(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0033788
(43) 공개일자 2015년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0112888
(22) 출원일자 2013년09월23일
심사청구일자 2013년09월23일

(71) 출원인
중앙대학교 산학협력단
서울 동작구 흑석동 221
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 서원구 내수동로 52 (개신동)
(72) 발명자
김재찬
서울 송파구 중대로 24, 216동 1202호 (문정동, 올림픽훼밀리타운)
김경우
서울 강남구 선릉로 222, 102동 1701호 (대치동, 대치아이파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

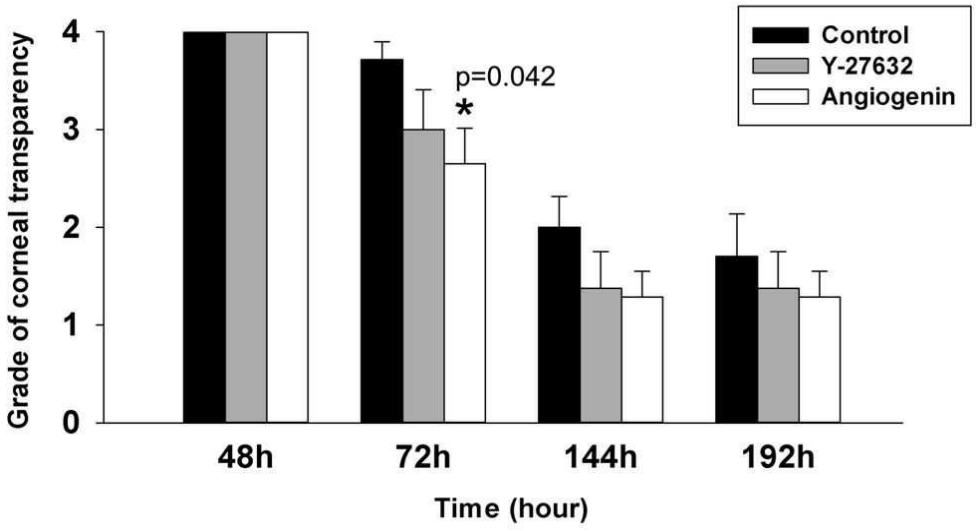
(54) 발명의 명칭 **안지오제닌을 유효성분으로 함유하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물**

(57) 요 약

본 발명은 안지오제닌을 유효성분으로 함유하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물을 제공한다.

본 발명은 종래 신생 혈관 생성에 관여한다고 알려진 안지오제닌이 안구의 각막 내피에서 PI3K/Akt 경로를 활성화시켜 자체 세포 증식능이 없는 각막 내피세포의 이주능과 증식능을 향상시킴으로서, 각막 내피의 창상을 치료하는 것을 특징으로 하는 안지오제닌의 새로운 점안 치료 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2b



(72) 발명자

전연숙

서울 송파구 잠실로 62, 344동 2601호 (잠실동, 트리지움)

박수현

서울 강서구 방화대로34길 88, 107동 607호 (방화동, 마곡푸르지오)

위성욱

서울 영등포구 63로 36, 1702호 (여의도동, 리버타워)

장수익

대전광역시 유성구 배울2로 133번지 경남아너스빌 2단지 아파트 203동 303호

민경미

충북 청주시 흥덕구 모충로26번길 60, 201동 1002호 (개신동, 두산2차한솔아파트)

김규완

충북 청주시 흥덕구 성봉로242번길 3-46, 202호 (개신동, 행복빌)

신영주

서울 강남구 도산대로70길 25, 201동 801호 (청담동, 청담2차e-편한세상)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A12148712010000100
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	난치성 각막내피 손상 질환 치료의 원천 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	중앙대학교 산학협력단
연구기간	2012.12.01 ~ 2015.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

안지오제닌을 유효성분으로 함유하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 안지오제닌은 PI3K/Akt 경로를 활성화하는 것을 특징으로 하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 안지오제닌은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부로 함유되는 것을 특징으로 하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 점안제, 주사제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 겔, 시럽, 현탁제, 유제, 점적제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안지오제닌의 신규한 각막 내피 창상 치료 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인간의 각막 내피세포는 누출성 장벽 기능 및 능동적 펌프 작용의 동적 평형을 통해 수분이동을 조절함으로써 각막의 투명성을 유지하는 생리적으로 가장 중요한 단일 세포층이다. 하지만 생체 내에서 손상된 각막 내피세포의 재생은 극히 제한적이어서, 폭스각막이영양증, 외상, 인공수정체 수포각막병증 등의 여러 질환들에 의해 내피세포가 손상되는 경우 각막의 부종 및 혼탁을 유발하여 심각한 시력의 소실을 초래하기도 한다.

[0003] 이러한 사람 각막 내피세포는 일생동안 세포 주기의 G1기에 정지해 있으며, 동시에 세포주기 진행을 억제하는 p53유전자와 같은 여러 조절자의 발현이 증가 되어 있어 대부분의 세포들이 창상 치유과정에서 세포증식 및 세포이주가 함께 동반되는데 반하여 각막 내피세포는 세포 이주와 세포 크기의 증가를 통해서 손상부위를 수복하게 된다. 그러나 사람 각막 내피세포 또한 세포 분열을 통한 증식을 하지 않지만 최근에는 주변부에서 심부로의 세포 증식 및 이주를 위한 부위가 각막 내피의 극주변부에 존재한다고 보고되었다.(He Z, & Campolmi N, & Gain P, & Ha Thi BM, & Dumollard JM, & Duband S, & Peoc'h M, & Piselli S, & Garraud O, & Thuret G. Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. Stem Cells. 2012;30:2523-2534.)

[0004] 안지오제닌은 123개 아미노산으로 이루어진 14.4kDa의 단일 사슬이며, 혈관내피성장인자(VEFG)와 함께 혈관형성(angiogenesis)을 유발하는 분비성 단백질 중의 하나이다. 혈관형성 시 혈관 내피세포 증식을 위한 안지오제닌 작동 기전으로 PI3k-Akt-내피 산화질소 합성 경로(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)와 세포 외 신호 조절인산화효소(extracellular signal-regulated kinase, Erk)경로가 활성화되며, eNOS에 의해 유도된 일산화

질소(nitric oxide, NO)는 혈관 내피세포의 자멸사를 방지하고 이주능을 증대시킨다고 알려져 있다.

[0005] 이에 본 연구진은 혈관 내피세포 증식의 자극 인자인 혈류의 전단력과 유사한 안구 방수의 흐름이 각막 내피세포와 직접 인접하고, 혈관 내피세포에서 안지오제닌 작동 경로가 사람 각막 내피세포의 생존 경로와 매우 유사함을 발견하여 안지오제닌을 각막 내피 창상 치유에 활용하고자 하였다.

[0006] 이러한 안지오제닌은 안과 분야에서 아직 많은 연구가 진행되지 않은 물질이나 한국공개특허 제 2013-0037477호에서는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 안지오제닌을 개시하고 있다. 그러나 상기 특허의 안구질환은 백내장, 녹내장 또는 안구 손상으로 발생하는 만성 안구 염증과 면역반응에 의해 형성되는 각막 기질의 신생혈관과 혼탁에 의한 시력저하를 예방, 치료하고자 하는 항 면역작용인 것에 반해, 본 발명은 자체의 증식이 없는 각막 내피세포에서 안지오제닌의 PI3k-Akt-eNOS경로와 Erk경로의 통합적 활성화를 통하여 세포의 이주능과 증식능을 증가시켜 사람의 각막 내피의 창상을 치유하고 각막의 혼탁을 예방하는 효과를 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 각막 내피세포의 손상은 시력 예후와 직결되는 중요한 문제이나, 각막 내피세포는 다른 세포들과 달리 자체 증식능이 없어 창상 치료에 어려움이 많았다. 따라서 본 발명은 상기 문제를 해결하기 위하여 안지오제닌의 PI3k/Akt 경로 활성화를 통하여 각막 내피세포의 이주능과 증식능을 향상시킨 창상 치료 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 안지오제닌을 유효성분으로 함유하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0009] 상기 안지오제닌은 PI3K/Akt 경로를 활성화하며,

[0010] 상기 안지오제닌은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부로 함유될 수 있다.

[0011] 상기 약학조성물은 점안제, 주사제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 겔, 시럽, 현탁제, 유제, 점적제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있다.

[0012] 상기 약학조성물은 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 안지오제닌은 PI3k/Akt 경로를 활성화시킴으로서 각막 내피세포의 세포 증식능과 이주능을 향상시켜 각막 내피세포 창상 예방 및 치료를 촉진 시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 경각막 냉동으로 가토의 중심 각막 내피 손상을 유도하는 과정이다.

도 2는 가토의 각막 내피 손상 후 대조군, Y-27632 처리군 및 안지오제닌 처리군의 각막 투명성을 측정한 결과로 도 2a는 각 시간별 세극등 현미경상 각막 투명도를 나타낸 것이고, 도 2b는 약물 처리 후 72시간째의 각막 투명도을 통계 분석한 그래프이다.

도 3은 가토의 각막 내피 손상 후 각각의 약물을 처리한 실험군과 대조군의 각막 투명도를 각 시간별로 디지털 카메라로 촬영한 것이다.

도 4는 가토의 각막 내피 손상 후 각각의 약물을 처리한 실험군과 대조군을 각 시간별 초음파 각막두께측정기로 중심부 각막의 두께를 3번 측정한 후 평균값을 나타낸 그래프이다.

도 5는 가토의 경강막 내피세포 손상 직전과 직후에 시행한 각막 내피 염색사진으로 도 5a는 경각막 내피세포 손상 전에 염색한 사진이며, 도 5b는 손상 후 염색한 사진이다.

도 6a은 가토의 각막 내피 손상 후 각각의 약물을 처리한 실험군과 대조군의 최대 경과시간인 192시간(8일)째의

각막 내피 창상 부를 염색한 사진이며, 도 6b는 창상 면적의 경계를 통계 분석한 그래프이다.

도 7은 정상 가토의 각막 내피 조직 절편을 배양하여 각각의 약물을 처리한 실험군과 대조군의 결과로 도 7a는 각각의 시간 경과에 따라 광학 현미경 40배율로 촬영한 사진이며, 도 7b는 각 시간별 창상 치유 지표(wound healing index)를 나타낸 그래프이다.

도 8은 사람 각막 내피세포를 배양하여 각각의 약물을 처리한 실험군과 대조군의 결과로 도 8a는 각 시간별 광학 현미경 40배율로 촬영한 사진이며, 도 8b는 각 시간별 창상 치유 지표(wound healing index)를 나타낸 그래프이다.

도 9는 농도별 안지오제닌이 사람 배양 각막 내피세포의 in vitro 이주, 증식능을 향상시키는 정도를 나타내는 그래프이다.

도 10는 가토의 각막 내피 손상 후 안지오제닌 단독 처리와 LY294002와 안지오제닌 동반 처리 후 72시간째의 결과를 나타낸 것으로 도 10a는 각 실험군의 세극등 현미경 상 각막 투명도 사진이며, 도 10b는 각 실험군을 통계 분석한 그래프이다.

도 11은 사람 각막 내피세포에 창상 후, LY294002와 안지오제닌 동반 처리 후 시간별 결과로 도 11a는 각 시간 경과에 따른 세극등 현미경 상 각막 투명도 사진이며, 도 11b는 각 시간별 창상 치유 지표 그래프이다.

도 12은 안지오제닌 하부 경로의 타겟 단백질의 발현 양상을 분석하기 위한 결과로 도 12a는 웨스턴 블럿 결과이며, 도 12b는 웨스턴 블럿 결과로 분석한 안지오제닌 하부 세포내 신호전달체계이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 종래 신생 혈관 생성에 관여한다고 알려진 안지오제닌이 각막 내피에서도 세포 이주능과 증식능 효과가 있음을 새롭게 밝혀낸 것으로, 이를 통한 안지오제닌의 각막 내피의 창상 치료 용도를 제공한다.

[0016] 따라서 본 발명은 안지오제닌을 유효성분으로 함유하는 각막 내피의 창상 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0017] 상기 안지오제닌은 PI3K/Akt 경로를 활성화 할 수 있다.

[0018] 도 10a와 도 10b를 통하여 PI3K/Akt 경로 억제제인 LY294002와 안지오제닌을 함께 투여 했을 때와 안지오제닌을 단독 투여 했을 때의 각막 혼탁 진행 정도를 확인 할 수 있는데 LY294002와 안지오제닌을 함께 투여 했을 경우 안지오제닌 단독 투여 시 보다 각막 혼탁이 진행 된 것을 확인 할 수 있다. 이를 통해 상기 안지오제닌은 PI3K/Akt 경로를 활성화하여 각막 내피의 세포 증식능을 향상시키고 각막 혼탁을 억제하는 각막 내피 창상 치료용 약학조성물로 제공될 수 있다.

[0019] 또한 상기 안지오제닌은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부로 함유될 수 있다.

[0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 안지오제닌을 유효성분으로 함유하는 각막 내피 창상 치료용 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 점안제, 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구체예에서, 안지오제닌을 유효성분으로 함유하는 각막 내피 창상 치료용 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브

오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0024] 상기 안지오제닌의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 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.

[0027] 하기의 참조예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 참조예를 제공하기 위한 것이다.

[0028] **<참조예> 통계 분석**

[0029] 각막의 투명도 등급, 중심각막두께, Alizarin red S 염색 상 각막 내피의 창상부 면적 및 in vitro 창상 면적의 군 간 비교는 Mann-Whitney U test로 검정하였다. 통계적 분석은 SPSS 소프트웨어 version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)를 이용하였으며, $p<0.05$를 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 측정치들은 평균±표준오차(standard error, SE)로 표시하였다.

[0030] **<실시예1> 안지오제닌의 in vivo 각막 내피 창상 치유 효과 분석**

[0031] **1. 가토의 각막 내피 손상 모델**

[0032] 모든 실험은 안과학 및 시기능 연구에서의 동물 실험에 대한 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)의 지침에 따라 진행되었다.

[0033] 외안부 혼탁이 없는 2.0 내지 3.0kg의 건강한 뉴질랜드 백색토끼 15마리 30안을 대상으로 틸레타민(Tiletamine)과 졸라제팜(Zolazepam) 혼합마취제 졸레틸(Zoletil, VirbacLab, France)12.5mg/kg과 자일라진(Xylazine, Rompun, BayerKorea, Korea)12.5mg/kg를 근육 내 주사하여 마취시킨 뒤 0.5% 포비돈 요오드 (povidone iodine)로 실험 시야 전 범위를 소독하였다. 가토의 각막 내피 손상 유도는 도 1과 같이 8mm 직경의 스테인레스 스틸 원기둥 막대 (probe)를 액화 질소에 3분 간 담그어 약 -196℃가 되었을 때 꺼내어 15초 간 각막 중심부에 균일하게 닿도록 접촉시킨 후 0.9% 생리식염수 10cc로 세척하였다. 각막의 감염 발생을 예방하기 위해 손상 유도 후 3일 간 레보플록사신(Levofloxacin, Cravit, Santen, Japan)점안액을 하루 3회 점안하였다.

[0034] 안지오제닌 200㎍/mL 점안군 10안, ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) 경로 억제제인 Y-27632(10mM) 점안군 7안, 그리고 대조군 (phosphate-buffered solution, PBS 점안) 7안의 3군으로 나누어 경각막 내피 냉동 손상 직후부터 시작하여 한번에 50㎕씩 초기 2일 간 하루 6회, 그 후 2일 간 하루 4회 점안하여 4일 간 총 20회 점안하였다.

[0035] **2. 각막의 투명도 호전에 미치는 안지오제닌의 효과 분석**

[0036] 안지오제닌, Y-27632 점안군과 대조군의 모든 안구에서 경각막 냉동 내피 손상 후 48시간 (2일), 72시간 (3일), 144시간 (6일), 192시간 (8일)째 표 1의 방법으로 세극등 현미경 각막의 투명도 정도를 객관적으로 등급화 하였

고, 대각선 방향에서 디지털 카메라 촬영 (VLUUNV100HD, Samsung, Suwon, Korea)을 하여 각막 혼탁 및 부종 유무를 평가하였다.

[0037] 그 결과 세극등 현미경상 각막의 투명도는 도 2a, 표2에서처럼 72시간 (3일), 144시간 (6일) 및 192시간 (8일)째 모두에서 안지오제닌 점안군에서 가장 높았으며, 그 중 도 2b와 같이 72시간째에는 안지오제닌 점안군에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다 (p=0.042). 또한 각막 부종 및 혼탁 여부를 평가하기 위해서 대각선 방향에서 촬영한 각막의 디지털 카메라 촬영 상은 도 3, 표 2와 같이 각막 부종 및 혼탁을 보이지 않은 안구의 분율이 72시간 (3일), 144시간 (6일) 및 192 시간 (8일)째 안지오제닌 점안군에서 가장 높았다.

[0038] **3. 중심각막두께 및 각막 부종 호전에 미치는 안지오제닌의 효과 분석**

[0039] 안지오제닌, Y-27632 점안군과 대조군의 모든 안에서 경각막 냉동 내피 손상 후 48시간 (2일), 72시간 (3일), 144시간 (6일), 192시간 (8일)째에 초음파 각막두께측정기 (POCKET-II, Quantel medical, Clemont-Ferrand, France)로 중심부 각막두께를 3번 측정하여 평균값을 산출하였다. 초음파 각막두께측정기의 최대 측정 가능 값인 1,000㎛을 최대 각막두께로 간주하였다.

[0040] 그 결과로 도 4를 참조하면, 중심각막두께는 내피 손상 144시간 (6일) 후부터 측정되었고, 144시간 (6일)과 192시간 (8일)째 중심 각막두께는 안지오제닌 점안 군이 각각 503.0±21.07㎛와 390.3±10.55㎛로 세 군 중 가장 작았으며, 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다. 또한, 표3에서처럼 Y-27632 점안군 역시 144시간과 192시간째 대조군에 비해 중심각막두께가 작았지만, 통계적으로 유의하지 않았다.

[0041] **4. 각막 내피의 창상부 회복에 미치는 안지오제닌의 효과 분석**

[0042] 총 30안 중 2안은 각각 정상 각막 내피의 음성 대조군과 경각막 내피 냉동 손상 직후 Alizarin red S 염색을 위한 양성 대조군으로서 이용하였다. 경각막 냉동 내피 손상 후 192시간 (8일)째 과용량의 KCl을 근육 내 주사하여 희생시키고 대조군, 안지오제닌 점안군 및 Y-27632 점안군에서 각 군 당 3안씩 적출하였다. 각막 윤부를 경계로 전체 각막을 떼어내어 1% Alizarin red S 용액 (Lab Chem, Pittsburgh, USA)에 2분간 담갔다가 0.9% 생리식염수로 세척 후 내피를 위쪽으로 wet mount 하였다. 즉시 광학 현미경 하에서 관찰한 후 사진을 찍어 40배율 하에서 Image J 소프트웨어 (National Institutes of Health (NIH); http://rsbweb.nih.gov/ij/)를 이용하여 창상부 면적을 디지털 사진의 픽셀 단위로 측정하였고, 200배율 하에서 창상부 주위 내피세포의 형태 (hexagonality)를 비교 관찰하였다.

[0043] 그 결과 도 5a 에서 나타난 바와 같이, 경각막 냉동 내피 손상 직후와 직전의 각각 1안에서 시행한 각막 내피 염색 상 음성 대조군에서는 육각형의 치밀한 구조의 각막 내피세포의 배열이 관찰된 반면, 도 5b의 양성 대조군에서는 각막 내피세포 없이 데스메막이 완전히 드러나 본 연구의 경각막 냉동이 내피 손상 유도 방법으로서 적합하다고 판단하였다.

[0044] 또한 도 6a 에서 알 수 있듯이, 최대 경과 관찰 기간인 192시간 (8일) 째 Alizarin red S 염색으로 관찰한 각막 내피의 창상 면적은 안지오제닌 점안군이 가장 작았다. 안지오제닌과 Y-27632 점안군 모두에서 대조군에 비해 창상부 면적이 작았으며, 도 6b와 같이 경계값이 통계적 유의한 차이를 보였다 (p=0.050). 200배율 하에서 창상부 주위 내피세포를 관찰하였을 때, 안지오제닌 점안군에서는 대체로 균일한 육각형 형태 (hexagonality)를 보였으나, Y-2732 점안군 및 대조군에서는 세포 형태의 변형이 현저하였다.

[0045] **<실시예 2> 안지오제닌이 각막 내피세포의 in vitro 이주, 증식능에 미치는 영향 분석**

[0046] **1. 가토 및 사람 각막 내피세포 배양**

[0047] 사체 각막에서 이식용으로 공여한 중심부 8㎜를 제외한 나머지 부분의 각막과 정상 가토의 각막 내피를 조직 절편 배양하였다. 각막 조직을 6등분 한 후 5% P/S (페니실린/스트렙토마이신) 7㎖를 첨가한 페트리 디쉬에서 6차례 흔들면서 세척을 하였다. 세척한 각 조직을 내피층이 아래로 향하도록 6-well 디쉬에 각각 옮겨 물기가 살짝 마를 정도로 반 건조한 후, 가토 각막은 사람 상피세포 성장인자(hEGF), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 5% 태아소혈청(FBS), 사람 중간엽줄기세포 성장인자 (hFGF), 인슐린양 성장인자 (IGF), 아스코르빈산, 겐타마이신 및 암포테리신-B를 함유한 배양액 (EGM™-2BulletKit™,Lonza,Allendale,USA)을 사람 각막은 Opti-MEM (Gibco,

New York, USA)에 8% FBS, 칼슘($CaCl_2$), 콘드로이친황산염(Chondroitinsulfate), 아스코르빈산, 종합비타민용액, 겐타마이신, 항 *Pseudomonas aeruginosa* 항생제, 뇌하수체 추출물 (pituitary extract), 상피세포 성장인자(EGF) 및 신경 성장인자(NGF)가 보충된 배양액을 첨가하여 5~7일 간 각막 내피세포를 배양하였다.

[0048] **2. 배양 각막 내피세포의 in vitro 창상 치유 실험**

[0049] 안지오제닌이 각막 내피세포의 이주, 증식능에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 3개의 6-well에서 가토의 배양 각막 내피세포가 80~90%의 합류도 (confluency)를 보일 때 각 well의 중심부를 200㎕ 파이펫 (pipette) 끝으로 긁어 창상을 만들었다. 3개의 6-well을 각각 1) 5% FBS (대조군), 2) Y-27632 (10㎛M)과 3) 안지오제닌 (2㎍/ml)을 함유한 배양액으로 교체하였다. 0시간, 12시간, 24시간 및 48시간째 광학 현미경의 40 배율 하 디지털 사진 촬영을 하여 잔여 창상부의 면적을 Image J 소프트웨어를 이용해 픽셀 단위로 측정하였다. 또한, 3개의 6-well 디쉬에서 사람 배양 각막 내피세포에 위와 동일한 방법으로 창상을 만들고, 1) 5% FBS (대조군), 2) Y-27632 (10㎛M)과 3) 안지오제닌 (5㎍/ml)을 함유한 배양액으로 교체 후 6시간과 24시간째 *Image J* 소프트웨어를 이용해 창상부 면적을 측정하였다. 초기 창상부 대비 회복 면적의 비율을 창상 치유 지표 (Wound healing index)라고 정의하였으며, 초기 창상 면적을 동일하게 보정 후 아래의 방법으로 계산하였다.

[0050] *창상 치유 지표 (Wound healing index(%))*

[0051] *= (초기 창상 면적 - 잔여 창상 면적) / 초기 창상 면적*

[0052] 그 결과 가토 각막 내피세포의 창상 치유 지표 (wound healing index, %)는 도 7a, 도 7b와 같이 안지오제닌 군에서 12, 24 및 48시간째 각각 28.7±2.9%, 66.7±4.3% 및 78.7±2.9%로 시간대별 각각 16.5±1.9%, 46.9±3.5% 및 64.4±4.6%를 보인 대조군에 비해 유의하게 높았으며, Y-27632 군과 대조군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 또한 사람 각막 내피세포의 창상 치유 지표는 도 8a, 도 8b와 같이 6시간과 24시간 째 모두에서 안지오제닌 군과 Y-27632 군 둘 다 대조군에 비해 높았다. 그러나 사람 및 가토 배양 내피세포 모두에서 안지오제닌 군과 Y-27632 군 간의 유의한 차이는 없었다.

[0053] **3. 사람배양각막내피세포의 in vitro 창상 치유의 적정 농도 규명**

[0054] 안지오제닌이 사람 배양 각막 내피세포의 in vitro 이주, 증식능을 향상시키는 최적 농도를 규명하고자 하였다. 4개의 6-well에서 사람 배양 각막 내피세포가 80~90%의 합류도 (confluency)를 보일 때 각 well의 중심부를 200㎕ 파이펫 끝으로 긁어 창상을 만들었다. 4개의 6-well을 각각 1) 안지오제닌 (1㎍/ml), 2) 안지오제닌 (2㎍/ml), 3) 안지오제닌 (5㎍/ml), 4) 안지오제닌 (10㎍/ml)을 함유한 배양액으로 교체하였다. 0시간, 12시간, 24시간, 48시간째 Image J 소프트웨어를 이용해 창상부 면적을 측정하여 창상 치유 지표로 나타내었다.

[0055] 그 결과 사람 각막 내피세포의 창상 치유 지표는 도 9와 같이 안지오제닌 5㎍/ml 군에서 가장 높았으며, 안지오제닌 2㎍/ml 군과 안지오제닌 5㎍/ml 군에서 나머지 군에 비해 유의하게 높았다.

[0056] **<실시예 3> 안지오제닌의 세포 내 작동 경로 규명**

[0057] **1. LY294002와 안지오제닌 동반 점안군의 in vivo 창상 회복 양상 분석**

[0058] 각막 내피 손상 후 각막의 투명도 회복에 있어 안지오제닌 유도 PI3k-Akt 신호전달체계의 영향력을 확인하고자 하였다. 가토 총 30안 중 4안에서 각막 내피의 냉동 손상 후 안지오제닌 200㎍/mL과 PI3k-Akt 경로 억제제인 LY294002 (200㎛M)를 1회 점안 시 각각 50㎕씩 3분 간격으로 동반 점안하였으며, 초기 2일 간 하루 6회, 그 후 1일 간 하루 4회 점안하여 3일 간 총 16회 점안하였다. 본 연구에서 대조군 대비 안지오제닌 점안 효과가 가장 높았던 손상 72시간 후에, 각막의 투명도를 세극등 현미경 검사 방법과 대각선방향에서 촬영한 디지털카메라사진을 통해 분석하여 안지오제닌 단독 점안군과 비교하였다.

[0059] 그 결과 도 10a와 같이 내피 손상 72시간째 세극등 현미경 상 각막 투명도는 통계적으로 유의하지는 않았지만 도 10b 에서처럼 안지오제닌과 LY294002 동반 점안군이 안지오제닌 단독 점안군에 비해 낮은 경향 (p=0.085)을 보였으며 디지털 사진 촬영결과 표 2처럼 안지오제닌과 LY294002 동반 점안군은 각막 부종과 혼탁을 보이지 않

은 안구의 분율이 0% 로서 안지오제닌 단독 점안군과 큰 차이를 보였다.

[0060] **2. LY294002와 안지오제닌 동반 처리 시 배양 각막 내피세포의 in vivo 창상 회복 양상 분석**

[0061] 각막 내피세포의 창상 치유에 있어 안지오제닌이 그의 하부 경로인 PI3k-Akt 경로를 경유하는지 알아보고자 하였다. 사람 배양 각막 내피세포의 in vitro 창상 후 안지오제닌 (5μg/ml)과 LY294002 (50μM) 혼합물을 함유한 배양액으로 교체하였다. 이후 6시간과 24시간 째 Image J 소프트웨어를 이용해 창상 치유 지표를 계산한 후 이를 앞서 실험한 안지오제닌 (5μg/ml) 단독 배양 결과와 비교하였다.

[0062] 도 11a, 도 11b와 같이 안지오제닌과 LY294002 혼합 배양액에 노출 시킨 사람 배양 각막 내피세포의 창상 치유 지표는 6시간과 24시간째 각각 24.3±4.4%와 47.3±4.6%로 같은 시간대 각각 44.9±2.8%와 85.9±1.5%를 보인 안지오제닌 군에 비해 창상회복이 현저하게 낮았다 (p=0.006 and 0.004, respectively).

[0063] **3. 안지오제닌 하부 경로 타겟 단백질 발현의 웨스턴 블롯 (Western blot) 분석**

[0064] 배양한 사람 각막 내피세포를 5μg/ml 안지오제닌 함유 배양액에 5분, 10분, 30분, 1시간 및 3시간 동안 처리한 후, 각 시간대 별로 안지오제닌의 하부 경로 타겟 단백질인 Akt, eNOS과 Erk1/2의 발현 양상을 분석하였다. 우선, 각막 내피세포로부터 PRO-PREP™ 단백질 추출 용액 (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 총 단백질을 분리하였다. 총 단백질 (30μg/시료)은 100℃에서 5분간 가열하였으며 10% 소디움도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 (sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide, SDS-PAGE) 겔을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 분자량에 따라 분리된 단백질들은 폴리비닐리데인 플루오라이드 (Polyvinylidene Fluoride, PVDF) 멤브레인으로 이동시켰다. 멤브레인은 1X TBS (tris-buffered saline)에 녹인 5% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 1시간 동안 상온에서 블로킹 하였다. 이후 TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS buffer)에 1:1,000으로 희석된 t-Akt, p-Akt, t-Erk1/2, p-Erk1/2, t-eNOS, p-eNOS, β-actin의 일차 항체 (t-Akt, p-Akt, Erk, p-Erk, Cell Signaling Technology, Danvers, USA; eNOS, p-eNOS, Enzo Life Sciences, New York, USA; β-actin, Sigma Chemicals, St. Louise, USA)를 4℃에서 16시간 동안 처리하여 반응을 유도하였다. 멤브레인을 실온에서 TBS-T로 교반기를 이용하여 15분씩 3번 흔들어서 세척한 후 호스래디쉬 퍼락시데이스 (horseradish peroxidase, HRP)가 결합된 이차 항체 (Bethyl Laboratories, Montgomerry, USA)를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 교반시키며 인큐베이션 하였다. 다시 멤브레인을 실온에서 TBS-T로 교반기를 이용하여 15분씩 3번 흔들어서 세척한 후 ECL 웨스턴 블로팅 검출 시약(Western Blotting Detection Reagent, Amersham Bioscience, Piscataway, USA)을 이용하여 발광시켰으며, 이를 ChemiDoc™ XRS system (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 이미지를 검출하였다.

[0065] 도 12a의 웨스턴 블롯 결과 사람 배양 각막 내피세포에 안제오제닌 처리 후, Akt, eNOS, Erk1/2 모두 전체 단백 발현량에 대한 인산화 단백의 상대적 발현 정도(p-form/t-form)가 대조군에 비해 증가되었다. 그 중에서도 Akt는 대조군에서는 거의 발현이 되지 않은 반면, 안지오제닌 투여 후 가장 뚜렷한 발현 증가를 보였다.

[0066] 이들 타겟 단백질 모두 시간에 따른 상이한 발현 양상을 보였는데, p-Akt는 안지오제닌 10분 처리 후, p-Erk1/2는 30분 처리 후, 그리고 p-eNOS는 3시간 처리 후 최대로 발현되었다. 이를 통해 도 12b와 같이 각막 내피 창상 치유 향상을 유도하는 세포내 안지오제닌 하부 신호전달체계를 확인하였다.

표 1

세극등 검사 각막 투명성 채점 기준

Grade	Characteristic
0	완전한 투명 각막
+0.5	희미한 흐림, 경사 조명에 의해서만 확인가능
+1.0	극히 적은 탁함, 확산 조명법으로 확인이 어려움
+2.0	약간 탁함, 초점 세극 조명법으로 쉽게 확인 가능
+3.0	중간 밀도의 탁함, 홍채를 부분적으로 가림
+4.0	심한 밀도의 탁함, 홍채를 완전히 가림

(* 통계적으로 유의한 값)

[0067]

표 2

각막 내피 상처 치유기간 동안 각막 투명성

각막 투명도 등급(세극등 생체 현미경)				
시간	48 h	72 h	144 h	192 h
대조군	4.00±0	3.71±0.18	2.00±0.32	1.70±0.44
Y-27632 군	4.00±0	3.00±0.41	1.38±0.38	1.38±0.38
p 값 (vs 대조군)	-	0.114	0.225	0.606
안지오제닌 군	4.00±0	2.65±0.37	1.29±0.26	1.29±0.26
p 값 (vs 대조군)	-	0.042*	0.096	0.442
안지오제닌 + LY294002 군	-	3.75±0.25	-	-
p 값 (vs안지오제닌군)	-	0.085	-	-
혼탁과 부종이 없는 각막 수의 비율 (디지털 사진)				
시간	48 h	72 h	144 h	192 h
대조군	0%	0%	0%	16.7%
Y-27632 군	0%	14.3%	14.3%	14.3%
안지오제닌 군	10%	20%	37.5%	50%
안지오제닌 +LY294002 군	-	0%	-	-

(* 통계적으로 유의한 값)

[0068]

표 3

각막 내피 상처 치유기간 동안 중심 각막 두께

중심 각막 두께(μm)					
시간	0 h	48 h	72 h	144 h	192 h
대조군	350.2±4.8	> 1,000	> 1,000	586.0±22.3	443.5±15.7
Y-27632	361.7±3.4	> 1,000	> 1,000	571.6±43.0	432.5±332.2
p 값 (vs 대조군)	0.086	-	-	0.806	0.806
Angiogenin	350.4±6.2	> 1,000	> 1,000	503.0±21.1	390.3±10.5
p 값 (vs 대조군)	0.808	-	-	0.028*	0.028*

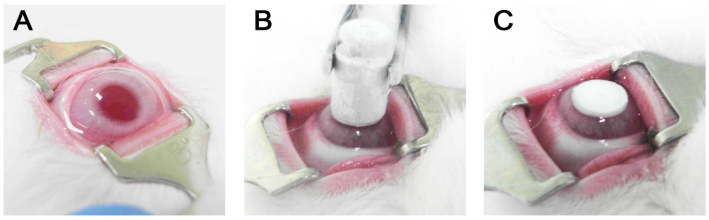
(* 통계적으로 유의한 값)

[0069]

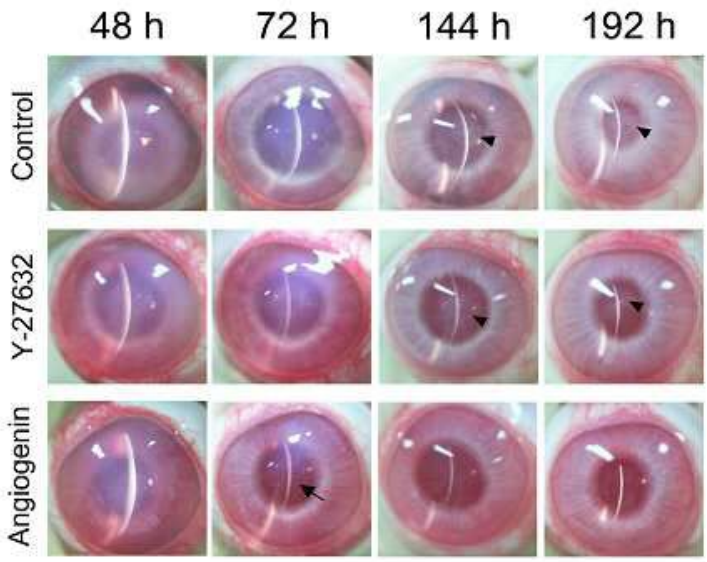
[0070] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

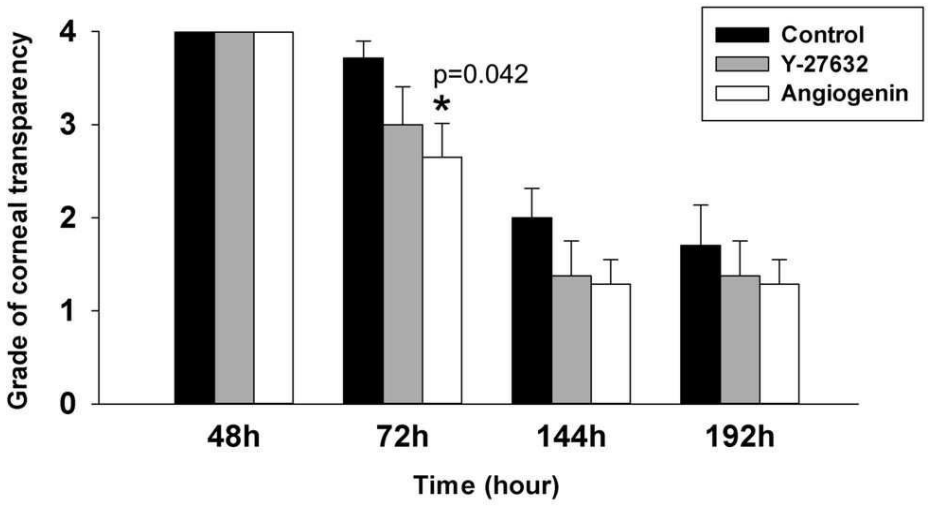
도면1



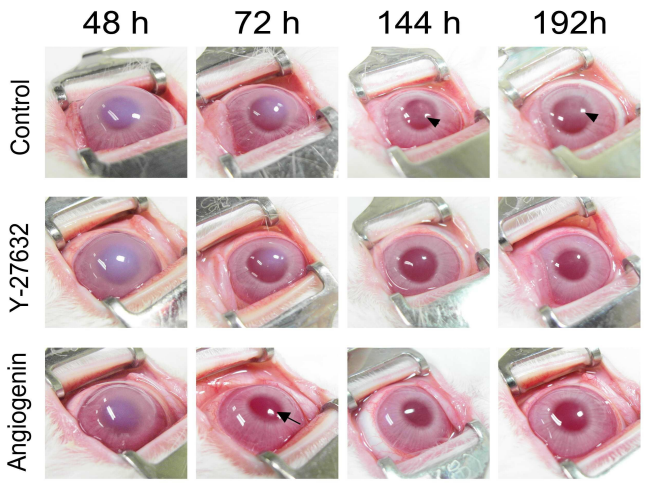
도면2a


48 h
72 h
144 h
192 h
Control
Y-27632
Angiogenin

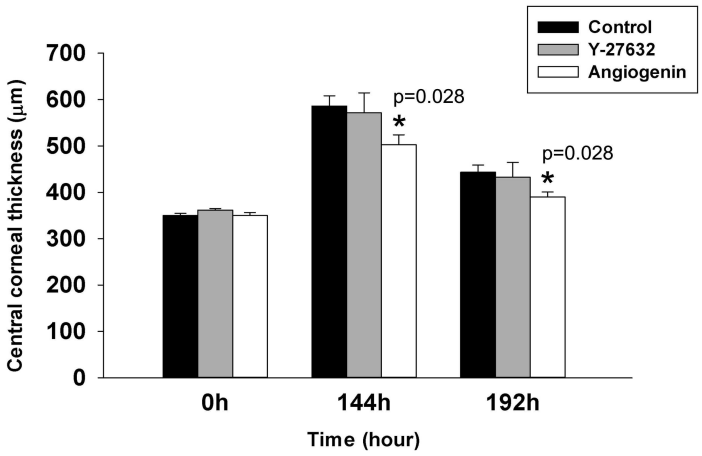
도면2b


Grade of corneal transparency
4
3
2
1
0
p=0.042
*
Control
Y-27632
Angiogenin
48h
72h
144h
192h
Time (hour)

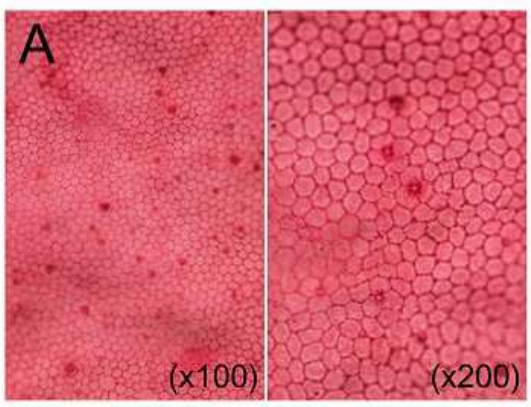
도면3


48 h
72 h
144 h
192h
Control
Y-27632
Angiogenin

도면4


Control
Y-27632
Angiogenin
Central corneal thickness (μm)
700
600
500
400
300
200
100
0
p=0.028
*
p=0.028
*
0h
144h
192h
Time (hour)

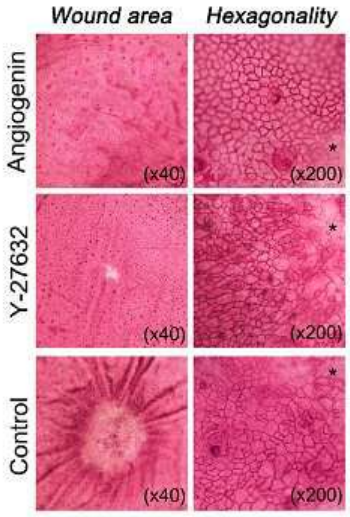
도면5a


A
(x100)
(x200)

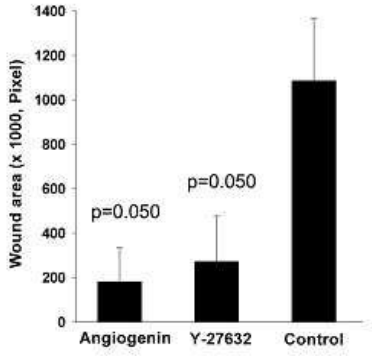
도면5b


B
(x100)

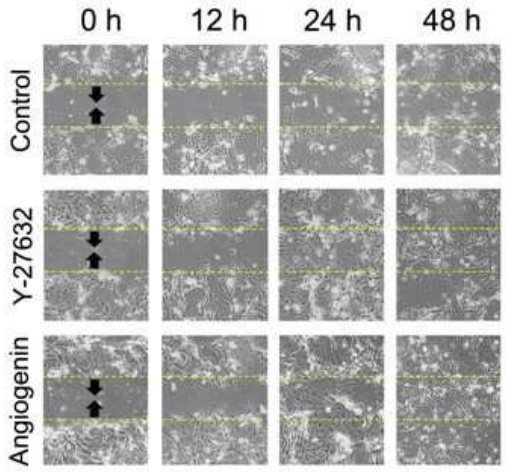
도면6a


Wound area
Hexagonality
Angiogenin
Y-27632
Control
(x40)
(x200)
*

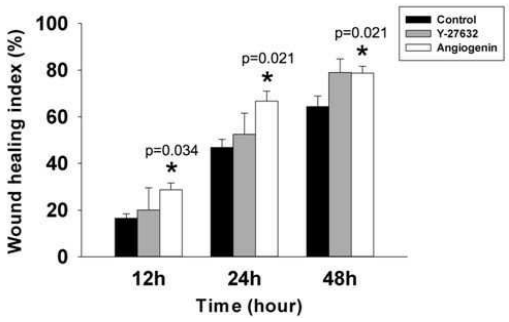
도면6b



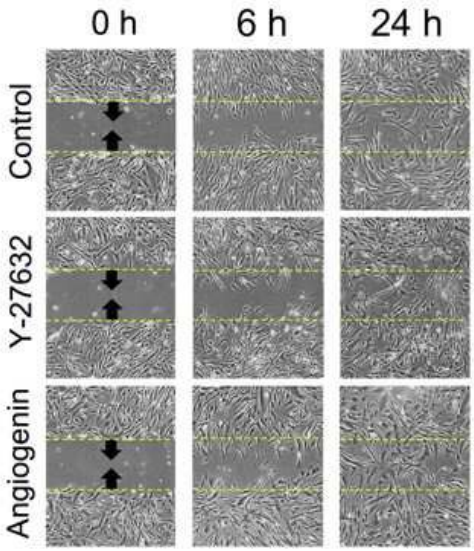
도면7a



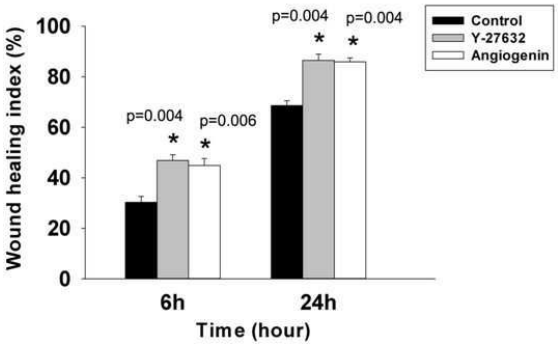
도면7b



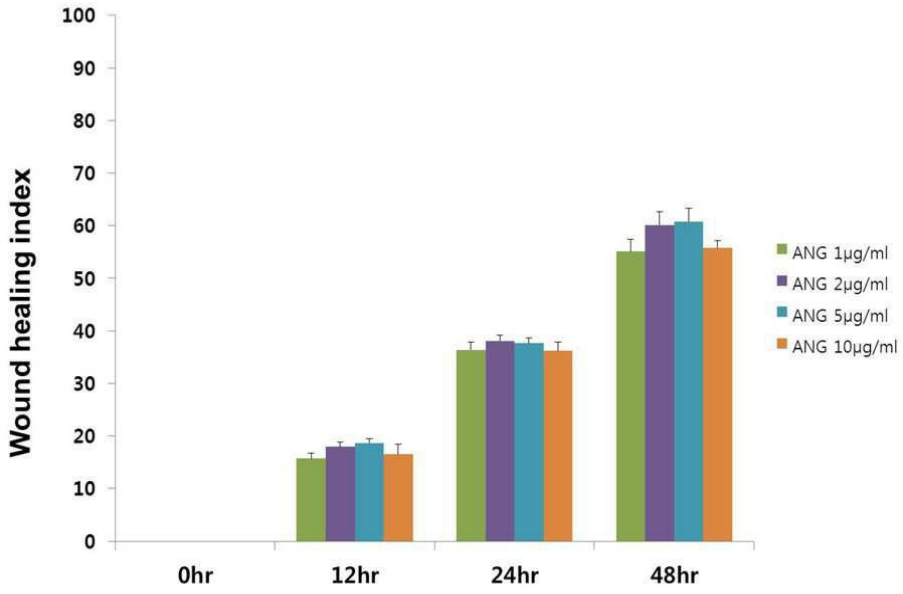
도면8a


0 h
6 h
24 h
Control
Y-27632
Angiogenin

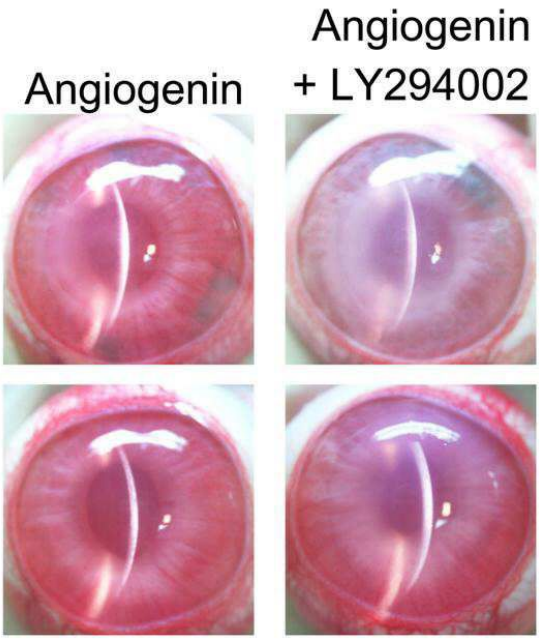
도면8b


Wound healing index (%)
100
80
60
40
20
0
p=0.004
*
p=0.006
*
p=0.004
*
p=0.004
*
6h
24h
Time (hour)
Control
Y-27632
Angiogenin

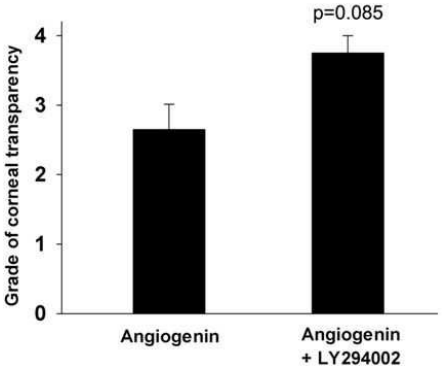
도면9


Wound healing index
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0hr
12hr
24hr
48hr
ANG 1μg/ml
ANG 2μg/ml
ANG 5μg/ml
ANG 10μg/ml

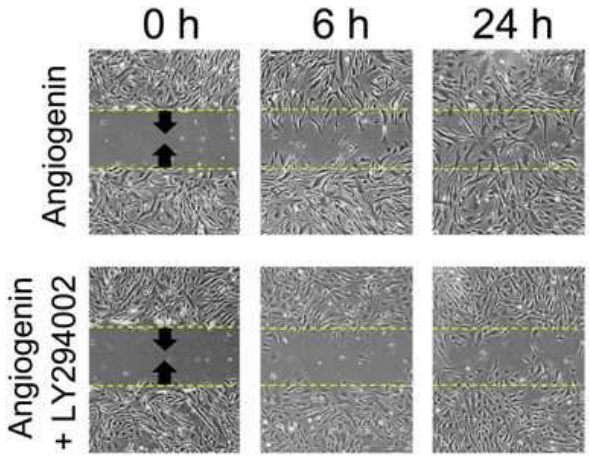
도면10a


Angiogenin
Angiogenin
+ LY294002

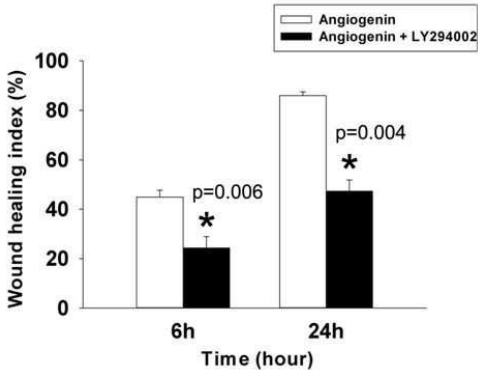
도면10b



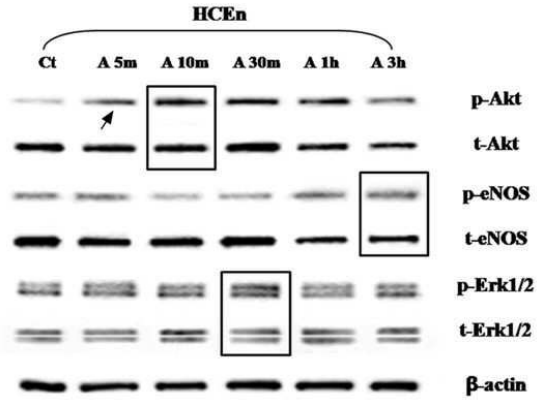
도면11a



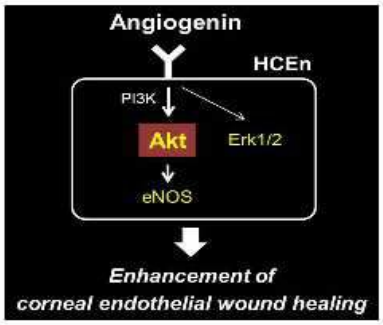
도면11b



도면12a



도면12b



(HCEn, Human corneal endothelial cell)