

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0119958 (43) 공개일자 2018년11월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01) A61K 38/39 (2006.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(52) CPC특허분류 A61K 48/00 (2013.01) A23L 33/13 (2016.08)		(72) 발명자 서준규 서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 803호(대치동, 우성1차아파트)
(21) 출원번호	10-2017-0053738	류지간 인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 77, 902동 701호(송도동, 더샵 엑스포)
(22) 출원일자	2017년04월26일	최민지 인천광역시 중구 서해대로 439, 101동 301호(신흥동1가, 경남아너스빌아파트)
심사청구일자	없음	(74) 대리인 김순용

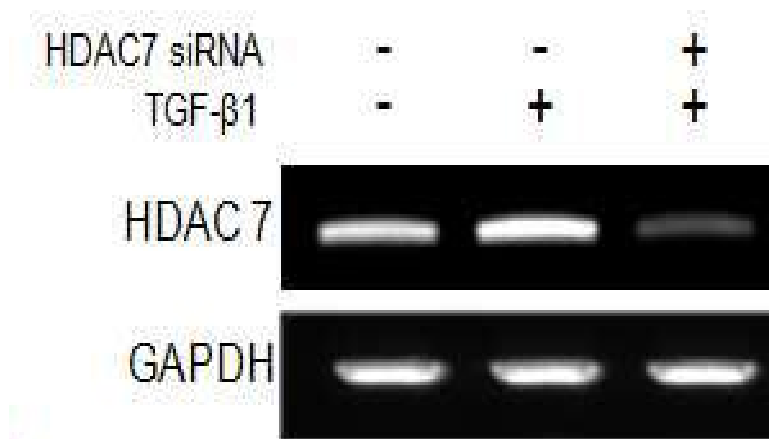
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 히스톤 탈아세틸화효소 7의 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 HDAC7의 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 HDAC7의 억제제는 음경백막의 섬유화 병변을 감소시키고, 섬유모세포 내 HDAC7의 발현을 억제하여 세포주기를 조절하고, 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포외기질의 합성을 감소시켜 조직섬유화를 억제시키는 효과가 우수하여, 페이로니병의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 38/39 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4013130

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심연구(중견연구)

연구과제명 음경만곡증의 분자기전 규명 및 신규 치료표적 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

히스톤 탈아세틸화효소 7 (Histone deacetylase7, HDAC7) 에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 히스톤 탈아세틸화효소 7에 대한 억제제는 HDAC7 siRNA인 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 HDAC7에 대한 억제제는 음경백막의 섬유화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 HDAC7에 대한 억제제는 섬유모세포에서 TGF- β 1에 의한 근섬유모세포로의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 HDAC7에 대한 억제제는 섬유모세포에서 TGF- β 1에 의한 세포외기질의 합성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 세포외기질은 플라스미노겐 활성인자 억제제-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1), 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 I(collagen I) 및 콜라겐 IV(collagen IV)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 HDAC7에 대한 억제제는 섬유모세포에서 세포주기 조절자인 Cyclin D1을 활성화 하는 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

히스톤 탈아세틸화효소 7 (Histone deacetylase7, HDAC7)에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 히스톤 탈아세틸화효소 7의 억제제는 HDAC7 siRNA인 것을 특징으로 하는, 페이로니병의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 히스톤 탈아세틸화효소 7의 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 히스톤 탈아세틸화효소 7(Histone deacetylase 7, 이하 'HDAC7'라 명명함)은 HDAC 패밀리에 속하는 하나로, 히스톤 단백질의 ε-N-아세틸 리신 아미노산으로부터 아세틸기($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$)를 제거하는 효소이다. DNA의 발현은 히스톤 단백질의 아세틸화와 탈아세틸화에 의해 조절되는데, HDAC 단백질들은 히스톤 단백질의 리신기(lysine)의 탈아세틸화를 촉진시킨다. HDAC 단백질들은 Class I[HDAC1, -2, -3, -8], Class II[HDAC4, -5, -6, -7, -9, -10], Class III[SIRT1-7, Sir2], Class IV[HDAC11]와 같이 4 그룹으로 나뉘며, HDAC7은 Class II에 속한다. (Gregorette IV et al, J Mol Biol, 338, pp17-31, 2004). HDAC의 기능에 대해 활발한 연구가 진행되고 있으나, 현재까지 HDAC 단백질, 특히 HDAC7과 페이로니병(음경만곡증 또는 음경섬유화라고도 함)의 연관 관계에 대해서는 전혀 개시된 바 없다.

[0004] 한편, 페이로니병은 음경 발기조직을 둘러싸고 있는 음경백막에 섬유화병변이 생기고, 발기 시에 통증을 유발하고 섬유화병변이 있는 쪽으로 음경이 휘는 음경만곡을 유발해서 정상적인 성행위에 장애를 주는 질환이다. 일종의 후천성 음경기형으로서 성행위시 음경백막의 반복적인 외상 또는 TGF-β(transforming growth factor-β)등과 같은 섬유화촉진자의 과발현이 섬유화병변의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 당뇨, 유전적 소인 등이 페이로니병의 원인이 될 수 있다.

[0005] 현재까지 페이로니병의 치료를 위해 개발된 전문의약품은 전혀 없으며, 비타민 E 등과 같이 항산화 작용이 있는 약물이 경험적으로 사용되고 있으나, 그 효과는 미미하고, 수술적 치료가 유일하게 효과적인 치료법이다. 따라서, 음경백막의 섬유화병변을 효과적으로 치료할 수 있는 페이로니병 치료제의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 페이로니병 예방 또는 치료용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, HDAC7의 억제제가 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 항섬유화 작용을 가지며, 섬유모세포에서 근 섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포외기질(extracellular matrix) 생성의 억제, 즉 섬유화 현상을 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 히스톤 탈아세틸화효소 7 (Histone deacetylase7, HDAC7)에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 히스톤 탈아세틸화효소 7 (Histone deacetylase7, HDAC7)에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 히스톤 탈아세틸화효소 7 (Histone deacetylase7, HDAC7)에 대한 억제

제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 히스톤 탈아세틸화효소 7 (Histone deacetylase7, HDAC7)에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 HDAC7의 억제제는 음경백막의 섬유화 병변을 감소시키고, 섬유모세포 내 HDAC7의 발현을 억제하여 TGF- β 신호전달경로의 활성을 억제하고, 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포외기질의 합성을 감소시켜 조직섬유화를 억제시키는 효과가 우수하여, 페이로니병의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 페이로니병 환자의 정상 조직과 섬유화병변에서 분리된 섬유모세포에서 HDAC7의 발현 양상을 나타낸 RT-PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA를 이용한 HDAC7 유전자 발현억제에 미치는 영향을 나타낸 RT-PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA를 이용한 HDAC7 단백질 발현억제에 미치는 영향을 나타낸 웨스턴블롯 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA를 이용한 HDAC7 유전자 발현억제가 TGF- β 1에 의한 세포외기질 유전자 합성에 미치는 영향을 나타낸 RT-PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA를 이용한 HDAC7 유전자 발현억제가 TGF- β 1에 의한 세포외기질 단백질 합성에 미치는 영향을 나타낸 웨스턴블롯 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA를 이용한 HDAC7 유전자 발현억제가 TGF- β 1에 의한 근섬유모세포로의 분화에 미치는 영향을 나타낸 웨스턴블롯 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA를 이용한 HDAC7 유전자 발현억제가 TGF- β 1에 의한 세포 주기에 미치는 영향을 나타낸 웨스턴블롯 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 히스톤 탈아세틸화효소 7 (Histone deacetylase7, HDAC7)에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 페이로니병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에 따른 HDAC7의 억제제는 음경백막의 섬유화 병변을 감소시키고, 섬유모세포 내 HDAC7의 발현을 억제하여 TGF- β 신호전달경로의 활성을 억제하고, 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 억제함으로써 세포외기질의 합성을 감소시켜 조직섬유화를 억제시키는 효과가 우수하다. 따라서, 본 발명에 따른 HDAC7의 억제제는 페이로니병의 예방 또는 치료에 유용한 의약품 또는 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물에서 유효성분인 HDAC7의 억제제는 HDAC7의 siRNA가 바람직하다.

[0020] 상기 HDAC7의 siRNA는 HDAC7을 만드는 mRNA를 간섭하여 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 짧은 이중사슬 RNA이며, HDAC7의 세포 내 발현을 억제하여 HDAC7의 발현을 억제시킬 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, HDAC7의 억제제는 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법 및 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-derived siRNA 발현 카세트를 세포 안으로 형질전환시키는 방법이 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 실험의 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 페이로니병은 음경 섬유모세포에서 세포외기질의 과도한 생성으로 인한 음경백막의 섬유화병변에 의하여 야기된 것일 수 있다. 이러한 음경백막의 섬유화는 성교시 손상, 당뇨병, 유전적 소인 및 이

들의 조합으로부터 선택된 것에 의하여 야기된 것일 수 있다.

- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 세포외기질 단백질은 플라스미노겐 활성인자 억제제-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1), 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 I(collagen I) 및 콜라겐 IV(collagen IV)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 HDAC7의 억제제를 유효성분으로 하는 조성물과 함께 페이로니병의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 벡스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 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, 비수성용액, 현탁액, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001mg/kg 내지 1000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 페이로니병의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서 “건강기능식품”이란, 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.
- [0031] 본 발명의 HDAC7의 억제제는 페이로니병의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 HDAC7의 억제제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 HDAC7의 억제제를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 HDAC7의 siRNA 억제제는 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료

수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0033] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g 일 수 있고, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g일 수 있다.

[0034] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0035] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1. 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리된 섬유모세포의 일차 배양 및 HDAC7의 siRNA가 세포외기질 단백질의 합성에 미치는 영향

[0038] 섬유모세포에서 HDAC7의 발현 정도 및 HDAC7의 siRNA가 HDAC7 유전자 발현 정도에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 페이로니병 환자의 정상 조직과 섬유화병변 조직으로부터 섬유모세포를 분리하여 일차 배양을 시행하였다. 이후 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA가 TGF-β1에 의한 HDAC7 유전자 발현 억제 및 세포외기질의 생성, 즉 섬유화 반응에 미치는 영향, 세포주기에 미치는 영향을 RT-PCR 및 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0040] 실시예 1-1. 섬유모세포 배양 및 HDAC7의 siRNA의 형질전환(transfection)

[0041] 페이로니병 환자의 정상조직과 섬유화병변 조직에서 분리 배양된 섬유모세포를 25℃에서 10% FBS(fetal bovine serum), 100units/ml 페니실린 및 100μg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium)배지에서 증식시켰다. 세포를 규칙적으로 계대 배양하여 대수적 성장을 유지하였다. 형질전환(transfection) 24시간 전, 약 80%의 세포 충만도(confluency)에서 트립신을 처리한 후 항생제가 포함되어 있지 않은 신선한 배지에서 배양을 유지시켰다. 형질전환은 부착성 세포에 대하여는 제조자의 지시에 따라 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 시약(GIBCO,USA)으로 수행되었다. 섬유모세포가 배양되어 있는 각 웰 당, 100 pmol 농도의 HDAC7의 siRNA(bioneer, Korea, #1067633)를 48시간 동안 처리하였고, 그 후 TGF-β1을 24시간 동안 처리하였다.

[0043] 실시예 1-2. 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA에 의한 HDAC7 유전자 발현 억제

[0044] 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA에 의한 HDAC7 유전자 발현 억제 여부를 확인하기 위하여, HDAC7의 siRNA로 형질전환된 섬유모세포로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0045] HDAC7의 siRNA로 형질전환된 섬유모세포로부터 트리졸(Trizol, Gibbco-BRL, 미국) 방법을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 이때 사용한 모든 용액은 0.1 % 디에틸피로카보네이트처리수(diethyl pyrocarbonate-treated water, DEPC-dH2O)를 처리함으로써 RNA 분해효소 활성을 억제하였다. 배양된 섬유모세포를 PBS로 완전하게 세척한 다음 트리졸(1 ml/1×10⁶ cells) 시약을 첨가하여 피펫팅하여 세포를 분쇄하였다. 상온에서 5분간 방치한 후, 상층액에 200 μl의 클로로포름을 첨가하고 15초 동안 세계 흔들어 섞어준 후, 상온에서 15분간 방치한다. 이후 혼합물을 4℃에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 새 튜브에 상층액만 분리해서 200 μl의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 세계 흔들어서 섞어준 후 얼음이 든 아이스박스에서 10분간 방치하였다. 혼합액은 4

℃에서 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 총 RNA를 획득하였다. RNA 펠렛은 DEPC-dH₂O 처리된 1 ml의 70 % 에탄올로 세척한 후 건조시켰고, DEPC-dH₂O로 재균질화 시킨 뒤 60℃에서 10분 동안 반응시킨 후 -70℃에서 보관하였다. RNA 농도는 동일한 조건하에서 260nm(RNA; 1 OD₂₆₀=40 µg of RNA/ml)와 280nm의 흡광도를 측정하였다.

[0046] 상기 방법으로 추출한 RNA를 역전사하여 HDAC7의 siRNA에 의한 HDAC7 유전자 발현 억제여부를 확인하였다. AccuPower PCR premix를 사용하여 RNA를 42℃에서 90분간 반응시킨 다음, 94℃에서 5분간 배양하여 잔류단백질을 불활성화 시켰다. HDAC7 유전자를 증폭하기 위하여 사용한 프라이머쌍(10 pmole, HDAC7 특이적 프라이머세트: 서열번호 1 및 2)을 각각 1 µl, cDNA를 1 µl, Taq polymerase(5U/µl)를 0.5 µl 넣고 나머지는 증류수로 50 µl가 되도록 첨가한 후, 94℃에서 5분간 반응시킨 후, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 45초간의 반응과정을 30 주기로 수행하였다. 72℃에서 10분간 신장시킨 다음 1% 아가로오스 겔에서 확인하였다. 이때, GAPDH(10 pmole, GAPDH 특이적 프라이머세트: 서열번호 3 및 4)를 대조군으로 사용하였다. 사용한 프라이머 세트의 구체적인 서열을 표 1에 나타내었다. 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

표 1

유전자	서열번호	프라이머	서열 크기 (bp)
Human HDAC7	서열번호 1	F: ATG GGG GAT CCT GAG TAC CT	51
Human HDAC7	서열번호 2	R: GAT GGG CAT CAC GAC TAT CC	
GAPDH	서열번호 3	F: CCA CTG GCG TCT TCA CCA C	503
GAPDH	서열번호 4	R: CCT GCT TCA CCA CCT TCT	

[0050] 도 1에 나타난 바와 같이, RT-PCR 결과, 섬유화병변 조직에서 분리된 섬유모세포에서 정상 음경백막에서 분리된 섬유모세포에 비해 HDAC7의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0051] 도 2에 나타난 바와 같이, RT-PCR 결과, 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 TGF-β 1 처리 후 HDAC7의 siRNA를 처리하였을 때, HDAC7 유전자의 발현이 성공적으로 억제되는 것을 확인하였다.

[0053] 실시예 1-3. 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA가 TGF-β 1에 의한 세포외기질 단백질 합성에 미치는 영향

[0054] 1-3-1. RT-PCR

[0055] 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA가 TGF-β 1에 의한 세포외기질 단백질 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다.

[0056] 상기 실시예 1-1에서의 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포를 이용하여, 플라스미노겐 활성인자 억제제-1(PAI-1), 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 I 및 콜라겐 IV의 프라이머쌍(10 pmole, PAI-1 특이적 프라이머세트: 서열번호 5 및 6, fibronectin 특이적 프라이머세트: 서열번호 7 및 8, 콜라겐 I 특이적 프라이머세트: 서열번호 9 및 10, 콜라겐 IV 특이적 프라이머세트: 서열번호 11 및 12)으로 실시예 1-2와 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 사용한 프라이머 세트의 구체적인 서열을 표 2에 나타내었다. 이때, GAPDH(10 pmole, GAPDH 특이적 프라이머세트: 서열번호 13 및 14)를 대조군으로 사용하였다.

표 2

유전자	서열번호	프라이머	서열 크기 (bp)
Human PAI-1	서열번호 5	F: ACT GGA AAG GCA ACA TGA CC	243
Human PAI-1	서열번호 6	R: TGA CAG CTG TGG ATG AGG AG	
Fibronectin-1	서열번호 7	F: GGG ATG CTC CTG CTG TCA C	384
Fibronectin-1	서열번호 8	R: CTG TTT GAT CTG GAC CTG CA	
콜라겐I	서열번호 9	F: GAC ATG CTC AGC TTT GTG GA	193
콜라겐I	서열번호 10	R: TGA GAG TCT GCC CTC CAA GT	

콜라겐 IV	서열번호 11	F: ACG AGA CAA CAG CAC ACA GG	246
콜라겐 IV	서열번호 12	R: AGG GAT GTG GCA AAA GAA TG	
GAPDH	서열번호 13	F: CCA CTG GCG TCT TCA CCA C	503
GAPDH	서열번호 14	R: CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

[0060] HDAC7 유전자 발현억제 유도 후 이에 따른 TGF- β 1 신호전달에 의한 세포외기질 단백질의 발현여부의 RT-PCR 관찰한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0061] 도 4에 나타난 바와 같이, 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 TGF- β 1을 처리한 결과, TGF- β 1에 의한 세포외기질(플라스미노겐 활성인자 억제제-1, 콜라겐 I, 콜라겐 IV) 유전자 발현이 증가하였고, HDAC7의 siRNA는 TGF- β 1에 의한 세포외기질 중 콜라겐 I 유전자 발현 증가를 성공적으로 억제함을 확인하였다.

[0063] 1-3-2. 웨스턴블롯

[0064] 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA가 TGF- β 1에 의한 세포외기질 단백질 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해서 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0065] 상기 실시예 1-1에서의 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포를 PBS로 완전하게 세척한 다음 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)이 포함된 세포 분해 완충액(RIPA buffer)을 넣고 용해시킨 후 4℃에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액만 회수하였다. 이 용해물을 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 추출된 단백질들은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동한 후 겔 속에 있던 단백질들을 니트로셀로로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 5% 탈지유(skim milk)로 차단(blocking)하였다. 그리고 HDAC7, 플라스미노겐 활성인자 억제제-1(PAI-1), 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 I 및 콜라겐 IV 항체를 사용하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 그 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 다음, 이차항체(HRP-labeled anti-mouse or HRP-labeled anti-rabbit antibody)를 1:200 비율로 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 3회 세척한 후에 발색시켰다.

[0066] HDAC7의 siRNA에 의한 HDAC7 유전자 발현정도를 웨스턴블롯으로 관찰한 결과는 도 3에 나타내었으며, HDAC7 유전자 발현억제 유도 후 이에 따른 TGF- β 1 신호전달에 의한 세포외기질 단백질의 발현여부의 웨스턴블롯 관찰한 결과는 도 5에 나타내었다.

[0067] 도 3에 나타난 바와 같이, 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 TGF- β 1을 처리한 결과 HDAC7 단백질 발현이 증가하였고, HDAC7의 siRNA는 TGF- β 1에 의한 HDAC7 단백질 발현 증가를 성공적으로 억제함을 확인하였다.

[0068] 도 5에 나타난 바와 같이, 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 TGF- β 1을 처리한 결과, TGF- β 1에 의한 세포외기질(플라스미노겐 활성인자 억제제-1, 피브로넥틴, 콜라겐 I, 콜라겐 IV) 단백질 합성이 증가하였고, HDAC7의 siRNA는 TGF- β 1에 의한 세포외기질 단백질 발현 증가를 성공적으로 억제함을 확인하였다.

[0070] 실시예 2. HDAC7의 억제제가 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화에 미치는 영향

[0071] 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 억제제에 의한 HDAC7 유전자 발현억제가 TGF- β 1에 의해 유도되는 근섬유모세포로의 분화에 미치는 영향을 규명하기 위해 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0073] 실시예 2-1. TGF- β 1에 의한 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화에 있어 α -SMA 발현에 미치는 영향

[0074] 상기 실시예 1-1에서의 폐이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포를 이용하여, α -SMA(smooth

muscle α -actin)항체로 실시예 1-3-2과 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다. 결과를 도 6에 나타내었다.

[0075] 도 6에 나타낸 바와 같이, 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에 TGF- β 1을 처리한 결과, 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화를 나타내는 표지인 α -SMA 발현이 현저하게 증가하였고, HDAC7의 siRNA는 TGF- β 1에 의한 α -SMA 발현 증가를 성공적으로 억제함을 확인하였다.

[0077] 실시예 3. HDAC7의 억제제가 세포주기에 미치는 영향

[0078] 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 억제제에 의한 HDAC7 유전자 발현억제가 세포주기에 미치는 영향을 규명하기 위해 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0079] 실시예 3-1. 섬유모세포에서 HDAC7의 siRNA가 TGF- β 1에 의한 Cyclin D1에 미치는 영향

[0080] 상기 실시예 1-1에서의 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포를 이용하여, Cyclin D1 항체로 실시예 1-3-1과 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다. 결과를 도 7에 나타내었다.

[0081] 도 7에 나타낸 바와 같이, 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 TGF- β 1을 처리한 결과, Cyclin D1이 감소하였고, HDAC7의 siRNA는 TGF- β 1에 의한 Cyclin D1의 감소를 성공적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0083] 상기 실시예의 결과들은 페이로니병 환자의 섬유화병변에서 분리 배양된 섬유모세포에서 HDAC7의 억제제를 이용한 HDAC7 유전자 발현억제가 TGF- β 신호전달경로의 억제 및 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화 억제를 통해서 세포외기질 합성, 즉 섬유화 현상을 억제할 수 있음을 명백하게 나타내고 있다. 이는 HDAC7의 억제제를 이용한 HDAC7 유전자 발현억제가 페이로니병의 치료에 유용할 수 있음을 의미한다.

[0085] 이하 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0087] 제제예 1. 약학적 조성물의 제제

[0088] 1-1. 산제의 제조

[0089]	HDAC7 억제제	20 mg
[0090]	유당	100 mg
[0091]	탈크	10 mg
[0092]	상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.	

[0094] 1-2. 정제의 제조

[0095]	HDAC7 억제제	10 mg
[0096]	옥수수전분	100 mg
[0097]	유당	100 mg
[0098]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0099]	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.	

[0101] 1-3. 캡슐제의 제조

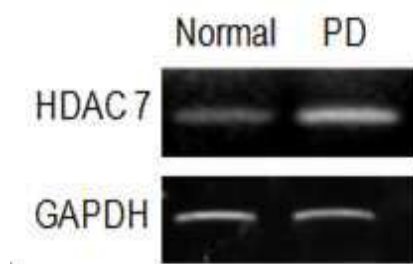
[0102]	HDAC7 억제제	10 mg
--------	-----------	-------

[0103]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0104]	락토오스	14.8 mg
[0105]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0106]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0108]	<u>1-4. 주사제의 제조</u>	
[0109]	HDAC7 억제제	10 mg
[0110]	만니톨	180 mg
[0111]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0112]	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	26 mg
[0113]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0115]	<u>1-5. 액제의 제조</u>	
[0116]	HDAC7 억제제	20 mg
[0117]	이성화당	10 g
[0118]	만니톨	5 g
[0119]	정제수	적량
[0120]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0122]	제제예 2. 식품 조성물의 제제	
[0123]	<u>2-1. 건강식품의 제조</u>	
[0124]	HDAC7 억제제	100 mg
[0125]	비타민 혼합물	적량
[0126]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0127]	비타민 E	1.0 mg
[0128]	비타민 B1	0.13 mg
[0129]	비타민 B2	0.15 mg
[0130]	비타민 B6	0.5 mg
[0131]	비타민 B12	0.2 μg
[0132]	비타민 C	10 mg
[0133]	비오틴	10 μg
[0134]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0135]	엽산	50 μg
[0136]	판토텐산 칼슘	0.5 mg

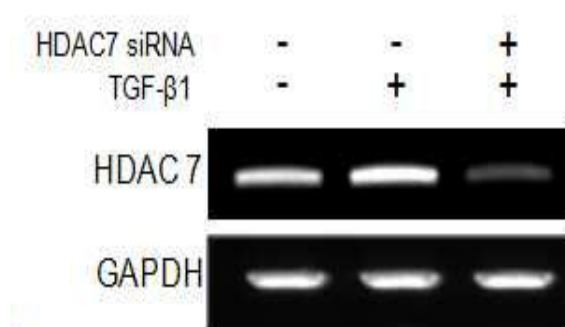
[0137]	무기질 혼합물	적량
[0138]	황산제1철	1.75 mg
[0139]	산화아연	0.82 mg
[0140]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0141]	제1인산칼륨	15 mg
[0142]	제2인산칼슘	55 mg
[0143]	구연산칼륨	90 mg
[0144]	탄산칼슘	100 mg
[0145]	염화마그네슘	24.8 mg
[0146]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0148]	<u>2-2. 건강음료의 제조</u>	
[0149]	HDAC7 억제제	100 mg
[0150]	비타민 C	15 g
[0151]	비타민 E(분말)	100 g
[0152]	젖산철	19.75 g
[0153]	산화아연	3.5 g
[0154]	니코틴산아미드	3.5 g
[0155]	비타민 A	0.2 g
[0156]	비타민 B1	0.25 g
[0157]	비타민 B2	0.3 g
[0158]	물	정량
[0159]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0161]	상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

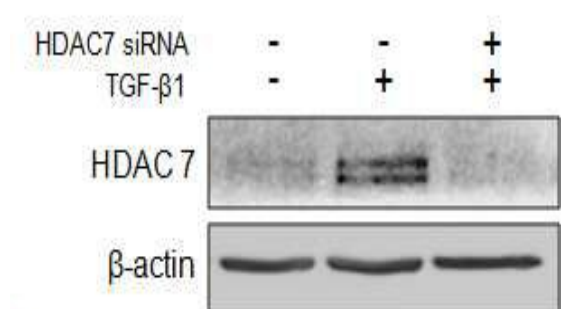
도면1



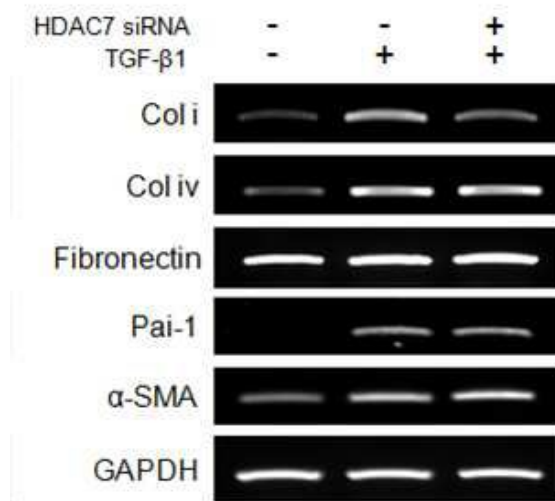
도면2



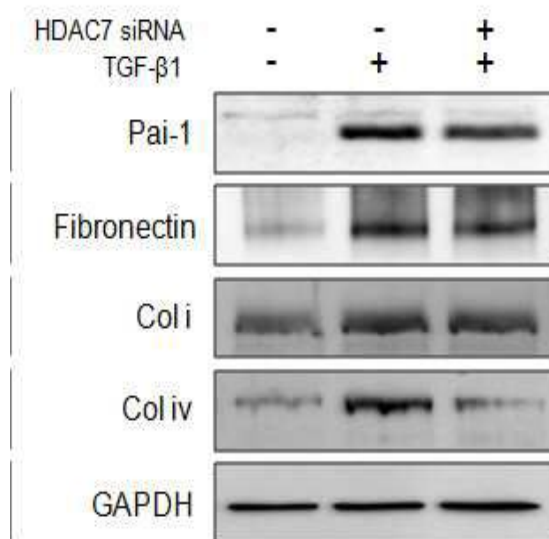
도면3



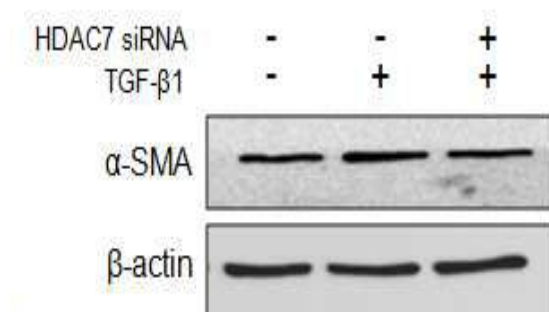
도면4



도면5



도면6



도면7

