



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137979
(43) 공개일자 2024년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/12 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/12 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-0031433

(22) 출원일자 2023년03월09일
심사청구일자 2023년03월09일

(71) 출원인

인제대학교 산학협력단

경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동,
인제대학교)

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

윤상억

경상남도 김해시 가야로 60, 303동 1003호(
삼계동, 분성마을동원로얄듀크아파트)

최윤지

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인위더피플

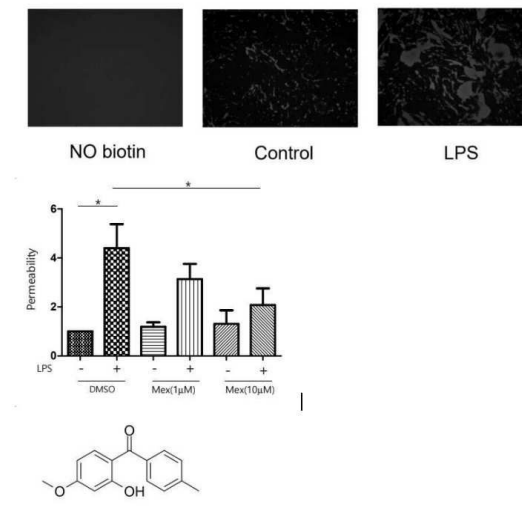
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 mexenone 을 포함하는 혈관 내피 장벽 강화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 mexenone 을 포함하는 혈관 내피 장벽 강화용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 VE-카테린의 Y685 사이트에 작용하여 혈관 내피 장벽을 강화하여 패혈증 등에 있어서 치료 효과를 나타낼 수 있는 혈관 내피 장벽 강화용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A61P 9/12 (2018.01)

(72) 발명자

김지혜

경상남도 거제시 양정5길 36, 104동 1402호 (양정동, 거제아이파크1차)

이사빈

경상남도 김해시 인제로 167, 113동 704호 (어방동, 대우유토피아아파트)

이보석

경상남도 양산시 물금읍 화합11길 32, 203호

엄채영

경상북도 영천시 화남면 귀호2길 17-3

안지민

경상남도 양산시 물금읍 신주로 35, 109동 501호 (양산2차 e-편한세상)

이효희

충청남도 천안시 서북구 충무로 158-10, 106동 1804호 (쌍용동, 선경해누리아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345351491
과제번호	2021R1I1A3051498
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	ECM에 의한 동맥경화 유도 기전 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인제대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

mexenone 을 포함하는 혈관 내피 장벽 강화용 조성물

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 VE-카테린의 Y685 사이트에서 작용하는 것인 조성물

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 당뇨병 황반부종, 동맥경화, 폐동맥 고혈압, 뇌졸중 또는 패혈증의 치료를 위한 것인 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 mexenone 을 포함하는 혈관 내피 장벽 강화용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 VE-카테린의 Y685 사이트에 작용하여 혈관 내피 장벽을 강화하여 패혈증 등에 있어서 치료 효과를 나타낼 수 있는 mexenone 을 유효 성분으로 포함하는 혈관 내피 장벽 강화용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 패혈증(Sepsis)은 병원성 미생물의 감염에 의해 생체의 면역체계가 과도하게 활성화됨으로써 유발되는 염증반응으로 심할 경우 환자를 쇼크와 사망에 이르게 한다. 패혈증은 대부분 전신 염증반응을 동반하게 되며, 전신 염증반응은 다양한 원인에 의해서 발생할 수 있다. 구체적으로 패혈증은 감염에 의해 나타나는 전신성 염증반응 증후군으로 면역력이 약한 유아, 노인, 또는 수술 환자에 주로 급성으로 발생한다. 체내 병원성 미생물의 감염에 의해 전신 염증반응이 발생하는 경우를 패혈증이라고 한다.

[0004] 패혈증 치료는 감염을 확인하는 것부터 시작하며, 치료는 감염관리, 혈액학적 보조(hemodynamic support), 숙주 면역조절 및 대사/내분비적인 보조 등 다각적인 방법으로 이루어진다. 무엇보다도 패혈증 치료에 가장 중요한 것은 빠른 시간에 패혈증을 진단하는 것이다.

[0005] 패혈증 치료에 있어서 항생제의 선택이 매우 중요하며, 원인 병원균이 밝혀지지 않은 상태에서 일차적으로 강하고 광범위한 항생제를 사용한다. 중증 패혈증이나 패혈쇼크 환자의 경우 진단 후 1시간 이내에 적절한 항생제를 정맥 주사하여야 사망률을 감소시킬 수 있다. 항생제의 사용 시점과 아울러 약제의 선택도 매우 중요하다. 가능성이 높은 원인균에 효과적인 하나 또는 두가지 이상의 항생제를 병합해서 사용하여야 효과가 좋은 것으로 알려져 있다. 항생제 치료 이외에 수액치료, 혈압상승제 치료, 강심제와 혈액제제의 사용, 인슐린 치료, 코티코스테로이드 등이 사용되기도 한다 (J Korean Med Assoc, 2013, 56(9), 819-826).

[0006] 패혈증은 중환자 사망의 대부분을 차지하는 질환으로 입원하는 환자의 약 25-30%를 차지하는 흔한 감염질환으로, 30-60%의 사망률을 나타내는 위험한 증상이나, 효과적인 치료제가 없는 질환이다.

[0007] 패혈증의 효과적인 치료제가 없는 상황에서 치료제를 개발하려는 다양한 시도가 이루어지고 있다. 특히 염증을

억제하는 방법으로 많은 시도가 이루어져 왔지만, 다양한 염증 억제 약물이 임상에서 실패하는 경우가 많아 염증을 억제하는 방법이 아닌 새로운 치료전략이 필요하다.

[0008] 이 중에서 고지혈증 치료제로 많이 사용되고 있는 약물(Simvastatin, Cerivastatin, Fluvastatin, Ulinastatin)들이 패혈증 연구에 많이 이용되고 있다 (Kidney International, 2006, 69, 1535-1542; J Pharm & Exp Therapeutics, 2000, 294(3), 1043-1046; J Pharm & Exp Therapeutics, 2006, 319(3), 1348-1354; Int J Molecular Medicine, 2017, 39(5), 1269-1276). 이러한 약물들은 Lipopolysaccharide (LPS) 처리하기 전에 전 처리하면 생존율(survival rate)을 40-60% 정도 개선시키는 효과를 보이고 있지만, LPS를 먼저 처리하면 그 효과가 떨어진다.

[0009] 패혈증 치료를 위한 다른 방법으로는 줄기세포를 이용한 다양한 방법들이 시도되고 있다. 지방줄기세포, 중배엽 줄기세포를 이용하거나 골수유래 줄기세포, 제대혈 줄기세포를 이용하는 방법들이 시도되고 있지만 그리 큰 효과를 보지 못하고 있다. LPS를 처리한 패혈증 모델에서 LPS 처리군에서 비해 생존율을 30-40% 정도 개선시키는 효과를 보이고 있다 (J Cell Science, 2018, 131, jcs211151; Anesthesiology, 2017, 127(6), 1017-1034; J Cell Physiology, 2017, 9999, 1-13; Molecular Medicine reports, 2016, 14, 3862-3870; J Inflammation, 2012, 9, 33).

[0010] 최근에 패혈증 환자에서 정상군에 비해 SIRT1 단백질의 활성과 합성이 감소되어 있고, sphingosine-1-phosphate (S1P)의 함량이 감소하고 있는 것이 밝혀졌다 (Critical care, 2015, 19, 372; Free radical Biology and Medicine, 2017, 113, 291-303). S1P 함량은 패혈증 환자에서 급격하게 감소하는 경향을 보이고 있어 S1P의 함량을 증가시키기 위해 S1P agonist를 사용하거나 S1P 분해 하는 효소를 억제하는 억제제를 사용해서 패혈증을 치료하려는 시도를 하고 있으며 (Circulation research, 2008, 103, 1164-1172; Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1841, 1403-1412; J Pharmacol Exp Ther., 2015, 352, 61-66), 패혈증 환자에서 감소되는 SIRT1 단백질의 함량과 활성을 증가시키는 시도를 하고 있다. SIRT1을 활성을 높이면 염증을 억제할 뿐 아니라 혈관내피 세포의 투과성(permeability)을 감소시키므로 패혈증을 개선한다고 보고하고 있다. S1P의 함량을 높이는 가장 좋은 방법은 S1P를 합성하는 유전자를 과잉생산하거나 S1P를 분해하는 효소를 knock down 혹은 knock out 시키는 방법이 사용되지만 이 방법은 유전자 조작이라는 불편함이 있고, S1P agonist를 사용하는 방법은 치료하는 효과가 미미한 실정이다. 특히, S1P agonist 가장 잘 알려진 FTY720 (fingolimod)도 치료효과가 매우 낮은 것으로 보고되었다. 줄기세포 단독과 줄기세포와 FTY720 병용요법에서 10프로 정도 치료효과를 보이고 있다. S1P를 직접 투여하는 방법이 있지만 매우 고가이고, 혈액 내에서 분해속도가 빨라 치료효과를 낮은 문제가 있다(Acta Pharmacologica Sinica, 2018, 0, 1-12; Free radical biology and medicine, 2017, 113, 291-303; Biochimica et Biophysica Acta, 2018, 1864(3), 784-792). 따라서 안전하고 높은 효능의 새로운 패혈증 치료제 개발이 절실한 상황이다.

[0011] 패혈증(sepsis)은 병원성 그람 음성 세균이 생체에 감염된 경우 세포벽 성분인 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)가 독소로 작용하여 생체의 면역체계가 과도하게 활성화됨으로써 유발되는 염증 반응으로서, 전신에 감염증을 일으키거나 증상이 심할 경우 쇼크를 동반하기도 한다. 구체적으로 패혈증은 악성종양, 백혈병, 악성림프종, 후천성면역부전증후군(AIDS), 교원병, 신부전, 간질환, 뇌혈관장애, 당뇨병 등의 기초질환을 가진 환자나 고령자, 미숙아 같은 체액성면역부전 또는 세포성면역부전을 가진 저항력이 약한 숙주가 부신피스테로이드나 항종양제의 화학요법, 코발트 조사 등의 방사선치료 또는 유치카테테르, 혈액투석, 장기이식, 심장수술 등의 처치, 수술을 받은 경우에 주로 발병한다. 패혈증은 병원 중환자 병동에 입원한 환자가 사망하는 주요한 원인이 되며, 이에 의한 치사율이 보통 30% 이상인 매우 심각한 질병이다. 의학기술의 발전에도 불구하고 아직도 전 세계적으로 수술 후유증으로 감염이 되어 패혈증이 발생하는 경우가 많으며, 신생아나 노인들과 같이 체내의 면역력이 약한 사람이 감염되었을 경우 패혈증으로 진행되는 경우도 많다. 대표적으로, 신생아 패혈증의 경우 만삭아 1,000명 중 3명 정도가 발생하는 것으로 알려져 있고, 미숙아는 발병률이 3 내지 4배 증가하는 것으로 알려져 있다. 패혈증에 걸렸을 경우 대개 항생제 치료를 받게 되지만, 적절한 처치가 늦어져 균들이 많이 증식했을 경우나 항생제에 내성이 강한 균주에 의해 감염이 되었을 경우에는 항생제만으로는 효과적인 치료를 할 수 없으며, 다양한 항생제에 대한 내성을 갖는 병원균이 점차 증가하고 있어 새로운 패혈증 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 폐혈증 등의 치료를 위한 새로운 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여 mexenone 을 포함하는 혈관 내피 장벽 강화용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 의한 조성물은 VE-카데린의 Y685 사이트에서 작용하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 카데린은 세포-세포 접촉을 유지하고 세포 골격 복합체를 조절하는데 필수적이라고 알려져 있다. 모세혈관의 벽을 이루는 내피세포들끼리는 VE-카데린(cadherin)이라는, 세포막에 박혀 있는 단백질을 통해 서로 고정돼 있다. 상피세포들의 세포간 결합 중 부착연접(adhering junction)에는 카데린(cadherin)이라는 세포부착분자(adhesion molecule)가 인접한 두 세포를 연결해 준다. 카데린은 세포막을 관통하여 위치하는 수용체 단백질로 5개의 세포외구역(extracellular domain)을 가지며, 인접세포에 위치한 다른 카데린과 결합하여 세포간의 단단한 결합의 유지시킨다.

[0018] 카데린은 막 통과 성분은 단일 사슬 당단백질 반복으로 구성되며, Ca 의존성이 있기 때문에, Ca 이온의 결합부위로 작용하는 5개의 탠덤 세포외 도메인 반복을 가지고 있다. 본원 발명에 의한 조성물은 이러한 도메인 중에 VE-카데린의 Y685 사이트에서 작용하는 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명에 의한 조성물은 당뇨병 황반부종, 동맥경화, 폐동맥 고혈압, 뇌졸중 또는 폐혈증의 치료를 위한 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 mexenone 을 포함하는 조성물은 폐혈증을 유도하는 대표적인 방법인 LPS 주사방법으로 폐혈증을 유도한후 처리한 결과 VE-카데린의 Y685 사이트에서 작용하여 폐혈증시 나타나는 acute lung injury를 억제하고 폐에서의 투과성을 감소시키는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 mexenone 에 의해 혈관투과성이 저해되는지를 평가한 결과를 나타낸다.

도 2는 mexenone 을 처리한 경우와 비교예인 DMSO로 처리한 경우에 VE 카데린 결합이 유지되는지 여부 및 장벽 유지 효과를 나타내는 위치를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3 및 도 4는 LPS 에 의해 유도된 폐 투과성에 미치는 mexenone 의 영향을 평가한 결과이다.

도 5는 mexenone 에 의해 LPS에 의해 유도된 폐 손상을 방지할 수 있는지 여부를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명이 이하의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

세포 내(in vitro) 혈관투과성 평가

[0027] mexenone 이 세포 내로 투과하는지 여부를 확인하기 위해, bio FN이 코팅된 표면에 endothelial 단층을 형성하고, LPS 유도 경로를 fluorescene microscopy 를 사용하여 측정하였다.

[0028] 도 1에서 mexenone 이 LPS 에 의해 유도된 혈관투과성을 투여량에 비례하여 유효하게 감소시키는 것을 알 수 있

다.

[0030] **mexenone 메카니즘 확인 - VE 카데린 인산화 평가(VE-cadherin phosphorylation)**

[0031] mexenone 이 LPS가 유도된 VE 카데린에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위해 먼저 LPS 처리후 혈관 내피 세포의 표면에 VE 카데린이 염색되었다.

[0032] 접합부에서의 VE 카데린의 중요한 안정화 요인인 VE 카데린의 Y 658 염색체가 Src와 p120 의 결합에 의해 인산화 된다고 알려져 있다.

[0033] 도 2에서 보는 바와 같이 mexenone 을 처리한 경우 비교예인 DMSO로 처리한 경우에 비해 VE 카데린 결합이 유지 되는 것을 알 수 있으며, VE 카데린의 함량 변화없이 LPS 유도된 인산화를 방지하는 것을 확인할 수 있다.

[0034] 또한, actin cytoskeletal contractility 또는 결합 단백질인 ZO-1 은 mexenone 에 의해 영향을 받지 않는 것을 알 수 있다. 즉, 이로부터 mexenone 은 장벽 효과를 높이기 위한 결합과 연관되어 있음을 알 수 있다.

[0036] **마우스 모델에서의 LPS 유도 폐 손상 방지 효과의 확인**

[0037] mexenone 이 마우스 모델에서 폐혈증을 방지할 수 있는지 확인하였다.

[0039] **폐혈증 마우스 모델**

[0040] 폐혈증 치료제를 개발하기 위해 다양한 방법으로 폐혈증을 유도하는 방법들이 개발되어 있다. 대표적으로 사용하는 방법으로는 선천성 면역반응을 활성화시키는 주요 원인 물질인 LPS(lipopolysaccharide, LPS)를 투여하거나, cecal ligation and puncture(CLP, 맹장결찰과 천공) 방법을 많이 사용하고 있으며, 병원성 미생물을 직접 투여하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명이 이하의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0042] 세포 내(in vitro) 혈관투과성 평가

[0043] mexenone 이 세포 내로 투과하는지 여부를 확인하기 위해, Biotinylated fibronectin 이 코팅된 표면에 endothelial 단층을 형성하고, LPS에 의한 투과성 증가 여부를 fluorescence microscopy 를 사용하여 측정하였다.

[0044] 도 1에서 mexenone 이 LPS 에 의해 유도된 혈관투과성을 투여량에 비례하여 유효하게 감소시키는 것을 알 수 있다.

[0046] **mexenone 메카니즘 확인 - VE 카데린 인산화 평가(VE-cadherin phosphorylation)**

[0047] mexenone 이 LPS가 유도된 VE 카데린에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위해 먼저 LPS 처리후 혈관 내피 세포의 표면에 VE 카데린이 염색되었다.

[0048] 접합부에서의 VE 카데린의 중요한 안정화 요인인 VE 카데린의 Y 658 염색체가 Src와 p120 의 결합에 의해 인산화 된다고 알려져 있다.

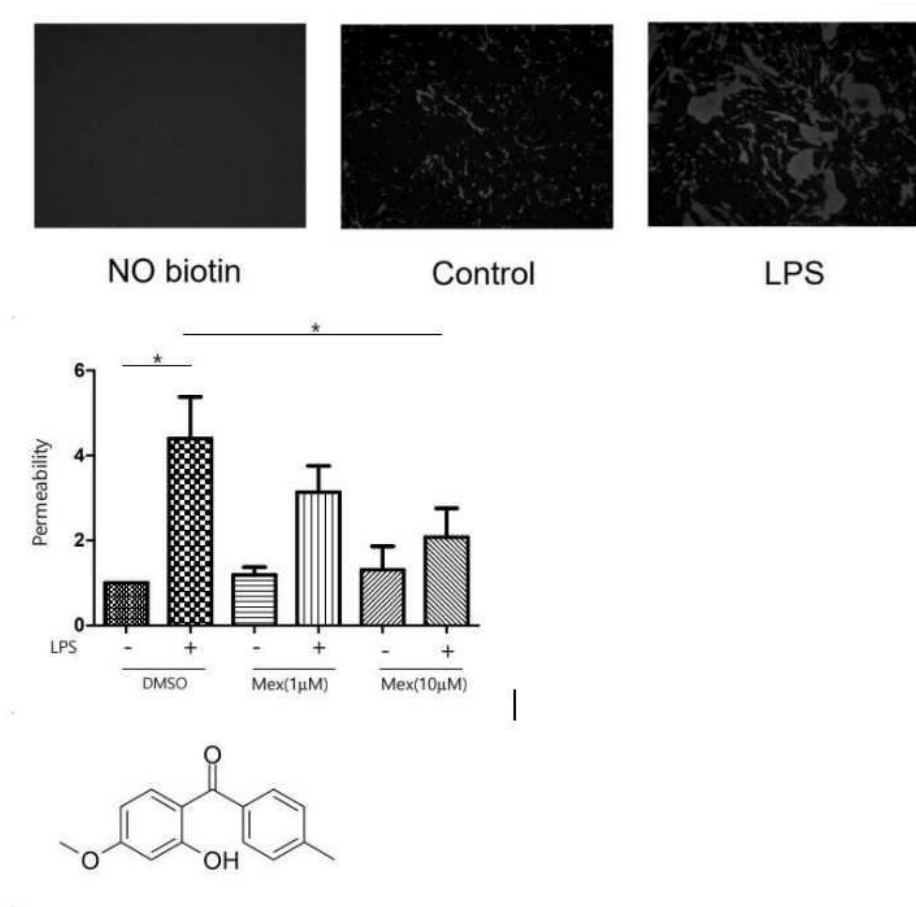
[0049] 도 2에서 보는 바와 같이 본원 발명에 의해 mexenone 을 처리한 경우 비교예인 DMSO로 처리한 경우에 비해 VE 카데린 결합이 유지되는 것을 알 수 있으며, VE 카데린의 함량 변화없이 LPS 유도된 인산화를 방지하는 것을 확인할 수 있다.

[0050] 또한, actin cytoskeletal contractility 또는 결합 단백질인 ZO-1 은 mexenone 에 의해 영향을 받지 않는 것을 알 수 있다. 즉, 이로부터 mexenone 은 장벽 효과를 높이기 위한 결합과 연관되어 있음을 알 수 있다.

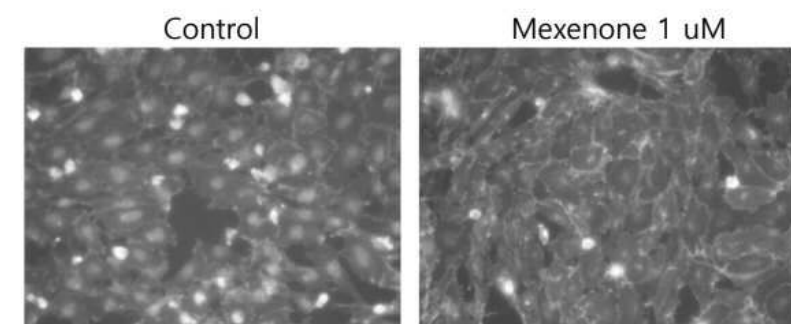
- [0052] 마우스 모델에서의 LPS 유도 폐 손상 방지 효과의 확인
- [0053] mexenone 이 마우스 모델에서 폐혈증을 방지할 수 있는지 확인하였다.
- [0055] 폐혈증 마우스 모델
- [0056] 폐혈증 치료제를 개발하기 위해 다양한 방법으로 폐혈증을 유도하는 방법들이 개발되어 있다. 대표적으로 사용하는 방법으로는 선천성 면역반응을 활성화시키는 주요 원인 물질인 LPS(lipopolysaccharide, LPS)를 투여하거나, cecal ligation and puncture(CLP, 맹장결찰과 천공) 방법을 많이 사용하고 있으며, 병원성 미생물을 직접 투여하는 방법도 있다.
- [0057] 본 발명에서는 내독소(endotoxin)라고 불리는 그람음성균의 외막성분인 지질다당류인 LPS를 투여하였다.
- [0059] 폐혈증 마우스 모델을 이용한 실험
- [0060] LPS 투여후 마우스의 혈관투과성 변화 여부와 급성폐손상 진행 여부의 실험을 위해서 7주령의 C57BL/6J를 구입하여 실험실에 적응시킨 후에 LPS (InvivoGen)를 18 mg/kg 농도로 인산완충용액(PBS)에 녹이고, 마우스 복강에 100 μ l씩 주사하였다.
- [0061] 조직병리학적 특성은 H&E 염색으로 확인하였다. 비교예에 의하여 LPS에 의해 폐 손상이 유도된 마우스의 경우에 비하여, 본원 발명에 의하여 mexenone 으로 처리한 경우 병리학적 변화가 감소하였으며 폐에서의 혈관투과성이 효과적으로 억제되었다. 이와 같은 결과로부터 mexenone 이 폐혈증에 의해 LPS 에 의해 유도된 폐 손상을 감소시킬 수 있다는 점을 알 수 있다.

도면

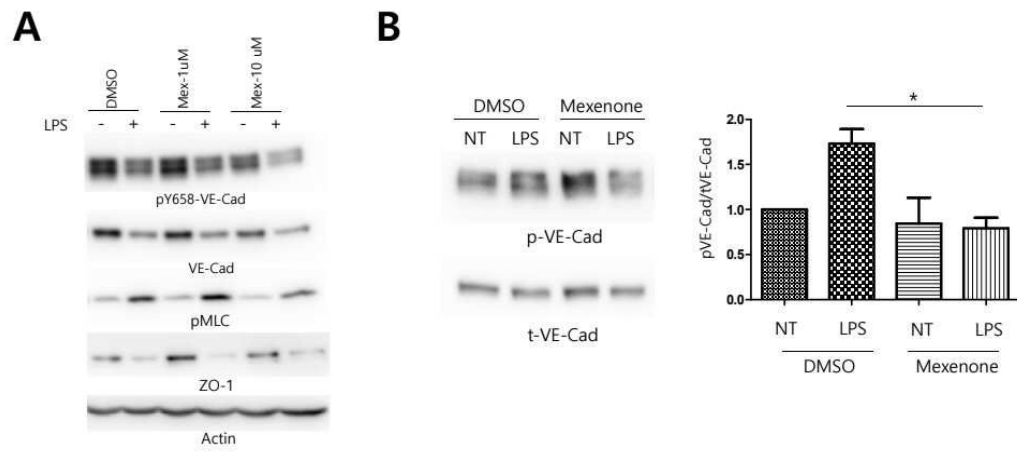
도면1



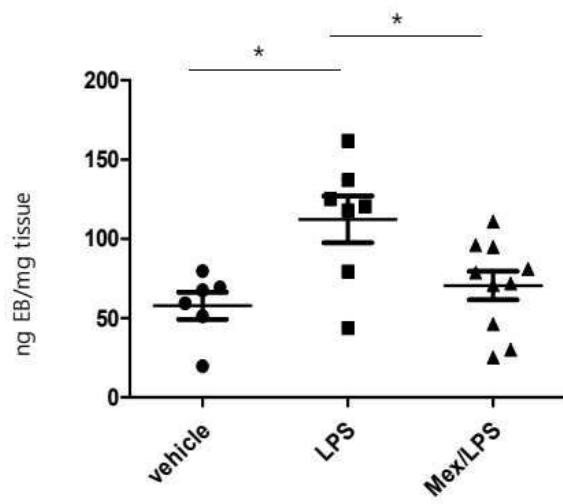
도면2



도면3



도면4



도면5

