



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년09월24일
(11) 등록번호 10-0918475
(24) 등록일자 2009년09월15일

(51) Int. Cl.

A61K 31/4196 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0017843

(22) 출원일자 2009년03월03일

심사청구일자 2009년03월03일

(56) 선행기술조사문헌

W02002083131 A1

Journal of Investigative Dermatology, 2004,
122(4), 971-983

Molecular Pharmacology, 2008, 74(5),
1429-1442

전체 청구항 수 : 총 1 항

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

서한극

경상남도 진주시 신안동 주공2차아파트 204-706호

(74) 대리인

김순용

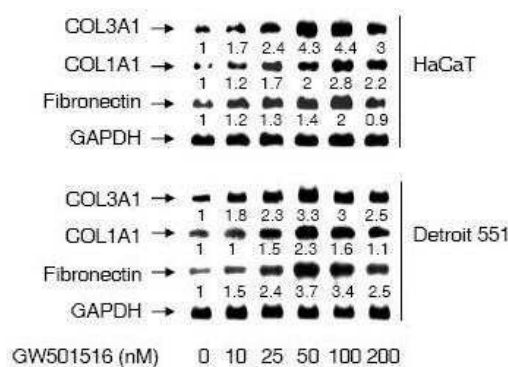
심사관 : 성선영

(54) 피옥시좀 증식활성화 수용체 델타에 특이적인 리간드를 포함하는 피부 외용제 조성물

(57) 요약

본 발명은 피옥시좀 증식활성화 수용체 델타(peroxisome proliferation-activated receptor δ)에 특이적인 리간드를 포함하는 피부 상처 치유용 약제학적 조성물 및 화장용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 피옥시좀 증식활성화 수용체 델타(PPAR δ) 특이적 리간드는 케라티노사이트 및 피부섬유아세포에서 타입 I 콜라겐, 타입 III 콜라겐, 피브로넥틴과 같은 세포외기질 단백질의 발현을 촉진함으로써 효과적으로 피부 상처를 치유하고, 피부 노화 및 주름을 개선할 수 있다.

대표도 - 도3a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2008-000-10428-0

부처명 한국과학재단

연구사업명 기초과학 연구사업

연구과제명 핵내수용체 PPAR δ 전사표적 유전자의 발현제어를 통한 통맥경화성 혈관질환치료를 위한
기반연구

주관기관 경상대학교

연구기간 2008년 5월 1일~2009년 2월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

GW501516 (2-[2-methyl-4-([4-methyl-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1,3-thiazol-5-yl]methylsulfonyl]phenoxy]acetic acid)를 포함하는 주름 개선용 화장용 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 피옥시좀 증식 활성화 수용체 델타(peroxisome proliferation-activated receptor δ)에 특이적인 리간드를 포함하는 피부 상처 치유용 약제학적 조성물 및 화장용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

<2> PPAR δ (peroxisome proliferation-activated receptors)는 핵내 호르몬 수용체 슈퍼패밀리에 속하는 리간드 유도성 전사인자로서, 세포 분화와 증식, 지질 항상성 및 에너지 대사를 포함한, 많은 세포성 및 대사성 과정을 조절한다. 지금까지 3개의 PPAR 서브패밀리인 PPAR α (NR1C1), PPAR δ (NR1C2, 또한 PPAR β , FAAR 및 NUC1로도 알려짐) 및 PPAR γ (NR1C3)가 동정되었다. 상기 수용체는 RXR(retinoid X receptor)와 이량체를 형성하고 타겟 유전자의 조절 영역에 존재하는 PPRE(PPAR response elements)라고 하는 특이적인 염기서열에 결합함으로써 유전자 발현을 조절하는데, PPAR 타겟 유전자의 프로모터 영역은 하나 또는 두 개의 뉴클레오타이드에 의해 구별되는, 6개의 염기서열인 AGGTCA의 반복적인 염기서열(DR1 또는 DR2)로 구성되어 있다. PPAR α 및 PPAR γ 과는 대조적으로, PPAR δ 는 케라티노사이트를 포함한 다양한 계통의 세포에서 풍부하게 발현되고 있으나, PPAR δ 의 피부조직을 구성하는 세포인 케라티노사이트와 피부 섬유아세포에서의 기능은 명확하게 밝혀져 있지 않다.

<3> 상처 치유는 조직의 고유성을 회복하는 매우 역동적인 생물학적 과정으로, 상처 부위에서의 조직치유는 콜라겐 침착과 리모델링의 균형에 의존한다. 따라서 상처치유에는 상해부위에서 분비되는 수많은 사이토카인을 비롯하여, 세포외기질(Extracellular Matrix; ECM)의 침착, 조직의 리모델링, 세포 부착과 증식, 염증 반응의

조절 등 다양한 생물학적 메커니즘이 관여하는 매우 복잡한 과정이다. 일반적으로, 상처 치유의 초기 단계에는 상처딱지의 형성을 위하여 콜라겐 합성이 촉진되지만, 이러한 빠른 콜라겐 합성 속도는 상처 치유의 최종 과정에서 정상 수준으로 점진적으로 감소하는데, 이러한 조절은 생체내의 다양한 인자들에 의하여 영향을 받고 있다. 한편, 타입 I 콜라겐, 타입 III 콜라겐, 피브로넥틴과 같은 세포외기질 단백질들은 피부조직의 중요한 구성요소로서, 피부의 탄력과 고유성(Integrity)유지에 있어서 필요 불가결한 생체내 인자들이다. 하지만 피부 조직의 주요한 구성세포이면서 상처 치유 과정, 피부노화 및 재생에서 중요한 역할을 수행하는 케라티노사이트와 피부 섬유아세포에서 콜라겐과 같은 세포외기질 단백질의 발현을 조절하는 작용 메커니즘은 정확히 알려져 있지 않다.

- <4> 이에 본 발명자는 케라티노사이트와 피부 섬유아세포에서 세포외기질 단백질의 발현을 조절하는 작용 메커니즘을 연구하던 중 PPAR δ 특이적 리간드가 케라티노사이트 및 섬유아세포에서 타입 I 및 III 콜라겐 및 피브로넥틴의 발현을 촉진함으로써 피부 상처를 치유하고 피부 노화억제 및 주름을 개선할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

- <5> 본 발명은 PPAR δ 에 특이적인 리간드를 포함하는 피부 상처 치유용 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.

- <6> 또한, 본 발명은 PPAR δ 에 특이적인 리간드를 포함하는 화장용 조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- <7> 본 발명은 PPAR δ 에 특이적인 리간드인 "GW501516 (2-[2-methyl-4-([4-methyl-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,3-thiazol-5-yl]methylsulfanyl]phenoxy]acetic acid)"에 의한 PPAR δ 의 활성화가 상처 치유에 과정에서 작용하는 중요한 세포외 기질 단백질인 타입 I 및 III 콜라겐 및 피브로넥틴의 발현을 유도함으로써 PPAR δ 가 피부에서 ECM 항상성을 조절함을 입증하였다. 또한, PPAR δ 의 활성화는 상처 봉합을 촉진하고, 상처 부위에서 타입 I 및 III 콜라겐 발현의 상향조절을 동반하였다. 이러한 결과는 PPAR δ 에 의해 유도된 콜라겐 발현이 상처 회복에 이로운 효과를 가지고 있음을 의미하였다.

- <8> 한편, 상처를 낸 마우스모델에서 GW501516를 직접 투여하였을시, GW501516은 상처 부위에서 콜라겐 타입 I 및 III의 발현을 촉진함으로써 상처 회복 과정을 가속화하였다. 따라서, 본 발명은 PPAR δ 가 콜라겐을 포함한 ECM 성분의 발현 조절을 통해 상처 치유 과정에 관여함으로써 상처 봉합을 촉진할 가능성을 제안한다. 또한, 상처 부위에서 PPAR δ 의 활성화는 항염증 및 세포사멸억제작용과 같은 세포의 이벤트를 촉진할 뿐만 아니라, ECM의 생산을 촉진함으로써 상처 치유 과정에서 다양한 효과를 발휘할 가능성도 제기된다.

- <9> 리간드에 의해 활성화된 PPAR δ 는 시험관내 스크래프(Scrape) 상처 에세이에서 사람 표피 케라티노사이트 및 진피 섬유아세포의 이동을 증가시켰다. 이러한 결과는 상처의 미세 환경내에서 ECM이 사람 케라티노사이트 및 섬유아세포의 이동을 촉진할 수 있음을 보여주었다. 상처 경계 주변 세포의 이동과 더불어 세포간 상호작용은 ECM 분자가 이웃한 세포들을 연결한다는 점에서 상처 치유에 필수적이므로, PPAR δ 에 의해 매개된 콜라겐을 포함한 ECM 관련 유전자의 유도는 케라티노사이트 및 섬유아세포의 이동을 가속화시킬 뿐만 아니라 상처 경계부에서 세포간 상호작용을 촉진함으로써 피부의 상처 치유 및 피부 노화억제에 기여할 것이다.

- <10> PPAR δ 리간드 처리에 의해 특이적으로 사람 케라티노사이트 및 피부 섬유아세포에서 콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 III, 피브로넥틴의 발현이 유도되었다. 상처 치유 과정에서 모든 PPAR 패밀리 멤버중 PPAR δ 만이 ECM 관련 유전자를 유도한다는 것을 본 발명에서 입증하였다. 이는 상처 치유 과정에서 특정한 핵내 수용체의 작용이 제한된 미세 환경에서 특정한 타겟 분자의 발현을 통해 효과를 발휘한다는 것을 의미한다. 따라서, 상처 경계부에서 PPAR δ 의 활성화는 콜라겐을 포함한 ECM 성분을 증가시킴으로써 상처 치유를 촉진할 수 있다.

- <11> 결론적으로, 본 발명은 생체내 피부 상처에서 PPAR δ 가 ECM의 발현을 증가시킴으로써 상처부위로의 세포이동 및 세포결합을 촉진시켜 상처치유 및 피부 노화억제과정에서 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

- <12> 따라서, 본 발명은 PPAR δ 에 특이적인 리간드를 포함하는 피부 상처 치유용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

- <13> 본 발명의 약제학적 조성물은 통상적인 경피 투여용 제제로 제형화될 수 있다. 그러한 제제로는 이에 제한되는 것은 아니지만, 연고제, 겔제, 크림제, 리니먼트제, 로션제 등이 포함된다.
- <14> 본 발명의 경피 투여용 제제의 한 양태는 연고제로, 이 제제는 유효 성분인 PPAR δ 에 특이적인 리간드와 당업계 공지된 바를 기초로 연고기제, 기타 첨가제 등을 적절히 배합 처리함으로써 제조할 수 있다. 연고기제는 예를 들면, 고급 지방산 또는 그의 에스테르류 (예, 아디프산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 올레산, 아디프산에스테르, 미리스트산에스테르, 팔미트산에스테르, 세바스산디메틸, 라우르산헥실, 이소옥탄산세틸), 납류 (예, 경랍, 밀랍, 셀레신), 계면활성제 (예, 폴리옥시에틸렌알킬에테르인산에스테르), 고급 알코올 (예, 세탄올, 스테아릴 알코올, 세토스테아릴알코올), 실리콘유 (예, 디메틸폴리실록산, 메틸페닐폴리실록산, 글리콜메틸폴리실록산, 실리콘글리콜폴리머), 탄화수소류 (예, 친수와세린, 백색와세린, 정제라놀린, 유동파라핀), 물, 보습제 (예, 글리세린, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 소르비톨), 감염방지제 등에서 적절히 선택하여 이용될 수 있다.
- <15> 다른 양태는 겔제로, 이 제제는 유효 성분인 PPAR δ 에 특이적인 리간드와 당업계 공지된 바를 기초로 겔 기제, 기타 첨가제 등을 적절히 배합 처리함으로써 제조할 수 있다. 겔 기제는 예를 들면, 저급 알코올 (예, 에탄올, 이소프로필알코올), 물, 겔화제 (예, 카르복시비닐중합체, 히드록시에틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산프로필렌글리콜에스테르), 중화제 (예, 트리에탄올아민, 디이소프로판올아민, 수산화나트륨), 계면활성제 (예, 세스퀴올레산소르비탄, 트레올레산소르비탄, 모노올레산소르비탄, 모노스테아르산소르비탄, 모노라우르산소르비탄, 모노스테아르산폴리에틸렌글리콜, 폴리옥시에틸렌도닐페닐에테르, 폴리옥시에틸렌라우릴에테르), 감염방지제 등을 들 수 있으며, 이 들 중에서 적절히 선택할 수 있다.
- <16> 또 다른 양태는 크림제로, 이 제제는 유효 성분인 PPAR δ 에 특이적인 리간드와 당업계 공지된 바를 기초로 크림 기제, 기타 첨가제 등을 적절히 배합 처리함으로써 제조할 수 있다. 크림 기제는 예를 들면, 고급지방산에스테르류 (예, 미리스트산에스테르, 팔미트산에스테르, 세바스산디에틸, 라우르산헥실, 이소옥탄산세틸), 저급 알코올 (예, 에탄올, 이소프로판올), 탄수화물 (예, 유동파라핀, 스쿠알란), 다가알코올 (예, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜), 고급 알코올 (예, 2-헥실데칸올, 세탄올, 2-옥틸도데칸올), 유화제 (예, 폴리옥시에틸렌알킬에테르류, 지방산에스테르류, 폴리에틸렌글리콜지방산에스테르), 방부제 (예, 파라옥시벤조산에스테르), 감염 방지제 등을 들 수 있고, 이들 중에서 적절히 선택할 수 있다.
- <17> 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 제형 형태 및 기간 등 여러 가지 요인에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물은 1일 체중 1kg 당 0.01 내지 1000mg, 바람직하게는 0.1 내지 500mg으로 투여할 수 있다. 투여는 증상에 따라 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회에 나누어 투여할 수도 있다.
- <18> 또한, 본 발명은 PPAR δ 에 특이적인 리간드를 포함하는 화장품용 조성물에 관한 것이다. 특히 본 발명의 화장품용 조성물은 노화 방지 및 주름 개선에 유용할 것이다.
- <19> 목적한 제형에 따라 이용할 수 있는 "피부학적으로 허용된 담체"는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알코올, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제(thickening agent), 향산화제, 점도 안정화제(viscosity stabilizer), 킬레이팅제, 완충제, 방부제, 저급 알코올 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 그 종류와 농도는 다양하고, 당업자가 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 수정 및 변경할 수 있는 부분을 포함한다. 필요에 따라 미백제, 보습제, 항염증제, 항박테리아제, 항진균제, 비타민, 자외선 차단제, 향생제, 여드름 방지제, 향수, 염료가 포함될 수도 있으며, 이들은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 양으로 본 발명에 따른 화장품용 조성물에 포함될 수 있다. 조성물 총 중량 당 0.001 내지 50 중량%가 적합하다.
- <20> 구체적으로 상기 오일로는 수소화 식물성유, 파마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있고, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸텔릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다. 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알코올로는 세틸 알코올, 옥틸 도데칸올, 올레일 알코올, 판텐올, 라놀린 알코올, 스테아릴 알코올, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며, 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트 등이 이용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <21> 계면활성제의 예로는 소듐 스테아레이트, 소듐 세틸설페이트, 폴리옥시에틸렌 라우릴에테르포스페이트, 소듐 N-아실 글루타메이트와 같은 음이온 계면활성제; 스테아릴디메틸벤질암모늄 클로라이드 및 스

테아릴트리메틸암모늄 클로라이드와 같은 양이온 계면활성제; 알킬아미노에틸글리신 하이드로클로라이드 및 레시틴과 같은 양성 계면활성제; 글리세린 모노스테아레이트, 소르비탄 모노스테아레이트, 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 올레일에테르, 폴리에틸렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트, 폴리옥시에틸렌 코코넛 지방산 모노에탄올아르니드(monoethanolamide), 폴리옥시프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 캐스터유, 폴리옥시에틸렌 라놀린과 같은 비이온성 계면활성제 등이 포함된다.

<22> 흡습제에는 글리세린, 1,3-부틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜이 이용될 수 있으며, 저급 알코올로는 에탄올, 이소프로판올이 이용 가능하다. 증점제의 예에는 알긴산 나트륨, 카제인산 나트륨, 젤라틴 한천, 크산탄 고무, 전분, 셀룰로오스 에테르 (예, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스, 하이드록시 프로필메틸 셀룰로오스), 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 항산화제로는 부틸레이티드 하이드록시톨루엔, 부틸레이티드 하이드록시아니솔, 프로필 갈레이트, 시트르산, 에톡시퀸(ethoxyquin)이 이용 가능하고, 킬레이팅제로는 디소듐 에데테이트, 에탄하이드록시 디포스페이트가 이용 가능하며, 완충제로는 시트르산, 소듐 시트레이트, 붕산, 보랙스(borax), 디소듐 하이드로젠 포스페이트가 이용 가능하고, 방부제로는 메틸 파라하이드록시벤조에이트, 에틸 파라하이드록시벤조에이트, 디하이드로아세트산, 살리실산, 벤조산이 이용 가능하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

효 과

<23> 본 발명에 의하면, 피옥시좀 증식활성화 수용체 델타(PPAR δ) 특이적 리간드는 케라티노사이트 및 섬유아세포에서 PPAR δ 를 활성화시키고, PPAR δ 의 활성화는 타입 I 콜라겐, 타입 III 콜라겐, 피브로넥틴과 같은 세포외기질 단백질의 발현을 촉진함으로써 효과적으로 피부 상처를 치유하고, 피부 노화와 주름을 개선할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<24> 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<25> 실시예 1: 재료와 방법

<26> GW501516는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. 폴리클론 래비트 항-콜라겐 타입 I, 래비트 항-피브로넥틴, 고오트 항-콜라겐 타입 III, 돈키 항-고오트 IgG-HRP 및 고오트 항-래비트 IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

<27> 1-1: 세포배양

<28> 사람 초대배양 케라티노사이트(WelSkin, Seoul, Korea)는 제조업자의 추천에 따라 케라티노사이트 성장 보충제를 함유한 케라티노사이트 성장 배지(Keratinocyte Growth Medium)에서 배양하였다. 사람 초대배양 피부 섬유아세포(WelSkin, Seoul, Korea) 및 피부로부터 각각 유래된 HaCaT 과 Detroit551 사람 세포주는 10% 열로 불활성화시킨 소태아혈청이 보충된 100 U/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37 $^{\circ}$ C, 95% 공기와 5% CO $_2$ 의 대기 조건하에서 배양하였다.

<29> 1-2: 노던 블롯 분석

<30> 총 RNA 중 5 μ g을, 50% 포름아미드를 함유한 러닝 완충용액(40 mM MOPS, 10sodium acetate, and 1EDTA, pH 7.0)에서 15분 동안 65 $^{\circ}$ C에서 열 변성시키고 2.2M 포름알데히드를 함유한 1% 아가로스 겔에서 전기영동하였다. 크기에 따라 분획된 RNA를 모세관 작용에 의해 Hybond-N $^{+}$ nylon membrane (Amersham Biosciences UK Ltd, UK)으로 하룻밤동안 이동시키고 68 $^{\circ}$ C에서 QuikHyb solution (Stratagene, La Jolla, CA, USA)으로 32 P로 표지된 특이적 프로브로 반응시켰다. 멤브레인을 세척한 후, 방사성 신호를 Fuji BAS-2500 Bioimaging Analyzer (Tokyo, Japan)로 검출하였다. 멤브레인은 다시 32 P-표지된 GAPDH cDNA 프로브와 반응시켰다. COL3A1, COL1A1 및 피브로넥틴에 대한 cDNA 프로브는 각각의 염기서열 105-447, 555-896, 436-760 및 1039-1297을 증폭하는 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 제조하였다.

- <31> 1-3: 웨스턴 블롯 분석
- <32> 시약으로 처리된 세포를 차가운 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)에서 용해하였다. 세포 용해물의 일부를 SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동한 후, Hybond-P⁺ polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Biosciences UK Ltd, UK)로 이동시켰다. 멤브레인에서 일반적인 방법에 의해 특이적 항체를 사용하여 단백질을 검출하였다.
- <33> 1-4: 세포 이동 에세이
- <34> 6mm 조직 배양조에서 배양한 세포 단층을 멸균된 외날 면도칼로 긁어서 상처를 낸 후에, 50 nM GW501516 또는 DMSO를 함유한 신선한 배지에서 정치 배양하였다. 지정된 기간 동안 정치배양 후에 세포를 고정하고 트립판 블루로 염색하였다. 고정된 세포를 현미경하에서 관찰하고 상처의 경계 영역을 가로질러 이동한 세포의 개수를 계수하였다.
- <35> 1-5: 상처 치유 연구
- <36> 6주령의 수컷 ICR 마우스(22-25 g)를 Hyochang Science (Daegu, Korea)로부터 구입하고 제어된 환경 조건 하에서 사육하였다. 수술 18-24 시간 전에 마우스에 GW501516 또는 DMSO를 10 mg/kg으로 복강내 주입하고 케타민을 복강내 주입하여 마취시킨 다음, 피부표면의 털을 제거한 후, 마우스의 등 부위에 4개의 두께 5mm 펀치 상처를 가하였다. 상처 부위를 관찰하기 위해 매일 14일까지 사진촬영을 수행하였다. 면역조직화학분석을 위해 (2-3 mm 더 넓은) 상해 주변 상처조직을 수집하고 4% 파라포름알데히드로 고정하였다.
- <37> 1-6: 면역조직화학 분석
- <38> 조직학적으로 검증한 조직을 4% 파라포름알데히드로 고정하고 20% 수크로오스에서 동결보존한 후 OCT (Sakura Finetech Co., Tokyo, Japan)로 포매하고 액체 질소로 미리 차갑게 한 이소펜텐에서 재빨리 동결(snap-frozen)시켰다. 일련의 동결절편 (10 μ m)을 젤라틴으로 코팅된 슬라이드에 표본 제작하고 3분 동안 10 mM 시트르산 나트륨에서 끓였다. 절편을 실온에서 2시간 동안 1% BSA를 함유한 0.1M TBS(Tris-buffered saline)에서 블로킹한 후, 지정된 항체로 4°C에서 하룻밤동안 반응시켰다. 3회 세척한 후 염색은 제조업자의 방법에 따라 DAB(diabaminobenzidine)로 ABC 키트(Vector Labs, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 조직관찰은 OLYMPUS BX50 microscope (Tokyo, Japan)를 사용하였다.
- <39> 1-7: siRNA에 의한 유전자 발현억제(knock-down)
- <40> 세포를 100mm 배양 디쉬에 접종하고 18-24시간 후에 Welfect-Q (WelGENE, Daegu, Korea)를 이용하여 무혈청 배지에서 80 nM의 대조군 siRNA 또는 사람 PPAR δ siRNA (Ambion, Austin, TX, USA)로 형질감염하였다. 6시간 동안 배양한 후 세포에 신선한 배지를 공급한 후 추가로 3일 동안 더 배양하고 지정된 시약을 38시간 동안 처리하였다. 유전자 발현억제 효과는 웨스턴과 노던 블롯 분석 및 리포터 유전자 에세이를 통해 확인되었다.
- <41> **실시예 2: PPAR δ 의 활성화는 상처 치유 과정을 촉진함**
- <42> 상처 치유 과정에서의 PPAR δ 의 역할을 조사하기 위해 마우스 절개 상해 모델 조직에서 상처의 치유, 타입 I 및 III 콜라겐을 포함한 ECM 관련 단백질의 발현 조절에 대한 PPAR δ 의 특이적 리간드인 GW501516의 영향을 조사하였다. GW501516에 의한 PPAR δ 의 활성화는 상해 후 초기 시점에서부터 DMSO(GW501516 용해 용매)로 처리된 상처에 비해 상처의 회복을 유의적으로 가속화시켰다(도 1a 및 도 1b). 8일째에 대조군에 비하여, GW501516로 처리된 군에서는 상처의 봉합이 거의 완전하게 이루어졌다(도 1a).
- <43> 주변 세포에 의한 다량의 세포외 기질 단백질(주로 콜라겐 타입 I 및 III)의 침착이 치유과정중의 상처의 신장 강도증가와 관련이 있으며, 리간드에 의해 활성화된 PPAR δ 가 상처 생검에서 ECM 관련 단백질의 발현에 영향을 미치는지 조사하였다. GW501516의 투여는 DMSO로 처리된 상처와 비교하였을 때 3-8일째에 타입 I 및 III 콜라겐의 발현을 현저하게 증가시켰다. 14일째에 이러한 분자들의 발현증가는 DMSO로 처리된 상처에서와 비슷한 수준으로 점진적으로 감소되었다(도 1c). 이들 단백질의 발현양은 상해 후 3-8일째에 감소된 상처 크기와 부합하였다(도 1). 이러한 결과는 PPAR δ 의 활성화가 상처난 마우스 조직에서 세포외 기질 단백질의 발현을 증가시킴으로써 상처 회복을 가속화시킨다는 것을 의미한다.
- <44> **실시예 3: PPAR δ 의 활성화는 사람 초대배양 상피의 케라티노사이트 및 진피의 섬유아세포의 이동을**

촉진함

<45> 주변 조직으로부터 상처 부위로의 케라티노사이트 및 섬유아세포의 이동은 상처의 상피화 과정에서 잘 알려진 필수적인 단계이고 콜라겐을 포함한 ECM 성분이 케라티노사이트의 이동을 촉진하는 것으로 보인다. 따라서, 사람 초대배양 상피 케라티노사이트 및 진피 섬유아세포에 대한 GW501516의 영향을 확인하기 위해 시험관내 스크래프(Scrape) 상처 모델을 도입하였다. 기준선으로서 증식 지수를 사용하여 GW501516처리그룹과 DMSO로 처리된 그룹을 비교하였을 때 시간 의존적인 방식으로 두 타입 모두의 세포이동을 유의적으로 촉진하였다(도 2a 및 도 2b). 이러한 결과는 PPAR δ 의 활성화는 주변 조직으로부터 케라티노사이트 및 섬유아세포의 상처 부위로의 이동을 가속화시킴으로써 상처 치유 과정을 촉진한다는 것을 의미한다.

<46> **실시예 4: PPAR δ 리간드는 ECM 관련 유전자의 mRNA 발현을 유도함**

<47> GW501516으로 사람 케라티노사이트 유래 HaCaT 및 사람 피부 섬유아세포 유래 Detroit 551 세포를 처리하였을시, 농도 의존적으로 타입 I 콜라겐, 타입 III 콜라겐, 피브로넥틴 mRNA의 발현을 현저하게 유도하였다(도 3a). 최대 발현량은 50-100nM GW501516로 38시간 처리한 후 관찰되었다.

<48> ECM 관련 유전자의 발현유도에 있어서 PPAR δ 의 역할을 검증하기 위해, PPAR δ siRNA를 처리한 세포에서 GW501516의 영향을 조사하였다. 두 타입의 세포에서 GW501516의 존재 또는 부재하에서, PPAR δ siRNA로 형질감염 한 세포에서는 PPAR δ 의 발현이 현저하게 감소된 반면에, 비특이적인 염기서열로 구성된 대조군 siRNA는 PPAR δ 발현에 어떠한 영향도 미치지 않았다(도 3b). 이렇게 siRNA에 의해 매개된 PPAR δ 의 발현억제는 GW501516에 의해 유도된 타입 I 콜라겐, 타입 III 콜라겐, 피브로넥틴의 발현을 억제하였다(도 3c).

도면의 간단한 설명

<49> 도 1a는 마우스 등 부위의 상처를 GW501516 또는 비히클(vehicle)로 처리한 후 지정된 일수별로 상처의 봉합 정도를 보여주는 사진이다.

<50> 도 1b는 마우스 등 부위의 상처를 GW501516 또는 비히클로 처리한 후 지정된 일수별로 상처의 봉합 정도를 나타낸 그래프이다.

<51> 도 1c는 마우스 등 부위의 상처를 GW501516 또는 비히클로 처리한 후 지정된 일수별로 면역조직화학적 분석한 결과를 나타낸 것이다.

<52> 도 2a는 시험관내 상처 치유 에세이를 통해 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 이동에 대한 GW501516의 영향을 나타낸 것이다.

<53> 도 2b는 시험관내 상처 치유 에세이를 통해 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 이동에 대한 GW501516의 영향을 정량적으로 나타낸 그래프이다.

<54> 도 3a는 지정된 농도의 GW501516으로 처리된 케라티노사이트 또는 섬유아세포에서 타입 I 콜라겐, 타입 III 콜라겐, 피브로넥틴의 발현 정도를 나타낸 것이다.

<55> 도 3b는 GW501516의 존재 또는 부재시에 PPAR δ siRNA 또는 대조군 siRNA로 처리된 케라티노사이트 또는 섬유아세포에서 PPAR δ 의 발현 정도를 나타낸 것이다.

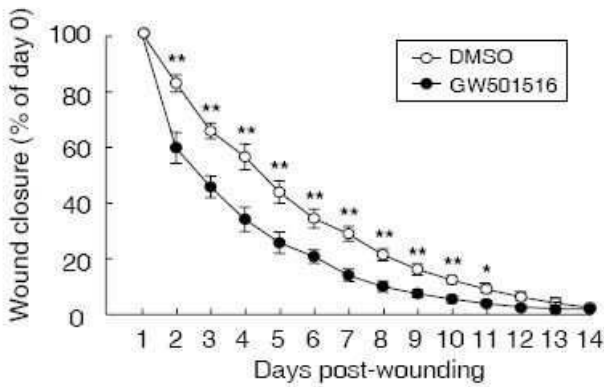
<56> 도 3c는 PPAR δ siRNA 존재 혹은 부재하에서 GW501516으로 처리된 케라티노사이트 또는 섬유아세포에서 타입 I 콜라겐, 타입 III 콜라겐, 피브로넥틴의 발현 정도를 나타낸 것이다.

도면

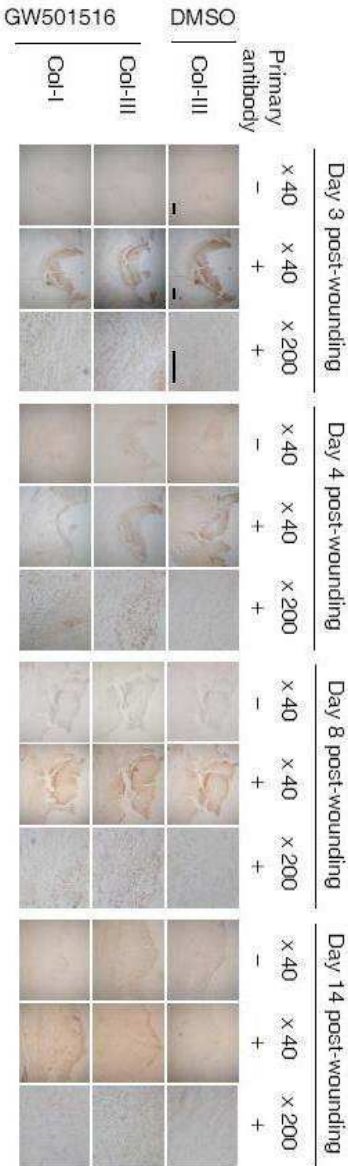
도면1a



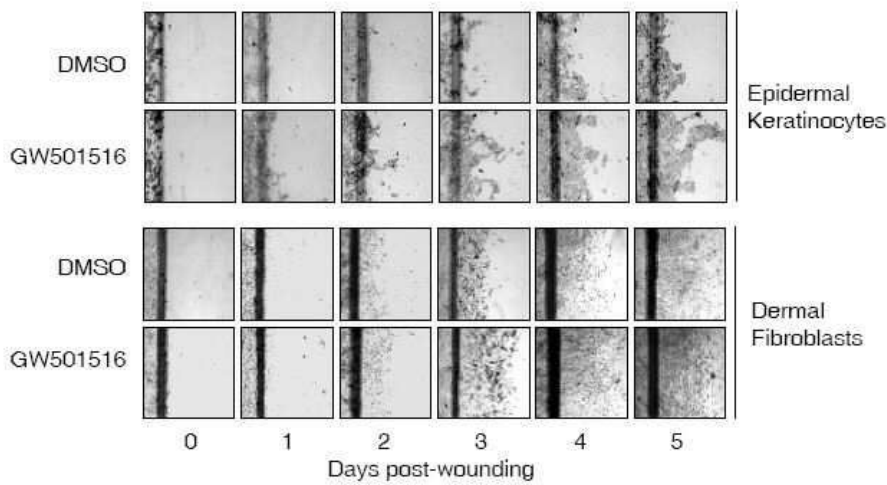
도면1b



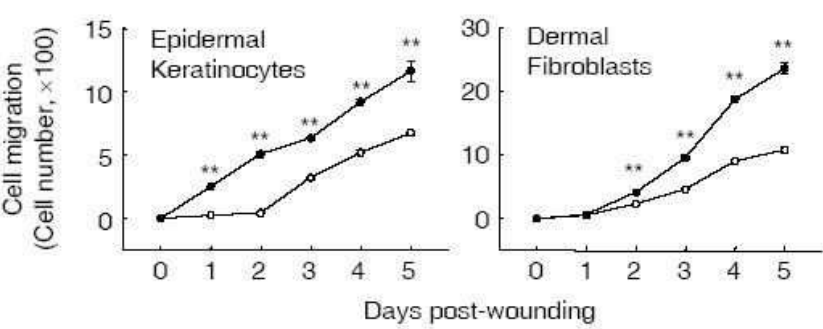
도면1c



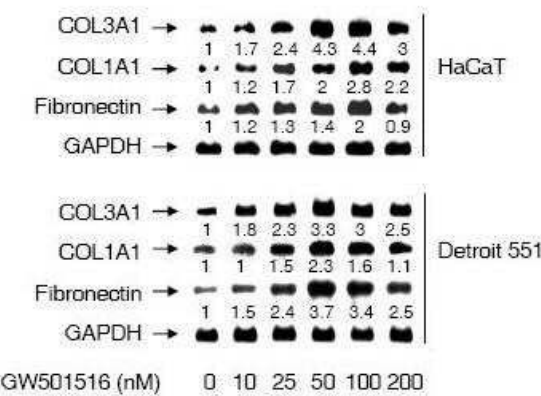
도면2a



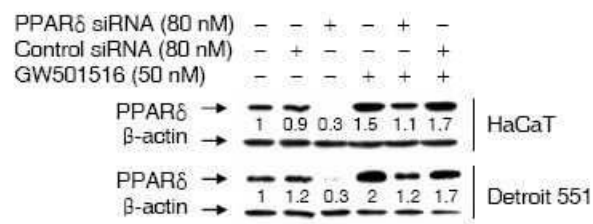
도면2b



도면3a



도면3b



도면3c

