



공개특허 10-2023-0140407



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0140407
(43) 공개일자 2023년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4409 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/4409 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-0038725

(22) 출원일자 2023년03월24일

심사청구일자 2023년03월24일

(30) 우선권주장
1020220036467 2022년03월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자
박지웅
서울특별시 용산구 한강대로 26, 102동 3002호(한
강로3가, 한강대우트럼프월드3차)
최민하
경기도 광명시 광덕산로 26, 109동 703호(하안동,
광명 두산위브 트레지움)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인이룸리온

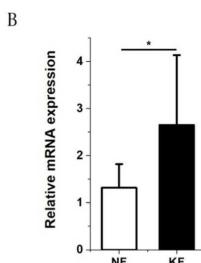
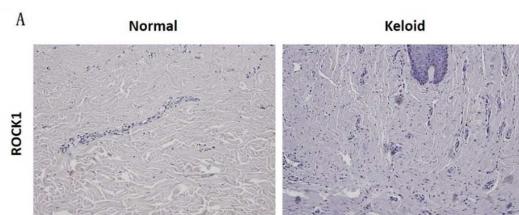
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 로-키나제 억제제를 포함하는 켈로이드 등 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성
물 및 그의 용도

(57) 요 약

본 발명은 로-키나제 억제제를 유효성분으로 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 피부 외용제 조성물 및 이를 이용한 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 43/00 (2018.01)

(72) 발명자

박준호

서울특별시 관악구 보라매로 25, 칸타빌라 7차 80
1호(봉천동)

강명희

서울특별시 구로구 신도림로11가길 36, 2동 711호
(신도림동, 미성아파트)

김지영

서울특별시 관악구 봉천로 219-3, 303호(봉천동)

민세리

서울특별시 강남구 언주로30길 56, A동 1401호(도
곡동, 타워팰리스)

양희웅

서울특별시 종로구 대학로 33, 801호(효제동)

명세서

청구범위

청구항 1

로-키나제 억제제를 유효성분으로 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 로-키나제 억제제는 로-키나제 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 이의 항원 결합 단편, 웹티드, 단백질, 또는 이들의 조합인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 로-키나제 억제제는 Y-27632, Y-27632 2HCl, Thiaxovivn, Fasudil (HA-1077), Fasudil (HA-1077) HCl, GSK429286A, RKI-1447, H-1152 dihydrochloride, Azaindole 1 (TC-S 7001), Hydroxyfasudil (HA-1100), Hydroxyfasudil (HA-1100) HCl, Y-39983, Y-39983 HCl, Netarsudil (AR-13324), Netarsudil (AR-13324) 2HCl, GSK269962A, GSK269962A HCl, Ripasudil (K-115) hydrochloride dihydrate, Belumosudil (KD025), 또는 AT 13148 인 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

로-키나제 억제제는 기계적 자극에 의하여 과발현되는 로-키나제를 표적하여 억제하는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

로-키나제 억제제는 F-액틴 형성을 억제하는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

로-키나제 억제제는 VEGF, SMA, vimentin, 콜라겐 I형(collagen type I), 콜라겐 III형(collagen type III)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현을 억제하는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 피부 섬유화 질환은 켈로이드(keloid), 스트레칭 마크(stretch marks)켈로이드(keloid), 비후성반흔, 과증식성 흉터(hypertrophic scar), 위축성 흉터(atrophic scar), 피부경화증(Scleroderma), 결합조직 질환(connective tissue disease) 또는 결합조직 질환(connective tissue disease)인 것인 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 로-키나제 억제제는 하기와 같은 특성으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타내는 것인 약학적 조성물:

- (a) 켈로이드 섬유아세포의 증식 억제;
- (b) 켈로이드 섬유아세포의 이동 억제; 및

(c) 켈로이드 조직의 크기 및 경도 감소.

청구항 9

로-키나제 억제제를 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 로-키나제 억제제는 Y-27632 2HCl, Thiaxovivn, Fasudil (HA-1077) HCl, GSK429286A, RKI-1447, H-1152 dihydrochloride, Azaindole 1 (TC-S 7001), Hydroxyfasudil (HA-1100) HCl, Y-39983 HCl, Netarsudil (AR-13324) 2HCl, GSK269962A HCl, Ripasudil (K-115) hydrochloride dihydrate, Belumosudil (KD025), 또는 AT 13148 인 것인 피부 외용제 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 피부 섬유화 질환은 켈로이드(keloid), 스트레칭 마크(stretch marks)켈로이드(keloid), 비후성반흔, 과증 식성 흉터(hypertrophic scar), 위축성 흉터(atrophic scar), 피부경화증(Scleroderma), 결합조직 질환 (connective tissue disease) 또는 결합조직 질환(connective tissue disease)인 것인 피부 외용제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

로-키나제 억제제를 포함하는 피부 섬유화 질환 치료용 약학적 조성물 및 이를 이용한 피부 섬유화 질환 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

켈로이드는 표면과 경계가 매우 불규칙하고, 딱딱하고, 두껍고, 다친 지 6-18개월이 지나도 작아지지 않으며 오히려 손상된 범위를 넘어 정상 피부까지 침범할 정도로 심각한 질환이다. 켈로이드는 환자에게 외양상 심각한 고통을 줄 뿐만 아니라, 작열감, 통증, 가려움증, 기능장애와 같은 증상을 동반하여 사회생활에 막대한 지장을 준다.

[0003]

켈로이드에 대한 세계적 관심은 외모에 대한 관심 증가, 흉터 치료에 대한 관심 증대 및 COVID-19 영향으로 인한 라이프 스타일 변화 등에 의해 폭발적으로 증가하였다. 종래의 켈로이드 치료 방법은 압력 요법, 스테로이드 주사법, 외과적 절제술, 방사선 요법 등으로 시행되고 있으나, 치료 후 50% 이상의 매우 높은 재발률을 보이고, 현재까지 근본적으로 치료할 수 있는 치료법이 없어 임상적 미충족 수요(Unmet Needs)가 매우 높은 상황이다.

[0004]

켈로이드는 외부 압력요법, 스테로이드 주사법, 외과적 절제술, 방사선 요법 등으로 치료되고 있으나, 치료 후 매우 높은 재발률을 보이고, 현재까지 근본적으로 치료할 수 있는 치료법이 없어 임상적 미충족 수요(Unmet Needs)가 매우 높은 난치성 질환이다. 켈로이드 치료를 위한 타겟 유전자들이 줄곧 보고되어지고 있으나, 연구 성과가 대부분 신약개발로 이어지지 못하고 논문발표로 국한되어 실용화 성과 창출이 미흡한 상태이다. 이는 켈로이드 치료용 타겟 발굴 파이프라인이 켈로이드의 인체 내 환경을 모사하지 못하기 때문이기도 한다.

[0005]

한편, 현재까지 발견된 켈로이드 조절 인자들이 어떠한 작용기전에 의해 켈로이드를 유발하는지에 대해서는 많은 부분들이 알려져 있지 않다.

[0006]

본 발명자들은 Cell Stretching System을 검증 과정에 이용하여 기계적 물리력이 관여하는 상황에서 켈로이드를 타겟팅하는 Rho Kinase 억제제가 켈로이드에 대한 예방 또는 치료제로서 사용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2021-0058592호 (2021.05.24)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 기존에 사용하지 않았던 Cell Stretching System을 검증 과정에 이용함으로써 기계적 물리력(물리적 스트레스)이 관여하는 상황에서 과발현된다고 알려진 Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase (Rho Kinase)를 표적하였다. 이로써 염증억제를 위한 스테로이드 또는 세포분열억제를 위한 항암제 등의 기존 켈로이드 치료제와 비교하여 보다 적극적으로 세포 내외의 다양한 물리적 스트레스에 대한 신호전달 체계를 반영하고 근본적인 억제 원인을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 로-키나제 억제제를 유효성분으로 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 로-키나제 억제제를 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 켈로이드 형성 및 증식이 유전자의 발현 변화에 의한 직접적인 결과 외에도 유전적 변화는 물론 생체의 물리적 환경에 의해 보다 심충적으로 조절되는 것에 착안하여, 기계적 물리력에 의해 유발되는 로-키나제(Rho-Kinase)를 켈로이드 치료의 타겟으로 설정하고, 로-키나제 억제제가 켈로이드, 비후성 반흔, 흉터 등 피부 섬유화 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 기계적 스트레스가 존재 하에서 로-키나제 억제제, Y-27632가 효과적으로 켈로이드 섬유아세포의 증식 및 생성을 차단함을 확인한 바 있다.

[0014] 본 발명에서는 일차배양된 켈로이드 섬유아세포에 일정한 기계적 스트레스가 가해지면 로-키나제의 발현 및 활성이 증가하고 결과적으로 켈로이드의 대표적인 특징인 콜라겐의 과다 생성이 유발됨을 확인하였다. Y-27632를 포함한 로-키나제는 기계적 스트레스 상황에서도 로-키나제 및 연관된 하위 기전의 활성을 억제함으로써 켈로이드 섬유아세포에서의 콜라겐 과다 생성을 차단시킨다. 이는 켈로이드 질환의 예방 및 치료는 물론이고, 재발 확률을 크게 낮출 수 있는 전략이 될 것이다.

[0015] 또한, 본 발명에서는 로-키나제(Rho-Kinase)와 코필린(cofilin), 로-키나제(Rho-Kinase)와 미오신 경쇄(Myosin light chain; MLC)의 상호작용 및 콜라겐(Collagen) 합성 경로 관여 인자의 발현 변화를 통해 로-키나제 억제제의 켈로이드의 예방 또는 치료 효과를 확인하였다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명자들은 켈로이드 환자의 수집된 조직에서 일차 배양을 통해 얻어진 섬유아세포 (fibroblast)는 안정화를 통해 세포수를 확보한 후, 후속 실험을 위해 뱉깅하였다. 뱉깅된 일차배양 섬유아세포에 기계적 물리력을 가하기 위해서 Stretching device (STB-1400; Strex Inc., Janpan)를 이용하였다. 보다 구체적으로, 기계적 스트레스를 주기위해 세포가 붙어 있는 용기를 Stretching device에 장착한 후, 스트레스의 정도, 빈도, 시간 등의 조건을 다양하게 적용함으로써 체내 생리활성에 가장 가까운 최적의 조건을 확립하였다. 한편, 기계적 스트레스에 의해 활성되는 로-키나제를 타겟팅하기 위해 로-키나제 억제제인 Y-27632를 사용하여 일차배양 섬유아세포를 이용, 기계적 스트레스가 있는 상황과 기계적 스트레스가 없는 상황에서 Y-27632의 켈로이드 형성 억제 효과를 확인하였다. 구체적으로는 로-키나제와 코필린(Cofilin), 로-키나제와 미오신 경쇄(Myosin light chain; MLC)의 상호작용 및 콜라겐(Collagen) 합성 경로 관여 인자들의 발현 변화를 Y-27632 와 기계적 스트레스가 각각 또는 동시에 가해진 환경에서 대조군과 비교하여 테스트하였다.

[0017] 본 발명은 로-키나제 억제제를 유효성분으로 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 로-키나제 (Rho-kinase)는 세린-트레오닌 키나제의 AGC (PKA/PKG/PKC) 패밀리에 속하는 키나제를 의미한다. 본 발명에서 로-연관 단백질 키나제(Rho-associated protein kinase: ROCK 라고도 한다)는 로-키나제 (Rho-kinase)를 의미하며, ROCK는 ROCK1 및 ROCK2로 구성된다.

[0019] 본 발명은 기존에 사용하지 않았던 Cell Stretching System을 검증 과정에 이용함으로써 기계적 물리력(물리적 스트레스)이 관여하는 상황에서 과발현되는 로-키나제(Rho-Kinase)를 표적하여 억제함으로서 기계적 물리력, 기계적 마찰 등 물리적 자극에 의해 유발된 로-키나제(Rho-Kinase)를 억제하여 켈로이드 섬유아세포에서의 콜라겐과다 생성을 차단시킨다. 이로써 염증억제를 위한 스테로이드 또는 세포분열억제를 위한 항암제 등의 기존 켈로이드 치료제와 비교하여 보다 적극적으로 세포 내외의 다양한 물리적 스트레스에 대한 신호전달 체계를 반영하였다. 따라서, 본 발명에서 상기 로-키나제 억제제는 기계적 자극에 의하여 과발현되는 로-키나제를 표적하여 억제하는 물질을 의미한다.

[0020] 본 발명에서 로-키나제 억제제는 세포 내에서 로-키나제의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제를 의미하는 것으로, 예를 들어, 로-키나제에 직접적으로 작용하거나 또는 로-키나제의 상위 조절자에 간접적으로 작용하여 로-키나제의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나, 발현된 로-키나제의 분해를 증가시키거나, 그 활성을 방해함으로써 로-키나제의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 제제를 의미할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 상기 로-키나제 활성 저해제는 로-키나제 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 이의 항원 결합 단편, 웨티드, 단백질 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 로-키나제 억제제는 로-키나제 저해 활성을 가진 물질이라면, 특별히 제한되지 않으나, 본 발명에서 상기 로-키나제 억제제는 Y-27632 ($C_{14}H_{21}N_3O$), Y-27632 2HCl, Thiaxovivn ($C_{15}H_{13}N_5OS$), Fasudil (HA-1077) ($C_{14}H_{17}N_3O_2S$), Fasudil (HA-1077) HCl, GSK429286A ($C_{21}H_{16}F_4N_4O_2$), RKI-1447 ($C_{16}H_{14}N_4O_2S$), H-1152 dihydrochloride ($C_{16}H_{23}Cl_2N_3O_2S$), Azaindole 1 (TC-S 7001) ($C_{16}H_{23}Cl_2N_3O_2S$), Hydroxyfasudil (HA-1100) ($C_{14}H_{17}N_3O_3S$), Hydroxyfasudil (HA-1100) HCl, Y-39983 ($C_{16}H_{16}N_4O$), Y-39983 HCl, Netarsudil (AR-13324) ($C_{28}H_{27}N_3O_3$), Netarsudil (AR-13324) 2HCl, GSK269962A ($C_{29}H_{30}N_8O_5$), GSK269962A HCl, Ripasudil (K-115) hydrochloride dihydrate ($C_{15}H_{18}FN_3O_2S \cdot HCl \cdot 2H_2O$), Belumosudil (KD025) ($C_{26}H_{24}N_6O_2$), 또는 AT 13148 ($C_{17}H_{16}C_1N_3O$)일 수 있다. 바람직하게, 상기 로-키나제 억제제는 Y-27632 또는 Y-27632 2HCl일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 Y-27632를 이용하여 로-키나제 저해를 통한 피부 섬유화 질환의 치료 효과를 확인하였다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 로-키나제 억제제는 기계적 자극에 의하여 과발현되는 로-키나제를 표적하여 억제할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 로-키나제 억제제는 F-액틴 형성을 억제할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 로-키나제 억제제는 VEGF, SMA, vimentin, 콜라겐 I형(collagen type I), 콜라겐 III형(collagen type III)로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현을 억제할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 로-키나제 억제제는 하기와 같은 특성으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타낸다. (a) 켈로이드 섬유아세포의 증식 억제; (b) 켈로이드 섬유아세포의 이동 억제; 및 (c) 켈로이드 조직의 크기 및 경도 감소.

[0027] 본 발명에서 상기 로-키나제 억제제는 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다. 상기 염은 약학 분야, 예를 들면 세포의 노화와 연관된 질환 분야에서 사용되는 통상의 산 부가염, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 철팜산, 인산 또는 질산과 같은 무기산으로부터 유도된 염 및 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 시트르산, 말레산, 말론산, 메탄술폰산, 타르타르산, 말산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 툴루엔술폰산, 옥살산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 유기산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한, 상기 염은 통상의 금속 염 형태, 예를 들면 리튬, 소듐, 칼륨, 마그네슘, 또는 칼슘과 같은 금속으로부터 유도된 염을 포함한다. 상기 산 부가염 또는 금속염은 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 로-키나제 억제제는 또한 그의 입체이성질체의 형태일 수 있다. 상기 입체이성질체는 거울상 이성질체 (enantiomer) 및 부분입체이성질체 (diastereomer)와 같은 모든 입체이성질체를 포함한다. 상기 화합물은 입체이성질체의 순수 형태 (stereoisomerically pure form) 또는 하나 이상의 입체이성질체의 혼합물, 예

를 들면 라세미 혼합물일 수 있다. 특정 입체이성질체의 분리는 당해 분야에 공지된 통상의 방법 중 하나에 의해 수행될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 피부 섬유화 질환은 상피 세포 또는 섬유성 결합 조직(fibrous connective tissue)의 과도한 증식으로 인한 흉터 내지는 섬유성 조직의 발달의 초래를 의미한다. 한편, 상처가 발생되면 지혈(hemostasis), 염증(inflammation), 증식(proliferation) 및 리모델링(remodeling)의 프로세스를 거쳐 치유되나, 피부 상처가 심하거나 반복될 경우 상처 치료 프로세스에 조절장애가 발생되고, 이는 손상된 피부 조직 주위로 과도한 섬유성 결합 조직(fibrous connective tissue)을 형성하여 피부 섬유화 질환을 유발할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 상기 피부 섬유화 질환은 임의의 피부 조직 및 상피 세포의 섬유증, 흉터(scar), 피부 및 두피의 상피 세포의 섬유증 등을 포괄하는 개념일 수 있다.

[0031] 본 발명에서 상기 흉터는 상해 또는 질환에 의해 파괴된 정상 조직을 대체하는 섬유 조직을 의미할 수 있다. 피부 외층의 손상은 조직을 재구축함으로써 치유되며, 이러한 경우, 흉터 형성은 미미할 수 있다. 그러나, 피부 아래의 조직의 두꺼운 층이 손상되는 경우, 재구축은 더욱 복잡해진다. 신체는 콜라겐 섬유(신체에 의해 자연적으로 생성되는 단백질)를 축적하고, 이는 일반적으로 뚜렷한 흉터를 발생시킨다.

[0032] 본 발명에서 상기 피부 섬유화 질환은 켈로이드(keloid), 스트레칭 마크(stretch marks)켈로이드(keloid), 비후성반흔, 과증식성 흉터(hypertrophic scar), 위축성 흉터(atrophic scar), 피부경화증(Scleroderma), 결합조직 질환(connective tissue disease) 또는 결합조직 질환(connective tissue disease)일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 예방은 일 양상에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하여 피부 섬유화 질환을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 포함한다. 본 발명에서 치료는 일 양상에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하여 피부 섬유화 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예를 들어, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게 상기 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 혼탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 혼탁제, 유제, 동결건조제제, 경피흡수제, 젤제, 로션제, 연고제, 크림제, 첨부제, 카타플라스마제, 페이스트제, 스프레이, 피부 유화액, 피부 혼탁액, 경피 전달성 패치, 약물 함유 붕대 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명에서 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 혼탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 혼탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 혼탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위테솔(witepsol), 마크로글, 트윈 61(tween 61), 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 상기 약학적 조성물의 투여 용량은 개체의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여 할 수도 있다. 예컨대, 유효성분 함량을 기준으로 1일 투여량이 0.1 내지 500 mg/kg, 일 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서, 병변의 크기, 개수, 개인적인 순응도 차이 등에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0039] 본 발명에서 상기 약학적 조성물, 피부 섬유화 질환, 예방, 치료 등에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0040] 본 발명에서 상기 방법은 상기 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 피부 섬유화 질환이 의심되는 개체 내에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 닭 또는 인간을 포함한 포유류 전체를 의미하는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있다. 비 경구 투여에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 투여방식은 정맥 주사, 피하주사, 피내주사제, 근육주사 및 점액 주사 등이 될 수 있다. 상기 약학적 조성물의 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 로-키나제 억제제는 피부 섬유화 질환이 진행된 세포의 증식 및 이동성을 유의적으로 감소시키는 효과를 나타내므로, 상기 로-키나제 억제제를 유효성분을 포함하는 약학적 조성물을 피부 섬유화 질환 의심 개체에 투여하여, 피부 섬유화 질환의 발생 또는 진행을 막아 피부 섬유화 질환을 치료할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 로-키나제 억제제를 포함하는 피부 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에서 상기 로-키나제 억제제, 예방, 피부 섬유화 질환 등에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0045] 본 발명에서 개선은 상기 피부 외용제 조성물을 개체에 적용하여 피부 섬유화 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 포함한다.

[0046] 본 발명에서 피부 외용제는 일반적으로 외용에 사용하는 조성물 전반을 포괄하는 개념으로, 기초 화장료, 메이크업 화장료, 모발용 화장료, 면도용 화장료 등 각종 화장료를 포함하는 화장료 조성물이나 연고제 등의 다양한 의약품 내지 의약외품 등으로 폭넓게 적용 가능한 것을 의미할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 피부 외용제 조성물은 유효성분 외에 사용용도 및 외용제 조성물의 성질에 따라 통상 외용제에 배합되고 있는 성분, 구체적으로 보습제, 자외선 흡수제, 비타민류, 동식 물 추출성분, 소화제, 미백제, 혈관확장제, 수렴제, 청량제, 호르몬제 등을 추가로 배합한 것일 수 있다.

[0048] 본 발명에서 상기 피부 외용제 조성물의 제형은 사용용도 및 외용제 조성물의 성질에 따라 적절한 형태를 취할 수 있으며, 구체적으로 수용액계, 가용화계, 유화계, 유액계, 겔계, 페이스트계, 연고계, 에어졸계, 물-기름 2층계, 물-기름-분말 3층계일 수 있으며, 상기 제형에 의해 본 발명의 외용제의 제형 및 형태가 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명에서 상기 피부 외용제는 유효성분을 피부 조직으로 침투 또는 이행시키기 위해서 필요한 기제를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0050] 본 발명에 따른 로-키나제 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 기계적 자극에 의하여 과발현되는 로-키나제를 표적하여 켈로이드 섬유아세포의 증식 및 이동, 피부 섬유화 마커의 발현, 켈로이드 조직의 크기 및 경도를 유의적으로 감소시킴으로써, 피부 섬유화 질환의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 켈로이드 조직과 섬유아세포에서 ROCK1의 발현을 나타낸 것이다. A는 인간 정상 피부 및 켈로이드에서 ROCK1 발현의 IHC 분석(축적 막대 = 200 μ m) 결과이다. B는 정상 섬유아세포(n=3) 및 켈로이드 섬유아세포(n=8)에서 ROCK1의 상대적인 mRNA 발현은 qRT-PCR에 의해 검출되었다. 모든 실험은 세 번 수행되었다. 결과는 SD와 함께 평균으로 표시되었다. 스튜던트 t 테스트는 모든 분석에 사용된다. *P < 0.05.

도 2는 기계적 스트레스가 켈로이드 섬유아세포에서 ROCK1 발현 및 F-액틴 재배열을 유도하는 것을 나타낸 것이다. A는 신장 자극에 반응하여 정상 섬유아세포(NF) 및 켈로이드 유래 섬유아세포(KF) 유도된 세포 재배향에 상이한 신장 강도(0-20%)를 적용하였다. B는 신축 강도 의존적 방식의 세포 증식을 CCK-8 검정으로 조사하였다. 세포를 다양한 스트레치 강도 0-20%(C) 및 인큐베이션 시간 0-24시간(D)에 적용한 후 웨스턴 블로팅을 조사하였다. ROCK1의 상대 수준은 GAPDH를 대조군으로 사용하여 계산되었다. E는 기계적 자극은 F-액틴 중합을 변화시켰다. 공초점 이미지는 F-액틴(녹색)에 대한 항체의 면역염색을 보여주었다. 축적 막대 = 20 μ m. 형광 강도의 정

량화를 나타내었다. 실험은 세 번 수행되었다. 결과는 SD와 함께 평균으로 표시된다. 스튜던트 t 테스트는 모든 분석에 사용된다. *P < 0.05.

도 3은 켈로이드 섬유아세포에서 F-액틴 세포골격 재배열에 대한 Y-27632의 효과를 나타낸 것이다. A는 24시간 동안 켈로이드 섬유아세포에서 Y-27632의 용량 증가에 따른 세포 생존력이다. B는 F-액틴의 발현은 Y-27632의 투여량을 증가시키면서 24시간 동안 처리된 켈로이드 섬유아세포에서 면역형광에 의해 결정된 것이다. 면역형광법 공초점 현미경(Immunofluorescence confocal microscopy) 실험은 F-액틴(녹색)과 vinculin(주황색)에 대한 항체로 수행되었다. 축적 막대 = 50 μ m. 형광 강도의 정량화를 나타내었다. 실험은 세 번 수행되었다. 스튜던트 t 테스트는 모든 분석에 사용된다. *P < 0.05.

도 4는 억제된 ROCK1이 Rho/ROCK1 변환 경로를 통해 켈로이드 섬유아세포에서 F-액틴 재배열을 유도한 것을 나타낸 것이다. A는 Y-27632 유무에 관계없이 기계적 스트레칭을 받거나 받지 않은 켈로이드 섬유아세포에서 ROCK1의 키나제 활성이다. B는 Y-27632 유무에 관계없이 기계적 스트레칭을 받거나 받지 않은 켈로이드 섬유아세포에서 F-액틴의 면역세포화학 분석이다. C는 Y-27632를 사용하거나 사용하지 않고 기계적 스트레칭을 받거나 받지 않은 켈로이드 섬유아세포에서 p-MLC 및 MLC, 또는 p-cofilin 및 cofilin의 웨스턴 블로팅 분석이다. D는 웨스턴 블로팅 결과로부터 상대 단백질 pMLC/MLC 및 pCofilin/Cofilin의 정량화(C)이다. E는 기계적 신장이 있거나 없는 siNC 및 siROCK1의 처리 하에 켈로이드 섬유아세포에서 p-MLC 및 MLC, 또는 p-cofilin 및 cofilin의 웨스턴 블로팅 분석이다. F는 웨스턴 블로팅 결과로부터 상대 단백질 pMLC/MLC 및 pCofilin/Cofilin의 정량화(E)이다. 축적 막대 = 50 μ m. 결과는 SD(n=5)의 평균으로 표현되었다. 실험은 세 번 수행되었다. 스튜던트 t 테스트는 모든 분석에 사용된다. *P < 0.05.

도 5는 억제 ROCK1은 켈로이드 섬유아세포에서 피부 섬유화 및 세포 이동을 약화시키는 것을 나타낸 것이다. A는 pro-fibrotic gene, COL1A1, COL3A1, FN, α -SMA, CTGF 및 PCNA의 mRNA 수준을 qRT-PCR로 분석 결과이다. Y-27632(B) 또는 siROCK1(E)에 의해 억제된 기계 활성화 켈로이드 섬유아세포의 이동 활동이다. Y-27632(C) 및 siROCK1(F)을 사용한 켈로이드 섬유아세포의 억제된 이동 활동의 정량화이다. 축적 막대 = 200 μ m. 결과는 SD(n=5)의 평균으로 표현되었다. 스튜던트 t 테스트는 모든 분석에 사용된다. *P < 0.05.

도 6은 순환 스트레치 활성화 ROCK1 트리거 YAP 및 MRTF 핵 전위를 나타낸 것이다. A는 YAP 및 MRTF의 핵 전자는 Y-27632 유무에 관계없이 기계적 신장을 받았거나 받지 않은 켈로이드 섬유아세포의 세포하 분획에서 웨스턴 블로팅 분석이다. B는 MRTF 및 YAP의 세포질 및 핵 발현 수준의 정량 분석이다. 결과는 SD(n=5)의 평균으로 표현되었다. 스튜던트 t 테스트는 모든 분석에 사용된다. *P < 0.05.

도 7은 Y-27632 처리 7일 후 SCID 마우스에서 인간 켈로이드 섬유아세포에 의해 형성된 결절의 조직학적 및 면역조직화학적 이미지이다. A는 DMSO 또는 Y-27632를 처리한 마우스로부터 결절을 분리이다. B는 결절 조직에서 대표적인 H&E 염색, MT 염색 및 VEGF, α -SMA, vimentin, MMP2, MMP9, COL I, COL III에 대한 면역조직화학이다. 원배율: 200 배, 축적 막대 = 100 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052]

이하, 본 발명의 이해를 돋기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0054]

실시예 1. 실험 재료 및 방법

[0056]

1.1 윤리 승인

[0058]

헬싱키 선언(Helsinki Declaration and Integrated Addendum to ICH: Guideline for Good Clinical Practice(ICH-GCP))의 규정에 따라 보라매병원 임상심사위원회로부터 윤리적 승인을 받았다(승인번호 26-2017-20). 윤리위원회의 지침에 따라 사전 동의하에 수술을 받는 환자로부터 인간의 정상 및 켈로이드 조직을 수집하였다.

[0060] 1.2 인간 정상 및 켈로이드 및 섬유아세포의 1차 배양

[0062] 1차 정상 및 켈로이드 섬유아세포 배양은 기준 방법으로 확립되었다(Choi, M.-H., et al., *Scientific reports*, 2021. 11(1): p. 1-10.). 간략하게, 서울대학교 보라매병원에서 수술적 절제를 시행한 5명의 환자로부터 인체 피부 및 켈로이드 조직을 채취하였다. 시료는 1% 항생제-항진균제 용액(A/A; Welgene, Gyeongsangbuk-do, Korea)을 함유한 Dulbecco의 인산완충식염수로 3번 헹구고 3mm 두께로 절단하였다. 이어서, 조직을 37°C에서 4시간 동안 5 mg/ml 디스파제 용액(Roche, Basel, Switzerland)에 두었다. 진피와 표피를 분리하고 1mm 두께로 잘게 썬 다음 3mg/ml 콜라제나제 I형(Thermo Fisher, MA, USA)에서 소화하여 단일 세포 혼탁액을 얻었다. 세포는 10% 우태아혈청(FBS; Biowest, France)과 1% Antibiotic/Antimycotic Solution(Welgene Inc., Korea)이 함유된 둘베코수정이글배지(DMEM; Biowest, Nuaillé, France)에서 가습 배양기에서 배양하였다. 37 °C에서 5% CO₂. 계대 4에서 8까지의 세포를 실험에 사용하였다.

[0064] 1.3 기계적 스트레칭 장치

[0066] 기계적 스트레칭 장치 (STB-1400; Strex Inc., Osaka, Japan)를 사용하여 기계적 스트레칭을 켈로이드 섬유아세포에 적용하였다. 간략하게, 켈로이드 섬유아세포를 20 μg/ml 쥐 꼬리 I형 콜라겐(C7661, Sigma Aldrich)으로 미리 코팅된 strex stretch chamber(STB-CH-10 Strex Inc., Osaka, Japan)에 1.2 X 10⁵ 세포의 밀도로 시딩하였다. 밤새 인큐베이션을 위한 부착을 허용한 후, strex 스트레치 챔버를 스트레치 장치로 이동하고 후크에 장착하였다. 유연한 실리콘 챔버는 24시간 동안 10주기/분(0.166Hz)의 주파수에서 길이가 0-20% 장력의 스트레칭에 노출되었다. 이 스트레칭 장력은 정상적인 건강한 성인 상태의 호흡 속도를 모방한다. 대조군의 세포는 인큐베이터에서 동일한 유형의 챔버에서 배양되었다.

[0068] 1.4 세포 증식 검정 CCK8

[0070] 정상 및 켈로이드 섬유아세포의 증식에 대한 스트레치 자극의 영향을 CCK-8 분석으로 평가하였다. 간략하게, 제조업체의 지침(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)에 따라 CCK-8 시약을 첨가하여 24시간 동안 일련의 신장 변형(0-20%)을 섬유아세포에 적용하였다. 증식 속도를 평가하기 위한 광학 밀도는 SpectraMax Plus 384 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 450 nm에서 판독되었다. 실험은 3회 수행되었으며 데이터는 평균 ± SD로 표시된다.

[0072] 1.5 로-키나제(Rho-kinase) 활성 검정

[0074] ROCK1 키나제 활성은 제조사의 지침에 따라 ROCK 활성 분석 키트(Cell Biolabs, CA, USA)로 분석되었다. ROCK Activity Assay 키트는 ROCK에 의해 Thr696에서 myosin phosphatase target subunit1의 인산화 수준을 검출하기 위해 설계된 효소 면역분석법이다. 간략하게, 켈로이드 섬유아세포(1.2 x 10⁵ 개 세포/콜라겐 코팅 실리콘 챔버)를 접종하여 밤새 80% 합류도에 도달하고 ROCK1 억제제 Y-27632(10 μM)로 추가 24시간 동안 정적 배양 및 신장 배양 조건에서 처리하였다. 세포를 수확하고 트립신화한 후 PBS를 2회 세척하였다. 세포를 용해 완충액 (Cell Signaling Technology, MA, USA)에서 30분 동안 용해시킨 다음 샘플을 4°C에서 15분 동안 15,000rpm에서 원심분리하여 단백질 용해물을 수집하였다. Pierce BCA Quantification Protein Kit(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 35 μg 용해물 단백질을 키나제 분석을 위해 로딩/웰하였다. 키나제 반응은 30°C 전탕 배양기에서 1시간 동안 약간 진동하면서 반응 용액(10mM DTT, 2mM ATP)을 첨가하여 활성화되었다. 키트 제공 세척액으로 3회 세척 단계를 거친 후 반응성 용액을 경사분리하였다. anti-

phospho-MYPT1(Thr696)을 각 웰에 첨가하고 밤새 4°C에서 배양하였다. 세척 후, HRP로 표지된 두 번째 항체를 실온에서 1시간 동안 적당히 진탕하면서 각 웰에 첨가하였다. 반응 혼합물을 세척하고 ELISA 플레이트를 100 μl 기질 용액과 함께 실온에서 추가로 15분 동안 인큐베이션하였다. HRP 기반 반응은 정지 용액으로 종료되었다. 흡광도는 SpectraMax Plus 384 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 450nm에서 읽었다.

[0076] 1.6 웨스턴 블로팅 분석

[0078] 전세포 추출물을 얻기 위해 포스파타제 억제제와 프로테아제 억제제가 포함된 Pierce Cell Lysis Buffer(Thermo Fisher, MA, USA)로 세포를 용해하였다. 단백질 추출물(30 μg)을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석하고 polyvinylidene difluoride 막으로 옮겼다. 이 막을 ROCK1(sc-17794, Santa Cruz, CA, USA), phospho COFILIN(#3313, Cell Signaling, MA, USA), COFILIN(#66057-1-Ig, Proteintech, IL, USA), phospho MLC(#3671, Cell Signaling, MA, USA), MLC(#ALX-BC-1150-S, Enzo Life Sciences, Inc., NY, USA) 및 GAPDH(sc-47724, Santa Cruz, CA, USA) 1차 항체, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)에 결합된 2차 항체(Enzo Life Sciences, Inc., NY, USA)와 함께 배양한다. GAPDH는 웨스턴 블로팅 분석을 위한 로딩 컨트롤로 사용되었다.

[0080] 1.7 실시간 정량적 역전사 중합효소연쇄반응(Real-Time qRT-PCR)

[0082] 총 RNA는 TRIzol 시약(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 추출하였다. RNA(1000ng)는 oligo(dT) 무작위 프라이머(Integrated DNA Technologies, IA, US) 및 AccuPower RT PreMix(Bioneer, South Korea)를 사용하여 다음 절차에 따라 cDNA 합성을 거쳤다: 42 °C에서 60분 및 95 °C 5분 동안 qRT-PCR은 StepOnePlus 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems, CA, USA)에서 PowerUp SYBR 그린 마스터 믹스로 수행되었다. 실시간 PCR에 사용되는 프라이머 서열은 표 1에 나열되어 있다. 각 유전자의 mRNA 수준은 GAPDH의 mRNA 수준으로 정규화되었다. PCR 단계는 94 °C에서 5 분 동안 초기 변성 단계로 구성되었다; 94 °C에서 1 분 동안 (변성), 1 분 동안 55 °C(어닐링) 및 2 분 동안 72°C(연장); 및 72 °C에서 7 분 동안 최종 연장 단계. ROCK1의 mRNA 발현, 피부 섬유성 마커인 Collagen Type I Alpha 1 Chain (COL1A1), Collagen Type III Alpha 1 Chain (COL3A1), Alpha-smooth muscle actin (SMA), Fibronectin (FN), connective tissue growth factor (CTGF) 및 증식세포 핵항원 (proliferating cell nuclear antigen; PCNA)을 평가하였다. 상대 발현은 2-△△Ct 방법을 사용하여 계산하였다.

표 1

명칭	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
COL1A1	CACCAATCACCTGCGGTACAGAA (서열번호 1)	CAGATCACGTCATCGCACAAC (서열번호 2)
COL1A3	CCCACTATTATTTGGCACACAG(서열번호 3)	AACGGATCCTGAGTCACAGACA (서열번호 4)
Fibronectin (FN1)	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG (서열번호 5)	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA (서열번호 6)
SMA	GCCAAGCACTGTCAGGAATC (서열번호 7)	TTGTCACACACCAAGGCAGT (서열번호 8)
CTGF (CCN2)	AGACCTGTGCCATT (서열번호 9)	TGTCTCCGTACATCTCCTG (서열번호 10)
PCNA	AGTAAAGATGCCTCTGGTGAA (서열번호 11)	TCCATTCCAAGTTCTCCACT (서열번호 12)
ROCK1	CCAAAGCTCGTTAACTGACAA (서열번호 13)	GAGCTTCTCTTCTTCTTCAGC (서열번호 14)

GAPDH	CACCCACTCCTCACCTTG (서열번호 15)	CCACCAACCTGTTGCTGTAG (서열번호 16)
-------	---------------------------------	-----------------------------------

[0086]

1.8 면역형광

[0088]

세포를 차가운 PBS로 두 번 세척하고 4%(w/v) 파라포름알데히드로 4°C에서 밤새 고정하였다. Permeabilization 단계는 0.1% Triton X-100/PBS로 30분 동안 수행한 후 PBS로 세척하였다. 세포를 실온에서 30분 동안 완충액(1% BSA/PBS)에 노출시키고 1% BSA/0.1% Triton X-100/PBS에 1시간 동안 Alexa Fluor 488-컨쥬게이션된 팔로이딘 (#A12379, Invitrogen, USA)에 노출시켰다. 실온에서 3회 세척 단계 후, 세포를 DAPI 장착 배지로 장착하고 커버 슬립으로 밀봉하고 공초점 레이저 스캐닝 현미경 LSM 900; Carl Zeiss, NY, USA)을 사용하여 검사하였다.

[0090]

1.9 마이그레이션 분석

[0092]

Transwell 8.0 μ M 가공 크기 폴리카보네이트 멤브레인(# 3422, Corning Inc., ME, USA)을 사용한 이동 분석용. 켈로이드 섬유아세포를 가습 인큐베이터(37°C에서 5% CO₂)에서 밤새 부착하기 위해 strex 스트레치 챔버에 사전 코팅된 콜라겐 I형에 1.2×10^5 세포의 밀도로 시팅한 후 추가로 24시간 동안 스트레칭 처리에 노출시켰다. 10 μ m Y-27632의 부재. 대조군으로서 정적 세포는 스트레치 자극 없이 동일한 조건 하에서 strex 스트레치 챔버에서 배양되었다. 그 후, 켈로이드 세포를 수확하고 계수하고, 2×10^4 세포를 1% FBS가 포함된 150 μ L 배지에 재현탁하고 삽입물의 상부 구획으로 재도입하였다. 하부 구획은 화학 유인 물질로서 2% FBS가 포함된 500 μ L의 배지로 채워졌다. 세포는 24시간 동안 37°C에서 이동하도록 허용되었다. 세포를 4% PFA에 고정하고, PBS 중 0.1% Triton X-100으로 10분 동안 투과시키고, 실온에서 10분 동안 헤마黠실린으로 염색하였다. PBS로 세척한 후, 상부 삽입물에서 이동하지 않은 세포를 면봉으로 제거하였다. 폴리카보네이트 멤브레인을 삽입물에서 제거하고 슬라이드에 장착하였다. 이동한 세포의 필드를 도립 현미경(Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)으로 캡처하였다. 마이그레이션 영역은 각 이미지에서 추출한 자주색 영역으로 평가하고 마이그레이션 된 영역의 백분율로 Image J 소프트웨어로 분석하였다.

[0094]

1.10 스트레칭 중인 YAP 및 MRTF의 핵 전좌(Nuclear translocation)

[0096]

핵/세포질 추출물은 제조사의 지시에 따라 NE-Per Nuclear 및 Cytoplasmic Extractons Reagents(#78833, Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하여 별도로 분리하였다. Subcellular fractionation lysis는 YAP(#5157, Cell Signaling, MA, USA), 세포질 및 핵 분획에 대한 내부 마커로서 GAPDH(sc-47724, Santa Cruz, CA, USA) 및 Lamin B(#12586, Cell Signaling, MA, USA)를 포함하는 MRTF(sc-47724, Santa Cruz, CA, USA), 각각을 western blotting analysis로 분석하였다. Image J 소프트웨어로 정량화를 수행하였다.

[0098]

1.11 동물 실험 절차

[0100]

서울대학교 보라매병원 동물실험실적위원회로부터 동물실험 승인(승인번호: 2019-0031)을 받았다. 수컷 NOD.CB17-Prkdc scid/J(SCID) 마우스(생후 5주, 체중: 22.58 ± 0.91g)를 Charles River Japan(Yokohama, Japan)에서 구입하였다. 모든 동물 실험 절차는 서울특별시보라매병원 동물실험연구위원회 가이드라인에 따라 수행되었다.

[0102]

1.12 켈로이드 동물 모델

[0104]

모든 실험은 무균 상태에서 수행되었다. isoflurane을 이용한 마취 하에 SCID 마우스 7마리의 등쪽 털을 제거하고 중간선을 표시한 후 1ml 주사기(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에 26개이지 바늘을 사용하였다. 이 세포들은 서울대학교 보라매병원에서 켈로이드 절제 수술을 받은 7명의 환자에게서 얻은 것이다. 세포는 마우스 등의 가장 눈에 띄는 부위의 왼쪽과 오른쪽에서 약 1cm 떨어져서 주입되었다. 마우스의 등에 결절이 형성된 후 왼쪽 결절에는 2% dimethyl sulfoxide(DMSO; control)를, 오른쪽 결절에는 Y-27632(20 mg/kg)를 주입하였다. 결절은 캘리퍼스로 2~3일마다 측정하고 결절 부피는 다음 방정식을 사용하여 계산하였다. 결절 부피 = $1/2 \times A \times B^2$, 여기서 A = 길이(밀리미터), B = 폭(밀리미터). 켈로이드 섬유아세포 주사 후 14 일째에 결절을 채취하기 위해 집게와 칼날을 이용하여 주위 피부를 조심스럽게 분리하고 결절만을 채취하여 무게를 켰다.

[0106]

1.13 생체내 조직학적 분석

[0108]

초기 세포 주입 14일 후 결절을 수확한 다음 4°C에서 24시간 동안 4% 파라포름알데히드에 고정하고 최소 4시간 동안 물로 세척한 다음 마지막으로 파라핀에 포매하였다. 제조사의 지침에 따라 파라핀 절편(두께 4 μm)을 해마 톡실린 및 애오신(H&E, ab245880, Abcam, Cambridge, UK) 및 MT(TRM-2, ScyTek, Logan, Utah, USA) 염색으로 염색하였다. H&E 염색 절편의 세포질(400 X 확대)과 MT 염색 절편의 콜라겐 밀도(400 X 확대)를 Olympus BX53 현미경(Olympus Corporation, Shinjuku, Japan)을 사용하여 각 절에 대해 확인하였다. 3개의 미세한 필드(오른쪽, 중앙 및 왼쪽)의 스크린샷을 획득하였다. 단위 면적(0.1mm²)당 염증 세포의 수는 Olympus cellSens 표준 이미징 소프트웨어를 사용하여 계산되었다. 콜라겐의 광학밀도는 아비딘-비오틴 복합체에 의한 ImageJ Immunohistochemical staining을 이용하여 측정하였다. 간단히 말해서, 파라포름알데히드(4%) 고정 시편을 파라핀 포매하고 4 μm 두께로 절단하였다. 절편을 56°C에서 1시간 동안 건조시킨 다음 자일렌으로 탈파라핀 및 재수화 단계를 수행하였다. 그런 다음 절편을 37 °C에서 30 분 동안 트립신 효소 항원 검색 용액(ab970, Abcam, Cambridge, UK)과 함께 배양하였다. 일차 항체와 함께 4°C에서 하룻밤 배양을 수행하였다. 0.025% Triton-100을 포함하는 Tris-완충 식염수로 3회 세척한 후, 두 번째 항체를 실온에서 30분 동안 섹션별로 적용하였다. Olympus BX53 현미경으로 3개 필드(오른쪽, 중앙 및 왼쪽)에서 이미지를 촬영하고 Image J 소프트웨어로 분석하였다.

[0110]

1.14 통계 분석

[0112]

체외 실험 결과는 최소 3회 독립적인 실험의 평균값 ± 표준 편차로 보고된다. 생체 내 실험의 경우 모든 값은 평균의 평균 ± 표준 오차로 보고된다. 두 그룹 간의 비교는 스튜던트 t 테스트를 사용하여 수행되었다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0114]

실시예 2. 실험 결과

[0116]

2.1 켈로이드 조직 수집

[0118]

켈로이드 홍터가 있는 20세 내지 80세 사이의 총 5명의 환자로부터 복부, 귀, 등에서 켈로이드를 조직을 확보하고, 분석을 위해 섬유모세포 세포를 분리한 후 켈로이드를 수집하였다.

[0120]

2.2 켈로이드 조직 및 섬유아세포에서 ROCK1의 과발현

[0122]

켈로이드 형성에 ROCK1이 관여하는지 확인하기 위해 인간 켈로이드 및 정상 피부 조직에서의 ROCK1 발현을 먼저 분석하였다. 면역 조직 화학 염색은 정상 피부 조직과 비교하여 인간 켈로이드 조직에서 ROCK1의 발현 증가를 보여주었다 (도 1A). 도 1A와 같이, 활성화된 ROCK1은 섬유아세포 세포가 주로 위치하는 켈로이드 피부 조직의 진피층에서 쉽게 검출되었다. 정상 및 켈로이드 조직에서 파생된 기본 섬유아세포에서 ROCK1의 발현을 조사하였다. 켈로이드 유래 및 인간 정상 섬유아세포에서 ROCK1의 변형된 mRNA 발현 수준은 정량적 역전사 PCR(RT-qPCR)에 의해 정량화되었다. 면역 조직 화학 분석과 일치하여 켈로이드 유래 섬유아세포의 ROCK1 수준은 정상 섬유아세포에 비해 눈에 띄게 상향 조절되었다 (도 1B). 종합하면, 이러한 결과는 켈로이드에서 ROCK1의 과발현을 확인했으며, ROCK1이 켈로이드 치료 요법에서 유망한 치료 표적임을 시사한다.

[0124]

2.3 기계적 스트레스에 의한 켈로이드 섬유아세포에서 ROCK 발현 및 F-액틴 재배열 유도

[0126]

켈로이드 섬유아세포 진행에 대한 기계적인 스트레스의 영향을 확인하기 위해, 본 발명에서는 순환 스트레칭 후 세포 형태 및 증식의 변화를 관찰하기 위해 섬유아세포에 스트레치 변형을 조절할 수 있는 순환 스트레칭 기계를 사용하였다. 24시간 동안 섬유아세포 세포에 스트레치 구배(5-20%)를 적용하고 세포에 대한 기계적 스트레치 효과를 평가하였다. 도 2A에서 관찰한 바와 같이, 켈로이드 섬유아세포는 신장 방향에 대해 평행하고 수직으로 정렬 및 재조직화되는 반면, 정상 섬유아세포는 순환 신장 구배에 관계없이 무방향성 배열을 나타냈다. 또한 신장 상태의 켈로이드 섬유아세포는 정상 섬유아세포에 비해 밀도가 두껍게 자라는 경향이 있다. 또한, 적용 스트레치의 5% 진폭에서의 증식률은 더 낮거나 더 높은 주기적 스트레치 진폭에 의해 유도된 증식률과 비교하여 두 가지 유형의 섬유아세포에서 가장 중요한 세포 증식을 나타낸다(도 2B). 흥미롭게도, 신장된 진폭(20%)은 정상 섬유아세포(~50%)와 켈로이드 섬유아세포(~90%)에서 증식 능력의 현저한 감소를 유도하였다. 이러한 결과는 켈로이드 섬유아세포의 과증식이 기계적 스트레스 크기와 밀접한 관련이 있지만 급성 기계적 힘이 생존율을 방해할 수 있음을 나타낸다.

[0127]

그 후, 웨스턴 블로팅 분석을 통해 cyclic stretch를 받은 섬유아세포에서 ROCK1 발현을 측정하였다. 섬유모세포가 순환 신장의 일련의 구배(5-20%)에 노출되었을 때, 예상대로 증가된 신장 진폭에서 ROCK1 발현이 상향 조절되었다(도 2C). 그러나 강렬한 순환 스트레치(20%)는 ROCK1 발현을 손상시켰는데, 이는 섬유아세포 기능에 부정적인 영향을 미치고 추가 연구에 적합하지 않은 20% 순환 스트레치를 언급하는 상대적인 세포 생존 능력의 감소와 일치한다. ROCK1 발현을 시간 의존적 방식(0-24시간)으로 조사하기 위해 섬유아세포에 5% 및 10%의 스트레스 변형만을 사용하였다. 결과는 가장 상향 조절된 ROCK1이 켈로이드 및 정상 섬유아세포 모두에서 5% 스트레치에 노출된 지 24시간 후에 검출되었음을 시사한다(도 2D).

[0128]

세포골격 네트워크의 주요 구성 요소는 F-액틴 섬유이다. 따라서 주기적인 스트레스에 대한 반응으로 섬유아세포에서 F-액틴의 변화를 조사하였다. Static 및 stretch culture에서 Phalloidin Alexa-488로 염색된 섬유아세포 세포를 관찰하고 24시간 배양 후 분석하였다. 도 2E는 신장되지 않은 자극(0%) 및 신장된 자극(5% 및 10%) 하에서 정상 및 켈로이드 섬유아세포의 F-액틴 섬유의 면역형광 이미지를 보여주었다. 스트레칭되지 않은 섬유아세포에서 염색된 섬유 형광은 모든 처리된 조건 사이에서 유의미하지 않은 변화를 나타냈으며, 이는 정상적인 섬유아세포에 대한 순환 스트레치 베어링 F-액틴 합성의 무감각성을 나타낸다. 상대적으로, 신장된 섬유아세포에서 상승된 형광 신호가 상당히 검출되었으며, 이는 신장 유도된 F-액틴 스트레스 섬유 중합의 증거를 나타낸다. 또한, 5% 스트레치에서 풍부한 F-액틴 섬유의 내부 공간은 10% 스트레치에 비해 더 넓은 경향이 있다. 이러한 결과는 앞서 언급한 ROCK1 발현의 웨스턴 블로팅과 함께 24시간 동안 5% 스트레치 조건에 대한 켈로이드 섬유모세포의 가장 기계적 민감성을 나타냄을 알 수 있다.

[0130]

2.4 켈로이드 섬유아세포에서 F-액틴 세포골격 재배열에 대한 Y-27632의 효과

[0132]

ROCK1에 대한 켈로이드에 대한 효과를 확인하기 위해 Y-27632를 사용하였다. 켈로이드 섬유아세포 증식에 대한 Y-27632의 억제 효과는 치료 용량에 관계없이 관찰되지 않았다(도 3A). 그러나 켈로이드 섬유아세포에서 F-액틴

섬유 형성은 Y-27632 치료의 용량 의존 방식에 의해 엄격하게 조절된다. 25 및 50 μ M Y-27632에서 F-액틴 세포 골격 구조의 극적인 붕괴가 관찰되었으며, 이는 액틴 해중합 측면에서 ROCK1 매개 켈로이드에 대한 Y-27632의 효과적인 억제 효과를 나타낸다. 10 μ M에서 켈로이드 섬유아세포에 대한 Y-27632의 효과적인 치료 용량을 최적화하였다(도 3B).

[0134] 2.5 신장-자극된 켈로이드 섬유아세포의 ROCK1 활성에 대한 Y-27632의 억제 효과

ROCK1을 억제하는 Y-27632의 효과적인 투여량을 확인한 후, 켈로이드 섬유아세포를 신장되지 않은 섬유아세포, 신장된 섬유아세포, Y-27632로 전처리된 신장되지 않은 섬유아세포 및 신장된 섬유아세포를 포함하는 4개의 그룹에 할당하였다. 여기서 ROCK1 활동에 대한 스트레치(신장) 자극 플랫폼에 대한 Y-27632의 영향을 분석하려고 하였다.

결과는 Y-27632 치료가 반대로 ROCK1 활성화를 억제하는 반면 켈로이드 섬유아세포에서 지속적으로 신장된 자극이 향상된 ROCK1 활성을 유도한다는 것을 보여주었다. Y-27632로 치료하고 신장 자극을 받은 켈로이드 섬유아세포는 Y-27632 단독으로 치료한 것(10.8%)과 비교하여 ROCK1(26%)의 활성 감소 비율이 가장 컸다. 이는 켈로이드의 병인과 관련된 ROCK1 활성 억제에 대한 기계적 및 화학적 효과의 시너지 효과를 나타낸다(도 4A).

[0139] 2.6 Y-27632의 Rho/ROCK1 경로를 통해 켈로이드 섬유모세포에서 기계적 스트레스 유도 F-액틴 채배열 억제 효과

기계적인 힘에 반응하여 G-액틴이 중합되어 F-액틴을 형성하고 과도한 힘이 가해지면 F-액틴이 과중합되는 경향이 있으며 이는 도 4B에서 명확하게 나타난다. 대조적으로, 섬유아세포가 Y-27632에 노출되었을 때 세포 F-액틴 네트워크는 현저하게 파괴되었다. 결과는 ROCK1 활동에 의존하는 F-액틴 네트워크의 섭동에 대한 우리의 가설을 확인한다.

코필린과 미오신 경쇄(MLC)의 ROCK1 유도 인산화의 역할을 설명하기 위해 차례로 액틴 중합과 세포 수축성을 촉진하기 위해 ROCK1 억제제 Y-27632의 도움을 받거나 받지 않고 확장 활성화 ROCK1 조건에 반응하여 코필린 및 MLC 인산화 정도를 순차적으로 조사하였다. 인산화된 코필린 및 미오신 경쇄의 실질적으로 증가된 함량은 세가지 다른 처리와 비교하여 신장 자극 하의 섬유아세포에서 검출되었다(도 4C). ROCK1 억제제 Y-27632에 의한 ROCK1 활성의 고갈은 인산화 단백질의 발현에서 가장 큰 감소를 보였다.

종합하면, 결과는 내부 세포골격 네트워크를 구축하기 위한 ROCK1 매개 Rho/ROCK1 경로의 중요한 역할을 나타낸다. Rho/ROCK1 경로의 조절 장애는 F-액틴 형성의 교란을 초래하여 비정상적인 흉터 및 피부 섬유증 질환의 틀에 기여할 수 있다.

[0145] 2.7 ROCK1 억제에 의한 섬유성 유전자의 하향조절을 유도 효과

켈로이드 섬유아세포는 일반적으로 높은 수준의 섬유증 마커를 발현하므로, 섬유화 유전자 발현의 조절을 통해 켈로이드의 병인을 이해하면 켈로이드 흉터의 치유에 기여할 수 있다. 이를 통해 기계적 유발 켈로이드에 대한 Y-27632의 억제 효과를 조사하고자 하였다.

섬유성 매개체의 상향 조절을 통한 섬유형성-보유 켈로이드에 대한 ROCK1의 관여는 mRNA 수준에서 COL1A1, COL3A1, Fibronectin, α -SMA, CTGF 및 PCNA의 발현을 평가함으로써 확인되었다. 주기적 기계적 자극은 모든 섬유증 마커를 크게 향상시켰다. 예상대로 Y-27632 치료는 섬유화 유전자의 mRNA 수준 감소를 통해 섬유화 과정을 약화시키는 경향이 있다. 관찰된 결과는 Y-27632가 스트레칭 장치에 의해 시뮬레이션된 생물학적 기계적 환경에서 켈로이드 진행을 방지하는 치료 효과를 보여준다 (도 5A).

[0150] 2.8 켈로이드 섬유모세포의 스트레치에 의한 이동 촉진 및 Y-27632에 의한 억제

[0152] 켈로이드는 원래 병변의 위치를 넘어 켈로이드 섬유모세포의 과도한 증식 및 이동을 특징으로 한다. 이에 따라 켈로이드 과이동의 예방이 켈로이드 형성 및 재발을 치유하는 핵심 인자로 제안되었다. transwell 이동 분석을 사용하여 켈로이드 섬유아세포의 이동 활동을 추가로 분석하였다. 도 5B에서 관찰된 바와 같이, 켈로이드 섬유모세포의 이동은 기계적인 힘 하에서 현저하게 촉진되었고 Y-27632에 반응하여 부분적으로 억제되었다.

[0154] 2.9 기계적 활성화된 ROCK의 YAP 및 MRTF 핵 전좌(nucleus translocation)를 통해 켈로이드 섬유아세포 활성화 유도

[0156] Rho/ROCK1 신호 전달 경로를 통한 스트레치 자극에 적응하기 위해 YAP(Yes-associated protein) 및 MRTF(Myocardin-related transcription factor)의 세포 내 분포를 조사하였다.

[0157] 예상대로 정적 배양 섬유아세포와 비교하여 신장된 섬유아세포의 핵에서 현저하게 향상된 YAP 및 MRTF 함량이 검출된 반면, Y-27632의 처리는 세포질에서 YAP 및 MRTF의 높은 촉적으로 확인된 이러한 기계 민감성 전사 인자 단백질의 핵 수입을 억제함으로써 이러한 영향을 역전시키는 것을 확인하였다(도 6).

[0159] 2.10 결절 형성의 환자 유래 켈로이드 이종 이식 SCID 마우스 모델에서 Y-27632의 억제 효과

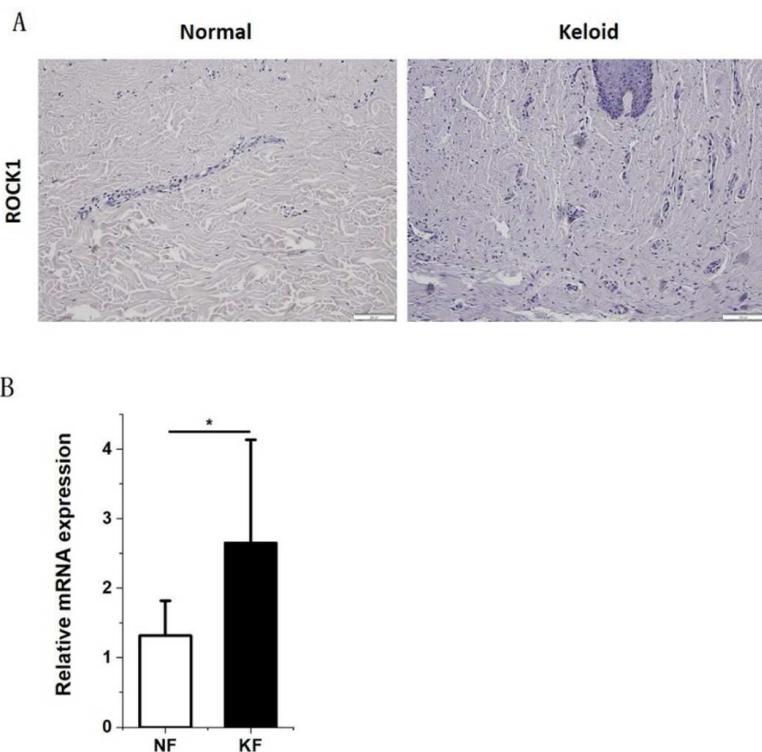
[0161] 켈로이드 결절(nodule) 진행을 억제에 대하여 켈로이드 이종 이식 SCID 마우스에서 평가하였다. 켈로이드 결절 적출시 Y-27632로 처리된 켈로이드 결절의 평균 부피는 $17.21 \pm 13.49 \text{ MM}^3$ 인 반면, 2% DMSO 그룹으로 처리된 대조군은 $21.27 \pm 13.98 \text{ MM}^3$ 이었다. 또한, 켈로이드 결절 무게는 대조군과 비교하여 Y-27632 처리 그룹에서 유의하게 감소되었다. Y-27632 처리된 그룹의 평균 중량 켈로이드 결절과 처리되지 않은 대조군의 경우 각각 $4.56 \pm 3.50 \text{ Mg}$ 및 $7.61 \pm 3.16 \text{ Mg}$ 였다(도 7A).

[0162] 켈로이드 부분은 대조군과 비교하여 Y-27632로 처리된 그룹에서 감소된 염증 세포를 나타냈다. MT 염색은 Y-27632 처리군과 비교하여 대조군에서 콜라겐 다발의 더 높은 중착을 보여 주었다. DMSO 처리 그룹과 비교하여 Y-27632 처리 그룹의 VEGF, SMA, vimentin, 콜라겐 I형(collagen type I), 콜라겐 III형(collagen type III)의 단백질 발현이 현저히 감소하였다(도 7B).

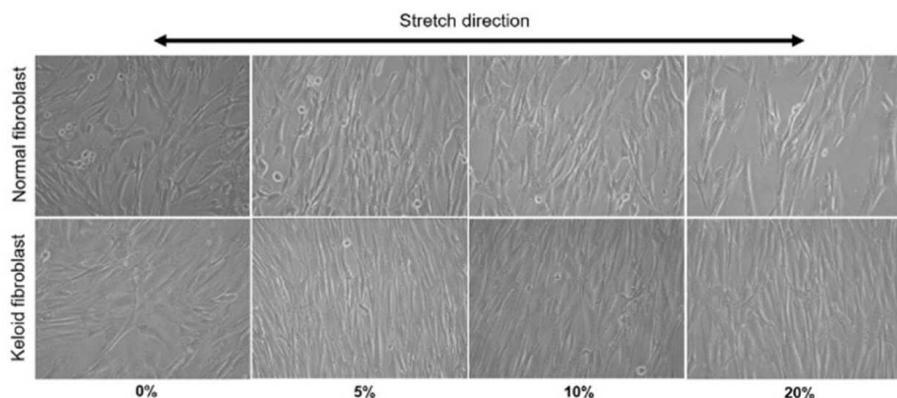
[0164] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

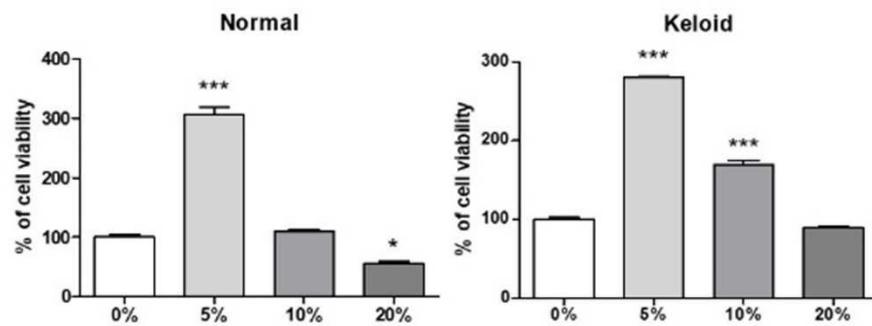
도면1



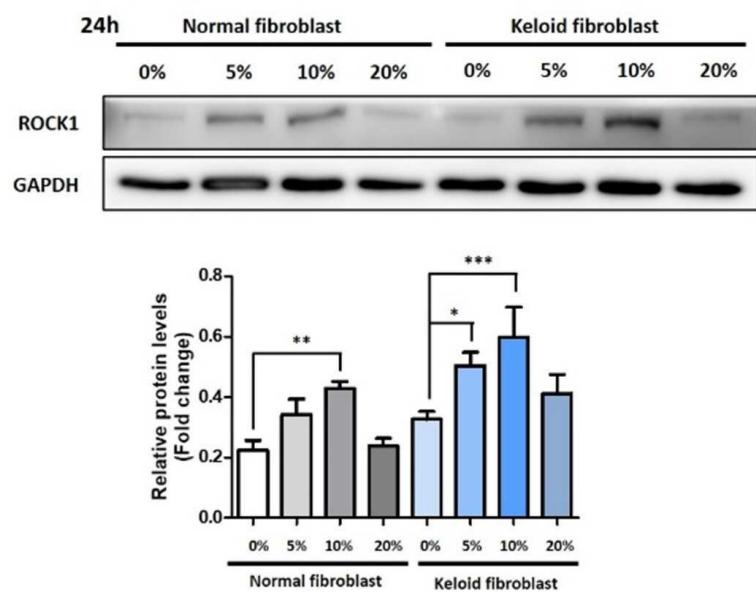
도면2a



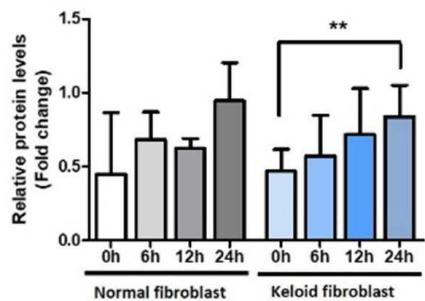
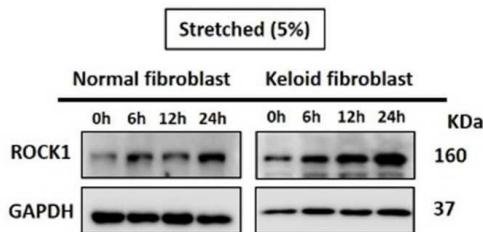
도면2b



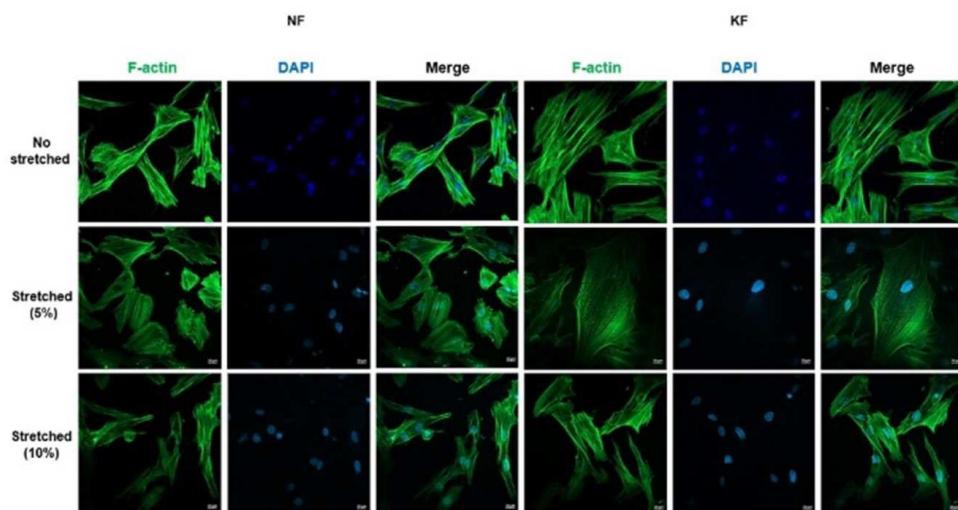
도면2c



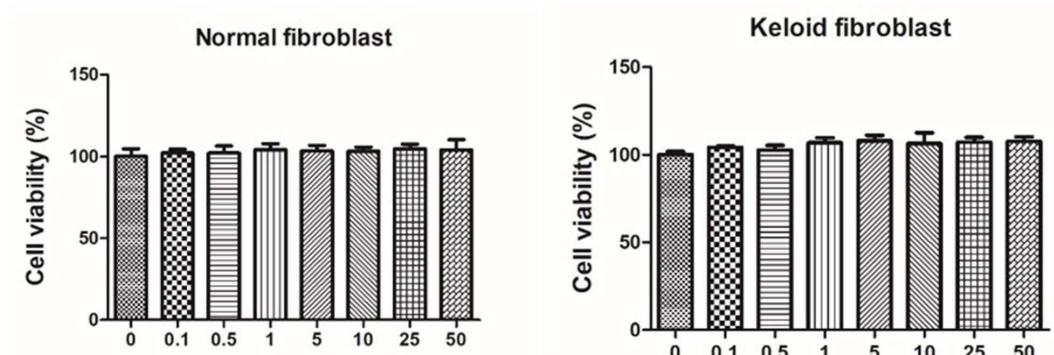
도면2d



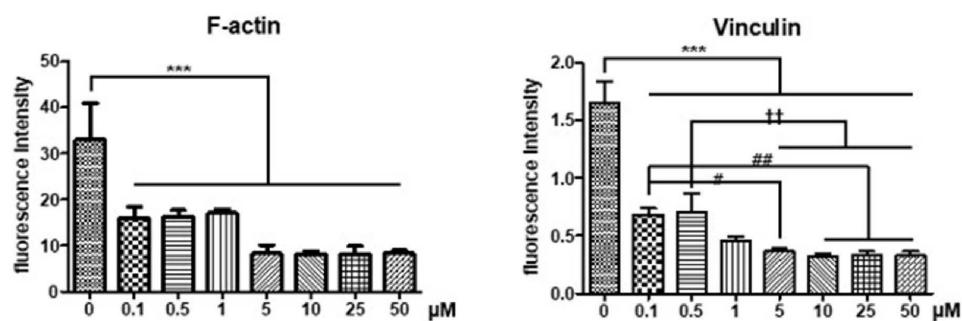
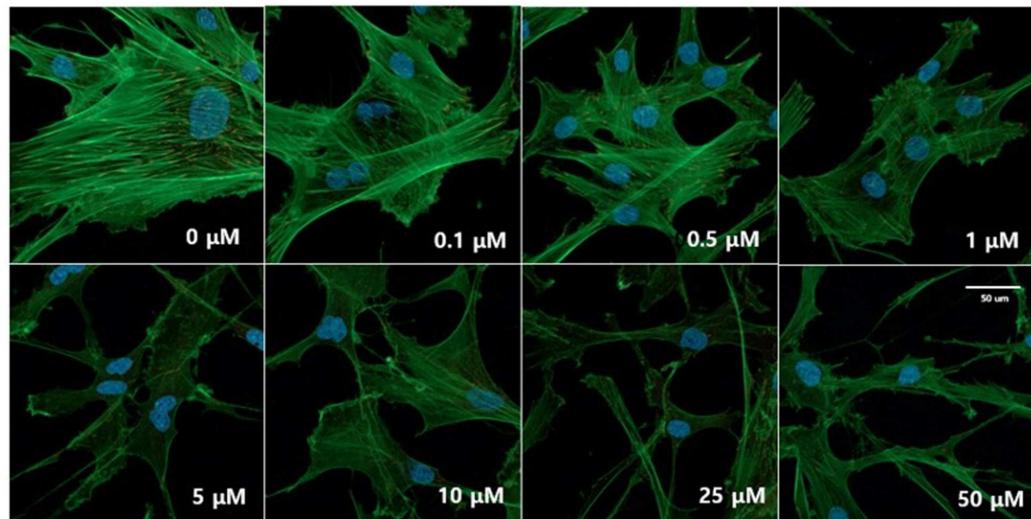
도면2e



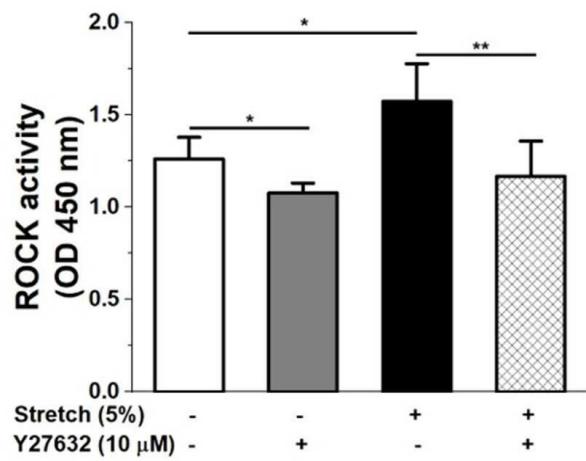
도면3a



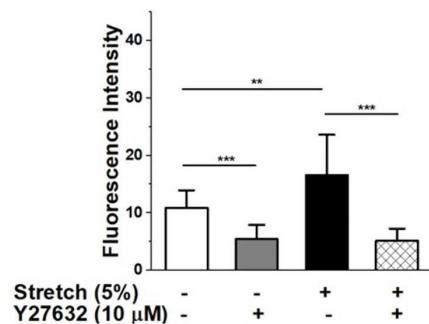
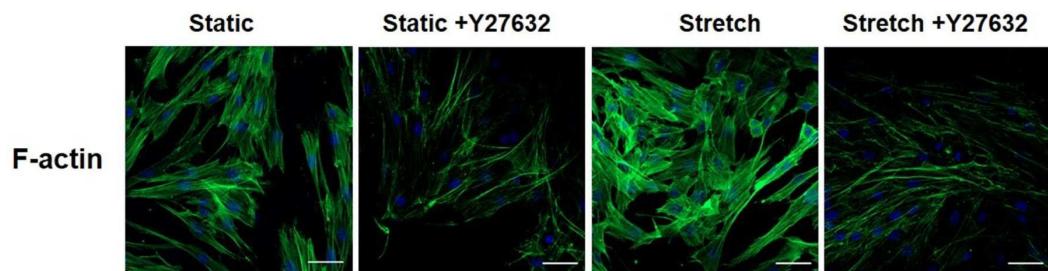
도면3b



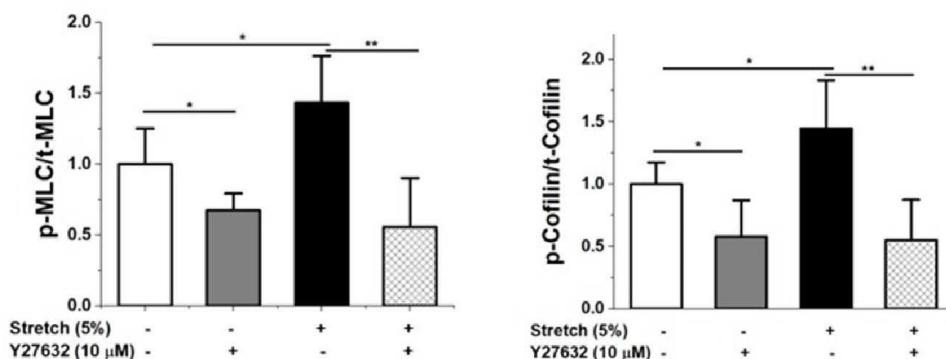
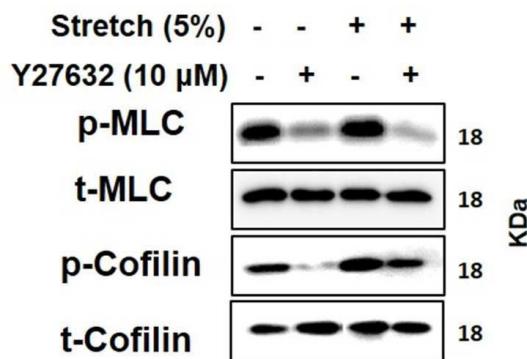
도면4a



도면4b

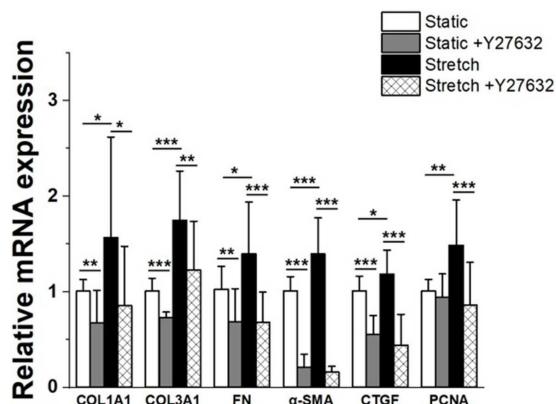


도면4c

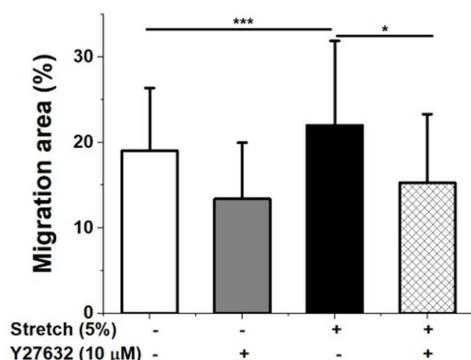
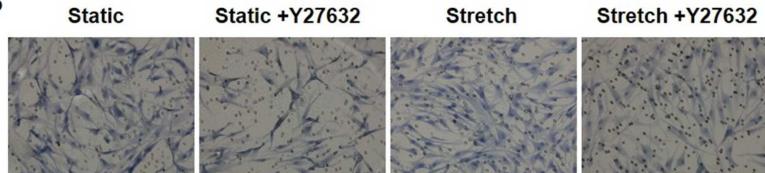


도면5

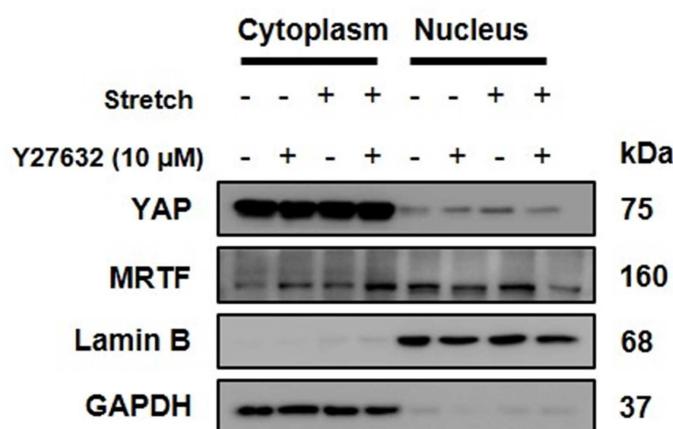
A



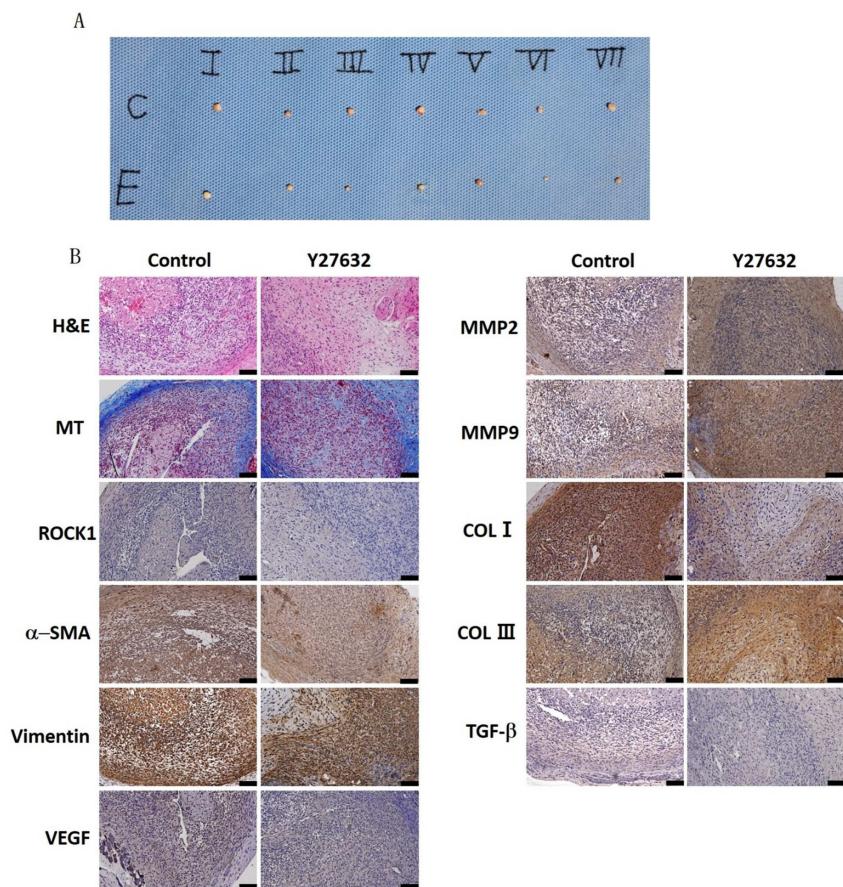
B



도면6



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 [Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.](#)