



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0025566

(43) 공개일자 2015년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/435 (2006.01) A61K 31/4409 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0103190

(22) 출원일자 2013년08월29일

심사청구일자 2013년08월29일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

신영주

서울특별시 강남구 도산대로78길 51, 201동 801호

(74) 대리인

특허법인태동

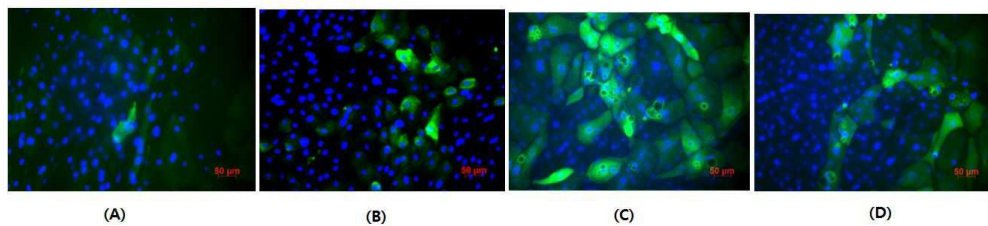
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 ROCK 저해제 Y-27632를 포함하는 안구건조증 예방 및 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 ROCK(Rho-associated coiled-coil kinase, Rho kinase) 저해제 Y-27632를 포함하는 안구건조증 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 안구 점액의 조절, 안구건조증의 치유 등에 효과적으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A2040118

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 2012년도 일반연구자지원사업 하반기

연구과제명 각막내피줄기세포의 배양과 분화 및 이식 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

ROCK(Rho-associated coiled-coil kinase) 저해제 Y-27632를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 안구 건조증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은,

EGF를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 안구건조증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 ROCK(Rho-associated coiled-coil kinase, Rho kinase) 저해제 Y-27632를 포함하는 안구건조증 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

안구건조증은 눈물이 부족하거나, 눈물이 지나치게 많이 증발하거나, 눈물 구성성분의 균형이 틀어져, 안구 표면이 손상되고, 눈이 시리고, 자극감, 이물감, 건조감과 같은 자극증상을 느끼게 되는 안구 질환을 의미한다. 안구건조증은 다양한 원인으로 일어날 수 있는데, 무신 분비의 장애도 그 중 한 원인이다.

[0003]

무신은 건강하고 젖은 안구 표면의 유지와 보수를 위해 필수적이다. 무신은 단백질 골격 및 고분자량 탄수화물을 포함하는 고분자 당 단백질이다. 무신의 다른 중요한 역할은 소수성 각막 상피와 친수성 눈물 사이의 공간을 제공함으로써 각막의 습윤성을 향상시킬 수 있는 것이다. 이렇게 하면 눈물 막을 안정화하고 표면장력을 감소시켜 수분층이 눈의 표면 전체에 걸쳐 퍼질 수 있게 된다. 눈 표면에서 발견되는 무신은 주로 술잔세포, 결막, 각막과 눈물샘의 선단세포로부터 생성된다 (Diebold Y, Rios JD, Hodges RR, Rawe I, Dartt DA. Presence of nerves and their receptors in mouse and human conjunctival goblet cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42:10:2270-2282).

[0004]

한편, 각막윤부 줄기세포는 건강한 안구 표면의 유지 보수, 분화된 세포의 공급을 위해 필수적이다. 각막윤부의 손상은 필수 세포 공급의 중단을 초래하여 혈관 신생을 허용한다. 최근 각막윤부 줄기세포는 다능성으로 각막 상피세포와 술잔세포로 분화하는 것으로 보고되어 있다(Li W, Sun X, Wang Z, Li R, Li L. The effect of nerve growth factor on differentiation of corneal limbal epithelial cells to conjunctival goblet cells in vitro. Mol Vis. 2010;16:2739-2744; Pajoohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Stepp MA. Corneal goblet cells and their niche: implications for corneal stem cell deficiency. Stem Cells. 2012;30:2032-2043)

[0005]

술잔세포(goblet cell)는 주로 안구 표면의 유일한 겔-형성 무신(gel-forming mucin)인 MUC5AC을 생성한다 (Gipson IK, Argueso P. Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. Int Rev Cytol. 2003;231:1-49). 술잔세포의 손실 또는 편평 상피 화생은 안구 표면 질환에서 보고되고 있다 (Argueso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjogren syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:1004-1011). 술잔세포의 손실은 눈 표면손상을 악화시킨다. 안구 표면 질환을 치료하기 위해 이러한 악순환을 중단시킬 필요가 있다.

[0006] 한편, Rho-연관 단백질 키나아제(Rho-associated protein kinase)인 ROCK은 세린/트레오닌 키나아제 (serinethreonine kinases)의 AGC(PKA/PKG/PKC) 패밀리에 속하는 키나아제이다. ROCKs(ROCK1 및 ROCK2)은 인간 을 비롯한 포유류(rat, mouse 등), 개구리(Xenopus), 제브라피쉬(zebrafish), 무척추동물(C. elegans, Mosquito, Drosophila) 및 닭(chicken)에서 나타나는데, 인간 ROCK1은 158kDa 분자량을 가진 작은 GTPase RhoA 의 주요 다운스트림 이펙터(effector)이다. Rho GTPase는 세포의 성장과 분화를 조절하는 신호 전달에 있어 중요한 역할을 하는 작은 G-단백질(protein)이다.

[0007] 포유류의 ROCK은 키나아제 도메인, 코일드-코일 지역(coiled-coil region) 및 플렉스트린 호몰로지 도메인(Pleckstrin homology domain)으로 구성되며, RhoA-GTP가 부재할 경우 자동억제 분자 내의 접힘 (autoinhibitory intramolecular fold)으로 인해 ROCKs의 키나아제 활성(kinase activity)이 감소된다. Rho 키 나아제는 미오신 포스파타아제를 직접적으로 인산화시키며 그의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다(Kimura, K, et al., Science, 273, 245-248, 1996). Rho는 단백질 키나아제 뿐만 아니라 지질 키나아제의 활성화에 관여하 는 것으로 보고되었으며(Zang, J. et al., J. Biol. Chem., 268, 22251-22254, 1993), Rho에 의해 활성화되는 인지질 (PLD)의 존재가 제시되었다(Siddiqi, A. R. et al., J. Biol. Chem., 268, 24535-24538, 1995).

[0008] ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)는 세포사멸(apoptosis)을 억제하는 기능을 하는 물질 로서, 신경돌기의 재생, 미오신 인산화 및 평활근 수축에 있어 작용-유도성 Ca^{2+} 증감(agonist-induced Ca^{2+} sensitization) 억제 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

[0009] 대표적인 ROCK 저해제인 Fasudil은 1995년도부터 일본에서 뇌혈관 치료에 사용되고 있으며, 현재 미국 에서는 Fasudil에 대해 레이노 현상(Raynaud's phenomenon) 치료와 혈관 손상(atherosclerosis-phaseIII와 hypercholesterolemia-phaseII) 효과에 대한 임상연구가 진행 중에 있다.

[0010] 또한, ROCK 저해제는 협심증(angina), 관상동맥 연축(coronary vasospasm), 고혈압(hypertension), 폐 동맥 고혈압(pulmonary hypertension), 심장 마비(heart failure), 뇌 허혈(cerebral ischemia) 등 다양한 심 혈관계 질환들의 임상시험에서 안정성을 가지며 효과적인 치료제임이 보고되고 있어, 현재 ROCK(Rho kinase) 저 해제 개발 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다.

[0011] 하지만, 안구와 관련하여 결막 술잔세포의 뮤신 분비 대한 ROCK(Rho-associated coiled kinase) 저해 제의 효과는 현재까지 충분히 밝혀지지 않고 있다. 다만, 안구와 관련하여, ROCK 저해제는 각막 상피의 이동과 증식을 매개하는 것으로 보고되고 있을 뿐이다(Nakamura M, Nagano T, Chikama T, Nishida T. Role of the small GTP-binding protein rho in epithelial cell migration in the rabbit cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 ;42:941-947; Yin J, Yu FS. Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 ;295:C378-C387).

[0012]

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 10-2012-0115977 (공개일자 2012. 10. 19)에는, "하나 또는 그 초과 부분불소화된 알칸을 포함하는 액체 비히클을 포함하는 건성각결막염의 치료를 위한 신규한 약학 조성물"이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 또한, 대한민국 특허공개번호 10-2012-0097975(공개일자 2012년 09월 05일)에는, "ROCK 저해제 스크리닝 방법"이 기재되어 있다.

(특허문헌 0003)

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) 한편, ROCK 저해제 Y-27632와 관련하여, Neurotoxicity research Volume 23, Number 3 238-248 1029-8428에서, Byeong Tak Jeon 등은, "The Rho-Kinase (ROCK) Inhibitor Y-27632 Protects Against Excitotoxicity-Induced Neuronal Death In Vivo and In Vitro"에 대해 발표한 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명에서는 각막윤부 줄기세포에서 술잔세포를 분화시키고, 각막윤부 줄기세포로부터 분화된 술잔세포의 뮤신 분비에 대한 ROCK(Rho-associated coiled kinase) 저해제 Y-27632의 효능에 대해 확인하고, 이를 바탕으로 안구건조증 예방 및 치료용 억제학적 조성물로 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 ROCK(Rho-associated coiled-coil kinase) 저해제 Y-27632를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 안구건조증 예방 및 치료용 억제학적 조성물을 제공한다. 이때, 상기 억제학적 조성물은 일 예로, EGF를 추가로 포함할 수 있다.
- [0017] 안구 표면은 각막 상피세포, 결막 상피세포 및 술잔세포를 포함한 세포에 의해 덮여있다. 각막윤부 줄기세포는 다능성이며, 각막 상피세포와 술잔세포로 분화하는 것으로 보고되어 있다.
- [0018] 본 발명에서는 각막윤부 줄기세포가 CK-7로 염색되는 술잔세포로 분화되는 것을 확인했는데, 웨스턴 블랏을 통해 CK-7 발현이 ROCK 저해제 Y-27632 및 EGF/ROCK 저해제 Y-27632의 조합으로 처리한 세포에서 더 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명에서는 ROCK 저해제 Y-27632 처리가 각막윤부 줄기세포의 술잔세포로의 분화를 증가시키는 것으로 확인한 것이다. ROCK 저해제 Y-27632는 배아 줄기세포나 신경 줄기세포에서의 분화를 촉진하는 것으로 보고되어 있지만, ROCK 저해제 Y-27632가 각막윤부 줄기세포의 술잔세포로의 분화를 강화하는 것을 확인한 것은 본 발명에서 처음으로 확인한 사실이다.
- [0019] 한편, MUC5AC는 술잔세포에 의해 분비되는 겔 형성 뮤신이며, 안구 표면 점액질의 주성분이다. 면역 형광법에 의해 염색 여부를 확인한 결과, MUC5AC 발현은 EGF, ROCK 저해제 Y-27632 및 EGF/ROCK 저해제 Y-27632의 조합을 가진 세포에서 우세했다. ELISA에 의한 세포 내 MUC5AC 수치는 EGF, ROCK 저해제 Y-27632, 그리고 EGF/ROCK 저해제 Y-27632 조합으로 처리한 군에서 대조군에 비해 높았다. 반면에 배지로 분비된 MUC5AC는 ROCK 저해제 Y-27632와 EGF/ROCK 저해제 Y-27632의 조합으로 처리한 군에서 더 높았다.
- [0020] 본 발명의 유효성분인 ROCK(Rho-associated coiled-coil kinase) 저해제 Y-27632는 당업계에서 Y-27632로 통칭되고 있으며(Liu Y, Goldberg AJ, Dennis JE, Gronowicz GA, Kuhn LT. One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. PLoS One. 2012;7(3):e33225), 일 예로 Sigma-Aldrich사로부터 구입가능하다. 또한, EGF는 'Epidermal Growth Factor'로서, 일 예로 Sigma-Aldrich사로부터 구입가능하다.
- [0021] ROCK 저해제 Y-27632는 본 발명의 전체 억제학적 조성물 중 0.00001 nM 내지 1000 mM의 유효량으로 첨가될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 "ROCK 저해제 Y-27632를 유효성분으로 포함하는"의 의미는, 본 발명의 억제학적 효과가 ROCK 저해제 Y-27632로부터 유래함을 의미하는 것이고, ROCK 저해제 Y-27632 외에 억제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 본 발명에서와 같은 효능을 보이는 다른 성분을 보조제로 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0023] 본 발명의 억제학적 조성물에 포함되는 억제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 수크로오스, 텍스트로오스, 만니톨, 전분, 솔비톨, 물 등을 포함하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 억제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 부형제로, 현탁제, 습윤제, 윤활제, 감미제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 억제학적 조성물은 안구에 직접 투여할 수 있으나, 그 외에 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 비경구 투여는 정맥 내 주입, 피하 주입, 경피 투여, 근육 주입 등을 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 조성물의 제형은 사용 방법에 따라 달라질 수 있으나, 경고제(Plasters), 산제(Powders), 액제(solutions), 유동엑스제(FluidextractsI), 유제(Emulsions), 현탁제(Suspensions), 정제(Tablets), 주사제(Injectons), 캡셀제(Capsules) 및 환제(Pills) 등으로 제조할 수 있다. 적합한 제형은 선택된 투여 경로에 따

라 결정될 수 있으며, 안구에 직접투여하는 경우 액제(solutions), 유동엑스제(FluidextractsI), 유제(Emulsions), 현탁제(Suspensions) 등으로 제조되는 것이 좋다.

[0026]

또한, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서의 흡수도, 불활성을 및 함께 사용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, 유효성분인 ROCK 저해제 Y-27632를 1일 기준으로 0.0001 ng/kg(체중) 내지 10 g/kg(체중)이 되게 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0027]

본 발명의 ROCK 저해제 Y-27632를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 안구건조증 예방 및 치료용약제학적 조성물을 사용할 경우, 안구 점액의 조절, 안구건조증의 치유 등에 효과적으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 다양한 배지에 배양된 각막윤부 줄기세포가 술잔세포로 분화된 것을 보여주는 것으로, 술잔세포의 특이한 케라틴(keratin)으로 알려진 CK-7로 염색되는 결과를 보여준다. 도 1에서 (A)는 DMEM/F12 + B27 + 페니실린 및 스트렙토마이신 (컨트롤 배지), (B)는 DMEM/F12 + B27 + EGF + 페니실린 및 스트렙토마이신 (EGF 배지), (C)는 DMEM/F12 + B27 + ROCK 저해제 (10 μ M, Y27632, Sigma-Aldrich 사) + 페니실린 및 스트렙토마이신 (ROCK 저해제 배지), (D)는 DMEM/F12 + B27 + EGF + ROCK 저해제 + 페니실린 및 스트렙토마이신 (EGF와 ROCK 저해제의 혼합 배지) 이다.

도 2는 다양한 배지에서 배양된 각막윤부 줄기세포가 술잔세포로 분화되어, 술잔세포의 특이한 케라틴(keratin)으로 알려진 CK-7를 발현하는 것을 정량적으로 보여주는 웨스턴 블랏(Western blot) 사진이다. 도 2에서, 'B27'는 DMEM/F12 + B27 + 페니실린 및 스트렙토마이신 (컨트롤 배지), 'EGF'는 DMEM/F12 + B27 + EGF + 페니실린 및 스트렙토마이신 (EGF 배지), 'RI'는 DMEM/F12 + B27 + ROCK 저해제 (10 μ M, Y27632, Sigma-Aldrich 사) + 페니실린 및 스트렙토마이신 (ROCK 저해제 배지), 'EGF and RI'는 DMEM/F12 + B27 + EGF + ROCK 저해제 + 페니실린 및 스트렙토마이신 (EGF와 ROCK 저해제의 혼합 배지) 이다.

도 3은 다양한 배지에서 배양된 각막윤부 줄기세포에서 MUC5AC의 면역형광염색 결과를 보여준다. 도 3에서, (A)는 DMEM/F12 + B27 + 페니실린 및 스트렙토마이신 (컨트롤 배지), (B)는 DMEM/F12 + B27 + EGF + 페니실린 및 스트렙토마이신 (EGF 배지), (C)는 DMEM/F12 + B27 + ROCK 저해제 (10 μ M, Y27632, Sigma-Aldrich 사) + 페니실린 및 스트렙토마이신 (ROCK 저해제 배지), (D)는 DMEM/F12 + B27 + EGF + ROCK 저해제 + 페니실린 및 스트렙토마이신 (EGF와 ROCK 저해제의 혼합 배지) 이다.

도 4는 다양한 배지에서 배양된 각막윤부의 세포질 내 또는 배양 배지 내 MUC5AC 생산 수치를 ELISA법에 의해 측정된 결과를 보여준다. 도 4에서, (A)는 세포질 내 수치, (B)는 배양 배지 내 수치를 나타낸다. 또한, 도 4에서, 'control'은 'DMEM/F12 + B27 + 페니실린 및 스트렙토마이신' 배지, 'EGF'는 'DMEM/F12 + B27 + EGF + 페니실린 및 스트렙토마이신' 배지, 'RI'는 'DMEM/F12 + B27 + ROCK 저해제 (10 μ M, Y27632, Sigma-Aldrich 사) + 페니실린 및 스트렙토마이신' 배지, 'EGF+RI'는 'DMEM/F12 + B27 + EGF + ROCK 저해제 + 페니실린 및 스트렙토마이신' 배지를 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

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.

[0030]

[실시예 1: 각막윤부 줄기세포의 술잔세포로의 분화 확인]

[0031]

본 실험은 헬싱키 선언의 원칙에 따라 이루어졌으며 한림 대학교 의료원의 윤리위원회에 의해 검토되고 승인되었다. 각막윤부 줄기세포는 각막이식 후 폐기되는 사람 각막-공막 링에서 얻었다. 배양을 위해 처리될 때까지 조직들은 Optisol™ -GS (Bausch and Lomb Inc., Rochester, NY)에 4 $^{\circ}$ C로 저장되어있었다.

[0032] 각막윤부 줄기세포는 기존의 논문에서 발표된 방법에 따라 배양하였다. 각막 이식 후 기증자의 잔류 조직에서 얻은 각막윤부 줄기세포를 기증자 사망 후 7일 이전에 얻었다. 기증자로부터 얻은 각막윤부 조직은 직경 약 2-3 mm의 작은 조각으로 분리하였다. 이렇게 얻은 조직은 dispase II (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) 안에서 37 ℃로 1시간 동안 배양하였고, 37 ℃에서 5 분 동안 0.25 % 트립신 / EDTA 용액으로 처리하고, 피펫팅에 의해 싱글 세포로 분리하였다. 기초 배지로 세척한 후, 완전히 탈 응집된 하나의 세포는 코팅되지 않은 접시에(24 웰 또는 96 웰프레이트) B27와 20 ng/ml의 EGF를 함유하는 혈청 및 'feeder cell free' 배지에서 500 cells/cm² 밀도로 1 주간 배양하였다. 이후, 세포는 1 주간 하기의 (1) 내지 (4)의 다양한 배지에서 배양되었다.

[0033] (1) DMEM/F12(Invitrogen 사에서 판매하는 상품명) + B27 (1:50 농도로 첨가, Invitrogen 사에서 판매하는 상품명, Serum-Free Supplement) + 페니실린 및 스트렙토마이신 (각각 1:100 농도로 첨가) (컨트롤 배지),

[0034] (2) DMEM/F12 + B27 (1:50 농도로 첨가) + EGF (20 ug/ml) + 페니실린 및 스트렙토마이신(각각 1:100 농도로 첨가) (EGF 배지),

[0035] (3) DMEM/F12 + B27 (1:50 농도로 첨가) + ROCK 저해제 (10 μM, Y27632, Sigma-Aldrich 사) + 페니실린 및 스트렙토마이신 (각각 1:100 농도로 첨가) (ROCK 저해제 배지)

[0036] (4) DMEM/F12 + B27 (1:50 농도로 첨가) + EGF (20 ug/ml) + ROCK 저해제 (10 μM, Y27632, Sigma-Aldrich 사) + 페니실린 및 스트렙토마이신(각각 1:100 농도로 첨가) (EGF와 ROCK 저해제의 혼합 배지).

[0037] 실험결과, 배양된 세포는 술잔세포의 특이한 케라틴(keratin)으로 알려진 CK-7(Cytokeratin-7)에 의해 염색되었다 (도 1). CK-7 양성 세포는 세포군집 주위에서 주로 발견되었다. CK-7 양성 세포의 수는 ROCK 저해제 (도 1의 C)와 EGF/ROCK 저해제와의 조합 (도 1의 D)을 처리한 군에서 증가하였다. 또한, ROCK 저해제와 EGF/ROCK 저해제와의 조합을 처리한 CK-7양성 세포에서(도 1의 C, 또 1의 D) 세포질 과립이 보였다.

[0038] 한편, 웨스턴 블랏(Western blot)을 통해, 술잔세포의 표지자인 CK-7의 발현여부를 확인하고자 하였다. 세포는 다양한 배양 조건에서 증식시키고 배양 배지를 제거한 후 프로테아제 저해제 콕테일(protease inhibitor cocktail; p8340, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) 및 포스파타아제 저해제 콕테일 테블렛(phosphatase inhibitor cocktail tablet; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 포함하는 RIPA 완충액 (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA (pH 8.0))에서 추출하였다. 상층액을 30 분간 13,000×g에서 원심 분리한 후, CK-7 및 GAPDH 수준을 측정하기 위해 사용한 후 -70 ℃에서 동결하였다. 20 또는 30 μg의 단백질을 포함하는 세포추출물들은 SDS-PAGE에 사용하였다. 단백질 밴드는 전기영동으로 SDS-PAGE에 의해 멤브레인 (Immobilon-P; Millipore Corp., Bedford, MA)으로 이동했다. TBS의 3 % 젤라틴에서 1 시간 동안 배양한 후에 4 ℃ mouse anti-human CK-7 antibody(Abcam, Cambridge, MA) 및 rabbit anti-human GAPDH antibody (Abfrontier, Seoul)에 밤새 담근 후, 2차 항체가 결합된 알카라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)로 2 시간 동안 처리하였다. 면역반응밴드는 제조자의 프로토콜에 따라 WesternBreeze Chromogenic immunodetection kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 검출하였다. 데이터는 비디오 이미지 분석 시스템으로 정량하였다.

[0039] 실험결과, 도 2에서 보는 바와 같이, 술잔세포의 표지자인 CK-7의 발현이 ROCK 억제제(RI) 또는 EGF/ROCK억제제를 조합한 군(EGF and RI)에서 높음을 알 수 있었다.

[0040] [실시예 2: 면역조직화학검사를 통한 MUC5AC의 생성 확인]

[0041] 본 실시예에서는 면역조직화학검사를 통한 안구 표면의 유일한 젤-형성 뮤신(gel-forming mucin)인 MUC5AC의 생성 여부를 확인하고자 하였다.

[0042] 12-웰 플레이트의 커버글라스에서 배양된 각막윤부 줄기세포를 PBS로 세척하고 3.7 %의 포르말데히드 용액에 20분간 고정했다. 세포는 0.5 % 트리톤 X-100으로 10 분간 투명하게 처리하고, 실온에서 1 % 보바인 시럼 알부민(bovine serum albumin)에서 1 시간 차단했다. 세척 후, 세포를 PBS로 세척 한 다음 4 ℃에서 토끼의 폴리클로날 항체인 ABCG2, CK-7 및 MUC5AC 와 함께 배양했다. 세포들은 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG

antibody(1:100)에 37 °C, 1시간 동안 배양되었고, 그 후 Hoechst nuclear staining dye(1:2000; Molecular Probes)로 제조사의 지시에 따라 대조 염색하였다. 그 후, PBS로 광범위하게 세척하고, 슬라이드는 광퇴색을 줄이기 위해 마운팅(mounting) 배지에 장착되었다. 음성대조염색은 1차 항체 없이 수행되었다.

[0043]

MUC5AC의 면역형광염색은 도 3에 나타났다. 대조군은 약한 녹색 형광을 보였다(도 3의 A). 하지만, EGF(도 3의 B), ROCK 저해제(도 3의 C), EGF와 ROCK 저해제(도 3의 D)로 처리한 세포에서는 MUC5AC이 강하게 염색(녹색)되었다. 핵은 파란색으로 염색되었다.

[0044]

[실시예 3: ELISA를 통한 MUC5AC의 생성량 확인]

[0045]

본 실시예에서는 ELISA를 통해 MUC5AC 생성을 정량적으로 확인하고자 하였다. 샘플은 세포 파쇄액(cell homogenate)과 배양 배지로부터 얻었다. 배지를 제거한 후, 세포를 프로테아제 억제제 카테일(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO)을 포함하는 NP-40으로 처리했다. 상층액은 10 분간 2000 rpm에서 원심 분리한 후 회수하여 MUC5AC 수준 측정을 위해 사용하기 전까지 -70 °C에서 동결했다.

[0046]

세포 파쇄액(cell homogenate)의 MUC5AC 농도 및 배양 배지의 MUC5AC의 농도는 제조사의 절차에 따라 commercial human MUC5AC ELISA kits(Cusabio, Wuhan, China)를 사용하여 측정하였다. 각 ELISA검사의 민감도 한계는 ~ 15.6 ng/mL였다. 미리 코팅된 웰들은 실온에서 1 시간 방치된 1 % 보마인 시럽 알부민을 함유하는 차단 완충액(pH7.4)으로 채웠다. 100 µl의 사람 MUC5AC의 표본 희석과 실험 샘플들은 분주되었다. 플레이트를 밀봉하고 37 °C에서 2 시간 배양하였고, 바이오틴(biotin) 결합 anti-human MUC5AC 항체 100 µl를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 1 시간 동안 37 °C에서 배양했다. 배양 후 플레이트를 4 번 세척했다. 이후 horseradish peroxidase-avidin 100 µl를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 1 시간 동안 37 °C에서 배양했다. 세척 후 파란색을 얻기 위해 발색 시약(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)이 100 µl씩 20 분 동안 접시에 적용되었다. 발색 반응은 50 µl의 1 M H₂SO₄를 첨가하여 멈추었다. 흡광도는 자동 ELISA reader를 사용하여 450nm에서 측정되었다.

[0047]

실험 결과는 도 4와 같이 나타났다. 도 4에서, MUC5AC의 세포질 내 수치는 도 4의 A에, MUC5AC의 배양 배지 내 수치는 도 4의 B에 나타났다.

[0048]

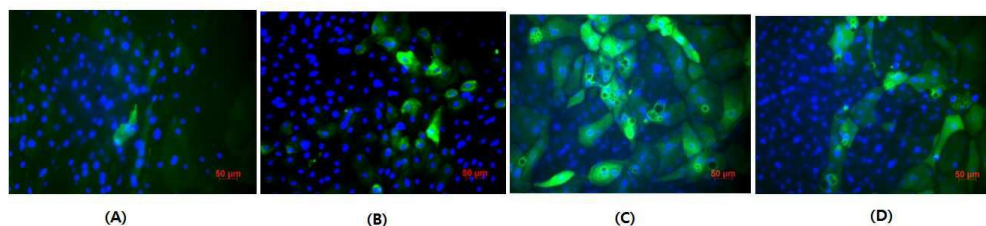
도 4의 A에 나타난 바와 같이, EGF, ROCK 저해제 및 EGF/ROCK 저해제의 조합으로 처리한 세포의 세포질에서 MUC5AC 수치는 대조군 배지(각각 p=0.029, 0.029 및 0.029, Mann-Whitney U test)의 세포의 수치에 비해 높게 나타났다. 다만, EGF, ROCK 저해제 및 EGF/ROCK 저해제의 조합으로 처리한 세포 사이에서는 큰 차이가 없었다.

[0049]

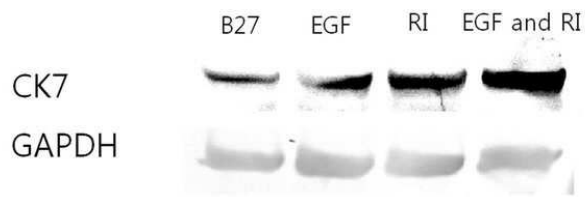
한편, 도 4의 B에 나타난 바와 같이, EGF, ROCK 저해제 및 EGF/ROCK 저해제의 조합으로 처리한 배양 배지의 MUC5AC 수치는 대조군 배지에 비해 높았다(각각 p=0.029, 0.029 및 0.029, Mann-Whitney U test). 이때, ROCK 저해제, EGF/ROCK 저해제를 함께 처리한 세포 배양배지의 MUC5AC 수치는 EGF로 처리한 세포에 비해 높게 나타났다(각각 p=0.029 및 0.029, Mann-Whitney U test).

도면

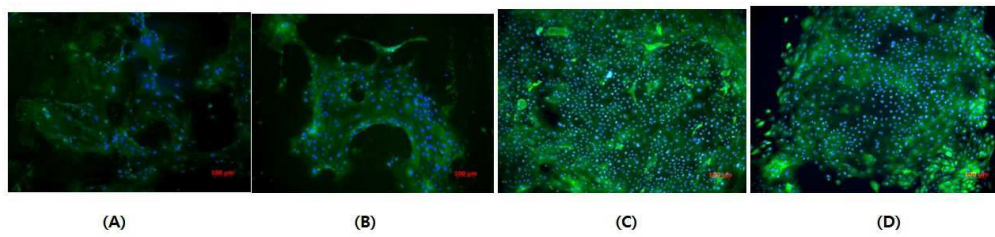
도면1



도면2



도면3



도면4

