



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0006219
(43) 공개일자 2023년01월10일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/27</i> (2006.01) <i>A61K 31/192</i> (2006.01)
 <i>A61K 38/57</i> (2006.01) <i>A61P 17/02</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/27</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/192</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0087126
 (22) 출원일자 2021년07월02일
 심사청구일자 2021년07월02일</p> | <p>(71) 출원인
 한림대학교 산학협력단
 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
 김준범
 서울 영등포구 버드나루로7길 12, 한림대학교 한강성심병원 소아청소년과</p> <p>(74) 대리인
 강성혜</p> |
|--|---|

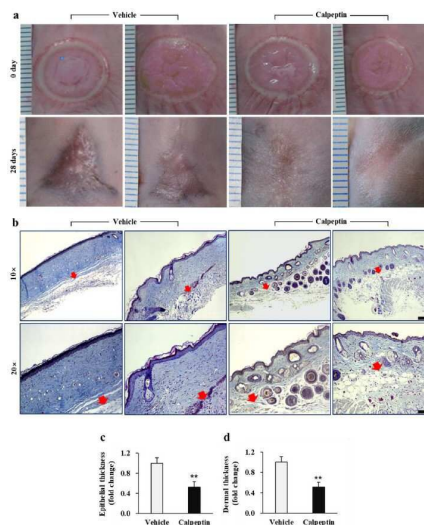
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **칼렙틴을 함유하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

화상 후 비후성 반흔을 일으키는 3도 화상 환자의 화상 조직을 이용해 피부 섬유아세포에서 칼파인의 발현과 활성을 확인했으며, 화상 환자의 섬유아세포와 화상 동물 모델을 이용해 칼파인 억제제인 칼렙틴의 항섬유화 효과를 처음으로 확인했다. 칼파인의 활성, mRNA 수준 및 단백질 수준은 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 정상 세포보다 현저하게 높았다. 칼렙틴에 의한 선택적 칼파인 억제는 화상 조직 섬유아세포의 증식뿐만 아니라 칼파인의 mRNA 및 단백질 발현과 비후성 섬유화 표지자인 TGF- β 1, α -SMA, I 형 및 III 형 콜라겐, 피브로넥틴 및 비멘틴의 mRNA 및 단백질 발현을 현저히 감소시켰다. 또한 화상 동물 모델 실험을 통해 칼렙틴이 화상에 의한 반흔 형성을 억제하는 효과가 있음을 분자생물학적, 조직학적, 시각적 분석을 통해 확인 검증했다. 본 발명은 화상 후 비후성 반흔 형성에서 칼파인의 병리학적 역할과 칼파인 억제를 통한 칼렙틴의 항섬유화 효과를 보여준다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 38/57 (2013.01)

A61P 17/02 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345321967

과제번호 2020R1I1A3053037

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야 기초연구사업 학문균형발전사업

연구과제명 화상에 의한 비후성 반흔 형성 과정에서 dipeptidyl peptidase-4 억제제의 반흔 형
성 억제 효과 및 세포사멸인자의 병태생리학적 역할 규명

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2025.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

칼팍틴을 함유하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 칼팍틴은 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포의 증식을 저해하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 칼팍틴은 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인의 활성 및 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 칼팍틴은 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 섬유증 마커의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 칼팍틴은 0.1 내지 2 mg/kg/day로 투여하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 칼파스타틴, 이의 활성 단편, 칼파스타틴 유사 폴리펩타이드, 이의 활성 단편 및 PD150606 중 선택된 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 화상 상처 발생 후 0 내지 60일에 투여하는 것을 특징으로 하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

인간을 제외한 포유류 동물의 화상 상처 발생 후 칼팰틴을 포함하는 조성물을 투여하여 화상 후 비후성 반흔 형성을 예방하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 조성물 내의 칼팰틴은 0.1 내지 2 mg/kg/day로 투여하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성을 예방하는 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 칼팰틴을 포함하는 조성물은 화상 상처 발생 후 0 내지 60일에 투여하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성을 예방하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 칼팰틴을 함유하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 화상 후 비후성 반흔은 화상 이후 상처가 회복되는 과정에서 흉터가 위로 불거져 나오는 것을 말한다. 화상 후 비후성 반흔의 발생비율은 화상 환자의 60%~90%로 발생 빈도가 매우 높아 화상 환자들의 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 화상 환자들에게서 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] 칼파인 (Calpain)은 세포 증식 및 분화, 조직 재형성 및 섬유증을 포함한 다양한 세포 기능에 관여하는 Ca^{2+} 의 존성 및 비-리소좀 시스테인 프로테아제이다. 이들의 기능은 주로 칼파인-1과 칼파인-2로 알려진 두 가지 주요 이형체에 기인하며, 이는 각각 Ca^{2+} 의 마이크로몰 및 밀리몰 농도에 반응하여 활성화된다. 칼파인의 병리학적 과잉 활성화는 심장 섬유증 및 특발성 폐 섬유증을 포함한 일부 섬유성 질환의 발생과 관련이 있다. 칼파인은 전사 및 번역 후 수준 모두에서 TGF- β 1을 활성화하여 상피-간엽 전이 및 콜라겐 합성과 같은 섬유증 기능을 유도하며 추가로, TGF- β 1은 칼파인을 활성화한다. 이 과정은 섬유아세포의 과도한 증식과 ECM 성분의 병리학적 축적을 초래하여 결국 조직 섬유증으로 이어질 수 있다.

[0005] 화상에 의한 비후성 반흔은 다른 원인에 의한 비후성 반흔 및 기타 섬유성 질환과는 형성 기전과 증상, 예후, 치료에 대한 반응 등에서 매우 큰 차이가 있다. 화상 후 비후성 반흔은 매우 심한 중증 화상에 의해 발생하기 때문에 병변의 범위가 넓고 그 정도가 심하며, 통증과 소양감 등 동반 증상이 매우 심하고, 이차적인 기능적 손상의 정도가 매우 심하다. 이로 인해 다른 원인에 의한 비후성 반흔이나 섬유성 질환보다 치료가 어렵고 재발이

흔하다. 그러나 화상 환자에서 가장 흔하고 심각한 합병증인 화상 후 비후성 반흔에서의 칼파인의 역할과 칼팍틴의 효과는 아직까지 알려진 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007]

- (비특허문헌 0001) Gauglitz, G.G. et al., Mol. Med. 2011, 17, 113-125
- (비특허문헌 0002) Finnerty, C.C. et al., Lancet 2016, 388, 1427-1436
- (비특허문헌 0003) Darby, I.A. et al., Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. 2014, 7, 301-311
- (비특허문헌 0004) Wang, J. et al., Lab. Invest. 88 (2008) 1278-1290
- (비특허문헌 0005) Momeni, H.R. Cell J. 2011, 13, 65-72
- (비특허문헌 0006) Glading, A. et al., Biochem. Pharmacol. 2004, 67, 1513-1521
- (비특허문헌 0007) Goll, D.E. et al., Physiol. Rev. 2003, 83, 731-801
- (비특허문헌 0008) Tabata, C. et al., Clin. Exp. Immunol. 2010, 162, 560-567
- (비특허문헌 0009) Li, F.Z. et al., Biochim. Biophys. Acta 2015, 1852, 1796-1804
- (비특허문헌 0010) Letavernier, E. et al., Cardiovasc. Res. 2012, 96, 38-45
- (비특허문헌 0011) Tang, L. et al., Sci. Rep. 2016, 6, 29975
- (비특허문헌 0012) Tan, W.J. et al., Am. J. Transl. Res. 2017, 9, 1402-1409
- (비특허문헌 0013) Tsujinaka, t. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 (1988) 1201-1208
- (비특허문헌 0014) Guo, S. et al., J. Dent. Res. 89 (2010) 219-229
- (비특허문헌 0015) Valentina, S.L. et al., Wounds. 23 (2011) 76-83
- (비특허문헌 0016) Cui, H.S. et al., Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 124
- (비특허문헌 0017) Deng, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113 (2016) 11453-11458
- (비특허문헌 0018) Cubison, T.C. et al., Burns 2006, 32, 992-999
- (비특허문헌 0019) Livak, K.J. et al., Methods 2001, 25, 402-408
- (비특허문헌 0020) Kim, S.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010, 391, 974-978
- (비특허문헌 0021) Deitch, E.A. et al., J. Trauma 23 (1983) 895-898
- (비특허문헌 0022) Sun, L. et al., Ophthalmic. Res. (2020). <https://doi.org/10.1159/000507632>.
- (비특허문헌 0023) Wang, S. et al., Int. J. Clin. Exp. Pathol. 12 (2019) 1835-1845.
- (비특허문헌 0024) Kim, J.-Y. et al., Antioxidants (Basel) 9 (2020) 39.
- (비특허문헌 0025) Yao, H. et al., Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2019 (2019) 5124026
- (비특허문헌 0026) Karel D Capek et al., In Total Burn Care 5th ed. 2018; 673-678
- (비특허문헌 0027) Peter C Esselman. Arch Phys Med Rehabil. 2007 Dec; 88(12 Suppl 2):S3-6

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 좀 더 효과적인 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명자들은 다양한 칼파인 저해제에 대하여 화상 후 비후성 반흔 형성 억제효과를 시험해본 결과, 칼파인 저해제인 칼렙틴이 현저한 억제효과를 나타냄을 밝혔다. 본 발명은 이 결과를 이용해 화상 후 비후성 반흔 형성 억제용 약제를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 칼파인은 섬유증식성 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있지만 화상 후 비후성 반흔에서의 역할은 아직 알려지지 않았다. 충분한 양의 이상적인 표본 (즉, 실험에 즉시 사용하기 위해 중증 3도 화상 후 초기에 기증된 비동결 조직)을 얻기가 어렵기 때문에 이 과정의 초기 단계 메커니즘을 조사하기가 어렵다. 본 연구에서는 화상 후 비후성 반흔의 초기 병인을 밝히기 위해 3도 화상 후 1 ~ 2 주 후에 환자로부터 직접 얻은 피부 섬유아세포에서 칼파인의 발현과 활성을 조사했다. 또한, 인 비트로 인간 표본과 인 비보 동물 화상 모델을 사용하여 세포 투과성 및 칼렙틴에 의한 칼파인 저해 여부를 조사했다.
- [0013] 대부분의 3도 화상 환자를 포함하여 화상 환자의 약 70%에서 비후성 반흔이 발생하며, 이는 화상 환자들에서 매우 심각한 미용적, 기능적, 심리적 문제를 야기한다. 화상 후 비후성 반흔은 화상 환자들에게 나타나는 가장 흔하고 심각한 합병증이지만 아직까지 효과적인 치료 방법이 없는 실정이다. 상처 치유는 염증, 증식 및 리모델링이라는 세 가지 단계에서 일어난다. 염증 단계에서는 수많은 사이토카인 및 기타 염증 유발 인자가 상처 부위로 방출되어 조직 완전성을 회복한다. 증식 단계는 손상 며칠 후 섬유아세포 침윤 및 증식과 함께 시작되며, 그 후 비후성 반흔 형성에 중요한 콜라겐이 상처 부위에 침착된다. 화상 후 비후성 반흔 형성의 초기 단계 발병기전을 조사하기 위해, 본 발명자들은 3도 화상이 발생한 후 1 ~ 2 주 이내에 화상 환자의 화상 부위 조직으로부터 직접 섬유아세포를 확보했다. 이후 진행한 연구로부터 화상 환자의 화상 조직내 섬유아세포는 정상 조직 세포와 비교하여 세포 증식이 유의하게 증가하고 세포 내 비후성 마커들의 발현이 현저히 증가함을 확인했다. 이러한 결과는 3도 화상을 입은 섬유아세포가 활성화되어 과도한 증식과 ECM 발현을 통해 화상 후 비후성 반흔 형성을 일으킴을 시사하는 것으로 기존에 보고된 바 없는 사실이다. 또한, 본 발명자들은 3도 화상을 입은 섬유아세포에서 칼파인의 증가된 활성과 발현을 처음으로 확인했다. 칼파인의 증가된 발현과 활성은 상처 부위의 조직 완전성을 회복하기 위해 화상 손상 후 병리학적으로 상승된 세포질 Ca^{2+} 수준으로 인한 생리학적 보상 메커니즘을 나타낼 수 있다. 병리학적 칼페인 과잉 활성화는 심장 섬유증 및 특발성 폐 섬유증과 같은 여러 섬유증 질환의 병리 기전과 관련이 있다. 참고로, 본 연구에서 칼파인-1 녹다운은 비후성 마커 발현을 감소시켰지만 칼파인-2 녹다운은 그렇지 않았다. 이것은 칼파인 이형체 중에서 칼파인-1이 화상 후 비후성 반흔 형성과 관련된 주요 이형체임을 의미한다. 이 발견은 화상 후 비후성 반흔의 병인에서 칼파인의 역할에 대한 우리의 지식을 확장하고 치료 표적으로서 칼파인-1에 대한 추가 연구의 근거를 제공한다.
- [0014] 이러한 결과를 바탕으로 본 발명자들은 화상 후 비후성 반흔 형성에서 칼파인의 역할과 칼렙틴의 항섬유화 가능성을 추가로 조사하였으며, 이로부터 칼렙틴에 의한 칼파인 억제가 화상 환자의 섬유아세포에서 세포 증식과 콜라겐을 포함한 비후성 마커의 발현을 현저하게 감소시킴을 확인했다. 또한, 칼렙틴의 항섬유화 효과를 마우스 화상 동물 모델을 이용해 분자생물학적, 조직학적, 시각적 분석 방법으로 추가로 확인 검증했다. 본 발명에서 칼렙틴 처리는 화상 환자의 섬유아세포와 화상 동물 모델의 화상 상처에서 TGF- β 1의 발현을 감소시켜 TGF- β 1 신호 전달을 억제시킴으로써 항 섬유화 효과를 발휘하는 것으로 확인되었다.
- [0015] 기존의 비후성 반흔 치료는 반흔 형성 이후에 사용되기 때문에 재발이 흔하며 치료 효과가 낮다. 화상 후 3 주 이내의 상처 치유는 비후성 반흔 형성의 중요한 예측 인자이다. 3주 이내에 정상적인 치유가 이루어지지 않을 경우 비후성 반흔이 형성된다. 따라서 본 발명에서 밝혀낸 칼파인 관련 흉터 형성 기전을 바탕으로, 화상 직후 비후성 반흔 형성 이전에 칼렙틴을 이용한 초기 치료는 비후성 반흔 발생 자체를 예방할 수 있다. 본 발명으로부터 칼렙틴을 처리하더라도 화상 조직 섬유아세포의 증식은 정상 조직 섬유아세포의 증식 수준 이하로 감소되지 않는 것을 확인했다. 이는 화상 동물 모델 실험에서 확인된 바와 같이 칼렙틴이 정상 세포에서 나타나는 상처 치유 능력을 감소시키지 않고 화상에 의한 흉터 형성만을 억제함을 나타낸다. 이것은 마우스 화상 모델을 사용한 후속 실험에서 확인되었다.
- [0016] 요약하면, 우리는 화상 환자의 섬유아세포와 마우스 화상 동물 모델 각각을 사용하여 화상 손상 후 피부 섬유아

세포에서 칼파인의 활성 및 발현 증가를 확인하였고 칼팍틴의 항섬유 효과를 처음으로 확인했다. 본 발명은 칼팍틴에 의한 칼파인 억제가 화상 손상 후 비후성 반흔 형성을 예방하는 데 유용할 수 있음을 나타낸다.

- [0018] 칼파인 저해제는 대략 다섯 가지로 분류할 수 있다. 첫째는 폴리펩타이드 칼파인 저해제로서 천연 단백질 저해제인 칼파스타틴 유사 폴리펩타이드, 키니노젠 중쇄 (kininogen heavy chain) 유사체 등, 둘째로는 가역적 펩타이드 알데하이드, 케톤 또는 케토아마이드로서 Boc-Leu-Nle-H, Z-Leu-Abu-CONHEt 등, 셋째, E64 유사체, 넷째, Z-Leu-Val-Gly-CHN2, Z-Gly-Leu-Phe-CH2Cl 등의 활성부위 알킬레이팅 펩타이드 할로케톤 및 디아조케톤, 다섯째, 비펩타이드 저해제로서 아이소쿠마린 유도체 등을 들 수 있다 (Wang K. et al., TiPS(1994) Vol. 15, PP 412-419). 본 발명자들은 이들 다양한 칼파인 저해제 중 대표적인 12종의 칼파인 저해제에 대하여 실험을 수행한 결과, 칼팍틴을 포함한 3종의 칼파인 저해제를 투여한 경우에만 유의한 비후성 반흔 형성 억제 효과를 관찰할 수 있었다.
- [0020] 본 발명은 칼팍틴을 함유하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 칼팍틴이 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포의 증식을 저해하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 칼팍틴이 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인의 활성 및 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 칼팍틴이 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 섬유증 마커의 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 칼팍틴을 0.1 내지 2 mg/kg/day로, 바람직하게는 0.5 내지 1.5 mg/kg/day로 투여하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 조성물에 칼파스타틴, 이의 활성 단편, 칼파스타틴 유사 폴리펩타이드 또는 이의 활성 단편, PD150606 중 선택된 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 화상 상처 발생 후 0일 내지 180일, 바람직하게는 0일 내지 60일, 더욱 바람직하게는 0일 내지 30일에 투여하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 이뿐만 아니라, 본 발명은 포유류 동물의 화상 상처 발생 후 칼팍틴을 투여하여 화상 후 비후성 반흔 형성을 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 칼팍틴을 0.1 내지 2 mg/kg/day로, 바람직하게는 0.5 내지 1.5 mg/kg/day로 투여하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성을 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0029] 나아가, 본 발명은 상기 칼팍틴을 화상 상처 발생 후 0일 내지 180일, 바람직하게는 0일 내지 60일, 더욱 바람직하게는 0일 내지 30일에 투여하는 것을 특징으로 하는 화상 후 비후성 반흔 형성을 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 칼팍틴을 유효성분으로 함유하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 상기 칼팍틴을 유효성분으로 함유하는 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분으로는 예컨대 칼파스타틴, 이의 활성 단편, 칼파스타틴 유사 폴리펩타이드 또는 이의 활성 단편, PD150606 중 선택된 1종 이상일 수 있다. 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 억제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 억제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제학적 조성물과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 억제

학적 조성물은 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 기술자에게 잘 알려진 화학요법약제 (chemotherapeutic agent)를 추가로 포함할 수 있다.

- [0034] 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.
- [0035] 또한, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0036] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 피하 투여, 근육 투여 또는 국소적용 (topical application)할 수 있으며, 용량은 일일 투여량 0.1~2 mg/kg의 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.
- [0037] 또한, 본 발명의 칼렙틴을 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.
- [0038] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에서 허용되는 약제학적 담체로는 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 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, 회석제, 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.
- [0039] 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.
- [0040] 본 발명의 조성물은 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 흉골 내, 경피, 비측 내, 흡입, 국소, 직장, 경구 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서, "유효량"은 비후성 반흔 형성 및/또는 성장을 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 0.1mg/kg~10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 0.1 내지 7 $\mu\text{g/kg/day}$, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 5 $\mu\text{g/kg/day}$ 로 투여할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 유전공학적인 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.
- [0043] 본 발명의 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료용 조성물은 단독으로, 또는 레이저 치료, 화학 치료 등과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명에 따르면, 환자에게서 얻은 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인의 활성과 발현은 증가하며, 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 섬유증 마커의 발현은 전사 및 번역 수준 모두에서 증가하며, 칼렙틴은 환자의 화상

조직 섬유아세포의 인 비트로 증식을 저해할 뿐만 아니라, 환자 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인의 활성화와 발현을 억제하고, 섬유증 마커의 발현을 억제하였다. 칼팍틴은 마우스 화상 조직에서 섬유증 마커의 발현을 억제하고, 마우스에서 화상 후 비후성 반흔 형성을 저해한다.

[0046]

본 발명에 따르면, 칼팍틴을 주요성분으로 함유하는 약학 조성물은 비후성 반흔 형성 예방제 및/또는 치료제, 특히 화상 후 비후성 반흔 형성 예방제 및/또는 치료제로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048]

도 1. 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인 mRNA 및 단백질의 발현 및 활성화. 정상 조직 섬유아세포 (NF)와 비교한 화상 조직 섬유아세포 (BF)의 (a, b) 칼파인-1 및 (c, d) 칼파인-2의 mRNA 및 단백질 수준. 화상 조직 섬유아세포 (BF)에서 칼파인 활성화 및 모든 발현 수준은 각 환자의 정상 조직 섬유아세포 (NF)의 것과 비교하여 정규화했다. NF, 정상 조직 섬유아세포. BF, 화상 조직 섬유아세포. RLU, 상대 광 단위 (relative light units). * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ 은 정상 조직 섬유아세포와 비교한 값이다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 표현된다. $n = 34$ (NF) 및 $n = 34$ (BF).

도 2. 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 섬유증 마커의 mRNA 및 단백질 발현. (a, b) TGF- $\beta 1$ (*TGFB1*), (c, d) α -SMA (*ACTA2*), (e, f) 피브로넥틴 (*FBN1*), (g, h) 콜라겐 I (*COL1A1*), (i, j) 콜라겐 III (*COL3A1*)의 mRNA 및 단백질 수준을 각 환자의 정상 조직 섬유아세포 (NF) 발현 수준과 비교하고 정규화했다. TGF- $\beta 1$, α -SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 mRNA 및 단백질 수준은 정상 조직 섬유아세포와 비교하여 현저히 증가하였다. ** $p < 0.01$ 은 정상 조직 섬유아세포와 비교한 값이다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 표현된다. $n = 34$ (NF) 및 $n = 34$ (BF).

도 3. 화상 조직 섬유아세포의 증식에 대한 칼팍틴의 효과. (a) 환자 화상 조직 섬유아세포 (BF)는 정상 섬유아세포 (NF)에 비해 현저하게 더 높은 증식을 보였다. 50 또는 75 μ M 칼팍틴으로 48시간 동안 처리한 BF의 증식은 DMSO (dimethyl sulfoxide) 처리된 BF에 비해 현저하게 감소했지만 NF보다 높았다. (b) 세포 이미지 (10 X)는 칼팍틴 (75 μ M) 처리된 BF가 DMSO 처리된 BF에 비해 감소하였지만 NF에 비해 더 높은 세포질을 보였다. 스케일 바, 50 μ m. NF, 정상 섬유아세포. BF, 화상 조직 섬유아세포. DMSO, 디메틸 설펍사이드 처리된 BF. ** $P < 0.01$, vs. NF; * $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$, vs. DMSO. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 표현된다. 각 군당 $n = 34$.

도 4. 환자의 화상 조직 섬유아세포 (BF)에서 섬유증 마커에 대한 칼팍틴의 영향. (a) 칼파인 활성화는 DMSO (dimethyl sulfoxide) 처리된 BF에 비해 50 또는 75 μ M 칼팍틴 처리된 BF에서 현저하게 감소했다. TGF- $\beta 1$ (b 및 c), α -SMA (d 및 e), 피브로넥틴 (f 및 g), 콜라겐 I (h 및 i), 콜라겐 III (j 및 k), 비멘틴 (l 및 m)의 mRNA 및 단백질 수준은 DMSO 처리된 BF에 비해 75 μ M 칼팍틴 처리된 BF에서 유의하게 감소했다. BF, 화상 조직 섬유아세포. RLU, 상대 광 단위. DMSO, 디메틸설펍사이드 처리된 BF. * $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$, vs. DMSO. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 나타낸다. 각 군당 $n = 34$.

도 5. 환자의 화상 조직 섬유아세포 (BF)에서 섬유증 마커 발현에 대한 칼파인-1 및 칼파인-2 특이적 siRNA의 효과. siRNA를 사용한 칼파인-1 및 칼파인-2 녹다운의 효율성 (a, b). 칼파인-1 및 칼파인-2 단백질 발현은 대조군 siRNA 처리된 BF에 비해 siRNA 처리된 BF에서 유의하게 감소하였다. 칼파인-1 녹다운은 TGF- $\beta 1$ (c), α -SMA (d), 피브로넥틴 (e), 콜라겐 I (f), 콜라겐 III (g) 및 비멘틴 (h)의 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다. 반면 칼파인-2 녹다운은 그렇지 않았다. 칼파인 siRNA를 처리한 BF의 단백질 수준을 각 환자의 대조군 siRNA로 처리한 BF와 비교하고 표준화했다. si-Ct, 음성 대조군 siRNA로 처리된 BF. si-CAPN1, calpain-1 siRNA로 처리된 BF. si-CAPN2, calpain-2 siRNA로 처리된 BF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. si-Ct. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 표현된다. $n =$ 그룹당 30.

도 6. 화상 마우스 동물 모델에서 섬유증 마커 발현에 대한 칼팍틴의 영향. 화상 손상 후 28일 동안 매일 1회 칼팍틴을 투여한 마우스의 화상 조직 내 (a, b) TGF- $\beta 1$ (*TGFB1*), (c, d) α -SMA (*ACTA2*), (e, f) 피브로넥틴 (*FBN1*), (g, h) 콜라겐 I (*COL1A1*), (i, j) 콜라겐 III (*COL3A1*) 및 (k, l) 비멘틴 (*VIM*)의 mRNA 및 단백질 수준을 담체 처리한 마우스와 비교하였다. 모든 발현 수준은 담체 처리 마우스 수준으로 정규화되었다. ** $p < 0.01$, vs. 담체 처리군. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 표현된다. $n = 36$ (담체 처리 대조군) 및 $n = 36$ (칼팍틴 처리군).

도 7. 마우스에서 화상 후 반흔 형성에 미치는 칼펩틴의 영향. (a) 담체 처리 대조군 및 칼펩틴 처리 마우스의 상처 이미지는 칼펩틴 처리 후 상처 입은 화상 피부에서 변색과 불규칙한 두께가 덜함을 보여준다. 눈금자의 단위, 1mm. (b) Masson의 trichrome 염색으로 얻은 칼펩틴 처리 마우스의 화상 피부 상처의 조직학적 이미지는 표피 및 진피 두께가 감소했음을 보여준다. 스케일 바 = 10배 확대하여 100 μ m. 화살표는 진피와 피하 조직 사이의 경계를 나타낸다. 마우스 화상 상처 부위의 (c) 표피 및 (d) 진피 두께의 정량 분석. Vehicle, 담체만 처리한 화상 마우스, Calpeptin, 칼펩틴 처리한 화상 마우스. $^{**}p < 0.01$, vs. vehicle. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 표현된다. n = 36 (담체 처리 대조군) 및 n = 36 (칼펩틴 처리군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 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.

[0051] 1. 인간 시험

[0052] 2018년 1월 10일부터 2019년 3월 28일까지 한림대학교 한강성심병원 화상 연구소에서 3도 화상 후 1 ~ 2주 사이에 중간층 피부 자가이식 (split-thickness skin autografting)을 받은 총 36명의 환자 각각으로부터 화상 피부 조직과 정상 조직을 채취했다 (도 8). 잠재적인 교란 요인을 줄이기 위해 각 환자는 신체의 손상되지 않은 부분에서 자가이식에 사용되는 정상적인 피부 조직의 일부를 제공함으로써 자신의 대조군 역할을 했다. 샘플 크기는 자금 지원 기관에서 규정한 연구 기간 동안 모집할 수 있는 환자 수로 결정되었다. 포함된 환자는 전체 신체 표면적 20% 이상의 3도 화상을 입었으며 연령 범위는 12-58세였다. 상처 치유에 영향을 미치는 혼동 변수를 줄이기 위한 제외 기준은 다음과 같다: 화상 전 6개월 이내 피부 알러지, 악성 종양, 갑상선 질환, 당뇨병, 임신 또는 수유, 약물 또는 알코올 남용, 화학 요법, 호르몬 요법 또는 기타 처방약 사용 병력. 환자의 화상 후 비후성 반흔 발생은 1년간 매월 2명의 화상 외과 의사 개별적으로 평가했으며, 화상 후 비후성 반흔이 발생하지 않은 환자의 실험 데이터는 최종적으로 제외하였다. 본 연구에 참여한 36명의 환자 중 34명의 환자에서 화상 후 비후성 반흔 형성이 발생했다.

[0053] 표 1은 화상 후 비후성 반흔이 발생한 환자의 인구 통계 및 화상 특성을 보여준다. 조직을 기증한 모든 환자로부터 서면 동의서를 받았으며, 이 연구는 한강성심병원 기관 심의위원회의 지침 (HG2018-018) 및 인간을 대상으로 한 실험을 위한 세계의료협회의 윤리 강령 (헬싱키 선언)에 따라 수행되었다.

[0055] 2. 실험 동물

[0056] 체중 20 ~ 25 g, 6주령 CBA/JCrHsd 근친 교배 마우스를 경기도 평택 소재 코아텍 실험동물 주식회사에서 구입하였다. 마우스를 폴리카보네이트 케이지에 수용하고 표준 실험실 사료 및 여과수에 자유롭게 접근할 수 있게 하였다. 실온 및 상대 습도는 각각 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 및 $55 \pm 5\%$ 였으며, 12시간 밝음/12시간 암흑 주기를 유지하였다. 모든 동물실험은 국립 보건원 실험 동물 관리 및 이용 가이드에 따라서 한림대학교 한강성심병원 동물 실험실에서 진행되었다. 본 연구는 한림대학교 동물 연구 윤리위원회의 승인을 받았다 (HMC2018-2-0222-2).

[0058] 3. 섬유아세포 분리 및 배양

[0059] 환자로부터 화상 상처 진피 섬유아세포의 분리 및 배양은 이전에 보고된 대로 수행하였다. 피부 조직 샘플을 70% 에탄올 및 DPBS (Biowest, Riverside, MO, USA)로 각각 세 번 세척했다. 그 후, 스트렙토마이신, 페니실린 및 암포테리신 B (Gibco, Grand Island, NY, USA)로 구성된 1% 항생제- 항진균제가 보충된 차가운 DPBS에 담갔다. 미세 핀셋과 메스를 사용하여 피하 지방과 느슨한 결합 조직을 제거했다. 조직을 약 1-2 mm 폭의 작은 조각으로 자르고, 10 mL Dispase II 용액 (1 U/mL) (Gibco)이 있는 50 mL 원뿔형 튜브로 옮기고 4°C 에서 밤새 배양하였다. 다음날, 멸균 집게를 사용하여 진피와 표피를 당기거나 벗겨냈다. 분리된 진피를 콜라게나제 IV 용액 (500 U/mL) (Gibco)을 사용하여 37°C 에서 30분 동안 분해하였다. 그런 다음 샘플을 10% 소 태아 혈청 (FBS; Biowest)을 포함하는 15 mL DMEM 배지 (Biowest)에 담가 콜라게나제를 비활성화하고 100 μ m 세포 스트레이너 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 300 $\times$ g에서 5분 동안 원심분리하였다. 펠렛을 10% FBS를 함유하는 DMEM에 재현탁하고 37°C 및 5% CO_2 에서 배양하였다. 확장된 섬유아세포는 모든 실험에서 1-

2 계대의 것을 사용하였다.

4. 세포 증식 및 칼팰틴 처리

환자 샘플 유래 정상 조직 섬유아세포, 화상 조직 섬유아세포 및 칼팰틴 처리된 화상 조직 섬유아세포의 증식은 CellTiter 96® AQueous One Solution 세포 증식 분석 키트 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 조사하였다. 정상 조직 섬유아세포 (NF)는 중간층 피부 자가이식에 사용된 비화상 피부에서 얻은 것이다. 세포를 10% FBS 및 상기 1% 항생제-항진균제가 보충된 DMEM을 함유하는 96-웰 조직 배양 플레이트에 접종하였다 (2×10^4 세포/웰). 다음날 배양액을 10% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하고, 화상 조직 섬유아세포를 DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 용해된 칼팰틴 (AdooQ Bioscience; Irvine, CA, USA) 10, 50 또는 75 μ M로 48시간 동안 처리하였다. 신선한 배양 배지 (100 μ L DMEM)와 20 μ L의 CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent를 세포에 첨가하고 37 °C에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후, 96-웰 플레이트 리더 (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식은 다음과 같이 계산하였다: 증식률 (%) = (샘플 흡광도-배경 흡광도)/(대조군 샘플 흡광도-배경 흡광도)×100. 칼팰틴 처리 48시간 후, 광학 현미경 (IX 70, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 세포 이미지를 획득했다.

그 밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA에 대해서도 위와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

각 환자에 대해 칼팰틴 처리한 BF의 증식을 NF 또는 DMSO로 처리한 BF와 비교하고 정규화했다. 실험은 세 번씩 수행하였다.

5. 칼파인 활성 측정

세포를 100mm 접시 플레이트에서 성장시키고 DPBS로 두 번 행구고 세포 분리 용액 Accutase™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 수확했다. 세포를 계수한 다음 방사선 면역 침전 분석 (RIPA) 완충액 (EDTA 무함유) (30 μ L/L $\times 10^5$ 세포)으로 용해한 다음 30분 동안 원심 분리했다 (13000 $\times$ g, 4°C). 상청액 중 칼파인 활성은 제조업체의 프로토콜에 따라 Calpain-Glo™ protease assay (Promega)을 사용하여 측정되었다. 발광은 멀티모드 검출기 (DTX880, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)에서 상대 광 단위로 측정되었다.

각 세포군은 세 번씩 테스트하였다. 배경값을 빼고, 결과는 각 환자에 대한 NF 또는 DPBS 처리된 BF에 대한 배 변화 (fold-change)로 표현되었다.

6. RNA 간섭

칼파인-1 및 칼파인-2에 대한 음성 대조군 siRNA 및 SMARTpool siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO, USA)는 BF가 30~50% 성장한 60mm 세포 배양 접시에서 50 μ M 농도로 사용되었다. Stemfect RNA transfection kit (Stemgent, Lexington, MA, USA)를 사용한 siRNA transfection은 제조업체의 프로토콜에 따라 혈청과 항생제가 없는 배지에서 수행되었다. 5시간 후, 배양 배지를 FBS 및 1% 항생제-항진균제가 보충된 배지로 교체하였다. 세포는 전사체 또는 단백질 분석 전에 24시간 또는 48시간 동안 추가로 배양되었다.

7. 쥐 화상 모델 및 칼팰틴 처리

마우스를 마취시키고 100% 산소와 2.5% 이소플루란 (하나팜 (주), 서울) 하에서 유지하였다. 각 마우스의 등을 면도하고 전기 가위와 70% 알코올로 각각 살균하였다. 직경 10mm의 깊은 3도 화상은 총 에너지 700 $\pm$ 10J의 레이저 조사로 생성되었다 (Sellas Evo™, 서울, 대한민국). 3도 화상은 조직학적으로 확인되었다. γ -칼팰틴 (AdooQ Bioscience)은 30% PEG400 + 0.5% Tween 80 + 5% 프로필렌 글리콜 + 64.5% (wt/wt) 물의 0.4 mg/mL 혼합물에 용해되었다. 화상을 유발한 직후 칼팰틴 (1 mg/kg) 또는 담체 대조군을 각 마우스군 (테스트 : n = 36, 대조군 : n = 36)에 28일 동안 매일 1회 피하 주사하였다. 화상 상처는 고압 멸균된 바셀린 거즈로 매일 드레싱

했다. 화상 손상 28일 후 마우스로부터 화상 피부 조직을 채취하였다.

[0075] 그 밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA에 대해서도 위와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0077] 8. qRT-PCR 분석

[0078] RNAzol (Cancer Rop Co., Seoul, Republic)의 샘플을 gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)로 균질화한 후 제조업체의 지침에 따라 ReliaPrep™ RNA Miniprep 시스템 (Promega)을 이용하여 추출하여 섬유 아세포와 화상 조직에서 총 RNA를 얻었다. RNA 농도는 NanoDrop 분광 광도계 (BioTek)로 측정하였고, PrimeScript™ RT 마스터 믹스 (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 2μg RNA를 cDNA로 변환했다. qRT-PCR은 50ng cDNA 및 0.5 μM 프라이머를 사용하여 LightCycler® 96 (Roche, Basel, Switzerland)에서 수행되었다. 반응 조건은 다음과 같다: 95℃에서 10분 동안 초기 변성, 95℃에서 10초와 60℃에서 30초를 40회 증폭 반복, 95℃에서 5초, 65℃에서 60초, 95℃에서 1초 동안 용융 곡선 분석. 각 유전자의 mRNA 발현은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 통해 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 발현으로 정규화되었다. 칼팰틴으로 처리하거나 또는 처리하지 않은 각 환자의 BF의 mRNA 발현 수준을 NF 또는 DMSO 처리 BF와 비교하고 정규화했다.

[0079] 그 밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA에 대해서도 위와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0080] 쥐 화상 모델에서 모든 화상 조직 (n = 36)의 mRNA 발현 수준을 모든 담체 대조군 (n = 36)의 mRNA 발현 수준과 비교하고 정규화했으며, 담체 평균을 1로 설정했다. 각 샘플은 세 번 분석되었다.

[0082] 9. 웨스턴 블롯 분석

[0083] 전체 단백질은 섬유 아세포 및 화상 상처로부터 프로테아제 및 포스포타제 억제제를 함유하는 RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 gentleMACS® Dissociator (Miltenyi Biotec)을 사용하여 샘플을 균질화함으로써 얻었다. 웨스턴 블롯팅은 종래 기술에 설명한 대로 수행하였다. 샘플을 4℃에서 30분 동안 계속 교반하면서 배양한 다음 30분 (13000 X g, 4℃) 동안 원심분리했다. 상청액의 단백질 농도는 Quick Start™ Bradford 단백질 분석 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정하였다. 용해물을 5X 환원 완충액 (경기도 성남시 바이오세상)에 넣고 95℃에서 3분간 가열하여 변성시켰다. 샘플을 겔 전기 영동으로 분리하고, 폴리비닐리덴디플루오라이드 막 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전기 전달하고 0.1 % Tween-20을 함유하는 Tris 완충 식염수에서 5% (w/v) 탈지유로 25℃에서 1시간 동안 차단했다. 다음과 같은 1차 항체가 사용되었다: 염소 항-칼파인-1 폴리클론 항체 (1:500, Cat. No. sc-7531; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 마우스 항-칼파인-2 모노클론 항체 (1:2000, Cat. No. NBP2-46063; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), 토끼 항-TGFβ-1 폴리클론 항체 (1:200, cat. no. sc-146, Santa Cruz Biotechnology), 마우스 항-α-SMA 폴리클론 항체 (1:500, Cat. No. ab1817; Abcam, Cambridge, UK), 토끼 항-피브로블라스트 모노클론 항체 (1:2000, Cat. No. ab6328; Abcam), 토끼 항-콜라겐 I 폴리클론 항체 (1:1000, Cat. No. ab34710; Abcam), 토끼 항-콜라겐 III 모노클론 항체 (1:2000, Cat. No. ab7778; Abcam), 토끼 항-비멘틴 폴리클론 항체 (1:3000, Cat. No. ab92547; Abcam), 토끼 항-β-액틴 폴리클론 항체 (1:2000, Cat. No. 4967; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 마우스 항-β-액틴 모노클론 항체 (1:1000, Cat. No. SC1616; Santa Cruz Biotechnology). 이차 항체는 호스래디쉬 퍼옥시데이즈-결합 염소 항-토끼 IgG 항체 (1:1000, Cat. No. AP307P; EMD Millipore) 및 호스래디쉬 퍼옥시데이즈-결합 염소 항-마우스 IgG 항체 (1:1000, Cat. No. AP308P; EMD Millipore)를 포함한다. 이미지는 chemiluminescence imaging system (WSE-6100; ATTO, Tokyo, Japan)으로 얻었고, 밴드의 광학 밀도는 CS Analyzer 4 소프트웨어 (ATTO)를 이용하여 얻었다. 단백질 발현은 β-액틴의 값으로 정규화되었다.

[0084] 그 밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA에 대해서도 위와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0085] 칼팰틴을 처리하거나 처리하지 않은 각 환자의 BF의 단백질 수준을 NF 또는 DMSO 처리 BF와 비교하고 정규화했다. 쥐 화상 모델에서 모든 화상 조직의 단백질 수준을 모든 담체 대조군의 단백질 수준과 비교하고 정규화했

며, 담체 대조군 평균을 1로 지정했다. 각 샘플은 세 번 분석했다.

10. 조직학적 평가

화상 손상 후 28일째에 마취하에 CO₂ 가스를 흡입하도록 하여 마우스를 희생시켰다. 피부 밑 근육층 (panniculus carnosus muscle layer)을 포함한 화상 조직을 조심스럽게 절제하고 즉시 4% 중성 완충 포르말린에서 고정하고 25°C에서 밤새 배양했다. 그 후, 조직을 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% 에탄올에서 연속적으로 탈수하고 벤젠으로 제거하고 파라핀 블록에 매립했다. 파라핀화된 조직 블록을 5μm 두께의 절편으로 자르고 실란 코팅 슬라이드 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)에 올려놓았다. 각 샘플에서 3 개의 절편이 무작위로 선택되었다. 절편은 제조업체의 지침에 따라 왁스 제거, 재수화하고, Masson 's trichrome (Abcam)으로 염색하였다. 절편을 탈수하고 장착하고 커버 슬립으로 덮었다. 절편의 이미지는 10× 및 20× 배율에서 광학 현미경 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)으로 획득했다. 표피 및 진피 두께는 ImageJ 1.53a (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <https://imagej.nih.gov/ij>)를 사용하여 각 절편에서 표피와 진피의 가장 높은 너비와 가장 낮은 너비를 측정하고 그런 다음 평균값을 계산하였다. 칼팰틴 처리 마우스의 화상 상처의 표피 두께와 진피 두께를 담체 처리 마우스와 비교하여 정규화하였으며, 담체 처리군 평균은 값 1로 지정하였다. 담체 및 칼팰틴 처리 마우스의 동일한 수의 조직 절편을 사용하여 표피 두께 및 진피 두께를 측정했다 [108 절편 (각 군의 36마리 마우스에서 각각 3개의 절편을 얻음)].

11. 통계 분석

SPSS Statistics ver. 24.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)이 통계 분석에 사용되었다. 결과는 평균 ± 표준편차로 표시된다. 샘플 번호 (n)는 각 실험에서 독립적인 생물학적 샘플의 수를 나타낸다. 각 샘플은 3중으로 분석되었다. 비교는 Student's t- test 및 일원 분산 분석을 사용한 후 Tukey의 사후 다중 비교 테스트를 사용하여 수행되었으며, $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 은 통계적 유의성을 나타낸다. 실험 마우스는 컴퓨터화된 프로그램 Stata v 9.0 소프트웨어 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA)를 사용하여 담체 또는 칼팰틴을 투여하도록 무작위로 할당되었다.

결과 1: 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인의 활성화와 발현은 증가한다.

칼파인이 상처 치유에 관여하는 것으로 생각되기 때문에, 우리는 화상 환자에서 얻은 화상 조직 섬유아세포 (BF)와 정상 조직 섬유아세포 (NF)에서 칼파인의 활성화와 발현을 확인했다. NF는 중간층 피부 자가이식 (split-thickness skin autografting)에 사용된, 화상을 입지 않은 피부 조직에서 유래하였다. 칼파인-1과 칼파인-2의 mRNA와 단백질 발현은 NF보다 BF에서 유의하게 높았다 (칼파인-1 mRNA: 4.60 ± 0.31 배, 단백질: 1.51 ± 0.08 배, 칼파인-2 mRNA: 4.17 ± 0.80 배), 단백질: 1.46 ± 0.08 배; $P < 0.05$) (도 1a-d). 또한, 칼파인 활성화는 NF보다 BF에서 현저하게 증가하였다 (2.51 ± 0.19 배, $p < 0.01$) (도 1e).

결과 2: 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 섬유증 마커의 발현은 증가한다.

3도 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 섬유증 마커의 발현 프로파일을 조사하기 위해 TGF-β1 (*TGFβ1*), α-평활근 액틴 (α-SMA) (*ACTA2*), 피브로넥틴 (*FBN1*), 콜라겐 I (*COL1A1*) 및 콜라겐 III (*COL3A1*)의 전사 수준 및 번역 수준을 각각 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다. 도 2a, c, e, g 및 i는 모든 화상 후 비후성 반흔 환자에서 TGF-β1, α-SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 mRNA 발현이 화상 조직 섬유아세포에서 정상 조직 섬유아세포보다 현저히 높음을 보여준다 (각각 2.12 ± 0.11 배, 5.21 ± 1.16 배, 2.47 ± 0.25 배, 3.13 ± 0.25 배 및 1.41 ± 0.15 배; $p < 0.01$). 또한, 도 2b, d, f, h, j는 TGF-β1, α-SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 단백질 발현이 화상 조직 섬유아세포에서 정상 조직 섬유아세포보다 현저히 높음을 보여준다 (각각 2.01 ± 0.10 배, 5.87 ± 1.85 배, 5.34 ± 1.11 배, 3.51 ± 0.63 배 및 2.81 ± 0.45 배; $p < 0.01$).

결과 3: 칼팰틴은 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포 증식을 저해한다.

[0100] 칼파인 억제제인 칼팍틴이 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포의 증식에 미치는 효과를 조사했다. 첫째, 환자 BF 및 NF의 증식은 배양 48시간 후 비색 분석을 수행하여 평가되었으며 (도 3a 및 b), BF의 증식이 상당히 더 높은 증가 (1.59 ± 0.15 배, $p < 0.01$)를 나타냈다. 10 μ M 칼팍틴으로 처리한 화상 조직 섬유아세포는 DMSO만 처리한 BF에 비해 BF의 증식을 유의하게 변화시키지 않았다 (0.96 ± 0.05 배, $p < 0.01$). 50 또는 75 μ M 칼팍틴으로 처리한 화상 조직 섬유아세포의 증식은 정상 조직 섬유아세포와 비교하여 현저히 억제되었다 (50 μ M: 1.42 ± 0.16 배, 75 μ M: 1.25 ± 0.18 배; $P < 0.01$) (도 3a, b).

[0101] 그 밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA의 경우 임상적으로 사용 가능한 유효 농도 100 μ M 이하의 인 비트로 농도에서 화상 환자의 화상부위 섬유아세포 증식을 유의하게 감소시키지 못했다 ($P > 0.05$ vs. DMSO 처리 BFs).

[0103] **결과 4: 칼팍틴은 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인의 활성화와 섬유증 마커의 발현을 억제한다.**

[0104] 칼팍틴이 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 칼파인의 활성화와 발현에 직접적인 영향을 미치는지 여부를 조사했다. 화상 조직 섬유아세포를 칼팍틴으로 처리한 후 칼파인 활성을 평가했다. 도 4a에서 볼 수 있듯이, 50 또는 75 μ M 칼팍틴으로 처리한 화상 조직 섬유아세포에서는 DMSO 처리한 화상 조직 섬유아세포와 비교하여 칼파인 활성이 크게 감소했다 (각각 0.77 ± 0.05 배 및 0.65 ± 0.03 배; $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$). 10 μ M 칼팍틴 처리는 유의한 억제 효과를 나타내지 않았다 (0.1 μ M: 0.94 ± 0.03 배, $p > 0.05$) (도 4a).

[0105] 그밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA의 경우 임상적으로 사용 가능한 유효 농도 100 μ M 이하의 인 비트로 농도에서 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포 내 칼파인의 발현과 활성을 유의하게 감소시키지 못했다 ($P > 0.05$ vs. DMSO 처리 BFs, 각 군별 $n = 34$).

[0106] 칼팍틴이 칼파인 활성화에 영향을 미치는 것으로 입증되었으므로 다음으로 화상 후 비후성 반흔이 생긴 모든 환자 ($n = 34$)에서 유래한 칼팍틴 처리 BF와 담체 대조군 처리 BF에서의 TGF- β 1, α -SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 I, 콜라겐 III 및 비멘틴의 mRNA와 단백질 발현을 분석하여 섬유증 마커에 미치는 영향을 조사했다. 50 또는 75 μ M 칼팍틴으로 48시간 동안 처리한 화상 조직 섬유아세포에서는 DMSO 처리한 화상 조직 섬유아세포와 비교하여 TGF- β 1, α -SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 I, 콜라겐 III 및 비멘틴의 mRNA와 단백질 발현이 현저히 낮아졌다: TGF- β 1 (각각 mRNA: 0.52 ± 0.07 배, 0.22 ± 0.06 배; 단백질 0.53 ± 0.15 배, 0.20 ± 0.12 배; $P < 0.01$) (도 4b, c), α -SMA (각각 mRNA: 0.45 ± 0.07 배, 0.21 ± 0.08 배; 단백질 0.58 ± 0.13 배, 0.21 ± 0.11 배; $P < 0.01$) (도 4d, e), 피브로넥틴 (각각 mRNA: 0.46 ± 0.13 배, 0.15 ± 0.11 배; 단백질: 0.5 ± 0.10 배, 0.12 ± 0.12 배; $p < 0.01$) (도 4f, g), 콜라겐 I (각각 mRNA: 0.56 ± 0.13 배, 0.19 ± 0.11 배; 단백질: 0.59 ± 0.10 배, 0.12 ± 0.11 배; $p < 0.01$) (도 4h, i), 콜라겐 III (각각 mRNA: 0.52 ± 0.15 배, 0.31 ± 0.12 배; 단백질: 0.55 ± 0.07 배, 0.11 ± 0.10 배; $p < 0.01$) (도 4j, k) 및 비멘틴 (각각 mRNA: 0.40 ± 0.12 배, 0.18 ± 0.13 배; 단백질: 0.46 ± 0.15 배, 0.34 ± 0.11 배; $p < 0.01$) (도 4l, m).

[0107] 그 밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA의 경우 임상적으로 사용 가능한 유효 농도 100 μ M 이하의 인 비트로 농도에서 화상 환자의 화상부위 섬유아세포 내 비후성 반흔 마커들의 발현을 유의하게 감소시키지 못했다 ($P > 0.05$ vs. DMSO 처리 BFs, 각 군별 $n = 34$).

[0109] **결과 5: 칼파인-1 녹다운은 화상 환자의 화상 조직 섬유아세포에서 섬유증 마커 발현을 억제한다.**

[0110] 칼파인 이형체가 다른 섬유화 효과를 발휘하는지 여부를 결정하기 위해 칼파인-1 및 칼파인-2 특이적 siRNA를 24시간 동안 세포에 형질 감염시킨 다음 섬유증 마커 발현을 평가했다. 칼파인-1 및 칼파인-2 녹다운의 효율은 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정된 바와 같이 각각 $80.2 \pm 10.9\%$ 및 $75.3 \pm 8.1\%$ 였다 ($P < 0.05$) (도 5a 및 b). 칼파인-1 녹다운은 대조군 siRNA 처리 환자 화상 조직 섬유아세포에서 해당 발현에 비해 TGF- β 1, α -SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 I, 콜라겐 III 및 비멘틴의 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다 (TGF- β 1 0.68 ± 0.09 배, α -SMA 0.69 ± 0.10 배, 피브로넥틴 0.48 ± 0.07 배, 콜라겐 I 0.75 ± 0.09 배, 콜라겐 III 0.65 ± 0.09 배 및 비멘틴 0.68 ± 0.09 배; $P < 0.05$) (도 5c-h). 그러나 칼파인-2 녹다운은 TGF- β 1, α -SMA, 피브로넥틴, 콜라겐

I, 콜라겐 III 또는 비멘틴의 단백질 발현에 유의한 영향을 미치지 않았다 (TGF- β 1 0.95 ± 0.10 배; α -SMA 1.02 ± 0.10 배, 피브로넥틴 1.05 ± 0.03 배, 콜라겐 I 1.09 ± 0.08 배, 콜라겐 III 1.08 ± 0.10 배, 비멘틴 1.03 ± 0.01 배, $P > 0.05$) (도 5c-h).

[0112] **결과 6: 칼렙틴은 마우스 화상 조직에서 섬유증 마커의 발현을 억제한다.**

[0113] 칼렙틴의 항 섬유화 효과를 동물 모델을 이용하여 생체 내에서 확인하기 위하여 마우스 화상 모델을 생성하고 마우스에게 칼렙틴을 투여하여 도 6과 같이 생체 내 화상 조직 섬유아세포의 섬유증 마커에 미치는 영향을 확인했다. 화상 동물 모델에 칼렙틴 (1 mg/kg/day)을 28일 동안 매일 복강 내 주사한 결과, 담체 처리 대조군의 조직과 비교하여 동물 모델의 화상 조직 내 TGF- β 1, α -SMA, 피브로넥틴, 콜라겐 I, 콜라겐 III 및 비멘틴의 mRNA와 단백질 발현이 현저히 낮아졌다: TGF- β 1 (mRNA: 0.38 ± 0.13 배; 단백질: 0.48 ± 0.13 배; $p < 0.01$) (도 6a, b), α -SMA (mRNA: 0.41 ± 0.07 배; 단백질: 0.50 ± 0.05 배; $P < 0.01$) (도 6c, d), 피브로넥틴 (mRNA: 0.34 ± 0.12 배; 단백질: 0.61 ± 0.05 배; $p < 0.01$) (도 6e, f), 콜라겐 I (mRNA: 0.52 ± 0.11 배; 단백질: 0.39 ± 0.06 배; $p < 0.01$) (도 6g, h), 콜라겐 III (mRNA: 0.39 ± 0.10 배; 단백질: 0.61 ± 0.06 배; $p < 0.01$) (도 6i, j), 비멘틴 (mRNA: 0.48 ± 0.05 배; 단백질: 0.53 ± 0.06 배; $p < 0.01$) (도 6k, l).

[0114] 그 밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA의 경우 임상적으로 사용 가능한 유효 농도 10mg/kg/day 이하의 인 비보 농도에서 화상 동물모델의 화상조직 내 비후성 반흔 마커들의 발현을 유의하게 감소시키지 못했다 ($P > 0.05$ vs. 담체 처리 대조군).

[0116] **결과 7: 칼렙틴은 마우스에서 화상 후 반흔 형성을 억제한다.**

[0117] 화상 상처에 대한 칼렙틴의 중요성은 칼파인에 의한 화상 후 반흔 형성을 억제할 수 있는지 여부이다. 따라서 칼렙틴이 화상 후 반흔 형성을 억제하는 역할을 하는지 확인하기 위해 칼렙틴을 처리한 마우스의 화상 상처와 담체 대조군의 상처를 비교 분석하였다. 도 7a와 같이, 칼렙틴 처리 마우스의 화상 상처는 화상 후 28일 후 붉고, 불규칙한 두꺼움과 강직성을 나타내는 담체 처리 마우스의 화상 상처보다 시각적으로 덜 붉고, 편평하며, 더 유연했다. Masson의 트리크롬 염색으로 얻은 조직학적 결과에서 28일 동안 칼렙틴을 투여한 마우스의 화상 상처의 표피와 진피 두께는 담체 처리된 대조군보다 유의하게 감소했다 (각각 0.52 ± 0.11 배 및 0.51 ± 0.09 배; $p < 0.01$; 각 군에서 108 개의 조직 절편 (군당 36 마리 마우스에서 각각 3 개의 절편)) (도 7b-d). 칼렙틴 처리 마우스와 담체 처리 마우스간에 표피 두께와 진피 두께 사이에 상대적인 차이는 관찰되지 않았다.

[0118] 그밖에 알려진 칼파인 저해제인 류펩틴 (Leupeptin), SJA-6017, MDL-28170, ALLN, ALLM, AK275, AK295, 퀴놀린카복사마이드 (Quinolinecarboxamide) 및 ATA의 경우 임상적으로 사용 가능한 유효 농도 10mg/kg/day 이하의 인 비보 농도에서 화상 동물모델의 화상 후 반흔 형성을 유의하게 감소시키지 못했다 ($P > 0.05$ vs. 담체 처리 대조군).

표 1

Patients (n = 34)	Cause	Age (years)	Gender	% TBSA burned	Location of specimens (burn/non-burn)
1	Flame	28	Male	23.5	Back/back
2	Contact	58	Male	23	Chest/abdomen
3	Flame	34	Male	27	Leg/leg
4	Flame	21	Male	22.5	Shoulder/shoulder
5	Scald	24	Male	28	Thigh/thigh
6	Scald	37	Male	23	Face/scalp
7	Contact	18	Male	22.5	Leg/leg
8	Flame	25	Male	27	Abdomen/abdomen
9	Flame	13	Male	28	Face/scalp
10	Scald	45	Male	23.5	Hand/hand
11	Contact	17	Male	27	Leg/leg
12	Contact	14	Male	27	Face/scalp
13	Flame	43	Male	22.5	Arm/arm
14	Flame	49	Male	23.5	Abdomen/abdomen
15	Electrical	22	Male	28	Arm/arm
16	Flame	41	Male	27	Leg/leg
17	Flame	12	Male	28	Hip/hip
18	Flame	29	Male	23.5	Leg/leg
19	Scald	34	Female	27	Face/scalp
20	Scald	37	Female	27	Abdomen/abdomen
21	Contact	16	Female	28	Leg/leg
22	Contact	19	Female	27	Face/scalp
23	Flame	41	Female	23.5	Breast/back
24	Flame	39	Female	28	Arm/arm
25	Flame	58	Female	22.5	Hand/hand
26	Contact	22	Female	27	Thigh/thigh
27	Flame	40	Female	23.5	Face/scalp
28	Flame	32	Female	27	Thigh/thigh
29	Flame	28	Female	28	Leg/leg
30	Flame	31	Female	23.5	Breast/abdomen
31	Scald	35	Female	27	Leg/leg
32	Flame	48	Female	22.5	Hand/hand
33	Contact	18	Female	27	Abdomen/abdomen
34	Contact	15	Female	23.5	Thigh/thigh

TBSA, total body surface area

[0119]

표 2

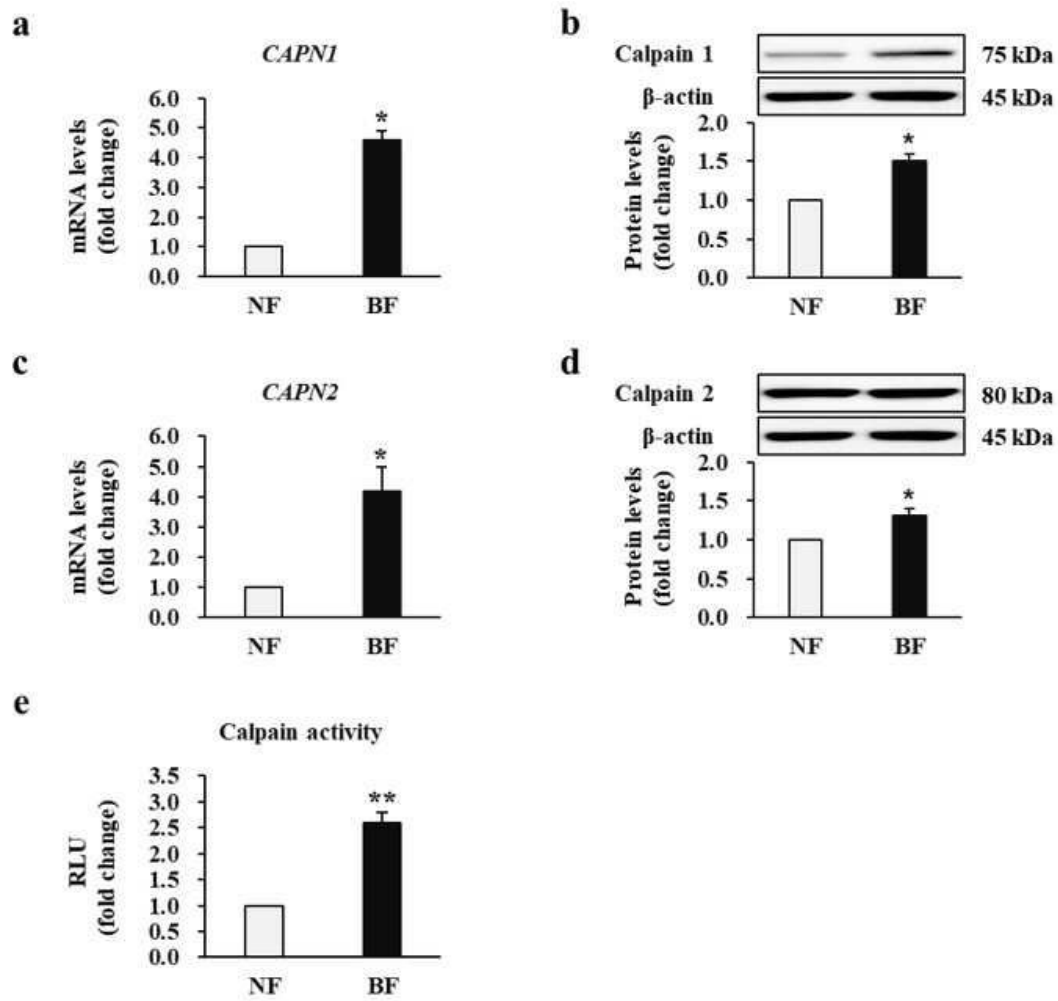
Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Efficiency
<i>CAPN1</i> (h)	CCTCCCTCACTCTCAACGAC	CTCCAGAACTCGTTGCCTTC	100.3
<i>CAPN2</i> (h)	CTGTAGCTAACTGGCCCATCC	TGGAAATTCGTTCTTTGCG	101.5
<i>TGFB1</i> (h)	GTAAAAAGTGGAGCAGCACG	GAGGTATCGCCAGGAATTGT	99.5
<i>ACTA2</i> (h)	CCGACCGAATGCAGAAGGA	ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA	101.3
<i>FN1</i> (h)	CCAGTCCACAGCTATTCCTG	ACAACCACGGATGAGCTG	100.2
<i>COL1A1</i> (h)	ATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC	CTGTACGCAGGTGATTGGTG	99.8
<i>COL3A1</i> (h)	CACTGGGGAATGGAGCAAAAC	ATCAGGACCACCAATGTCATAGG	103.1
<i>VIM</i> (h)	AACCGACACTCCTACAAGAT	CAGAAACAAGTTGGTTGGATAC	99.9
<i>GAPDH</i> (h)	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	101.2
<i>Tgfb1</i> (m)	CACTCCCGTGGCTTCTAGTG	GTCTTGCAGGTGGAGAGTCC	99.3
<i>Acta2</i> (m)	CAGATGTGGATCAGCAAAACAGGA	GACTTAGAAGCATTTGCGGTGGA	99.8
<i>Fn1</i> (m)	ATCATAGTGGAGGCACTGCAGAA	GGTCAAAGCATGAGTCATCTGTAGG	102.1
<i>Col1a1</i> (m)	GACATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC	GGGACCCTTAGGCCATTGTGTA	100.5
<i>Col3a1</i> (m)	GCACAGCAGTCCAACGTAGA	TCTCCAAATGGGATCTCTGG	101.8
<i>Vim</i> (m)	AAAGCGTGGCTGCCAAGAA	ACCTGTCTCCGGTACTCGTTTGA	103.1
<i>Gapdh</i> (m)	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT	103.2

h, human; m, mouse.

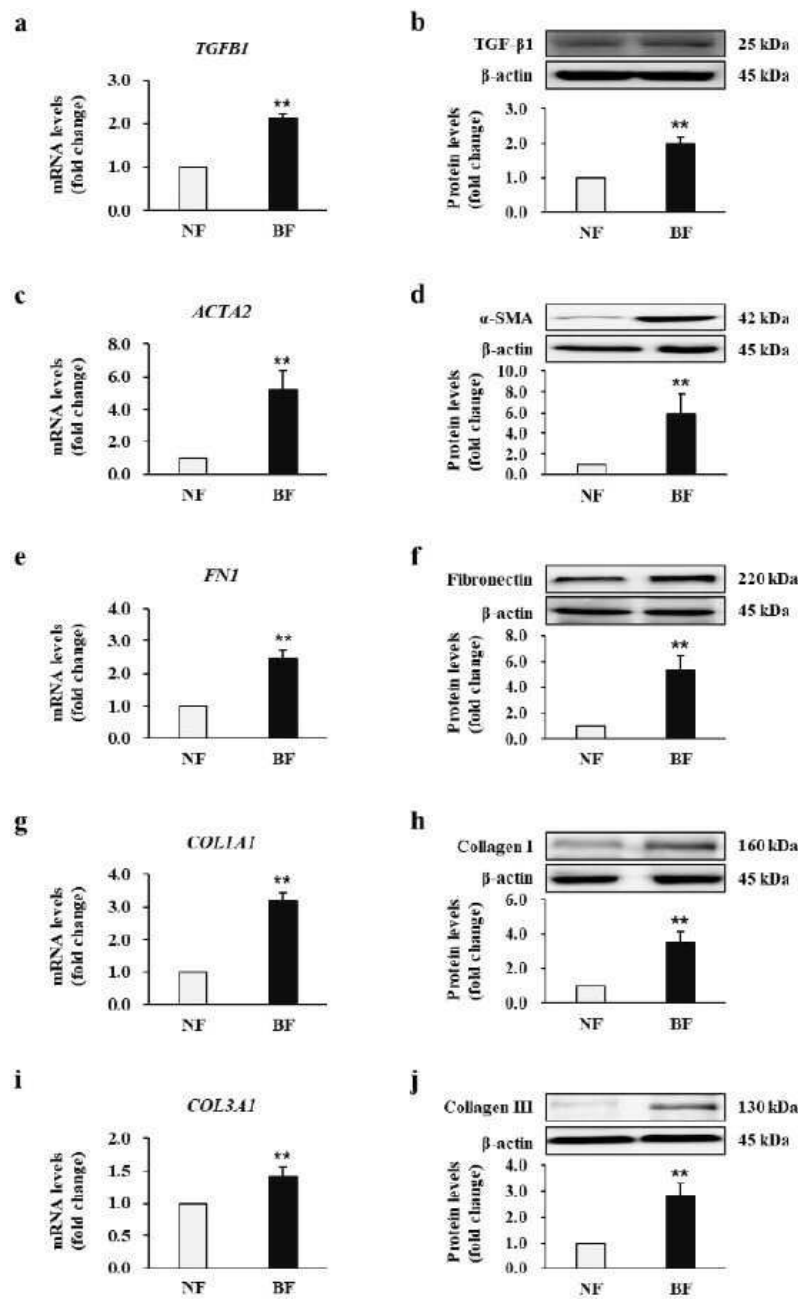
[0120]

도면

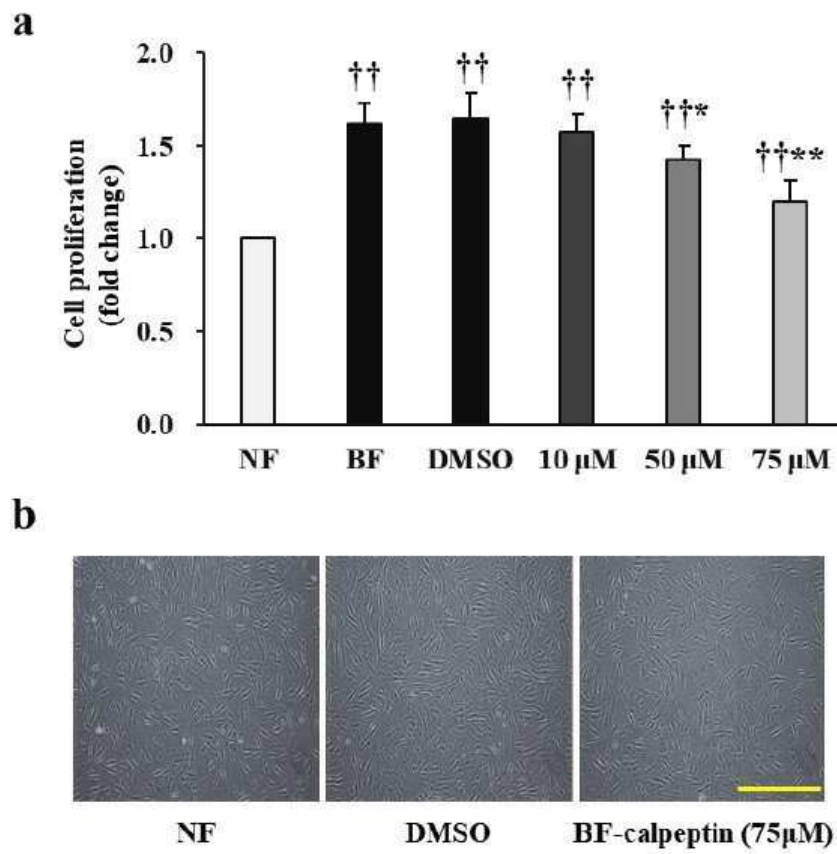
도면1



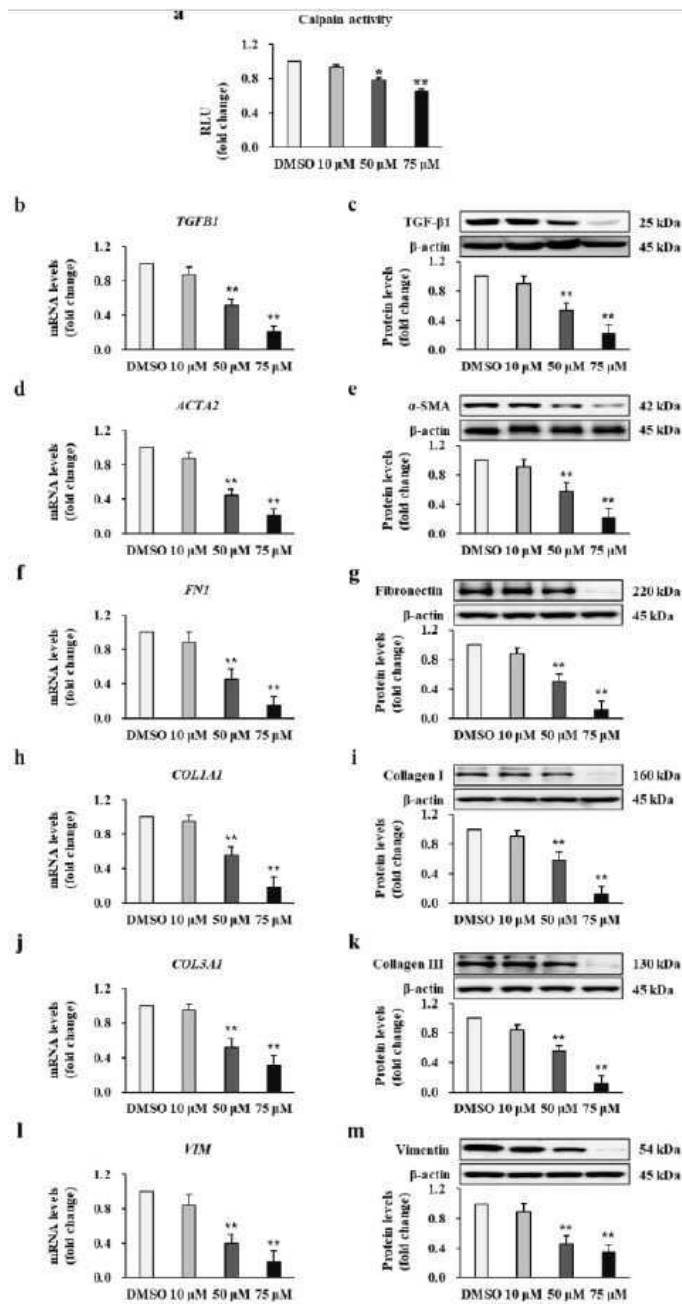
도면2



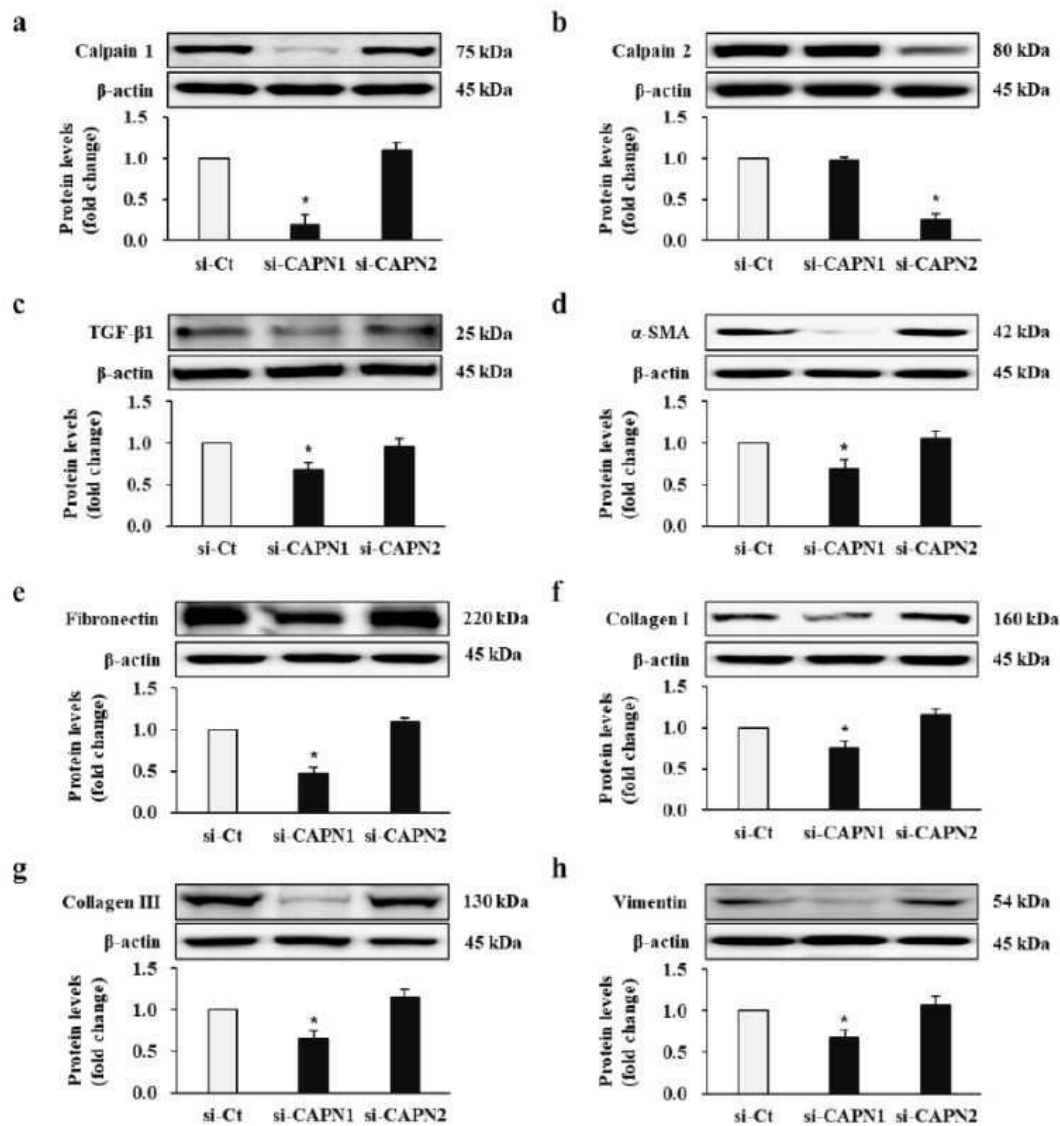
도면3



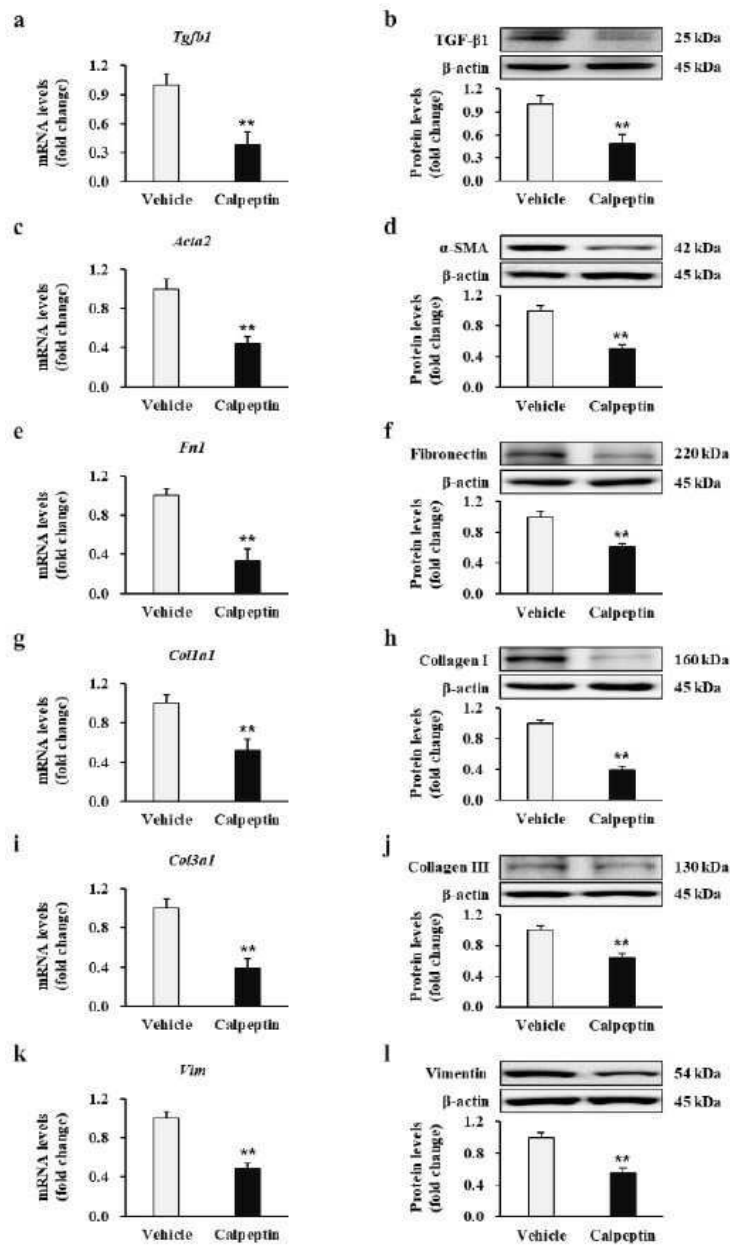
도면4



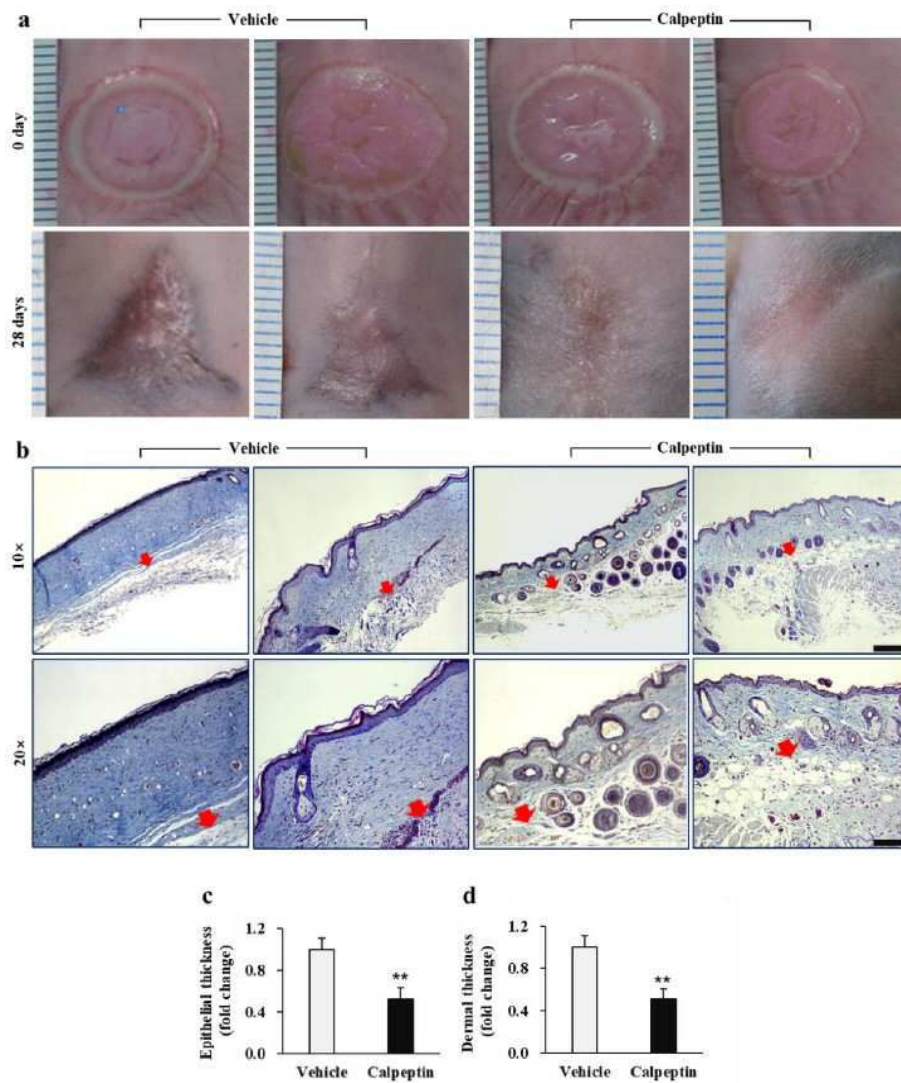
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition containing Calpeptin for preventing or treating hypertrophic scar formation
- <130> June-Bum_Kim_calpeptin
- <160> 32
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer

<400>	1	
gttaaaagtg gagcagcacg		20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
gaggtatcgc caggaattgt		20
<210>	3	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
ccgaccgaat gcagaagga		19
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
acagagtatt tgcgtccga a		21
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
ccagtcaca gctattcctg		20
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
acaaccacgg	atgagctg	18
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
atgttcagct	ttgtggacct c	21
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
ctgtacgcag	gtgattggtg	20
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
cactggggaa	tgagcaaaa c	21
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
atcaggacca	ccaatgtcat agg	23
<210>	11	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 aaccgacact cctacaagat 20
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 cagaaacaag ttggttgat ac 22
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 cctccctcac tctcaacgac 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 ctccagaact cgtgccttc 20
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 ctgtagctaa ctggcccatc c 21

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 tggaaattcg ttcctttgcg 20

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 catgagaagt atgacaacag cct 23

<210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 agtccttcca cgatacaaaa gt 22

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 cactcccgtg gcttctagtg 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400>	20	
gtcttgcagg tggagagtcc		20
<210>	21	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	21	
cagatgtgga tcagcaaaca gga		23
<210>	22	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	22	
gacttagaag catttgcggt gga		23
<210>	23	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	23	
atcatagtgg aggcaactgca gaa		23
<210>	24	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	24	
ggtcaaagca tgagtcatct gtagg		25
<210>	25	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	primer	
<400>	25	
gacatgttca gctttgtgga cctc		24
<210>	26	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	26	
gggaccctta ggccattgtg ta		22
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	27	
gcacagcagt ccaacgtaga		20
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	28	
tctccaaatg ggatctctgg		20
<210>	29	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	29	
aaagcgtggc tgccaagaa		19
<210>	30	
<211>	23	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

acctgtctcc ggtactcggt tga 23

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 31

catggccttc cgtgttccta 20

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 32

tgtcatcata cttggcaggt ttct 24