



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월03일

(11) 등록번호 10-2561856

(24) 등록일자 2023년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4436 (2006.01) A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01) A61K 31/575 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01) A61P 17/10 (2006.01)

A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/4436 (2013.01)

A61K 31/47 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0146012(분할)

(22) 출원일자 2021년10월28일

심사청구일자 2022년10월25일

(65) 공개번호 10-2021-0134276

(43) 공개일자 2021년11월09일

(62) 원출원 특허 10-2019-0159385

원출원일자 2019년12월03일

심사청구일자 2019년12월03일

(56) 선행기술조사문헌

W02017209270 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

동국대학교 산학협력단

서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

이경

경기도 고양시 일산동구 위시티1로 6-19, 506동 502호

고혁완

서울특별시 강남구 삼성로51길 37, 112동 1305호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 최연정

(54) 발명의 명칭 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 헤지호그 신호전달계 활성화를 통한 염증성 질환의 예방 또는 치료에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방, 치료, 개선용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 Smo 수용체의 활성화를 통해 헤지호그 신호전달 경로를 활성화시킴으로써, Gli1+ 세포의 증식 및 탈섬모화(deciliation)를 억제하여 표피 세포의 과증식을 억제하고, Th17 세포 매개성 염증 반응을 억제하는 효과를 나타내므로 염증성 질환의 새로운 치료 전략으로서 활용될 수 있으며, 따라서 본 발명의 조성물은 건선, 접촉성 피부염, 알레르기 피부질환 등을 포함하는 염증성 또는 과증식성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/5377 (2013.01)

A61K 31/575 (2013.01)

A61P 17/06 (2018.01)

A61P 17/10 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

(73) 특허권자

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김준

대전광역시 유성구 대덕대로541번길 68, 103동
1004호

이시형

서울특별시 서초구 동광로45길 19, 201호

이한규

제주특별자치도 제주시 구남로7길 23, 나동102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130015
과제번호	2018R1A5A2023127
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	암 관해 표적제어 혁신의약품 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	동국대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104897
과제번호	2015M3A9B6027820
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	인체내 재생 조직 항상성 유지 기능에 있어서 섬모의 역할 규명 및 제어기술 개발
기 여 율	70/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2015.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

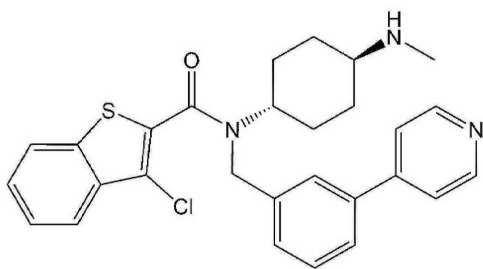
청구항 1

헤지호그(Hedgehog) 신호전달계 활성화제(activator)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

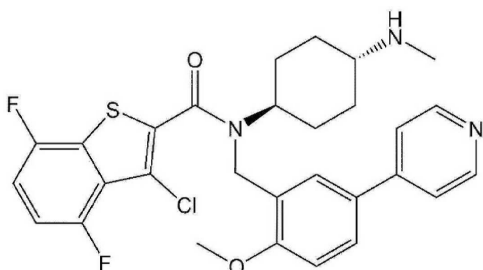
상기 염증성 피부 질환은 접촉성 피부염, 알레르기 피부질환, 아토피성 피부염, 및 여드름으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이고,

상기 헤지호그 신호전달계 활성화제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 활성화제는 Smo(smoothened) 수용체의 아고니스트(agonist)인 것을 특징으로 하는, 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 활성화제는 Th17 세포-매개성 염증반응을 억제하는 것을 특징으로 하는, 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 활성화제는 표피 세포의 과증식을 억제하는 것을 특징으로 하는, 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 과증식 억제는 Gli1 발현 세포의 모낭주위 이동을 억제함으로써 달성되는 것을 특징으로 하는, 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

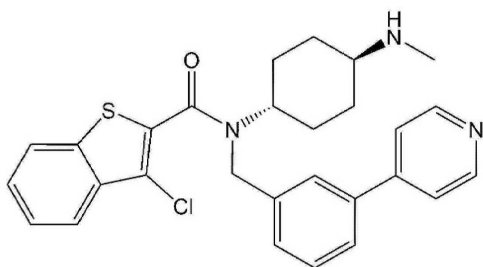
청구항 8

헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물로서

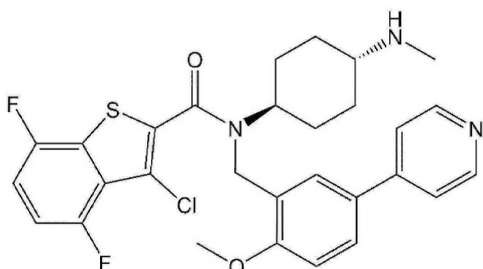
상기 염증성 피부 질환은 접촉성 피부염, 알레르기 피부질환, 아토피성 피부염, 및 여드름으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이고,

상기 헤지호그 신호전달계 활성화제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



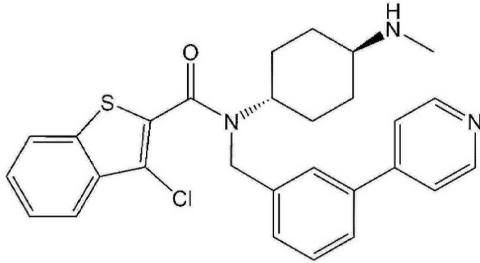
청구항 9

헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물로서,

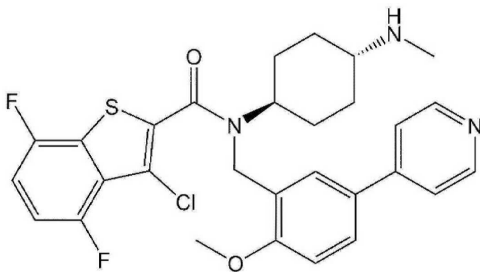
상기 염증성 피부 질환은 접촉성 피부염, 알레르기 피부질환, 아토피성 피부염, 및 여드름으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이고

상기 헤지호그 신호전달계 활성화제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 헤지호그 신호전달계 활성화를 통한 염증성 질환의 예방 또는 치료에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방, 치료, 개선용 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 대표적인 염증성 질환 중 하나인 건선은 인편상 홍반 플라크(scaly erythematous plaques)가 나타나는 것을 특징으로 한다. 또한, 표피의 비후화(thickening) 및 과립층의 손실과 같은 건선의 전형적인 조직학적 소견은 증가된 세포 증식 및 각질형성세포(keratinocyte)의 분화 손상에 의해 야기된다. 이에 더하여, 건선은 림프구(lymphocytes), 수지상 세포(dendritic cells), 대식세포(macrophages) 및 비만세포(mast cells)를 포함한 수많은 염증 세포의 침윤이 영향을 받은 진피에서, 특히 혈관 주변 영역에서 발생한다. 건선 병변의 사이토카인(cytokine) 프로파일은 17형 보조 T세포(Th17)가 건선의 발병 기전에서 주요한 역할을 한다는 것을 보여주는 것이다. 마우스에서 톨-유사 수용체(Toll-like receptor) 7/8 작용제 이미퀴모드(Imiquimod, IMQ)를 국소적으로 도포하는 경우, 인터루킨(IL)-17 및 IL-22에 의해 촉진된 피부 염증이 유도되고, 건선의 병변 피부를 모방한 표피의 과형성이 유발된다.

[0004] 한편, 헤지호그 신호전달 경로(Hedgehog signaling pathway)는 배아세포의 적절한 발달을 조정하고, 기저세포암(basal cell carcinoma) 및 수모세포종(medulloblastoma)을 포함한 일부 인간의 암에서 종양 형성을 유도한다. 최근, 헤지호그 신호전달 경로의 척추동물-특이적 및 1차 섬모-의존적 조절 메커니즘이 밝혀진바 있다. 간단히 말하면, 헤지호그는 분비된 리간드 단백질이며, Ptch1(Patched1) 막관통수용체(Transmembrane receptor)에 결합하여 막관통단백질 Smo(Smoothed)의 탈억제(derepression)를 초래한다. 이렇게 활성화된 Smo는 1차 섬모로 이동하고 섬모의 끝 부분에서 활성화제 형태의 Gli 전사 인자의 생성을 촉진한다. Gli는 핵에서 Gli1 및 Ptch1을 포함한 헤지호그 표적 유전자의 발현을 촉발시킨다.

[0005] 피부의 헤지호그는 배아의 발달 기간 및 성인의 모발 주기에서 모낭(hair follicle)의 형태형성(morphogenesis)

s)에 중요한 역할을 한다. 모낭의 벌지 영역(Bulge region)은 모낭의 재생 주기를 지원하는 줄기세포를 수용하는 것으로 나타났다. 벌지 줄기세포는 주로 모낭의 분화하는 내층(inner layer)을 둘러싸는 외부의 모근초세포(root sheath cells)를 발생시킨다. 또한, 계통-추적(lineage-tracing) 실험은 벌지 줄기세포의 다분화능(multipotent)에 의해 이들이 급성 상처 치유에 기여할 수 있음을 입증하였다. 표피가 손상된 후, 벌지 줄기세포는 상처의 중심으로 이동하여 그들의 계통을 표피세포를 생성하는 변화 증폭 세포(transit amplifying cells)로 변경시킨다. 헤지호그 반응 유전자 *Gli1*의 발현에 의해 표지된 벌지 세포는 다분화성 벌지 줄기세포로서 작용한다. *Gli1*-발현 세포는 모낭의 재생을 담당할뿐만 아니라 상처의 치유 과정에서 표피세포를 생성한다. 모낭을 자극하는 감각 뉴런에 의해 분비되는 소닉 헤지호그는 벌지 줄기 세포에서 *Gli1*의 발현을 매개하는 것으로 보인다.

[0006] 이의 유사분열 효과와는 대조적으로, 최근의 연구는 헤지호그 신호전달이 성인의 폐 휴지기(quiescence)의 유지를 위해 필요하다는 것을 보여주었다. 헤지호그 신호전달의 하향조절(downregulation)은 폐 손상의 급성기(acute phase) 동안 발생하며, 이는 상처가 치유되는 동안 세포의 증식을 위한 전제 조건이다. 또한, 헤지호그 신호전달은 대장염(colitis) 모델에서 Th17 세포-매개성 염증을 나타내는 면역 조절 효과를 갖는 것으로 나타났다. 텍스트란 소듐 설페이트(dextran sodium sulfate)에 의해 유도된 대장염 모델에서, *Gli1*⁺ 골수세포(myeloid cells)가 증가하고 헤지호그 신호전달의 활성화에 반응하여 면역관용(tolerogenic) 역할을 하는 것으로 제안되었다. 유전적 또는 약리학적 조작에 의한 헤지호그의 하향조절은 자발적인 장 염증 또는 심한 대장염 표현형을 유도하는 반면, 헤지호그의 활성화는 염증을 개선시킨다. 그러나, 염증성 질환의 발병 기전에서 헤지호그의 역할은 밝혀진 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Bowcock, A., Krueger, J. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. Nat Rev Immunol 5, 699-711 (2005) doi:10.1038/nri1689

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 헤지호그(Hedgehog) 신호전달계 활성화제(activator)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환 예방 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 헤지호그(Hedgehog) 신호전달계 활성화제(activator)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 헤지호그 신호전달계 활성화제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0016] 더욱이, 본 발명은 상기 헤지호그 신호전달계 활성화제의, 염증성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

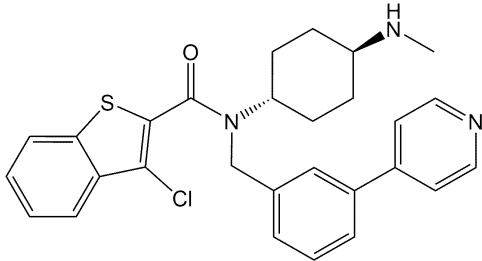
[0017] 또한, 본 발명은 헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 조성물은 의약품 조성물, 화장품 조성물 및 식품 조성물을 포함한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 활성화제는 Smo(smoothened) 수용체의 아고니스트(agonist)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

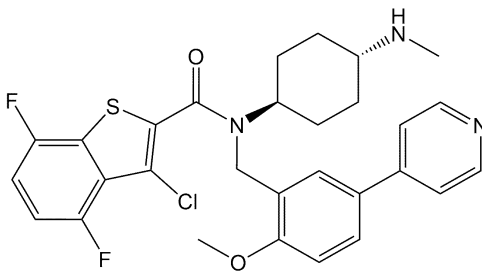
[0020] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 활성화제는 하기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 화합물 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] [화학식 1]



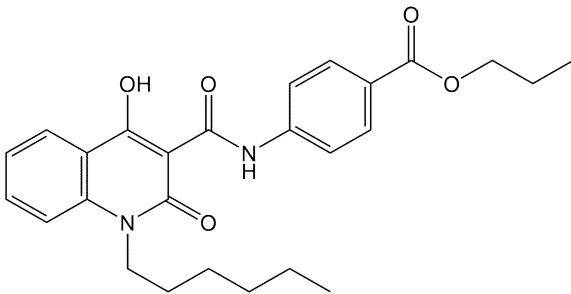
[0022]

[0025] [화학식 2]



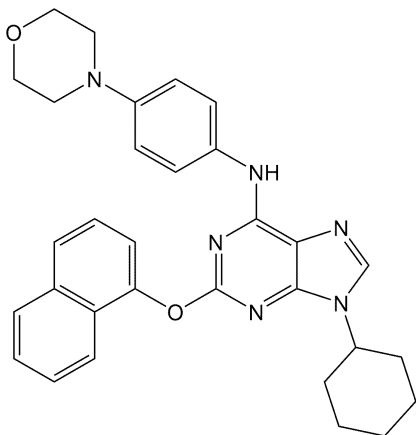
[0026]

[0028] [화학식 3]



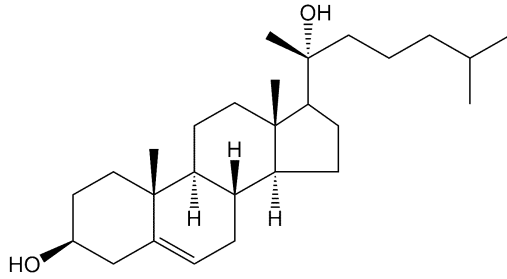
[0029]

[0031] [화학식 4]



[0032]

[0034] [화학식 5]



[0035]

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 활성화제는 Th17 세포-매개성 염증반응을 억제하는 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 활성화제는 표피 세포의 과증식을 억제하는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 과증식 억제제는 Gli1 발현 세포의 모낭주위 이동을 억제함으로써 달성되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 따른 헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 Smo 수용체의 활성화를 통해 헤지호그 신호전달 경로를 활성화시킴으로써, $Gli1^{+}$ 세포의 증식 및 탈섬모화(deciliation)를 억제하여 표피 세포의 과증식을 억제하고, Th17 세포 매개성 염증 반응을 억제하는 효과를 나타낸다. 즉, 본 발명의 조성물은 다양한 염증성 질환에서 염증 세포의 활성을 억제함으로써 염증성 질환의 예방, 개선 및 치료 효과를 갖는 것이다. 이러한 효과는 기존에 알려진 염증성 질환의 치료법과는 다른 새로운 치료 전략의 가능성을 시사하는 것이다. 따라서, 본 발명의 조성물은 건선을 포함하는 염증성 질환 또는 과증식성 피부질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1a 내지 도 1f는 헤지호그 신호전달이 이미퀴모드로 유도된 건선 피부 염증에서 하향조절됨을 보여주는 도이다: (도 1a) 7일 동안 이미퀴모드 또는 비히클을 처리한 마우스 귀의 대표 이미지; (도 1b) 이미퀴모드(IMQ) 또는 비히클 처리에 따른 귀 두께의 변화를 나타낸 그래프; (도 1c) 5일 동안 이미퀴모드 또는 비히클을 처리한 귀 피부에서 $Gli1$ 및 $Ptch1$ mRNA의 발현을 나타낸 그래프; (도 1d) 표시된 일 동안 비히클 또는 이미퀴모드(IMQ)가 도포된 마우스 귀 피부에서 GLI1 발현을 확인한 웨스턴 블롯 이미지; (도 1e) 타목시펜 처리 $Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}$ 마우스의 이미퀴모드 또는 비히클 도포 귀 피부의 공초점 현미경 이미지(scale bar, 100 μ m); (도 1f) 실험 개략도 및 타목시펜 유도 $Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}$ 마우스의 이미퀴모드가 처리된 등 피부의 공초점 현미경 이미지(scale bar, 100 μ m).

도 2a 내지 도 2h는 증가된 헤지호그 신호전달이 이미퀴모드에 의해 유도된 건선-유사 염증의 발달을 억제함을 보여주는 도이다: (도 2a) 실험 개략도; (도 2b) 이미퀴모드의 처리 기간 동안 SAG 또는 DMSO를 주사한 마우스의 귀 두께를 나타낸 그래프; (도 2c) 이미퀴모드에 의해 유도된 귀 두께의 증가 및 SAG 처리에 의한 증상 완화를 보여주는 H&E 염색 이미지(scale bar, 200 μ m); (도 2d) 이미퀴모드 또는 이미퀴모드와 SAG 처리에 따른 mRNA 발현량을 비교한 그래프; (도 2e) 이미퀴모드 또는 이미퀴모드와 SAG 처리에 따른 GLI1 단백질의 발현을 확인한 웨스턴 블롯 이미지; (도 2f) 실험 개략도; (도 2g) 이미퀴모드의 처리 기간 동안 $Gli1^{CreER/+};R26^{SmoM2}$ 또는 $Gli1^{CreER/+}$ 마우스의 귀 두께를 나타낸 그래프; (도 2h) 이미퀴모드를 처리한 $Gli1^{CreER/+};R26^{SmoM2}$ 또는 $Gli1^{CreER/+}$ 마우스의 귀 피부에서 $Gli1$ 및 $Ptch1$ mRNA의 발현을 비교한 그래프.

도 3a 내지 도 3f는 이미퀴모드로 유도된 피부 염증에 대한 헤지호그 신호전달의 억제 효과가 $Foxp3^{+}$ Treg 및 IL-10와 연관되어 있음을 보여주는 도이다: (도 3a) 이미퀴모드를 도포한 귀 피부에서 SAG 또는 DMSO 처리에 따른 $I117a$, $I117f$ 및 $I122$ 의 mRNA 발현을 비교한 그래프; (도 3b) 이미퀴모드를 도포한 등 피부에 SAG 또는 DMSO를 함께 처리한 후 CD3 또는 MHC II를 면역 염색을 통하여 확인한 이미지(scale bar, 10 μ m); (도 3c) 각 약물을 처리된 마우스로부터 진피 내의 각 항체로 표지된 세포의 수를 나타낸 그래프; (도 3d) 이미퀴모드를 도

포한 귀 피부에서 SAG 또는 DMSO 처리에 따른 *I110* 및 *Foxp3*의 mRNA 발현을 비교한 그래프; (도 3e) 항-Foxp3 항체로 면역 염색한 대표 이미지(scale bar, 10 μ m); (도 3f) 각 약물을 처리된 마우스로부터 진피 내 Foxp3+ 세포의 수를 나타낸 그래프.

도 4a 내지 도 4e는 이미퀴모드-유도 피부 염증에서 나타나는 Gli1+ 세포의 모낭주위 이동 및 증식의 증가가 SAG에 의해 억제됨을 보여주는 도이다: (도 4a) 타목시펜으로 유도된 *Gli1*^{CreER/+}; *R26*^{LacZ/+} 마우스 피부에서 이미퀴모드 처리에 따른 X-gal 염색 이미지[scale bar, 50 μ m(상단 패널), 1mm(하단 패널)]; (도 4b) 실험 개략도(상단 좌측 패널), 0일, 1일, 3일, 5일 및 7일에 획득한 피부 샘플의 면역 형광 염색 이미지(하단 패널) 및 Gli1+ 세포의 모낭주위 확장을 나타내는 모낭의 백분율 그래프(상단 우측 패널); (도 4c) SAG 또는 DMSO를 처리한 타목시펜으로 유도된 *Gli1*^{CreER/+}; *R26*^{LacZ/+} 마우스의 X-gal 염색 이미지[scale bar, 50 μ m(상단 패널), 1mm(하단 패널)]; (도 4d) 이미퀴모드 또는 비히클을 처리한 타목시펜으로 유도된 *Gli1*^{CreER/+}; *R26*^{tdTomato/+} 마우스의 면역 형광 염색 이미지(scale bar, 20 μ m); (도 4e) 이미퀴모드 또는 비히클을 처리한 타목시펜으로 유도된 *Gli1*^{CreER/+}; *R26*^{tdTomato/+} 마우스의 EdU 표지된 tdTomato+ 세포의 백분율 그래프.

도 5a 및 도 5b는 이미퀴모드에 의해 유도된 Gli1+ 세포의 탈섬모화가 헤지호그 신호전달에 의해 회복됨을 보여주는 도이다: (도 5a) 타목시펜으로 유도된 *Gli1*^{CreER/+}; *R26*^{tdTomato/+} 마우스에서 이미퀴모드 또는 비히클 처리에 따른 면역 형광 염색 이미지(scale bar, 20 μ m); (도 5b) 타목시펜으로 유도된 *Gli1*^{CreER/+}; *R26*^{tdTomato/+} 마우스에서 이미퀴모드 또는 비히클 처리에 따른 섬모상 tdTomato+ 세포의 백분율 그래프.

도 6은 염증성 사이토카인이 피부에서 Gli1+ 세포 집단의 확장 및 헤지호그 신호전달에 미치는 영향을 보여주는 도이다(scale bar, 20 μ m).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본 발명자들은 기존에 알려진 바와는 다르게 헤지호그(Hedgehog) 신호전달 경로의 활성화에 따른 건선 치료 효과를 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에서는, 이미퀴모드(Imiquimod)로 유도된 건선 동물 모델에서 헤지호그 신호전달 경로가 억제된다는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [0046] 본 발명의 다른 실시예에서는, 건선 동물 모델에서 헤지호그 신호전달의 활성화제를 투여한 경우 건선의 발병이 억제되고, 나아가 치료 효과가 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 헤지호그 신호전달 경로를 활성화시킴에 따라 T 림프구 및 수지상 세포가 감소되고, Th17 이펙터 사이토카인이 하향조절되며, 조절 T세포 및 IL-10이 증가되어 이미퀴모드-유도 피부 염증의 억제 효과를 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0048] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는, 헤지호그 신호전달 경로의 활성화에 의해 Gli1+ 세포의 모낭주위 이동 및 증식이 억제됨으로써 표피 세포의 과증식을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(실시예 5 내지 7 참조).
- [0049] 따라서, 본 발명은 헤지호그(Hedgehog) 신호전달계 활성화제(activator)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0050] 본 명세서에서 사용된 용어, “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 건선 증상을 차단하거나, 건선 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0051] 본 명세서에서 사용된 용어, “치료”란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 건선 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0052] 한편, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적 조성물로 제조하기 위하여 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및/또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0053] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리

케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여된다. 본 발명에 있어서, “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0055] 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 경구 투여, 비강 내 투여, 경기관지 투여, 동맥 주사, 정맥 주사, 피하 주사, 근육 주사 또는 복강 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 일일 투여량은 하루 일회 내지 수회 나누어 투여할 수 있다.

[0058] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0059] 본 명세서에서 사용된 용어, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 건선과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0060] 본 명세서에서 사용된 용어, “의약품”은 사람이나 동물의 질병을 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물질들 중 의약품보다 작용이 경미한 물질들을 의미한다. 예를 들어, 약사법에 따른 의약품은 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람/동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

[0061] 본 발명의 조성물을 의약품 조성물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 헤지호그 신호전달계 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0064] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 헤지호그 신호전달계 활성화제뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명의 조성물은 헤지호그 신호전달계 활성화제 이외에, 상기 활성화제와 반응하여 피부보호 효과를 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 유기 자외선 차단제를 혼합하여 사용할 수도 있다. 상기 유기 자외선 차단제로는 글리세릴파바, 드로메트리졸트리실록산, 드로메트리졸, 디갈로일트리올리에이트, 디소듐페닐 디벤즈이미다졸테트라실포네이트, 디에틸헥실부타미도트리아존, 디에틸아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트, 디이에이-메톡시신나메이트, 로우손과 디하이드록시아세톤의 혼합물, 메틸렌비스-벤조트리아졸테트라메칠부틸페놀, 4-메틸벤질리덴캠퍼, 멘틸안트라닐레이트, 벤조페논-3(옥시벤존), 벤조페논-4, 벤조페논-8(디옥시페벤존), 부틸메톡시디벤조일메탄, 비스에틸헥실옥시페놀메톡시페닐트리아진, 시녹세이트, 에틸디하이드록시프로필파바, 옥토크릴렌, 에틸헥실디메틸파바, 에틸헥실메톡시신나메이트, 에틸헥실살리실레이트, 에틸헥실트리아존, 이소아말-p-메톡시신나메이트, 폴리실리콘-15(디메치코디에틸벤잘말로네이트), 테레프탈릴리덴디캠퍼설포닉애씨드 및 그 염류, 티이에이-살리실레이트 및 아미노벤조산(파바)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

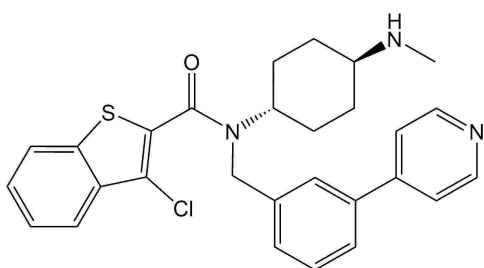
[0066] 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩,

비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 립스틱, 메이크업 베이스, 파운데이션, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

[0067] 본 발명에 있어서, 상기 활성화제는 Smo(smoothened) 수용체의 아고니스트(agonist)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

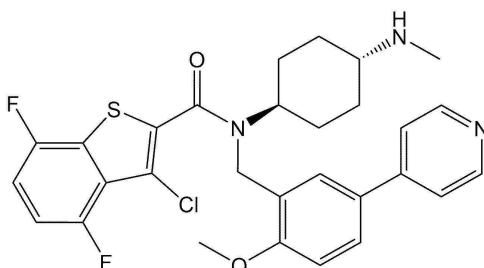
[0068] 또한, 본 발명에 있어서 상기 활성화제는 하기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 화합물 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 조성물은, 바람직하게는 하기 화학식 1의 화합물[3-Chloro-N-(trans-4-(methylamino)cyclohexyl)-N-(3-(4-pyridinyl)benzyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있으나, 헤지호그 신호전달을 활성화시킬 수 있는 화합물이라면 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 헤지호그 신호전달 활성화제인 하기 화학식 1의 화합물(SAG), 하기 화학식 2의 화합물(SAG 21k), 화학식 3의 화합물(GSA 10), 화학식 4의 화합물(Purmorphamine) 또는 화학식 5(20(S)-Hydroxycholesterol)의 화합물 등, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다.

[0069] [화학식 1]



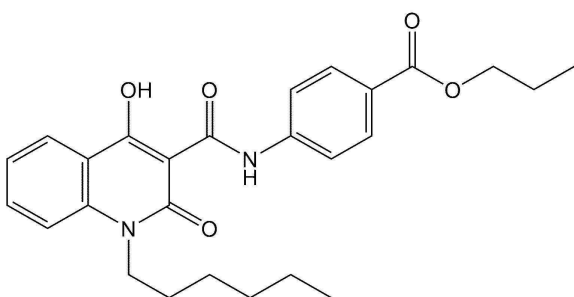
[0070]

[0073] [화학식 2]



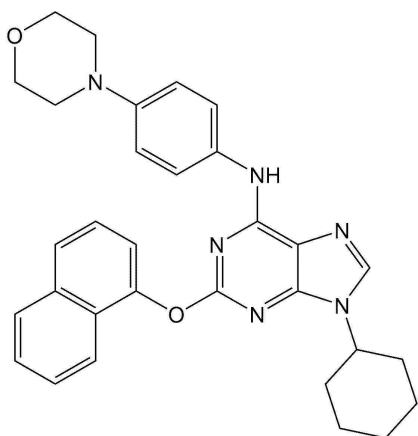
[0074]

[0076] [화학식 3]



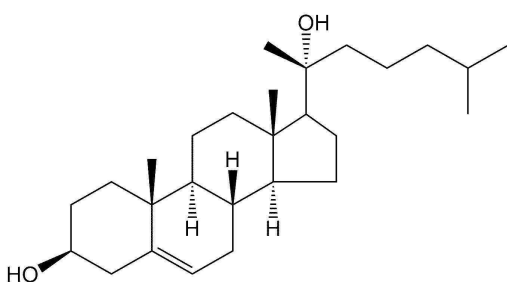
[0077]

[0079] [화학식 4]



[0080]

[0082] [화학식 5]



[0083]

[0085] 본 명세서에서 사용된 용어, “약학적으로 허용 가능한”이라는 용어는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점이나 합병증 없이 이득/위험 비가 합리적이어서 대상체(예: 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 건전한 의학적 판단의 범위 이내인 화합물 또는 조성물을 의미한다.

[0086] 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용할 수 있다.

[0087] 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다.

[0088] 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살 레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0089] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1의 화합물을 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0090] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 상기 화학식 1의 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또

는 칼슘염을 제조하는 것이 제약 상 적합할 수 있다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

- [0091] 본 발명의 화합물의 범위에는 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 이성질체, 수화물 및 용매화물이 모두 포함될 수 있다.
- [0092] 본 발명에 있어서, 상기 활성화제는 Th17 세포-매개성 염증반응을 억제하는 것일 수 있다.
- [0093] 본 발명에 있어서, 상기 활성화제는 표피 세포의 과증식을 억제하는 것일 수 있다.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 과증식 억제는 Gli1 발현 세포의 모낭주위 이동을 억제함으로써 달성되는 것일 수 있다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 질환 급성 또는 만성 장기이식 거부반응, 이식편대숙주병, 염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 대장염, 염증성 피부 질환, 다발성 경화증, 궤양염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 알러지성 결막염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절염, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절염, 장질환 척추염, 연소자성 관절염, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절염, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 루게릭병, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성 근육통, 관절세포 동맥염, 칼슘 결정침착 관절염, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염, 신경병증성 관절질환(neuropathic joint disease 또는 charcot joint), 출혈성 관절염(hemarthrosis), 알레르기 자반병, 비후성 골관절염, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 베체트씨병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(bronchopulmonary dysplasia), 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 동맥경화, 알츠하이머성 치매, 가족성 한랭자가염증 증후군(familial cold autoinflammatory syndrome), 머클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome), 신생아발병 다발성 염증성질환(neonatal multisystem inflammatory disease), 만성 유아 신경피부관절증후군(chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome), 성인발증형 스틸병(adult-onset Still's disease), 접촉성 피부염, 포상기태(hydatidiform mole), PAPA 증후군(syndrome of pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne), 고면역글로불린 D 증후군(hyperimmunoglobulin d syndrome), 크리오피린 관련 주기적 증후군(cryopyrin-associated periodic syndrome), 각막염, 결막염, 망막염, 망막혈관염, 포도막염, 안검염, 알레르기 결막염, 건성 안(dry eye), 전신성 경피증(progressive systemic sclerosis), 다발성 근염(polymyositis), 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증(myasthenia gravis), 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa) 및 섬유조절염(fibromyalgia syndrome)일 수 있고, 바람직하게는 염증성 피부질환일 수 있으며, 보다 바람직하게는 건선, 아토피성 피부염, 습진성 피부염, 접촉성 피부염, 지루성 피부염, 장미색 비강진, 편평 태선, 혈관염, 모공성 홍색 비강진, 봉와직염, 모낭염, 웅종, 천포창, 수포성(bulus) 천포창, 표피 수포증, 담마진, 혈관 부종, 맥관염, 홍반 또는 피부 호산구 증가증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0096] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 염증성 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0097] (a) 동물에 염증성 질환을 유도하는 단계;
- [0098] (b) 상기 염증성 질환을 유도한 병변 조직에서 Gli1 및 Ptch1으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계;
- [0099] (c) 염증성 질환 치료제 후보 물질을 상기 병변 조직에 처리하는 단계;
- [0100] (d) 후보 물질을 처리한 병변 조직에서 Gli1 및 Ptch1으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0101] (e) 상기 (d) 단계에서 측정된 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 상기 (b) 단계에서의 수준과 비교하여 증가한 경우의 후보 물질을 선택하는 단계.
- [0103] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는

원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0104] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0106] [실시예]

[0107] 실시예 1: 실험 재료 및 방법

[0108] 1.1. 실험동물

[0109] *Gli1*^{CreER/+}, *CD11c*^{Cre/+}, *R26*^{SmoM2/+}, *Ptch1*^{LacZ/+}, *R26*^{RtdTomato/+}, 및 *R26R*^{LacZ/+} 마우스는 한국과학기술원(KAIST), 동국대학교의 동물 시설에 수용하여 C57BL/6N 백그라운드로 사육하였다. 모든 마우스 실험, 사육 및 번식은 KAIST와 동국대학교의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 받았다. 실험은 7 내지 11 주령의 동물을 사용하여 수행되었다. 타목시펜(Tamoxifen, Sigma-Aldrich, 미국)은 옥수수 오일(10mg/ml)에 용해시키고 25mg/kg으로 복강내 주사하였다. EdU(200mg/kg)는 희생 1 시간 전에 복강내 주사하였다. 배측 몸통 피부에 이미퀴모드를 바르기 전에, 타목시펜 또는 SAG(Smoothened agonist)를 포함하는 약물을 투여하기에 2일 앞서 제모기를 사용하여 모발을 제거하였다.

[0111] 1.2. 이미퀴모드-유도 건선 모델 및 *in vivo* 실험

[0112] 마우스의 귀 피부에, 20mg의 5% 이미퀴모드 크림(Aldara, 3M Pharmaceuticals, 미국) 또는 비히클(Zeroid, Neopharm, 대한민국)을 연속 7일 동안 국소적으로 도포하였다. 배측 몸통의 피부를 사용한 실험의 경우, 귀 피부에 도포하는 것과 동일한 방식으로 30mg의 이미퀴모드 또는 비히클을 도포하였다. SAG(566660, Merck Millipore, 미국)는 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시키고 이미퀴모드 처리 1일 전부터 연속적인 7일에 걸쳐 격일로 1kg 체중 당 20mg의 용량으로 복강내 주사하였다. 이미퀴모드 처리 기간 동안 캘리퍼(calipers)를 사용하여 귀의 중심 영역에서의 귀 두께를 측정하였다. 재조합 마우스에는 TNF-alpha (20 µl에서 50ng, R&D Systems, 410-MT), IL-1 bata (20 µl에서 50ng, R&D Systems, 401-ML), IL-17A (20 µl에서 500ng, R&D Systems, 421-ML), IL-22 (20 µl에서 1 µg, R&D Systems, 582-ML) 및 IFN-gamma (20 µl에서 200ng, R&D Systems, 485-MI)를 타목시펜 주사 3일 뒤 등의 한쪽 면에 피내(intradermal) 주사하였다. 동일한 부피(20 µl)의 PBS를 등의 반대편에 주사하였다. 사이토카인 혼합물은 본 발명에 사용된 모든 종류의 사이토카인의 농도가 동일하도록 하였다. PBS 또는 사이토카인을 연속으로 2일 동안 주사하고, 마지막 주사로부터 24시간 후에 면역형광법(immunofluorescence) 및 qRT-PCR를 위한 피부 샘플을 수집하였다.

[0114] 1.3. 면역블롯팅(Immunoblotting)

[0115] 마우스 피부는 1mM PMSF 1X 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitor, Roche, 스위스)가 첨가된 변형된 RIPA 완충액[50mM Tris·HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.25% Na-deoxycholate]으로 용해시켰다. 추출물은 원심분리에 의해 정화시켰다. 단백질 농도는 BCA 분석(Pierce, 미국)에 의해 결정되었다. SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 단백질을 분리한 후, 이를 Trans-Blot SD 반건식 전달 시스템(Bio-Rad, 미국)를 사용하여 PVDF 멤브레인(polyvinylidene difluoride membrane, Millipore, 미국)으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 5% 탈지유(skim milk)를 함유한 TBST에서 1시간 동안 블로킹 하고, 다음의 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션 하였다: 래빗 항-Gli1(1:1000; Cell Signaling Technology, 2534, 미국) 및 마우스 항-α 튜불린(1:5000; Sigma-Aldrich, T5168, 미국). 세척 후, 막을 2시간 동안 2차 항체와 함께 인큐베이션 하였다. 신호는 화학발광 시약(chemiluminescent reagent, Millipore, 미국)으로 검출하였다.

[0117] 1.4. RNA 추출 및 qRT-PCR(quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction)

[0118] RNA 추출은 TRIzol(Invitrogen, 미국)을 사용하여 마우스 피부로부터 분리하고, cDNA를 First-Strand cDNA Synthesis kit(Takara, 일본)로 합성하였다. RT-PCR은 SYBR Premix Ex Taq™(Takara, 일본)와 함께 Rotor Gene Q 기기(Qiagen, 독일)를 사용하여 수행되었다. 본 발명에서 *Gli1*, *Ptch1*, *Gli2*, *Gli3*, *Smo*, *Sufu*, *Foxp3* 및 *IL10*의 정량을 위해 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0119] *Gli1*, 정방향, 5'-GGTGTGCTGCCTAAGCCAGTGCCTC-3' (서열번호 1);

[0120] *Gli1*, 역방향, 5'-GTGCCAATCCGGTGGAGTCAGACCG-3' (서열번호 2);

- [0121] *Ptch1*, 정방향, 5'-AATTCTCGACTCACTCGTCCA-3' (서열번호 3);
- [0122] *Ptch1*, 역방향, 5'-CTCCTCATATTTGGGGCCTT-3' (서열번호 4);
- [0123] *Gli2*, 정방향, 5'-CCATTATGACCCTCACTCTGTC-3' (서열번호 5);
- [0124] *Gli2*, 역방향, 5'-GGGTGTGGAGAAAGTCGTATC-3' (서열번호 6);
- [0125] *Gli3*, 정방향, 5'-GTGGTTCCTATGGGCACTTATC-3' (서열번호 7);
- [0126] *Gli3*, 역방향, 5'-GTCGGCTTAGGATCTGTTGATG-3' (서열번호 8);
- [0127] *Smo*, 정방향, 5'-CTCGGGCAAGACATCCTATTT-3' (서열번호 9);
- [0128] *Smo*, 역방향, 5'-ACTCACGGAGTCTCCATCTAC-3' (서열번호 10);
- [0129] *Sufu*, 정방향, 5'-CTCGAGAGCGTGCATCTAAA-3' (서열번호 11);
- [0130] *Sufu*, 역방향, 5'-GTCGCCTGTGATACTCTTGTAG-3' (서열번호 12);
- [0131] *Foxp3*, 정방향, 5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA-3' (서열번호 13);
- [0132] *Foxp3*, 역방향, 5'-GCTGATCATGGCTGGGTTGT-3' (서열번호 14);
- [0133] *IL10*, 정방향, 5'-TGAATTCCCTGGGTGAGAAG-3' (서열번호 15);
- [0134] *IL10*, 역방향, 5'-CTCTTACCTGCTCCACTGC-3' (서열번호 16).
- [0135] *GAPDH*는 내부 대조군으로서 사용하였고, 본 발명에서 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다:
- [0136] *GAPDH*, 정방향, 5'-AACAGCAACTCCCACTCTTC-3' (서열번호 17);
- [0137] *GAPDH*, 역방향, 5'-CCTGTGCTGTAGCCGTATT-3' (서열번호 18).
- [0138] 상대적인 mRNA 수준은 Rotor Gene Q 시리즈 소프트웨어의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 계산되었다. *TNFA*, *IL1B*, *IL6*, *IL17A*, *IL17F*, *IL-22*, *IL-23*, *CXCL10*, *CCL20*, *KRT14*, *S100A8* 및 *S100A9*의 mRNA 수준은 TaqMan 유전자 발현 분석(Applied Biosystems, 미국)을 사용하여 측정되었다.
- [0140] **1.5. 조직 준비, 면역조직화학(immunohistochemistry), 현미경 및 이미지 분석**
- [0141] 마우스 피부를 표지된 날에 해부하고, 4시간 동안 4℃에서 4% PFA에 고정시켰다. 이어서, 조직을 Tissue-Tek® O.C.T.™ 컴파운드(Sakura, 일본)에 매립시키고 12μm로 절편화 하였다. 1시간 동안 5% FBS로 블로킹한 후, 다음의 1차 항체를 4℃에서 밤새 처리하였다: 래빗 항-Arl13b(1:800; Proteintech, 17711-1-AP, 미국) 및 래트 항-K8(1:500; Developmental studies hybridoma bank, clone TROMA-I). 그 후, Alexa 488-컨쥬게이트드 2차 항체(1:1000; Life Technologies, 미국)를 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 혼입된 EdU는 제조사의 지침에 따라 분석되었다(Thermo Fisher Scientific, C10337, 미국). DAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, 미국) 0.25 μg/ml와 5분 동안 배양한 후, 조직을 마운팅 용액(Dako, 미국)으로 장착하였다. 섬모 세포 및 EdU-혼입 세포를 포함한 세포를 계수하기 위해, LSM 780 공 초점 현미경(Carl Zeiss, 독일)으로 각 조직에 대해 63X 대물렌즈를 사용하여 무작위로 선택된 5개의 필드를 획득하였다. *Gli1*⁺ 세포의 모낭주위 이송을 나타내는 모낭을 계수하기 위해, 20X 대물렌즈를 사용하여 무작위로 선택된 5개의 필드를 사용하였다. 각 그룹당 3 마리 이상의 동물을 평가 하였다.
- [0142] T 림프구, 수지상 세포 및 조절 T세포를 포함하는 면역세포를 계수하기 위해, 래빗 항-CD3 (1:100; Abcam, ab5690, 미국), 래트 항-MHC class II (1:100; BioLegend, 107602, 미국) 및 래빗 항-Foxp3 (1:200; Novus Biologicals, NB100-39002, 미국)를 사용하여 면역조직화학 염색(immunohistochemical staining)을 수행하였다. 절편을 실온에서 1시간 동안 1차 항체와 함께 인큐베이션 한 후, 다시 실온에서 1시간 동안 상응하는 2차 항체(DAKO, P0448, 미국)와 함께 인큐베이션 하였다. 액체 DAB(Diaminobenzidine) 기질 크로모젠(chromogen) 시스템(Dako, 미국)을 사용하여 색상을 전개시켰다. 헤마톡실린(Hematoxylin)은 대비염색에 사용하였다. BX53 현미경(Olympus, 일본)으로 각 조직에 대해 100X 대물 렌즈를 사용하여 무작위로 선택된 5개의 필드를 획득하였다. 각 그룹당 3 마리 이상의 동물을 평가하였다. 최종 도표를 구성하기 위해 포토샵 CS6(Adobe, 미국)가 사용되었다. GraphPad Prism 5.0을 사용한 unpaired Student's t-test에서 P-값이 <0.05 인 경우 실험

값의 차이가 유의한 것으로 간주되었다.

1.6. X-gal 염색

β -갈락토시다아제(β -galactosidase)의 존재를 검출하기 위해, X-gal 용액을 희석 용액(5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide 및 1M $MgCl_2$)에 희석하고 37°C에서 4시간 동안 조직에 처리하였다. 에오신(eosin)은 대비염색으로 사용되었다. 이어서, 조직을 마운팅 용액(Dako, 미국)으로 장착하였다. 전체-마운트 염색(whole-mount staining)의 경우, 해부된 피부를 4°C에서 4시간 동안 4% PFA에 고정시켰다. PBS에서 3회 세척한 후, 조직을 상기와 같이 희석한 X-gal 용액에서 밤새 배양하였다. 이미지는 디지털 현미경(Shenzhen Wotng Tech, 중국)으로 캡처하였다.

1.7. 조직 투명화

4% PFA(paraformaldehyde)로 고정한 후, 피부 샘플을 2% PBST(PBS 중 0.2% 소듐 아자이드가 포함된 2% Triton-X100)와 함께 실온에서 레드 교반기를 이용하여 48시간 동안 처리하였다. PBS로 세척 한 후, 샘플을 RapiClear® 1.52 용액(RC152001, SunJin Lab, 대만)과 함께 8시간 동안 배양하였다. 이어서, 조직을 RapiClear® 1.52 용액으로 마운트하였다.

1.8. 골수유래 수지상 세포(Bone marrow-derived dendritic cell, BMDC) 분석

마우스 BMDC는 10% FBS(fetal bovine serum, Welgene, 대한민국) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 5% GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 포함 RPMI-1640 배지(Welgene)와 함께 마우스 골수세포를 7일 간 배양하여 생성하였다. BMDC의 성숙 또는 사이토카인의 생성에 대한 SAG의 효과를 분석하기 위해, 2×10^5 BMDCs를 이미퀴모드 또는 LPS(lipopolysaccharide)로 자극하고 SAG의 존재 또는 부재하에 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 수집한 후, 다음의 항체로 표지하였다: CD8(BD Biosciences, clone, clone GL1), CD11c(BD Biosciences, clone HL3) 및 MHCII(BD Biosciences, clone M5/114.15.2). 분석은 FACSCalibur(BD Biosciences)를 사용하여 수행하였다. 세포 배양 상등액(supernatant) 중의 IL-6 및 IL-1 β 수준은 제조사의 지침에 따라 ELISA 키트(eBioscience, 미국)를 사용하여 측정하였다.

1.9. 정량화 및 통계적 분석

qRT-PCR 데이터는 각 값을 대조군의 평균으로 나눔으로써 정규화되었다. 모든 데이터는 평균 표준오차로 나타내었다. GraphPad Prism 5.0 소프트웨어를 사용하여 데이터 분석을 수행하였고, 0.05 미만의 P 값은 two-sided unpaired Student's t-test에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

실시예 2: IMQ 마우스 모델을 이용한 헤지호그 신호전달 억제 확인

건선의 병인에서 헤지호그 신호전달의 역할을 확인하기 위해, 본 발명자들은 톨-유사 수용체 7의 활성화에 의한 건선-유사 병변의 유도에 사용되어 왔던 이미퀴모드를 처리하여 마우스에서 건선-유사 피부 병변을 유도하였다. 연속된 7일에 걸쳐 20mg의 이미퀴모드 크림을 귀 피부의 한쪽면에 도포하고, 비히클(vehicle) 크림을 대조군으로서 다른 면에 도포하였다. 표피의 비후화는 건선의 주요한 특징 중 하나이므로, 건선-유사 피부 병변의 발병을 모니터링하기 위해 이미퀴모드 도포 직전에 귀 두께를 측정하였다. 그 결과 도 1a 및 1b에 나타난 바와 같이, 비히클 크림을 도포한 귀와 비교하여 이미퀴모드 크림을 도포한 피부에서, 인설(scale) 및 두꺼워진 피부가 관찰되었다.

또한, 상기 마우스 모델에서 헤지호그 신호전달의 표적 유전자의 발현을 면역 블롯팅 및 qRT-PCR에 의해 평가하였다. 그 결과 도 1c에 나타난 바와 같이, GLI1 및 PTCH1 mRNA 발현 모두 비히클이 처리된 대조군과 비교하여 이미퀴모드를 처리한 피부에서 감소됨을 확인하였다. GLI1의 단백질 수준 또한 시간-의존적인 방식으로 감소하였지만, 비히클을 처리한 피부에서 GLI1의 발현에는 변화가 없었다(도 1d 참조).

추가적인 확인을 위해, 헤지호그 반응 세포의 시공간 패턴을 $Ptch1^{LacZ/+}$ 마우스를 사용하여 평가하였다. 비히클을 처리한 피부에서, $Ptch1^{LacZ/+}$ 는 모낭, 특히 모발의 벌지(bulge) 영역, 모원배(hair germ) 및 모유두(dermal papilla)에서 발현되었으며, 여기서 헤지호그 활성을 갖는 세포가 위치하는 것으로 보고되었다. 그러나, 이미퀴모드가 처리된 피부에서는 $Ptch1^{LacZ}$ 의 발현은 없었다. 조직을 샘플링하기 24시간 전 타목시펜의 유도에 의해 $Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}$ 마우스에서 이미퀴모드의 처리에 반응한 Gli1 발현을 평가하였다. 그 결과 도 1e에 나타난 바와 같이, 비히클이 처리된 피부의 벌지 영역 및 모원배에서 표지된 세포가 관찰된 것과 대조적으로,

$Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}$ 마우스의 이미퀴모드 처리 피부에서는 표지된 세포가 관찰되지 않았다. 또한, 이미퀴모드를 처리하는 동안 타목시펜을 각기 다른 날에 처리하여 유도된 $Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}$ 마우스에서, 표지된 세포는 이미퀴모드 도포 1일 후 사라지고, 7일 동안 이미퀴모드를 도포한 조직에서는 표지된 세포가 일부 다시 나타났다.(도 1f 참조). 이러한 발견은 이미퀴모드 처리의 후기 단계에서 Gli1 단백질 수준의 회복을 보여준 Gli1의 면역 블롯팅 결과와 일치하는 것이다. Gli2, Gli3, Smo 및 Sufu를 포함한 헤지호그 신호전달 요소의 mRNA 발현은 대조군과 비교하여 이미퀴모드가 처리된 피부에서 일관된 변화를 나타냈다.

[0160] 상기의 결과를 종합하면, 헤지호그 경로는 건선 마우스 모델뿐만 아니라 건선 환자의 병변 피부에서 하향조절됨을 확인한 것이다.

[0162] **실시예 3: 헤지호그 신호전달의 활성화에 따른 건선 발병 억제 효과**

[0163] 헤지호그의 하향조절이 건선의 발병에 대한 선행요인이 되는지 또는 단순히 상관관계가 있는 현상일 뿐인지 확인하기 위해, 본 발명자들은 약리학 및 유전자 조작을 통해 헤지호그 경로의 활성화 후 이미퀴모드-유발 모델의 건선-유사 피부 병변의 진행을 탐구하였다. 헤지호그 경로를 활성화시키기 위해, 헤지호그 경로를 활성화시키는 소분자인 SAG를 복강내 주사하였다. SAG는 도 2a에 도식화한 바와 같이, 첫 이미퀴모드의 도포 전달부터 투여하기 시작하여 이틀마다 체중(kg) 당 20mg의 용량으로 투여하였다. SAG는 DMSO에 용해하였기 때문에, DMSO-처리 마우스를 대조군으로 할당하였다. 그 결과 도 2b에 나타난 바와 같이, 대조군은 귀 두께가 0.24mm에서 0.47mm로 증가(95.8%)한 것으로 확인되었다. 한편, SAG를 처리한 경우에는 귀 두께가 0.23mm에서 0.3mm로 증가한 것에 그쳐, 비후화가 크게 약화(30.4%)됨을 확인하였다.

[0164] 이에 본 발명자들은, 이미퀴모드의 도포 이후에도 SAG가 처리된 마우스의 피부에서 헤지호그 경로가 활성화되는지 여부를 확인하기 위해, SAG 또는 DMSO를 처리한 마우스의 이미퀴모드를 도포한 피부에서 헤지호그 표적 유전자의 발현을 비교하였다. 그 결과 도 2d 및 도 2e에 나타난 바와 같이 PTCH1 및 GLI1의 발현 수준은 대조군과 비교하여 SAG를 처리한 마우스에서 증가됨을 확인하였다. 또한, SMO, SUFU, GLI2 및 GLI3과 같은 다른 헤지호그 요소의 발현도 SAG의 처리에 의해 영향을 받았다.

[0165] 이어서, 본 발명자들은 활성화된 헤지호그 신호전달 경로에 의한 건선-유사 병변의 발달 억제 효과를 확인하기 위해, 타목시펜의 처리에 따라 $Gli1$ -발현 세포에서 활성화된 형태의 Smo가 상시 발현되는 $Gli1^{CreER/+};R26^{SmoM2/+}$ 마우스의 이미퀴모드-유발 건선-유사 병변에 대해 조사하였다. 도 2f에 도식화한 바와 같이, 이미퀴모드 도포 3일 전에 $Gli1^{CreER/+};R26^{SmoM2/+}$ 마우스 및 $Gli1^{CreER/+}$ 마우스 모두에 타목시펜을 복강 내로 투여하였다. 그 결과 도 2g에 나타난 바와 같이, $Gli1^{CreER/+};R26^{SmoM2/+}$ 마우스의 귀 두께 증가(71.4 %)는 $Gli1^{CreER/+}$ 마우스에서의 귀 두께 증가(126.2 %)와 비교하여 크게 감소되는 것을 확인하였다. 또한, 헤지호그 경로의 약리학적 활성화에 따라, $Gli1^{CreER/+};R26^{SmoM2/+}$ 마우스는 대조군과 비교하였을 때 그들의 피부에서 헤지호그 경로가 활성화됨을 보였다(도 2h 참조).

[0166] 상기와 같은 결과는 헤지호그의 하향조절이 이미퀴모드-유발 마우스 모델의 건선-유사 피부 병변의 적절한 발현을 위한 전제조건임을 시사하는 것이다.

[0168] **실시예 4: 헤지호그 신호전달 경로 활성화에 따른 염증 억제 효과**

[0169] 건선-유사 피부 염증의 발달에 헤지호그 신호전달의 조절 역할에 대한 근본적인 메커니즘을 밝히기 위해, 본 발명자들은 SAG 처리 또는 DMSO 처리 마우스의 이미퀴모드 도포 피부에서 건선 관련 마커의 발현 수준을 비교하였다. 이를 위해, 귀 피부에 이미퀴모드 크립을 도포한 것과 동일한 방식으로 면도된 배측 몸통 피부의 한쪽면에 30mg의 이미퀴모드 크립을 국소적으로 도포하였다. 이미퀴모드 모델의 귀 두께 증가에 대한 SAG의 효과와 부합되게, SAG-처리 마우스는 대조군과 비교하여 $S100A8$ 및 $S100A9$ 를 포함하는 건선 관련 마커의 mRNA 발현이 감소된 것으로 나타났다.

[0170] 또한, Th17 및 Th1 활성화를 수반하는 피부 염증은 건선에서 주요 병원성 인자로 간주되므로, 염증성 사이토카인의 발현을 조사하였다. IL-1 β 및 TNF- α 에 더하여, IL-17A, IL-17F 및 IL-22를 포함한 Th17의 이펙터 사이토카인은 SAG를 처리한 마우스에서 현저하게 하향조절됨을 확인하였다(도 3a 참조). 이에 더하여, SAG를 처리한 마우스는 DMSO-처리 마우스와 비교하여 T 림프구 및 수치상 세포가 감소되었음을 확인하였다(도 3b 및 도 3c 참조). 이와는 대조적으로, Th17의 유도 및 유지에 관여하는 IL-6 및 IL-23, 그리고 건선 병변으로의 T 림프구 동원에 관여하는 케모카인(chemokines)인 CCL20 및 CXCL10의 발현은 SAG 처리에 의한 영향을 받지 않았다.

[0171] 이전의 연구에서 헤지호그 신호전달은 대장염 마우스 모델에서 $CD4^{+}Foxp3^{+}$ 조절 T세포와 IL-10의 증가를 통한 항염증 효과를 보였기 때문에, 본 발명자들은 SAG 또는 DMSO 처리 이미퀴모드 마우스 모델에서 *Foxp3* 및 *I110*의 mRNA 발현을 조사하였다. 흥미롭게도, 도 3d에 나타난 바와 같이, *Foxp3* 및 *I110*은 이미퀴모드의 처리뿐만 아니라 SAG의 처리에 의해서도 증가되었다. 또한, 도 3f에 나타난 바와 같이, *Foxp3^{+}* 조절 T세포는 SAG가 처리된 마우스에서 증가되었다. 이러한 결과는 헤지호그 신호전달이 대장염 모델에서와 같이 조절 T세포 및 IL-10의 증가를 통해 이미퀴모드-유도 피부 염증을 억제한다는 사실을 시사하는 것이다.

[0173] **실시예 5: 헤지호그 신호전달에 의한 Gli1⁺ 세포의 모낭주위 이동 및 증식 억제 효과**

[0174] 건선의 발달에 헤지호그 신호전달의 역할에 대한 이해를 향상시키기 위해, 본 발명자들은 8주령의 *Gli1^{CreER/+};R26^{RLacZ/+}* 마우스에서 첫 이미퀴모드의 도포 3일 전에 타목시펜을 투여함으로써 건선의 발생 동안 헤지호그 활성을 나타내는 세포를 추적하였다. 비히클을 처리한 피부에서 표지된 세포는 *Ptch1^{LacZ/+}* 마우스에서와 같이 모발 벌지 영역 및 모원배에 위치하였다. 그러나 도 4a에 나타난 바와 같이, 이미퀴모드를 처리한 피부에서는 X-gal로 염색된 세포가 모낭의 상피 부분뿐만 아니라 상처를 입은 피부와 같은 모낭주위 표피(perifollicular epidermis) 전체에서 발견됨을 확인하였다. 모낭주위의 표지된 세포가 모낭에서 기원한 것인지 확인하게 위해, 이미퀴모드-처리 및 비히클-처리 피부에서 전체-마운트 X-gal 염색을 수행하였다. 표면에 어떠한 표지된 세포도 나타나지 않은 비히클-처리 피부와 대조적으로, 이미퀴모드를 처리한 피부는, 특히 모발 개구(hair opening) 근처에서 표지된 세포로 구성된 많은 반점이 관찰되었고, 이는 표지된 세포가 모낭, 특히 벌지 영역으로부터 기원한 것임 시사하는 것이다(도 4a 참조). 상기와 같은 발견은 *Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}* 마우스에서도 일관되게 입증되었다. 흥미롭게도, 이들 마우스에서 Gli1⁺ 세포는 진피에서 이미퀴모드에 의해 증가되었다. 이들 피부 Gli1⁺ 세포는 CD3 또는 MHC II와 함께 국부화(colocalize)되지는 않았다. 예상한 바와 같이, Gli1의 발현 억제로 인하여 이미퀴모드의 처리 동안 타목시펜으로 유도된 *Gli1^{CreER/+};R26^{LacZ/+}* 마우스에서 모낭주위 이동이 검출되지 않았다. 이미퀴모드 처리에 의해 Gli1⁺ 세포의 모낭주위 이동을 나타내는 모낭이 점차 증가되었다(도 4b 참조). 흥미롭게도, 일부 표지된 세포는 모낭주위 영역에서도 여전히 증식하였다. 또한, 이미퀴모드 처리에 반응하여, Gli1⁺ 세포의 모낭주위 이동을 보이는 모낭의 백분율 및 귀 두께는 다섯 번째 이미퀴모드 처리부터 안정한 상태가 유지되는 유사한 패턴이 관찰되었으며, 이는 건선-유사 피부 염증에서 표피의 비후화에 Gli1⁺ 세포의 모낭주위 이동이 기여함을 시사하는 것이다.

[0175] Gli1⁺ 세포의 모낭주위 이동에 대한 SAG의 역할을 결정하기 위해, 본 계통-추적 마우스에 SAG를 처리하였다. 그 결과 도 4c에 나타난 바와 같이, SAG는 *Gli1^{CreER/+};R26^{LacZ/+}* 마우스에서 표피의 비후화뿐만 아니라 Gli1⁺ 세포의 이미퀴모드-유도 모낭주위 이동을 크게 약화시켰다. 폐 손상 모델에서 헤지호그 신호전달은 세포 증식을 억제하는 효과를 나타내기 때문에, 본 발명자들은 헤지호그가 이미퀴모드로 유발된 피부 염증에서 Gli1⁺ 세포의 증식에 대한 억제 효과가 있는지 여부를 평가하였다. 그 결과 도 4d 및 도 4e에 나타난 바와 같이, 1일 동안 이미퀴모드의 처리에 의해 Gli1⁺ 발현이 감소되는 것 외에도, Gli1⁺ 세포는 증가된 증식을 나타내었으며, 이는 SAG의 전 처리에 의해 억제되었다. 비록 부위-특이적인 차이가 있지만, 이미퀴모드 및 SAG에 의한 Gli1⁺ 세포 증식의 조절은 Gli1⁺ 세포가 위치한 터치 돔(touch dome), 모발 벌지 및 모원배에서 유사하였다. 이러한 결과는 헤지호그 신호전달이 폐 손상 모델에서와 같이 이미퀴모드에 의해 유도된 피부 염증에서 세포 증식에 대한 억제 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[0177] **실시예 6: SAG의 탈섬모화(deciliation) 억제 효과**

[0178] 1차 섬모는 헤지호그 신호전달을 위한 중요한 소기관이므로, 본 발명자들은 Gli1⁺ 세포에서 1차 섬모의 존재를 평가하였다. *Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}* 마우스에서, Gli1 발현 세포는 타목시펜 주사에 의해 tdTomato로 표지되었고, 표지된 세포는 터치 돔, 모원배 및 모발 벌지에 위치하였으며, 고도로 섬모가 형성되었다. 흥미롭게도, Gli1⁺ 세포는 이미퀴모드의 처리에 반응하여 탈섬모화 되었다. Gli1⁺ 세포의 탈섬모화는 첫 이미퀴모드를 처리한 후 24 시간이 경과된 시점에서 나타났고, SAG의 전처리에 의해 강하게 억제되었다(도 5a 및 5b 참조). 따라서, 상기와

같은 결과는 $Gli1^{+}$ 세포의 탈섬모화가 적어도 부분적으로 헤지호그 신호전달의 조절을 통해 모낭주위 이동 및 $Gli1^{+}$ 세포의 증식에 관여할 가능성을 시사하는 것이다.

[0180] **실시예 7: 염증성 사이토카인에 의한 $Gli1^{+}$ 세포 집단 확장 유도 및 헤지호그 신호전달의 조절**

[0181] TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-17A 및 IL-22를 포함한 건선 관련 사이토카인의 처리에 의해 피부에 건선 관련 마커를 유도하는 것 외에도, 이러한 사이토카인은 건선 환자에서 이들 항체를 표적으로하는 약물의 효과적인 임상적 대응에 의해, 건선의 발달 및 유지에 가장 중요한 요인인 것으로 입증되었다. 건선에 대한 헤지호그 신호전달 및 $Gli1^{+}$ 세포의 관련성을 강화시키기 위해, 본 발명자들은 헤지호그 신호전달 및 $Gli1^{+}$ 세포에 대한 건선 관련 사이토카인의 효과를 평가하였다. 흥미롭게도, $Gli1^{+}$ 세포 집단 및 헤지호그 신호전달은 사이토카인 특이적 방식으로 건선 관련 사이토카인의 피내 주사에 의해 동적으로 조절되었다. 사이토카인 주사 전에 타목시펜으로 유도된 $Gli1^{CreER/+};R26^{tdTomato/+}$ 마우스에서 TNF- α , IFN- γ IL-17A 및 IL-22의 피내 주사는 $Gli1^{+}$ 세포 집단의 확장을 초래하였다. 이들 사이토카인 중에서, TNF- α 는 특별히 모발 벌지 및 모원배에 더 영향을 미치는 반면, IL-22는 터치 돔에 보다 현저한 영향을 나타냈다. IFN- γ 및 사이토카인 혼합물은 모낭 및 모원배 모두에서 $Gli1^{+}$ 세포의 확장에 현저한 효과를 나타냈다. 이와는 대조적으로, IL-1 β 는 DMSO가 투여된 대조군과 비교하여 $Gli1^{+}$ 세포 집단을 오히려 감소시켰다(도 6 참조). 이러한 결과를 설명하기 위해, 우리는 헤지호그 신호전달에 대한 상기 사이토카인의 영향을 평가하였다. 이미퀴모드를 처리한 피부에서, IL-1 β 를 제외한 건선 관련 사이토카인의 피내 주사는 헤지호그 신호전달의 활성을 감소시켰다.

[0182] 또한, *Ptch1* 및 *Gli1*을 포함한 헤지호그 표적 유전자는 관련되지 않은 피부(GSE 13355)에 비해 건선 피부에서 상당히 하향 조절되는 것으로 밝혀졌다. 이 결과를 확인하기 위해 추가 GEO 데이터 세트(GSE14905)를 사용하여 건선의 병변 피부에서 *Gli1* 및 *Ptch1*의 발현을 분석하였다. 두 데이터 세트에서, 헤지호그 경로-특이적 표적 유전자는 건강한 기증자의 피부 또는 비병변성 피부와 비교하여 병변 피부에서의 발현이 유의하게 감소되었다. 종합적으로, 상기와 같은 결과는 건선에 헤지호그 신호전달 및 $Gli1^{+}$ 세포 집단이 깊게 연관되어 있음을 증명하는 것이다.

[0184] 건선은 표피성 과증식(hyperproliferation) 및 인터루킨 17-생성 보조 T세포(Th17)에 의해 매개되는 피부 염증을 특징으로하는 만성 피부 질환이다. 이전의 연구에서는 건선 환자의 병변 피부에서 헤지호그(Hedgehog, Hh) 신호전달의 변화가 보고되었지만, 그에 따른 기능적 결과는 알려져 있지 않았다. 본 발명자들은 마우스에서 헤지호그 신호전달의 하향조절이 이미퀴모드(Imiquimod, IMQ)-유발 건선-유사 병변의 발생과 관련이 있음을 확인하였다. 작은 크기의 분자인 SAG(Smoothed agonist)에 의한 헤지호그 신호전달의 활성화는 조절 T 세포(Regulatory T cells)의 수 및 IL-10의 발현을 증가시켜, 이미퀴모드로 유도된 피부의 비후화 및 염증을 완화시키는 결과를 가져왔다. 또한, *Gli1*-발현 세포에서 지속적인 활성화형의 Smo (SmoM2)를 이용한 헤지호그 신호전달 유전자의 활성화는 건선 병변의 발생을 억제하였다. 비록, 이미퀴모드의 적용은 헤지호그 신호전달뿐만 아니라 헤지호그 신호전달을 매개하는 1차 섬모의 형성 또한 억제하였으나, 모낭(hair follicles)에서 유래한 $Gli1^{+}$ 헤지호그-반응성 세포는 현저하게 확장되어 병변 피부의 모낭주위 표피(perifollicular epidermis)로 이동되었다. 이와는 대조적으로, SAG에 의한 헤지호그 신호전달의 활성화는 이미퀴모드에 의해 유도된 $Gli1^{+}$ 세포의 증식 및 탈섬모화(deciliation)를 억제하였다. 흥미롭게도, 건선 관련 사이토카인(cytokine)인 TNF- α , 인터페론- γ , 인터루킨(IL)-17A 및 IL-22의 피내 주사(intradermal injection)는 헤지호그 신호전달의 하향조절 및 모낭과 터치 돔(touch dome)에서 $Gli1^{+}$ 세포의 확장으로 요약될 수 있다. 이러한 결과는 헤지호그 신호전달이 Th17 세포-매개성 염증 및 $Gli1^{+}$ 세포 확장을 조절함으로써 건선의 진행에 결정적인 역할을 한다는 사실을 시사하는 것이다. 본 발명자들은 상기와 같은 결과를 종합하여, 건선을 포함한 염증성 질환에 대한 치료 전략으로서 헤지호그 신호전달의 활성화 및 이를 통한 염증 세포의 억제 기전을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

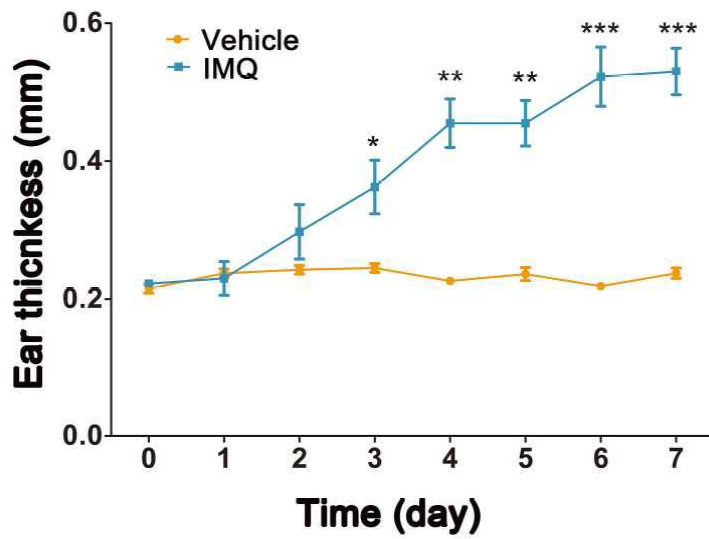
[0186] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

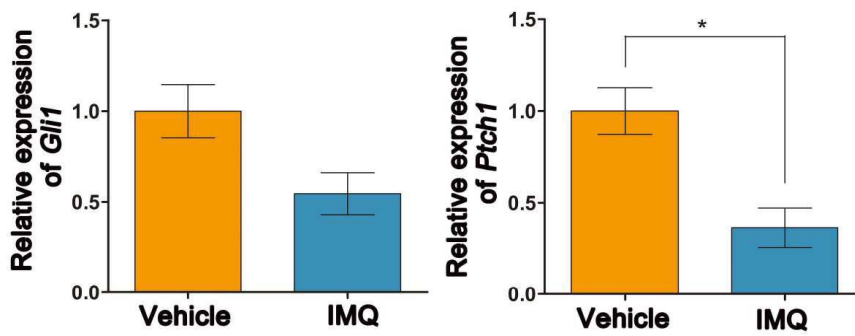
도면1a



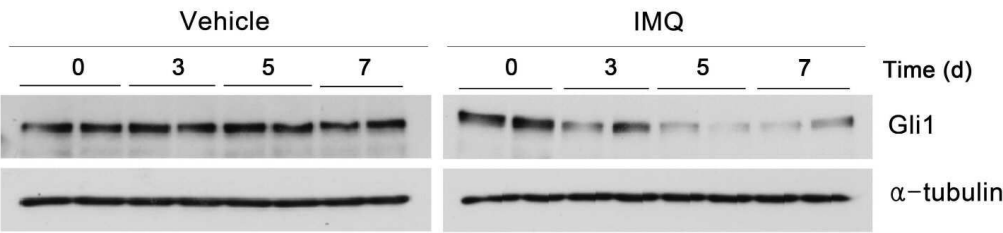
도면1b



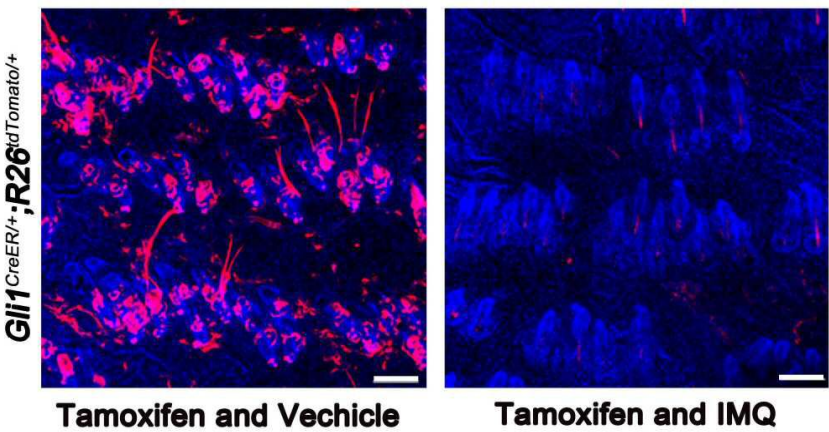
도면1c



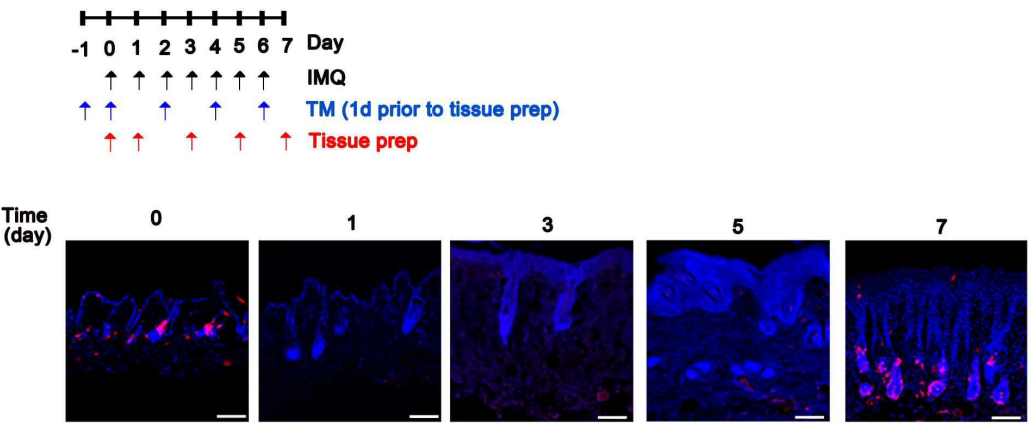
도면1d



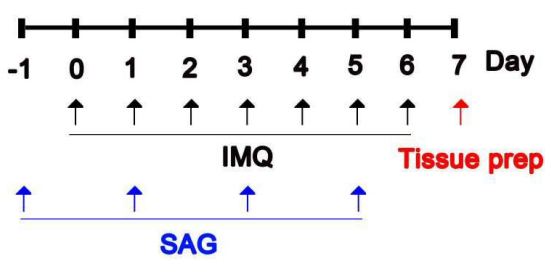
도면1e



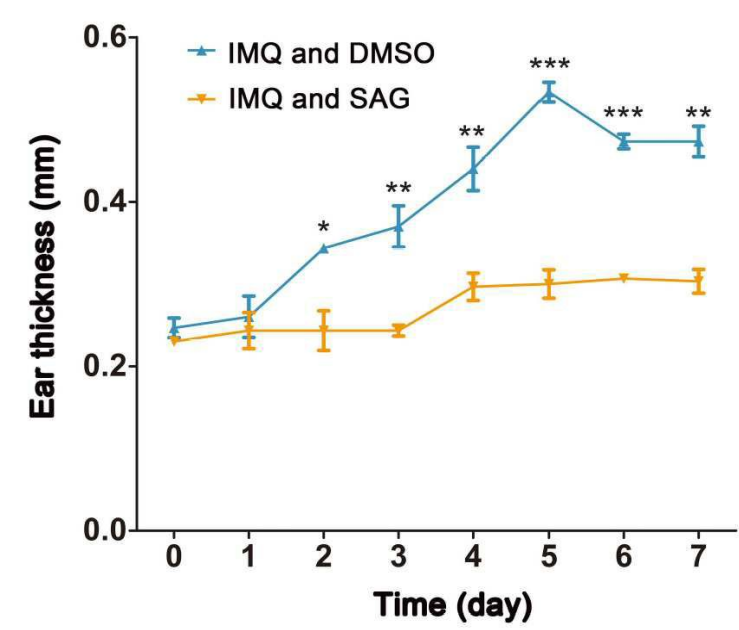
도면1f



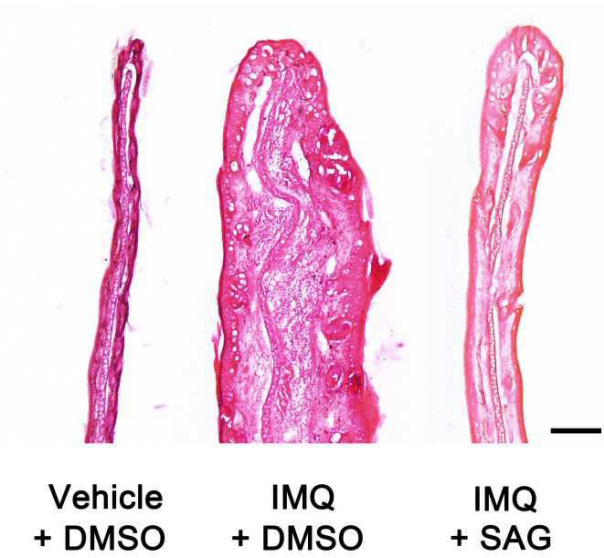
도면2a



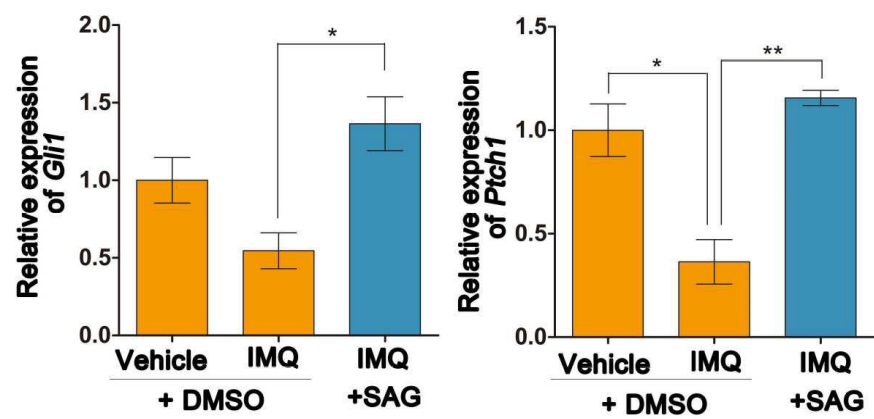
도면2b



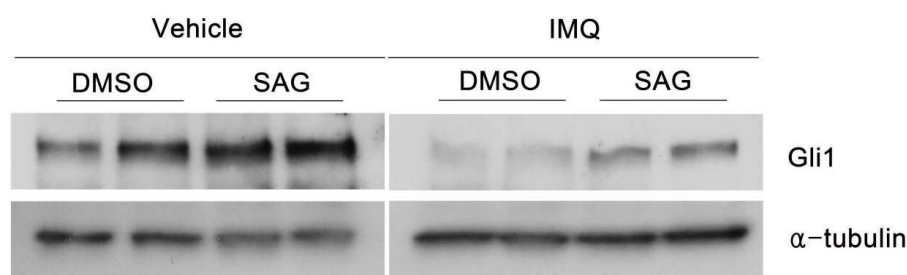
도면2c



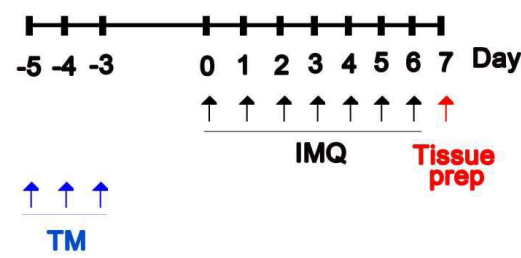
도면2d



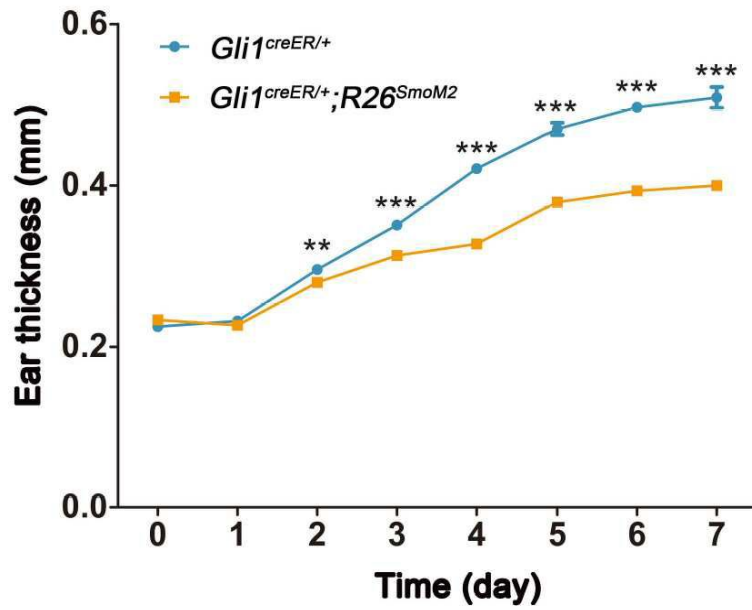
도면2e



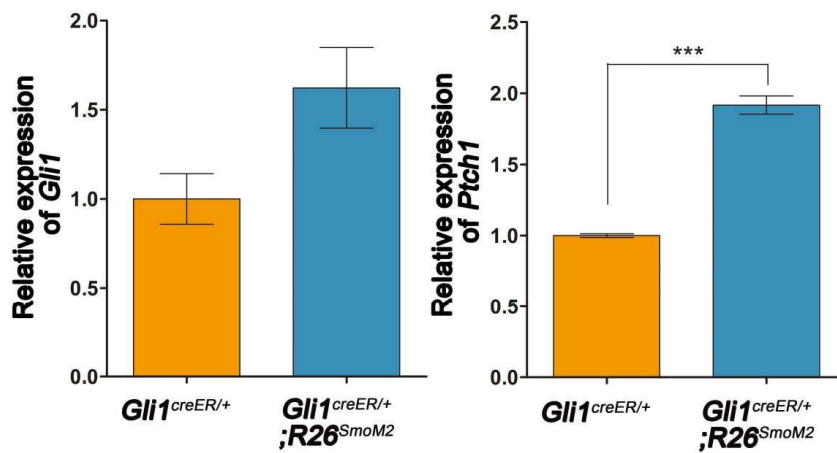
도면2f



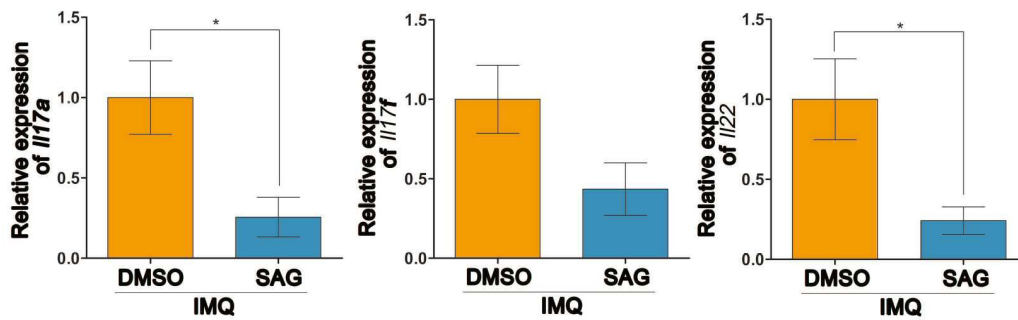
도면2g



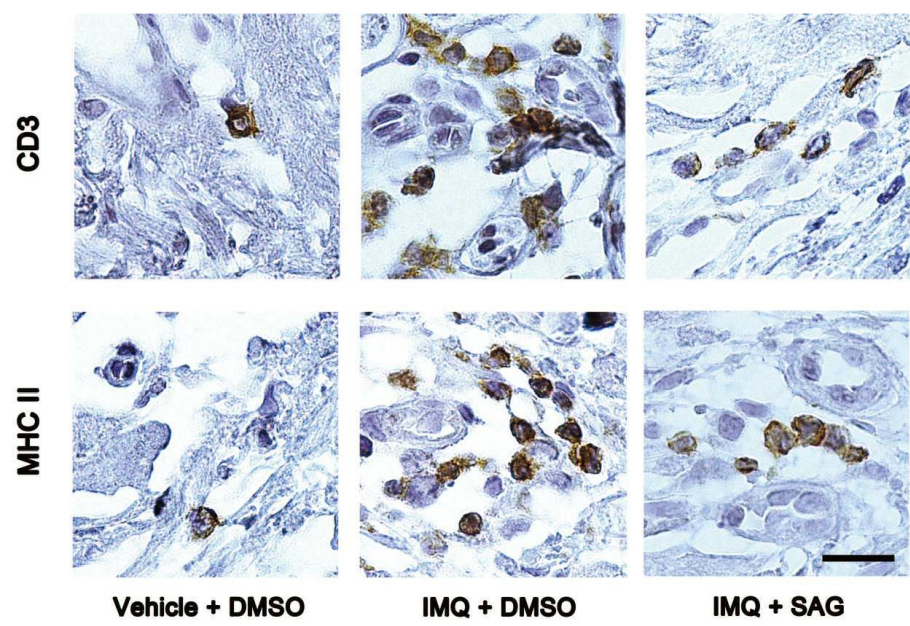
도면2h



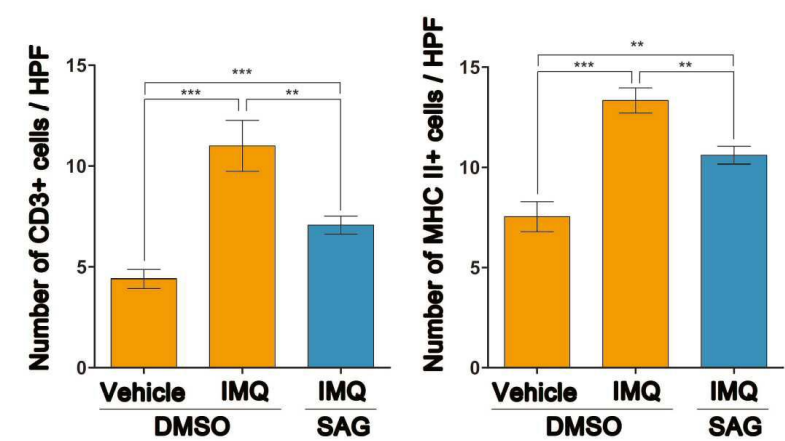
도면3a



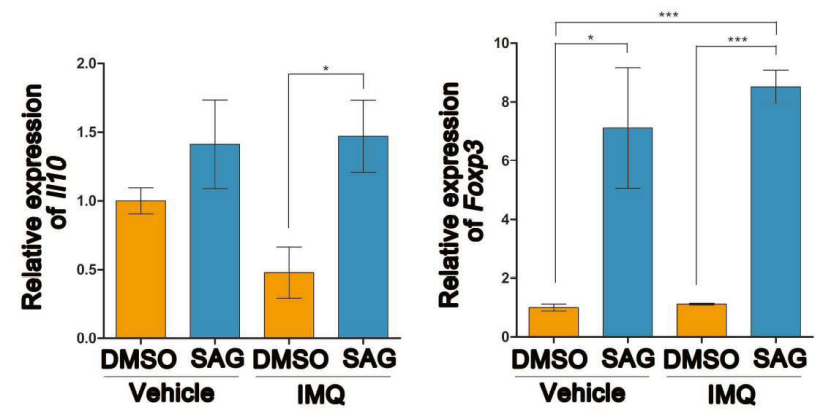
도면3b



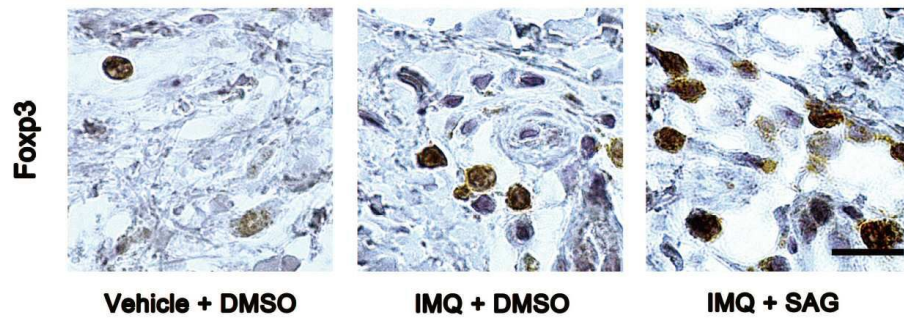
도면3c



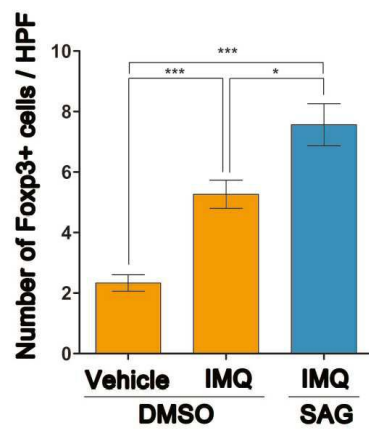
도면3d



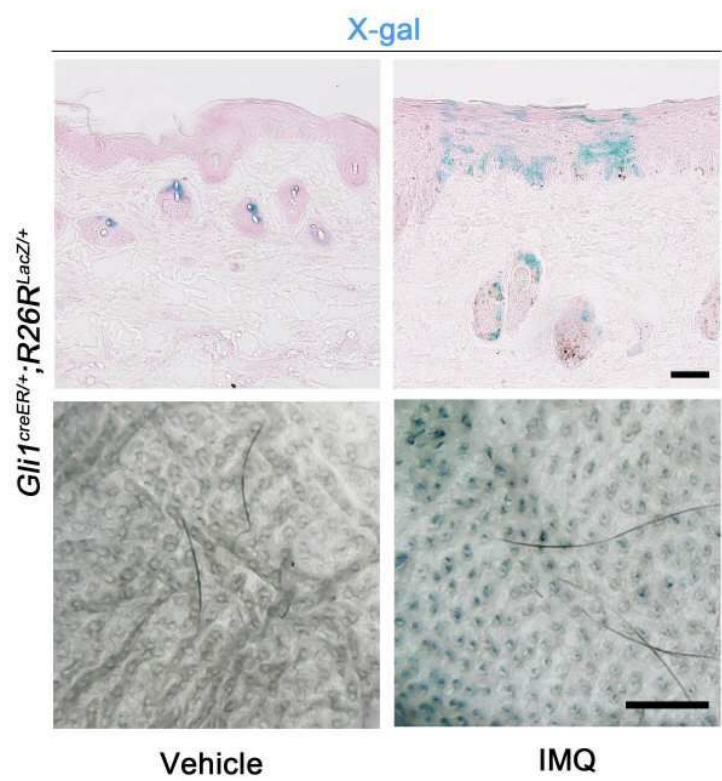
도면3e



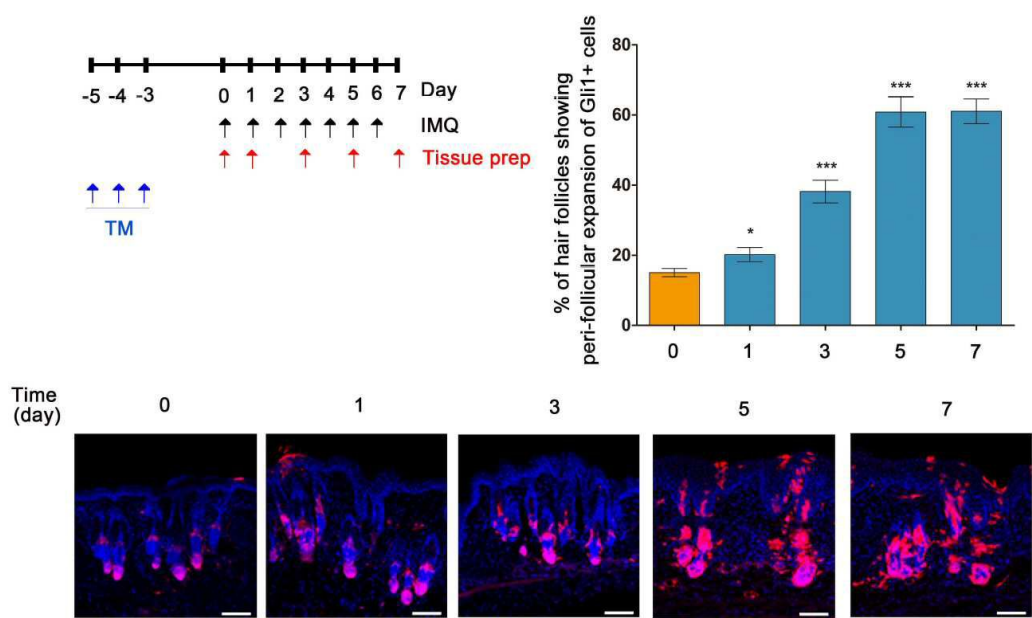
도면3f



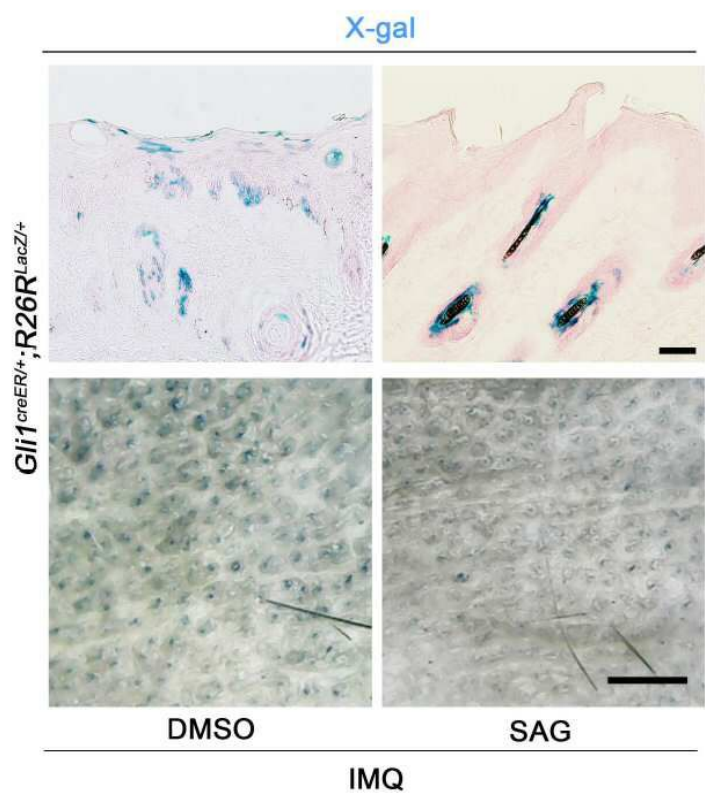
도면4a



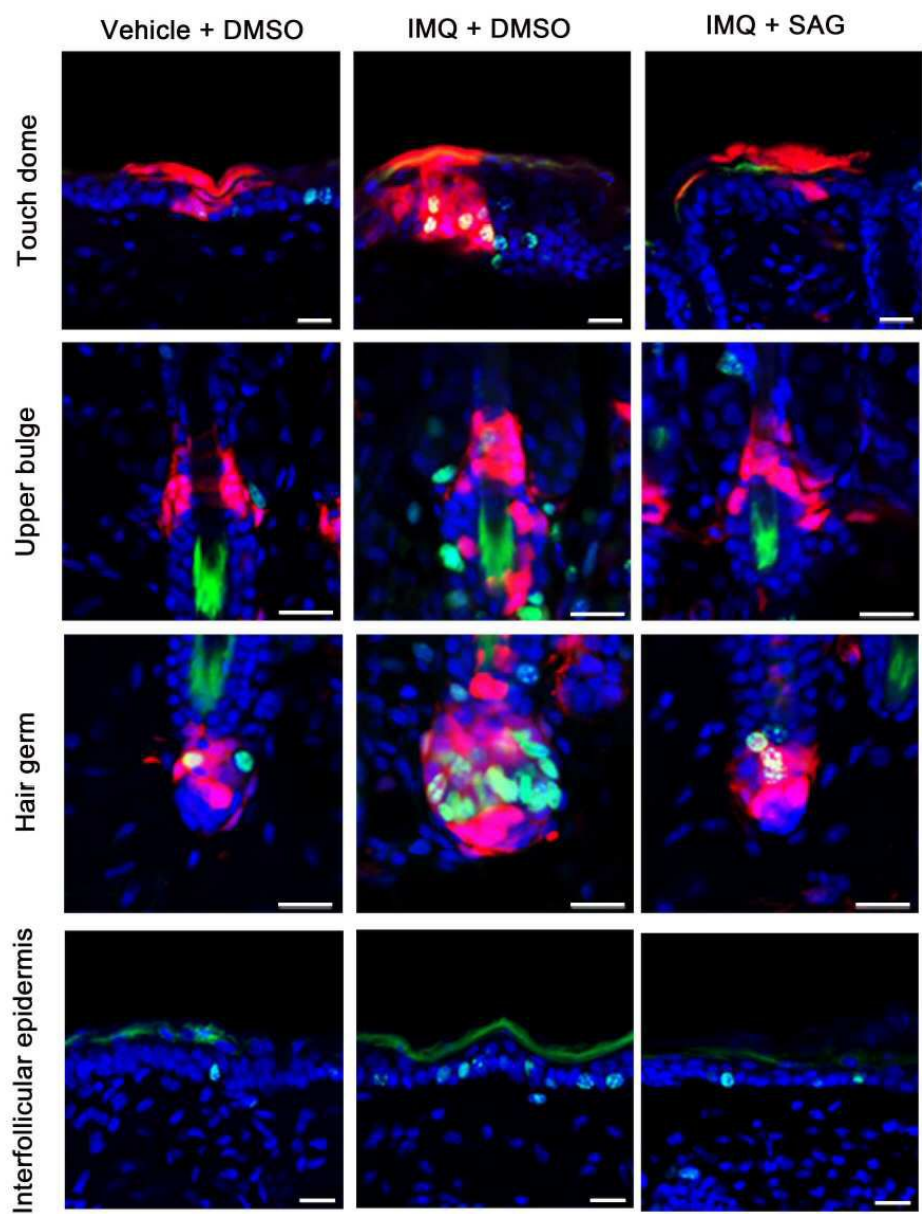
도면4b



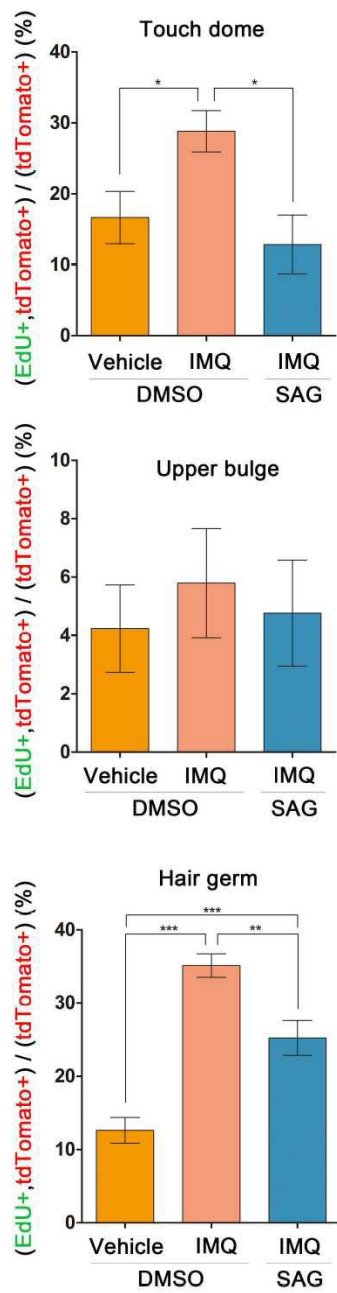
도면4c



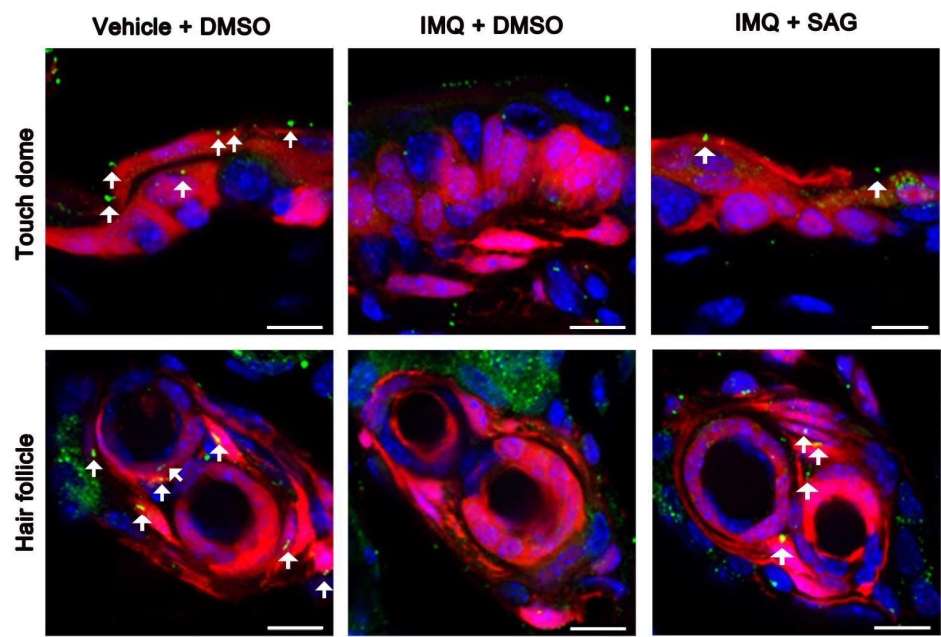
도면4d



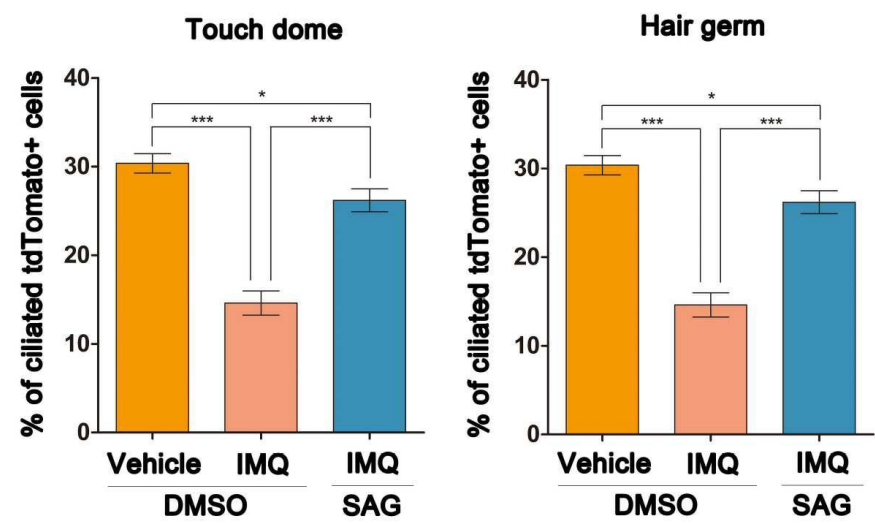
도면4e



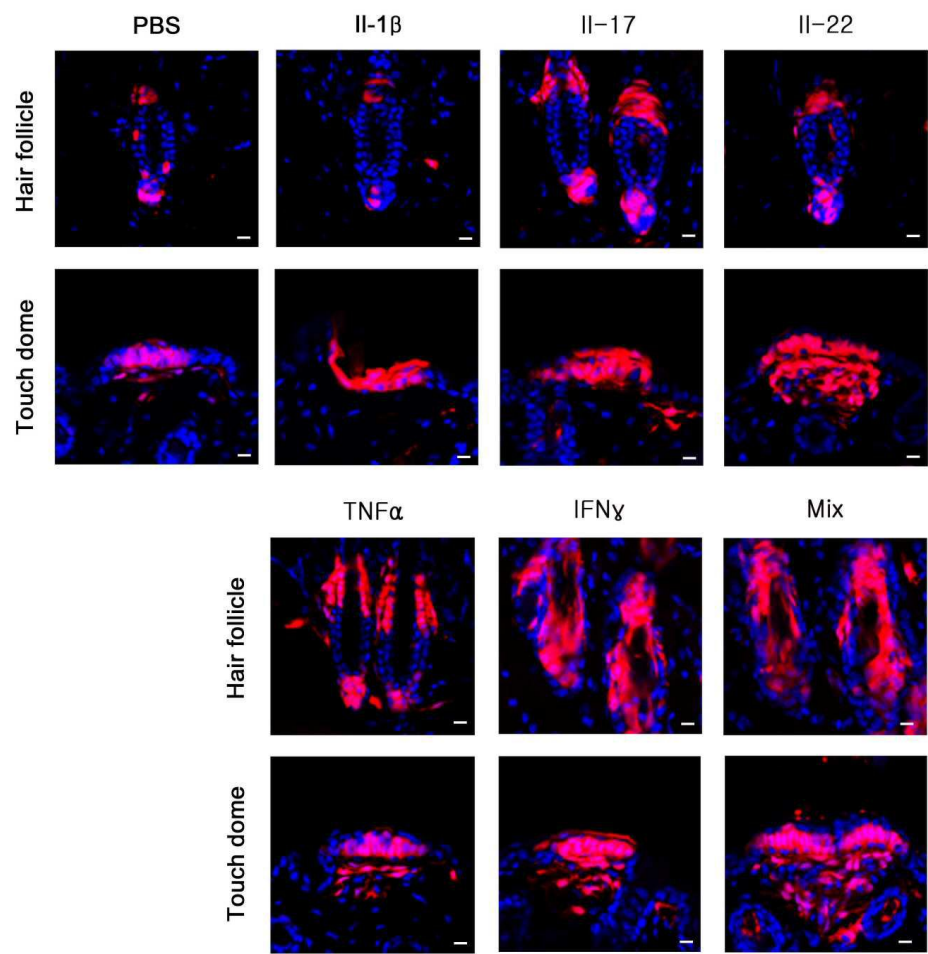
도면5a



도면5b



도면6



서열 목록

- <110> Dongguk University Industry-Academic Cooperation Foundation
Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
Seoul National University R&DB Foundation
Korea Advanced Institute of Science and Technology
- <120> Composition for preventing, improving or treating an inflammatory disease
- <130> MP19-285-D1
- <160> 18
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of Gli1

<400> 1

ggtgctgcct aagccagtgc etc 23

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of Gli1

<400> 2

gtgccaatcc ggtggagtca gaccg 25

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of Ptch1

<400> 3

aattctcgac tcactctcc a 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of Ptch1

<400> 4

ctctcatat ttggggcctt 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of Gli2

<400> 5

ccattatgac cctcactctg tc 22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of Gli2

<400>

6

gggtgtggag aaagtcgtat c 21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of Gli3

<400> 7

gtggttccta tgggcactta tc 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of Gli3

<400> 8

gtcggcttag gatctgttga tg 22

<210> 9

<211>

21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer of Smo

<400> 9

ctcgggcaag acatcctatt t 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer of Smo

<400> 10

actcacggag tctccatcta c 21

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of Sufu
 <400> 11

ctcgagagcg tgcattctaaa 20

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of Sufu
 <400> 12

gtcgctgtg atactcttgt ag 22

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of Foxp3
 <400> 13

ggcccttctc caggacaga 19

<210> 14
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer of Foxp3
 <400> 14

gctgatcatg gctgggttgt 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer of IL10

<400>	15	
tgaattccct gggtgagaag		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse Primer of IL10	
<400>	16	
ctcttcacct gctccactgc		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward Primer of GAPDH	
<400>	17	
aacagcaact cccactcttc		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse Primer of GAPDH	
<400>	18	
cctgttgctg tagccgtatt		20