

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 4일 (04.12.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/193061 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01) G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011805
- (22) 국제출원일: 2013년 12월 18일 (18.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0061800 2013년 5월 30일 (30.05.2013) KR
- (71) 출원인: 인제대학교 산학협력단 (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 621-749 경상남도 김해시 어방동 607, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 허대영 (HUR, Dae Young); 608-790 부산시 남구 용호 1동 지에스자이하이츠 아파트 301-1402, Busan (KR). 박가빈 (PARK, Ga Bin); 614-768 부산시 부산진구 양정 1동 유립아시아드아파트 101-1708, Busan (KR). 김영석 (KIM, Yeong Seok); 612-788 부산시 해운대구 우 1동 대우마리나아파트 203-503, Busan (KR). 김대진 (KIM, Dae Jin); 151-909 서울시 관악구 난향동 1736 대우신림 2차 푸르지오아파트 101-1403, Seoul (KR). 김성한 (KIM, Seong Han); 614-863 부산시 부산진구 전포 3동 362-64 한라비발디 101-2508, Busan

(KR). 이현경 (LEE, Hyun Kyung); 608-790 부산시 남구 용호 1동 지에스자이하이츠 아파트 301-1402, Busan (KR). 양재욱 (YANG, Jae Wook); 607-786 부산시 동래구 사직 2동 사직쌍용 예가아파트 118-2502, Busan (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털 1로 151 이노플렉스 1차 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

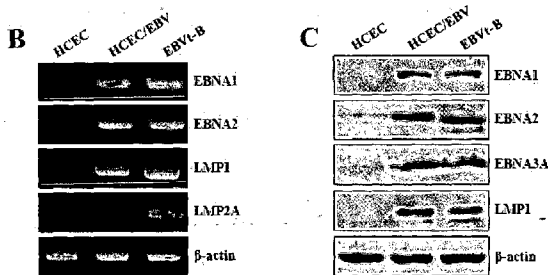
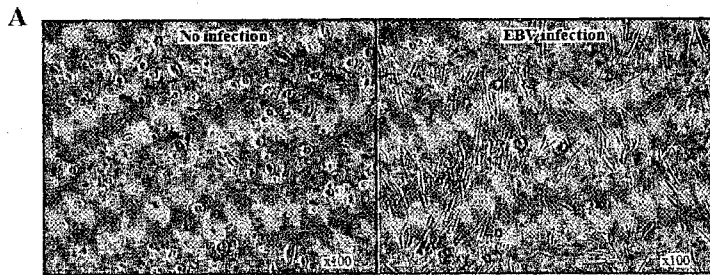
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CELL MODEL FOR NEOVASCULAR DISEASES USING EBV-INFECTED HUMAN CORNEAL EPITHELIAL CELLS

(54) 발명의 명칭 : E B V 감염 인간각막상피세포를 이용한 혈관신생 질환용 세포 모델

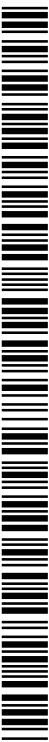
[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a cell model for neovascular diseases using Epstein Barr virus (EBV)-infected human corneal epithelial cells (HCEC). Provided are: a method for preparing a cell model for neovascular diseases comprising a step of infecting HCEC with EBV, a step of culturing the infected HCEC, and a step of checking whether the cultured HCEC is infected with EBV; and a cell model for neovascular diseases prepared by the preparation method. In addition, provided is a method for screening neovascular disease therapeutic agents using the cell model for neovascular diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Barr virus; EBV) 감염 인간각막상피세포 (human corneal epithelial cells; HCEC)를 이용한 각막 혈관신생 질환용 세포 모델에 관한 것으로서, EBV를 인간각막상피세포 (human corneal epithelial cells; HCEC)에 감염시키는 단계; 상기 감염시킨 인간각막상피세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양한 인간각막상피세포의 EBV 감염 여부를 확인하는 단계를 포함하는 각막 혈관신생 질환용 세포 모델 제조방법을 제공하고, 상기

제조방법에 따라 제조된 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 제공한다. 또한, 상기 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 이용한 각막 혈관신생질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.



WO 2014/193061 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG). **공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: E B V 감염 인간각막상피세포를 이용한 혈관신생 질환용 세포 모델

기술분야

- [1] 본 발명은 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus; EBV) 감염 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)를 이용한 각막 혈관신생 질환용 세포 모델에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus; EBV)는 전 세계에 널리 분포하는 헤르페스(herpes)과, 감마헤르페스(gammaherpes)아과, 림포크립토바이러스(lyphocryptovirus) 속에 속하는 바이러스이다. EBV에 감염되면, 바이러스가 B림프구 내 genome으로 들어가 면역반응에 의해 제거되지 않으므로 잠복 감염 상태로 유지된다. EBV 초감염 연령은 위생적인 환경에 따라 다르지만 3세에 약 80%, 20세 전후에 90%, 20대 후반에는 거의 100%에서 항체 양성율을 나타낸다. 유아기에 초감염되면 무증상이나 경한 증상으로 그치는 경우가 많지만, 청년기에 초감염 되면 일부에서 전염성 단핵구증(infectious mononucleosis, IM)을 일으키고, 때로는 만성 EBV 감염증(chronic EBV infection)이나 일단 감염이 잠재되는 EBV가 재활성화 과정에서 opportunistic B cell lymphoma, Burkitt's lymphoma(B L), 상인두암(nasopharyngeal carcinoma, NPC)을 일으킨다. 이와 같이 초감염 연령에 따라 발병률이 다른 이유는 잘 알려지지 않았으나 생체 면역기구의 성숙도에 따라 나타나는 차이라고 여겨진다. 한편, EBV는 여러 신생물성 이상(neoplastic disorders)을 일으키는 중요한 발암물질이고, 용해성 감염 세포는 EBV-관련 악성 종양의 성장을 촉진하는데, 이러한 현상은 혈관신생을 증가시키는 것과 관련이 있다. 눈의 망막(retina)에 있어 EBV 감염은 드물지만 실제 임상에서 만성 활동성 EBV 감염 시 합병증의 하나로 EBV에 의한 망막염이 발생한다는 보고가 있으며 이는 혈관신생과 이에 따른 망막괴사를 동반하는 것으로 알려져 있다.
- [3] 혈관신생(Angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 현상으로, 악성(고형)종양, 당뇨병성 망막증, 노인성 황반 변성증, 관절 류머티즘 등의 염증성 질환 등에 있어서 그에 따른 발증이나 진전에 깊이 관여하고 있다는 것이 알려져 있다. 또한, 암 치료상 중요한 문제가 되고 있는 전이에 있어서 그 길을 확보한다는 의미에서 혈관신생이 중요한 스텝이 되고 있다. 이와 같이 혈관신생은 다양한 병변에서 관찰되고, 각각의 병태의 진전을 조장하기 때문에, 혈관신생을 평가하고 각종 약물의 개발시에 이들 약물의 효능을 평가하는데 사용될 수 있는 모델의 개발이 시급하다. 특히, 세포모델의 개발은 임상 모델과 동물실험모델에 비하여 현저히 적은 비용이 소요되며 손쉬운 처치와 결과를

언을 수 있어 그 효용성이 매우 높다고 생각된다.

[4]

[5] 한편, 한국특허출원 제10-2008-0009530호(출원일 2008.01.30)는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 미토콘드리아 복합체Ⅲ의 유비퀴논-결합 단백질(QP-C)과 시험 물질의 접촉을 통해 혈관신생 억제제를 스크리닝하는 방법에 대해 개시하고 있으나, 본 발명의 EBV 감염 인간각막상피세포를 이용한 혈관신생 질환용 세포모델에 대한 언급은 없다.

[6]

[7] 따라서, 본 발명자들은 EBV 감염된 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)에 있어서, 세포형태가 방추형을 나타내고, 길어졌으며, 섬유아세포 유사 형태의 특성을 보이고, 혈관신생(angiogenesis)에 관여한다고 알려진 인자들의 발현이 상대적으로 증가하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명의 목적은 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus; EBV)를 감염시킨 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)를 이용한 각막 혈관신생 질환용 세포 모델 제조방법을 제공하는데 있다.

[9] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법에 따라 제조된 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 제공하는데 있다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 이용한 각막 혈관신생 치료제 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

[11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus; EBV)를 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)에 감염시키는 단계; 상기 감염시킨 인간각막상피세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양한 인간각막상피세포의 EBV 감염 여부를 확인하는 단계를 포함하는 각막 혈관신생 질환용 세포 모델 제조방법을 제공한다.

[12] 상세하게는, 상기 EBV 감염 여부를 확인하는 단계는 EBNA1, EBNA2, EBNA3A 및 LMP1로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질의 발현을 확인하는 것을 특징으로 하고, 상기 각막 혈관신생 질환은 콘택트렌즈 및 각종 염증에 의한 각막염, 각막궤양 또는 익상편이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[13] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 따라 제조된 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 따라 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 제조하는 단계; 상기 각막 혈관신생 질환용 세포 모델에 치료제 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 치료제 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계를

포함하는 각막 혈관신생질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명은 EBV 감염 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)를 이용한 각막 혈관신생 질환용 세포모델에 관한 것으로서, EBV 감염된 인간각막상피세포는 세포형태가 방추형을 나타내고, 길어졌으며, 섬유아세포 유사 형태의 특성을 보이고, 혈관신생(angiogenesis)에 관여한다고 알려진 인자들의 발현이 상대적으로 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 이를 이용하면 각막 혈관신생 메카니즘을 밝히는 용이한 세포 모델로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 HCEC 세포에 EBV 감염시킨 후, 세포 변화 및 EBV 감염 여부를 확인한 실험결과를 나타낸다. A, 감염시킨 후 세포형태를 나타내는 결과; B, EBV mRNA의 발현 확인 RT-PCR결과(EBVt-B 세포는 양성 대조군으로 사용); C, EBV 단백질의 발현을 확인한 웨스턴 블랏 결과.
- [17] 도 2는 EBV 감염시킨 HCEC 세포에서 혈관신생(angiogenesis) 관련 전사인자를 비롯한 신호전달 물질의 발현 변화를 확인한 RT-PCR 및 웨스턴 블랏 결과를 나타낸다. A, 감염시킨 후 혈관신생(angiogenesis) 관련 물질인 IL-6, IL-8, VEGF, MCP-1 및 TGF-beta의 발현이 증가함을 확인; B, 대표적인 혈관신생 인자(angiogenic factor)인 STAT-3, VEGF, angiotensin-1 (Ang-1)의 발현을 단백질 수준에서 확인한 웨스턴 블랏 실험 결과.
- [18] 도 3은 EBV 감염시킨 HCEC 세포에서 혈관신생(angiogenesis) 관련 물질인 IL-8, MCP-1, VEGF, IL-6, TGF-beta의 발현 증가로 인해 배양액으로의 분비가 증가 되는지를 확인한 ELISA 실험결과를 나타낸다.
- [19] 도 4는 EBV 감염시킨 HCEC 세포가 상피-중간엽 이행(epithelial-mesenchymal transition; EMT)이 일어나는지를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus; EBV)를 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)에 감염시키는 단계; 상기 감염시킨 인간각막상피세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양한 인간각막상피세포의 EBV 감염 여부를 확인하는 단계를 포함하는 각막 혈관신생 질환용 세포 모델 제조방법을 제공한다.
- [21] 상세하게는, 상기 EBV 감염 여부를 확인하는 단계는 EBNA1, EBNA2, EBNA3A 및 LMP1로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질의 발현을 확인하는 것을 특징으로 하고, 상기 각막 혈관신생 질환은 콘택트렌즈 및 각종 염증에 의한 각막염, 각막궤양 또는 익상편이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[22]

- [23] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 따라 제조된 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을

제공한다.

[24]

[25] 본 발명에 관한 세포 모델은 각막 혈관신생 질환 치료 연구의 피험 약제의 약효 평가에 적합한 것이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 형태의 것이어도 사용할 수 있다. 본 발명에서 EBV의 도입 대상이 되는 세포주는 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[26]

[27] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 따라 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 제조하는 단계; 상기 각막 혈관신생 질환용 세포 모델에 치료제 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 치료제 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 각막 혈관신생질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[28]

[29] 상기 각막 혈관신생질환 치료제 후보 물질이란 각막 혈관신생질환에 대한 치료효과가 있는 것으로 예상되어, 치료 효과를 측정하기 위한 실험대상으로 사용될 수 있는 모든 물질을 의미하며, 실험동물에 적용할 수 있고 치료 효과를 측정할 수 있으면 천연물질 또는 그로부터 얻어진 것이든, 인공적으로 합성된 것이든 제한되지 않고, 그 종류도 제한되지 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

[30] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[31]

[32] <실시예 1> EBV-감염 HCEC 세포의 제작 및 EBV-감염 HCEC 세포에서의 EBV 관련 분자의 검출

[33]

[34] 1. EBV-감염 HCEC 세포의 제작

[35] EBV B95-8 세포주(ATCC)로부터 EBV 상등액 스톡(stock)을 제조하였다. 각막상피세포를 EBV 스톡 상등액에 첨가하고, 2시간 동안 37°C에서 배양한 후에 keratinocyte serum-free medium (Gibco)을 첨가하였다(3×10^4 cells/ml). 배양물은 1일-4주 동안 배양되었다.

[36]

[37] 2. 세포 배양

[38] 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)는 Gibco로부터 구입하였다. 세포들은 소 뇌하수체 추출물(Bovine Pituitary Extract; BPE, Gibco) 및 인간 재조합 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factor; EGF, Gibco)가 첨가된 keratinocyte serum-free medium에서 5% CO₂, 37°C로 유지되었다. EBV-형질전환된 B 세포는 양성 대조군으로서 사용되었다.

[39]

[40] 3. RT-PCR

[41] 총 RNA는 RNeasy Mini kit (Qiagen)을 이용하여 추출하였고, oligo (dT) 프라이머와 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 산물은 특이적 프라이머 세트(Bioneer)(표 1) 및 Prime Taq Premix (GeNet Bio)를 이용하여 증폭시켰고, 아가로스 젤에 전기영동을 수행한 후, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하여 multiple Gel DOC system (Fujifilm)을 사용하여, UV 하에서 band를 확인하였다.

[42]

[43] 표 1

[Table 1]

RT-PCR을 위해 사용되는 특이 프라이머 서열

Target	Primers, 5' → 3'	
	Sense	Antisense
EBNA1	GAG CGG GGA GAT AAT GTA CA	TAA AAG ATG GCC GGA CAA GG
EBNA2	AAC CCT CTA AGA CTC AAG GC	ACT TTC GTC TAA GTC TGC GG
LMP1	CAC GAC CTT GAG AGG GGC CCA	GCC AGA TGG TGG CAC CAA GTC
LMP2A	ATG ACT CAT CTC AAC ACA TA	CAT GTT AGG CAA ATT GCA AA
IL-8	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT	TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C
IL-6	GTG TTG CCT GCT GCC TTC CCT G	CTC TAG GTA TAC CTC AAA CTC CAA
TGF-β	GGA CAC CAA CTA TTG CTT CAG	TCC AGG CTC CAA ATG TAG G
Hif-1α	TGA TTG CAT CTC CAT CTC CTA CC	GAC TCA AAG CGA CAG ATA ACA CG
VEGF	AGG AGG GCA GAA TCA TCA CG	CAA GGC CCA CAG GGA TTT TCT
STAT3	ACC TGC AGC AAT ACC ATT GAC	AAG GTG AGG GAC TCA AAC TGC
MCP-1	AAT GCC CCA GTC ACC TGC TGT TAT	GCA ATT TCC CCA AGT CTC TGT ATC
N-cadherin	CAC CCA ACA TGT TTA CAA TCA ACA ATG AGA C	CTG CAG CAA CAG TAA GGA CAA ACA TCC TAT T
E-cadherin	GAC GCG GAC GAT GAT GTG AAC	TTG TAC TGTR TGT GGA TTG AAG
Vimentin	GGA AGA GAA CTT TGC CGT TGA A	GTG ACG AGC CAT TTC CTC CTT
S100A4	TCA GAA CTA AAG GAG CTG CTG ACC	TTT CTT CCT GGG CTG CTT ATC TGG

α -SMA	ATC ACC ATC GGA AAT GAA CG	CTG GAA GGT GGA CAG AGA GG
Snail	CAG ATG AGG ACA GTG GGA AAG G	ACT CTT GGT GCT TGT GGA GCA G
Fibronectin	CCG TGG GCA ACT CTG TC	TGC GGC AGT TGT CAC AG
MMP2	TGG CAA GTA CGG CTT CTG TC	TGG CAA GTA CGG CTT CTG TC
MMP9	TGC GCT ACC ACC TCG AAC TT	GAT GCC ATT GAC GTC GTC CT
β -actin	ATC CAC GAA ACT ACC TTC AA	ATC CAC ACG GAG TAC TTG C

[44]

[45] 4. 웨스턴 블롯(Western Blot)

[46]

세포들은 수확하였고, 프로테아제 억제 콕테일(protease inhibitor cocktail) 및 포스파타아제 억제 콕테일(phosphatase inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich)이 포함된 NP-40 buffer(Elpis Biotech)로 용해하였다. 총 세포 용해물은 SDS-PAGE를 수행하였다. 분리된 단백질은 니트로셀룰로스 막(Millipore)으로 옮겨졌고, 그 후 5% 스킴 밀크(skim milk)로 덮어 씌우고, 여러 항체를 이용하여 일반적인 면역블롯을 수행하였다. 그 후, ECL kit (Advansta) 및 multiple Gel DOC system으로 면역반응성 단백질을 검출하였다. 다음의 1차 Abs가 사용되었다. phospho-STAT3 (Tyr⁷⁰⁵), STAT3, Hif-1 α , MMP-2, MMP-9, phospho-Akt (Ser⁴⁷³), Akt, phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), ERK1/2, E-cadherin, N-cadherin, β -catenin, Vimentin, Snail, TCF8/ZEB1 및 β -actin은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)로부터 구했고, EBNA-2, EBNA-3A, LMP-1, Ang-1, 및 VEGF는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구했으며, EBNA-1는 Thermo Scientific로부터 구했다. 밀도측정(Densitometry) 분석은 ImageJ 1.38 software (National Institutes of Health)로 수행하였다.

[47]

[48] 5. 결과

[49]

EBV는 B 세포 및 상피세포에 감염시킬 수 있다. HCEC 세포에 EBV를 감염시키기 위해서, 본 발명자들은 우선 유세포분석기를 이용하여 잘 알려진 HCEC 세포 상의 CD21 수용체의 존재여부를 조사하였다. 하지만, HCEC 세포는 CD21을 발현하지 않았다. 그럼에도 불구하고, 본 발명자들은 잠재기 타입 III(latency type III)를 나타내는 EBV-함유 HCEC 세포를 구축하였다. 전형적으로, B세포에서의 EBV 형질전환 과정은 거의 4주에 걸쳐 확립되고, 형질전환의 초기

장후(세포 크기 증가, 세포 응집 및 갑작스러운 성장 증가)는 1-3 주 후에 관찰된다. 이러한 상황에서, 본 발명자들은 EBV-감염 HCEC 세포의 형태가 비-감염 세포와 비교시 적어도 1주일 내에 입방형(cuboidal) 및 난형(ovoidal)에서 방추형(spindle)으로 변하는 것을 확인하였다. 특히, EBV 노출 3주 후에는 부착 세포들이 중간엽(mesenchymal) 섬유아세포(fibroblast)-유사 방추형(spindle-shaped) 세포와 완전히 비슷해졌다(도 1A). EBV-감염 HCEC 세포가 방추형을 나타내고, 길어졌으며, 섬유아세포 유사 형태를 보이는데, 이는 양극성 또는 다극성이라는 의미이다. HCEC 세포 상 EBV 감염을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 바이러스 전사체 및 단백질 분석을 위한 RT-PCR 및 웨스턴 블랏을 수행하였다. 비노출 HCEC 세포에 있어서는 EBV-관련 유전자 전사체 및 단백질들을 관찰할 수 없었는데, 이는 HCEC 세포가 EBV 감염로부터 자유롭다는 것을 나타낸다(도 1B 및 1C). EBV 노출 후에는, EBV-감염 HCEC 세포에서 LMP2A를 제외하고 EBNA1, EBNA2, EBNA3A 및 LMP1의 발현을 관찰하였다(도 1B 및 1C).

[50]

[51] <실시예 2> HCEC 세포에 있어서 EBV 감염에 의한 다양한 전염증 및 혈관신생 인자의 생산 유도

[52]

[53] 1. ELISA 분석

[54] 세포를 24 시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 회수하여, HCEC 세포 또는 EBV-감염 HCEC 세포에 의해 분비되는 IL-6, IL-8 및 MCP-1 양을 제조사의 지시에 따라 Single Analyte ELISArray Kit (Qiagen)으로 정량화하였다. VEGF 및 TGF- β 는 Single cytokine ELISA assay Kit (R&D systems)를 이용하여 정량화했다. 결과는 생물학적 반복 횟수의 평균 \pm 표준편차(standard deviation; SD)로 표시하였다.

[55]

[56] 2. 결과

[57] 이전의 연구들은 EBV를 포함한 바이러스 감염이 면역세포 및 종양세포에서 사이토카인 또는 케모카인의 생산을 유도한다고 밝혀냈다. 또한, 본 발명자들은 EBV 감염에 의해서 섬유아세포-유사 세포로 HCEC 세포가 분화되는 것은 성장 및 혈관생성 인자를 유도시키는 능력과 관련되어 있다고 추정한다.

오토크라인(autocrine) 및 파라크라인(paracrine) 반응을 통해, 상기 인자들은 종양세포를 포함하는 여러 세포의 성장을 촉진하고, 종양 성장에 필요한 영양분 및 산소를 공급하여 혈관 발달을 유도한다. 이를 시험하기 위해서, 본 발명자들은 RT-PCR 및 웨스턴 블랏 분석을 이용하여 전염증(pro-inflammatory) 사이토카인 및 혈관신생 인자들의 mRNA 수준 및 단백질 수준을 분석하였다. 상기 인자들의 분비 수준은 HCEC 또는 EBV-감염 HCEC 세포의 배양 상등액에서 Single Analyte ELISArray kit을 이용하여 정량적으로 분석되었다. 도

2에서 나타낸 바와 같이, 전혈관신생(pro-angiogenic) 및 성장 인자인 IL-6, IL-8, VEGF, MCP-1 및 TGF- β 은 비-감염 세포와 비교시 EBV 감염 후에 더 많이 발현되었다. 특히, MCP-1, IL-6 및 TGF- β 의 분비 수준은 EBV 감염 HCEC 세포에서 크게 향상되었고, IL-8 및 VEGF는 EBV 감염 HCEC 세포에서 충분히 분비되었다(도 3). 또한, 상피-중간엽 이행(epithelial- mesenchymal transition; EMT)를 유도하는 것으로 알려진 TGF- β 의 분비는 EBV 감염 HCEC 세포에서 증가된 반면, 비-감염 세포에서는 TGF- β 를 생산하지 않았다. EBV 감염 HCEC 세포에 있어서 전염증(pro-inflammatory) 및 전혈관신생(pro-angiogenic) 인자의 생산을 유발하는 분자를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 Hif-1 α 및 Stat3를 주목하였는데, 이는 신혈관형성(neovascularization)과 관련되어 있다. Hif-1 α , p-STAT3 및 Ang-1의 발현 수준은 비-감염 세포와 비교하여 EBV 감염 HCEC 세포에서 크게 증가되었다. 더구나, MMP2 및 MMP9와 같은 Stat3 표적 유전자는 또한 EBV 감염 후에 현저히 증가되었다(도 2A 및 2B).

[58]

[59] <실시예 3> HCEC 세포에 있어서 EBV 감염에 의한 표현형 변화 유도

[60]

[61] 상피-중간엽 이행(epithelial- mesenchymal transition; EMT)은 분극화되고 고정된 상피세포를 이동성 중간엽 세포로 전환시킬 수 있는 세포 교차분화(transdifferentiation) 기작이다. 상기 기작은 1차 상피종양으로부터 단일 악성 세포로의 전이 및 침윤을 촉진시키는 것과 관련되어 있다.

[62]

HCEC 세포에 있어서 EBV 감염에 의한 섬유아세포-유사 세포로의 분화 및 TGF- β 의 분비는 상피-중간엽 이행(epithelial- mesenchymal transition; EMT)과 유사하기 때문에, 본 발명자들은 EBV 감염 HCEC 세포가 상피-중간엽 이행(epithelial- mesenchymal transition; EMT) 되었는지 조사하였다. 이를 입증하기 위해서, EMT 마커들의 발현이 EBV 감염 후에 변화하였는지 RT-PCR 분석을 통해 조사하였다. 일반적으로, HCEC 세포는 E-cadherin 및 β -catenin를 우세하게 발현하는 것으로 나타난 반면, N-cadherin, vimentin, α -SMA, S100A4, TCF8/ZEB1, fibronectin 및 Snail의 발현은 거의 없거나 낮은 수준이었다(도 4A 및 도4B). 놀랍게도, EBV 감염 HCEC 세포는 상피 마커인 E-cadherin과 β -catenin은 거의 발현이 검출되지 않았다. 반대로, 상기 세포들은 중간엽 마커인, N-cadherin, vimentin, α -SMA, S100A4, TCF8/ZEB1, fibronectin 및 Snail을 높게 발현하였다(도 4A 및 도4B). 따라서, 이 결과는 HCEC 세포에서의 EBV 감염이 EMT 형성의 개시에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[63]

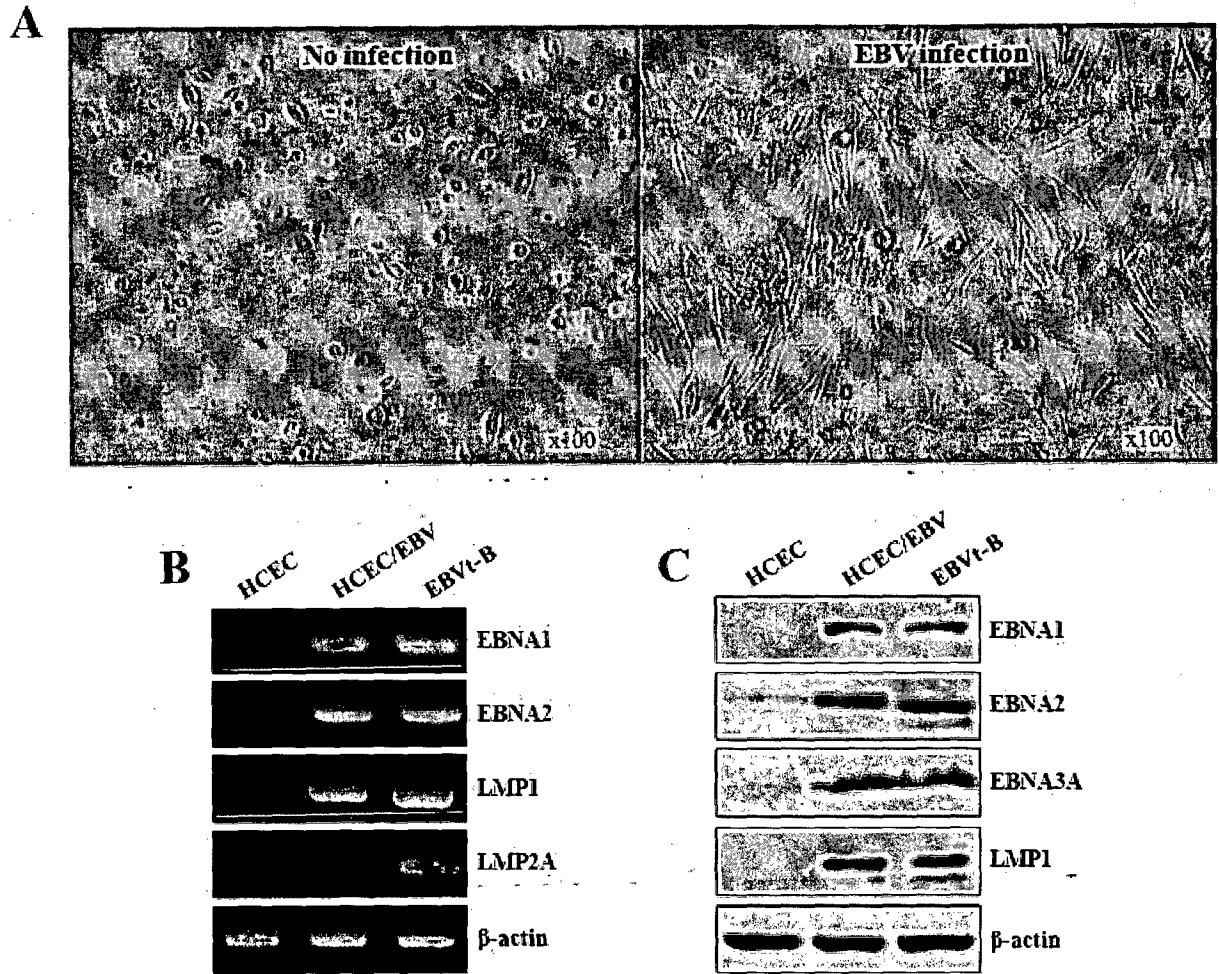
PI3K/Akt 및 ERK1/2 활성화는 TGF- β 유도된 EMT를 포함하는 많은 생리학적 기능에 있어서 세포 이동 및 세포골격(cytoskeleton)의 동적 조절에 중요한 역할을 한다. 따라서, 본 발명자들은 HCEC 세포에서 EBV-감염 유도된 EMT에 있어서 Akt 및 ERK1/2의 관련 가능성에 대해 조사하였다. 그 결과, Akt 및 ERK1/2의 인산화는 EBV 감염 후에 크게 증가하였다(도 4C). 이러한 결과는 Akt

및 ERK1/2가 HCEC 세포에서 EBV-유도된 EMT에 중요한 역할을 할 수도 있다는 것을 나타낸다.

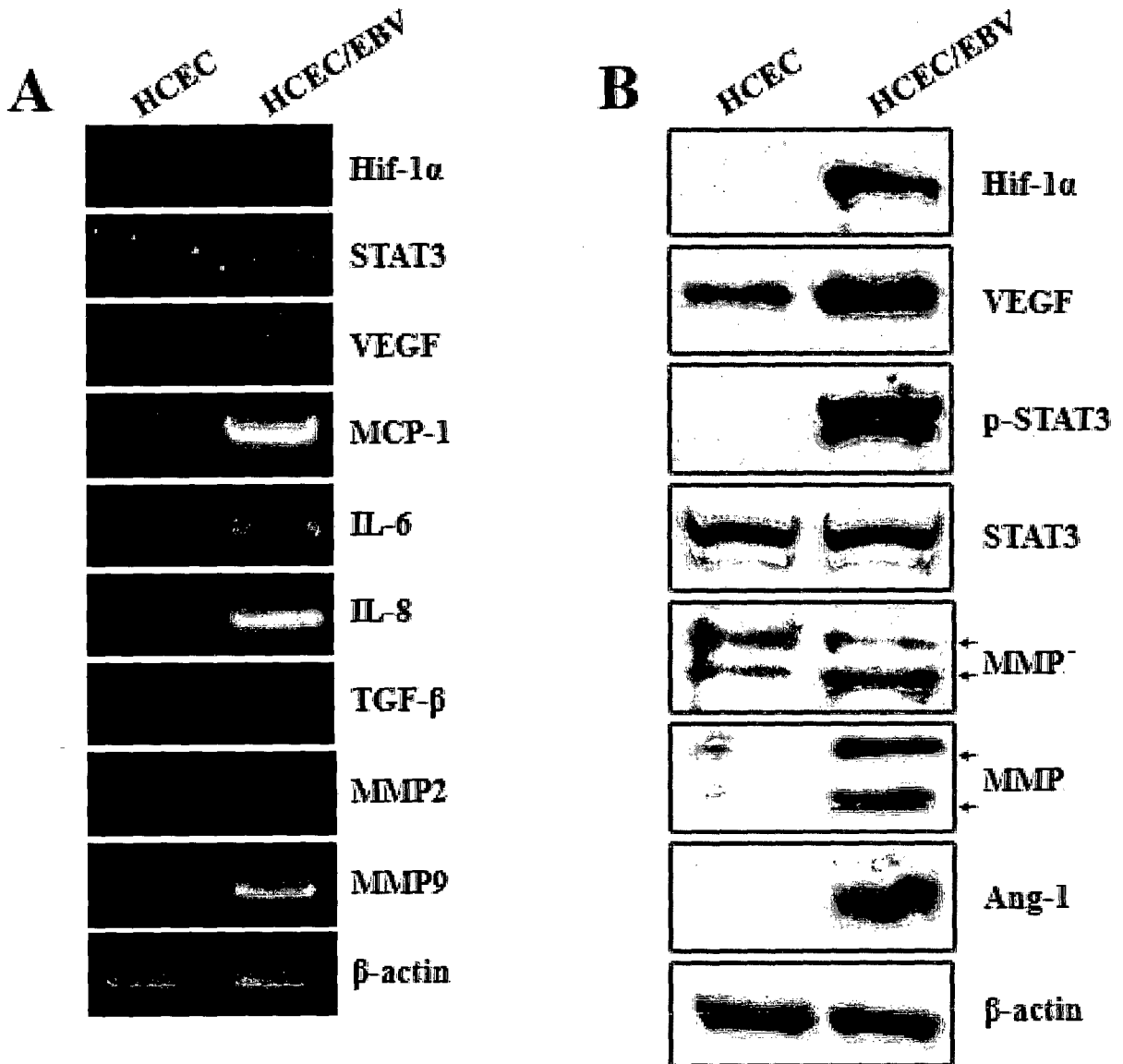
청구범위

- [청구항 1] 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus; EBV)를 인간각막상피세포(human corneal epithelial cells; HCEC)에 감염시키는 단계; 상기 감염시킨 인간각막상피세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양한 인간각막상피세포의 EBV 감염 여부를 확인하는 단계를 포함하는 각막 혈관신생 질환용 세포 모델 제조방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 EBV 감염 여부를 확인하는 단계는 EBNA1, EBNA2, EBNA3A 및 LMP1로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질의 발현을 확인하는 것을 특징으로 하는 각막 혈관신생 질환용 세포 모델 제조방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 각막 혈관신생 질환은 각막염, 각막궤양 또는 익상편인 것을 특징으로 하는 각막 혈관신생 질환용 세포 모델 제조방법.
- [청구항 4] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 각막 혈관신생 질환용 세포 모델.
- [청구항 5] 제 1 항의 방법에 따라 각막 혈관신생 질환용 세포 모델을 제조하는 단계; 상기 각막 혈관신생 질환용 세포 모델에 치료제 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 치료제 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 각막 혈관신생질환 치료제 스크리닝 방법.

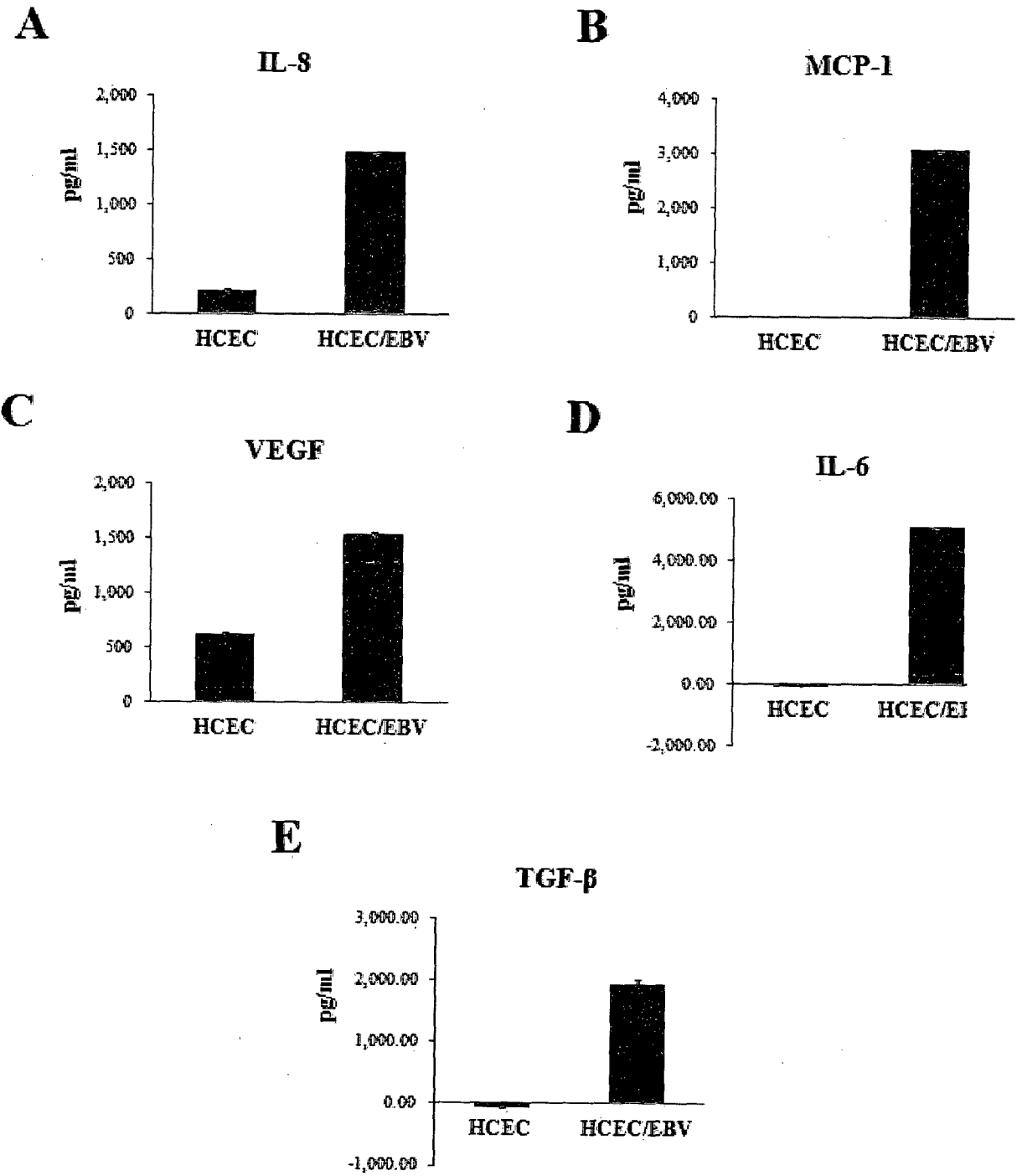
[Fig. 1]



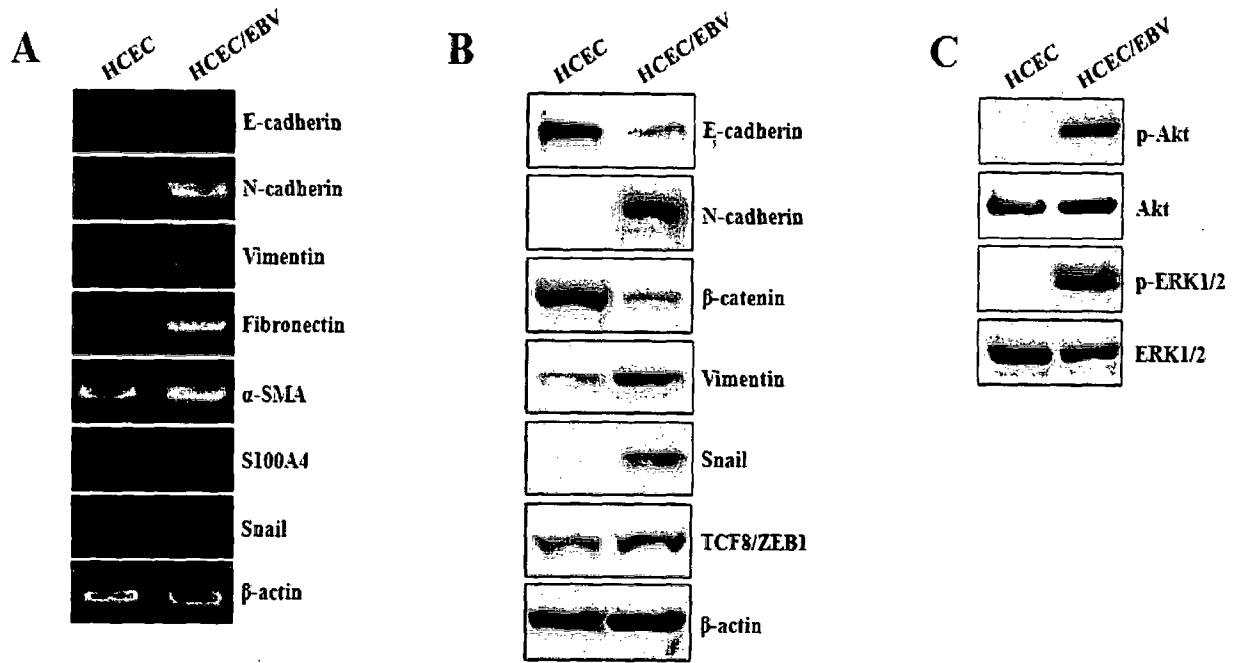
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071; G01N 33/15; G01N 33/53; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
 Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: eye infection, EBV, corneal epithelial cell, HHV4, HSV angiogenesis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIN, CHIN-TARNG et al., "Response of nasopharyngeal carcinoma cells to Epstein-Barr virus infection in vitro", Laboratory Investigation, 2000, vol. 80, no. 8, pp. 1149-1160 See abstract and pages 1157-1158.	1-5
A	KR 10-2009-0083619 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 04 August 2009 See abstract and claims 1-8.	1-5
A	REMEIJER, LIES et al., "Human herpes simplex virus keratitis: the pathogenesis revisited", Ocular Immunology and Inflammation, 2004, vol. 12, no. 4, pp. 255-285 See the entire document.	1-5
A	PESSINA, AUGUSTO et al., "Microbiological risk assessment in stem cell manipulation", Critical Reviews in Microbiology, 2008, vol. 34, no. 1, pp. 1-12 See abstract and pages 10-12.	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 MARCH 2014 (26.03.2014)

Date of mailing of the international search report

27 MARCH 2014 (27.03.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011805

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIN, ZHEN et al., "Detection of murine leukemia virus in the Epstein-Barr virus-positive human B-cell line JY, using a computational RNA-Seq-based exogenous agent detection pipeline, PARSES", Journal of Virology, 11 January 2012, vol. 686, no. 6, pp. 2970-2977 See the entire document.	1-5
PA	SUGITA, SUNAO et al., "Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases", Ophthalmology, September 2013, vol. 120, no. 9, pp. 1761-1768 See the entire document.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011805

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0083619 A	04/08/2009	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/071(2010.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)j		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/071; G01N 33/15; G01N 33/53; G01N 33/68 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: eye infection, EBV, corneal epithelial cell, HHV4, HSV angiogenesis		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LIN, CHIN-TARNG 외 5명, 'Response of nasopharyngeal carcinoma cells to Epstein-Barr virus infection in vitro', Laboratory Investigation, 2000, 80권, 8호, 페이지 1149-1160 요약 및 페이지 1157-1158 참조.	1-5
A	KR 10-2009-0083619 A (연세대학교 산학협력단) 2009.08.04. 요약 및 청구항 제1항-제8항 참조.	1-5
A	REMEIJER, LIES 외 2명, 'Human herpes simplex virus keratitis: the pathogenesis revisited', Ocular Immunology and Inflammation, 2004, 12권, 4호, 페이지 255-285 전체 문헌 참조.	1-5
A	PESSINA, AUGUSTO 외 5명, 'Microbiological risk assessment in stem cell manipulation', Critical Reviews in Microbiology, 2008, 34권, 1호, 페이지 1-12 요약 및 페이지 10-12 참조.	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 03월 26일 (26.03.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 03월 27일 (27.03.2014)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 	

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LIN, ZHEN 외 9명, ‘Detection of murine leukemia virus in the Epstein-Barr virus-positive human B-cell line JY, using a computational RNA-Seq-based exogenous agent detection pipeline, PARSES’ , Journal of Virology, 2012.01.11., 686권, 6호, 페이지 2970-2977 전체 문헌 참조.	1-5
PA	SUGITA, SUNAO 외 12명, ‘Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases’ , Ophthalmology, 2013.09., 120권, 9호, 페이지 1761-1768 전체 문헌 참조.	1-5

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0083619 A	2009/08/04	없음	