(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024502
(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/30 (2015.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61K 35/545 (2015.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/30 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0107512
(22) 출원일자 2024년08월12일
심사청구일자 2024년08월12일
(30) 우선권주장
1020230105484 2023년08월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김재용
서울특별시 광진구 광나루로 595, 102동 303호
이훈
서울특별시 서초구 신반포로15길 19, 106동 1303호
정호석
서울특별시 강남구 언주로 615, 101동 202호
(74) 대리인
특허법인더웨이브

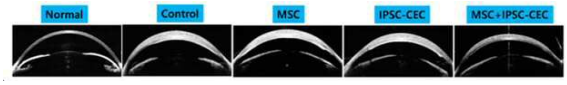
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **분화 유도된 각막 내피 세포를 포함하는 각막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

일 양상에 따른 조성물에 의하면, 분화 유도된 각막 내피 세포 및 줄기세포를 함께 투여하는 경우, 손상된 각막 내피세포를 호전시켜 각막 혼탁도 개선, 각막 두께 감소, 각막 내 염증 감소, 각막 섬유화 완화 등의 각막질환 예방 또는 치료에 효과가 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 35/545 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711184434
과제번호 2022R1F1A1073895
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 각막내피부전 동물모델에서의 인간탯줄 유래 또는 양막 유래 중간엽줄기세포과 함께 이식된 인간 유도만능줄기세포 유래 각막내피유사세포이식의 효용성 및 안정성
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC) 및 줄기세포(stem cell)를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 상기 분화 유도된 각막 내피 세포 및 줄기세포를 0.5 내지 2.0 : 0.5 내지 2.0의 비율로 포함하는 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 상기 분화 유도된 각막 내피 세포를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개 포함하는 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 상기 줄기세포를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개 포함하는 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 하기 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 하는, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

- 각막 혼탁도를 개선시킴;
- 각막 두께를 감소시킴;
- 각막 내 펌프 기능 및 세포간 밀착성을 개선시킴;
- 염증성 사이토카인(cytokine)의 발현을 감소시킴;
- 각막 내 세포 자살(apoptosis)를 감소시킴;
- 각막 섬유화를 감소시킴; 및
- 동종이식(allograft) 거부 반응을 완화시킴.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cells, ESCs), 성체 줄기세포(adult stem cells) 또는 유도 만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cells, iPSCs)인 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)인 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 골수, 혈액, 제대혈, 탯줄, 지방조직, 간장, 피부, 위장관, 태반 및 자궁으로부터 유래한 줄기세포로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 분화 유도된 각막 내피 세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cells, ESCs), 성체 줄기세포(adult stem cells) 또는 유도 만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cells, iPSCs)로부터 분화 유도된 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 각막질환은 각막내피부전(Corneal Endothelial Decompensation), 폭스 각막이영양증(Fuchs' Dystrophy), 각막 내피 세포병증(Corneal Endothelial Cell Dystrophy), 각막 부종(Corneal Edema), 일차 후부 다형성 각막이영양증(Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy, PPCD) 및 각막 이식 거부반응(Corneal Transplant Rejection)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 포함하는 제1 제제; 및

줄기세포를 포함하는 제2 제제;를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 병용투여 제제.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 제1 제제 및 제2 제제는 안구 직접 투여용인 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 병용투여 제제.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 제1 제제 및 제2 제제는 동시, 순차적 또는 역순으로 병용투여 되는 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 병용투여 제제.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 상기 제1 제제는 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개 포함하는 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 병용투여 제제.

청구항 15

청구항 11에 있어서, 상기 제2 제제는 상기 줄기세포를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개 포함하는 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 병용투여 제제.

청구항 16

분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC) 및 줄기세포(stem cell)를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 분화 유도된 각막 내피 세포를 포함하는 각막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 각막(cornea)은 안구의 가장 바깥쪽 구조로, 빛을 굴절시켜 주는 주된 기관 중 하나이다. 각막은 각막 상피(Corneal epithelium), 보우만층(Bowman's layer), 각막 기질(각막 실질; Corneal stroma), 두아층(Dua's layer), 데스메막(Descemet's membrane) 및 각막 내피의 총 6개 층으로 이루어져 있다.

[0003] 각막 내피(corneal endothelium)는 각막의 후방 표면에 있는 육각형 세포의 단일층 구조이며 생리학적 이온 펌프가 내장되어 있다. 각막 내피에 내장되어 있는 이온 펌프는 각막 기질에서 과도한 수분을 제거하여 각막의 투

명성을 확보한다. 각막의 수분조절 기능이 제대로 이루어지지 않으면 각막이 부어오르고 혼탁해져 시력저하를 초래할 수 있다.

[0004] 한편, 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)는 성인에서는 증식 능력이 제한적이어서 각막 내피 세포가 손상되면 세포는 유사 분열이 아닌 세포 확장 및 이동을 통해 복구함에 따라 각막은 정상 각막 두께의 몇 배로 붓게 되고, 불투명해져 그 기능을 잃게 된다. 손상은 영구적으로 유지된다.

[0005] 이에 본 발명자는 줄기세포 유래 각막내피세포 및 줄기세포를 주입하여 손상된 각막내피세포를 호전시킴으로써 각막 질환 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 개발하였다. 이 조성물은 손상된 각막 내피 세포를 대체하거나 복구하는 데 도움을 주어 각막의 투명성을 회복시킬 수 있고, 각막 내피의 수분 조절 기능을 회복시켜 각막 부종을 줄이는 데 효과적이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC) 및 줄기세포(stem cell)를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 분화 유도된 각막 내피 세포를 포함하는 제1 제제; 및 줄기세포를 포함하는 제2 제제;를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 병용투여 제제를 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 분화 유도된 각막 내피 세포 및 줄기세포를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 양상은 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC) 및 줄기세포(stem cell)를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 명세서에서 용어, "각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)"는 각막 내피를 구성하는 세포를 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 각막 내피 세포는 각막의 가장 내측에 위치한 단일 층의 세포들로 눈의 투명성과 수분 균형을 유지하는 중요한 역할을 한다. 각막 내피 세포는 각막의 투명성을 유지하기 위해 각막 내로 수분이 과도하게 유입되지 않도록 조절하기 위해 이온 펌프, 특히 Na+/K+ ATPase를 사용하여 스트로마(Stroma)에서 안방수(Aqueous Humor)로 물을 이동시킨다.

[0011] 일 구체예에 있어서, 상기 분화 유도된 각막 내피 세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cells, ESCs), 성체 줄기세포(adult stem cells) 또는 유도 만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cells, iPSCs)로부터 분화 유도된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 분화 유도된 각막 내피세포는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)로부터 분화 유도된 것일 수 있고, 골수, 혈액, 제대혈, 탯줄, 지방조직, 간장, 피부, 위장관, 태반 및 자궁으로부터 유래한 줄기세포로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로부터 분화 유도된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 본 명세서의 용어, "줄기세포(stem cell)"는 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 전능성 세포(totipotent cell) 또는 여러 종류의 세포로 분화할 수 있는 만능성 세포(pluripotent cell)를 의미할 수 있으며, 줄기세포는 미분화 세포로서 특정 조직의 세포로 분화될 수 있다.

[0013] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cell, ESC), 성체 줄기세포(adult stem cell), 또는 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)일 수 있다.

[0014] 상기 배아 줄기세포는 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 포배기 배아에서 내세포괴(inner cell mass)를 추출하여 체외에서 배양한 것일 수 있고, 상기 성체 줄기세포는 신체 각 조직에 극히 소량만이 존재하는 미분화된 세포로서 죽은 세포나 손상된 조직을 대체하는 세포일 수 있다. 상기 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)는 분화가 끝난 체세포에 세포 분화 관련 유전자를 주입하여 분화 이전의 세포 단계로 되돌려, 배아 줄기세포처럼 만능성을 유도한 세포일 수 있다.

[0015] 일 구체예에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 일 구체예에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 골수, 혈액, 제대혈, 탯줄, 지방조직, 간장, 피부, 위장관, 태반 및 자궁으로부터 유래한 줄기세포로 구성된 군으로부터 선택된 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 명세서에서 용어, "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화되는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위해 형태나 기능이 변해가는 것을 의미할 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 용어, "줄기세포로부터 각막 내피 세포로의 분화 유도"는 iPSC 등을 포함하는 줄기세포로부터 각막 내피 세포로의 완전히 분화가 유도된 경우 뿐만 아니라, 각막 내피 세포 특이적인 마커가 발현된 세포로 분화가 유도된 경우도 포함할 수 있다.

[0019] 본 명세서의 용어, "줄기세포로부터 각막 내피 세포로의 분화 유도시키기 위한 배양 배지"는 줄기세포의 각막 내피 세포로의 분화 유도 과정에서 만능성 세포로서의 특성을 감소시키고, 각막 내피 세포 특이적인 특성을 증가시킴으로써 줄기세포의 각막 내피 세포로의 분화를 유도할 수 있는 것이면 어느 것이든 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 배양 배지는 만능 줄기 세포 특이적 마커의 발현을 감소시키거나, 각막 내피 세포 특이적 마커의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0020] 일 구체예에 있어서, 상기 각막질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 하기 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0021] - 각막 혼탁도를 개선시킴;

[0022] - 각막 두께를 감소시킴;

[0023] - 각막 내 펌프 기능 및 세포간 밀착성을 개선시킴;

[0024] - 염증성 사이토카인(cytokine)의 발현을 감소시킴;

[0025] - 각막 내 세포 자살(apoptosis)를 감소시킴;

[0026] - 각막 섬유화를 감소시킴; 및

[0027] - 동종이식(allograft) 거부 반응을 완화시킴.

[0028] 일 구체예에 있어서, 상기 각막질환 예방 또는 치료용 조성물은 상기 분화 유도된 각막 내피 세포 및 줄기세포를 0.5 내지 2 : 0.5 내지 2 의 비율로 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 분화 유도된 각막 내피 세포 및 줄기세포의 비율은 0.5: 0.5, 0.5: 0.6, 0.5: 0.7, 0.5: 0.8, 0.5: 0.9, 0.5: 1.0, 0.5: 1.1, 0.5: 1.2, 0.5: 1.3, 0.5: 1.4, 0.5: 1.5, 0.5: 1.6, 0.5: 1.7, 0.5: 1.8, 0.5: 1.9, 0.5: 2.0, 0.6: 0.5, 0.6: 0.6, 0.6: 0.7, 0.6: 0.8, 0.6: 0.9, 0.6: 1.0, 0.6: 1.1, 0.6: 1.2, 0.6: 1.3, 0.6: 1.4, 0.6: 1.5, 0.6: 1.6, 0.6: 1.7, 0.6: 1.8, 0.6: 1.9, 0.6: 2.0, 0.7: 0.5, 0.7: 0.6, 0.7: 0.7, 0.7: 0.8, 0.7: 0.9, 0.7: 1.0, 0.7: 1.1, 0.7: 1.2, 0.7: 1.3, 0.7: 1.4, 0.7: 1.5, 0.7: 1.6, 0.7: 1.7, 0.7: 1.8, 0.7: 1.9, 0.7: 2.0, 0.8: 0.5, 0.8: 0.6, 0.8: 0.7, 0.8: 0.8, 0.8: 0.9, 0.8: 1.0, 0.8: 1.1, 0.8: 1.2, 0.8: 1.3, 0.8: 1.4, 0.8: 1.5, 0.8: 1.6, 0.8: 1.7, 0.8: 1.8, 0.8: 1.9, 0.8: 2.0, 0.9: 0.5, 0.9: 0.6, 0.9: 0.7, 0.9: 0.8, 0.9: 0.9, 0.9: 1.0, 0.9: 1.1, 0.9: 1.2, 0.9: 1.3, 0.9: 1.4, 0.9: 1.5, 0.9: 1.6, 0.9: 1.7, 0.9: 1.8, 0.9: 1.9, 0.9: 2.0, 1.0: 0.5, 1.0: 0.6, 1.0: 0.7, 1.0: 0.8, 1.0: 0.9, 1.0: 1.0, 1.0: 1.1, 1.0: 1.2, 1.0: 1.3, 1.0: 1.4, 1.0: 1.5, 1.0: 1.6, 1.0: 1.7, 1.0: 1.8, 1.0: 1.9, 1.0: 2.0, 1.1: 0.5, 1.1: 0.6, 1.1: 0.7, 1.1: 0.8, 1.1: 0.9, 1.1: 1.0, 1.1: 1.1, 1.1: 1.2, 1.1: 1.3, 1.1: 1.4, 1.1: 1.5, 1.1: 1.6, 1.1: 1.7, 1.1: 1.8, 1.1: 1.9, 1.1: 2.0, 1.2: 0.5, 1.2: 0.6, 1.2: 0.7, 1.2: 0.8, 1.2: 0.9, 1.2: 1.0, 1.2: 1.1, 1.2: 1.2, 1.2: 1.3, 1.2: 1.4, 1.2: 1.5, 1.2: 1.6, 1.2: 1.7, 1.2: 1.8, 1.2: 1.9, 1.2: 2.0, 1.3: 0.5, 1.3: 0.6, 1.3: 0.7, 1.3: 0.8, 1.3: 0.9, 1.3: 1.0, 1.3: 1.1, 1.3: 1.2, 1.3: 1.3, 1.3: 1.4, 1.3: 1.5, 1.3: 1.6, 1.3: 1.7, 1.3: 1.8, 1.3: 1.9, 1.3: 2.0, 1.4: 0.5, 1.4: 0.6, 1.4: 0.7, 1.4: 0.8, 1.4: 0.9, 1.4: 1.0, 1.4: 1.1, 1.4: 1.2, 1.4: 1.3, 1.4: 1.4, 1.4: 1.5, 1.4: 1.6, 1.4: 1.7, 1.4: 1.8, 1.4: 1.9, 1.4: 2.0, 1.5: 0.5, 1.5: 0.6, 1.5: 0.7, 1.5: 0.8, 1.5: 0.9, 1.5: 1.0, 1.5: 1.1, 1.5: 1.2, 1.5: 1.3, 1.5: 1.4, 1.5: 1.5, 1.5: 1.6, 1.5: 1.7, 1.5: 1.8, 1.5: 1.9, 1.5: 2.0, 1.6: 0.5, 1.6: 0.6, 1.6: 0.7, 1.6: 0.8, 1.6: 0.9, 1.6: 1.0, 1.6: 1.1, 1.6: 1.2, 1.6: 1.3, 1.6: 1.4, 1.6: 1.5, 1.6: 1.6, 1.6: 1.7, 1.6: 1.8, 1.6: 1.9, 1.6: 2.0, 1.7: 0.5, 1.7: 0.6, 1.7: 0.7, 1.7: 0.8, 1.7: 0.9, 1.7: 1.0, 1.7: 1.1, 1.7: 1.2, 1.7: 1.3, 1.7: 1.4, 1.7: 1.5, 1.7: 1.6, 1.7: 1.7, 1.7: 1.8, 1.7: 1.9, 1.7: 2.0, 1.8: 0.5, 1.8: 0.6, 1.8: 0.7, 1.8: 0.8, 1.8: 0.9, 1.8: 1.0, 1.8: 1.1, 1.8: 1.2, 1.8: 1.3, 1.8: 1.4,

1.8: 1.5, 1.8: 1.6, 1.8: 1.7, 1.8: 1.8, 1.8: 1.9, 1.8: 2.0, 1.9: 0.5, 1.9: 0.6, 1.9: 0.7, 1.9: 0.8, 1.9: 0.9, 1.9: 1.0, 1.9: 1.1, 1.9: 1.2, 1.9: 1.3, 1.9: 1.4, 1.9: 1.5, 1.9: 1.6, 1.9: 1.7, 1.9: 1.8, 1.9: 1.9, 1.9: 2.0, 2.0: 0.5, 2.0: 0.6, 2.0: 0.7, 2.0: 0.8, 2.0: 0.9, 2.0: 1.0, 2.0: 1.1, 2.0: 1.2, 2.0: 1.3, 2.0: 1.4, 2.0: 1.5, 2.0: 1.6, 2.0: 1.7, 2.0: 1.8, 2.0: 1.9 또는 2.0: 2.0 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 일 구체예에 있어서, 상기 각막질환 예방 또는 치료용 조성물은 상기 분화 유도된 각막 내피 세포를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$ 개 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 각막질환 예방 또는 치료용 조성물은 상기 유도된 각막 내피세포를 $1X10^4$ 개, $2X10^4$ 개, $3X10^4$ 개, $4X10^4$ 개, $5X10^4$ 개, $6X10^4$ 개, $7X10^4$ 개, $8X10^4$ 개, $9X10^4$ 개, $1X10^5$ 개, $2X10^5$ 개, $3X10^5$ 개, $4X10^5$ 개, $5X10^5$ 개, $6X10^5$ 개, $7X10^5$ 개, $8X10^5$ 개, $9X10^5$ 개, $1X10^6$ 개, $2X10^6$ 개, $3X10^6$ 개, $4X10^6$ 개, $5X10^6$ 개, $6X10^6$ 개, $7X10^6$ 개, $8X10^6$ 개, $9X10^6$ 개 또는 $1X10^7$ 개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 일 구체예에 있어서, 상기 각막질환 예방 또는 치료용 조성물은 상기 줄기세포를 $1X10^4$개 내지 $1X10^7$개 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 각막질환 예방 또는 치료용 조성물은 상기 줄기세포를 $1X10^4$ 개, $2X10^4$ 개, $3X10^4$ 개, $4X10^4$ 개, $5X10^4$ 개, $6X10^4$ 개, $7X10^4$ 개, $8X10^4$ 개, $9X10^4$ 개, $1X10^5$ 개, $2X10^5$ 개, $3X10^5$ 개, $4X10^5$ 개, $5X10^5$ 개, $6X10^5$ 개, $7X10^5$ 개, $8X10^5$ 개, $9X10^5$ 개, $1X10^6$ 개, $2X10^6$ 개, $3X10^6$ 개, $4X10^6$ 개, $5X10^6$ 개, $6X10^6$ 개, $7X10^6$ 개, $8X10^6$ 개, $9X10^6$ 개 또는 $1X10^7$ 개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서 용어, "각막질환"은 각막 세포가 손상되어 각막의 투명성을 유지하지 못하는 모든 질환이나 손상을 의미하며, 구체적으로, 상기 각막질환은 각막내피부전(Corneal Endothelial Decompensation), 폭스 각막이영양증(Fuchs' Dystrophy), 각막 내피 세포병증(Corneal Endothelial Cell Dystrophy), 각막 부종(Corneal Edema), 일차 후부 다형성 각막이영양증(Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy, PPCD) 및 각막 이식 거부반응(Corneal Transplant Rejection)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "치료 (treat)"는 자연 치유에 비하여 단축된 시간에 각막질환 등이 치유되는 것을 의미할 수 있다. 상기 치료는 각막질환의 개선 및/또는 완화를 포함할 수 있다. 또한, 상기 치료는 각막질환으로부터 유발되는 증상의 치유 및/또는 회복을 의미할 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 용어 "예방(prevention)"은 질환, 장애, 또는 그의 부수적 증상의 발병 또는 재발을 부분적으로 또는 완전히 지연시키거나 방지하거나, 질환 또는 장애의 획득 또는 재획득을 막거나, 질환 또는 장애의 획득의 위험을 감소시키는 방법을 말한다. 예를 들어, 상기 예방은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 각막질환의 발생을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0034] 상기 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다

[0035] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"는 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체 (non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다. 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0037] 본 명세서의 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 1 내지 2 백만 개의 세포(1 to 2 million cells per eye)를 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC) 및 줄기세포(stem cell)를 포함하는 약학적 조성물이 각막질환 또는 결막질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 특성상, 조성물의 투여 경로는 안구를 통하여 투여될 수 있다.

[0041] 다른 양상은 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 제1 제제로 포함하고, 줄기세포를 제2 제제로 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 병용투여 제제를 제공한다.

[0042] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 제제 및 제2 제제는 안구에 직접 투여용인 것일 수 있다.

[0043] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 제제 및 제2 제제는 동시, 순차적 또는 역순으로 병용투여 되는 것일 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 용어 "병용" 또는 "병용 치료(combined treatment)" 또는 "병용하여(in combination)"는 적어도 2개의 별개의 치료제들을 사용한 임의 형태의 동시 또는 병행 치료를 지칭한다. 병용 요법의 성분들은 동시에, 순차적으로, 역순으로 또는 임의의 순서로 투여될 수 있다. 성분들은 상이한 복용량으로 또는 상이한 투여 빈도로 또는 상이한 경로를 통해 적절한 방식으로 투여될 수 있다.

[0045] 상기 병용투여는 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 포함하는 제1 제제; 및 줄기세포를 포함하는 제2 제제;를 동시에, 순차적으로 또는 개별적으로, 그리고 임의순서로 투여하는 것을 의미할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 용어 "동시에 투여되는"은 특별히 제한되지 않으며, 병용 요법의 성분들이 예를 들면 혼합물로서 또는 즉시 이어지는 순서로 실질적으로 동시에 투여되는 것을 의미한다.

[0047] 본 명세서에서 용어 "순차적으로 투여되는"은 특별히 제한되지 않으며, 병용 요법의 성분들이 동시에 투여되지 않고, 투여 사이에 특정한 시간 간격을 두고 하나씩 차례로 또는 무리지어 투여됨을 의미한다. 시간 간격은 병용 요법의 성분들의 각각의 투여 사이에서 동일하거나 상이할 수 있으며, 예를 들면, 2분 내지 96시간, 1일 내지 7일 또는 1주, 2주 또는 3주의 범위에서 선택될 수 있다. 일반적으로, 투여 사이의 시간 간격은 수 분 내지 수 시간, 예를 들면 2분 내지 72시간, 30분 내지 24시간, 또는 1 내지 12시간 범위일 수 있다. 추가의 예는 24 내지 96시간, 12 내지 36시간, 8 내지 24시간, 및 6 내지 12시간 범위의 시간 간격을 포함한다.

[0048] 예를 들어, 상기 병용 투여는 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 포함하는 제1 제제 및 줄기세포를 포함하는 제2 제제;를 동시에 투여하거나, 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 포함하는 제1 제제를 투여한 후 제2 제제를 투여하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 병용 치료법은 예를 들어, 반응 정도, 반응 속도 또는 질병 진행까지의 기간을 통해 측정된 효능이 병용 치료법의 성분 중 하나 또는 나머지를 통상적인 용량으로 투약하여 얻을 수 있는 효능보다 치료학적으로 우수하면 상승 효과를 제공할 수 있는 것으로 정의될 수 있다. 예를 들면, 상기 각각을 단독으로 사용하여 얻어지는 효능보다 치료학적으로 그 효능이 우수하면 병용 치료법의 효능은 상승적이다. 특히, 반응 정도, 반응 속도 및 질병 진행까지의 기간 데이타 중 하나 이상에 해를 주지 않으면서, 특히 반응 지속기간에 해를 주지 않고, 각 성분을 통상적인 용량으로 사용했을 때 발생하는 것보다, 문제가 되는 부작용이 줄고/줄거나 적으면서 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC) 및 줄기세포를 함유하는 물질의 통상적인 용량을 감소시킬 수 있으면 상승 효과가 존재하는 것으로 간주한다.

[0049] 본 명세서에서 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, "개체"란 각막 질환을 보유할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0050] 본 명세서의 용어 "병용투여 제제"는 두 각막 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 두 가지 이상의 약물이나 치료제를 함께 사용하도록 설계된 조합을 의미하는 것이다. 예를 들면, 상기 병용투여 제제는 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 포함하는 제1 제제; 및 줄기세포를 포함하는 제2 제제;를 동시에, 순차적으로 또는 개별적으로, 그리고 임의순서로 투여할 수 있도록 설계된 조합을 의미할 수 있다. 구체적으로, 제제는 점안제, 주사제, 안연고, 안구 삽입제, 점적제, 겔제, 현탁제 및 유제로 이루어진 군에서 선택된 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 제제는 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC)를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 제제는 상기 유도된 각막 내피세포를 $1X10^4$ 개, $2X10^4$ 개, $3X10^4$ 개, $4X10^4$ 개, $5X10^4$ 개, $6X10^4$ 개, $7X10^4$ 개, $8X10^4$ 개, $9X10^4$ 개, $1X10^5$ 개, $2X10^5$ 개, $3X10^5$ 개, $4X10^5$ 개, $5X10^5$ 개, $6X10^5$ 개, $7X10^5$ 개, $8X10^5$ 개, $9X10^5$ 개, $1X10^6$ 개, $2X10^6$ 개, $3X10^6$ 개, $4X10^6$ 개, $5X10^6$ 개, $6X10^6$ 개, $7X10^6$ 개, $8X10^6$ 개, $9X10^6$ 개 또는 $1X10^7$ 개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 일 구체예에 있어서, 상기 제2 제제는 상기 줄기세포를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 제제는 상기 줄기세포를 $1X10^4$ 개, $2X10^4$ 개, $3X10^4$ 개, $4X10^4$ 개, $5X10^4$ 개, $6X10^4$ 개, $7X10^4$ 개, $8X10^4$ 개, $9X10^4$ 개, $1X10^5$ 개, $2X10^5$ 개, $3X10^5$ 개, $4X10^5$ 개, $5X10^5$ 개, $6X10^5$ 개, $7X10^5$ 개, $8X10^5$ 개, $9X10^5$ 개, $1X10^6$ 개, $2X10^6$ 개, $3X10^6$ 개, $4X10^6$ 개, $5X10^6$ 개, $6X10^6$ 개, $7X10^6$ 개, $8X10^6$ 개, $9X10^6$ 개 또는 $1X10^7$ 개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 또 다른 양상은 분화 유도된 각막 내피 세포(corneal endothelial cell: CEC) 및 줄기세포(stem cell)를 포함하는 각막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공한다.

[0054] 본 명세서의 용어, "세포 치료제"는 환자의 질병이나 손상된 조직을 치료하기 위해 살아있는 세포를 사용하는 치료 방법을 의미할 수 있다. 구체적으로, 세포를 체외에서 배양하거나 조작한 후, 이를 환자에게 투여하여 조직 재생, 면역 조절, 또는 특정 세포 기능을 회복하도록 하는 치료제를 의미할 수 있다.

[0055] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 치료제는 하기 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 하는 각막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제일 수 있다.

[0056] - 각막 혼탁도를 개선시킴;

[0057] - 각막 두께를 감소시킴;

[0058] - 각막 내 펌프 기능 및 세포간 밀착성을 개선시킴;

[0059] - 염증성 사이토카인(cytokine)의 발현을 감소시킴;

[0060] - 각막 내 세포 자살(apoptosis)를 감소시킴;

[0061] - 각막 섬유화를 감소시킴; 및

[0062] - 동종이식(allograft) 거부 반응을 완화시킴.

[0063] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cells, ESCs), 성체 줄기세포(adult stem cells) 또는 유도 만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cells, iPSCs)인 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제 일 수 있다.

[0064] 일 구체예에 있어서, 상기 분화 유도된 각막 내피 세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cells, ESCs), 성체 줄기세포(adult stem cells) 또는 유도 만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cells, iPSCs)로부터 분화 유도된 것인, 각막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제 일 수 있다.

[0065] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 치료제는 상기 분화 유도된 각막 내피 세포는 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 세포 치료제는 상기 유도된 각막 내피세포를 $1X10^4$ 개, $2X10^4$ 개, $3X10^4$ 개, $4X10^4$ 개, $5X10^4$ 개, $6X10^4$ 개, $7X10^4$ 개, $8X10^4$ 개, $9X10^4$ 개, $1X10^5$ 개, $2X10^5$ 개, $3X10^5$ 개, $4X10^5$ 개, $5X10^5$ 개, $6X10^5$ 개, $7X10^5$ 개, $8X10^5$ 개, $9X10^5$ 개, $1X10^6$ 개, $2X10^6$ 개, $3X10^6$ 개, $4X10^6$ 개, $5X10^6$ 개, $6X10^6$ 개, $7X10^6$ 개, $8X10^6$ 개, $9X10^6$ 개 또는 $1X10^7$ 개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 치료제는 상기 줄기세포를 $1X10^4$ 개 내지 $1X10^7$개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 세포 치료제는 상기 줄기세포를 $1X10^4$ 개, $2X10^4$ 개, $3X10^4$ 개, $4X10^4$ 개, $5X10^4$ 개, $6X10^4$ 개, $7X10^4$ 개, $8X10^4$ 개, $9X10^4$ 개, $1X10^5$ 개, $2X10^5$ 개, $3X10^5$ 개, $4X10^5$ 개, $5X10^5$ 개, $6X10^5$ 개, $7X10^5$ 개, $8X10^5$ 개, $9X10^5$ 개, $1X10^6$ 개, $2X10^6$ 개, $3X10^6$ 개, $4X10^6$ 개, $5X10^6$ 개, $6X10^6$ 개, $7X10^6$ 개, $8X10^6$ 개, $9X10^6$ 개 또는 $1X10^7$ 개를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 치료제는 상기 분화 유도된 각막 내피 세포 및 줄기세포를 0.5 내지 2 : 0.5 내지 2의 비율로 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 1.0: 0.5, 1.0: 0.6, 1.0: 0.7, 1.0: 0.8, 1.0: 0.9, 1.0: 1.0, 1.0: 1.1, 1.0: 1.2, 1.0: 1.3, 1.0: 1.4, 1.0: 1.5 비율로 포함한 것 일 수 있다. 더욱 구체적으로, 0.5: 0.5, 0.5: 0.6, 0.5: 0.7, 0.5: 0.8, 0.5: 0.9, 0.5: 1.0, 0.5: 1.1, 0.5: 1.2, 0.5: 1.3, 0.5: 1.4, 0.5: 1.5, 0.5: 1.6, 0.5: 1.7, 0.5: 1.8, 0.5: 1.9, 0.5: 2.0, 0.6: 0.5, 0.6: 0.6, 0.6: 0.7, 0.6: 0.8, 0.6: 0.9, 0.6: 1.0, 0.6: 1.1, 0.6: 1.2, 0.6: 1.3, 0.6: 1.4, 0.6: 1.5, 0.6: 1.6, 0.6: 1.7, 0.6: 1.8, 0.6: 1.9, 0.6: 2.0, 0.7: 0.5, 0.7: 0.6, 0.7: 0.7, 0.7: 0.8, 0.7: 0.9, 0.7: 1.0, 0.7: 1.1, 0.7: 1.2, 0.7: 1.3, 0.7: 1.4, 0.7: 1.5, 0.7: 1.6, 0.7: 1.7, 0.7: 1.8, 0.7: 1.9, 0.7: 2.0, 0.8: 0.5, 0.8: 0.6, 0.8: 0.7, 0.8: 0.8, 0.8: 0.9, 0.8: 1.0, 0.8: 1.1, 0.8: 1.2, 0.8: 1.3, 0.8: 1.4, 0.8: 1.5, 0.8: 1.6, 0.8: 1.7, 0.8: 1.8, 0.8: 1.9, 0.8: 2.0, 0.9: 0.5, 0.9: 0.6, 0.9: 0.7, 0.9: 0.8, 0.9: 0.9, 0.9: 1.0, 0.9: 1.1, 0.9: 1.2, 0.9: 1.3, 0.9: 1.4, 0.9: 1.5, 0.9: 1.6, 0.9: 1.7, 0.9: 1.8, 0.9: 1.9, 0.9: 2.0, 1.0: 0.5, 1.0: 0.6, 1.0: 0.7, 1.0: 0.8, 1.0: 0.9, 1.0: 1.0, 1.0: 1.1, 1.0: 1.2, 1.0: 1.3, 1.0: 1.4, 1.0: 1.5, 1.0: 1.6, 1.0: 1.7, 1.0: 1.8, 1.0: 1.9, 1.0: 2.0, 1.1: 0.5, 1.1: 0.6, 1.1: 0.7, 1.1: 0.8, 1.1: 0.9, 1.1: 1.0, 1.1: 1.1, 1.1: 1.2, 1.1: 1.3, 1.1: 1.4, 1.1: 1.5, 1.1: 1.6, 1.1: 1.7, 1.1: 1.8, 1.1: 1.9, 1.1: 2.0, 1.2: 0.5, 1.2: 0.6, 1.2: 0.7, 1.2: 0.8, 1.2: 0.9, 1.2: 1.0, 1.2: 1.1, 1.2: 1.2, 1.2: 1.3, 1.2: 1.4, 1.2: 1.5, 1.2: 1.6, 1.2: 1.7, 1.2: 1.8, 1.2: 1.9, 1.2: 2.0, 1.3: 0.5, 1.3: 0.6, 1.3: 0.7, 1.3: 0.8, 1.3: 0.9, 1.3: 1.0, 1.3: 1.1, 1.3: 1.2, 1.3: 1.3, 1.3: 1.4, 1.3: 1.5, 1.3: 1.6, 1.3: 1.7, 1.3: 1.8, 1.3: 1.9, 1.3: 2.0, 1.4: 0.5, 1.4: 0.6, 1.4: 0.7, 1.4: 0.8, 1.4: 0.9, 1.4: 1.0, 1.4: 1.1, 1.4: 1.2, 1.4: 1.3, 1.4: 1.4, 1.4: 1.5, 1.4: 1.6, 1.4: 1.7, 1.4: 1.8, 1.4: 1.9, 1.4: 2.0, 1.5: 0.5, 1.5: 0.6, 1.5: 0.7, 1.5: 0.8, 1.5: 0.9, 1.5: 1.0, 1.5: 1.1, 1.5: 1.2, 1.5: 1.3, 1.5: 1.4, 1.5: 1.5, 1.5: 1.6, 1.5: 1.7, 1.5: 1.8, 1.5: 1.9, 1.5: 2.0, 1.6: 0.5, 1.6: 0.6, 1.6: 0.7, 1.6: 0.8, 1.6: 0.9, 1.6: 1.0, 1.6: 1.1, 1.6: 1.2, 1.6: 1.3, 1.6: 1.4, 1.6: 1.5, 1.6: 1.6, 1.6: 1.7, 1.6: 1.8, 1.6: 1.9, 1.6: 2.0, 1.7: 0.5, 1.7: 0.6, 1.7: 0.7, 1.7: 0.8, 1.7: 0.9, 1.7: 1.0, 1.7: 1.1, 1.7: 1.2, 1.7: 1.3, 1.7: 1.4, 1.7: 1.5, 1.7: 1.6, 1.7: 1.7, 1.7: 1.8, 1.7: 1.9, 1.7: 2.0, 1.8: 0.5, 1.8: 0.6, 1.8: 0.7, 1.8: 0.8, 1.8: 0.9, 1.8: 1.0, 1.8: 1.1, 1.8: 1.2, 1.8: 1.3, 1.8: 1.4, 1.8: 1.5, 1.8: 1.6, 1.8: 1.7, 1.8: 1.8, 1.8: 1.9, 1.8: 2.0, 1.9: 0.5, 1.9: 0.6, 1.9: 0.7, 1.9: 0.8, 1.9: 0.9, 1.9: 1.0, 1.9: 1.1, 1.9: 1.2, 1.9: 1.3, 1.9: 1.4, 1.9: 1.5, 1.9: 1.6, 1.9: 1.7, 1.9: 1.8, 1.9: 1.9, 1.9: 2.0, 2.0: 0.5, 2.0: 0.6, 2.0: 0.7, 2.0: 0.8, 2.0: 0.9, 2.0: 1.0, 2.0: 1.1, 2.0: 1.2, 2.0: 1.3, 2.0: 1.4, 2.0: 1.5, 2.0: 1.6, 2.0: 1.7, 2.0: 1.8, 2.0: 1.9 또는 2.0: 2.0 의 비율로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 상기 발명에 대해 기술한 용어 및 방법 등은 각 발명들 간에 동일하게 적용된다.

발명의 효과

[0069] 일 양상에 따른 조성물에 의하면, 분화 유도된 각막 내피 세포 및 줄기세포를 함께 투여하는 경우, 손상된 각막

내피세포를 호전시켜 각막 혼탁도 개선, 각막 두께 감소, 각막 내 염증 감소, 각막 섬유화 완화 등의 각막질환 예방 또는 치료에 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 유도만능줄기세포를 이용한 각막내피유사세포 분화 과정을 도식화한 것이다.

도 2은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델에 유도된 각막 내피 세포의 이식 과정을 나타낸 것이다.

도 3는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 1주, 2주 3주, 4주, 5주, 6주 경과 후, 각막 투명도를 미세 수술실 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 4는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 실험군 별 각막 혼탁도를 평가하여 점수화한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 실험군 별 광간섭단층촬영 결과를 나타낸 사진이다.

도 6은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 실험군 별 각막 두께를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 H&E 염색을 수행한 사진이다.

도 8은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 Na+K+-ATPase, ZO-1 및 N-cadherin의 발현 여부를 확인한 사진이다.

도 9는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 Na+K+-ATPase, ZO-1 및 N-cadherin가 발현되는 세포의 수를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 TNF-α 및 IL-1β의 발현 여부를 확인한 사진이다.

도 11은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 TNF-α 및 IL-1β가 발현되는 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

도 12는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 TNF-α, IL-1 및 IL-6의 발현 여부를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 13은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)을 통해 세포 자살을 확인한 사진이다.

도 14는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 절단된 DNA가 검출되는 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

도 15는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-

CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 α-SMA(α-smooth muscle actin)의 발현 여부를 확인한 사진이다.

도 16은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 α-SMA의 발현 여부를 나타낸 그래프이다.

도 17은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 CXCL9, CXCL10 CXCL11의 발현 여부를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1. 줄기세포로부터 각막 내피 세포로의 분화**

[0074] 인간 유도 만능 줄기세포(hiPSC)는 (주)입셀 로부터 제공받았고, 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells, UC-MSC)를 서울아산병원 세포치료센터(아산 생명과학 연구원, 서울)로부터 제공받았다.

[0075] E8 배지(Life Technologies)를 사용하여, 인간 유도 만능 줄기세포(hiPSC) 또는 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells, UC-MSC)를 배양하였다. 이후, Human Endothelial Serum-Free Medium(Human Endothelial-SFM)에 supplements를 추가한 배지로 교체하여 각막 내피 세포로의 분화를 유도하였다. 그리고 각막 내피 세포로 분화된 세포가 약 80-90%의 세포 밀도에 도달했을 때 이를 계대 배양하였다. 유도만능줄기세포를 이용한 각막내피유사세포 분화 과정을 도 1에 나타내었다.

[0076] 도 1은 유도만능줄기세포를 이용한 각막내피유사세포 분화 과정을 도식화한 것이다.

[0077] 한편, 인간 유도 만능 줄기세포(hiPSC) 또는 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells, UC-MSC)로부터 각막 내피 세포로 유도하는데 사용되는 구체적인 배양 배지 성분은 표 1에 나타내었다.

표 1

Cells	Basic Media	Supplements
UC-MSC	Human Endothelial SFM	Polyvinyl alcohol SB431542 (1uM) H-1125 (2.5uM) 2-phosphate ascorbic acid ITS (1%) CaCl2 (0.2mg/mL) Y27632 (10uM) GSK3 inhibitor IV
iPSC	Human Endothelial SFM	SB431542 (1uM) H-1152 (2.5uM) 2-phosphate ascorbic acid (0.02mg/ml) 1% ITS hEGF (10ng/ml) CaCl2 (0.2mg/ml) Fasudil (10uM)
Human primary CECs	DMEM/F12 media	Fetal bovine serum (5%) Insulin-Transferrine-Selenium (1%) Y27632 (10uM) Ascorbic acid (0.02mg/ml) Cacl2 (0.2mg/ml) Human epithelial growth factor (10ng/ml) Antibiotic-antimycotic (1%)

[0078]

[0080] **실시예 2. 유도된 각막 내피 세포의 생존율, 형태 변화 및 기능 유지 확인**

[0081] 실시예 1의 방법으로 분화시켜 액체질소에 보관했던 줄기세포 유래 각막 내피 세포를 해동하고, 상기 줄기세포 유래 각막 내피 세포의 생존 여부 및 형태(morphology) 변화 여부를 분석하였다. 또한, 계대 배양에 따른 유도된 각막 내피 세포의 고유기능 및 고유 표현형 변화를 확인하였다.

[0082] 구체적으로, 상기 줄기세포 유래 각막 내피 유사세포의 생존 여부는 트리판블루를 이용한 세포 수 카운트를 통해 확인하였고, 상기 줄기세포 유래 각막 내피 유사세포의 morphology 변화는 현미경을 통해 확인하였으며, 계대 배양에 따른 줄기세포로 유래 각막 내피 세포의 고유기능 및 고유 표현형 변화를 WB(Western Blot), qPCR, 그리고 ICC(Immunocytochemistry)을 통해 확인하였다.

[0083] 상기 실험을 통해 실시예 1의 방법으로 분화시킨 각막 내피 세포를 액체질소에 보관하여 해동하더라도 대부분의 각막 내피 세포는 생존하는 것으로 확인되었으며, 각막 내피 세포의 대표적인 특징인 육각형 및 서로 긴밀한 세포 접합을 나타남을 확인하였다.또한, 실시예 1의 방법으로 분화시킨 줄기세포 유래 각막 내피 세포는 계대 배양 하더라도 세포 고유기능 및 고유 표현형이 유지됨을 확인하였다.

[0085] **실시예 3. 각막내피부전 동물모델에 유도된 각막 내피 세포의 이식**

[0086] **3.1 각막내피부전 동물모델 제작**

[0087] 3개월령 뉴질랜드 화이트(New Zealand White, 주식회사 자바이오(JA BIO)토끼를 구입하였다. 상기 토끼 안구의 내피층 및 기질층을 Reverse sinskey hook을 이용하여 제거하여 각막내피손상 동물모델을 제작하였다.

[0088] **3.2 유도된 각막 내피 세포의 이식**

[0089] 실시예 3.1의 방법으로 제작한 각막내피부전 동물모델의 안구전방에 direct injection하는 방법으로 각 세포를 이식하였다.

[0090] 구체적으로, 실시예 3.1의 방법으로 제작한 각막내피부전 동물모델의 안구전방에 탯줄 유래 중간엽줄기세포(MSC); 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC); 또는 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC);를 이식하였다.

[0091] 상기 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC)는 $1X10^6$개, 상기 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC)는 $1X10^6$개, 상기 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)는 $2X10^6$개 용량을 이식하였다. 상기 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 함께 이식하는 경우는 1: 1의 비율로 이식하였다.

[0092] 도 2는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델에 유도된 각막 내피 세포의 이식 과정을 나타낸 것이다.

[0093] 각막 내피 세포의 이식 이후, human mitochondrial DNA 발현을 각막내피부전 동물모델의 각막조직에서 PCR을 이용하여 확인하였고, ZO-1, ATP1A1 등이 발현됨을 면역조직염색으로 확인하였다. 이는 이식한 세포가 각막내피부전 동물모델의 안구에서 생존하고 있으며, 각막내피세포의 고유특징을 유지하고 있음을 의미하는 것이다.

[0095] **실험예 1. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 혼탁도 개선**

[0096] 실시예 3.1의 방법으로 제작한 각막내피부전 동물모델의 안구전방에 실시예 3.2의 방법으로 각 세포를 이식하고 1주, 2주 3주, 4주, 5주, 6주 경과 후, 각막 투명도를 미세 수술실 현미경으로 추적 관찰하였다.

[0097] 구체적으로, 실시예 3의 각막내피부전 동물모델을 대조군(세포이식을 시행하지 않는 군), 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC)만 이식한 군(1군:MSC), 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC)만 이식한 군(2군: iPSC-CEC), 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC)와 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC)를 함께 이식한 군(3군: iPSC-CEC+MSC)으로 나누어 각막 투명도를 관찰하고, 각 군별 각막 혼탁도를 평가하여 0 내지 4로 점수화 하였다(0: 각막 흐림 없음 1: 홍채 세부구조 관찰 가능 2: 동공 경계 부분은 관찰 가능하나 홍채 세부구조 관찰 불가 3: 동공 경계 파악 불가 4: 전체 각막 혼탁).

[0098] 도 3은 각막내피부전 동물모델에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포

(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주 경과 후, 각막 투명도를 미세 수술실 현미경으로 관찰한 사진이다.

[0099] 도 4는 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 실험군 별 각막 혼탁도를 평가하여 점수화한 결과를 나타낸 그래프이다(0: 각막 흐림 없음 1: 홍채 세부구조 관찰 가능 2: 동공 경계 부분은 관찰 가능하나 홍채 세부구조 관찰 불가 3: 동공 경계 파악 불가 4: 전체 각막 혼탁).

[0100] 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하는 경우 대조군과 대비하여 각막내피부전 동물모델의 각막 혼탁도가 현저히 개선되는 것을 확인하였다.

[0101] 이는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

[0103] **실험예 2. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 두께 개선**

[0104] 실시예 3.1의 방법으로 제작한 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 실시예 3.2의 방법으로 유도된 각막 내피세포를 이식하고 6주 경과 후, 광간섭단층촬영(Optical Coherence Tomography, OCT)을 진행하였다.

[0105] 구체적으로, 실시예 3의 각막내피부전 동물모델을 대조군(세포이식을 시행하지 않는 군), 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC)만 이식한 군(1군:MSC), 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC)만 이식한 군(2군: iPSC-CEC), 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC)와 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC)를 함께 이식한 군(3군: iPSC-CEC+MSC)으로 나누어 광간섭단층촬영(OCT)을 하였고, 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0106] 도 5는 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 실험군 별 광간섭단층촬영 결과를 나타낸 사진이다.

[0107] 도 6은 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 실험군 별 각막 두께를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0108] 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 함께 이식하는 경우, 대조군과 대비하여 각막내피부전 동물모델의 각막 두께가 현저히 얇아진 것을 확인하였다.

[0109] 이는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

[0111] **실험예 3. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막의 형태 및 세포 침윤 개선**

[0112] 실시예 3.1의 방법으로 제작한 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 실시예 3.2의 방법으로 유도된 각막 내피세포를 이식하고 6주 경과 후, 각막 내피부전 동물모델의 각막을 H&E 염색하여 각막의 형태 및 세포 침윤 여부를 확인하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0113] 도 7은 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 H&E 염색을 수행한 사진이다.

[0114] 도 7에 나타난 바와 같이, 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 함께 이식하는 경우, 다른 군과 대비하여 염증 세포 침윤 현상이 줄고 내피 세포의 구조도 현저히 개선되어 정상과 비슷한 모양을 보이는 것을 확인하였다.

[0115] 이는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

[0117] **실험예 4. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 내 펌프 기능 및 세포간 밀착성 개선 확인**

[0118] 실시예 3.1의 방법으로 제작한 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 실시예 3.2의 방법으로 유도된 각막 내피 세포를 이식하고 6주 경과 후, 각막 내피부전 동물모델의 각막을 면역형광염색(Immunofluorescence staining)하고, 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0119] 구체적으로, 실시예 3의 각막내피부전 동물모델을 대조군(세포이식을 시행하지 않는 군), 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC)만 이식한 군(1군:MSC), 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC)만 이식한 군(2군: iPSC-CEC), 유도만능줄기세포를 이용하여 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC)와 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC)를 함께 이식한 군(3군: iPSC-CEC+MSC)에서 각막을 수집하고, 수집된 각막을 2~3일간 4% 파라포름알데히드로 고정하고, PBST 완충액으로 세척한 후, 0.5% Triton X-100에서 투과화하고, 3% 소 혈청 알부민(Sigma-Aldrich)을 함유하는 PBST에서 차단하였다. 샘플을 1차 항체로 항-인간 항-ZO-1(1:250; Invitrogen) 항체, 항-Na+/K+ATPase(1:200; Abcam)항- IL-1β 항체(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 및 항-N-cadherin(1:200; Cell Signaling)항체와 함께 4℃에서 밤새도록 배양한 다음, IgG Alexa Fluor 488-접합 및 IgG Alexa Fluor 647-접합 2차 항체(1:500; Abcam, Cambridge, UK)로 배양하였다. 핵은 10분 동안 4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI; Sigma-Aldrich)로 대조 염색하였고, 형광 신호는 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan) 또는 형광 현미경(EVOS, Life Technologies)으로 검출하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 또한, 상기 현광 현미경을 이용하여 얻은 사진에서 이미지 분석 시스템을 이용하여 Na+K+-ATPase, ZO-1 및 N-cadherin가 발현되는 세포의 수를 검출하고 이를 도 9에 나타내었다.

[0120] 도 8은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 Na+K+-ATPase, ZO-1 및 N-cadherin의 발현 여부를 확인한 사진이다.

[0121] 도 9는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 Na+K+-ATPase, ZO-1 및 N-cadherin가 발현되는 세포의 수를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0122] 도 8 및 도 9에 나타난 바와 같이, 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 함께 이식하는 경우, Na+K+-ATPase, ZO-1 및 N-cadherin을 발현하는 세포의 수가 대조군과 비교하여 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0123] 이는 각막 내 펌프 기능 및 세포 밀착연접 형성이 개선된 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

[0125] **실험예 5. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 내 염증 감소 확인**

[0126] 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 내 염증 감소 확인하기 위하여, 1차 항체를 항-인간 항-TNF-α(1:250; Life Technologies) 항체 및 항- IL-1β 항체(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 사용한 것을 제외하고는 실험예 4와 동일한 방법으로 실험하였고, 그 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.

[0127] 도 10은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 TNF-α 및 IL-1β의 발현 여부를 확인한 사진이다.

[0128] 도 11은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 TNF-α 및 IL-1β가 발현되는 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

[0129] 한편, 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델에 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC) 및/또는 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC) 투여시 각막 내 염증 감소 효과를 확인하기 위해, TNF-α, IL-1 및 IL-6의 발현 여부를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

[0130] 구체적으로, 토끼 모델에서 채취한 각막 샘플을 차가운 PBS에 세척하고 포스파타아제 및 프로테아제 억제제를

함유한 lysis버퍼를 통해 배양하였다. 호모게나이져 혹은 소니케이션을 통해 분해된 조직을 원심분리기를 통해 침윤하여, 상층액을 분리한 후, 소듐 도데실 황산-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 통해 단백질을 PVDF 막으로 흡착하였다, 이후 소혈청 알부민이 포함된 TBST완충액을 통해 블로킹하였다. 이전의 준비된 막은 4℃에 IL-1, IL-6, TNF-α, and β-actin과 밤새 배양하였다. 이후, 막은 HRP-linked 2차항체와 함께 새척 후 배양하였다. 밴드는 Chemiluminescence Imaging System을 이용해 확인하였고, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0131] 도 12는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 TNF-α, IL-1 및 IL-6의 발현 여부를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

[0132] 도 10 내지 도 12에 나타난 바와 같이, 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 함께 이식하는 경우, TNF-α, IL-1 및 IL-6를 발현하는 세포의 수가 대조군과 비교하여 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0133] TNF-α, IL-1 및 IL-6은 모두 염증 반응 촉진과 관련된 사이토카인으로서, 상기 실험결과는 각막내피부전 동물모델의 각막 내 염증이 개선된 것을 의미한다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

[0135] **실험예 6. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 내 세포 자살(apoptosis) 억제 확인**

[0136] 실시예 3.1의 방법으로 제작한 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 실시예 3.2의 방법으로 유도된 각막 내피세포를 이식하고 6주 경과 후, 각막 내피부전 동물모델의 각막을 수득하여 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 염색을 실시하였다.

[0137] 구체적으로, 5㎛크기로 파라핀 블럭에서 절편된 토기 조직을 60℃에서 약 30분간 가열하고 자일렌과 에탄올을 이용하여 세척을 통한 dewaxing 처리하였다. 이후 세포는 DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole (Roche, Inc., Mannheim, Germany) 염색 처리하여 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 형광촬영을 실시하였다. TUNEL 양성 세포의 분포 및 수를 확인하였고, 그 결과를 도 13 및 도 14에 나타내었다.

[0138] 도 13은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 염색을 통해 세포 자살을 확인한 사진이다.

[0139] 도 14는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 절단된 DNA가 검출되는 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

[0140] 도 13 및 도 14에 나타난 바와 같이, 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 함께 이식하는 경우, 절단된 DNA가 검출되는 세포의 수가 대조군과 비교하여 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[0141] 이는 각막 내 세포 자살(apoptosis) 현상이 개선된 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

[0143] **실험예 7. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 섬유화 완화 확인**

[0144] 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 각막 섬유화 완화 확인하기 위하여, 1차 항체를 항-인간 항-α-SMA (1:250; Life Technologies) 항체를 사용한 것을 제외하고는 실험예 4와 동일한 방법으로 실험하였고, 그 결과를 도 15 및 도 16에 나타내었다.

[0145] 도 15는 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델의 안구 전방에 각 실험군에 따라 탯줄유래 중간엽줄기세포(MSC), 분화 유도된 각막내피세포(iPSC-CEC), 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-

CEC+MSC)를 이식하고 6주 경과 후, 각 실험군에서 각막을 수득하여 α-SMA(α-smooth muscle actin)의 발현 여부를 확인한 사진이다.

[0146] 도 16은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 조직에서 α-SMA의 발현 여부를 나타낸 그래프이다.

[0147] 도 15 및 도 16에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 이식하는 경우, α-SMA(α-smooth muscle actin)을 발현 수준이 대조군과 비교하여 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[0148] 이는 각막내피부전 동물모델 실험군의 각막 섬유화가 완화된 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

[0150] **실험예 8. 유도된 각막 내피 세포 이식에 따른 allograft 거부 반응 완화 확인**

[0151] 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델에서 유도된 각막 내피 세포 및/또는 줄기세포 이식에 따른 allograft 거부 반응 완화 여부를 확인하기 위하여 ELISA를 실시하였다.

[0152] 구체적으로, 시약, 표준물질 및 시료(방수액)를 준비하였다. (CXCL-9, 10 및 11, R 및 D 시스템). 각 웰에 150 μL의 Assay Diluent를 추가하고, 100 μL의 표준물질, 대조군 및 방수액(75 μL)을 추가한 후, 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 이 후, 각 웰을 4번 씻어내고, 200 μL의 Conjugate를 추가하여 2시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰을 4번 씻어내고, 200 μL의 Substrate Solution을 추가하여 빛을 차단한 상태에서 30분 동안 배양하였다. 50 μL의 Stop Solution을 추가 후, 450 nm에서 30분 이내에 측정하고, 파장을 540 nm 또는 570 nm로 보정하였다.

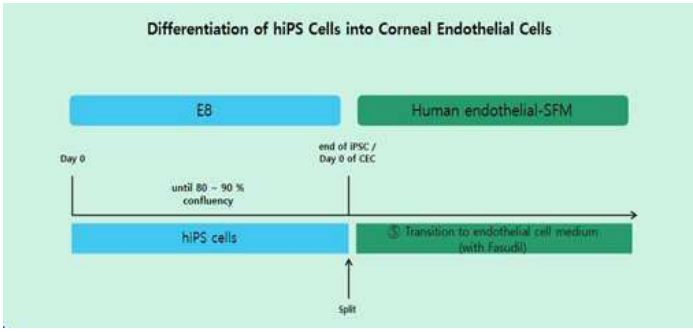
[0153] 도 17은 일 양상에 따른 각막내피부전 동물모델 실험군의 CXCL9, CXCL10 CXCL11의 발현 여부를 나타낸 그래프이다.

[0154] 도 17에 나타난 바와 같이, 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)를 함께 이식하는 경우, CXCL9, CXCL10 CXCL11발현 수준이 대조군과 비교하여 감소한 것을 확인하였다.

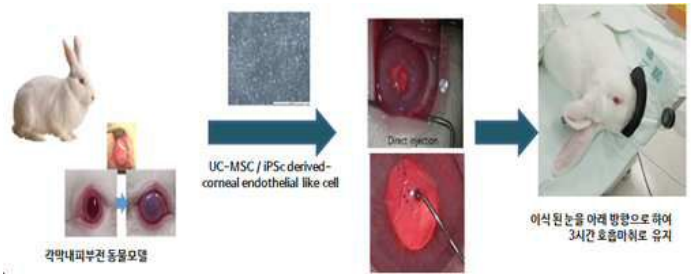
[0155] 이는 각막내피부전 동물모델 실험군에서 allograft 거부 반응이 완화된 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 유도된 각막내피세포 및 탯줄유래 중간엽줄기세포(iPSC-CEC+MSC)의 이식이 각막내피부전 예방 및 치료에 효과적임을 의미하는 것이다.

도면

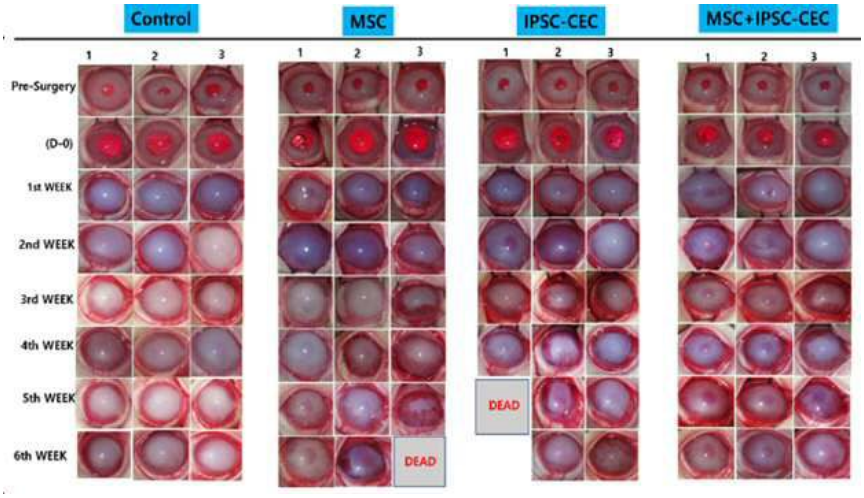
도면1



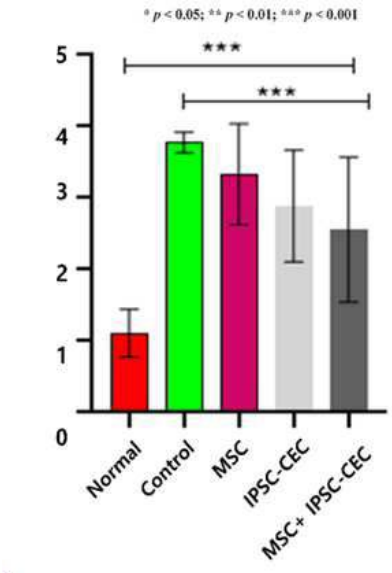
도면2


각막내피부전동물모델
UC-MSC / iPSc derived-
corneal endothelial like cell
Direct injection
이식된 눈을 아래 방향으로 하여
3시간 호흡미허로 유지

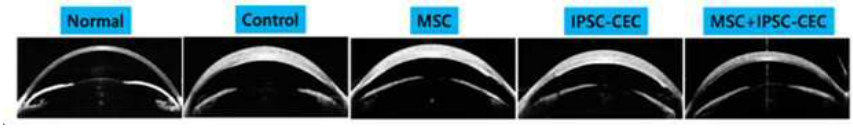
도면3


Control
MSC
IPSC-CEC
MSC+IPSC-CEC
1
2
3
Pre-Surgery
(D-0)
1st WEEK
2nd WEEK
3rd WEEK
4th WEEK
5th WEEK
6th WEEK
DEAD
DEAD

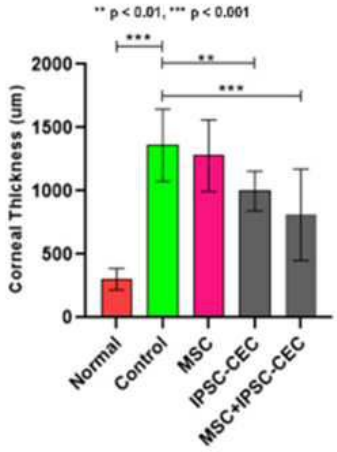
도면4


* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001
***
***
5
4
3
2
1
0
Normal
Control
MSC
IPSC-CEC
MSC+ IPSC-CEC

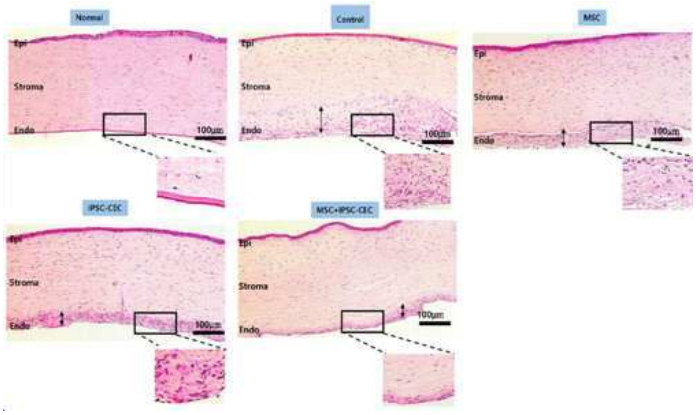
도면5


Normal
Control
MSC
IPSC-CEC
MSC+IPSC-CEC

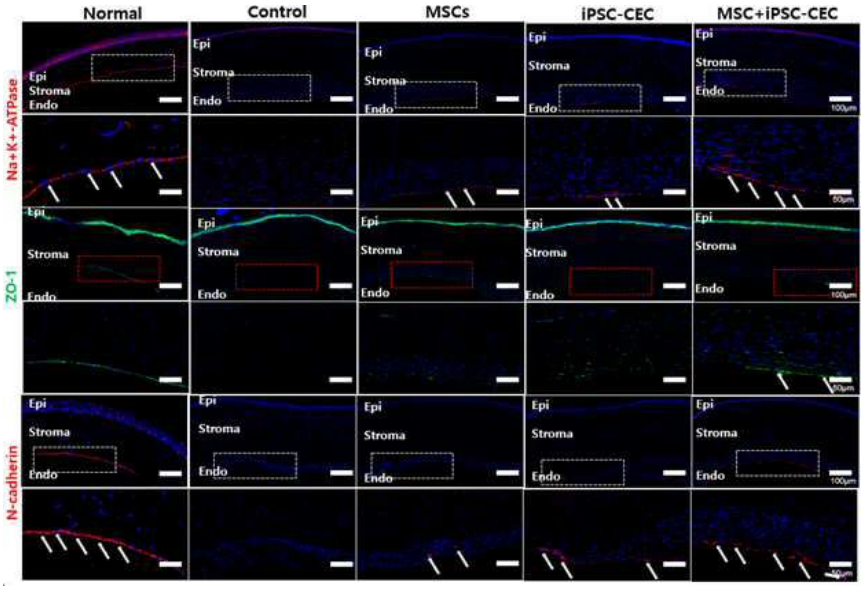
도면6


** p < 0.01, *** p < 0.001
***
**
***
Corneal Thickness (um)
2000
1500
1000
500
0
Normal
Control
MSC
IPSC-CEC
MSC+IPSC-CEC

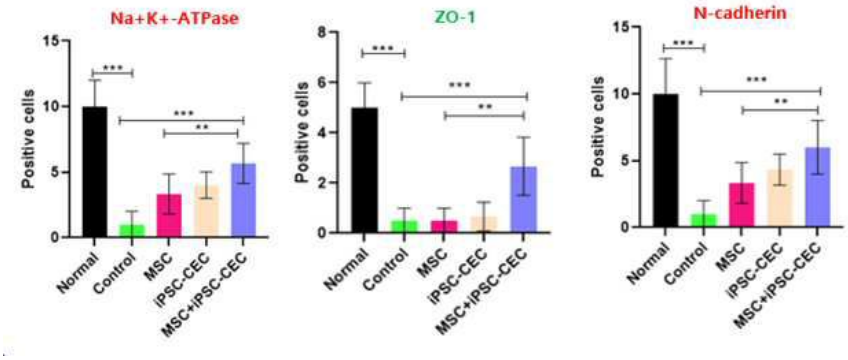
도면7


Normal
Control
MSC
IPSC-CEC
MSC+IPSC-CEC
Epi
Stroma
Endo
100μm

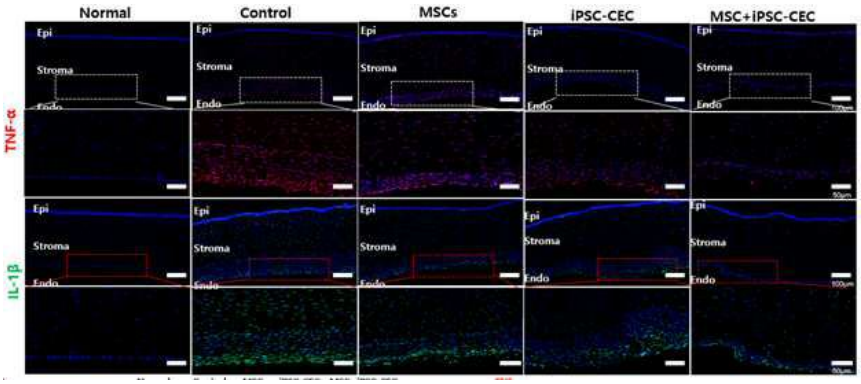
도면8


Normal
Control
MSCs
iPSC-CEC
MSC+iPSC-CEC
Na+K+-ATPase
ZO-1
N-cadherin
Epi
Stroma
Endo

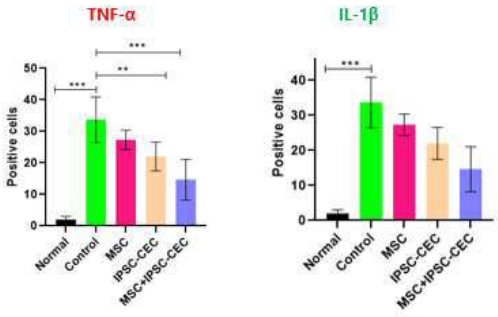
도면9


Na+K+-ATPase
ZO-1
N-cadherin
Positive cells
Normal
Control
MSC
iPSC-CEC
MSC+iPSC-CEC

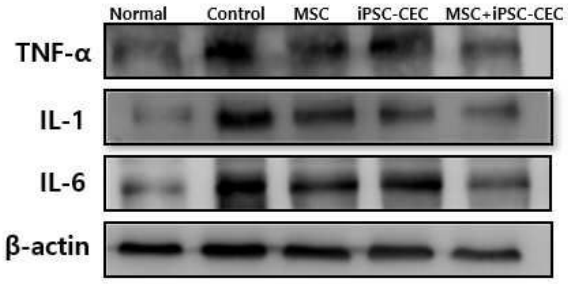
도면10


Normal
Control
MSCs
iPSC-CEC
MSC+iPSC-CEC
TNF-α
IL-1β
Epi
Stroma
Endo

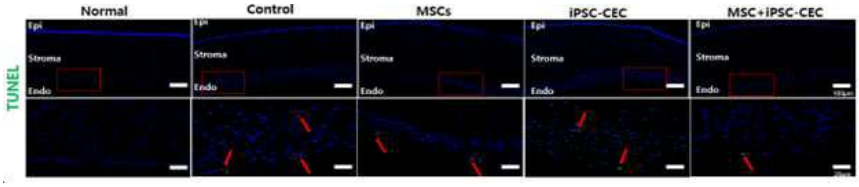
도면11



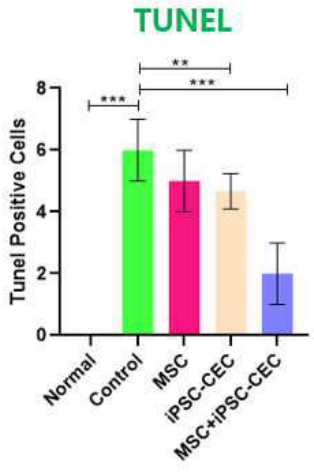
도면12



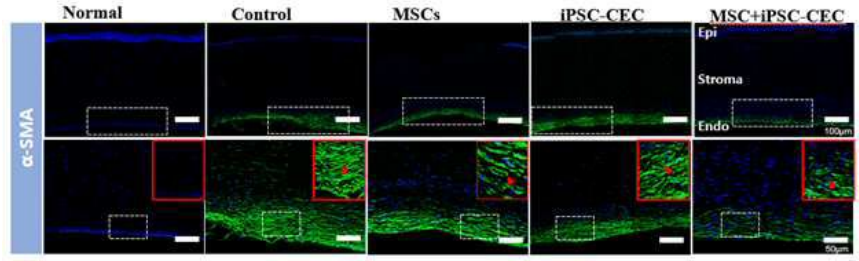
도면13



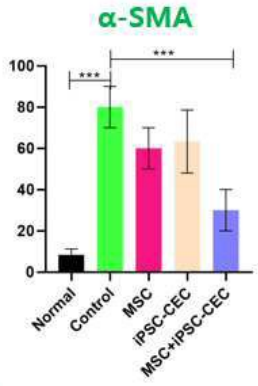
도면14



도면15



도면16



도면17

