



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0062028
(43) 공개일자 2017년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01) A61K 9/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 38/1767 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0167355
(22) 출원일자 2015년11월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
인제대학교 산학협력단
경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동, 인제대학교)

한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자
양재욱
부산광역시 동래구 사직로 80, 118동 2502호 (사직동, 사직쌍용예가)

이혜숙
부산광역시 부산진구 백양대로300번길 19, 101동 2003호 (개금동, 신개금엘지아파트)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인태백

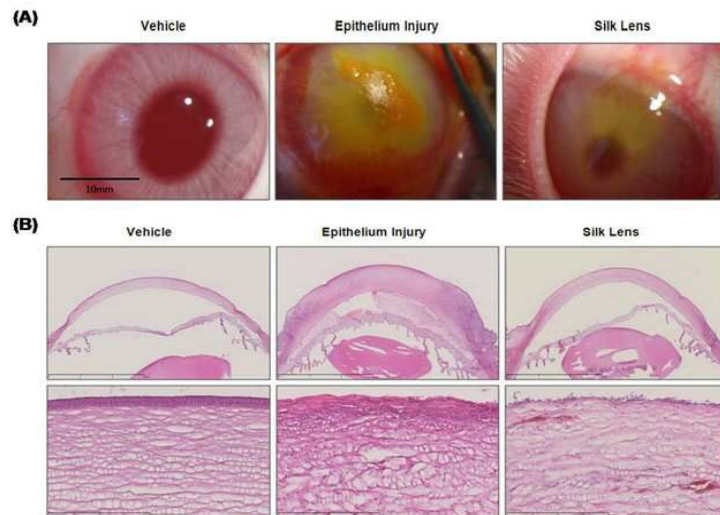
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 실크 피브로인을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 실크 피브로인을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환 치료용 조성물에 관한 것으로서, 각막상피 손상 토끼 모델에서 실크 피브로인의 처치는 각막 및 결막 부위의 조직학적인 개선을 보였으며, 특히 5% 실크 피브로인 점안은 정상 안구 수준의 대식세포 발현과 혈관생성인자 및 염증성 대식세포 발현을 억제함이 확인되었다. 또한 건성안 마우스 모델에서 실크 피브로인 파우더를 처리한 결과 눈물량 증가, 각막 굴곡성 개선, 상피세포 박리, 배상세포 분포 등 건성안에서 나타나는 특징들에서 개선이 있음을 규명하였다. 따라서, 실크 피브로인은 안구 표면 질환을 치료하기 위한 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/06 (2013.01)

A61K 9/70 (2013.01)

(72) 발명자

이윤진

부산광역시 해운대구 선수촌로 122, 103동 2404호
(반여동, 아시아선수촌아파트)

박찬흠

강원도 춘천시 지석로 67, 204동 1302호 (석사동,
현진에버빌2차)

이민채

경기도 구리시 원수택로 6-15, 가동 201호 (수택동, 현암아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0005 (A120006)

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 안신생혈관질환 치료기술 개발 센터

기 여 율 1/1

주관기관 인제대학교 부산백병원

연구기간 2012.05.01 ~ 2017.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

실크 피브로인(silk fibroin)을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약학조성물은 연고, 분말, 겔 또는 필름 형태인 것을 특징으로 하는 안구 표면 질환 치료용 약학조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 안구 표면 질환은 각막 상피 손상, 건성안 또는 각막 염증인 것을 특징으로 하는 안구 표면 질환 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 실크 피브로인을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 안구표면의 각막과 결막조직은 투명한 얇은 조직(각막: 0.5~0.7mm, 결막: 0.5mm)으로, 인구 노령화, 야외활동과 스포츠인구 증가, 대기 오염에 의한 자외선 및 오염물질 노출 확대로 안구 표면 질환 발병률이 증가하는 추세이다.

[0003] 세계적으로 1억 6천만명 정도가 시력장애를 겪고 있고 25년 후면 2배로 증가할 것으로 예상되며(WHO 보고서), 국내 약 5만명의 환자가 난치성 질환이나 부상에 의한 각막 손상으로 각막이식을 대기하고 있는 실정이다.

[0004] 1906년 기증 각막을 이용한 동종각막이식술이 처음 시행되었으나 부족한 안구기증으로 인해 인공각막에 대한 개발이 활발히 진행되고 있다. 다양한 소재와 디자인의 인공각막이 연구, 개발되었지만, 물리적 불안정성과 생체 적합성의 문제로 인해 효과적인 대체품은 현재까지 소개된 바 없다. 안구용 의료소재의 개발이 부진한 가운데, 각종 사이토카인 및 성장인자들이 함유된 양막의 항염증, 창상보호, 상피재생효과를 바탕으로, 여러 안구표면질환 치료를 위해 양막 이식술이 1995년 처음 시행되었고, 안구표면 재건용 이식재로 활발한 연구와 임상적용이 진행되고 있으나, 다음과 같은 한계가 있다. 양막은 인체 유래물로서 공급의 불확실성, 윤리적인 문제와 더불어 에이즈, B형 간염, C형 간염, 매독 등 전염성 질환의 위험성이 있고, 기증자의 나이나 임신기간에 따른 단백질의 발현 정도에 차이가 있으며 조직은행마다 가공 및 저장방법이 달라 상품의 표준화가 어려운 점이 있다. 또한, 조직의 특성상 기계적 강도가 약해 봉합시 쉽게 찢어지거나 스스로 접히고 서로 부착되는 성질이 있어서 다루기 어려우며, 이식 후 결손이 발생하고 2mm 이상의 깊은 손상의 경우엔 얇은 두께로 인해 치료효과가 떨어지는 것으로 보고되고 있다.

[0005] 현재까지 다양한 소재와 디자인의 인공각막이 연구개발되었지만, 물리적 안정성과 생체적합성의 문제로 심각한 합병증을 유발해 효과적인 대체품의 필요성이 대두되는 실정이다. 따라서 표준화된 물리적 특성과 안정성이 보장되며, 다양한 제형 변화가 가능한 생체적합성 고분자와 생체소재들을 활용한 안구 표면 이식재의 개발 요구가 절실한 실정이다.

[0006] 실크는 누에고치에서 추출하여 제조한 천연 고분자로서 피브로인과 세리신으로 구성되어있으며, 다른 천연 고분자 재료와 달리 대량으로 얻을 수 있으며, 특별한 정제 과정을 거치지 않아도 인체에 대한 거부 반응이 거의 일어나지 않아 분말, 막, 다공질 지지체 및 겔 등 다양한 형태로 제조 가능하다. 실크 단백질의 조성이 인체 피부를 구성하고 있는 콜라겐 단백질의 아미노산 조성과 매우 유사하여 피부 친화성에 기초한 식품 및 화장품 소재에 사용되고 있으며, 효소고정화 담체, 세포 배양 지지체 등 생물 공학용 소재 및 창상 피복재, 인공 혈관 등의 의료용 소재로 사용되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 미국공개특허 2014-0193466(2014.07.10 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 실크 피브로인(silk fibroin)을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환 치료용 약학조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 실크 피브로인(silk fibroin)을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환, 특히 각막 상피 손상, 건성안 또는 각막 염증 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 실크 피브로인을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환 치료용 조성물에 관한 것으로서, 각막상피 손상 토끼 모델에서 실크 피브로인의 처리는 각막 및 결막 부위의 조직학적인 개선을 보였으며, 특히 5% 실크 피브로인 점안은 정상 안구 수준의 대식세포 발현과 혈관생성인자 및 염증성 대식세포 발현을 억제함이 확인되었다. 또한 건성안 마우스 모델에서 실크 피브로인 파우더를 처리한 결과 눈물량 증가, 각막 굴곡성 개선, 상피 세포 박리, 배상세포 분포 등 건성안에서 나타나는 특징들에서 개선이 있음을 규명하였다. 따라서, 실크 피브로인은 안구 표면 질환을 치료하기 위한 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 각막상피 손상 토끼 모델을 대상으로 실크 피브로인 렌즈 이식에 따른 효과를 나타낸다.
- 도 2는 각막상피 손상 토끼 모델을 대상으로 3가지 형태의 실크 피브로인 필름의 이식에 따른 효과를 나타낸다.
- 도 3은 각막상피 손상 토끼 모델을 대상으로 한 실크 피브로인 파우더의 효과를 나타낸다.
- 도 4는 눈물량 생성에 미치는 실크 피브로인의 영향을 나타낸다.
- 도 5는 각막 표면의 굴곡성에 미치는 실크 피브로인의 영향을 나타낸다.
- 도 6은 각막 상피세포의 박리에 미치는 실크 피브로인의 영향을 나타낸다.
- 도 7은 결막 배상세포 분포에 미치는 실크 피브로인의 영향을 나타낸다.
- 도 8은 실크 피브로인의 항염증 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 실크 피브로인(silk fibroin)을 유효성분으로 함유하는 안구 표면 질환 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 약학조성물은 연고, 분말, 겔 또는 필름 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 안구 표면 질환은 각막 상피 손상, 건성안 또는 각막 염증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 실크 피브로인(silk fibroin)을 0.01 내지 90 중량부로 함유할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수

있다.

- [0017] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 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 스테아레이트, 탈크 같은 율활제들도 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, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0019] 상기 약학조성물의 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 실시예에 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.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 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.
- [0022] 하기의 실험에는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0023] <실험예>
- [0024] **1. 실크 피브로인의 준비**
- [0025] Bombyx mori의 누에고치를 0.02 M Na₂CO₃ 수용액에서 60분 동안 100℃로 가열하고 증류수로 3회 반복 세척의 정련과정을 거쳐 세리신 단백질과 불순물 등을 제거하여 순수한 실크 피브로인을 얻었다. 정련된 실크 피브로인은 CaCl₂ : H₂O : EtOH = 1 : 8 : 2 mol 비의 혼합용매에 90℃에서 2시간 동안 용해시킨 다음 증류수에서 72시간 동안 투석하였고, 5 w/w%의 순수한 실크 피브로인 용액을 제작하였다.
- [0026] 제작된 실크 피브로인 용액을 90 × 15 mm petri dish에 10mL의 실크 피브로인 용액을 넣고 한쪽은 평균온도 24℃에 실내에서 48시간 동안 건조하여 평균 두께 40-60 μm 의 필름을 제작하였다. 이렇게 완성된 실크 피브로인 필름은 70℃에서 15분간 수화시켜 결정화하였다.
- [0027] 렌즈 형태 필름은 자체 제작한 직경 1cm 반구형 렌즈 몰드 위에 200 μm 실크 피브로인 용액을 넣어 24℃에 실내에서 24시간 동안 건조하여 제작하였고, 완성된 렌즈 형태 실크 피브로인 필름은 70℃에서 15분간 수화시켜 결정화하였다.
- [0028] 파우더 형태는 실크 피브로인 용액을 125 x 125 mm square dish에 50 ml 넣은 후, 동결 건조기를 이용하여 -70℃로 동결 건조 하였다. 동결 건조한 스펀지는 막자 사발로 갈아서 파우더 형태로 제작하였다.
- [0029] 일자, 격자 무늬 필름은 직경 120 mm의 알루미늄 원통에 실크 피브로인 용액 5 mL에 1000 rpm으로 평균온도 26℃에 실내에서 2 ~ 3시간 회전 건조시켜 실크 피브로인 막을 제작하였다. 이때 회전하는 원통 내에 일자 또는 격자 무늬를 각인 또는 삽입하여 패턴을 프린팅하는 방법을 사용해 제작하였다.

[0030] 2. 각막상피 손상 토끼 모델에서 실크 피브로인의 유효성 평가

[0031] (1) 실험동물 및 각막상피 손상 모델 제작

[0032] 뉴질랜드 흰색 토끼를 Samtako (Osan, Korea)에서 구입하여 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 동물 실험은 인체대학교 의과대학 (No. 2014-028)과 ARVO에 승인된 지침에 따라 수행되었다. 2.0~2.5 kg 내외의 뉴질랜드 흰색 토끼는 케타민 하이드로클로라이드 (30 mg/kg body weight, Huons, Jecheon, Korea) 및 자일라진 하이드로클로라이드 (2.5 mg/kg, Bayer Korea Ltd., Seoul, Korea) 혼합물을 근육에 주사하여 전신 마취 후, 알카라인 프로프라카인점안액 (Alcaine propracaine, Alcon Inc., Seoul, Korea)을 이용하여 국소 마취하였다.

[0033] 마취한 토끼의 각막을 99% 에탄올에 1분간 노출시킨 후, 브러시로 쓸어 각막상피 손상을 유발하였다. 손상된 각막 상피에 실크 피브로인의 처리는 렌즈, 필름, 파우더의 3가지 형태로 진행하였으며, 필름 형태의 실크 피브로인은 민무늬, 일자무늬, 격자무늬의 세가지 형태를 준비하여 처리하였다. 또한 파우더 형태의 실크 피브로인은 생리 식염수(PBS)에 1%, 5%, 10%의 농도로 녹인 다음 점안하여 처리하였으며 아무것도 처리하지 않은 식염수를 음성 대조군으로 설정하였다. 렌즈와 필름 형태의 실크 피브로인은 절단된 부분을 완전히 덮을 수 있도록 이식하고 10-0 나일론으로 봉합하였다. 실크 피브로인 이식 후 동물의 행동 및 식이를 제한하지 않았으며, 실크 피브로인 이식 직후 (DAY 0) 와 7일 후 (DAY 7) 각막 표면 사진을 촬영하였다. 촬영 종료 후 토끼를 CO₂ chamber에서 안락사 시킨 다음 하기의 실험을 진행하였다.

[0034] (2) 조직 면역 염색 (H&E 염색)

[0035] 안락사시킨 토끼에게서 안구를 적출하여 10% 포르말린으로 고정시키고 파라핀블록을 제작하였다. 포매된 조직은 6 μm으로 절편하여 헤마톡실린과 에오신을 사용하여 염색하였다(H&E 염색). 구체적으로 H&E 염색은 다음의 방법으로 진행하였다. 6 μm의 조직절편을 슬라이드에 부착시켜 1시간 건조시킨 다음, 헤마톡실린으로 3-5분간 염색한 후 세척하였다. HCl 용액에 반응시키고 세척하여 에오신 용액에 30초-1분간 염색한 후, 재세척하였다. 세척한 절편을 80, 85, 90, 100% 에탄올에 각각 1분간 처리한 다음, 카르복실렌(carboxylene)과 자일렌(xylene)에 1분씩 반응시킨 후 봉입하여 가상 현미경 (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japan)을 이용하여 촬영 및 각막 두께 분석을 수행하였다.

[0036] (3) 면역 조직화학 분석

[0037] 면역조직 분석을 위하여 조직을 6 μm 두께의 절편으로 절단한 후 3.5% 파라포름 알데히드로 고정하였다. 이후 0.1% 트리톤 X-100을 침투시킨 다음, 2% 소혈청 알부민(BSA; all from sigma)으로 불활성화시킨 후, 1차 항체로 항-macrophages, 항-CD31 (1:1000; all from Abcam Inc, Cambridge, MA)을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 상기 절편을 2차 항체(DAKO Corp, Glostrup, Denmark)로 20분 동안 반응시켰다. 이 때 면역 반응은 디아민벤지딘(DAB) 발색체로 가시화시켰고, 절편을 Mayer's hematoxylin (Sigma)으로 실온에서 30초 동안 대비염색시켰다. 상기 절편의 이미지를 가상 현미경(NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japan)으로 촬영하였다.

[0038] 3. 건성안 마우스 모델에서 실크 피브로인의 유효성 평가

[0039] (1) 실험동물 및 건성안 모델제작

[0040] NOD.B10.H2b 마우스를 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였다. 본 동물 실험은 눈과 시력 연구를 위한 동물 사용에 대하여 인체대학교 의과대학(No.; 2014-029)과 ARVO에 승인된 지침에 따라 수행되었다. 12 - 16 주령의 NOD.B10.H2b 마우스에게 건조 스트레스로 하루 18시간 동안 40-50%의 주위 습도와 팬을 이용한 통풍에 노출시켰으며, 피하에 0.5 mg/0.2 mL 무스카린 수용체 차단제를 주사하였다. 또한 10일 동안 오전 9시, 오후 12시, 오후 3시 및 오후 6시로 하루 4회, 브롬화수소산 스코폴라민(scopolamine hydrobromide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 마우스 양쪽 엉덩이에 번갈아 가며 주사하였다. 안구 건조 스트레스 10일 후 스코폴라민 주사를 중단하고, 일반 습도와 온도 환경으로 전환하고 건조 스트레스를 제거하였으며, 건조 스트레스 제거 후 Silk 처리 그룹은 Silk을 PBS에 용해(1mg/ml, 5mg/ml)하여 5 μL씩 하루에 5번 10일간 안구에 투여하였으며, 대조군인 PBS 처리 그룹은 PBS를 5 μL씩 하루에 5번 10일간 안구 투여하였다. 두 실험군은 각각 5마리씩 마우스의 양쪽 눈을 이용하여 상기 실험을 진행하였으며 모든 실험은 반복적으로 진행되었다. 상기 방법으로 처리된 마우스는 스트레스 제거 10일 후 안락사시켰으며 실험기간 동안 동물의 행동과 음식 및 물 섭취를 제한하지 않았다.

- [0041] (2) 눈물량의 측정
- [0042] 눈물 생성은 페놀 레드-침윤 면 스투드 (phenol red-impregnated cotton threads; Zone-Quick; Oasis, Glendora, CA)를 이용하여 보고된 방법 (Villareal AL, Farley W, Pflugfelder SC. Effect of topical ophthalmic epinastine and olopatadine on tear volume in mice. Eye Contact Lens. 2006;32(6):272-276)으로 측정하였다. 눈물량은 의료용 핀셋을 이용하여 스투드를 20초 동안 측면 안각에 위치시키고 눈물에 젖어 적색으로 변한 스투드를 현미경(SZX7; Olympus corp, Tokyo, Japan)으로 관찰하여 밀리미터로 표시하였다. 상기 측정된 밀리미터 내 누액을 20초 동안 마우스의 눈물량으로 예상되는 용량의 염기성 용액(0.9% 염분 1500 mL와 5 mL의 5 N NaOH)을 적신 면 스투드로 나타낸 표준곡선과 비교하였다.
- [0043] (3) 각막 표면의 매끄러움 평가
- [0044] Silk 처리 그룹과 대조군인 PBS 처리 그룹에서 각막 표면의 매끄러움을 평가하였다. 두 그룹의 동물을 안락사시킨 후 즉시 실체현미경(SZX7; Olympus)의 광섬유 링 조명으로부터 흰색 링의 반사이미지를 얻었다. 각막 매끄러움을 디지털 이미지의 흰색 링에 반사된 각막상피 세포의 불규칙성을 등급화하여 평가하였다. 각막 불규칙성 심각도 점수는 반사 링을 4등분으로 나누어 불규칙성 정도에 따라 5등급으로 계산하였다. 불규칙성 없음은 0등급, 1/4등분의 불규칙성을 1등급, 2/4등분의 불규칙성은 2등급, 3/4 등분의 불규칙성을 3등급, 모두 불규칙한 정도를 4등급; 심각한 정도를 5등급으로 하여 모든 링을 확인하였다.
- [0045] (4) 조직학적 분석
- [0046] PBS 처리 그룹과 Silk 처리 그룹의 안구와 부속기관을 외과적으로 적출하여 10% 포르말린으로 고정시키고 파라핀과 OCT 혼합물에 깊숙이 박았다. 상기 방법으로 처리된 6µm 조직 시료를 H&E 와 과요오드산 시프 시약(periodic acid-Schiff reagent; PAS)을 사용하여 염색하였다. 각 그룹의 동물 5마리의 안구를 상기 방법으로 염색하고 가상 현미경 (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japan)을 이용하여 촬영 및 분석을 수행하였다.
- [0047] (5) 면역 조직 분석
- [0048] 면역조직 분석을 위하여, 조직을 6µm 두께의 절편으로 잘랐다. 상기 절편을 3.5% 파라포름알데히드로 고정하여 0.1% 트리톤 X-100을 침투시키고, 2% 소혈청 알부민(BSA; all from sigma)으로 불활성화시킨 후, 1차 항체로 항-TNF-α, 항-MMP-2(1:1000; all from Abcam Inc, Cambridge, MA), 항-MMP-9(1:1000; Lifespan Biosciences Inc, Seattle, WA), 항-ICAM-1, 항-VCAM-1(1:1000; all from Bioss Inc, Woburn, MA)을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 상기 절편을 2차 항체(DAKO Corp, Glostrup, Denmark)로 20분 동안 반응시켰다. 이때 면역 반응은 디아민벤지딘(DAB) 발색제로 가시화시켰고, 절편을 Mayer's hematoxylin (Sigma)으로 실온에서 30초 동안 대비염색시켰다. 상기 절편의 이미지를 가상 현미경 (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japan)으로 촬영하였다.
- [0049] **4. 통계처리**
- [0050] 실험결과의 통계처리는 SPSS version 18 program (Chicago, IL)을 이용하여 분석하여 means±SD로 표시하였으며, 각 군 간의 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 검증한 다음 P<0.05 수준에서 Turkey test에 의해 사후 검증하였다.
- [0051] **<실시에 1> 각막상피 손상 토끼 모델에 대한 실크 피브로인의 조직 개선 효과**
- [0052] 1. 각막상피 손상 토끼 모델에 대한 실크 피브로인 렌즈 이식 유효성 평가
- [0053] 각막상피 손상 토끼 모델을 대상으로 실크 피브로인 렌즈 이식에 따른 신생혈관 및 염증 반응 억제에 대한 유효성을 확인하였다(도 1). 각막 손상 안구에서 상피세포 손실, 기질층 부종 및 섬유성 염증세포 과증식이 관찰되었으며, 실크 렌즈 이식군은 이식 7일 후 각막 손상 안구에 비해 유의적인 개선을 보였다.
- [0054] 2. 각막상피 손상 토끼 모델에 대한 실크 피브로인의 필름의 이식 유효성 평가
- [0055] 각막상피 손상 토끼 모델을 대상으로 표면의 무너를 달리한 실크 피브로인 필름을 이식하여 무너에 따른 개선 정도의 차이점을 확인하였다(도 2). 각막 손상 안구에서 각막 신생혈관 증가, 상피세포 손실, 기질층 부종 및 섬유성 염증세포의 과증식이 확인되었다. 실크 피브로인 필름 이식 안구 중에서 일자무너 필름이 이식된 안구에서 가장 우수한 개선 효과를 나타내었다.
- [0056] 3. 각막상피 손상 토끼 모델에 대한 실크 피브로인의 파우더의 점안 유효성 평가

[0057] 각막상피 손상 토끼 모델을 대상으로 실크 피브로인 파우더를 점안하여 신생혈관 및 조직변화 억제에 대한 차이 점과 유효 효능을 확인하였다(도 3). 각막상피 손상 토끼 모델을 대상으로 7일간 1~10% 실크 피브로인을 점안한 결과, 각막손상 안구에서 증가된 각막 신생혈관, 상피세포의 손실, 기질층의 부종 및 섬유성 염증세포의 과증식이 개선되었다. 특히 5% 실크 피브로인 점안은 각막조직 내 염증성 대식세포의 발현과 혈관생성자인 CD31이 정상안구 수준으로 감소되어 각막 손상성 안구표면질환 치료에 탁월한 효능을 나타내었다.

[0058] <실시예 2> 건성안 마우스 모델에 대한 실크 피브로인 파우더의 조직 개선 효과

[0059] 1. 눈물량 생성에 미치는 실크 피브로인의 영향

[0060] 건조 스트레스는 NOD.B10.H2b 마우스의 눈물량을 정상군(Control group, $0.16 \pm 0.01 \mu\text{L}$)과 비교하여 75% 가량 감소시켰다(도 4, DS 10D group, $0.04 \pm 0.02 \mu\text{L}$). 건조 스트레스를 제거한 후 실크 피브로인 파우더의 처치는 대조군인 PBS 군과 비교하여 약 30% 눈물량을 증가시켰다(10D group, $0.12 \pm 0.04 \mu\text{L}$). 실크 피브로인 점안 시 점안 농도에 관계없이 건성안에서 유발되는 눈물량 감소를 유의적인 수준으로 치료하여 정상 안구에서 분비되는 눈물량 수준으로의 회복을 유도하였다.

[0061] 2. 각막 표면의 굴곡성에 미치는 실크 피브로인의 영향

[0062] 건성안 마우스 각막의 굴곡 정도를 수치화한 결과, 10일간 건조 스트레스에 노출된 마우스의 각막표면의 굴곡 정도는 정상 각막과 비교하여 약 15배 증가하였다(DS 10D group, 3.75 ± 0.5). 음성대조군인 PBS 처리군은 3, 5, 7 및 10일째 각막 표면의 굴곡성에 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, 실크 피브로인 처리군은 처리 농도에 관계없이 모두 굴곡성이 개선되었다(도 5B). 특히 5mg/ml 처리군은 굴곡성 개선 효과가 더욱 크게 나타났다(10D group, 1.75 ± 0.5).

[0063] 3. 각막 상피세포의 박리에 미치는 실크 피브로인의 영향

[0064] NOD.B10.H2b 마우스의 각막을 H&E 염색한 결과, 도 6에서 보듯 건조 스트레스에 의해 각막의 상피 세포 박리가 약 16배 증가하였다(DS 10D group, $1.52 \pm 0.16/0.1\text{mm}^2$). 이러한 변화는 PBS 처치(PBS group, $1.04 \pm 0.43/0.1\text{mm}^2$)에 의해서는 개선되지 않은데 반해, 실크 피브로인 처치에 의한 각막 상피세포 박리 정도(All silk group, $0.09 \pm 0.16/0.1 \text{mm}^2$, $p < 0.05$)는 정상 각막과 동일한 수준까지 회복되었다.

[0065]

[0066] 4. 결막 배상세포 분포에 미치는 실크 피브로인의 영향

[0067] 건성안 마우스 모델을 대상으로 실크 피브로인 점안에 따른 결막 배상세포의 분포를 관찰하였다(도 7). 건조 스트레스는 정상 결막과 비교하여 약 57% (DS 10D group, $6.85 \pm 1.03/0.1\text{mm}^2$)의 배상세포를 감소시켰다. PBS 처치군에서는 결막 배상세포 분포에 있어 유의한 수준의 개선 효과가 관찰되지 않았다. 그러나 실크 피브로인 처치 군에서는 건조스트레스에 의해 감소된 결막 배상세포가 현저히 증가하여 각각 1.4배 (Silk 1mg/ml group, $11.71 \pm 1.03/0.1\text{mm}^2$)와 1.7배 (Silk 5mg/ml group, $14.10 \pm 1.15/0.1\text{mm}^2$) 증가된 결과를 나타내었다.

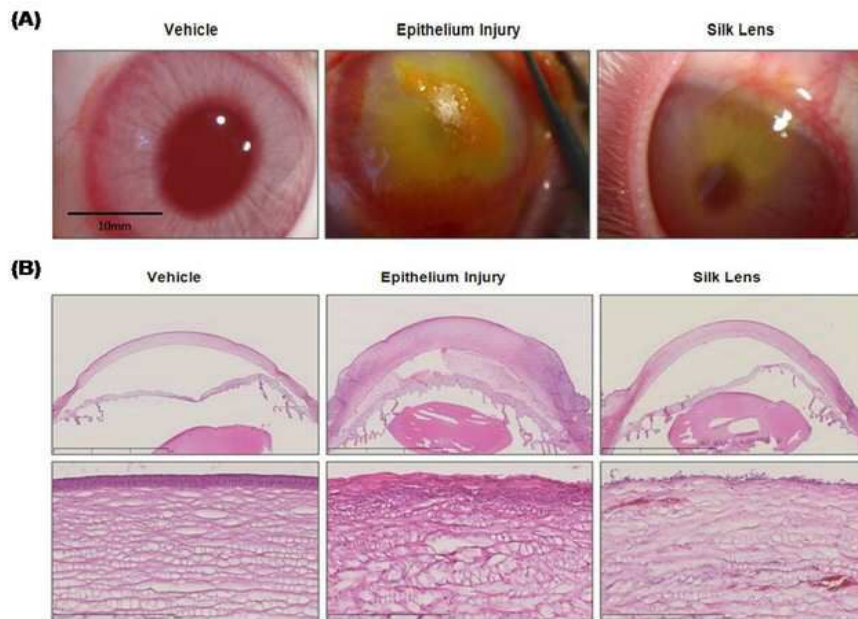
[0068] 5. 실크 피브로인의 항염증 효과

[0069] 건성안 마우스 모델을 대상으로 염증반응 마커들의 발현에 있어 실크 피브로인의 효과를 평가하기 위해 결막에서 TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, MMP-2와 MMP-9의 면역 염색을 실시하였다. 그 결과 도 8에서 보듯, 면역 염색 결과 건조스트레스는 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 부착 분자인 ICAM-1, VCAM-1의 결막 조직 내 발현을 현저히 증가시켰다. 또한 건조 스트레스에 의해 결막 내 MMP-2와 MMP-9이 두드러지게 증가하였다. 그러나 실크 피브로인 파우더 처치 군은 상기 염증관련 마커들의 결막 내 발현이 약화되었으며, 특히 silk 5mg/ml 군에서는 현저히 감소한 결과를 나타내었다.

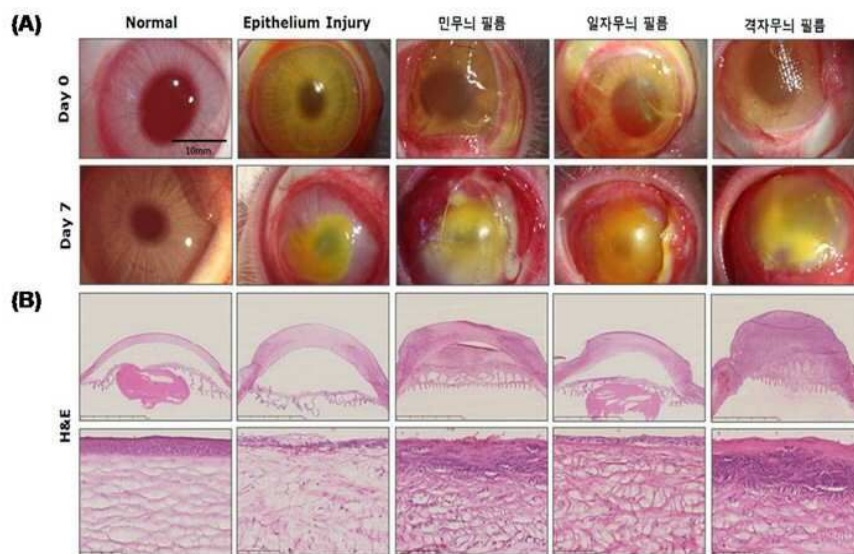
[0070] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

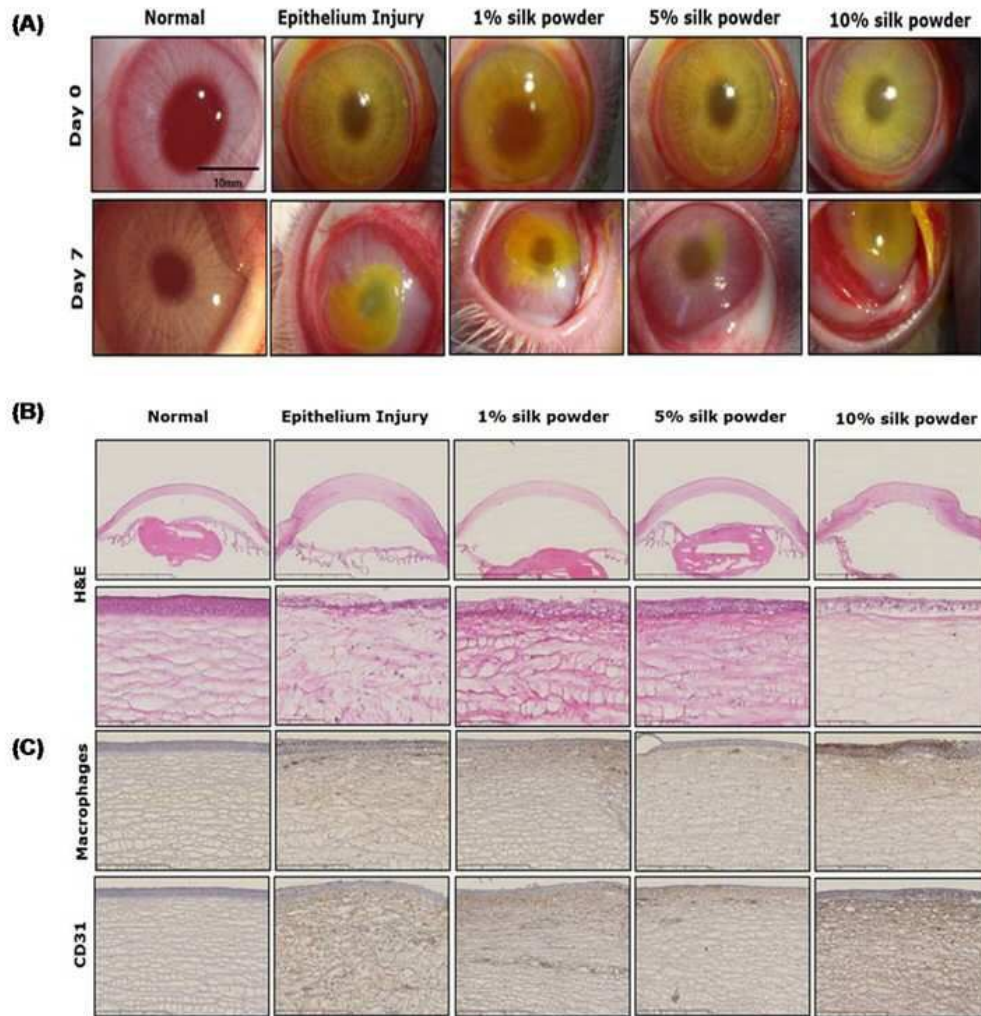
도면1



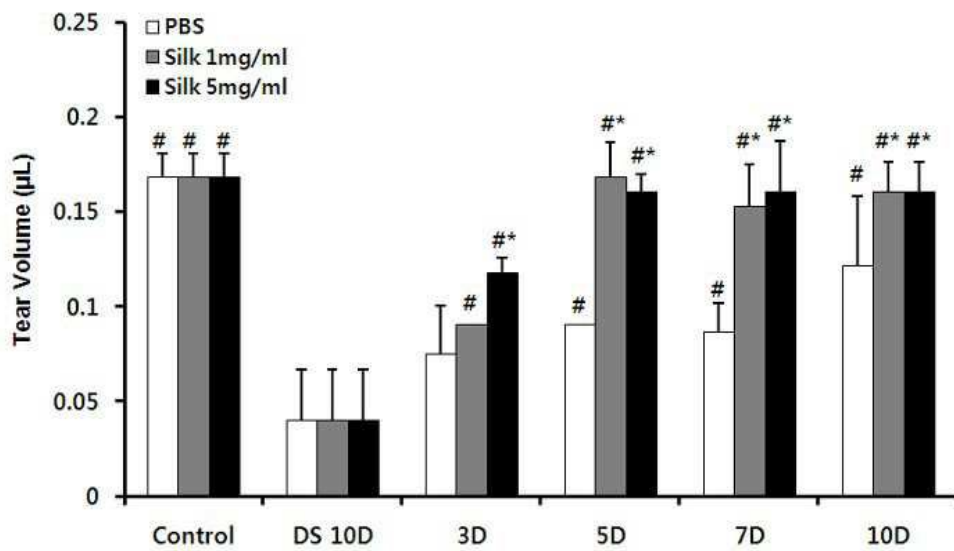
도면2



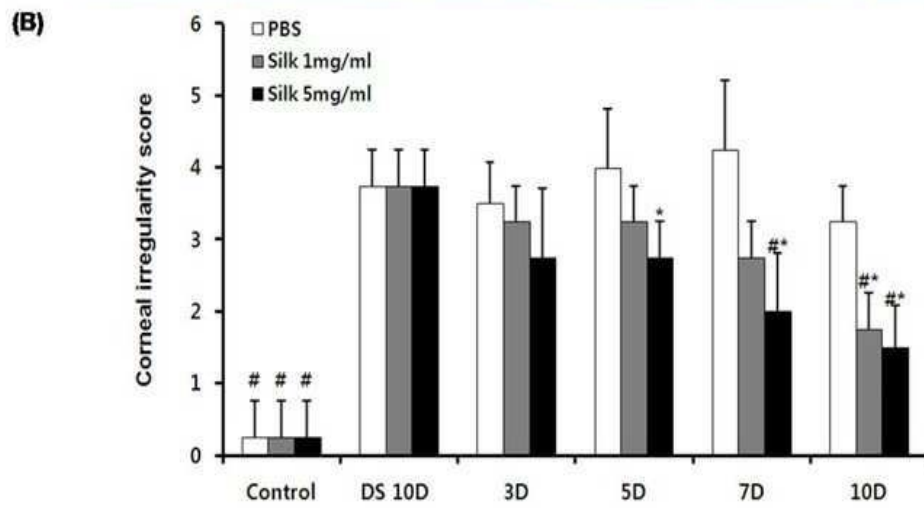
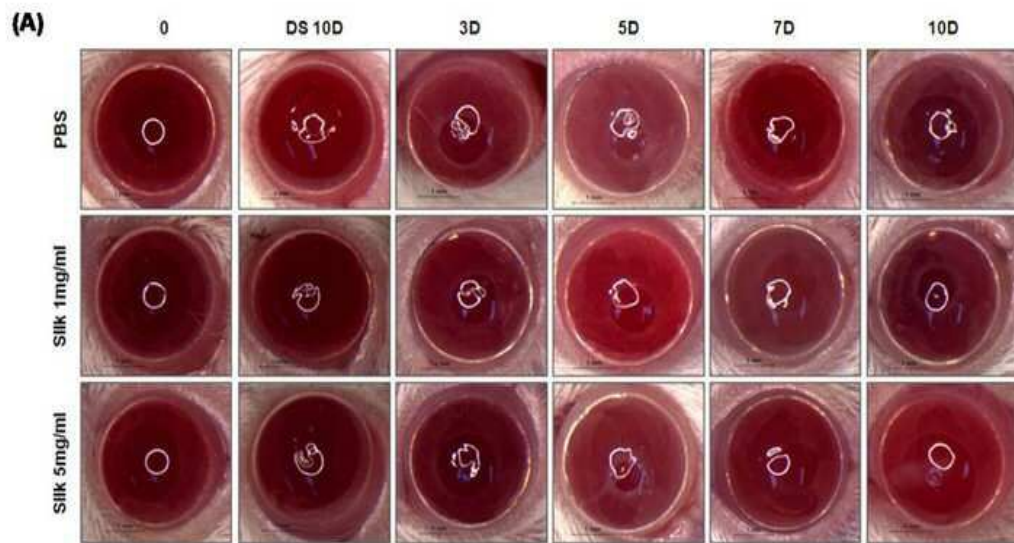
도면3



도면4

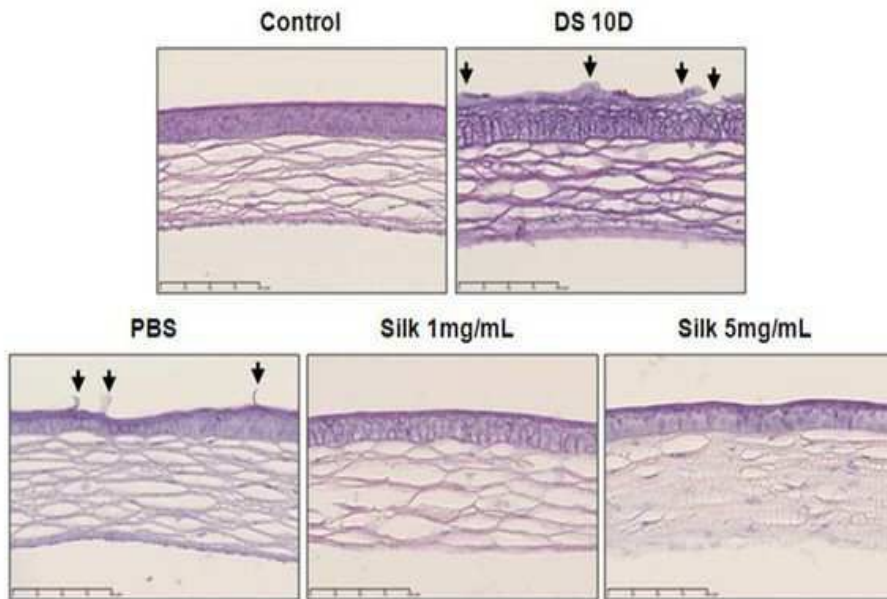


도면5

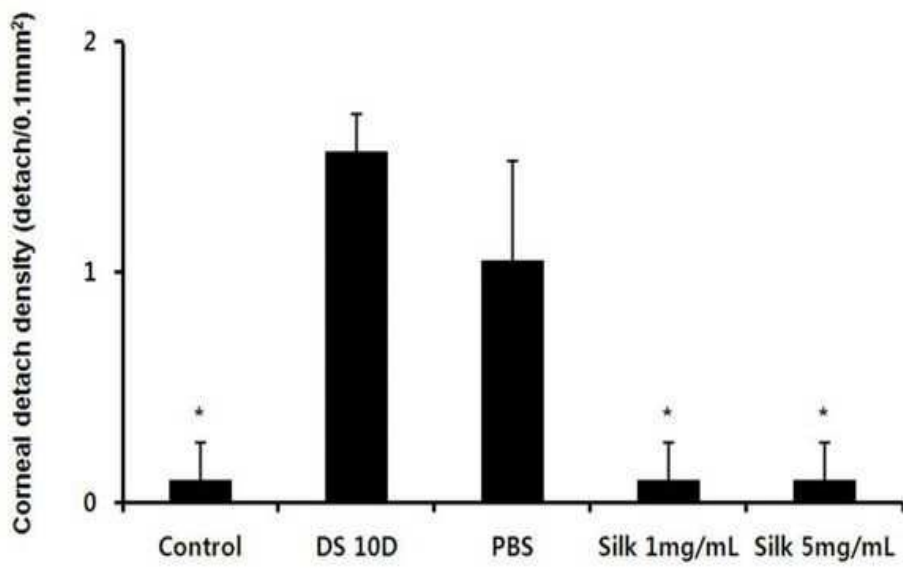


도면6

(A)

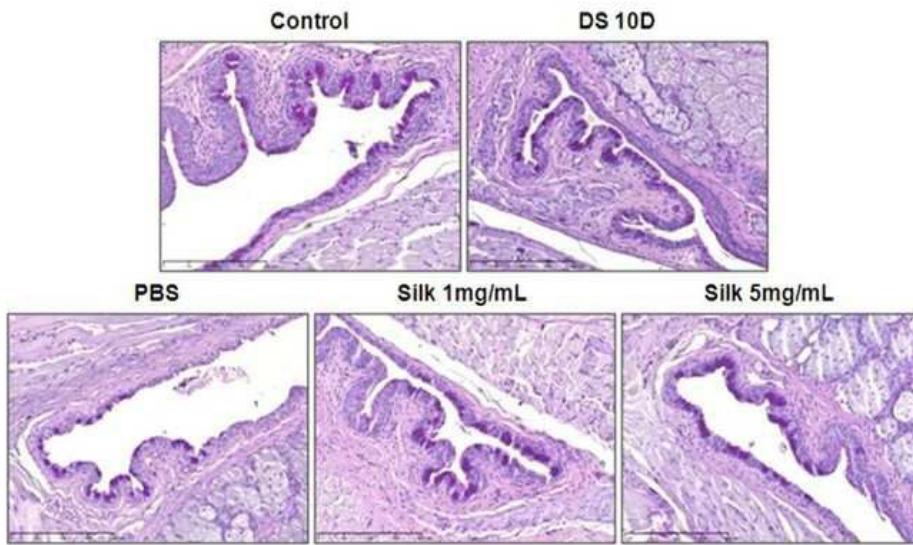


(B)

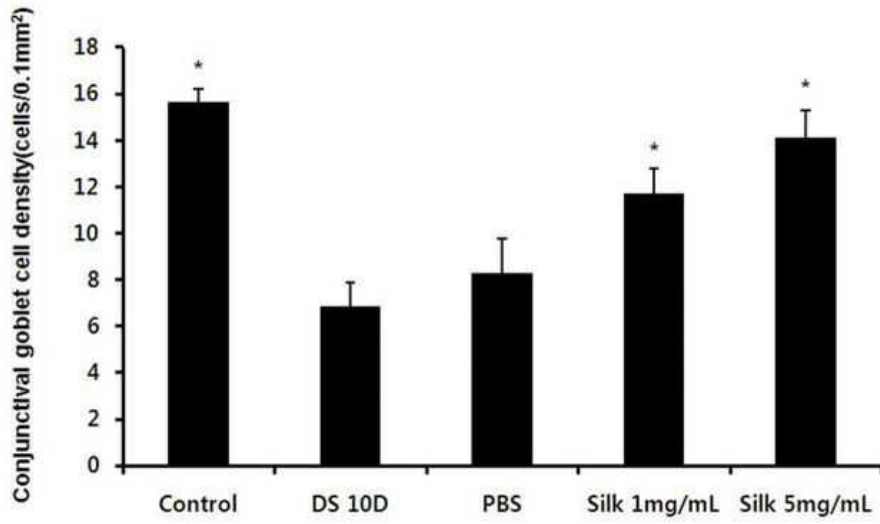


도면7

(A)



(B)



도면8

