



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0014454
(43) 공개일자 2019년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0032713
(22) 출원일자 2018년03월21일
심사청구일자 2018년03월21일
(30) 우선권주장
1020170098075 2017년08월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김국성
대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 901호
(대흥동, 센트럴자이)
오상하
대전광역시 서구 둔산로 155, 114동 902호 (둔산동, 크로바아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

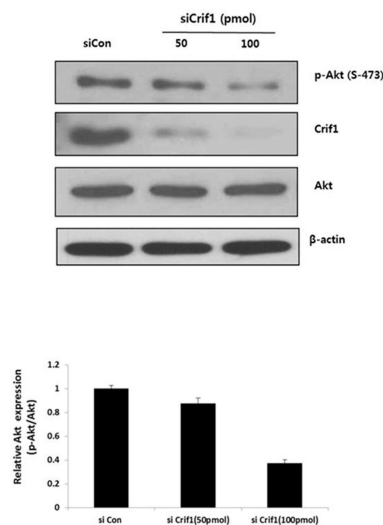
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 CRIF1 억제제를 함유하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 켈로이드의 증식과 신생혈관 생성, 세포의 이동 및 ECM의 생성을 억제하는 것에 의해 켈로이드 및 비후성 반흔의 형성을 억제하거나 이를 치료하는 것에 효과적인 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CRIF1(CR6 interacting factor 1) 유전자의 발현 억제제 또는 CRIF1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0014 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

(72) 발명자

김선희

인천광역시 서구 서곶로 818, 제116동 501호 (당하동, 영남탑스빌아파트)

최수정

서울특별시 강서구 초록마을로32길 11, 101호 (화곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구지원사업

연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교의과대학

연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01061516

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구지원사업

연구과제명 혈관내피세포 미토콘드리아 기능장애에 의한 동맥경화증 발병기전 규명

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교의과대학

연구기간 2015.07.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

CRIF1(CR6 interacting factor 1) 유전자의 발현 억제제 또는 CRIF1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 유전자의 발현 억제제는 CRIF1 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드 또는 siRNA인 것을 특징으로 하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 1 및 2의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 단백질의 활성 억제제는 CRIF1 단백질에 특이적인 항체인 것을 특징으로 하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 상처 치유 과정 중 재구성단계에 사용되는 것을 특징으로 하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 피부 외용제 또는 주사제의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 켈로이드 세포의 증식, 세포의 이동 및 ECM의 생성을 억제하는 것에 의해 상처 치유과정의 후기에서 켈로이드 및 비후성 반흔의 형성을 억제하거나, 켈로이드 및 비후성 반흔을 치료하는 것에 효과적인 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 상처는 외부의 압력에 의하여 외부 또는 조직의 연속성이 파괴되거나, 일부 영역에 결손이 생기는 상태이다. 상처를 입는 경우 통증, 출혈, 기능장애, 염증의 증상을 나타낼 수 있으며, 생체는 이에 반응하여 원래의 상태를 빨리 회복하려고 한다. 상처의 치유란 '세포가 재생, 분화, 증식되어 잃어버렸던 연속성을 다시 유지하는 것'으로 정의할 수 있다. 이러한 상처의 치유과정은 크게 염증단계, 증식단계, 재구성단계를 거치는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 염증단계는 상처 부위의 혈액이 응고되어 지혈이 이루어지는 한편, 백혈구와 호중구를 비롯한 면역세포들이 해당 부위로 이동하여 외부로부터 유입된 위해물질 및 손상된 조직을 면역반응에 의해 제거하는 단계이다. 증식단계에는 혈관내피세포가 상처 부위로 이동하여 손상된 조직 내로 새로운 혈관이 형성되며, 콜라겐이나 엘라스틴과 같은 조직구성 단백질이 생성되는 동시에 섬유아세포가 상처부위로 이동하여 육아조직을 형성한다. 또한 상처 주변의 피부와 조직이 수축되고 상처의 주변부로부터 상피세포가 증식되면서 상처 부위의 크기가 감소하게 된다. 재구성단계는 증식된 상피세포들이 성숙해지고, 섬유조직의 형성에 의해 새로 합성된 조직과 증식된 세포들간의 접합력과 탄력성이 증가되는 상처 치유과정의 최종 단계이다. 상처의 발생 후 새로운 상피세포가 증식되고 삼출물이 나오지 않게 되는데는 3주 이하의 기간이 소요되지만, 상처의 재구성이 완료되는데는 수개월~수년의 시간이 소요되며 이 기간 동안에 적절한 관리를 하지 않으면 상처의 형태나 모양이 좋지 못한 결과를 불러온다.
- [0004] 상처가 수술 또는 외상으로 인하여 진피의 깊은 층까지 손상을 입었을 경우, 피부의 긴장도를 유지하는 진피층의 콜라겐이 과다하게 증식하여 상처가 치유된 후에도 얇아진 피부를 밀고나와 피부의 치유 흔적을 남기게 되는데 이를 "일반 흉터"라 한다. 이는 상처의 치유 결과이나, 상처 치유 과정을 적절하게 조절하고 억제하는 기능의 장애가 있는 경우에는 비정상적으로 섬유조직이 밀집되게 성장하여 비후성 반흔이나 켈로이드가 생길 수 있다. 비후성 반흔은 상처 범위를 넘어서지 않으며 시간이 경과함에 따라 점차 소실되는 경향을 보이지만, 켈로이드는 시간이 지남에 따라 손상부위보다 더 넓게 자라나 정상피부까지 침범하는 차이가 있다. 비후성 반흔이나 켈로이드의 치료를 위해서 수술요법, 방사선 요법, 스테로이드 요법, 실리콘 겔에 의한 폐쇄성 드레싱, 레이저 요법을 포함한 여러 가지 시도가 있었으나 제한적인 효과만을 보이고 있어 아직 정립된 방법은 없다.
- [0005] 비후성 반흔이나 켈로이드의 생성은 상처 치유단계에서 재구성단계 동안 세포의 이동이 과활성화되거나, 조직의 세포와 모세혈관이 이상 증식되어 과형성되거나 정상적으로 분해되지 않아 콜라겐이 과다하게 축적되는 것에 기인한다. 등록특허 10-1505294호는 콜라겐에 대한 가수분해 효과가 있어 켈로이드 또는 흉터 형성을 감소시키는 데 사용할 수 있는 불가사리 부화액 추출물에서 분리한 부화효소를 개시하였으며, 등록특허 10-1697396호는 섬유증과 관련된 결합조직성장인자(CTGF)를 표적으로 하는 안티센스 화합물을 사용하여 켈로이드 또는 비후성 흉터를 치료하는 방법에 대해 보고하였다.
- [0006] CRIF1(CR6 interacting factor 1)은 미토콘드리아에 존재하는 단백질로 CRIF1의 결핍은 미토콘드리아의 기능장애를 유도하고, ROS 생성을 자극하는 것으로 알려져 있다. 공개특허 10-2016-0022628호는 CRIF1의 결핍은 내피세포 기능장애와 혈관 염증을 유발시켜, 내피세포 기능장애 및 혈관 염증과 관련된 혈관질환의 진단 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 보고하였다. 공개특허 10-2009-0103763호는 CRIF1 단백질이 C-말단에 존재하는 cc-도메인을 통한 geminin의 기능조절을 통하여 DNA의 비정상적인 복제를 제어하는 것에 의해 암에 대한 치료효과가 있음을 보고하였다.
- [0007] 그러나, CRIF1이 세포의 이동에 영향을 미치거나, 켈로이드 또는 비후성 반흔의 형성과 관련된 요소들에 영향을 미친다는 것에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1505294호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1697396호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 침범범위가 넓어 미용적인 문제를 일으키거나 관절과 같이 중요한 부위에 발생할 경우 관절의 운동을 방해하는 등의 부작용을 유발하는 켈로이드 또는 비후성 반흔의 예방 및 치료에 효과적인 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 CRIF1(CR6 interacting factor 1) 유전자의 발현 억제제 또는 CRIF1 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0011] 세포의 증식과 혈관의 신생, 세포의 이동은 상처 치유에 중요한 역할을 하지만, 치유단계에 따라 상처 치유를 촉진하는 긍정적인 역할을 하거나 혹은 켈로이드나 비후성 반흔과 같은 흉터를 남기는 부정적인 역할을 하기도 한다. 즉, 상처 치료의 초기 단계인 염증단계와 증식단계에서는 세포 증식, 혈관신생, 세포 이동이 효율적으로 일어날수록 손상된 조직을 제거하고 새로운 조직을 형성하는 기작이 활성화되기 때문에 상처 치유가 촉진된다. 그러나 상처 치유의 최종 단계인 재구성단계에서는 세포증식, 혈관신생, 세포 이동이 과활성화 되는 경우 켈로이드나 비후성 반흔을 형성하는 원인이 되므로, 이를 억제하는 것이 필요하다.

[0012] siRNA를 이용하여 CRIF1 억제로 인해 세포 내 CRIF1의 발현 수준을 조절하면, CRIF1의 발현 억제 정도에 따라 종래 혈관내피세포의 혈관 증식 및 섬유아세포의 증식에 영향을 주는 것으로 알려진 Akt 인산화가 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한, CRIF1는 발현 수준을 조절하는 것에 따라 종래 세포 이동을 조절하는 것으로 알려진 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것을 확인하였으며, 상처 회복능 평가에서도 CRIF1의 발현 또는 활성 억제에 의해 세포 이동성을 억제할 수 있음을 보여주었다. 이는 CRIF1의 발현 억제제 또는 CRIF1의 활성 억제제가 상처 치유 과정 중 재구성 단계에서 혈관의 신생 및 섬유아세포 증식, 세포의 이동을 억제하는 효과에 의해 켈로이드 및 비후성 반흔을 형성하는 데 사용할 수 있음을 의미한다.

[0013] 실제 켈로이드 섬유아세포를 대상으로 한 실험에서 CRIF1의 결핍은 켈로이드 및 비후성 반흔 형성의 주요한 원인인 켈로이드의 증식, 정상조직으로의 이동, 과도한 ECM의 생성을 모두 효과적으로 억제하여 켈로이드 및 비후성 반흔의 예방 및 치료에 효과적으로 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0014] 상기 CRIF1 유전자의 발현 억제제는 CRIF1 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA일 수 있다. 본 명세서에서 "CRIF1 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드"란 CRIF1의 mRNA의 특정부위에 상보적인 서열을 갖는 것에 의해 CRIF1의 mRNA와 특이적으로 결합하여 mRNA가 단백질로 번역되는 것을 저해하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 DNA, RNA, PNA 또는 이들의 유도체로 이루어질 수 있다. 본 명세서에서 "siRNA"는 CRIF1의 mRNA를 절단 분해하는 것에 의해 단백질의 생산을 억제하는 2중 나선 RNA를 의미한다. 상기 CRIF1 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드와 siRNA는 당업자라면 당업계에 공지된 인간 CRIF1의 mRNA 서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있을 것이다. 하기 실시예에서는 서열번호 1과 서열번호 2로 이루어진 2중 나선 RNA를 siRNA로 사용하였으나, 이에 한정되는 것이 아님은 당연하다.

[0015] 센스 : 5'-UGGAGGCCGAAGAACGCGAAUGGUA-3' (서열번호 1)

[0016] 안티센스 : 5'-UACCAUUCGCGUUCUUCGGCCUCCA-3' (서열번호 2)

[0017] 상기 단백질의 활성 억제제는 CRIF1 단백질에 특이적인 항체일 수 있다. 상기 항체는 CRIF1 단백질과 특이적으로 결합하여 CRIF1 단백질의 활성을 억제하는 것으로, 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. CRIF1 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명의 상처 치료용 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 다양한 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 예를 들면, 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 시럽, 에멀전과 같은 경구형 제형이나, 외용제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 조성물은 상처 치료의 목적을 고려하면, 국소 투여가 가능한 피부 외용제 또는 주사제의 형태인 것이 더욱 바람직하다. 상기 피부 외용제의 형태로는 액제, 연고제, 크림제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 젤제, 에어로졸제 등을 예로 들 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합

리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 상처의 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0019] 이상과 같이 본 발명의 조성물에 의하면 켈로이드의 증식과 신생혈관 생성, 세포의 이동 및 ECM의 생성을 억제하는 효과가 있어, 켈로이드 및 비후성 반흔 형성 억제 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 CRIF1 녹다운에 의한 Akt 인산화 저해를 보여주는 전기영동 이미지 및 정량 그래프.
 도 2는 CRIF1 녹다운에 의한 Rho GDI2 발현 증가를 보여주는 전기영동 이미지 및 정량 그래프.
 도 3은 CRIF1 녹다운에 의한 상처 회복능 평가 결과를 보여주는 이미지 및 정량 그래프.
 도 4는 켈로이드 섬유아세포에서 CRIF1 녹다운에 의한 CRIF1 발현 감소를 보여주는 웨스턴 블랏 이미지.
 도 5는 CRIF1 녹다운에 의한 켈로이드 섬유아세포의 세포증식 억제효과를 보여주는 그래프 및 웨스턴 블랏 이미지.
 도 6은 CRIF1 녹다운에 의한 켈로이드 섬유아세포의 세포이동 억제효과를 보여주는 이미지 및 정량 그래프.
 도 7은 CRIF1 녹다운이 켈로이드 섬유아세포에서 ECM 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0022] [실시예]

[0023] 실시예 1 : CRIF1이 혈관내피세포의 세포이동에 미치는 영향 평가

[0024] 1) 세포배양 및 siRNA 감염에 의한 CRIF1 유전자의 녹다운

[0025] HUVECs(Human umbilical vein endothelial cells)는 Clonetics(USA)로부터 구입하여, Endothelial Growth Medium-2(Lonza, USA)에서 제조사의 지시에 따라 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 2~8 계대(passages)에서 아융합(sub-confluent)의 증식성 HUVECs를 사용하였다. HUVECs는 Lipofectamine 2000(Invitrogen, USA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 전술한 서열번호 1, 2의 CRIF1에 대한 siRNA로 감염시켰다. 감염된 세포는 CRIF1 유전자의 녹다운(knockdown)을 위하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. 대조군으로는 서열번호 1과 2의 siRNA 대신 Stealth RNAi Negative Control Duplexes, Medium GC Duplex(Invitrogen)를 사용하여 감염시켰다.

[0026] 2) CRIF1 녹다운에 의한 Akt 인산화 저해 확인

[0027] 1)에서 siRNA를 감염시키고 배양한 세포를 RIPA(10mM Tris-HCl at pH 8.0, 1mM EDTA, 140mM NaCl, 0.1% SDS, 0.1% 200 sodium deoxycholate, and 1% Triton X-100)와 protease inhibitor cocktail (Roche)을 사용하여 용균(lysis)하였다. 30μg의 용균액을 SDS-PAGE에 용해시킨 후 PVDF 멤브레인으로 옮겨 당업계에서 알려진 통상의 웨스턴 블랏 방법에 의해 CRIF1, Akt 및 p-Akt 단백질을 정량하였다. 웨스턴 블랏을 위한 항체로, Anti-CRIF1, anti-phospho Akt 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서, Akt 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 분리된 단백질들의 시각화를 위해 peroxidase가 접합된 이차 항체(Santa Cruz)를 처리하고, Thermo Fisher Scientific 사의 Super Signal West Pico 또는

Femto Substrate를 사용하여 화학발광 신호를 현상하였다. 현상된 블랏과 밴드의 밀도는 Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 Gel Doc 2000 Chemi Doc system으로 정량하였다.

[0028] 도 1은 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 전기영동 이미지와 정량 그래프로 siRNA의 감염에 의해 CRIF1의 발현이 감소함에 따라 Akt 인산화 과정 역시 저해됨을 보여준다.

[0029] **3) CRIF1 억다운에 의한 Rho GDI2의 발현 수준 평가**

[0030] Rho GDI2는 세포의 이동을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에 CRIF1의 억다운이 Rho GDI2의 발현에 영향을 미치는 지 웨스턴 블랏에 의해 확인하였다. 웨스턴 블랏은 2)와 동일한 방법으로 실시하였으며, 항체로는 anti-Rho GDI2 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다.

[0031] 도 2는 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 전기영동 사진 및 정량 그래프이다. 도 2로부터 CRIF1은 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것에 의해 세포의 이동성을 조절할 수 있음을 보여준다.

[0032] **4) 상처 회복능에 의한 세포 이동성 평가(Wound healing assay)**

[0033] HUVECs를 6-웰 플레이트에서 1)에 기재된 방법에 따라 배양하고, CRIF1에 대한 siRNA로 감염시켰다. 이후 24시간 추가로 배양하고, 용합된 세포 단층에 살균된 200 μ l 피펫 팁을 사용하여 일정한 넓이로 상처를 내고, 잔해를 PBS를 사용하여 세척하였다. 이후 추가로 48시간 배양하고 배양 전·후의 사진으로부터 Image J software를 사용하여 상처 부위의 세포의 이동 거리를 측정하는 것에 의해 상처 회복능을 평가하였다.

[0034] 도 3은 상처 회복능 평가 실험의 현미경 이미지와 상처 회복능을 정량화한 그래프이다. 도 3은 CRIF1을 억다운시킨 경우 대조군에 비해 상처 회복능이 크게 감소하는 것을 보여주며, 이로부터 CRIF1의 발현이 억제되면 세포의 이동성이 저해됨을 알 수 있었다. 이는 3)의 세포의 이동성을 억제하는 Rho GDI2의 발현이 증가한 것과 일치하는 것으로, CRIF1이 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것에 의해 세포의 이동성에 영향을 주는 것을 시사한다.

[0035] **실시예 2 : CRIF1이 켈로이드 섬유아세포의 증식 및 세포이동에 미치는 영향 평가**

[0036] 실시예 1에서 CRIF1의 발현 억제가 혈관내피세포의 이동에 영향을 미치는 것을 확인함에 따라, 세포 이동이 과활성화와 관련이 있는 켈로이드 또는 비후성 반흔의 예방 및 치료에 이용가능할 것으로 판단하고 이를 확인하였다.

[0037] **1) 켈로이드 섬유아세포의 배양 및 siRNA 감염에 의한 CRIF1 유전자의 억다운**

[0038] 켈로이드 섬유아세포(keloid fibroblast)는 ATCC로부터 구입하였으며, 4 mM L-글루타민, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린 및 10% 우태아혈청을 함유하는 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 상기 방법에 의해 배양된 켈로이드 섬유아세포를 Lipofectamine 2000(Invitrogen, USA)를 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 전술한 서열번호 1, 2의 CRIF1에 대한 siRNA로 감염시켰다. 감염된 세포는 CRIF1 유전자의 억다운(knockdown)을 위하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. 대조군으로는 서열번호 1과 2의 siRNA 대신 Stealth RNAi Negative Control Duplexes, Medium GC Duplex(Invitrogen)를 사용하여 감염시켰다.

[0039] siRNA에 의해 감염된 세포를 사용하여 실시예 1의 2)의 방법에 따라 웨스턴 블랏에 의해 CRIF1의 발현량을 분석하였다. 도 4는 그 결과를 보여주는 웨스턴 블랏 이미지로 siRNA의 감염에 의해 CRIF1 유전자가 효과적으로 억다운된 것을 확인할 수 있었다.

[0040] **2) CRIF1 유전자의 억다운에 의한 켈로이드 섬유아세포의 증식 억제 효과 확인**

[0041] 1)에서 CRIF1 유전자를 억다운시킨 켈로이드 섬유아세포 또는 대조군의 켈로이드 섬유아세포를 5×10^4 cells/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 접종하여 배양하였다. 배양 24시간 후, CCK-8 kit (Dojindo, Japan)의 시약을 50 μ l 처리한 뒤 1시간 뒤에 OD값을 450nm에서 측정하는 것에 의해 세포 증식률을 측정하였다. 대조군의 세포 수를 100으로 하여 상대적인 증식률을 구하고 그 결과를 도 5에 도시하였다. 별도로 세포증식 마커인 PCNA 단백질의 발현을 웨스턴 블랏으로 측정하고 그 결과를 도 5에 함께 도시하였다.

[0042] 도 5로부터, 대조군에 비해 CRIF1의 결핍에 의해 켈로이드 섬유아세포의 증식이 약 30% 정도 감소되며, PCNA 단백질의 발현 역시 감소함을 확인할 수 있었다.

[0043] **3) CRIF1 유전자의 억다운에 의한 켈로이드 섬유아세포의 이동 억제 효과 확인**

[0044] 켈로이드 섬유아세포에 대해 실시예 1의 4)와 동일한 방법에 의해 CRIF1 유전자가 암세포의 이동에 미치는 영향

을 평가하였다.

[0045] 도 6은 그 결과를 보여주는 상처 회복능 평가 실험의 현미경 이미지와 상처 회복능을 정량화한 그래프이다. 도 6에서 CRIF1을 녹다운 시킨 경우 대조군에 비해 상처 회복능이 크게 감소하는 것을 보여주며, 이로부터 CRIF1의 발현이 억제되면 켈로이드 섬유아세포의 이동성 역시 저하되는 것을 알 수 있다.

[0046] 4) CRIF1 유전자의 녹다운이 켈로이드 섬유아세포의 ECM 관련 유전자의 발현에 미치는 효과 확인

[0047] 켈로이드는 ECM(세포외 매트릭스, extracellular matrix)의 구성물이 과량으로 축적되어 정상 조직으로의 침윤 등이 나타나는 병변으로, CRIF1의 조절에 의한 켈로이드 및 비후성 반흔의 예방 및 치료를 확인하기 위하여 CRIF1의 결핍이 ECM 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[0048] 구체적으로, 켈로이드 섬유아세포를 6well plate에 접종하여 24시간 배양한 후, 1)과 동일한 방법에 의해 CRIF1 유전자를 녹다운시켰다. 추가로 48시간 배양한 후에 세포를 키우던 배양액을 Suction하고 Trizol reagent(Invitrogen, USA) 1 ml로 처리하였다. 세포를 긁어서 모아준 뒤 클로로포름 200 μ l를 처리하고, 12000g로 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 이소프로판올 500 μ l를 처리하고, 12000g로 10분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 침전물은 75% 에탄올 1 ml로 세척한 후 상온에서 건조하였다. 1 μ g의 건조된 침전물을 15 μ l의 Rnase-Free water로 녹인 후 RT-preMix (Intron, KOREA)를 이용하여 45°C 60분, 95°C 5분의 사이클로 PCR 하여 cDNA를 수득하였다.

[0049] 얻어진 cDNA와 하기 표 1에 기재된 프라이머 및 DNA에 직접 binding하여 발광을 하는 시약인 SYBR green(Enzynomics, KOREA)을 사용하여 Realtime PCR을 진행하여 ECM 관련 mRNA의 발현을 정량하였다. rt PCR은 95°C에서 10분간 cDNA를 denaturation시키고 95°C 10초, annealing 60°C 20초, elongation 72°C 30초를 40 사이클 반복하여 진행하였다. 얻어진 결과는 house keeping 유전자인 GAPDH를 대조군으로 사용하여 보정하였으며, CRIF1을 녹다운하지 않은 대조군 세포의 보정결과를 1로 하여 상대적인 값으로 나타내었다.

표 1

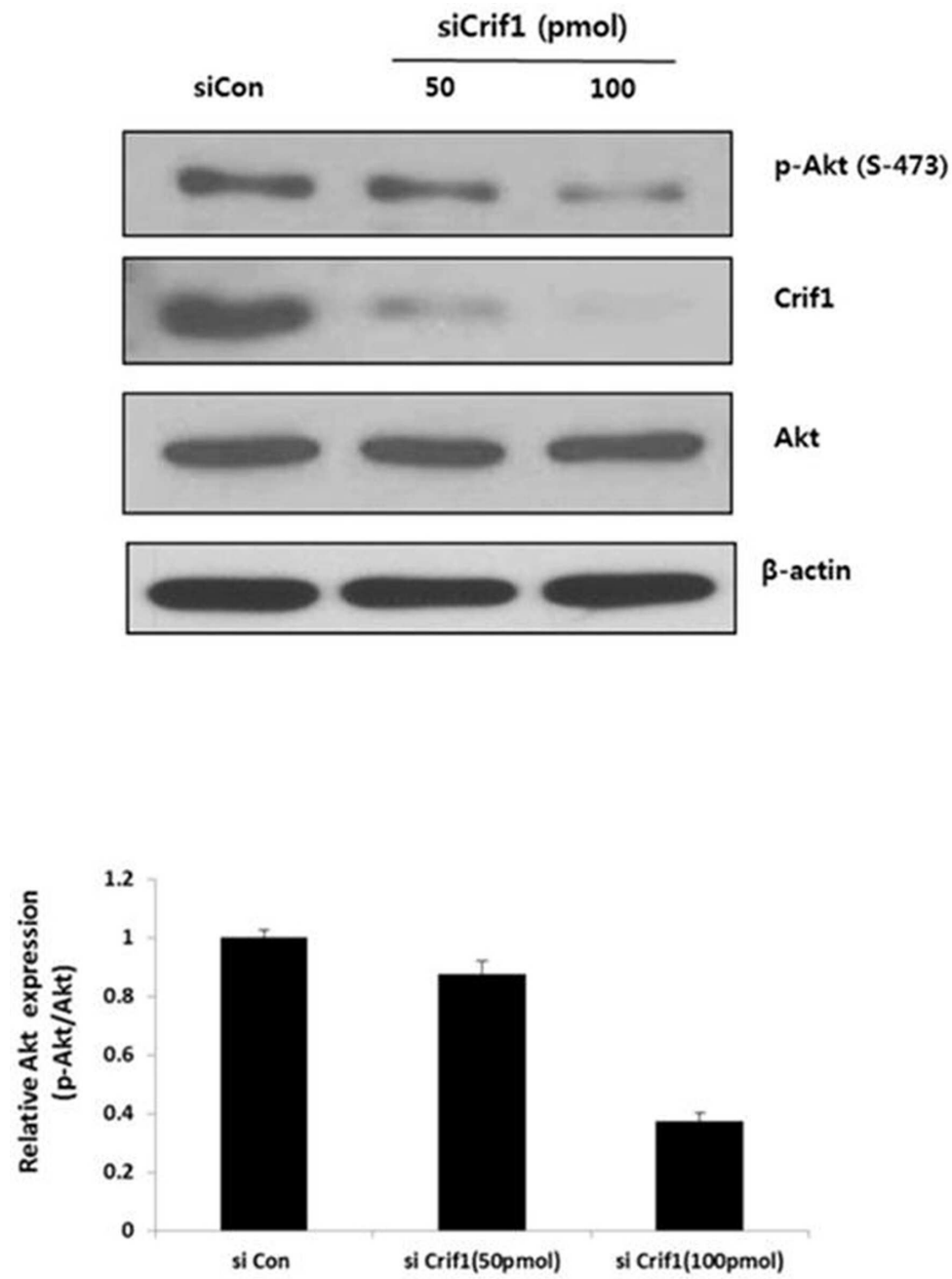
유전자		서열								
h-CRIF1	센스	GCA	CGC	AGC	CTA	CTA	GGT	G	서열번호 3	
	안티센스	CGA	ACT	GCT	TAG	CCG	CGT	A	서열번호 4	
h-TGF-beta	센스	CAA	TTC	CTG	GCG	ATA	CCT	CAG	서열번호 5	
	안티센스	GCA	CAA	CTC	CGG	TGA	CAT	CAA	서열번호 6	
h-COL1A1	센스	GAG	GGC	CAA	GAC	GAA	GAC	ATC	서열번호 7	
	안티센스	CAG	ATC	ACG	TCA	TCG	CAC	AAC	서열번호 8	
h-COL3A1	센스	GGA	GCT	GGC	TAC	TTC	TCG	C	서열번호 9	
	안티센스	GGG	AAC	ATC	CTC	CTT	CAA	CAG	서열번호 10	
h-PAI1	센스	AGT	GGA	CTT	TTC	AGA	GGT	GGA	서열번호 11	
	안티센스	GCC	GTT	GAA	GTA	GAG	GGC	ATT	서열번호 12	
h-CTGF	센스	CAG	CAT	GGA	CGT	TCG	TCT	G	서열번호 13	
	안티센스	AAC	CAC	GGT	TTG	GTC	CTT	GG	서열번호 14	
h-GAPDH	센스	GGC	TGT	TGT	CAT	ACT	TCT	CAT	GG	서열번호 15
	안티센스	GGA	GCG	AGA	TCC	CTC	CAA	AAT	서열번호 16	

[0050]

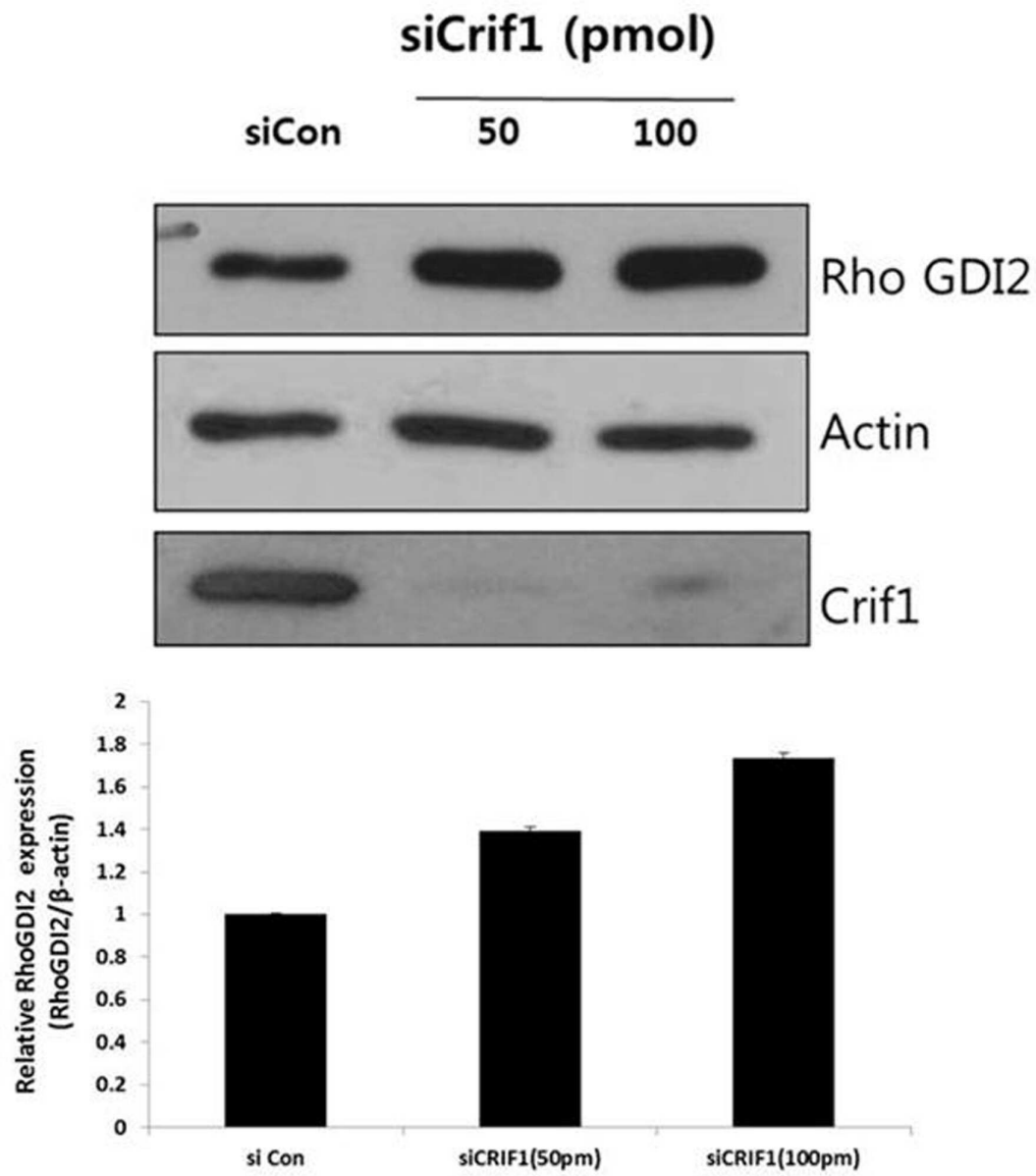
[0051] 도 7은 그 결과를 보여주는 그래프로, 도 7에서 ECM 합성에 가장 주요하게 관여하는 것으로 알려진 TGF- β (Transforming growth factor- β) mRNA의 발현은 증가하였음에도 불구하고, pathway의 가장 하위에 존재하는 mRNA 및 ECM의 발현은 감소한 것을 볼 수 있다.

도면

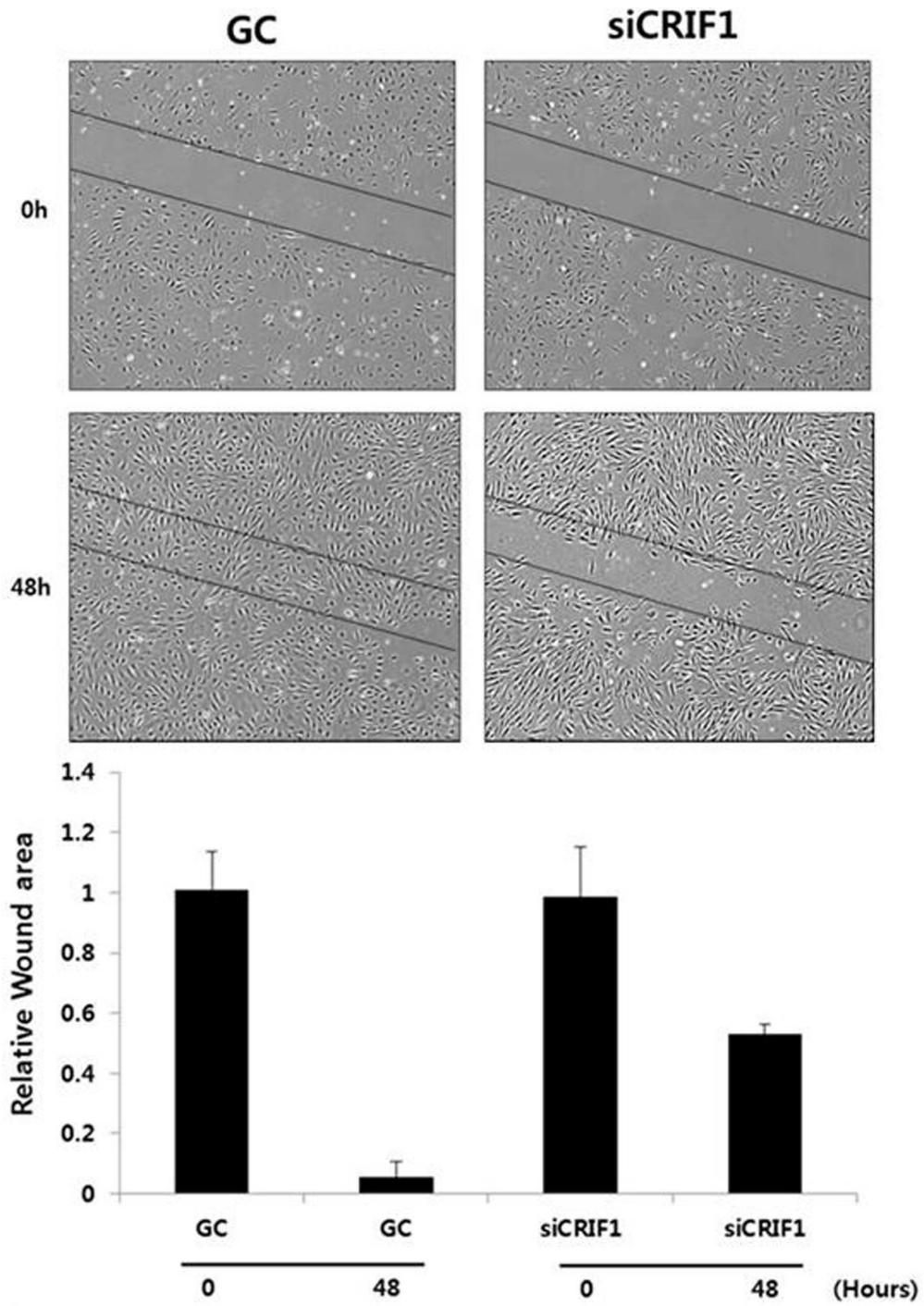
도면1



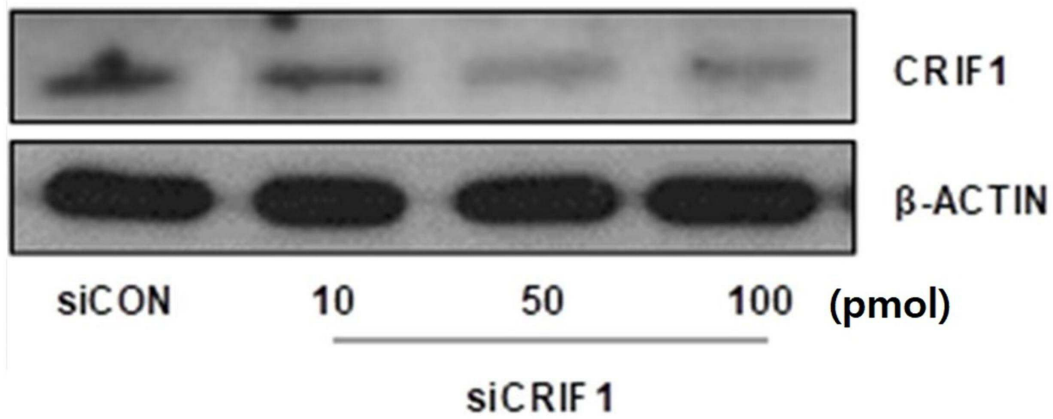
도면2



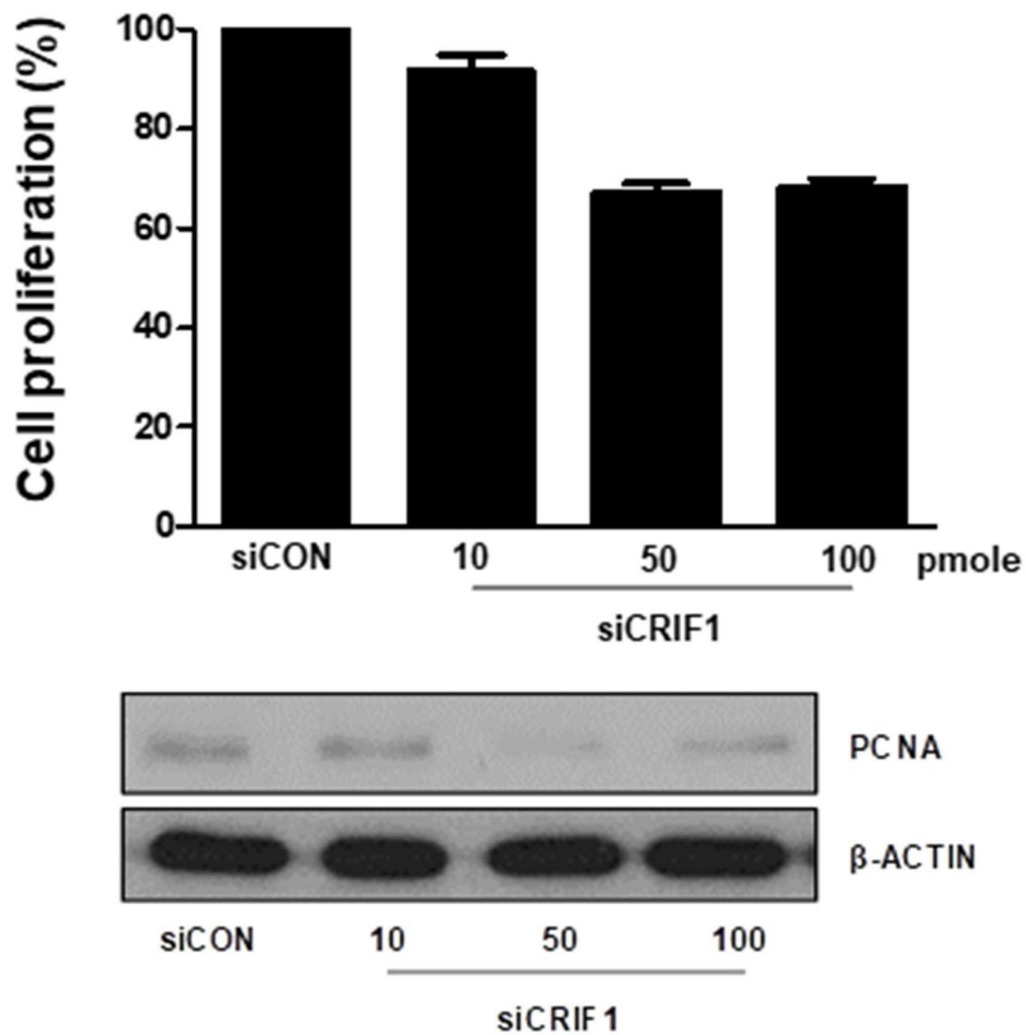
도면3



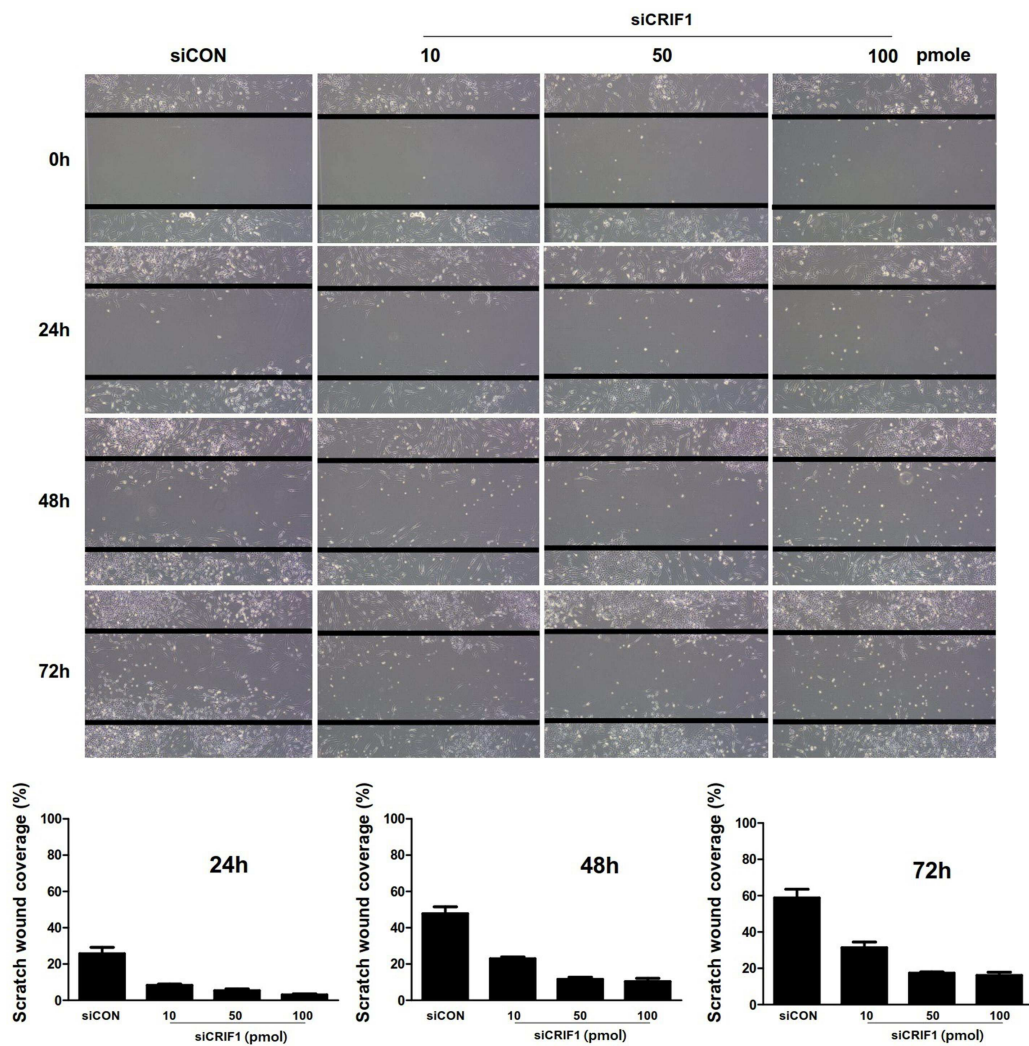
도면4



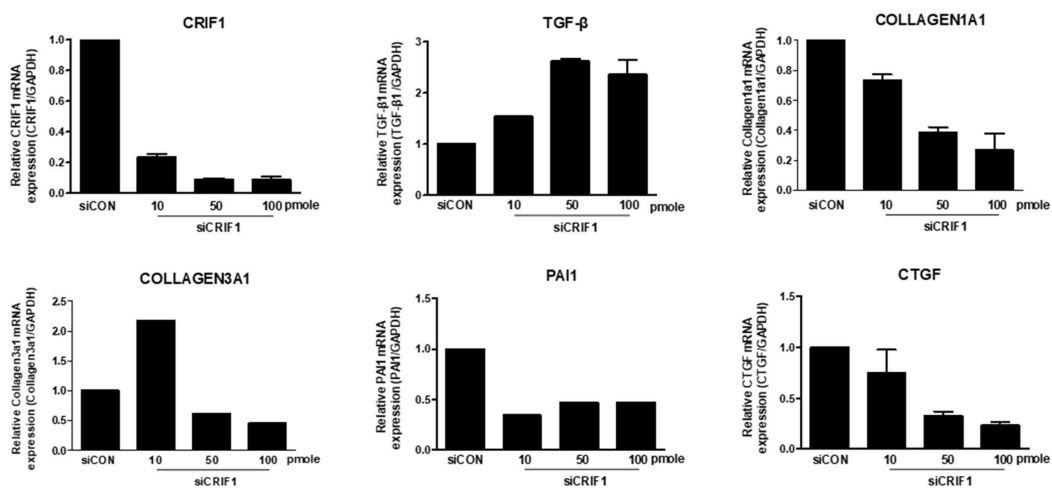
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Composition for Inhibition or Treatment of Keloids and

Hypertrophic Scar Comprising CRIF1 Antagonist

<130> P0318-173

<150> KR 10-2017-0098075

<151> 2017-08-02

<160> 16

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense siRNA for CRIF1

<400> 1

uggaggccga agaacgcgaa uggua

25

<210> 2

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense siRNA for CRIF1

<400> 2

uaccauucgc guucuucggc cucca

25

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gcacgcagcc tactaggtg

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

cgaactgctt agccgcgta

19

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

caattcctgg cgatacctca g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gcacaactcc ggtgacatca a

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gagggccaag acgaagacat c

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cagatcacgt catgcacaa c

21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 9
 ggagctggct acttctcgc 19
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 gggaacatcc tccttcaaca g 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 agtggacttt tcagaggtgg a 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gccgttgaag tagagggcat t 21
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 cagcatggac gttcgtctg 19
 <210> 14
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 aaccacggtt tggtccttgg 20
 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 ggctgtgtgc atacttctca tgg 23
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 ggagcgagat ccctccaaaa t 21