

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호	10-2016-0047111
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자	2016년05월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 39/08</i> (2006.01) <i>A61K 38/17</i> (2006.01) <i>A61K 38/48</i> (2006.01) <i>A61P 17/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0143055 (22) 출원일자 2014년10월22일 심사청구일자 2014년10월22일		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교) (72) 발명자 오상하 대전광역시 중구 문화로 282 충남대학교병원 성형외과 (74) 대리인 추혁, 박아혁	

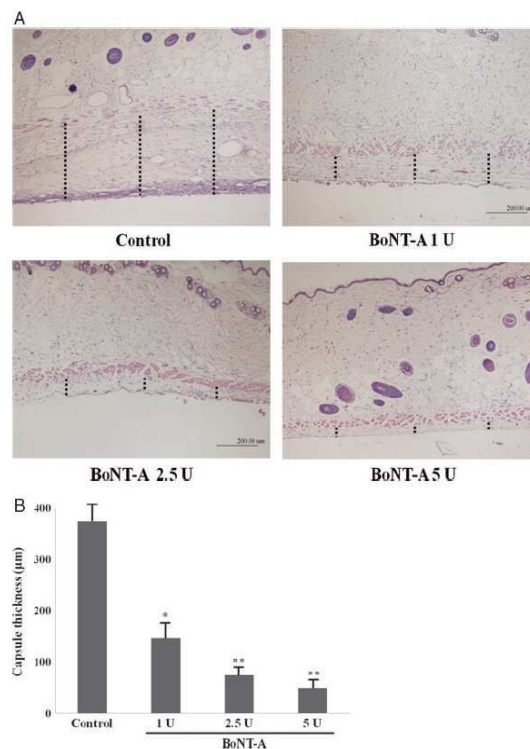
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 실리콘 보형물 주변에 보툴리눔 독소 타입 에이를 투여하는 것을 포함하는 피막 구축 예방 방법

(57) 요약

본 발명은 보툴리눔 신경독소 A형(BoNT-A)가 피막 구축(capsular contracture)을 감소시키는 것을 확인하였고, 가능한 기작을 규명하였다. 실리콘 블록을 20마리의 마우스의 피하로 주입하고, BoNT-A (1, 2.5 또는 5U)를 투여한 실험 그룹은 피하 주머니로 주입되었다. 삼십일 후, 보형물 주위의 피막을 채취하고 분석하였다. 인간 피부에 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



서 채취된 섬유아세포를 배양하여 근섬유아세포로의 분화에 대한 BoNT-A의 효과를 웨스턴블롯 분석에 의해 조사하였다. 배양된 섬유아세포에서 TGF- β 1 발현의 변화는 ELISA로 확인하였다.

In vivo 연구에서, 피막의 두께($P < 0.05$) 및 피막에서의 알파-平滑근 액틴(α -SMA)+ 세포의 수($P < 0.05$)는 실험군에서 현저하게 감소하였다. TGF- β 1는 실험군에서 현저하게 발현이 억제되었다($P < 0.05$). *In vitro* 연구에서, BoNT-A는 섬유아세포 생존율에는 그다지 영향을 미치지 않았다. 웨스턴 블롯 분석은 실험군에서 α -SMA 단백질 수준이 현저하게 감소됨을 나타내었다($P < 0.05$). ELISA에 기초하여, TGF- β 1의 양은 실험군에서 의미있게 감소되었고($P < 0.05$), 특히, 고용량의 BoNT-A로 처리된 실험군에서 현저하게 감소되었다($P < 0.001$). 본 연구는 BoNT-A가 아마도 TGF- β 1 신호전달을 억제함으로써, 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 분화를 방해함으로써, 실리콘 보형물 주위의 피막구축을 방지하는 것임을 확인하였다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A1057928

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업/일반연구자지원사업/신진연구지원사업

연구과제명 신피콘 피막구축에서 근섬유모세포의 역할 규명

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

실리콘 보형물 주변에 보툴리눔 독소 타입 A(BoNT-A)를 투여하는 것을 포함하는 피막 구축 예방 및 방지 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 BoNT-A의 농도는 1 ~ 5U 인 것을 특징으로 하는 실리콘 보형물 주변에 BoNT-A를 투여하는 것을 포함하는 피막 구축 예방 및 방지 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 BoNT-A는 30일간 처리되는 것을 특징으로 하는 실리콘 보형물 주변에 BoNT-A를 투여하는 것을 포함하는 피막 구축 예방 및 방지 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 BoNT-A가 피막 구축에 관여하는 사이토카인인 TGF- β 1 신호전달을 억제함으로써, 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 분화를 방해하는 것을 특징으로 하는 실리콘 보형물 주변에 BoNT-A를 투여하는 것을 포함하는 피막 구축 예방 및 방지 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 실리콘 보형물 주변에 보툴리눔 독소 타입 A(이하, 'BoNT-A'라 함)를 투여하는 것을 포함하는 피막 구축 예방 및 방지 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 실리콘 유방 보형물은 일반적으로 유방 재건 및 미용을 위한 유방수술에 사용된다. 피막 구축(Capsular Contracture)은 보형물을 이용한 유방수술에서 재수술이 필요한 가장 흔한 합병증이다. 피막 구축의 원인에 대해 많은 연구가 있어 왔다(Benlier E, et al., Effect of verapamil on reduction of peri-implant capsular thickness. *Aesthetic Plast Surg* 2009;**33**:570-5). 비후성 흉터 가설, 근섬유아세포, 실리콘 젤 출혈, 혈종 이론, 연령 및 감염 등 여러 가설이 있다(Adams WP Jr. Capsular contracture: what is it? What causes it? How can it be prevented and managed? *Clin Plast Surg* 2009;**36**:119-26.). 하지만, 원인과 예방에 대한 결론은 없는 상태이다.

[0003] 1980년대 초, BoNT-A는 사시 안검 경련과 같은 임상적 치료를 위해 처음으로 도입되었다. BoNT는 주사 후 2-6개월 동안, 아세틸 콜린의 방출을 방지하고 횡문근의 기능적 신경제거를 야기함으로써, 시냅스 전 뉴런에 대한 작용을 통해, 화학적 신경절단(Chemodenervation)을 유도한다. 이러한, 화학적 신경절단은 근섬유 위축 및 후속으로 이완성 마비를 야기한다. 이러한 기전을 이용하여, 근육에 의해 유도되는 주름 치료에 널리 사용되고 있다.

[0004] 그 외에도 다양한 임상적 상황에서의 BoNT-A의 사용이 연구되고 있으며, 특히, 일부 의사들은 개선을 위해 쓰고 있다(Gassner HG, et al. Treatment of facial wounds with botulinum toxin A improves cosmetic outcome in primates. *Plast Reconstr Surg* 2000;**105**:1948-53 discussion 54-5).

[0005] 이식 장치 주위에 피막의 생성은 이물질에 대한 신체의 정상적인 반응이며, 성숙한 피막은 일반적으로 흉터 조직에서 발견되는 것과 유사한 세포로 구성되어있다(Brohim RM, et al., Early tissue reaction to textured breast implant surfaces. *Ann Plast Surg* 1992;28:354-2).

[0006] 위와 같은 결과는 BoNT-A가 실리콘 보형물 주변의 피막 형성에도 영향을 끼칠 수 있다고 생각되었다. 그래서, BoNT-A가 실리콘 보형물 주위에서 피막 구축을 감소시킴을 더 증명하기 위해, 우리는 실리콘 유도 피막구축에 대한 효과를 *in vivo* 마우스 모델과 *in vitro* 인간 섬유아세포에서 연구하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) * 등록 특허 제10-0882817호 : 보툴리눔 독소를 유효성분으로 포함하는 지방세포 생착증진용 약학적 조성물

(특허문헌 0002) * 등록 특허 제10-0852824호 보툴리눔 신경독소를 포함하는 치료 조성물

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 보툴리눔 독소 타입 에이를 이용한 실리콘 보형물 주변에 피막 구축 예방 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 실리콘 보형물 주변에 보툴리눔 독소 타입 A(BoNT-A)를 투여하는 것을 특징으로 하는 피막 구축 예방 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 바람직하게 본 발명에서, 상기 BoNT-A의 농도는 1 ~ 5U 인 것을 특징으로 한다.

[0011] 또한, 바람직하게는 상기 BoNT-A는 30일간 처리되는 것이 바람직하다.

[0012] 또한, 상기 BoNT-A가 피막 구축에 관여하는 사이토카인인 TGF- β 1 신호전달을 억제함으로써, 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 분화를 방해하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 실리콘 보형물 주위에 보툴리눔 신경독소 A형(BoNT-A)를 투여함으로써, 피막 구축이 감소되는 것을 확인하였다. 실리콘 블록을 20마리의 마우스의 피하로 주입하였고, BoNT-A (1, 2.5 또는 5U)를 투여한 실험 그룹은 피하 주머니로 주입되었다. 30일 후, 보형물 주위의 피막이 채워지고 분석되었다. 인간 피부의 배양된 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 분화에 대한 BoNT-A의 효과는 웨스턴블롯 분석에 의해 조사하였다. 배양된 피부아세포에서 TGF- β 1 발현의 변화는 ELISA로 조사되었다.

[0014] *in vivo* 연구에서, 피막의 두께($P < 0.05$) 및 피막에서의 알파-평활근 액틴(α -SMA)+ 세포의 수($P < 0.05$)는 실험군에서 현저하게 감소하였다. TGF- β 1는 실험군에서 현저하게 발현이 억제되었다($P < 0.05$).

[0015] *in vitro* 연구에서, BoNT-A는 섬유아세포 생존율에 그다지 영향을 미치지 않았다. 웨스턴 블롯 분석은 실험군에서 α -SMA 단백질 수준이 현저하게 감소됨을 나타내었다($P < 0.05$). ELISA에 기초하여, TGF- β 1의 양은 실험군에서 현저하게 감소되었고($P < 0.05$), 특히, 고용량의 BoNT-A로 처리된 실험군에서 현저하게 감소되었다($P < 0.001$).

[0016] 본 연구는 BoNT-A가 아마도 TGF- β 1 신호전달을 억제함으로써, 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 분화를 방해함으로써, 실리콘 보형물 주위의 피막구축을 방지하는 것임을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 30 일 시점에서 실험군 또는 대조군의 피막 조직의 조직학적 단면을 나타낸 것이다(기본 배율, $\times 40$). 색

선은 헤마톡 실린 및 에오신으로 염색하였다. 도트 라인의 길이는 피막 두께이다. 실험군의 피막은 대조군에 비해 상당히 얇았다($P < 0.05$). 실험군 1의 실험군 2 및 3보다 훨씬 두꺼웠다($P < 0.05$). * $P < 0.05$ 대 대조군; ** $P < 0.01$ 대 대조군.

도 2는 30일 시점에서, 실험군과 대조군의 피막 조직의 면역 형광 현미경 단면을 나타낸 것이다. 근섬유 아세포를 정량화 하기 위해, 단면 조직은 항-알파-平滑근 액틴(α -SMA) 항체로 면역 염색하였고, α -SMA+ 세포는 4개의 무작위로 선택된 필드에서 계수되었다. 파막에서 α -SMA+ 세포의 수는 대조군에 비해, 실험군에서 감소하였다($P < 0.05$). * $P < 0.05$ 대 대조군; ** $P < 0.01$ 대 대조군.

도 3은 마우스의 채취된 피막에서 TGF- β 1, TNF- α 및 VEGF 유전자 발현의 역전사 PCR 분석을 나타낸 것이다. 모든 샘플의 TNF- α 와 VEGF의 발현은 현저한 차이를 나타내지 않았다($P < 0.05$). TGF- β 1는 실험군에서 현저히 감소되었다($P < 0.05$). * $P < 0.05$ 대 대조군; ** $P < 0.01$ 대 대조군.

도 4는 MTT 분석에서, 다양한 농도의 BoNT-A로 처리한 섬유아세포와 BoNT-A를 처리하지 않은 것의 생존율에는 의미있는 차이가 없었다.

도 5 α -SMA의 단백질 수준은 표준 웨스턴 블로팅 기법을 이용하여 측정하였다. α -SMA의 단백질 발현은 무혈청 처리된 섬유아세포 보다 BoNT-A 처리군에서 현저하게 감소되었다. 또한, 이러한 효과는 농도 의존적이다. * $P < 0.05$ 대 대조군; ** $P < 0.01$ 대 대조군.

도 6은 BoNT-A 처리 후 처리후 효소 면역 분석법(ELISA)을 사용하여 TGF- β 1 단백질의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 결과는 BoNT-A로 처리된 TGF- β 1에서의 감소를 나타내었다. 또한, 이 효과는 농도 의존적이었다. * $P < 0.05$ 대 대조군; ** $P < 0.01$ 대 대조군; *** $P < 0.001$ 대 대조군

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 실리콘 보형물 주변에 보툴리눔 독소 타입 A를 투여하는 것을 포함 하는 피막 구축 예방 및 방지 방법에 관한 것이다.

[0019] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하나, 이들이 발명의 내용을 제한하는 것은 아니다.

[실시예 1 : 재료 및 방법- *in vivo* 분석]

[0020] 20마리의 암컷 마우스(Orient, Bio, Inc., 서울, 한국)이 충남대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회(CNUCOM - 2007-017)의 승인을 받은 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 규약에 따라 동물실험에 사용되었다. 고체, 부드러운 표면의 반구 실리콘 블록(직경 1.0cm)이 실험을 위해 준비되었고, 에틸렌 옥사이드 가스를 이용하여 멸균되었다. 마취는 7주령 마우스에 유도되었고, 피부와 마우스 근위 등쪽 영역의 양 옆에 의료적 등 중간 라인으로부터 근육층 0.5cm에 1.0cm 절개가 이루어졌다. 지름 1.5cm 를 측정하는 포켓이 생성되었고, 보형물이 도입되었으며, 피부 절개를 봉쇄하였다. 동물은 4 그룹으로 나누었다(그룹당, n=5). 대조군은 피하 주머니로 침투되는 식염수를 투여받았고, 세 실험군, 그룹 1, 2 및 3은 각각 1, 2.5 및 5 U BoNT-A(botox®; Allergan, Irvine, CA)로 주사되었다.

[0022] 수술 후, 마우스는 30일간 추적 관찰되었다. 이 기간의 마지막에, 동물은 희생되었고, 실리콘 보형물, 상처와 연관 조직이 일괄적으로 채취되었다. 실리콘 보형물에서 분리한 후, 각 마우스의 오른쪽 측면에서 상처와 주변의 연조직 샘플은 10%의 포르말데히드에 고정되었고, 파라핀에 매립되어, 5 μ m의 두께의 섹션으로 절단되었다. 왼쪽 측면의 상처와 주변의 연조직 샘플은 RNAlater 용액(Applied Biosystems, Foster City, CA)에 두었으며, -80°C에서 저장되었다.

[0023] 1.1 조직학적 분석

[0024] 조직학적 분석을 위해, 실리콘 디스크의 주위의 피막은 적어도 24시간 동안 4 % 파라포름 알데히드에서 고정되었고, 등급화된 알코올 시리즈에서 배양되었으며, 파라핀에 매립되고, 4 μ m의 두께 섹션으로 절단되었다. 섹션들은 헤마톡실린 및 에오신으로 염색되었고, 광학 현미경하에서 관찰되었다. 피막의 두께는 각 섹션의 3가지 다른 영역에서 측정되었고, 평균 두께가 계산되었다.

[0025] **1.2 α-SMA의 면역 형광 현미경**

[0026] 피막에 있는 근섬유의 내용을 검사하기 위해, 면역 형광 현미경법을 실시하였다. 면역 형광 염색을 위해, 피막은 0.01M 포스페이트 버퍼 식염수(PBS)로 완전히 세척되었고, Antigen retrieval을 위해 시트르산 나트륨에 두었고, 끓인 수, 5분간 식혀두었다. PBS로 3번 세척한 후, 섹션을 30분 동안 10 %의 염소 혈청 및 0.1 % 트리톤 X-100으로 보충된 PBS에 두었다. 샘플은 인간 알파 평활근 액틴(α-SMA)(R&D System, 미네아 폴리스, MN)에 대한 항체(1:200 희석)으로 4℃에서 밤새 배양되었고, PBS로 다시 세척되었으며, Cy³-결합 항-토끼 2차 항체(1:500; Amersham, Little Chalfont, UK)로 2시간 동안 상온에서 배양되었다.

[0027] 핵은 DAPI로 염색했다(40-60-아미디노-2-페닐인돌; Sigma, St. Louis, MO). 섹션은 DAPI 필터 (365nm 여기)로, Leica digital DMI 6000 형광 현미경(Leica Microsystems, 하이델베르크, 독일)로 관찰하였다. α-SMA 형광은 PE 필터(546 nm 여기)로 400 × 배율로 시각화되었고, 이미지는 광도 카메라(Cool Snap HQ, Tucson, AZ)로 촬영되었다. 근섬유아세포를 정량화하기 위해, 섹션화된 조직은 항-α-SMA 항체로 면역화되었고, α-SMA 세포는 4개의 무작위로 선택된 필드에서 계산되었다.

[0028] **1.3 사이토카인 발현의 역전사 PCR 분석**

[0029] 피막 구축과 관련된 성장 인자 발현의 변화를 조사하기 위하여, 우리는 성장 인자-β 1(TGF-β 1), 종양 괴사 인자-알파(TNF-α) 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 수용체를 변형시키는 메신저 RNA(mRNA)의 발현을 분석하였다. 실리콘 보형물 주위의 피막으로부터의 전체 RNA는 트리졸 시약을 사용하여 추출되었다.

[0030] 각 샘플에서 약 2 μg의 전체 RNA는 40 μl의 반응에서 200U의 SuperScript II 역전사 효소(Invitrogen, Carlsbad, CA)와 올리고(dT)fmf 이용하여 cDNA를 생성하는데 사용되었다. 다음으로, 2 μL의 각 cDNA 샘플은 다음의 프라이머 세트를 이용하여 DNA 중합 효소를 사용하여 중합 효소 연쇄 반응에 의해 증폭되었다: TGF-β 1 (BC013738.1), 5'-CTT CAG CTC의 CAC AGA GAA GAA-3' 및 5'-TCA TGT TGG ACA ACT GCT CC-3'; TNF-α (NM 013693.2), 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3' 및 5'-CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC-3'; VEGF (NM 001025250.3), 5'-TGA ACT TTC TGC TCT CTT GG-3' 및 5'-AAC AAA TGC TTT CTC CGC TC-3'; 및 β-액틴, 5'-GTC ACC AACTGG GAC GAC ATG-3' 및 5'-GCC GTC AGG CAG CTC GTA GC-3'. PCR 프로그램은 95℃에서 40초간 변성에 대한 33 사이클로서, 52℃에서 30초 동안 어닐링되고, 72℃에서 30초 동안 연장되며, 72℃에서 10분 동안 최종 연장되었다.

[0031] **[실시예 2 : 재료 및 방법- *in vitro* 분석]**

[0032] **2.1 1차 섬유아세포 배양 및 BoNT-A 처리**

[0033] 정상 인간의 피부 샘플은 충남 대학교 병원의 윤리위원회의 승인에 따라 주위에서 얻었다. 표본은 70 % 에탄올로 소독되고, 잘려진 후, 배지에서 배양 10% 소 태아 혈청 및 항생제가 보충된 Dulbecco's Modified Eagles's 배지에서 배양되었다. 피부 섬유아세포는 5~7일 후, 외식편으로부터 성장되었다. 융합에서, 세포들이 채취되고, 1×10^5 /ml에서 접종되고, 24시간 동안 혈청에서 배양되었다. 세포들은 무 혈청 조건하에서 0U, 1U, 2.5U 또는 5 U의 BoNT-A로 처리되었다.

[0034] **2.2 MTT 분석**

[0035] 인간의 피부섬유아세포(1×10^5 /ml)는 96 웰 플레이트에 접종되고, 24시간 동안 배양되었으며, 0U, 1U, 2.5U 또는 5U의 BoNT-A로 6시간 동안 배양되었다. 그런 다음, MTT(5 mg/ml)의 20 μL가 37℃에서 각각의 웰에 추가되었고, 이후, 배양 배지의 제거 및 디메틸설폭사이드(Sigma) 150 μL가 첨가되었다. 흡광도는 655 nm의 참조 파장으로 하여, 570 nm에서 측정했다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였다.

[0036] **2.3 α-SMA의 웨스턴블롯 분석**

- [0037] 배양된 섬유 아세포는 스크래핑에 의해 수집하고, 펠렛은 프로테아제 억제제 카테일로 PRO-PREP 시약(인트론 바이오 테크놀로지, 성남, 한국)을 이용하여 용해 버퍼에서 용해되었다. 활발히 피펫팅한 후, 추출물은 12,700g에서 15분간 원심 분리에 의해 분류되었다. 전체 단백질을 브래드 포트 (Bradford) 단백질 분석 키트(바이오 래드 연구소, 헤라클레스, CA)를 사용하여 측정하였다.
- [0038] 각각의 샘플에서 단백질 함량을 정규화한 후, 각 샘플에서 30mg의 총 세포 단백질이 10% 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴 아미드 겔 전기 영동에 의해 분리되었고, 니트로 셀룰로오스 멤브레인 상에 트랜스블롯팅되었다. 블롯은 차단 용액에서 α -SMA (산타 크루즈 바이오 테크놀로지, 산타 크루즈, CA) 및 항 액틴(산타 크루즈 바이오 테크놀로지) 항체로 탐침되었고, 다음으로, 상온에서 1시간 동안 퍼옥시다아제-결합 이차 항체로 배양되었다. 면역반응 단백질은 강화된 화학 발광(아머삼 바이오 사이언스, 스웨덴 옉살라)에 의해 검출되었다. 밀도계측은 ImageJ 소프트웨어(NIH, 베데스다, MD)를 사용하여 수행되었다.
- [0039] **2.4 ELISA에 의한 TGF- β 1의 확인**
- [0040] 조직에서 전체 TGF- β 1 수준을 확인하기 위해, 상처 균질물이 1N HCl (5 : 1)에서 10분간 배양되었고, 산성화된 샘플은 1 ~ 2N 수산화 나트륨 / 0 ~ 5M HEPES를 추가하여 중화되었다. 다양한 농도의 BoNT-A로 처리된 무 혈청 배양 세포의 배양 상층액에서 TGF- β 1 수준은 효소 결합 면역분석법(ELISA) 키트(DY240, R&D 시스템, 미네아폴리스, MN)을 이용하여 분석되었다. TGF- β 1 수준은 총 단백질의 TGF- β 1/ μ g의 피코그램으로 나타낸다.
- [0041] **[실시예 3 : 통계분석]**
- [0042] 통계 분석은 윈도우 SPSS의 버전 12.0(SPSS 사, 시카고, IL)을 사용하여 수행하였다. Scheffe post hoc 테스트와 함께 분산의 t-테스트 및 파라미터 분석은 그룹 간 비교에 대해 이용되었다. 값 $P < 0.05$ 의 값은 통계적 유의성을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타낸다.
- [0043] **< 결 과 >**
- [0044] **1. *in vivo* 생체 분석**
- [0045] 보형물 주위 캡슐의 조직학적 분석은 수술 후 대조군 및 실험 그룹 간의 피막 두께의 현저한 차이를 나타내었다. BoNT-A로 처리된 쥐는 30일 시간 포인트($P < 0.05$)에서 대조군보다 보다 훨씬 얇았으며, 이는 피막 구축이 BoNT-A에 의해 현저하게 영향을 받는 것임을 나타내는 것이다. 또한, 피막 두께의 감소는 농도 의존적이었다(도 1). 1 U의 BoNT-A로 처리된 생쥐의 피막(실험군 1)는 고용량 (2.5 및 5 U)으로 처리 마우스에 비해 상당히 두꺼웠으나($P < 0.05$), 실험군 2(2.5U)와 실험군 3(5U) 간의 피막 두께는 유의미한 차이가 없었다.
- [0046] 피막에서 근섬유의 함량을 검사하기 위해, 대조군과 실험용 마우스로부터의 피막에 대한 α -SMA 발현은 면역 형광 현미경으로 탐지되었다. 피막에서 α -SMA+ 세포 수는 대조군보다 실험군에서 더 낮았으며($P < 0.05$), 이는 BoNT-A가 섬유 아세포의 근섬유아세포로의 분화에 현저히 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 또한, α -SMA+ 세포 수의 감소는 그 경향이 현저하지 않았음에도 불구하고($P > 0.05$), 농도 의존적이다(도 2).
- [0047] 피막구축과 관련된 성장 인자 발현의 변화를 조사하기 위해, 피막에서 TGF- β 1, TNF- α 와 VEGF 수용체의 mRNA 발현이 분석되었다. TNF- α 와 VEGF 수용체의 발현은 네 그룹의 중에 현저한 차이가 없었다. 반면, TGF- β 1은 대조군과 비교하여 현저하게 발현이 되지 않았으며($P < 0.05$)(도 3), 이는 피막구축과 TGF- β 1의 관련성을 나타낸다.
- [0048] **1. *in vitro* 시험관내 분석**
- [0049] 섬유아세포는 BoNT-A의 부재하에서 또는 1×10^5 세포 당 1U, 2.5U 또는 5U의 BoNT-A의 존재하에서 배양되었고, 1-2일 후, 세포 생존율을 MTT를 이용하여 측정하였다. BoNT-A로 처리된 섬유아세포는 처리되지 않은 섬유아세포보다 큰 증식을 나타내었으며, 이는 세포 생존율이 BoNT-A에 의해 현저하게 감소되지 않음을 나타낸다(도 4).
- [0050] 미처리 및 BoNT-A 처리된 피부 섬유아세포에 의한 α -SMA의 단백질 수준은 웨스턴블롯에서 분석되었다. α -

SMA의 단백질 발현은 미처리 섬유아세포에서의 발현과 비교하여, BoNT-A로 처리된 섬유아세포에서 현저하게 감소되었으며($P < 0.05$), 효과는 농도 의존적이었다(도 5).

[0051] 이러한 결과는 BoNT-A가 α -SMA의 단백질 발현을 억제함을 나타낸다. 미처리 및 BoNT-A 처리된 피부 섬유아세포에 의한 TGF- β 1 단백질 발현이 ELISA에 의해 분석되는 경우, 그 결과는 TGF- β 1의 발현이 가장 큰 농도의 BoNT-A(1×10^5 세포 당 5 U)에서 현저하게 감소되는 것을 나타내었다(도 6).

[0052] α -SMA의 단백질 발현의 감소는 BoNT-A로 처리된 배양 섬유아세포에서의 TGF- β 1 발현의 감소 조절로 나타났으며, 이는 우리의 상기 *in vivo* 실험결과와 일치하는 것이다.

[0053] <Discussion>

[0054] 1980년대 초, BoNT-A는 사시와 안검 경련과 같은 의료 시술을 위해 처음 도입되었다. BoNT-A는 주사 후 2-6개월 동안, 아세틸 콜린의 방출을 방지하고 횡문근의 기능적 신경체계를 야기함으로써, 시냅스 전 뉴런에 대한 작용을 통해, 화학적신경절단(Chemodenervation)을 유도한다. 이러한, 화학적신경절단은 근섬유 위축 및 후속으로 이완성 마비를 야기한다. 지금까지, 근육에 의해 유도되는 주름을 치료하기 위한 미용적 목적으로 널리 사용되고 있다.

[0055] 그 외에도 다양한 임상적 상황에서의 BoNT-A의 사용이 연구되고 있으며, 일부 의사들은 BoNT 투여가 상처 아래의 근육의 일시적인 마비를 유도함으로써, 상처 가장자리를 치료하는 장력을 효과적으로 감소하기 때문에, 흉터의 미용 개선을 관찰해오고 있다. 이식물 주위에 피막의 생성은 이물질에 대한 신체의 정상적인 반응이며, 성숙한 피막은 일반적으로 흉터 조직에서 발견되는 것과 유사한 세포로 구성되어 있다.

[0056] 우리의 조직학적 결과는 BoNT-A로 처리된 마우스가 미처리 대조군 마우스의 반응과 비교하여, 이식 주위의 강한 염증반응이 덜하다는 것을 증명하였다. BoNT-A-처리된 그룹에서 보형물 주위의 피막은 대조군 그룹의 피막과 비교하여, 섬유 조직 증착이 적었으며, 세포벽이 훨씬 얇았다. 이러한 결과는 BoNT가 피막 구축을 감소시킴을 나타내는 것이다. 2.5U와 5U의 BoNT-A 처리 마우스 간의 현저한 차이가 없었음에도 불구하고, BoNT-A의 투여량 증가와 함께, 예방 효과가 증가하였다.

[0057] 근섬유아세포가 손상 후에 결합 조직의 생리적 재건과 섬유화에서 관찰되는 병리적 조직의 변형에 중요한 역할을 한다는 것은 일반적으로 인식되어 있다. 근섬유아세포는 또한, 그러한 기작을 지지하는 정보가 적음에도 불구하고, 피막 구축에 관여하는 것으로 생각된다. 우리의 *in vivo* 연구는 실험군의 피막 내의 근섬유군과 밀도의 감소를 입증하였다. 우리의 *in vitro* 실험은 널리 사용되는 근섬유 마커인 α -SMA 단백질의 발현을 미처리 피부 섬유아세포에 비해, BoNT-A 처리된 피부 섬유아세포에서 현저하게 감소됨을 나타내었고, 이 효과는 농도 의존적이다. 종합적으로 고려할 때, 이들 결과는 BoNT-A가 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화를 방지함으로써, 보형물 주위의 피막 구축을 감소시키는 것을 나타내는 것이다.

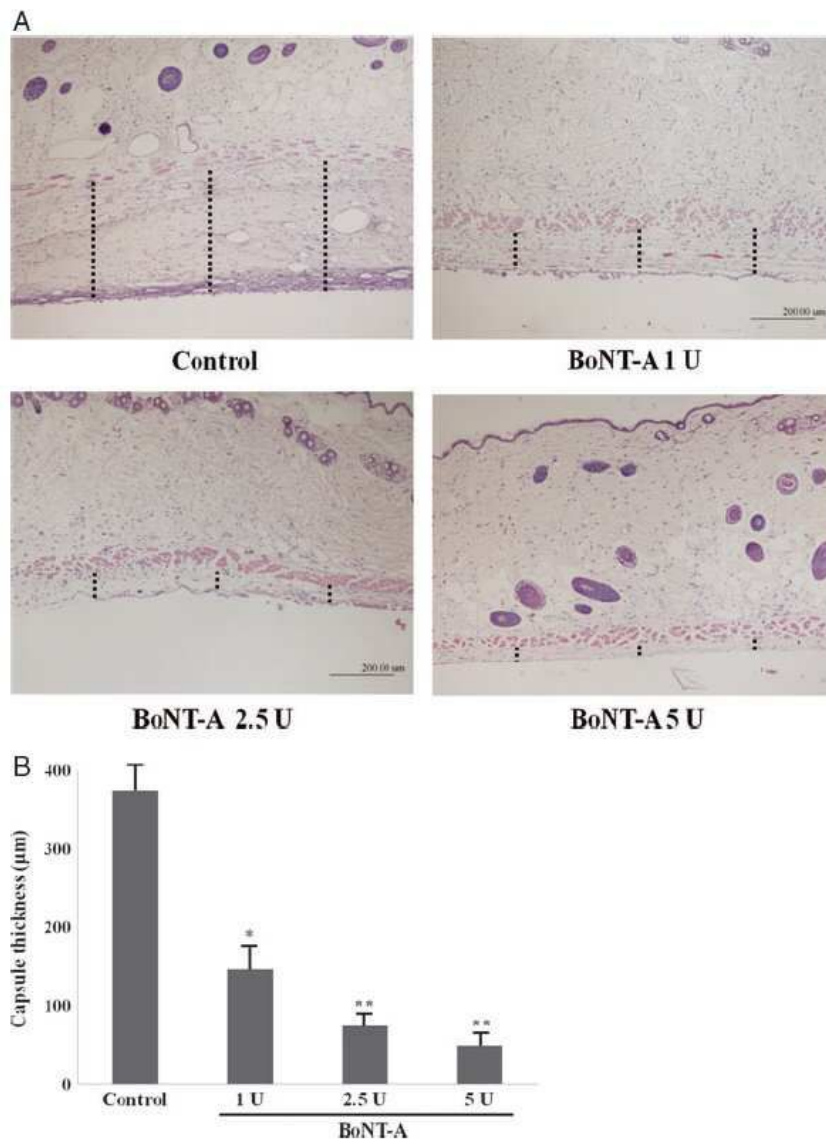
[0058] 피막 구축은 보형물 주위의 염증 관련 치료 반응의 일종으로서, 다른 세포 서브세트는 중복되는 단계를 조절하는 수많은 매개체를 분비한다. 사이토카인 및 성장 인자는 세포-세포 간 크로스 토크에 기여하며, 염증 유도 경로의 기능에 대한 마커이다.

[0059] 우리는 세가지 사이토카인(TGF- β 1, TNF- α 및 VEGF 수용체)의 발현이 상처 치료 과정에서 조직 염증과 관련됨을 증명하였다. 이들 중 TGF- β 1만이 실험군에서 현저하게 발현이 억제되었다. 또한, *in vitro* 분석은 BoNT-A 처리된 배양 섬유아세포에서의 TGF- β 1 단백질 수준의 감소를 나타내었다. TGF- β 1은 α -SMA의 발현을 유도함으로써, 근섬유 아세포의 발달을 직접적으로 촉진하는 주요 성장인자로 간주된다. 본 발명에서, BoNT-A는 아마도 TGF- β 1 신호전달을 억제함으로써, 섬유아세포에서 근섬유아세포로의 분화를 방해함으로써, 실리콘 보형물 주위의 피막구축을 방지한다.

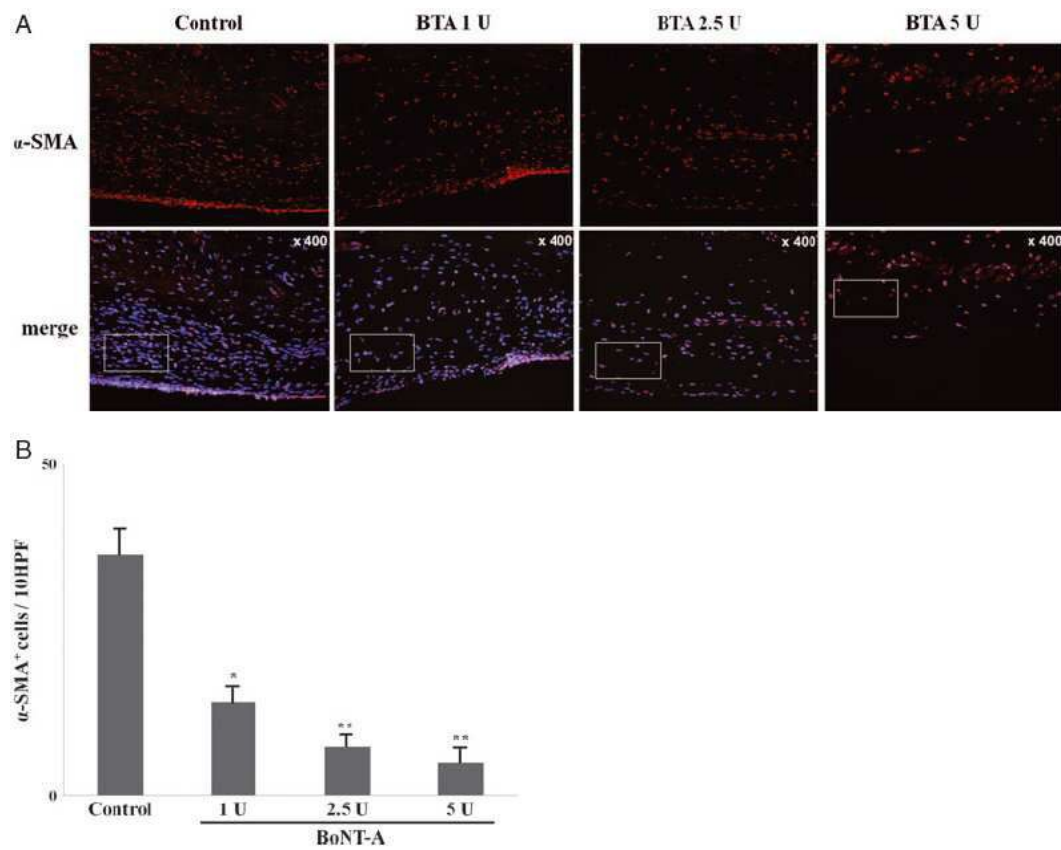
[0060] 상기에 제시된 실시예는 예시적인 것으로 이 분야에서 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위에서 제시된 실시예에 대한 다양한 변형 및 수정 고안을 만들 수 있을 것이다. 이러한 변형 및 수정 고안에 의하여 본 발명의 범위는 제한되지 않는다.

도면

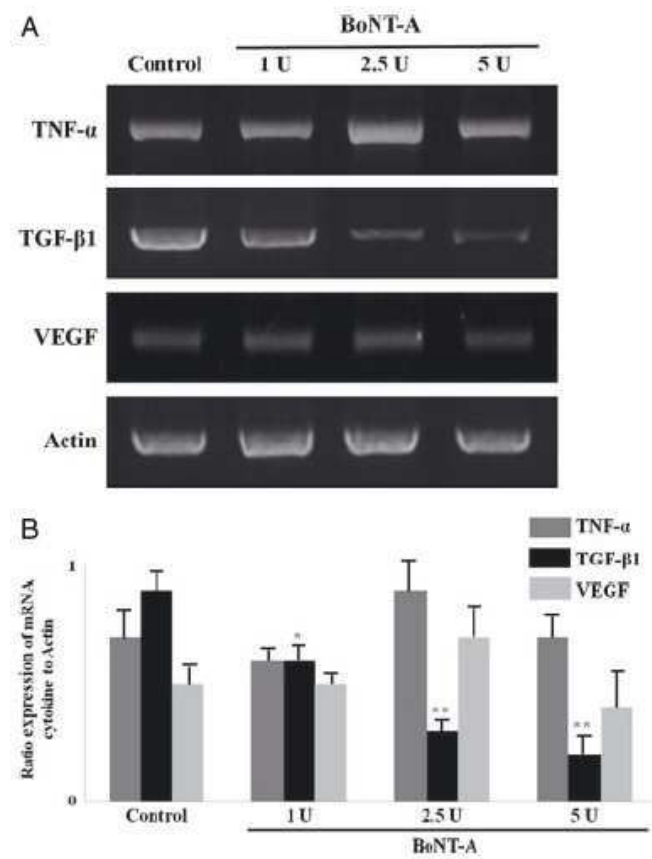
도면1



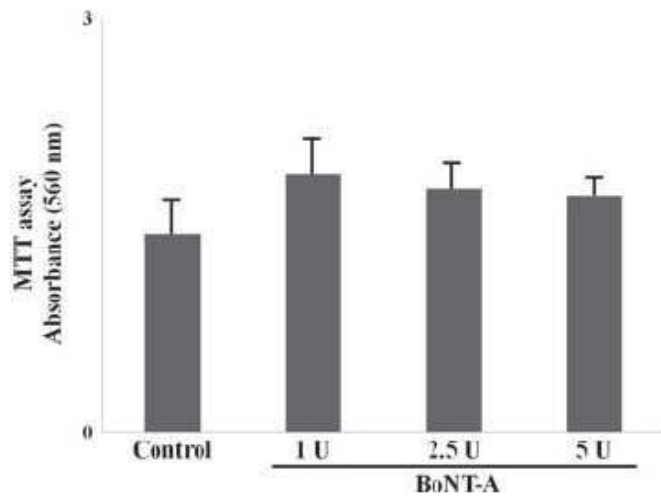
도면2



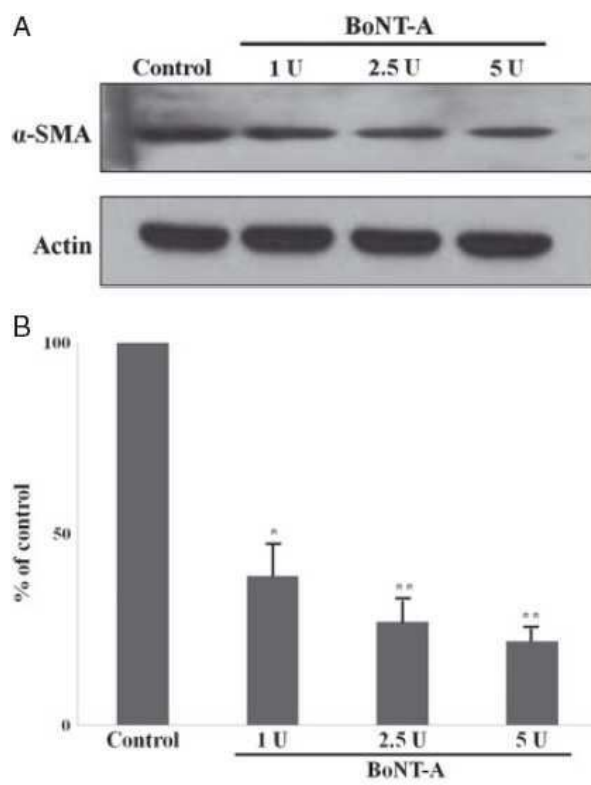
도면3



도면4



도면5



도면6

