

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0102833 (43) 공개일자 2012년09월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/426 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(21) 출원번호 10-2011-0017343		(72) 발명자 서한극 경상남도 진주시 신안들말길 47, 주공2차 아파트 204동 706호 (신안동)
(22) 출원일자 2011년02월25일 심사청구일자 2011년02월25일		(74) 대리인 김순용

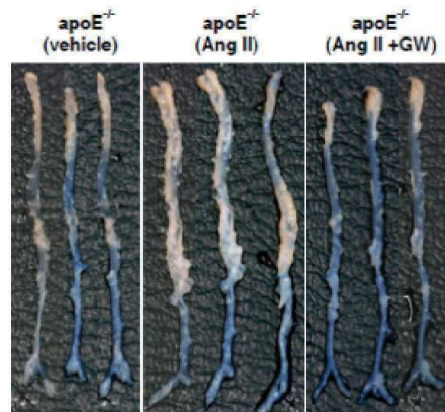
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **퍼옥시즘 증식활성화 수용체 델타에 특이적인 리간드를 포함하는 복부대동맥류의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 퍼옥시즘 증식활성화 수용체 델타에 특이적인 리간드를 포함하는 심혈관계 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 상기 퍼옥시즘 증식활성화 수용체 (PPAR) δ 특이적 리간드는 혈관 평활근 세포 (VSMC) 내에서 퍼옥시즘 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 활성화시켜, 세포외기질의 발현 활성화 및 염증반응을 억제함으로써 복부대동맥류 (Abdominal aortic aneurysm, AAA)를 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-0058052

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초과학연구사업

연구과제명 핵내수용체 PPAR δ 전사표적유전자의 발현제어를 통한 동맥경화성 혈관질환치료를 위한 기반 연구

주관기관 경상대학교

연구기간 2008.05.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

퍼옥시좀 증식활성화 수용체 델타 (PPAR δ)에 특이적인 리간드를 포함하는 복부대동맥류의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리간드는 세포외 기질을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 세포외기질은 콜라겐 타입 , 콜라겐 타입 , 엘라스틴, 피브로넥틴 및 TGF- β 1 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 리간드는 단핵구 주화인자 단백질-1 (Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1), 대식세포 염증 단백질-1 β (Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 β 및 iNOS의 발현을 감소시킴을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 리간드는 기질 금속단백분해효소-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2)의 발현을 억제하고, 금속단백분해효소의 조직 억제자-2 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-2, MMP-2) 및 TIMP-3의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 리간드는 GW501516 (2-[2-methyl-4-([4-methyl-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1,3-thiazol-5-yl]methylsulfanyl]phenoxy]acetic acid)인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 퍼옥시좀 증식활성화 수용체 델타에 특이적인 리간드를 포함하는 복부대동맥류 (AAA)의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 퍼옥시좀 증식활성화 수용체 (PPARs)는 지질 항상성, 물질대사 및 염증 뿐 아니라 세포 분화 및 증식의 제어에 영향을 미치는 핵 내 호르몬 수용체의 일종이다. 이들 수용체는 표적 유전자의 조절부위에 존재하는 특정 인식 서열인 PPAR 반응 부분 (PPAR Response Element; PPRE)을 매개로 하여 레티노이드 X 수용체 (RXR)와 함께 헤테로다이머를 형성함으로써 유전자 발현을 제어한다. PPAR α (NR1C1), PPAR δ (NR1C2), 및 PPAR γ (NR1C3)의 3 가지 서로 다른 이형체 (isoform)가 포유류에서 동정되었고, PPAR α 및 PPAR γ 과는 대조적으로, PPAR δ 의 생리학적 기능은 명확하게 밝혀져 있지 않다.

[0003] PPAR δ 는 VSMCs (vascular smooth muscle cells)를 포함하는 다양한 세포에서 풍부하게 발현되고 있으며, 이러한 혈관 평활근 세포 (VSMC)는 죽상경화 플라그 캡 (plaque caps)의 구조적인 구성인자로서 플라그 (plaque)의 안정성 유지에 중요한 역할을 한다. 세포외기질 (extracellular matrix , ECM)의 항상성 유지는 혈관 평활근 세포의 중요한 기능 중의 하나이고, 정상 혈관에서 세포외기질의 항상성은 기질 금속단백분해효소 (matrix metalloproteinases, MMPs)와 그것의 내인성 억제자인 금속단백분해효소의 조직억제자 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) 사이의 확실하게 조절된 균형을 반영하는 것이다.

- [0004] 한편, 타입 I 및 타입 III 콜라겐은 죽상경화 플라그의 구성요소로서, 플라그에 구조적으로 강함과 탄력성을 제공하고 있다. 따라서 간질 콜라겐의 합성 및 분해의 불균형은 동맥경화 플라그의 파괴를 일으키는 주요 현상이다. 동맥경화 플라그 내에서, 특히 섬유소 캡 (fibros cap)의 rupture-prone shoulder 부위에서, 이러한 균형은 세포외기질의 분해로 기울게 된다. 이유는 섬유소 캡에 축적된 대식세포 (macrophages)와 분화된 혈관 평활근 세포가 MMPs를 포함하는 단백분해효소를 대량으로 분비하기 때문이다.
- [0005] 복부대동맥류 (Abdominal aortic aneurysm, AAA)는 결합조직의 국소적 분해와 혈관 평활근 세포 (VSMCs)의 사멸이 특징적인 염증성 질환이다. 최근에는 AAA의 진행과 관련된 많은 수의 분자와 경로가 밝혀져 오고 있다 (Miller FJ Jr, 2002; Pyo R, 2000; Eliason JL, 2005; Chun HJ, 2008; Thomas M, 2006). 하지만, 혈관의 온전성을 파괴하는 정확한 분자적 기전과 과정들이 명확히 설명되지 않고 있다.
- [0006] 피옥시좀 증식활성화 수용체의 리간드를 통한 심혈관계 치료와 관련하여, Alan Daugherty 등 (Pioglitazone-Induced Reductions in Atherosclerosis Occur via Smooth Muscle Cell-Specific Interaction With PPAA, Circulation Research, 2010; 107:953-958)은 PPAA agonist 가 안지오텐신-II 유도 죽상경화증을 약화시키고, AAA에 대해서는 영향이 없음을 밝히고 있다. 또한, Gillian W. Cockerill 등 (Rosiglitazone Reduces the Development and Rupture of Experimental Aortic Aneurysms, Circulation. 2009;119:3125-3132)은 PPAA agonist의 하나인 Rosiglitazone이 대동맥류의 확장 또는 파열을 감소시킨다는 내용을 개시하였고, Tangirala RK 등 (PPARdelta-mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis, Proc Natl Acad Sci USA, 2008 Mar 18;105(11): 4277-82)은 안지오텐신 II-유도 죽상경화증 모델에서 PPAR δ agonist의 하나인 GW0742의 투여 시 동맥 내 염증 및 죽상관련 유전자 발현의 억제를 통해 안지오텐신-II 유도 죽상경화증을 약화시킨다는 내용을 개시한 바 있다.
- [0007] 하지만, 상기 선행문헌들에는 PPAR δ 리간드의 AAA 치료효과에 대해서는 전혀 개시하고 있지 않는 바, 본 발명의 발명자는 PPAR δ 의 리간드 활성이 apoE-결손 마우스에서 안지오텐신 II (Ang II)-유도 AAA 형성을 직접적으로 억제함을 확인하고 본 발명에 이르렀다.
- [0008] 즉, 본 발명의 발명자들은 PPAR δ 의 특이적 활성인자인 GW501516의 투여가 apoE-결손 마우스에서 AAA의 발생 정도와 심각도 모두를 약화시켰음을 확인하였다. 또한, PPAR δ 의 리간드에 의한 활성은 대식세포의 침윤을 감소시켰는데, 이로 인해 monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 β 및 inducible nitric oxide synthase와 같은 주화성 단백질 (chemotactic proteins)을 현저하게 감소시켰다. 이러한, GW501516의 항-염증 효과는 내측 박리 (medial dissection) 및 대동맥 파열 (aortic rupture)을 유발하는 내측 평활근 소실 및 국소 엘라스틴 (elastin) 파괴 억제를 수반하는 세포사멸 억제와 관련되었고, GW501516의 Ang II-유도 AAA에 대한 개선된 효과는 transforming growth factor- β 1의 상향-조절뿐 아니라, 타입 I 및 III 콜라겐, 파이브로넥틴 (fibronectin) 및 엘라스틴 (elastin)과 같은 ECM 단백질의 발현증가와 관련되었음을 확인하였다. 또한, 리간드에 의해 활성화된 PPAR δ 는 MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)의 발현을 강하게 억제하는 반면, TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)-2 및 3의 발현을 증가시켰다.
- [0009] 결과적으로, 본 발명의 발명자들은 이러한 결과들을 통해 PPAR δ 리간드, 구체적으로 GW501516에 의한 PPAR δ 의 활성화는 ECM 항상성 및 염증반응을 조절함으로써 Ang II-유도 AAA 형성을 약화시킴을 확인하였다. 즉, PPAR δ 의 리간드를 통한 활성은 AAA 치료의 새로운 전략이 될 수 있음을 제공하는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 세포외기질의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 피옥시좀 증식활성화 수용체 델타 (PPAR δ)에 특이적인 리간드를 포함하는 심혈관계 질환, 더 구체적으로는 복부대동맥류 (Abdominal aortic aneurysm, AAA)의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포외기질의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 피옥시좀 증식활성화 수용체 델타 (PPAR δ)에 특이적인 리간드를 포함하는 심혈관계 질환, 더 구체적으로는 복부대동맥류의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다. 상기 리간드는 ECM의 항상성 및 염증반응을 조절함으로써 Ang II-유도 AAA 형성을 억제한다. 사람유래 평활근세포 (VSMC)에서 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 를 경유하여 세포외기질

(extracellular matrix)의 발현을 유도함으로써 세포외기질을 활성화하며, 상기 세포의 기질은 콜라겐 타입 , 콜라겐 타입 , 엘라스틴, 피브로넥틴 또는 TIMP-3 이다. 바람직하게는 상기 PPAR δ 특이적 리간드는 GW501516 (2-[2-methyl-4-([4-methyl-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1,3-thiazol-5-yl)methylsulfanyl]phenoxy]acetic acid)이다.

[0012] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 세포외기질의 발현 활성화에 의하여 MMP-2의 발현을 강하게 억제하는 반면, TIMP-2 및 -3의 발현을 증가시키며, transforming growth factor- β 1의 상향-조절, 타입 I 및 III collagen, fibronectin 및 elastin와 같은 ECM 단백질의 발현증가시킴으로써 심혈관계 질환, 구체적으로는 복부대동맥류를 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 피옥시좀 증식활성화 수용체 델타 (PPAR δ)에 특이적인 리간드를 포함하는 복부대동맥류의 예방 및 치료용 조성물은 세포의 기질을 활성화시키는 것을 특징으로 하며, 상기 세포외기질은 콜라겐 타입 , 콜라겐 타입 , 엘라스틴, 피브로넥틴 및 TGF- β 1 중에서 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 리간드는 단핵구 주화인자 단백질-1 (Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1), 대식세포 염증 단백질-1 β (Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 β 및 iNOS의 발현을 감소시키며, 기질 금속단백분해효소-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2)의 발현을 억제하고, 금속단백분해효소의 조직 억제자-2 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-2, MMP-2) 및 TIMP-3의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명에서 PPAR δ 은 실험동물 모델에서 Ang II-유도 대동맥류 발생을 억제할 수 있는 중요한 타겟이 될 수 있다는 것을 제공한다. 본 발명에서 PPAR δ 리간드는 PPAR δ 의 활성화에 의한 혈장 콜레스테롤의 농도, ECM 단백질 발현 및 염증반응을 조절할 수 있다. 또한, 본 발명의 일시예에서 PPAR δ 하나의 리간드인 GW501516가 Ang II-유도 대식세포 침윤을 억제하고, MCP-1, MIP-1 β 및 iNOS의 발현을 억제한다는 결과는 대동맥류 발생에 관여하는 핵 수용체 신호전달의 중심이 된다는 것을 강력하게 지지하는 것이다. 본 발명의 발명자는 PPAR δ 의 리간드를 통한 활성화가 Ang II가 주입된 apoE-/-mice에서 대식세포의 침윤 및 TUNEL-양성 염색을 감소시킴을 확인하였다. 즉, 본 발명은 PPAR δ -매개 혈관 염증의 억제를 통하여 단백질분해 및 VSMCs의 세포자살을 억제함으로써 대동맥류 발병을 차단할 수 있음을 제공한다.

[0016] 특징적으로, 본 발명에서 PPAR δ 의 리간드를 통한 활성화는 MMP-2의 감소와 TIMP-2/3의 증가로 인한 평활근 세포 층의 소실 및 내측 엘라스틴 파괴를 현저하게 억제하였다. MMP-2는 AAA의 병인론에서 중요한 원인 인자로 (Longo GM, 2002), 본 발명에서 Ang II에 의해 유도된 MMP-2의 증가된 발현이 PPAR δ 리간드인 GW051516에 의해 현저하게 억제되었다.

[0017] 또한, 본 발명은 TIMP-2/3가 대동맥류 발생에 관여하고, TIMPs의 조절에 의해 AAA를 예방하거나 진행을 지연시킬 수 있음을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명에서 PPAR δ 활성화가 TGF- β 및 중요한 ECM 단백질, 엘라스틴, 피브로넥틴, 콜라겐 타입 I 및 III의 발현을 상향 조절하여 대동맥류의 발생을 억제할 수 있음을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명의 상기 리간드를 함유하는 조성물은 포유동물 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 12시간마다 투여될 수 있다.

[0020] 추가의 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.

[0021] 추가의 구체예에서, 상기 본 발명의 조성물은 산화 질소 생산 유도제, 소염제, 생리학적으로 허용 가능한 산화 방지제, 생리학적으로 허용 가능한 무기물, 음 하전 인지질, 카르티노이드, 스타틴, 혈관 신생 억제 약물, 매트릭스 메탈로프로티나제 억제제, Long or short chain fatty acids, fatty acid derivatives, 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 이상의 부가적 제제를 더 포함할 수 있다.

- [0022] 일 구체예에서, 본원에 기술된 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.
- [0023] 전술한 구체예 중 임의의 구체예에 있어서, 본원에 기술된 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. 또 다른 구체예에서, 상기 화합물은 포유 동물에게 일일 기준으로 투여된다.
- [0024] 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.
- [0025] 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, 이러한 질병, 질환 또는 병상에 따른 증상을 치료하거나 또는 최소한 부분적으로나마 지연시키는 데에 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. 당 업자는 이러한 치료적 유효량이 통상의 실험 (예를 들어, 투여량 증량 임상 실험(dose escalation clinical trial))에 의해 결정된다는 사실을 잘 알고 있다.
- [0026] 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. 당 업자는 이러한 예방적 유효량이 통상의 실험(예를 들어, 투여량 증량 임상 실험)에 의해 결정된다는 사실을 잘 알고 있다.
- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0029] 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 mg 이 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.
- [0030] 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 애쥬반트를 투여하였을 때 강화될 수 있다[즉, 상기 애쥬반트는 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.

- [0031] 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].
- [0032] 또한, 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.
- [0033] 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.
- [0034] 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.
- [0035] 아스피린과 같은 혈소판 응집 저해제, 쿠마린과 같은 항혈전증제; 베라파밀, 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. 또한, 상기 반응인자를 이부프로펜, 인도메타신, 페노프로펜, 메펜아민산, 플루펜아민산, 설리다크와 같은 비스테로이드성 항염증제와 함께 투여할 수도 있다. 상기 반응인자를 또한 코리트코스테로이드와 함께 투여할 수도 있다.
- [0036] 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 에 의해 매개되는 심장혈관질환을 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. 즉, 약리적으로 허용가능한 담체 또는 희석제에, 치료대상 환자에게 심각한 독성효과를 나타내지 않으면서 치료적으로 유효한 양을 환자에게 전달하기에 충분한 양으로 반응 인자를 포함한다.
- [0037] 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. 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. 반응 인자를 물약, 현탁물, 시럽, 웨이퍼, 츄잉검 등과 같은 성분과 같이 투여할 수 있으며, 작용을 저해하지 않은 다른 활성성분 또는 바람직한 작용을 보충하는 다른 활성성분, 예컨대 향생물질, 향균제, 항염증제, 또는 항바이러스 화합물을 투여할 수 있다. 아스피린과 같은 혈소판 응집 저해제, 쿠마딘과 같은 항혈전증제; 베라파밀, 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. 비경구, 경피, 피하 또는 국소적용 용액 또는 현탁액으로서 멸균 희석제, 항박테리아제, 항산화제, 킬레이트제, 완충액 및 삼투압 조절제를 더 포함할 수 있다. 국소 적용에 적합한 운반체나 담체는 알려진 바와 같이, 로션, 현탁액, 연고, 크림, 겔, 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. 빠른 방출로부터 반응인자를 보호하는 담체, 예컨대 이식체 및 마이크로캡슐화 전달시스템을 포함하는 조절방출 제제와 함께 제조할 수도 있다.

발명의 효과

- [0038] 상술한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 특이적 리간드를 포함하여 피옥시좀 증식활성화 수용체(PPAR) δ 의 활성화에 의하여 심혈관계 질환, 특히 복부대동맥류를 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 PPAR δ 의 리간드에 의한 활성화는 apoE^{-/-} mice에서 Ang II-유도복부대동맥류의 형성을 억제하는 결과를 나타낸 것이다: (A) 절단된 대동맥 분절을 나타낸 것임. (B) vehicle (n=10), Ang II (n=10), 또는 GW501516 및 Ang II (n=18)의 투여 시 대동맥류의 발생비율. (C) vehicle (n=10), Ang II (n=10), 또는 GW501516 및 Ang II (n=18)로 투여된 마우스의 복부 대동맥의 직경. (D) Ang II (n=10), 또는 GW501516 및 Ang II (n=18)로 투여된 마우스의 생존률. (E) Ang II (n=10), 또는 GW501516 및 Ang II (n=18)로 투여된 마우스의 수축기 혈압.
- 도 2는 PPAR δ 의 리간드에 의한 활성화가 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥의 대식세포 침윤 및 세포사멸에 미치는 영향을 면역염색 및 TUNEL assay 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 Ang II - 유도 AAA의 조직학적 검사결과로, VSMCs의 소실과 medial layer의 국소 엘라스틴의 붕괴를 수반하는 복부 대동맥의 외막 내의 구조적 이형성을 보이고 있음.
- 도 4는 PPAR δ 의 리간드에 의한 활성화가 Ang II - 유도 염증반응을 억제하는 결과를 나타낸 것으로, (A)는 vehicle, Ang II, 또는 GW501516 및 Ang II가 투여된 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥에서의 MCP-1 및 iNOS의 면역염색결과를 나타낸 것이고, (B)는 image analyser에 의한 밴드 강도를 나타낸 것임. (C)는 Ang II-처리 그룹과의 비교결과를 나타낸 것임.
- 도5는 PPAR δ 의 리간드에 의한 활성화가 TGF- β 1, type I 및 III collagens, elastin 및 fibronectin의 발현을 상향 조절한 결과를 나타낸 것으로, (A)는 vehicle, Ang II, 또는 GW501516 및 Ang II가 투여된 apoE^{-/-} mice의 면역염색결과를 나타낸 것이고, (B)는 image analyser에 의한 밴드 강도를 나타낸 것임. (C)는 Ang II-처리 그룹과의 비교결과를 나타낸 것임.
- 도6은 PPAR δ 의 리간드에 의한 활성화가 MMP-2의 발현을 감소시키고, TIMP-2 및 -3의 발현을 증가시키는 결과를 나타낸 것으로 (A)는 vehicle, Ang II, 또는 GW501516 및 Ang II가 투여된 apoE^{-/-} mice의 면역염색결과를 나타낸 것이고, (B)는 image analyser에 의한 밴드 강도를 나타낸 것임. (C)는 Ang II-처리 그룹과의 비교결과를 나타낸 것임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 이하, 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만, 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 국한되는 것은 아니다.

[0041] <실시예 1> 실험동물

- [0042] ApoE^{-/-} mice는 Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan)로부터 입수하였고, 무균환경에서 유지되었다. 12시간 낮/밤 사이클 (06:00 점등)의 조절된 환경 하에서 표준 살균 실험실 먹이와 음수가 임의섭식 되도록 하였다. 6-월령 수컷 apoE^{-/-} mice를 3그룹에 하나씩 임의로 할당하였다: 비히클 (vehicle)의 주입 (대조군), Ang II의 주입 (1.44 mg/kg/day) 또는 Ang II 및 GW501516 (1.44 and 3.3 mg/kg/day, respectively)의 주입. 4주간 지시된 시약을 피하로 주사하기 위해 osmotic mini-pumps (model 2004, Alzet, Cupertino, CA)가 이식되었다. 표준 효소 분석 키트 (WakoChemicalCo., Japan)를 사용하는 Seoul Clinical Laboratories (Seoul, Korea) services로 혈액 콜레스테롤, 트리글리세라이드 (triglyceride) 및 지방산 수준을 프로파일링하였다. 복부 대동맥 (last intercostal artery로부터 ileal bifurcation까지)을 절개하고, 이 조직의 일부분을 면역조직화학분석을 위해 4% 파라포름알데히드에 고정하거나 웨스턴 블랏 분석을 위해 균질화시켰다. 모든 동물 실험들은 국립경상대학교의 실험동물보호위원회의 승인 하에 이루어졌다.

[0043] <실시예 2> 수축기혈압 측정

- [0044] 본 연구과정 동안 tail-cuff computerized system (BP-2000, Visitech Systems, Inc., Apex, NC)를 사용하여 매주 수축기 (최대) 혈압 (SBP)을 측정하였다. 마우스들은 실제 측정 전 5일 연속하여 장비에 적응시켰다.

[0045] <실시예 3> 대동맥 직경의 측정

[0046] 동물들을 안락사시킨 후, 오른쪽 심실로부터 혈액을 뽑고, 왼쪽 심실을 통하여 차가운 PBS로 대동맥을 세척하였다. 해부현미경 (Olympus SZ-CTV, Tokyo, Japan)을 사용하여 복부대동맥을 노출시키고, 혈관외막주위 조직을 외부 표면으로부터 조심스럽게 박리하였다. 최대 동맥직경을 수술현미경 (Olympus CKX41, Tokyo, Japan) 및 고정된 TEM 그리드 (Ted Pella Inc., Redding, CA)를 이용하여 측정하였다. AAA는 최대 복부 대동맥 직경의 50% 이상으로 정의하였다.

[0047] *<실시예 4> 분석

[0048] 4-1 웨스턴 블랏 분석

[0049] 대동맥 조직은 ceramic shepre를 가진 FastPrep-24 장치 (MP Biomedicals, OH)를 이용하여 균질화하였고, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)에 맞는 단백질 일정량을 Hybond-P+ polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Biosciences UKLtd., UK) 상으로 옮겼다. 멤브레인은 0.1% Tween-20를 함유하는 Tris-buffered saline (TBS)에서 5% nonfat milk로 4℃로 밤새 블로킹하고, 1% BSA 및 0.05% Tween-20를 함유하는 TBS에서 지시된 특정 항체와 4℃로 밤새 반응시키고 1:3000 으로 희석된 peroxidase-conjugated goat antibody와 상온에서 2시간 배양하였다. 0.1% BSA 및 0.1% Tween-20를 함유하는 TBS에서 광범위하게 세척한 후, West-ZOLPlus (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 immuno-reactive bands를 측정하였다. horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgG 뿐 아니라, type I 및 III collagens, elastin, fibronectin, MCP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TGF-β1에 대한 특이적 다클론 항체는 Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA)로부터 구매하였다. Polyclonal goat anti-mouse MIP-1 β 및 rabbit anti-actin antibodies는 R&D Systems (Minneapolis, MN) 및 Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO)로부터 각각 구매하였다. Polyclonal rabbit anti-mouse iNOS 및 anti-α-SMA antibodies는 Abcam plc. (Cambridge, UK)로부터 구매하였다.

[0050] 4-2 조직학적 분석

[0051] 4% paraformaldehyde로 고정된 후, 조직을 파라핀에 임베딩하였다. 파라핀 블록을 5 μm로 절단하고 double-gelatin 으로 코팅된 slide glass에 올렸다. 조직학적 분석 전에, 절편들을 탈파라핀하고 물로 수화시켰다. 대동맥절편을 Hematoxylin-Eosin 및 Masson's trichrome로 통상적으로 염색하였다. elastic fiber integrity를 보기 위해 절편들을 Weigert's Resorcin Fuchsin kit (Cat # 26370, EMS, PA, USA)로 또 염색하였다. 면역조직화분석을 위해 조직들을 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 10분간 끓여 항원들을 회수하였다. 2차 항체가 있는 동일한 종으로부터 정상 혈청 (1%)을 제조하여 항체의 블랏킹 및 희석을 위해 사용하였다. 각 절편들을 1차 항체로 상온 또는 4℃에서 밤새 배양하였다. MCP-1, iNOS, α-SMA 및 대식세포 (macrophage)를 검출하기 위해, Alexa Flour 488 또는 Alexa Flour 594 conjugated secondary antibodies (Invitrogen)가 사용되었다. 대식세포는 rabbit anti-serum against murine macrophages (AIA31240, Accurate Chemical and Scientific)로 면역염색하였다. Biotinylated-secondary antibodies 및 streptavidin-conjugated Alexa Flour 594는 types I 및 III collagen, elastin, fibronectin, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 및 TGF-β1의 염색에 사용되었다. 복부대동맥 내 사멸세포들은 insitucell death detection Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)를 사용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) 분석을 통해 시각화하였다. 절편들은 ProLong® Gold에 올리고, DAPI (Invitrogen)로 변색을 방지하고, fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 촬영하였다.

[0052] <결과>

[0053] 1. PPAR δ의 리간드 활성화는 복부대동맥류의 Ang II-유도 형성을 억제한다.

[0054] 고지혈증 마우스 (DaughertyA, 1999; DaughertyA, 2000)의 복부 대동맥으로 Ang II의 주입은 현저하게 동맥류를 형성하였다. PPARδ 특이적 리간드인 GW501516가 Ang II 주입에 의해 형성된 동맥류에 미치는 효과를 검증하

였다. 아포리포프로테인 e-결손 (apolipoprotein E-deficient, apoE^{-/-}) 마우스에 Ang II 주입 후 4주에, 대부분의 마우스들은 AAA를 일으켰지만, Ang II와 GW501516를 동시에 주입한 경우 AAA로의 발병을 현저하게 감소시켰다 (도 1a 및 b).

[0055] Ang II로 처리한 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥의 최대 직경은 vehicle-treated mice (대조군)보다 현저하게 컸다. GW501516를 동시에 투여하는 경우 Ang II-유도된 대동맥직경의 증가를 무디게 하였다 (도 1c).

[0056] 더욱이, Ang II와 GW501516의 동시 투여는 Ang II 단독처리된 마우스에 비하여 apoE^{-/-} mice의 생존율이 증가되었다 (도1d).

[0057] Ang II에 의해 유도된 혈압의 증가가 AAA의 잘 알려진 위험 요인이므로 (Wong DR,2007), noninvasive tail-cuff system으로 의식 있는 apoE^{-/-} mice의 수축기 혈압 (systolic blood pressure, SBP)을 모니터링하였다. 그 결과 Ang II-주입 마우스에서 시간-의존적으로 SBP가 증가되는 것으로 나타났는데, GW501516을 동시에 처리하거나 그렇지 않은 경우에 차이가 없었다 (도1e).

[0058] 이러한 결과는, 동맥류 형성에 대한 GW501516에 대한 효과는 혈압의 감소에 의해 매개되지 않음을 나타내는 것이다. 또한, GW501516와의 동시 투여 또는 투여 없이 Ang II가 주입된 apoE^{-/-} mice의 고지혈증 정도를 측정하였다. 예상대로, Ang II가 주입된 경우 현저한 고지혈증을 유발하였다. 하지만, 체중과 지방 프로파일에서는 GW051516과 동시투여 또는 이의 투여 없이 Ang II를 주입한 마우스 간에는 차이가 없었다 (표1).

표 1

[0059] GW501516와 동시 또는 Ang II 단독투여 시의 apoE^{-/-} mice의 체중 및 혈장 지방 프로파일

	Control	AngII	AngII +GW501561
Body weight(g)			
Baseline	31.1±0.6	30.8±1.0	31.6±0.8
End	31.8±0.4	29.2±0.8	31.8±1.0
Cholesterol(mg/dL)			
Total	544±25	781±58*	768±32
Triglycerides	159±22	243±38	232±28
HDL	53±3	77±5	82±6
Free fatty acid(mEq/L)	0.23±0.03	0.30±0.04	0.29±0.03

[0060] **2. PPAR δ의 리간드 활성화는 apoE^{-/-} mice에서 대동맥 대식세포 침윤과 세포사멸을 약화시킨다.**

[0061] 대동맥 조직의 염증 및 VSMCs의 세포사멸은 동맥류의 발생과 뒤이은 대동맥 벽의 약화에 관계되어 있다 (Henderson EL, 1999; Miyake T, 2009). vehicle-infused mice에서 대식세포는 복부 대동맥에서 낮은 정도로 침윤되었지만, Ang II가 주입된 apoE^{-/-} mice에서 특히 외막에서 대식세포의 현저한 침윤이 관찰되었다 (도2, 위쪽 패널).

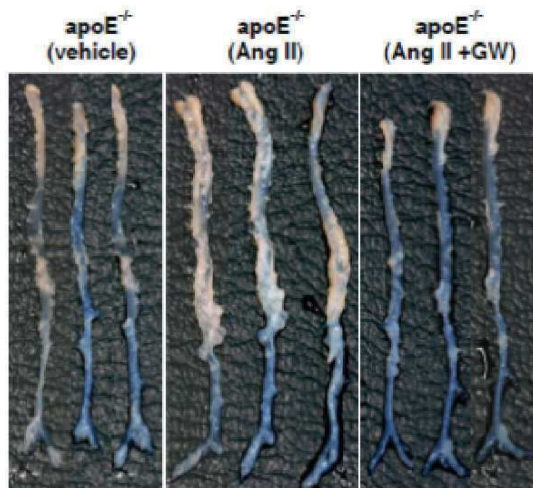
[0062] AngII와 함께 GW501516를 투여하는 경우 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥에서 대식세포의 침윤을 현저히 약화시켰다. AngII-주입 AAA에서 리간드로 활성화된 PPAR δ의 역할을 더 명확히 하기 위해, TUNEL assay를 사용하여 대동맥 조직에서 GW501516가 세포자살사에 미치는 효과를 조사하였다. 도2에서 보는 바와 같이 (아래 패널), Ang II를 투여한 경우 명확히 세포자살사를 증가시켰지만, GW501516로 처리된 apoE^{-/-} mice에서는 TUNEL-positive cells 수를 약화시켰다.

[0063] Ang II - 유도 대동맥류 형성은 내측 평활근 세포 (medial smooth muscle cells)의 소실과 엘라스틴 붕괴로 인한 혈관벽이 약화된 것과 관련되어 있다 (Daugherty A, 2000; Wang Y, 2010). Ang II - 유도 AAA의 조직학적 검사는 VSMCs의 소실과 medial layer의 국소 엘라스틴의 붕괴를 수반하는 복부 대동맥의 외막 내의 구조적 이형성을 보여주었다 (도 3).

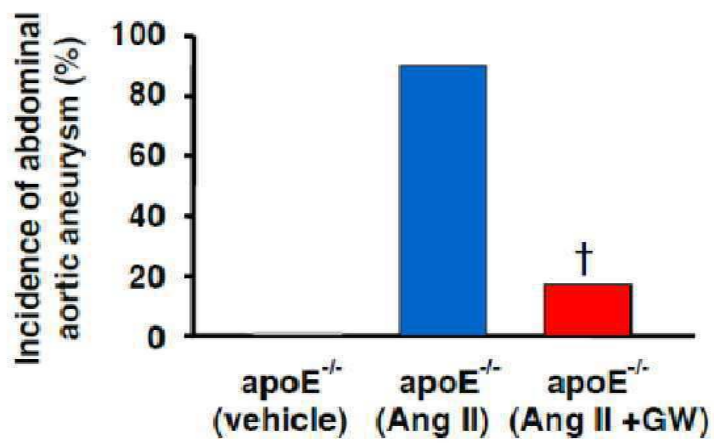
- [0064] AngII에 의해 유발된 이러한 구조적 변화는 GW501516를 이용하여 PPAR δ 를 활성화시킴에 의해 현저하게 개선되었다. 종합하여 보면, 이러한 발견들은 혈관의 구조적 온전성을 지키기 위해서 염증 반응을 조절하는 PPAR δ 의 역할이 필수적임을 알 수 있다.
- [0065] **3. PPAR δ 의 리간드 활성화는 Ang II-주입 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥에서 MCP-1, MIP-1 β , and iNOS의 발현을 억제한다.**
- [0066] Ang II-주입 AAA에서 염증반응에 대한 PPAR δ 의 역할을 확인하기 위해, 주화성 단백질 (chemotactic proteins)의 발현수준을 측정하였다. 대동맥 최대 직경 지점으로부터 동일한 위치에서 제조된 연속적 조직 블록의 면역조직화학분석결과는 Ang II-주입으로 증가된 monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현이 GW501516으로 처리된 apoE^{-/-}mice의 복부 대동맥에서 약화되었음을 보여주었다 (도4a).
- [0067] 면역조직화학분석 결과와 일치되게, 증가된 MCP-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β 및 iNOS 단백질의 수준이 GW501516으로 처리한 apoE^{-/-}mice의 대동맥 조직에서 현저하게 약화되었다 (도4b, c).
- [0068] **4. PPAR δ 의 리간드 활성화는 Ang II-주입 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥에서 TGF- β 1 and ECM-related proteins의 조절한다.**
- [0069] 대동맥류에서 대동맥 벽이 점진적인 약화는 ECM의 퇴화 및 elastic lamina의 붕괴를 특징으로 하므로 (Thompson RW, 2002), ECM 단백질의 발현이 혈관 구조의 보전에 관여하는지 (Galis ZS, 2002)를 조사하였다. Ang II-주입된 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥과 비교하여, GW501516으로 처리된 apoE^{-/-} mice에서 type I and III collagens, elastin, fibronectin 및 TGF- β 1의 현저한 발현증가를 보였다 (도5a).
- [0070] 이들 결과와 일치되게, PPAR δ 의 리간드 활성화는 AngII-주입 apoE^{-/-} mice의 대동맥 조직에서 ECM-관련 단백질의 발현을 현저하게 증가시켰다 (도5b, c)
- [0071] ECM의 항상성은 MMPs와 이들의 내재성 억제자인 TIMPs의 균형에 의해 조절된다 (Galis ZS, 2002). 도6a에서 보는 바와 같이, GW501516 및 Ang II가 주입된 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥에서 MMP-9이 아닌 MMP-2의 발현을 현저하게 억제되었다. 다른 한편으로, TIMP-1 항체가 아니라 TIMP-2 및 3 항체로 염색했을 때 GW501516으로 처리된 apoE^{-/-} mice의 복부 대동맥에서 면역-반응성 세포들이 증가되었다. 유사하게, 웨스턴 블랏 분석에서도 GW501516은 대동맥 조직에서 MMP-2를 억제하면서 TIMP2 및 3의 발현을 현저하게 증가시켰다 (도 6b, c).
- [0072] 종합하여 보면, 이러한 발견들은 혈관의 안정성을 유지하기 위해 PPAR δ 활성화가 중요한 역할을 함을 보여준다.

도면

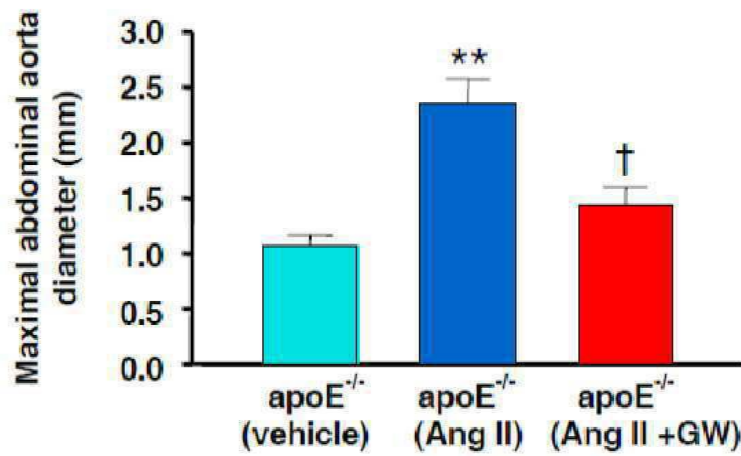
도면1a



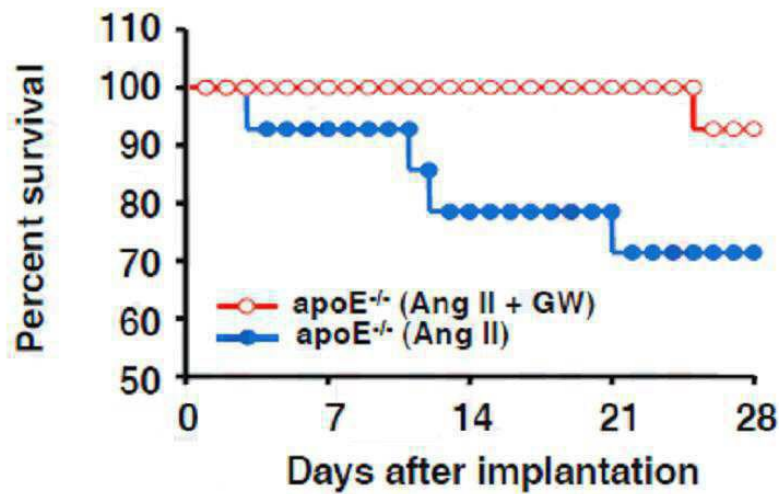
도면1b



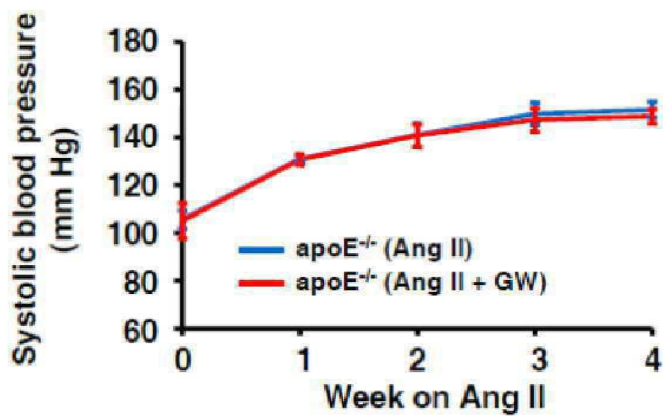
도면1c



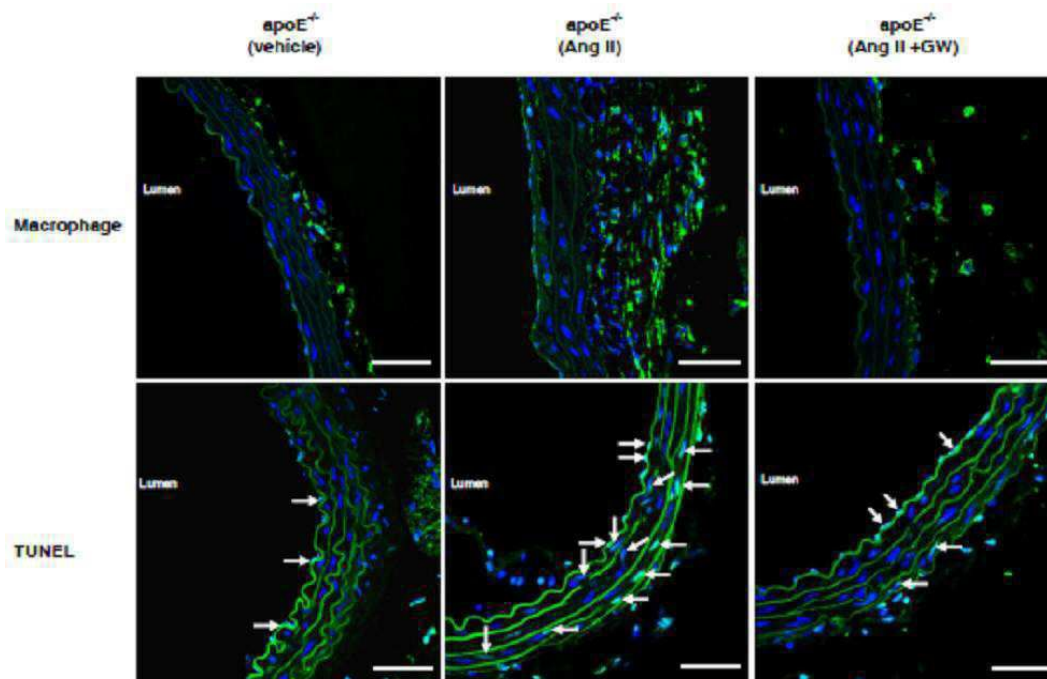
도면1d



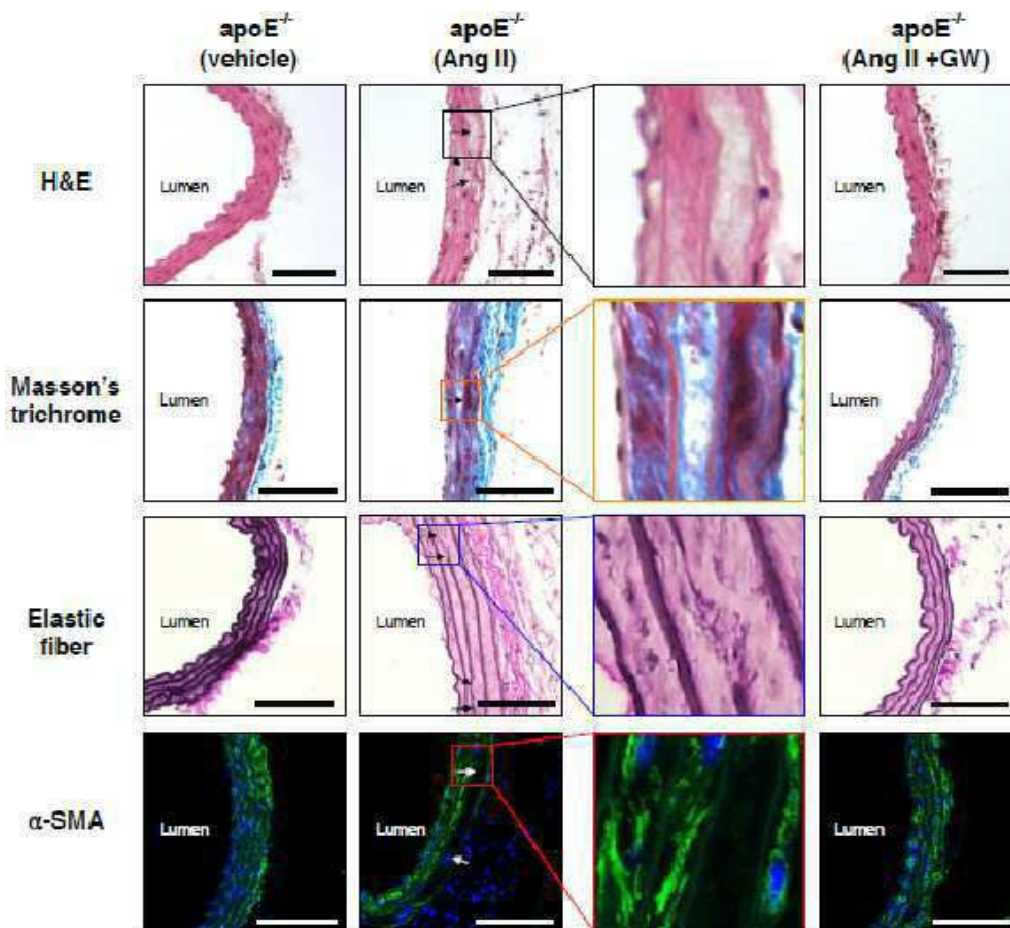
도면1e



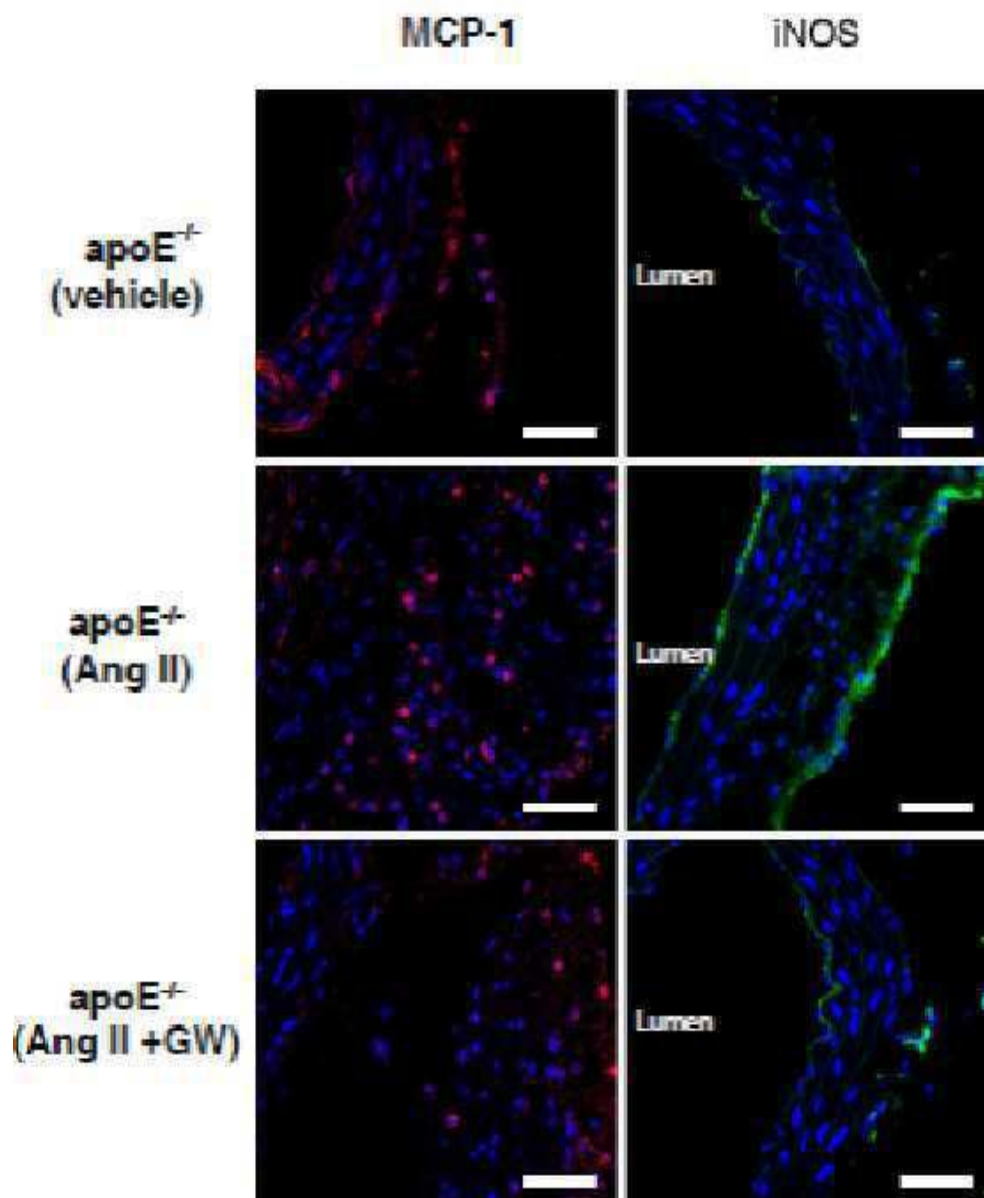
도면2



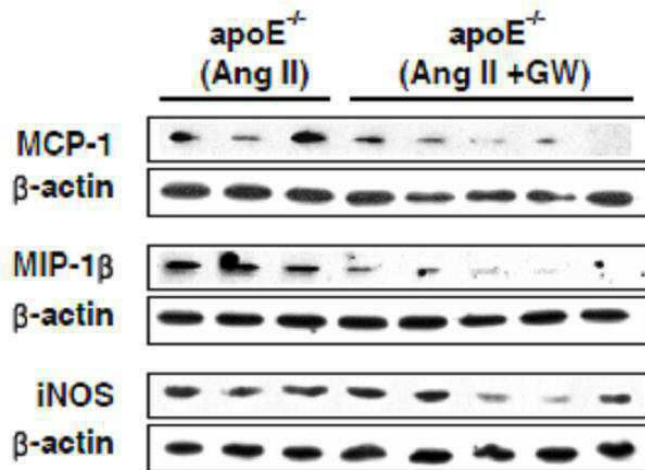
도면3



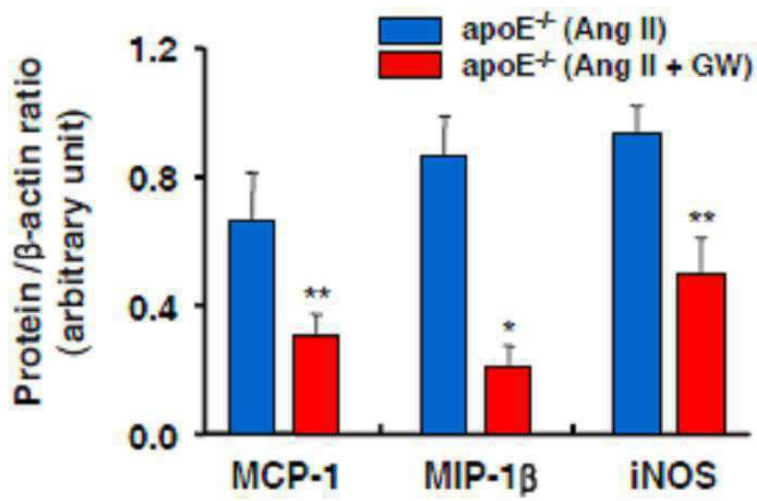
도면4a



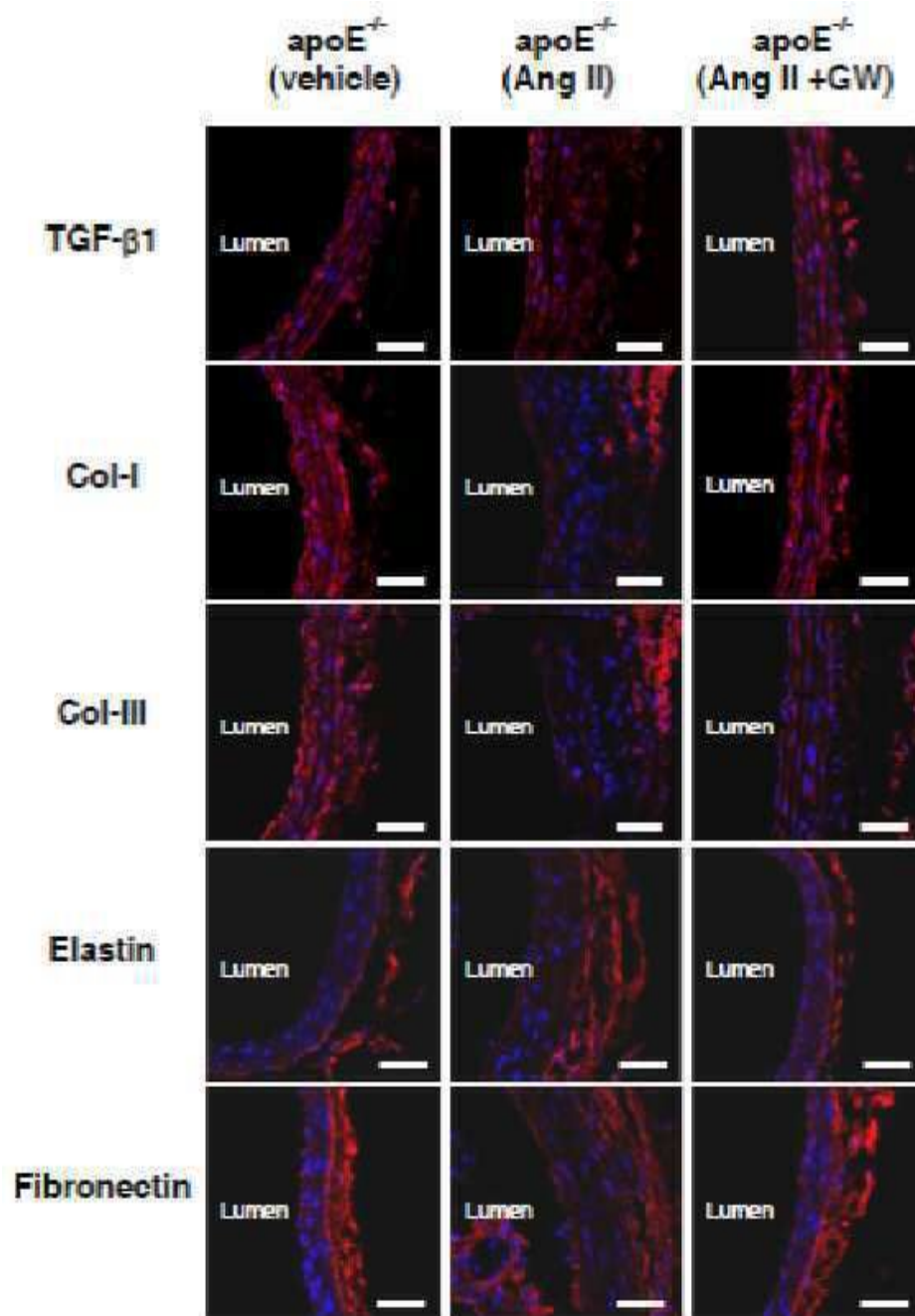
도면4b



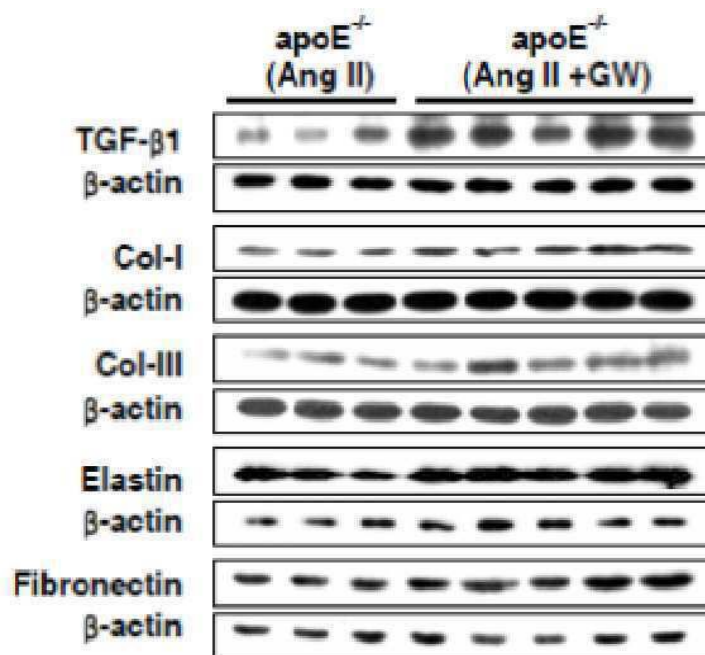
도면4c



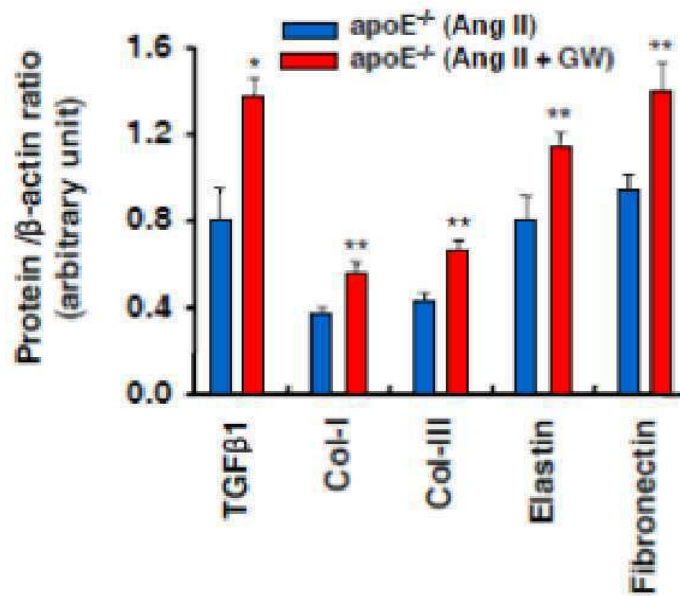
도면5a



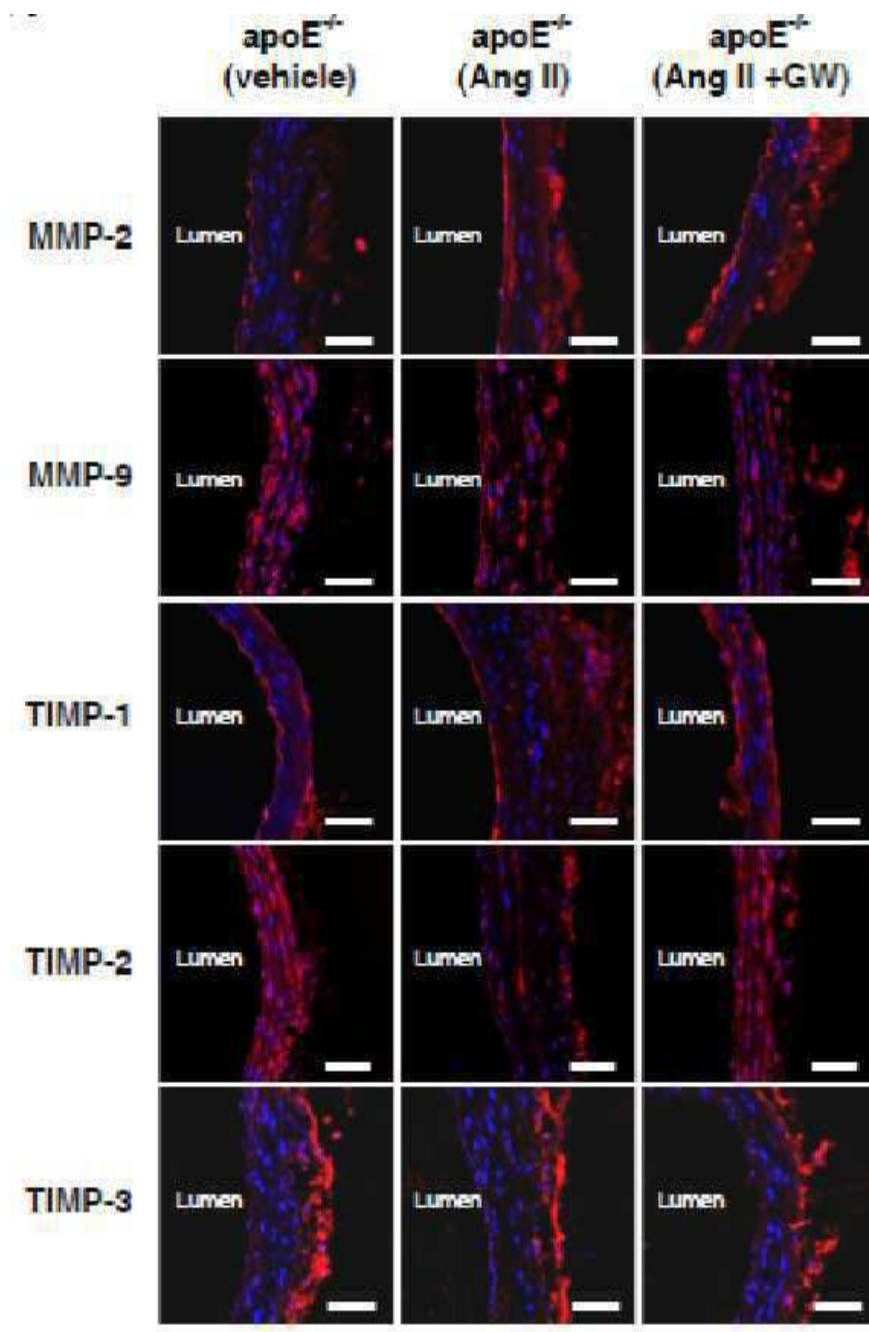
도면5b



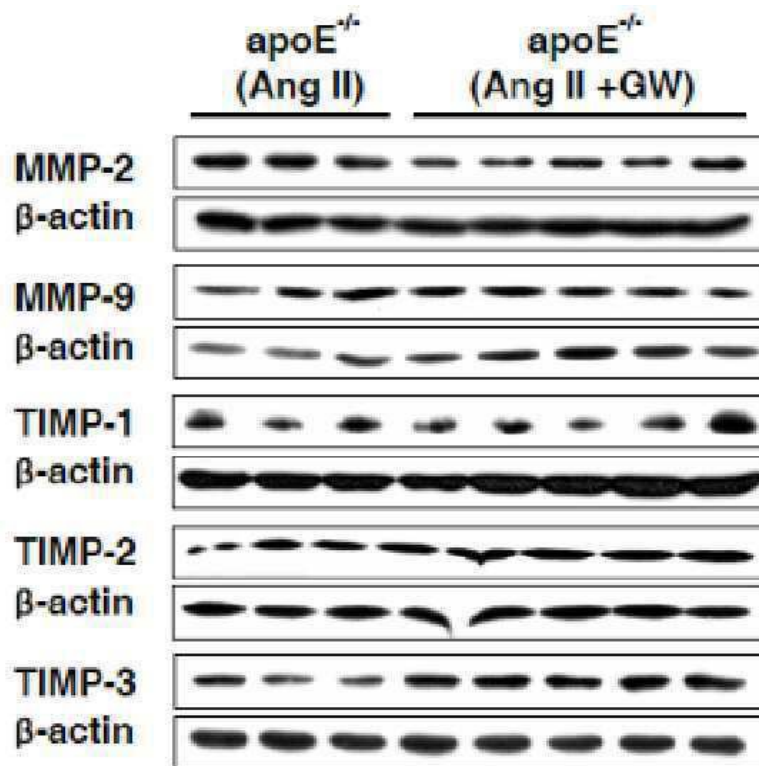
도면5c



도면6a



도면6b



도면6c

