

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2018년 2월 15일 (15.02.2018)



(10) 국제공개번호

WO 2018/030735 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/075 (2010.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/008507

(22) 국제출원일:

2017년 8월 7일 (07.08.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0100569 2016년 8월 8일 (08.08.2016) KR

(71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 오정수 (OH, Jeong Su); 16330 경기도 수원시 장안구 만석로20번길 28, 632동 805호, Gyeonggi-do (KR).

전혁준 (JEON, Hyuk Joon); 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 의관 2102호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, Seoul (KR).

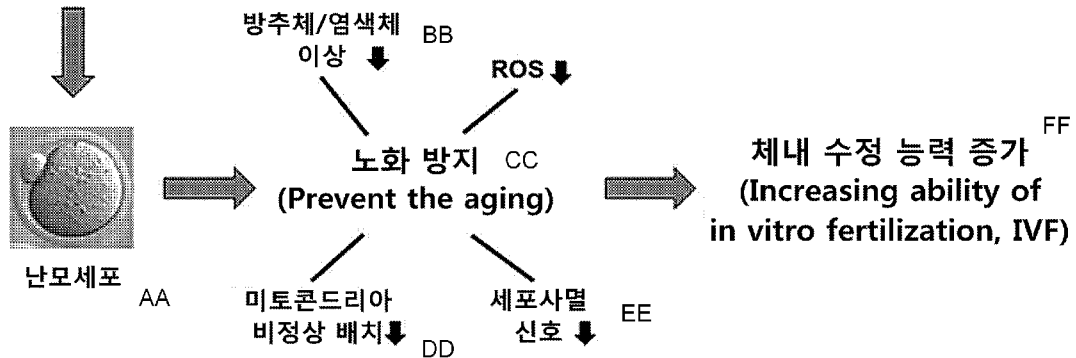
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING AGING OF OR IMPROVING FERTILIZING ABILITY OF OOCYTES, CONTAINING TCTP

(54) 발명의 명칭: TCTP 단백질을 포함하는 난모세포 노화 방지 또는 수정능력 개선용 조성물

TCTP



AA ... Oocytes

BB ... Abnormality in mitotic spindle/chromosome

CC ... Prevention of aging (Prevent the aging)

DD ... Abnormal arrangement of mitochondria

EE ... Apoptosis signaling

FF ... Increase in ability of in vitro fertilization (Increasing ability of in vitro fertilization, IVF)

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing aging of or improving fertilizing ability of oocytes, containing a translationally controlled tumor protein (TCTP) as an active ingredient. It is expected that the protein can be useful in the prevention or treatment of infertility (sterility) by improving the quality of ova, and can also be used as a culture liquid additive used during *in vitro* fertilization.

(57) 요약서: 본 발명은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 난모세포 (oocytes)의 노화 방지 또는 수정능력 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 단백질은 난자의 질 개선을 통하여 불임 (난임)의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있으며, 체외 수정 시 사용되는 배양액 첨가물로도 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]



LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: TCTP 단백질을 포함하는 난모세포 노화 방지 또는 수정능력 개선용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 난모세포 (oocytes)의 노화 방지 또는 수정능력 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 난자의 질 개선용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 배란 후, 포유류의 난자는 수정될 때까지 제 2 감수분열 (MII)의 중기에 머무르게 된다. 만약 수정이 장시간 발생하지 않는 경우, 일명 배란 후의 노화 (postovulatory aging) 시기 동안 난자는 계속해서 시간-의존적 질적 노화를 겪는다. 배란 후의 노화 (postovulatory aging) 시기 동안 난자는 자발적 활성화, 부분 피질 과립 세포 외 유출, 투명대 경화, 미토콘드리아 기능 장애, 스핀들 이상 및 염색체 무결성의 손실을 포함하는, 형태학적 세포 및 분자의 변화를 보여준다. 이 기형 현상은 수정 이후의 배아 발달을 저해할 수 있으며, 또한, 난자의 품질에 심각한 손상을 주고, 결국 세포 사멸을 이끌게 된다.
- [4] 비록, 난자의 배란 후의 노화 (postovulatory aging)에는 다양한 요인에 따른 영향이 있지만, 산화성 스트레스가 난자 품질의 손상에 관여하는 중요한 요소 중 하나로 간주되고 있다. 실제로, 난자의 체외 배양 기간 동안 난자 연령에 따라 ROS 수준이 증가하고, 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸이 증가하는 것이 밝혀졌다.
- [5] 더불어, 난소기능저하 (poor ovarian responder, POR)는 흔히 과배란 유도 저반응군이라고 부르기도 하는데, 이때 난소의 반응 (ovarian respond)은 특히 시험관시술을 목적으로 배란 유도제를 통해 난소의 배란을 유도할 경우, 약물에 대한 난소의 반응 정도를 표현하는 용어로 쓰인다. 즉, 배란 유도제에 의한 난소 반응 (ovarian respond)이 잘되지 않는 (poor) 경우에 난소기능저하라고 표현하며, 이를 흔히 난소기능이 저하되어 배란 유도가 잘되지 않는다고 말하고 있다.
- [6] 시험관 시술을 위해서는 체내의 FSH의 농도를 높여 과배란 유도 (controled ovarian stimulation, COS)를 통한 여러 개의 난자를 채취하는 과정이 필요한데, 이때, 동일한 용량에서도 사람에 따라 COS에 대한 난소 반응이 제각각일 뿐만 아니라 반응 정도를 예측하기도 힘들다. 즉, 어떤 사람에서는 COS 자극에 과도하게 반응해서 난소과잉증후군이 나타나는 반면, 어떤 사람은 고용량의 자극에도 불구하고 난소반응이 현저하게 떨어지는 난소기능저하가 될 수 있다.
- [7] 현재 시험관 시술에 있어서 쟁점은 질 좋은 난자를 여럿 확보하는 것이고, 이에, 난자의 품질을 유지하기 위한 방법을 개발하는 것이 요구되고 있다.

- [8] TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질은 세포 생존과 성장에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있으며, 최근 연구에서는 TCTP가 아미노산 조각 정보를 활용하여 ATM과 결합하고, ATM의 효소 기능을 높여준다는 사실이 밝혀졌고, 나아가 TCTP 및 ATM이 방사선에 의해 손상된 DNA를 복구하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 하지만, 이러한 TCTP가 난자의 질에 미치는 영향은 아직 보고된 바가 없다(한국등록특허공보 10-0630657 참조).

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 난모세포 (oocytes)의 노화 방지 효과를 갖는 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 본 발명의 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질이 배란 후의 노화 (postovulatory aging)로부터 난자를 보호하는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [11] 이에, 본 발명의 목적은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 불임 또는 난임 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 불임 또는 난임 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [15] 본 발명의 일 구현예로, 상기 TCTP 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [16] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 조성물은 난모세포의 방추체 (spindle) 및 염색체 (chromosome) 이상 (abnormalities)의 감소를 통하여 난자의 질을 유지할 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 난모세포 내 ROS(Reactive oxygen species) 생성을 억제할 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 난모세포의 미토콘드리아 (mitochondria)의 비정상적인 배치를 감소시킬 수 있다.
- [19] 또한, 본 발명은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 불임 또는 난임의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 불임 또는 난임의 치료 또는 예방 용도를 제공한다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 발명은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 난모세포 (oocytes)의 노화 방지 또는 수정능력 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 단백질은 난자의 질 개선을 통하여 불임 (난임)의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있으며, 체외 수정 시 사용되는 배양액 첨가물로도 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 노화 (aging)가 난자의 질 (oocyte quality)에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

[25] 도 2a는 난자가 노화함에 따라 TCTP의 양이 변화하는 것을 확인한 도이다.

[26] 도 2b는 TCTP를 난자 내에서 감소시킬 때 난모세포의 방추체 및 염색체(spindle 및 chromosome)의 변화와, 활성산소종 (ROS)의 양이 변화하는 것 및 미토콘드리아의 배치 변화를 확인한 도이다.

[27] 도 3은 TCTP 처리 시 난자의 질 (oocyte quality) 유지 효과를 나타낸 도이다.

[28] 도 4는 TCTP 처리 시 수정 후 발생 단계에 미치는 효과를 나타내는 도이다.

[29] 도 5는 TCTP (Translationally controlled tumour protein)의 난모세포(oocytes) 노화 방지/수정능력 개선 효과를 개략적으로 나타낸 도이다.

[30]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[31] 본 발명자들은, 실시예에서 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질 과발현 (overexpression)이 난자의 노화 관련 이상 (abnormalities)을 감소시킬 수 있다는 점에 기반하여 상기 단백질의 처리에 따른 ROS 축적, 미토콘드리아 결함 및 방추체/염색체 이상 (abnormalities) 등을 구체적으로 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[32]

[33] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[34]

[35] 본 발명은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 난모세포 (oocytes) 노화 방지 또는 수정능력 개선용 조성물을 제공함에 특징이 있으며, 상기 TCTP 단백질의 아미노산 서열을 서열번호 1에 나타내었다.

[36] 본 발명의 "난모세포 (oocytes) 노화"란 난모세포의 자발적 활성화, 투명대

경화, 미토콘드리아 기능 장애, 스핀들 이상 및 염색체 무결성의 손실 등으로 난자의 품질이 악화된 상태를 말한다. 이때, 배란 후의 노화 (postovulatory aging)는 난자가 배란된 이후 제 2 감수분열 중기에 더이상 세포분열이 일어나지 않고 멈춰있는 난자가 수정이 되지 않았을 때 세포 사멸이 되기 전까지의 과정을 의미하는 반면, 상기 배란 후의 노화 시기와 구별되는 개념으로서, 난자 성숙 (Oocyte maturation)은 난소 내 난세포의 성숙과정을 나타내는 것으로 거대한 핵 (난핵포)을 갖는 제1 성숙분열 전기의 상태에서 성숙분열을 일단 휴지하다가 난성숙 유기물질의 작용으로 성숙분열을 재개하며 난핵포 붕괴가 시작되는 2 회의 성숙분열과정을 거쳐 난핵은 자성전핵이 되어 융성전핵과 수정 완료과정인 융합이 가능해진 상태를 칭하며, 난자가 성숙하는 과정에서는 세포가 죽어가는 과정이 아니라 염색체 분리 등 세포 주기가 일어나고 있기 때문에 난자가 노화된다고 하지 않는다.

- [37] 본 발명의 일실시예에서는, TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질의 난모세포 (oocytes) 노화 방지 및 수정능력 개선 효과를 확인하기 위해, TCTP 단백질의 녹다운 (knockdown) 및 과발현에 따른 난모세포 노화-관련 품질을 확인한 결과, 상기 난모세포에 녹다운 (knockdown) TCTP 단백질 처리 시, TCTP 과발현군에 비하여 우수한 노화-관련 품질 저하 방지 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다 (실시예 3 및 4 참조).
- [38] 따라서, 본 발명에 따른 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질은 ROS 저해 활성 및 방추체/염색체 (spindle/chromosome) 이상 (abnormalities) 감소 효과를 갖는 바, 난모세포 (oocytes) 노화 방지 및 수정능력 개선 효과가 요구되는 다양한 목적 및 용도, 예컨대 난임, 불임 등의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [39] 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 조성물이 약학적 조성물의 형태로 사용되는 경우, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하고 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 난모세포(oocytes) 노화에 의해 기인하는 질환의 증상을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다.
- [40] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 조성물이 배지용 조성물의 형태로 사용되는 경우, 상기 조성물을 통상적인 포유동물 수정란 배양에 이용되는 기본 배지에 첨가하여 사용할 수 있다. 본 발명에서 "기본 배지"는 포유동물의 종에 따라 차이가 있으나, 무기염류, 탄소원, 아미노산, 소 혈청 알부민 및 보조인자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하며, 당업자에게 알려진 일반적인 배지를 모두 포함할 수 있다.
- [41] 본 발명의 일 구현예로, 상기 무기염류로는 NaCl, KCl, 및 NaHCO₃ 등을 사용할 수 있고, 탄소원으로는 글루코즈, 나트륨, 피루베이트 및 젖산칼슘염 등을 사용할 수 있으며, 아미노산으로는 글루타민을 비롯한 필수아미노산 및

- 비필수아미노산, 보조인자로써는 기타 미량원소 및 완충액 등을 사용할 수 있다.
- [42] 또한 상기 "기본 배지"는 항생제를 추가로 포함할 수 있으며, 바람직한 실시예로서 상기 기본 배지로는 포유동물 세포 배양용으로 공지되어 상업화된 여러 배지, 예를 들어 CR1-aa (Rosenkrans, CF Jr., et al., Biol. Reprod., 49(3);459-462, 1993), TCM (tissue culture medium of medium199, Gibco, USA; Yue, C., et al., Development, 121:2645-2654, 1995), CZB (Chatot -Ziomek-Bavister medium; Chatot, C.L., et al., J. Reprod. Fert., 86:679-688, 1989) 등을 그대로 사용할 수 있으며, 이러한 기본 배지 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [43] 본 발명의 다른 구현예로, 본 발명의 배지 조성물을 적용시킬 수 있는 포유동물 수정란은 체외에서 배양될 수 있는 수정란이라면 모두 이에 해당하고, 상기 수정란은 체외수정란 또는 복제수정란을 모두 대상으로 할 수 있으며, 바람직하게는 초기 성숙란을 수정시켜 제조한 체외수정란을 대상으로 할 수 있다. 여기서 "체외수정란"이란 난자와 정자를 채취하여 체외에서 수정시킨 것을 말하고, "복제수정란"이란 체세포 공여핵을 유전물질이 제거된 수핵 난자에 주입한 후 물리적 또는 화학적 방법으로 융합시킨 것을 의미한다.
- [44] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 불임(난임)의 치료방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [45] 이때 투여량과 투여 경로와 같은 투여방식은 개체의 연령, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [46]
- [47] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [48]
- [49] **[실시예]**
- [50] **실시예 1. 실험 준비 및 실험 방법**
- [51] **1-1. 난모세포 수집 및 배양**
- [52] 마우스의 관리 및 사용에 관한 모든 절차는 지침에 따라 실시되었고, 성균관대학교의 동물 관리 및 사용위원회에 의해 승인되었다.
- [53] 4-6 주령 암컷 CD-1 마우스에 임신 암말의 생식선 자극 호르몬 (GTH) 혈청 (PMSG, 10 IU; Sigma-Aldrich)을 복강 내 주사하고, 46-50 시간 후에 난소를 분리하였다. MII기 유도를 위해, 인간 융모성 생식선 자극 호르몬 혈청 (hCG, 10 IU; Sigma-Aldrich)을 주사하였다. 난모세포는 모낭에서 수집하고, 감수분열 재개를 방지하기 위하여 3-아이소뷰틸-1-메틸산틴 (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX) 200 μ M이 첨가된 M2 배지에서 회수하였다. 시험관 (in vitro) 내 성숙을

유도하기 위하여, TCTP 녹다운 (knockdown) MII 난모세포 및 TCTP 과발현 난모세포를 주사 후 각각 12, 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 난모세포는 무-IBMX M16 배지 (37°C, 5% CO₂)에 배양하였다. 모든 시약 및 배지는 특별히 명시되지 않는 한 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

- [54] 또한, 성숙한 B6D2F1 암컷 마우스에 임신 암말의 생식선 자극 호르몬 (GTH) 혈청 (PMSG, 5 IU; Sigma-Aldrich)을 주사하고, 48 시간 후에 인간 융모성 생식선 자극 호르몬 혈청(hCG, 5 IU; Sigma-Aldrich)을 주사하여 과배란시켰다. COCs (cumulus oocyte complexes)는 hCG의 주입 13 시간 후에 난관에서 수집하였다. 난구세포는 M2 배지 (Sigma-Aldrich)에 0.1 % 소 고환 히알루로니다아제 (Sigma-Aldrich)와 함께 분산시켰다. 몇 분 후, 난모세포는 M2 배지 방울로 이동시키고 부드러운 피펫으로 거의 모든 난구세포를 제거하였다. TCTP의 과발현 및 시험관 (in vitro) 내 노화 난모세포를 얻기 위하여, TCTP-mCherry-cRNA를 균질 난형질 (homogeneous ooplasm)과 함께 무결함 신선 난모세포의 세포질에 미세주입하고, 무균 미네랄 오일로 덮어 KSOM 배지 (37°C, 5% CO₂)에서 12 시간 동안 유지하였다. 이때, 대조군 (control) 난모세포는 mCherry-cRNA와 함께 미세주입하였다.

[55]

[56] **1-2. 미세주입술 (Microinjection)**

- [57] 약 5-10 pL의 dsRNA 또는 cRNA를 미세조작기 (micromanipulator, Narishige, Japan)가 장착된 Leica inverted 현미경 (DMIRB) 및 FemtoJet 미세주사기 (microinjector, Eppendorf, Germany)를 사용하여 난자의 세포질에 주입하였다. 주입 후, 난모세포는 IBMX가 첨가된 M16 배지에서 24 시간 동안 배양하였다. 그 후, 신선한 배지로 옮기고 미네랄 오일 하에서 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다.

[58]

[59] **1-3. 세포 내 ROS 측정**

- [60] 난모세포를 다이하이드로로다민 123 (DHR-123, ThermoFisher scientific, USA) 20 µM 및 DCFHFDA (Sigma, USA)를 첨가한 M16 배지에서 1시간 동안 배양한 후, PBS/PVP로 세척하였다. 난모세포는 530-550 nm 필터로 시각화하고, 형광 신호는 Nikon Eclipse Ti inverted microscope with CCD cooled camera (DS-Qi1Mc, Nikon, Japan)를 이용하여 획득하였고, Image J software를 사용하여 정량화하였다.

[61]

[62] **1-4. 미토콘드리아 (Mitochondrial) 분석**

- [63] 난모세포는 CytoPainter 미토콘드리아 염색 버퍼 (abcam, USA)에서 30 분간 배양하고, 공초점 레이저 주사 현미경 (LSM 700, Zeiss, Germany)로 이미지를 촬영하였다. MII기 난모세포에서 신호는 Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)로 분석하였다.

[64]

[65] **1-5. 세포 염색 (Annexin-V staining)**

[66] 난모세포의 초기 세포사멸 (apoptosis)을 검출하기 위하여, Annexin-V 염색 키트 (BD Biosciences, USA)를 사용하였다. 난모세포는 제조사의 지시에 따라, Annexin-V-FITC 5 μ l이 첨가된 결합 완충액 100 ml로 어두운 곳에서 염색하였다. 형광 신호는 450-490 nm 여기 (excitation) 및 520 nm 방출 (emission) 필터로 형광현미경을 이용하여 측정하였다.

[67]

[68] **1-6. 면역학적 블로팅 (Immunoblotting) 분석**

[69] 난모세포를 SDS 샘플 버퍼에 용해 후, SDS-PAGE를 실시하였다. 전사 후, 1시간 동안 실온에서 blocking buffer (0.1 % Tween-20, 3 % BSA, TBS buffer)로 막을 차단한 후, 4°C에서 하룻밤 동안 일차 항체와 함께 배양하였다. 이를 TBST buffer (0.1 % Tween-20, TBS buffer)로 3 회 세척한 후에, 1 시간 동안 이차 항체로 인큐베이션하였으며, ECL Plus Western Blotting 검출 키트 (GE 헬스케어)로 검출하였다. 일차 항체는 anti-TCTP (Abcam; 1:500), anti-pTCTP (Cell Signaling Technology; 1:500), anti-Plk1 (Santa Cruz; 1:500), anti-CHFR (Abcam; 1:500) 및 β -actin (Cell Signaling; 1:2500)을 사용하였으며, HRP-표지 마우스 및 래빗 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 이차 항체로 사용하였다.

[70]

[71] **1-7. 면역형광 (Immunofluorescence) 분석**

[72] 특정 단계의 난모세포를 10 분간 4 % 파라포름알데히드로 고정하고, 15 분간 0.1 % 트리톤 X-100이 첨가된 인산완충식염수 (PBS)로 투과시킨 후, 3 % 소혈청알부민과 함께 PBS로 블로킹하였다. 이후, 난모세포는 일차 항체와 함께 배양하고, Alexa Fluor-결합 488 및 594 이차 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)로 인큐베이션하였다. DNA 대조용으로 DAPI를 사용하였다. 특별한 언급이 없는 한, 각 그룹마다 적어도 20 개의 난모세포를 조사하였다. 본 실험에 사용된 항체는 다음과 같다. anti-TCTP (Abcam; 1:50), anti-pTCTP (Cell Signaling Technology; 1:50), anti-CHFR (Abcam; 1:100), anti-acetylated α -tubulin (Sigma; 1:500) 및 anticentromere antibody (Antibodies Incorporated; 1:50).

[73]

[74] **1-8. 세포질 내 정자 주입술 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)**

[75] 먼저, 정자는 성숙한 B6D2F1 수컷 마우스의 꼬리 부고환부속물 (cauda epididymidis)로부터 수집하고, 각 실험을 위하여 M2 배지 (37°C, 5% CO₂)에서 30 분 동안 배양하였다. 현탁액의 1 μ l를 미세 조작 챔버에서 10 % 폴리비닐 피롤리돈 (PVP)-HEPES- 완충 HTF 용액 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 방울 (droplets)에 위치시켰다. ICSI는 하기 설명대로 수행하였다 (Kimura and Yanagimachi, 1995).

[76] 정자 머리는 목 영역에 여러 개의 피에조 펄스 (piezo pulses)를 사용하여 꼬리로부터 분리하고, 머리를 실제로 1-1의 B6D2F1 암컷 마우스로부터 배란된

난자에 주입하였다. 실온에서 10 분간 회복 후, 난자를 KSOM 배지에서 배양하였다. 이때, 난자는 일반적인 표면의 특징을 가지고 자발적으로 활성화되지 않은 경우에만 사용되었다. 6-8 시간 배양 후, 수정 (PN formation) 속도를 평가하였으며, 난자의 발달율은 정자 주입 후 각각 22-24 및 96-98 시간 후에 2세포 난할 (Cleavage) 단계/배반포 (blastocyste) 단계에 도달한 난자에서 주입한 정자 대비 생존한 정자의 비율을 기준으로 평가하였다.

[77]

[78] 실시예 2. 노화 (aging)가 난자의 질 (oocyte quality)에 미치는 영향 확인

[79] 난모세포가 노화됨에 따라, 난자의 질 (oocyte quality)에 어떠한 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에 따라, 세포 생존율, ROS 수준, 세포사멸 (apoptosis) 등을 측정하였다.

[80] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 난자가 노화됨에 따라 생존율은 감소하고, 활성산소종 (ROS)의 양이 증가하며, 세포사멸 (apoptosis) 또한 증가하는 것을 확인하였고, 나아가 난모세포의 방추체 및 염색체 (spindle 및 chromosome)에 이상이 생김을 알 수 있었다.

[81] 상기 결과를 종합한 결과, 노화에 의해 나타나는 표현형 (phenotype)들로서, 세포 생존율, 활성산소종 (ROS)의 양 및 방추체/염색체 (spindle/chromosome) 이상 등이 나타남을 알 수 있었다.

[82]

[83] 실시예 3. TCTP 처리 시 난자의 노화 (oocyte aging)에 미치는 효과 확인

[84] TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질이 난자의 노화에 관여하고 있는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에 따라, TCTP 억제 시 세포 생존율, ROS 수준, 세포사멸 (apoptosis) 등을 측정하고, 난자에 TCTP dsRNA 주입 (injection) 후 TCTP의 양을 측정하였다.

[85] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 난자가 노화함에 따라 TCTP의 양 변화가 감소하는 것을 확인하였으며, 나아가 난자에 TCTP dsRNA 주입 시, TCTP의 양이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 도 2b에 나타낸 바와 같이, TCTP를 난자 내에서 감소시켰을 때, 난모세포의 방추체 및 염색체 (spindle 및 chromosome)에 이상이 생겼으며, 활성산소종 (ROS)의 양이 증가하였고, 미토콘드리아의 배치가 비정상적으로 변하는 것을 확인하였다.

[86] 상기 결과를 종합한 결과, TCTP가 감소하면 노화에 의해 나타나는 표현형 (phenotype)들이 증가하며, 이를 통하여 TCTP 감소하는 경우, 난자의 노화 진행이 빨라지는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[87]

[88] 실시예 4. TCTP 처리 시 난자의 질 (oocyte quality) 유지 효과 확인

[89] TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질의 난자의 질 유지 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에 따라, TCTP 증가 시 세포 생존율, ROS 수준, 세포사멸 (apoptosis) 등을 측정하였다.

- [90] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, TCTP를 난자 내에서 증가시켰을 때, 활성산소종 (ROS)의 양이 감소하였고, 난모세포의 방추체 및 염색체 (spindle 및 chromosome)에 이상이 감소하였으며, 미토콘드리아의 배치가 비정상적으로 변하는 것이 적어지는 것을 확인하였다.
- [91] 상기 결과를 종합한 결과, TCTP가 증가하는 경우, 난자의 노화 진행을 늦추고, 이에 따라 난자의 질을 유지하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[92]

[93] **실시예 5. TCTP 처리 시 수정 후 발생 단계에 미치는 효과 확인**

- [94] TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질의 수정 후 발생 단계에 있어서의 질 개선 효과를 확인하기 위하여, TCTP mRNA 주입으로 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 발현시킨 후, 실시예 1-8의 방법으로 세포질 내 정자 주입술 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 의해 인공수정을 시킨 수정란을 발생 단계별로 관찰하였다.

- [95] 그 결과, 하기 표 1 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 수정 후 초기발생 단계에서 발달율이 현저하게 높아지는 것을 확인하였다.

[96]

[97] [표1]

발달율	Fresh No. (%)	Tre. B (Ctrl) No. (%)	Tre. A (TCTP)No. (%)	P 값
No. of ICSI	60	106	125	
수정 (Fertilization)(2 PN)	59 (98.4±1.60)	99 (92.7±1.84)	119 (95.6±1.32)	
난할 (Cleavage)	58 (96.8±3.17)	81 (76.5±3.48)	112 (90.6±2.98)	1 vs. 2 : 0.0032 vs. 3 : 0.007
배반포 (Blastocyst)	53 (87.0±6.50)	37 (34.1±5.45)	78 (62.6±4.66)	1 vs. 2 : 0.0002 vs. 3 : 0.0011 vs. 3 : 0.015

[98]

- [99] 이러한 결과는, TCTP가 난자의 노화를 억제함으로써 수정능력을 증가시키는 효과가 있음을 시사하고 있다.

[100]

- [101] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을

것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[102]

산업상 이용가능성

[103]

본 발명은 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 불임 또는 난임의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 상기 단백질은 난자의 질 개선을 통하여 불임 (난임)의 예방 또는 치료와 관련한 기술분야에서 유용하게 이용될 수 있으며, 체외 수정 시 사용되는 배양액 첨가물로도 이용될 수 있다.

[104]

서열목록 Free Text

[105]

<210> 1

[106]

<211> 172

[107]

<212> PRT

[108]

<213> Translationally controlled tumour protein

[109]

[110]

<400> 1

[111]

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp

[112]

1 5 10 15

[113]

[114]

Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu

[115]

20 25 30

[116]

[117]

Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile

[118]

35 40 45

[119]

[120]

Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser

[121]

50 55 60

[122]

[123]

Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu

[124]

65 70 75 80

[125]

[126]

Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met

[127]

85 90 95

[128]

[129]

Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys

[130]

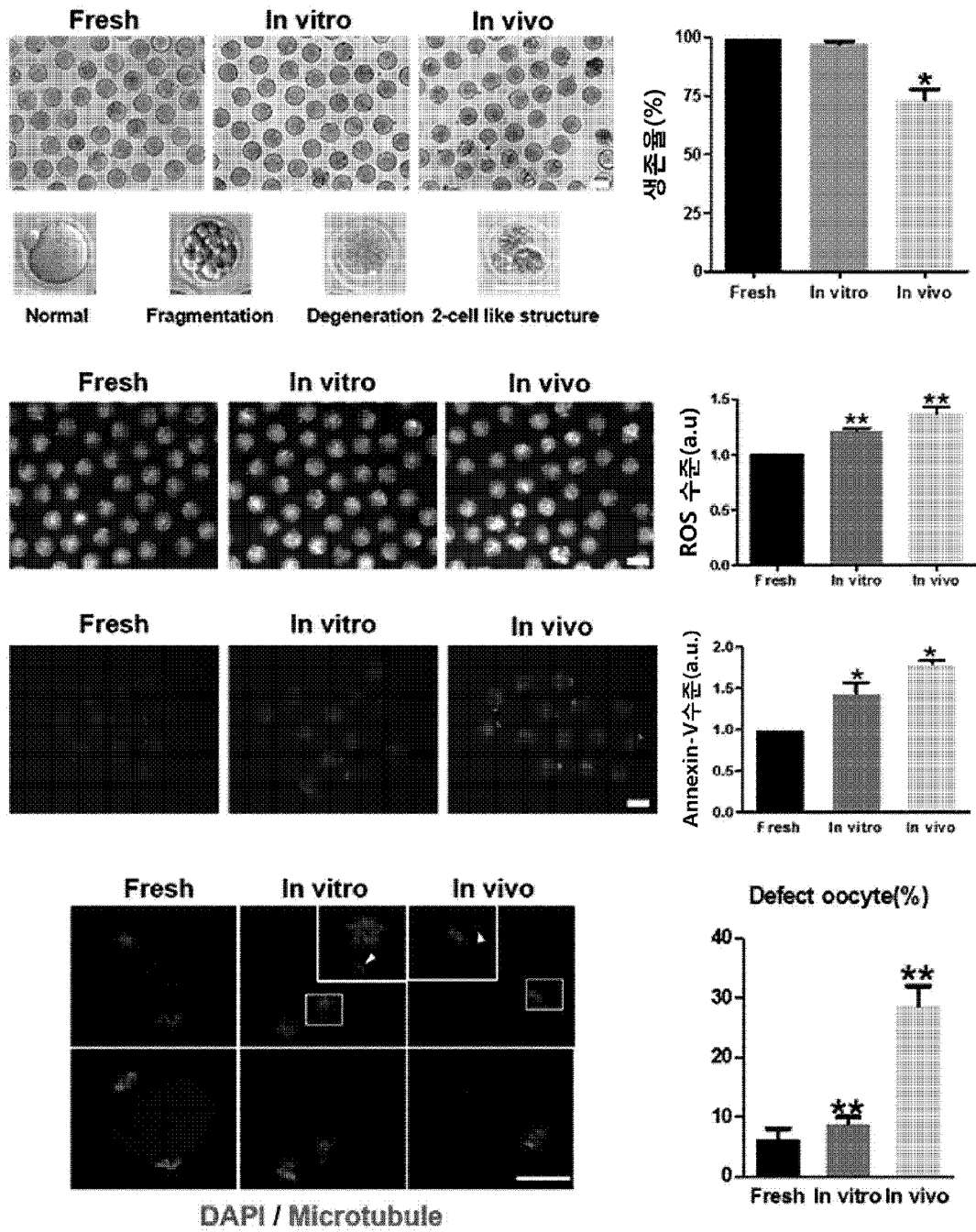
100 105 110

[131]
[132] Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
[133] 115 120 125
[134]
[135] Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
[136] 130 135 140
[137]
[138] Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met
[139] 145 150 155 160
[140]
[141] Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Lys Met Glu Lys Cys
[142] 165 170

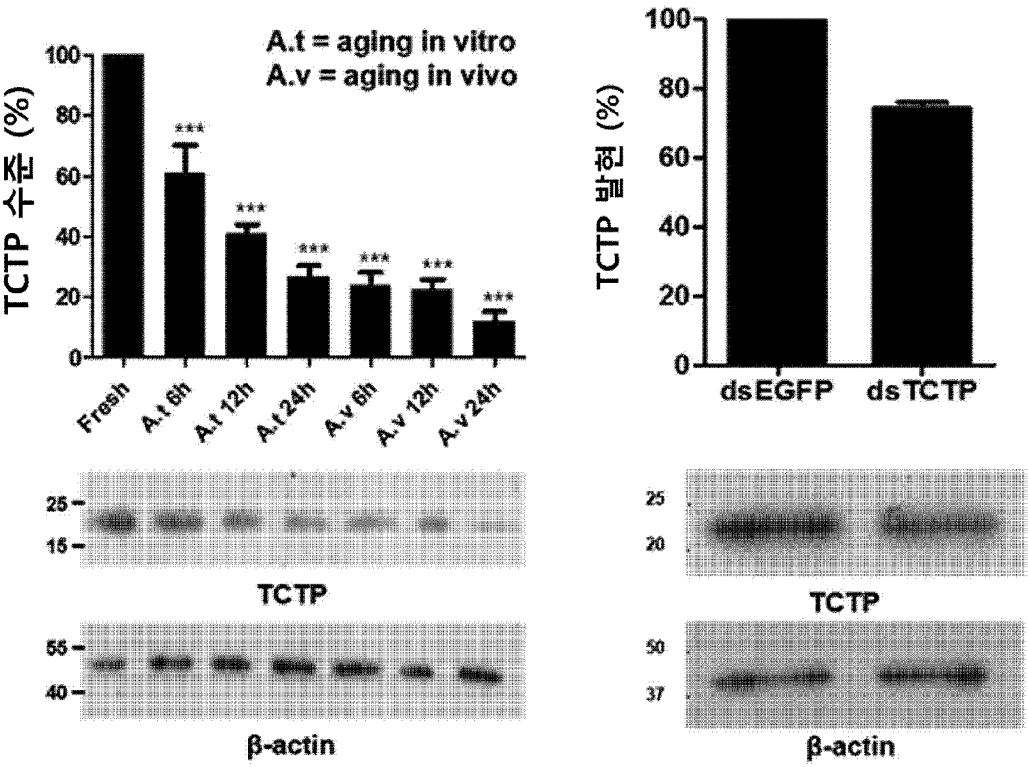
청구범위

- [청구항 1] TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는, 불임 또는 난임의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 난모세포의 방추체 (spindle) 및 염색체 (chromosome) 이상 (abnormalities)의 감소를 통하여 난자의 질을 유지하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 난모세포 내 ROS (Reactive oxygen species) 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 난모세포의 미토콘드리아 (mitochondria)의 비정상적인 배치를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 불임 또는 난임의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 7] TCTP (Translationally controlled tumour protein) 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물의 불임 또는 난임의 치료 또는 예방 용도.

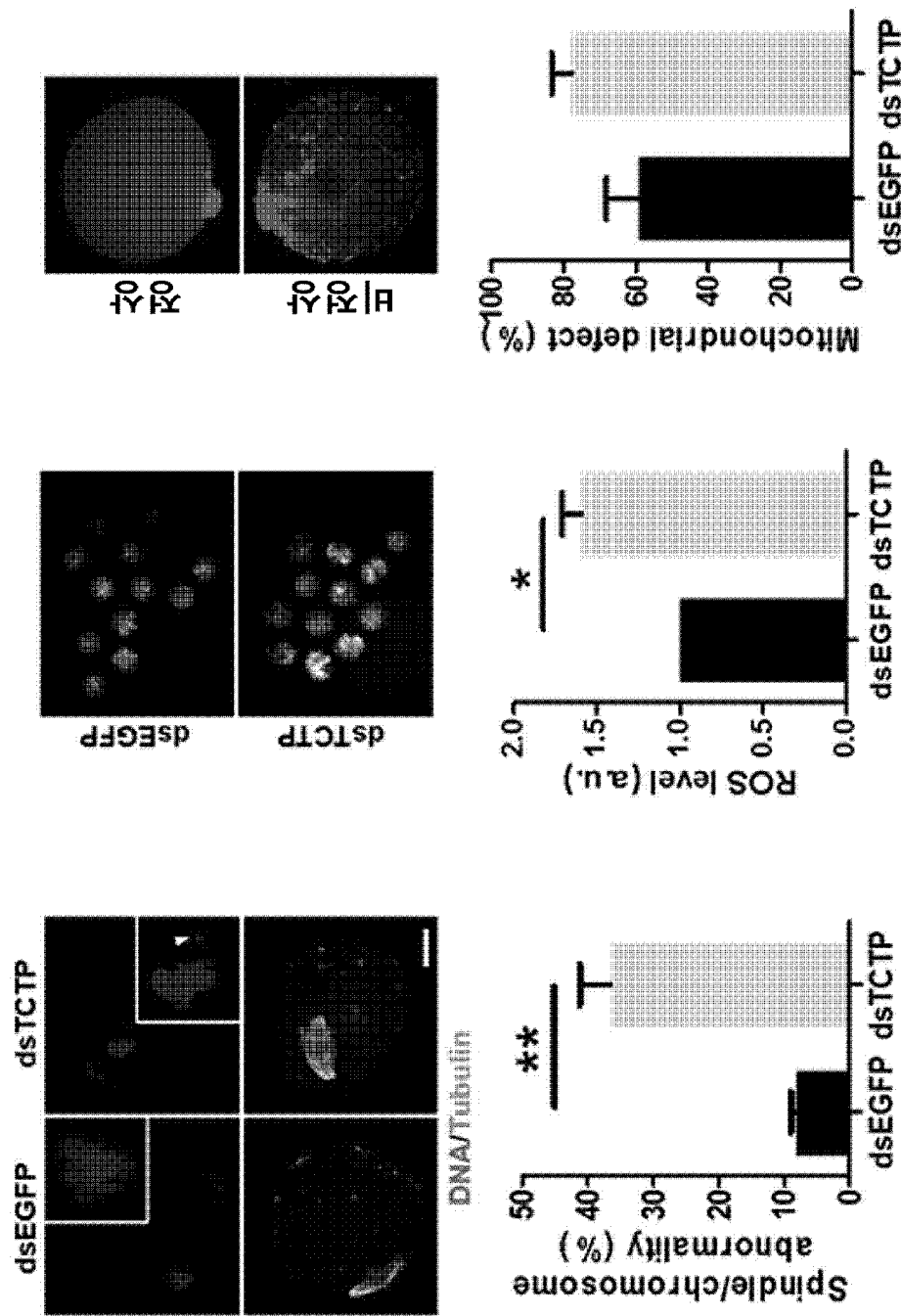
[도1]



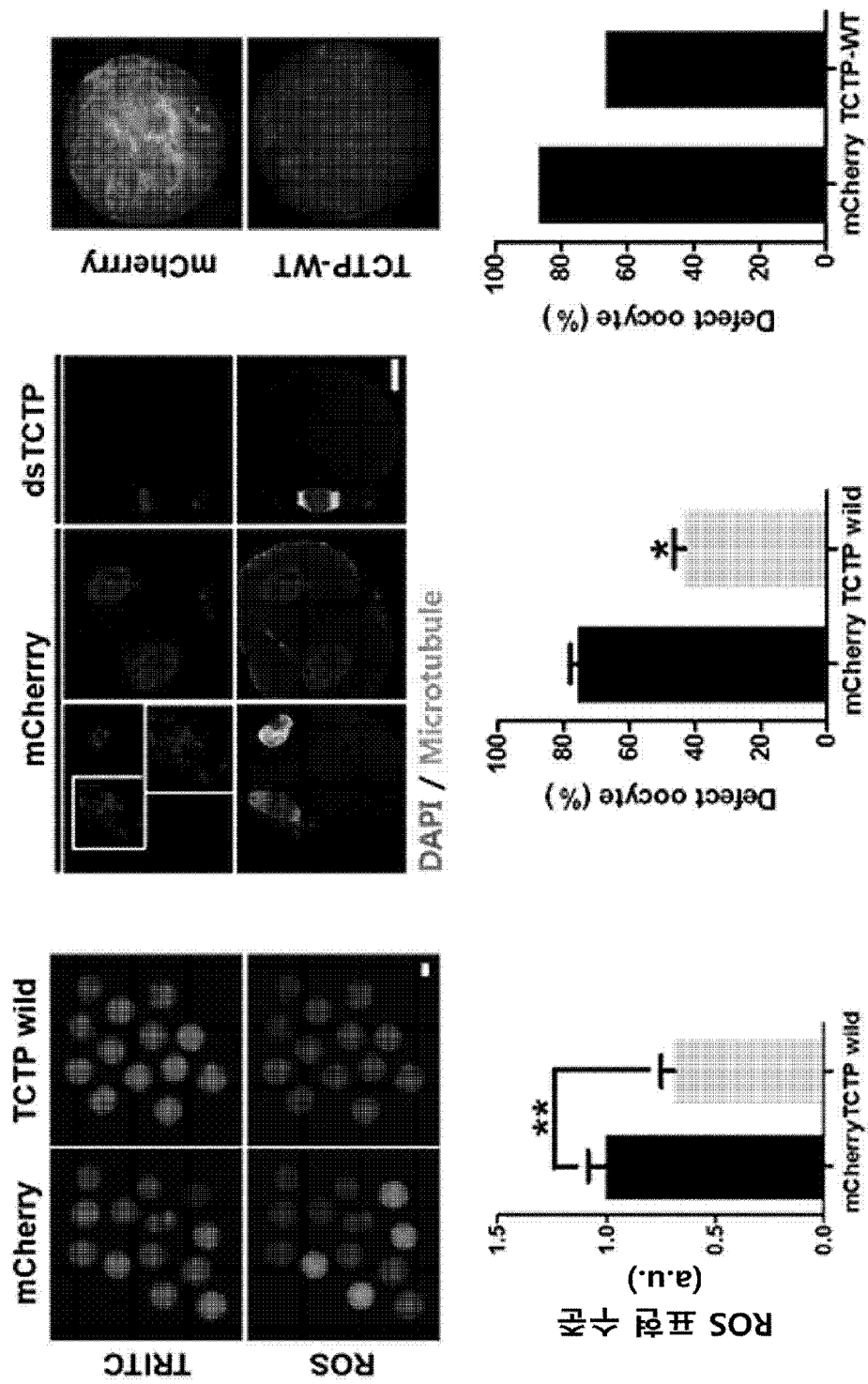
[도2a]



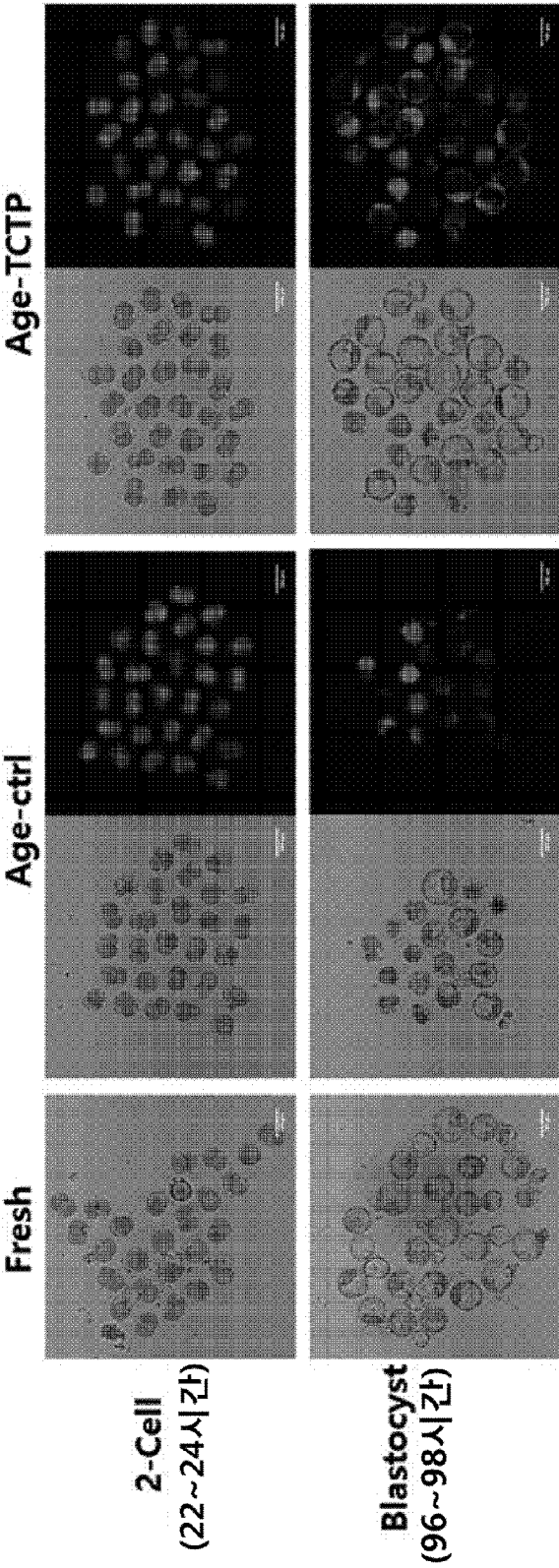
[도2b]



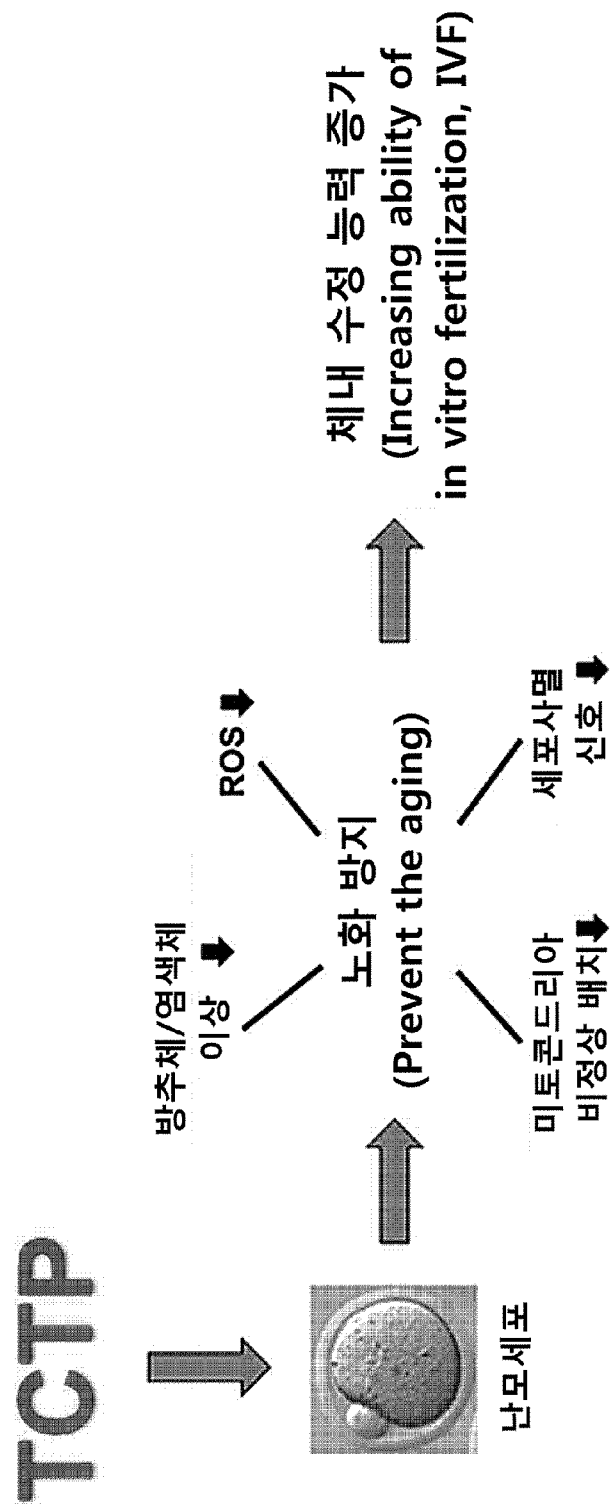
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/075(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/075; A61K 48/00; C12Q 1/68; A61K 31/565

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: TCTP, infertility, infertility, oocyte, spindle, ROS, mitochondria

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JEON, Hyuk-Joon et al., "TCTP Regulates Spindle Microtubule Dynamics by Stabilizing Polar Microtubules during Mouse Oocyte Meiosis", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, (Electronic publishing) 21 January 2016, vol. 1863, pages 630-637 See abstract; page 637, left column; figures 2-4.	1,3-5,7
Y		2
Y	NCBI, GenBank accession no. AAQ01550.1 (09 July 2009) See all sequences.	2
A	HONG, Sung-Tae et al., "TCTP Directly Regulates ATM Activity to Control Genome Stability and Organ Development in Drosophila Melanogaster", Nature Communications, 19 December 2013, vol. 4, article no. 2986, pages 1-14 See the entire document.	1-5,7
A	US 7691567 B2 (FUJISE, Ken et al.) 06 April 2010 See claims 1-2; SEQ ID NO: 2.	1-5,7
A	WO 98-04291 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 05 February 1998 See claims 1-2.	1-5,7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 NOVEMBER 2017 (23.11.2017)

Date of mailing of the international search report

24 NOVEMBER 2017 (24.11.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008507

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 6 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008507

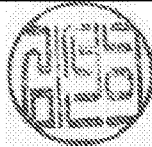
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	JEON, Hyuk-Joon et al., "TCTP Regulates Spindle Assembly during Postovulatory Aging and Prevents Deterioration in Mouse Oocyte Quality", <i>Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research</i>, (Electronic publishing) 02 May 2017, vol. 1864, pages 1328-1334 See abstract; page 1330, left column, second paragraph-page 1331, left column, third paragraph; figures 1-4.	1,3-5,7
PX	JEON, Hyuk-Joon, Master's Thesis: "Roles of Translationally Controlled Tumor Protein in Spindle Dynamics and Postovulatory Aging", Sungkyunkwan University, The Graduate School, Department of Biotechnology and Bioengineering, August 2016, pages 1-5 See abstract; pages 12-15 and 26-27; figures 1-9.	1,3-5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/008507

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 7691567 B2	06/04/2010	AU 3240702 A	15/05/2002
		US 2003-0172388 A1	11/09/2003
		WO 02-036624 A3	29/08/2002
		WO 02-036624 A9	20/11/2003
		WO 02-36624 A2	10/05/2002
WO 98-04291 A1	05/02/1998	AT 279212 T	15/10/2004
		AU 3738397 A	20/02/1998
		AU 723401 B2	24/08/2000
		CA 2262533 A1	05/02/1998
		DE 69731213 T2	23/02/2006
		EP 0921821 A1	02/01/2004
		EP 0921821 B1	13/10/2004
		JP 2000-517299 A	26/12/2000
		US 2003-0099614 A1	29/05/2003
		US 5958892 A	28/09/1999
		US 6410029 B1	25/06/2002
		WO 98-04291 A1	05/02/1998

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/075(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/075; A61K 48/00; C12Q 1/68; A61K 31/565 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TCTP, 불임, 난임, 난모세포, 방추체, ROS, 미토콘드리아		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JEON, HYUK-JOON 등, 'TCTP regulates spindle microtubule dynamics by stabilizing polar microtubules during mouse oocyte meiosis', Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, (전자공개) 2016.01.21, 제1863권, 630-637 페이지 초록; 페이지 637, 좌컬럼; 도면 2-4 참조.	1,3-5,7
Y		2
Y	NCBI, GenBank accession no. AAQ01550.1 (2009.07.09) 전체 서열 참조.	2
A	HONG, SUNG-TAE 등, 'TCTP directly regulates ATM activity to control genome stability and organ development in Drosophila melanogaster', Nature communications, 2013.12.19, 제4권, 아티클 번호 2986, 1-14 페이지 전체 문헌 참조.	1-5,7
A	US 7691567 B2 (FUJISE, KEN 등) 2010.04.06 청구항 1-2; SEQ ID NO:2 참조.	1-5,7
A	WO 98-04291 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 1998.02.05 청구항 1-2 참조.	1-5,7
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 11월 23일 (23.11.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 11월 24일 (24.11.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김선희 전화번호 +82-42-481-5405 	

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 6
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 6은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의
규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를
요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된
기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	JEON, HYUK-JOON 등, 'TCTP regulates spindle assembly during postovulatory aging and prevents deterioration in mouse oocyte quality' , Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, (전자공개) 2017.05.02, 제1864권, 1328-1334 페이지 초록; 페이지 1330, 좌컬럼, 두 번째 단락-페이지 1331, 좌컬럼, 세 번째 단락; 도면 1-4 참조.	1,3-5,7
PX	전혁준, 석사 논문: 'Roles of translationally controlled tumor protein in spindle dynamics and postovulatory aging' , 성균관대학교 일반대학원, 생명공학과, 2016.08, 1-53 페이지 초록; 페이지 12-15 및 26-27; 도면 1-9 참조.	1,3-5,7

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/008507

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 7691567 B2	2010/04/06	AU 3240702 A US 2003-0172388 A1 WO 02-036624 A3 WO 02-036624 A9 WO 02-36624 A2	2002/05/15 2003/09/11 2002/08/29 2003/11/20 2002/05/10
WO 98-04291 A1	1998/02/05	AT 279212 T AU 3738397 A AU 723401 B2 CA 2262533 A1 DE 69731213 T2 EP 0921821 A1 EP 0921821 B1 JP 2000-517299 A US 2003-0099614 A1 US 5958892 A US 6410029 B1 WO 98-04291 A1	2004/10/15 1998/02/20 2000/08/24 1998/02/05 2006/02/23 2004/01/02 2004/10/13 2000/12/26 2003/05/29 1999/09/28 2002/06/25 1998/02/05