

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0023097 (43) 공개일자 2012년03월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/075 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)		(71) 출원인 애들레이드 리서치 앤드 이노베이션 피티와이 리미티드 오스트레일리아 사우쓰 오스트레일리아 5000 애들레이드 그렌펠 스트리트 115 레벨 7
(21) 출원번호 10-2011-7030001		(72) 발명자 길크리스트 로버트 브루스 오스트레일리아 사우쓰 오스트레일리아 5011 우드빌 아버펠드 애비뉴 3 톰슨 제레미 오스트레일리아 사우쓰 오스트레일리아 5022 그란쥐 모나코 크레센트 14 알버즈 피라스 벨기에 비-1780 뱀멜 애비뉴 드 림부르크 스티름 263부스 4
(22) 출원일자(국제) 2010년05월14일 심사청구일자 없음		(74) 대리인 박장원
(85) 번역문제출일자 2011년12월14일		
(86) 국제출원번호 PCT/AU2010/000569		
(87) 국제공개번호 WO 2010/130008 국제공개일자 2010년11월18일		
(30) 우선권주장 61/178,318 2009년05월14일 미국(US)		

전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 **난모세포의 수집 및 성숙 방법**

(57) 요약

본 발명은 보조 생식 기술에 의하여 난모세포로부터 배아를 제조하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 (a) 대상체의 난소로부터 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포 내의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지중으로 난모세포를 수집하는 단계, (b) 상기 난모세포를 제2 포스포디에스테라아제 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 배양하는 단계와, (c) 보조 생식 기술로 상기 난모세포로부터 배아를 제조하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명은 난모세포 성숙의 유도 방법에 대한 것이다. 예컨대, 상기 (a)와 (b)단계를 포함하는 시험관 내 난모세포 성숙 방법이 개시된다. 또한 본 발명은 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하는 난모세포 성숙 배지에 관한 것이다. 상기 언급된 수집 난모세포 및 성숙 배지를 포함하는 배합물도 역시 개시된다.

특허청구의 범위

청구항 1

보조 생식 기술에 의하여 난모세포로부터 배아를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은

- (a) 대상체의 난소로부터 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 상기 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지 중으로 난모세포를 수집하는 단계와,
- (b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 상기 난모세포를 배양하는 단계와,
- (c) 보조 생식 기술에 의하여 상기 난모세포로부터 배아를 생산하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 난모세포의 세포 내 cAMP 생산을 증가시키는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제제는 포스포콜린인 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 난모세포의 세포 내 cAMP의 분해를 저감시키는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은 난모세포를 리간드에 노출시켜 상기 난모세포의 성숙을 유도하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 리간드의 농도는 상기 난모세포의 cAMP 유발성 감수분열 어레스트 (arrest)를 극복하는 것인 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 리간드는 여포 자극 호르몬 (FSH)인 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 FSH의 농도는 10 mIU/ml를 초과하는 것인 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 리간드는 표피 성장 인자 (EGF)인 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 EGF의 농도는 1 ng/ml을 초과하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 상이한 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제는 IBMX인 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 실로스트아미드인 것

인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 포스포디에스터레이즈 억제제 및 제2 포스포디에스터레이즈 억제제는 동일한 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 보조 생식 기술은 시험관 내 수정을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 배아는 인간 배아인 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 시험관 내 수정은 난모세포 수집 후 24시간을 초과하여 일어나는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 배아는 소 배아인 것인 방법.

청구항 19

난모세포의 시험관 내 성숙 방법으로서, 상기 방법은

(a) 대상체의 난소로부터 제1 포스포디에스터레이즈 억제제 및 상기 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지 중으로 난모세포를 수집하는 단계와,

(b) 제2 포스포디에스터레이즈 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 상기 난모세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제제는 상기 난모세포 내 cAMP의 생산을 증가시키는 것인 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 제제는 포스콜린인 것인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 제제는 상기 난모세포의 세포 내 cAMP의 분해를 저감시키는 것인 방법.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은 상기 난모세포를 리간드에 노출시켜 상기 난모세포의 성숙을 유도하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 리간드의 농도는 상기 난모세포의 cAMP 유발성 감수분열 어레스트를 극복하는 것인 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 리간드는 여포 자극 호르몬 (FSH)인 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 FSH의 농도는 10 mIU/ml를 초과하는 것인 방법.

청구항 27

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 리간드는 표피 성장 인자 (EGF)인 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 EGF의 농도는 1 ng/ml을 초과하는 것인 방법.

청구항 29

제19항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 상이한 것인 방법.

청구항 30

제19항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제는 IBMX인 것인 방법.

청구항 31

제19항 내지 제30항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 실로스트아미드인 것인 방법.

청구항 32

제19항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 동일한 것인 방법.

청구항 33

난모세포 성숙 배지로서, 상기 배지는

(a) 포스포디에스테라아제 억제제와,

(b) 난모세포 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하고,

상기 난모세포 성숙 배지 중의 상기 리간드 농도는 상기 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트 (arrest)를 극복하는 농도인 성숙 배지.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 포스포디에스테라아제 억제제는 실로스트아미드인 것인 난모세포 성숙 배지.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 리간드는 FSH인 것인 난모세포 성숙 배지.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 FSH의 농도는 10 mIU/ml를 초과하는 것인 난모세포 성숙 배지.

청구항 37

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 리간드는 EGF인 것인 난모세포 성숙 배지.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 EGF의 농도는 1 ng/ml을 초과하는 것인 난모세포 성숙 배지.

청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 배지는 인간 난모세포 성숙 배지인 것인 난모세포 성숙 배지.

청구항 40

제33항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 배지는 소 난모세포 성숙 배지인 것인 난모세포 성숙 배지.

청구항 41

다음의 성분을 포함하는 배합물:

(a) 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 난모세포 수집 배지, 및

(b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하는 난모세포 성숙 배지,

여기에서 상기 난모세포 성숙 배지 중의 상기 리간드 농도는 상기 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트 (arrest)를 극복하는 농도인 것이다.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 수집 배지 및 상기 성숙 배지는 인간 난모세포의 수집용 및 성숙용으로 사용되는 것인 배합물.

청구항 43

제41항에 있어서, 상기 수집 배지 및 상기 성숙 배지는 소 난모세포의 수집용 및 성숙용으로 사용되는 것인 배합물.

청구항 44

난모세포의 성숙을 유도하는 방법으로서, 상기 방법은

포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하는 성숙 배지에서 난모세포를 배양하는 단계를 포함하고,

상기 성숙 배지 중의 상기 리간드 농도는 상기 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트 (arrest)를 극복하고, 이로써 상기 난모세포를 성숙시키는 것인 방법.

청구항 45

감수분열 어레스트 (arrest) 상태에 있는 난모세포의 성숙을 유도하는 방법으로서, 상기 방법은

감수분열 어레스트를 극복하기에 충분한 농도의 리간드와 난모세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제19항 내지 제32항, 제44항 및 제45항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은 보조 생식 기술의 일부인 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 보조 생식 기술은 시험관 내 수정을 포함하는 것인 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 국제 특허 출원은 2009년 5월 14일 출원된 미국 가출원 61/178,318호로부터 우선권을 주장하며, 그 내용은 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0002] 발명의 분야

[0003] 본 발명은 일반적으로 난모세포의 수집 및 성숙 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 시험관 내에서, 개선된

수집 배지 및 성숙 배지를 이용하는 방법에 관한 것이고, 이는 수정 전 난모세포의 성숙을 촉진한다.

배경 기술

- [0004] 포유류에서, 미성숙 난자 (난모세포)는 난소 내 여포에서 성장하고 발달한다. 미성숙 난모세포는 체성 과립막 세포 (somatic granulosa cell)와 대사적으로 커플링되어 있는데, 이것은 난모세포를 둘러싸고 배란 전까지 난모세포의 발생을 육성한다. 난모세포의 성숙은 근본적으로 그 동반자인 체성 과립막 세포와의 연계에 의존적인데 체성 과립막 세포는 그 성장과 발달을 보조할 뿐만 아니라 감수분열의 진행을 조절한다.
- [0005] 전배란기 (pre-ovulatory) 발생 중 난모세포의 세포질 성숙 및 핵의 성숙은 밀접하게 관련되어 있는 과정이지만, 성공적인 수정, 배아의 발생 및 아마도 배아의 착상 능력, 궁극적으로 임신 결과에 중요한 분화적으로 구별되는 과정이다.
- [0006] 세포질 발생 중, 난모세포의 직경은 실질적으로 $\sim 15 \mu\text{m}$ 에서 $100 \mu\text{m}$ 까지 증가하며, 부피로는 300배 증가에 해당한다. 이 단계에서 난모세포는 전사 및 번역 양자에 있어 매우 활성이다. 예컨대, 마우스의 성숙한 난모세포는 평균적인 체세포보다 ~ 200 배 많은 RNA와 ~ 50 - 60 배 많은 단백질을 함유한다. 난모세포 내 mRNA의 양도 역시 많은데, 체세포의 ~ 2 - 3% 와 비교하여 ~ 15 - 20% 의 양이다.
- [0007] 난모세포의 핵 발생은 생식선 자극 황체 형성 호르몬 급증 후 일어나고, 핵막의 해체, 염색체 밀집 후 적도판에 도열 및 방추체에 미세소관 조직을 수반한다.
- [0008] 현재 서구 국가의 상당수 아이들이 보조 생식 기술, 예컨대 시험관 수정 방법 (*in vitro* fertilization, IVF)을 이용하여 태어난다. IVF는 일반적으로 여성의 난소를 자극하여 성장하는 다수의 여포를 생산시키고, 배란을 준비하고 있는 이들 성장중인 커다란 여포로부터 난자를 수집하며, 수집된 난자와 정자를 시험관 내에서 접촉시켜 결과물인 배아를 자궁으로 도입하는 형태를 취한다. 난모세포의 체외 성숙 (*in vitro* maturation, IVM)은 IVF의 부속요법이며, 이는 치료 도중 생식선 자극 호르몬 투여의 필요성을 현저히 저감시킨다. IVM은 생식선 자극 호르몬을 저수준으로 투여받거나 심지어 전혀 투여받지 않은 환자의 작은 여포로부터 난자를 수득하는 것을 수반한다. 난자를 수득하기 위하여 사용되는 방법은 수정된 환자 관리 시스템 및 난자 선별 과정을 필요로 한다.
- [0009] 표준 IVF 과정에 사용되는 생식선 자극 호르몬의 다량 투여는 난소 과자극 증후군 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS) 질환을 야기할 수 있고, 이는 IVF 사이클에 임한 여성들 중 대략 5% 에서 발생한다. OHSS는 보통 약하고 자가 제한적이다. 몇몇 경우에, 긴급한 의료적 주의가 필요하다. 심한 경우, 이 질환은 입원, 수액 요법, 진통제 및 기타 의약을 필요로 하며 잠재적으로 생명을 위협할 수 있다. 드문 경우에 다리의 혈전으로부터 폐색전증 또는 심한 탈수증이라는 합병증이 야기될 수 있다.
- [0010] 다낭성 난소 증후군 질환을 앓는 여성들은 생식선 자극 호르몬, 또는 임의의 기타 난소 여포 자극제의 투여로 야기되는 난소 과자극 증후군을 피하기 위하여 IVF보다는 IVM을 필요로 한다. 또한, IVM은 불임 치료 도중 여포 자극을 최소화하는 것을 선호하는 여성들에게 적용된다. IVM은 그것이 약물 투여를 덜 필요로 하는 이유로도 환자들에게 더욱 편리하고, 이는 보통 환자들 자신에 의해서도 시행된다. 또한 IVM은 약물 사용 비용이 최소화되기 때문에 비용적 이익도 있다.
- [0011] 그럼에도 불구하고, 임신 및 정상 출산 확립에 있어서 IVM의 효율은 IVF와 비교하여 낮다. 최근 환자 관리에 다소 개선이 있어 왔지만, 실험실 기술은 거의 진전하지 않았다.
- [0012] 동물 배아의 시험관 생산 (*in vitro* production, IVP)은 다양한 목적을 가진다. 예컨대 가축 및 가축 종의 유전적 개량, 희귀종의 유전적 구조, 및 예컨대 유성 정자로부터 유성 배아의 생산, 또는 체세포 핵 이식에 의한 클로닝 등 조작용 플랫폼 기술 등이 있다. 시험관 내 배아 생산에 있어서 본질적인 기술은 시험관 내 난모세포의 성숙 (IVM)에 있다. IVP는 (인간의 임상적 적용과 유사하게) 생식선 자극 호르몬 처리를 필요로 하는 다수의 배란과 수정관 이식 (multiple ovulation and embryo transfer, MOET) 등 현재의 종래 기술들을 대체할 잠재력을 가지고 있다. 그러나, 이식 가능한 단계의 배아 생산의 효율이 낮고, 뒤이어 이러한 배아의 배아 이식의 결과가 좋지 않고, 뒤이어 이러한 배아의 동결 및 해동 (저장) 결과도 좋지 않게 되므로 번식 및 기타 용도로 IVP를 채택하는 것이 저해되고 있다.
- [0013] 따라서, 난모세포를 배양하는 새로운 방법 및 배지가 필요하다. 특히, 난모세포를 수집하고 성숙시켜 보조 생식 기술을 개선시키기 위한 새로운 방법 및 배지가 특별히 필요하다.
- [0014] 본 명세서의 어떠한 선행 기술에 대한 참조도 이 선행 기술이 임의의 국가에서 일반적인 상식을 이루는 것이라

는 시사 또는 지식이 아니며, 그렇게 받아들여져서는 아니된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0015] 발명의 요약

[0016] 본 발명은 난모세포의 시험관 내 배양 배지 및 그 구성 성분의 연구로부터 비롯된 것이며, 이것은 일단 난소로부터 수확된 난모세포의 성숙을 증진시키는 것이다.

[0017] 한 가지 관점에서, 본 발명은 보조 생식 기술에 의하여 난모세포로부터 배아를 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은

[0018] (a) 대상체의 난소로부터 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지 중으로 난모세포를 수집하는 단계와,

[0019] (b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 상기 난모세포를 배양하는 단계와,

[0020] (c) 보조 생식 기술에 의하여 상기 난모세포로부터 배아를 생산하는 단계를 포함한다.

[0021] 또 다른 관점에서, 본 발명은 난모세포의 시험관 내 성숙 방법을 제공하고, 상기 방법은

[0022] (a) 대상체의 난소로부터 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지 중으로 난모세포를 수집하는 단계와,

[0023] (b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 상기 난모세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0024] 또 다른 관점에서, 본 발명은 난모세포 성숙 배지를 제공하고, 상기 배지는

[0025] (a) 포스포디에스테라아제 억제제와,

[0026] (b) 상기 난모세포 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하고,

[0027] 상기 난모세포 성숙 배지 중의 상기 리간드 농도는 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트 (arrest)를 극복하는 농도이다.

[0028] 또 다른 관점에서, 본 발명은 다음의 성분을 포함하는 배합물을 제공한다.

[0029] (a) 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 난모세포 수집 배지와,

[0030] (b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제 및 상기 난모세포의 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하는 난모세포 성숙 배지를 포함하고,

[0031] 상기 난모세포 성숙 배지 중의 상기 리간드 농도는 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트를 극복하는 농도이다.

[0032] 또 다른 관점에서, 본 발명은 난모세포의 성숙을 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하는 성숙 배지에서 난모세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 성숙 배지 중의 상기 리간드 농도는 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트를 극복하는 농도이고, 이로써 상기 난모세포를 성숙시키는 것이다.

[0033] 또 다른 관점에서, 본 발명은 감수분열 어레스트 상태에 있는 난모세포의 성숙을 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 감수분열 어레스트를 극복하기에 충분한 농도의 리간드와 상기 난모세포를 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0034] 도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 프리-IVM 단계 중에 프리-IVM (pre-IVM) 말기의 전체 COCs (온전한 난구를 가지는 난모세포)의 cAMP 함량에 대한 IBMX (500 μ M)의 부존재시(A) 또는 존재시(B) 포스콜린 (forskolin) 투여량 증가의 효과를 나타내는 그래프들이다.

[0036] 도 2는 포스콜린 및 IBMX의 농도를 증가시키며 배양했을 때 COC cAMP에 대한 프리-IVM 시간의 효과를 입증하는

그래프이다.

- [0037] 도 3은 난모세포 (그들의 온전한 난구 외피를 보유한 채로 수집 및 배양된 난모세포 (COCs) 및 시험 전 탈피된 난모세포 (DO)) 내부의 cAMP 함량에 대한 프리-IVM 시간의 효과를 나타내는 그래프이다.
- [0038] 도 4는 두 가지 상이한 유형의 난모세포: (A) 그들의 온전한 난구 외피를 보유한 채로 수집되고 시험된 난모세포 (COCs) 및 (B) COC로 수집되었으나 시험 전 그들의 난구 외피를 탈피시킨 난모세포 (DO)의 cAMP 함량에 대한 다양한 프리-시험관 내 성숙 (pre-IVM) 단계 처리군들의 시간에 따른 효과를 나타내는 그래프들이다.
- [0039] 도 5는 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에서 난구난모세포복합체 (cumulus-oocyte complexes)를 배양한 후 난모세포의 자발적 성숙 (GV/GVBD)에 대한 효과를 보여주는 그래프이다.
- [0040] 도 6은 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에서 배양된 난구난모세포복합체의 난핵포 (GV) 형태에 대한 효과를 보여주는 일련의 차트이다.
- [0041] 도 7은 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에서 난모세포를 배양한 후 난모세포-난구세포 간극연접 교신에 대한 효과를 나타내는 그래프이다.
- [0042] 도 8은 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에 노출된 난구난모세포복합체 (COCs)의 감수분열 성장 유도에 대한 여포 자극 호르몬 (FSH)의 효과를 나타내는 차트이다.
- [0043] 도 9는 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에 노출된 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 보여주는 그래프이다.
- [0044] 도 10은 제3형 PDE 억제제의 존재하 여포 자극 호르몬 (FSH) 유발성 난모세포 성숙에 대한 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제의 효과를 보여주는 그래프이다.
- [0045] 도 11은 IVM 단계 진행 중 20 μ M 실로스트아미드 존재하에서 난모세포를 성숙시켰을 때 난모세포 발생능에 대한 IBMX의 효과 및 포스콜린 투여량 증가의 효과를 증명하는 그래프들이다.
- [0046] 도 12는 난모세포 발생능 (즉, 배반포기로의 난할 및 발생)에 대한 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에 존재하는 cAMP 조절 체계의 효과를 요약한 두 가지 그래프들을 보여준다.
- [0047] 도 13은 배반포 세포수에 대한 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에 존재하는 cAMP 조절 체계의 효과를 나타내는 그래프이다.
- [0048] 도 14는 난모세포의 시험관 내 성숙 전 프리-IVM 단계 (COC 수집 및 선별을 포함하는 2시간) 중 시험관 내 배양된 cAMP(B)와 비교하여, 말의 융모성 생식선 자극 호르몬 (eCG) 및 인간의 융모성 생식선 자극 호르몬 (hCG) 유발성 난모세포 성장으로 유도된 여포 성장 후 마우스의 난구난모세포복합체 (COCs)의 생체내 cAMP 농도들(A) 간의 비교 결과를 보여주는 그래프들이다.
- [0049] 도 15는 제3형 PDE 억제제 (실로스트아미드; 1 μ M(A) 또는 0.1 μ M(B))의 존재하에 성숙된 마우스의 난구난모세포복합체 (COCs)의 감수분열 성숙을 유도하기 위한 FSH의 투여량 증가의 효과를 나타내는 그래프들이다.
- [0050] 도 16은 난모세포 감수분열 성숙을 완결하는데 소요되는 시간에 대한 프리-IVM 및 IVM 중 cAMP 조절체의 효과를 보여주는 그래프이다.
- [0051] 도 17은 배양 18시간 및 22시간 후, 유도 IVM 또는 자발적 IVM 중 어느 하나에서 성숙시킨 마우스 COCs의 감수분열 성숙을 보여주는 그래프이다.
- [0052] 도 18은 난할률 (제2일)(A) 및 배반포 비율 (제5일)(B)로 측정된 바 난모세포의 발생능에 대한, 시험관 내 성숙 중인 마우스 난모세포 (유도 IVM 또는 자발적 IVM 중 어느 하나의 IVM 18시간 또는 22시간 동안)의 효과를 증명하는 두 가지 그래프들이다.
- [0053] 도 19는 마우스의 배반포 질에 대하여 유도 IVM과 비교한 자발적 IVM의 효과를 보여주는 그래프들이다.
- [0054] 도 20은 마우스 난모세포 발생능에 대한 프리-IVM 단계 및 IVM 단계 중 상이한 cAMP 조절체를 사용한 효과를 나타내는 그래프이다.
- [0055] 도 21은 생체 내에서 유도 IVM 또는 자발적 IVM에 의하여 성숙시킨 마우스 난모세포의 발생능을 보여주는 그래프들이다.

- [0056] 도 22는 생체 내에서 유도 IVM 또는 자발적 IVM에 의하여 성숙시킨 난모세포로부터 유래한 배아로 착상시킨 마우스에서의 임신 결과에 대한 (A-C) 및 태아 발생에 대한 (D-E) 유도 IVM의 효과를 보여주는 그래프들을 제공한다.
- [0057] 도 23은 종래 IVF (생체 내 성숙된 난모세포) 및 표준의 자발적 IVM과 비교한 유도 IVM의 핵심 개념 및 태아 생상시 이들 세 가지 방법의 상대적 효율을 요약한 도면이다.
- [0058] **발명의 일반적인 설명**
- [0059] 본 명세서에서 "포함하다" ("comprise", "comprises", "comprised" 또는 "comprising")라는 용어가 사용되는 경우, 언급되는 특징, 정수, 단계 또는 성분의 존재를 명시하지만 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 성분 또는 이들의 군의 존재를 배제하지는 않는 것으로 해석되어야 한다.
- [0060] 본 명세서에서 사용되는 바, 단수형 ("a", "an" 및 "the")은 문맥상 명백히 달리 기술되지 않는 한 복수형을 포함한다.
- [0061] 수치 범위가 표현된 경우, 이 범위는 그 범위 중 상한 및 하한, 그리고 이들 한계 사이의 모든 수치를 포함하는 것으로 명백히 이해된다.
- [0062] 본 발명은 시험관 내 난모세포의 개선된 수집 및 성숙 방법에 관한 것이다. 수확된 난모세포를 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포 및/또는 난모세포와 결부되어 있는 난구세포의 세포 내 cAMP를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지에 위치시키고, 뒤이어 성숙 배지도 역시 포스포디에스테라아제 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 배양함으로써 다양한 종, 예컨대 인간 및 소(牛) 종의 난소로부터 수확된 난모세포의 성숙이 현저히 증진된다는 것을 알게 되었다. 보조 생식 기술에 있어서, 상기 개선된 방법은 난모세포의 성숙도가 생식 사이클 중 자연적으로 발생하는 성숙도와 가까워질 때까지 난모세포의 수정을 지연시킨다 (공지의 배지에서 수집된 난모세포의 성숙도와 비교한 경우).
- [0063] 따라서, 제1 관점에 있어서 본 발명은 보조 생식 기술에 의하여 난모세포로부터 배아를 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0064] (a) 대상체의 난소로부터 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지 중으로 난모세포를 수집하는 단계와,
- [0065] (b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 상기 난모세포를 배양하는 단계와,
- [0066] (c) 보조 생식 기술에 의하여 상기 난모세포로부터 배아를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0067] 또한, 제2 관점에 있어서 본 발명은 난모세포의 시험관 내 성숙 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0068] (a) 대상체의 난소로부터 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 수집 배지 중으로 난모세포를 수집하는 단계와,
- [0069] (b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제를 포함하는 성숙 배지에서 상기 난모세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0070] 전술한 바와 같이, 보조 생식 기술의 성공은 상당 부분 수정 전 난모세포의 성숙도에 달려있다. 난소로부터 수확된 난모세포는 배양액에 위치하게 되면 통상적으로 자발적인 감수분열의 재개, 즉 핵 성숙으로 진행하게 된다. 이 핵 성숙은 종종 난모세포가 세포질 성숙을 완료하기 전에 일어난다. 궁극적으로 이것이 수정 및 아마도 뒤이어 일어나는 배아 착상과 발생의 성공에 영향을 주는 것으로 여겨진다.
- [0071] 이런 점에서, "난모세포"라는 용어는 난모세포 단독 또는 하나 이상의 다른 세포와 결부된 난모세포, 예컨대 난구난모세포복합체의 일부로서의 난모세포를 포함한다.
- [0072] 따라서, 제1 관점 및 제2 관점에 따른 본 발명의 방법은 대상체의 난소로부터 난모세포를 수집하기 위한 배지, 본 발명에서 "난모세포 수집 배지", "수집 배지" 또는 이들을 변화시켜 언급하기도 하는 배지를 이용하고, 이것은 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함한다.
- [0073] 또한, 제1 관점 및 제2 관점에 따른 본 발명의 방법은, 뒤이은 수집된 난모세포의 배양 및 성숙을 위한 배지, 본 발명에서 "난모세포 성숙 배지", "성숙 배지" 또는 이들을 변화시켜 언급하기도 하는 배지를 이용하고, 이것은 제2 포스포디에스테라아제 억제제를 포함한다.
- [0074] 전술한 바와 같이, 수집 배지 및 성숙 배지 양자 모두 포스포디에스테라아제 억제제를 함유한다. 포스포디에스

터레이즈 억제제가 수집 배지 및 성숙 배지에 존재하고, 수집 배지에 난모세포 세포 내 cAMP를 증가시키는 제제가 더 존재하면 수확된 난모세포가 자발적인 감수분열 재개로 진행되는 것을 저해하는 이점을 제공한다. 그러므로 각각의 배지는 핵 성숙 전에 난모세포의 세포질 성숙을 촉진하고 그 후 수정 과정이 시작된다.

- [0075] "포스포디에스터레이즈 억제제"는 포스포디에스터레이즈 (PDEs)를 직접 또는 간접적으로 막거나 억제하는 제제를 의미하는 것으로 이해되고 그 작용은 3'-포스포디에스테르 결합을 가수분해함으로써 환식 뉴클레오티드 표적 (예컨대, cAMP 및 cGMP)의 불활성화를 일으켜, 특정 환식 뉴클레오티드의 피동적인 축적이라는 결과를 가져오는 것이다. 억제제는 모든 포스포디에스터레이즈 이형체 (isoform)에 대하여 비선택적이거나 특정 이형체에 대하여 선택적일 수 있다.
- [0076] "포스포디에스터레이즈 이형체"는 세포 내 2차 전달자인 cAMP 및 cGMP의 대사 또는 분해를 담당하는 동질 효소 (isozyme) 또는 이형체족을 말한다. 특정 이형체는 고도로 선택적으로 세포 내 및 세포 하위 기관에 위치할 수 있다. 포스포디에스터레이즈 이형체의 예로는 PDE3 및 PDE4를 들 수 있다.
- [0077] 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 PDE 억제제는 자연에 존재하는 선택적 또는 비선택적인 임의의 비독성 PDE 억제제를 포함한다. PDE 억제제는 단백질, 항체, 앵타머 (aptamers), 안티센스 핵산, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNAs, 폴리펩티드, 펩티드, 소분자, 약물, 다당류, 당단백질 및 지질의 형태일 수 있다. 예컨대, 적절한 PDE 억제제는 이소부틸메틸잔틴 (IBMX), 실로스트아미드, 테오필린, AH-21-132, Org-30029 (Organon), Org-20241 (Organon), Org-9731 (Organon), 자르다베린, 빈포세틴, EHNA (MEP-1), 밀리논, 시구아조단, 자프리카스트, SK+F 96231, 톨라펜트린 (Byk Gulden), 및 필라미나스트 (Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 기타 PDE 억제제들도 이 기술 분야에 알려져 있다.
- [0078] 수집 배지의 PDE 억제제 ("제1 PDE 억제제")는 성숙 배지의 PDE 억제제 ("제2 PDE 억제제")와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0079] 한 가지 실시 상태에 있어서, 수집 배지의 PDE 억제제는 IBMX이다.
- [0080] 또 다른 실시 상태에 있어서, 성숙 배지의 PDE 억제제는 실로스트아미드이다.
- [0081] 한 가지 특정 실시 상태에 있어서, 수집 배지의 PDE 억제제는 IBMX이고 성숙 배지의 PDE 억제제는 실로스트아미드이다.
- [0082] 전술한 바와 같이, 수집 배지는 수집된 난모세포의 세포 내 cAMP 수준 또는 농도를 증가시키는 제제 및/또는 난모세포와 결부된 난구세포의 cAMP 수준 또는 농도를 증가시키는 제제도 역시 함유한다. 이 제제는 난모세포 및/또는 난모세포와 결부된 난구세포 내에서 cAMP 합성 또는 생산을 증가시키거나, 그 분해를 감소시키거나, 또는 양자 모두에 의하여 직접 또는 간접적으로 그렇게 할 수 있다. cAMP 합성, 생산 또는 분해의 수준을 측정하는 방법이 이 기술 분야에 알려져 있다.
- [0083] 한 가지 실시 상태에 있어서, cAMP의 합성 또는 생산은 미처리 난모세포와 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배 또는 100배 이상 증가될 수 있다. 유사하게, 또 다른 실시 상태에 있어서, cAMP의 분해는 미처리 난모세포와 비교하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상 감소될 수 있다.
- [0084] 세포 내 cAMP 수준 또는 농도를 증가시키는 제제는 단백질, 항체, 앵타머 (aptamers), 안티센스 핵산, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNAs, 폴리펩티드, 펩티드, 소분자, 약물, 다당류, 당단백질 및 지질의 형태일 수 있다. 예컨대, cAMP의 합성 또는 생산을 증가시키는 제제로는 아데닐 사이클레이즈의 활성화제, 예컨대 포스콜린 등을 들 수 있다. cAMP의 분해를 감소시키는 조절자의 예로는 테오필린 등의 포스포디에스터레이즈 억제제들을 들 수 있다. 한 가지 실시 상태에 있어서, 세포 내 cAMP 수준 또는 농도를 증가시키는 제제는 포스콜린, 침습성 아데닐레이트 사이클레이즈 및 프로스타글란딘 E₂ 중 1종 이상이다.
- [0085] 본 발명의 제1 관점 및 제2 관점에 따른 방법은 난모세포의 핵 성숙을 유도하는 리간드에 상기 난모세포를 노출시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 리간드의 농도는 상기 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트를 극복하기에 충분한 농도이다.
- [0086] 상기 리간드는 상기 난모세포 성숙 배지의 성분으로서 포함될 수도 있고, 또는 개별 성분 또는 상기 난모세포가 접촉하는 개별 배지의 일부일 수 있다. 후자의 경우, 본 발명의 제1 관점 및 제2 관점에 따른 방법의 단계(b) 후에 상기 리간드가 첨가될 수 있다.

- [0087] 상기 리간드는 단백질, 항체, 앵타머 (aptamers), 안티센스 핵산, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNAs, 폴리 펩티드, 펩티드, 소분자, 약물, 다당류, 당단백질 및 지질의 형태일 수 있다. 예컨대, 상기 리간드는 여포 자극 호르몬 (FSH), 표피 성장 인자 (EGF) (EGF 유사 펩티드인 앵피레굴린 및 에피레굴린을 포함) 또는 이들의 기능적 이형체 등일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 1종 이상의 리간드가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다고 여겨진다.
- [0088] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 리간드는 FSH이다.
- [0089] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 FSH의 농도는 10 mIU/ml보다 높다. 예컨대, 상기 FSH의 농도는 10-200 mIU/ml의 범위일 수 있다.
- [0090] 추가적인 실시 상태에 있어서, 상기 리간드는 EGF이다.
- [0091] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 EGF의 농도는 1 ng/ml보다 높다.
- [0092] 본 발명의 제1 관점은 "보조 생식 기술"을 고려한다. 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 "보조 생식 기술"이라는 용어는 단리된 난모세포 및/또는 단리된 정자를 수반하는 인간과 동물의 임의의 수정 기술을 의미하는 것으로 이해되고, 예컨대 난모세포 또는 시험관 내에서 배양된 배아를 이용하는 기술 (예컨대, 난모세포의 시험관 내 성숙), 시험관 수정 (IVF; 난모세포의 흡입, 실험실에서의 수정 및 배아의 수여자에게로의 이식), 생식 세포 자궁관 내 이식 (GIFT; 난모세포와 정자를 자궁관 내로 배치), 접합자 나팔관 내 이식 (ZIFT; 수정된 난모세포를 나팔관 내로 배치), 배아 난관 내 이식 (TET; 난할중인 배아를 자궁관 내로 배치), 생식 세포 복강 내 이식 (POST; 난모세포와 정자를 복강 내로 배치), 세포질 내 정자 주입 (ICSI), 고환 정액 추출 (TESE) 및 미세 수술적 부고환 정자 흡입 (MESA), 또는 핵 이식, 단위생식 활성화 및 전분화세포의 사용 등 인간 및/또는 동물에서 배아를 생산하기 위한 임의의 시험관 내 기술 등을 들 수 있다.
- [0093] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 보조 생식 기술은 인간 배아를 생산하는데 사용된다.
- [0094] 또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 보조 생식 기술은 소 배아를 생산하는데 사용된다.
- [0095] 본 발명의 제1 관점 및 제2 관점에 따른 방법에 있어서, 우선 대상체의 난소로부터 난모세포가 수확 또는 수집된다. 난모세포 수집은 이 기술 분야에 오랫동안 알려진 표준 기술에 따라 시행될 수 있다. 예컨대, 보조생식에 대한 교과서인 [Laboratory and Clinical Perspectives (2003) Editors Gardner, D.K., Weissman, A., Howles, C.M., Shoham, Z. Martin Dunits Ltd, London, UK]; 및 [Gordon, I. (2003) Laboratory Production of Cattle Embryos 2nd Edition CABI Publishing, Oxon, UK]를 참고할 수 있다.
- [0096] 대부분의 난모세포 수집 기술은 질식 초음파 (transvaginal ultrasound)를 이용하여 난소의 여포에 흡입 바늘을 삽입하는 것을 수반한다. 흡입 바늘은 물질 수집 트랩과 튜브로 연결되어 있고, 차례로 수집 트랩은 수동으로 조작되는 시린지 또는 전기 기계적 진공원 (vacuum source) 등의 석션부와 연결되어 있다. 난모세포는 통상적으로 다수의 여포로부터 단리된다. 이로써, 수확된 난모세포는 그 발생적 잠재력에 있어서 이중 개체군을 대표한다.
- [0097] 본 발명의 방법의 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 보조 생식 기술은 IVF를 포함한다. IVF는 시험관 내 난모세포의 수정에 관한 것이고, 여기서 상기 난모세포는 대상체로부터 단리되고 상기 난모세포가 수정되도록 액체 배지에서 배양된 것이다.
- [0098] 상기 나타낸 바와 같이, 적절한 여성으로부터 난모세포를 수집하고 시험관 내에서 난모세포를 수정시키는 방법은 잘 알려져 있다. 난모세포의 수정이 이상적으로 24시간을 초과하여 이루어질 수 있지만 60시간을 넘지 않는다는 것이 고려되고, 난모세포 수집 단계 후, 이러한 난모세포의 성숙도는 IVF 방법에서의 이후 과정의 성공을 최대화할 수 있는 충분한 단계에 있게 된다.
- [0099] 통상적으로, 난모세포는 35-39°C에서 15-120분간 수집 배지에서 유지된다. 그 후 난모세포는 통상적으로 적절한 기체 혼합물을 함유하는 37-39°C 배양기의 성숙 배지에서 20-60시간 배양된다. 적절한 기체 혼합물로는 공기 또는 생물학적 활성을 유지하는 분압의 O₂와 N₂의 혼합물과 균형을 맞춘 CO₂ (1-10 부피%)로 이루어지는 기체 혼합물을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0100] 난모세포는 그 후 16 내지 60시간 동안 성숙을 위하여 성숙 배지에서 유지되고, 통상적으로 24-50시간, 어떤 경우에는 28-44시간 동안 성숙된다.

- [0101] 성숙 시간이 종마다 상이할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 일반적으로 성숙 시간은 이들 시스템에서 감수 분열의 중기 II에 이르기까지의 시간일 것이고, 이렇게 성숙 시간은 통상적으로 감수분열의 중기 II에 도달하는 정중시간 (median time)을 기준으로 12시간 전부터 18시간 후까지이다. 적절한 시간은 감수분열의 중기 II에 도달하기 3시간 전부터 6시간 후까지이다. 예컨대, 소에 대하여 세팅하는 경우 IVM 시간은 일반적으로 중기 II까지의 감수분열 진행을 특이적으로 억제하는 화합물의 부재하에서 18-24시간의 범위이다.
- [0102] 인간에 대하여 세팅하는 경우, 상기 IVM 시간은 일반적으로 30시간을 초과하고, 보통 대부분 30-50시간이다.
- [0103] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 인간의 IVM 시간은 36시간 이상이고, 예컨대 36-48시간이다.
- [0104] 한 가지 특정 실시 상태에 있어서, 상기 인간의 IVM 시간은 40시간 이상이고, 예컨대 40-48시간이다.
- [0105] 한 가지 특정 실시 상태에 있어서, 상기 인간의 IVM 시간은 48시간 이상이고, 예컨대 48-50시간이다.
- [0106] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 "대상체"라는 용어는 인간 여성 또는 포유류 암컷을 포함하는 임의의 여성을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 적절한 포유류의 예로는 영장류, 가축 동물 (예컨대, 말, 소, 양, 돼지 또는 염소), 반려 동물 (예컨대, 개 또는 고양이), 실험실 시험 동물 (예컨대, 마우스, 쥐 또는 기니피그) 또는 수의학적 또는 경제적으로 중요한 임의의 동물을 들 수 있다.
- [0107] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 대상체는 보스 인디쿠스 (*Bos indicus*) 소이다. 또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 대상체는 보스 타우루스 (*Bos taurus*) 소이다.
- [0108] 본 발명의 이러한 관점 또는 다른 관점에 있어서, 상기 난모세포는, 예컨대 여포의 일부인 난모세포, 난구난모세포복합체 (COC)의 일부 또는 탈피 (denuded) 난모세포일 수 있다.
- [0109] 본 발명의 방법의 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 대상체는 인간 여성이고, 상기 난모세포는 인간의 난모세포이며, 상기 배아는 인간 배아이다.
- [0110] 본 발명의 방법의 또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 대상체는 소이고, 상기 난모세포는 소의 난모세포이며, 상기 배아는 소의 배아이다.
- [0111] 포스포디에스테라아제 억제제, 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제 및 난모세포의 핵 성숙을 유도하는 리간드가 난모세포 성숙 배지 등의 난모세포 배양 배지에서 보충제로서 사용될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다.
- [0112] 따라서, 본 발명의 제3 관점에 있어서,
- [0113] (a) 포스포디에스테라아제 억제제와,
- [0114] (b) 상기 난모세포의 핵 성숙을 유도하기 위한 리간드
- [0115] 를 포함하는 난모세포 배양 배지가 제공된다.
- [0116] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 난모세포 배양 배지는 난모세포 성숙 배지이다.
- [0117] 본 발명의 제4 관점에 있어서,
- [0118] (a) 포스포디에스테라아제 억제제와,
- [0119] (b) 상기 난모세포의 핵 성숙을 유도하기 위한 리간드
- [0120] 를 포함하고, 상기 난모세포 성숙 배지에서 상기 리간드의 농도는 상기 난모세포의 cAMP-유발성 어레스트를 극복하는 농도인 난모세포 성숙 배지가 제공된다.
- [0121] 일부 실시 상태에 있어서, 본 발명의 제3 관점 또는 제4 관점에 따른 성숙 배지 내의 상기 포스포디에스테라아제 억제제는 지금까지 설명한 바와 같을 수 있다. 한 가지 특정 실시 상태에 있어서, 상기 포스포디에스테라아제 억제제는 실로스트아미드일 수 있다.
- [0122] 일부 실시 상태에 있어서, 본 발명의 제3 관점 또는 제4 관점에 따른 상기 리간드는 지금까지 설명한 바와 같을 수 있다. 특정 실시 상태들에 있어서, 상기 리간드는 FSH 또는 EGF일 수 있다. 상기 각 리간드의 농도는 지금까지 설명한 바와 같을 수 있다.
- [0123] 본 발명의 제3 관점 및 제4 관점의 일부 실시 상태에 있어서, 상기 난모세포 성숙 배지는 인간의 난모세포 성숙

배지 또는 소의 난모세포 성숙 배지이다.

- [0124] 제5 관점에 있어서, 본 발명은 이하의 성분,
- [0125] (a) 제1 포스포디에스테라아제 억제제 및 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함하는 난모세포 수집 배지와,
- [0126] (b) 제2 포스포디에스테라아제 억제제 및 상기 난모세포의 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하는 난모세포 성숙 배지를 포함하고,
- [0127] 상기 난모세포 성숙 배지 중의 상기 리간드 농도는 상기 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트를 극복하는 농도인 배합물을 제공한다.
- [0128] 본 발명의 이러한 관점의 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 제제는 상기 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시킨다. 예컨대, 이 제제는 포스포콜린일 수 있다. 또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 제제는 상기 난모세포의 세포 내 cAMP 분해를 저감시킨다.
- [0129] 일부 실시 상태에 있어서, 상기 성숙 배지 중의 상기 리간드는 FSH 또는 EGF이다. 상기 FSH의 농도는 일반적으로 10 mIU/ml보다 높고 상기 EGF의 농도는 일반적으로 1 ng/ml보다 높다.
- [0130] 본 발명의 제5 관점의 일부 실시 상태에 있어서, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제와 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 상이하다. 예컨대, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제는 IBMX일 수 있고 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 실로스트아미드일 수 있다.
- [0131] 일부 실시 상태에 있어서, 상기 제1 포스포디에스테라아제 억제제와 상기 제2 포스포디에스테라아제 억제제는 동일하다.
- [0132] 일부 실시 상태에 있어서, 본 발명의 난모세포 수집 배지 및 성숙 배지, 또는 이들의 배합물은 본 발명의 방법 중 임의의 어느 하나에 따라 사용될 수 있다. 예컨대, 그들은 인간 또는 소의 난모세포의 수집 및 성숙을 위하여 사용될 수 있다.
- [0133] 또한, 본 발명의 난모세포 수집 배지는 대상체의 난소로부터 난모세포를 수확하는 과정 중에 난모세포를 세척(flushing, washing) 및 유지하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0134] 상기 난모세포 수집 배지는 NaCl, KCl, Mg_2SO_4 , KH_2PO_4 , Ca[젖산염], $NaHCO_3$, 아미노산과 유도체, 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 글루코오스, 피루브산 및 항체 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 상기 배지는 지금까지 설명한 바와 같이 PDE 억제제와 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 제제를 포함한다.
- [0135] 일부 실시 상태에 있어서, 상기 난모세포 수집 배지의 상기 PDE 억제제는 IBMX이다. 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 IBMX의 농도는 5-5000 μM 의 범위이다. 일반적으로 상기 농도는 50-1000 μM 의 범위이다.
- [0136] 일부 실시 상태에 있어서, 상기 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 증가시키는 상기 제제는 포스포콜린이다. 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 포스포콜린의 농도는 1-2000 μM 의 범위이다. 일반적으로 상기 농도는 10-200 μM 의 범위이다.
- [0137] 본 발명의 난모세포 성숙 배지는 수집된 난모세포를 수정 전의 물리적 단계로 성숙하게 하는데, 이는 생체 내에서 생식 사이클의 배란기에 난소로부터 방출된 난모세포의 성숙을 자극한다.
- [0138] 대상체의 난모세포 성숙 호르몬 불내증(intolerance) 때문에 시험관 내에서 대상으로부터 수집한 난모세포에 상기 호르몬을 처리해야 할 필요가 있는 경우가 바로 이러한 배지의 적용이 필요할 수도 있는 상황의 일례이다. 본 발명은 24시간 이상 성숙 배지에서 난모세포를 유지하는 것을 고려하나, 60시간을 넘지는 않고, 이후 난모세포를 수집하여 수정 전 발생을 촉진하게 된다.
- [0139] 난모세포 성숙 배지는 NaCl, KCl, Mg_2SO_4 , KH_2PO_4 , Ca[젖산염], $NaHCO_3$, 아미노산과 유도체, 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 글루코오스, 피루브산 및 항체 중 1종 이상을 포함할 수 있고 PDE 억제제를 포함한다. 또한, 성숙 배지는 난모세포의 핵 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함할 수 있는데, 여기서 배지 중 리간드의 농도는 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트를 극복하는 농도이다. 그러나, 전술한 바와 같이, 난모세포 성숙 배지가 리간드를 함유할 필요는 없는 것으로 이해되고, 리간드는 독립적인 성분일 수 있고, 또는 독립적인 배지의 일부일 수도 있다.

- [0140] PDE 억제제 및 리간드는 지금까지 설명한 바와 같다.
- [0141] 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 성숙 배지 중의 PDE 억제제는 실로스트아미드이다. 일반적으로, 실로스트아미드는 0.01-100 μM 범위의 농도로 사용되고, 통상 0.01-50 μM 의 범위이다. 소에 대하여 세팅한 실시예에서는, 적절한 농도는 10-30 μM 사이이고, 인간에 대하여 세팅한 실시예에서는 0.1-1.0 μM 이다.
- [0142] 또 다른 특정 실시 상태에 있어서, 상기 난모세포의 핵 성숙을 유도하는 리간드는 FSH 및/또는 EGF이고, 상기 FSH 및 EGF의 농도는 각각 10 mIU/ml 및 1 ng/ml를 초과하고, 각각 500 mIU 및 50 ng/ml 미만이며, 종기로는 각각 50 mIU 및 5 ng/ml 초과이고, 각각 200 mIU 및 20 ng/ml 미만이다.
- [0143] 본 발명의 난모세포 수집 배지 및 성숙 배지와, 이들의 배합물의 성분은 적절한 용기에 (종기로는 멸균된), 예컨대 다용도이거나 유닛형인 앰플, 병 또는 바이알에 독자적으로 포장될 수 있다. 용기는 충전된 후 밀폐될 수 있다. 상기 성분들은 단리형 또는 정제형 또는 반정제형일 수 있고 안정성을 위하여 및/또는 상기 성분을 사용을 위하여 추가적인 첨가제를 함유할 수 있다. 여러 가지 성분들을 포장하기 위한 방법들이 이 기술 분야에 알려져 있다.
- [0144] 본 발명의 수집 배지 및 성숙 배지와 이들의 배합물은 인간에게 사용하기 위한 것만이 아니라, 다른 포유류의 난모세포와 배아를 배양하기 위하여도 적합하다. 그러므로, 본 발명은 인간의 보조 생식 기술용으로 응용될 수 있을 뿐 아니라, 비인간 포유류의 보조 생식 기술 및 비인간 포유류에서 배아를 생산하는 기타 기술들, 예컨대 단위생식적 활성화에의 용도, 체세포 핵 이식 및 전분화 줄기세포에의 용도로도 역시 응용될 수 있다.
- [0145] 본 발명의 제6 관점은 난모세포 성숙을 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 포스포디에스테라아제 (PDE) 억제제 및 난모세포의 성숙을 유도하기 위한 리간드를 포함하는 성숙 배지에서 상기 난모세포를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 성숙 배지 중 상기 리간드의 농도는 상기 난모세포의 cAMP-유발성 감수분열 어레스트를 극복하는 농도로서, 이에 따라 상기 난모세포를 성숙시키는 것이다.
- [0146] 본 발명의 이러한 관점에 따른 PDE 억제제 및 리간드와 이들의 농도는 지금까지 설명한 바와 같을 수 있다. 본 발명의 이러한 관점의 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 포스포디에스테라아제 억제제는 실로스트아미드이다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 리간드는 FSH 또는 EGF이다. 일반적으로, FSH의 농도는 10 mIU/ml를 초과하고 EGF의 농도는 1 ng/ml를 초과한다.
- [0147] 제7 관점에 있어서, 본 발명은 감수분열 어레스트 상태인 난모세포의 성숙을 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 감수분열 어레스트를 극복하기에 충분한 농도의 리간드와 상기 난모세포를 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0148] 본 발명의 이 관점의 한 가지 실시 상태에 있어서, 상기 감수분열 어레스트는 cAMP 유발성이다. 본 발명의 이 관점에 따른 리간드와 이들의 농도는 지금까지 설명한 바와 같을 수 있다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 리간드는 FSH 또는 EGF이다. 일반적으로, FSH의 농도는 10 mIU/ml를 초과하고 EGF의 농도는 1 ng/ml를 초과한다.
- [0149] 본 발명의 제2, 제6 및 제7 관점의 한 가지 실시 상태에 따르면, 상기 방법은 보조 생식 기술의 일부이다. 예컨대, 상기 보조 생식 기술은 시험관 수정 방법을 포함한다.
- [0150] 본 발명의 상기 일반적인 이론을 구체화하는 실험적 실시예들이 하기에 참조될 것이다. 그러나, 이하의 설명은 상기 발명의 상세한 설명의 일반성을 제한하는 것이 아니다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에서 제공되는 교시의 결과 명백한 임의의 모든 변형을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0151] 실시예 1
- [0152] 소의 난모세포 성숙 동력학에 있어서 난모세포 수집 배지 및 성숙 배지 중의 cAMP 조절 제제의 효과
- [0153] 난모세포의 질은 배아 발생에서 중요한 역할을 한다. 예컨대, 본 발명자들은 생체 내에서 성숙된 난모세포가 시험관 내에서 성숙시킨 난모세포보다 높은 배반포 비율을 나타낸다는 것을 보여준다.
- [0154] 불행히도, 현재의 시험관 내 성숙 기술은 차선이다. 생체 내에서, 난모세포의 발생 능력은 여포의 성장 및 발생 중에 점차 획득된다. 그러나, 본 발명자들은 여포로부터 회수된 난모세포가 자발적으로 감수분열 어레스트를 극복할 수 있고, 이로부터 세포질이 완전히 성숙되기 전에 중기 II로 진행할 수 있다는 것을 보여준다.
- [0155] 미성숙 난모세포는 여포로부터 단리된 후에 감수분열을 재개할 수 있지만, 세포질 성숙은 핵 성숙보다

뒤쳐진다. 본 발명자들은 미성숙 난모세포가 세포질 성숙을 완결할 시간을 더 허락함으로써 시험관 내의 난모세포 발생 능력이 향상될 것이라고 추정한다.

[0156] 난모세포의 발생 능력을 향상시키는 가능한 전략은, 그들이 감수분열을 재개하게 하기보다는 긴 시간 동안 시험관 내에서 감수분열 어레스트를 유지하도록 하는 것이다. 이론에 얽매일 필요 없이, 본 발명자들은 이러한 지연이 난모세포로 하여금 세포질의 변화 (예컨대, mRNA 및 단백질의 저장, 형태적 변화, 초구조적 재구성)를 수행할 시간을 부여하고 후속 보조 생식 응용법에 사용되는 개시 단계의 미성숙 난모세포의 동조화(synchronize)를 증진시킬 수 있게 한다는 가설을 세웠다.

[0157] 이에 관하여, 본 발명자들은 소 난모세포의 세포 내 cAMP 수준, 난구난모세포 간극연접 교신, 핵 성숙 및 배아 발생과 같은 난모세포 성숙 동력학에 관하여, 수집 배지 및 처리 (성숙) 배지에 cAMP 조절 체제를 포함시키는 효과를 시험하였다.

[0158] 재료 및 방법

[0159] 달리 설명하지 않는 한, 모든 화학 물질과 시약은 시그마 (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다.

[0160] 난모세포 수집 및 선별 - 프리-시험관 내 성숙 (pre-IVM) 단계

[0161] 소의 난소를 지역 도살장으로부터 수집하여 따뜻한 식염수 (30-35℃)에 담아 실험실로 이송시켰다. 하루에 수집된 모든 난소를 모아 무작위로 사용하였다. 18-게이지 바늘과 10 ml 주사기를 사용하여 흡입하기 위한 동난포 (antral follicle) (직경 2 내지 8 mm)를 선택하였다. 난모세포를 그들의 온전한 난구 외피를 유지한 채로 (COCs) 흡입하였다. COC 일부는 실험 전 그들의 난구 외피를 탈피시켰다 (DO). 흡입 및 그 후의 선별 과정을 (프리-IVM 단계) 난모세포 (COCs 및 DOs)가 처리되는 다양한 배지 ("프리-IVM 단계 배지" 또는 "프리-IVM 배지")에서 2시간 동안 수행하였다. 이들은 난포액 또는 두 가지 수집 배지에서 난모세포를 처리하는 단계를 포함하였다. 난모세포 흡입 및 선별을 위한 수집 배지는 (1) 50 µg/ml 젠타마이신과 0.2 mg/ml 무지방산 소혈청알부민 (FAF-BSA; ICPbio Ltd, Auckland, NZ)으로 보충된 소의 난모세포 수집 배지 ("Bovine VitroMat", Cook Australia, Eight Mile Plains, QId, Australia); 또는 (2) 두 가지 cAMP 조절제, 이류하여 아데닐레이트 사이클레이즈 활성화제, 포스콜린 (100 µM)과, 비특이 PDE 억제제, 3-이소부틸 1-메틸잔틴 (IBMX) (500 µM)으로 보충된 동일한 배지를 포함하였다.

[0162] 밀리몰 스톡 농도의 cAMP 조절제를 무수 디메틸-설폭사이드 (DMSO)에 용해시켜 -20℃에 저장하였다. 조절제를 함유하는 용액을 각 실험을 위하여 새로 희석하였다.

[0163] 프리-IVM 단계의 마지막에, 5겹의 세포층보다 많은 수의 조밀한 난구 외피를 보유하고, 균일하게 색소화된 세포질을 보유하는 온전한 COCs를 해부 현미경으로 선택하였다. 시험관 내 성숙 (IVM) 전에, COCs를 각각 프리-IVM 단계 배지에서 2회 세척하고, IVM 배지에서 2회 세척하였다 (아래 참조).

[0164] 시험관 내 성숙 (IVM) 단계의 난모세포

[0165] IVM 단계용으로 사용되는 난모세포 성숙 기본 배지 ("IVM 배지" 또는 "IVM 단계 배지"라고도 부름)는 소의 성숙 배지 (Bovine VitroMat, Cook Australia), 소의 난포액 이온 조성을 근사하게 모사하도록 제조된 배지이다. 표시된, 제3형 PDE 특이적 억제제 실로스트아미드 (20 µM; Biomol Plymouth Meeting, PA) 또는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 카이네이즈 억제제, AG1478 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA)를, DMSO에 용해시켜 -20℃에 저장시킨 밀리몰 스톡 용액으로부터의 IVM 배지에 첨가하였다. 모든 IVM 처리군은 0.1 IU/ml의 여포 자극 호르몬 (FSH) (Puregon, Organon, Oss, Netherlands)으로 보충되었다. COCs를 미리 평형 상태로 만든 미네랄 오일로 덮힌 300 µl의 배지에서 배양하고 습윤 공기 5% CO₂, 39℃에서 배양하였다.

[0166] 시험관 수정 및 배아 배양

[0167] IVM 24시간 또는 30시간 후에, COCs를 Bovine VitroWash (Cook Australia)로 2회 세척하고, 페니실라민 (0.2 mM; Sigma), 하이포타우린 (0.1 mM; Sigma) 및 헤파린 (2 mg/ml; Sigma)으로 보충된 시험관 수정 (IVF) 배지 (Bovine VitroFert, Cook Australia)를 포함하는 수정 접시 (insemination dishes)로 옮겼다. 임신 (fertility)이 증명된 한 마리 보증 종모우(保證種牡牛)의 냉동 정액을 수정에 사용하였다. 간단히, 해동된 정액을 불연속 (45% : 90%) 피클 구매 위에 넣고 700 g에서 20-25분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 정자 펠렛을 500 µl의 Bovine VitroWash로 세척한 후 200 g에서 5분간 추가로 원심분리하였다. 정자를 IVF 배지 (Bovine VitroFert)에 재현탁하고, 그 후 수정 배지 (Bovine VitroFert, 0.01 mM 헤파린, 0.2 mM 페니실라민

및 0.1 mM 하이포타우린으로 보충)에 1×10^6 정자/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 습윤 공기 6% CO₂, 39°C에서 24시간 동안 COCs를 COC당 IVF 배지 10 μ l 밀도에서 수정시켰다. 수정 23-24시간 후 부드럽게 파이펫팅하여 COCs를 수득하고, 5개의 추정 접합자를 미리 평형 상태로 만든 Cook Bovine VitroCleave 배지 (Cook Australia) 20 μ l로 옮겨 N₂로 균형을 맞춘 7% O₂, 6% CO₂, 38.5°C에서 5일간 (제1일 부터 제5일까지) 미네랄 오일 조건하에서 배양하였다. 제5일에는, 그룹 5-6의 배아들을 미리 평형 상태로 만든 Bovine VitroBlast (Cook Australia)로 옮겨 미네랄 오일로 덮고 38.5°C에서 제8일까지 배양하였다. 제8일에 배아의 질을 문헌 [Stingfellow and Seidel, 1998, Manual of the International Embryo Transfer Society. In. (IETS: Savoy, IL, USA)]에 제시된 정의에 따라 평가하였고, 숙련된 소 발생학자에 의하여 독립적으로 어림 (blinded)시험 수행하였다.

[0168] 배반포 분화 염색

[0169] 배반포를 37°C에서 0.5% 프로네이즈 내에 넣어 투명층을 제거한 후, 인산염 완충 식염수 (PBS/PVA) 중의 4 mg/ml 폴리 비닐 알코올 (PVA)로 간단하게 세척하였다. 그 후 투명층이 없는 배반포를 4°C에서 10분간 PBS/PVA 중의 10 mM 트리니트로벤젠 술폰산으로 배양하였다. 이후 배반포를 0.1 mg/ml 항-디니트로페놀-BSA 항체 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 37°C에서 10분간 배양한 후, 요오드화프로포듐을 함유하는 기니 피그 혈청에 37°C에서 5분간 두었다. 배반포를 세척하고 10 μ g/ml의 요오드화프로포듐에 37°C에서 5분간 둔 후 (영양외배엽을 염색하기 위하여), 100% 에탄올 중의 4 μ g/ml 비스벤즈이미드 (Hoechst 33342; Sigma-Aldrich)에 4°C에서 밤새 두었다 (내부세포괴 (ICM) 및 영양외배엽 모두를 염색하기 위하여). 그 후, 배반포를 PBS 중의 80% 글리세롤에 넣어 현미경 슬라이드 상에 완전히 올리고 커버슬립을 매니큐어로 봉하였다. 이후에 자외선 필터와 부착 디지털 카메라가 장착된 형광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 으로 400X에서 배반포를 관찰하여 내부세포괴 (ICM) 핵은 푸르게 보이고 영양외배엽 (TE) 핵은 분홍색으로 염색된 총세포수와 구획 세포수를 측정하였다.

[0170] 세포 내 cAMP의 측정

[0171] COCs와 탈피 난모세포 (DOs), 즉 COCs로 배양되었으나 시험 전에 그들의 난구 외피가 탈피된 것들의 환식 AMP 함량을, 종래 문헌 [Reddoch *et al.*, 1986, *Endocrinology* 119: 879-886]에 기재되고 인준된 방사 면역 측정법을 이용하여 측정하였다. 종말점 시간 후에, 6-10개의 COCs 및 21-24개의 DOs를 VitroCollect (Cook Australia)에서 세척하고, 0.5 ml의 에탄올 (100%)로 옮겨 -20°C에 저장하였다. cAMP를 측정하기 전에, 시료를 30초간 불택성 교반하고, 그 후 4°C에서 15분간 3000 g에서 원심분리하였다. 간단히, 상층액을 수집, 증발, 시험 완충액 (50 mM 아세트산나트륨, pH 5.5)에 재현탁하고 트리에틸렌아민 (AJAX Chemicals, Sydney, Australia)과 아세트산 무수물 (BDH Laboratory Supplies, Poole, England) 2:1 v/v를 첨가하여 아세틸화한다. cAMP는 적당히 희석한 후에 2회 측정되었다. 시료에 ¹²⁵I-표지된 cAMP (비방사능 2175 Ci/mM) 및 cAMP 항체 (전술한 Reddoch *et al*에 의하여 제조) 를 첨가하여 4°C에서 밤새 두었다. 다음날, 차가운 100% 에탄올 1 ml를첨가하고 시료를 3000 g에서 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 펠렛을 건조하여 감마 계수기로 계수하였다. 농도를 알고 있는 시료를 2회 측정하여 표준 곡선을 만드는데 사용하였다 (4-1024 fmol cAMP).

[0172] 난모세포 핵 형태 평가

[0173] 배양 중기에, COCs를 탈피시키고 난모세포를 PBS 중의 4% 파라포름알데히드 (pH 7.4)에 30분간 고정시켰다. 그 후 난모세포를 0.1% 시트르산나트륨 중의 0.1% 트리톤 X-100에 1시간 동안 투과화되게 하여, 핵 물질용 형광 염료인 0.001% 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI)로 옮겨 15분간 두었다. 난모세포를 PBS+0.03% BSA에서 3회 세척하고, 슬라이드에 올려 Olympus 형광 현미경을 사용하여 400X에서 핵 상태를 평가하였다. 공지의 기술 [Chohan and Hunter, 2003, *Anim. Reprod. Sci.* 76: 43-51]에 기초하여 난핵포 (GV)와 그 후의 감수분열 발생기를 평가하였다. 간단하게, 소 난모세포의 GV 염색질을 GV I - 인과 핵막 주위의 압축된 필라멘트형 염색질; GV II - 인을 둘러싼 필라멘트형 염색질; GV III - 필라멘트형 염색질 피가 핵 내에 분포하고 인은 사라짐; GV IV - 염색질이 하나의 두꺼운 피로 압축; 초기 이동기 - 단일한 덩어리로 염색질이 압축되기 시작; 이동기 - 단일한 덩어리로 염색질 압축; 중기 I - 스핀들에 4분 염색체가 도열; 및 중기 II - 중기 염색질 및 염색질 함유 소형 극체가 뚜렷함.

[0174] 난모-난구 세포 간극연접 교신 시험

[0175] 종래 문헌 [Thomas *et al*, 2004, In "*Biol. Reprod.*", pp 1142-1149]에 기재된 바와 같이 난모세포로의 칼세인

이동의 정량적 형광 현미경 관찰로 난구 난모 세포 간극연접 교신 (GJC)을 측정하였다. 실로스트아미드 ($20 \mu\text{M}$)의 존재 또는 부존재하 프리-IVM 단계 2시간 후 또는 그 후 IVM 단계의 추가 3시간 후에 GJC를 측정하였다. 각 4회의 반복 실험으로 각 처리 그룹에 평균 10-12개의 난모세포를 사용하였다. 배양 후, 폴리 비닐 알코올 (PVA; 0.3 mg/ml)로 보충된 BSA-무함유 Bovine VitroCollect (Cook Australia)에서 새로 제조된, $1 \mu\text{M}$ 칼세인-AM (3',6'-디(0-아세틸)-2',7'-비스[N,N-비스(카르복시메틸) 아미노 메틸]-플루오레세인, 테트라아세톡시 메틸 에스테르; C-3100; 분자 탐침; Eugene, OR, USA) 용액으로 COCs를 옴겼다. COCs를 안료와 함께 15분간 배양하고, 그 후 칼세인-AM-무함유 Bovine VitroCollect (Cook Australia)에서 3회 세척함으로써 혼입되지 않은 안료를 제거하고 난구세포로부터 난모세포로 이동시키기 위하여 추가 25분간 배양하였다. 형광 미세 광측정 전에, COCs를 격렬하게 파이펫팅하여 주위의 난구세포를 완전히 탈피시켜 오로지 간극연접을 통하여 수송된 후 탈피 난모세포 내에 갇히게 된 안료만을 측정하였다. 탈피 30분 내에, 난모세포 내 칼세인의 난모세포 내부 형광 방출을 형광측정 도립 현미경 (Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 측정하였다.

[0176] 통계 분석

[0177] 윈도우즈용 Prism 5.00 GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 이용하여 통계 분석을 수행하였다. 통계적 유의도를, ANOVA와 평균들 간의 개별적 차이점을 밝히기 위한 그 후의 Dunnett 또는 Bonferroni의 다중 비교 사후 검정으로 평가하였다. 모든 수치는 그들 평균의 해당 표준 오차 (SEM)과 함께 제공된다.

[0178] 결과

[0179] 프리-IVM 단계 중의 소 COCs 및 DOs의 cAMP 함량

[0180] 도 1 내지 도 4는 COCs와 난모세포의 cAMP 함량에 대한 다양한 프리-시험관 내 성숙 (pre-IVM) 단계 처리군의 시간에 따른 효과를 나타낸다. 도 1A에 나타난 바와 같이, 프리-IVM 2시간 후, 포스콜린은 COCs 내의 cAMP 수준을 투여량에 의존하여 현저히 상승시켰다 ($P < 0.05$). 난포액 대조군과 비교하여, 가장 높은 농도의 포스콜린 ($100 \mu\text{M}$) 농도만이 유사한 수치를 나타내었다. 그러나 $0.4 \mu\text{M}$ 또는 $2 \mu\text{M}$ 포스콜린 어느 것도 cAMP 수준에 있어서 어떠한 증가도 보여주지 못하였는데, 이는 대조군 처리 (cAMP 조절제를 함유하지 않는 수집 배지)와 크게 다르지 않다. IBMX와의 조합에서는, 포스콜린 농도의 증가함에 따라 투여량에 의존하여, IBMX 부존재 및 포스콜린이 단독으로 존재한 경우 관찰된 수준보다 20배의 cAMP 증가가 유도되었다 (도 1B). 그러므로, 포스콜린 또는 IBMX 단독은 cAMP 수준을 유지하는 시키지만 대조군보다 실질적으로 높게 상승시키지는 않는다.

[0181] 도 2의 실험의 목적은 COCs를 IBMX를 투여함과 동시에 포스콜린의 투여량을 증가시키면서 ($10\text{-}100 \mu\text{M}$) 함께 배양하는 경우 COC cAMP 수준에 대한 프리-IVM 시간의 효과를 시험하는 것이었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 대조군 그룹 (cAMP 조절제를 함유하지 않는 수집 배지)를 제외한 모든 처리 그룹에서 프리-IVM 시간 중에 COC cAMP 수준이 유지되었다. COCs를 단독으로 수집 배지에서만 배양한 경우, 30분 후 cAMP 수준은 14 fmol/COC 에서 4 fmol/COC 로 현저히 저하되었고 ($P < 0.05$), 배양 시간을 2시간까지 증가시키자 그와 함께 계속하여 현저히 저하되었다 (0.4 fmol/COC). COCs를 IBMX 또는 포스콜린 단독으로 처리하자 cAMP 수준이 2시간 동안 유지되었다. 그러나, COCs를 IBMX를 투여함과 동시에 포스콜린의 투여량을 증가시키면서 배양하였을 때 cAMP 수준이 20배까지 극적으로 유도됨을 알 수 있었고, 이러한 cAMP 수준의 증가는 배양 시간과는 무관함을 알 수 있었다. 최고 수준의 cAMP는 COCs를 IBMX와 $50 \mu\text{M}$ 또는 $100 \mu\text{M}$ 포스콜린 (대략 165 fmol/COC)의 존재하에 배양하였을 때임을 알 수 있었다. 대조군 그룹 (cAMP 조절제 무함유)을 제외하고 COC에서의 cAMP 증가에 있어서 시간의 효과는 없었다.

[0182] 도 3의 실험의 목적은 난모세포 (프리-IVM 이후 탈피된 COCs)에서 cAMP 수준 및 이들 수준이 cAMP 조절제의 존재하에 프리-IVM 단계에서 배양 시간을 늘림에 따라 어떻게 변화하는가를 시험하기 위한 것이었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군 (0.5 fmol/난모세포 , $P < 0.05$)과 비교하여 IBMX와 10 , 50 또는 $100 \mu\text{M}$ 포스콜린의 존재하에 COCs를 배양한 경우, 배양 30분 후, cAMP 수준이 현저히 높아졌다 (12 fmol/난모세포). 2시간 후, cAMP 수준은 대조군 (0.1 gmol/난모세포 , $P < 0.05$)과 비교하여 34 fmol/난모세포 까지로 더욱 현저하게 증가하였다. IBMX와 고농도의 포스콜린의 존재하에 프리-IVM 단계에서 배양 시간을 증가시키면 난모세포 내부의 cAMP의 실질적인 증가를 점진적으로 이끌어낼 수 있는 것으로 보인다.

[0183] 도 4는 온전한 COCs와 난모세포 내의 cAMP 함량에 대한 다양한 프리-시험관 내 성숙 (pre-IVM) 단계 처리군의 시간에 따른 효과를 보여준다: (A) 온전한 난구 외피를 가지는 난모세포 (COC)를 수집 및 시험; (B) COCs로 수집되었지만, 시험 전에 그들의 난구 외피를 제거한 난모세포 (DO). 순수한 난포액, 수집 배지 또는 cAMP 조절제 (포스콜린 및 IBMX)로 보충된 수집 배지 내에서 두 가지 유형의 난모세포를 수집하고 선별하였다. 처리 실험당

6-10개의 COCs 또는 21-24개의 DOs를 사용하여 3회 반복한 결과 난모세포당 또는 복합체당 cAMP의 평균 농도±SEM으로 수치를 표현하였다. 상이한 글자 (A, a, B, b 또는 c)로 표시한 동일한 그래프/난모세포 유형에 나타낸 평균들은 각각의 처리 또는 종말점 (양방향 ANOVA, $P < 0.05$) 간 현저히 상이한 cAMP 양을 나타낸다.

[0184] 도 4A에서 보여지는 바와 같이, 프리-IVM 단계 5분 후, cAMP 조절제의 존재하에 수집된 COCs의 cAMP 수준은 대조군, 즉 cAMP 조절제의 부재 또는 순수한 난포액 ($P < 0.0001$)보다 9배 높았다. cAMP 수준의 증가는 프리-IVM 단계 도중 (30분) 및 말기 (2시간)에 조절되었다. 난포액은 COCs에서 30분간 cAMP 수준을 유지시켰으나, 프리-IVM 단계 (20 ± 3 에서 10 ± 3 fmol/COC로) ($P < 0.05$)에서 그 수준은 저하되었다. cAMP 조절제 부재하에 수집된 COCs들에서는, 여포로부터 난모세포를 단리한 후 단시간에 (30분) cAMP 수준이 급격히 저하되었다 (15 ± 4 로부터 2 ± 1 fmol/COC로).

[0185] 난모세포 내부 cAMP 수준에 대한 주변 난구세포의 효과를 조사하기 위하여 탈피 난모세포 (DOs)를 사용하였다 (도 4B). 여포로부터 단리하고 5분 후 모든 처리군에서의 난모세포 내부 cAMP의 수준은 대략 0.9 ± 0.1 이었다. 프리-IVM 단계 배지에서 30분간 처리한 후, cAMP 조절제를 함유하여 처리된 난모세포 내의 cAMP 수준은 대조군보다 현저히 높았고 프리-IVM 단계 말기까지 계속하여 (2시간) 배양 시간에 따라 증가하였다 (16 ± 0.1). 난포액은 프리-IVM 전체 시간 동안 난모세포 내부 cAMP 수준을 유지시켰지만, cAMP 조절제 부재하에 수집된 난모세포에서는 세포 내 cAMP 수준이 30분 이내에 현저하게 저하되었고 프리-IVM 단계 말기까지 계속하여 저하되었다 (0.3 ± 0.2) ($P < 0.05$).

[0186] 자발적 난모세포 성숙 (GV/GVBD)에 대한 프리-IVM 단계에서의 cAMP 조절 제제 및 제3형 PDE 억제제의 효과

[0187] 도 5는 다양한 프리-시험관 내 성숙 (pre-IVM) 단계 배지 및 IVM 단계 배지에서 난구난모세포복합체를 배양한 후 자발적인 난모세포 성숙 (GV/GVBD)에 대한 효과를 나타낸다.

[0188] 소의 COCs를 프리-IVM 단계 배지에서 앞서 설명한 대로 배양하고, 뒤이어 FSH의 존재하, 실로스트아미드 ($20 \mu M$)의 존재 또는 부존재하에서 7시간 배양하였다. 그 후 난모세포를 고정시키고 감수분열 진행을 평가하였고, GV (무순상 난핵포-여진히 감수분열 어레스트 상태) 또는 GVBD (난핵포 붕괴-감수분열 재개)로 분류하였다. 4회 반복 실험에서 평균 45개의 난모세포가 각 처리 그룹과 시점에 사용되었다. 각 컬럼 위의 문자 (a 또는 b)는 ANOVA 분석과 그 후의 Bonferonni 사후 검정, $P < 0.05$ 로 측정된 평균값들 간의 통계적 차이를 나타낸다.

[0189] 도 5에서 보여지는 바와 같이, 대조군 (IVM에서 실로스트아미드(-))과 비교하여 IVM 단계 중의 배양 배지에 FSH 및 실로스트아미드를 포함시킨 것이 모든 프리-IVM 처리군들 중에서 GVBD 비율을 현저하게 낮추었다. 그러나, 배지에 실로스트아미드가 존재하지 않으면, 프리-IVM 동안 cAMP를 함유한 수집 배지에서 처리된 GVBD에 현저한 지연이 있는 난모세포들을 제외하고, 대부분의 난모세포가 GVBD를 개시하였다 ($P < 0.05$). 이들 결과는 본 발명자들로 하여금 프리-IVM 단계 말기와 IVM 단계 중의 GV 형태 변화를 조사하게 하였다 (이하 참조).

[0190] 난핵포 형태에 대한 프리-IVM 단계에서의 cAMP 조절 제제 및 제3형 PDE 억제제의 효과

[0191] 도 6은 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에서 배양된 난구난모세포복합체의 난핵포 (GV) 형태에 대한 효과를 보여준다. 난포액, 수집 배지 또는 cAMP 조절제 (포스폴린 및 IBMX)로 보충된 수집 배지를 포함하는 프리-IVM 단계 배지들에 난모세포를 노출시켰고(A), 그 후 제3형 PDE 억제제, 실로스트아미드 ($20 \mu M$), 더하여 여포 자극 호르몬의 존재(C; E) 또는 부존재(B; D)하에 연장 배양하였다. 그 후에 난모세포를 고정하고 2, 5 및 9시간에 GV 형태를 평가하였다. 4회 반복 실험에서 평균 40개의 난모세포가 각 처리 그룹과 시점에 사용되었다.

[0192] 도 6A에서 보여지는 바와 같이, 프리-IVM 단계 말기 (2시간)에, 난포액에서 배양되거나 ($61\% \pm 5$) 또는 cAMP 조절제로 보충된 수집 배지에서 배양된 ($67\% \pm 5$) ($P < 0.05$) 대부분의 난모세포는 GV II기에 있었다. 그러나, 수집 배지 단독으로 처리된 난모세포는 GV II 비율이 감소하였고 ($P < 0.05$) GV III로 진행하였다 ($66\% \pm 5$) ($P < 0.001$).

[0193] 5시간 후 (2시간의 프리-IVM 및 3시간의 IVM+실로스트아미드), 수집된 난모세포들은 IVM 배양 전에 이미 그 목적하는 GV기에 어레스트되어 있었다 (도 6C). 도 6B와 비교하였을 때, 이것은 IVM 배양의 개시 시간 중에 배양 배지에 FSH와 실로스트아미드가 존재하면 FSH가 단독으로 존재하는 배양 조건 (IVM-실로스트아미드)에서 배양된 COCs와 비교하여, COCs가 GV 형태를 통하여 진행하는 것을 저해한다는 것을 나타낸다. 도 6B에서 보여지는 바와 같이, 순수한 난포액에서 처리된 난모세포들이 GV III으로 진행 ($58\% \pm 8$)한 반면, cAMP 조절제 무함유 배양 배지에서 처리된 대부분의 난모세포는 GV III ($41\% \pm 10$) 또는 GV IV ($52\% \pm 12$) ($P < 0.05$)로 진행하였다. 놀랍게도, IVM 중에 배양 배지에 실로스트아미드가 존재하지 않은 경우에도, cAMP 조절제를 함유하여 처리하면

COCs는 여전히 GV II (55%±3)에서 어레스트되어 있었다 (도 6B, 오른쪽 컬럼).

[0194] 도 6E의 오른쪽 컬럼에서 보여지는 바와 같이, 난모세포 배양 9시간 후 (프리-IVM 2시간 및 IVM+실로스트아미드 7시간), cAMP를 함유하는 배지에서 처리된 COCs는 대부분의 COCs가 GV II (44±3%) 또는 GV III (42±3%)로의 성숙이 진행되었다. 이것은 대부분의 난모세포가 GV III (63±6)에 있는 순수한 난포액에서 선별된 난모세포들, 및 난모세포들이 GV IV (51%±10)(P<0.05)로 진행된 cAMP 조절제를 결여한 수집 배지에서 처리된 난모세포들과 비교되는 것이다 (도 6E, 각각 좌측 및 중앙 컬럼). 9시간 후 및 FSH만이 존재할 때 (IVM-실로스트아미드), cAMP 조절제로 처리된 대부분의 난모세포가 GV III기 (58%±4)로 진행한 반면 (도 6D, 우측 컬럼), 순수 난포액에서 처리되었던 대부분의 난모세포들은 이동기 (40%±4) 및 M I (38%±4)으로 진행하였다 (도 6D, 좌측 컬럼). 대조적으로, cAMP 조절제를 결여한 수집 배지로 처리된 난모세포 중 23%±6가 이동기에, 57%±5가 M I기로 진행하였다 (P<0.05) (도 6D, 중앙 컬럼).

[0195] 난모-난구세포 간극연접 교신에 대한 프리-IVM 및 IVM 진행 중 cAMP 조절 제제의 효과

[0196] 프리-IVM 단계 및 난모세포 배양 5시간 후 (프리-IVM 2시간 및 IVM+실로스트아미드 3시간)에 난모-난구세포 간극연접 교신 (GJC) 실험을 수행하였다. 도 7의 컬럼 1 내지 3에서 보여지는 바와 같이, 프리-IVM 단계 말기 (2시간)에, 난모세포와 난구세포 간의 간극연접 교신의 수준은 대략 형광 세기 1000 (난모세포를 흡입하여 cAMP 조절제로 보충된 수집 배지에서 처리한 경우)에서 대략 400 및 600 (난모세포를 흡입하여 각각 난포액 또는 cAMP 조절제 무함유 수집 배지에서 처리)로 현저하게 감소하였다 (P<0.05) .

[0197] 게다가, COCs를 순수한 난포액 또는 cAMP 조절제 무함유 수집 배지에서 수집한 경우, IVM 배양 3시간 후 (프리-IVM 단계 후)에 간극연접 교신 수준은 극적으로 감소하였다. 예외는 프리-IVM 단계 중에 cAMP 조절제로 보충된 수집 배지에서 처리된 COCs 뿐이었고, IVM 도중 실로스트아미드의 존재 또는 부존재와는 무관하였다 (P<0.05) (도 7, 컬럼 4-9). 배양 배지 중 FSH (및 실로스트아미드의 존재 또는 부존재)의 포함 여부는 난모세포와 그 주위의 난구세포 간 간극연접 교신에 아무런 효과를 미치지 못하였다.

[0198] 도 7의 각 컬럼 위의 문자 (a, b, g, h 또는 x)는 ANOVA 분석과 그 후의 Bonferonni 사후 검정으로 측정된 평균값들 간의 통계적 차이를 나타낸다.

[0199] M II기로 난모세포 감수분열 진행에 대한 프리-IVM 단계에서의 cAMP 조절 제제 및 제3형 PDE 억제제의 효과

[0200] 도 8은 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에 노출된 난모난모세포복합체 (COCs)의 감수분열 성숙 유도에 대한 여포 자극 호르몬 (FSH)의 효과를 보여준다. 앞서 설명했던 바와 같이, 난모세포를 흡입하고 2시간 동안 난포액, 수집 배지 또는 100 μM 포스콜린 (FSK)과 500 μM IBMX로 보충된 수집 배지에서 선별하였다. 그 후 FSH의 부재(A) 또는 존재(B)하에 2 가지 배지 (+/- 실로스트아미드)에서 COCs를 배양하였다. 이후에 난모세포를 고정시키고 20, 24 및 28시간에 감수분열 진행을 평가하였다. 4회 반복 실험에서 평균 45개의 난모세포가 각 처리 그룹과 시점에 사용되었다.

[0201] 도 8A에서 보여지는 바와 같이, FSH 부재시, 실로스트아미드 처리는 프리-IVM 배지 중 cAMP 조절제가 존재하지 않든 간에 IVM 24시간에 난모세포의 M II기로의 감수분열 진행 (50%)을 지연시킨다. 그러나, IVM 20시간에는, 난모세포가 cAMP 조절제를 결여한 수집 배지에서 처리되었을 때 36%±4의 난모세포가 M I기에 있다는 점과 비교할 때, 프리-IVM 단계에서 난모세포가 cAMP 조절제로 보충된 수집 배지에서 처리되었을 때는 83%±7의 난모세포가 M I기에 있었다 (도 8A, 각각 컬럼 9과 컬럼 3).

[0202] 도 8B에서 보여지는 바와 같이, FSH 존재시, 난모세포의 M II기로의 진행을 지연시키는 데 있어서 실로스트아미드의 억제효는 IVM 배지에 FSH가 제공됨으로써 중단된다. 예컨대, 실로스트아미드가 존재하고 FSH는 존재하지 않을 때는 GV기의 난모세포를 관찰할 수 있는 반면 (도 8A), IVM 배지에 FSH가 존재하면 이러한 난모세포는 관찰되지 않는다. 흥미롭게도, IVM+실로스트아미드 처리 20시간 후에는, 난모세포가 수집 배지 단독으로만 처리되었을 때 21%±4의 난모세포가 M I기에 있는 것과 비교하여 (도 8B, 컬럼 3), 그들이 프리-IVM 단계 중에 cAMP 조절제로 보충된 수집 배지로 처리되었을 때 72%±5의 난모세포가 M I기에 있었다 (도 8B, 컬럼 9).

[0203] 프리-IVM 단계 및 IVM 단계 후 난모세포 중의 세포 내 cAMP 농도

[0204] 도 9는 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에 노출시킨 난모세포의 세포 내 cAMP 농도를 보여준다. 난모세포는 실험 전에 우선 그들의 난구 외피가 탈피되고 (DOs), 그 후 세 가지 상이한 프리-IVM 단계 배지 (난포액, 수집 배지 단독, 100 μM 포스콜린 (FSK)과 500 μM IBMX로 보충된 수집 배지)에서 수집되고 조작된 후, 제 3형 PDE 억제제 실로스트아미드 (20 μM)의 존재 또는 부재하에 24시간 동안 연장 배양되었다. 4회 반복한 실험

결과는 DO당 평균 cAMP 수준 $\pm$ SEM을 나타낸다. 각 측정은 24개의 DO에 대하여 실시되었다. 각 컬럼 위의 문자 (a, b, c 또는 d)는 ANOVA 분석과 그 후의 Dunnett 사후 검정으로 측정된 평균값들 간의 통계적 차이를 나타낸다.

[0205] 도 9에서 보여지는 바와 같이, 난모세포를 프리-IVM 중에 cAMP 조절제로 보충된 수집 배지에서 수집하고 처리하였을 때, 배양 24시간 후 DOs의 세포 내 cAMP 농도는 유의하게 높게 남아 있었고 (순수한 난포액 또는 cAMP 조절제를 결여한 수집 배지에서 배양된 것들과는 반대로), 제공된 실로스트아미드도 배양 배지 중에 존재하였다.

[0206] 제3형 PDE 억제제 (실로스트아미드)의 존재하에 FSH-유발성 난모세포 성숙에 대한 표피성장인자 수용체 카이네이즈 억제제의 효과

[0207] 도 10에서 보여지는 바와 같이, 난모세포의 감수분열 진행에 대한 실로스트아미드의 억제효는 배양액에 FSH를 첨가함으로써 중단된다. 그러므로, 예컨대 EGFR 카이네이즈 억제제, AG1478이 이러한 패턴의 성숙에 영향을 미칠지를 시험함으로써 FSH-유발성 성숙 (감수분열 유도)이 표피성장인자 수용체 (EGFR)에 대한 항혈청에 의하여 억제되는지 여부를 시험하는 것이 관심사였다.

[0208] 이러한 점에서, 도 10은 FSH (100 mIU), PDE 억제제 실로스트아미드 (20 μ M)의 존재 및 EGFR 억제제 AG1478의 투여량을 증가시키는 조건하에서 여포 자극 호르몬 (FSH)-유발성 난모세포 성숙에 대한 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제의 효과를 보여준다. 그 후 난모세포를 고정시키고 24시간에 감수분열 진행을 평가하였다. 3회 반복 실험에서 평균 40개의 난모세포가 각 처리 그룹과 시점에 사용되었다. 각 컬럼 위의 문자 (a, b 또는 c)는 ANOVA 분석과 그 후의 Dunnett 사후 검정으로 측정된 평균값들 간의 통계적 차이를 나타낸다.

[0209] 도 10에서 보여지는 바와 같이, IVM 배지에 AG1478의 투여량을 증가시키면서 첨가하자 성숙 비율이 현저히 감소되었고 (>80%으로부터 대략 5%)($P<0.05$), 그럼으로써 유도 반응을 완전히 억제하였다. 이것은 FSH-유발성 난모세포 성숙에 있어서 EGF 신호전달이 필요하다는 것을 나타낸다.

[0210] 배반포로의 난할 및 발생에 대한 프리-IVM 단계 및 IVM 단계 중의 cAMP 조절 제제의 효과

[0211] 표 1에서 보여지는 바와 같이, 난모세포가 FSH의 존재하에 표준 IVM 배지에서 24시간 동안 성숙되었을 때, 프리-IVM 단계 중 수집 배지에 cAMP 조절제가 포함되면 조절제 부재시와 비교하여 난할률이 증가하고 (각각 $89\pm 2.0\%$ 대 $78\pm 2\%$, $P<0.05$), 배반포 발생을 향상시킨다 ($32\pm 3\%$ vs. $26\pm 3\%$, $P<0.05$).

표 1

[0212]

프리-IVM 처리	난모세포수	난할률 %	난할된 배반포 %
난포액	186	89.5 ± 1.4^a	38.5 ± 5.7^a
수집 배지	205	77.8 ± 3.6^b	26.5 ± 4.0^b
수집 배지 +cAMP 조절제	200	88.5 ± 1.9^a	32.0 ± 2.1^{ab}

[0213] 주: 동일한 컬럼 내에 상이한 위첨자인 a, b 수치는 통계적으로 유의적인 차이 ($P<0.05$)를 나타낸다. 수치들은 (평균 $\pm$ SEM)으로 표현되었다.

[0214] 도 8에서 이미 보여진 바와 같이, 프리-IVM 단계 중에 cAMP 조절제로 난모세포를 전처리하고, IVM 배지에 실로스트아미드를 포함시키면 FSH의 존재와 더불어 4시간까지 난모세포의 M II 개시를 지연시킨다. 그러므로, 난구 난모세포복합체 (COCs)를 난포액, 수집 배지 또는 100 μ M 포스콜린 (FSK)과 500 μ M IBMX로 보충된 수집 배지에서 2시간 동안 흡입하고 선별하였다. 그 후, 실로스트아미드 (20 μ M)의 존재하에 FSH를 첨가하여 24시간 또는 30시간 동안 COCs를 성숙시켰다. 그 다음, 시험관 내 수정 후 난모세포 발생능을 평가하였고, 제8일에 난할률과 배반포 비율로써 배아 발생을 평가하였다. 4회 반복 실험에서 평균 45개의 난모세포가 각 처리 그룹에서 사용되었다. 각 컬럼 위의 문자 (a, b, x, y 또는 z)는 ANOVA 분석과 그 후의 Bonferonni 사후 검정으로 측정된 평균값들 간의 통계적 차이를 나타낸다. 표 2는 배반포 형성 비율에 관한 본 연구의 결과를 제공한다.

표 2

수집 단계	IVM	성숙 시간	배반포 %
CM	대조군	24	27%
CM	+실로스트아미드	24	22%
CM	+ 실로스트아미드	30	29%
난포액	대조군	24	39%
난포액	+ 실로스트아미드	24	38%
난포액	+ 실로스트아미드	30	61%
CM + cAMP 조절제	대조군	24	32%
CM + cAMP 조절제	+ 실로스트아미드	24	48%
CM + cAMP 조절제	+ 실로스트아미드	30	69%

주: CM-수집 배지

도 11A는 IVM 전에 30-60분간 IBMX와 50 또는 100 μ M 포스콜린의 존재하에 배양된 난모세포의 난할률이, IBMX가 단독으로 존재하거나 또는 대조 처리군에서 배양된 난모세포의 그것보다 현저히 빠르다는 것을 보여준다 ($P<0.05$). 배반포기로의 발생 (도 11B)은 대조 처리군과 비교하여, IVM 전에 30-60분간 IBMX와 50 또는 100 μ M 포스콜린의 존재하에 배양된 난모세포에서도 유사하게 향상되었다 ($P<0.05$). 게다가, 배반포기로의 발생률은 IBMX 단독 또는 IBMX와 10 μ M 포스콜린 그룹간에 유의적 차이를 나타내지 않았으나, 대조군 (cAMP 조절제 불포함) 보다는 현저히 높았다 ($P<0.05$). 그러므로, IVM 전에 난모세포 내 cAMP 수준을 증가시키면 실로스트아미드의 존재하에 COCs를 성숙시킬 때 발생 결과에 있어서 실질적인 향상이 있게 된다.

도 12A에서 보여지는 바와 같이, 24시간에, 난포액 또는 cAMP 조절제로 보충된 수집 배지에서 전처리된 난모세포의 난할률은 대략 80%인데, 이것은 프리-IVM 단계 중 cAMP 조절제의 부재하에 수집된 난모세포 (67%)($P<0.05$)보다 현저히 높은 것이다. 게다가, 도 12B에서 보여지는 바와 같이, 배반포로의 발생률도 역시 프리-IVM 배지에 cAMP 조절제의 존재시 (48%) 발생률이 그것이 존재하지 않는 경우 (22%)와 비교하여 현저히 높다.

그러나, 30시간에 수정된 난모세포는 cAMP 조절제없이 수집되고 조작된 난모세포와 비교하여 (배반포 27%)($P<0.05$)(도 12B, 컬럼 5), cAMP 조절제 없이 전처리되고 FSH+실로스트아미드로 성숙시켰을 때 배반포의 극적인 증가를 나타내었다 (배반포 42%로부터 배반포 69%로 증가)(도 12B, 각각 컬럼 3 및 컬럼 6).

배반포 세포수에 대한 프리-IVM 및 IVM 중의 cAMP 조절제의 효과

도 13은 다양한 프리-IVM 단계 배지 및 IVM 단계 배지에 존재하는 cAMP 조절제의 배반포 세포수에 대한 효과를 보여준다. 난구난모세포복합체 (COCs)를 난포액, 수집 배지 또는 100 μ M 포스콜린 (FSK)와 500 μ M IBMX로 보충된 수집 배지에서 2시간 동안 흡입하고 선별하였다. 그 후, 실로스트아미드 (20 μ M)의 존재하에 FSH를 첨가하여 30시간 동안 COCs를 성숙시켰다. 생장 및 부화된 제8일째 배반포의 내부세포피 및 영양외배엽의 총세포수 (평균 $\pm$ SEM)를 측정하였다. 각 처리 그룹에 평균 20-30개의 생장된 또는 부화된 배반포가 사용되었다. 각 컬럼 위의 문자 (a, b, h, l, x 또는 y)는 ANOVA 분석과 그 후의 Bonferroni 사후 검정으로 측정된 평균값들 간의 통계적 차이를 나타낸다.

도 13에서 보여지는 바와 같이, 프리-IVM 단계에 cAMP가 결여된 배양 배지에서 처리된 난모세포와 비교하여, IVM 단계 배지에 실로스트아미드가 존재하면, 순수한 난포액 또는 프리-IVM 단계 배지에 cAMP가 존재하는 조건에서 처리된 난모세포는 총배반포 세포, 영양외배엽 및 내부세포피의 수를 현저히 증가시켰다 ($P<0.05$).

본 연구는 수집 후 즉시 그리고 성숙 과정 중에 난모세포의 세포 내 cAMP 수준을 조작함으로써 시험관 내 난모세포 성숙을 유도하기 위한 방법을 개발하면 핵과 세포질 구획을 동조화하여, 이로부터 성숙중인 난모세포의 발생능을 향상시킬 수 있다는 가설을 시험하기 위하여 착수되었다.

포유류의 난모세포 성숙을 조절하는 데 cAMP가 관여한다는 것이 지난 몇 년간 밝혀져 왔다. 그럼에도 불구하고, cAMP에 의하여 유도되는 일련의 연관 사건들의 분자적 기작은 명확히 알려지지 않았다. 지금까지 기재한 실험적 결과는 PDE 억제제의 효율이 IVM 이전 기간 중에 cAMP 수준을 조절함으로써 증진될 수 있다는 것을 보여주었다. 본 연구의 처음 부분 (도 1 내지 도 4)에서, 온전한 COCs 또는 DOs에서 cAMP 수준을 측정하여 얻은 결과는 여포

수득 순간에 소에서 측정된 종래의 결과와 일치한다. 특히, 본 실험 결과는 여포로부터의 난모세포 단리와 시험관 내 성숙 (IVM)의 시작 사이의 시격(時隔) 중 세포 내 cAMP 농도가 난모세포 동력학 및 고발생능을 달성하는데 중요해 보인다는 것을 보여준다. 사실, 프리-IVM 단계에서 난모세포의 cAMP 수준을 조절하는 것이, 실로스트아미드의 존재하에 배양시 IVM 24시간 후 높은 cAMP 수준을 유지하는데 장기적 효과가 있는 것으로 보인다 (도 9).

[0225] 본 발명에서 이용된 상이한 수집 조건들이, 난모세포의 세포 내 cAMP 수준, 난모세포 감수분열 진행, 난모-난구세포 간극연접 교신 및 결과적으로 발생능에 대하여 중대한 효과를 미친다는 것을 알게 되었다. 본 발명의 결과는 COC 단리 시간으로부터 단시간 동안 cAMP를 조절하는 것이 난구세포와 난모세포 사이의 간극연접 교신의 유지를 이끌어낼 수 있다는 것을 증명하였다 (도 7).

[0226] 프리-IVM 단계 중에 cAMP 수준이 조절되는 경우, 본 연구에서 관찰된 간극연접 교신의 증가는 연장된 간극연접 전도도 및/또는 난구세포 유발성 감수분열 조절 인자로부터 난모세포로의 간극연접 제거에서 비롯된 것이고, 이로부터 난모세포 배양 7시간 후 GV 형태 또는 GVBD를 지연시키게 된다 (도 5 및 도 6).

[0227] 흥미로운 문제는 cAMP의 외인적 조절로 생식세포 및 체세포에서 자극 또는 억제 반응을 불러 일으키는 방법이었다. 전술한 실험에서, 다른 처리군들과 비교하여 프리-IVM 단계 및 IVM 단계 중 배양 배지에 cAMP가 존재하는 경우 난모세포 내부의 cAMP 수준이 15배 높았다 (도 9). 이것은 IVM 도중에 EGFR 카이네이즈 억제제, AG1478을 시험한 실험으로부터도 뒷받침되는 것이었다 (도 10). 선행 연구들은 표피 성장 인자 (EGF)가 난소 세포에 의하여 생산될 수 있고, 다수의 다른 성장 촉진 인자들 중에서도 난구 증식 및 감수분열 재개에 대한 가장 강력한 자극자라는 것을 보여주었다. 또한, EGF 유사 펩티드가 배란 전 여포에서의 생식선 자극 호르몬의 작용을 매개할 수 있다는 것도 보여주었다. 그러므로, EGF 유사 펩티드는 상이한 세포 유형의 대사 경로들 간의 측면비 신호전달에 있어서 밀접한 역할을 담당함으로써 난모세포 성숙 및 여포 파열을 일으키게 된다.

[0228] 그러므로, 도 10에서 그 결과가 보여지는 상기 실험들의 한 가지 목적은 실로스트아미드로 배양된 COCs의 여포 자극호르몬으로부터 유도된 성숙에 있어서 EGF 유사 펩티드의 역할을 시험하고자 하는 것이었다. 전술한 바와 같이, 난모세포 내부의 cAMP 수준을 15배까지 증가시키면 28시간까지 M II로의 감수분열 진행을 지연시켰다 (도 8). 흥미롭게도, 본 연구에서 난모세포에 대한 실로스트아미드의 억제효는 배양액에 FSH를 첨가함으로써 극복되었다 (도 8B). FSH가 존재하지 않으면, 배양 24시간 후에 40-50%의 실로스트아미드 처리된 난모세포들이 M I기에 어레스트된 상태로 남아있었다 (도 8A). 그러나, FSH를 첨가하자, 초기에는 GVBD를 지연시켰지만 (도 5), 결국에는 배양 24시간 후 대부분의 실로스트아미드 처리된 난모세포의 M II로의 진행을 유도하였다 (도 8B). 예외는 프리-IVM 단계 도중에 cAMP 조절제로 보충된 배지에서 수집된 난모세포 뿐이었고, 여기에서는 FSH가 존재하여도 GVBD의 지연이 있었다. 그러나, 이렇게 처리된 난모세포도 결국에는 배양 28시간 후 M II기로 진행하였고, 이는 IVM 배지에 cAMP 조절제를 함유시킨 효과가 수집 후 COC의 cAMP 수준을 조절함으로써 향상될 수 있고, 이로부터 배양액 중의 FSH의 존재에 의하여 유도될 수 있는 추가적인 감수분열 억제를 이끌어 낸다는 것을 보여주는 것이다.

[0229] 이러한 결과는 여포로부터 물리적으로 수득된 난모세포가 자발적 감수분열 재개라는 결과를 낳는다는 자발적 성숙과 배치되는, 반추 동물 종에 있어서 난모세포 유도 성숙에 대하여 설명하는 최초의 표본일 수 있다. 그러나, 생체 내에서 감수분열 재개는 생식선 자극 호르몬의 배란 전 급증 때문에 일어난다는 것이 잘 알려져 있음에도, 이것이 이루어지는 기작은 완전히 이해되지 못하고 있다.

[0230] 난모세포를 실로스트아미드의 존재하에 배양하면, FSH의 처리는 처음에는 억제효를 나타내지만 나중에는 자극효를 나타내는 결과를 낳는다 (도 8). FSH에 의하여 생성된 cAMP가, 결국 양성 (positive) 효과로 작용하는 신호전달 캐스케이드의 하위 요소들보다 먼저 초기에 성숙을 막음으로써 역설적인 효과를 나타내는 것으로 제안되었다. EGF 유사 펩티드가 이러한 결과를 낳는 것인지 시험하기 위하여, 유도 IVM에 관한 실험을, FSH 처리하여 및 EGFR 타이로신 카이네이즈 억제제인 AG1478의 투여량을 증가시키면서 노출하여 반복하였다. AG1478 투여량의 증가는 FSH 및 실로스트아미드 처리된 COCs의 감수분열 회복을 완전히 차단하였고, 이는 EGF 유사 펩티드의 합성 및 방출과 EGF 신호전달이 FSH 유발성 난모세포 성숙에 필요하다는 것을 나타낸다.

[0231] 또한, 본 발명에서 보고되는 실험들은 프리-IVM 및 IVM 중에 난모세포의 cAMP의 수준을 조절하는 것이 초기 발생을 뒷받침하는 능력을 높이는 것임을 보여준다. 표 2에 보여지는 바와 같이, 프리-IVM 중에만 cAMP를 조절하거나, 또는 IVM에서만 cAMP를 조절하는 것은 약 30% 배반포 비율을 생성시켰다. 그러나, 두 단계 모두에서 cAMP 조절제를 포함시키자 배반포 비율 (69%)에 현저한 증가 (3배까지)를 이끌어냈다. 프리-IVM에서 cAMP 조절제 부재하에, 실로스트아미드의 존재하에 난모세포를 배양하자, 프리-IVM 배지에 그들이 존재하는 경우 (69%)와 비교

하여 배반포 비율이 감소하였다는 (29%) 것이 흥미롭다. 이러한 결과는 동물에게 난모세포 흡입 6시간 전에 황체 형성 호르몬을 투여한 경우 80%의 배반포가 발생되었다는 생체 내 코스팅 (coasting)에 대한 종래 보고와 일치한다.

[0232] 결과적으로, 이 실시예에서 제공되는 증거는 프리-IVM 단계 중 세포 내 cAMP 수준이 여포로부터 COC를 수득하는 개시시부터 성숙의 마지막까지 난모세포 발생능 및 배반포의 질에 중대한 영향을 미친다는 것을 처음으로 증명하였다. 시험관 내 성숙 도중 난모세포와 난구세포에서 세포 내 cAMP 수준을 생리적 범위 이내로 안정하게 조절하면 유도된 시험관 내 성숙을 이룰 수 있고, 차례로 높은 발생 잠재력을 획득할 수 있다.

[0233] 실시예 2

[0234] 도 14는 cAMP 조절제 부재하 난모세포의 시험관 내 성숙 전 프리-IVM 단계 중에 cAMP 조절제 없이 시험관 내 배양된 (COC 수집 및 선별을 포함하는 2시간) COCs 중의 cAMP 농도(B)와 비교하여, 말의 융모성 생식선 자극 호르몬 (eCG) 및 인간의 융모성 생식선 자극 호르몬 (hCG) 유발성 난모세포 성장으로 유도된 여포 생장 후 마우스의 난구난모세포복합체 (COCs)의 생체내 cAMP 농도들(A) 간의 비교 결과를 보여준다. 결과는 4회 실험에서 COC당 평균 cAMP 수준±SEM을 나타낸다. 각 측정을 12개의 COCs에서 실시하였다.

[0235] 도면은 hCG 처리 후 생체 내에서 성숙된 난모세포의 cAMP 농도에서는 현저한 증가가 있는 반면, 자발적으로 성숙된, 시험관 내 성숙된 난모세포는 cAMP 수준이 낮다는, 심지어 더욱 낮아진다는 것을 보여준다. 자발 성숙된 난모세포의 이러한 cAMP의 손실은 저하된 발생능과 관련된 것으로 보인다.

[0236] 실시예 3

[0237] 도 15는 제3형 PDE 억제제 (실로스트아미드; 1 μ M(A) 또는 0.1 μ M(B))의 존재하에 성숙된 마우스의 난구난모세포복합체 (COCs)의 감수분열 성숙을 유도하기 위하여 FSH의 투여량을 증가시키에 따른 효과를 보여준다. 이 실시예에 있어서, 마우스 난모세포 성숙용으로 사용된 기본 배지 (환형 AMP 조절제 부존재)는 HEPES 완충 α -최소 필수 배지 (HEPES-buffered α -Minimal Essential Medium, HEPES-MEM)이었고, IVM에 사용되는 실로스트아미드의 농도에 따라 3 mg/ml BSA, 1 mg/ml 페투인 및 1.0 또는 0.1 μ M 실로스트아미드로 보충되었다. COCs를 대략 30분간 수집 배지에 유지시켰다. IVM용으로, 기본 성숙 배지는 3 mg/ml BSA, 1 mg/ml 페투인으로 보충된 중탄산염 완충 α -최소 필수 배지 (MEM)였고, 습윤 공기 6% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 다양한 FSH 농도를 사용하였다. COC를 MEM + 실로스트아미드 (1 μ M(A) 또는 0.1 μ M(B))에서 및 FSH의 투여량을 증가시키며 (0.01 -200 mIU) IVM 24시간동안 배양하였다. 그 후 난모세포를 고정시켜 18, 24 및 42시간에 감수분열 진행을 평가하였다. 4회 반복 실험에서 평균 40개의 난모세포가 각 처리 그룹 및 시점에서 사용되었다. 도 15A 및 15B의 막대들은 아래와 같은 추가의 대조군을 나타낸다. 막대 1 : 50 mIU의 FSH만으로 성숙된 COCs (IVM 18시간); 막대 2: 1 μ M(A) 또는 0.1 μ M(B)의 실로스트아미드만으로 성숙된 COCs (IVM 18시간); 및 막대 3: 1 μ M(A) 또는 0.1 μ M(B)의 실로스트아미드와 10 mIU의 FSH로 24시간 동안 그 후 50 mIU의 FSH로 IVM 18시간 동안 (2 단계 IVM) 성숙된 COCs.

[0238] 이 도면은 PDE 억제제 및 FSH 양자 모두의 농도가 함께 유도 성숙의 시기를 조절할 수 있다는 것을 증명한다.

[0239] 실시예 4

[0240] 도 16은 난모세포 감수분열 재개에 대한 프리-IVM 및 IVM 두가지 단계 중에 cAMP 조절제의 효과를 보여준다. 이 실시예에 있어서, 마우스 난모세포 성숙용으로 사용된 기본 배지 (환형 AMP 조절제 부존재)는 HEPES 완충 α -최소 필수 배지 (HEPES-buffered α -Minimal Essential Medium, HEPES-MEM)이었고, 3 mg/ml BSA, 1 mg/ml 페투인으로 보충되었다. IVM용으로, 기본 성숙 배지는 3 mg/ml BSA, 1 mg/ml 페투인으로 보충된 중탄산염 완충 α -최소 필수 배지 (MEM)였고, 습윤 공기 6% CO₂, 37°C에서 배양하였다. COCs를 0.1 μ M 실로스트아미드로 보충된 수집 배지 또는 50 μ M 포스콜린 (FSK)으로 보충된 수집배지에서, 50 μ M IBMX와 함께 1시간 동안 흡입하고 선별하였다. 그 후 18-26시간 동안 100 mIU FSH 및 0.1 μ M 실로스트아미드의 존재하에 성숙 배지에서 COCs를 성숙시켰다. 그 이후, 난모세포를 고정시켜 각 시점에 감수분열 진행을 평가하였다. 4회 반복 실험에서 평균 45개의 난모세포가 각 처리 그룹 및 시점에서 사용되었다. 그러므로, 본 발명에 기재된 유도 성숙 조건하에서 마우스 난자를 수정시키기 위한 최적 수정 시간은 22시간이고, 그러므로 18시간인 "보통의 사례"보다 지연되었다 (도 17의 첫번째 막대로 증명됨을 참조).

[0241] 실시예 5

[0242] 도 17은 18시간 및 22시간 배양한 후 유도 IVM (수집 = HEPES-MEM+포스콜린+IBMX, 성숙 = MEM+실로스트아미드

+FSH) 또는 자발적 IVM (수집 = HEPES-MEM, 성숙 = MEM+FSH) 중 하나로 성숙된 마우스 COCs의 감수분열 성숙을 보여주는 그래프이다. 그 후 난모세포를 감수분열 진행에 대하여 평가하고 M II기로 분류하였다.

[0243] 도 17은 자발적 IVM과 비교하여 유도 IVM 18시간에 성숙시켰을 때 마우스 COCs의 감수분열 성숙은 지연되지만, M II 비율은 자발적 IVM 22시간 성숙과 동일하고 등가라는 것을 보여준다. 이것은 유도 성숙이 마우스에서의 성숙 진행을 늦춘다는 것을 증명한다.

[0244] 도 18에서 보여지는 바와 같이, 이것은 곧이어 수정된 접합자의 발생 증가에 의하여 증명되는, 난모세포의 발생능을 향상시킨다. 난모세포 발생 능력을 시험관 수정 및 배아 발생 이후 난할률 (제2일)(A) 및 배반포 비율 (제5일)(B)에 의하여 평가하였다. 유도 IVM (수집 = HEPES-MEM+포스콜린+IBMX, 성숙 = MEM+실로스트아미드+FSH). 자발적 IVM (수집 = HEPES-MEM, 성숙 = MEM+FSH).

[0245] 도 18에서 보여지는 바와 같이, 난할률 (상위 그래프) 및 배반포 수율 (하위 그래프)은 18시간 동안 성숙 후 또는 22시간 동안 자발적 성숙 후의 양자의 시스템과 비교하여 22시간 동안 성숙시켰을 때의 유도 성숙에서 가장 높았다.

[0246] 이러한 향상된 난모세포 발생능은 도 19에서 보여지는 바 배반포의 질에도 역시 반영된다. COCs를 유도 IVM 또는 자발적 IVM 중 하나로 18시간 (상위 그래프) 또는 22시간 (하위 그래프) 동안 성숙시켰다. 성숙된 난모세포는 그 후 수정되었다. 배아를 5일간 배양하고, 배반포 질을 총세포수 계수 ("총세포수") 및 영양외배엽 (TE) 또는 내부세포괴 (ICM)로의 세포 할당으로 측정하였다. 유도 IVM (수집 = HEPES-MEM+포스콜린+IBMX, 성숙 = MEM+실로스트아미드+FSH). 자발적 IVM (수집 = HEPES-MEM, 성숙 = MEM+FSH).

[0247] 도 19로부터 볼 수 있는 바와 같이, 유도 성숙 시스템에서 22시간 성숙시킨 후 총세포수, 내부세포괴 (ICM) 및 총세포수에 대한 내부세포괴의 비율은 자발적 성숙 시스템에서의 그것보다 많았다. 이 결과는, 마우스 난모세포에서는 전술한 이들 장점이 수집 배지에 PDE 억제제 IBMX가 포함되는 경우에 일어난다는 것을 증명한다.

[0248] 그러나, 도 20에서 보여지는 바와 같이, 이들 장점은 포스콜린 및 IBMX 두 가지 모두가 수집 배지에 함유되는 경우에 더욱 향상된다. COCs를 기본 수집 배지 또는 50 μ M IBMX +/- 50 μ M 포스콜린 (FSK)으로 보충된 수집 배지 중 하나에 1시간 동안 배양시켰다. 그 후 COCs를 MEM+50 mIU FSH에서 실로스트아미드 없이 18시간 동안 성숙시키거나 또는 22시간 동안 MEM+100 mIU FSH에서 실로스트아미드 (0.1 μ M)의 존재하에 성숙시켰다. 다음으로, 시험관 내 수정 및 배아 발생 후 제6일에 난할률, 배반포 비율 및 부화 배반포 비율로 난모세포 발생능을 평가하였다.

[0249] 도 21은 유도 IVM (수집 = HEPES-MEM+포스콜린+IBMX, 성숙 = MEM+실로스트아미드+FSH) 또는 자발적 IVM (수집 = HEPES-MEM, 성숙 = MEM+FSH) 중 어느 하나에 의하여 생체 내에서 성숙시킨 난모세포의 발생능을 보여주는 그래프이다. IVM 이후, COCs를 수정시켜 배아를 제5일까지 배양하였다(A). 배반포 질을 총세포수 계수 및 영양외배엽 (TE) 또는 내부세포괴 (ICM)로의 세포 할당으로 측정하였다(B). 생체 내 성숙된 대조군 난모세포 = hCG 투여 14시간 후 난관으로부터 수집된 COCs.

[0250] 도 21은 자발적 IVM이 아닌, 유도 IVM만이 배란된 여포로부터 얻어지는 난모세포를 가장 근접하게 모사한다 (그리고 본 발명에서 생체 내 성숙된 난모세포로 언급하고 있는 완전한 발생능을 획득한다)는 결과 (난모세포 발생능 측면에서)를 나타낸다는 것을 증명한다.

[0251] 도 22는 임신 결과 및 태아의 파라미터에 대한 유도 IVM의 효과를 보여주는 그래프를 제공한다. 유도 IVM (수집 = HEPES-MEM+포스콜린+IBMX, 성숙 = MEM+실로스트아미드+FSH) 또는 자발적 IVM (수집 = HEPES-MEM, 성숙 = MEM+FSH) 중 어느 하나에 의하여 생체 내에서 성숙시킨 COCs로부터 발생시킨 4.5일된 배반포를 가(假)임신 환자들에게로 착상시켜 결과를 임신 제18일에 분석하였다. 착상률 = 총착상/이동시킨 배아. 태아 생존 = 태아의 수/착상 위치. 생체 내 성숙시킨 대조군 = hCG 투여 14시간 후 난관으로부터 수집된 COCs.

[0252] 도 22A-C에서 볼 수 있는 바와 같이, 세 가지 상이한 그룹의 난모세포 성숙 시스템으로부터 배아를 착상시켰을 때, 유도 IVM으로부터의 배아가 생체 내 성숙 난모세포로부터 얻을 수 있는 착상 후 발생 결과와 유사하였고, 자발적 성숙 난모세포로부터의 배아의 그것보다 높았다. 또한, 이러한 결과는 도 22D-E에서 보여지는 바와 같이 태아의 크기 (태자체장) 및 태아:태반 중량비에도 역시 반영된다.

[0253] 실시예 6

[0254] 그 후 동물 난모세포를 이용하여 발생시킨 유도 IVM 개념을 인간의 난모세포를 이용하여 시험하였다.

[0255] 인간에의 기술 응용은 (1) 인간의 IVM 단계 도중 사용되는 실로스트아미드의 최적 농도와, (2) 인간의 프리-IVM 단계 도중 사용되는 포스콜린 및 IBMX의 최적 농도, (3) 난모세포 성숙을 완결시키는 데 필요한 시간에 대한 이들 제제의 상호 효과 및 (4) 수정 후 배아 발생에 있어서 탈피 시간 (체세포 제거)의 효과를 고려하여 결정할 필요가 있다.

[0256] **재료 및 방법**

[0257] 젊고 건강한 여성으로부터 미성숙 인간 난구난모세포복합체 (COC)를 수집하였다 (IVF 환자로부터 수집한 것이 아니다). 이들 여성들은 일반 임상적 IVM 사이클의 하나에서 통상적으로 시행되는 것과 같이 최소의 난소 자극을 받았다 (통상적으로 300 - 500 IU FSH/사이클, hCG 무처리). 선두 난소 여포가 12 mm에 도달하였을 때 난모세포 선별을 수행하였다. 이하 설명하는 바와 같이, 그 후 미성숙 난모세포를 프리-IVM 시간 또는 IVM 시간 도중에 여러 가지 처리로 계층화하였다. 또한, 난모세포 성숙 기간 중 난모세포로부터 체세포를 제거하는 (탈피) 시간을 시험하였다. 이하의 실험을 행하였다.

[0258] ?IVM 도중 PDE3 억제제 (실로스트아미드)의 투여량: 0 대 0.1 대 1.0 μ M

[0259] ?프리-IVM 도중 cAMP 조절제: 대조군 대 IBMX 대 IBMX + 포스콜린

[0260] ?배아 발생에 대한 난모세포 탈피 시간의 효과: 30시간 대 40시간 대 44-48시간

[0261] 난모세포 선별시, COC를 VitroCollect 배지 (Cook Australia, Brisbane, Australia)의 프리-IVM 처리군으로 즉시 수집하여 1시간 동안 유지하였다. 프리-IVM 이후, COC를 세척한 다음 VitroMat 배지 (Cook)의 IVM 처리군 (예컨대, 실로스트아미드 투여)으로 이동시켜 표준 조건하에서 성숙시켰다. 탈피 후 다양한 시점에, 난모세포의 성숙 (극체 [PB] 방출)을 모니터하였다. 성숙 말기 (48시간)에 최종 감수분열 점수가 부여되었다. 난모세포가 성숙되었을 때, 그들을 기증자의 정자를 이용하여 표준 세포질 내 정자 주입 (ICSI) 방법으로 수정시켰다. 24시간 후, 수정률을 측정하였다. 발생 어레스트까지 최대 6일간 표준 방법으로 배아를 배양하였다.

[0262] **결과**

[0263] 인간 IVM 도중 실로스트아미드의 투여량

[0264] 결과를 아래 표 3에 나타내었다.

표 3

	실로스트아미드 처리		
	0 μ M (n=41)	0.1 μ M (n=39)	1.0 μ M (n=38)
난핵포 붕괴	54%	44%	13%

[0266] 난핵포 붕괴 (GVBD)는 난모세포가 감수분열을 재개하였다는 표지이다. 이들 결과는 1.0 μ M이 인간 난모세포에 대한 실로스트아미드의 억제 투여량이라는 것을 보여준다. 0.1 μ M은 억제효과 없으므로, 이하 보고될 연구에 있어 IVM 중 이 투여량을 사용하였다.

[0267] 인간 IVM 중 0.1 μ M 실로스트아미드와 함께한 경우 프리-IVM cAMP 조절 제제의 효과

[0268] 결과를 아래 표 4 내지 표 6에 나타내었다.

표 4

	프리-IVM: 대조군			
	n	% GV	% GVBD	% PB
30 시간	33	33.3	51.5	15.2
36-40 시간	36	30.6	36.1	33.3
42-44 시간	36	30.6	33.3	36.1
48 시간	36	27.8	30.6	41.7

표 5

[0270]

	프리-IVM: 대조군			
	n	% GV	% GVBD	% PB
30 시간	33	33.3	51.5	15.2
36-40 시간	36	30.6	36.1	33.3
42-44 시간	36	30.6	33.3	36.1
48 시간	36	27.8	30.6	41.7

표 6

[0271]

	프리-IVM: 대조군			
	n	% GV	% GVBD	% PB
30 시간	33	33.3	51.5	15.2
36-40 시간	36	30.6	36.1	33.3
42-44 시간	36	30.6	33.3	36.1
48 시간	36	27.8	30.6	41.7

[0272]

주: GV-난핵포 (미성숙); GVBD-난핵포 붕괴 (성숙 중); PB-극체 (성숙)

[0273]

이들 결과는 인간 난모세포를 이용한 유도 IVM 이론을 증명한다. 이 결과는, 난모세포를 IVM 단계 중 FSH의 존재하에 0.1 μ M 실로스트아미드로 처리하였을 때, IBMX+FSK를 함유한 프리-IVM이 표준 프리-IVM 난모세포 수집 조건에 대하여 (대조군; PB기 41.7%) 성숙 난모세포의 비율 (PB기 64.9%)을 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0274]

IVM 후 인간 배아 발생에 대한 탈피 시간의 효과

[0275]

결과를 아래 표 7에 나타내었다.

표 7

[0276]

탈피 시간	n PB	Fert % (n)	%Blast/PB (n)	%Blast/Cleave (n)
30	29	90% (26)	35% (10)	39% (10)
40	25	96% (24)	36% (9)	38% (9)
44 + 48	18^	72% (13)	6% (1)	8% (1)

[0277]

주: PB = 극체; Fert = 수정; Blast = 배반포; Cleave = 난할된 배아

[0278]

본 발명자들은 유도 IVM 시스템을 이용하여 성숙시킨 난모세포로부터 인간 배아를 생산하였다. 지금까지의 적은 횟수에도 불구하고, 본 시스템은 배아 형성에 있어서 배반포로 35-40% 진행하는 고효율을 입증하였다. 이것은 표준 임상적 비율보다 실질적으로 높은 것이다. 유도 IVM 시스템에서 중요한 인자는 IVM 시간 또는 수정 시간이 다. 본 발명의 결과는 44-48시간의 탈피 시간이 배아 발생에 악영향을 미친다는 것을 시사한다.

[0279]

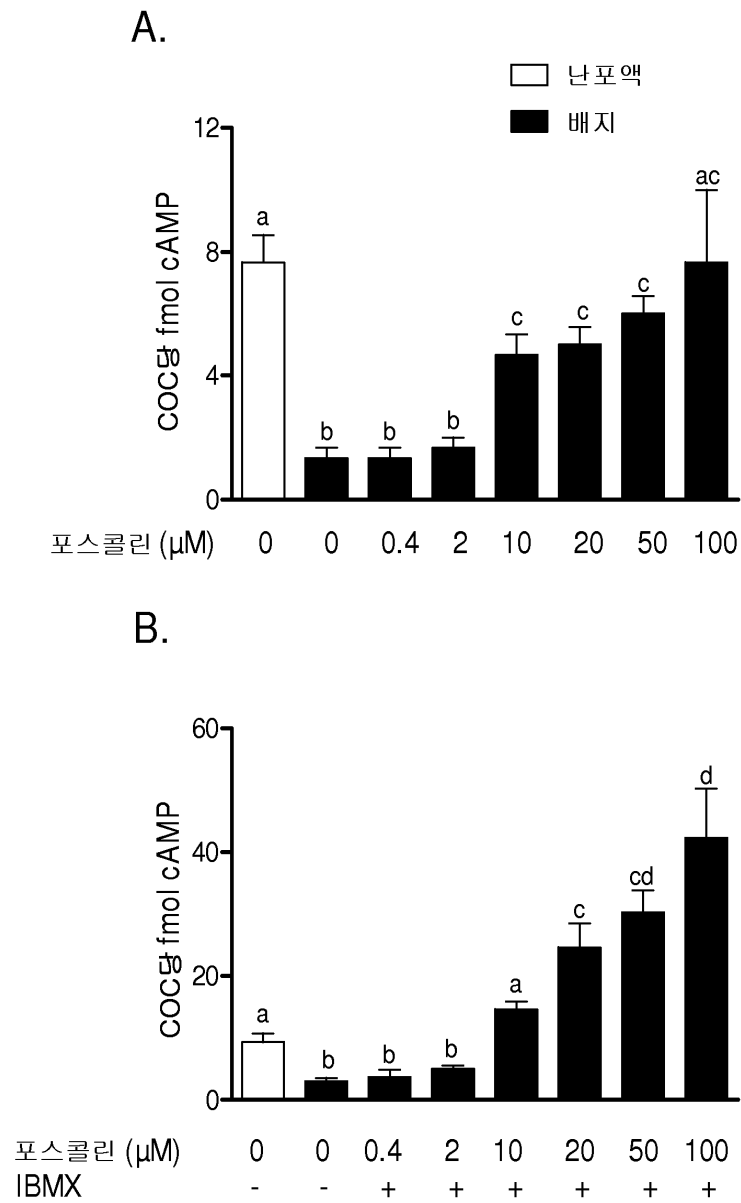
도 23은 종래 IVF (생체 내 성숙된 난모세포) 및 표준 자발적 IVM과 비교한 유도 IVM의 핵심 개념 및 태아 생성 시 이들 세 가지 방법의 상대적 효율을 요약한 도면이다.

[0280]

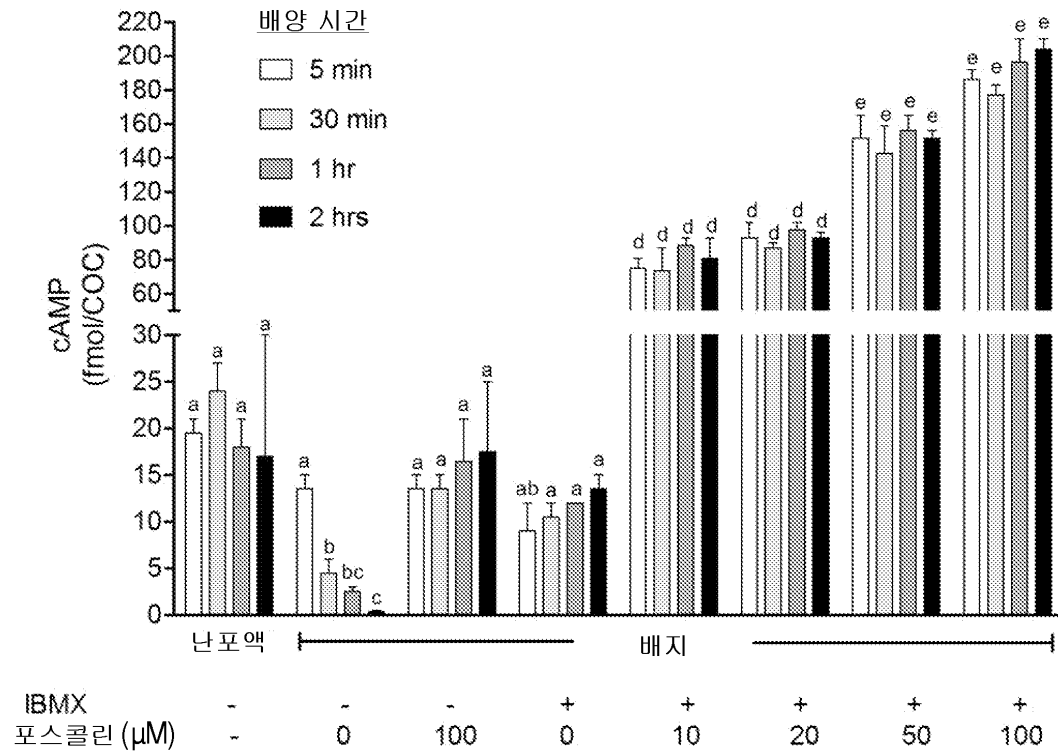
마지막으로, 본 발명의 청구 범위 및 개념과 동떨어짐 없이 본 명세서에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물의 다양한 수정 및 변형이 이 기술 분야의 숙련자에게 자명할 것이라는 것을 이해할 수 있다. 특정 실시 상태와 관련하여 본 발명을 설명하였지만, 청구된 발명을 이러한 특정 실시 상태에 지나치게 한정시켜서는 아니된다는 것이 이해되어야 한다. 실제로, 이 기술 분야의 숙련자에게 자명한, 본 발명을 시행하기 위하여 기재된 모드의 다양한 변형이 본 발명의 범위 내일 것이다.

도면

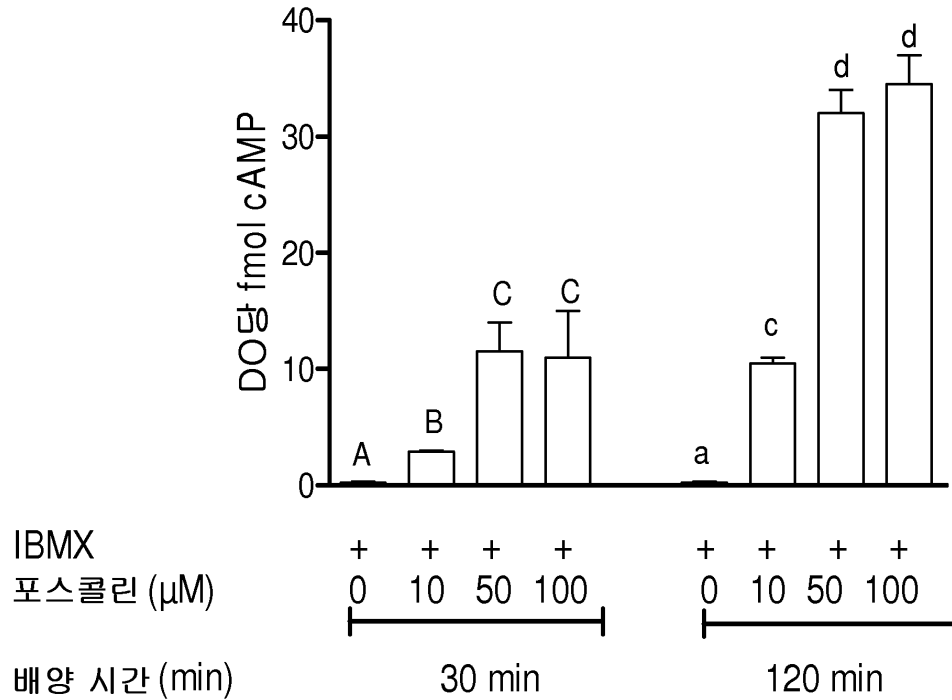
도면1



도면2

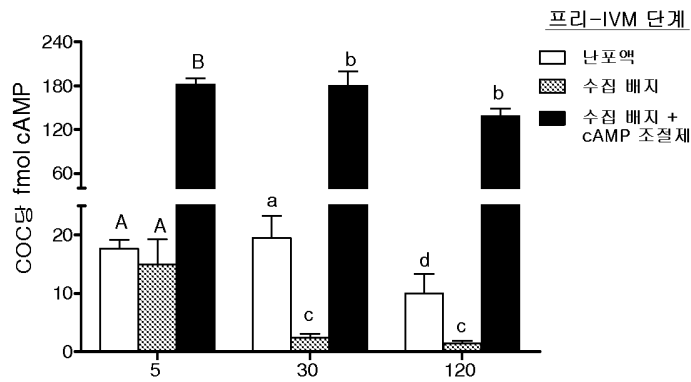


도면3

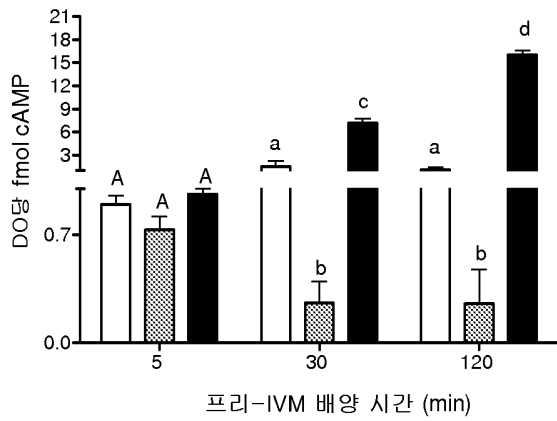


도면4

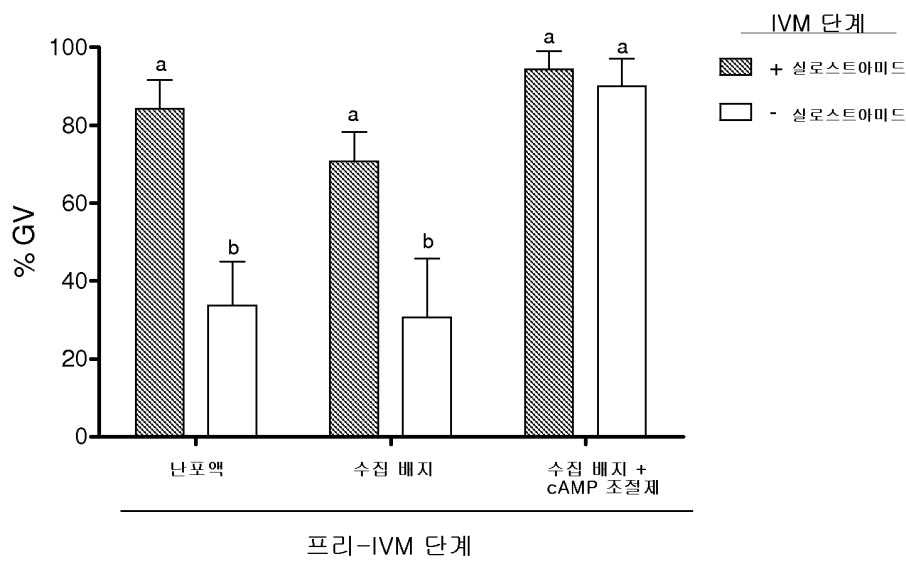
A COC



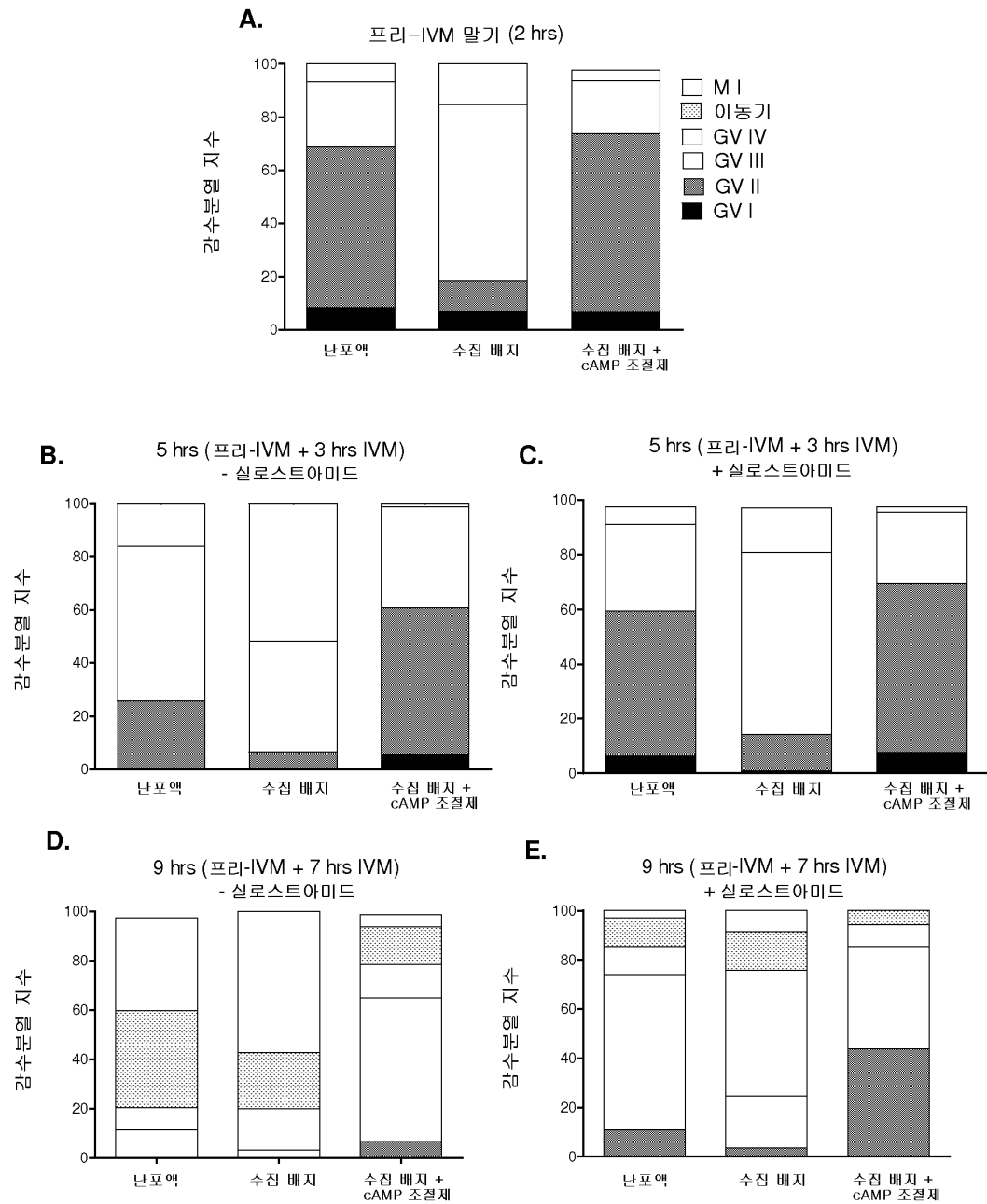
B DO



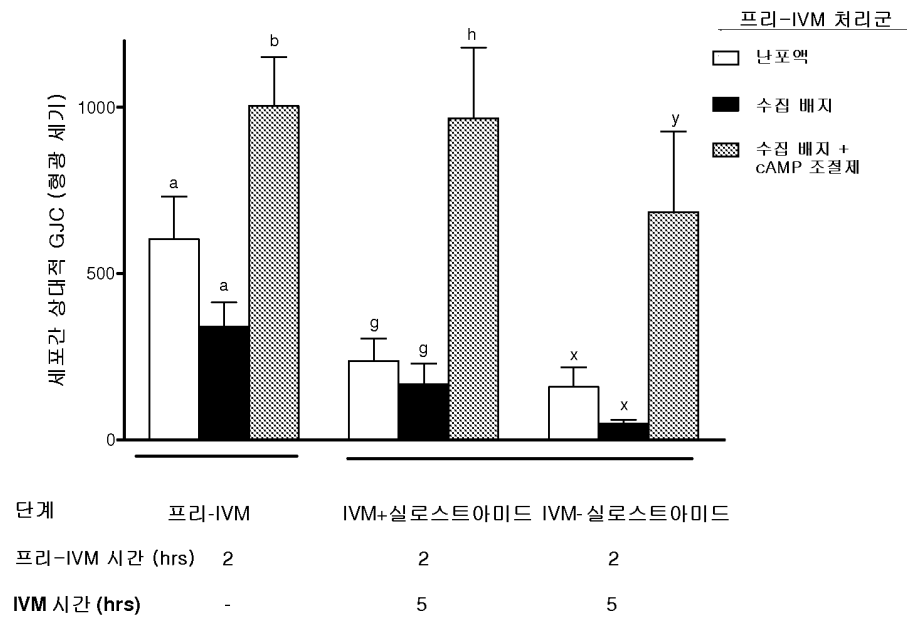
도면5



도면6

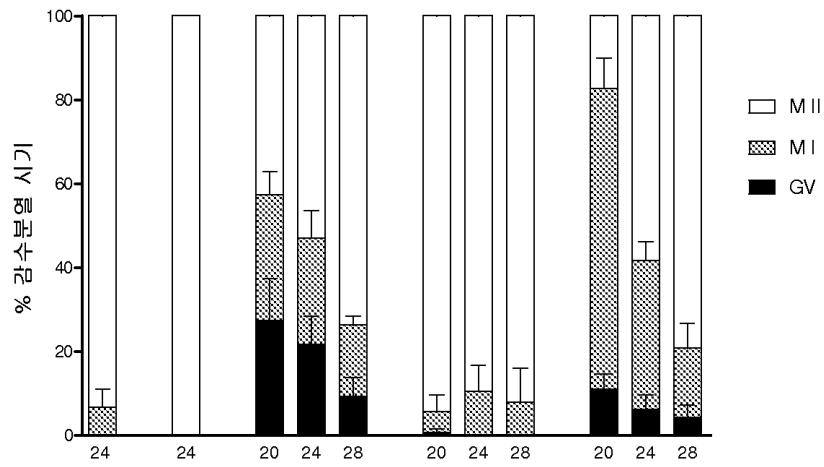


도면7

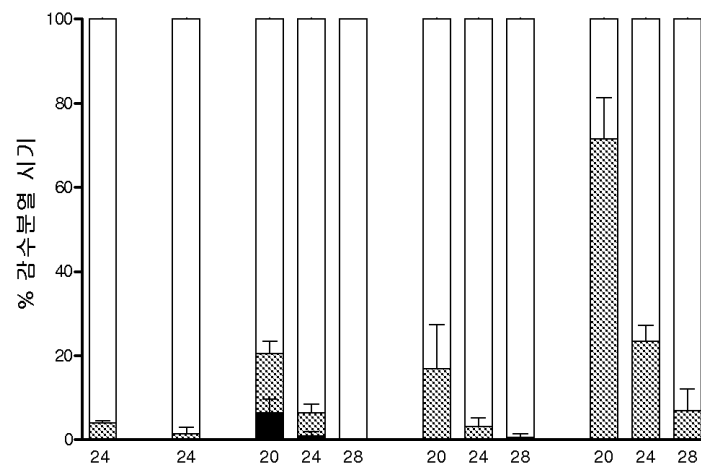


도면8

A - FSH



B +FSH



프리-IVM 단계

cAMP 조절제

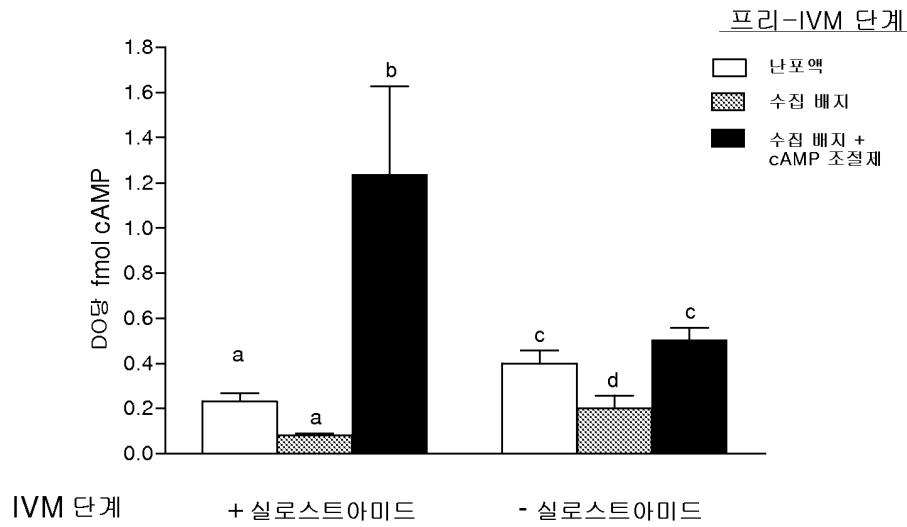
IVM 단계

(+/- 실로스타미드)

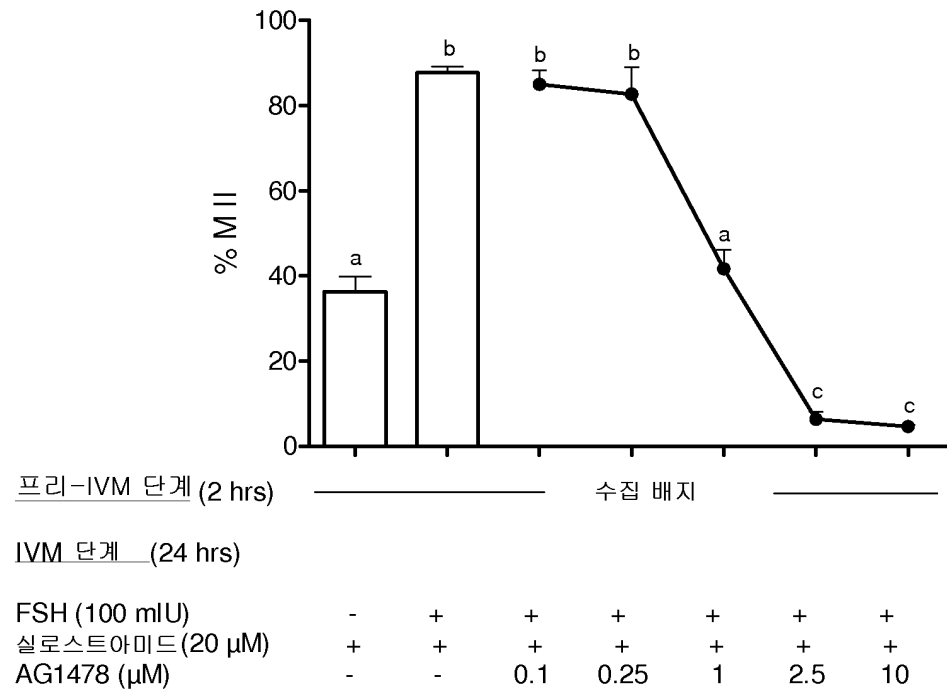
난포액

수집 배지

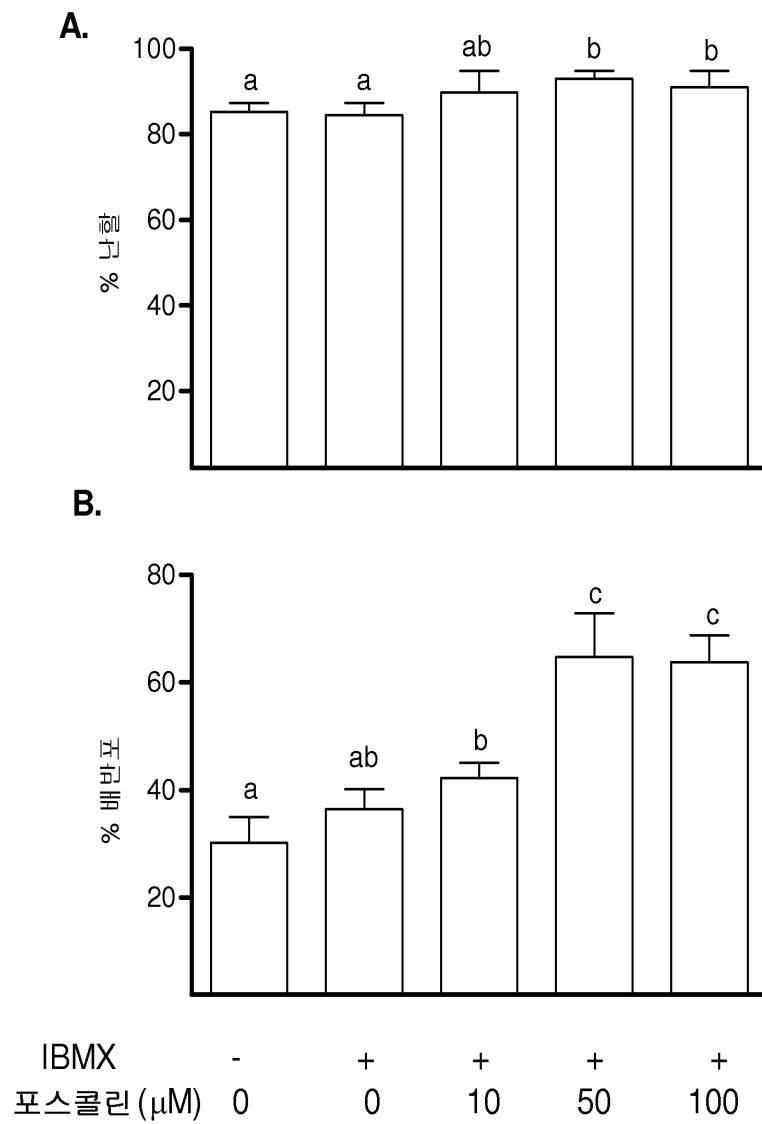
도면9



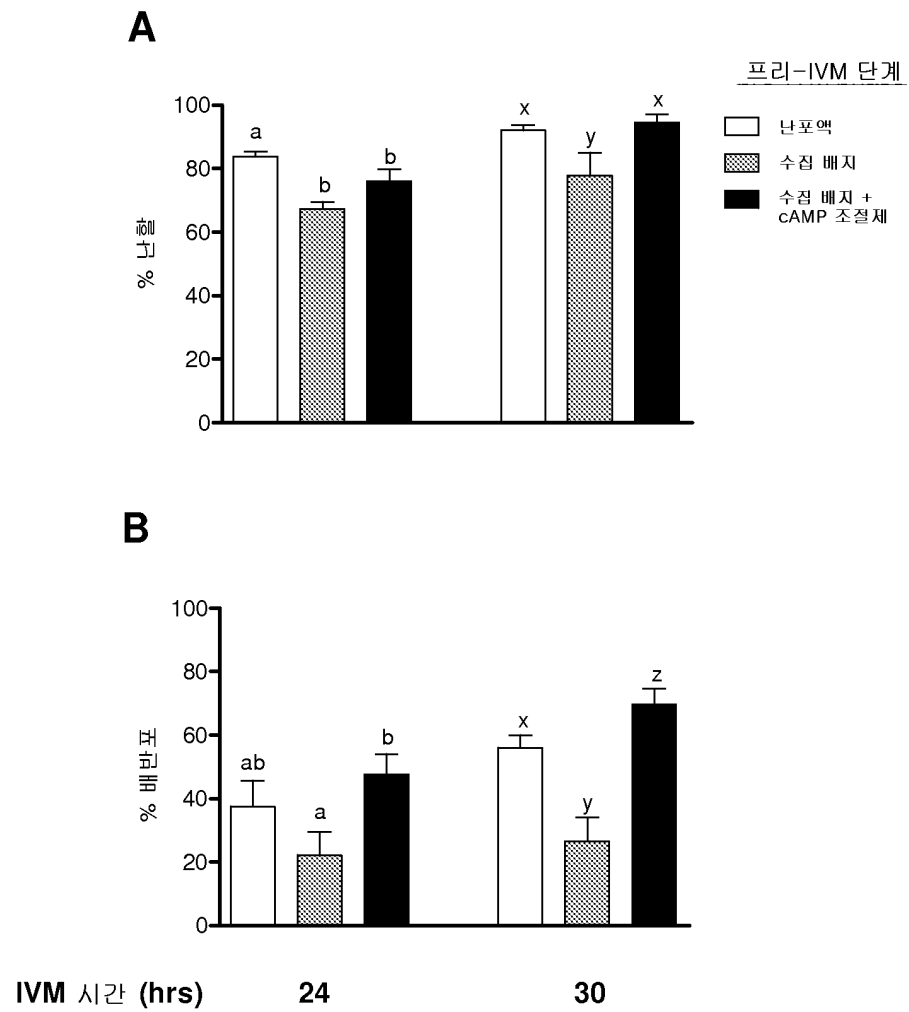
도면10



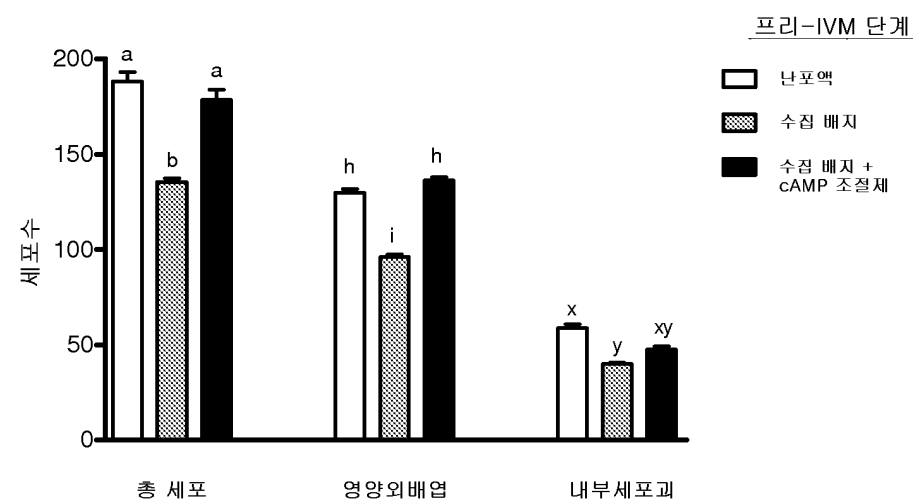
도면11



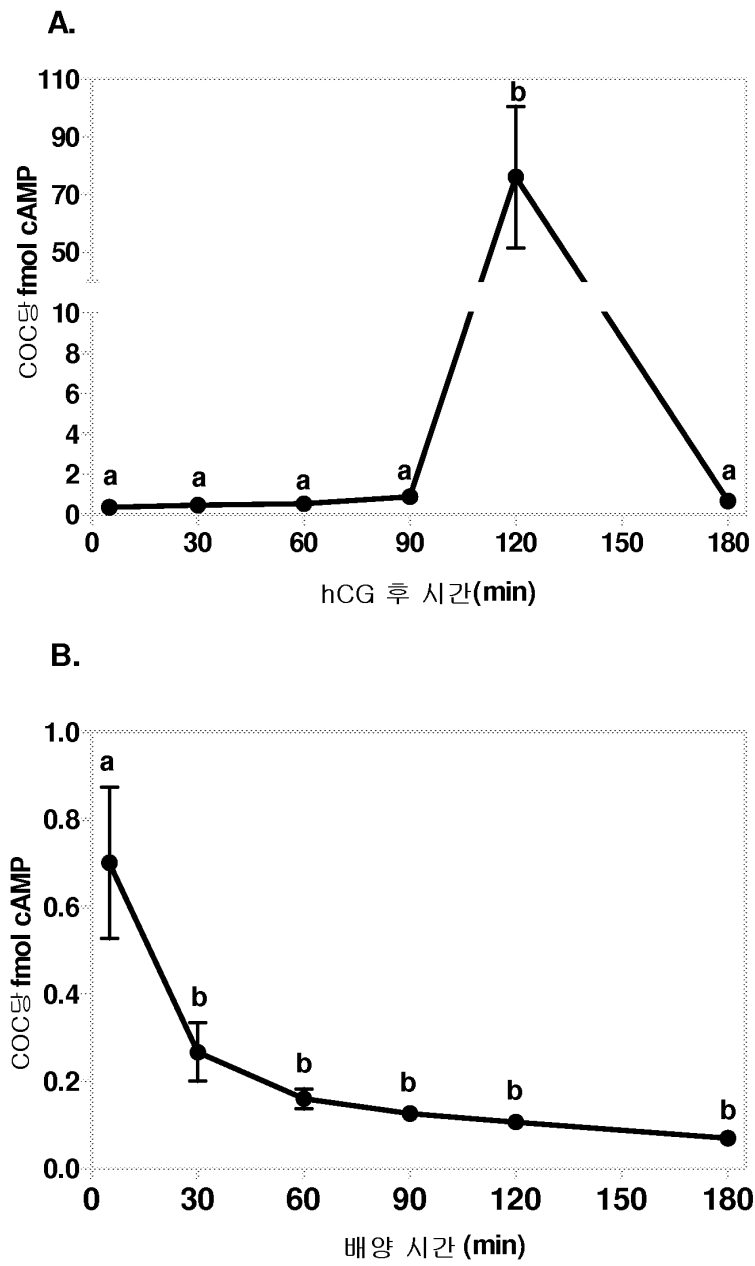
도면12



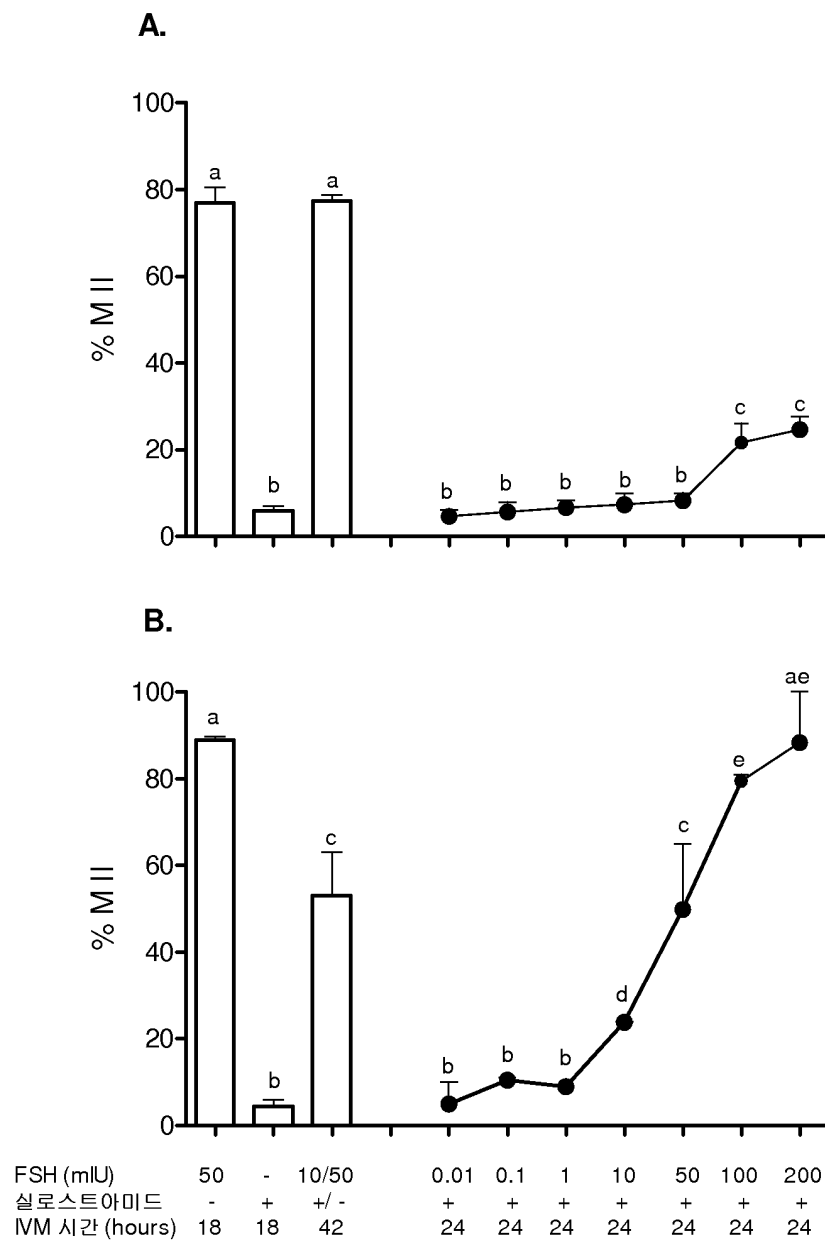
도면13



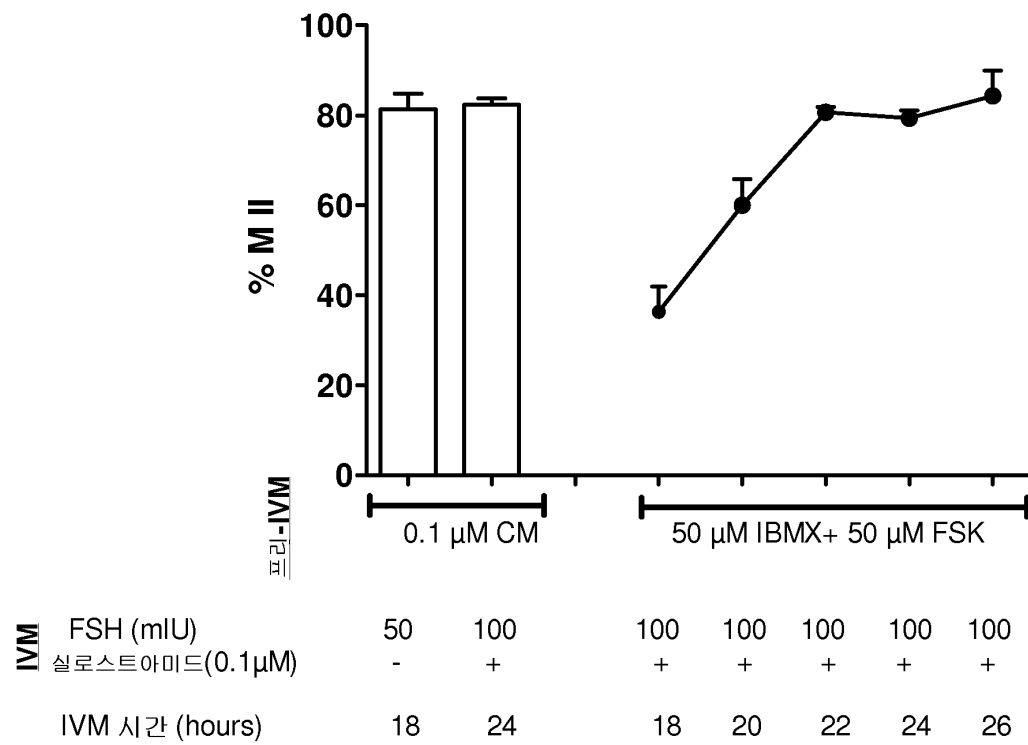
도면14



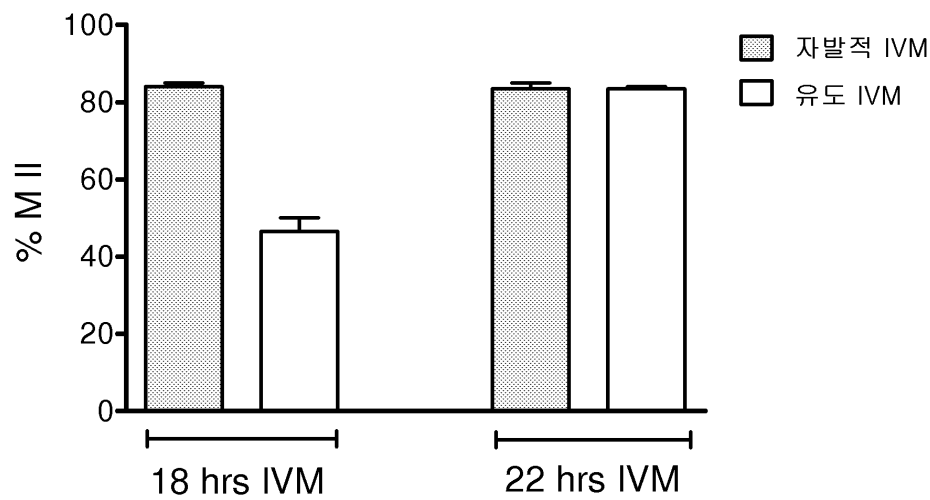
도면15



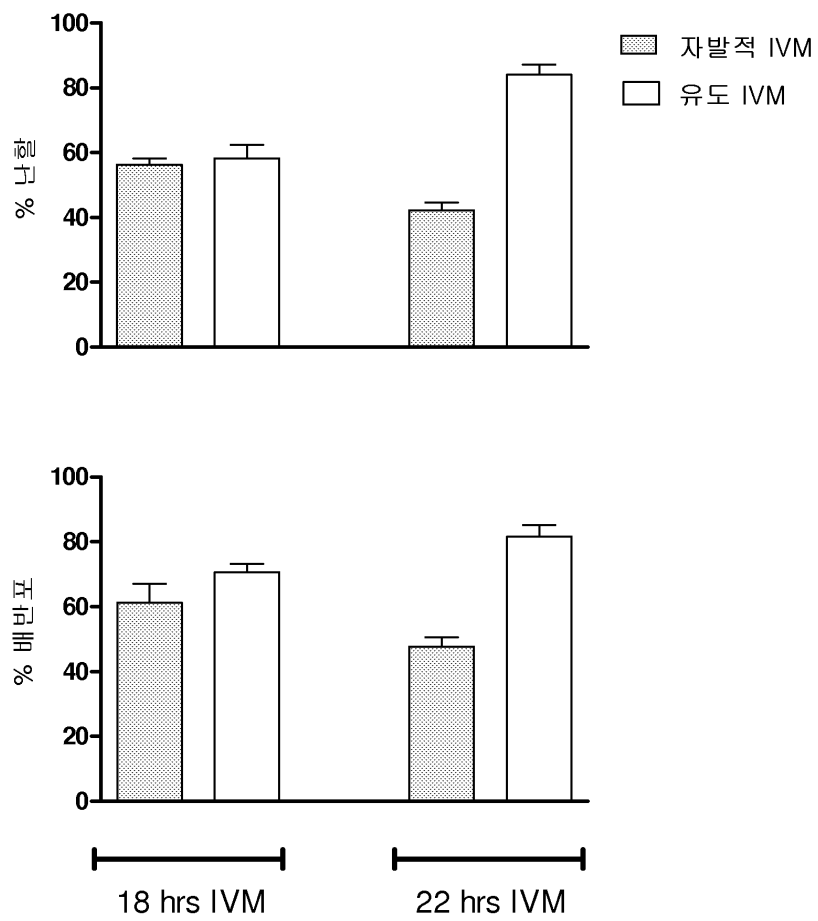
도면16



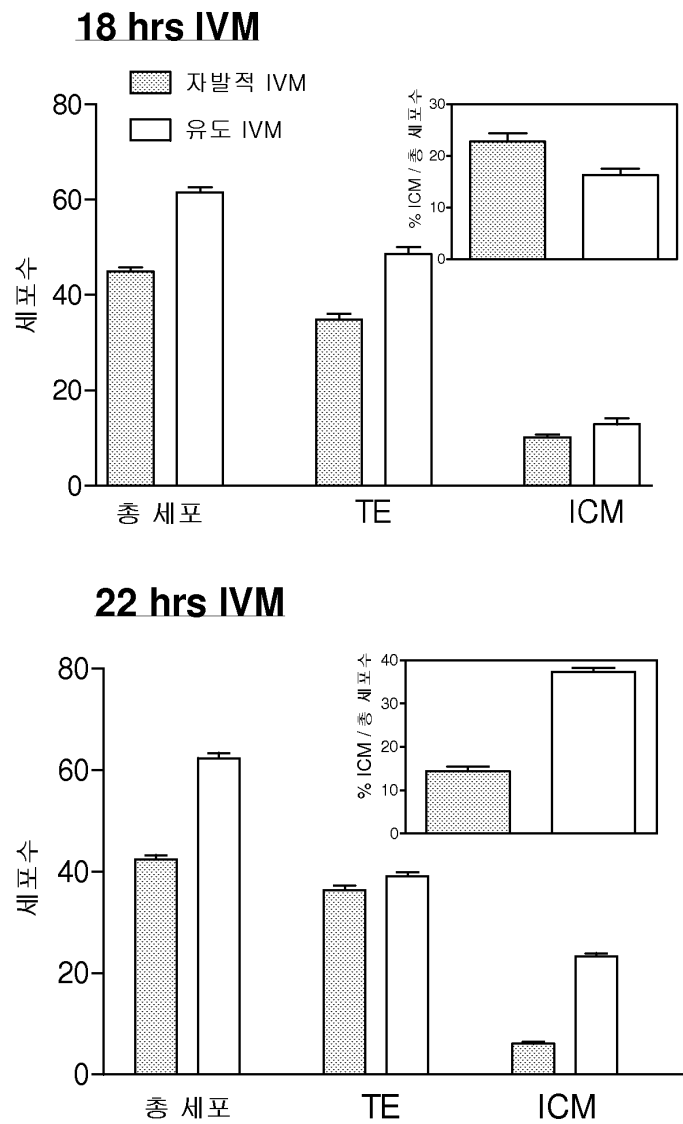
도면17



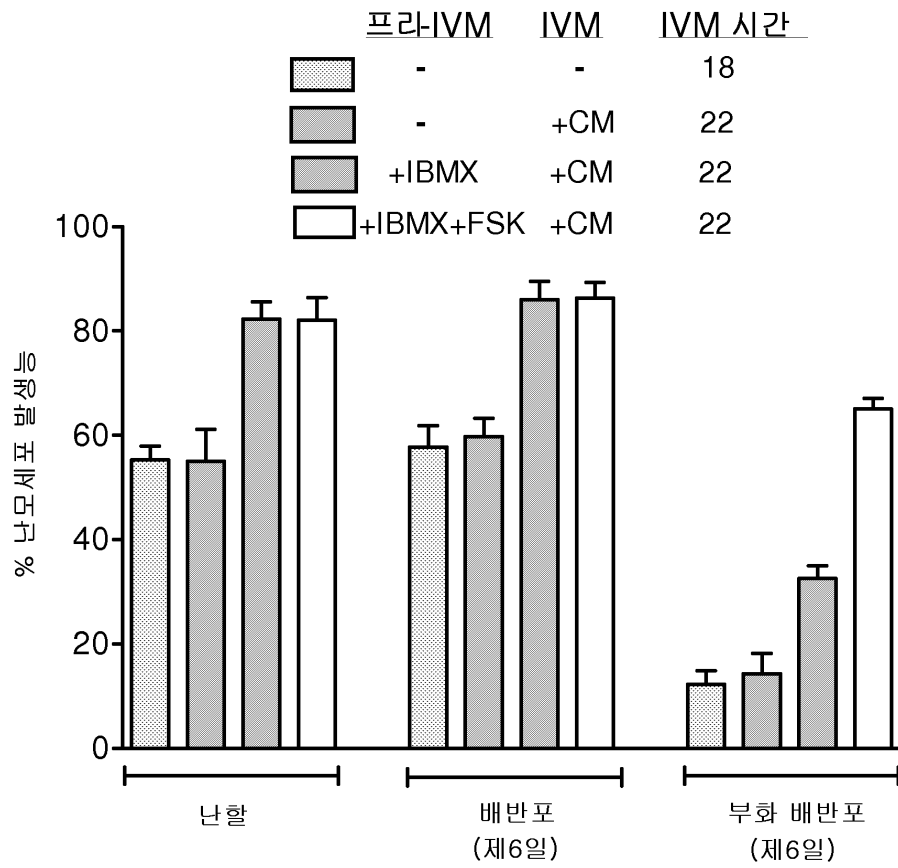
도면18



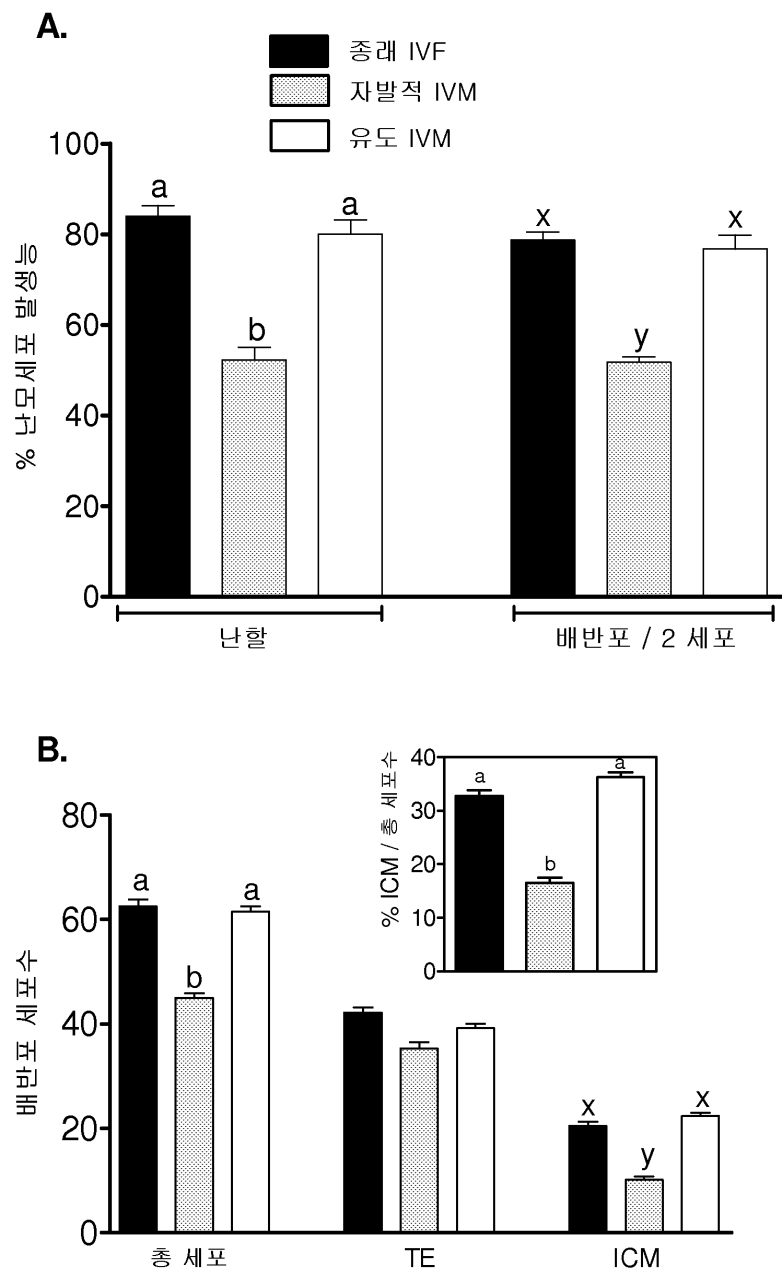
도면19



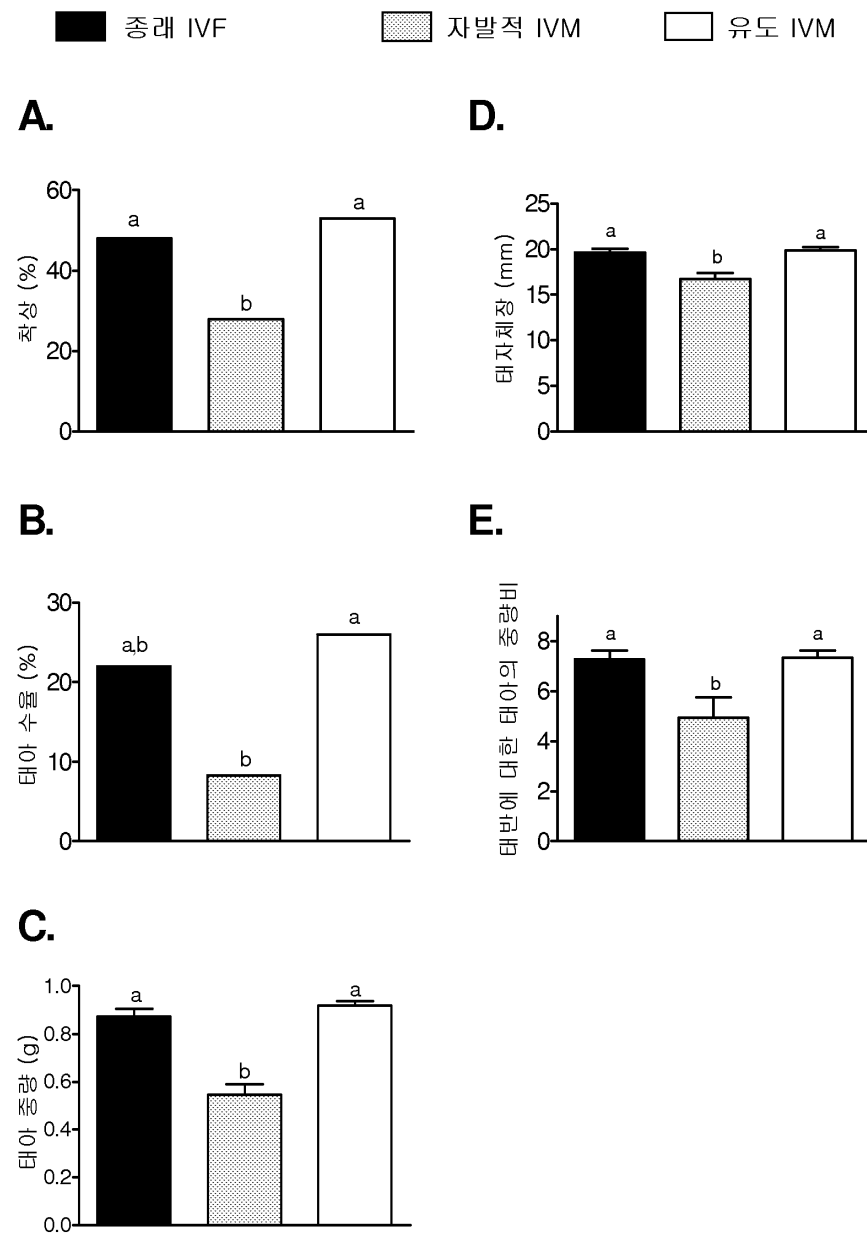
도면20



도면21



도면22



도면23

