



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0129528

(43) 공개일자 2015년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4412 (2006.01) A61K 31/44 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01) A61P 11/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0056657

(22) 출원일자 2014년05월12일

심사청구일자 2014년05월12일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이흥만

서울특별시 강남구 삼성로 150, 107동 1307호 (대치동, 미도아파트)

조정선

서울특별시 양천구 신정로13길 50, 101동 403호 (신월동, 벽산아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제한

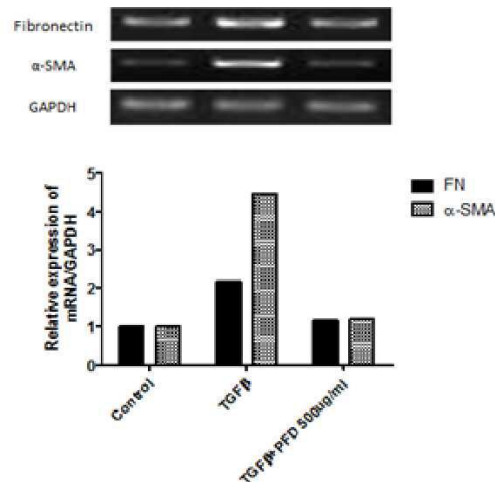
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **퍼페니돈을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 퍼페니돈을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염 및 비용종(nasal polyp)이 동반되지 않은 만성 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 퍼페니돈을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물은 TGF- β 발현 억제를 통하여, 섬유세포에서 근섬유모세포로의 분화 및 세포외물질 침착을 감소시키는 효과가 있으므로, 만성 비부비동염의 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

퍼페니돈 (pirfenidone)을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비부비동염은 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비부비동염은 비용종(nasal polyp)이 동반되지 않은 만성 비부비동염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 하기 특성 중 하나 이상을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물:

- 1) 세포내 TGF- β 의 발현을 억제;
- 2) 피브로넥틴 및 알파-평활근 액틴의 발현을 억제;
- 3) 콜라겐 생성을 억제;
- 4) Smad2/3의 인산화를 억제;
- 5) 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화를 억제; 및
- 6) 섬유모세포에 세포외물질 침착을 억제.

청구항 5

제1항에 있어서, 국소 적용(topical application) 제형인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 국소 적용(topical application) 제형은 용액, 크림, 로션, 젤, 에멀전, 연고, 페이스트 및 스프레이인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 보존제, 착색제, 침투 촉진제, 풍미제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 퍼페니돈을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염 및 비용종(nasal polyp)이 동반되지 않은 만성 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 비부비동염(rhinosinusitis)은 전 세계적으로 가장 흔한 질환 중 하나이지만, 아직까지 명확한 정의나 분류 기준이 정해져 있지 않다. 만성 비부비동염 환자는 삶의 질의 저하로 고통받고, 이러한 증후군은 천식, 습진 및 중이염 같은 다른 심각한 질병과 관련되어 있다.
- [0003] 만성 비부비동염은 형태에 따라 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염과 비용종(nasal polyp)이 동반되지 않은 만성 비부비동염으로 나뉜다. 비용종은 많은 경우 비부비동염 및 만성 비부비동염의 원인이며, 알러지성 비염, 급성 및 만성 비염 또는 바이러스성 또는 세균성 감염에 의해 야기될 수 있다.
- [0004] 코내시경의 도입으로 비부비동염의 안전한 수술적 접근이 가능해짐에 따라, 비부비동염의 치료에서 내시경하 부비동 수술이 기준으로 자리잡는 듯 하였으나, 다양한 병인으로 인한 작은 재발로 인해 많은 환자들이 고통받고 있다. 만성 부비동염의 재발 방지 및 억제제를 위해, 경구 스테로이드 요법이나 저용량 마이크로이드계 항생제 장기요법 등이 시행되고 있으나, 스테로이드 부작용 및 항생제 오남용의 문제 때문에 적극적인 사용이 어려운 실정이다. 따라서, 보다 안전하고 효과가 우수한 난치성 만성 비부비동염의 치료제의 개발이 필요하다.
- [0005] 퍼페니돈(pirfenidone)은 $C_{12}H_{11}NO$ 의 화학식으로 표기되며 화학명 5-메틸-1-페닐-2-(1H)-피리돈인 분자량 185.23의 비펩타이드 합성 분자이다(Okazaki *et al.*, *Pulm Pharmacol Ther.* 26:603-8, 2013; Bizargity *et al.*, *Transplantation* 94:114-22, 2012). 퍼페니돈은 항섬유화, 항염증 및 항산화의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, TGF- β (Park *et al.*, *Am J Rhinol Allergy* 24:348-53, 2010; Clarke *et al.*, *Trends Cell Biol* 18:430-42, 2008)와 TIMP의 발현을 억제하고, PDGF의 증식효과를 저해하며, 전염증 사이토카인(TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10 등)의 분비를 억제한다. 이러한 효과에 근거하여 퍼페니돈은 특발성 폐섬유증에 사용되고 있는 약물이다.
- [0006] 하지만, 퍼페니돈이 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염 및 비용종(nasal polyp)이 동반되지 않은 만성 비부비동염의 예방 및 치료 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 퍼페니돈이 만성 비부비동염의 치료에서 근섬유모세포로의 분화 및 콜라겐 침착을 억제하는 효과를 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 퍼페니돈을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명에 있어서, 상기 비부비동염은 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염 또는 비용종(nasal polyp)이 동반되지 않은 만성 비부비동염인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0011] 본 발명에 있어서, 상기 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 갖는다.
- [0012] 1) 세포내 TGF- β 의 발현을 억제;

- [0013] 2) 피브로넥틴 및 알파-평활근 액틴의 발현을 억제;
- [0014] 3) 콜라겐 생성을 억제;
- [0015] 4) Smad2/3의 인산화를 억제;
- [0016] 5) 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화를 억제; 및
- [0017] 6) 섬유모세포에 세포외물질 침착을 억제.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물은 국소 적용(topical application) 제형인 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 퍼페니돈을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물은 TGF- β 발현 억제를 통하여, 섬유세포에서 근섬유모세포로의 분화 및 세포외물질 침착을 감소시키는 효과가 있으므로, 만성 비부비동염의 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 코 조직 유래 섬유모세포에서 퍼페니돈(pirfenidone, PFD)의 독성 정도를 확인한 결과이다.
- 도 2는 퍼페니돈에 의한 피브로넥틴 및 알파-평활근액틴의 발현 억제를 유전자 수준에서 확인한 결과이다.
- 도 3은 퍼페니돈에 의한 피브로넥틴 및 알파-평활근액틴의 발현 억제를 단백질 수준에서 확인한 결과이다.
- 도 4는 퍼페니돈에 의한 근섬유모세포로의 분화 억제효과를 면역형광 세포화학 염색법으로 확인한 결과이다.
- 도 5는 퍼페니돈에 의한 콜라겐 생성 억제 효과를 단백질 수준에서 확인한 결과이다.
- 도 6은 퍼페니돈이 TGF- β 에 의해 활성화되는 Smad2/3의 인산화를 억제하는 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0022] 만성 비부비동염은 TGF- β 의 발현이 증가되어, 섬유모세포에서 근섬유모세포로의 분화와 세포외물질 침착을 특징으로 한다. 이에, 본 발명자들은 TGF- β 의 발현이 증가된 섬유모세포에서 퍼페니돈에 의한 근섬유모세포로의 분화와 세포외물질 침착 억제 효과를 확인하였다.
- [0023] 본 발명은 일 관점에서, 퍼페니돈 (pirfenidone)을 유효성분으로 함유하는 비부비동염의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명의 퍼페니돈 (pirfenidone)은 항섬유화, 항염증 및 항산화 효과를 갖는 화합물로, 상기 퍼페니돈 (pirfenidone)은 $C_{12}H_{11}NO$ 의 화학식으로 표기되며 화학명 5-메틸-1-페닐-2-(1H)-피리돈인 분자량 185.23의 비펩타이드 합성 분자이다.
- [0025] 본 발명의 비부비동염은 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염 또는 비용종(nasal polyp)이 동반되지 않은 만성 비부비동염인 것을 특징으로 할 수 있으며, 세포외물질 침착 억제 효과에 의해 비용종(nasal polyp)이 동반된 만성 비부비동염에 적용되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 1) 세포내 TGF- β 의 발현을 억제;
- [0028] 2) 피브로넥틴 및 알파-평활근 액틴의 발현을 억제;

- [0029] 3) 콜라겐 생성을 억제;
- [0030] 4) Smad2/3의 인산화를 억제;
- [0031] 5) 섬유모세포의 근섬유모세포로의 분화를 억제; 및
- [0032] 6) 섬유모세포에 세포외물질 침착을 억제.
- [0033] 본 발명의 조성물은 섬유모세포에 세포외물질 침착을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 콜라겐 침착을 억제하는 효과가 우수하다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 국소 적용(topical application) 제형인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "국소 적용"은 일반적으로 주위에 노출된 신체상의 표면에 대한 투여를 포함하는, 이의 가장 넓은 개념으로 사용되며, 비강 및 구강 통로뿐만 아니라 피부를 포함한다. 따라서, 국소 적용은 비강 통로에 대한 적용, 구강(상부 및 하부 포함)에 대한 적용 및 피부에 대한 적용을 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 환제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수용액제, 현탁액 및 동결 건조제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다. 상기 국소 적용(topical application) 제형은 용액, 크림, 로션, 젤, 에멀전, 연고, 페이스트, 폼(거품) 및 스프레이인 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 비강 스프레이 형태이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 추가적으로 약학적으로 허용되는 다른 성분, 즉, 비강에 적용될 수 있는 제형을 제조하는데 유용한 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 국소 스프레이 제형은 담체, 부형제, 보존제, 착색제, 침투 촉진제, 풍미제 또는 희석제 등의 추가적인 성분을 포함할 수 있다.
- [0037] [실시예]
- [0038] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0039] **실시예 1: 섬유모세포의 분리 배양 및 퍼페니돈의 독성 확인**
- [0040] 수술과정에서 채취된 만성 비부비동염 조직의 epithelium은 제거하고 subepithelial 부위를 취한 후, 1mm³ 크기로 절단하여 Dulbeccos Modified Eagles medium(DMEM)과 10% fetal bovine serum(FBS), 100units/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신을 첨가한 배지에서 배양하였다. 배양용 접시에 조직이 부착된 후, 단층을 형성하면 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA로 37℃에서 5분간 처리하여 세포들을 분리하였다. 분리된 세포를 얻어 다시 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 계대배양 하였다.
- [0041] 배양된 세포에 퍼페니돈을 농도별 (0-2000 μg/ml)로 처리하여 MTT assay를 통해 만성 비부비동염 섬유모세포에 대한 퍼페니돈의 세포독성 분석을 실시한 후, 세포독성이 미치지 않는 범위의 농도를 선정하였다.
- [0042] 그 결과, 퍼페니돈 1000 μg/ml의 농도까지 세포독성은 나타나지 않았다(도 1).
- [0043] **실시예 2: 섬유모세포에서 분화 및 세포외기질 축적 억제 효과를 유전자 수준에서 확인**
- [0044] 코 조직 유래 섬유모세포에 TGF-β (5ng/ml)를 처리하여 근섬유모세포로의 분화를 유도하여 양성 대조군으로 사용하였다. TGF-β (5ng/ml)와 퍼페니돈(500 μg/ml)을 동시에 12시간 동안 처리하여, 퍼페니돈에 의한 근섬유모세포로의 분화 및 세포외기질 축적 억제를 유전자 수준에서 확인하였다. 도 2는 세포외기질 중 하나인 피브로넥틴과 근섬유모세포로의 분화표지자인 알파 평활근 액틴의 mRNA 발현이 퍼페니돈에 의해 억제되는 것을 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통해 확인한 결과이다.
- [0045] **실시예 3: 섬유모세포에서 분화 및 세포외기질 축적 억제 효과를 단백질 수준에서 확인**

[0046] 실시예 2와 같이, TGF- β (5ng/ml) 및 TGF- β (5ng/ml)와 퍼페니돈(500 μ g/ml)을 동시에 48시간 동안 처리 한 후, 퍼페니돈에 의한 근섬유모세포로의 분화 및 세포외기질 축적 억제를 단백질 수준에서 확인하였다. 도 3은 세포외기질중 하나인 피브로넥틴과 근섬유모세포로의 분화표지자인 α 1(I)와 평활근 액틴의 단백질 발현이 퍼페니돈에 의해 억제되는 것을 웨스턴 블롯팅을 통해 확인한 결과이다.

[0047] 실시예 4: 면역형광 세포화학 염색법을 이용한 섬유모세포에서 퍼페니돈에 의한 분화 억제 효과 확인

[0048] 실시예 2와 같이, TGF- β (5ng/ml) 및 TGF- β (5ng/ml)와 퍼페니돈(500 μ g/ml)을 동시에 48시간 동안 처리 한 후, 퍼페니돈에 의한 근섬유모세포로의 분화 및 세포외기질 축적 억제를 면역형광 세포화학 염색법으로 확인하였다. 도 4는 근섬유모세포에서 세포외기질중 하나인 피브로넥틴과 근섬유모세포로의 분화표지자인 α 1(I)와 평활근 액틴의 단백질 발현 정도와 위치를 확인한 결과이다.

[0049] 실시예 5: 섬유모세포에서 콜라겐 생성 억제 효과를 단백질 수준에서 확인

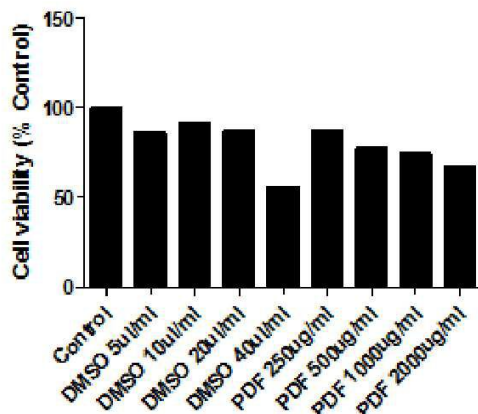
[0050] 본 실시예에서는 만성 비부비동염 섬유모세포에 TGF- β (5ng/ml)을 단독으로 처리하거나, TGF- β (5ng/ml)와 함께 퍼페니돈(500 μ g/ml)을 48시간 동안 처리한 후, TGF- β 에 의해 유도된 세포외기질 중 하나인 콜라겐 생성 억제 효과를 sircol collagen assay를 통해 단백질 수준에서 확인한 후 정량화 하였다(도 5).

[0051] 실시예 6: 섬유모세포에서 퍼페니돈에 의한 Smad2/3의 인산화 억제 효과 확인

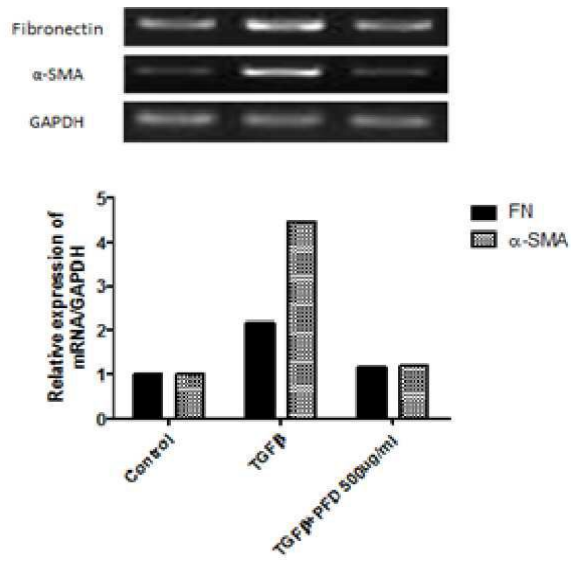
[0052] 본 실시예에서는 만성 비부비동염 섬유모세포에 TGF- β (5ng/ml)을 단독으로 처리하거나, TGF- β (5ng/ml)와 함께 퍼페니돈(500 μ g/ml)을 60분 동안 처리한 후, TGF- β 에 의해 활성화 되는 Smad2/3의 인산화를 퍼페니돈이 억제하는 것을 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다(도 6).

도면

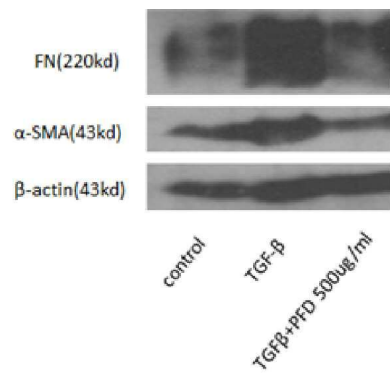
도면1



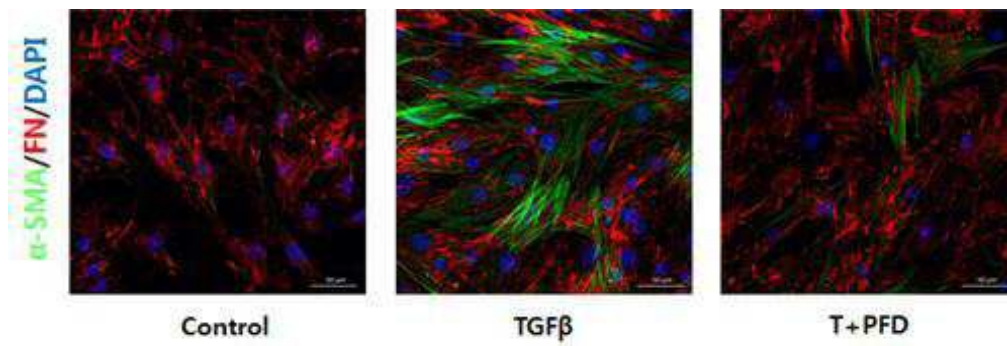
도면2



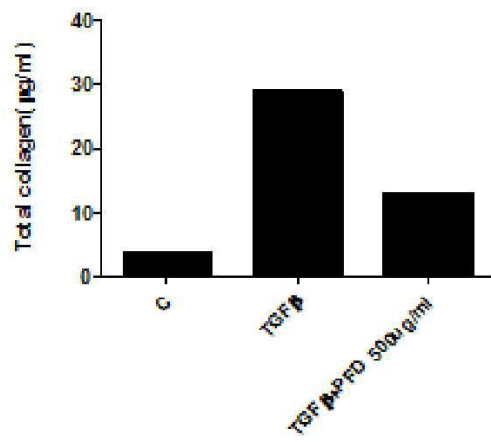
도면3



도면4



도면5



도면6

