



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0017271
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61F 2/14 (2006.01) A61K 35/30 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61F 2/142 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0100710
(22) 출원일자 2016년08월08일
심사청구일자 2016년08월08일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
신영주
서울특별시 강남구 선릉로 130길 20, 래미안삼성
2차아파트 107동 301호
(74) 대리인
특허법인태동

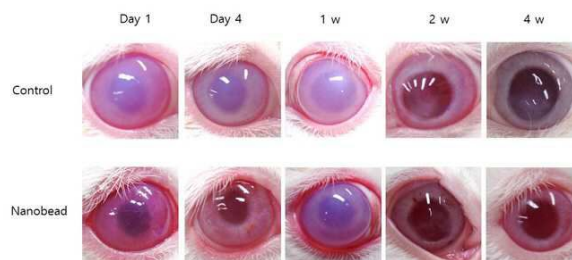
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 마그네틱 나노비드가 부착된 각막내피세포 및 이를 사용한 각막내피세포의 이식방법

(57) 요약

본 발명은 마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포 및 이를 이용한 각막내피세포의 이식방법에 관한 것으로, 마그네틱 나노비드 (Magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포를 사용하여 각막내피세포를 데스메막 안쪽으로 성공적으로 위치하게 부착시켰다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61F 2210/009 (2013.01)

A61L 2400/12 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A2040118

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 기초연구사업 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 각막내피줄기세포의 배양과 분화 및 이식 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마그네틱 나노비드는,

직경이 50~150 nm인 것을 특징으로 하는 마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포.

청구항 3

각막내피세포에 마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)를 결합시키는 단계 (A);

상기 마그네틱 나노비드가 결합된 각막내피세포를 동물의 안구 전방(前房) 내에 주입하는 단계 (B);

단계 (B) 후, 자석을 사용하여 마그네틱 나노비드가 결합된 각막내피세포를 앞쪽 테스메막 안쪽에 부착시키고 4~8시간 동안 고정시키는 단계 (C);를 포함하는 것을 특징으로 하는 동물 안구 내 각막내피세포의 이식방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전방은,

홍채와 각막 사이의 빈 공간인 것을 특징으로 하는 동물 안구 내 각막내피세포의 이식방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 마그네틱 나노비드는,

직경이 50~150 nm인 것을 특징으로 하는 동물 안구 내 각막내피세포의 이식방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포 및 이를 이용한 각막내피세포의 이식 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 각막은 외계에 접하며 일정한 두께와 굴절률, 투명성을 유지하며, 빛이 통과하는 첫 번째 관문이다. 각막의 두께와 투명성을 유지하는데에는 각막내피세포가 결정적인 역할을 하는데, 각막내피세포는 각막의 후면을 형성하며, 다각형 세포들이 단층으로 형성되어 있다.

[0003] 각막내피세포는 투과성 장벽으로서의 기능을 발휘하며, 각막기질(stroma of cornea) 내로 물 또는 용질이 이동

하는 것을 제한한다. 따라서, 각막내피세포가 잘 유지되어야 내피의 장벽 기능이 정상적으로 발휘되고, 각막의 투명도도 유지될 수 있다. 만약 각막의 내피가 무너지면 각막부종이 급격히 발생한다.

[0004] 각막내피 장벽은 생리학적으로 투과성 장벽으로 분류되어, 폐쇄된 장벽을 가지고 있는 각막 상피와는 비교가 된다. 장벽 기능을 정량화하는 고전적인 방법으로는 내피층을 가로지르는 전기저항 측정법이 있다. 토끼 각막내피는 $45\sim60/\text{cm}^2$ 의 전기 저항을 가지며, 거기에 비해 각막 상피는 $6\sim10 \text{ k}/\text{cm}^2$ 정도이다. 각막내피저항이 상피저항보다 작기 때문에 물이나 용질이 상피층에 비해 내피층을 쉽게 잘 통과하는 것이다.

[0005] 생리학적으로 정상인 투명한 각막에서는, 늦지만 일정한 속도로 전방수가 내피세포를 통과하여 각막기질(stroma of cornea) 내로 들어간다. 일정하게 전방수가 각막기질 내로 들어감으로써 혈관이 없는 각막 세포에 글루코스(glucose), 아미노산(amino acid) 및 그외 다른 영양분이 공급될 수 있다. 따라서, 각막내피세포의 기능은 “펌프”라고 불릴 정도로 필수적이며, 중요하다.

[0006] 백내장수술 후나, 각막부전, 폭스 각막내피세포이영양증, 외상 등 여러 가지 원인에 의해 각막 내피세포가 손상을 받으면, 각막은 그 기능을 발휘할 수 없게 된다. 물론, 주변세포가 이동하여 크기가 넓어져서 그 기능을 일부 보상하기도 하지만, 손상 양이 많으면 결국 그 기능을 보상하지 못하게 되어, 각막은 정상각막 두께의 몇 배로 붓게 되고, 불투명해져, 그 기능을 잃게 된다.

[0007] 최근에 각막내피세포의 줄기세포가 각막내피와 섬유주 사이에 존재한다는 것이 알려지고 (선행문헌 1; 선행문헌 2), 이 이행대 부위에서 줄기세포 표지자인 네스틴(nestin)에 염색되는 세포들이 발견되어, 각막내피세포도 사람 생체 내에서 증식될 수 있을 것으로 생각된다. 하지만, 아직까지 각막내피세포를 생체 내에서 증식시킬 수 있는 마땅한 방법은 보고되지 않고 있다. 따라서, 각막내피세포 부전의 치료방법으로 각막 이식 이외의 다른 대안은 없는 실정이었다.

[0008] 그런데, 각막내피세포는 생체 내에서는 증식하지 못하나, 실험실에서 '*in vitro*'로는 여러 조건을 변화시켜 주고, 여러 성장인자를 넣어주면, 증식이 가능하다. 각막내피세포 질환에서 각막상피세포나 간질은 정상이므로, 진층 각막이식을 할 필요없이 각막내피세포만 이식해주면 질환이 치유될 가능성이 있다. 따라서, 각막내피세포를 '*in vitro*'로 증식시켜 안구전방 내로 삽입시켜 각막내피로 안착시킨다면, 각막내피세포 부전에 빠진 각막맹환자들에게 진보된 치료방법이 될 것이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 선행문헌 1: Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. Mol Vis. 2005 Sep 26;11:816-24.

(비특허문헌 0002) 선행문헌 2: McGowan SL1, Edelhauser HF, Pfister RR, Whikehart DR. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. Mol Vis. 2007 Oct 18;13:1984-2000.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 체외에서 증식시킨 각막내피세포를 안구전방에 효율적으로 삽입시킬 수 있는 매개체 및 그 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포를 제공한다.

[0012] 상기 본 발명의 마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포에 있어서, 상기 마그네틱 나노비드는 바람직하게 직경이 $50\sim150 \text{ nm}$ 인 것이 좋다.

[0013] 본 발명은 각막내피세포에 마그네틱 나노비드(magnetic nanobead)를 결합시키는 단계 (A); 상기 마그네틱 나노비드가 결합된 각막내피세포를 동물의 안구 전방(前房) 내에 주입하는 단계 (B); 단계 (B) 후, 자석을 사용하여 마그네틱 나노비드가 결합된 각막내피세포를 앞쪽 테스메막 안쪽에 부착시키고 4~8시간 동안 고정시키는 단계 (C);를 포함하는 것을 특징으로 하는 동물 안구 내 각막내피세포의 이식방법을 제공한다.

[0014] 상기 본 발명의 동물 안구 내 각막내피세포의 이식방법에 있어서, 상기 전방은 바람직하게 홍채와 각막 사이의 빈 공간인 것이 좋다.

[0015] 또한, 본 발명의 동물 안구 내 각막내피세포의 이식방법에 있어서, 상기 마그네틱 나노비드는 바람직하게 직경이 50~150 nm인 것이 좋다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에서는 마그네틱 나노비드 (Magnetic nanobead)가 부착된 각막내피세포를 사용함으로써, 각막내피세포를 테스메막 안쪽에 성공적으로 위치하게 부착시켰다. 각막내피세포 이식의 주안점이 전방수가 지속적으로 흐르는 전방에서 전방수의 흐름과 중력에 반하여 배양한 각막내피세포를 제 위치에 부착시키는 것이라고 할 때, 본 발명자가 사용한 방법은 성공적이라 할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 대조군에 비해 나노비드(nano bead) 군에서 더 일찍 각막부종이 호전되어 유지되는 결과를 보여준다.

도 2는 대조군과 나노비드군에 있어 초음파각막두께 측정기로 측정한 각막두께 결과이다.

도 3은 대조군과 나노비드군의 'Alizarin red' 염색검사 결과이다.

도 4는 대조군과 나노비드군의 'Hemotoxylin & Eosin stain' 결과이다.

도 5는 대조군과 나노비드군의 CD3 (거부반응의 주요 세포인 T 세포) 염색 결과이다.

도 6은 대조군과 나노비드군의 ZO-1 (상피부착복합체의 중요 구성성분인 tight junction) 염색 결과이다.

도 7은 대조군과 나노비드군의 'Aquaporin 1 (AQP1)' 염색 결과이다.

도 8은, 대조군과 나노비드군의 'Na⁺/K⁺ ATPase' 염색 결과이다.

도 9 및 도 10은 대조군과 나노비드군의 'collagen VIIa' 염색 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0019] [실시예 1: 마그네틱 나노 비드를 이용하여 배양한 각막내피세포의 이식]

[0020] 1) 각막내피세포 이식

[0021] 각막내피세포의 표면을 ZO-1 과 COL8A2의 일차항체로 잡고, 이것을 'FITC-conjugated antibody'로 잡은 후, 'FITC isolation kit'를 이용하여 직경 100 nm의 마그네틱 나노비드가 부착된 항체로 잡아 붙임으로써 각막내피세포에 직경 100 nm의 마그네틱 나노비드를 붙였다. 이렇게 제작한 마그네틱 나노비드가 부착된 각막내피세포를 안구 전방 내에 주입 후 자석으로 끌어당겨 테스메막 안쪽에 부착시키고, 전방수의 흐름에 대해 4시간 이상 위치를 고정하여 부착능을 증진시켰다. 좀 더 구체적으로 설명하자면, 1cc 주사기를 사용하여 마그네틱 나노비드가 부착된 각막내피세포를 안구 전방 내로 주입한 후, 바로 각막바깥쪽 상피에 자석을 대어서, 마그네틱 나노비드가 부착된 각막내피세포를 각막의 테스메막쪽으로 끌어당김으로써 테스메막 안쪽에 부착시켰다.

[0022] 이식 전 각막내피세포는 DIO 로 염색하여 공여세포가 수여가토의 세포와 구분될 수 있게 하였다. 세포 주입 후 각막은 3일, 7일, 2주, 4주에 각막 사진을 찍어 투명도를 검사하고, 각막 두께를 잰 후 희생하여 조직검사를 시행하였다.

[0023] 수술 후 투약 및 처치로써, 덱사메타손(Dexamethasone)을 포함한 안연고를 1일 2회 점안하였고, 눈꺼풀을 봉합하였는데, 가토는 각막 노출이 비교적 심하기 때문에 경과 관찰 시를 제외하고 눈꺼풀 봉합을 유지하였다. 전층

각막이식의 경우, 치료용 콘택트렌즈를 삽입하고 수술 후 4주간 유지하였다.

[0024] **2) 임상 경과 관찰**

[0025] 세극등현미경 검사를 통해 이식편의 상피화, 부종, 혼탁, 신생혈관형성 정도를 관찰하였다. 또한, 전안부 사진 촬영을 수행하였고, 포터블 파키미터 (portable pachymeter)를 이용하여 중심각막두께를 측정하였다.

[0026] **3) 조직 검사**

[0027] 수술 후 1주, 2주, 3주 시점에 수여자 가토 3마리씩을 각각 희생하고, 각막을 채취한 후 조직검사를 시행하여 조직공학적 각막의 생존 및 염증세포 침윤 여부와 각막상피세포, 각막간질세포, 각막내피세포의 생착을 확인하였다.

[0028] 또한, 'Hemotoxylin & Eosin stain', 면역조직화학염색, CD11b (거부반응의 주요 세포인 T 세포 염색), 'Collagen VII (상피부착복합체의 중요 구성성분인 hemidesmosome 의 anchoring fibril 염색)', 각막내피세포 염색 (Aquaporin 1 (AQP1), Na⁺/K⁺ ATPase, collagen VIIa 에 대한 면역조직화학 염색)을 시행하였다.

[0029] **4) 실험 결과**

[0030] 가토의 각막은 대조군에 비해 나노비드(nano bead) 군에서 더 일찍 각막부종이 호전되어 유지되었다 (도 1).

[0031] 또한, 초음파각막두께 측정기로 측정한 각막두께는 대조군에 비해 나노비드군에서 각막부종이 호전되어 유지되었다 (도 2).

[0032] 또한, 'Alizarin red' 염색검사에서, 나노비드 군은 대조군에 비해 각막내피세포의 호전 양상이 빨랐다 (도 3).

[0033] 또한, 'Hemotoxylin & Eosin stain'에서, 대조군은 각막내피세포가 보이지 않았으나, 나노비드군은 데스메막을 따라 각막내피세포가 줄지어 있는 모습을 볼 수 있었다 (도 4).

[0034] 또한, CD3 (거부반응의 주요 세포인 T 세포) 염색에서, 대조군과 나노비드군은 모두 CD3를 발현하는 세포가 거의 보이지 않았다 (도 5).

[0035] 또한, ZO-1 (상피부착복합체의 중요 구성성분인 tight junction) 염색에서, 대조군에서는 ZO-1으로 염색되는 각막내피세포가 보이지 않았으나, 나노비드군에서는 ZO-1으로 염색되는 각막내피세포가 데스메막 위에 존재하였다 (도 6).

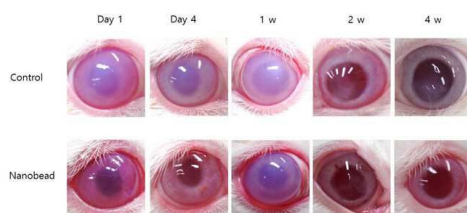
[0036] 또한, 'Aquaporin 1 (AQP1)' 염색에서, 대조군은 'Aquaporin 1'를 발현하는 각막내피세포가 보이지 않으나, 나노비드군은 각막내피세포가 데스메막을 따라 줄지어 있는 모습을 볼 수 있었다 (도 7).

[0037] 또한, 'Na⁺/K⁺ ATPase' 염색에서, 대조군은 'Na⁺/K⁺ ATPase'를 발현하는 각막내피세포가 보이지 않으나, 나노비드군은 각막내피세포가 데스메막을 따라 줄지어 있는 모습을 볼 수 있었다 (도 8).

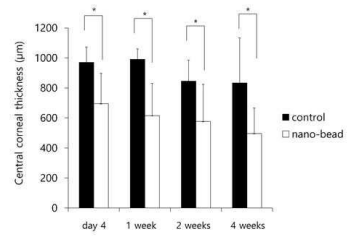
[0038] 또한, 'collagen VIIa' 염색에서, 대조군은 'collagen VIIa'를 발현하는 각막내피세포가 보이지 않았으나, 나노비드에서는 각막내피세포가 데스메막을 따라 줄지어 있는 모습을 볼 수 있었다 (도 9, 도 10).

도면

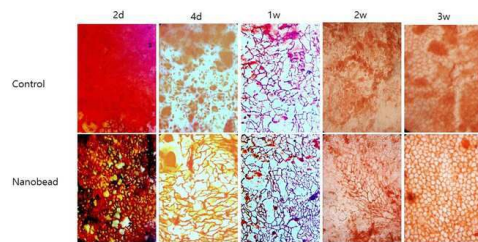
도면1



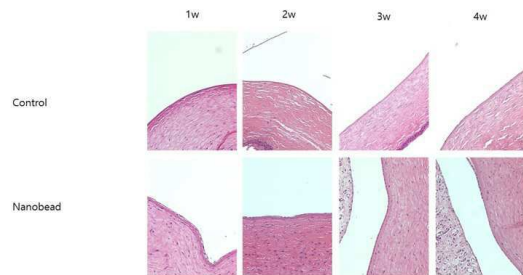
도면2



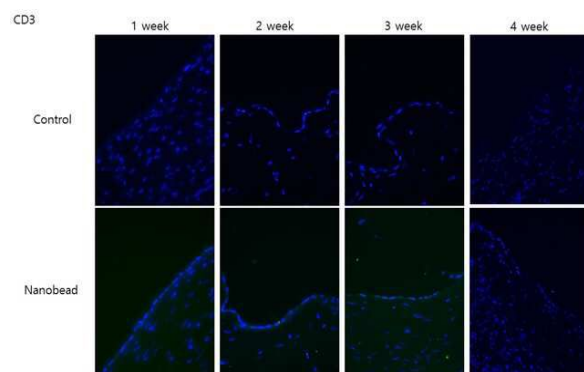
도면3



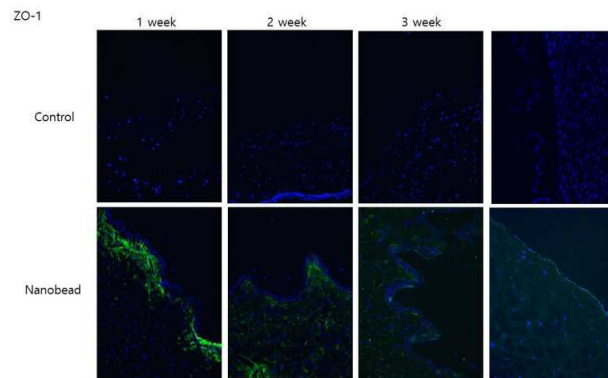
도면4



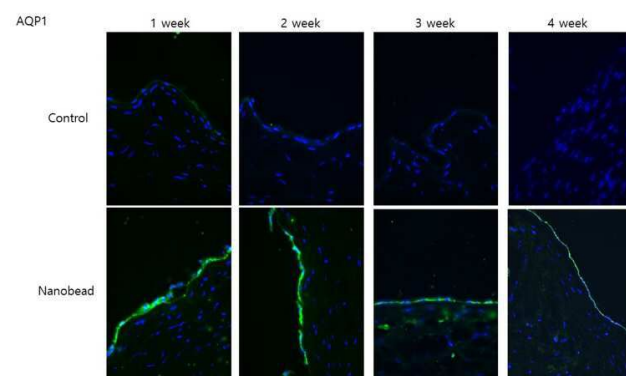
도면5



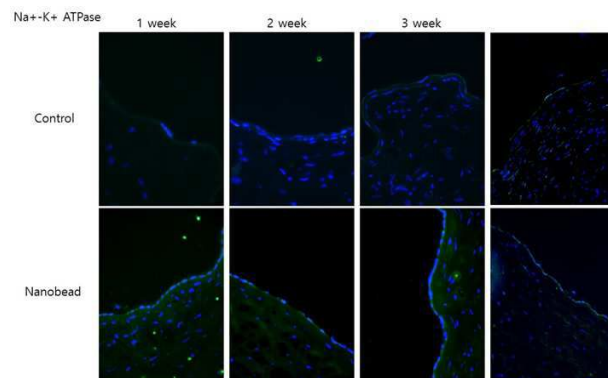
도면6



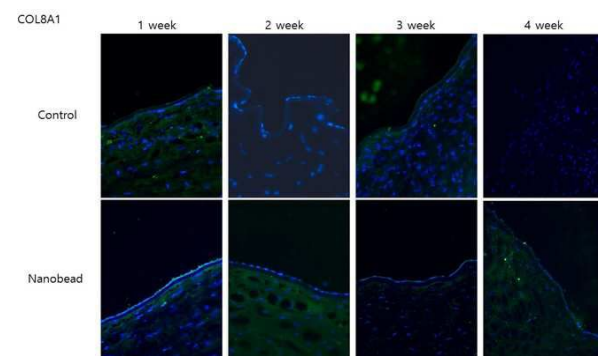
도면7



도면8



도면9



도면10

