(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0013375
(43) 공개일자 2019년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/415 (2006.01) *A61K 31/165* (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/415 (2013.01)
A61K 31/165 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0106015
(22) 출원일자 2017년08월22일
심사청구일자 2017년08월22일
(30) 우선권주장
1020170095330 2017년07월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김준범
서울 영등포구 버드나루로7길 12, 한림대학교 한강성심병원 소아청소년과
(74) 대리인
강성혜

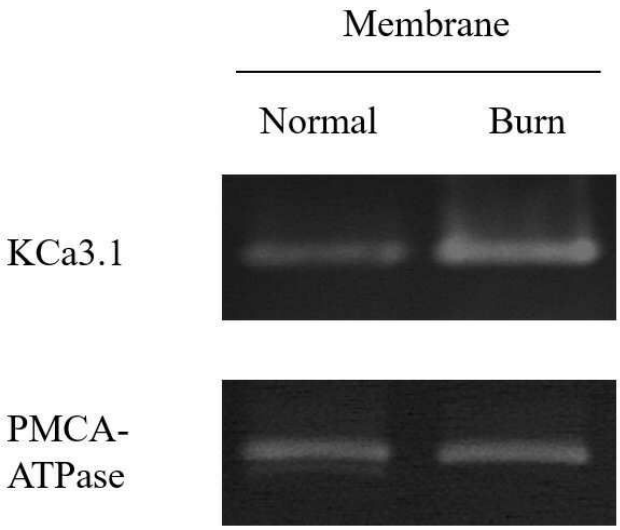
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **TRAM-34를 함유하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 TRAM-34, 세니카포크, 클로트리마졸과 같은 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 억제제를 함유하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2a



(52) CPC특허분류
A61K 31/4164 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1D1A1B03029731
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야 기초연구사업 기본연구지원사업
연구과제명 화상 후 비후성 반흔 형성 억제를 위한 TRAM-34의 치료 효과 및 Calpain의 병태생리학적 역할 규명
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

$K_{ca}3.1$ 채널 활성 억제제를 함유하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 억제제는 $K_{ca}3.1$ 채널 선택적 차단제임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 $K_{ca}3.1$ 채널 선택적 차단제는 TRAM-34, 세니카포크 (Senicapoc) 및 클로트리마졸 (Clotrimazole) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제가 $K_{ca}3.1$ 채널에 결합하는 항 $K_{ca}3.1$ 채널 항체임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 항 $K_{ca}3.1$ 채널 항체는 서열번호 1번의 아미노산 서열을 항원결정부위로 하여 생산된 것임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 비후성 반흔은 수술후 반흔, 화상 켈로이드, 켈로이드, 화상후 비후성 반흔, 외상후 켈로이드, 경피적 심장동맥 성형술 후 재협착증 또는 비후성 반흔 판누스임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 $K_{ca}3.1$ 채널 선택적 차단제를 함유하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화상 후 비후성 반흔은 화상 이후 상처가 회복되는 과정에서 흉터가 위로 불거져 나오는 것을 말한다. 화상 후 비후성 반흔의 발생비율은 화상환자의 60%~90%로 발생 빈도가 매우 높아 화상환자들의 육체적, 정신적 고통과 경제적 피해는 매우 크고 심각한 사회적 문제이다. 비후성 반흔은 화상 상처가 치유되면서 1~2주 경부터 생겨나기 시작해, 대부분 4~6개월, 길게는 2년까지 자라며 다양한 증상을 동반하는데, 치료를 하지 않으면 영구적으로 남아 이차적인 피부 구축 (contraction)과 관절 구축을 초래한다. 또한, 정상 피부와 달리 땀샘이나, 지방샘, 모발, 모낭 등 피부 부속기를 포함하지 않아 경미한 자극에도 쉽게 상처가 생기고 잘 아물지 않는다. 화상 후 비후성 반흔은 보기에 흉할 뿐만 아니라 통증과 가려움증 등 다양한 감각 이상을 동반하며 부위에 따라 심각한 기능 장애를 초래한다.

[0003] 화상 후 비후성 반흔은 화상환자들에게서 나타나는 매우 흔하고 심각한 문제이지만 아직까지 정확한 발병 기전과 정립된 효과적인 치료방법이 없어 명확한 병태생리학적 발생기전 규명과 그 기전에 근거한 병증 특이적 치료제 개발이 시급한 실정이다.

[0004] 다양한 자극에 대해 세포는 세포막과 소포체막에 위치한 칼슘채널을 통해 세포질내 칼슘 농도를 증가시킨다. 증가한 세포질내 칼슘 이온은 세포막에 위치한 K_{ca} 채널 (calcium-activated potassium channel)을 활성화하여 세포막을 탈분극시키고 세포의 증식과 이동 등 다양한 형태의 반응을 가능하게 한다.

[0005] 화상 후 비후성 반흔형성의 원인은 섬유아세포의 과다증식과 세포외 기질인 타입 III 콜라겐의 과다분비 (1) 때문인데, $K_{ca}3.1$ 채널은 섬유아세포에 특이적으로 분포하는 K_{ca} 채널의 일종으로 섬유아세포의 활성에 주된 기능을 담당한다.

[0006] $K_{ca}3.1$ 채널에 선택적으로 부착해 기능을 억제하는 '선택적 차단제' 로 잘알려진 TRAM-34는 기존 연구들에서 신장 조직의 항섬유화 작용, 폐조직의 항섬유화 작용, 혈관신생성 억제효과, 항동맥경화 작용 등이 보고되었으나 (2-5), 아직 화상환자에서 화상 후 비후성 반흔 형성과 관련된 연구는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Oliveira GV et al., Hypertrophic versus non hypertrophic scars compared by immunohistochemistry and laser confocal microscopy: type I and III collagens. Int Wound J. 2009; 6: 445-52

(비특허문헌 0002) Huang C et al., KCa3.1 mediates activation of fibroblasts in diabetic renal interstitial fibrosis. Nephrol Dial Transplant. 2014; 29: 313-24.

(비특허문헌 0003) Roach KM et al., The K+ channel KCa3.1 as a novel target for idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One. 2013; 8: e85244

(비특허문헌 0004) Kohler R et al., Blockade of the intermediateconductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. Circulation 2003; 108: 1119-1125

(비특허문헌 0005) Wulff H et al., Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. Curr Med Chem 2007; 14: 1437-1457

(비특허문헌 0006) Jensen BS et al., Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca(2+)-activated K(+) channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 10917-21

(비특허문헌 0007) Arakawa M et al., Increased collagen synthesis accompanying elevated m-RNA levels in cultured Werner's syndrome fibroblasts. J Invest Dermatol 1990; 94:187-90.

(비특허문헌 0008) Kim JB et al., Expression patterns of two potassium channel genes in skeletal

muscle cells of patients with familial hypokalemic periodic paralysis. Neurol India 2011;59:527-31.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 좀 더 효과적인 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 섬유아세포는 세포 손상시 반흔 형성에 주된 역할을 담당한다. 본 발명에서는 섬유아세포에 널리 분포하며 증가한 세포내 칼슘 농도에 의한 세포 활성에 주된 기능을 수행하는 중간 전도도 $K_{ca}3.1$ 채널 (intermediate-conductance K_{ca} channel)의 선택적 억제제 (selective blocker)인 TRAM-34 등을 이용해 화상 후 비후성 반흔 형성 억제를 통한 새로운 치료제 개발 가능성을 확인하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 좀 더 효과적인 화상후 비후성 반흔 치료용 약학 조성물을 개발하기 위하여 연구한 결과, 화상 세포에서는 정상 세포와 비교하여 현저히 높은 세포질 칼슘 이온 농도가 나타남을 처음으로 확인하였고, 정상 세포와 비교하여 화상 섬유아세포의 막 분획에서는 $K_{Ca}3.1$ 발현이 현저히 높았고 (1.43 ± 0.12, $P<0.01$), 세포질 분획에서는 낮았다 (0.64 ± 0.25, $P<0.01$). 이와 같은 실험 결과를 근거로 하여 화상 세포막의 $K_{Ca}3.1$ 채널 활성을 억제하면 화상 이후 섬유아세포의 과도한 활성으로 인한 섬유아세포의 과다 증식 및 세포외 기질인 타입 III 콜라겐의 과다생성을 억제해 비후성 반흔 형성을 예방하거나 치료하는 효과가 있을 것으로 예측하였다.

[0011] 본 발명은 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제를 포함하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제가 $K_{ca}3.1$ 채널 선택적 차단제임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제가 $K_{ca}3.1$ 채널에 결합하는 항 $K_{ca}3.1$ 채널 항체임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 항 $K_{ca}3.1$ 채널 항체가 서열번호 1번의 아미노산 서열을 항원결정부위로 하여 생산된 것임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 $K_{ca}3.1$ 채널 선택적 차단제가 TRAM-34, 세니카포크 (Senicapoc)(3) 및 클로트리마졸 (Clotrimazole)(6) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 비후성 반흔이 수술후 반흔, 화상 켈로이드, 켈로이드, 화상후 비후성 반흔, 외상후 켈로이드, 경피적 심장동맥 성형술 후 재협착증 또는 비후성 반흔 판누스임을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제를 유효성분으로 함유하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.

[0018] 본 발명의 조성물은 상기 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제를 유효성분으로 함유하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한 $K_{ca}3.1$ 채널 단백질에 대한 억제제를 포함하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. $K_{ca}3.1$ 채널 억제제로는 $K_{ca}3.1$ 채널 선택적 차단제인 TRAM-34, 세니카포크 (Senicapoc) 및 클로트리마졸 (Clotrimazole) 중 선택된 1종 이상 등을 들 수 있다.

[0020] 상기 $K_{ca}3.1$ 채널 단백질에 대한 억제제는 $K_{ca}3.1$ 채널 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 단백질에 대한 단일

클론 항체는 당업계에 통상적인 단일클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 단일클론 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다. 항체의 일례로는 랫트 KCNN4 (accession number Q9QYW1)의 아미노산 잔기 350-363에 해당하는 펩타이드 RQVRLKHRKLREQV(C)(서열번호 #1)를 항원결정부위로 하여 생산된 단일클론항체 또는 폴리클론항체를 사용한다.

[0021] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 단백질에 대한 억제제가 항체일 경우 약제학적으로 허용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 기술자에게 잘 알려진 화학요법약제 (chemotherapeutic agent)를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 상기 유효 성분 외에도 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 가용화제 등이 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0025] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 피하 투여, 근육 투여 또는 국소적용(topical application)할 수 있으며, 용량은 일일 투여량이 0.001㎍~10㎎/㎏의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제를 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 $K_{ca}3.1$ 채널 활성 저해제를 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.

[0027] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0028] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 약제 제제 형태는 연고, 크림제, 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0029] 본 발명의 유방암 증식 및 전이 억제용 조성물 또는 항암제 내성 유방암 치료 보조제는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 동맥 내, 복강 내, 흉골 내, 경피, 비측 내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구 내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0030] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서, "유효량"은 비후성 반흔 형성을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 본 발명의 유효 성분의 "유효량"은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 억제제를 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1㎎/㎏~10㎎/㎏, 상기 단백질에 대한 단일클론 항체일 경우 0.1㎎/㎏~10㎎/㎏의 용량으로 투여하는 것이 바람

직하다.

[0031] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 좀 더 명확해진다.

[0032] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 조성물은 단독으로, 또는 레이저 치료, 화학 치료 등과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따르면, 정상 세포와 비교하여 화상 섬유아세포의 막 분획에서는 $K_{Ca}3.1$ 채널 단백질 발현이 현저히 높게 나타나, 화상 세포 막의 $K_{Ca}3.1$ 채널 활성을 억제하면 화상 이후 섬유아세포의 과도한 활성으로 인한 섬유아세포의 과다 증식과 세포외 기질 합성을 억제해 비후성 반흔 형성을 예방하거나 치료하는 효과가 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 Fura-2AM (fura-2-acetoxymethyl ester) 염색과 유동 세포 분석법 (flow cytometry)으로 섬유아세포 내의 세포질 칼슘 수준을 측정한 것이다. 도 1a와 도 1b는 각각 화상세포가 정상 세포에 비하여 세포질에서 칼슘 이온농도가 현저히 높음을 보여주는 히스토그램과 막대그래프이다. $^{*}P<0.01$은 정상 시료와 비교한 것이다.

도 2a는 정상 세포 및 화상 세포의 막 분획에서 $K_{Ca}3.1$ 단백질을 웨스턴 블롯팅 분석한 결과이다. 도 2b는 $K_{Ca}3.1$ 단백질을 밀도계로 분석한 것이다. 각 값은 배수 변화 (fold-change)로 나타내었다. 정상 세포는 1로 나타낸다. $^{*}P<0.01$은 정상 세포와 비교한 것이다. 플라즈마 막 Ca^{2+} ATPase (PMCA ATPase)가 막 단백질의 로딩 대조군으로 사용되었다.

도 3a는 정상 세포와 화상 세포의 세포질 분획에서 $K_{Ca}3.1$ 단백질을 웨스턴 블롯 분석한 결과이다. 도 3b는 상기 도 3a의 결과를 밀도계로 분석한 결과이다. 각 값은 배수 변화 (fold-change)로 나타내었다. 정상 세포는 1로 나타낸다. $^{*}P<0.01$은 정상 세포와 비교한 것이다. β-액틴을 세포질 단백질의 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 4a와 도 4b는 각각 화상 세포에서 TRAM-34 처리가 타입 Ⅲ 콜라겐 mRNA와 단백질 수준을 투여량 의존적으로 감소시킴을 보여주는 실시간 RT-PCR (도 4a)과 웨스턴 블롯 및 밀도계 분석(도 4b) 결과이다. 담체는 DMSO로 처리한 화상 세포를 나타내며, 이는 상대적 밀도 100%로 정의되었다. Normal vehicle은 DMSO로 처리한 정상 세포를 말한다. $^{*}P<0.01$은 정상 세포와 비교한 것이다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0036] **1. 피험자**

[0037] 화상 후 1-2주 되고, 한림대학교 한강성심병원에서 외과 수술을 받은 36명 환자의 외상 부위 피부조직과 그 환자의 정상 피부조직을 채취하였다. 환자들은 체표면적 전체의 20% 이상에 3도 화상을 입었고, 나이는 6~18세였다. 모든 환자에게서 조직 제공에 관하여 서면 동의를 받았고, 연구는 한림대학교 부속 한강성심병원의 임상시험심사위원회의 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0038] **2. 피부조직 채취 등**

[0039] 피부조직 시료를 채취하고 70% 에탄올로 세 번 씻은 다음 Ca^{2+}-Mg^{2+} 및 항생제와 항진균제가 함유된 차가운 PBS에 두었다 (Gibco, Life Technologies, Waltham, MA, USA). 피하지방과 느슨한 결합조직은 미세한 핀셋과 메스를 이용하여 제거하였다. 조직은 폭을 약 3-4mm가 되는 작은 조각으로 만들고 10㎖ 디스페이즈 (dispase) Ⅱ 용액 (1U/㎖) (Gibco, Life Technologies)을 함유한 50 ㎖ 코니칼 튜브로 옮기고 4℃에서 16시간 동안 유지하였

다. 분해반응 후, 진피와 표피를 소독한 핀셋으로 당기거나 벗겨내었다. 분리된 진피는 콜라게네이즈 타입 IV 용액 (500U/㎖) (Gibco, Life Technologies)으로 37℃에서 30분간 분해하였다. 이후 시료는 10% 우태혈청, 2μM 글루타민 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% 비필수 아미노산 (Thermo Scientific), 0.1mM β-머캅토에탄올 (Sigma-Aldrich), 5-ng/mL 섬유아세포 성장인자 기반 재조합 인간 단백질 (fibroblast growth factor-basic recombinant human protein, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Caisson, Logan, UT, USA)이 함유된 DMEM 배지 (Thermo Scientific, Marietta, OH, USA)에 넣어 콜라게네이즈를 불활성화하고, 여과한 다음 300 x g로 5분간 원심분리했다. 침전은 10% FBS 함유 DMEM에 재현탁하고 하루 동안 37℃로 95% 공기, 5% CO_2 함유 배양기 (Thermo Scientific)에서 배양하였다. 다음날 섬유아세포를 모든 실험에 사용하였다. 세포는 0.1μM, 1μM 또는 10μM TRAM-34 (1-[(2-chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (DMSO 용액으로 제조된 것); Sigma-Aldrich)에 24시간 동안 노출된 다음 배양 상층액, 총 RNA 및 세포 용균액을 각각 모았다.

[0040] **3. 세포질 칼슘 수준 측정**

[0041] 세포질 칼슘 수준은 막 투과성 칼슘-민감성 형광 안료인 Fura-2AM (fura-2-acetoxymethyl ester)(Sigma-Aldrich)을 이용하여 분석하였다. 정상 및 화상 세포를 모두 4 mM 칼륨 완충액에 희석한 1μM Fura-2AM에 로딩하고 30분 동안 CO_2 배양기에 넣어두었다. 잔여 안료를 제거하기 위하여 칼륨 완충액으로 씻은 다음, 세포를 트립신 EDTA (Caisson)로 처리했다. 이후, 세포를 모아 Ca^{2+}가 없는 PBS로 세척하고, 유동 세포 분석법으로 분석하였다 (Millipore, Billerica, MA, USA). 모든 실험 프로토콜은 세 번 수행하였다.

[0042] **4. 정량적 역전사 PCR 분석**

[0043] TRIzol 시약 (Invitrogen)을 이용하여 섬유아세포로부터 총 RNA를 추출하고, 제조자의 지시에 따라 SuperScript III 역전사효소 (Invitrogen)를 이용하여 총 RNA 100 ng을 cDNA로 전환하였다. AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejun, Korea)를 반응 혼합물에 가하고, $K_{Ca}3.1$ 채널 유전자 *KCNN4*와 타입 III 콜라겐 유전자 *COL3A1*에 대한 프라이머를 이용하여 정량적 역전사 PCR 분석을 수행하였다. 프라이머는 VectorNTI10 (Invitrogen) 및 Primer3 소프트웨어 (http://sourceforge.net/projects/primer3/)를 이용하여 디자인하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 95℃로 5분간 첫 변성 단계, 이후 95℃로 30초간, 55℃로 30초간, 72℃로 1분간을 30회 반복, 마지막으로 72℃로 5분간 최종 연장. 모든 반응은 세 번 수행하였다. 각 유전자의 mRNA 발현 수준은 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 발현에 대해 표준화하였다.

[0044] **5. 웨스턴 블롯 분석**

[0045] 단백질분해효소 저해제가 함유된 RIPA 완충액 (Roche, 독일) 내의 배양 상층액과 세포 용균액에서 타입 III 콜라겐을 측정하였다. $K_{Ca}3.1$의 발현 패턴을 평가하기 위하여 정상 세포와 화상 세포의 세포질 단백질 분획과 막 단백질 분획을 분리하여 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 분획 및 웨스턴 블롯 분석의 구체적인 방법은 종래 논문에 기술된 바와 같다 (2). 채널 단백질을 탐지하기 위하여 $K_{Ca}3.1$에 대한 일차 항체 (IK1 [D-5]), 타입 III 콜라겐에 대한 일차 항체, β-액틴에 대한 일차 항체 (β-actin [C4]) 및 플라즈마 막 Ca^{2+} ATPase에 대한 일차 항체 (PMCA ATPase [5F10])를 항염소, 항마우스 또는 항토끼 이차항체와 조합하여 사용하였다. 단백질은 제조자의 지시에 따라 TINA 2.0 밀도분석 시스템 (Raytest Isotopenmeβgerate GmbH, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 정량하였다. 모든 실험은 적어도 세 번 수행하였다.

[0046] **6. 통계 분석**

[0047] 통계 분석에는 IBM SPSS Statistics ver. 19.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하였다. 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. Student's *t*-test와 이원분산분석으로 통계학적 유의성을 나타내는 $P<0.01$과 비교하였다.

[0049] **결과 1: 섬유아세포의 세포질 칼슘 수준**

[0050] 칼슘-민감성 안료 Fura-2AM을 이용하여 정상 섬유아세포와 화상 섬유아세포 모두에서 세포질 칼슘 수준을 측정하였다. 형광 백분율은 유동 세포 분석법으로 측정하였다. 각 시료에서 최소 5,000개의 세포를 InCite 소프트웨어 ver. 2.2.2 (Millipore)로 분석하였고, 극치 값은 SSC 291이었다. 화상 세포는 정상 세포와 비교하여 현저히 높은 세포질 칼슘 이온 농도를 나타내었다 (40.41%±3.70% vs. 28.31%±1.56%, $P<0.01$) (도 1).

[0051] **결과 2: K_{Ca}3.1 채널 mRNA 발현**

[0052] 화상 세포와 정상 세포 간의 K_{Ca}3.1 채널 유전자 *KCNN4*의 mRNA 수준을 비교하기 위하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 두 종류의 섬유아세포 간에 현저한 차이점은 없었다 (1.01±0.02, P>0.01).

[0053] **결과 3: K_{Ca} 3.1 단백질 발현 패턴을 평가하기 위한 웨스턴 블롯 분석**

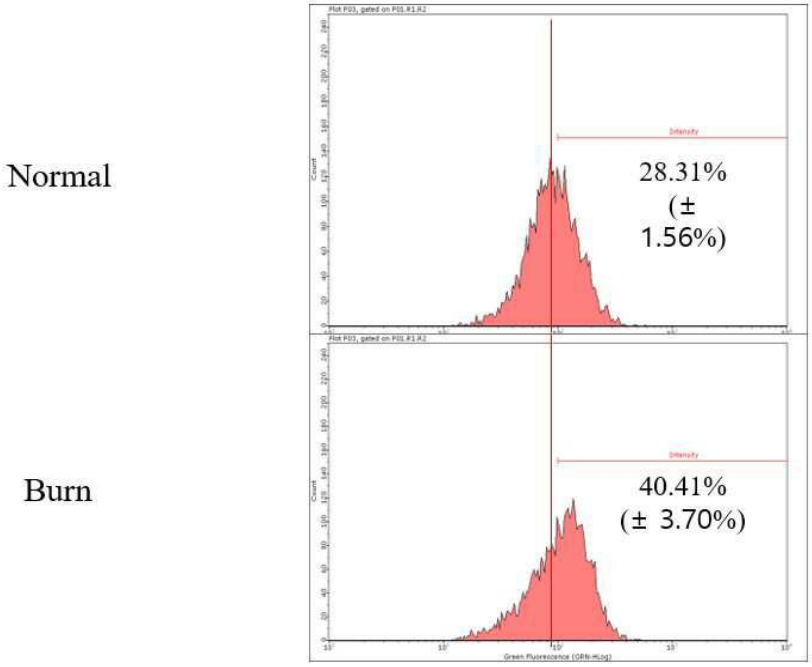
[0054] 화상 세포 및 정상 세포의 K_{Ca}3.1 채널 단백질 발현 프로파일을 비교하였다. 세포의 막 분획과 세포질 분획을 분리하고 K_{Ca}3.1 단백질 수준을 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 정상 세포와 비교하여 화상 섬유아세포의 막 분획에서는 K_{Ca}3.1 발현이 현저히 높았고 (1.43±0.19, P<0.01), 세포질 분획에서는 낮았다 (0.64±0.25, P<0.01)(도 2, 3).

[0055] **결과 4: TRAM-34는 타입 Ⅲ 콜라겐의 발현을 저해한다.**

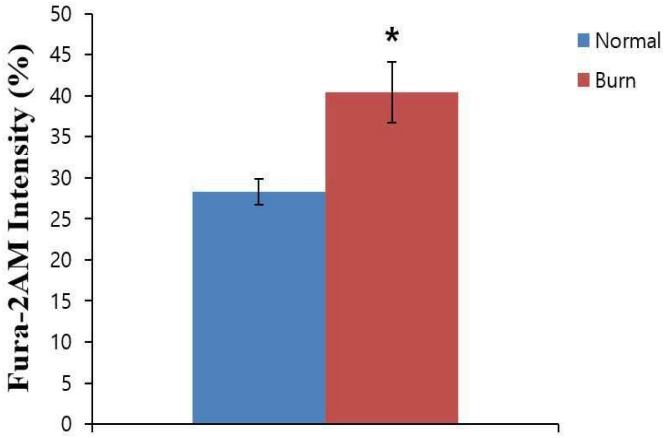
[0056] 실시간 RT-PCR 분석은 0.1μM, 1μM 및 10μM TRAM-34를 화상 유래 섬유아세포에 처리한 경우, DMSO 처리 화상 유래 섬유아세포 (담체 대조군)와 비교하여 섬유형성 마커인 타입 Ⅲ 콜라겐의 mRNA 발현이 투여량 의존적으로 감소함을 보여준다 (41.84-87.63%, P<0.01) (도 4A). 웨스턴 블롯 결과는 나아가 0.1μM, 1μM 및 10μM 농도의 TRAM-34 처리가 담체 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 타입 Ⅲ 콜라겐의 발현을 감소시킴을 보여준다 (26.32-72.15%, P<0.01)(도 4B).

도면

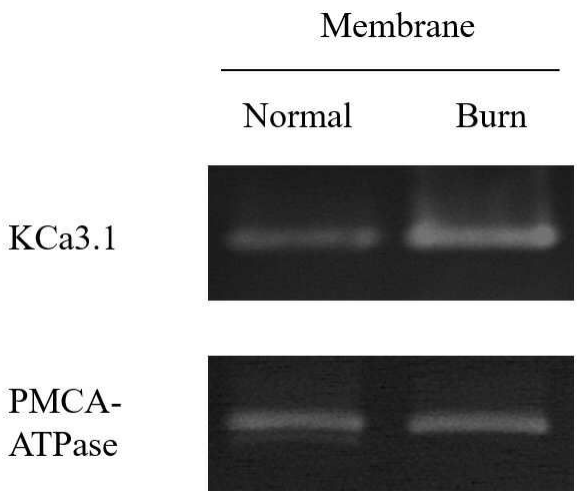
도면1a



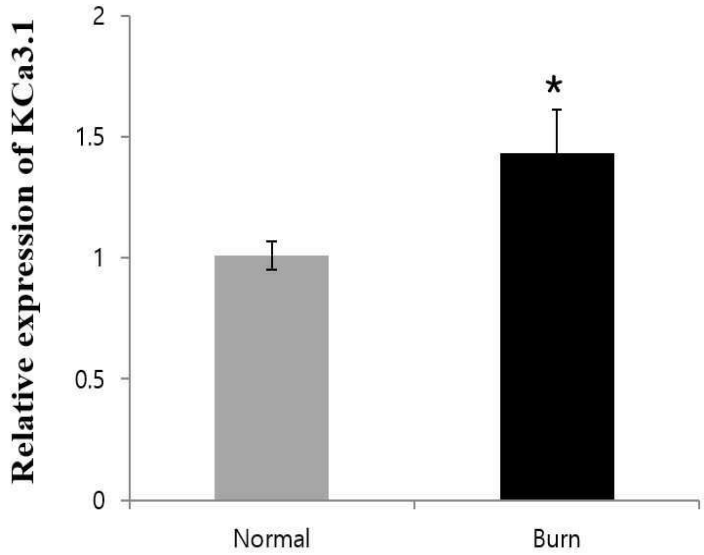
도면1b



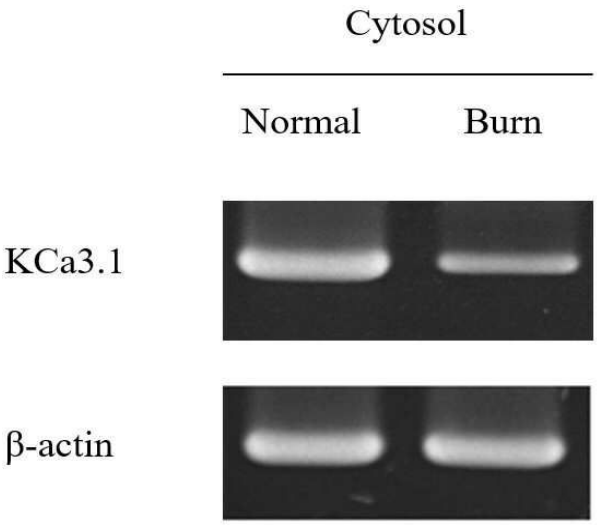
도면2a



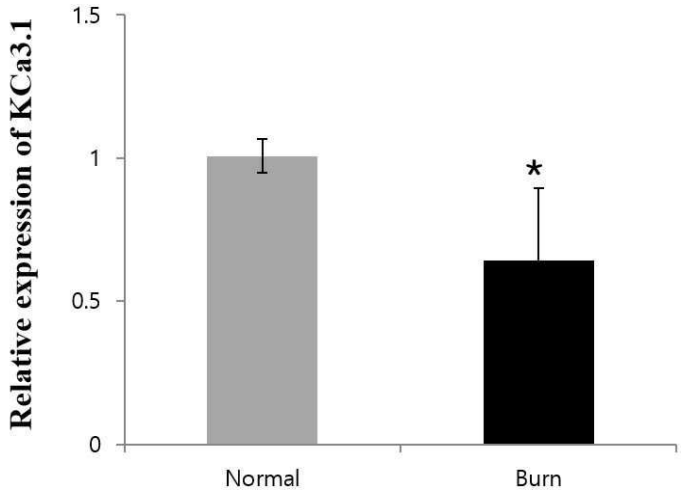
도면2b



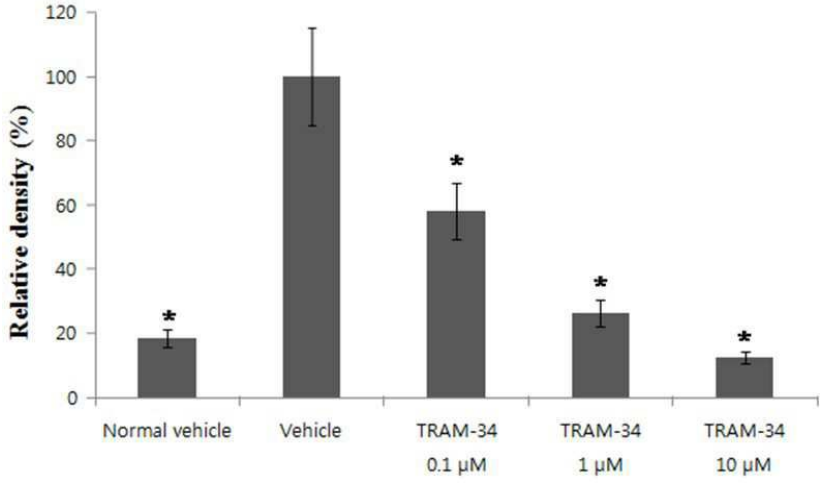
도면3a



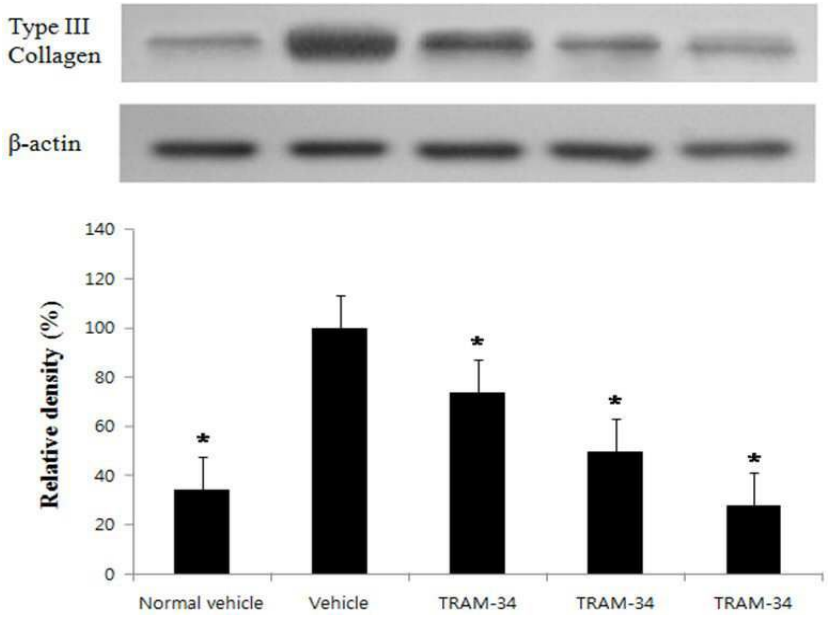
도면3b



도면4a



도면4b



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Pharmaceutical composition containing Kca3.1 channel selective blockers for preventing hypertrophic scar formation

<130> HallymU-JuneBumKim-Kca3.1

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

rvrkhrkreq v 11