



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0046484
(43) 공개일자 2009년05월11일

(51) Int. Cl.

A61K 31/557 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0112672

(22) 출원일자 2007년11월06일

심사청구일자 2007년11월06일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

서한극

경남 진주시 신안동 주공2차아파트 204동 706호

김효정

경남 진주시 칠암동 518-6 경남빌라 702호

김성욱

경남 진해시 경화동 972-10번지

(74) 대리인

김순용

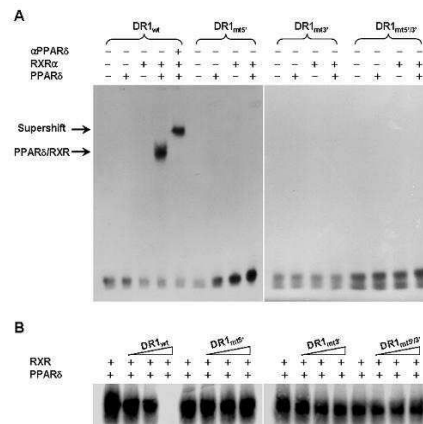
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 혈관성 질환 치료용 억제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 폐옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 경유하여 전환 성장 인자(TGF)- β 1을 유도하는 리간드, 조성물 및 혈관평활근 세포(VSMC)내에서 발현을 촉진하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 폐옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 활성화시켜 혈관평활근 세포(VSMC)내에서 전환 성장 인자(TGF)- β 1의 발현을 촉진시켜 대사증후군, 혈관성 질환, 상처 치유, 피부 노화 및 주름, 퇴행성 관절염, 및 염증성 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

Carbacyclin, prostaglandin I₂(PGI₂) 동족체, 1,3,5-tri치환 아릴 화합물, GW501516, L-165041, GW2433, 장쇄 불포화 지방산 또는 장쇄 포화 지방산으로부터 선택된 1종 이상으로, 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) delta 을 경유하여 전환 성장 인자(TGF)-beta 1을 유도하는 용도를 갖는 리간드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리간드의 유효량을 포유 동물에게 전신 투여하는 것에 의해 TGF-beta 1을 활성화하는 리간드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 포유 동물은 인간인 것을 특징으로 하는 리간드.

청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항의 리간드를 포함하여 이루어지는 TGF-beta 1의 유도 조성물

청구항 5

제4항에 의한 조성물에 의해 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 활성화시켜 TGF-β 1의 발현을 촉진시키는 방법

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 리간드에 의한 PPAR delta의 활성화는 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 발현을 규제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 발현은 상기 TGF-beta 1 프로모터내에 위치한 기능성 PPRE 에 의해 매개되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제4항의 조성물에 의해 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 활성화시켜 TGF-β 1 의존 방식으로 인터루킨-1β 에 의해 유도된 MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)의 프로모터 활성화 및 발현을 감쇄시키는 방법

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 TGF-beta 1은 그 발현을 투여량 및 시간 의존 방식으로 규제한 것을 특징으로 하는 방법

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 활성화된 PPAR delta는 반복부위 (DR) 1 반응 인자 TGF-beta 1-DR1에 대한 결합에 의해 TGF-beta 1 프로모터 활성을 감쇄시키는 방법

청구항 11

제4항의 조성물에 의한 대사증후군을 예방 및 치료하는 방법.

청구항 12

제4항의 조성물에 의한 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 을 매개로한 혈관성 질환을 예방 및 치료하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 혈관성 질환은 동맥경화증, 당뇨병, 협심증, 심근경색인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제4항의 조성물에 의한 콜라겐 발현을 조절하여 상처를 치유하는 방법.

청구항 15

제4항의 조성물에 의한 피부 노화 및 주름을 예방 및 제거하는 방법.

청구항 16

제4항의 조성물에 의한 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) delta을 매개로한 퇴행성 관절염, 염증성 질환을 예방 및 제거하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 염증성 질환은 평활근세포의 증식성 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 전환 성장 인자(TGF)- β 1의 유도 리간드, 조성물 및 혈관평활근 세포(VSMC)내 발현 촉진법에 관한 것으로, 구체적으로는 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 경유하여 전환 성장 인자(TGF)- β 1을 유도하는 리간드, 이를 함유하는 조성물, 및 혈관평활근 세포(VSMC)내에서 발현을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 전환 성장 인자- β (TGF- β)는 조직의 리모델링, 세포 분화 및 증식뿐 아니라 염증의 조절 및 면역 반응을 포함하는 다양한 생명과정에서 중요한 역할을 수행한다(1. Verrecchia F, Mauviel A. transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol.*2002;118:211-215, 2. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA, transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99-146).
- <3> 3가지 포유동물의 TGF- β isoform은 TGF-beta 1, TGF- β 2 및 TGF- β 3인 것으로 확인되었으며, 이들은 아미노산 레벨에서 60-80% 상동성을 공유하며 이들은 서로 다른 각각의 유전자에 의해 인코딩된다(35. Gizard F, Amant C, Barbier O, Bellosta S, Robillard R, Percevault F, Sevestre H, Krimpenfort P, Corsini A, Rochette J, Glineur C, Fruchart JC, Torpier G, Staels B. PPAR alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16INK4a. *J Clin Invest.* 2005;115:3228-3238.).
- <4> TGF-beta 1은 가장 집중적으로 연구되어온 isoform으로서, 인간, 소, 원숭이 및 돼지 종에서 아미노산이 완전히 동일하며, 쥐 isoform의 경우 단지 1개의 아미노산 잔기만이 차이가 난다(3. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem.* 1989;264:402-408.).
- <5> 이같은 광대한 아미노산 보존은 TGF-beta 1가 세포의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 수행한다는 것을 의미한다. TGF-beta 1은 혈관평활근세포 (VSMC)내에서 발현되어 동맥경화증(atherosclerosis) 및 재협착(restenosis)에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (6. Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, Walker MG. The role of transforming growth factor-beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:28-36.).
- <6> TGF-beta 1은 혈관계(vascular system)에서 염증 반응을 조절하고 (7. Metcalfe JC, Grainger DJ. TGF-beta: implications for human vascular disease. *J Hum Hypertens.* 1995;9:679.) TGF-beta 1 유전자의 파괴는 혈관 내에서의 과도한 염증 반응 및 조기 치사를 야기하였다 (8. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght

M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. transforming growth factor-beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:770-774. **9**. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992;359:693-699.).

<7> 더욱이, TGF-beta 1은 그것의 작동체인 Smad3를 매개하여 MCP-1의 발현을 억제하고 (**3**. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem*. 1989;264:402-408., **10**. Feinberg MW, Shimizu K, Lebedeva M, Haspel R, Takayama K, Chen Z, Frederick JP, Wang XF, Simon DI, Libby P, Mitchell RN, Jain MK. Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. *Circ Res*. 2004;94:601-608.), TGF-beta 1의 신호전달 억제는 염증을 촉진함으로써 동맥경화증을 악화시킴으로서 불안정한 프라그를 유도한다 (**11**. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*. 2001;89:930-934., **12**. Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Kotliansky VE, Daemen MJ. transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:975-982.)).

<8> 따라서, TGF-beta 1은 혈관성 염증과 프라그 안정성을 규제하는 핵심 인자이다 (**13**. Grainger DJ. transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:399-404.)).

<9> 퍼옥시좀 증식활성화 수용체 (PPARs)는 지질 항상성, 물질대사 및 염증 뿐 아니라 세포 분화 및 증식의 제어에 영향을 미치는 핵 호르몬 수용체의 일종이다(**14**. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347:645-650., **15**. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83:835-839., **16**. Desvergne B, Wahli W. PPARs: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999;20:649-688., **17**. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000;405:421-424.)).

<10> 이들 수용체는 표적 유전자내에 존재하는 특정 인식 서열인 PPAR 반응 배열 (PPRE)를 매개로 하여 레티노이드 X 수용체 (RXR)와 함께 헤테로다이머를 형성함으로써 유전자 발현을 제어한다 (**18**. Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response factor in the 5'flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene, *EMBO J*. 1992;11:433-439.). PPAR α (NR1C1), PPAR δ (NR1C2; PPARβ, FAAR, 및 NUC1로도 알려짐), 및 PPAR γ (NR1C3)의 3가지 서로 다른 isoform이 포유류에서 동정되었다.

<11> PPAR α 및 PPAR γ 과는 대조적으로, PPAR delta의 생리학적 기능은 명확하게 밝혀져 있지 않지만, VSMC를 포함하는 다양한 세포 계통 내에서 발현되고 있는 것으로 알려져 있다 (**19**. Zhang J, Fu M, Zhu X, Xiao Y, Mou Y, Zheng H, Akinbami MA, Wang Q, Chen YE. PPARs delta is up-regulated during vascular lesion formation and promotes post-confluent cell proliferation in VMC. *J Biol Chem*. 2002;277:11505-11512.)).

<12> 상기 PPAR 표적 유전자의 프로모터 영역에는 6개의 핵산서열 AGGTCA가 반복배열로 존재하고 있으며, 1 혹은 2 (DR1 혹은 DR2)개의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다(**16**. Desvergne B, Wahli W. PPARs: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999;20:649-688.)).

<13> 이들 PPREs는 표적유전자의 프로모터 영역내에 위치하여 PPAR delta-RXR 복합체가 결합함으로써 표적유전자의 발현을 활성화할 수 있다(**16**. Desvergne B, Wahli W. PPARs: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999;20:649-688.)).

<14> 최근의 연구에 의하면, PPAR delta 리간드가 생체내(in vivo)에서 항동맥경화 (antiatherogenic) 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다 (**20**. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*. 2003;302:453-457.)).

- <15> 따라서, PPAR delta가 동맥경화증 및 기타 염증성 혈관계 질병의 치료학적 표적이 될 수 있다는 것이 대두되고 있다(**21.** Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006;116:590-597.).
- <16> 결론적으로, PPAR delta에 의해 지배받는 유전자 발현을 잘 이해함으로써 치료학적 잠재력을 갖는 물질을 개발하는 것이 가능할 수도 있다. 다수의 인자들이 PPAR delta 작용에 관여하는 것으로 알려져 있지만, PPAR이 조절하는 작동 유전자에 대하여는 거의 알려져 있지 않다. 이에 본 발명자는 VSMC내에서의 PPAR delta의 역할을 파악하기 위하여 PPAR delta의 전사 표적에 착안하여 본 발명을 수행하고, 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <17> 본 발명의 일 목적은 VSMC내 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 의 전사 표적인자를 동정하는 것이다.
- <18> 본 발명의 다른 목적은 동정해낸 전사 표적을 이용하여 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 의 전사 활성을 선택적으로 조절할 수 있는 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <19> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) delta 을 경유하여 전환 성장 인자(TGF)- β 1을 유도하는 용도를 갖는 리간드를 제공한다.
- <20> 또한, 본 발명에서는 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 경유하여 전환 성장 인자(TGF)- β 1을 유도하는 조성물을 제공한다.
- <21> 나아가, 본 발명에서는 상기 조성물을 이용하여 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 활성화시켜 혈관평활근 세포(VSMC)내에서 전환 성장 인자(TGF)- β 1의 발현을 촉진시키는 방법을 제공한다.
- <22> 더 나아가, 본 발명은 PPAR delta를 개재한 TGF-beta 1의 발현유도를 이용하여 대사증후군, 혈관성 질환, 상처 치유, 피부 노화 및 주름, 퇴행성 관절염, 염증성질환 등을 예방 및 치료하는 방법을 제공한다.
- <23> 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- <24> 본 발명에 따르면, 하기 실시예에 의해 규명된 바와 같이, PPAR delta의 활성이 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 발현을 강하게 조절하며, 이들은 TGF-beta 1 프로모터내에 위치한 기능성 PPRE에 의해 매개되는 것을 보고하였다.
- <25> 흥미롭게도, PPAR delta의 활성은 TGF-beta 1에 의존적으로 인터루킨-1 β 에 의해 유도된 MCP-1의 프로모터 활성 및 발현을 감쇄시켰다.
- <26> 특히, PPAR delta 활성화제인 GW501516를 투여한 경우, TGF-beta 1의 발현을 농도 및 시간 의존적으로 조절하였다. 이는 PPAR delta siRNA 존재하 혹은 PPAR delta의 억제제인 GW9662에 의하여 현저한 감쇄가 유도되었다. 상기 GW501516뿐 아니라, Carbacyclin(sigma사 시판제품명: C3305), prostaglandin I₂(PGI₂) 동족체, 1,3,5-tri치환 아릴 화합물(시판제품명: GW2433), L-165041, 다수의 장쇄(C10-) 불포화 지방산 또는 장쇄(C10-) 포화 지방산으로부터 선택된 리간드에 의해 PPAR delta 를 활성화시킬 수 있다. GW501516에 의한 PPAR delta의 활성은 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 발현을 조절하였다. 나머지 상기 리간드에 의해서도 PPAR delta가 활성화되고 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 발현을 조절할 가능성이 있다.
- <27> 이에 한정하는 것은 아니나, 사용가능한 장쇄 불포화 지방산 및 장쇄 포화 지방산의 종류를 다음표 내에 정리하였다.

표 1

<28>

불포화 지방산	포화 지방산	디카르복시 지방산
ω 3-PUFAs α -Linolenic C18:3 γ -Linolenic C18:3 Eicosapentaenoic C20:5(EPA) Docohexaenoic C22:6 (DHA)	Capric C10:0 Lauric C12:0 Myristic C14:0 Palmitic C16:0 Stearic C18:0 Arachidic C20:0 Behenic C22:0	Dodecanedioic C12
ω 6-PUFAs Linoleic C18:2 Dihomo- γ -linolenic C20:3 Arachidonic C20:4		
ω 9-mUFAs Palmitoleic C16:1 Oleic C18:1 Elaidic C18:1 trans Erucic C22:1 Nervonic C24:1		
ω 2-mUFA Petroselinic C18:1		

<29>

더욱이, 활성화된 PPAR delta는 TGF-beta 1의 프로모터내에 존재하는 PPRE의 반복부위인 DR-1에 대한 결합에 의해 TGF-beta 1 프로모터 활성을 유도하였으며, DR-1의 5' 혹은 3' 내에서의 뉴클레오타이드 치환체는 전사 활성과 PPAR delta 결합을 모두 상쇄시켰다. 이는 상기 DR-1타입의 PPRE가 TGF-beta 1의 프로모터내에 존재하는 PPAR delta 반응 부위라는 것을 제시한다.

<30>

더욱이, 리간드에 의해 활성화된 PPAR delta는 인터루킨-1 β 에 의해 유도된 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)의 프로모터 활성 및 발현을 저하시켰다. 이같은 효과는 PPAR delta siRNA, anti-TGF-beta 1 항체 혹은 TGF- β 타입 I 수용체 억제제 존재하에 현저하게 감쇄되었다.

<31>

이같은 결과로부터 PPAR delta의 항염증 활성이 TGF-beta 1을 매개한 경로임을 확인하였다.

<32>

이때 상기 리간드를 함유하는 유도 조성물은 포유 동물 내에서 유효량을 복수회로 투여하는 단계를 포함하는데, 여기서 (i) 복수 회 투여 간 시간은 1주일 이상이고; (ii) 복수 회 투여 간 시간은 1일 이상이며; 그리고 (iii) 상기 화합물은 포유 동물에게 일일 기준으로 투여되거나; 또는 (iv) 상기 화합물은 포유 동물에 12시간 마다 투여된다.

<33>

추가 또는 대안적인 구체예에서, 상기 투여 방법은 약물 휴약기(drug holiday)를 포함하는데, 즉 이 화합물의 투여를 일시적으로 중단하거나 또는 이 화합물의 투여량을 일시적으로 줄이며; 약물 휴약기의 종결시 화합물의 투여를 재개한다. 약물 투여 휴지기의 길이는 2일에서 1년으로 다양할 수 있다.

<34>

추가 구체예에서, 상기 본 발명의 방법은 산화 질소 생산 유도제, 소염제, 생리학적으로 허용 가능한 산화 방지제, 생리학적으로 허용 가능한 무기물, 음 하전 인지질, 카로티노이드, 스타틴, 혈관 신생 억제 약물, 메트릭스 메탈로프로티나제 억제제, 13-cis-레티노산(retinoic acid)(13-cis-레티노산의 유도체 포함), 11-cis-레티노산(11-cis-레티노산 유도체 포함), 9-cis-레티노산(9-cis-레티노산 유도체 포함) 및 레티닐아민 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의부가적 제제를 투여하는 단계를 포함한다.

<35>

하나의 구체예에서, 본원에 기술된 조성물이 사용되는 방법은 산화 질소 생산 유도제, 산화 방지제, 소염제, 무기물, 항-산화제, 카로티노이드, 음 하전 인지질 및 스타틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.

<36>

일 구체예에서, 본원에 기술된 방법 및 조성물에 사용되는 화합물의 유효량을 포유 동물에게 전신 투여할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 상기 화합물은 포유 동물에 경구 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 화합물은 포유 동물에 정맥 내 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 화합물은 포유동물에게 주입법으로 투여할 수 있다.

- <37> 전술한 구체예 중 임의의 구체예에 있어서, 본원에 기술된 방법 및 조성물이 사용되는 포유 동물은 인간이다. 또 다른 구체예에서, 본원에 기술된 조성물이 사용되는 방법은 화합물의 유효량을 복수 회 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 복수 투여 사이의 시간 간격은 1주일 이상이다, 다른 구체예에서, 복수 투여 사이의 시간 간격은 1일 이상이다. 또다른 구체예에서, 상기 화합물은 포유 동물에게 일일 기준으로 투여된다.
- <38> 본원에 사용된 "포유 동물"이란 용어는, 인간을 포함한 모든 포유 동물을 의미한다. 포유 동물의 예로서는 인간, 인간을 제외한 영장류, 소, 개, 고양이, 염소, 양, 돼지, 래트, 마우스 및 토끼를 포함한다.
- <39> 본원에 기술된 리간드를 함유하는 조성물은 예방적 처치 및/또는 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다. "치료"란 용어는, 예방적 및/또는 치료적 처치를 의미한다. 치료 분야에 있어서, 조성물은 이미 질병, 병상 또는 질환이 발병한 환자에게,
- <40> 이러한 질병, 질환 또는 병상에 따른 증상을 치료하거나 또는 최소한 부분적으로나마 지연시키는데에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 용도로 사용되기에 유효한 양은 질병, 질환 또는 병상의 진행 정도와 심각성, 치료 경험 유무, 환자의 건강 상태와 약물에 대한 반응, 그리고 치료하는 의사의 판단에 따라서 달라질 것이다. 당업자는 이러한 치료적 유효량이 통상의 실험(예를 들어, 투여량 증량 임상 실험(dose escalation clinical trial))에 의해 결정된다는 사실을 잘 알고 있다.
- <41> 예방적 처치에 있어서, 본원에 기술된 화합물을 함유하는 조성물은 특정 질병, 질환 또는 병상에 민감하거나 또는 발병 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양을 "예방적 유효량 또는 유효 투여량"이라고 정의한다. 이와 같이 투여할 경우, 환자의 건강 상태 및 체중 등에 따라서 정확한 양이 결정된다. 당업자는 이러한 예방적 유효량이 통상의 실험(예를 들어, 투여량 증량 임상 실험)에 의해 결정된다는 사실을 잘 알고 있다.
- <42> 이때 "강화하다" 또는 "강화"라는 용어는, 원하는 효과의 지속 기간이나 효능을 연장하거나 또는 증가시키는 것을 의미한다. 그러므로, 치료제 효능을 강화함에 있어서, "강화"란 용어는, 전체 시스템에 기타 치료제가 미치는 효과가 지속되는 기간 또는 효능을 연장 또는 증가시키는 능력을 의미한다. 본원에 사용된 "강화 유효량(enhancing-effective amount)"이란, 원하는 시스템 내에서 다른 치료제의 효능을 강화하도록 조정된 양을 의미한다. 환자에 사용될 때, 이러한 용도로 사용되기에 유효한 양은 질병, 질환 또는 병상의 진행 정도와 심각성, 치료 경험 유무, 환자의 건강 상태와 약물에 대한 반응, 그리고 치료하는 의사의 판단에 따라서 달라질 것이다.
- <43> 환자의 병상이 호전되지 않을 경우, 의사의 재량에 따라서, 본 발명의 화합물이 장기 투여될 수도 있는데, 예를 들어, 환자의 질병 또는 병상에 따른 증상을 완화, 제어 또는 제한하기 위해 환자의 일생 중 오랜 기간 동안 투여될 수 있다. 환자의 상태가 호전될 경우, 의사의 재량에 따라서, 본 발명의 화합물은 연속적으로 투여될 수 있거나, 또는 임의의 기간 (즉, "약물 휴약기") 동안 일시적으로 투여가 중단될 수도 있다. 일단 환자의 병상이 호전되면, 필요에 따라서 유지 용량(maintenance dose)만큼 투여된다. 결과적으로, 투여량 또는 투여 횟수, 아니면 이 둘 다는 증상에 따라서 질병, 질환 또는 병상이 호전된 상태로 유지되는 수준까지 감소시킬 수 있는 것이다. 그러나, 환자는 증상이 재발하면 오랜 기간 동안 간헐적으로 처치를 요구할 수 있다.
- <44> 이와 같은 양에 해당하는 제제의 소정량은, 특정 화합물, 질병, 병상 및 이의 심각성, 치료가 필요한 개체 또는 숙주의 동일성(예를 들어, 체중)과 같은 요인에 따라서 달라질 것이지만, 예를 들어, 투여될 특정 제제, 투여 경로, 치료될 병상 및 치료될 개체 또는 숙주와 같이 구체적인 주위 환경에 따라서 당 업계에 공지된 방식에 따라 통상적으로 결정될 수 있다. 그러나, 일반적으로는 성인 치료에 적용되는 투여량은 통상적으로 하루에 0.02~5000 mg, 바람직하게는 하루에 1~1500 mg이 될 것이다. 목적 투여량은 단일 투여량으로서 제공될 수 있거나 또는 동시 투여될 투여량을 분할하여 제공하거나(또는 짧은 기간에 걸쳐 제공되거나) 또는 간격을 적당히 두고(예를 들어, 하루에 2회, 3회 또는 4회 이상) 제공될 수 있다.
- <45> 임의의 경우, 본원에 기술된 화합물(또는 약학적으로 허용 가능한 염, 에스테르, 아미드, 전구 약물 또는 용매 화합물) 중 하나 이상을 다른 치료제와 함께 투여하는 것이 적당할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 화합물 중 하나를 투여받은 환자가 부작용(예를 들어, 염증)을 겪게 된다면, 초기 치료제와 소염제를 함께 투여하는 것이 적당할 수 있다. 또는, 예를 들어, 본원에 기술된 화합물 중 하나의 치료 효능은 애쉴반트를 투여하였을 때 강화될 수 있다[즉, 상기 애쉴반트는 최소한의 치료 효과를 가질 수 있지만, 다른 치료제와 함께 환자에게 투여되면, 전체적인 치료 효과는 강화됨]. 또는, 예를 들어, 환자가 겪는 효능은 본원에 기술된 화합물 중 하나와, 역시 치료 효과를 나타내는 다른 치료제(치료 방식도 포함)를 함께 투여할 경우 상승할 수 있다.
- <46> 수행 가능한 병행 요법의 구체적이되, 비 제한적인 예로서는, 산화 질소(NO) 유도제, 스타틴, 음 하전 인지질,

산화 방지제, 무기물, 소염제, 혈관 신생 억제제, 기질 메탈로프로티나제 억제제 및 카로티노이드와 함께, 사용하는 방법을 포함한다. 몇몇 경우에 있어서, 적당한 병용 제제는 다수의 부류에 해당하는 것일 수 있다[예를 들어, 산화 방지제인 루테인과 카로티노이드].

- <47> 본 명세서에서 언급한 TGF-beta 1은 대사증후군 및 심장혈관질환의 치료 및 보조적 의학치료 모두에 유용하다. 상기 반응 인자는 예를 들면, 동맥경화증, 당뇨병, stroke, 협심증, 심근경색, 관상동맥 질환을 포함하는 관상동맥 질환의 우선적 치료에 유용하다. 적절히 사용될 때, 본 명세서에서 기술한 발명은 새로운 손상부위가 전개되거나 이미 생성된 손상부위가 악화되는 것을 방지함으로써 의학적으로 "치료"하는 가능성을 제공한다.
- <48>
- <49> 또한, 본 명세서에서 언급한 TGF-beta 1은 콜라겐과 같은 세포외기질 (Extracellular Matrix; ECM)의 발현을 조절하여 상처를 치유하고, 퇴행성 관절염, 피부 노화 및 주름을 예방 및 제거할 수 있다.
- <50> 또다른 일례로서, 본 명세서에서 언급한 TGF-beta 1은 PPAR delta에 의해 매개되는 염증성 피부 질환, 특히 PPAR delta에 의해 매개되는 사람의 내피 질병, 예컨대 다발성 경화증 이외에 평활근 세포의 증식성 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는 질병의 치료에도 사용될 수 있다.
- <51> 또다른 일례에서, 상기 반응인자는 단핵 백혈구가 매개하는 항염증 반응을 치료하기 위하여 선택될 수도 있다.
- <52> 심장혈관의 치료에 있어서, 관상동맥이나 다른 동맥의 혈관형성술 대신에 또는 순차적으로 살포 풍선 카테터를 사용하여 혈관벽에 상기 반응 인자를 직접 투여할 수 있다. 예로서, 상기 반응인자를 포함하는 생리적으로 허용가능한 용액을 2-5ml을 1-5 대기압하에 투여할 수도 있다.
- <53> 상기 반응 인자의 상대적으로 단시간 치료는 혈관형성술이나 외과적 수술로 치료할 수 없는 관상동맥 질환손상의 "수축"을 일으키는데 사용된다. 단기간 치료의 비제한적인 예로는 2-6개월 동안 체중 범위의 투여량을 매일 3회 내지 2일에 1회 간격으로 투여할 수 있다.
- <54> 장기간 치료는 위험이 높은 환자에 있어서 진전된 손상의 전개를 방지하기 위하여 사용된다. 장기간 치료는 체중 범위의 투여량을 매일 3회 내지 2일에 1회 간격으로 투여할 수 있다.
- <55> 아스피린과 같은 혈소판 응집 저해제, 쿠마린과 같은 항혈전증제; 베라파밀, 딜티아젠 및 니페디핀과 같은 칼슘 채널 차단제; 갑토프릴 및 엔알로프릴과 같은 엔지오텐신 전환효소(ACE); 및 프로판알올, 테르부탈올 및 라베탈올과 같은 베타-차단제를 포함하는 심장 혈관 질환의 치료에 사용되는 다른 약물과 함께 상기 반응 인자를 투여할 수도 있다. 또한, 상기 반응인자를 이부프로펜, 인도메타신, 페노프로펜, 메펜아민산, 플루펜아민산, 설리다크와 같은 비스테로이성 항염증제와 함께 투여할 수도 있다. 상기 반응인자를 또한 코리트코스테로이드와 함께 투여할 수도 있다.
- <56> 염증성 피부 질환의 치료를 위한 국소 적용을 위해서, 부착된 자리에서 충분한 치료적 효과가 나타나기에 충분한 양으로 피부에 의해 흡수되도록 반응인자를 제제화하여야 한다. 일반적으로 치료지수(EC₅₀/IC₅₀)가 최소 2이상인 것이 바람직하다.
- <57> 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ에 의해 매개되는 심장혈관질환 및 염증성 상태를 포함하여 본 명세서에 기술한 어떠한 질병을 갖는 사람, 말, 고양이, 소 및 다른 동물들, 특히 포유동물에게 유효량의 상기 기술한 반응인자를 약리적으로 허용가능한 담체나 희석제로 하여 투여함으로써 이러한 질병을 치료할 수 있다.
- <58> 즉, 약리적으로 허용가능한 담체 또는 희석제에, 치료대상 환자에게 심각한 독성효과를 나타내지 않으면서 치료적으로 유효한 양을 환자에게 전달하기에 충분한 양으로 반응 인자를 포함한다.
- <59> 일반적으로 경구 조성물은 안정한 희석제 또는 섭취가능한 담체를 포함할 수도 있고, 또한 젤라틴 캡슐에 포함되거나 압축하여 정제로 제조될 수도 있다. 나아가 약리적으로 양립되는 결합제 및/또는 부형제 물질을 포함할 수도 있다.
- <60> 정제, 알약, 캡슐, 트로치 등은 다음의 성분 또는 유사한 성질을 갖는 화합물 중 일종 이상을 포함할 수 있다: 미세결정 셀룰로오스, 젤라킨과 같은 결합제; 녹말 또는 락토오스와 같은 부형제; 알긴산 또는 옥수수 녹말과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 수쿠로스 또는 사카린과 같은 감미제; 또는 향료. 단위 투여량 형태가 캡슐인 경우에는 지방산 오일과 같은 액체 담체를 포함할 수 있다.

- <61> 반응 인자를 몰약, 현탁물, 시럽, 웨이퍼, 츄잉검 등과 같은 성분과 같이 투여할 수 있으며, 작용을 저해하지 않은 다른 활성성분 또는 바람직한 작용을 보충하는 다른 활성성분, 예컨대 항생물질, 항균제, 항염증제, 또는 항바이러스 화합물을 투여할 수 있다. 아스피린과 같은 혈소판 응집 저해제, 쿠마딘과 같은 항혈전증제; 바라파밀, 딜티아젠 및 니페디핀과 같은 칼슘 채널 차단제; 캅토프릴 및 엔알로프릴과 같은 엔지오텐신 전환효소(ACE); 및 프로판알올, 테르부탈올 및 라베탈올과 같은 베타-차단제를 포함하는 심장 혈관 질환의 치료에 사용되는 다른 약물과 함께 상기 반응 인자를 투여할 수도 있다.
- <62> 비경구, 경피, 피하 또는 국소적용 용액 또는 현탁액으로서 멸균 회석제, 항박테리아제, 항산화제, 킬레이트제, 완충액 및 삼투압 조절제를 더 포함할 수 있다.
- <63> 국소 적용에 적합한 운반체나 담체는 알려진 바와 같이, 로션, 현탁액, 연고, 크림, 젤, 팅크(tincture), 스프레이, 분말, 풀, 서방형 경피 패치, 천식을 위한 에어로졸, 및 좌약 형태를 포함한다. 이같은 국소 적용을 위해서는 농주제, 완화제 및 안정화제를 추가로 사용할 수도 있다. 특히 피부표면에 적용하기 위해 고안된 제제의 경우에 안정한 염료 또는 착색제를 포함할 수도 있다.
- <64> 빠른 방출로부터 반응인자를 보호하는 담체, 예컨대 이식체 및 마이크로캡슐화 전달시스템을 포함하는 조절방출 제제와 함께 제조할 수도 있다.

효 과

- <65> 상술한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 퍼옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 활성화시킴으로써 혈관평활근 세포(VSMC)내에서 전한 성장 인자(TGF)- β 1의 발현을 촉진시켜 대사증후군, 혈관성 질환, 상처 치유, 피부 노화 및 주름, 퇴행성 관절염 및 염증성 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <66> 이하, 본원에 기술된 방법을 수행하는데 있어서 성분, 방법 및 절차는 전술한 바와 상응하는 것이다. 이하 절차는 특히 바람직한 구체예와 함께 기술되어 있다. 별도로 기술하지 않은 임의의 방법, 재료, 시약 또는 부형제는 검정 및 스크리닝 분야의 당 업자에게 일반적으로 공지되어 있으며 또한 당업자가 구할 수 있는 것일 것이다.
- <67> <물질 및 실험방법>
- <68> 물질
- <69> GW501516, GW9662, WY-14643, 트로글리타존(troglitazone), 15-디옥시- δ 12,14-프로스타글란딘(prostaglandin) J2, TGF- β 타입 I 수용체 (T β R-I) 억제제 및 IL-1 β 는 Calbiochem (La Jolla, CA) 사로부터 구입하였다. 래트 PPAR delta에 대한 Control scrambled siRNA 및 siRNA는 Ambion (Austin, TX)사로부터 구입하였다.
- <70> SuperFect 형질전환 시약은 Qiagen (Valencia, CA)사로부터 구입하였다. 루시페라제 및 β -갈락토시다제 assay systems은 Promega Co. (Madison, WI)사로부터 구입하였다. 다클론 토끼 항-PPAR α , 항-PPAR delta, 항-PPAR γ , 염소 항-토끼 IgG-HRP 및 염소 항-마우스 IgG-HRP 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. 단클론 마우스 항-TGF-beta 1 항체는 R&D systems (Minneapolis, MN)로부터 구입하였다.
- <71> <세포 배양>
- <72> 래트 대동맥 혈관평활근 세포 (VSMC)를 공지된 방법(23. Chang KC, Paek KS, Kim HJ, Lee YS, Yabe-Nishimura C, Seo HG. Substrate-induced up-regulation of aldose reductase by methylglyoxal, a reactive oxoaldehyde elevated in diabetes. *Mol Pharmacol*. 2002;61:1184-1191)으로 분리하였다.
- <73> <노던 블롯 분석>
- <74> 전체 RNA를 공지된 방법(24. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.)으로 산 구아니듐 티오시아네이트-페놀-클로로포름을 사용하여 추출하였다. 1% 아가로스 겔에서 전기영동에 의해 분획한 전체 RNA (5 μ g)를 32P-라벨한 래트 TGF-beta 1 혹은 MCP-1 cDNA 프로브로 분석하였다. cDNA 프로브를 각각 TGF-beta 1 및 MCP-1의 1039 - 1297 및 61 - 475 뉴클레오티드를 증폭시킨 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 생

성하였다.

<75> <웨스턴 블롯 분석>

<76> 여러 가지 시약을 처리한 VSMC를 얼음-냉각 PBS로 수세하고, 이어서 PRO-PREP 단백질 추출액 (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)내에서 용해시켰다. 세포 용해액을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행하고 Hybond-P+ 폴리비닐리덴 디플로라이드 막 (Amersham Biosciences UK Ltd, UK)상으로 이동하였다. 상기 막을 상술한 공지 방법(Chang KC, et al., 2002)에 의해 특정 항체로 탐침하였다.

<77> <플라스미드 및 핵산치환체의 구축>

<78> 뉴클레오티드 치환체를 프라이머 (TGF-beta 1-DR1_{mt5'}, 5'-CCA CCT TCT GAT ATC AGA TCG CGC CCA TCT-3' 및 5'-AGA TGG GCG CGA TCT GAT ATC AGA AGG TGG-3'; 혹은 TGF-beta 1-DR1_{mt3'}, 5'-CCA CCT TCT GGT ACC ATA TGG CGC CCA TCT-3' 및 5'-AGA TGG GCG CCA TAT GGT ACC AGA AGG TGG-3')와 QuikChange 핵산치환체 키트 (Stratagene, CA)를 사용하여 TGFβ1 프로모터내 DR1 자리의 핵산을 치환하였다.

<79> <EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay)>

<80> Wild-타입 혹은 치환된 DR1 컨센서스 서열 (5'-CCACCTTCTGGTACCAGATCGCGCCCATCT-3', 5'-CCACCTTCTGATATCAGATCGCGCCCATCT-3', 5'-CCACCTTCTGGTACCATATGGCGCCCATCT-3', 혹은 5'-CCACCTTCTGATATCATATGGCGCCCATCT-3')를 포함하는 올리고뉴클레오타이드로 EMSA를 상술한 공지(25) 방법에 따라 수행하였다. 인간 PPAR delta 및/또는 인간 RXR α 단백질을 TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, WI)을 사용하여 시험관내(*in vitro*)에서 합성하였다.

<81> (Reporter gene 에세이)

<82> 인간 MCP-1 루시퍼라제 reporter 벡터를 Dr Alfredo Garzino-Demo (Institute of Human Virology, University of Maryland Biotechnology Institute, MD)로부터 제공받았다. VSMC를 6-웰 조직 배양 플레이트에 시드하고 SuperFect 제제 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 각 발현 벡터를 형질전환한 다음 루시퍼라제 활성을 상술한 공지(25)방법에 의해 측정하였다.

<83> (siRNA을 이용한 유전자 발현억제)

<84> VSMC를 형질전환하기에 앞서 100mm 배양 접시내에서 18-24시간동안 배양한후, 80 nM 대조 siRNA 혹은 래트 PPAR delta siRNA (Ambion, Austin, TX)로 형질전환시켰다. 유전자 발현억제의 효과를 웨스턴 블롯 분석과 reporter 유전자 검정으로 검정하였다.

<85> <크로마틴 면역침강 (ChIP) 검정>

<86> 핵 단백질을 1% 포름알데히드로 게놈 DNA와 결합시키고 항-PPAR delta 항체로 침전시켰다. TGF-beta 1 프로모터로부터 추정 PPAR delta 결합 자리 (DR1) 및 멀리 떨어진 영역 (각각 -402/-114 및 -627/-468)을 포함하는 래트 게놈 서열은 다음 프라이머: oligo#1 세트 (AAAGACTTCACCCAAAGCTG and AGGTAGGTGATAGTCCTGAAC) 및 oligos#2 세트 (GACGAGCTGGTGGGAGAAGA and GTAGCAATCGAGTGTCCACGA)를 사용하여 증폭시켰다.

<87> <통계학적 분석>

<88> 통계학적 분석을 위하여 Student *t*-테스트 혹은 Dunnet 테스트를 사용하였다.

<89> <결과>

<90> 첫째, PPAR delta 리간드는 VSMC내에서 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질 발현을 유도한다.

<91> VSMC를 PPAR delta의 특정 리간드인, GW501516로 처리하면 TGF-beta 1 전사체 및 단백질 레벨에서 증가를 나타내었고, 농도 및 시간 의존적인 것을 입증하였다 (도 1 참조).

<92> 50 nM GW501516의 존재하에, TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 증가된 레벨은 12h에서 검출되었으며, 38h에서 최대치에 도달하였다.

<93> 둘째, PPAR α 혹은 PPAR γ 가 아니라, PPAR delta의 활성화가 VSMC내에서 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질 발현을 유도한다.

<94> PPAR isoform이 TGF-beta 1의 유도에 포함되는지를 확인하기 위하여, VSMC를 PPAR α, PPAR γ 및 PPAR delta용

특정 리간드로 처리하고 그 결과를 도 2에 도시하였다.

- <95> VSMC는 본질적으로 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질이 조금은 발현되고 있었으며, 이들 발현레벨은 이후 PPAR delta를 활성화함으로써 증가됨을 알 수 있었다. 그러나, TGF-beta 1 발현이 PPAR α 혹은 PPAR γ 의 활성화엔 별 차이가 없었으며, 이는 PPAR delta isoform만이 TGF-beta 1를 강하게 조절한다는 것을 제시한다.
- <96> 셋째, siRNA 혹은 or PPAR delta의 억제제는 GW501516에 의해 유도되는 TGF-beta 1 발현유도를 억제한다.
- <97> GW501516에 의해 유도된 TGF-beta 1의 발현유도에 대해 PPAR delta가 어떠한 역할을 수행하는지를 조사하기 위하여, VSMC를 PPAR delta siRNA로 형질전환하였다. PPAR delta siRNA의 존재하에, PPAR delta의 레벨은 현저히 감소된 반면, 비특이 대조 siRNA로 형질전환한 군에서는 어떠한 영향도 받지 않았다(도 3a 참조). 상기 siRNA 처리에 의한 PPAR delta의 발현 억제는 PPAR delta 리간드에 의한 TGF-beta 1의 증가된 발현을 상쇄시켰다(도 3b 참조). 이어서, PPAR delta의 비가역 억제제인 GW9662의 효과를 측정한 결과, PPAR delta에 의해 유도된 TGF-beta 1의 발현상승에서 현저한 감소를 관찰하였다(도 3b 참조). 이들 데이터는 TGF-beta 1 발현이 PPAR delta-의존적으로 조절된다는 것을 입증한다.
- <98> 넷째, PPAR delta 활성화는 전사 레벨에서 TGF-beta 1 발현을 유도한다.
- <99> PPAR delta 활성이 VSMC내에서 TGF-beta 1 프로모터 활성화에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여, 형질전환 검정을 TGF-beta 1 프로모터에서 유래된 루시페라제 reporter를 사용하여 수행하였다. GW501516에 의해 유도된 PPAR delta의 활성화는 TGF-beta 1 프로모터 활성을 현저하게 증가시켰으나, PPAR delta 단백질 발현에는 어떠한 영향도 미치지 않았다. 대조적으로, 다른 PPAR 리간드는 프로모터 활성화에 있어 거의 혹은 전혀 영향을 미치지 못하였다(도 4a 참조). TGF-beta 1의 발현에 PPAR delta가 관여한다는 것을 확인하기 위하여, TGF-beta 1 reporter 유전자를 PPAR delta 발현 벡터 (pSG5-PPAR delta) 혹은 PPAR delta이 없는 벡터 (pSG5)와 동시에 형질전환하였다. 형질전환체를 GW501516 혹은 비히클(DMSO)로 처리하였다. TGF-beta 1 프로모터 활성화에 있어서의 증가는 PPAR delta을 동시에 형질전환한 실험군에서 관찰되었으며, 발현은 GW501516의 존재하에 증가되었다(도 4b 참조). GW501516의 존재하에, TGF-beta 1 프로모터 활성이 현저하게 증가됨이 관찰되었으며, 이는 내인성 PPAR delta만으로도 TGF-beta 1 프로모터 활성을 충분히 이끌어낸다는 것을 확인시키는 것이다. PPAR delta에 의해 유도된 TGF-beta 1의 발현조절에 반응하는 프로모터 영역을 확인하기 위하여, TGF-beta 1 프로모터에서 유래된 순차적으로 끝이 잘린 프로모터를 사용하여 reporter 검정을 수행하였다. PPAR delta에 대한 반응은 완전하게 -323 및 -175사이에서 위치한 서열의 결손시 무력화되었으며, 이는 PPAR delta에 반응하는 부위가 TGF-beta 1 유전자상의 -0.32 및 -0.17 kb 사이에 위치한다는 것을 의미한다(도 4c 참조).
- <100> 다섯째, PPAR delta는 TGF-beta 1 유전자 프로모터내의 PPRE에 결합한다.
- <101> PPAR delta가 TGF-beta 1 프로모터내의 PPRE에 직접 결합하는지 여부를 확인하기 위하여, -0.32 내지 -0.17 kb사이 영역내 데이터베이스를 사용하여 PPRE 동족체 서열을 조사하였다. 상기 영역의 근접 조사 결과 추정 PPRE의 존재는 현존하는 PPREs와 고도의 상동성을 갖는다는 것을 확인하였다(도 5a 참조). 상기 추정 PPRE 자리는 TGF-beta 1 프로모터의 -224 to -212 위치에서 DR1 서열을 포함하고 있는것을 확인하였다. 상기 PPRE가 PPAR delta에 의한 전사활성을 매개하는지를 확인하기 위하여, 1.36kb TGF-beta 1 프로모터내로 핵산치환 돌연변이를 도입하였다. Wild 타입 TGF-beta 1-DR1 자리 존재하에, GW501516에 의해 매개된 PPAR delta 활성화는 루시페라제 활성을 4배 증가시켰다. 이 효과는 PPAR delta siRNA 혹은 PPAR delta의 억제제인 GW9662의 존재하에 감소되었다. 나아가, TGF-beta 1-DR1 부위의 5' 혹은 3' 모티프의 핵산치환은 PPAR delta 리간드에 의한 프로모터의 활성을 억제하는 결과를 낳았다(도 5b 참조). 이같은 결과는 TGF-beta 1 프로모터가 PPAR delta에 의해 조절되며 이는 GF- β 1-DR1 부위를 매개로 하여 매개된다는 것을 명백히 입증하는 것이다.
- <102> PPAR delta가 TGF-beta 1-DR1 부위와 직접 결합하는지 여부를 확인하기 위하여, 시험관내(in vitro) 합성된 PPAR delta 및 RXR α 단백질을 사용하여 전기영동 이동성 변위 검정(EMSA)을 수행하고 그 결과를 도 6에 도시하였다(도 6 참조). 예상된 바와 같이, RXR α 혹은 PPAR delta 단독으로는 wild-타입 혹은 핵산치환된 TGF-beta 1-DR1 자리에 직접 결합하지 않았다(도 6a 참조). 그러나, PPAR delta 및 RXR α 의 존재하에서는(lane 4) TGF-beta 1-DR1 자리에 결합된다는 것을 관찰할 수 있었다. 상기 결합된 복합체는 항-PPAR delta 항체(lane 5) 존재시 supershift되었고, 어떠한 단백질-DNA 복합체도 핵산치환된 TGF-beta 1-DR1mt5, TGF-beta 1-DR1mt3혹은 TGF-beta 1-DR1mt53 프로브 존재하에서는 관찰되지 않았다. 라벨되지 않는 Wild-타입 TGF-beta 1-DR1 (DR1wt), TGF-beta 1-DR1mt5(DR1mt5), TGF-beta 1-DR1mt3(DR1mt3) 혹은 TGF-beta 1-DR1mt53(DR1mt53) 등의 올리고뉴클레오타이드를 (10-, 50- 및 100-배 과량) 첨가하면, TGF-beta 1-DR1wt 올리고에 대한 PPAR delta

결합이 TGF-beta 1-DR1wt 자리와 강하게 경쟁하는 것을 관찰하였다. 반면 핵산치환된 TGF-beta 1-DR1 올리고뉴클레오타이드는 PPAR delta 및 DR1 사이 결합에 어떠한 영향도 미치지 않았다(도 6b 참조). 이들 데이터는 DR1 PPRE 자리에 결합한 PPAR delta-RXR α heterodimer 결합이 TGF-beta 1 유전자의 -224 내지 -212 포지션에 위치하고 있음을 나타내었다.

<103> **여섯째, GW501516 처리는 TGF-beta 1 프로모터 영역으로 PPAR delta를 끌어들인다.**

<104> PPAR delta가 TGF-beta 1 프로모터와 직접 상호작용하는지 그리고 그 결합이 TGF-beta 1의 전사유도와 관련있는지를 확인하기 위하여, 크로마틴 면역침강(ChIP) 검정을 수행하고 그 결과를 도 7에 도시하였다.

<105> VSMC를 GW501516의 존재 혹은 비존재하에서 0, 4, 8, 18, 38 h동안 처리하고, 크로마틴 분획을 항-PPAR delta 항체를 사용하여 면역침강시켰다. 면역침강체내에 포함된 게놈성 DNA를 추정 TGF-beta 1 PPRE 자리를 포함하는 프로모터 영역에 상응하는, 프라이머 셋트 올리고#1을 사용하여 PCR 증폭시켰다 (도 7내 도식 대표도 참고). GW501516로 처리된 세포에서, PPAR delta가 PCR-증폭 영역에 존재함을 확인하였고, GW501516 미처리 세포에서는 PPAR delta의 존재가 검출되지 않았다. 더욱이, PPAR delta가 결합하는 부위와 상관이 없는 영역의 프라이머(올리고#2)를 사용하여 동일한 크로마틴 제조물에서 수행한 PCR 증폭에서는 PPAR delta의 존재가 검출되지 않았다. 이들 결과는 EMSA에 의해 얻어진 발견과 일치되는 것으로, 이는 PPAR delta가 TGF-beta 1 프로모터내에서 동정확인된 PPRE에 결합한다는 것을 나타내었다.

<106> **일곱째, PPAR delta의 활성화는 TGF-beta 1를 매개로 하여 사이토카인에 의해 유도된 MCP-1의 발현을 억제한다.**

<107> IL-1β은 VSMC에서 MCP-1의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다(28. Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T, Frederick JP, Wang XF, Sukhatme VP, Jain MK. transforming growth factor-beta1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.* 2004;279:16388-16393., 29. Miyoshi T, Tian J, Matsumoto AH, Shi W. Differential response of vascular smooth muscle cells to oxidized LDL in mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Atherosclerosis.* 2006;189:99-105.). 리간드에 의해 활성화된 PPAR delta가 VSMC에서 MCP-1 mRNA의 유도성 발현에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. 자극받지 않은 세포내에서, MCP-1 mRNA은 낮은 레벨로 발현되었으나, IL-1β에 의한 유도로 발현이 현저하게 증가하였다 (도 8 참조). GW501516의 전처리는 이들 유도를 현저하게 감소시켰지만 PPAR delta siRNA는 거의 완전하게 GW501516의 억제 효과를 무력화시켰다(도 8a 참조).

<108> 대식세포내에서, PPAR delta은 전사 억제인자인 BCL-6과의 접촉 및 탈착을 매개로 하여 염증 상태를 제어하는 것으로 보고되고 있다(Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science.* 2003;302:453-457.). 따라서, VSMC에서, PPAR delta에 의해 유도된 TGF-beta 1이 BCL-6과 유사하게 항염증 역할을 수행할 수 있을 것이라는 가설을 세웠다. 실제로, 항-TGF-beta 1 항체 혹은 TβR-1 억제제의 첨가는 MCP-1 mRNA 발현에 있어서의 PPAR delta의 효과를 현저하게 감소시켰다(도 8b, 하부 패널 참조).

<109> IL-1β에 의한 MCP-1의 유도는 전사 단계에서 주로 일어나는 것으로 알려져있다(28. Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T, Frederick JP, Wang XF, Sukhatme VP, Jain MK. transforming growth factor-beta1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.* 2004;279:16388-16393., 29. Miyoshi T, Tian J, Matsumoto AH, Shi W. Differential response of vascular smooth muscle cells to oxidized LDL in mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Atherosclerosis.* 2006;189:99-105.). 이 같은 발견과 일치하는 결과로서, MCP-1 프로모터를 사용한 일시적인 형질전환 검정 결과는 세포가 GW501516로 전처리시 IL-1β에 의해 유도된 MCP-1프로모터 활성이 현저하게 감소되는데 반해 PPAR delta siRNA, 항TGF-beta 1 항체 혹은 TβR-1 억제제의 존재하에서는 MCP-1프로모터 활성의 현저한 감소가 억제됨을 확인할 수 있었다 (도 8a, b 참조). 이같은 발견은 VSMC내에서, PPAR delta가 TGF-beta 1을 을 경유하여 전사 레벨에서 MCP-1 발현을 조절하는 것을 제시하는 것이다.

<110> **<결과>**

<111> 핵 수용체 PPAR delta의 활성화는 수많은 유전자의 발현을 조절하고 이들은 다른 병태생리학적 상태하에서 폭 넓은 반응을 이끌어내는 것으로 보고되고 있다(30. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S,

Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Activation of PPAR receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuations metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15924-15929., 33. Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Genetic- or transforming growth factor-beta 1-induced changes in epidermal PPAR beta/delta expression dictate wound repair kinetics. *J Biol Chem*. 2005;280:18163-18170.).

<112> 많은 인자들이 PPAR delta의 생리활성에 관여된다고 하여도, PPAR delta가 규제하는 실질적인 표적 유전자는 거의 알려져 있지 않다. 그러나, 본 발명에서는 특정 리간드 GW501516에 의한 PPAR delta활성이 VSMC내에서 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 발현을 유도한다는 것을 입증하였다. 형질전환 실험결과, TGF-beta 1 발현은 전사 레벨에서 PPAR delta에 의해 규제되었다. TGF-beta 1 프로모터 영역내에 위치한 DR1 부위의 핵산치환은 PPAR delta에 의한 유도된 TGF-beta 1의 전사 유도를 무효화하였으며, 이는 이들 부위가 새로운 PPRE 타입임을 나타내었다. 나아가, PPAR delta의 활성화는 VSMC내에서 IL-1 β 에 의해 유도된 MCP-1의 발현을 감소시켰고 이 반응은 TGF-beta 1를 매개로 하여 일어나고 있었다.

<113> PPAR α 혹은 γ 가 아니라 PPAR delta의 활성화가 VSMC내에서 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질의 발현을 강하게 유도하였다. 이같은 발현유도는 TGF-beta 1 유전자 영역내에 위치한 PPRE에 PPAR delta-RXR α 가 결합함으로써 전사 레벨에서 조절되었다.

<114> 본 발명에서 확인된 PPRE는 시토신에 의해 분리된 일반적인 DR1 모티프를 포함한다. PPAR isoform중 PPAR delta만이 VSMC내 특정 리간드를 사용하여 TGF-beta 1 발현을 규제하였다. 따라서, 각각의 핵 수용체의 활성화는 특정 표적 분자의 발현을 조절함으로써 특징지어질 수 있다는 것이 가능하다.

<115> 인간 TGF-beta 1 유전자는 다수의 전사 개시 자리를 갖으며 전형적으로 TATA 혹은 CAAT boxe를 포함하지 않는다(Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem*. 1989;264:402-408.). 대신 인간 TGF-beta 1 유전자 프로모터는 11개의 다이렉트 CCGCCC 반복체를 갖는 GC가 풍부한 영역을 포함한다(Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem*. 1989;264:402-408). 다수의 연구결과, TGF-beta 1 유전자의 5' 영역내에 위치한 AP-1 자리가 종양 괴사 인자- α , 인터루킨 (IL)-1 β 및 IL-13과 같은 내인성 사이토카인에 의해 규제된 발현에 중요한 역할을 수행한다는 것이 알려져있다(36. Warshamana GS, Corti M, Brody AR. TNF-alpha, PDGF, and TGF-beta(1) expression by primary mouse bronchiolar-alveolar epithelial and mesenchymal cells: TNF-alpha induces TGF-beta(1). *Exp Mol Pathol*. 2001;71:13-33., 38. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliensky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta (1). *J Exp Med*. 2001;194:809-821.). 더욱이, AP-1 자리를 매개로 한 TGF-beta 1 유전자의 자가유도가 보고되었으며(39. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol*. 1990;10:1492-1497.), 상기 AP-1 자리는 TGF-beta 1 유전자의 전사 규제에 있어서 가장 중요한 역할을 수행하고 있는 인자인 것으로 입증되고 있다(40. Dhandapani KM, Khan MM, Wade FM, Wakade C, Mahesh VB, Brann DW. Induction of transforming growth factor-beta1 by basic fibroblast growth factor in rat C6 glioma cells and astrocytes is mediated by MEK/ERK signaling and AP-1 activation. *J Neurosci Res*. 2007;85:1033-1045.).

<116> 본 발명에서는 TGF-beta 1 유전자의 프로모터 영역내의 cis-인자로서 DR1을 확인하였으며 PPAR delta에 의해 유도된 TGF-beta 1의 발현증가가 DR1과 관련되어 있음을 확인하였다. 특히 흥미로운 점은 PPAR delta에 의해 유도된 TGF-beta 1 발현증가가 VSMC내의 염증조절에 관여할 가능성이 있다는데 있다. GW501516에 의한 PPAR delta의 활성화는 IL-1 β 에 의해 유도된 MCP-1의 발현을 현저하게 억제하였다. 더욱이, PPAR delta siRNA의 첨가는 이 같은 MCP-1의 발현억제 거의 완전하게 무력화하였다. 또한, 항-TGF-beta 1 항체 및 T β R-I 억제제는 PPAR delta의 작용을 억제하고 있는데, 이는 MCP-1 발현에 있어서의 PPAR delta의 효과는 TGF-beta 1-의존적임을 나타내는 것이다. TGF-beta 1은 또한 Smad3-에 의존적으로 대식세포의 활성화, 사이토카인에 의한 MMP(matrix metalloproteinase)-12, 유도성 질산 산화물 합성효소 (iNOS) 및 MCP-1의 발현유도를 억제하는 것으로 보고되고 있다(10. Feinberg MW, Shimizu K, Lebedeva M, Haspel R, Takayama K, Chen Z, Frederick JP, Wang XF, Simon DI, Libby P, Mitchell RN, Jain MK. Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. *Circ Res*. 2004;94:601-608., 28. Feinberg MW, Watanabe M,

Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T, Frederick JP, Wang XF, Sukhatme VP, Jain MK. transforming growth factor-beta1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.* 2004;279:16388-16393., 41. Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P, Chin MT, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.* 2000;275:36653-36658.).

- <117> 이와는 대조적으로, PPAR delta가 항염증성 인자인 BCL-6와 물리적으로 접착 혹은 탈착하여 혈관내에서 MCP-1, -3 및 IL-1 β 레벨을 규제한다는 보고이외에, PPAR delta의 항염증 활성화에 대한 역할은 거의 알려진 바가 없다(20. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science.* 2003;302:453-457).

산업이용 가능성

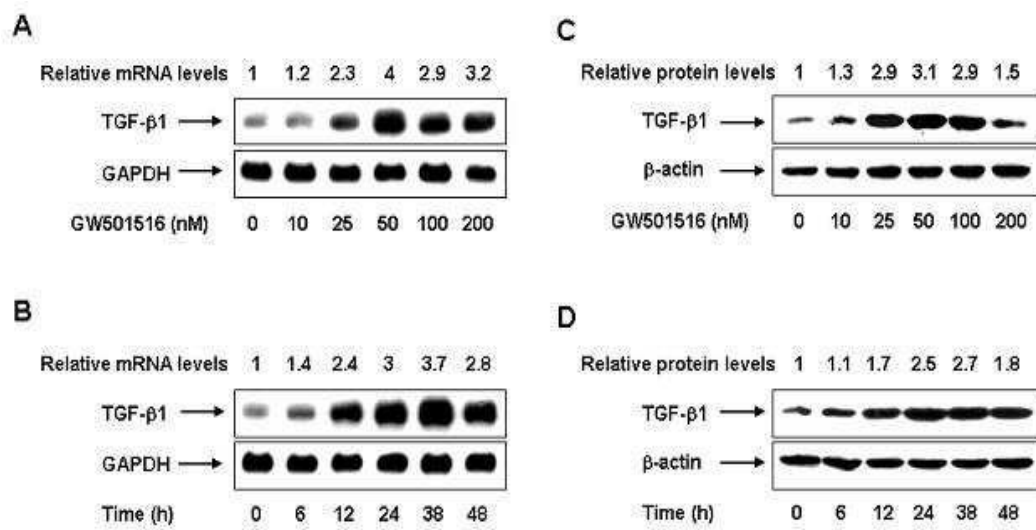
- <118> 본 발명의 결과는 MCP-1과 같은 염증성 사이토카인의 발현 조절을 통하여 동맥경화증등과 같은 염증이 관여하는 혈관성 질환의 치료에 적용이 가능함을 제시한다. 뿐만 아니라 다양한 병태생리하에서, PPAR delta가 혈관계의 항염증 조절자로서 중요한 역할을 수행할 수 있다는 것을 함께 제시한다.

도면의 간단한 설명

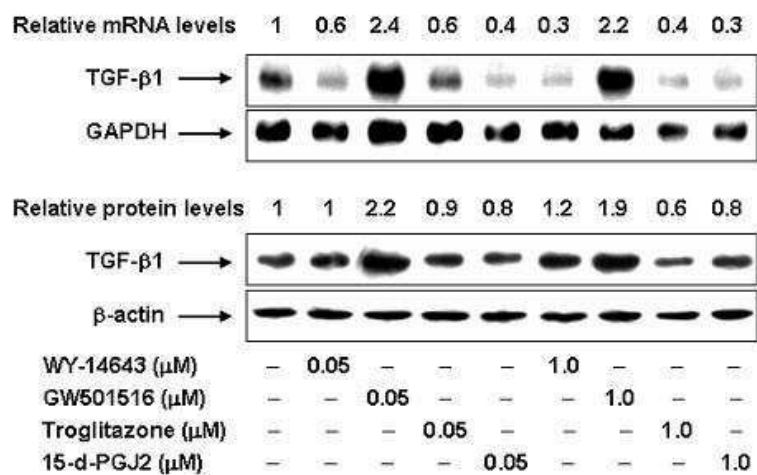
- <119> 도 1은 PPAR delta 리간드는 VSMC내에서 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질 발현을 유도하는 것을 입증하는 도면이다.
- <120> 도 2는 PPAR α 혹은 PPAR γ 가 아니라, PPAR delta의 활성화가 VSMC내에서 TGF-beta 1 mRNA 및 단백질 발현을 유도하는 것을 입증하는 도면이다.
- <121> 도 3은 PPAR delta siRNA 혹은 PPAR delta의 억제제는 GW501516에 의해 유도되는 TGF-beta 1 발현유도를 억제하는 것을 입증하는 도면이다.
- <122> 도 4는 PPAR delta 활성화는 전사 레벨에서 TGF-beta 1 발현을 유도하는 것을 입증하는 도면이다.
- <123> 도 5는 PPAR delta의 활성화는 DR1 서열을 경유하여 TGF-beta 1 유전자 프로모터의 활성을 증가시키는 것을 입증하는 도면이다.
- <124> 도 6은 PPAR delta-RXR α heterodimer가 TGF-beta 1 유전자 프로모터의 DR1 자리에 결합하는 것을 입증하는 도면이다.
- <125> 도 7은 GW501516을 처리하여 PPAR delta을 활성화시키면 TGF-beta 1 유전자 프로모터의 DR1 자리에 PPAR delta가 물리적으로 접촉하여 TGF-beta 1의 전사를 촉진시키는 것을 입증하는 도면이다.
- <126> 도 8은 PPAR delta의 활성화가 TGF-beta 1를 매개로 하여 사이토카인에 의해 유도된 MCP-1의 발현을 억제하는 것을 입증하는 도면이다.

도면

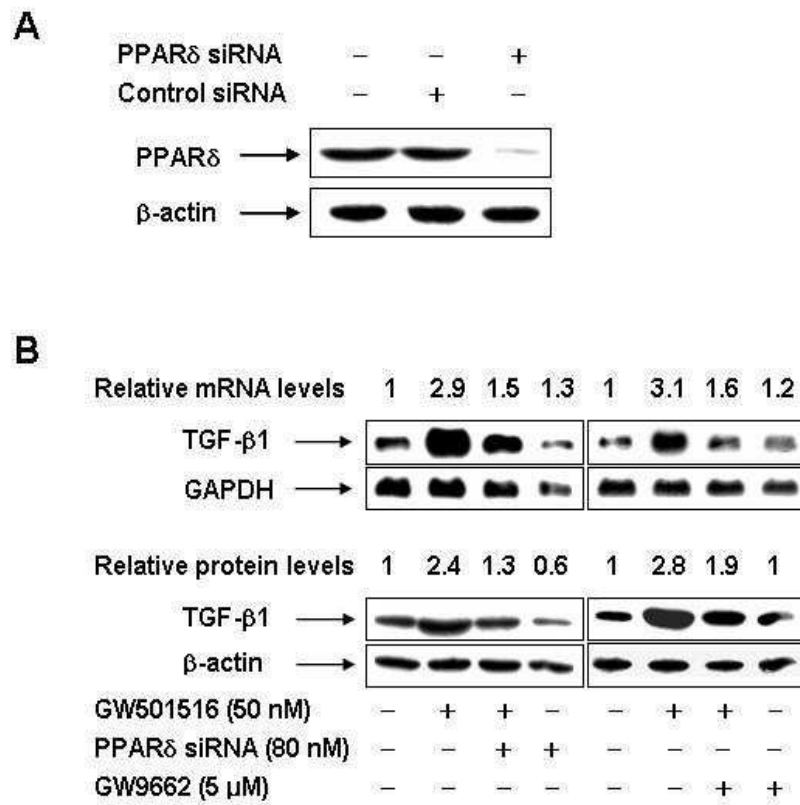
도면1



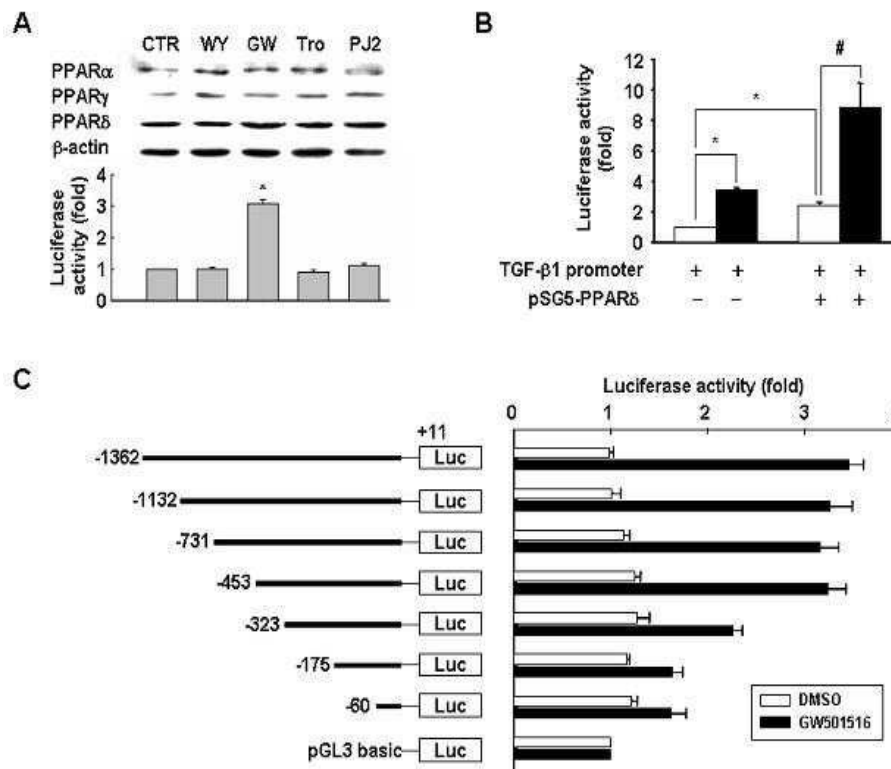
도면2



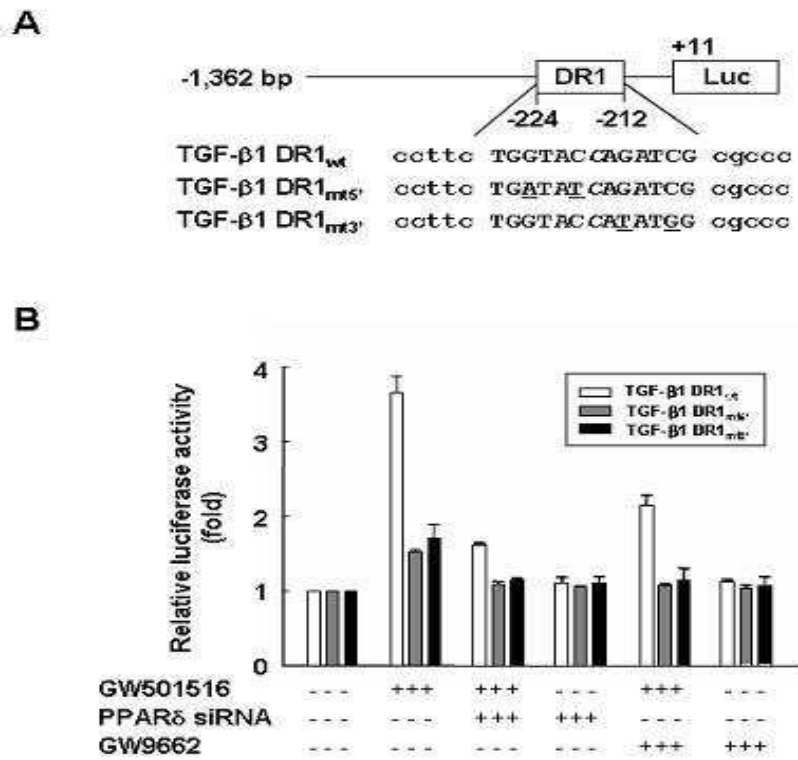
도면3



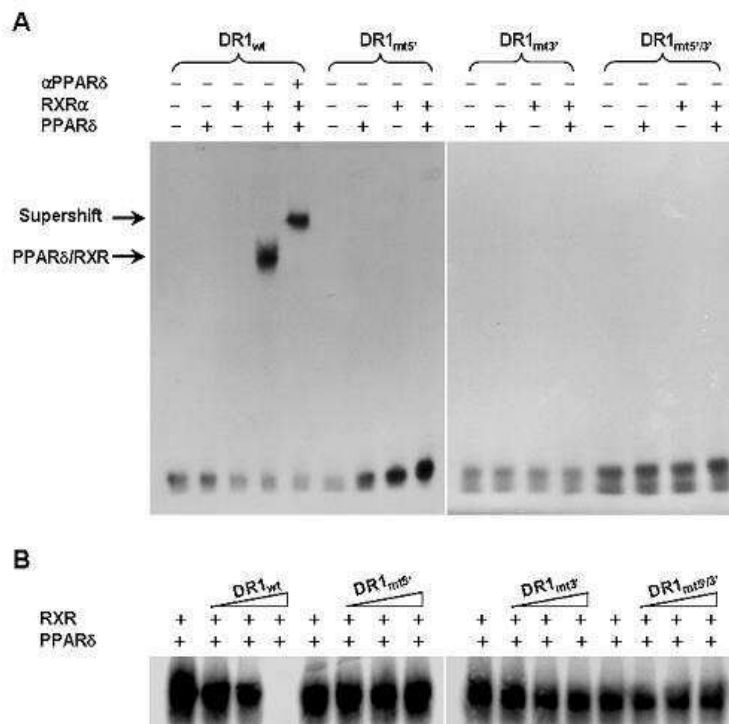
도면4



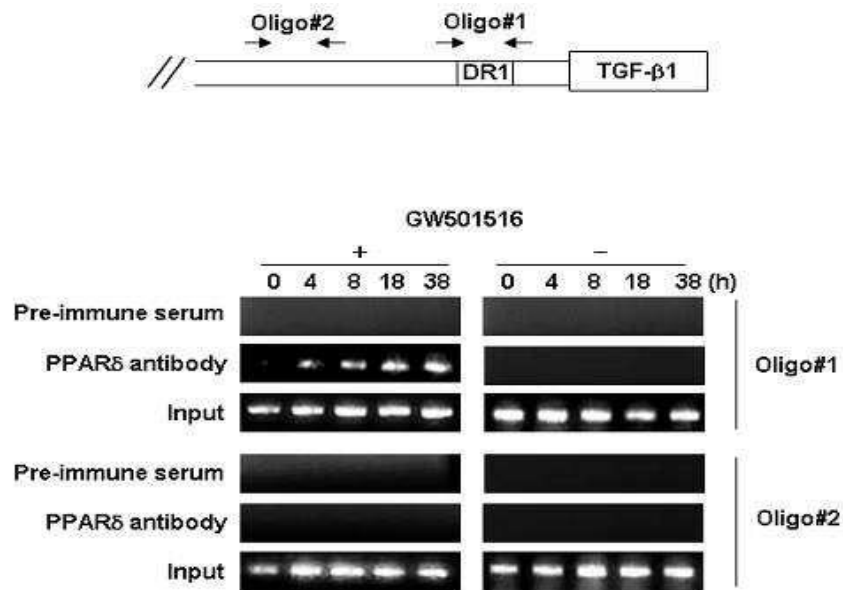
도면5



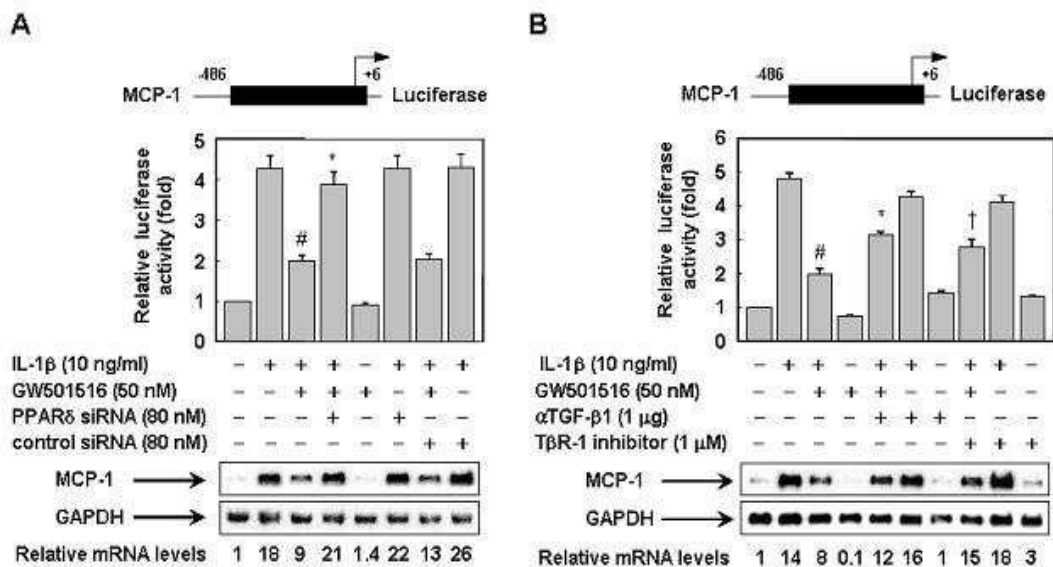
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Ligand, composition for up-regulation of TGF-beta one Expression
and a method for activation the same in VSMC
- <130> DP20070105
- <160> 8

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DR1mt5' consensus primer 1

<400> 1

ccaccttctg atatcagatc gcgcccatct

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DR1mt5' consensus primer 2

<400> 2

agatgggcgc gatctgatat cagaaggtgg

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DR1mt3' consensus primer 1

<400> 3

ccaccttctg gtaccatgatg gcgcccatct

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DR1mt3' consensus primer 2

<400> 4
agatgggcgc catatggtac cagaaggtgg 30

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> one primer of oligo#1 set

<400> 5
aaagacttca ccccaaagct g 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> other primer of oligo#1 set

<400> 6
aggtaggtga tagtcctgaa c 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> one primer of oligo# 2 set

<400> 7
gacgagctgg ttgggagaag a 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> other primer of oligo#2 set

<400> 8
gtagcaatcg agtgtccacg a

21