(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0117605
(43) 공개일자 2022년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01) *A61P 9/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/2093 (2013.01)
A61P 9/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-0021152
(22) 출원일자 2021년02월17일
심사청구일자 2021년02월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최종일
서울특별시 서초구 신반포로 270(반포동, 반포자이아파트)
이혜정
서울특별시 성북구 종암로9나길 40, 202호(종암동, 호스트하우스)
(74) 대리인
특허법인 무한

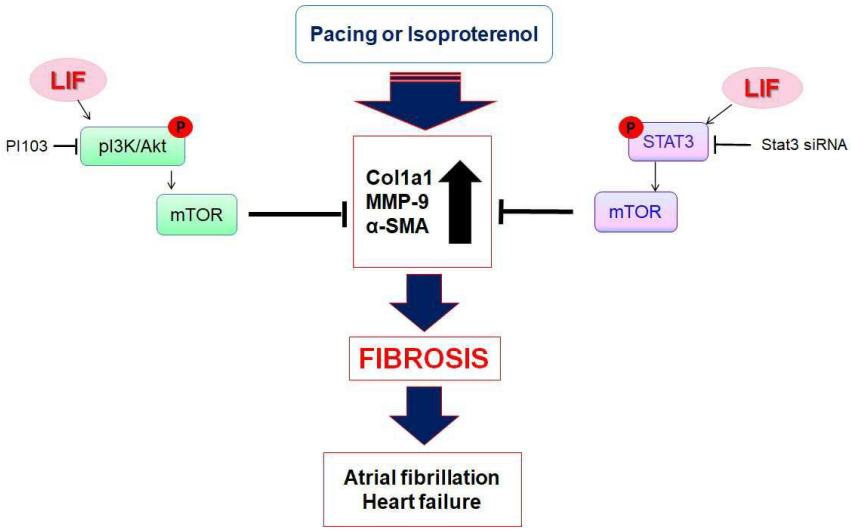
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시예에 따르면, LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공되며, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 mTOR, Akt 및 Stat3 를 인산화시켜 Col1a1, MMP-9 및 α-SMA 중 하나 이상의 섬유증 마커 발현을 억제하여 궁극적으로 심장 섬유화를 감소시키므로, 부정맥, 심부전 또는 심방 세동 등의 심혈관 질환을 예방하거나 치료 효과를 나타낼 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61P 9/04 (2018.01)
A61P 9/06 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 심혈관 질환은 부정맥, 심부전 또는 심방 세동인 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 LIF 는 심장 섬유화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 LIF 는 심방근 세포에서의 mRNA 레벨에서 섬유증 마커 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 LIF 는 심방근 세포에서의 mTOR, Akt 및 Stat3 를 인산화시키는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 섬유증 마커는 Col1a1, MMP-9 및 α-SMA 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 심장 섬유화는 이소프로테레놀(Isoproterenol) 또는 전기 자극(electrical stimulation)을 통해 유도되는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제 및 방부제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상 및 제1항에 기재된 약학적 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 제제.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제제는 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이며, 보다 상세하게는 심장 섬유화를 감소시킬 수 있는 LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심방 세동, 부정맥, 심부전 등에 의한 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 가장 흔한 심장 부정맥 중 하나인 심방 세동의 메커니즘은 다인성이며 구조적, 수축성 및 전기적 리모델링과 관련이 있다. 리모델링 과정의 특징은 심방 섬유증의 발달과 진행이다.

[0004] 운동 강도와 심혈관 질환 및 수명의 관계에 대한 연구가 일반적이다. 신체 활동을 한 사람은 그렇지 않은 사람보다 심혈관 질환으로 인한 사망률이 낮았고, 운동 강도가 높아질수록 관상 동맥 심장 질환이 감소하였다. 운동 중 골격근에서 분비되는 사이토카인(cytokines)인, 마이오카인(myokines)은 심장 허혈성 손상 및 부정적 심장 리모델링을 제한하는 방식으로, 심장에 유익한 역할을 한다.

[0005] 마이오카인인, 백혈병 억제 인자(Leukemia inhibitory factor; LIF)는 근육 발달과 성인 근육 세포 항상성에 관여하고, 최근 LIF 는 심근 경색 후 심근 세포 재생을 개선하는 것으로 보고되었다. LIF 는 마우스 신장 섬유아세포 세포에서 신장 섬유증을 감소시키고 손상된 근육을 개선하며, 심근 세포를 재생하고 섬유증을 약화시킬 수 있다. 그러나, 지금까지 심장 섬유증 과정에서 LIF 활동의 분자 메커니즘은 명확하지 않았으며, 특히, 심방 세동의 세포 모델에서 LIF 에 따른 치료 효과를 나타낸 연구는 존재하지 않았다. 아울러, 심방 세동에 대한 현재의 약물 치료는 나트륨 채널 등 이온채널을 직접 차단시키는 방법을 사용하므로, 이로 인한 부작용이 존재하며, 이에 따라 세포 수준에서의 근원적 기전 치료가 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) (1) Zou Y, Takano H, Mizukami M, Akazawa H, Qin Y, Toko H, Sakamoto M, Minamino T, Nagai T, Komuro I. Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction. Circulation. 2003;108:748-753

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 LIF 가 심근 세포의 섬유증에 미치는 영향과 이러한 영향에 관여하는 신호 전달 경로를 밝혀, 이를 이용하여 심장 섬유화 감소를 통한 심방 세동, 부정맥, 심부전 등의 치료에 이용할 수 있음을 발견하여, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 일 목적은 LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제 및 방부제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상 및 LIF 를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 제제를 제공하는 것이다.

[0012] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른

과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0015] 일 측에 따르면, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제 및 방부제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상 및 LIF 를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 제제가 제공된다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 mTOR, Akt 및 Stat3 를 인산화시켜 Colla1, MMP-9 및 α-SMA 중 하나 이상의 섬유증 마커 발현을 억제하여 궁극적으로 심장 섬유화를 감소시키므로, 부정맥, 심부전 또는 심방 세동 등의 심혈관 질환을 예방하거나 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0019] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1 은 심방 근세포에서의 페이싱 유도(pacing-induced) 섬유화를 나타낸 도면이다.

도 2 는 심방 근세포에서의 이소프로테레놀 유도(isoproterenol-induced) 섬유화를 나타낸 도면이다.

도 3 은 심방 근세포에서 LIF 가 페이싱 및 이소프로테레놀 유도 섬유화를 감소시키는 것을 나타낸 도면이다.

도 4 는 심방 근세포에서 mTOR, Akt 및 Stat3 신호를 활성화시키는 것을 나타낸 도면이다.

도 5 는 LIF 가 mTOR, Akt 및 Stat3 신호를 통해 이소프로테레놀 유도 심방 섬유화를 감소시키는 것을 나타낸 도면이다.

도 6 은 심방 섬유화에 대한 제안된 LIF 의 치료 메커니즘을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0023] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0024] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0025] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 따르면, LIF(Leukemia inhibitory factor)를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0028] 본 명세서에서 사용된 용어, "예방" 이란 조성물의 투여로 심장 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료" 란 조성물의 투여로 심장 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0029] 상기 LIF 는 운동 중 분비되는 사이토카인에 해당하며, 항섬유화 효과와 관련이 있다. 그러나 LIF 에 대한 역심방성 섬유증(reverse atrial fibrosis)에 대한 효과는 알려진 바가 없다. 이에 본 발명 및 하기 실험에서는, 심방 근세포에서 LIF 가 Akt 및 Stat3 매개 경로를 통해 중요한 항 섬유화 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 특히, LIF 는 심방 근세포에서 mTOR, Akt 및 Stat3 의 인산화를 촉진시키고, 이를 통해, mRNA 레벨에서의 섬유증 마커 발현을 감소시켜, 심장 섬유화를 억제하는 메커니즘을 확인하였는바, LIF 를 통해 심혈관 질환의 예방 또는 치료용으로 활용할 수 있다.

[0030] 상기 mRNA 레벨에서의 섬유증 마커의 종류로는 특히, Colla1, MMP-9 및 α-SMA 를 예로 들 수 있으며, 상기 LIF 는 상기 섬유증 마커 중 하나 이상의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0031] 또한, 상기 심혈관 질환은 부정맥, 심부전 또는 심방 세동으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 심방 세동에 해당할 수 있다.

[0033] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따라 제공되는 약학적 조성물이 제제(약제)로 이용되기 위해서, 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제, 방부제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성성분 외에 서방성 목적으로 사용되는 기제를 포함하여 활성성분의 방출이 천천히 일어나도록 서방형 제제로 제조될 수 있다.

[0034] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 퀩티드 제제에 대한 경구 투여용으로 사용되는 다양한 약물 전달 물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현택제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있으며, 예를 들어 경구 또

는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여 방법으로는 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 요법에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 이는 제제화 방법, 투여경로 치료 횟수 뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 증상, 투여시간 및 방법 등 다양한 요인들을 고려하여 결정될 수 있다. 이러한 점을 고려할 때, 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 있어 특별히 제한되지 아니한다.

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **<실험 방법 및 결과>**

[0046] **실험방법 1 : 셀 배양(Cell culture)**

[0047] HL-1 마우스 심방 심근 세포는 10% 소 태아 혈청, 노르에피네프린(10mM, 100X) 0.1 mM, L-글루타민(200mM) 및 10% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 Claycomb Medium(Sigma)에서 37℃, 5% CO_2 대기 하에서 유지되었다. 모든 배양 접시는 0.02% 젤라틴 및 피브로넥틴(0.2 ㎛ 멸균필터를 사용하여 여과한, 0.02% 젤라틴 50mL 에 250㎕의 피브로넥틴)으로 코팅되었으며, 37℃ 에서 밤새 배양하였다.

[0049] **실험방법 2 : 빠른 전기 자극(Rapid electrical stimulation)**

[0050] 젤라틴/피브로넥틴 코팅된 35 ㎜ 배양 접시에 HL-1 세포를 접종(seed)하였다. 24 시간에, 세포는 confluent 단계에 있었고 계대배양 후 2 일째에 24 시간 동안 혈청 부족 상태(serum-starved)에 있었으며, 전기 자극이 가해졌다. 자극 속도는 10Hz 였으며, 자극의 강도는 1.0 V/cm 의 전압 구배를 생성하였다.

[0052] **실험방법 3 : 시약(Reagents)**

[0053] 본 실험에서는, Cell Signaling Technology 의 Phospho-Akt(Ser473), phospho-mTOR(Ser2448), Stat3 및 phosphor-Stat3(Tyr705)에 대한 항체; Abcam 의 MMP-9; Enzo 의 Donkey anti-mouse 및 Donkey anti-rabbit; EnoGene 의 β-actin 을 사용하였다. PI-103(강력한 포스파티딜이노시톨 3 키나아제 억제제)은 EMD Millopore 로부터 얻었으며, 이노프로테레놀은 Sigma 로부터 구입하였다. 재조합 인간 LIF 는 Peprotech 에서 구입하였으며, Stat3 siRNA 는 Dharmacon 에서 구입하였다.

[0055] **실험방법 4 : siRNA 트랜스펙션(transfection)**

[0056] 제조업체의 프로토콜에 따라 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 일시적 트랜스펙션을 수행하였다. 즉, Stat3 에 대한 siRNA 및 비표적 대조군 siRNA 를 생성하였다. siRNA(5 ㎕) 및 5 ㎕ 의 Lipofectamine 2000 을 각각 90 ㎕ 의 환원된 혈청 배지(Opti-MEM; Invitrogen)로 희석한 다음 결합하였다. 혼합물을 실온에서 15 분 동안 배양한 다음, 800 ㎕ Opti-MEM 을 함유하는 배양 웰에 적가하여, 최종 siRNA 농도가 100 nM 에 도달하였다.

[0058] **실험방법 5 : 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)**

[0059] mRNA 발현은 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Life Technologies)을 사용하여 정량적 real-time PCR 로 조사하였다. cDNA 증폭은 GenempSystem 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Warrington, UK) 를 사용하여 수행하였다. 증폭에 사용된 프라이머는 하기와 같다:

[0060] GAPDH, 5'-AGA ACA TCA TCC CTG CAT CC-3' (sense) 및 5'-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC-3' (antisense); Col1a1, 5'-AGANCGG CTG AGT AGG GAA CA-3' (sense) 및 5'-GAG CGG AGA GTA CTG GAT CG-3' (antisense); 및 MMP-9, 5'-CTG CTC CTG GCT CTC CTG-3' (sense) 및 5'-CTG GGT GTC CGT GAG GTT-3'(antisense).

[0061] PCR 프로그램은 95℃ 에서 10 분동안 시작된 다음 95℃ 에서 30 초동안 40 사이클로 진행되었다. Col1a1 및 GAPDH 를 60℃ 에서, MMP-9 및 GAPDH 를 64℃ 에서 15 초 동안 배양한 다음 72℃ 에서 30분 동안 배양하였다. 각 RT-PCR 반응에서 얻은 10 마이크로리터의 생성물을 아가로스 겔 전기영동을 통해 분석하였다.

[0063] **실험방법 6 : 면역 블롯 분석(Immunoblot analysis)**

[0064] 처리 또는 자극 전에 HL-1 세포를 6-well 플레이트에서 성장시키고 24 시간 동안 혈청 기아 상태를 유지하였다. 실험 조작 후, 배지를 제거하고, 세포를 ice-cold PBS 로 두번 세척하고 60 ㎕ 의 용해 완충액으로 용해시켰다. 샘플을 초음파 처리한 다음 25 분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 5×SDS 샘플 버퍼로 5분간 끓이고 SDS-PAGE(8 ~ 10%) 겔 상에서 처리하였다. 이어서 생성물을 폴리비닐리덴 플루오라이드 막으로 옮기고, 1차 항체와 함께 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 0.1% Tween20 이 포함된 Tris-buffered 식염수로 6 회 세척한 후, 막을 상온에서 horseradish 과산화효소-결합 2차 항체로 1시간 동안 배양하였다. 블롯을 세척하고 Amersham Biosciences ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시스템(Amersham International plc, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 화학 발광을 통해 시각화하였다.

[0066] **실험방법 7 : 면역 형광 현미경(Immunofluorescence microscopy)**

[0067] 세포를 10 ㎜ 유리 커버슬립에 시드(seed)하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시킨 후, 0.1% Triton X-100/3% 소혈청 알부민으로 차단/투과하였다. 세포를 표시된 1차 항체와 함께 배양하였다. 사용된 2차 항체는 Alexa488-donkey anti-mouse 및 Cy™3-donkey anti-mouse(Invitrogen)이었다. 커버슬립은 면역 형광 장착 미디엄(medium)으로 장착(mounted)되었다. 이미지는 CLSM(Zeiss LSM 700) 공초점 현미경으로 기록하였다.

[0069] **실험결과 1 : 심방근 세포에서의 페이싱 유도 섬유증**

[0070] 심방 HL-1 세포에서 시간 의존적 페이싱을 자극하고 웨스턴 블롯팅 및 RT-PCR 을 통해 섬유증 마커를 확인하였다. 페이싱 자극이 섬유증 마커 콜라겐 type I alpha 1(Col1a1) 및 매트릭스 메탈로펩티다아제 9(MMP)를 증가시키는 것을 발견하였다. Col1a1 및 MMP-9 의 웨스턴 블롯 발현 수준은 페이싱 자극 24 시간 이후 유의하게 증가하였다(도 1A). 이는 RT-PCR 에 의해 측정된 mRNA 레벨에 의해 확인되었다. 베이스라인과 비교하여, 모든 시점에서의 MMP 및 3 시간 및 6 시간에서의 Col1a1 의 mRNA 레벨에 상당한 변화가 있었다. 이러한 결과는 페이싱이 심방 HL-1 세포에서 섬유증을 유발했음을 나타낸다.

[0072] **실험결과 2 : 심방근 세포에서의 이소프로테레놀 유도 섬유증**

[0073] 심방 HL-1 세포에서 이소프로테레놀(ISO) 처리 후의 섬유증 레벨을 확인하였다. 이 섬유증은 시간과 용량에 따라 발생하였다. ISO 처리는 Col1a1 및 MMP-9 의 레벨 수치를 상승시켰다. 상승된 Col1a1 및 MMP-9 의 레벨은 ISO 처리 12 시간 후에 관찰되었다(도 2A-2B). 이는 또한, RT-PCR 에 의해 측정된 mRNA 레벨에 의해 확인되었다(도 2C-2D). Col1a1 mRNA 레벨은 6 시간 때에 상당한 변화를 보였으며, MMP-9 mRNA 레벨은 3시간 내지 6시간 사이에서 상당한 변화를 보였다. 이러한 결과는 ISO 처리가 심방 HL-1 세포에서 섬유증을 야기했음을 증명한다.

[0075] **실험결과 3 : LIF 에 의한 심방근 세포에서의 ISO 유도 섬유증 감소 효과**

[0076] 페이싱 자극 이전에 LIF 로 전처리를 하였을 경우, 섬유증 마커 발현이 현저히 감소하였다(도 3A). LIF 로 전처

리한 후 ISO 와 함께 배양하면 Col1a1 및 MMP-9 발현이 크게 감소하였다(도 3B). LIF 전처리가 mRNA 레벨에서도 섬유증 마커 발현을 감소시키는 것을 확인하였다(도 3C-3D). 공초점 현미경을 사용하여, 형광 강도로 결정되는, Col1a1, MMP-8 및 α-SMA 의 레벨이 LIF 전처리 이후에 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 LIF 가 섬유화 방지 효과가 있음을 나타낸다.

[0078] **실험결과 4 : LIF 에 의한 심방근 세포에서의 mTOR, Akt 및 Stat3 신호 활성 효과**

[0079] LIF 가 항 섬유화 활성에 영향을 미치는 분자 메커니즘을 확인하기 위하여, 여러 단백질의 인산화 패턴을 평가하였다. 웨스턴 블롯 이미지는 LIF 가 15 분에 최대에 도달한 mTOR 및 Akt 인산화를 유도하였으며, Stat3 인산화가 심방근 세포에서 용량 의존적 방식으로(도 4B), 5 내지 30 분 사이에 유도(도 4A)되었음을 나타내었다. 이 경로에서 mTOR 및 Akt 의 관련성을 확인하기 위하여 PI-103 을 사용하였다. PI-103 은 LIF 매개 mTOR 및 Akt 인산화를 차단하였다(도 4C). siRNA 를 사용한 Stat3(신호 전달 및 전사)의 녹다운(knockdown)은 mTOR 및 Stat3 의 인산화를 감소시켰다(도 4D). 이러한 결과는 LIF 가 포스파티딜이노시톨 3 키나아제(PI3K) 및 Stat3 의존적 방식으로, mTOR, Akt 및 Stat3 를 인산화 시켰음을 증명한다.

[0081] **실험결과 5 : mTOR, Akt 및 Stat3 신호를 통한, LIF 에 의한 심방근 세포에서의 ISO 유도 섬유증 감소 효과**

[0082] 항 섬유화 과정에서 PI3K 및 Stat3 의 관련성을 확인하기 위하여, PI-103 및 Stat3 siRNA 의 존재 하에 Col1a1 및 MMP-9 발현 레벨을 조사하였다. mTOR 및 Akt 의 억제(inhibition)는 Col1a1 및 MMP-9 발현을 억제하였다(도 5A). Stat3 의 녹다운은 또한 섬유증과 관련된 단백질의 발현을 감소시켰다(도 5B). 이러한 결과는 LIF 가 mTOR, Akt 및 Stat3 의 활성화에 의해 섬유성 단백질의 발현을 감소시켰음을 나타낸다.

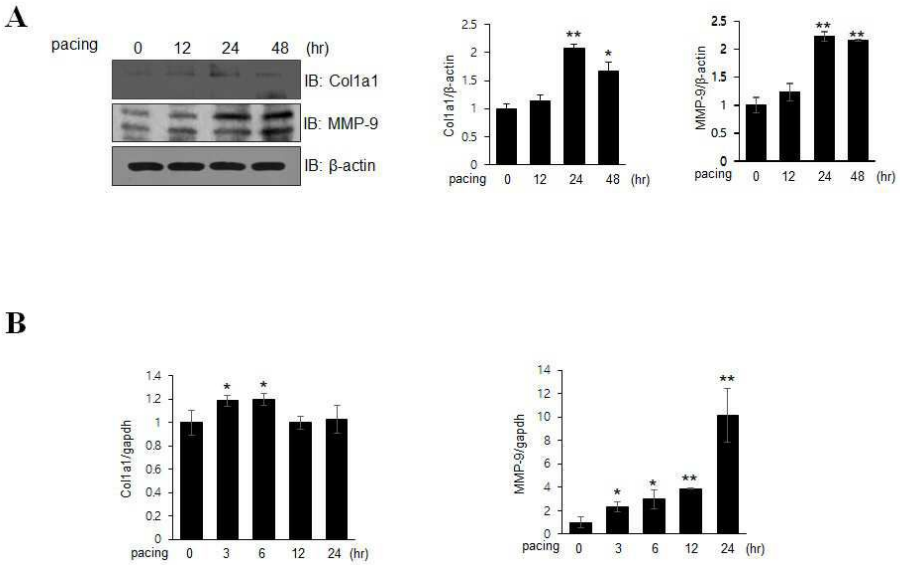
[0084] 상기 실시예들의 결과들은, 본 발명에 있어서, LIF 가 PI3K 와 Stat3 라는 이중 경로를 통해 항 섬유화 효과를 가질 수 있음을 시사하며(도 6), LIF 를 이용하여, 심장섬유화 감소를 통해 부정맥, 심부전, 심방 세동 등의 치료에 유용하게 활용될 수 있음을 보여준다. 특히, 앞선 실시예를 통해 확인한 섬유증은 심방 세동의 주요 원인으로서, 심방근세포에서의 섬유증의 발현은 심방 세동의 발현에 주요한 영향을 미칠 수 있는 것이므로, 심방근세포의 섬유증 감소가 심방 세동의 예방 또는 치료에 보다 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 것임을 알 수 있고, 궁극적으로 LIF 가 mTOR, Akt 및 Stat3 를 인산화시키고, Col1a1, MMP-9 및 α-SMA 등의 섬유증 마커의 발현 감소를 통해, 심방 세동의 예방 및/또는 치료에 대해 보다 효과적임을 확인할 수 있다.

[0086] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

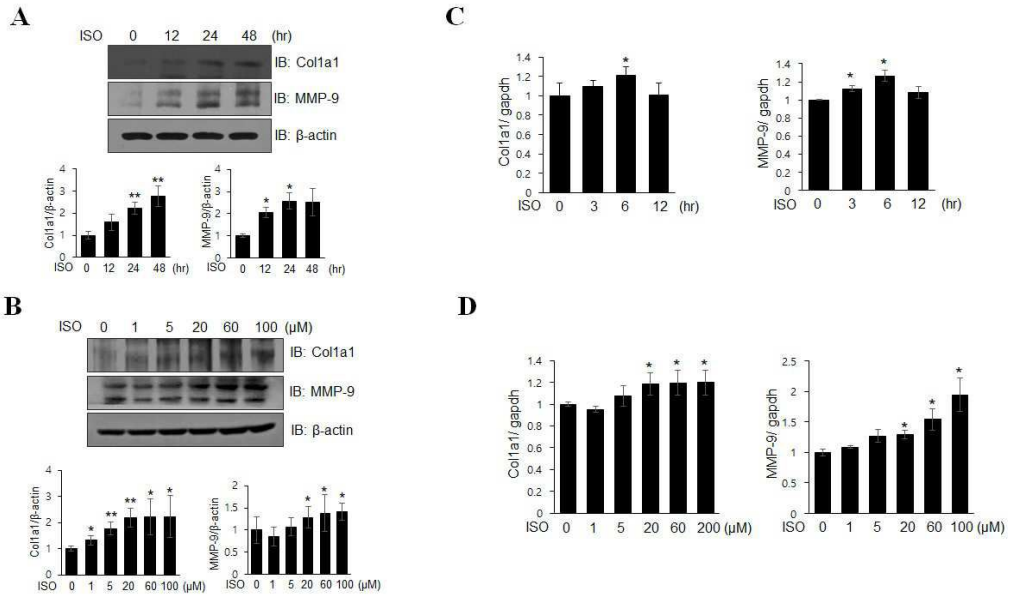
[0087] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

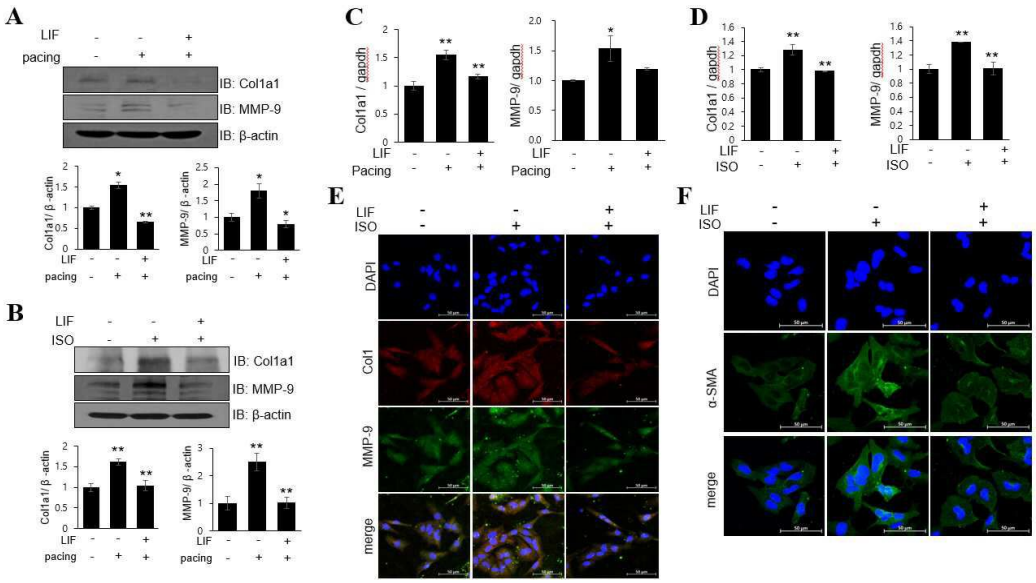
도면1


A
pacing 0 12 24 48 (hr)
IB: Col1a1
IB: MMP-9
IB: β-actin
Col1a1/β-actin
MMP-9/β-actin
B
Col1a1/gapdh
MMP-9/gapdh
pacing 0 3 6 12 24 (hr)

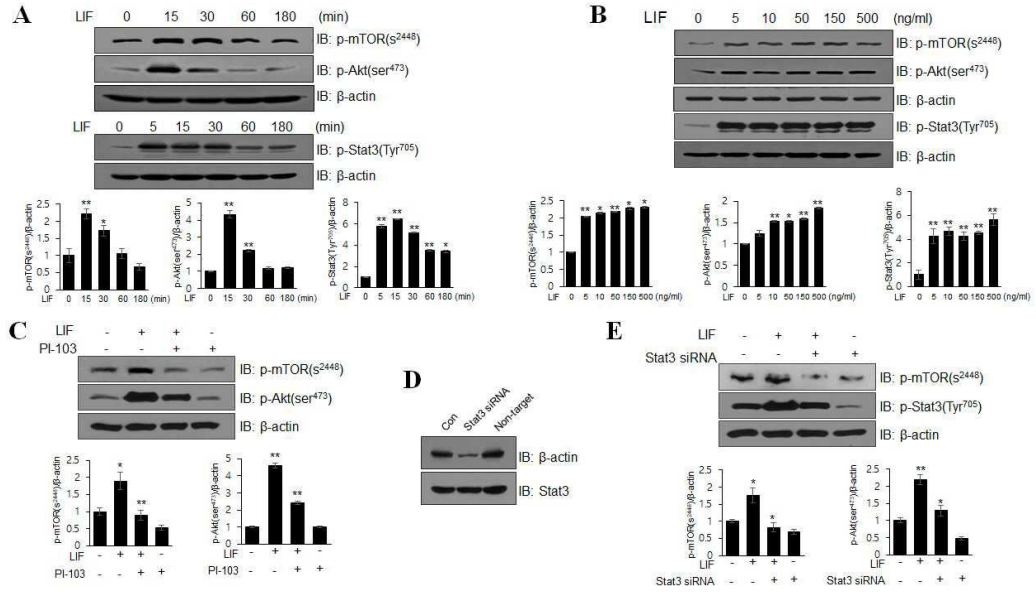
도면2


A
ISO 0 12 24 48 (hr)
IB: Col1a1
IB: MMP-9
IB: β-actin
Col1a1/β-actin
MMP-9/β-actin
B
ISO 0 1 5 20 60 100 (μM)
C
Col1a1/ gapdh
MMP-9/ gapdh
ISO 0 3 6 12 (hr)
D
ISO 0 1 5 20 60 200 (μM)
ISO 0 1 5 20 60 100 (μM)

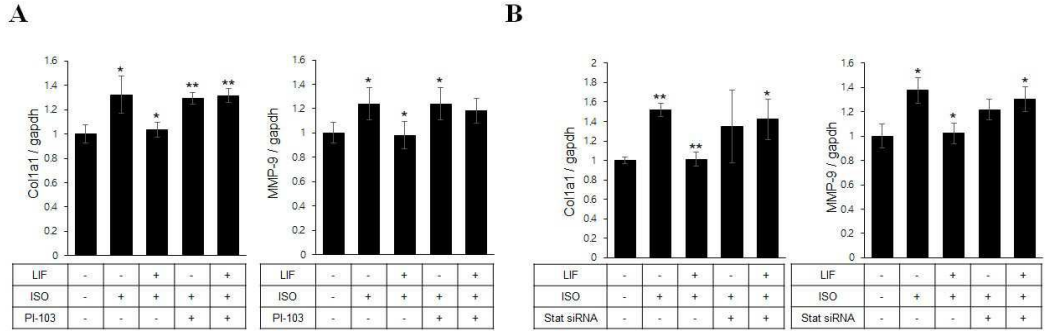
도면3


A
LIF
pacing
IB: Col1a1
IB: MMP-9
IB: β-actin
Col1a1/ β -actin
MMP-9/ β -actin
B
ISO
C
Col1a1 / gapdh
MMP-9/ gapdh
Pacing
D
E
DAPI
Col1
MMP-9
merge
F
α-SMA

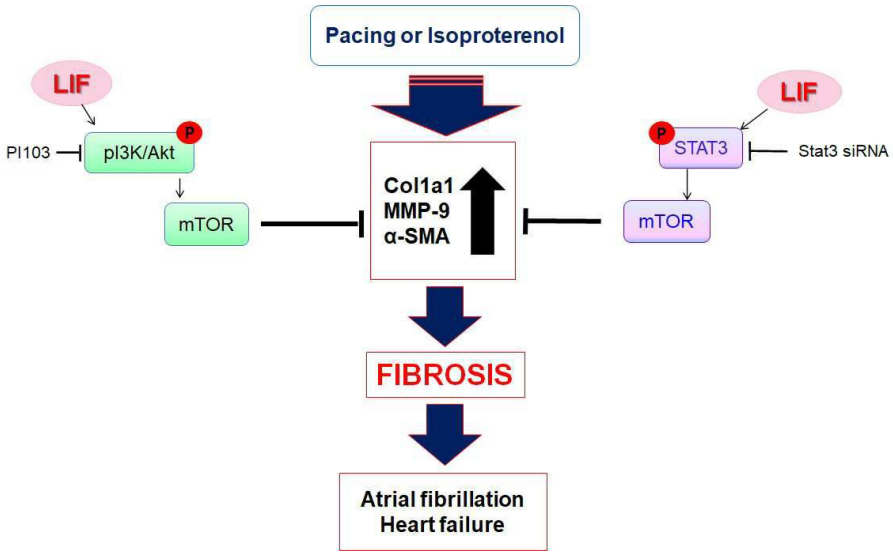
도면4


A
LIF 0 15 30 60 180 (min)
IB: p-mTOR(s2448)
IB: p-Akt(ser473)
IB: β-actin
LIF 0 5 15 30 60 180 (min)
IB: p-Stat3(Tyr705)
B
LIF 0 5 10 50 150 500 (ng/ml)
C
PI-103
D
Con
Stat3 siRNA
Non-target
IB: Stat3
E
Stat3 siRNA

도면5


A
Col1a1 / gapdh
MMP-9 / gapdh
LIF
ISO
PI-103
B
Stat siRNA

도면6


Pacing or Isoproterenol
LIF
PI103
pI3K/Akt
P
mTOR
Col1a1
MMP-9
α-SMA
LIF
P
STAT3
Stat3 siRNA
mTOR
FIBROSIS
Atrial fibrillation
Heart failure