



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0100544
(43) 공개일자 2022년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/495 (2006.01) A61P 9/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/495 (2013.01)
A61P 9/06 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0003292
(22) 출원일자 2022년01월10일
심사청구일자 2022년01월10일
(30) 우선권주장
1020210002488 2021년01월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최종일
서울특별시 성북구 고려대로 73(안암동5가, 고려대병원)
(74) 대리인
특허법인 무한

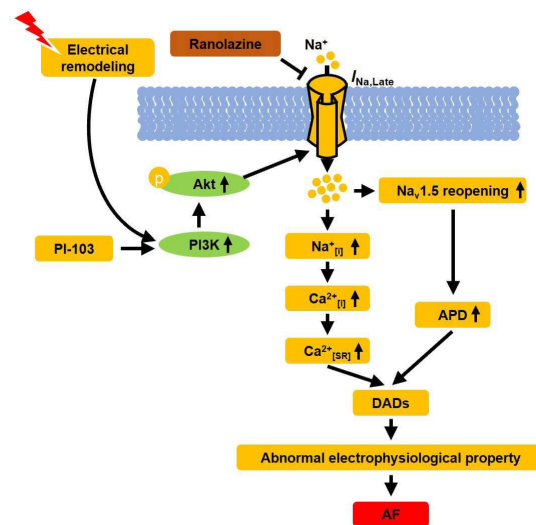
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 PI3K/Akt 매개 후기 나트륨 전류 억제를 통한 부정맥 치료용 약학 조성물 및 치료방법

(57) 요약

본 발명은 PI3K/Akt 매개 후기 나트륨 전류 억제를 통한 부정맥 치료용 약학적 조성물 및 이를 이용한 부정맥의 치료방법에 관한 발명으로써, 구체적으로는 후기 나트륨 전류의 억제가 PI3K/Akt의 상향조절과 관련성이 있음을 확인하여 완성한 후기 나트륨 전류 억제제를 통한 신호전달 경로 매개의 부정맥 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도9



명세서

청구범위

청구항 1

PI3K/Akt 신호전달을 상향조절하는 제제의 유효량을 포함하는 부정맥 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 부정맥은 심방세동, LQT3(긴 QT3 증후군), 협심증 및 심부전으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 PI3K/Akt 신호전달을 상향조절하는 제제는 후기 나트륨 전류 억제제인, 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 후기 나트륨 전류 억제제는 Nav1.5 나트륨 채널의 길항제인, 약학적 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 PI3K/Akt 신호전달을 상향조절하는 제제는 라놀라진인, 약학적 조성물.

청구항 6

인간을 제외한 포유동물인 대상체에게 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 투여하는, 부정맥의 치료방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 부정맥은 심방세동, LQT3(긴 QT3 증후군), 협심증 및 심부전에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 치료방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 PI3K/Akt 신호가 병원성 후기 나트륨 조절 및 변경에 결정적인 역할을 한다는 것을 확인하여, 이와 관련한 부정맥의 치료용 조성물 및 이를 이용한 치료방법에 관해 완성한 발명이다.

배경기술

[0003] 나트륨 이온 통로는 심근세포에서 활동전위를 형성한다. 크게 활동전위의 형성과 전파에 영향을 주는 초기 전류(fast(peak) current)와, 불활성화 되지 않은 이온 통로를 통해 나트륨 이온이 투과하면서 활동전위 안정기

(plateau)의 유지 및 연장의 역할을 하는 후기 전류(late current)로 구성되어 있다. 후기 나트륨 전류(INa,Late)는 병리학적으로 유전 질환이나 후천적 심장 질환에 의해 증가할 수 있다.

- [0004] 후기 나트륨 전류는 심근세포 및 뉴런의 초기 나트륨 전류의 지속성 구성요소이다. 후기 나트륨 전류의 증가는 이온 통로의 불활성화(inactivation gate)의 근본적인 변화 또는 이상과 연관되어 있을 수 있다.
- [0005] 심근세포에서 후기 나트륨 전류가 증가하면 심장 활동전위에서 막 전압이 높게 유지되는 구간(plateau)에서도 탈분극 전류가 발생하게 되고, 이는 활동전위의 연장(AP prolongation)으로 이어진다. 활동전위의 연장은 세포 단위에서 조기 후탈분극(Early afterdepolarization) 및 조직/장기 단위에서 토르사드 드 포인트 (TdP) 부정맥을 유발한다.
- [0006] 나트륨 이온 통로 억제제인 플레카나이드(Flecainide), 리도카인(lidocaine), 아미오다론(amiodarone) 등을 후기 나트륨 전류의 증가에 의한 심장 질환 치료제로 개발하고자 하는 시도가 있었다. 그러나 어떤 약물도 후기 나트륨 전류만 선택적으로 저해하지 못했기 때문에 대부분 실패하였다. 따라서 후기 나트륨 전류의 증가에 의한 심장 질환을 치료하기 위한 약물은 초기 전류와 후기 전류를 구별하여야 안전성 및 약효를 확보할 수 있다.
- [0007] 후기 나트륨 전류(INa,Late) 증가와 관련된 질환으로 선천적인 나트륨 통로의 돌연변이로 인한 LQT3 증후군(long QT3 syndrome), 부정맥, 협심증 등이 알려져 있다.
- [0008] 심방 세동 (AF)은 가장 빈번한 유형의 심장 부정맥이며 불규칙한 심방 반응으로 이환율과 사망률이 높아진다. 심방 세동은 비정상적인 구조적 및 전기적 리모델링에 기여하여 전기적 균질성의 조절 장애를 유발하여 결국 심부전과 같은 여러 심장 장애를 유발한다. 이온 채널 특성의 조절이 심방 세동에 대한 효과적인 치료 표적임을 시사하는 증거가 증가하고 있다. 심방 세동 치료에 이온 채널 표적 약물을 사용할 수 있지만 이러한 치료의 기본 메커니즘은 여전히 밝혀지지 않고 있다.
- [0009] 심장 나트륨 채널(Nav1.5)은 막 탈분극에 의한 활동 전위(AP) 상승을 시작하여 심장 전체에 전기 충격을 전파하는데 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 활동 전위의 0 위상 동안 최대 나트륨 전류(Nav1.5에 의해 수행된 INa Peak)는 빠르게 활성화되고, 막 탈분극을 일으켜 여기 과정을 유도한다. Nav1.5의 돌연변이는 INa 특성의 변화를 유발하고 긴 QT 증후군, 전도 결함, 확장성 심근병증 및 심방 세동을 포함한 부정맥 상태와 관련이 있다. 이러한 부정맥은 주로 "후기 나트륨 전류"(INa,Late)라고 하는 Nav1.5의 비정상적인 비활성화로 인해 발생한다. INa의 두 번째 성분인 후기 나트륨 전류는 일반적으로 생리적 조건하에서 활동 전위의 안정기 동안 느린 비활성화에 의해 유지된다. 중요한 것은 후기 나트륨 전류의 증가가 비정상적인 Nav1.5 비활성화(지연 또는 불안정화)로 인해 활동 전위 기간 (APD) 및 형태에 영향을 미칠 수 있어 심방 세동과 같은 부정맥을 유발할 수 있다.
- [0010] 후기 나트륨 전류를 조절하는 분자 메커니즘은 불분명하지만, 최근 연구에 따르면 phosphoinositide-3-kinase (PI3K) 억제제는 증강된 후기 나트륨 전류 활성화, 병리학적 심장 리모델링을 유도한다. PI3K는 세포 생존, 성장, 및 증식에 관련있다. 하류 분자(downstream molecule) 인 Akt는 Nav1.5를 포함한 심장 이온 채널의 조절에 관여한다. 이전 보고에서는 PI3K 억제로 인해 APD의 연장과 후기 나트륨 전류의 증가가 보고되었고, 이는 병리학적 심장 리모델링 및 후속 부정맥으로 이어졌다. 더욱이 PI3K p110가 결핍된 마우스 심장은 후기 나트륨 전류증가로 인해 더 긴 활동 전위 기간을 보였지만, 심방 세동 이후 불규칙한 심방 리모델링과 관련된 PI3K/Akt 신호 전달의 기본 메커니즘은 아직 명확하지 않다. 즉, HL-1 심방 근세포에서 전기 자극을 사용하여 심방 세동 조건 하에서 후기 나트륨 전류 및 PI3K/Akt 신호의 효과와 잠재적인 역할을 밝힐 수 있다.
- [0011] 이전 연구는 tsA201 세포로부터의 SCAN5A 1472del의 돌연변이에서, 활성 및 비활성의 생물 물리학적 결함과 함께 감소된 나트륨 전류 피크 및 향상된 후기 나트륨 전류에 대하여 보고하였다. 또한, Watanabe et al. 는 D1275 SCN5A 돌연변이 마우스가 불활성화 곡선에서 양의 이동으로 나트륨 전류 피크가 감소하고 후기 나트륨 전류가 향상되었지만 활성화에는 유의한 차이가 없음을 입증했다. 보다 최근에 Lebek et al.은 수면 장애 호흡 환자의 심방 근세포에서 활성화 곡선의 차이 없이 정상 상태 비활성화의 음의 이동으로 인해 나트륨 전류 피크는 감소했지만 후기 나트륨 전류는 증가했다고 보고했다. 임상 및 실험 연구에서 이전 발견이 부정맥에서 INa의 조절 장애를 보고했지만, 근본적인 메커니즘과 잠재적인 치료법은 아직 명확하지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) KR 10-2010-0133439 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명에 따르면, PI3K/Akt 신호전달을 상향조절하는 제제의 유효량을 포함하는 부정맥 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 유효용량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 부정맥의 치료방법이 제공된다.

[0014] 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

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, PI3K/Akt 신호전달을 상향조절하는 제제의 유효량을 포함하는 부정맥 치료용 약학적 조성물이 제공된다. 본 발명자들은 PI3K/Akt 신호전달이 후기 나트륨 전류와 밀접한 관련이 있음에 착안하여, PI3K의 상향조절 및 후기 나트륨 전류의 억제에 심방세동을 포함한 부정맥 관련 질환을 치료하는데 효과적임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0017] 본 명세서에서 “부정맥”은 임의의 비정상적 심박수 및 그로 인한 병리적 현상을 지칭한다. 서맥은 비정상적으로 느린 심박수를 지칭하는 반면, 빈맥은 비정상적으로 빠른 심박수를 지칭한다. 본 명세서에서, 부정맥의 치료는 심실상성 빈맥, 예컨대 심방 세동, 심방 조동, AV 결절성 회귀성 빈맥, 심방성 빈맥 및 특발성 심실성 빈맥, 심실 세동, 조기홍분 증후군 및 토르사드 드포인트(TdP)를 포함한 심실성 빈맥(VT)의 치료를 포함한다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 부정맥은 심방세동, LQT3(긴 QT3 증후군), 협심증 및 심부전으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 질환을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기한 비정상적 심박수 갖는 질환이거나, 비정상적인 후기 나트륨 전류와 관련된 질환이라면 적용될 수 있다.

[0019] 상기 PI3K/Akt 신호전달을 상향조절하는 제제는 후기 나트륨 전류 억제제일 수 있다. 상기 후기 나트륨 전류 억제제는 종래 보고를 통해 후기 나트륨 전류의 억제 효과가 있는 것으로 밝혀진 것으로 제한되지 않으나, 바람직하게는 라놀라진일 수 있다. 또한, 상기 PI3K/Akt의 상향조절은 관련된 유전자의 상향조절인자를 투여하여 이루어질 수 있다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 후기 나트륨 전류 억제제는 Nav1.5 나트륨 채널의 길항제일 수 있다.

[0021] 상기 Nav1.5는 전압의존성 나트륨 채널의 소단위를 지칭하며, 관련 돌연변이가 일어나 병리적 현상을 일으키는 것일 수 있으나, Nav1.5의 활성변화, 바람직하게는 차단을 통해 부정맥 관련 질환의 병리적 현상을 개선할 수 있는 것이라면 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 명세서에서 사용된 용어 “길항제”란 작용제(agonist)를 저해하는 물질로서, 길항제 자체만으로는 수용체 활성화에 변화를 일으키지 않으나 수용체와 상호작용하는 작용제를 저해함으로써 수용체의 활성화에 영향을 줄 수 있다. 상기 Nav1.5 나트륨 채널의 길항제는 특별한 작용제에 대한 길항제로 제한되지 아니하나, 바람직하게는 역작용제에 대한 길항제가 제외될 수 있다.

[0023] 일 측에 따르면, 상기 PI3K/Akt 신호전달을 상향조절하는 제제는 라놀라진일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 인간을 제외한 포유동물인 대상체에게 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 투여하는, 부정맥의 치료방법이 제공된다.

[0025] 일 측에 따르면, 상기 부정맥은 심방세동, LQT3(긴 QT3 증후군), 협심증 및 심부전에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0026] 일 측에 따르면, 상기 치료방법은 활동전위기간(APD)의 감소 또는 지연된 후탈분극(DAD)의 감소를 통하여 이루어질 수 있다. 연장된 활동전위기간 및 잦은 지연된 후탈분극은 부정맥의 전조 증상 내지는 대표적인 증상이며, 타키페이싱을 통해 유도된 심근세포주에서 상기 연장된 활동전위기간 및 잦은 지연된 후탈분극이 재현됨과, 후기 나트륨 전류 억제제를 투여하여 개선됨을 확인할 수 있었다.

- [0027] 본 발명의 일 구체예에 따른 상기 약제 또는 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 질내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 일 구체예에 따른 약제학적 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 투여되는 경로는 치료 대상의 일반적인 조건 및 연령, 치료 조건의 성질 및 선택되는 활성 성분에 따라 달라질 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 구체예에 따른 상기 약제 또는 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.
- [0029] 일 구체예에 따른 상기 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 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 약제학적 조성물은 좌약, 스프레이, 연고, 크림, 젤, 흡입제 또는 피부 패치의 형태로 투여될 수 있다. 또한 상기 약제학적 조성물은 포유동물 투여용, 더 바람직하게는 인간 투여용으로 제조될 수 있다.
- [0030] 약제학적으로 허용되는 담체는 고체이거나 액체일 수 있으며, 부형제, 향산화제, 완충액, 정균제, 분산제, 흡착제, 계면활성제, 결합제, 방부제, 붕해제, 감미제, 향미제, 활택제, 방출조절제, 습윤제, 안정화제, 현탁화제 및 윤활제에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 또한, 약제학적으로 허용되는 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- [0031] 일 구체예에서, 적절한 부형제(filler)로는, 당(예컨대, 텍스트로스, 수크로스, 말토스 및 락토스), 전분(예컨대, 옥수수 전분), 당-알코올(예컨대, 만니톨, 솔비톨, 말티톨, 에리스리톨 및 자일리톨), 전분 가수분해물(starch hydrolysates)(예컨대, 텍스트린 및 말토텍스트린), 셀룰로스 또는 셀룰로스 유도체(예컨대, 미세결정질 셀룰로스) 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 일 구체예에서, 적절한 결합제(binder)로는, 포비돈, 코포비돈, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 젤라틴, 검류, 수크로스, 전분 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 일 구체예에서, 적절한 방부제(preservative)로는, 벤조산, 소듐 벤조에이트, 벤질 알콜, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 클로르부톨, 갈레이트, 하이드록시벤조에이트, EDTA 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 일 구체예에서, 적절한 붕해제(disintegrant)로는, 전분 글리콜레이트 소듐염(sodium starch glycolate), 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 가교된 카르복시메틸셀룰로스, 전분, 미세결정질 셀룰로스 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 일 구체예에서, 적절한 감미제로는 수크랄로스, 사카린, 소듐 또는 포타슘 또는 칼슘 사카린, 아세실팜 포타슘 또는 소듐 시클라메이트, 만니톨, 프럭토스, 수크로스, 말토스 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 일 구체예에서, 적절한 활택제(glidant)로는 실리카, 콜로이드성 실리콘 디옥사이드, 탈크 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 일 구체예에서, 적절한 윤활제(lubricant)로는, 장쇄 지방산 및 그 염, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트 및 스테아르산, 탈크, 글리세라이드 왁스 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 본 명세서에 사용된 용어 "대상체"는 예방 또는 치료의 객체가 되는 동물, 바람직하게는 포유동물(예컨대, 영장류(primates)(예를 들어, 사람), 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 쥐, 마우스 등), 가장 바람직하게는 사람을 의미한다.
- [0039] 본 명세서에 사용된 용어 "예방하다(prevent)", "예방하는(preventing)" 및 "예방(prevention)"은 질병에 걸릴

가능성을 감소시키거나 가능성을 제거하는 것이다.

[0040] 본 명세서에 사용된 용어 "치료하다(treat)", "치료하는(treating)" 및 "치료(treatment)"는 질병 및/또는 이의 수반되는 증상을 모두 또는 일부 제거하는 것이다.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 치료방법은 PI3K/Akt가 후기 나트륨 전류와 밀접한 관련이 있음에 착안하여, PI3K의 상향조절 및 후기 나트륨 전류의 억제에 심방세동을 포함한 부정맥 관련 질환을 치료하는데 효과적임을 확인하여 완성한 것이다.

[0043] 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

[0045] 도 1은 타키페이싱 유도된 HL-1 세포의 세포생존력 및 PI3K 관련 인자의 발현을 나타낸 것이다.
 도 2는 타키페이싱된 HL-1 세포에 라놀라진을 적용하여 PI3K 관련된 인자의 발현을 확인한 것이다.
 도 3은 타키페이싱된 HL-1 세포에 라놀라진을 적용하여 지연된 후탈분극 및 활동 전위 기간을 측정하는 것이다.
 도 4는 타키페이싱된 HL-1 세포에 라놀라진을 적용하여 나트륨 전류 피크 밀도를 확인한 것이다.
 도 5는 타키페이싱된 HL-1 세포에 라놀라진을 적용하여 후기 나트륨 전류 및 Nav1.5의 발현을 측정하는 것이다.
 도 6은 타키페이싱된 HL-1 세포에 라놀라진을 적용하여 Ca²⁺ 방출 억제작용을 확인한 것이다.
 도 7은 PI3K 억제제와 PI3K 억제제+라놀라진을 각각 투여하여 PI3K 발현정도, 지연된 후탈분극 및 활동전위기간을 측정하는 것이다.
 도 8은 PI3K 억제제와 PI3K 억제제+라놀라진을 각각 투여하여 후기 나트륨 전류를 측정하는 것이다.
 도 9는 본 발명의 조성물이 작용하는 전반적인 기작을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 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.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] 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.

- [0051] 빠르게 페이스되는(rapid paced) HL-1 세포에서 비정상적인 병원성 후기 나트륨 전류 및 심방세동(atrial fibrillation, AF) 유도성을 평가했다. 병원성 후기 나트륨 전류 억제는, HL-1 세포의 빠른 페이스에 대한 반응으로, 비정상적인 Ca^{2+} 처리 및 AP(연장된 APD 및 DAD(Delayed Afterdepolarization))를 역전시켰음을 확인했다. 이 회복의 효과는 PI3K/Akt 신호의 향상과 관련이 있다. 즉, PI3K 억제는 병원성 후기 나트륨 전류의 현저한 증가 및 비정상적인 활동전위 형태에 대한 후속 기여(subsequent contributions)를 나타냈다. 이것은 후기 나트륨 전류 차단제(blocker)인 라놀라진 노출에 의해 복구 될 수 있으며, PI3K/Akt 신호가 전기적 리모델링에서, 병원성 후기 나트륨 전류조절 및 변경에 유익한 역할을 한다는 것을 시사한다. 후기 나트륨 전류의 조절에서 PI3K / Akt 경로의 잠재적 역할에 대한 새로운 통찰력을 제공하며 이러한 조절은 심방세동 및 부정맥의 치료에 중요하다.
- [0052] Nav1.5의 돌연변이는 심방세동에서 근세포(myocyte) 리모델링 관리에 중추적인 역할을 할 수 있다. 특히, INa (나트륨 전류 피크 및 후기 나트륨 전류) 진폭 및 기간의 조절 장애는, 발생 유발 활동 및 활동전위 연장에 기여하며 심한 심방세동과 관련이 있다. 나트륨 전류 피크는 활동전위의 상승 및 전파를 시작하는 역할을 하며, 이러한 기능 장애는 심방세동을 포함한 부정맥 장애에 기여한다. 나트륨 전류 피크의 감소는 브루가다 증후군(Brugada syndrome), 긴 QT 증후군(long QT syndrome) 및 심방세동을 포함하는 부정맥성 장애(arrhythmic disorders)에서 관찰되었다. 효과는 생물 물리학적 특성(비활성화 또는 재활성화)을 변경하여 후기 나트륨 전류를 추가로 증가시킨다. 특히 후기 나트륨 전류의 증가는 세포 내 Na^{+} 상승에 기여하여 비정상적인 Ca^{2+} 과도 동역학에 의해 세포 내 Ca^{2+} 과부하를 유발하고, 증가된 SR(sarcoplasmic reticulum, 근소포체) Ca^{2+} , 궁극적으로 지연된 후탈분극 및 심각한 심방세동을 유도한다. 따라서, INa 기능의 결합된 증가 및 상실은 부정맥 활동에 기여한다.
- [0053] 이전 연구는 tsA201 세포로부터의 SCAN5A 1472del의 돌연변이에서, 활성 및 비활성의 생물 물리학적 결합과 함께 감소된 나트륨 전류 피크 및 향상된 후기 나트륨 전류에 대하여 보고하였다. 또한, Watanabe et al.는 D1275 SCN5A 돌연변이 마우스가 불활성화 곡선에서 양의 이동으로 나트륨 전류 피크가 감소하고 후기 나트륨 전류가 향상되었지만 활성화에는 유의한 차이가 없음을 입증했다. 보다 최근에 Lebek et al.은 수면 장애 호흡 환자의 심방 근세포에서 활성화 곡선의 차이 없이 정상 상태 비활성화의 음의 이동으로 인해 나트륨 전류 피크는 감소했지만 후기 나트륨 전류는 증가했다고 보고했다. 임상 및 실험 연구에서 이전 발견이 부정맥에서 INa의 조절 장애를 보고했지만, 근본적인 메커니즘과 이에 따른 치료 및 치료용 조성물의 사용은 아직 명확하지 않다. 빠르게 페이스되는 HL-1 세포에서 발생하는 심방세동에서 INa 조절의 병리학적 역할과 후기 나트륨 전류 억제에 의한 INa의 영향을 명확히 하기 위해, 빠르게 페이스되는 HL-1 세포에서 나트륨 전류 피크 및 후기 나트륨 전류 진폭을 모두 조사했다. 감소된 나트륨 전류 피크와 증가된 후기 나트륨 전류를 관찰하였으며, HL-1 세포의 비-페이스에 비해 빠른 페이스에서 탈분극된 오른쪽으로 이동하여 활성화 및 비활성화의 동역학을 감소시켰다. 중요한 것은 병리학적 리모델링의 이러한 결과가 모두 라놀라진에의 노출을 추가함으로써 후기 나트륨 전류 억제에 의해 크게 반전되었다. 또한, 라놀라진은 빠르게 페이스되는 HL-1 세포에서 불규칙한 Ca^{2+} 처리 및 활동 전위 형태를 추가로 회복시켰다. 이러한 결과는 후기 나트륨 전류가 INa 기능의 효율적인 변조기로서의 전기적 리모델링의 변화를 확인하여 부정맥 효과를 예방하는데 기여한다.
- [0054] 중요한 것은 후기 나트륨 전류의 지속적인 증가는 세포 내 Na^{+} 의 상승에 기여하여 주로 $Na^{+}-Ca^{2+}$ 교환기(NCX)의 역모드로 인해 발생하는 세포 내 Ca^{2+} 축적(비정상적인 Ca^{2+} 과도 동역학 및 SR Ca^{2+} 로딩 증가)을 유도한다. 병원성 후기 나트륨 전류를 향상시키는 것이 Ca^{2+} 조절 장애 및 활동 전위 기간의 연장 및 지연된 후탈분극의 발생에 더 기여한다는 것을 입증했지만 이러한 해로운 효과는 후기 나트륨 전류 억제에 의해 없어짐을 확인하였다. 후기 나트륨 전류 향상으로 인한 과도한 세포 내 Na^{+} 과부하는 PI3K 신호 전달 감소의 결과 일 수 있으며, 이는 더 나아가 세포 내 Ca^{2+} 과부하로 이어질 수 있다. PI3K 매개 후기 나트륨 전류 조절은 적어도 부분적으로는 기본 Ca^{2+} 수준과 불규칙한 Ca^{2+} 방출을 변갈아 가며 보여준다.
- [0055] PI3K/Akt 신호의 감소 또는 억제는 비정상적인 심장재 형성의 해로운 영향을 미치므로 부정맥에 대한 감수성을 향상시킨다. 또한 PI3K 신호의 손실은 이온 채널 활동의 조절 장애로 인해 전기적 리모델링을 유도한다. PI3K는 다운스트림 분자인 Akt를 조절한다. 세포 생존, 성장 및 증식은 병원성 후기 나트륨 전류의 조절에 기여한다. 따라서 PI3K/Akt 신호 전달의 조절은 병원성 후기 나트륨 전류를 조절하고 심방세동 및 부정맥 치료에 효과적이다.
- [0056] 빠른 페이스가 PI3K/Akt 신호 전달을 감소시키고 후기 나트륨 전류를 증가시켰다. 이러한 관찰은 심방세동 환자의 인간 심방 조직에서 PI3K 활성이 감소되었음을 보여주는 Pretorius et al.의 임상 연구와 일치한다. PI3K 신호의 이러한 손실은 활성화 및 비활성화의 동역학 감소로 인해 후기 나트륨 전류를 크게 향상시켰으며, 이는

연장된 활동 전위 기간, 지연된 후탈분극 및 심방세동 관련에 추가로 기여한다. PI3K의 억제제는 후기 나트륨 전류의 기능 장애 및 후속 부정맥의 결과와 관련이 있다. PI-103 또는 닐로티닙에 의한 2 시간 동안의 PI3K 억제는, 개과 심실 근세포(canine ventricular myocytes)에서 후기 나트륨 전류의 증가를 초래했다. 또한 Yang et al.11은 PI3K α 특이적 서브 유닛의 억제가 후기 나트륨 전류의 증가를 유발하고 활동 전위 기간을 연장하고 활성을 유발하는 데 기여함을 입증했다. PI3K 억제제가 PI3K 110a 및 인산화된 Akt의 상향 조절과 함께 비정상적인 활동 전위 기간 및 지연된 후탈분극의 증가로 이어진다는 것을 보여준다. 이것은 PI3K/Akt 신호 전달의 감소가 후기 나트륨 전류 및 INa 개방 확률의 조절 장애의 향상에 기여하며, 이는 심방세동 조건 하에서 세포 내 Na⁺의 축적을 추가로 초래할 수 있음을 시사한다. 따라서, 본 발명의 연구 결과는 병원성 후기 나트륨 전류 조절에서 PI3K/Akt 신호 전달 경로의 잠재적 역할을 강조한다.

[0058]

본 실시예에서의 실험조건은 하기와 같다.

[0059]

- 라놀라진, PI-103의 적용

[0060]

라놀라진(Abcam, CAS #. 142387-99-3)을 디메틸 설펜사이드(DMSO, Biosesang)에 용해시키고 페이싱이 종료되기 전에 2시간 동안 50 μ M의 최종 농도로 세포에 적용하였다. PI3K 저해제인 PI-103을 DMSO(Biosesang)에 녹이고 최종 농도 100 nM으로 라놀라진의 부재 또는 존재하에서 2시간 동안 세포에 적용하였다. 배양 배지에서 DMSO의 최대 농도는 0.2%였다.

[0061]

- 세포 생존력 분석

[0062]

세포 생존력은 트립판 블루 배제에 의해 분석되었다. 세포를 트립신 처리하고 배양 배지에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 동일한 부피의 0.4% 트립판 블루 용액(Gendepot)과 혼합하고 1분 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존율은 광학 현미경(Olympus)에서 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 세어 C-Chip 혈구계(Incyto)를 사용하여 결정되었다.

[0063]

- 활동전위 및 나트륨 전류의 측정

[0064]

AP 및 Na⁺ 전류(INa)는 현미경의 기록 챔버에 배치된 HL-1 세포에서 기록되었으며 Axopatch 200B 증폭기(Axon Instrument)는 실온(23 $\pm$ 1° C)에서 전압 및 전류 클램핑에 사용되었다. HL-1 세포를 도립현미경에 장착된 챔버에 넣었다. 유리 미세전극을 당겨서 기가실(gigaseal)이 형성되고 패치가 파열된 후 피펫 용액을 채웠을 때 3-5M Ω 의 팁 저항을 생성하였다. 모든 기록은 세포가 허용되도록 전체 세포 구성을 만든 후 5분에 수행되었다. P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller(Sutter Instrument Company)를 사용하여 얇은 벽의 붕규산 모세관(Clark Electromedical Instruments)에서 패치 피펫을 뽑았다. 전압 및 전류 신호는 10kHz에서 4극 Bessel 유형 저역 통과 필터를 사용하여 필터링되고 25kHz의 속도로 샘플링되었다. 셀 커패시턴스(pF)와 액세스 저항(M Ω)이 자동으로 계산되어 커패시턴스 전류를 보상하고 이온 전류(pA/pF)를 정규화하는 데 사용되었다. 데이터 수집 및 분석은 디지타이저(DigiData 1550B) 및 분석 소프트웨어 pClamp 10.7(Molecular Devices)을 사용하여 수행되었다. TTX(10 μ M)는 전압 개폐형 Na⁺ 채널을 차단하는 데 사용되었다.

[0065]

HL-1 근세포는 도립 현미경에 장착된 챔버에 배치되었고 활동 전위 측정은 전체 세포 구성으로 이루어졌다. KCl 140, EGTA 5, 포도당 5, HEPES 5, Mg-ATP 5 및 MgCl₂ 1(KOH로 pH 7.2 조정)을 포함하는 K⁺가 풍부한 피펫 충전 용액을 사용했다. 세포는 (mM단위) NaCl 143, KCl 5.4, HEPES 5, NaH₂PO₄ 0.33, MgCl₂ 0.5, CaCl₂ 1.8, 및 포도당 10(NaOH로 조정된 pH 7.4)을 함유하는 Normal Tyrode(NT) 용액으로 연속적으로 슈퍼퓨징되었다. 간단히 말해서, 세포는 2ms 동안 0.7nA 전류 펄스에 의해 자극되었고 펄스 열은 0.5Hz에서 유도되었다. 지연된 후탈분극(DAD)은 10개의 연속 활동 전위에서 두 번 이상 계산하고 20초로 나누어 평균을 냈다. AP 진폭(APA), 최대 상향 스트로크 속도(dv/dt_{max}), 휴지기 막 전위(RMP), 50% 및 90%에서 활동 전위 기간의 재분극(APD₅₀ 및 APD₉₀)은 소프트웨어 pClamp 10.7(Molecular Devices)을 사용하여 10개의 연속 활동 전위에서 분석되었다.

[0066]

피크 및 후기 INa(나트륨 전류 피크 및 후기 나트륨 전류) 기록을 위해 세포를 NT 용액에서 배양하고 전체 세포 구성 후 TEA 용액으로 전환했다. TEA 용액은 다음을 포함한다(mM 단위): NaCl 120, TEA-Cl 20, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 10 및 포도당 10(NaOH로 조정된 pH 7.4). 피펫은 NaCl 10, CsCl 50, CsF 30, L-아스파르트산 50, EGTA 5 및 HEPES 1(CsOH로 조정된 pH 7.3)을 포함하는 피펫 용액으로 채웠다(mM 단위). 나트륨 전류 피크는 -100~+60mV 범위의 전위로 5mV 증분으로 50ms 전압 단계에 의해 유발되었으며 유지 전위는 -140mV였다. 후기 나트륨 전류는 -120mV ~ -10mV 범위의 전위까지 10mV씩 증가하는 200ms 전압 단계에 의해 유도되고 50-150ms 사이의 평균으로 결정되고 TTX의 존재와 부재 사이를 빼서 피크 전류로 정규화되었다(10 μ M). INa의 전

압 의존적 활성화는 피크 컨덕턴스(G)를 측정함으로써 평가되었으며, 이는 $G = I_{Na}(V - V_{rev})$ 에서 계산되었으며, 여기서 I_{Na} 는 각 전압 단계(V)에 대한 전류이고 V_{rev} 는 반전 전위이다. 데이터는 최대 피크 컨덕턴스(G_{max})에 의해 정규화되었고 볼츠만 함수: $G/G_{max} = 1/[1 + \exp((V - V_{1/2})/k)]$ 에 맞춰졌다. 여기서 $V_{1/2}$ 는 절반이 되는 전압이다. Nav1.5 채널이 활성화되고 k 는 기울기 계수이다. 정상 상태 비활성화 곡선의 전압 의존성은 120mV의 고정 전위에서 표준 2-펄스 프로토콜에 의해 측정되었으며, 세포는 500msec(사전 펄스) 동안 -140~+20mV 범위에서 유지된 다음 -40 mV 테스트 펄스 ~ 20msec에 적용되었다. 전류(I)는 최대 $I(I_{max})$ 로 정규화되었고 곡선은 다음 형식의 볼츠만 함수에 의해 피팅되었다. $I/I_{max} = 1/[1 + \exp((V - V_{1/2})/k)]$, 여기서 $V_{1/2}$ 는 Nav1.5의 절반이 비활성화되는 전압이고 k 는 기울기 계수이다.

[0067] - 공초점 Ca²⁺ 이미징

[0068] 세포 내 Ca²⁺ 신호를 측정하기 위해 HL-1 근육세포에 30분 동안 3mM fluo-4 AM을 로딩했다. 세포는 36.5°C에서 137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 10 포도당(pH 7.4)으로 구성된 정상 Tyrode 용액을 함유하는 1.8 mM Ca²⁺로 연속적으로 슈퍼퓨즈되었다. > 80% 컨플루언스(confluence)에서 성장한 HL-1 세포는 일반적으로 전기 자극이 없을 때 Ca²⁺ 트랜지언트가 규칙적으로 발생하는 것으로 나타났다. Ca²⁺ 형광은 x60 오일 침지 대물 렌즈(Plan Apo, Numerical Aperture 1.4, Nikon)가 장착된 도립 현미경(Eclipse Ti, Nikon)에 부착된 레이저 스캐닝 공초점 이미징 시스템(A1, Nikon)을 사용하여 2차원에서 60 또는 120Hz에서 이미지화되었다. 염료는 Ar 레이저(Ommichrome)를 사용하여 488 nm에서 여기되었고, > 510 nm에서 형광 방출이 감지되었다. 워크스테이션 소프트웨어 NIS Elements AR(v3.2, Nikon)을 사용하여 이미지를 기록하고 분석했다. Ca²⁺ 증가를 추정하기 위해 Ca²⁺ 상향 스트로크 직전의 여러 프레임에서 평균 휴지 형광 강도(F_0)를 계산했다. 국소 Ca²⁺ 신호의 추적은 $F_0(F/F_0)$ 에 대해 정규화된 각 관심 영역(ROI)의 평균 형광으로 표시되었다. 정상 HL-1 세포에서 측정한 평균 F_0 는 빠르게 진행되는 세포에서 Ca²⁺ 흔적을 얻기 위해 F/F_0 를 계산하는 데 사용되었다.

[0069] - 면역형광

[0070] 젤라틴/피브로넥틴이 코팅된 커버슬립에서 성장한 세포를 PBS로 2회 세척하고 4% 파라포름알데히드(PFA, Biosesang)로 20분 동안 고정했다. 고정된 세포를 1% 소 혈청 알부민(BSA, Gendepot)을 함유하는 PBS로 1시간 동안 차단하였다. 세포내 단백질의 경우, 0.1% Triton X-100을 차단 완충액에 첨가하고 커버슬립을 1차 항체(Cell Signaling의 인산화된 Akt, PI3K p110a(1:100, Abcam) 및 인산화된 Akt(1:100, Cell Signaling)의 혼합)와 함께 배양했다. 항체 데이터시트에서 권장하는 역가를 사용하여 각 차단 완충액에서 Coverslip을 1X PBS 완충액으로 2회 세척하고 Alexa Fluor 488(Abcam)로 표지된 1차 항체와 함께 배양했다. Coverslips는 PBS로 2회 세척하고 디아미디노-2-페닐린돌(diamidino-2-phenylindole(DAPI), Abcam), 슬라이드 글라스에 장착되었다. 슬라이드의 시각화는 형광현미경(Olympus)으로 수행하였으며, 총 형광 강도는 ImageJ로 측정 및 분석하였다.

[0071] - 면역블로팅

[0072] 세포를 1X 인산완충식염수(PBS)로 2회 세척하고 프로테아제 억제제(GenDepot) 및 포스파타제 억제제 콕테일(GenDepot)을 함유하는 Nonidet P-40(NP-40) 완충액(GenDepot)에서 용해시켰다. 용해물을 초음파 처리하고 간헐적인 볼텍싱과 함께 얼음 위에서 5-15분 동안 인큐베이션한 다음, 용해물을 4°C에서 25분 동안 14,000rpm으로 원심분리했다. 상층액을 깨끗한 마이크로튜브에 수집했다. 총 단백질은 Bradford protein assay로 정량한 후, 단백질을 아크릴아미드 겔 전기영동으로 크기를 분리하여 니트로셀룰로오스 멤브레인(Atto)으로 옮겼다. 막을 TBS-T(Biosesang) 중 5% 탈지유(Biosesang)로 1시간 동안 차단하고 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션했다. 1차 항체는 다음과 같다: Nav1.5(1:200, Alomone), 항-PI3K p110a(1:1000, Abcam), 인산화된 Akt(1:1000, Cell Signaling), Akt(1:1000, Abcam) 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH) 항체(1:5000, Enogene). 강화 화학 발광(ECL) 용액(Thermo)으로 오점을 검출하기 위해 거자무과산화효소(HRP)-접합 1차 항체(Enzo)를 사용했다. 블롯의 검출 및 분석은 Chemidoc(Bio-Rad) 및 Image Studio™ 분석 소프트웨어(LI-COR Biosciences)로 수행되었다.

[0073] - 통계 분석

[0074] 모든 실험 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되었다. 그룹 비교를 위해 Prism 8(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 사용한 Tukey의 다중 비교 테스트와 함께 일원 분산 분석으로 통계적 차이를 평가했다. P -값 < 0.05는 그룹 간의 유의한 차이를 나타내는 것으로 간주되었다.

[0076] 실시예 1. 병원성 심근세포의 구현

[0077] HL-1 심방 근세포 세포주(Merck Millipore)는 마우스 심방 암종 세포주인 AT-1에서 파생된다. 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS, Merck), 10 μ M 노르에피네프린(Sigma), 2mM L-글루타민(Sigma) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gendepot)을 함유하는 보충된 Claycomb 배지(Sigma)와 함께 젤라틴-피브로넥틴 코팅된 배양 접시, 37° C, 5% CO₂ 환경에서 배양되었다. 타키페이싱을 위해 HL-1 심방 근세포는 37° C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 1.5V/cm, 4ms, 10Hz로 빠른 전기적 페이스를 수행하였다. 6시간 동안 페이스가 없는 세포를 대조군으로 설정하였다. 세포가 80 ~ 100 %에 도달하면, 배지를 2mM L-글루타민과 1 % 페니실린/스트렙토 마이신이 함유된 Claycomb 배지로 구성된 스타베이션 배지(starvation medium)로 변경하여 밤새 혈청 효과를 제거했다(<24 시간). 그 후, 세포를 실온 1 X PBS 완충액으로 세척하고 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 1.5 V/cm, 4msec, 10Hz로 급속 전기 페이스를 적용했다. 6 시간 동안 페이스가 없는 세포를 기준 대조군으로 사용했다.

[0079] 실시예 2. 후기 나트륨 전류 억제제의 PI3K/Akt 신호 전달 향상 효과 확인

[0080] 빠른 전기적 페이스(Rapid Electrical pacing)은 많은 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 연구에서 AF 모델을 구성하는 데 사용되는 잘 알려진 방법이다. 본 실시예에서는 HL-1 근세포에 시간 의존적 방식으로 빠른 전기 자극을 주어 세포성 AF 모델을 구성하였다. 도 1a에 나타난 바와 같이, 6시간 타키페이싱이 유의하게 낮은 세포 생존력을 보여주었다. 또한, 6시간 타키페이싱은 0시간 타키페이싱에 비해 PI3K p110 α 및 pAkt 발현의 낮은 발현을 나타내어(도 1b-d), 타키페이싱 유도 근세포 리모델링을 유도하였다.

[0081] 감소된 PI3K/Akt 신호전달이 후기 나트륨 전류 억제에 의해 역전될 수 있는지 여부를 평가하기 위해 타키페이싱이 종료되기 전 2시간 동안 후기 나트륨 전류 차단제인 라놀라진(50 μ M)을 적용하였다. 도 2a 내지 도 2c에 나타나듯이, 타키페이싱이 PI3K p110 α 및 pAkt 발현의 감소를 나타내고 후기 나트륨 전류 억제에 의해 유의하게 회복됨을 확인하였다. 또한, 타키페이싱은 PI3K p110 α 및 pAkt의 형광이 낮은 반면, 후기 나트륨 전류의 억제는 타키페이싱으로 유도된 HL-1 근세포보다 유의하게 더 높았으며, 이를 도 2d 및 도 2e에 나타내었다. 이러한 결과는 타키페이싱으로 유도된 HL-1 근세포에서 PI3K/Akt 신호전달의 상향 조절을 통한 후기 나트륨 전류 억제 효과의 효과를 보여준다.

[0083] 실시예3. 후기 나트륨 전류의 억제의 타키페이싱 유도된 근세포에서 비정상적 근세포 흥분성 회복 효과

[0084] 후기 나트륨 전류의 강화는 APD의 연장에 영향을 미치고 심각한 부정맥 장애로 이어질 수 있는 유발된 활성화(조기 후탈분극 및 지연된 후탈분극)를 유도한다. 심방 흥분성에 대한 후기 나트륨 전류 억제제의 영향을 확인하기 위해 패치 클램프 기술을 사용하여 활동 전위 기록을 수행하였다. 도 3a 및 도 3b에 나타나듯이, 타키페이싱은 지연된 후탈분극(DAD)의 심각한 발생을 나타내었고 후기 나트륨 전류의 억제에 의해 지연된 후탈분극 유발 부정맥 발생을 현저히 감소시켰다. 또한, 타키페이싱은 페이스되지 않은 HL-1 근세포와 비교하여 50% 및 90%에서 활동 전위 기간의 유의한 연장을 나타내었지만 후기 나트륨 전류의 억제에 의해 현저하게 감소되었고, 이를 도 3c 및 도 3d에 나타내었다. 이 실시예는 타키페이싱에 의해 유도된 HL-1 근세포의 심방 흥분성에서 후기 나트륨 전류의 주요 역할을 뒷받침한다.

[0086] 실시예 4. 후기 나트륨 전류 억제제의 비정상적 INa 특성억제 효과 확인

[0087] 후기 나트륨 전류의 억제가 INa 속성에 미치는 영향을 조사하기 위해 먼저 패치 클램프 기술을 사용하여 나트륨 전류 피크를 기록하였다. 도 4a에서 볼 수 있듯이, 나트륨 전류 피크의 전체 세포 측정을 통해 타키페이싱된 세포가 페이스되지 않은 HL-1 근세포에 비해 나트륨 전류 피크 밀도가 감소됨을 확인하였다(도 4b, 4c). 후기 나트륨 전류의 억제는 또한 페이스되지 않은 HL-1 근세포보다 나트륨 전류 피크 밀도가 감소하였지만, 후기 나트륨 전류 억제제와 타키페이싱에 의해 유도된 HL-1 근세포 사이에는 차이가 없었다(도 4b, c). 그러나 타키페이싱된 세포의 실험결과는, 페이스되지 않은 HL-1 근세포에 비해 INa 활성화의 양성 이동을 보였고, 후기 나트륨 전류 억제제에 의해 유의하게 회복되었는데(도 4d, e), 이는 전도 장애의 방지 때문인 것으로 보인다.

[0088] 후기 나트륨 전류의 조절은 심방세동의 관리에 중요하지만 후기 나트륨 전류는 나트륨 전류 피크의 약 1%까지 관찰된다. 병적 심방 리모델링에 대한 후기 나트륨 전류의 영향을 시험하기 위해 다음으로 후기 나트륨 전류를 기록하였다. 직접 기록은 비페이스 HL-1 근세포보다 타키페이싱 된 세포에서 유의하게 더 높은 후기 나트륨 전

류를 나타냈고, 후기 나트륨 전류 억제제는 그 증가를 현저하게 감소시켰다(도 5a, b). 타키페이싱 세포는 후기 나트륨 전류 억제에 의해 현저하게 회복된 INa 불활성화의 더 양적인 이동을 나타내었고(도 5c, d), 이는 후기 나트륨 전류 억제제가 Nav1.5의 특성의 비정상적 동역학을 효과적으로 회복했음을 보여준다. Nav1.5 발현도 확인했지만 그룹 간에 유의미한 차이는 없었다(도 5 e, f). 상기 실시예로 INa 개방 확률에서 후기 나트륨 전류 억제제의 잠재적 역할을 확인할 수 있다.

[0090] 실시예 5. 후기 나트륨 전류 억제제의 타키페이싱 유발 칼슘이온 방출 억제 효과 확인

[0091] 후기 나트륨 전류는 세포내 Na⁺를 증가시키고 Ca²⁺ 유입을 증가시켜 궁극적으로 Ca²⁺ 과부하 및 전기적 이상을 유발할 수 있다. 따라서, 다음으로 후기 나트륨 전류의 증가가 타키페이싱-유도된 HL-1 근세포에서 Ca²⁺ 처리에 영향을 미치는지 여부를 실험하였다. 도 6a i 및 b i (좌측)는 정상 조건에서 HL-1 근세포에서 측정된 Ca²⁺ 트레이스(trace)를 보여준다. 이들 근세포는 >80%의 합류점에서 규칙적인 자율박동성 Ca²⁺ 트랜지언트(transient)를 보였다. SR(sarcoplasmic reticulum) Ca²⁺ 로딩 상태를 추정하기 위해 주기적인 Ca²⁺ 방출을 측정된 후 동일한 세포에 카페인(10mM)을 적용했다. 6시간 간격의 HL-1 근세포에서 다양한 크기의 불규칙한 Ca²⁺ 방출과 더 높은 기저 Ca²⁺ 수준을 확인할 수 있었다(도 6bii, c). 또한 대조군에 비해 Ca²⁺ 스파이크가 더 많이 발생함도 확인할 수 있었다. 타키페이싱이 있는 HL-1 근세포에서 Ca²⁺ 트랜지언트의 평균 크기는 대조군 조건에서 HL-1 근세포의 60% 수준으로(도 6c) 유의하게 작았다. 그러나, 타키페이싱에 의해 유도된 HL-1 근세포에서 더 크고 더 연장된 Ca²⁺ 방출이 존재하였다. 규칙적인 Ca²⁺ 피크의 수에 대한 부정맥 Ca²⁺ 스파이크의 백분율은 10초 동안 기록된 Ca²⁺ 트레이스로부터 추정되었다. 불규칙한 Ca²⁺ 트랜지언트의 비율이 타키페이싱에 의해 유도된 HL-1 근세포에서 극적으로 증가한다는 것을 확인할 수 있었다(도 6bii, c). 특히, 카페인 유발 Ca²⁺ 방출의 진폭은 6시간 타키페이싱 후 약 2배 증가했으며(도 6bii 및 c), 이는 SR Ca²⁺ 부하의 증가가 타키페이싱으로 인한 것임을 보여준다.

[0092] 후기 나트륨 전류를 억제하는 라놀라진(50 mM)이 타키페이싱으로 유도된 HL-1 근세포에서 비정상적인 부정맥 Ca²⁺ 신호에 미치는 영향을 조사하였다. 6시간의 타키페이싱 기간 중 마지막 2시간 동안 라놀라진을 외부 용액에 첨가했다. 라놀라진으로 처리된 대부분의 세포는 규칙적인 Ca²⁺ 트랜지언트를 보였다(도 6biii, c). 또한, 이들 세포에서 기저 Ca²⁺ 수준은 대조군 수준으로 완전히 역전되었다. 그럼에도 불구하고, SR Ca²⁺ 로딩은 약간 감소했지만(도 6biii, c), Ca²⁺ 트랜지언트의 크기, SR Ca²⁺ 로딩 및 Ca²⁺ 스파이크 속도는 라놀라진 적용 후 대조군 수준보다 높게 유지되었다. 이러한 결과는 후기 나트륨 전류가 심방세동을 모방한 장기간의 고주파 전기 여기에서 심방 근세포의 기저 Ca²⁺ 증가와 박동 리듬의 붕괴에 중요한 역할을 할 수 있음을 보여준다. 이러한 데이터는 또한 후기 나트륨 전류 억제제(Na⁺ 유입 매개) Ca²⁺ 증가의 억제를 통해 타키페이싱에 의해 유발된 비정상적인 Ca²⁺ 과도 현상을 역전시킬 수 있음을 보여준다.

[0094] 실시예 6. 후기 나트륨 전류 억제에 의해 PI3K 억제에 의한 근세포 흥분성 조절장애의 역전 확인

[0095] PI3K 억제제가 심방 흥분성을 손상시키고 병원성 후기 나트륨 전류에 추가로 기여하는지 여부를 결정하기 위해 PI3K 억제제로 PI-103(100nM)만 처리한 HL-1 근세포에서 AP를 측정하거나 PI-103을 2시간 동안 라놀라진(50 μM)을 투여하여 대조군(CTRL), PI-103 처리(PI), PI-103과 라놀라진의 동시 적용(PI + Ran)의 세 그룹으로 나누었다. PI3K 억제 후, 도 7a와 같이 면역 블롯 분석에서 CTRL 그룹과 비교하여 PI3K p110a 및 pAkt가 유의하게 감소했으며 후기 나트륨 전류 억제제인 라놀라진을 함께 투여하는 경우 대조군 수준으로 완전히 역전되어서, 후기 나트륨 전류 억제제의 PI3K/Akt 신호 전달의 상향 조절을 입증하였다(도 7b, c).

[0096] PI3K 억제에 대한 심방 흥분성의 영향을 조사하기 위해 패치 클램프 기술을 사용하여 AP를 기록하였다. 도 7d에 도시된 바와 같이, PI3K 억제는 지연된 후탈분극의 심각한 발생을 나타내었고, 이는 후기 나트륨 전류의 억제에 의해 유의하게 사라졌다(도 7e). 또한, PI3K 억제는 대조군 HL-1 근세포와 비교하여 연장된 APD50 및 APD90을 나타내었고(도 7f, g), PI3K 억제에 의해 심방 흥분성에 악영향을 줄 수 있음을 보여준다. 대조적으로, 후기 나트륨 전류 억제제는 PI-103에 의해 유도된 HL-1 근세포와 비교하여 APD50 및 APD90에서 유의한 감소를 나타내었다(도 7f, g). 이러한 결과는 후기 나트륨 전류에 의해 조절되는 근세포 흥분성에서 PI3K/Akt 신호전달의 중추적 역할을 뒷받침한다.

[0098] 실시예 7. PI3K/Akt의 후기 나트륨 전류 조절

[0099] 상기 실시예들에 따르면, PI3K/Akt 신호가 후기 나트륨 전류 조절에 항부정맥 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 따라서 PI3K/Akt 신호전달이 병원성 후기 나트륨 전류를 조절하는 것으로 확인된다. 후기 나트륨 전류 조절에서 PI3K/Akt 신호 전달의 직접적인 효과를 확인하기 위해 후기 나트륨 전류를 직접 기록하였다. PI3K 억제제는 대조군 HL-1 근세포와 비교하여 후기 나트륨 전류를 유의하게 증가시켰고 라놀라진에 의해 회복되었다(도 8a, b). Nav1.5 발현의 면역 블롯을 수행했지만 그룹 간에 유의한 차이가 없었다(도 8c, d).

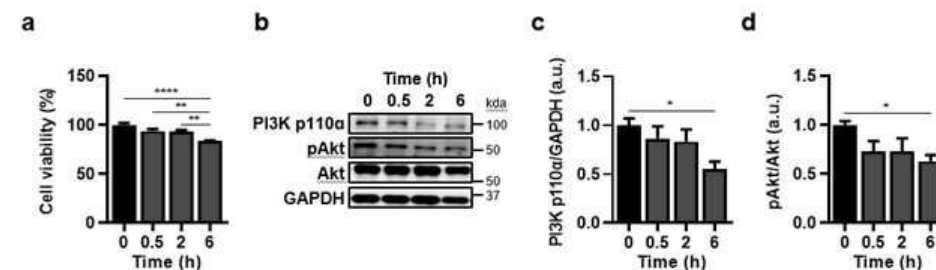
[0101] 종합하면, 상기 실시예들은 병원성 후기 나트륨 전류 조절에 대한 PI3K/Akt 신호 전달의 항부정맥 효과를 뒷받침하여 심방세동에서의 전기 생리학적 기능 장애 및 부정맥 효과를 예방할 수 있음을 보여준다. 상기 실시예 2 내지 7과 같은 효과들은 상기 실시예의 세포실험에서 뿐 아니라 동물실험에서도 동일하게 검증되었다.

[0103] 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 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

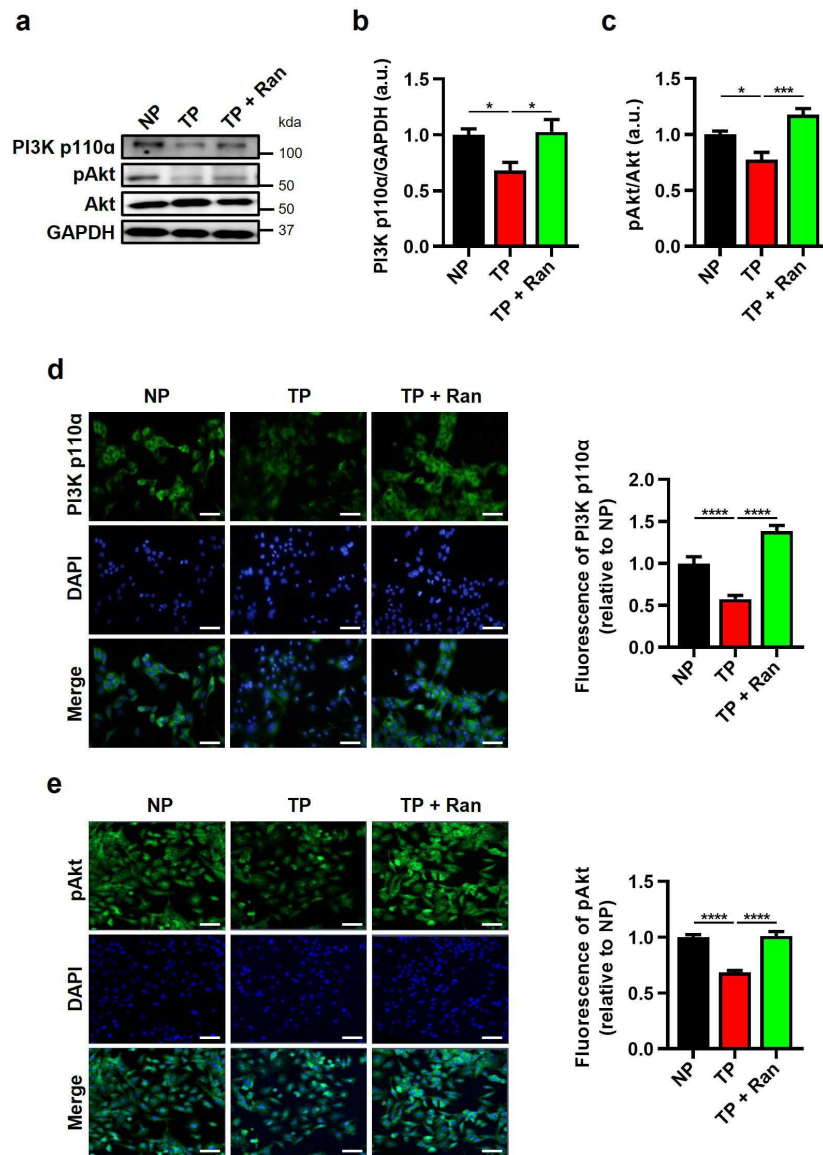
[0104] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

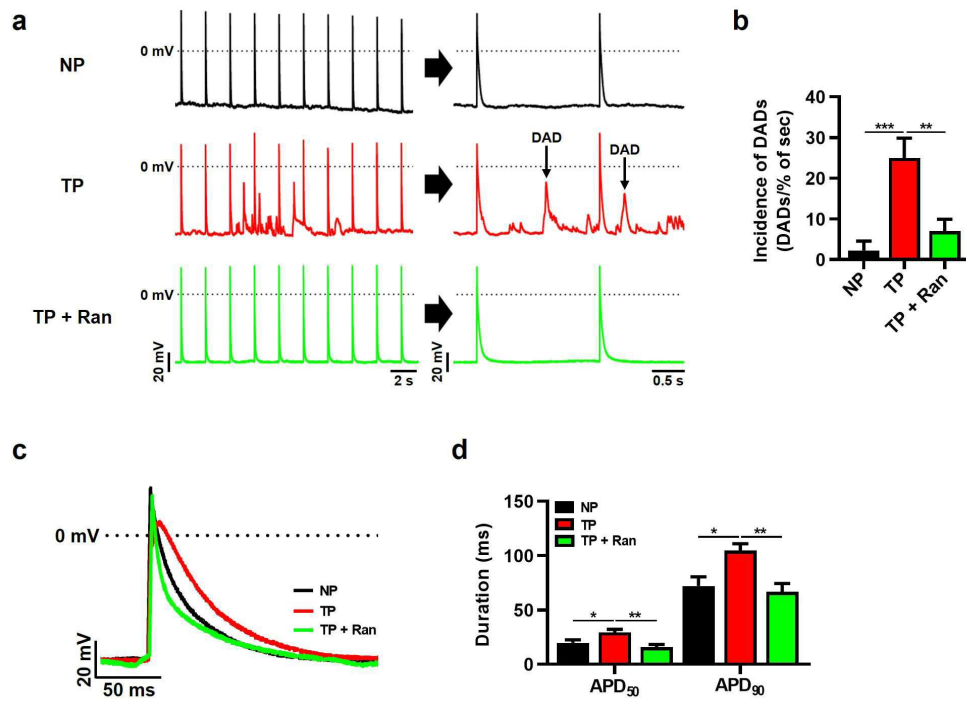
도면1



도면2

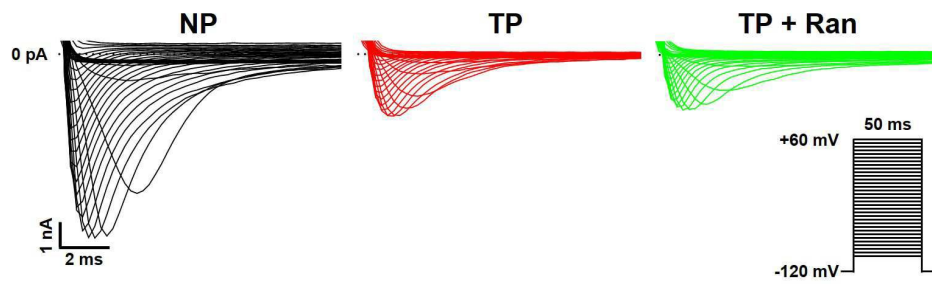


도면3

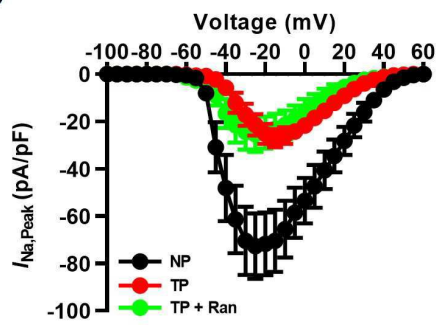


도면4

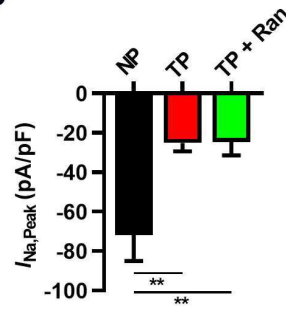
a



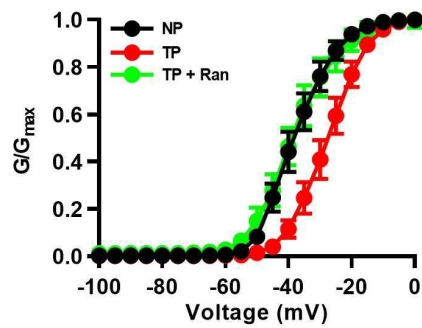
b



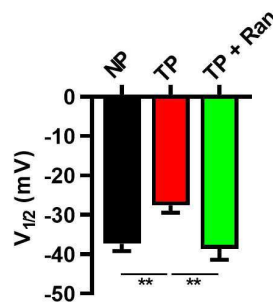
c



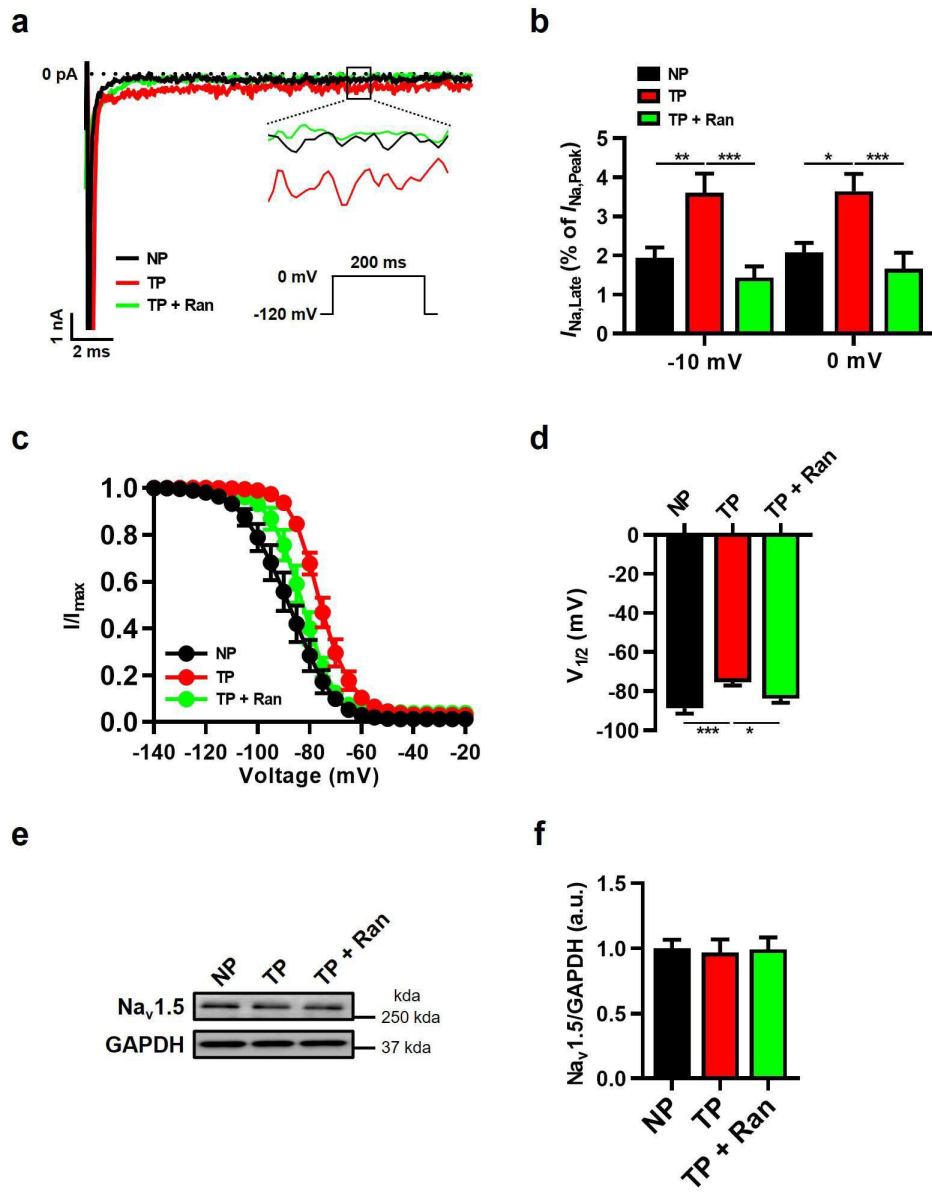
d



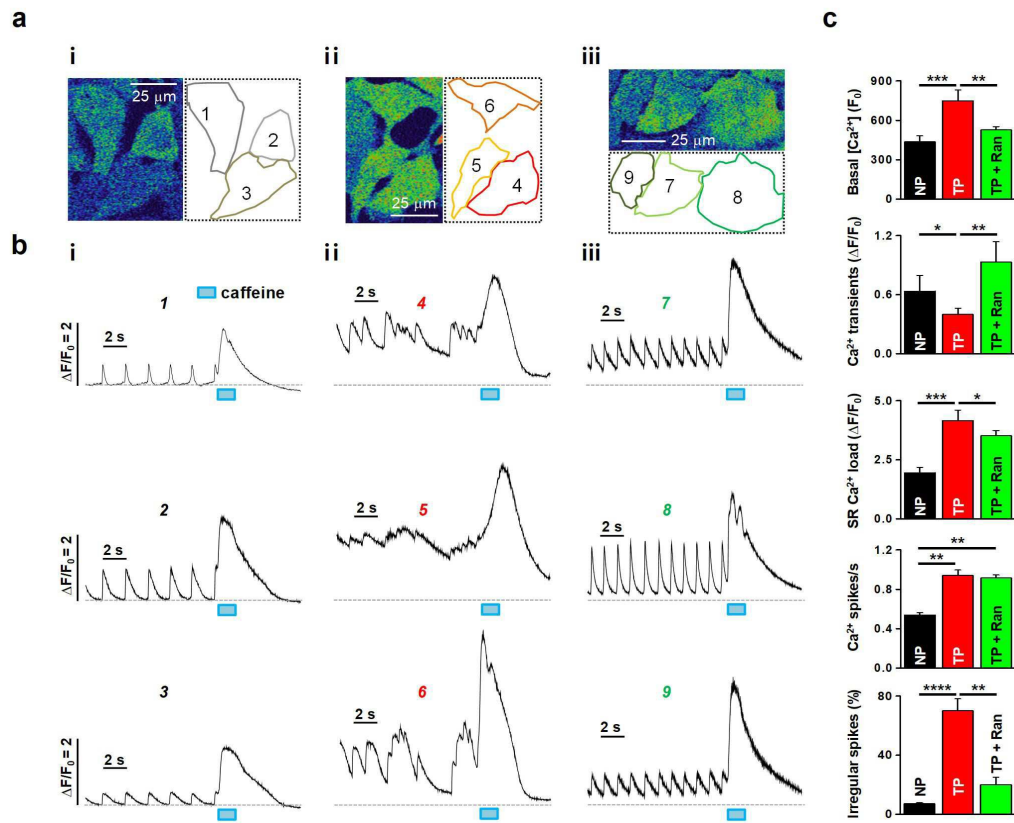
e



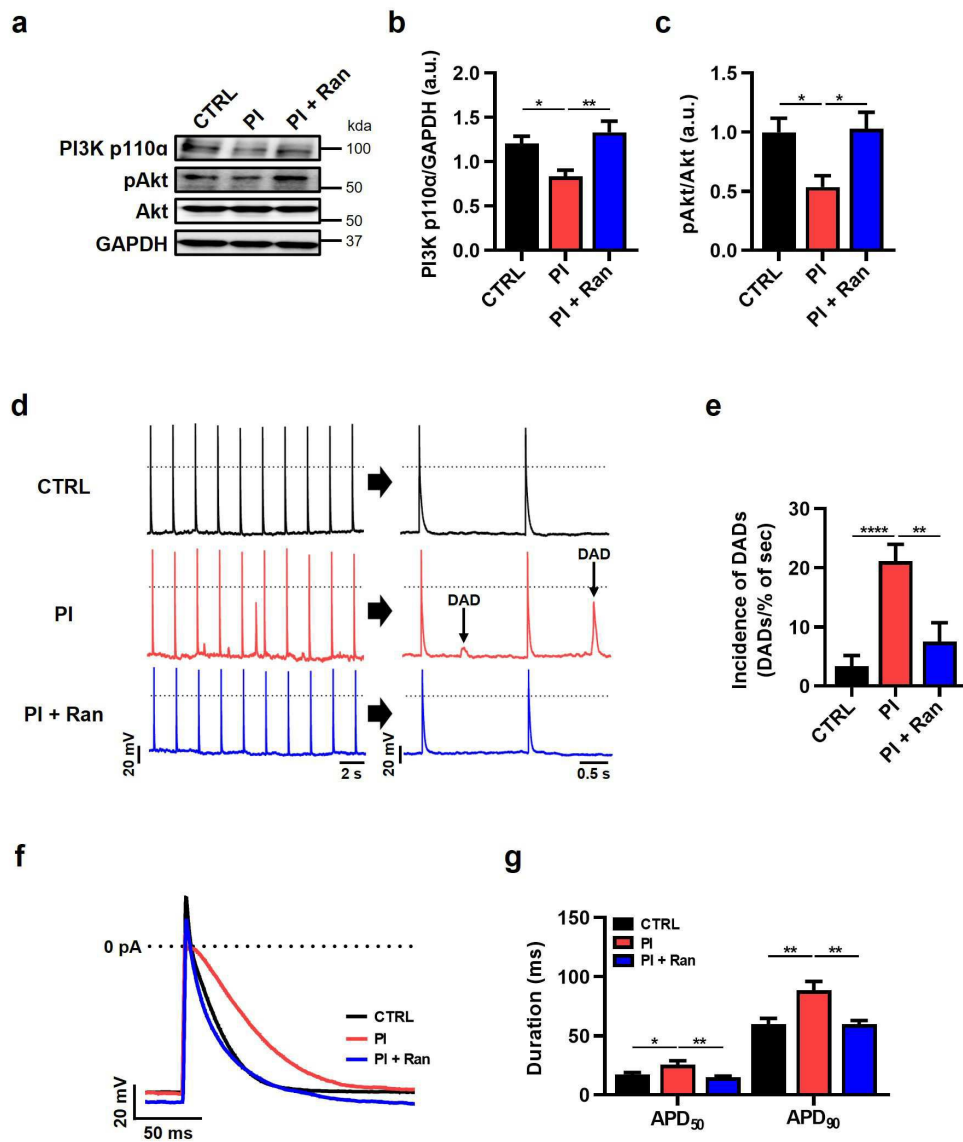
도면5



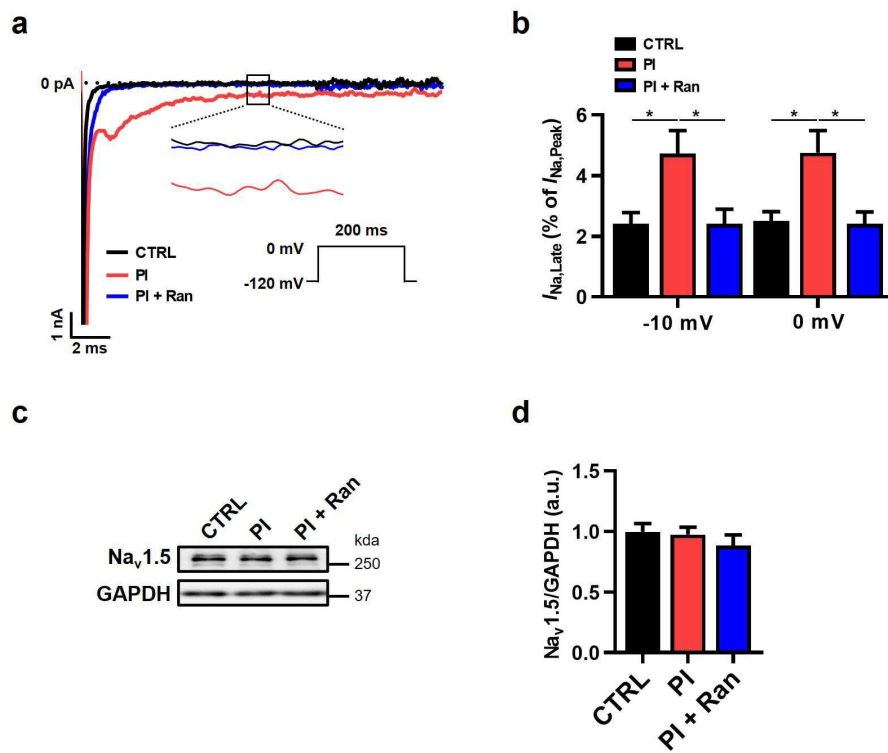
도면6



도면7



도면8



도면9

