



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월04일  
(11) 등록번호 10-1516791  
(24) 등록일자 2015년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 7/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)  
A61P 9/00 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0079156  
(22) 출원일자 2013년07월05일  
심사청구일자 2013년07월05일  
(65) 공개번호 10-2014-0010889  
(43) 공개일자 2014년01월27일  
(30) 우선권주장  
61/668,034 2012년07월05일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20040214760 A1  
US20040121942 A1  
KR1020120025626 A  
KR1020090035711 A

(73) 특허권자  
광주과학기술원  
광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)  
(72) 발명자  
박우진  
광주 북구 첨단과기로 123, A동 604호 (오룡동, 광주과학기술원)  
로저 하자르  
미국 뉴욕 10029, 매디슨 애비뉴 1428 (메일스탑 1030), 에이트란 버그 실험실 건물 5층 8실  
오재균  
광주 광산구 월계로 117-22, 203동 404호 (월계동, 첨단두산2차아파트)  
(74) 대리인  
양부현

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 포스포람반의 단백질 포스파타아제 1-매개 탈인산화 억제용 테코이 펩타이드

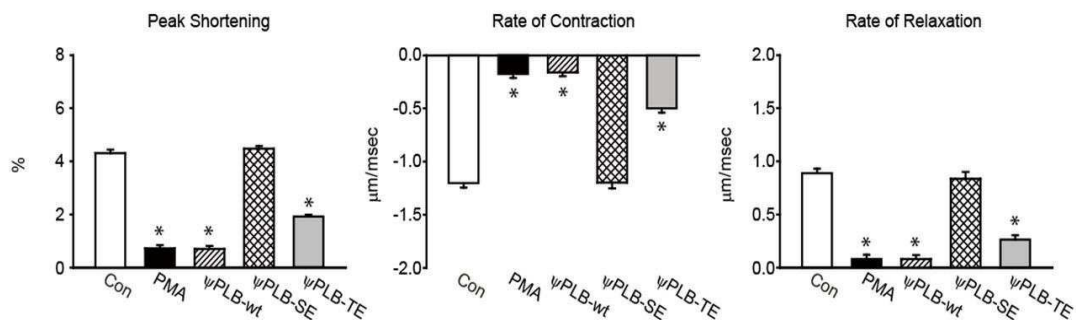
(57) 요약

본 발명은 하기 일반식 I로 표시되는 펩타이드 서열로 구성되는 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 관한 것이다:  
 $X_1\text{-Ala-X}_2\text{-X}_3\text{-Ile-Glu-X}_4$  (I)

상기  $X_1$ 은 0-50개의 아미노산 잔기, 상기  $X_2$ 는 Ser, Glu 또는 Asp, 상기  $X_3$ 은 Thr, Glu 또는 Asp, 상기  $X_4$ 는 0-50

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2a



개의 아미노산 잔기를 나타내고, 상기  $X_3$ 이 Thr인 경우  $X_2$ 는 Ser이 아니며; 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 경쟁적 억제에 의하여 PLB(포스포람반)의 PP1(단백질 포스파타아제 1)-매개 탈인산화를 억제한다. 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 PP1-매개 탈인산화의 억제에 의하여 PLB의 인산화 레벨을 현저하게 증가시키는 것에 주목할만하다. 또한, 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 SERCA2a 활성 회복에 의한 심장 보호 효과 및 심근 수축성 향상의 강심 효과를 제공한다. 본 발명은 PLB 관련 질병의 예방 또는 치료에 기여할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	M6-0605-00-0001
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌연구실사업
연구과제명	심장질환의 신호전달 연구 및 유전자 치료
기여율	1/1
주관기관	광주과학기술원
연구기간	2006.06.01 ~ 2015.03.31

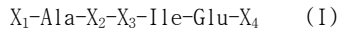
---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

하기 일반식 I로 표시되는 펩타이드 서열로 구성되는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드:



상기  $X_1$ 은 0-20개의 아미노산 잔기, 상기  $X_2$ 는 Ser, Glu 또는 Asp, 상기  $X_3$ 은 Thr, Glu 또는 Asp, 상기  $X_4$ 는 0-20개의 아미노산 잔기를 나타내고, 상기  $X_3$ 이 Thr인 경우  $X_2$ 는 Ser이 아니며;

상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 경쟁적 억제에 의하여 PLB(포스포람반)의 PP1(단백질 포스파타아제 1)-매개 탈인산화를 억제한다.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, 상기  $X_1$ 은 0-1개의 아미노산 잔기이고, 상기  $X_4$ 는 0-3개의 아미노산 잔기인 것을 특징으로 하는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드.

**청구항 4**

제 3 항에 있어서, 상기  $X_1$ 은 Arg인 것을 특징으로 하는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 상기  $X_4$ 는 Met, Met-Pro 또는 Met-Pro-Gln인 것을 특징으로 하는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드.

**청구항 6**

제 1 항에 있어서, 상기  $X_2$ 는 Glu 또는 Asp이고,  $X_3$ 은 Thr, Glu 또는 Asp인 것을 특징으로 하는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드.

**청구항 7**

제 1 항에 있어서, 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열 내지 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드.

**청구항 8**

제 1 항에 있어서, 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 세포막 투과성 펩타이드가 추가적으로 결합되어

있는 것을 특징으로 하는 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드.

**청구항 9**

(a) 제 1 항 및 제 3 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 심장 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

제 9 항에 있어서, 상기 심장 질환은 심부전, 허혈, 부정맥, 심근 경색, 울혈성 심부전, 이식 거부, 비정상적 심장 수축 또는 비정상적  $Ca^{2+}$  대사인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

**청구항 12**

하기 단계를 포함하는 경쟁적 억제에 의하여 PLB의 PP1-매개 탈인산화를 억제하는 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 제조방법:

(a) 서열목록 제10서열의 아미노산 서열의 16번째 아미노산인 Ser 잔기 및/또는 17번째 아미노산인 Thr 잔기를 Glu 또는 Asp로 치환하고, 상기 서열목록 제10서열의 아미노산 서열의 15-19번째 아미노산 주변의 주위 아미노산 잔기를 0-95개 선택함에 의하여 PLB의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 설계하는 단계로서, 상기 설계된 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 하기 일반식 I로 표시되는 펩타이드 서열로 구성되고,



상기  $X_1$ 은 0-50개의 아미노산 잔기, 상기  $X_2$ 는 Ser, Glu 또는 Asp, 상기  $X_3$ 은 Thr, Glu 또는 Asp, 상기  $X_4$ 는 0-50개의 아미노산 잔기를 나타내고, 상기  $X_3$ 이 Thr인 경우  $X_2$ 는 Ser이 아닌 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 설계된 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제조하는 단계.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서, 상기 주위 아미노산 잔기는 (i) 서열목록 제10서열의 아미노산 서열의 15번째 아미노산의 N-말단 방향에 0-50개의 아미노산 잔기가 이어진 아미노산 서열 및 (ii) 서열목록 제10서열의 아미노산 서열의 19번째 아미노산의 C-말단 방향에 0-50개의 아미노산 잔기가 이어진 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제 13 항에 있어서, 상기 15번째 아미노산의 N-말단 방향의 아미노산 서열은 0-20개의 아미노산 잔기가 이어진 것이고, 상기 19번째 아미노산의 C-말단 방향의 아미노산 서열은 0-20개의 아미노산 잔기가 이어진 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제 14 항에 있어서, 상기 15번째 아미노산의 N-말단 방향의 아미노산 서열은 0-1개의 아미노산 잔기가 이어진 것이고, 상기 19번째 아미노산의 C-말단 방향의 아미노산 서열은 0-3개의 아미노산 잔기가 이어진 것을 특징으로 하는 방법.

로 하는 방법.

**청구항 16**

제 15 항에 있어서, 상기 15번째 아미노산의 N-말단 방향의 아미노산 잔기는 Arg인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제 13 항에 있어서, 상기 19번째 아미노산의 C-말단 방향의 아미노산 잔기는 Met, Met-Pro 또는 Met-Pro-Gln인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 12 항에 있어서, 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 Ser 잔기 또는 Ser과 Thr 잔기 모두를 Glu 또는 Asp 잔기로 치환하여 설계한 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 12 항에 있어서, 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열 내지 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 단백질 포스파타아제 1-매개 포스포람반의 탈인산화를 억제할 수 있는 포스포람반의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 그의 용도 및 제조방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 심부전(Heart failure)은 전 세계적으로 사망률 및 이병률의 주요 원인으로 남아있다[1-3]. 심부전의 특징은 심장의 심실 챔버 사이즈 증가 및 심장 수축 기능 감소이다. 종래의 연구는 심장 수축의 이상이 심부전의 시작 및 진행을 야기한다는 생각을 뒷받침한다[4-6]. 세포 내  $Ca^{2+}$  사이클링(cycling)은 심근 세포의 수축성을 직접적으로 조절한다[7, 8]. 적은 양의 세포 외  $Ca^{2+}$ 이 전압-의존적 L-타입  $Ca^{2+}$  채널을 통하여 심근 세포로 유입되고, 이후 리아노딘 수용체(RyR: ryanodine receptor)를 통하여 근소포체(SR: sarcoplasmic reticulum)로부터  $Ca^{2+}$ 이 대량 방출된다[9]. 세포 내  $Ca^{2+}$  증가는 근필라멘트(myofilament) 수축을 촉발한다. 근섬유막(sarcolemma)에서의 SR  $Ca^{2+}$ -ATP아제(SERCA) 2a 및  $Na^+/Ca^{2+}$  교환체(exchanger)를 통한 SR로의  $Ca^{2+}$ 의 재유입은 이후 근필라멘트의 이완을 개시한다.

[0003] 종래의 연구는 SERCA2a 발현 및 활성 감소가 인간 및 동물 모델에서 심부전과 관련됨을 보여준다[10-12]. 따라서 유전자량 증가에 의한 SERCA2a 레벨의 회복이 심부전 치료에 대한 합리적인 접근이라고 판단되었고, 이는 랫트[13-15] 및 돼지[16]의 심부전 모델을 이용한 사례에서 증명되었다. 나아가, SERCA2a의 아데노-관련 바이러스-매개 전달은 최근 심부전 환자에서 심 기능을 향상에 대한 안전하고 효과적인 양상을 보였다[17, 18].

[0004] 내인성 저해제인 포스포람반(PLB: phospholamban)은 SERCA2a 활성을 음성적으로 조절하고, 이는 단백질 키나아제 A(PKA: protein kinase A),  $Ca^{2+}$ /칼모듈린-의존적 단백질 키나아제 II(CaMKII:  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II) 및 단백질 포스파타아제 1(PP1: protein phosphatase 1)에 의해 순차적으로 조절된다.

PKA 및 CaMKII는 각각 PLB의 Ser<sup>16</sup> 및 Thr<sup>17</sup>을 인산화하고, 이는 SERCA2a로부터 PLB의 분리를 야기하며, SERCA2a의 Ca<sup>2+</sup>-ATP아제 활성이 거의 최대가 되도록 한다[19-21]. 반면, PP1에 의한 PLB의 Ser<sup>16</sup> 및 Thr<sup>17</sup>에서의 탈인산화는 PLB와 SERCA2a의 결합 및 PLB에 의한 SERCA2a 억제를 향상시킨다[22, 23]. 흥미롭게도, 동물 모델 및 말기 인간 심부전 모델에서 PP1 활성 증가[27, 28]에 수반되는 PLB 인산화 감소[24-26]를 관찰하였다. 따라서 PP1 활성 및 PLB 인산화의 정상화는 심기능 향상 및 심부전 진행을 억제하기 위한 타당한 접근이다.

[0005] 표적 단백질을 모방한 작은 펩타이드와 같은 분자 데코이(decoy)는 단백질-단백질 상호결합 방해[29], 단백질 키나아제에 의한 표적 단백질의 인산화 방해[30] 및 포스포타아제에 의한 인산화된 단백질의 탈인산화를 방해[31, 32]하는데 성공적으로 이용되어져 왔다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명자들은 PLB 관련 질병, 특히 PLB의 탈인산화 레벨에 의하여 감소된 SERCA2a 활성에 의하여 유발된 질병의 치료를 위한 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 PLB의 인산화 레벨을 현저히 증가시키는 데코이 펩타이드를 합성하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 데코이 펩타이드가 인 비트로에서 수축성 파라미터를 증가시키고, 엑스 비보에서 좌심실 이완기 압력을 향상 시킴을 발견하였다. 즉, 본 발명자들은 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 SERCA2a 활성 회복에 의한 심장 보호 효과 및 심근 수축성 향상의 강심 효과를 제공하고, 따라서 이를 PLB의 탈인산화 억제에 의한 PLB 관련 질병의 치료에 이용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

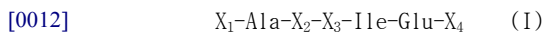
[0008] 따라서 본 발명의 목적은 경쟁적 억제에 의하여 PLB의 PP1-매개 탈인산화를 억제하는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 PLB 관련 질병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 일반식 I로 표시되는 펩타이드 서열로 구성되는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제공한다:



[0013] 상기 X<sub>1</sub>은 0-50개의 아미노산 잔기, 상기 X<sub>2</sub>는 Ser, Glu 또는 Asp, 상기 X<sub>3</sub>는 Thr, Glu 또는 Asp, 상기 X<sub>4</sub>는 0-50개의 아미노산 잔기를 나타내고, 상기 X<sub>3</sub>이 Thr인 경우 X<sub>2</sub>는 Ser이 아니며; 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 경쟁적 억제에 의하여 PLB(포스포람판)의 PP1(단백질 포스포타아제 1)-매개 탈인산화를 억제한다.

[0014] 본 발명자들은 PLB 관련 질병, 특히 PLB의 탈인산화 레벨에 의하여 감소된 SERCA2a 활성에 의하여 유발된 질병의 치료를 위한 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 PLB의 인산화 레벨을 현저히 증가시키는 데코이 펩타이드를 합성하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 데코이 펩타이드가 인 비트로에서 수축성 파라미터를 증가시키고, 엑스 비보에서 좌심실 이완기 압력을 향상 시킴을 발견하였다. 즉, 본 발명자들은 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 SERCA2a 활성 회복에

의한 심장 보호 효과 및 심근 수축성 향상의 강심 효과를 제공하고, 따라서 이를 PLB의 탈인산화 억제에 의한 PLB 관련 질병의 치료에 이용할 수 있음을 확인하였다.

- [0015] 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드 하기 일반식 I로 표시되는 펩타이드 서열로 구성된다:
- [0016]  $X_1\text{-Ala-X}_2\text{-X}_3\text{-Ile-Glu-X}_4$  (I)
- [0017] 인산화된 PLB를 모방하여 설계된 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 PLB의 PP1-매개 탈인산화를 억제하고, PLB의 인산화 레벨을 현저하게 증가시키며, 수축성 파라미터를 증가시킴으로써, 좌심실 이완기 압력을 현저하게 향상시킨다. 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 부전성 심장(failing heart)에서의 SERCA2a 활성 회복을 위한 대체 양식을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드에서, 본 발명의 서열 “Ala-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-Ile-Glu”은 상기 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 작용 및 기능에 필수적이다. 상기 X<sub>1</sub> 및 X<sub>4</sub> 잔기는 다양하게 변형될 수 있다. 이러한 점에서, 본 발명은 PP1에 대한 테코이로의 기능 또는 활성을 유지하는 한은 “Ala-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-Ile-Glu” 서열을 포함하는 어떠한 펩타이드 또는 폴리펩타이드도 포함한다.
- [0019] 본 명세서의 용어 “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의하여 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 직선형 분자를 의미한다. 본 명세서의 용어 “폴리펩타이드”는 펩타이드 결합에 의하여 결합된 아미노산(동일 또는 상이한)의 중합체(polymer)를 의미한다.
- [0020] 본 명세서에서 PLB와 함께 사용되는 용어 “테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드”는 인산화된 PLB의 연결 단루프를 모방한 펩타이드 서열을 포함하도록 설계된 펩타이드 또는 폴리펩타이드이고, 이는 경쟁적 방식에 의하여 PP1에 결합할 수 있음으로써, PP1의 작용을 차단할 수 있다.
- [0021] 본 명세서의 용어 “PP1-매개 탈인산화”는 PP1에 의한 PLB의 탈인산화를 의미한다.
- [0022] 테코이 펩타이드(또는 폴리펩타이드)에 관한 본 명세서의 용어 “경쟁적 억제”는 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드-PP1 복합체 형성을 위하여 PP1에 대한 경쟁적 결합에 의하여 탈인산화가 억제되는 것을 의미한다. 상기 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 PP1에 결합하는 PLB의 인산화 위치와 경쟁하는 방식으로 PP1과 결합한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 세포질 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다. 즉, 일반식 I에서, X<sub>1</sub> 및 X<sub>4</sub>는 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 세포질에 존재하는 것을 방해할 수 있는 아미노산 도메인을 포함하지 않는다. 예컨대, 상기 아미노산 도메인은 막-관통 도메인(membrane-spanning domain) 및 세포 소기관-표적 도메인(organelle-targeting domain)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 관점에서, X<sub>1</sub> 및 X<sub>4</sub>는 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 세포질에 존재할 수 있게 하는 범위 내의 어떠한 아미노산 잔기도 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 PLB의 PP1-매개 탈인산화를 억제하는 범위 내이면 어떠한 길이의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드도 포함한다. 예컨대, 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 아미노산 5-100개, 5-80개, 5-60개, 5-40개, 5-30개, 5-20개, 5-15개, 5-9개 또는 6-9개의 길이일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 일반식 I의 X<sub>1</sub>은 0-40개, 0-30개, 0-20개, 0-10개, 0-3개 또는 0-1개의 아미노산 잔기이다.
- [0026] 본 발명의 일반식 I에서, 상기 X<sub>1</sub>에는 어떠한 아미노산도 위치할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 X<sub>1</sub>은 PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 15번째 아미노산의 N-말단 방향에 0-50개, 0-40개, 0-30개, 0-20개, 0-10개, 0-3개 또는 0-1개의 아미노산 잔기가 이어진 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 X<sub>1</sub>은 PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 15번째 아미노산의 N-말단 방향에 1개의 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 일반식 I의 X<sub>4</sub>은 0-40개, 0-30개, 0-20개, 0-10개 또는 0-3개의 아미노산 잔기이다.

- [0028] 본 발명의 일반식 I에서  $X_4$ 에는 어떠한 아미노산도 위치할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기  $X_4$ 는 PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 19번째 아미노산의 C-말단 방향에 0-50개, 0-40개, 0-30개, 0-20개, 0-10개 또는 0-3개의 아미노산 잔기가 이어진 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 상기  $X_4$ 는 PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 19번째 아미노산의 C-말단 방향에 0 또는 3개의 아미노산 잔기로 구성된다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기  $X_4$ 는 PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 19번째 아미노산의 C-말단 방향에 3개의 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의  $X_1$ 은 Arg이다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의  $X_4$ 는 Met, Met-Pro 또는 Met-Pro-Gln이다.
- [0031] 본 발명의 PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 16번째 아미노산인 Ser잔기( $Ser^{16}$ ) 및 17번째 아미노산인 Thr 잔기( $Thr^{17}$ )는 PLB의 유동적 루프 지역(PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 14-22번째 아미노산)에 위치하는 인산화 자리이다. 일반식 I에서,  $X_2$  및  $X_3$ 은 각각 PLB 내  $Ser^{16}$  및  $Thr^{17}$ 이 자리하고 있는 아미노산 위치를 나타낸다.
- [0032] 본 발명에서,  $Ser^{16}$  및/또는  $Thr^{17}$ 을 Glu 또는 Asp로 치환하여 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 설계한다. 본 발명의 일반식 I의  $X_2$  및/또는  $X_3$ 에 Glu 또는 Asp을 포함하는 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 인산화된 PLB와 유사하여, PP1에 결합하는 PLB의 인산화 위치와 경쟁한다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의  $X_2$ 는 Glu 또는 Asp이고,  $X_3$ 은 Thr, Glu 또는 Asp이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의  $X_2$ 는 Glu 또는 Asp이고,  $X_3$ 은 Thr이다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열 내지 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열 및 제3서열 내지 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열, 제3서열 및 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된다.
- [0035] 본 발명의 서열목록 제1서열 내지 제6서열은 다음과 같다:
- [0036] 서열목록 제1서열은 Arg-Ala-Glu-Thr-Ile-Glu-Met-Pro-Gln이다.
- [0037] 서열목록 제2서열은 Arg-Ala-Ser-Glu-Ile-Glu-Met-Pro-Gln이다.
- [0038] 서열목록 제3서열은 Arg-Ala-Asp-Thr-Ile-Glu-Met-Pro-Gln이다.
- [0039] 서열목록 제4서열은 Ala-Glu-Thr-Ile-Glu-Met-Pro-Gln이다.
- [0040] 서열목록 제5서열은 Arg-Ala-Glu-Thr-Ile-Glu-Met이다.
- [0041] 서열목록 제6서열은 Arg-Ala-Glu-Thr-Ile-Glu이다.
- [0042] 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 변형된 측쇄를 가지는 하나 이상의 아미노산이 있는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 측쇄 변형의 예는 환원 알킬화 반응; 메틸아세티미데이트에 의한 아미디화; 아세트 엔하이드라이드에 의한 알킬화; 시아네이트에 의한 아미노 그룹의 카르바모일레이션; 2,4,6-트리니트로벤젠 술포닉산(TNBS)에 의한 아미노산의 트리니트로벤질레이션; 숙신 엔하이드라이드에 의한 아미노 그룹의 알킬화; 및 피리오살-5-포스페이트 처리후  $NaBH_4$ 로 환원된 피리도실레이션과 같은 아미노그룹의 변형을 포함한다.
- [0043] 아르기닌 잔기의 구아니딘 그룹은 2,3-부탄디온, 페닐글리옥살 및 글리옥살과 같은 시약에 의한 헤테로고리 축합물의 형성으로 변형될 수 있다. 카르복실 그룹은, 0-아킬소우레아 형성에 의하여 카르보디이미드 활성을 하고 이어 유도체화, 예컨대, 아마이드화로 유도체화하여 변형시킬 수 있다.

- [0044] 설프히드릴 그룹은 요오드아세트산 또는 요오드아세트아마이드에 의한 카르복실메틸레이션; 시스테인산에로의 퍼프산 산화; 다른 티올 화합물에 의한 혼합된 다이설파이드의 형성; 말레이미드, 무수말레인산 또는 다른 치환 말레이미드에 의한 반응; 4-클로로머큐리벤조에이트, 4-클로로머큐리페닐술폰산, 페닐머큐릴 클로라이드, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 및 다른 수은제를 사용한 수은 유도체의 형성; 염기 pH에서 시아네이트에 의한 카르바모일레이션과 같은 방법에 의해 변형될 수 있다. 시스테인 잔기의 어떠한 변형도, 펩타이드가 필요로 하는 이황화 결합을 형성하는데 영향을 주지 않아야 한다. 또한, 시스테인의 설프히드릴 그룹은 셀레늄 등가물로 대체할 수 있으며, 이에 의해 펩타이드에는 하나 이상의 이황화 결합 위치에 다이셀레늄 결합이 형성될 수 있다.
- [0045] 트립토판 잔기는 예컨대, N-브로모숙신이미드에 의한 산화 또는 2-히드록시-5-니트로벤질브로마이드 또는 술페닐 할라이드에 의한 인돌 고리의 알킬화에 의해 변형될 수 있다. 한편, 타이로신 잔기는 테트라니트로메탄을 이용한 니트로화에 의해 변형되어 3-니트로타이로신 유도체를 형성시킬 수 있다.
- [0046] 히스티딘 잔기의 이미다졸 고리의 변형은 요오드아세트산 유도체에 의한 알킬화 또는 디에틸피로카르보네이트에 의한 N-카르베톡실레이션에 의해 수행될 수 있다.
- [0047] 프롤린 잔기는 예컨대, 4-위치에서의 히드로실레이션에 의해 변형될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 이의 아미노산 잔기를 변형시킴으로써 더욱 안정성을 향상시킬 수 있다. 예컨대, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 적어도 하나의 아미노산은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 갖는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 아세틸기의 보호기가 결합되어 있다.
- [0049] 본 명세서에서 용어 "안정성"은 인 *비보*에서의 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미한다. 상술한 보호기는 인 *비보*에서 단백질 절단효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 작용을 한다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 세포막 투과성 펩타이드가 추가적으로 결합되어 있다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 N-말단 및/또는 C-말단에 세포막 투과성 펩타이드가 추가적으로 결합되어 있다.
- [0051] 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 심근 세포 내로 운반하기 위해서는, 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 세포막 투과성 펩타이드를 포함하고 있어야 한다. 본 명세서의 용어 세포막 투과성 펩타이드는 특정 펩타이드(또는 폴리펩타이드)를 세포 내로 운반하기 위해 필수적인 펩타이드로, 통상적으로 10-50개 또는 그 이상의 아미노산 서열로 구성되어 있다.
- [0052] 세포막 투과성 펩타이드는 그 자체로 인지질 이중막의 세포막을 통과할 수 있는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드로, 예컨대, Tat-유래 펩타이드, 시그널 펩타이드(예컨대, 세포 투과성 펩타이드), 아르기닌-리치 펩타이드, 트랜스포탄 또는 양친매성 펩타이드 캐리어 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다(Morris, M. C. et al., *Nature Biotechnol.* 19:1173-1176 (2001); Dupont, A. J. and Prochiantz, A., *CRC Handbook on Cell Penetrating Peptides*, Langel, Editor, CRC Press, (2002); Chaloin, L. et al., *Biochemistry* 36(37):11179-87 (1997); 및 Lundberg, P. and Langel, U., *J. Mol. Recognit.* 16(5):227-233 (2003)). 또한, 상기와 같은 친연적 서열과 더불어, 레트로인버소(retroinverso) 및 D-아이스머 펩타이드를 포함하는, 세포막 투과 성질을 가진 다양한 안테나 다리(antennapedia)-기초 펩타이드들이 알려져 있다(Brugidou, J. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 214(2):685-93 (1995); Derossi, D. et al., *Trends Cell Biol.* 8:84-87 (1998)).
- [0053] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 세포막 투과성 펩타이드는 TAT 펩타이드(Tat-유래 펩타이드)이다.
- [0054] 인간 면역 결핍 바이러스(HIV: human immunodeficiency virus)에서 유래한 Tat 단백질은 86개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 시스테인-리치, 염기성 및 인테그린-결합 부분의 주 단백질 도메인을 가지고 있다. 비록, Tat 펩타이드는 YGRKKRRQRRR(서열목록 제11서열)(즉, Tat 단백질의 48-60번째의 아미노산 서열) 서열만으로 단백질의 세포막 투과 성질을 갖지만, 부가적으로 Tat 서열 RKKRRQRRR의 여러 카피를 포함하는 가지 구조가 있는 경우 세포막을 더욱 효과적으로 통과할 수 있다고 알려져 있다(Tung, C. H., et al., *Bioorg. Med Chem* 10:3609-3614(2002)). 세포막 투과 성질을 갖는 Tat 펩타이드의 다양성에 대해서는 Schwarze, S. R., et

al., *Science* 285:1569-1572(1999)에 기재되어 있다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 TAT 펩타이드는 서열목록 제11서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0055] 또한, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 용합 단백질을 포함할 수 있고, 이는 글루타민 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia社, 미국), 말토스 결합 단백질(NEB社, 미국), FLAG(ABI社, 미국) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen社, 미국)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 용합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예컨대, 글루타민-S-트랜스퍼라제가 용합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타민을 이용할 수 있고, 6x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen社, 미국)을 이용하여 원하는 용합단백질을 신속하고 용이하게 얻을 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 PLB는 인간으로부터 유래되고, 이의 아미노산 서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 게시되어 있다. NCBI 내 인간 PLB 아미노산 서열의 수납 번호(Accession Number)는 AAA60109.1, AAA60083.1 및 AAD55950.1이다.

[0057] 본 발명에 따르면, 본 명세서의 용어 “데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드”는 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 기능적 균등물을 포함하는 것으로 해석된다. 본 명세서의 용어 “기능적 균등물”은 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드와 비교할 때 유사 또는 향상된 생물학적 활성을 갖는 동시에, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 일부 아미노산 서열에서의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 갖는 아미노산 서열의 변형(예컨대, 필수적 서열인 Ala-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-Ile-Glu의 주위 아미노산 잔기의 변형)을 의미한다. 상기 아미노산 치환은 보존적 치환일 수 있다. 자연적으로 아미노산에 발생하는 상기 보존적 치환의 예는 지방족 아미노산(Gly, Ala 및 Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu 및 Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr 및 Trp), 산성 아미노산(Asp 및 Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln 및 Asn) 및 황-함유 아미노산(Cys 및 Met)을 포함한다. 상기 아미노산 결실은 본 발명의 데코이 펩타이드 및 폴리펩타이드 활성에 직접적으로 연관되지 않은 부분에 위치한다.

[0058] 본 발명에 따르면, 본 발명에서 이용 가능한 본 발명의 데코이 펩타이드 및 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 본 발명의 데코이 펩타이드 서열에 실질적으로 동일성을 가지는 펩타이드 서열을 포함하는 것으로 해석된다. 본 명세서의 용어 “실질적 동일성”은 두 아미노산 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, BLAST, GAP 또는 BESTFIT과 같은 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘 또는 육안 검사를 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 약 60%, 70%, 80%, 85%, 90% or 95%의 서열 상동성을 공유하는 것을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 게시되어 있다.

[0059] NCBI 베이직 로칼 얼라인먼트 서치 툴(BLAST: Basic Local Alignment Search Tool)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)에서 확인할 수 있다.

[0060] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드 중 어느 하나의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 PLB 관련 질병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0061] PLB 관련 질병에 대하여 사용되는 본 명세서의 용어 “예방”은 PLB 관련 질병의 완전한 예방, 상기 질병을 가진 대상체에서의 증상 발생의 예방 또는 상기 질병을 가진 대상체에서의 증상 재발의 예방을 의미한다.

[0062] PLB 관련 질병에 대하여 사용되는 본 명세서의 용어 “치료”는 대상체에서 PLB 관련 질병 증상의 일부 또는 전부의 제거 또는 증상 강도의 감소를 나타낸다.

[0063] PLB 관련 질병에 대하여 사용되는 본 명세서의 용어 “약제학적 유효량”은 대상체에 투여되는, PLB 관련 증상,

상태 또는 질병의 예방 또는 치료에 충분한 양을 의미한다.

- [0064] 본 명세서의 용어 “대상체(subject)”는 인간, 인간 아닌 포유류 또는 동물을 포함한다. 상기 인간 아닌 포유류는 소, 양, 염소, 말, 돼지, 개 및 고양이와 같은 가축 및 반려동물을 의미한다.
- [0065] 본 발명에 따르면, 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 PLB 관련 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0066] 심근 세포의 수축성은 세포 내  $Ca^{2+}$  사이클링에 의하여 직접적으로 조절되고, SERCA2a는 심근 세포 내 상기  $Ca^{2+}$  사이클링에서 중요한 역할을 한다. PLB는 SERCA2a의 내인성 억제제이고 PP1에 의한 탈인산화를 통하여 이의 억제 활성이 향상된다.
- [0067] 본 발명에서, 본 발명의 테코이 펩타이드는 PLB의 인산화 레벨을 현저하게 증가시킨다(도 1c 및 1d). 또한, 본 발명의 테코이 펩타이드는 인 비트로에서 수축성 파라미터를 증가시키고(도 2a-2d), 엑스 비보에서 좌심실 이완기 혈압을 향상시킨다(도 3a 및 3b). 즉, 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 SERCA2a 활성화 회복에 의한 심장 보호 효과 및 심근 수축성 향상의 강심 효과를 제공하고, 따라서 본 발명의 테코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 PLB의 PP1-매개 탈인산화 억제에 의한 PLB 관련 질환의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 PLB 관련 질환은 심장 질환이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 심장 질환은 심부전, 허혈, 부정맥, 심근 경색, 울혈성 심부전, 이식 거부, 비정상적 심장 수축 또는 비정상적  $Ca^{2+}$  대사이다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 심장 질환은 심부전 또는 허혈이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 심장 질환은 심부전이다.
- [0069] 본 명세서의 용어 심부전은 심장의 박출량이 정상 이하로 떨어짐으로 인해 심장의 기능이 말초 조직의 대사 요구량을 충족시키지 못하는 임상 증후군을 의미한다. 즉, 심부전은 여러 원인에 의해 심장이 혈액을 펌프질하는 능력이 감소되거나, 정상적으로 박동을 하더라도 충분한 양의 혈액을 온 몸으로 보내지 못하는 상태를 의미한다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 심부전은 심장 비대증, 관상 동맥 경화증, 심근 경색, 심장 판막증, 고혈압 또는 심근증에 의해 유발된다.
- [0071] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물은 강심용 조성물이다.
- [0072] 본 발명에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물(예: 락토스, 아밀로스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스, 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름(예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유향제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0073] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 적합한 1일 투여량은, 0.0001-100 mg/kg(체중)이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유향액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안

정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0076] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) PLB 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 16번째 아미노산인 Ser 잔기 및/또는 17번째 아미노산인 Thr 잔기를 Glu 또는 Asp로 치환하고, 상기 PLB 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 15-19번째 아미노산 주변의 주위 아미노산 잔기를 0-95개 선택함에 의하여 PLB의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 설계하는 단계로서, 상기 설계된 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 하기 일반식 I로 표시되는 펩타이드 서열로 구성되고,
- [0077]  $X_1\text{-Ala-X}_2\text{-X}_3\text{-Ile-Glu-X}_4$  (I)
- [0078] 상기  $X_1$ 은 0-50개의 아미노산 잔기, 상기  $X_2$ 는 Ser, Glu 또는 Asp, 상기  $X_3$ 은 Thr, Glu 또는 Asp, 상기  $X_4$ 는 0-50개의 아미노산 잔기를 나타내고, 상기  $X_3$ 이 Thr인 경우  $X_2$ 는 Ser이 아닌 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에서 설계된 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제조하는 단계를 포함하는 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0079] 본 발명의 방법을 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0080] 단계(a): 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드 설계
- [0081] 본 발명에 따르면, 우선 PLB 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 16번째 아미노산인 Ser 잔기 및/또는 17번째 아미노산인 Thr 잔기를 Glu 또는 Asp로 치환하고, 상기 PLB 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 15-19번째 아미노산 주변의 주위 아미노산 잔기를 0-95개 선택함에 의하여 PLB의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 설계한다. 상기 설계된 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 일반식 I( $X_1\text{-Ala-X}_2\text{-X}_3\text{-Ile-Glu-X}_4$ )로 표시되는 펩타이드 서열로 구성되고, 상기  $X_1$ 은 0-50개의 아미노산 잔기, 상기  $X_2$ 는 Ser, Glu 또는 Asp, 상기  $X_3$ 은 Thr, Glu 또는 Asp, 상기  $X_4$ 는 0-50개의 아미노산 잔기를 나타내고, 상기  $X_3$ 이 Thr인 경우  $X_2$ 는 Ser이 아니다.
- [0082] 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드에서, 상기 PLB 아미노산 서열의 15, 18 및 19번째 아미노산 잔기는 Asp, Ile 및 Glu이다(서열목록 제10서열의 아미노산 서열 참고).
- [0083] 본 발명에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 “Ala-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-Ile-Glu”은 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 작용 및 기능에 필수적이다. 상기 주위 아미노산 잔기는 다양하게 변형될 수 있다. 이러한 관점에서, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 PP1에 대한 유인체(decoy)로의 기능 또는 활성을 유지하는 범위 내이면 어떠한 주위 아미노산 잔기도 포함한다.
- [0084] 본 발명의 주위 아미노산 잔기는 PLB의 PP1-매개 탈인산화를 억제하는 범위 내이면 어떠한 길이의 아미노산 잔기도 포함한다. 예컨대, 본 발명의 주위 아미노산 잔기는 아미노산 0-95개, 0-75개, 0-55개, 0-35개, 0-15개, 0-10개, 0-4개 또는 1-4개 길이이다.
- [0085] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 주위 아미노산 잔기는 (i) PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 15번째 아미노산의 N-말단 방향에 0-50개, 0-40개, 0-30개, 0-20개, 0-10개, 0-3개 또는 0-1개의 아미노산 잔기가 이어진 아미노산 서열 및 (ii) PLB의 아미노산 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)의 19번째 아미노산의 C-말단 방향에 0-50개, 0-40개, 0-30개, 0-20개, 0-10개 또는 0-3개개의 아미노산 잔기가 이어진 아미노산 서열로 구성된다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 15번째 아미노산의 N-말단 방향의 아미노산 서열은 1개의 아미노산 잔기가 이어진 것이고, 상기 19번째 아미노산의 C-말단 방향의 아미노산 서열은 0 또는 3개의 아미노산 잔기가 이어진 것이다.
- [0086] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 15번째 아미노산의 N-말단 방향의 아미노산 잔기는 Arg이다.
- [0087] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 19번째 아미노산의 C-말단 방향의 아미노산 잔기는 Met, Met-Pro 또는 Met-Pro-Gln이다.
- [0088] 본 발명에서, 상기 Ser<sup>16</sup> 잔기 또는 Thr<sup>17</sup> 잔기를 Glu 또는 Asp 잔기로 치환한 본 발명의 데코이 펩타이드 또는

폴리펩타이드는 PLB의 인산화를 증가시킨다(도 1c 및 1d). 따라서 Ser<sup>16</sup> 잔기 또는 Thr<sup>17</sup> 잔기 중 어느 하나의 아미노산 잔기만이 Glu 또는 Asp 잔기로 치환된 경우라도, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 PLB의 PP1-매개 탈인산화를 억제할 수 있다.

[0089] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 Ser 잔기 또는 Ser과 Thr 잔기 모두를 Glu 또는 Asp 잔기로 치환하여 설계한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 Ser 잔기만을 Glu 또는 Asp 잔기로 치환하여 설계한다.

[0090] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열 내지 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되도록 설계한다. 본 발명의 다른 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열 및 제3서열 내지 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되도록 설계한다. 본 발명의 또 다른 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 서열목록 제1서열, 제3서열 및 제6서열의 아미노산 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성되도록 설계한다.

[0091] 단계 (b): 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 제조

[0092] 단계 (a) 실시 이후, 설계된 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제조한다.

[0093] 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 당업계에서 일반적으로 실시하는 재조합 DNA 기술(recombinant DNA technologies) 또는 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)로 제조할 수 있다(Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154(1963), Kaiser, E., Colescot, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I., *Anal. Biochem.*, 34:595-598(1970)). α-아미노기와 측쇄기를 갖는 보호된 아미노산은 수지에 부착되어있다. 이어서, α-아미노 보호기를 제거한 후, 중간체를 얻기 위하여 아미노산을 순차적으로 결합시킨다.

### 발명의 효과

[0094] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0095] (a) 본 발명은 경쟁적 억제에 의하여 PLB의 PP1-매개 탈인산화를 억제할 수 있는 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 그의 제조방법 및 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 PLB 관련 질병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0096] (b) 본 발명의 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 PP1-매개 탈인산화의 억제에 의하여 PLB의 인산화 레벨을 현저하게 증가시키는 것에 주목할만하다. 또한, 상기 데코이 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 SERCA2a 활성 회복에 의한 심근 보호 효과 및 심근 수축성 향상의 강심 효과를 제공한다.

[0097] (c) 본 발명은 PLB 관련 질병의 예방 또는 치료에 기여할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0098] 도 1은 단량체 PLB(좌측)의 구조 및 데코이 펩타이드의 아미노산 서열(우측)을 나타낸다. 상기 단량체 PLB의 “L-형태” 구조는 세포질 헬릭스, 연결 단루프 및 막관통 헬릭스를 포함한다. 상기 연결 단루프를 구성하는 9개의 아미노산으로부터 펩타이드를 유도하였다. 상기 데코이 펩타이드에서, 인산화를 모방하기 위하여 Ser(S, 세린) 또는 Thr(T, 트레오닌) 잔기를 Glu(E, 글루탐산)으로 치환하였다. 상기 치환된 글루탐산 잔기를 밑줄로 표시하였다.

도 1b는 심근 세포에서 데코이 펩타이드의 세포 내 흡수를 나타낸다. 상기 분리된 심근 세포를 37°C에서 1시간 동안 1 μM의 펩타이드 용액으로 인큐베이션하였다. Con은 처리하지 않은 세포, ψPLB-SE는 FITC로 표지된 데코이 펩타이드, DIC는 차등간섭대비(differential interference contrast) 이미지; FITC는 FITC 형광 이미지를 나타낸다.

도 1c-1d는 데코이 펩타이드에 의한 PLB 인산화 증가(도 1c) 및 단축된 데코이 펩타이드(도 1d)를 나타낸다. 분리된 성체 심근 세포를 45분 동안 1 μM의 데코이 펩타이드로 처리하고, 이후 15분 동안 1 μM의 PMA로 처리

하였다. 인산화-PLB (S<sup>16</sup>), 인산화-PLB(T<sup>17</sup>), 총 PLB 또는 GAPDH에 대한 항체를 프로브로 하여 세포 파쇄물 (cell lysate)을 웨스턴 블롯팅 하였다. 상기 테코이 펩타이드의 서열은 다음과 같다: ψPLB-SE, RAETIEMPQ (서열목록 제1서열); ψPLB-SD, RADTIEMPQ(서열목록 제3서열); ψPLB-TE, RASEIEMPQ(서열목록 제2서열). 상기 단축된 테코이 펩타이드의 서열은 다음과 같다: ψPLB-8-mer, AETIEMPQ(서열목록 제4서열); ψPLB-7-mer, RAETIEM(서열목록 제5서열); ψPLB-6-mer, RAETIE(서열목록 제6서열); ψPLB-5-mer: RAETI(서열목록 제7서열). PMA는 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 나타낸다.

도 2a-2d는 테코이 펩타이드에 의한 심장 수축성 증가를 나타낸다. 분리된 성체 심근 세포를 45분 동안 1 μM의 테코이 펩타이드로 처리하고, 이후 15분 동안 1 μM의 PMA로 처리하였다. 이후 수축성 파라미터를 측정하였다. 도 2a 및 2b는 수축성 파라미터를 보여준다. 세포 단축 피크(Peak cell shortening)는 단축된 세포 길이의 백분율, -dL/dt는 세포 단축의 최대 속도; +dL/dt는 세포 재연장(relengthening)의 최대 속도를 나타낸다. 도 2c 및 2d는 Fura2/AM으로 측정된 일과성(transient) Ca<sup>2+</sup> 특성의 평균 파라미터를 나타낸다. 기준선(Baseline) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>은 이완 시 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도, Δ[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>(340/380)은 수축 시 세포 내 증가된 Ca<sup>2+</sup> 농도, τ (ms)는 Ca<sup>2+</sup> 일과성 감소 속도를 나타낸다. 8개의 개별 심장으로부터 약 500개의 세포를 선별하고 Ca<sup>2+</sup> 일과성 측정을 수행하였다. #는 대조군과 비교하여 P < 0.05, \*는 대조군과 비교하여 P < 0.01, 에러 바(error bar)는 SD를 나타낸다.

도 3a-3d는 엑스 비/보에서의 허혈 후 심기능을 나타낸다. 도 3a는 란젠도르프-관류한 랫트의 심장을 보여준다. 전반적 허혈 유도를 위하여 20분 동안 과류를 중지한 후, 1 μM TAT 또는 ψPLB-SE를 동시 투여하여 30분 동안 재관류 하여 좌심실 이완기 압력(LVDP)의 변화를 관찰하였다. n=4이고, \*는 TAT와 비교하여 P < 0.01, 에러 바는 SEM을 나타낸다. 도 3b는 재관류 후 제조한 심장 파쇄물을 보여준다. 인산화-PLB (S<sup>16</sup>), 인산화-PLB (T<sup>17</sup>), 총 PLB, 카스파아제 3, 또는 GAPDH에 대한 항체를 프로브로 하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0099] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0100] 실시예

[0101] 1. 실험 기구 및 방법

[0102] 테코이 펩타이드

[0103] 본 발명의 테코이 펩타이드는 인산화 자리인 Ser<sup>16</sup> 및 Thr<sup>17</sup> 주변의 PLB 단백질 서열(서열목록 제10서열의 아미노산 서열)에서 유도하였다: RAS<sup>16,17</sup>IEMPQ. 상기 펩타이드는 세포 내 유입 촉진을 위해 시스테인-시스테인 결합에 의하여 세포 관통 펩타이드 TAT(YGRKKRRQRRR: 서열목록 제11서열)를 N-말단에 콘주게이트하였다. 본 발명에서 사용한 펩타이드는 다음과 같다: PLB-wt, RASTIEMPQ(서열목록 제8서열); ψPLB-SE, RAETIEMPQ(서열목록 제1서열); ψPLB-TE, RASEIEMPQ(서열목록 제2서열); ψPLB-SD, RADTIEMPQ(서열목록 제3서열). 또한, 하기의 단축된 ψPLB-SE 펩타이드도 실험하였다: 8-mer, AETIEMPQ(서열목록 제4서열); 7-mer, RAETIEM(서열목록 제5); 6-mer, RAETIE(서열목록 제6서열); 5-mer, RAETI(서열목록 제7서열). 상기의 모든 펩타이드를 에니젠社(대한민국)에서 합성 및 변형하였고, 1 mM의 스탁 농도로 증류수에 용해하였다. 펩타이드는 >95% 순수하였다. 상기 테코이 펩타이드를 최종 농도 1 μM에서 1시간 동안 처리하였다. 세포 생존률 및 형태는 펩타이드에 중대한 영향을 미치지 않았다.

[0104] 성체 랫트의 심실 심근 세포 분리

[0105] 종래의 문헌[33]에 개시된 바에서 최소한 변형을 하여 이에 따라 SD 랫트 심장에서 심실 심근 세포를 분리하였

다. 상기 랫트는 8-12주령 웅성 랫트를 사용하였다. 간략히 설명하면, 5분 동안 아이소퓨란(0.5%)을 흡입시켜 랫트를 마취하였다. 상기 심장을 흉부에서 빠르게 제거하고, 100% O<sub>2</sub> 가스 하 37°C에서 3분 동안 무칼슘 타이로드 완충액(calcium-free Tyrode buffer: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 글루코오스, 10 mM HEPES[pH 7.4], 10 mM 2,3-부테인디온 모노옥심, 5 mM 타우린)을 대동맥에 역으로 관류하였다. 이후 관류 용액에 콜라게나아제 타입 B(0.35 U/ml; Roche社) 및 할루로니다아제(0.1 mg/ml; Worthington社)를 첨가하여 효소 분해를 개시하였다. 분해 10분 후 상기 심장이 팽창을 시작할 때, 좌심실을 빠르게 제거하고, 여러 개의 덩어리로 나눈 후, 상기와 동일한 효소 용액 내 37°C에서 10분 동안 6070 rpm으로 교반하여 추가적으로 분해시켰다. 분산된 심근 세포를 포함하는 상층액을 세포 여과기(포어 크기 100 μm, BD Falcon社)로 여과하고, 500 rpm에서 1분 동안 부드럽게 원심분리하였다. Ca<sup>2+</sup> 역행을 피하기 위하여 세포 외 Ca<sup>2+</sup>을 30분 동안 1.25 mM 농도로 역으로 첨가하였다. 이러한 과정에 의하여 보통 80% 이상의 수율로 명확한 근절 무늬를 가지는 로드형 심실 심근 세포를 얻었다. 명확한 근섬유막 수포를 가지거나 자발적으로 수축하는 심근 세포는 폐기하였다.

[0106]

[0107]

**형광현미경 관찰**

[0108]

펩타이드의 세포 내 유입(uptake)을 확인하기 위하여, FITC로 ψPLB-SE를 표지하였다. 상기 분리한 심근 세포를 라미닌-코팅된 유리 플레이트에 도말하고, 2 mM L-카르니틴, 5 mM 크레아틴, 5 mM 타우린 및 100 IU/ml 페니실린이 보충된 HBSS(Hanks' Balanced Salts Solution)가 함유된 MEM(modified Eagle's Medium) 배지에서 배양하였다. 상기 세포를 1 μM FITC-표지된 ψPLB-SE 에 1시간 동안 노출시킨 후 타이로드 용액으로 두 번 세척하였다. 63x(1.4NA) 오일 대물렌즈 및 플루오레세인(fluorescein) FITC-최적화 필터 세트(OmegaR Optical Inc., 미국)가 장착된 Leica DMRBE 현미경(LabCommerce社, 미국)을 이용하여 형광 이미지를 시각화하였다. CoolSNAP Tmfx CCD(Photometrics社, 미국) 카메라를 이용하여 이미지를 얻고, 메타몰프 이미징 소프트웨어(Universal Imaging社, 미국)로 분석하였다.

[0109]

[0110]

**웨스턴 블롯 분석**

[0111]

SDS 시료 완충액 내 심장 파쇄물(50 μg)을 SDS-PAGE 젤에 전개시킨 후, PVDF 막(Bio-Rad社, 미국)에 옮겼다. 상기 막을 5% 탈지 우유(skim milk) 용액으로 차단하고, 이후 PLB(Affinity Bioreagents社, 미국), 인산화-PLB(Ser<sup>16</sup>, Cell Signaling社, 미국), 인산화-PLB(Thr<sup>17</sup>, Badrilla社, 영국), SERCA2a(Santa Cruz社, 미국), 카스파아제 3(Cell Signaling社, 미국), or GAPDH(Santa Cruz社, 미국)에 대한 항체로 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 이후 상기 막을 홀스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, Jackson Immuno Research社, 미국)가 콘쥬게이션된 2차 항체로 인큐베이션하고, 웨스턴 라이팅 케미루미네스센스 시약(Western Lighting chemiluminescence reagent, Perkin Elmer社, 미국)을 이용하여 현상하였다.

[0112]

[0113]

**세포 수축성 및 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 일과성(transient) 측정**

[0114]

심실 심근 세포의 기계적인 특성은 종래 문헌[34]에 기재된 바에 따라 비디오-기반된 엷지 감지 시스템(IonOptix社, 미국)을 이용하여 평가하였다. 간략히 설명하면, 도립 현미경(Nikon Eclipse TE-100F, Nikon社, 일본)의 재물대에 올려진 챔버 내에 세포를 부착한 라미닌-코팅된 커버슬립을 위치시키고, 37°C에서 약 1 ml/min 속도로 타이로드 버퍼(137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 글루코오스 10 mM HEPES[pH7.4])를 관류하였다. HLD-CS 배양 챔버/스팁 홀더 상에 위치한 STIM-AT 스티뮬레이터/서모스탯(Cell Micro Controls社, 미국)을 이용하여 3 Hz(30 V)의 빈도로 상기 세포를 펄드-자극하였다. IonOptix MyoCam 카메라(IonOptix社, 미국)를 이용하여 상기 목적 심근 세포를 컴퓨터 모니터상에 표시하였고, 매 8.3 ms 마다 빠르게 이미지 구역을 스캔한 결과 단축 또는 재연장의 진폭 및 속도가 충실하게 기록되었다. 단축 또는 재연장하는 동안의 세포 길이의 변화를 포착하고, 소프트 엷지 소프트웨어(IonOptix社, 미국)를 이용하여 분석하였다. 상기 심근 세포를 Ca<sup>2+</sup>-민감성 지시계(indicator)인 0.5 μM Fura2-AM(Molecular Probes社, 미국) 37°C에서 15분 동안 놓았다. 형광 방출을 근세포 칼슘 및 수축성 기록 시스템(Myocyte calcium and contractility recording system, IonOptix社, 미국)을 이용하여 수축성 측정과 동시에 기록하였다. 상술한 바와 같이 펄드-자극하는 동안 340 또는 380 nm 필터를 통한 75 W 할로겐 램프에 의하여 방출되는 빛에 심근 세

포를 노출하였다. 340 nm에서 0.5초 동안 초기 조광한 다음 포토멀티플라이어 튜브에 의하여 480 및 520 nm에서 형광 방출을 탐지한 후, 380 nm에서 기록 프로토콜의 지속기간 동안 형광 방출을 탐지하였다. 프로토콜의 종료시점에서 상기 340 nm 여기(들뜸) 스캔을 반복하였고, 두 과정에서 Fura 형광 강도의 비율로부터 세포 내  $Ca^{2+}$  농도의 질적 변화를 추론하였다.

[0115]

[0116]

**분리 심장 관류 장치 실험**

[0117]

아이소플란(0.5%)을 5분 동안 흡입시켜 랫트를 마취하였다. 심장을 빠르게 제거한 후 냉각 과산화 타이로드 용액(137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM 글루코오스, 1 mM  $CaCl_2$ , 10 mM HEPES [pH 7.4], 100%  $O_2$ )에 위치시켰다. 대동맥에 캐논리를 삽입하고, 일정한 압력(65 mmHg,  $37 \pm 0.2^\circ C$ )에서 라젠도르프 방법에 의하여 과산화 타이로드 용액을 관류하였다. 심장 기능의 계속적 측정을 위하여 물이 채워진 라텍스 풍선을 좌심실 챔버에 삽입하고 압력 트랜스듀서(AD Instruments社, 미국)를 연결하였다. 파워랩 차트 시스템즈(AD Instruments社, 미국)를 이용하여 심박동, 좌심실 이완기 압력(LVDP) 및 좌심실압 1차 도함수(최대 LV +dP/dt 및 최대 LV -dP/dt)를 모두 기록하였다. 측정된 마지막 이완기 압력이 6-10 mmHg의 범위가 되도록 상기 풍선의 부피를 약 250-300  $\mu l$ 로 조절하였다. 30분의 안정기 이후, 전반적 허혈 유도를 위하여 20분 동안 상기 심장의 관류를 중지하고, 이후 30분 동안 재관류시켰다. 최종 농도 1  $\mu M$ 로 테코이 펩타이드를 관류시켰다.

[0118]

[0119]

**통계**

[0120]

적절한 평가를 위하여 평균  $\pm$  SD 로 데이터를 표시하였다. Student's t-test 또는 본페로니 콜렉션(Bonferroni correction)을 장착한 일원배치 분산분석(one-way ANOVA, Statview version 5.0, SAS社, 미국)을 이용하여 각 군의 평균을 비교하였다. P-value <0.05를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0121]

[0122]

**실험 결과**

[0123]

**테코이 펩타이드**

[0124]

PLB는 N-말단에 세포질 헬릭스, C-말단에 막관통 헬릭스, 그리고 상기 두 헬릭스를 연결하는 유동적인 루프를 포함한다(도 1, 좌측). 인산화 자리는 상기 연결 루프 부분 내의 Ser<sup>16</sup> 및 Thr<sup>17</sup> 잔기이다. 본 발명자들은 루프 지역의 9개의 아미노산과 정확히 매칭되는 서열인 9-mer 펩타이드(RASTIEMPQ, 서열목록 제8서열)를 합성하였고, 이황화본드에 의하여 세포 투과 펩타이드 TAT와 결합시켜  $\psi$ PLB-wt을 제조하였다. 또한, 본 발명자들은 TAT-결합된 유사 펩타이드를 제조하였는데, 이는 PLB의 Ser<sup>16</sup> 또는 Thr<sup>17</sup>과 상응하는 Ser 또는 Thr 잔기 각각을 Glu로 대체한  $\psi$ PLB-SE 또는  $\psi$ PLB-TE이다(도 1a, 우측). 상기 펩타이드를 FITC로 표지하고 랫트 좌심실에서 분리하여 배양한 심근 세포에 첨가하였다. 형광현미경 하에서 관찰한 결과 거의 모든 심근 세포 내로 상기 펩타이드가 효과적으로 유입되었음을 알 수 있었다(도 1b). 상기 실험에 의하여 상기 심근 세포가 효과적으로 본 발명의 펩타이드를 흡수하는 것을 확인하였고, 표지하지 않은 펩타이드는 이후 실험에서 사용하였다.

[0125]

심근 세포에 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate)를 처리하는 경우 PKCa 활성화에 의하여 PLB의 인산화가 현저하게 감소함은 이미 알려져 있다.  $\psi$ PLB-SE를 전처리한 경우,  $\psi$ PLB-wt를 처리한 경우와 달리 Ser<sup>16</sup> 및 Thr<sup>17</sup> 모두에서 PLB의 PMA-유도된 탈인산화를 상당히 차단하였다.  $\psi$ PLB-TE의 처리도 PLB의 탈인산화를 차단하였으나,  $\psi$ PLB-SE의 처리보다 효과적이지 못하였다(도 1c). PLB의 인산화 레벨은  $\psi$ PLB-SE 처리 이후 약간 증가하였으나, 기준 레벨보다는 현저하게 높았다. PP1이 PLB를 탈인산화시키는 것으로 알려진 유일한 단백질 포스포타아제임을 고려할 때, 상기 데이터는  $\psi$ PLB-SE가 PP1-매개 탈인산화를 완벽하게 억제하는 테코이 펩타이드로서 작용함을 입증한다.

[0126]

Ser<sup>16</sup>을 Asp로 대체한  $\psi$ PLB-SD는  $\psi$ PLB-SE만큼 PLB의 인산화 레벨 증가에 효과적이었다(도 1c). 본 발명자들은 AETIEMPQ( $\psi$ PLB-8-mer, 서열목록 제4서열), RAETIEM( $\psi$ PLB-7-mer, 서열목록 제5서열), RAETIE( $\psi$ PLB-6-mer, 서열목록 제6서열) 및 RAETI( $\psi$ PLB-5-mer, 서열목록 제7서열)로 구성된 단축된  $\psi$ PLB-SE 펩타이드를 합성하였다. 상기 펩타이드 중 오직  $\psi$ PLB-5-mer만이 PLB의 인산화 레벨 증가에 효과가 없었다(도 1d). 따라서 상기 결과는 ASTIE(서열목록 제9서열)가 필요한 최소한의 아미노산 서열이고, Ser 잔기를 Glu 또는 Asp로

대체하는 경우 PP1에 대하여 효과적인 데코이 펩타이드를 제조할 수 있음을 보여주었다.

[0127]

[0128]

***ψPLB-SE는 심근 세포 수축성을 증가시킨다.***

[0129]

본 발명자들은 다음으로 ψPLB-SE가 심근 세포 수축성에 영향을 미치는지 여부를 시험하였다. 분리한 성체 심근 세포를 펩타이드로 전처리하고 PMA로 처리하였다. 피크 단축을 포함하는 수축성 파라미터의 감소 및 수축과 이완 속도로 나타내어지는 바와 같이, PMA는 수축성을 상당히 감소시켰다. ψPLB-wt 및 ψPLB-TE가 수축성에 있어 없거나 미미한 효과를 나타내는 반면, ψPLB-SE는 수축성의 PMA-유도된 감소를 완벽하게 방지하였다(도 2a). PMA는 또한 Ca<sup>2+</sup> 일과성 증폭의 현저한 감소 및 Ca<sup>2+</sup> 일과성 감소의 시간 상수(τ)의 현저한 증가를 유발하였다. ψPLB-wt 및 ψPLB-TE의 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 조절에 대한 효과가 무시해도 될 정도 또는 미미한 정도인 반면, ψPLB-SE 전처리는 상기 PMA-유도된 결함을 완전히 전환시켰다(도 2b). 이러한 데이터는 ψPLB-SE의 전처리에 의하여 내인성 PLB의 복원된 인산화 레벨이 수축성을 정상화시킴을 나타낸다. ψPLB-SD 및 ψPLB-6-mer는 모두 수축성 유지 및 칼슘이온 조절에 ψPLB-SE와 마찬가지로 효과적이었다(도 2c 및 2d).

[0130]

[0131]

***ψPLB-SE는 엑스 비보에서 허혈/재관류 후의 기능적 회복을 향상시킨다.***

[0132]

본 발명자들은 나아가 엑스 비보에서 허혈/재관류(I/R: ischemia/reperfusion) 동안의 ψPLB-SE의 이점을 실험하였다. 랫트 심장을 란젠도르프-관류하고, 전반적 허혈 유도를 위하여 20분 동안 과류를 중지한 후, 30분 동안 재관류하였다. I/R은 좌심실의 이완기 압력을 현저하게 낮추었다(37-44 mmHg vs. 허혈 전 80-100 mmHg). 재관류 시점에서, ψPLB-SE 또는 대조군 펩타이드 TAT를 재관류 용액에 첨가했다. TAT는 효과가 없었던 반면, ψPLB-SE는 이완기 압력을 현저하게 증가시켰다(73-78 mmHg)(도 3a). 실험의 종료 시점에서, 심장 파쇄물을 제조하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. I/R은 Ser<sup>16</sup> 및 Thr<sup>17</sup> 모두에서 PLB의 인산화를 상당히 감소시켰고, ψPLB-SE는 Ser<sup>16</sup>에서의 인산화를 현저하게 회복시켰다. 또한, I/R은 세포 사멸-연관된 카스파아제 3을 활성화시켰고, ψPLB-SE는 이러한 결과를 완벽하게 역행시켰다(도 3b). 총괄적으로, 이러한 데이터는 ψPLB-SE가 Ser<sup>16</sup>에서 PLB의 인산화 레벨을 증가시킴에 의하여 최소한 부분적으로라도 I/R 이후 기능적 회복을 향상시킴을 보여준다.

[0133]

[0134]

**고찰**

[0135]

SERCA2a는 심근 세포에서 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 조절의 결정적인 조절자이고, 심부전 및 I/R 손상에서의 상기 SERCA2a의 역할은 잘 확립되어 있다[6]. 따라서 SERCA2a 레벨 및/또는 활성의 정상화 양상은 중요한 치료적 잠재요소가 될 수 있다. 부전성 심장에서 억제된 SERCA2a 레벨의 유전자 이동-매개 회복이 하나의 접근이 될 수 있다. 이러한 접근은 심부전 동물모델에서의 효과적이고[13-16], 최근 말기 인간 심부전 환자에서 안전하고 효과적임이 밝혀졌다[17, 18].

[0136]

PLB는 SERCA2a의 내인성 억제제이고, 따라서 PLB는 SERCA2a 활성화 조절을 위한 잠재적 표적이다. 안티센스 RNA[35] 또는 siRNA(small interfering RNA)[36]에 의한 PLB의 하향-조절은 SERCA2a 활성화 및 심근 세포 수축성을 부분적으로 회복시켰다. 내인성 PLB의 구조를 붕괴하기 위하여 설계된 PLB의 우성 음성 형태인 K3E/R14E는 신생아 및 성체 심근 세포에서 SERCA2a 활성을 향상시켰다[35].

[0137]

본 발명에서, 본 발명자들은 ψPLB-SE가 PP1에 대한 유인체 펩타이드로 작용함에 의하여 PLB의 탈인산화를 방지함을 보였다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 ψPLB-TE가 ψPLB-SE만큼 효과적이지 않음을 발견하였다(도 1c). 비록 구조상 인식이 현재 불가하지만, Ser<sup>16</sup>에 인산화된 PLB가 Thr<sup>17</sup>에 인산화된 PLB보다 PP1에 대하여 더 좋은 기질임을 파악할 수 있다. Thr<sup>17</sup> 위치의 인산화는 β-아드레너직 자극 동안 오직 Ser<sup>16</sup>에 인산화에 뒤이어 일어남에 주목할만하다[36]. 따라서 Thr<sup>17</sup>에만 인산화된 PLB는 인 비보에서 존재하지 않을 것이다. 결론적으로, 본 발명자들은 SERCA2a 활성 회복에 의하여 ψPLB-SE가 심장-보호 효과를 나타내는지를 보였다. 짧은 펩타이드 처럼, ψPLB-SE는 siRNA 또는 돌연변이 PLB 단백질 보다 여러 치료적 이점을 갖는다. 앞으로의 실험은 ψPLB-SE가 심부전의 다양한 수술적 및 유전적 모델들에 효과적인지 여부를 결정하게 될 것이다.

- [0138] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0139] **참고문헌**
- [0140] 1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*.2006 May 27; 367(9524): 1747-57.
- [0141] 2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*.2006 Nov; 3(11): e442.
- [0142] 3. Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *Br Med Bull*. 2009; 92: 7-32.
- [0143] 4. Houser SR, Piacentino V, 3rd, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Sep; 32(9): 1595-607.
- [0144] 5. Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res*. 2003 Mar 7; 92(4): 350-8.
- [0145] 6. Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009 Dec; 14(4): 213-24.
- [0146] 7. Bers DM, Guo T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun; 1047: 86-98.
- [0147] 8. Schaub MC, Hefti MA, Zaugg M. Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Aug; 41(2): 183-214.
- [0148] 9. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul; 4(7): 566-77.
- [0149] 10. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*. 1994 Apr; 74(4): 555-64.
- [0150] 11. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, et al. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1994 Sep; 75(3): 434-42.
- [0151] 12. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995 Aug 15; 92(4): 778-84.
- [0152] 13. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Jan 18; 97(2): 793-8.
- [0153] 14. del Monte F, Hajjar RJ, Harding SE. Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure. *Circ Res*. 2001 Jun 8; 88(11): E66-7.
- [0154] 15. Sakata S, Lebeche D, Sakata Y, Sakata N, Chemaly ER, Liang L, et al. Transcoronary gene transfer of SERCA2a increases coronary blood flow and decreases cardiomyocyte size in a type 2 diabetic rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Feb; 292(2): H1204-7.
- [0155] 16. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, et al. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll*

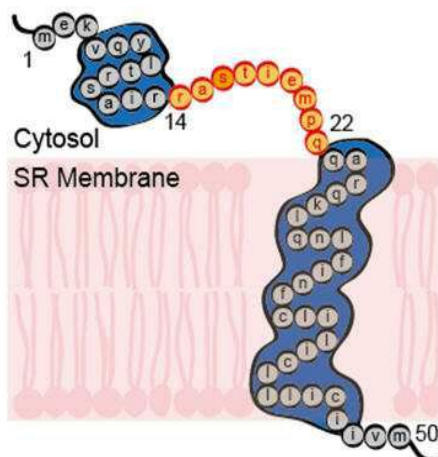
*Cardiol.* 2008 Mar 18; 51(11): 1112-9.

- [0156] 17. Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail.* 2009 Apr; 15(3): 171-81.
- [0157] 18. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 2011 Jul 19; 124(3): 304-13.
- [0158] 19. Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG. Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry.* 1979 Nov 13; 18(23): 5150-7.
- [0159] 20. James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca<sup>2+</sup> pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature.* 1989 Nov 2; 342(6245): 90-2.
- [0160] 21. Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res.* 2005 Dec 1; 68(3): 366-75.
- [0161] 22. MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem.* 1991 Mar 28; 196(3): 725-34.
- [0162] 23. Steenaart NA, Ganim JR, Di Salvo J, Kranias EG. The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 1992 Feb 14; 293(1): 17-24.
- [0163] 24. Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Mar; 31(3): 479-91.
- [0164] 25. Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG, Sabbah HN. Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant.* 2002 Mar; 21(3): 366-73.
- [0165] 26. Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bokenes J, Tonnessen T, Holt E, et al. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res.* 2002 Feb 1; 53(2): 382-91.
- [0166] 27. Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, et al. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Jan; 29(1): 265-72.
- [0167] 28. Huang B, Wang S, Qin D, Boutjdir M, El-Sherif N. Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, G(i) protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circ Res.* 1999 Oct 29; 85(9): 848-55.
- [0168] 29. Ta HM, Nguyen GT, Jin HM, Choi J, Park H, Kim N, et al. Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Nov 23; 107(47): 20281-6.
- [0169] 30. Law JH, Li Y, To K, Wang M, Astanehe A, Lambie K, et al. Molecular decoy to the Y-box binding protein-1 suppresses the growth of breast and prostate cancer cells whilst sparing normal cell viability. *PLoS One.* 2010; 5(9).
- [0170] 31. Yamaguchi H, Durell SR, Feng H, Bai Y, Anderson CW, Appella E. Development of a substrate-based cyclic phosphopeptide inhibitor of protein phosphatase 2Cdelta, Wip1. *Biochemistry.* 2006 Nov 7; 45(44): 13193-202.

- [0171] 32. Hayashi R, Tanoue K, Durell SR, Chatterjee DK, Jenkins LM, Appella DH, et al. Optimization of a cyclic peptide inhibitor of Ser/Thr phosphatase PPM1D (Wip1). *Biochemistry*. 2011 May 31; 50(21): 4537-49.
- [0172] 33. Ren J, Wold LE. Measurement of Cardiac Mechanical Function in Isolated Ventricular Myocytes from Rats and Mice by Computerized Video-Based Imaging. *Biol Proced Online*. 2001 Dec 11; 3: 43-53.
- [0173] 34. Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, et al. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jul; 279(1): H429-36.
- [0174] 35. He H, Meyer M, Martin JL, McDonough PM, Ho P, Lou X, et al. Effects of mutant and antisense RNA of phospholamban on SR Ca(2+)-ATPase activity and cardiac myocyte contractility. *Circulation*. 1999 Aug 31; 100(9): 974-80.
- [0175] 36. Luo W, Chu G, Sato Y, Zhou Z, Kadambi VJ, Kranias EG. Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem*. 1998 Feb 20; 273(8): 4734-9.

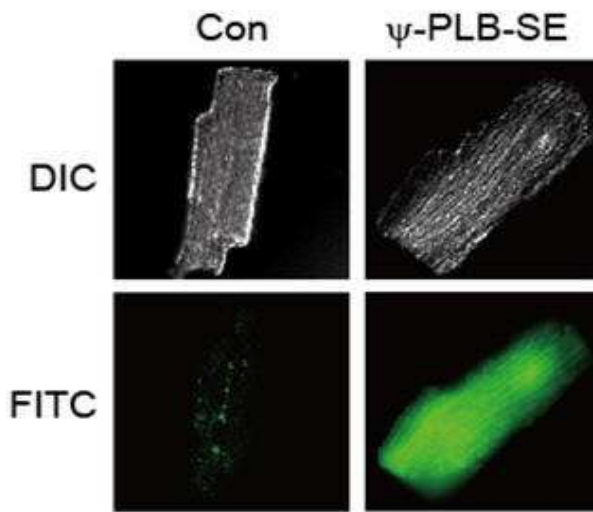
도면

도면1a

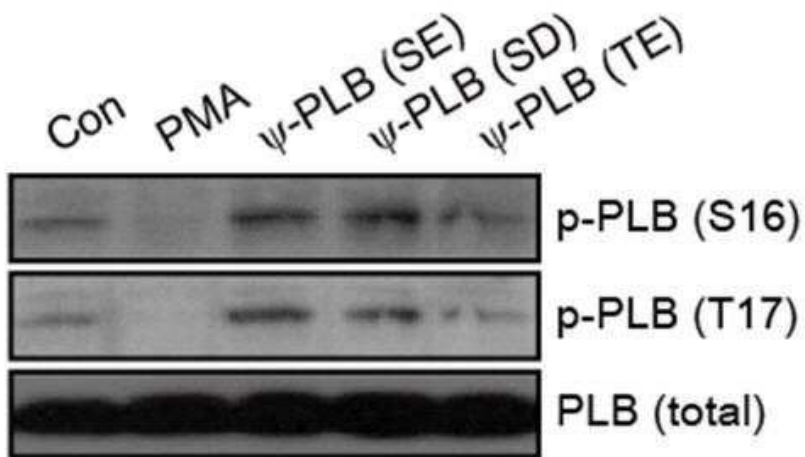


Name	Sequence
TAT	YGRKKRRQRRR
ψPLB-wt	TAT-cc-RA <u>S</u> TIEMPQ
ψPLB-SE	TAT-cc-RA <u>E</u> TIEMPQ
ψPLB-TE	TAT-cc-RA <u>S</u> <u>E</u> TIEMPQ

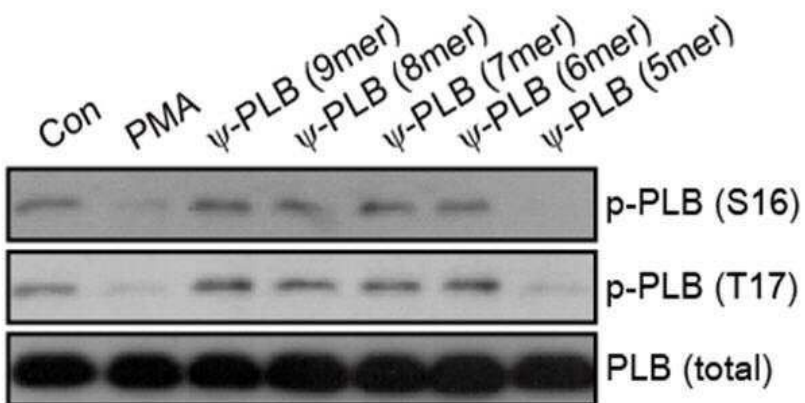
도면1b



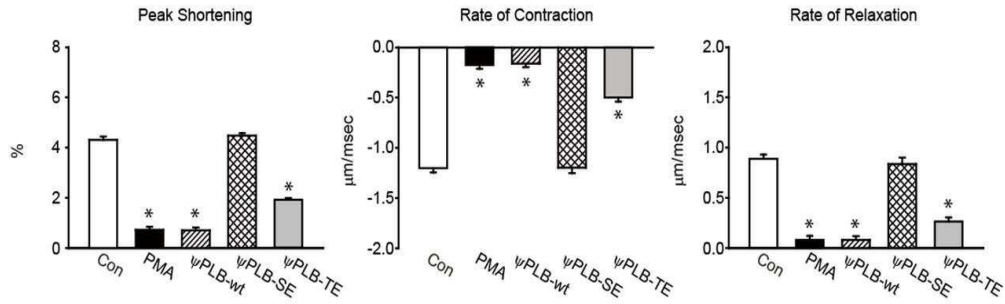
도면1c



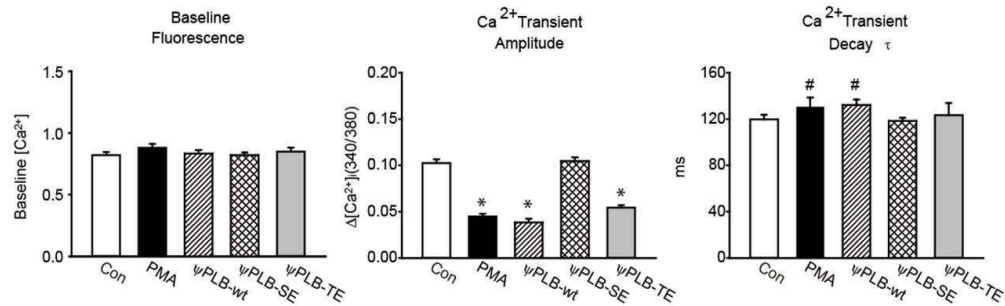
도면1d



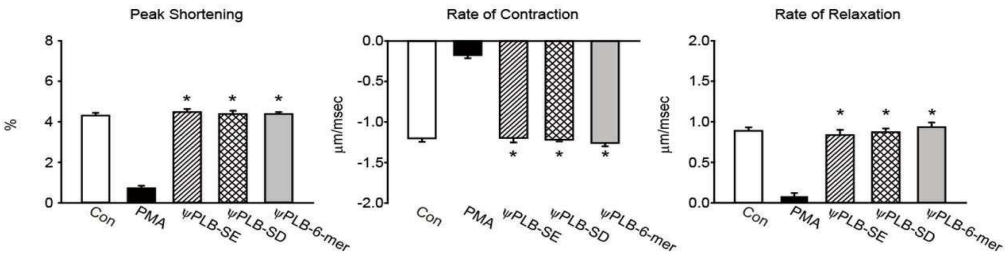
도면2a



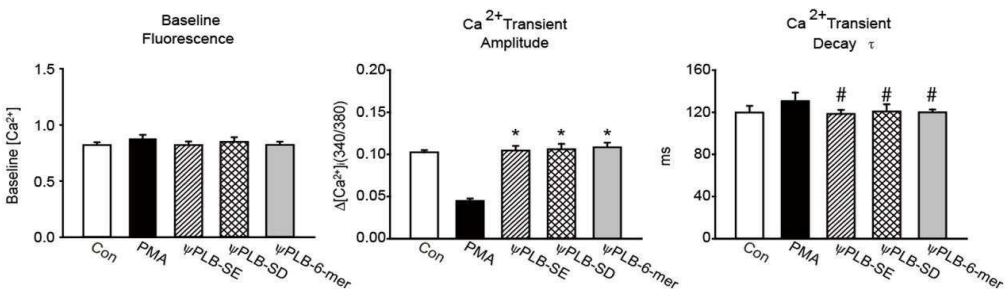
도면2b



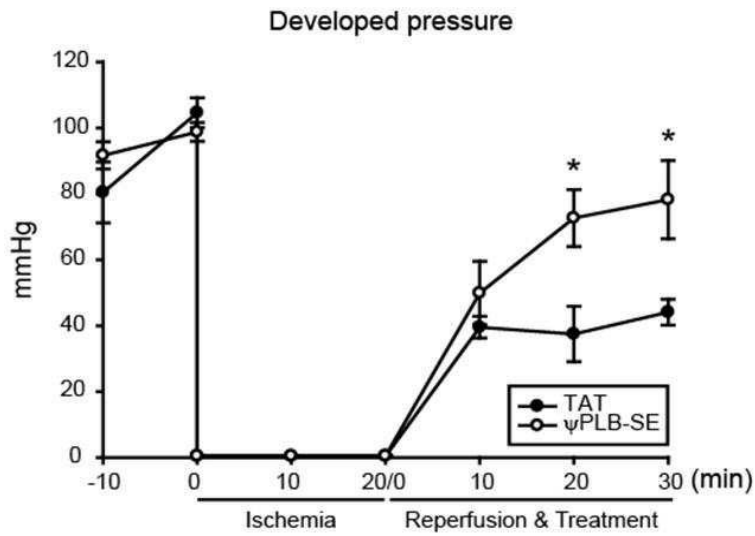
도면2c



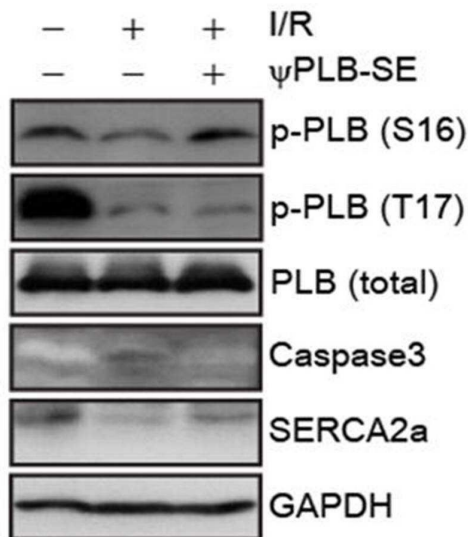
도면2d



도면3a



도면3b



서열목록

- <110> GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- <120> DECOY PEPTIDES INHIBITING PROTEIN PHOSPHATASE 1-MEDIATED DEPHOSPHORYLATION OF PHOSPHOLAMBAN
- <130> PN130362
- <150> US 61/668034
- <151> 2012-07-05
- <160> 11
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> SEQ ID NO:1  
<400> 1  
Arg Ala Glu Thr Ile Glu Met Pro Gln

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:2

<400> 2

Arg Ala Ser Glu Ile Glu Met Pro Gln

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:3

<400> 3

Arg Ala Asp Thr Ile Glu Met Pro Gln

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:4

<400> 4

Ala Glu Thr Ile Glu Met Pro Gln

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SEQ ID NO:5  
 <400> 5  
 Arg Ala Glu Thr Ile Glu Met  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SEQ ID NO:6  
 <400> 6  
 Arg Ala Glu Thr Ile Glu  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SEQ ID NO:7  
 <400> 7  
 Arg Ala Glu Thr Ile  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213>  
 > Artificial Sequence  
 <220><223> SEQ ID NO:8  
 <400> 8  
 Arg Ala Ser Thr Ile Glu Met Pro Gln  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:9

<400> 9

Ala Ser Thr Ile Glu

1 5

<210> 10

<211> 52

<212> PRT

<213> SEQ ID NO:10(Homo sapiens PLB)

<400> 10

Met Glu Lys Val Gln Tyr Leu Thr Arg Ser Ala Ile Arg Arg Ala Ser

1 5 10 15

Thr Ile Glu Met Pro Gln Gln Ala Arg Gln Lys Leu Gln Asn Leu Phe

20 25 30

Ile Asn Phe Cys Leu Ile Leu Ile Cys Leu Leu Leu Ile Cys Ile Ile

35 40 45

Val Met Leu Leu

50

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO:11

<400> 11

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10