키기 위해 사용되는 수용액이다. 정액 증량제는 전형적으로 정자 세포의 대사 유지를 위한 영양소 (예를 들어, 포도당)를 공급하고, 저온 충격 (예를 들어, BSA)에 대한 보호를 제공하고, 배지의 pH (예를 들어, 중탄산염, 트리스, 헤페스) 및 삼투압 (예를 들어, NaCl, KC1)을 유지하고, 미생물 성장 (예를 들어, 항생제)을 억제할 것이다. 정액 증량제는 시판되는 정액 증량제 (예를 들어, 미니 튜브의 안드로 스타 보어 정액 증량제 (BSE))를 포함하여 당 업계에 공지된 것들 중 임의의 것을 포함 할 수 있다. 정액 증량제는 전형적으로 정자가 유래된 특정 종에 적합하거나 호환되도록 제제화된다.
- [0323] 본 발명의 제3측면에 따르면, 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물을 포함하는 시약, 키트 또는 칩이 제공된다.
- [0324] 시약, 키트 또는 칩은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 단일 클론 항체, 상기 항체를 암호화하는 핵산, 또는 진핵 세포, 원핵 세포 및 상기 항체를 함유하는 바이러스.
- [0325] 시약, 키트 또는 칩의 다른 선택적인 성분은 항체 활성 분석 실험을 수행하기위한 제한 엔도뉴클레아제, 프라이머 및 플라스미드, 완충액 등을 포함한다. 상기 시약, 키트 또는 칩의 핵산은 비-토끼 항체 핵산과의 연결을 위해 제한 엔도뉴클레아제 부위, 다중 클론 부위, 프라이머 부위 등을 추가로 포함 할 수 있다. 상기 시약, 키트 또는 칩의 모든 성분은 별도의 용기에 개별적으로 저장 될 수 있거나, 일부 호환 가능한 성분은 필요에 따라 단일 용기에 사전 어셈블 될 수 있다.
- [0326] 본 발명의 제4측면에 따르면, 제1측면의 단일 클론 항체의 용도 또는 진단제, 시약 또는 도구로서 제2측면의 조성물이 제공된다.
- [0327] 이와 관련하여, 단일 클론 항체는 예를 들어, 방사성 동위 원소, 분석 가능한 물질을 생산할 수 있는 효소, 형광 단백질 및 비오틴에 의해 표지되고 검출될 수 있다. 또한, 단일 클론 항체는 (폴리스티렌) 플레이트 또는 비드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 고체 담체와 결합 할 수 있다.
- [0328] 본 발명의 제5측면에 따르면, 정자 함유 포유 동물 정액을 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물에 적용시켜, 항체가 정액의 수컷 정자 ("수컷 정자 세포")에 특이적으로 결합하는 단계를 포함하는, 포유동물의 정자 ('정자 세포')를 처리하는 방법이 제공된다.
- [0329] 정액을 단일 클론 항체에 적용하는 것은 "처리된 정액", "처리된 정자" 또는 "처리된 정자 세포"를 생성한다.
- [0330] 본 발명의 제6측면에 따르면, 포유 동물 정자를 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물과 접촉시켜, 항체가 수컷 정자에 특이적으로 결합하는 단계를 포함하면서, 그로부터 암컷에서 새끼의 생산 확률을 증가시키는 포유동물의 정자 ('정자 세포')를 처리하는 방법이 제공된다.
- [0331] 본 발명의 제7측면에 따르면, 정액의 정자를 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물과 접촉시켜, 항체가 정액의 수컷 정자에 특이적으로 결합하는 단계를 포함하는, 포유 동물의 정액을 성 감별하는 방법이 제공된다.
- [0332] 본 발명의 제8측면에 따르면, 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물로 처리 될 때 정액 또는 정자를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0333] 본 발명의 제9측면에 따르면, 포유 동물에 투여하는 단계를 포함하면서, 그로부터 암컷에서 새끼의 생산 확률을 증가시키는 포유 동물을 인공적으로 수정하는 방법이 제공된다:
- [0334] (i) 제1측면의 유효량의 단일 클론 항체;
 - [0335] (ii) 제2측면의 유효량의 조성물; 또는
 - [0336] (iii) 제8측면의 유효량의 조성물,

- [0337] 상기 포유 동물을 인위적으로 수정하기 위해.
- [0338] 본 발명의 제10측면에 따르면, 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물 및 수컷 정자 ("수컷 정자 세포")의 의 접합체 (conjugate)가 제공된다.
- [0339] 본 발명의 제11측면에 따르면, 제1측면의 단일 클론 항체 및 제2측면의 수컷 정자 또는 조성물 및 수컷 정자의 접합체를 포함하는 처리된 정자 또는 처리된 정액이 제공된다.
- [0340] 본 발명의 제12측면에 따르면, 수컷 정자 ("수컷 정자 세포") 선택을 위한 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물의 용도가 제공되며, 여기서 상기 수컷 정자 선택은 선택적으로 대량 정액으로 수행된다.
- [0341] 본 발명의 제13측면에 따르면, 포유 동물의 정액 또는 정자를 성 감별하기 위한 제1측면의 단일 클론 항체 또는 제2측면의 조성물의 용도가 제공된다.
- [0342] 하나 또는 복수의 암컷 대상체를 상기 처리된 정자 또는 처리된 정액과 인공적으로 수정하기 전에 단일 클론 항체 또는 조성물과 복수의 수컷 정자 세포 사이의 접합체를 형성하기에 충분한 시간 동안 정자 또는 정액은 단일 클론 항체 또는 조성물과 접촉된다. 설명의 목적으로, 5 내지 600 분의 범위가 언급되지만, 수정 전의 접촉 시간은 1, 2, 3 또는 4 분과 같이 더 짧거나, 700, 800, 900 또는 1000분과 같이 더 길 수 있다. 5 내지 600 분의 범위는 물론 6, 7, 8 분 뿐만아니라 5 내지 600 사이의 모든 1 분 중분을 포함한다.
- [0343] 정액 또는 정자는 갓 채취될 수 있거나 사전에 동결된 후 해동 될 수 있다. 바람직하게는, 정액 또는 정자는 갓 채취되었다.
- [0344] 배타적이지는 않지만, 전형적으로 정액 또는 정자는 단일 클론 항체 또는 조성물과 접촉되기 전에 세척되지 않았다.
- [0345] 상기 방법 또는 용도는 정액 샘플에서 시험관 내 또는 체내 (*in vivo*)에서 단일 클론 항체 또는 조성물 및 정자를 암컷 동물의 생식관 내로 동시에 또는 순차적으로 도입함으로써 수행 될 수 있다. 바람직하게는, 상기 방법은 정자와 단일 클론 항체 또는 조성물 사이에 하나 이상의 복수의 접합체를 형성하기에 충분한 접촉 기간을 보장하기 위해 시험관 내에서 수행된다.
- [0346] 상기 기재된 본 발명의 측면에 대한 일부 구체예에서, 단일 클론 항체 및/또는 조성물은 수컷 정자의 운동성 및/또는 활성을 감소시키거나 억제한다. 이를 달성하기위한 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다. 적합한 예는 자기 비드 분리 (magnetic bead separation), 응집, 여과 및 유동 세포 분석법을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 방법은 남아있는 암컷 정자의 운동성, 생존력 및/또는 활성을 감소시키거나 변경시키지 않는다.
- [0347] 수컷 정자 세포의 운동성 및/또는 활성을 설명하기 위해 본원에 사용된 용어 "감소" 및 "억제"는 대상체로부터 대조군 샘플 또는 추가의 생물학적 샘플과 비교할 때, 그러한 운동성 및/또는 활성의 및/또는 양 또는 수준에서의 감소를 지칭한다. 일부 구체예에서, 수컷 정자 세포의 운동성 및/또는 활성은 그의 운동성 및/또는 활성 수준이 약 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % 또는 10 % 미만이거나, 대상체로부터 대조군 샘플 또는 추가의 생물학적 샘플에서 수컷 정자 세포 운동성 및/또는 활성의 수준이 약 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, 0.1 %, 0.01 %, 0.001 % 또는 0.0001 % 미만인 경우, 수컷 정자 세포의 운동성 및/또는 활성이 감소된다.
- [0348] 정자 운동성 및/또는 활성을 결정하는 것은 당 업계에 공지된 임의의 방법 또는 이들의 조합을 포함 할 수 있다. 이러한 방법의 비제한적인 예는 광 현미경, 위상 현미경, 컴퓨터 보조 정자 분석 (예를 들어, 흡수 정자 추적기), 스윕업 방법 및 이동/침강 챔버를 포함한다. 이와 관련하여, 정자 운동성의 척도는 정량적 또는 정성적 척도가 될 수 있다.
- [0349] 상기 기재된 본 발명의 측면에 대한 일부 구체예에서, 방법 또는 용도는 처리된 정액 또는 정자로부터 항체-결합된 수컷 정자를 제거하는 단계를 포함한다. 항체-결합된 수컷 정자를 제거하기위한 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다. 적합한 예는 자기 비드 분리, 응집, 여과 및 유동 세포 분석법을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 방법은 남아있는 암컷 정자의 운동성, 생존력 및/또는 활성을 감소시키거나 변경시키지 않는다.
- [0350] 일부 실시예에서, 유동 세포 분석법, 시험관 내 수정, 정량적 PCR (qPCR) 분석, 형광 항체, 형광성 원위치 하이브리디세이션 (FISH) 및/또는 단백질 G 커버된 자기 비드는 항체-결합된 수컷 정자에 대한 처리된 정액 또는 처리된 정액에 항체-결합된 수컷 정자가 없거나 주로 없는지 여부, 또는 처리된 정액이 암컷 정자에 대해 풍부하게 되는지 여부를 확인하는 데 사용될 수 있다.

- [0351] 암컷 정자 선택 또는 정액의 성 감별은 대량으로 수행 될 수 있다. 상기 기술된 방법 또는 용도의 일부 구체예에서, 종의 유형 및 생성된 정액의 부피에는 제한이 없다. 예를 들어, 돼지, 돌고래 및 말은 250mL에서 수 리터까지 대량/높은 용량의 정액을 생산하는 반면, 개, 소 및 기타 반추 동물은 밀리리터 용량을 생산한다.
- [0352] 특정 구체예에서, 단일 클론 항체 또는 조성물은 임의로 하나 이상의 항체 또는 수컷 정자 세포를 표적으로하는 시약과 수정시키기 위해 수집된 정자 또는 정액 및/또는 암컷 동물의 생식관에 직접 첨가되는 처리 용액에 포함될 수 있다.
- [0353] 추가로, 제1측면의 단일 클론 항체는 예를 들어 코팅 수집, 저장 및 다른 인공 수정 장비에 의해 시험관 내에서 사용될 수 있다.
- [0354] 적합하게는, 정자 제조는 포유 동물의 인공 수정을 위한 생물학적으로 허용 가능한 농도 및/또는 생존력으로 복수의 정자를 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이것은 예를 들어 인공적으로 수정될 포유 동물의 연령 및/또는 종에 따라 상당히 달라질 수 있다. 이 농도는 복수의 정자의 형태 및/또는 운동성에 따라 사용자에 의해 변경 될 수 있다.
- [0355] (i)의 이러한 맥락에서, "유효량"은 상기 포유 동물의 인공 수정시 생성된 암컷에서 새끼의 생산 확률을 증가시키기 위해, 복수의 정자에 대한 원하는 약리학적, 생리학적 및/또는 치료학적 효과를 유발하기에 충분한 상기 기재된 단일 클론 항체 및/또는 조성물의 양 또는 농도를 의미한다. 따라서, 그렇게 함으로써 처리된 정자/처리된 정액의 인공 수정으로부터 암컷 새끼의 증가된 생산 가능성을 촉진하기 위해, 유효량의 실질적으로 정제된 항체 또는 조성물은 정자 내 다수의 수컷 정자 세포에서 관련 표면 단백질에 결합하고, 결합된 수컷 정자의 활성, 기능 및/또는 운동성에 대한 것과 같이, 그것에 대한 억제 효과를 부여하기에 충분한 양이다. (ii)의 이러한 맥락에서, "유효량"은 암컷 포유 동물의 인공 수정시 새끼를 생산하기에 충분한 정자 제조의 양 또는 농도를 의미한다.
- [0356] 유효량은 포유 동물의 연령, 품종, 종, 체중, 생식력 및 일반 건강 상태, 정자의 상태, 및 단일 클론 항체, 조성물 및/또는 정자 제조가 투여되는 방식과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다.
- [0357] 적합하게는, 단일 클론 항체 및/또는 조성물 및 복수의 정자가 동시에 또는 순차적으로 첨가된다. 이와 관련하여, 단일 클론 항체 및/또는 조성물은 먼저 포유 동물에게 투여되고, 이어서 복수의 정자에 투여 될 수 있다. 대안적으로, 복수의 정자는 단일 클론 항체 및/또는 조성물 전에 포유 동물에게 투여 될 수 있다.
- [0358] 적합하게는, 단일 클론 항체 및/또는 조성물 및 복수의 정자는 a) 안전하고; b) 생식력에 방해하지 않고; c) 기형 발생 영향을 유발하지 않고; d) 암컷의 건강에 해롭지 않는 양으로 암컷에 투여된다.
- [0359] 사용된 복수의 정자는 갓 채취되거나 미리 동결 된 후 해동 될 수 있는 것으로 이해 될 것이다. 바람직하게는 정자는 갓 채취된 것이다.
- [0360] 인공 수정은 정자/정액이 수컷 포유 동물로부터 수집되고 이어서 기구의 도움으로 적절한 시간에 암컷 포유 동물의 생식관에 도입되는 기술인 것으로 잘 이해된다. 본 발명의 방법과 관련하여, 단일 클론 항체 및/또는 조성물 및 정자는 당 업계에 공지된 임의의 인공 수정 방법에 의해 포유 동물에게 투여 될 수 있다. 전형적으로, 단일 클론 항체 및/또는 조성물 및 정자/정액 또는 처리된 정자/처리된 정액은 적절한 시간 (예를 들어, 암컷 포유 동물이 발정기에 있음) 및 위생적인 조건 하에 기계적인 방법에 의해 자궁 경부 및/또는 자궁에 그것의 일부를 배치함으로써 암컷 포유 동물에 수정시킨다.
- [0361] 상기 기재된 방법 또는 용도의 일부 구체예에서, 정자 세포 선택 또는 정액의 성 감별은 대량으로 수행 될 수 있다. 상기 기재된 방법 또는 용도의 일부 구체예에서, 종의 유형 및 생성된 정액의 용량에는 제한이 없다. 예를 들어, 돼지, 돌고래 및 말은 250mL에서 수 리터까지 대량/높은 용량의 정액을 생산하는 반면, 개, 소 및 기타 반추 동물은 밀리리터 용량을 생산한다. 본 발명의 일부 구체예는 두 시나리오 모두에 적용될 수 있다.
- [0362] 본 발명의 제14측면에 따르면, 제1측면의 단일 클론 항체를 포함하는 하이브리도마 세포가 제공된다.
- [0363] 본 발명의 제15측면에 따르면, 다음을 암호화하는 하나 이상의 단리되거나, 정제되거나 또는 재조합 핵산이 제공된다:
- [0364] (i) 제1측면의 단일 클론 항체의 중사를 가변 도메인;
- [0365] (ii) 제1측면의 단일 클론 항체의 경사를 가변 도메인;

- [0366] (iii) 제1측면의 단일 클론 항체의 중사를 가변 도메인의 CDR1 (서열 식별 번호: 363), CDR2 (서열 식별 번호: 364) 및 CDR3 (서열 식별 번호: 365); 및/또는
- [0367] (iv) 제1측면의 단일 클론 항체의 경사를 가변 도메인의 CDR1 (서열 식별 번호: 360), CDR2 (서열 식별 번호: 361) 및 CDR3 (서열 식별 번호: 362).
- [0368] 본 발명의 제16측면에 따르면, 서열 식별 번호 347의 아미노산 서열에 대해 상승 할 때 단일 클론 항체가 제공된다.
- [0369] 본 명세서에 기재된 임의의 특징은 본 발명의 범위 내에서 본 명세서에 기재된 다른 특징 중 임의의 하나 이상과 임의의 조합으로 조합 될 수 있다.
- [0370] 명세서 전체에 걸쳐, 본 발명을 임의의 하나의 구체예 또는 특정한 특징의 수집으로 제한하지 않고 본 발명의 바람직한 구체예를 설명하는 것이 목표였다. 그러므로, 본 개시 내용에 비추어, 특정 구체예에서 다양한 수정 및 변경이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 이해 될 것이다.
- [0371] 본 발명이 보다 쉽게 이해되고 실제적인 효과를 발휘할 수 있도록, 당업자는 다음의 비제한적인 예를 참조한다.
- [0372] **도면의 간단한 설명 3**
- [0373] 도 1C. 골격 영역 (FWR) 및 상보성 결정 영역 (CDR)을 나타내는, 단일 클론 항체 SdW1 RE5.B7.F9b ('클론 RE5' 또는 'RE5 항체'라고도 함)의 주석이 달린 VH 및 VL 아미노산 서열.
- [0374] 도 2C. 템플릿으로서 항체 mAb735 (PDB 3wbd) 및 표적으로서 RE 5 항체를 사용하여 구축된 상동관계 모델.
- [0375] 도 3C. 항체 RE5의 예측된 3D 구조. CDR 루프는 구조에서 동그라미로 표시된다.
- [0376] 도 4C. N/C 말단에 따라 색칠된 DBY 표면 단백질 (수컷 정자 세포 상)의 예측된 3D 구조. N 말단 영역은 파란색이고 C 말단 영역은 빨간색이다. 22-mer 웨티드는 백색으로 착색된다.
- [0377] 도 5C. RE5 항체의 CDR 영역 주위에 3 개의 대표적인 그룹 (벤젠, 아세테이트 이온 및 Mgua)의 MCSS 최소 분포.
- [0378] 도 6C. 가능 기 및 팔호 내 그의 해당 아미노산의 MCSS 최소 분포: BENZ (Phe), PHEN (TYR), IMIA (His), ACET (GLU/ASP) 및 MGUA (ARG).
- [0379] 도 7C. 주황색으로 색칠된 예측된 결합 웨티드를 갖는 RE5 항체 및 DBY 단백질의 복합체 구조. 항체는 흰색 표면으로 표시된다. RE5 항체를 개발하기 위해 사용 된 웨티드는 파란색으로 색칠된다.
- [0380] 도 8C. 밑줄로 표시된 단일 클론 항체 RE5에 대한 3 개의 예측된 웨티드 결합체/에피토프/도킹 부위.
- [0381] 도 9C. 단일 클론 항체의 생산, 선별 및 특징화 과정을 보여주는 흐름도. 공정은 다음 단계를 포함한다: 1. 항체를 생성하는 단계; 2. 응집, 형광 이차 항체, FISH 또는 자기 비드 기술에 의해 정액에 대한 항체의 효과를 결정하는 단계; 3. 고 생산성의 시험관 내 수정 (HT IVF) 또는 선택적 용해 및 qPCR을 사용하여 정액에 대한 항체의 효과를 테스트하는 단계; 및 4. 시퀀싱, 3-D 구조의 구축 및 에피토프의 결정의 방법에 의해 항체를 특징화하는 단계.

표 11**표 2C. 서열식별번호의 리스트**

서열 식별 번호.	간단한 설명	서열
1-346	항원 DBY / DEAD, MEA 1, MEA 2 및 SRY에 기반하거나 또는 유래된 웨티드 서열	표 1C 참조
347	항원 SdW1a (유리 웨티드)	EMESHESVTQAGVQWPDLGSLEV
348	단일 클론 항체 클론 RE5 (뉴클레오티드 서열)의 중사를 가변 영역 (VH)	GAAGTGAAGGTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGG GATCCATGAAAATCTCCTGTGTTGCCCTCTGGATTCACTTCAGAA CTACTGGATGAACTGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAAG TGGGTTGCTGAAATTAGATCGAACATCTAATAATGAAAAACATT ATGCAGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGATT TAAAAGTAGTGTGTACCTGCAAATGAACAACCTTAAGAACTGAAGAC ACTGGCATTATTACTGTACGGGGGGACCTTGAECTACTGGGGCC AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

350	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 중사슬 가변 영역 (VH)	EVKVEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFKNYWMNVRQSPEKGLE WVAEIRSKSNNNEKHYAESVKGRFTISRDDFKSSVYLQMNNLRTED TGIIYYCTGGTFTDYWGQQGTTLVSS
351	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 경사슬 (카파) 가변 영역 (VL)	DVVVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSHSLVHSDGNTYHWYLQKPG QSPKLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTHVPPYTFGG GTQLEIK
352	DBY (호모 사파엔스). NIH로부터 유전자 ID G49469의 아미노산 번역.	DBYIDKVVPAVLALVVAEAAADEVVTATAEDLVEVMLIFLLG RAFCFSFFFFEMESHSTQAGVQWPDLGSLEVTLLPQPPKGQLQV GGNMPSFFSISFNRDGVSPCWPGWSLPPDLMHTPWPPVEVLGLQAA TVPGLGSLFLRVLFFKAFIGEIFLRDTKSNSRFLLLVLCSTEKKG INELNFSLNIFLDRWLWRLLQWIWRKLLPGGLVGQLN
353	단일 클론 항체 RE5에 의해 인식되는 DBY의 실제 웨티드 결합체/ 에피토프/ 도킹 부위	SFFFFEMESH
354	단일 클론 항체에 대한, DBY의 예측된 최적의 웨티드 결합체/ 에피토프/ 도킹 부위	FSIFNRDG
355	단일 클론 항체에 대한, DBY의 예측된 최적의 웨티드 결합체/ 에피토프/ 도킹 부위	SLNIFLDRW
356	염색체 1에 특정한 포워드 프라이머	GTTGCACTTCACGGACGCAGC
357	염색체 1에 특정한 리버스 프라이머	CTAGCCCCATTGCTCGCCATAGC
358	염색체 Y에 특정한 포워드 프라이머	AATCCACCATACCTCATGGACC
359	염색체 Y에 특정한 리버스 프라이머	TTTCTCCTGTATCCTCCTGC
360	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 경사슬 가변 영역 (VH) CDR1	HSLVHSDGNTY
361	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 경사슬 가변 영역 (VH) CDR2	KVS
362	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 경사슬 가변 영역 (VH) CDR3	SQTHVPPYT
363	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 중사슬 (카파) 가변 영역 (VH) CDR1	GFTFKNYW
364	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 중사슬 (카파) 가변 영역 (VH) CDR2	IRSKSNNNEK
365	단일 클론 항체 클론 RE5 (아미노산 서열)의 중사슬 (카파) 가변 영역 (VH) CDR3	TGGTFDY
336-373	PCR 프라이머 및 프로브	표 3B 참조

[0383] 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 3

[0384] 본 발명의 바람직한 특징, 구체예 및 변형은 이 기술분야의 당업자가 본 발명을 수행하기에 충분한 정보를 제공하는 구체예의 설명으로부터 이해할 수 있다. 구체예의 설명은 어떠한 방식으로든 다음의 본 발명의 상세한 설명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0385] 항원 제조

[0386] 일부 웨티드를 주문제작 합성하고 키홀 림펫 혈모사이아닌 (Keyhole Limpet Hemocyanin) (KLH-웨티드)에 결합시켰다. KLH는 거대한 키홀 림펫 (*Megathura crenulata*)의 혈액 림프종에서 발견되는 금속 단백질이다. 단백질

은 크고 다수의 서브 유닛으로 산소를 운반하므로, 웨티드에 이상적인 담체가 된다.

[0387] 단일 클론 항체의 생산

[0388] 면역 및 혈청 역가 (titre): 2개의 로버트슨 (Robertsonian) 마우스를 2주 간격으로 3 회 피하 경로를 통해 50 µg의 항원 (서열 식별 번호: 347)과 메틸화된 CpG와 결합하여 면역 보조제 (Sigma-Aldrich cat# S6322)의 조합으로 면역화하였다. 면역화된 마우스로부터 혈청 샘플을 수집하고, 항원에 대한 반응성을 1:250 및 1:1250의 희석으로 ELISA에 의해 테스트하고, 면역화 전 (pre-immunization) 샘플과 비교하였다. 두 동물 모두 양성 역가를 나타내었고 융합을 위해 선택되었다.

[0389] 하이브리도마 융합: 하이브리도마 세포를 생성하기 위해, 마우스 비장을 절제하고, 단일 세포 혼탁액으로 분리하고 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 SP2/0-Ag14 골수종 세포에 융합시켰다. 생성된 하이브리도마 세포를 20 x 96 웰 조직 배양 플레이트에서 배지를 함유하는 아자세린 하이포잔틴에서 성장시켰다.

[0390] 스크리닝: 하이브리도마 세포를 10 일 동안 성장시켰고, 이 시점에서 양성 하이브리도마 콜로니의 수가 결정되었고, 추가 3 일의 인큐베이션 후, 항체 상청액의 부분 표본이 스크리닝을 위해 취해졌다. 상청액은 먼저 IgG-특이적 2 차 항체를 사용하는 항원 마이크로 어레이에 의해, 뒤이어 임의의 양성 항체-클론 생산을 확인하기 위한 상청액 ELISA에 의해, 항원 SdW1a (유리 웨티드 - 서열 식별 번호: 347) 및 SdW1b (KLH-웨티드)에 대한 반응성에 대해 분석하였다.

[0391] 확장 및 동결: 최고 반응 ELISA 양성 클론을 3-4 일 동안 24-웰 조직 배양 플레이트로 확장시켰고, 이 시점에서 6-웰 조직 배양 플레이트로 확장되었다. 세포를 1:5 (상청액 웰) 및 1:25 (세포 웰) 비로 배양 (seed)하였다. 세포가 80 % 융합 (confluence)에 도달하면, 세포를 채취하고 10 % DMSO에서 저온 보존하고 액체 질소에 저장하였다. 각각의 클론으로부터의 상청액도 채취하고 -20° C에서 동결시켰다.

[0392] 서브 클로닝: 서브 클로닝을 위해 선택된 ELISA- 양성 클론 중 하나인 SdW1 RE5.B7.F9b ('클론 RE5')은 2 회 순차적인 희석을 시켰다. 각각의 희석 단계 후, 세포를 4-5 일 동안 성장시키고 항원에 양성인 항체를 생성하는 단일 콜로니를 상청액 ELISA에 의해 결정하고, 상위 2 개의 클론을 추가 회차 동안 확장시켰다. 최종 단일 클론 세포주 (cell-line)는 4-5 일 동안 6-웰 세포 배양 플레이트로 확장되었고, 상청액은 추출되어 세포와 함께 동결되었다.

[0393] 아이소 타이핑: 서브 클로닝된 세포주의 상청액은 생산되는 단일 클론 항체의 이소 타입을 결정하기 위해 상업적으로 이용 가능한 분석 키트로 테스트하였다. 5 가지 항체 이소 타입 중, 가장 흔한 2 가지가 IgG 및 IgM이다. IgG mAb 중에서, 5 개의 잠재적 서브 클래스 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c 및 IgG3)가 있다. 또한, 각 mAb는 카파 (kappa) 또는 람다 (lambda) 경사슬을 가질 수 있다. 특별한 관심있고 지정된 클론 RE5의 단일 클론 항체는 이소 타입 마우스 IgG2a, 카파 (IgG2a K)를 가졌다.

[0394] 클론 항체 클론 RE5'의 시퀀싱, 이소 타입: 마우스 IgG2a, 카파

[0395] 단일 클론 항체 클론 RE5'의 중사슬 가변 영역 (VH) 및 경사슬 가변 영역 (VL)을 서열 분석하였다. 간략하게, 항체 시퀀싱은 다음 단계를 수반하였다: 세포주의 세포를 성장시켰고; 이를 세포로부터 전체 RNA를 정제하였고; 메신저 RNA는 전체 RNA로부터 추가로 정제되었고; cDNA 합성은 VH 및 VL 유전자-특이적 반응을 사용하여 수행되었고; cDNA의 dGTP-꼬리 (tailing)를 수행하였고; VH 및 VL cDNA 생성물을 PCR 증폭시켰고; PCR 생성물을 절정제하고 pCR™ 2.1에 클로닝 하였고; PCR을 사용하여 콜로니 스크리닝을 수행하였고; 관심있는 PCR 생성물 또는 플라스미드를 DNA 시퀀싱에 적용하였고; DNA 시퀀싱 결과를 분석 하였다.

[0396] 단일 클론 항체 클론 RE5의 중사슬 가변 영역 (VH)은 서열 식별 번호: 348의 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0397] 단일 클론 항체 클론 RE5의 경사슬 가변 영역 (VL)은 서열 식별 번호: 349의 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0398] 단일 클론 항체 클론 RE5의 중사슬 가변 영역 (VH)은 서열 식별 번호: 350의 폴리웨티드 서열을 갖는다.

[0399] 단일 클론 항체 클론 RE5의 경사슬 가변 영역 (VL)은 서열 식별 번호: 351의 폴리웨티드 서열을 갖는다.

[0400] 단일 클론 항체 클론 RE5의 중사슬 가변 영역 (VH)의 CRD는 서열 식별 번호: 363, 364 및 365의 폴리웨티드 서열을 갖는다.

[0401] 단일 클론 항체 클론 RE5의 경사슬 가변 영역 (VL)의 CRD는 서열 식별 번호: 360, 361 및 362의 폴리웨티드 서열을 갖는다.

[0402] 중사슬 및 경사슬 항체 가변 영역 유전자 서열의 분석은 IMGT/V-Quest 프로그램 (The International Immunogenetics Information System; http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest)을 사용하여 수행되었다. 클론 RE5의 VH 및 VL 서열과 (재배치되지 않은) 생식선 마우스 항체 유전자의 유사성이 표 3C에 제시되어 있다.

표 12

표 3C. 클론 RE5 VH 및 VL의 재배열되지 않은 생식선 마우스 항체 서열과의 유사성 (IMGT/V-Quest 프로그램 사용). N/A=적용 불가능

	V 유전자 및 대립 유전자 (nt identity)	J 유전자 및 대립 유전자 (nt identity)	D 영역 및 대립 유전자
VL (카파)	<u>Musmus</u> IGKV1-110*01 F (97.96%)	<u>Musmus</u> IGKJ2*01 F (94.74%)	N/A
VH	<u>Musmus</u> IGHV6-6*02 F (95.58%)	<u>Musmus</u> IGHJ2*01 F (91.67%)	<u>Musmus</u> IGHD3-3*01 F

[0404] 골격 영역 (FWR) 및 상보성 결정 영역 (CDR)을 나타내는 항체 RE5의 주석이 달린 VH 및 VL 아미노산 서열이 도 1C에 도시되어 있다.

[0405] 항체 RE5의 3D 구조

[0406] 항체 RE5 (표적)의 서열에 기초하여, 도 2C에 도시된 바와 같이, 템플릿으로서 항체 mAb735 (PDB 3wbd)을 사용하여 상동관계 모델을 구축하였다.

[0407] 항체 RE5의 3D 구조

[0408] 항체 RE5의 3D 구조는 도 3C에 나타낸 바와 같이, 성공적으로 구축되었다. 표적의 서열은 템플릿과 약간 상이하고, RE5 항체의 정확한 3D구조는 상이한 아미노산의 결사슬을 수동으로 구성함으로써 구축되었다는 점에 유의한다.

[0409] 항체에 대한 DBY의 결합 에피토프의 예측

[0410] RE5 VH 및 VL 영역의 서열이 규명된 후, 단백질 DBY에 대한 항체의 결합 영역이 결정되었다. 항체에 결합하는 항원의 에피토프는 (Zhang, W, Zeng, X, Zhang, L, Peng, H, Jiao, Y, Zeng, J, Treutlein, HR, (2013) “인간 단일 클론 항체 (Mab 4-5)에 의해 인식되는 새로운 분야바이러스 (SFTS virus)의 당단백질에서 에피토프의 컴퓨터를 이용한 식별”, J. Comput. Aided Mol. Des. 27:539-550)에 공개된 방법을 사용하여 측정되었다.

[0411] 간략하게, DBY의 잠재적으로 결합하는 영역/에피토프를 확인하기 위해 다음 단계가 사용되었다:

[0412] 1) RE5 단일 클론 항체 서열이 해결되었다. 서열을 사용하여, 항체의 상동 관계 모델을 구축 하였다.

[0413] 2) DBY 단백질의 3D 구조가 모델링되었다.

[0414] 3) 항체상의 작용기의 MCSS 맵핑이 수행되었다.

[0415] 4) MCSS 최저로부터 결합 웹티드 서열 패턴의 확인을 수행하고 단백질 DBY 서열에 대한 패턴을 검색하여 단백질의 항체에 대한 결합 영역을 확인하였다.

[0416] 5) DBY 단백질에 대한 항체의 도킹을 수행하였다.

[0417] 6) 수중의 항체-DBY 복합체의 분자 역학 시뮬레이션이 예측되었다.

[0418] DBY 단백질-단백질의 3D 구조

[0419] 단백질 DBY (DBY2 인간 수컷 호모 사파엔스 STS 게놈, 서열 태그된 부위; 689 bp 게놈 DNA. 성별: 수컷. 클론 _lib: 인간 수컷; 수탁: G49469.1; GI: 5114028)에 대한 이용 가능한 실험 구조가 없다. NIH (유전자 ID G49469)로부터의 뉴클레오티드 서열을 사용하여, 서열 식별 번호: 352에 나타난 바와 같이, 먼저 단백질 서열로 번역되었다.

[0420] DBY는 본질적으로 매우 보존적이다. 이의 아미노산 서열은 인간, 소 및 돼지 종을 포함한 다른 포유 동물 종 사이에서 고도로 보존된다. 결과적으로, 단일 클론 항체 RE5는 전부는 아니지만 대부분의 포유 동물 종의 DBY

에 결합 할 것으로 예상된다.

[0421] DBY의 단백질 서열에 기초하여, 단백질 구조의 모델링은 InFold algorithm (McGuffin, L.J., Shuid, A.M., Kempster, R., Maghrabi, A.H.A., Nealon J.O., Salehe, B.R., Atkins, J.D. & Roche, D.B. (2017) Accurate Template Based Modelling in CASP12 using the IntFOLD4-TS, ModFOLD6 and ReFOLD methods. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 86 Suppl 1, 335-344, doi: 10.1002/prot.25360; McGuffin, L.J., Atkins, J., Salehe, B.R., Shuid, A.N. & Roche, D.B. (2015) IntFOLD: an integrated server for modelling protein structures and functions from amino acid sequences. Nucleic Acids Research, 43, W169-73; Buenavista, M. T., Roche, D. B. & McGuffin, L. J. (2012); Improvement of 3D protein models using multiple templates guided by single-template model quality assessment. Bioinformatics, 28, 1851-1857; Zhang, W, Zeng, X, Zhang, L, Peng, H, Jiao, Y, Zeng, J, Treutlein, HR, (2013) “Computational identification of epitopes in the glycoproteins of novel bunyavirus (SFTS virus) recognized by a human monoclonal antibody (Mab 4-5)” , J. Comput. Aided Mol. Des. 27:539-550)을 이용하여 수행되었다.

[0422] 도 4C는 DBY 단백질의 생성된 3D 구조를 도시한다.

[0423] RE5 항체의 표면에서의 MCSS 최저

[0424] 도 5C는 RE5 항체의 CDR 영역 주위에 3 개의 대표적인 그룹 (벤젠, 아세테이트 이온 및 Mgua)의 MCSS 최저 분포를 나타낸다. 모든 MCSS 최저 분포가 도 6C에 추가로 도시되어있다. 아미노산 Phe의 결사슬에 해당하는 BENZ 최저는 B1에만 위치한다. 그룹 MGUA (Arg) 및 PHEN (Tyr)에 대해서도 유사한 기능이 발견되었다. 아미노산 ASP 또는 GLU의 결사슬에 상응하는 음으로 하전된 그룹 ACET의 경우, 2 개의 클러스터가 각각 B1 및 B2에서 확인되었다. 작용기 IMIA (His)에 대해서도 유사한 특징이 발견되었다. 사이트 B1과 B2 사이에 깊은 빈 부분 (cavity)이 있으며, 대부분의 MCSS 최저가 발견된다. 이 빈 부분은 항체의 상동 관계 모델링으로 인해 인공물 일 가능성이 있고 빈 공간 내부의 최저는 무시되었다.

[0425] RE5항체에 대한 DBY의 결합 웨티드

[0426] MCSS 최저에 기초하여, X-Z의 서열 패턴은 DBY 단백질의 서열을 검색하기 위해 사용되었고, 여기서 X=R,Y,F,H,D/E 및 Z=Y,D/E이다. 도 7C는 DBY 내 웨티드 결합제 (오렌지색) 및 항체와 DBY 사이의 도킹된 입체 구조에서의 위치를 나타낸다.

[0427] 단일 클론 항체 RE5에 대한 3 개의 예측된 웨티드 결합제/에피토프/도킹 부위는 도 8C내 밀출 및 서열 식별 번호 353 내지 355에 도시되어있다. 실제 결합 부위/에피토프는 SFFFEMESH (서열 식별 번호: 353)이다. 다른 2 개의 에피토프 (서열 식별 번호: 354 및 355)는 추가 항체 생성의 주요 후보이다.

[0428] 항체의 검증

[0429] 단일 클론 항체 클론이 생성된 후, 정자에 대한 항체의 효과는 응집 또는 그외부재, 형광 이차 항체 염색, FISH 및 자기 비드 분리를 결정하기 위한 위상 대비 혼미경법을 사용하여 결정되었다.

[0430] 정액에 대한 IgG의 적정.

[0431] 정제된 IgG 또는 배양 상청액을 Androstar Boar Semen Extender (BSE)로 표준 25 mg/ml로 희석하였다. 항체를 추가로 10 배 희석하고 희석 당 100 μ l 용량을 ELISA 플레이트의 웰에 첨가하였다. BSE에서 ml 당 107 세포의 밀도 (용량 당 109 세포와 동일함)로 표준 용량 (200 μ l)의 신선한 (<5일령) 수퇘지 (bore) 정액을 항체 희석 액에 첨가하고 37° C로 유지하였다. 각각의 샘플을 30 분 내지 4 시간에 걸쳐 100 X 배율에서 육안으로 확인하고 군집 (clumping)의 백분율을 측정 하였다. 정자의 군집0 (군집 없음), 1+ (<50 %), 2+ (50 %) 및 3+ (100 %)의 주관적인 점수가 개발되었다.

[0432] 형광 항체 테스트

[0433] 정자에 부착된 항체를 입증하기 위해, 형광 (Alexa Fluor 488) 염소 항-마우스 이차 항체 (Jackson Immunologicals)를 사용하여 일차 항체를 추적하였다. 일차 항체로 처리한 후, 정액을 PBS로 3X 세척하였다. 이차 항체를 1/20 희석액에 첨가하고, 37° C에서 60 분 동안 배양한 다음 3 X PBS 세척하였다. 정자는 투순 카메라와 소프트웨어 (Scope Scientific, Brisbane)를 사용하여 빛과 형광 조건에서 계산되었다. 광 조건 하에서 형광 정자의 수 대 정자의 전체 수의 비는 각각의 처리에 대한 Y-CCSP (수컷 정자) 및 X-CCSP (암컷 정자)의 %를 계산하기 위해 사용되었다. 가능한 경우, 샘플 당 전체 750 개의 정자 수가 계산되었다.

[0434] 형광성 원위치 하이브리디세이션 (FISH)

[0435] FISH는 형광 항체 결과를 확인하고, 형광 정자가 Y-염색체 운반 (수컷 정자 세포)임을 입증하기 위해 사용되었다. 이 방법은 Parilla, et al. 2003에 의해 기술된 방법의 변형이었다. 요컨대, 돼지 근육, 혈액 및 정자에서 DNA를 추출했다. 염색체 I 및 염색체 Y, 244 및 377 bp에 각각 상응하는 2 개의 생성물을 증폭시키기 위해 PCR을 사용하였다. 프라이머 서열은 표 4C 및 서열 목록에 나타난다.

표 13

표 4C. 염색체 1 및 염색체 Y에 대한 프라이밍 올리고 뉴클레오티드 서열.

표적	방향	서열
염색체 1	포워드	5'-GTTGCACTTTCACGGACCGCAGC-3' (서열 식별 번호: 356)
염색체 1	리버스	5'-CTAGCCCCATTGCTCGCCATAGC-3' (서열 식별 번호: 357)
염색체 Y	포워드	5'-AATCCACCACATACCTCATGGACC-3' (서열 식별 번호: 358)
염색체 Y	리버스	5'-TTTCTCCTGTATCCTCCTGC-3' (서열 식별 번호: 359)

[0437] PCR 반응을 위한 마스터 믹스는 0.4 μ l의 4 dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 각각 2mmol/1), 2.5 μ l (10 pmol μ l/1 stock으로부터)의 염색체 1 (one) 및 Y각각에 대한 프라이머, 50–500 ng 돼지 DNA, 5 μ l의 10X PCR 완충액 (100 mmol Tris-HCl 1/1, pH 8.3, 500 mmol KCL 1-1, 15 mmol MgCl₂ 1-10.01 % (w/v) 젤라틴) 및 0.5 μ l의 5 U Taq DNA 폴리머아제 μ l/1로 구성되었다. 반응의 총 부피는 DNase가 없는 물로 최대 50 μ l로 구성되었다. 95° C에서 5 분 동안 초기 변성 후, 다음으로 35 사이클의 변성 (denaturation) (95° C, 15 초), 결합 (annealing) (60° C, 1 분) 및 신장 (extension) (72° C, 15 초)의 3 단계 증폭을 사용하였다. 마지막으로, 연장 (elongation) 단계 (72° C, 7 분)가 사이클을 완료했다.

[0438] PCR 생성물을 풀링하고 PicoPure PCR 컬럼 (Qiagen)으로 세척하고, DNA 농도를 측정하여 낙 번역에 사용하였다. Abbot 낙 번역 키트를 사용하여 변형된 데옥시 우리딘 트리포스페이트 (dUTP)를 PCR 생성물에 통합시켰다. SpectrumGreen™ dUTP를 사용하여 염색체 1 프로브를 표시하고 SpectrumRed™ dUTP를 염색체 Y 프로브에 통합했다. 이것은 염색체 1에 대한 녹색 형광 신호 및 염색체 Y에 대한 적색 형광 신호를 제공하였다. 성분을 낙 번역을 위해 나열된 순서대로 튜브에 첨가 한 후, 효소 (마지막 성분)를 첨가하기 전에 튜브를 간단히 원심 분리하고 볼 텍싱 하였다: 17.5-x μ l 뉴클레아제-없는 물; x μ l의 1 μ g 추출된 DNA; 2.5 μ l 0.2 mM 스펙트럼 그린, 스펙트럼 오렌지 또는 스펙트럼 레드 dUTP; 5 μ l 0.1 mM dTTP; 10 μ l dNTP 믹스; 5 μ l 10X 낙 번역 완충액; 총 부피 50 μ l를 생산하는, 10 μ l 낙 번역 효소.

[0439] 샘플을 15° C에서 밤새 배양하였다. 10 분, 80° C 단계는 반응을 정지시켰다. 5 μ l Tris-EDTA (0.2mmol 1/1) 및 5 μ l FISH 하이브리디세이션 완충액으로 구성된 최종 용리 완충액으로, PicoPure PCR 컬럼 (Qiagen)을 사용하여 생성물을 다시 한번 세척하였다.

[0440] FISH의 정액 샘플을 KC1 (75mM)로 2 회 세척 한 후 Tris-EDTA (1M)로 1 회 세척 하였다. 3 μ l의 정액 혼탁액을 유리 상에 카바이드 연필로 그려진 7 mm 직경 원의 깨끗한 유리 슬라이드 상에 펼쳤다. 슬라이드를 공기 건조시키고 얼음처럼 차가운 메탄올:빙초산 (3:1)에 고정시켰다. 하이브리디세이션 전에 슬라이드를 2X 식염수-구연산 나트륨 (SSC) 완충액에 담가 과량의 고정액을 제거하고, 이를 일련의 에탄올 용기 (70 %, 80 % 및 100 %)에 통과시켜 탈수시키고 공기 건조시켰다. 슬라이드를 1M NaOH 용액으로 3 분 동안 침수시키고, 2X SSC로 세척하고, 탈수시키고 공기 건조시켰다. 각 원에 2 μ l의 하이브리디세이션 완충액 (Vysis, Abbott)을 떨어뜨려, 유리 커버 슬립으로 덮고 5 분 동안 75° C에서 배양함으로써 변성을 수행하였다.

[0441] 프로브 혼합물은 동일한 양의 녹색 (염색체 1), 적색 (염색체 Y) 및 하이브리디세이션 완충액으로 구성되었다. 이를 75° C에서 5 분 동안 변성시켰다. 유리 슬라이드를 2X 식염수-구연산 나트륨 (SSC) 완충액에 담가 다시 세척하고, 이를 일련의 에탄올 용기 (70 %, 80 % 및 100 %)에 통과시켜 탈수시키고 공기 건조시켰다. 변성된 프로브 믹스를 첨가하고 (샘플 당 1.2 μ l), 유리 슬립으로 덮고, 가장자리를 고무 시멘트로 밀봉하여 건조를 방지했다. 슬라이드를 다시 한번 5 분 동안 75° C로 가열 한 후, 37° C에서 밤새 어두운 습한 용기에서 배양하였다. 하이브리디세이션 후, 슬라이드를 75° C에서 0.4 x SSC + 0.1 % NP-40 용액에서 2 분 동안 세척 한 후, 2 x SSC + (0.3 % NP-40)에서 실온 세척 하였다. 에탄올 계열을 통한 탈수 및 공기 건조로 반응이 완료되었다. 슬라이드를 5 μ l의 4', 6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI) 안티 페이드 용액 (Vysis)으로 대조 염색하고, 3 개의 필터를 갖는 형광 현미경하에 검사하였다. (큐브에 장착된 DAPI, FITC 및 Texas Red에 최적화된 밝은 전

체 다중 대역 필터 세트). 모든 세포는 염색체 1의 존재를 나타내는 녹색 시그니처를 함유하였다. 이것은 양성 대조군으로 사용되었다. 추가의 적색 (염색체 Y의 경우) 신호를 함유하는 세포를 Y-CCSP (수컷 정자 세포)로 간주하였다. 녹색 신호만을 함유하는 세포는 X-CCSP (암컷 정자 세포)로 간주하였다.

[0442] 정액 샘플을 항체와 혼합하고 수컷을 침전시켰다. 덩어리진 군집 정자가 바닥으로 가라 앉을 때, 상부 자유-스위밍 (swimming) 정자는 회복되어 개별 정자의 성별을 결정했다. 각 샘플에 대해 평균 750 개의 세포를 계수하였다.

[0443] 항체의 특이성을 평가하기 위한 자기 비드의 사용

[0444] 단백질 G 자기 비드는 항체의 소규모 분리 및 정제를 위한 친화성 매트릭스이다. 안티-말 또는 마우스 형광 항체에 의해 검출된 바와 같이, 우리의 항체가 정자의 50 %에 부착 된 것을 알았다. 이 연구의 목적은 자기 비드의 도움으로 부착된 항체로 정자를 분리하고 수컷에 대한 다른 단일 클론 항체 클론의 특이성을 결정하기 위해 정자를 성 구별하는 것이었다. 자기 비드에 보유된 항체 처리된 정자에 대해 FISH를 수행하여, 자기 비드에 의해 암컷보다 많은 수컷이 제거되었는지를 결정하였다.

[0445] 절차는 다음 단계를 수반하였다:

1. 2 마리의 수퇘지 (bore)로부터 신선한 정액을 수집하는 단계.

2. 첨가될 항체의 용량을 계산하고 결정하는 단계.

3. 2 ml의 정액에 항체를 첨가하고, 37° C에서 1 시간 동안 배양하는 단계.

4. PBS로 정액을 3 회 세척하여 부착되지 않은 항체를 제거하는 단계.

5. 50 μl의 비드 혼탁액을 500 μl의 결합 완충제와 혼합. 볼텍싱, 자기 비드 적용, 상청액 제거 및 이 절차를 다시 반복하는 단계.

6. 세척된 정액 50 μl에 160 μl 결합 완충제를 첨가하는 단계.

7. 4° C에서 30 분 동안 혼합 및 유지하는 단계.

8. 상청액을 제거하기 위해 자석을 적용하는 단계.

9. 500 μl의 결합 완충제를 첨가하고, 잘 혼합하고, 상청액을 제거하는 단계; 이 절차를 두 번 반복하는 단계.

10. FISH 분석에서와 같이 샘플의 절반을 저장하는 단계.

[0456] 11. 나머지 샘플: 다음과 같이 항체/정액 결합을 끊음으로써 정액을 벗겨냄: 번호 11로부터 비드 펠릿에, 100 μl의 용리 완충제를 첨가하고, 볼텍싱하고, 4° C에서 5 분 동안 배양함. 자석을 적용하고, 정자를 새 튜브로 옮기고, 이 절차를 반복하고, 용출된 정액을 모으는 단계. 다음날 아침 수집된 정액에 FISH를 계속하면서 40 μl의 1M Tris-HCl (pH 9)을 첨가하는 단계.

[0457] 클론 RE5에 대한 정액의 처리 후 성비의 왜곡에 대한 항체의 효과를 평가하기 위한 HT IVF의 사용

[0458] 총 828 개의 난모세포가 수정되었다 (n 대조군 = 376 및 n 처리 = 452). 배아를 용해시키고 각각의 성별을 결정하였다.

[0459] 정액에 첨가될 항체의 용량의 계산

[0460] 정액의 용량 당 정자 및 항체의 정확한 비율을 결정하기 위한 공식이 개발되었다. 공여자 동물의 모든 단일 사정액은 운동성, 생존력 및 부피 당 총 정자 수와 관련하여 상이하므로, Y 정자의 응집을 최적화하기 위해 용량 당 부피를 표준화하는 방법을 개발해야했다.

[0461] 최적의 항체 대 정자 비율은 하기 식을 사용하여 확립되었다: 용량 당 정자의 총 수를 1 또는 0.1, 또는 0.09, 또는 0.08 또는 0.075 또는 0.06 또는 0.05 또는 0.045 또는 0.03 또는 0.025 또는 0.015 또는 0.01의 인자로 나누어 용량 당 항체의 mg을 제공하였다. 이어서 이것은 용량 당 밀리 리터당 부피로 바뀌었다. 필요한 부피는 22° C 또는 23° C 또는 25° C 또는 27° C 또는 30° C 또는 32° C 또는 33° C 또는 35° C 또는 37° C 또는 38.5° C 또는 39° C에서 정자에 첨가되었다. 정액을 이 온도에서 5 내지 240 분 동안 유지 한 후, 천천히 실온으로 냉각시키고, 여과하고, 포장하고, 15° C 내지 17° C에서 농장으로 (수정을 위해) 보냈다.

[0462] 전술한 점을 고려하여, 본 발명이 실제로 어떻게 수행 될 수 있는지의 예는 다음과 같다는 것이 이해 될

것이다:

[0463] 암퇘지 (sow)에서의 시험

[0464] 50%의 정자를 군집화 하기 위한 정액 대 항체의 비율은 암퇘지 (sow)를 수정하기 위해 사용되었다. 용량 당 상이한 수의 총 정액 (1 X 109, 2 X 109, 3 X 109 및 4 X 109)을 시험하였다. 수퇘지 (boar) 정액을 수집하여 즉시 예열된 (22° C 또는 23° C 또는 25° C 또는 27° C 또는 30° C 또는 32° C 또는 33° C 또는 35° C 또는 37° C 또는 38.5° C 또는 39° C) Androstar Boar Semen Extender와 혼합하였다. 정액을 Androstar Boar Semen Extender에 미리 희석된 항체와 추가로 혼합하고, 모두 22° C 또는 23° C 또는 25° C 또는 27° C 또는 30° C 또는 32° C 또는 33° C 또는 35° C 또는 37° C 또는 38.5° C 또는 39° C로 유지하였다. 항체 및 정액은 22° C 또는 23° C 또는 25° C 또는 27° C 또는 30° C 또는 32° C 또는 33° C 또는 35° C 또는 37° C 또는 38.5° C 또는 39° C에서 5 내지 240 분 동안 반응하도록 두었다. 정액을 80 ml 용량으로 나누고 실온에서 두고 22° C 또는 23° C 또는 25° C 또는 27° C 또는 30° C 또는 32° C 또는 33° C 또는 35° C 또는 37° C 또는 38.5° C 또는 39° C에서 천천히 냉각하도록 두었다. 샘플은 15° C에서 농장으로 운송되었고, 여기서 암퇘지 당 2 회 용량이 투여되었다. 정액 샘플은 수집 5 일 이내에 사용되었다.

[0465] 자기 비드

[0466] (단일 클론 항체의) 상이한 클론은 자기 비드에 대해 상이한 친화도를 가졌다. 시험된 클론에 따라, 비드 상에 보유된 샘플의 74.5 % 내지 30.5 %가 수컷이었다. 정자의 성별은 FISH를 사용하여 결정되었다. 13 개의 클론에 대한 결과가 표 5C에 나타난다.

표 14

표 5C. 각각의 클론으로부터의 항체로 2 개의 상이한 수퇘지 정액 샘플을

처리한 후 자기 비드에 의해 포획된 남성 정자의 백분율.

Sample no	% Males in retention sample (MAG BEADS)			
	Sensitivity			
	Mab	Boar1	Boar 2	Average
RF6		72	77	74.5
RF3		72	68	70
RC6		72	66	69
RF4		67	68	67.5
RE6		67	68	67.5
RE5		65	66	65.5
RB2		67	61	64
RC5		67	60	63.5
RG3		60	65	62.5
RA6		58	63	60.5
RA1		59	59	59
RF2		54	57	55.5
RE3		23	38	30.5

[0467]

[0468] 형광성 원위치 하이브리디세이션

[0469] 각 정자의 성별은 FISH에 의해 결정되었다. 수컷은 적색 (Y 염색체)과 녹색 (염색체 1) 마커가 있다. 암컷은 Y 염색체가 없는 녹색 마커만 있다. 군집, 형광성 정자는 대부분 수컷 정자 (녹색 + 적색 신호)를 나타낸다. 정액을 다양한 항체로 처리한 후 상청액에서 암컷의 백분율을 표 6C에 도시하였다.

표 15

표 6C. 정액을 상이한 클론으로부터 유래된 항체로 처리한 후 상청액에서 암컷의 백분율. 각 정자의 성별 결정은 FISH에 의해 이루어졌다.

항체 클론	% 암컷
RB2	66
RF4	63
RE5	63
RE6	58
RC5	56
RA6	54
RF6	53.3
RE3	52
RG3	52
RF2	52
RF3	46
RA1	45
RC6	39

[0471] 고 생산성의 시험관 내 수정

[0472] 25개의 군의 난모세포에 대한 대조군의 암컷 정자의 백분율 대 처리된 군의 암컷 정자의 백분율은 표 7C에 제시되어 있다 (n 전체 = 828, n 대조군 = 376 및 n 처리 = 452). 처리를 위한 암컷의 평균 백분율은 대조군 45 %에 대해 71 %였다. 대조군으로부터의 평균 이동은 25 %였다. 처리를 위한 95 % CI는 0.64–0.78이었고 대조군은 0.17–32였다.

표 16

표 7C. 처리시 IVF로 생성된 암컷 배아의 백분율 대 난모세포의 25 개 그룹에 대한 대조군에서 암컷의 백분율.

처리 난모세포는 수정 전에 항체가 첨가된 정액으로 수정되었다. 대조군은 수정 전에 PBS를 첨가하였다. 백분율 이동은 대조군과 처리군 사이 암컷에 대한 백분율 점 증가를 나타낸다.

처리군 번호	처리군에서 % 암컷	대조군에서 % 암컷	대조군으로부터 % 이동
1	25	13	12
2	40	13	27
3	50	17	33
4	52	14	38
5	67	67	0
6	73	67	6
7	77	44	33
8	50	17	33
9	78	58	20
10	80	80	0
11	82	40	42
12	86	25	61
13	90	75	15
14	100	94	6
15	100	94	6
16	72	54	18
17	22	0	22
18	54	7	47
19	78	25	53
21	77	20	57
22	59	45	14
23	72	54	18
24	91	91	0
25	87	43	44

[0474] 표제 4

[0475] 성 선택을 포함하는 물질 및 방법

[0476] 기술분야 4

[0477] 본 발명은 무엇보다도 이전 섹션 (섹션 1 내지 3의 발명)에 기술된, 정액 성 감별, 성별 선택, HT-IVF에 대한, 생성된 새끼를 유전적으로 특징화, 및/또는 원하는 새끼를 획득하는 가능성 증가를 서로 조합하여 포함하는, 물질 및 방법에 관한 것이다.

[0478] 배경기술 4

[0479] 과거의 정액 성 감별에 대한 면역학적 접근법의 비판 중 하나는 "비-일관성"이다. 실제로, 정액 성 감별, 성 선택, HT-IVF, 생성된 새끼의 유전자 특징화 및/또는 원하는 새끼를 획득하는 가능성 증가에 대한 공지된 기술에는 많은 문제점이 있었다.

[0480] 발명의 구체적인 내용 4

[0481] 본 발명자들은 상기 기술된 하나 이상의 문제점을 최소화하기 위한 물질 및 방법을 개발하였다.

[0482] 본 발명의 제 1 측면에 따르면, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:

[0483] 1. 임의적으로 정자를 처리 단계에 적용시키는 단계;

[0484] 2. 단계 1의 정자를 성 선택 단계에 적용하여 관심 있는 암컷 또는 수컷 정자를 선택하는 단계;

[0485] 3. 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 생성하기 위해 단계 2의 관심 있는 정자를 사용하여 수정 단계를 수행하는 단계;

[0486] 4. 정자의 존재하에 단계 3의 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시켜 적어도 하나의 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 세포 물질을 선택적으로 방출시키는 단계;

[0487] 5. 적어도 하나의 다운 스트림 적용에서 방출된 세포 물질을 사용하는 단계.

[0488] 정자는 임의의 적합한 정제, 반 정제 또는 정제되지 않은 형태일 수 있다. 예를 들어, 정자는 정액 내에 있거나 정액으로부터 부분적으로 또는 완전히 분리될 수 있다. 정자 또는 정액은 예를 들어, 정액 증량제와 혼합될 수 있다. 정자는 본 특허 명세서의 다른 섹션에 기재된 바와 같을 수 있다.

[0489] 단계 1은, 예를 들어, 처리 단계에 구체적으로 적용되는지 여부에 관계없이 정자를 이용하는 단계를 포함 할 수 있다. 단계 1은 정자가 전혀 처리될 필요가 없다는 점에서 임의적이다. 일부 구체예에서, 단계 1의 미처리된 정자로부터 유래된 방출된 세포 물질은 예를 들어, 유전적 변화가 확인되는 적어도 하나의 다운스트림 적용을 사용하여 특성화된다.

[0490] 임의의 적합한 처리 단계 또는 처리 단계의 조합이 단계 1에서 사용될 수 있다.

[0491] 일부 구체예에서, 처리는 정자에 유동 세포 분석법, 냉각, 동결, 장기간 저장 등과 같은 실험 기술을 적용하는 것을 포함 할 수 있다. 즉, 이러한 처리를 받는 정자는 유전적으로 또는 다른 방식으로 변화 할 수 있으며, 이러한 변화는 다운 스트림 적용을 사용하여 확인되거나 특성화 될 수 있다.

[0492] 일부 구체예에서, 처리는 사실상 화학적이든 비-화학적이든 상관없이 정자에 돌연변이 유발 요인 또는 의심되는 돌연변이 유발 요인을 적용시키는 것을 포함 할 수 있다. 일부 구체예에서, 돌연변이 유발 요인 또는 잠재적 돌연변이 유발 요인은 예컨대 자외선 차단제, 세정제, 활석 등 화학 물질 또는 돌연변이 유발 효과 또는 돌연변이 유발 효과가 의심되는 임의의 다른 화학 물질 일 수 있다.

[0493] 일부 구체예에서, 처리 단계는 크리스퍼 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats gene editing), SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer), 탈렌 (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) 또는 다른 재조합 기술로 정자를 조작하는 단계 또는 정자를 생물학적 분자, 특히 결합 분자, 예컨대 항체에 적용하는 단계를 포함할 수 있다.

[0494] 일부 구체예에서, 처리 단계는 정자를 자외복사, 전자파 또는 열과 같은 하나 이상의 형태의 방사선에 노출시키는 것을 포함 할 수 있다.

[0495] 처리 단계는 본 특허 명세서의 임의의 다른 섹션에 기재된 바와 같을 수 있음을 이해해야한다.

- [0496] 상기 방법은 단계 3의 하나 이상의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 치료 단계에 적용하는 단계를 임의로 포함한다. 처리 단계는 단계 1에 대해 기술 된 바와 같거나 단계 1에 대해 기술된 것과 상이 할 수 있다.
- [0497] 단계 2의 성 선택 단계는 임의의 적절한 방식으로 수행 될 수 있다. 일부 구체예에서, 정자-특이적 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 특허 명세서의 다른 섹션에 기재된 바와 같은 항체가 성 선택에 사용될 수 있다. 마찬가지로, 본 특허 명세서의 다른 섹션에 기술 된 성 선택 방법이 사용될 수 있다.
- [0498] 단계 2는 수컷 정자 또는 암컷 정자를 선택하기 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는 수컷 특이적 항체는 본 특허 명세서의 다른 섹션에 기술 된 바와 같이 수컷 정자 세포에 결합하고 이를 비활성화시키기 위해 사용된다.
- [0499] 수정 단계 3은 임의의 적절한 방식으로 수행 될 수 있다. 바람직하게, 단계 3은 본 특허 명세서의 다른 섹션에 기술 된 바와 같이 HT-IVF를 사용하여 수행된다. 이 단계는 필요한 경우 본 특허 명세서의 다른 섹션에 기재된 바와 같이 수정된 세포를 배양하는 것을 포함한다.
- [0500] 적어도 하나의 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 세포 물질을 선택적으로 방출시키기 위하여, 정자 존재 하 단계 4에서 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시키는 것은 임의의 적절한 방식으로 수행 될 수 있다. 바람직하게는 단계 4는 본 특허 명세서의 다른 섹션에 기술 된 바와 같이 용해 완충제 및 방법을 사용하여 수행된다.
- [0501] 본 명세서의 다른 곳에서 언급 된 바와 같이, "세포 물질"은 바람직하게는 용해없이 방출되지 않은 실질적으로 세포 내 물질이다. 용어 "세포 물질"은 또한 막 결합된 상태로 남아있을 물질을 포함한다.
- [0502] 본 명세서의 다른 곳에서 언급 된 바와 같이, "세포 물질"은 그 범위 내에 유전 물질 (핵산, 폴리 뉴클레오티드 및 보다 구체적으로 계놈, 유전자, 유전자 전사체, 유전자 산물 및 RNA를 포함하는 이의 모든 형태), 단백질성 물질 (폴리펩타이드, 단백질, 펩티드 및 아미노산을 포함하는 이의 모든 형태), 지질 물질 (지방 및 지질을 포함하는 이의 모든 형태) 및 탄수화물 물질 (이의 모든 형태)을 포함한다. 본 명세서의 다른 곳에서 언급 된 바와 같이, "세포 물질"은 그 범위 내에 세포 시스템의 모든 구성 요소 또는 구조를 포함한다.
- [0503] 단계 5에서, 임의의 적합한 다운 스트림 적용이 사용될 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 언급 된 바와 같이, 다운 스트림 적용은 임의의 및 모든 문자-기반 방법 및 절차를 포함한다. 이러한 방법 및 절차는 선택적 특성화, 변형, 단리 또는 증폭 등에 대해 정량적, 정성적일 수 있다. 다운 스트림 적용은 스크리닝 테스트 또는 진단 테스트일 수 있으며, 난모세포, 배아세포 (blastocyte)/배반포 (blastocyst), 난자, 배아 세포, 배아 또는 정자의 세포 물질에 대한 변화를 식별하거나 확인 할 수 있다.
- [0504] 다운스트림 적용은 세포 물질이 단백질-기반 효소 또는 RNA 기반 효소와 같은 적어도 하나의 외인성으로 첨가된 효소의 작용을 받는 것을 포함 할 수 있다
- [0505] 다운 스트림 적용은, 예를 들어 유전자 (유전체학 및 후성 유전학), 전사체 (전사체학), 단백질 (단백질학), 대사 산물 (대사체학), 지질 (지질체학) 또는 상호 작용 (상호작용체학)의 연구를 위한 것일 수 있다.
- [0506] 세포 물질에 대한 잠재적 다운스트림 적용은 Wangs and Bodovitz, Trends Biotechnol, 2010 June; 28 (6): 281-290에 기술되어있고, 이의 전체 내용은 본원에 상호 참조에 포함된다. 다른 잠재적 다운스트림 적용은 이 명세서의 다른 곳에 설명되어 있다.
- [0507] 본 발명의 제2측면에 따르면, 다음 단계를 포함하는, 유전적 변화의 특징화 방법이 제공된다:
1. 임의적으로 정자를 처리 단계에 적용시키는 단계;
 2. 단계 1의 정자에 성 선택 단계를 적용하여 관심 있는 암컷 또는 수컷 정자를 선택하는 단계;
 3. 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 생성하기 위해 단계 2의 관심 정자를 사용하여 수정 단계를 수행하는 단계;
 4. 정자의 존재하에 단계 3의 적어도 하나의 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아를 선택적으로 용해시켜 적어도 하나의 용해된 난모세포, 배반포, 난자, 배아 세포 또는 배아로부터 세포 유전적 물질을 선택적으로 방출시키는 단계; 및
 5. 유전자 변화를 특징화 하기 위해 방출된 세포 유전적 물질과 관련하여 적어도 하나의 다운 스트림 적용을 사용하는 단계.

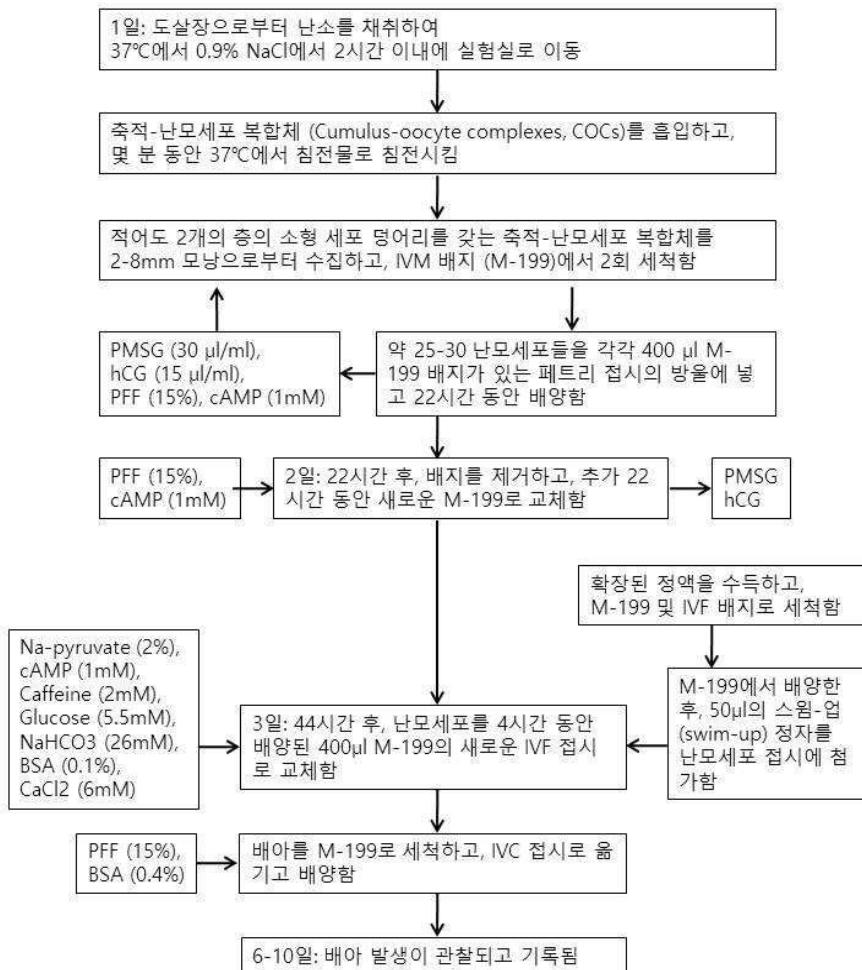
- [0513] 본 발명의 제1측면에 대해 언급 된 바와 같이, 제2측면의 특징은 본 특허 명세서의 임의의 다른 부분으로부터 수집 될 수 있다.
- [0514] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 방법은 MEA 1, MEA 2, SRY, DBY/DEAD 및/또는 TSPY가 그의 Y-염색체 정자에 의해 선택적으로 또는 구체적으로 발현 될 수 있는 임의의 인간 또는 비-인간 동물 또는 포유 동물에 적용 가능 할 수 있다. 특정 구체예에서, 용어 "포유 동물"은 돼지, 소, 말, 당나귀, 개 및 고양이를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 포유 동물의 좋은 돼지 또는 소이다.
- [0515] 상기 기재된 방법 또는 용도의 일부 구체예에서, 정자 세포 선택 또는 정액의 성 감별은 대량으로 수행 될 수 있다.
- [0516] 상기 기술된 방법 또는 용도의 일부 구체예에서, 종의 유형 및 생성된 정액의 용량은 제한이 없다. 예를 들어, 돼지, 돌고래 및 말은 250mL에서 수 리터까지 대량/높은 용량의 정액을 생산하는 반면, 개, 소 및 기타 반추 동물은 밀리리터 용량을 생산한다.
- [0517] 본 발명의 일부 바람직한 구체예는 본 명세서의 part 2의 도 4B에 도시되어있다.
- [0518] 일부 구체예에서, 본 방법은 아래에 요약된 바와 같이, 고 생산성 시험관 내 수정 (HT-IVF)에 사용될 수 있다:
- [0519] 돼지 (또는 다른) 난소로부터 난모세포를 처리하여 (IVP와 관련하여 본 명세서의 다른 섹션에 기술 된 바와 같아) 새로 개발된 배지에서 성숙을 향상시킨다.
- [0520] 신선하고 확장된 돼지 (또는 다른) 정액으로 수정한다.
- [0521] 8-16 개의 세포로 성장하여 → 70 %의 난모세포가 성숙하고 새로운 절차, 산업 표준 약 40 %에서 성장한다.
- [0522] 난모세포 및 잔류 정액은 신규한 용해 용액으로 다르게 용해되어, 정자에는 영향을 주지 않고 난모세포 DNA를 추출 할 수 있다.
- [0523] REPLI g 키트 SC 폴리머라아제 (Qiagen)에 의해 qPCR을 사용하여 난모세포 DNA를 증폭시킨다.
- [0524] 실시간 PCR (qPCR)에 의해 유전자형 특성의 범위를 검출하기 위해 DNA를 희석시킨다.
- [0525] 유전자 산물의 변화 또는 부재는 다음에 의해 정자 및/또는 난모세포의 처리에 의해 야기될 수 있다:
- [0526] 크리스퍼 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats gene editing);
- [0527] SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer) (Rodrigues 2013); 탈렌 (Transcription Activator-Like Effector Nucleases);
- [0528] 정자상의 도킹 부위를 차단하는 항체; 난모세포 상의 도킹 부위를 차단하는 항체;
- [0529] 자외선 차단제, 세정제, 활석 등과 같은 임의의 화학 물질; 또는
- [0530] 돌연변이 유발 효과를 가질 수 있는 화학 물질
- [0531] 용도:
- [0532] 유전자형을 변화시키는 시험 요법 또는 처리의 능력을 결정;
- [0533] 유전자 도입 동물;
- [0534] 시험관 내 수정; 또는
- [0535] 배아의 성 감별.
- [0536] 본 명세서 전체에서 '일 구체예' 또는 '구체예'에 대한 언급은 구체예와 관련하여 설명된 특정한 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구체예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체의 여러 곳에서 '일 구체예에서' 또는 '구체예에서'라는 문구가 모두 동일한 구체예를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정한 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 조합으로 임의의 적합한 방식으로 조합 될 수 있다.
- [0537] 법령에 따라, 본 발명은 구조적 또는 방법적 특징에 다소 특정한 언어로 설명되었다. 본 명세서에 설명된 수단이 본 발명을 적용하는 바람직한 형태를 포함하기 때문에 본 발명은 도시되거나 설명된 특정한 특징에 제한되지 않는다는 것이 이해되어야한다. 따라서, 본 발명은 당업자에 의해 적절하게 해석되는 첨부된 청구 범위의 적절

한 범위 내에서 임의의 형태 또는 변형으로 청구된다.

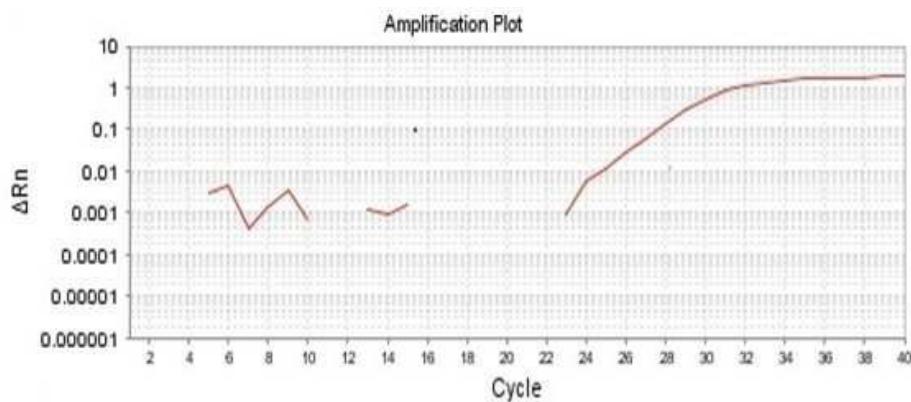
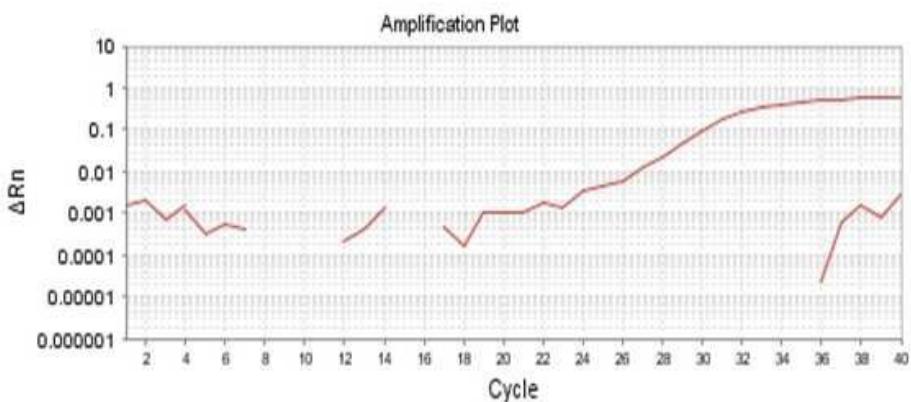
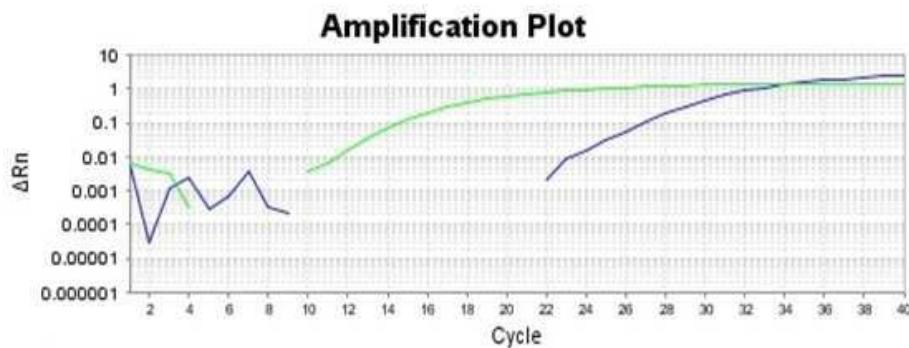
- [0538] 선행 기술 간행물이 본 명세서에서 언급되는 경우, 이 참조 문헌이 간행물이 호주 또는 다른 국가에서 당 업계의 일반적인 지식의 일부를 형성한다는 것을 인정하는 것은 아님을 이해할 것이다.
- [0539] 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본원에서 사용된 용어 "포함하다" 및 "포함하는", "포함하는" 및 "포함된"과 같은 용어의 변형은 추가의 요소, 성분, 정수를 배제하도록 의도되지 않거나, 단계를 포함하지만 하나 이상의 명시되지 않은 추가 요소, 구성 요소, 정수 또는 단계를 포함 할 수 있다.
- [0540] 본 명세서의 섹션 1 내지 4로부터 본 발명의 바람직한 구체예는 아래의 청구 범위에서 정의된다.

도면

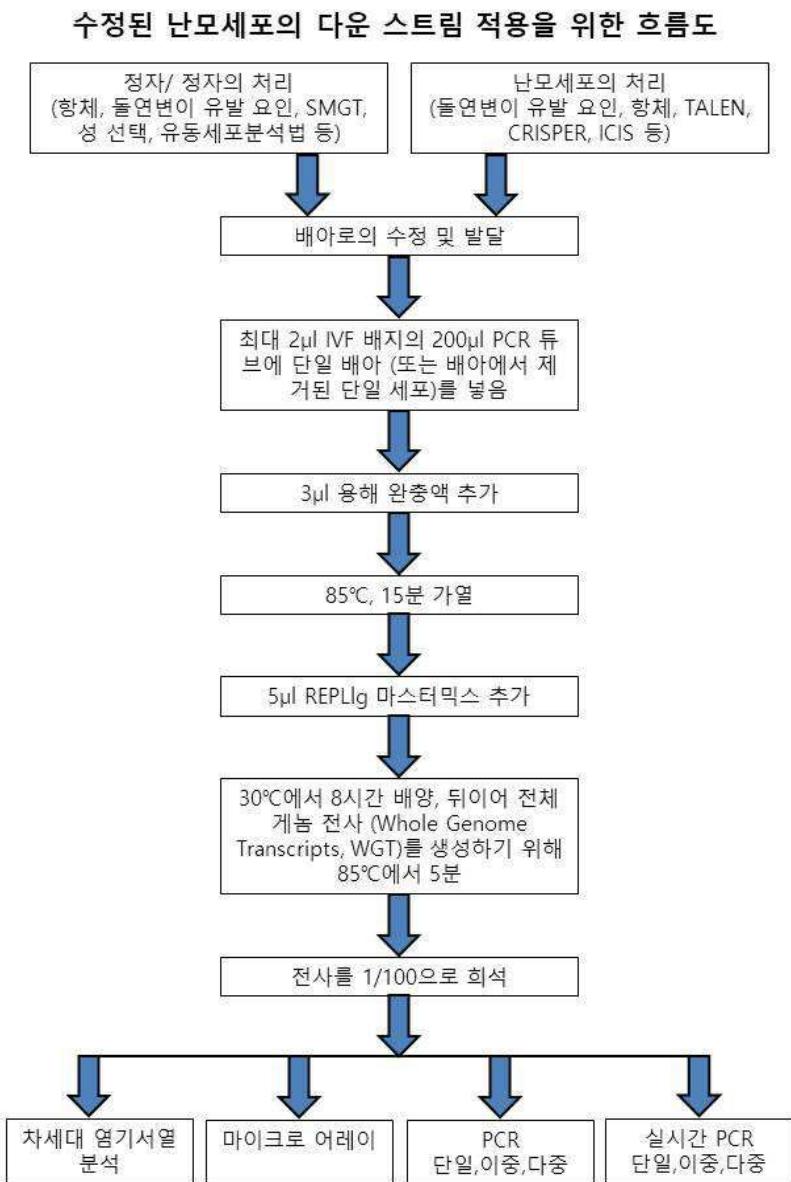
도면 1a



1A

도면1b**1B****도면2b****2B****도면3b****3B**

도면4b



4B

도면 1c

A FWR1 CDR1 FWR2
 EVKVEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFKNYWMNWVRQS
 CDR2 FWR3
 PEKGLEWVAEIRSKSNNNEKHYAESVKGRFTISRDDFKSSVYL
 CDR3 FWR4
 QMNNLRTEDTGIYYCTGGTFDYWGQQTTLVSS

B

	FWR1		CDR1	
DVVVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSHSLVHSDGNTYLHW				
	FWR2	CDR2		FWR3
YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR				
	CDR3		FWR4	
VEAEDLGVYFCSTTHVPPYTFGGGTQLEIK				

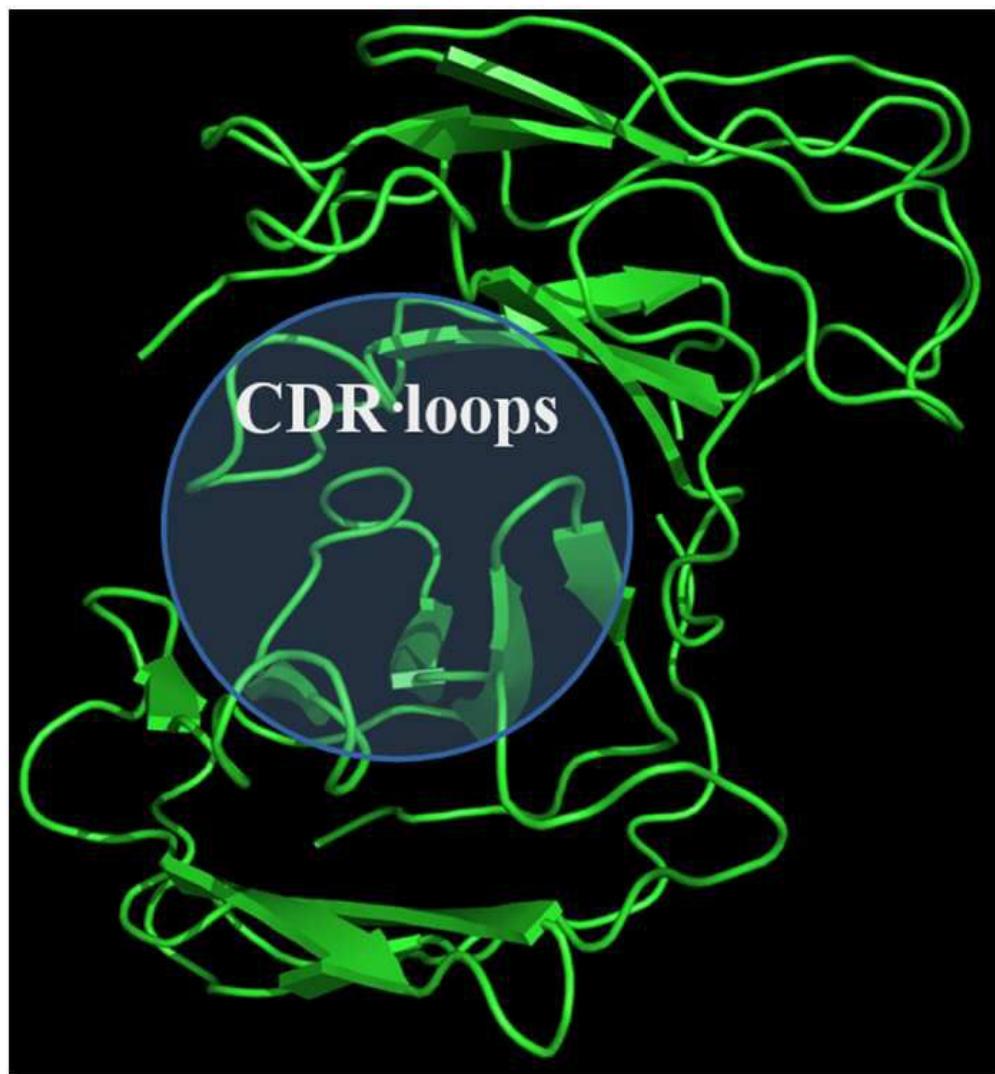
1C

도면2c

Target 3wbd.1.A	DVVVTQTPGALPVLGDQASISCRSSGSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVKARFSGSGSGTDFTLKI DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTLYWYLQKPGQSPKPILYRVSNRFSGPDRFSGSGSGTDFTLKI
Target 3wbd.1.A	SSLTTEDLGVYFCQSQTTHVPFAFGGGTQLEIK-----EVKVEESPATLVQPGGSMKISCVASGFVNNSY SRVEAEDLGVYFCFQGTHV-PTYFGGGTRLEIKGGGSGGGGGGGGSQIQLQQSGPELVRPAGSVKISKASGYTFTDY
Target 3wbd.1.A	WMNNWRQSPKEGLEWVAEIRSQLNNNEKHYAESVKGRFTISRDDFKSDFTLQMNNLRTEDTGIIYCT-GGR--PDTWGQQ YIHVWKQRPGEGLEWIGWIYPGSGNTK--YNEKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDAVFCARGGKFAMDYWQGG
Target 3wbd.1.A	TTLELS TSVTVS

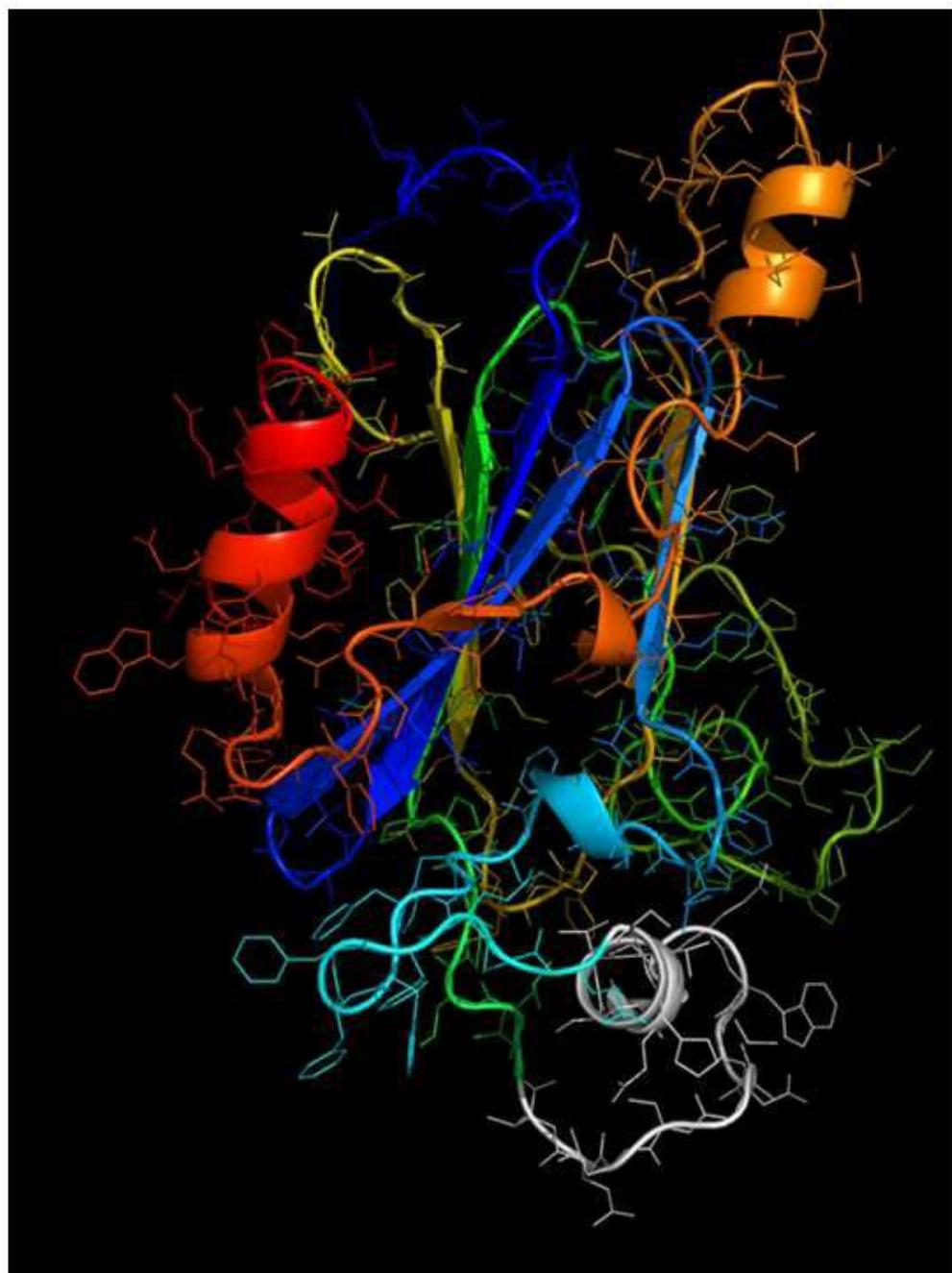
2C

도면3c



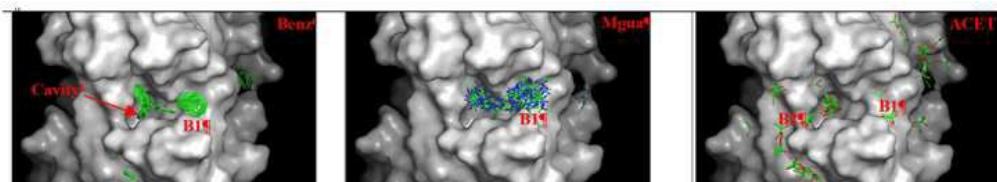
3C

도면4c



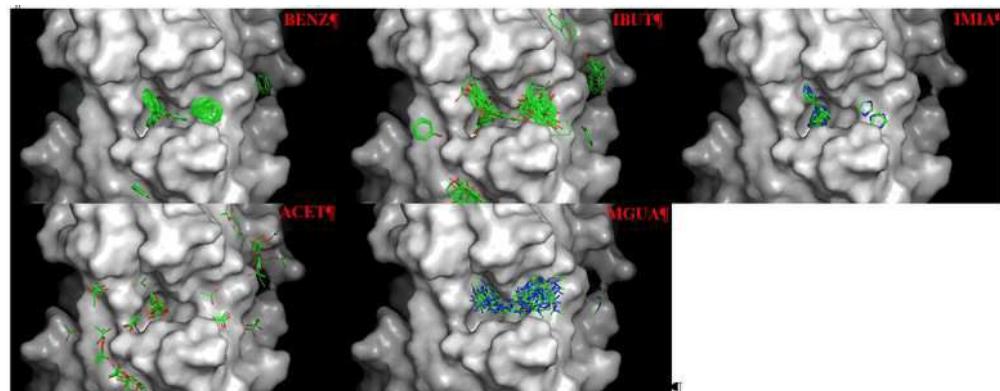
4C

도면5c



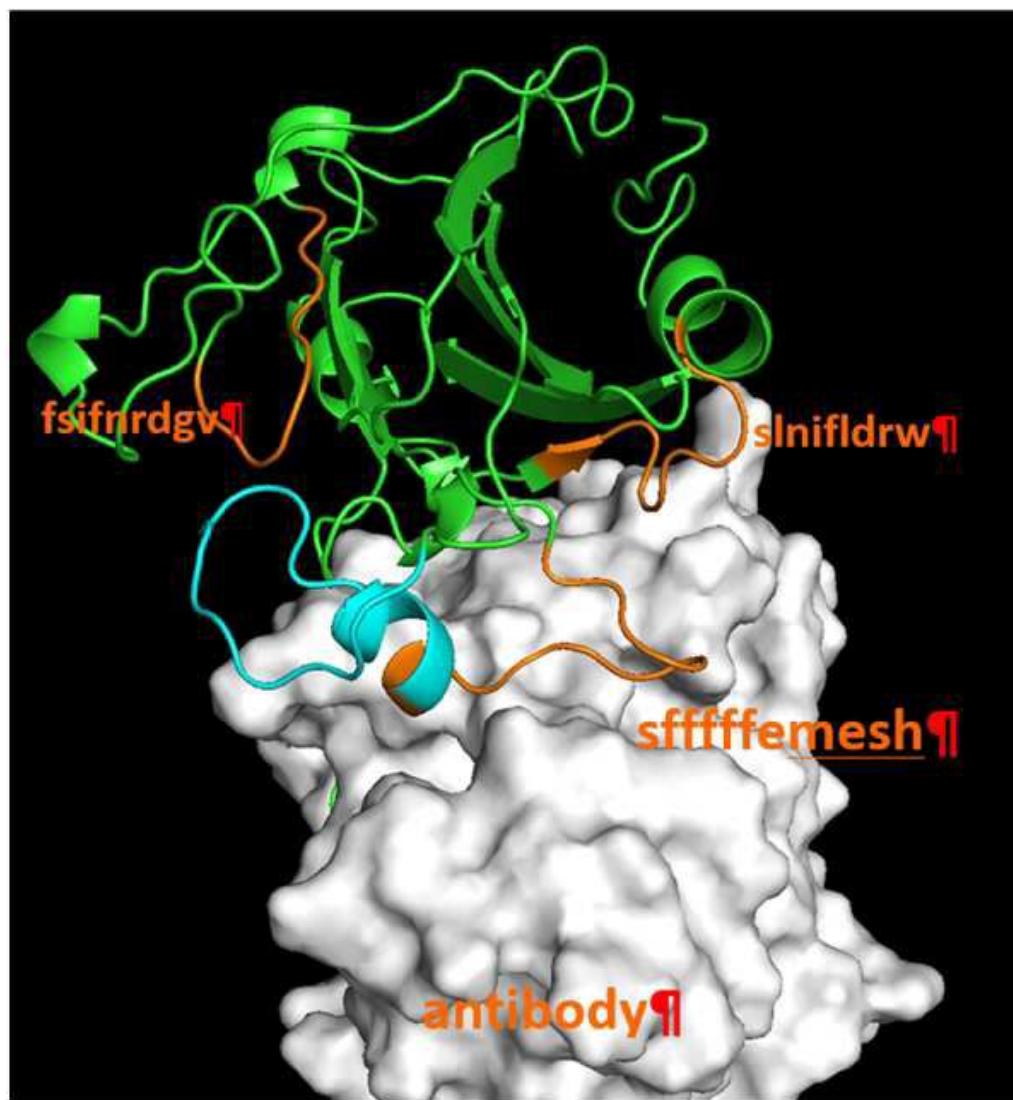
5C

도면6c



6C

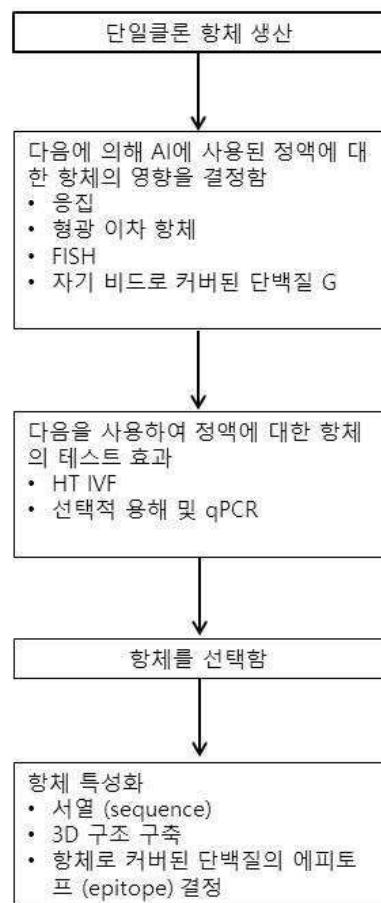
도면7c



7C

도면8c

IDKVVVPAVLALVLVAEAAA
AVVEVVTATAEDLVEVMLIFLLGRAFCFSFFFFEMESHSVTQA
GVQWPDLGSLEVLLPQPPKVGLQVGGNMPSSFSIFNRDGVSPCWPGWSLPPDLMIHTPW
PEVLGLQAATVPGLGSLFLRLVLFKAFIGEIFLRDTKSNSRFLLVLCSTEKKGINELNFSLNIFLDR
WLWRLLQWIWRKLLPGGLVGQLN

8C**도면9c****9C**