

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0078269
(43) 공개일자 2022년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/36 (2006.01) *A61F 2/06* (2006.01)*A61L 27/50* (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/3604 (2013.01)*A61F 2/062* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0167628

(22) 출원일자 2020년12월03일

심사청구일자 2020년12월03일

(71) 출원인

충남대학교병원

대전광역시 중구 문화로 282 (대사동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김석환

대전광역시 서구 둔산북로 160 한마루아파트
7-705

여민경

대전광역시 서구 둔산남로 127 목련아파트
305-505

김국성

대전광역시 서구 둔산북로 160 한마루아파트
109-901

(74) 대리인

특허법인주원

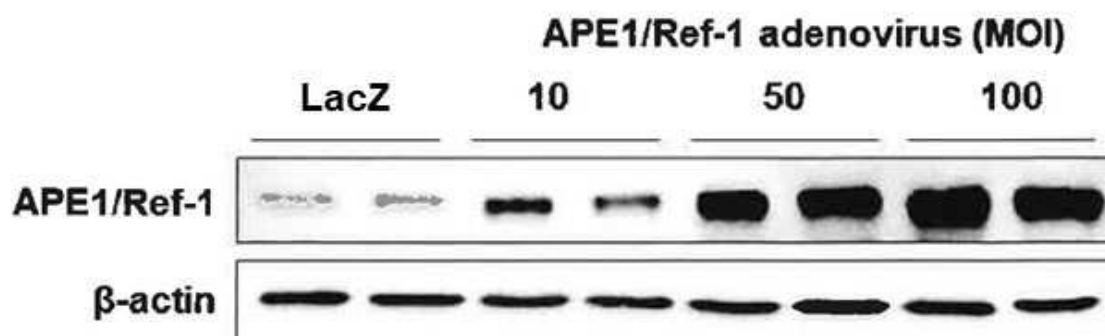
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 Ref-1이 과발현된 동종 장막 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 Ref-1이 과발현된 동종 장막(serous membrane) 및 이를 이용한 혈관 재건(vascular reconstruction) 용도를 제공하는 데 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61L 27/3683 (2013.01)
A61L 27/507 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
A61L 2300/258 (2013.01)
C12N 2710/10043 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104373
과제번호	2019M3E5D1A02068572
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구사업
연구과제명	복부 수술 중 정맥 재건을 위한 혈관 대체물로서 복막 사용에 대한 동물 모델에서의
가능성 평가	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교병원
연구기간	2019.07.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Ref-1이 과발현된 분리된 장막(serous membrane)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 장막은 복막(peritoneum), 흉막(pleura) 및 심막(pericardium)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 장막

청구항 3

제1항에 있어서, Ref-1은 아데노바이러스 벡터에 삽입되어 과발현된 것을 특징으로 하는 분리된 장막

청구항 4

제1항에 있어서, 과발현은 중피층(mesothelial layer) 투여를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 분리된 장막

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 분리된 장막을 포함하는 혈관 재건용 조성물

청구항 6

제5항에 있어서, 분리된 장막은 동종 또는 이종으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 혈관 재건용 조성물

청구항 7

제5항에 있어서, 혈관은 정맥 또는 동맥인 것을 특징으로 하는 혈관 재건용 조성물

청구항 8

제5항에 있어서, 혈관은 간 중간정맥(middle hepatic vein), 간 문맥(portal vein), 간 대정맥(inferior vena cava), 췌장문맥(pancreatic portal vein), 신장정맥(renal vein), 팔 정맥 및 다리 정맥으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 혈관 재건용 조성물

청구항 9

제5항에 있어서, 장막은 차가운 크랩스 완충액(iced Krebs buffer)에 보관 후 사용되는 것을 특징으로 하는 혈관 재건용 조성물

청구항 10

제5항에 있어서, 혈관 재건은 분리된 장막을 준비하는 단계; 차가운 완충액에 보관하는 단계; 원통형 구조물을 이용하여 혈관모양을 만드는 단계; 및 정맥을 부분 절제 후 장막혈관을 대치하여 연결하는 단계;로 구성된 것을 특징으로 하는 혈관 재건용 조성물

청구항 11

분리된 장막을 준비하는 단계;

차가운 완충액에 보관하는 단계;

Ref-1을 과발현시키는 단계; 및

Ref-1 과발현 여부를 확인하는 단계; 를 포함하는

제1항의 분리된 장막을 제조하는 방법

청구항 12

제1항의 분리된 장막을 준비하는 단계;

원통형 구조물을 이용하여 혈관모양을 만드는 단계; 및

정맥을 부분 절제 후 장막혈관을 대치하여 연결하는 단계;를 포함하는

인간을 제외한 동물에서 혈관을 재건하는 방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Ref-1이 과발현된 동종 장막 및 이를 이용한 혈관 재건 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현재 사용되고 있는 대표적인 암 치료법은 외과적 수술, 항암치료, 방사선 치료 등이 있다. 이 중 암 치료를 위해 가장 먼저 개발되어 사용된 방법은 바로 수술 요법이다. 암의 수술적 치료에는 크게 근치적 수술과 고식적 수술이 있다. ‘근치적 수술’이란 암 조직을 완전히 제거하는 수술로 완치를 목적으로 하는 수술을 말하며, 대부분의 암 수술이 여기 속한다. ‘고식적 수술’이란 암의 완전 제거는 불가능하지만 암 때문에 생긴 환자의 증상을 호전시키기 위해 시행하는 수술을 말한다. 예를 들어 암이 위장관을 막아서 음식을 못 먹는 경우라든가, 암이 담도를 막아서 황달이 심한 경우 수술로서 증상을 완화시키는 경우를 말한다.

[0004] 수술 방법이 고도화 됨에 따라 암 수술시 주변의 혈관 동반 절제를 통해 완벽히 암을 제거하고자 하는 시도가 수행되어 왔으나, 재건혈관 부족시 암을 완전히 제거하기에 어려움이 있었다. 생체 간이식의 경우 중간정맥 재건을 위한 혈관대체물질의 수요가 증가하고 있다. 인조혈관을 비롯한 다양한 시도들이 진행되어 왔으나, 이물반응으로 장 천공이 발생하는 등 다양한 부작용이 발생하여 그 사용에 제한이 있었다.

[0005] 장막(serous membrane)은 척추동물에서 복막, 흉막, 심막 등 체강에 맞닿은 유리면을 덮는 얇은 막으로, 복강내에서는 복막이지만, 흉부에서는 흉막과 심막 등의 용어로 불린다. 복막(peritoneum)은 복강을 따라 위치하는 장액성 막으로, 대부분의 복강내 장기를 덮고 있으며 얇은 결합조직인 중피막(mesothelial cell single layer)으로 구성되어 있다. 복막은 복부 내 여러 장기를 지지하며, 수많은 신경과 혈관, 림프관들이 지나다니는 도관과 같은 역할을 한다. 자가 복막(autologous peritoneum)을 이용한 혈관재건 수술방법은 프랑스의 safi dokmak이 최초로 발표하여 다양한 혈관재건에 이용되어 왔다. 간/담도/췌장 수술 분야에서는 문맥 및 대정맥 재건에 사용될 수 있고, 간이식분야에서는 생체간이식에서 중간 간정맥 및 대정맥 재건에 사용될 수 있으며, 췌장이식분야에서는 문맥재건에 사용가능하고, 신장이식분야에서는 신장정맥재건에 사용하는 등 다양한 혈관 재건 분야에서 광범위하게 사용될 수 있다. 그러나, 혈관재건 후 발생하는 다양한 합병증의 발생으로 인해 개선이 요구되고 있다.

[0006] APE1/Ref-1 (Apyrimidinic/apurinic endonuclease1/redox factor-1)은 염기절제 DNA 복구 및 유전자 발현의 전사 조절과 관련된 다기능 단백질이다. APE1/Ref-1의 다기능적 특성은 산화스트레스에 대한 세포 반응의 폭넓은 연구를 통해 밝혀져 있다. APE1/Ref-1의 산화환원 및 DNA 복구 기능은 완전히 독립적이고, in vitro에서 절단된 APE1/Ref-1 단백질의 분석은 산화환원 및 복구 활성이 별개의 영역에 의해 코딩됨을 나타내고 있다. 특히, N-말단 영역은 2개의 중요한 시스테인 잔기, C65와 C93으로 특징되는 산화환원 조절 도메인을 포함한다. APE1/Ref-1의 핵 위치이동(nuclear localization)은 N-말단 서열의 처음 20-25 아미노산에 의해 조절된다. 또한, APE1/Ref-1의 니트로소화(nitrosation)는 CRM1(chromosome region maintenance 1)-독립된 과정에서 세포질 위치이동(cytoplasmic localization)을 초래한다는 것이 보고되어 있다. 따라서 핵 이동 및 방출(nuclear import and export) 시스템은 APE1/Ref-1의 세포내 분포를 조절할 수 있다. APE1/Ref-1은 세포질의 Rac1-조절된 활성 산소종의 생성의 조절을 통해 산화 스트레스를 억제하고 내피세포의 산화질소 합성을 활성화함으로써 산화질소 생산을 자극한다. 내피세포에서, APE1/Ref-1은 TNF- α -유도된 단백질 부착을 완화시키고 혈관세포 부착 분자의 발현을 억제시킨다. 최근, APE1/Ref-1은 p66shc의 PKC β II-매개된 세린 인산화를 저해함으로써 내피세포에서 산

화된 LDL-유도성 p66shc 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다.

[0007] 한국등록특허 제1522499호는 APE1/Ref-1 변이체를 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, APE1/Ref-1를 포함하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제 947553호는 생체조직 이식재 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 소 양막을 이용한 다양한 생체조직 이식물을 포함하고 있다.

[0008] 하지만, 본 발명의 Ref-1이 과발현된 동종 장막 및 이를 이용한 혈관 재건 용도에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1522499호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제947553호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, Ref-1이 과발현된 동종 장막 및 이를 이용한 혈관 재건 용도를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 Ref-1이 과발현된 분리된 장막(serous membrane)을 제공한다.

[0014] 상기 장막은 복막(peritoneum), 흉막(pleura) 및 심막(pericardium)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, Ref-1은 아데노바이러스 벡터에 삽입되어 과발현된 것이며, 과발현은 중피층(mesothelial layer) 투여를 통해 이루어지는 것일 수 있다.

[0015] 다른 예로, 본 발명은 분리된 장막을 포함하는 혈관 재건용 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 분리된 장막은 동종 또는 이종으로부터 유래한 것이고, 혈관은 정맥 또는 동맥인 것이거나, 간 중간정맥(middle hepatic vein), 간 문맥(portal vein), 간 대정맥(inferior vena cava), 췌장문맥(pancreatic portal vein), 신장정맥(renal vein), 팔 정맥 및 다리 정맥으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0017] 상기 장막은 차가운 크랩스 완충액(iced Krebs buffer)에 보관 후 사용되는 것이고, 혈관 재건은 분리된 장막을 준비하는 단계; 차가운 완충액에 보관하는 단계; 원통형 구조물을 이용하여 혈관모양을 만드는 단계; 및 정맥을 부분 절제 후 장막혈관을 대치하여 연결하는 단계;로 구성된 것일 수 있다.

[0018] 또 다른 예로, 본 발명은 분리된 장막을 준비하는 단계; 차가운 완충액에 보관하는 단계; Ref-1을 과발현시키는 단계; 및 Ref-1 과발현 여부를 확인하는 단계; 를 포함하는 Ref-1이 과발현된 분리된 장막을 제조하는 방법을 제공한다.

[0019] 추가적으로, 본 발명은 Ref-1이 과발현된 분리된 장막을 준비하는 단계; 원통형 구조물을 이용하여 혈관모양을 만드는 단계; 및 정맥을 부분 절제 후 장막혈관을 대치하여 연결하는 단계;를 포함하는 인간을 제외한 동물에서 혈관을 재건하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은, Ref-1이 과발현된 동종 장막 및 이를 이용한 혈관 재건 용도에 관한 것으로, 제조된 동종 장막은 다

양한 외과 수술에서 혈관 대체물질로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명에 따른 AdLacZ 또는 AdAPE1(Ref-1) 재조합 벡터를 나타내는 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 동종 복막에서 AdRef-1 투여량에 따른 발현 결과를 나타내는 것이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 동종 복막을 이용한 혈관 수술 방법을 나타내는 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 AdRef-1 과발현 동종 복막을 사용한 수술 후 혈관 재건 효과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명의 바람직한 구현예에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명에서는 구체적인 구성요소 등과 같은 많은 특정 사항들이 도시되어 있는데, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0026] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Ref-1이 과발현된 분리된 장막(serous membrane)을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 ref-1 발현 아데노바이러스 벡터는 생체조직에 항 혈전 효과를 나타내는 기법으로 자체로서 또는 장막을 포함하는 다른 조직을 이용한 혈관 대체물질 개발에 사용될 수 있고, 바람직하게는 장막을 이용한 혈관 대체물질에 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 Ref-1은 바이러스 벡터를 사용하여 과발현될 수 있고, 바람직하게는 아데노바이러스 벡터에 삽입되어 과발현된 것이나, 이에 제한되는 것은 아니며, 과발현은 중피층(mesothelial layer) 투여를 통해 이루어지는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 장막은 필요할 때에 원하는 모양과 크기의 혈관으로 쉽게 만들 수 있는 장점이 있다. 상기 장막은 복막(peritoneum), 흉막(pleura) 및 심막(pericardium)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 또한, 본 발명은 분리된 장막을 포함하는 혈관 재건용 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명에 따른 장막을 이용한 혈관 재건은 사람을 포함하는 동물의 모든 혈관의 재건에 관한 것이고, 구체적으로 동맥 또는 혈관의 재건에 관한 것이다. 바람직하게는 생체 간이식 수술에서 중간정맥(middle hepatic vein) 재건, 간/담도/췌장암 수술에서 문맥(portal vein) 및 대정맥(inferior vena cava) 재건, 복부 수술 중 정맥 재건, 췌장이식 수술에서 췌장문맥(pancreatic portal vein), 신장이식 수술에서 신장정맥(renal vein) 및 혈관이 필요한 팔 또는 다리의 혈관 재건이 필요한 경우로 이루어진 것에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 따른 장막을 이용한 혈관 재건은 종의 종류와 무관하게 사용할 수 있고, 바람직하게는 동종의 장막 조직을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 장막의 처리는 완충액(buffer) 농도를 맞추기만 하면 누구든지 쉽게 할 수 있는 방법이다. 본 발명에서 장막의 처리를 위한 완충액은 세포 또는 조직의 처리를 위해 사용할 수 있는 모든 완충액을 사용할 수 있고, 구체적으로 세포 배양 배지(cell culture medium), 인산염 완충액(PBS), 크랩스 완충액 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 차가운 크랩스 완충액(Iced Krebs buffer- 118.3 mM NaCl / 4.7 mM KCl / 2.5 mM CaCl₂ / 1.2 mM KH₂PO₄ / 25 mM NaHCO₃ / 1.2 mM MgSO₄ / 11 mM 포도당 / 0.0026 mM CaNa₂EDTA)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명은 분리된 장막의 제조방법으로, 본 발명은 분리된 장막을 준비하는 단계; 차가운 완충액에 보관하는 단계; Ref-1을 과발현시키는 단계; 및 Ref-1 과발현 여부를 확인하는 단계; 를 포함하는 Ref-1이 과발현된 분리된 장막을 제조하는 방법을 제공한다.

[0035] 추가적으로, 본 발명은 Ref-1이 과발현된 분리된 장막을 준비하는 단계; 원통형 구조물을 이용하여 혈관모양을 만드는 단계; 및 정맥을 부분 절제 후 장막혈관을 대치하여 연결하는 단계;를 포함하는 인간을 제외한 동물에서 혈관을 재건하는 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다

[0039] <실시예 1> AdLacZ 및 AdAPE1(Ref-1) 제조방법

[0040] 본 발명에서 사용한 LacZ의 서열은 Genbank Accession No. NC_000913.3이고, Ref-1의 서열은 Genbank Accession No. NM_080648.3이다. 프로모터는 CMV이며, 작동부위는 MCS 시작부분이다. 그리고 항생제 부위는 Kanamycin 저항성 부위를 사용하여, 이 분야에서 일반적으로 사용하는 벡터 제작 방법으로 제작하였다. 바이러스는 Adeno viral gate way expression kit (TehrmoFisher)를 이용하여 제작하였다(도 1).

[0042] <실시예 2> 복막처리 방법 및 ref-1 발현량 확인

[0043] 1) 복막을 조심스럽게 절제하고 차가운 크랩스 완충액(Iced Krebs buffer- 118.3 mM NaCl / 4.7 mM KCl / 2.5 mM CaCl₂ / 1.2 mM KH₂PO₄ / 25 mM NaHCO₃ / 1.2 mM MgSO₄ / 11 mM 포도당 / 0.0026 mM CaNa₂EDTA)에 보관하였다.

[0044] 2) 복강 절편(1cm X 1cm)은 DMEM(10%BSA) 2ml에 배양을 하였으며, AdLacZ 또는 AdRef-1 10, 50, 100 MOI 씩 DMEM 배지에 투여하여 감염시키고 37° C 에서 24시간 동안 배양하였다.

[0045] 3) Western blot 분석

[0046] 복강 절편을 RIPA buffer(10mM Tris-HCl at pH 8.0, 1mM EDTA, 140mM NaCl, 0.1% SDS, 0.1% 200 sodium deoxycholate, 1% Triton X-100)와 protease inhibitor cocktail 을 사용하여 Homogenize machine를 통해 용균(lysis)하였다.

[0047] 30μg의 단백질을 SDS-PAGE에 loading한 후 transfer (90V, 4℃, 2h)를 시행하였다. 5% skim milk에서 blocking 후 1차 항체(Ref-1 또는 β-actin; Santa Cruz Biotechnology)를 반응시켰으며(4℃, 0/N), 2차 항체는 Rabbit 과 Mouse를 각각 사용하였다. ECL solution를 이용하여 형광을 발광시켰으며 Chemi Doc을 이용하여 정량하였다.

[0048] 복막을 상기 방법으로 처리하였을 때, ref-1 복막에 용량의존적으로 발현되는 것을 확인하였다(도 2).

[0050] <실시예 3> 동종 복막을 이용한 혈관 수술 방법

[0051] 도 3에 나타낸 바와 같이, 복막을 이용한 혈관 수술 방법은 하기의 단계로 구성된다.

[0052] 1) 동종의 복막을 blunt scissors로 조심스럽게 분리한다(도 3의 좌측).

[0053] 2) Ref-1으로 처리된 복막을 원통형 구조물을 이용하여 혈관 모양을 만든다(도 3의 중간).

[0054] 3) 정맥을 부분 절제후 복막혈관을 대치하여 연결한다(도 3의 우측).

[0056] <실시예 4> AdRef-1 과발현 동종 복막을 사용한 수술 후 혈관 재건

[0057] 본 발명에 사용한 동물은 뉴질랜드 화이트 토끼 10주령 수컷을 사용하였다. 각 14일째, 28일째 두 그룹으로 나누었으며, 각각 Ref-1 처리 여부에 따라 세부 그룹을 나누어 두 마리씩 실험을 진행하였다(표 1)

표 1

Model (n=8)	14-day group (n=4)		28-day group (n=4)	
	Ref-1 (X, n=2)	Ref-1 (O, n=2)	Ref-1 (X, n=2)	Ref-1 (O, n=2)
Patency (%)	50	100	0 (near total occlusion)	100
Outer diameter (mm)				
Anastomosis				
Initial	7.18	7.28	7.21	7.20
At end of the study	6.30	6.38	3.46	3.58
Midpoint of the graft				
Initial	7.35	7.54	7.29	7.31
At end of the study	6.69	6.84	4.38	4.22
Inner diameter (mm)				
Anastomosis				
At end of the study	5.22	5.63	(thrombosed)	3.32
Midpoint of the graft				
At end of the study	5.34	5.72	(thrombosed)	3.43

[0059]

[0061]

동종에서 복막을 적출한 뒤 아무런 처리를 하지 않고 토끼의 대정맥을 대치하는 수술을 하였을 때, 수술 후 14 일째부터 혈전으로 막히는 것을 확인할 수 있다(도 4의 상단).

[0062]

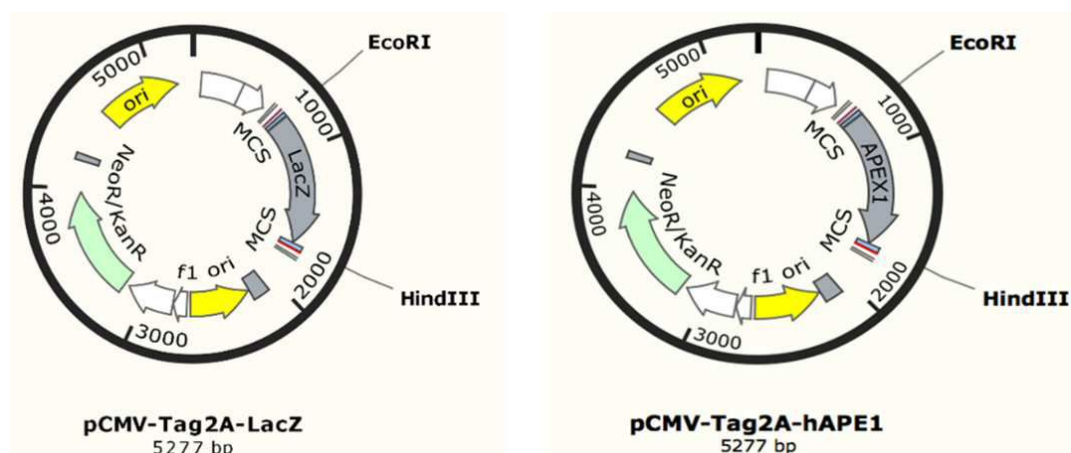
동종복막을 adenovirus를 이용하여 ref-1 발현 후 동일 수술을 진행하였을 때, 수술 후 14일 뿐 아니라 28일에도 개통성이 유지되는 것을 볼 수 있다(도 4의 하단).

[0063]

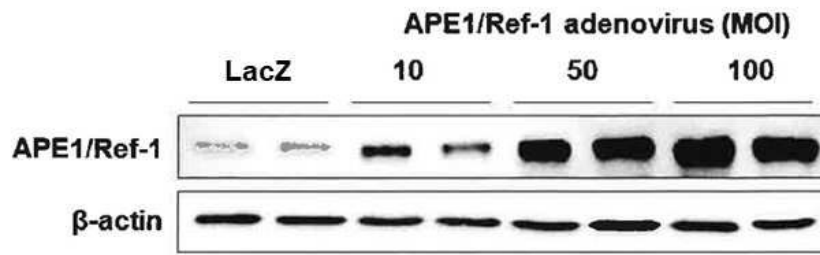
따라서 복막의 ref-1 발현은 정맥혈관 수술에서 antithrombus, 항혈전 작용이 있음을 충분히 알 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3



도면4

