



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0091584
(43) 공개일자 2023년06월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
A01N 1/0284 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0180818
(22) 출원일자 2021년12월16일
심사청구일자 2021년12월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이상훈
서울특별시 강남구 삼성로111길 8, 210동 1301호 (삼성동, 삼성동힐스테이트2단지아파트)
김보람
서울특별시 용산구 청파로71가길 22, 302호(청파동1가)
이장우
서울특별시 동대문구 약령시로5길 4-4, 401호(제기동, 제기 파크빌 1)
(74) 대리인
특허법인태백

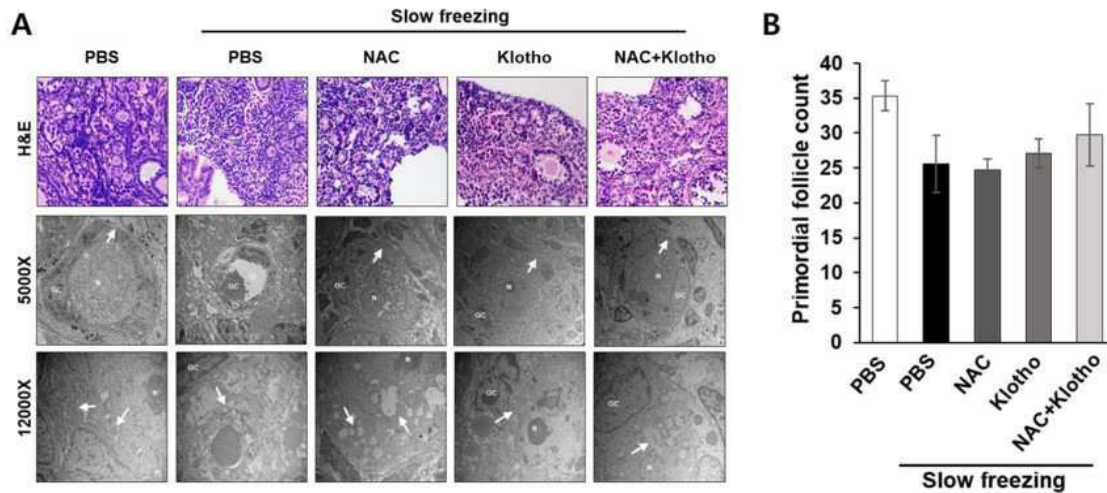
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 클로토 단백질 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 난소 동결보존용 조성물

(57) 요약

본 발명은 클로토(Klotho) 단백질 및 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine; NAC)을 포함하는 난소 동결보존용 조성물에 대한 것으로서, 암환자의 가임력 보존을 위한 난소조직의 동결보관시, 동결보존액에 항산화 단백질을 첨가하여 난소를 동결보존하는 방법에 관한 것으로, 조직손상을 최소화할 수 있는 동결보존용 조성물에 관한 것이다. 항산화물질이 함유된 동결보존액 및 해동액을 사용한 난소조직은 ROS와 세포사멸을 감소시키고 미토콘드리아 기능과 세포생존력을 향상시켜 난소조직의 냉동보존 및 해동에 효과적이었다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 5/0682 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110751
과제번호	2016R1C1B3015250
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	인간난소조직 동결보존 및 이식술 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

클로토(Klotho) 단백질을 유효성분으로 포함하는 난소 동결보존용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine; NAC)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 난소 동결보존용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 0.4ug/ml의 클로토(Klotho) 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 난소 동결보존용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 조성물은 5mM의 NAC를 포함하는 것을 특징으로 하는 난소 동결보존용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결보존은 4℃에서 -2.0℃/min의 속도로 -7.0℃까지 냉각시키고, -0.3℃/min의 속도로 -40.0℃까지 냉각시키며, -10℃/min의 속도로 -140℃까지 냉각시킨 후, 액체 질소에서 보관하는 것을 특징으로 하는 난소 동결보존용 조성물.

청구항 6

난소 조직을 클로토(Klotho) 단백질이 포함된 배지에 첨가하는 단계; 및
상기 배지를 동결보존하는 단계를 포함하는 난소 동결보존 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 배지에는 NAC가 더 포함되는 것을 특징으로 하는 난소 동결보존 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 동결보존은 4℃에서 -2.0℃/min의 속도로 -7.0℃까지 냉각시키고, -0.3℃/min의 속도로 -40.0℃까지 냉각시키며, -10℃/min의 속도로 -140℃까지 냉각시킨 후, 액체 질소에서 보관하는 것을 특징으로 하는 난소 동결보존 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 클로토(Klotho) 단백질 및 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine; NAC)을 포함하는 난소 동결보존용 조성물에 대한 것으로서, 암환자의 가임력 보존을 위한 난소조직의 동결보관시, 동결보존액에 항산화 단백질을 첨가하여 난소를 동결보존하는 방법에 관한 것으로, 조직손상을 최소화할 수 있는 동결보존용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난소 조직동결은 아주 작게 보관된 난소 피질 조직 한 조각에도 향후 무수히 많은 난자로 성숙될 수 있는 원시 난포가 모여있는 조직이며, 암 치료전 환자의 가임력을 보존하기 위해 암 치료를 시작하기 전에 난소조직을 동결보관을 시행한다. 이때, 조직의 손상을 최소화시키기 위하여 동결보호제 선택, 농도, 노출시간 등을 적절히

조정할 필요가 있다. 이를 위해 다양한 보존제의 연구 및 프로세스가 연구 및 임상에 적용되고 있다.

[0003] 활성산소종(ROS)은 분자산소(O_2)로부터 형성된 반응성이 높은 화학물질로 생물학적으로 ROS는 정상적인 산소 대사의 부산물이다. 분자 산소의 환원은 과산화물을 생성하고 과산화물의 불균일화는 과산화수소(H_2O_2)를 생성한다. 과산화수소는 부분적으로 환원되어 수산화물 이온과 히드록실 라디칼($\cdot OH$)을 형성하거나 완전히 물로 환원될 수 있다.

[0004] ROS는 세포 기능에 본질적이며 정상 세포에서 낮고 정지된 수준으로 존재한다. 그러나 환경 스트레스가 있는 동안 ROS 수준이 급격하게 증가할 수 있다. ROS가 증가하면 일부 세포 구성 요소를 산화 및 변형하고 원래 기능을 수행하는 것을 방해하기 때문에 DNA에 돌이킬 수 없는 손상을 줄 수 있다. 이것은 세포 구조에 심각한 손상을 초래할 수 있다. 이를 산화 스트레스라고 하는데 산화 스트레스는 산화 DNA 손상을 일으키고, 이는 이후 p53을 상향 조절하여 내재적 미토콘드리아 세포 사멸을 유발한다.

[0005] 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈(Superoxide dismutases; SOD)는 수퍼옥사이드(superoxide)를 산소와 과산화수소로 변환하는 촉매 작용을 하는 효소의 한 종류다. 따라서 이들은 산소에 노출된 거의 모든 세포에서 중요한 항산화 방어 역할을 하는데, NAC 및 클로토(Klotho)는 FoxO3a를 통해 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈(Superoxide dismutases)를 상향조절하여 미토콘드리아 ROS 생산의 음성 조절자로서 기능을 한다.

[0006] 지금까지 알려진 종래의 동결 보존기술에서는 동결보호제와 최적화된 프로토콜의 사용으로 세포 생존력을 향상시키는 것으로 보이지만, 동결, 해동 과정에 걸쳐 세포는 다수의 스트레스와 손상을 받게 되고 조직 내의 세포에 회복 불가능한 손상을 초래할 수 있는 극도의 스트레스 요인이다. 산화 스트레스가 고농도이면 세포 독성을 유발하고 정자와 난자를 수정하는 능력을 손상시킬 수 있다. 이에 이를 개선할 수 있는 난소 동결보존 기술이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 중국공개특허 CN 113207869 A (2021.08.06 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명은 클로토(Klotho) 단백질 및 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine; NAC)을 포함하는 난소 동결보존용 조성물에 대한 것으로서, 암환자의 가임력 보존을 위한 난소조직의 동결보관시, 동결보존액에 항산화 단백질을 첨가하여 난소를 동결보존하는 방법에 관한 것으로, 조직손상을 최소화할 수 있는 동결보존용 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클로토(Klotho) 단백질을 유효성분으로 포함하는 난소 동결보존용 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 조성물은 NAC를 더 포함할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 난소 조직을 클로토(Klotho) 단백질이 포함된 배지에 첨가하여, 동결보존하는 단계를 포함하는 난소 동결보존 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 배지는 NAC를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 클로토(Klotho) 단백질 및 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine; NAC)을 포함하는 난소 동결보존용 조성물에 대한 것으로서, 암환자의 가임력 보존을 위한 난소조직의 동결보관시, 동결보존액에 항산화 단백질을 첨가하여 난소를 동결보존하는 방법에 관한 것으로, 조직손상을 최소화할 수 있는 동결보존용 조성물에 관한 것이다. 항산화물질이 함유된 동결보존액 및 해동액을 사용한 난소조직은 ROS와 세포사멸을 감소시키고 미토콘드리아 기능과 세포생존력을 향상시켜 난소조직의 냉동보존 및 해동에 효과적이었다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명의 느린 동결(Slow freezing) 방법의 모식도를 나타낸다.
- 도 2는 각 그룹의 원시 난포의 형태는 헤마톡실린(Hematoxylin)과 에오신(eosin)(H&E) 염색과 투과전자현미경으로 평가한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 동결보존으로 인한 산화 스트레스가 난소 DNA 손상에 의해 매개되는지 여부를 확인하기 위해, DNA 손상으로 인한 이중 가닥 파손(DSB) 마커인 γ -H2AX와 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)을 사용하여 면역화학적 염색을 수행한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 NAC와 클로토(Klotho)가 냉동보존으로 유도된 노화에 미치는 영향을 테스트하기 위해, 생물학적 노화 마커인 p16ink4a를 면역화학적 염색을 수행한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 NAC 및 클로토(Klotho) 처리가 동결 보존에서 환경 스트레스에 대한 반응으로 DNA 복구와 세포사멸에 관여하는 마커인 PARP를 면역화학적 염색 및 세포 사멸 매개 단백질의 면역 블로팅 분석을 수행한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

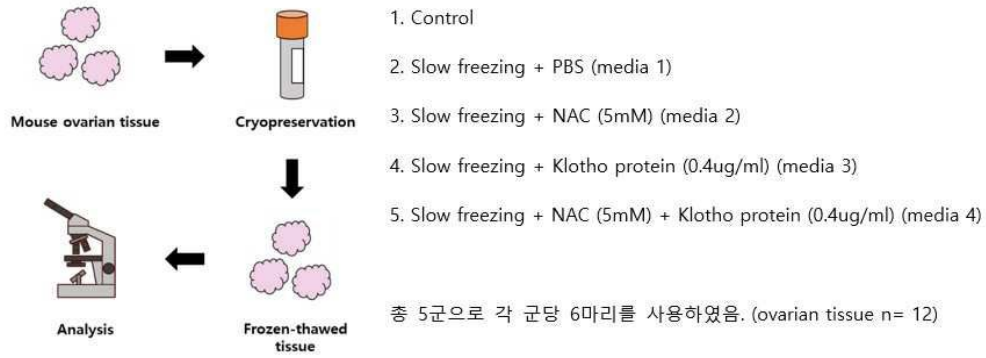
- [0013] 본 발명은 클로토(Klotho) 단백질을 유효성분으로 포함하는 난소 동결보존용 조성물을 제공한다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 조성물은 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine; NAC)를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 보다 바람직하게는, 상기 조성물은 0.4ug/ml의 클로토(Klotho) 단백질을 포함할 수 있고, 5mM의 NAC를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 보다 바람직하게는, 상기 동결보존은 4℃에서 -2.0℃/min의 속도로 -7.0℃까지 냉각시키고, -0.3℃/min의 속도로 -40.0℃까지 냉각시키며, -10℃/min의 속도로 -140℃까지 냉각시킨 후, 액체 질소에서 보관할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 또한, 본 발명은 난소 조직을 클로토(Klotho) 단백질이 포함된 배지에 첨가하는 단계; 및 상기 배지를 동결보존하는 단계를 포함하는 난소 동결보존 방법을 제공한다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 배지에는 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine; NAC)를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 보다 바람직하게는, 상기 동결보존은 4℃에서 -2.0℃/min의 속도로 -7.0℃까지 냉각시키고, -0.3℃/min의 속도로 -40.0℃까지 냉각시키며, -10℃/min의 속도로 -140℃까지 냉각시킨 후, 액체 질소에서 보관할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 용어 "동결보존"이란, 냉동을 통해 장기간에 걸쳐 세포를 안정하게 유지시키는 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "동결보존용 조성물"이란, 동결보존제 또는 동결보호제라고도 하고, 세포를 동결상태에서 보존할 경우, 다수의 스트레스와 손상을 경감할 목적으로 첨가시키는 물질을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 동결보존용 조성물은 난소를 동결보존하기 위하여 사용되는 조성물로 해석될 수 있는데, 클로토(Klotho) 단백질을 주성분으로 포함하고, NAC를 추가적으로 포함할 수 있으며, 난소의 동결보존에 사용되는 기타 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0023] <실시예>
- [0024] 1. 실험 방법
- [0025] 난소 조직을 아래 조건으로 순차적 처리 후, 제어 속도 동결 장치를 통해 4℃에서 -2.0℃/min의 속도로 -7.0℃까지 냉각한 다음, -40.0℃까지 -0.3℃/min의 속도, -140℃까지 -10℃/min의 속도로 냉각시킨 후 액체 질소에서 196℃에 보관하였다.
- [0026] media 1. M199 배양 배지 + 5% SSS, 5% DMSO - 5분

- [0027] media 2. M199 배양 배지 + 5% SSS, 7.5% DMSO - 15분
- [0028] media 3. M199 배양 배지 + 5% SSS, 10% DMSO - 15분으로 순차적 처리
- [0029] media 4. M199 배양 배지 + 5% SSS, 12.5% DMSO 1ml를 동결튜브에 난소조직과 함께 담는다.
- [0030] 도 1에 나타난 바와 같이, Control은 냉각처리를 진행하지 않은 조직 샘플이며, 2-5번 군은 상기 media 1-4번에 각 군에 맞추어 PBS, NAC (5mM), 클로토(Klotho) 단백질 (0.4ug/ml), NAC (5mM) + 클로토(Klotho) 단백질 (0.4ug/ml)을 각 media 1-4에 첨가하여 진행하였다. 이후, 4주간 액체질소 통에 보관 후 37℃ 온수에 해동 후 실험 진행하였다.
- [0031] **2. 실험 결과**
- [0032] 각 그룹의 원시 난포의 형태는 헤마톡실린(Hematoxylin)과 에오신(eosin)(H&E) 염색과 투과전자현미경으로 평가하였다. 원시 난포의 수는 대조군 마우스 난소 조직과 비교하여 느린 동결(Slow freezing) 조직에서 약간 감소하였다(도 2B). 투과전자현미경에서 대조군에서는 원시 난포 주변의 기저층이 내부와 외부로 명확하게 구분하였다. PBS로 천천히 얼린 조직은 원시 난포 주변의 손상된 기저층을 보인 반면, NAC, 클로토(Klotho) 및 이들의 조합으로 전처리된 마우스 난소 조직은 복원된 원시 난포 기저층을 보여주었다(도 2A, 중간). 투과 전자 현미경은 미토콘드리아 구조가 천천히 동결된 조직에서 파괴되었음을 보여주었으며, 이는 미토콘드리아가 느린 동결 조건에서 생존하지 못할 수 있음을 암시한다. NAC, 클로토(Klotho) 단백질 및 이들의 조합으로 처리하면 느리게 동결된 마우스 난소 조직에서 미토콘드리아 구조가 회복되었다(도 1A, 하단). 이러한 데이터는 NAC와 클로토(Klotho)가 느린 동결 방법에 의한 난소 조직의 동결 보존으로부터 형태학적 변화를 보호할 수 있음을 시사한다.
- [0033] 또한, 동결보존으로 인한 산화 스트레스가 난소 DNA 손상에 의해 매개되는지 여부를 확인하기 위해, DNA 손상으로 인한 이중 가닥 파손(DSB) 마커인 γ -H2AX와 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)을 사용하여 면역화학적 염색을 수행하였다. 8-OHdG는 활성산소 유발 산화 병변의 주된 형태 중 하나인 산화 스트레스에 대한 바이오마커이다. 느린 동결 마우스 난소 조직은 대조군 난소 조직과 비교하여 γ -H2AX를 현저하게 증가시킨 반면, NAC, 클로토(Klotho) 및 조합 처리는 느린 동결 유도 γ -H2AX를 유의하게 감소시켰다(도 3A 및 도 3B). 이와 유사하게 느린 동결(Slow freezing)된 마우스 조직에서 증가된 8-OHdG는 NAC, 클로토(Klotho) 및 이들의 조합 처리에 의해 억제되었다(도 3A 및 도 3C). 또한, 성장 정지 및 DNA 손상 유도성 단백질인 GADD45A의 qPCR은 느린 동결(Slow freezing)로 유도된 GADD45A 발현이 NAC, 클로토(Klotho) 및 이들의 조합 처리에 의해 억제됨을 보여주었다(도 3D). 이 데이터는 느린 동결 제어에서 DNA 손상과 산화 스트레스의 증가가 난소 조직 동결 보존에서 NAC와 클로토(Klotho) 단백질 처리에 의해 조절되었음을 시사한다.
- [0034] 한편, NAC와 클로토(Klotho)가 냉동보존으로 유도된 노화에 미치는 영향을 테스트하기 위해, 생물학적 노화 마커인 p16ink4a를 면역화학적 염색을 통해 수행하였다(도 4A 및 도 4B). p16ink4a의 수준은 천천히 동결된 대조군 조직과 비교하여 NAC 처리된 난소 조직에서 유의하게 유도되었다. 대조적으로, 클로토(Klotho) 단백질 처리군은 NAC로 유도된 p16ink4a를 유의하게 감소시켰다(도 4A 및 도 4B). 이러한 데이터는 클로토(Klotho) 단백질이 난소 조직에서 동결 보존 또는 NAC 유도 노화를 보호할 수 있음을 입증하였다. 스트레스 반응에 대한 클로토(Klotho) 단백질의 영향을 확인하기 위해 세포 조절 및 수명에 관여하는 Sirtuin1(SIRT1)의 qPCR을 수행했습니다. NAC로 유도된 SIRT1 발현이 느린 동결 조건에서 클로토(Klotho) 단백질에 의해 유의하게 감소되었음을 보여주었다(도 4C). 이러한 데이터는 클로토(Klotho) 단백질이 난소 조직에서 동결보존 또는 NAC 유발 스트레스를 보호할 수 있음을 입증하였다.
- [0035] 투과 전자 현미경은 NAC 처리가 천천히 동결된 난소 마우스 조직에서 비정상적인 핵 구조를 유도함을 보여주었다(도 5A, 상단). NAC 및 클로토(Klotho) 처리가 동결 보존에서 환경 스트레스에 대한 반응으로 DNA 복구와 세포사멸에 관여하는 마커인 PARP를 면역화학적 염색을 실행하였다(도 5A, 하단). NAC를 처리한 그룹에서 PARP가 증가된 반면, 클로토(Klotho) 단백질 처리 그룹에서 NAC 매개 PARP를 유의하게 감소시켰다(도 5A 및 도 5B). 또한, 세포사멸 매개 단백질의 면역블롯팅 분석은 느린 동결(Slow freezing) PBS 및 NAC 처리가 동결보존된 난소 조직에서 세포사멸 수준을 유도함을 보여주었다(도 5C). 그러나 클로토(Klotho) 단백질은 세포사멸 매개 단백질의 발현을 유의하게 감소시켰으며, 이는 클로토(Klotho)가 천천히 동결된 난소 조직에서 유망한 항세포사멸사제가 될 수 있음을 시사한다.
- [0036] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

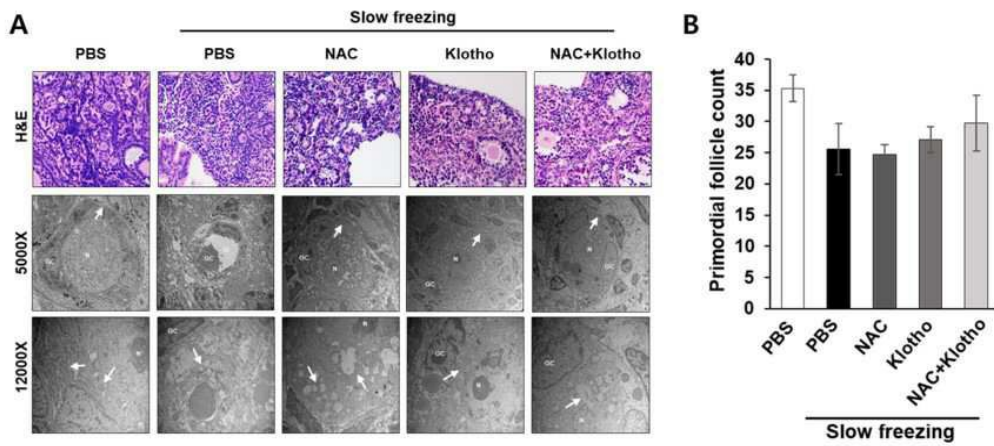
명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

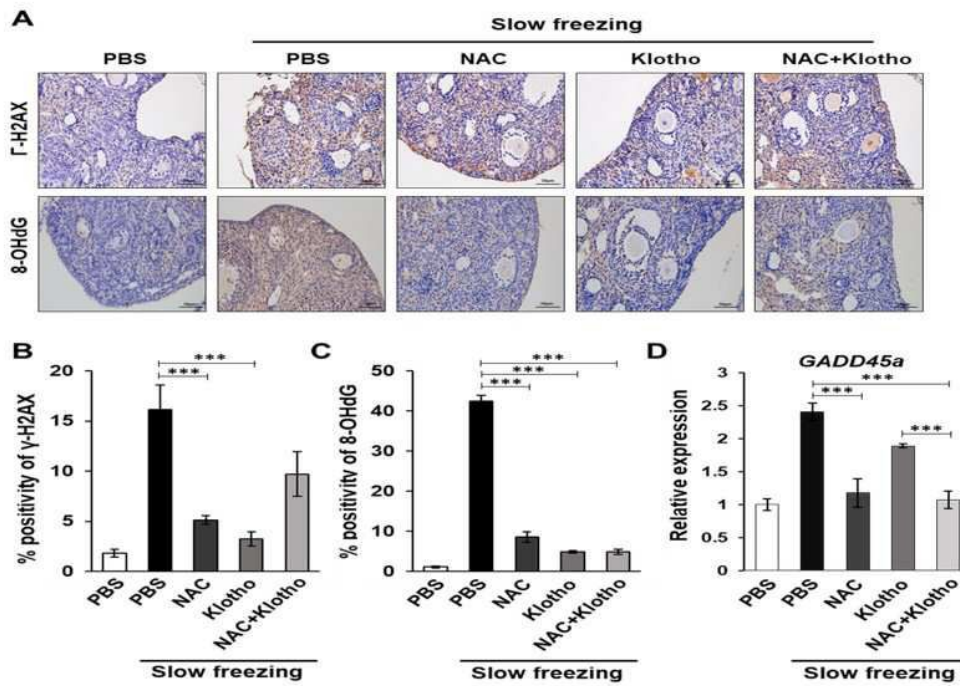
도면1



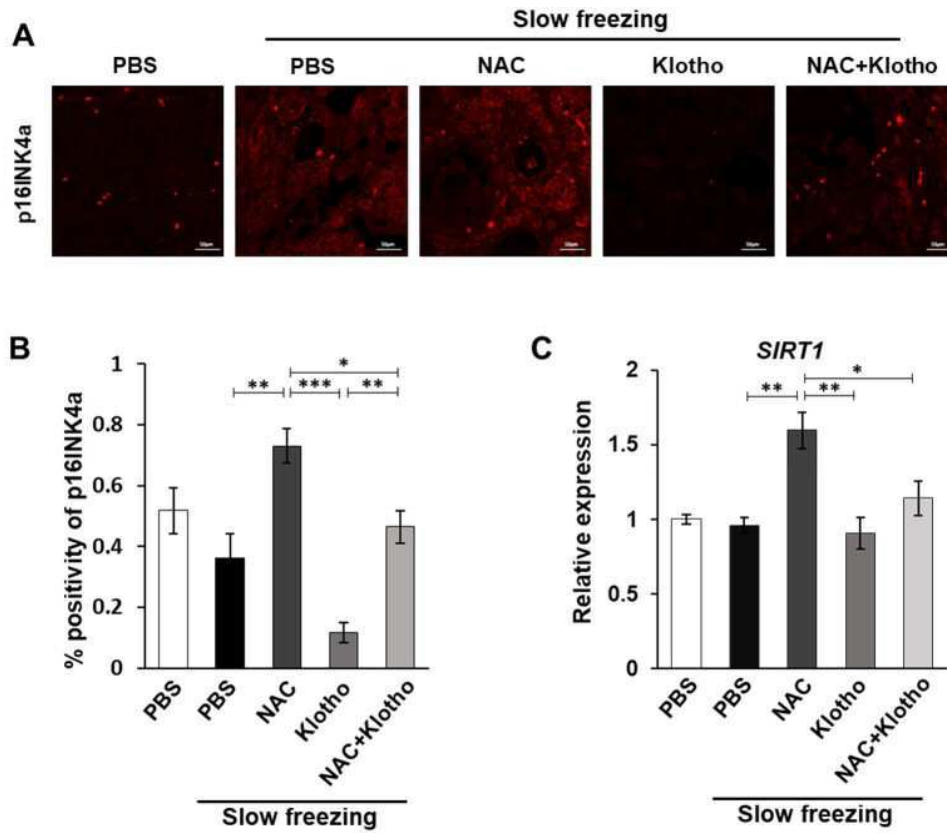
도면2



도면3



도면4



도면5

