

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0017720 (43) 공개일자 2014년02월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/52 (2006.01) A61K 31/555 (2006.01) A61K 31/28 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)		(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93
(21) 출원번호 10-2012-0082548		(72) 발명자 정현택 울산 울주군 언양읍 반천강변길 51, 103동 1010호 (반천현대아파트) 조연수 울산 울주군 언양읍 복문11길 9, 107동 1301호 (신울산경남아너스빌) 신다용 울산 남구 문수로369번길 63-1, 802호 (신정동, 다운듀크빌)
(22) 출원일자 2012년07월27일 심사청구일자 2012년07월27일		(74) 대리인 특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 7 항

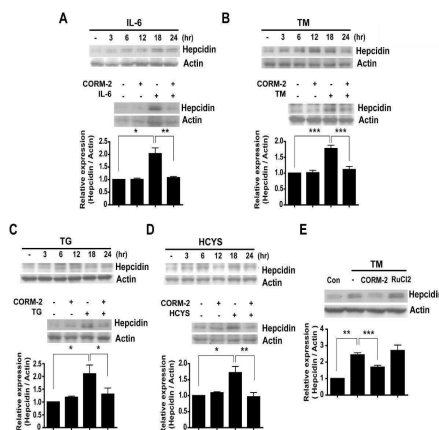
(54) 발명의 명칭 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 일산화탄소는 헵시딘의 발현을 억제하는 활성이 우수하여, 빈혈과 같이 헵시딘의 과활성으로부터 기인하는 질병을 예방 및 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0586

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구실사업

연구과제명 Meta-inflammation 제어 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2010.03.16 ~ 2011.03.15

특허청구의 범위

청구항 1

일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소는 헴옥시게나제(heme oxygenase)-1에 의해 발생하는 것인 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 공급체는 RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM-1(Mn_2CO_{10} :manganese decacarbonyl), CORM-3($(Ru(CO))_3Cl(glycinate)$) 및 CORM-Al(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상인 것인 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소는 헵시딘(Hepcidin)의 발현을 억제하는 것인 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 헵시딘은 소포체 스트레스 또는 면역반응에 의해 발현이 유도된 것인 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 일산화탄소는 STAT-3 또는 CREBH 신호전달 경로의 저해를 통해 헵시딘의 발현을 억제하는 것인 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 빈혈은 만성질환빈혈인 것인 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 헵시딘(hepcidin)의 발현을 억제하는 효과가 있는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 주로 간세포에 의해 발현된 폴리펩티드인 인간 헵시딘은, 장내 철분 흡수, 대식세포에 의한 철분 재생, 및 간에 저장된 철분으로부터의 철분 동원을 음성적으로 조절하는 중요한 철분 조절 단백질인 것으로 여겨진다. 헵시딘의 과생산은 빈혈 및/또는 만성 질환으로 인한 빈혈의 병태생리에서 중요한 역할을 수행한다.

[0003] 인간 헵시딘은, 전형적인 N-말단의 24개의 아미노산으로 이루어진 소포체-표적 신호 서열과, 공통 퓨린-절단 영

역을 포함하는 35개의 아미노산으로 이루어진 프로영역(proregion) 바로 다음의, C-말단의 25개의 아미노산으로 이루어진 생체활성의 철분-조절 호르몬인 인간 헤파시딘-25를 함유하는, 84개의 아미노산으로 이루어진 프리프로 펩티드로서 코딩된다.

- [0004] 만성질환빈혈은 전체 빈혈 빈도 중 두번째로 많은 빈혈이며, 입원 환자의 빈혈 중에서는 가장 높은 빈도를 나타내는 빈혈이다. 전신 질환과 연관되어 나타나므로 만성질환 빈혈이라 부르게 되었다. 만성질환빈혈은 감염, 자가면역질환, 암을 포함하여 급성 혹은 만성 염증을 동반한 환자에서 발생한다. 만성질환빈혈은 면역 기전으로 발생하는 것으로 알려져 있다. 염증반응을 유발하는 각종 만성질환에서 생산된 Cytokine들, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α 등에 의해 신장에서의 erythropoietin 생성 감소 Erythroid progenitor의 suppression 그리고 Reticuloendothelium 에서의 철분 유리 저해 등의 작용을 통해 빈혈을 유발한다
- [0005] 만성 질환으로 인한 빈혈에서, 헤파시딘은 간에서 발현이 증가하며, 철분 방출 단백질인 ferroportin과 결합하여 이의 엔도시토시스(endocytosis) 및 분해를 유발한다. 이에 따라, 세포내 철분의 방출은 저해되고, 철분은 대식 세포, 장세포, 간세포에 축적되게된다. 염증 반응동안 헤파시딘은 IL-6에 의해 조절되는데, 이에 따라 IL-6에 의해 유발되는 헤파시딘을 조절하는 것이 염증반응으로 인한 질병현상을 조절하는 중요한 기전으로 여겨지고 있다.
- [0006] 헤파 옥시게나제-1(HO-1)은 헤파의 분해의 제1단계를 촉매하는 작용을 한다. HO-1은 산화에 의하여 b-형 헤파분자의 α -메소 탄소 가교를 절단하여 동일 몰량의 빌리베르딘 IXa, 일산화탄소(CO) 및 유리 철을 생성시킨다. 이후, 빌리베르딘은 빌리베르딘 리덕타제를 통하여 빌리루빈으로 전환되고, 유리 철은 페리틴내로 격리된다.
- [0007] 헤파 옥시게나제-1에 의해 발생하는 일산화탄소는 생체 내에서 중요한 신호 분자로서 밝혀진 바 있으며(Verma et al., Science 259: 381-384, 1993), 특히, 일산화탄소는 뇌내 뉴런의 메신저 분자로서(Id.), 시상하부내의 뉴로-내분비 조절인자로서 작용한다는 내용이 보고된 바 있다(Pozzoli et al., Endocrinology 735: 2314-2317, 1994). 또한, 이러한 일산화탄소는 평활근 이완제로 작용하고(Utz et al., Biochem Pharmacol. 47: 195-201, 1991; Christodoulides et al., Circulation 97: 2306-9, 1995), 혈소판 응집을 억제하는 활성이 있으며(Mansouri et al., Thromb Haemost. 48: 286-8, 1982), 저농도의 일산화탄소의 흡입은 염증을 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀진 바 있다.
- [0008] 그러나, 아직까지 이러한 헤파 옥시게나제-1에 의해 발생하는 일산화탄소가 헤파시딘을 조절하는 기작에 따라 빈혈을 치료하는 효과가 있다는 내용에 대해서는 전혀 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서 본 발명은 헤파시딘을 효과적으로 저해하는 기작을 통해 빈혈을 예방 또는 치료할 수 있는 일산화탄소의 신규한 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 일산화탄소는 헤파시딘(hepcidine)의 발현을 억제하는 기작을 통해서 빈혈을 예방 또는 치료할 수 있다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 일산화탄소는 STAT-3 및 CREBH 신호전달 경로의 저해를 통해 세포 스트레스 또는 면역반응에 의해 발현이 유도된 헤파시딘을 억제하는 효과가 우수하여, 세포 스트레스 또는 면역반응에 따라 증가된 헤파시딘 활성으로부터 유발되는 빈혈질환, 보다 구체적으로 만성질환빈혈의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 CO가 IL-6 및 ER 스트레스 유발제로부터 유도된 헤파시딘 발현을 저해한다는 점을 입증하는 실험

결과이다.

도 2는 CO가 IL-6-유도 STAT-3 활성화를 완화시킨다는 점을 입증하는 실험 결과이다.

도 3은 CO가 IL-6 유도 헵시딘 발현을 CREBH 활성 억제에 의해 저해시킨다는 점을 입증하는 실험 결과이다.

도 4는 CO가 ER 스트레스에 의해 유도된 헵시딘 발현을 CREBH 활성 억제에 의해 저해시킨다는 점을 입증하는 실험 결과이다.

도 5는 CO가 ER 스트레스에 의해 유도된 헵시딘 발현을 저해하고, ER 스트레스 유도된 마우스 모델에서의 철 항상성을 조절한다는 점을 입증하는 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 한 구체예에서, “일산화탄소(CO)”는 액체 형태로 압출된 또는 수용액에 용해된 기체상인 분자 일산화탄소로 정의할 수 있으며, “일산화탄소를 포함하는 조성물”은 이를 필요로 하는 개체에 처리 또는 투여될 수 있는 일산화탄소를 함유하는 기체 또는 액체 조성물을 말한다.
- [0016] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 일산화탄소는 헴옥시게나제(heme oxygenase)-1에 의해 발생하는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 헴옥시게나제(HO)는 헴의 분해시 최초 단계 및 속도 제한 단계를 촉매화하여 동일한 몰의 비리베르딘 IXa, 일산화탄소(CO) 및 철을 생산시키며, 헴옥시게나제는 3개의 이소형태, 즉, 고도 유도성인 HO-1 및 항상 발현되는 HO-2와 HO-3가 존재한다(Choi 등, E. J. Bioch. 247: 725-732). 이중, HO-1의 경우, 헴이 주된 기질임에도 불구하고, 중금속, 사이토카인, 호르몬, 엔도톡신 및 열충격을 비롯한 다양한 비-헴 제제들 또한 HO-1 발현의 강한 유도자로 알려져 있다. 이러한 HO-1 유도자의 다양성은 HO-1의 헴 분해시의 역할에도 불구하고, HO-1이 세포내에서 항상성을 유지하는 생체 기능도 담당한다는 추측을 추가적으로 지지해 준다. 더욱이, HO-1은 과산화수소, 글루타티온 고갈자, UV 방사, 엔도톡신 및 과산소증을 비롯한 산화적 스트레스를 유발하는 다양한 제제에 의해서도 강하게 유도될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 일산화탄소는 헴옥시게나제(heme oxygenase)-1 뿐만 아니라 헴옥시게나제(heme oxygenase)-1의 유도물질에 의해서도 발생될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 일산화탄소 공급체는 이에 제한되지는 않으나, RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM-1(Mn₂CO₁₀:manganese decacarbonyl), CORM-3(Ru(CO)(₃)Cl(glycinate)) 및 CORM-A1(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군 중에서 선택된 것일 수 있고, 바람직하게는 RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide) 또는 CORM-3(Ru(CO)(₃)Cl(glycinate))일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체로부터 공급된 일산화탄소는 헵시딘의 발현을 억제하는 기작을 통해 빈혈을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0020] 보다 구체적으로, 상기 헵시딘은 소포체 스트레스 또는 면역반응에 의해 발현이 유도된 것일 수 있으며, 이러한 발현이 유도된 헵시딘은 본 발명의 일산화탄소가 STAT-3 또는 CREBH 신호전달 경로의 저해를 통해 발현을 억제할 수 있다.
- [0021] 상기 “소포체 스트레스”란 잘못 접힌(misfolding) 단백질들의 축적 및 응집, 특정 단백질의 비정상적인 과다 발현, 글라이코실화 반응 등의 정상적인 단백질 번역후 과정의 억제 등에 의해 세포가 받게 되는 스트레스를 말하며, 이와 같은 소포체 스트레스에 의해 일련의 미폴딩 단백질 반응(UPR)이 나타나게 된다.
- [0022] 헵시딘은 상기 소포체 스트레스, 또는 소포체 스트레스를 유발시키는 물질에 의해 발현이 유도되는데, 상기 소포체(ER) 스트레스를 유발시킬 수 있는 물질로는 당업계에서 소포체 스트레스를 유발시키기 위해 사용할 수 있는 물질이라면 모두 사용가능하고, 바람직하게는 이에 제한되지는 않으나, TG(thapsigargin), TM(tunicamycin) 및 호모시스테인(homocysteine)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 또한 “면역반응”은 주로 만성적인 면역반응이 이에 해당할 수 있으며, 염증반응을 유발하는 각종 만성질환에서 생산된 Cytokine들, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α 등에 의해 헵시딘의 발현이 유도되는데, 보다 구체적으로,

Cytokine 중 IL-6에 의해 헵시딘의 발현이 유도될 수 있다.

- [0024] 활성화된 STAT-3은 타겟 서열(TTCTTGGA)인 전사개시부위 64bp 상단에 결합하는 헵시딘 프로모터에 결합하는데, 상기 결합은 IL-6에 의해 조절되는 헵시딘 발현의 주요 기작으로 알려져 있다. 본 발명의 일실시예에서, 일산화탄소는 STAT-3의 티로신 인산화반응(Y705)을 저해하여 STAT-3의 활성화를 억제하는 기전으로 헵시딘 발현을 억제하며, SOCS-3도 상기 기전에 연관되어 있음을 확인할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 일산화탄소는 소포체 스트레스 또는 IL-6로부터 활성이 유도되는 CREBH에 대해 작용하여, 활성화된 형태인 GREBH의 절단형의 형성을 저해하는 것으로 나타났다.
- [0026] 이에 본 발명의 발명자들은 일산화탄소가 소포체 스트레스 또는 IL-6에 의해 발현이 유도된 헵시딘을 SOCS-3와 연관된 STAT-3의 활성화 억제기전 또는 CREBH의 절단형 형성으로 인한 활성화 억제기전을 통해 발현을 저해한다는 사실을 확인하였고(도 5G 참조), 이에 따라 소포체 스트레스 또는 IL-6로 인해 과유도된 헵시딘으로 인해 유발되는 철분 대사 관련 질병, 즉 빈혈, 보다 구체적으로 만성질환빈혈의 치료에 일산화탄소가 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0027] 따라서 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물, 빈혈 치료제의 제조를 위한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체의 용도, 그리고 치료상 유효량의 일산화탄소를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 빈혈의 치료 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 한 구체예에서, 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 빈혈의 예방 또는 치료용 조성물은 통상적인 방법에 따라 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 제형화하여 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 본 발명의 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0032] 상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업

계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0035] <실험예>

[0036] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0037] 1. 시약

[0038] 트리카보닐 디클로로루테늄(tricarbonyl dichlororuthenium) (II) 다이머(RuCO₂, CORM-2), TG(thapsigargin), TM(tunicamycin), 호모시스테인(Hcys), 4-페닐부티릭산(4-PBA) 및 루테늄 클로라이드는 시그마 알드리치사(St. Louis, MO)로부터 구입한 것을 사용하였다. 트리카보닐클로로 (글리시네이트) 루테늄 (II) (CORM-3)은 Dr. Haksung Kim (Kangwon National University, Korea) 으로부터 제공받은 것을 사용하였다. CORM-3은 신규한 수용성 루테늄-기초 카보닐 CO 운반체로, *in vivo* 실험을 위해 개발되었다. CORM-3은 37℃, 산성 pH 물에서 안정하며, 생리 수용액 및 생체액(biological fluids)에서 CO를 빠르게 방출한다. 또한, *in vivo* 실험을 통해 CORM-3이 CO 가스 흡입시의 생물학적 활성과 유사하게 CO를 세포 및 조직에 특이적으로 전달한다는 점이 입증되었다.

[0039] 재조합 인간 및 마우스 IL-6 및 oncostatin M(OSM)은 R&D 시스템(Minneapolis, MN)으로부터 구입하였다. 재조합 LIF 및 BMP-2는 시그마-알드리치사로부터 구입하였다. 헵시딘(hepcidin)에 대한 항체는 Abcam Inc. (Cambridge, MA)로부터 구입하였다(Abcam; ab30760). 상기 항체는 헵시딘의 절단형을 검출한다. 면역원은 KLH와 결합하는 합성 펩타이드로, 인간 헵시딘-25의 C-말단 50개 잔기에서 유래한다. 상기 항체는 인간 재조합 헵시딘과 반응시켰을 때 약 32kDa의 분자크기의 밴드를 인식하였다.

[0040] STAT-1, STAT-3, CREBH, phospho-ERK, 총 ERK 에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. phospho-STAT-1 및 -3, phospho-SMAD 1/5/8 에 대한 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA)로부터 구입하였다. Flag에 대한 항체는 시그마 알드리치사로부터 구입하였고, 이외 기타 시약들은 모두 시그마 알드리치사로부터 구입한 것을 사용하였다.

[0041] 2. 실험 동물

[0042] 모든 동물실험은 울산대학교의 동물실험 관리 위원회로부터 승인받은 바에 따라 수행하였다. 7주령의 수컷 C57BL/6 야생형 마우스 및 C3H가 ORIENT (Pusan, Korea)사로부터 구입되었다. 마우스는 무특이병원체(specific pathogen-free) 조건 하에서 22℃, 임의량의 음식 및 물이 주어지는 환경에 유지되었다. CORM-3를 매 실험 전 새롭게 증류수에 용해하였고, C57BL/6 마우스에 주입(10 mg/kg/day, *i.v.*)하였다. 대조군 마우스에는 동일량의 증류수만이 주입되었다. CORM-3 주입 3시간 후, 재조합 마우스 IL-6 (mIL-6, 25 ?g/kg *i.p.*) 또는 0.5% *v/v* DMSO/식염수 용액에 용해된 튜니카마이신(1.5 mg/kg, *i.p.*)이 마우스에 주입되었다. 대조군 마우스는 동일량의 0.5% DMSO/식염수 용액만이 주입되었다. 24시간 후, CORM-3가 다시 주입되었다. 주입 48시간 후, 마우스는 경추 과열법으로 희생되었고, 그들의 혈청(orbital sinus로부터 획득된 정맥혈), 비장, 간 조직이 실험을 위해 획득되었다.

[0043] 3. 세포 배양

[0044] 세포는 37℃, 5% 이산화탄소 및 95% 공기조건하에서 배양되었다. 인간 간암 세포주(hepatocellular carcinoma cell line), HepG2는 ATCC (Manassas, VA)로부터 구입하였으며, 10% 우태혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액을 포함하는 DMEM 배지에서 배양되었다. 인간 간세포 Huh7 세포는 10% 우태혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액을 포함하는 RPMI 배지에서 배양되었다.

[0045] 4. 면역블랏 분석

[0046] 배양된 세포는 찬 PBS로 두번 세척된 후 실험에 사용되었다. 세포는 포스파타제 및 프로테아제 저해제가 포함된 1X RIPA 버퍼로 용해되었다. 마우스로부터 획득된 혈청 샘플은 1X PBS로 희석되었다. 동일량의 세포 용해액 및 혈청이 BCA 단백질 분석 시약 (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)으로 측정되었다.

[0047] 샘플은 β-머캅토에탄올을 포함하는 2X 샘플 버퍼로 희석되었고, 동일량의 단백질이 6%-15% SDS-PAGE 겔로 분리된 후 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (PVDF) 막에 이동되었다. 막은 0.1% Tween 20 (PBS-T)을 포함하는 PBS 에 존재하는 5% 무지방우유로 20분간 블락되었으며, 1% 무지방우유를 포함하는 PBS-T 용액에 존재하는 헵시딘 (1:1000), CREBH (1:500) 및 SOCS-3(1:1000) 항체와 하룻밤 동안 배양되었다. 퍼옥시다아제-결합된 이차항체로 블랏이 생성되었고, 반응한 단백질은 ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life

Sciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 시각화되었다. 밴드의 상대적인 신호 강도는 Scion Image Software (Scion Corporation, Frederick, MD)를 사용하여 표준화되었다.

[0048] 5. RNA 분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

[0049] 마우스 HepG2 세포 및 간조직의 총 세포 RNA는 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 사용법에 따라 분리되었다. 간단히 요약하면, 2 µg의 추출된 RNA가 M-MLV 역전사효소 및 올리고(dT) 15 프라이머 (Promega, Madison, WI)를 사용하여 상보적 DNA(cDNA)로 역전사되었으며, cDNA는 인간 헵시딘, 마우스 헵시딘 및 XBP-1 절단부에 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR 증폭되었다. RT-PCR을 통한 유전자 발현 데이터는 GAPDH에 연관되어 정량화되었다.

[0050] 6. 실시간 중합효소연쇄반응(Real time quantitative RT-PCR, qRT-PCR)

[0051] 총 세포 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen, San Giuliano Milanese, MI, Italy)을 사용하여 사용법에 따라 추출되었다. cDNA는 역전사를 통해 제조되었고, 실시간 PCR 이 SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (USB products, Affymetrix)을 사용하여 ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 상에서 수행되었다.

[0052] 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0053] 1) hHAMP,

[0054] 정방향 5' -TGTTTCCACAACAGACGGG-3'

[0055] 역방향 5' -CGCAGCAGAAAATGCAGATGG-3'

[0056] 2) hId2,

[0057] 정방향 5' -GACCCGATGAGCCTGCTATAC-3'

[0058] 역방향 5' -GGTGCTGCAGGATTTCCATCT-3'

[0059] 7. 플라스미드, siRNA 형질감염

[0060] pCMV-Flag/wtSTAT3, pCMV-Flag/dnSTAT3(R382W), pCMVT2B-Flag는 울산대학교의 박정우 박사로부터 제공받았다. 플라스미드는 Hispeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen)를 사용하여 정제되었다. 세포는 플라스미드(웰당 4 µg DNA)를 사용하여 12시간동안 리포펙타민 방법(Invitrogen)을 통해 형질감염되었고, 10% FBS를 포함하는 배지에 36시간동안 보관되었다.

[0061] 미리 설계된 STAT-3, SOCS-3 및 CREBH에 대한 siRNA는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구입되었다. 세포는 siRNA(50nM 또는 100nM)로 12시간동안 리포펙타민 방법으로 형질감염되었고, 10% FBS를 포함하는 배지에 36시간동안 보관되었다. STAT3 및 SOC-3, CREBH 발현의 저해는 항-STAT3, SOCS-3 및 CREBH 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 확인되었다. 대조군으로는 스크램블 siRNA를 사용하였다.

[0062] 8. 혈청 철 및 헵시딘 분석

[0063] 혈청 철은 상업적으로 사용가능한 Iron Assay Kit (BioVision, Mountain View, CA)을 사용하여 양이 분석되었다. 마우스 헵시딘 ELISA 키트는 USCN Life Science Inc (Wuhan, China)로부터 구입되었다. 혈청 철 및 헵시딘 레벨은 사용법에 따라 분석되었다.

[0064] 9. 파라핀-임베디드 부위의 철 염색

[0065] 간 및 비장의 철 분포 부위를 확인하기 위해, Iron Stain Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 마우스 조직이 4% 포르말린에 침강-고정되고, 파라핀 왁스에 임베디드 되었으며, 분획되고, Perls' Prussian Blue로 염색되었다.

[0066] 10. 조직 비-헴(heme) 철 분석

[0067] 비장 샘플은 65°C에서 24시간동안 건조된 후 실험에 사용되었다. 샘플은 65°C, 24시간동안 산-소화 혼합액(3 M hydrochloric acid/10% trichloroacetic acid, Sigma Aldrich)에서 소화되었고, 100 µl의 각각의 산 추출물이 300 µl의 ferene(3 mM, Sigma Aldrich) 크로모젠 시약과 배양되었다. 592nm에서의 흡광도가 Spetramax M2 스펙트로포토미터로 측정되었다. 검량선은 45 mM ferrous ammonium sulfate (Sigma) 용액을 점차적으로 희석하여 얻었다. 결과는 mmol/gm 비장 조직 건조중량으로 나타내었다.

[0068] <실시예 1> CO는 IL-6 및 ER 스트레스 촉진제에 의한 헵시딘 발현을 저해한다.

[0069] IL-6는 간세포의 APR 의 주요 조절자이다. 염증 유발 자극에 의해, 대식세포는 IL-6를 분비하고, 이는 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 헵시딘 발현을 유발한다. 본 발명의 일실시예에서도, IL-6 처리는 시간 의존적으로 12시간 후부터 18시간 후 최대로 HepG2 세포의 헵시딘 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(도 1A 참조). CO의 항염증 활성이 IL-6에 의한 헵시딘 유발을 억제할 수 있는 지 확인하기 위해, HepG2 세포가 CO 방출 분자(CORM-2)와 함께 IL-6로 처리되었다. 결과를 도 1A에 나타내었다. 도 1A를 참조하면, CORM-2처리를 통해 IL-6-의존적인 헵시딘 발현 유도는 현저하게 저해되었음을 알 수 있었다.

[0070] ER 스트레스를 유발하는 시약이 *in vivo* 에서 헵시딘 발현을 유도하여, 저철혈증(hypoferremia) 및 비장 철 격리(splenic iron sequestration)를 유발하는 것이 선행문헌으로부터 보고된 바 있다. 따라서 본 발명의 발명자들은 ER 스트레스 반응을 유도하는 인자 (예: 튜니카마이신(tunicamycin), 탐시가진(thapsigargin) 및 호모시스테인(homocysteine))가 헵시딘 발현을 유도한다는 점을 *in vitro* 로 간암 세포주 모델에서 확인하였다. 상기 ER 스트레스 유발인자의 HepG2 세포에의 처리로 인해 헵시딘의 양이 급격히 증가하였다(도 1 B(튜니카마이신, TM), C(탐시가진, TG), D(호모시스테인, HCYS) 참조). 다음으로, CO 처리에 의해 ER 스트레스 유발 인자에 의해 유도된 헵시딘 발현이 조절되는지 조사하였고, 결과를 도 1 B, C, D 하단에 나타내었다. 도 1의 B, C, D를 참조하면, CORM-2의 전처리에 의해 ER-스트레스에 의해 유도된 헵시딘 단백질의 발현은 급격히 감소한 것을 알 수 있었다.

[0071] CORM-2의 CO방출이 헵시딘 발현에 영향을 미치는 주요 인자임을 밝히기 위해, HepG2세포는 CORM-2 또는 루테늄 클로라이드($RuCl_2$)로 처리되고, 튜니카마이신이 헵시딘 유발인자로 처리되었다. 두 분자 모두가 루테늄을 포함하고 있지만, $RuCl_2$ 은 튜니카마이신에 의해 유발된 헵시딘의 발현을 억제하지 못하는 것을 확인 할 수 있었다(도 1E 참조).

[0072] <실시예 2> CO는 IL-6 에 의해 유발된 STAT-3 활성을 감소시킨다.

[0073] IL-6는 STAT-3의 활성화를 통해 헵시딘을 유도한다. CO에 의한 헵시딘의 저해가 STAT-3 신호전달 경로의 조절에 의한 것인지 확인하기 위해, IL-6의 처리에 따른 STAT-3 티로신 인산화반응 (Y705)을 조사하였다. 포스포-STAT-3은 IL-6의 처리에 따라 급격히 증가하였는데, 처리 후 30분 내에 최대에 도달하였다(도 2A 참조). 그러나 CORM-2의 전처리에 의해 IL-6-의존적인 STAT-3의 활성화는 Y705의 인산화를 바탕으로 판단해 볼 때, 감소하는 양상을 보였다(도 2B 참조).

[0074] STAT-3이 헵시딘 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해, 본 발명의 발명자들은 빈 플라스미드, 야생형 STAT-3을 발현하는 플라스미드, 또는 DNA 결합 도메인이 돌연변이된 STAT-3 우성음성돌연변이체(STAT-3 DN)를 발현하는 플라스미드를 세포에 형질감염시켰다. 야생형 STAT-3 또는 유사 형질감염이 수행된 HepG2 세포는 재조합 IL-6의 처리에 의해 헵시딘을 발현하였다. 반면, 재조합 IL-6 처리에 의해서도 STAT-3 DN이 형질감염된 세포는 헵시딘을 발현하지 못하였다. 또한, CO 전처리는 STAT-3 DN이 형질감염된 세포의 헵시딘 발현을 효과적으로 저해하지 못하였다(도 2C 참조). 상기 결과는 CO가 IL-6-의존적인 헵시딘 유도를 STAT-3 활성 억제를 통해 저해함을 시사한다.

[0075] 사이토카인 신호전달의 억제인자(suppressors of cytokine signaling, SOCS)는 사이토카인-의존적인 신호전달의 음성 조절자로 작용한다. 발현되면, SOCS는 JAK/STAT-의존적 신호전달 경로를 저해한다. SOCS 단백질은 다양한 아미노-말단부위를 포함하는데, 중앙 Src-homology 2(SH2) 도메인 및 신규한 C-말단 보존모티프인 SOCS box 등이 이에 포함된다. 본 발명의 발명자들은 CO-매개 IL-6-유발된 JAK/STAT 신호전달경로 활성화의 억제가 SOCS-3의 유발을 포함하는 것으로 가설을 세우고, 확인하였다. 확인 결과, CORM-2는 IL-6 유무와는 관계없이 SOCS-3 단백질 발현을 유도함을 확인할 수 있었다(도 2D 참조). SOCS-3이 STAT-3 활성화로 인해 유도된 IL-6의 저해 기작에 연관되어 있음을 확인하기 위해, HepG2 세포를 SOCS-3 siRNA로 형질감염시키고 영향을 조사하였다. SOCS-3 siRNA로 형질감염된 세포는 스크램블 siRNA에 비해 IL-6에 따라 포스포-STAT-3을 강하게 유도하였다. 또한, CO는 SOCS-3-siRNA-감염 세포에서 STAT-3 활성화 억제 효과를 상실하였다(도 2E 참조).

[0076] 본 발명의 발명자들은 또한 CO의 STAT-3에 대한 활성 억제효과의 저하가 헵시딘 수준에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. SOCS-3 siRNA 감염된 실험군에서, 재조합 인간 IL-6의 처리에 따른 헵시딘의 발현 증가가 관측되었

다. CORM-2는 헵시딘 발현 수준을 억제하는데 활성이 없었고, 헵시딘 발현은 IL-6에 의해 미량 증가한 것으로 나타났다(도 2F 참조). 상기 실험 결과는 SOCS-3이 CO가 STAT-3 경로를 억제함에 있어 필수적인 역할을 수행함을 시사한다.

[0077] <실시예 3> CO는 CREBH 활성화의 억제를 통해 헵시딘 발현을 저해한다.

[0078] CREBH가 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 헵시딘 발현을 유도하는 주요 전사인자라는 점이 보고되어 왔다. ER 스트레스 중의 CREBH의 활성화는 헵시딘을 포함하는 APR 유전자 전사를 조절하는 활성화된 절단된 형태를 형성하기 위해 절단을 필요로 한다. 따라서 본 발명의 발명자들은 CO에 의해 수행되는 헵시딘의 저해작용이 CREBH의 활성화 조절에 수반되어 일어나는 기작인지 여부를 확인하였다.

[0079] 첫번째로, HepG2 세포에서 IL-6가 GREBH의 절단을 유도하여 이의 활성화 형태인 CREBH-N으로의 형성을 유도하는지 여부를 조사하였다. 도 3A를 참조하면, IL-6는 시간-의존적으로 처리 6시간 후부터 GREBH의 절단을 유도하여 GREBH-N을 형성하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 절단형인 GREBH-N은 핵으로 이동하는 것으로 나타났는데(도 3B 참조), 핵 분획에서 많이 검출되었고, IL-6 처리 12시간 후에 핵단백질인 라민 A/C와 함께 나타났다.

[0080] CORM-2로 전처리된 HepG2 세포는 IL-6로 인해 유발된 CREBH 절단이 감소되는 경향을 보였다(도 3C 참조). 본 발명의 발명자들은 또한 CORM-2가 CREBH mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였고, IL-6에 의해 발현이 자극된 CREBH 유전자는 CORM-2를 HepG2 세포에 전처리 후 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 3D 참조). CREBH가 IL-6 의존적인 헵시딘 발현에 필수적인지 여부를 확인하기 위해, HepG2 세포를 CREBH siRNA 또는 대응하는 대조군인 스크램블 siRNA로 형질감염시켰다. siRNA-의존적인 GREBH의 저해가 확인되었고, 대조군 대비 헵시딘의 mRNA 발현 수준(도 3E 참조) 및 단백질 수준(도 3F 참조)이 감소됨을 알 수 있었다. CREBH siRNA가 감염된 세포에서, CORM-2 전처리는 IL-6 처리된 그룹과 비교할때, 헵시딘 발현을 조절하지 못하는 것을 확인할 수 있었다(도 3F 참조).

[0081] ER 스트레스로 인해 유도된 헵시딘 발현을 CO가 저해하는 기작을 조사하기 위해, CO가 CREBH의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 예상한 바와 같이, TM(튜니카마이신) 처리에 의해 유발된 ER 스트레스는 CREBH의 절단을 유도하였고, 이에 따라 증가된 CREBH-N을 확인할 수 있었다(도 4A 참조). TM 처리는 CREBH-N의 핵으로의 이동을 촉진시켰고(도 4B 참조), ER 스트레스로 인해 증가된 CREBH-N의 생성은 CORM-2의 전처리에 의해 감소되는 경향을 보였다(도 4C 참조). CORM-2는 또한 TM에 의한 CREBH 유전자 발현을 또한 억제하였다(도 4D 참조).

[0082] IL-6로부터 얻어진 결과와 유사하게, CREBH siRNA가 감염된 세포는 대조군에 비해 TM에 의해 유도된 헵시딘 mRNA(도 4E 참조) 및 헵시딘 단백질 발현 수준(도 4F, G 참조)이 저해됨을 알 수 있었다. CREBH siRNA가 감염된 세포에서, CORM-2 전처리는 TM 처리된 그룹과 비교할때, 헵시딘 발현을 조절하지 못하는 것을 확인할 수 있었다(도 4G 참조).

[0083] 상기 결과를 참조할 때, CO가 IL-6, ER 스트레스에 의해 유발되는 헵시딘 발현을 CREBH 절단 및 활성화 기작의 저해를 통해 억제하는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

[0084] <실시예 4> CO는 ER-스트레스 유도된 마우스에서 헵시딘 발현을 억제하며, 철 항상성을 조절한다.

[0085] 본 발명의 발명자들은 CO 처리로 인한 헵시딘 발현 억제의 효과가 *in vivo* 에서도 효과가 있는지 여부를 확인하였다. C57BL/6 마우스 및 C3H 마우스가 CORM-3로 전처리되었고, 3시간 후 재조합 mIL-6 또는 TM(튜니카마이신)이 각각 염증반응 또는 ER-스트레스 유발을 위해 처리되었다. C57BL/6 마우스는 46시간 후 희생되었고, 혈액이 혈청내 철 및 헵시딘 양 분석을 위해 회수되었고, 간조직이 간 헵시딘 mRNA 수준 분석을 위해 회수되었다. 동일한 실험을 통해, C3H 마우스의 비장 조직이 철 염색 및 비-헴(heme) 철 분석을 위해 회수되었다.

[0086] CORM-2가 DMSO과 같은 유기용매에 가용성인 반면, CORM-3는 수용성이다. DMSO의 잠재적인 오프 타겟 효과를 제거하기 위해, CORM-3를 마우스 실험에 사용하였다. mIL-6가 주입된 마우스는 증가된 헵시딘 발현을 보였다(도 5A 참조). 그러나 CORM-3을 전처리한 마우스는 헵시딘의 발현 및 방출을 간세포 및 혈청 모두에서 감소시켰다(도 5C 참조).

[0087] 본 발명의 발명자들은 또한 CORM-3의 효과를 TM(튜니카마이신)이 주입된 마우스에서 확인하였다. 우선, XBP-1 mRNA의 스플라이싱을 조사하여 TM(튜니카마이신)이 주입된 마우스에서 ER 스트레스가 발생하는지 확인하였다.

TM 주입에 의해 XBP-1의 절단형 mRNA가 간조직에서 축적되는 것을 확인하였다. 상기 조건 하에서, CORM-3는 간 조직의 헵시딘 mRNA를 눈에 띄게 감소시켰으며(도 5B 참조), 혈청 헵시딘 단백질 또한 감소시켰다(도 5C 참조).

[0088] 헵시딘은 철 방출제인 ferroportin을 분해하는 철 조절 호르몬이므로, 비장에서의 혈청 철 농도 및 세포내 철 축적량을 조사하였다. 혈청 철 농도는 ER-스트레스 유발된 마우스에서 현저하게 낮게 나타났고, 그러나 CORM-3이 전처리된 마우스는 혈청 철 농도를 대조군 값과 유사한 수준으로 유지하는 것을 확인할 수 있었다(도 5D 참조).

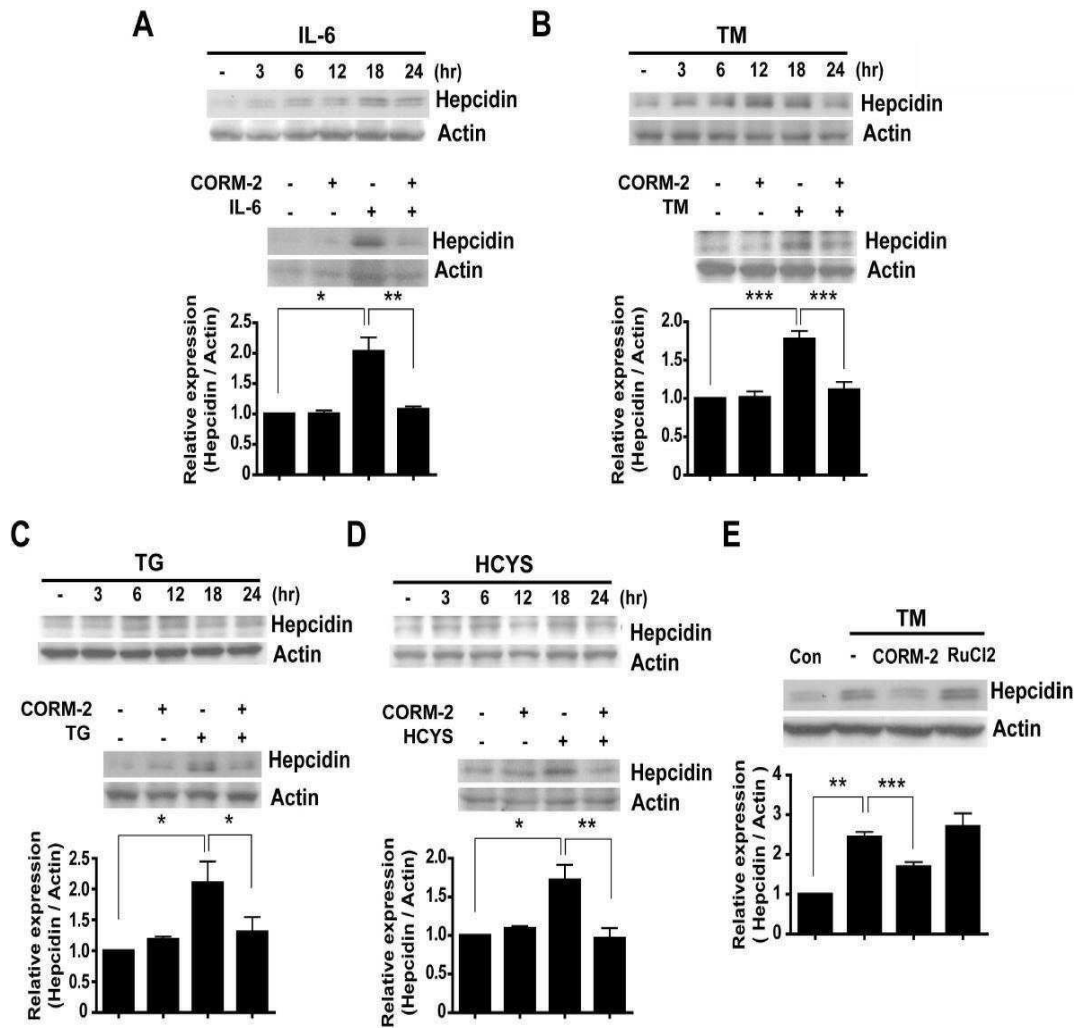
[0089] 비장조직의 철 축적량이 Perls' Prussian blue 염색으로 조사되었다. 염색 감수성이 마우스 종 별로 다르므로, 보다 감수성이 있는 C3H 종을 사용하였다. 비장 대식세포의 철 축적은 푸른색 염색으로 확인되었고, ER-스트레스 유발된 마우스에서 증가하는 것으로 나타났다. 반면 CORM-3이 전처리된 마우스에서는 철 축적이 감소하는 것으로 나타났다(도 5E 참조).

[0090] 비장에서의 비-헴(heme) 철 함량을 정량하기 위해, 비장의 산 추출물이 ferene chromogen과 반응되었다. 비-헴 철 함량은 대조군에 비해 약 2배 증가함을 확인할 수 있었다. 반면, CORM-3이 전처리된 마우스에서는 비-헴 철 함량의 증가가 감소되는 양상을 보였다(도 5F 참조). 상기 결과는 CO 가 헵시딘 발현을 증가시켜, ER-스트레스 유발된 마우스에서의 철 대사 조절제로 사용될 수 있음을 시사한다.

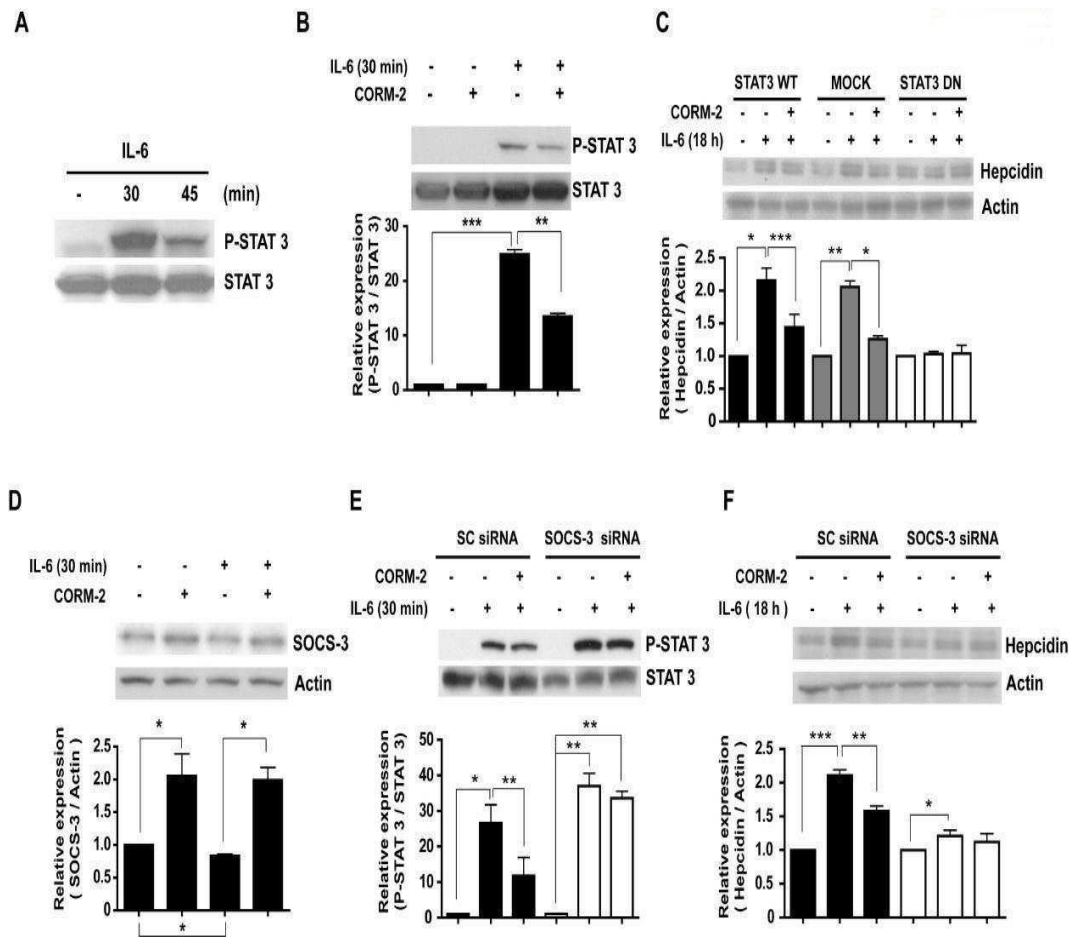
[0091] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

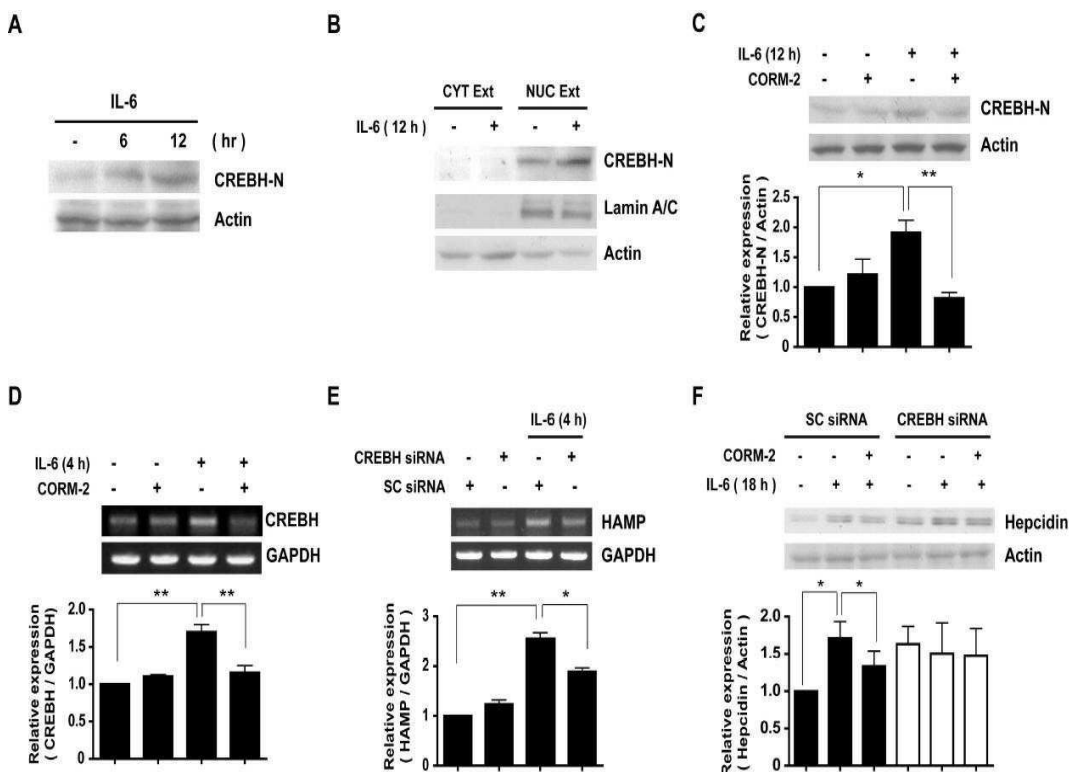
도면1



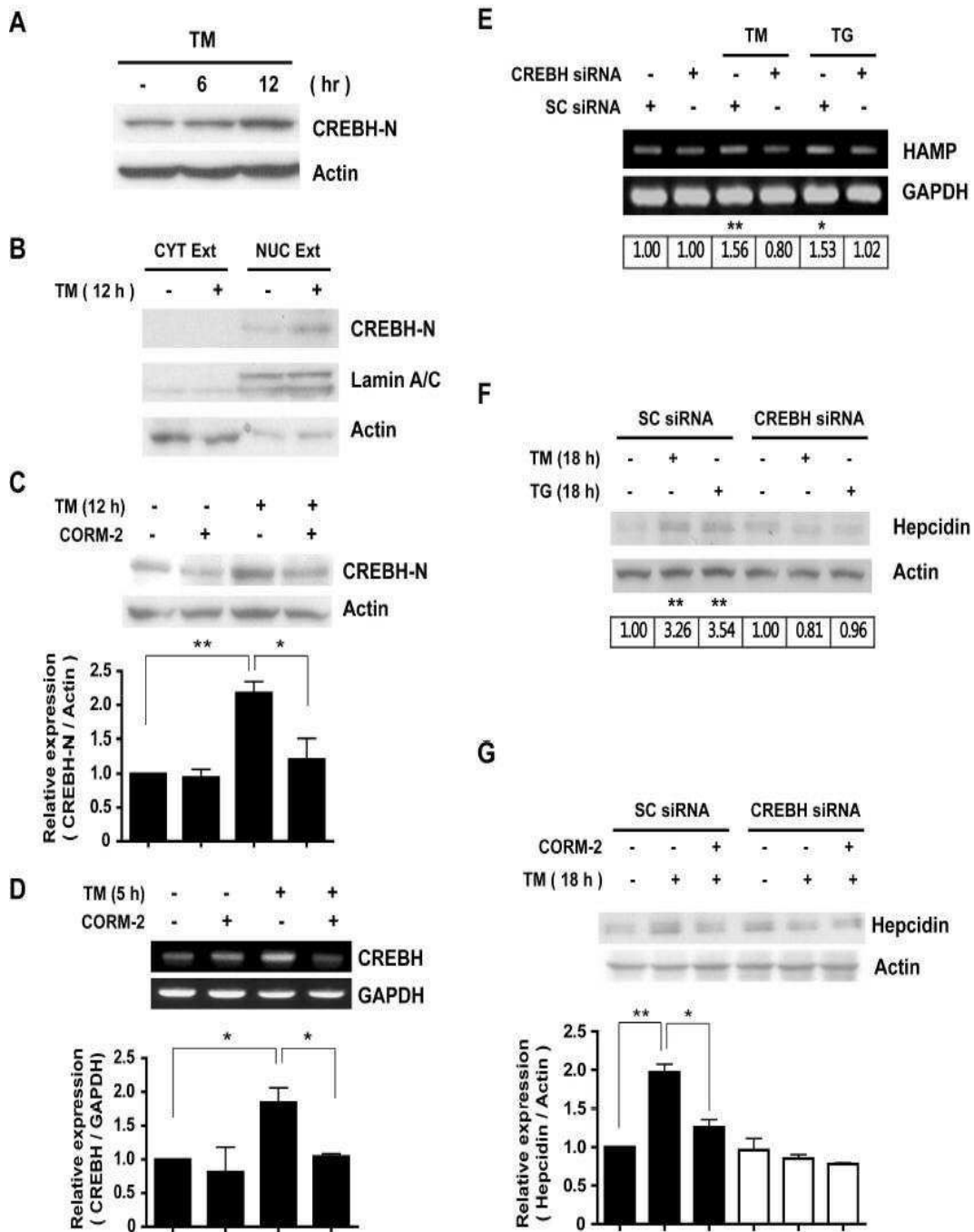
도면2



도면3



도면4



도면5

