

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 9월 29일 (29.09.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/118928 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01) C12N 15/861 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/001685
- (22) 국제출원일: 2011년 3월 10일 (10.03.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0025109 2010년 3월 22일 (22.03.2010) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 광
주 과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCI-
ENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 광주광역시
북구 첨단과기로 261(오룡동 1번지), 500-712
Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 박우진 (PARK, Woo
Jin) [KR/KR]; 서울특별시 노원구 중계동 366 라이프

중계아파트 110-802, 139-220 Seoul (KR). 윤평오
(YOON, Pyoung Oh) [KR/KR]; 광주광역시 북구 신용
동 용두주공아파트 108-1504, 500-250 Gwangju (KR).
양동권 (YANG, Dong Kwon) [KR/KR]; 광주광역시 북
구 용봉동 금호어울림아파트 101-1905, 500-070
Gwangju (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악
구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 Seoul
(KR).

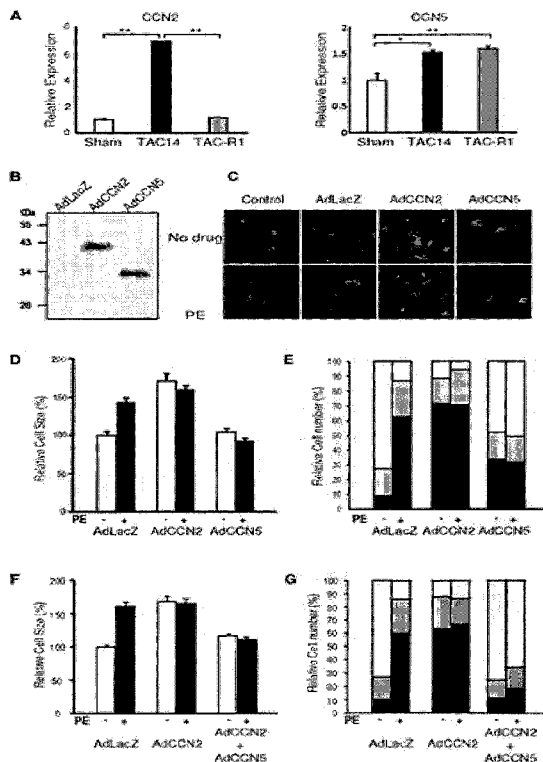
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING HEART FAILURE AND METHOD
FOR SCREENING AGENT FOR PREVENTING OR TREATING HEART FAILURE

(54) 발명의 명칭: 심부전 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 심부전 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법

도 1



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating a heart failure, and a method for screening an agent for preventing or treating a heart failure. The pharmaceutical composition of the present invention comprises a CCN5 or CCN2ΔCT protein, which has an anti-hypertrophic effect, or a gene carrier having a nucleotide sequence which encodes the protein, and thus the composition very effectively prevents or treats a heart failure even without a surgical treatment of transplanting a new heart.

(57) 요약서: 본 발명은 심부전(heart failure) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 심부전 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 반-심근비대(anti-hypertrophy)적 효능을 갖는 CCN5 또는 CCN2ΔCT 단백질, 또는 이들을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 담체를 포함하여, 새로운 심장을 이식받는 수술적 요법을 사용하지 않고도 심부전을 예방 및 치료하는데 큰 효능을 발휘한다.



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

심부전 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 심부전 예방 또는
치료제의 스크리닝 방법

5

【기술분야】

본 발명은 심부전 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 심부전
예방 또는 치료제의 스크리닝 방법 관한 것이다.

10 【배경기술】

고혈압, 당뇨병과 더불어 심장병은 3 대 성인병의 하나로 꼽히고
있다. 이중 심장병으로 인한 사망은 세계적으로 연간 1,700 만 명에 이르고
있고, 문제가 가장 심각한 나라 중의 하나인 미국의 경우에는 하루에 약
2,600 명이 심장병으로 사망하고 있다. 따라서 선진국을 중심으로 심장 질환
15 관련 약물과 치료법의 개발이 활발하여 세계적인 시장 규모가 약 45 억
달러에 이르고 있다. 우리나라에서도 심장병의 중요성이 인식되어 활발한
연구가 진행되고 있다.

비만, 당뇨, 고혈압 등 여러 가지 병인으로 인해 심장에 혈압
과부하 (pressure overload)가 걸리면 심장은 심근비대라는 현상으로
20 반응하게 된다. 심장은 발생학적으로 분화가 완전히 종결된 기관으로 더
이상의 세포증식이 불가능하다. 따라서 심장의 기능(cardiac output)을
증가시켜야 할 필요가 생기면, 기존의 심장근 세포의 크기를 증가시켜
심근의 수축능력(contractility)을 올리는 것이 유일한 대책인데 이런
생리현상을 심근비대라고 한다.

25 심장근(cardiac muscle)이란 심장 벽에서 발견되는 불수의
가로무늬근의 하나로서, 카디오미오사이트(cardiomyocytes) 또는 카디악
미오사이트(cardiac myocytes)라고 불리기도 한다. 심장근은 가로무늬가
있고 및 수축한다는 점에서 골격근(skeletal muscle)과 유사한 점이 있으나,

그 구조, 기능, 수축조절 및 자극-수축 반응의 측면에 있어서 평활근(smooth muscle)과는 근본적으로 다르다.

심근비대는 외부의 자극에 의한 보상 반응(compensation)으로 여겨지고, 그 자체로는 큰 문제로 여겨지지 않는다. 그러나 이
 5 심근비대가 일정 기간 오래 지속되면 심부전으로 악화될 수 있는 가능성이 매우 높다[1-3]. 심부전은 세포사멸에 의해 심장의 벽이 얇아지고 심방과 심실의 내강이 확장되어 심장의 기능이 매우 저하되어 있는 것을 일컫는다. 인간의 경우에 여러 가지 병인으로 심근비대(보다 정확하게는 LVH, left ventricular hypertrophy)가 발생하거나 관상동맥의 폐색으로 인한
 10 심근경색(MI, myocardial infarction)이 발생하게 된다. 이것은 각각 심장의 이완기(diastolic) 및 수축기(systolic) 기능장애를 가져오게 되는데, 이것은 사람에 따라 수년에서 수십년동안 별 특이한 증상 없이 유지될 수 있다. 그러나 이것들이 일단 심부전(heart failure)으로 진행이 되면 수개월에서 수년 사이에 급사할 수 있는 가능성이 매우 높다.
 15 심근비대 자체가 문제로 여겨지지 않지만 심부전으로 진행될 수 있는 가능성이 높기 때문에, 심근비대를 급사를 초래할 수 있는 중요한 위험요소(risk factor)로 분류하고 있다.

한편, CCN(Cyr61, CTGF 및 Nov)족 단백질은 세포 및 기질 결합 분비-단백질로서 상처 치료, 혈관계 질환, 섬유증, 혈관신생, 종양생성,
 20 세포 분화 및 생존과 같은 세포 기능에 다양한 역할을 하는 것으로 알려졌다[6].

상기 CCN-족 단백질 중에서, CCN2 는 CTGF(Connective Tissue Growth Factor)로도 알려져 있는데, 이는 심장 섬유증의 발전에 중요한 역할을 한다. 호-섬유증(pro-fibrotic) 시토킨인 TGF- β 는 섬유모세포 및
 25 심근세포에서 CCN2 발현을 유도하였다[7]. CCN2 는 TGF- β 의 생리학적 효능의 필수적인 매개자로 보인다[8]. 또한 쇠약해가는 비대한 심장에서 CCN2 발현이 증가하는 것으로 보고된 점을 고려할 때 CCN2 는 심근비대증과도 깊은 관계가 있는 것으로 보인다[9-11]. 분리한

심근세포에서 CCN2 처리는 Akt 신호-매개 세포 크기 증가를 야기하였으며[12], 마우스 심장에서 형질전환유전자-매개 CCN2 의 과발현은 심근비대증의 연령의존적 발달을 촉진하였으나, 심장 섬유증을 유도하지는 않았다[13].

5

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.

10

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

15

본 발명자들은 새로운 심장을 이식받는 수술적 요법을 사용하지 않고도 심부전을 예방 및 치료할 수 있는 약제학적 조성물의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 CCN5 단백질 및 CCCN2 Δ CT 단백질이 심장 벽이 과도하게 비대해지는 것을 효과적으로 억제 하는 반-심근비대(anti-hypertrophic)적 효능을 갖는다는 사실을 알아냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 심근비대증 및 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

20

본 발명의 다른 목적은 심부전(heart failure) 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

따라서 본 발명의 목적은 심근비대증 및 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는데 있다

25

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

【 기술적 해결방법 】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) (i) CCN(Cyr61, CTGF 및 Nov)5 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 (ii) CCN2 에서 CT 도메인이 결손된 CCN2 Δ CT 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을
5 포함하는 유전자 담체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 심부전 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 약제학적 조성물을 필요로 하는 대상(Subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 심부전 예방 또는 치료방법을 제공한다.

10 CCN5 란 CCN-족(family) 단백질에 속하는 기질세포 단백질이다[5]. CCN5 는 다른 CCN-족(family) 단백질과는 달리 심장 조직에서의 기능적 역할이 많이 알려져 있지 않았다. CCN5 는 민무늬근 세포에서 세포의 증식과 운동성을 억제하며[15, 17-19], CCN5 의 이러한 효능은 세포의 증식과 운동성을 촉진하는 CCN1 및 CCN2 의 효능과 반대되는 것으로 보인다[20, 21].

15 CCN1-4 및 CCN6 는 다음과 같은 구별되는 4 개의 도메인을 포함한다: (i) 인슐린-유사 성장인자 결합 도메인(insulin-like growth factor binding Domain: IGFBD)), (ii) 폰 빌레브란트 인자 타입-C(von Willebrand factor type-C: vWC)), (iii) 트롬보스포틴 타입-1(thrombospondin type-1: TPS-1) 및 (iv) C-말단 도메인 CT) [22]. 그러나,
20 CCN5 에는 CT 도메인이 결여되어 있는데, 상기 도메인은 CCN1 및 CCN2 의 세포증식활성을 갖는 것이다[23]. CCN5 의 이런 구조적 차이를 고려할 때, CCN5 는 다른 CCN-족(family) 단백질과는 다른 기능을 할 것이라는 막연한 추측이 가능하다.

본 발명자들은 상기와 같은 막연한 추측에서 머물지 않고,
25 구체적인 연구 및 실험을 수행하여, 심장근 세포 크기가 성장하는 심근 비대증에 있어서 CCN2 가 호-심근비대(pro-hypertrophic)적 효능을 가지는 반면, CCN5 는 반-심근비대(anti-hypertrophic)적 효능을 갖는다는 것을

확인하고 특히 CCN5 가 TGF- β -SMAD 신호전달 경로를 억제하는 메카니즘으로 심근비대를 방지한다는 사실을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

또한, 본 발명자들은 호-심근비대(pro-hypotrophic) 인자인 CCN2 에서 CT 도메인을 삭제하면 반-심근비대(anti-hypotrophic) 인자로서의
 5 효능을 갖게 됨을 밝혀내고 상기 CCN2 에서 CT 도메인이 삭제된 폴리펩타이드를 CCN2 Δ CT 단백질라고 명명하였다. 상기 CT 도메인의 구조는 VEGF, TGF- β , BMP, NGF 및 PDGF 를 포함하는 많은 성장 인자에서 발견되는 구조와 유사하다[31, 32]. 이는 이량화 모듈로서 기능할 것으로 여겨지는
 6 개의 보존된 시스테인 잔기의 시스테인 매듭 모티브를 포함한다.

10 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 CCN5 를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 바람직한 다른 구현예에 따르면, 상기 CCN2 에서 CT 도메인이 결손된 CCN2 Δ CT 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은
 15 서열목록 제 2 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 약제학적 조성물은 CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자를 전달하여 심근비대를 유발하는 기전인 TGF- β -SMAD 신호전달 경로를 효과적으로 차단함으로써 심부전을 예방 또는 치료한다.

20 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달”은 유전자가 세포 내로 운반되는 것을 의미하며, 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.

25 본 발명의 유전자 전달 시스템을 제조하기 위해, CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 적합한 발현 컨스트럭트(expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 컨스트럭트에서, CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자는

프로모터에 작동적으로 연결되는 것이 바람직하다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다. 본 발명에 있어서, CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자 서열에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, CMV 프로모터이다.

본 발명의 유전자 담체는 다양한 형태로 제작할 수 있는 데, 이는 (i) 내이키드(naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 플라스미드, (iii) 바이러스 벡터, 그리고, (iv) 상기 내이키드 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드를 내포하는 리포솜 또는 니오솜의 형태로 제작할 수 있다.

CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 통상적인 유전자 치료에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드, 아데노바이러스 (Lockett LJ, et al., *Clin. Cancer Res.* 3:2075-2080(1997)), 아데노-관련 바이러스 (Adeno-associated viruses: AAV, Lashford LS., et al., *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), 레트로바이러스 (Gunzburg WH, et al., *Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999),

렌티바이러스 (Wang G. et al., *J. Clin. Invest.* 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Chamber R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:1411-1415(1995)), 배시니아 바이러스 (Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999)), 리포좀 (Methods in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) 또는 니오솜에 적용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 아데노바이러스에 적용하여 제조된다.

10 i. 아데노바이러스

아데노바이러스는 중간 정도의 지놈 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타깃세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다. 지놈의 양 말단은 100-200 bp 의 ITR (inverted terminal repeat)를 포함하며, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 시스템 엘리먼트이다. 지놈의 E1 영역 (E1A 및 E1B)은 전사 및 숙주 세포 유전자의 전사를 조절하는 단백질을 코딩한다. E2 영역 (E2A 및 E2B)은 바이러스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 코딩한다.

현재 개발된 아데노바이러스 벡터 중에서, E1 영역이 결여된 복제 불능 아데노바이러스가 많이 이용되고 있다. 한편, E3 영역은 통상적인 아데노바이러스 벡터에서 제거되어 외래 유전자가 삽입되는 자리를 제공한다 (Thimmappaya, B. et al., *Cell*, 31:543-551(1982); 및 Riordan, J. R. et al., *Science*, 245:1066-1073(1989)). 따라서, 본 발명의 CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자는 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 결실된 E3 영역에 삽입된다. 한편, 세포내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 결실된 E1 영역에 삽입된다.

또한, 상기 삽입 서열들은 결실된 E4 영역에도 삽입될 수 있다. 본 명세서에서 바이러스 지놈 서열과 관련하여 사용되는 용어, “결실”은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다.

5 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 아데노바이러스 유전자 전달 시스템은 “프로모터-목적 뉴클레오타이드 서열-폴리 A 서열”와 “프로모터-CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자-폴리 A 서열”이 연결된 구조를 갖고, 상기 “프로모터-목적 뉴클레오타이드 서열-폴리 A 서열”은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는
10 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역, 바람직하게는 결실된 E1 영역에 삽입된 것이고, 상기 “프로모터-CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자-폴리 A 서열”은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역, 바람직하게는 결실된 E3 영역에 삽입된 것이다. 또한, “프로모터-목적 뉴클레오타이드 서열-폴리 A 서열-
15 IRES-CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자-폴리 A 서열”처럼 목적 뉴클레오타이드와 CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자가 IRES (internal ribosome entry site)에 의해 연결된 바이시스트론 (bicistronic) 발현 시스템에 의해서도 발현될 수 있다.

또한, 아데노바이러스는 야생형 지놈의 약 105%까지 패키징할 수
20 있기 때문에, 약 2 kb 를 추가적으로 패키징할 수 있다 (Ghosh-Choudhury et al., *EMBO J.*, 6:1733-1739(1987)). 따라서, 아데노바이러스에 삽입되는 상술한 외래 서열은 아데노바이러스의 지놈에 추가적으로 결합시킬 수도 있다.

아데노바이러스는 42 개의 상이한 혈청형 및 A-F 의 서브그룹을
25 갖는다. 이 중에서, 서브그룹 C 에 속하는 아데노바이러스 타입 5 가 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 얻기 위한 가장 바람직한 출발물질이다. 아데노바이러스 타입 5 에 대한 생화학적 및 유전적 정보는 잘 알려져 있다.

아데노바이러스에 의해 운반되는 외래 유전자는 에피솜과 동일한 방식으로 복제되며, 이에 숙주세포에 대해 유전적독성이 매우 낮다. 따라서, 본 발명의 아데노바이러스 유전자 전달 시스템을 이용한 유전자 치료가 매우 안전할 것으로 판단된다.

5

ii. 레트로바이러스

레트로바이러스는 자신의 유전자를 숙주의 지놈으로 삽입시키고, 대량의 외래 유전 물질을 운반할 수 있으며, 감염시킬 수 있는 세포의 스펙트럼이 넓기 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다.

10

레트로바이러스 벡터를 구축하기 위하여, CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 레트로바이러스의 서열 대신에 레트로바이러스 지놈에 삽입되어 복제 불능의 바이러스를 생산한다. 바이리온을 생산하기 위하여, gag, pol 및 env 유전자를 포함하지만 LTR (long terminal repeat)와 Ψ 서열은 없는 패키징 세포주를 구축한다 (Mann et al., *Cell*, 33:153-159(1983)). CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자, 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열, LTR 및 Ψ 서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 상기 세포주에 이입하면, Ψ 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체의 생산을 가능하게 하며, 이 전사체는 바이러스로 패키징되고, 바이러스는 배지로

배출된다 (Nicolas and Rubinstein "Retroviral vectors," In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513(1988)). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고 농축하여 유전자 전달 시스템으로 이용한다.

25

2 세대 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달이 발표되었다. Kasahara et al. *Science*, 266:1373-1376(1994))는 몰로니 뮤라인 류케미아 바이러스의 변이체를 제조하였고, 여기에서 EPO (erythropoietin) 서열을 엔벨로프 부위에 삽입하여 새로운 결합 특성을 갖는 키메릭 단백질을

생산하였다. 본 발명의 유전자 전달 시스템도 이와 같은 2 세대 레트로바이러스 벡터의 구축 전략에 따라 제조할 수 있다.

iii. AAV 벡터

아데노-관련 바이러스 (AAV)는 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 적합하다. AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제 5,139,941 호 및 제 4,797,368 호에 상세하게 개시되어 있다.

유전자 전달 시스템으로서의 AAV 에 대한 연구는 LaFace et al, *Virology*, 162:483-486(1988), Zhou et al., *Exp. Hematol.* (NY), 21:928-933(1993), Walsh et al, *J. Clin. Invest.*, 94:1440-1448(1994) 및 Flotte et al., *Gene Therapy*, 2:29-37(1995)에 개시되어 있다. 최근에, AAV 벡터는 낭포성 섬유증의 치료제로서 임상 I 을 실시하고 있다.

전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피드가 옆에 위치되어 있는 목적의 유전자 서열 (CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열)을 포함하는 플라스미드 (McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963-1973(1988); 및 Samulski et al., *J. Virol.*, 63:3822-3828(1989)) 및 말단 리피드가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미드 (McCarty et al., *J. Virol.*, 65:2936-2945(1991))를 동시형질전환시켜 제조된다.

iv. 다른 바이러스 벡터

다른 바이러스 벡터들도 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 이용할 수 있다. 배시니아 바이러스 (Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez and Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492(1988);

Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. *Gene transfer*. New York: Plenum Press, 117-148(1986) 및 Coupar et al., *Gene*, 68:1-10(1988)), 렌티바이러스 (Wang G. et al., *J. Clin. Invest.* 104(11):R55-62(1999)) 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Chamber R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:1411-1415(1995))로부터 유래된 벡터들도, CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 세포내로 운반할 수 있는 운반 시스템으로 이용할 수 있다.

10

v. 리포좀

리포좀은 수상에 분산된 인지질에 의해 자동적으로 형성된다. 외래 DNA 분자를 리포좀으로 성공적으로 세포 내로 운반한 예는 Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982) 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)에 개시되어 있다. 한편, 리포좀을 이용한 동물세포의 형질전환에 가장 많이 이용되는 시약으로는 Lipofectamine (Gibco BRL)이 있다. CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 내포한 리포좀은 엔도사이토시스, 세포 표면으로의 흡착 또는 플라즈마 세포막과의 융합 등의 기전을 통해 세포와 상호작용하여 세포내로 CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 단백질 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 운반한다.

20

본 발명에서, 유전자 담체가 바이러스 벡터에 기초하여 제작된 경우에는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여방법은 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 실시된다. 바이러스 벡터를 이용한 숙주 세포의 감염은 상술한 인용문헌에 기재되어 있다.

25

본 발명에서 유전자 전달 시스템이 내이키드 (naked) 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*,

22:479(1980); 및 Harland 와 Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099(1985)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973); 및 Chen 과 Okayama, *Mol. Cell Biol.* 7:2745-2752(1987)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982); 및 Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982); 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 방법에 의해 유전자를 세포내로 이입시킬 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 상술한 유전자 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, CCN5 단백질을 또는 CCN2 Δ CT 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드를 기준으로 하였을 때 0.0001 mg/kg(체중) 내지 100 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 심부전 뿐만 아니라 심근비대증, 심근비대 관련 질병 및 기타 TGF- β -SMAD 신호 경로의 과발현으로 인한 질병의 예방 및 치료에 사용될 수 있으며, 이러한 질병을 예시하면

심근증(cardiomyopathy), 심장대상부전(cardiac decompensation), 심장 섬유증(cardiac fibrosis), 각종 염증 및 암이 있다.

본 발명에 의해 예방 또는 치료되는 심장 섬유증 또는 심장 섬유화 질환(cardiac fibrotic disorders)는 급성 또는 만성으로 특정될 수 있으며, 심장 섬유 조직에 의한 정상 조직의 대체에 따른 과도한 콜라겐 축적 및 기능의 상실과 같은 공통된 특성을 나타낸다. 급성 심장 섬유증은 급성 고혈압, 외상(trauma), 감염, 수술, 화상, 방사선 및 화학요법치료제 등에 대한 반응을 포함한다. 만성 섬유증은 만성 고혈압, 바이러스 감염, 당뇨, 비만, 지방간 및 공피증을 유발하는 다른 만성 질환에 의해 야기된다.

따라서, 본 발명에 의해 예방 또는 치료되는 심장 섬유증은 병리학적 상태 또는 질환에 의한 심장 섬유증, 방사능 손상에 의한 심장 섬유증 및 화학요법치료제(예컨대, 블레오마이신, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 메토트록세이트, 무스틴 또는 프로카르바진)에 의한 심장 섬유증을 포함하는 모든 심근섬유화 질환을 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) (i) CCN5 단백질 또는 (ii) CCN2 에서 CT 도메인이 결손된 CCN2 Δ CT 단백질의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 심부전 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 억제학적 조성물을 필요로 하는 대상(Subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 심부전 예방 또는 치료방법을 제공한다.

본 발명의 억제학적 조성물에 억제학적 유효량으로 포함되는 CCN5 단백질 또는 CCN2 Δ CT 는 상술한 유전자 담체가 발현하는 단백질이기 때문에, 상기 유전자 담체를 포함하는 억제학적 조성물과의 관계에서 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 CCN5 는 서열목록 제 3 서열에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 바람직한 다른 구현예에 따르면, 상기 CCN2 Δ CT 단백질은 서열목록 제 4 서열에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 비경구 투여는 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 5 조직에 직접 주입하는 방법 등을 포함한다.

상기 약제학적 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으나, 경고제 (Plasters), 과립제 (Granule), 산제 (Powders), 시럽제 (Syrups), 액제 (solutions), 유동엑스제 (FluidextractsI), 유제 (Emulsions), 현탁제 (Suspensions), 침제 (Infusions), 정제 (Tablets), 주사제 10 (Injections), 캡셀제 (Capsules) 및 환제(Pills)등으로 제조할 수 있다.

본 발명의 조성물에서 유효 성분으로 이용되는 것은 상기 CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질 자체뿐만 아니라, 그의 약제학적으로 허용 가능한 염, 수화물 또는 용매화물이다.

용어, “약제학적으로 허용 가능한 염”은 소망하는 약리학적 효과, 15 즉 심근비대 발전을 억제 및 예방하고 비대해진 심장을 정상상태로 되돌리는 리모델링 활성을 갖는 상기 CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질의 염을 나타낸다. 이러한 염은 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드 및 하이드로요오다이드와 같은 무기산, 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 20 비설페이트, 설파메이트, 설페이트, 나프틸레이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 2-히드록시에탄설페이트, 락테이트, 말리에이트, 메탄설포네이트, 2- 25 나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 토실레이트 및 운데카노에이트와 같은 유기산을 이용하여 형성된다.

용어, “약제학적으로 허용 가능한 수화물”은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질의 수화물을 나타낸다. 용어,

“약제학적으로 허용 가능한 용매화물”은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질의 용매화물을 나타낸다. 상기 수화물 및 용매화물도 상기한 산을 이용하여 제조될 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질을 기준으로 하였을 때 0.0001 mg/kg(체중) 내지 100 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) CCN5 단백질의 유전자를 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 CCN5 단백질 유전자의 발현을 분석하는 단계를 포함하며, 상기 시험물질이 CCN5 단백질 유전자의 발현을 증가시키면 심부전 예방 또는 치료제로 판단하는 것을 특징으로 하는 심부전(heart failure) 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 방법에 따르면, 우선 CCN5 단백질 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킨다. 바람직하게는, CCN5 단백질 유전자를 포함하는 세포는 심장으로부터 유래한 세포이다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 CCN5 단백질 유전자의 발현량 또는 CCN5 단백질의 양에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

이어, 시험물질이 처리된 세포에서 CCN5 단백질 유전자의 발현량 또는 CCN5 단백질의 양을 측정한다. 측정 결과, CCN5 단백질 유전자의 발현량 또는 CCN5 단백질의 양이 증가-조절(up-regulation)되는 것이 측정되면, 상기 시험물질은 심부전 예방 또는 치료제로 판정될 수 있다.

CCN5 단백질 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등,

Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufman et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인

5 시투(*in situ*) 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시험물질을

10 처리한 세포에서 총 RNA 를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제 1 쉐 cDNA 를 제조한다. 이어, 제 1 쉐 cDNA 를 주형으로 이용하고, CCN5 단백질 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 CCN5 단백질 유전자의 발현량 변화를 측정한다.

【유리한 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(i) 본 발명은 심부전의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 심부전 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

20 (ii) 본 발명의 약제학적 조성물은 반-심근비대(anti-hypertrophy)적 효능을 갖는 CCN5 또는 CCN2 Δ CT 단백질, 또는 이들을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 담체를 포함하여, 새로운 심장을 이식받는 수술적 요법을 사용하지 않고도 심부전을 예방 및 치료하는데 큰 효능을 발휘한다.

【도면의 간단한 설명】

25 도 1. 배양된 래트 신생아 심근세포에서 페닐에프린(PE)-유도 비대증에 대한 CCN2 및 CCN5 의 영향.

(A) 각각의 실험 조건(Sham, TAC 14 및 TAC-R1) 하 3 개의 독립적인 심장 샘플을 가지고 정량적 RT-PCR 을 3 회 수행하였다. TAC14: 대동맥 교차 협착(TAC) 14 일 후. TAC-R1: TAC 14 일 및 협착 제거 1 일. (B) 배양된 신생아 심근세포에 AdLacZ, AdCCN2 및 AdCCN5 의 아데노 바이랄-매개 이전을
 5 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 모든 감염에 대해 MOI 는 100 이었다. CCN2 및 CCN5 단백질로 추정되는 밴드를 탐지하였다. (C) 안티-액티닌 항체로 염색하여 근절 기관을 시각화하였다. PE 및 AdCCN2 감염 모두에 반응하여 표시된 근절 재편성이 관찰되었다. 상기 반응은 AdCCN5 에 의해 완전히 억제되었다. (D) 이미지 J 소프트웨어(n=50)를 사용하여 심근세포의 세포
 10 표면적을 측정하였다. (E) 심근세포의 근절 재배열은 총 세포 면적 대비 재배열된 근절이 차지하는 면적에 기초하여 반-정량적으로 산정되었다: 세포 면적의 1/3 미만(백색 막대), 세포 면적의 1/3 이상 2/3 미만(회색 막대), 세포 면적의 2/3 이상(흑색 막대). (F 및 G) 심근세포를 AdLacZ, AdCCN2 또는 AdCCN2 + AdCCN5 으로 감염시키고, PE 로 48 시간 동안
 15 자극하였다. 세포 면적을 측정하고 근절 재배열을 반정량적으로 평가하였다.

도 2. CCN5 는 CT 도메인 결여로 인해 음성 도미넌트 분자이다.

(A) AdLacZ, AdCCN2 Δ T 및 AdCCN5/CT 의 배양된 신생아 심근세포에의 아데노 바이러스 매개 이전을 웨스턴 블롯으로 분석하였다.
 20 (B) 심근세포의 근절 기관은 안티-액티닌 항체로 염색하여 시각화하였다. (C) 심근세포의 세포 표면적은 이미지 J 소프트웨어(n=50)를 사용하여 측정하였다. (D) 심근세포의 근절 재편성은 도 1 에서 기술한 방법에 따라 반정량적으로 평가하였다.

25 도 3. CCN2 는 인 비보에서 심근비대증에 영향을 주지 않는다.

(A) α -MHC 프로모터 제어하 CCN2 발현. (B) 야생형 한배 자손(WT) 및 CCN2 TG 마우스(CCN2 TG line40)의 심장 추출액에서 CCN2 웨스턴 블롯. (C)삼 오퍼레이션 또는 협착(TAC) 상태에서 4 주간 있었던 WT 및 CCN2 TG

마우스의 심장중량/체중(HW/BW) 비율의 산정. (D) TAC 를 4 주간 겪은
 심장의 단면(WT 및 CCN2 TG 에 대하여 n=6). 단면 면적(Cross-sectional
 areas: CSA)은 AnalySIS 이미지 분석 프로그램을 사용하여 측정하였다(WT
 및 CCN2 TG 에 대하여 n=3). (E) TAC 를 4 주간 겪은 마우스 심장 내 ANF,
 5 β -MHC 및 SKA 전사 레벨의 정량적 RT-PCR 분석(n=6). *P<0.05, **p<0.01.

도 4. CCN5 는 인 비보에서 심근비대증을 억제한다.

(A) α -MHC 프로모터 제어하 CCN5 발현. (B) 야생형 한배자손(WT)
 및 CCN5 TG 마우스(CCN5 TG line81)의 심장 추출액에서 CCN5 웨스턴 블롯.
 10 (C)삼 오퍼레이션 또는 협착(TAC) 상태에서 4 주간 있었던 WT 및 CCN5 TG
 마우스의 심장중량/체중(HW/BW) 비율의 산정. (D) TAC 를 4 주간 겪은
 심장의 단면(WT 및 CCN5 TG-81 에 대하여 n=6). 단면 면적(Cross-sectional
 areas: CSA)은 AnalySIS 이미지 분석 프로그램을 사용하여 측정하였다(WT
 및 CCN5 TG 에 대하여 n=3). (E) TAC 를 4 주간 겪은 마우스 심장 내 ANF,
 15 β -MHC 및 SKA 전사 레벨의 정량적 RT-PCR 분석(n=6). *P<0.05, **p<0.01.

도 5. 인 비보에서 CCN2 는 심근 섬유증을 가속화하고, CCN5 는 심근
 섬유증을 억제한다.

(A) TAC 과정을 4 주간 겪은 CCN2 및 CCN5 TG 마우스 및 각각의
 20 상응하는 WT 한배 자손 심장의 조직학적 단편 트리크롬 염색. (B) AnalySIS
 이미지 분석기를 사용하여 조직학적 단편의 섬유 영역을 정량하였다. n=3.
 (C) TAC 를 4 주간 겪은 마우스 심장 내 콜라겐 I 및 TGF- β 1 전사 레벨의
 정량적 RT-PCR 분석(n=3). *P<0.05, **p<0.01.

25 도 6. CCN5 는 심부전을 억제한다.

CCN2 TG 및 CCN5 TG 마우스 및 각각의 상응하는 WT 한배자손을
 4 주간 TAC 하에 두고, 그 결과 심장 구조 및 기능을 초음파 심장 검진법을
 사용하여 모니터하였다(n=8-10). LVIDS, 수축기의 좌심실 내부

부피(leftventricular internal dimension at the systole); FS, 분획 단축(fractional shortening).

**p<0.01 vs. 기준선. TG 및 WT 한배 자손 간 세타 p<0.05 및 세타 p<0.01.

5

도 7. SMAD 신호는 CCN2 TG 에서 상승하고, CCN5 TG 에서 억제된다.

(A) CCN2 TG 및 CCN5 TG 마우스 및 각각의 상응하는 WT 한배자손을 4 주간 TAC 하에 두었다. 심장 추출액을 SDS-PAGE 로 분리하고, 블롯하고, 포스포-Smad2, Smad2/3, Smad4 및 Smad7 의 항체로 탐지하였다. 로딩
10 대조군으로는 튜블린을 사용하였다. 상기 블롯을 스캔하고 AnalySIS 이미지 분석기를 사용하여 정량하였다. 모든 그룹에 대해 n=3. *p<0.05, **p<0.01.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다.
15 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

20 실험재료 및 방법

1. 세포 배양 및 비대증 유도

1 일령의 SD 래트(Sprague-Dawley rat)(다물 사이언스)로부터 신생아 래트 심근세포를 채취하였다. 종전에 알려진 방법에 따라 상기 심근세포를 분리 및 배양하고 특성 분석하였다[25]. 간단히 설명하면,
25 심실세포를 효소로 해리시키고, 이로 인해 발생한 세포 현탁액을 페콜(Amersham Pharmacia) 구매 원심분리를 이용해 농축하여 심근세포를 분리하였다. 분리된 심근세포를 콜라겐-코팅 배양 접시(Corning) 또는 커버

슬립위에 이식한 후 배지(10% FBS 및 2 mM L-글루타메이트로 보충한 DMEM 및 5-브로모디옥시유리딘 100 μ M GIBCO BRL)에서 배양하였다.

과다성장을 유도하기 위하여, 상기 심근세포는 적어도 24 시간 동안 무혈청 배지에서 배양되었고, 그 다음 24 시간 동안 페닐에프린(PE) 100 μ M로 처리되었다.

2. 재조합 아데노 바이러스인 AdCCN2, AdCCN5, AdCCN2 Δ T 및 AdCCN5/CT 의 생성

재조합 아데노 바이러스를 생성하기 위하여 AdEasy XL 아데노 바이럴 벡터 시스템(Stratagene)을 사용하였다. 아미노-말단 헤마글루티닌(HA)이 태그된 전장의 마우스 CCN2 cDNA 및 CCN5 cDNA 를 pShuttle-IRES-hrGFP2(Stratagene)으로 서브클로닝 하였다. CT 도메인이 결여된 CCN2 컨스트럭트, CCN2 Δ CT, 및 CT 도메인을 포함하는 CCN5 컨스트럭트, CCN5/CT 를 PCR-매개 돌연변이유도법을 사용하여 제조하고 상기 서플 벡터로 서브클로닝 하였다. 그 다음 선형화된 서플 벡터를 *E. coli* BJ5183 균주에서 (Stratagene) 혈청형 5 첫세대 아데노바이러스 백본인 AdEasy-1(Stratagene)와 재조합하였다. 성공적으로 재조합된 바이러스 백본을 AD293 세포(Stratagene)로 도입하였고, 대량으로 배양하였다. 아데노바이러스를 표준 CsCl 초원심분리 및 탈염 방법으로 정제하였다. 바이러스 역가는 플라크 분석법을 사용하여 결정하였다. 심근세포를 10 또는 100 MOI(multiplicity of infection)의 재조합 아데노바이러스로 2 시간 동안 감염시키고, 트랜스유전자의 발현을 위해 추가적으로 48 시간 동안 배양 하였다.

3. 형질전환 마우스의 생성

완전한 길이의 마우스 CCN2 및 CCN5 cDNA 는 α -미오신 헤비체인(α -MHC) 프로모터 및 인간 성장 호르몬 3' 미번역 구간 5.5-kb 세그먼트를 포함한 pNC 벡터(Dr. Jim Gulick)로 서브클로닝 하였다.

C57BL/6 수정란(Macrogen, Korea) 내로 DNA 컨스트럭트를 마이크로 주입하였고, 이렇게 주입된 유전자의 융합을 서던 블롯(Macrogen, Korea)으로 확인하였다. 형질전환 마우스 및 야생형 한배자손으로 8 내지 10 주령의 것을 사용하였다.

5

4. 대동맥 교차 협착(Transverse Aortic Constriction: TAC)

8 내지 10 주령의 웅성 마우스(25-30g)(다물 사이언스)를 사용하였다. 0.5 ml 내지 0.7 ml 의 1x 애버틴 용액(2-2-2 트리브로모에탄올 및 터타밀 알코올의 혼합물)(Sigma, USA)을 복막내로 주입하는 방식으로 10 투여하여 상기 마우스를 마취시켰다. 1 회 호흡량 0.1 ml 및 분당 120 회의 호흡률로 상기 마우스를 강제 호흡시켰다(Harvard Apparatus). 대동맥의 아치가 보이도록 중앙 흉골 부위를 2 내지 3 mm 세로 절제하였다. 상기 횡단 대동맥 아치는 오버레이드 27-게이지 바늘(아이리 공업사)을 사용하여 좌측 익명의 평범한 동맥 사이에 결착시켰다. 그 다음 상기 바늘을 즉시 15 제거하여 분리된 결착 부위를 남겨두었다.

5. 심근 조직의 조직학적 검사

TAC 또는 sham 오퍼레이션 4 주 후에 상기 마우스를 희생시켰다. 심장을 마지막 이완기에 잡아두고 좌심실을 우심실로부터 분리하여 무게를 20 측정하였다. 파라핀-포매 심장을 5 μ m 의 슬라이스로 자르고 헤마톡실린-에오신 용액으로 염색하였다. 심근세포의 표면적을 측정하기 위하여, 거의 원형의 모세관 프로파일 및 핵을 가진 적절한 단편을 선택하였다. 악시오포트 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 이를 관찰하고 애널리시스- SIS3.2 소프트웨어(Soft-Imaging System, Germany)를 사용하여 25 분석하였다. 섬유화 영역을 측정하기 위하여, 심장 단편을 트릭롬 염색하였다. 그 결과 섬유화 영역은 청색으로, 정상조직은 적색으로 나타났다. 간질성 섬유화 영역은 단면 전체 영역에 대한 간질성 섬유화 영역의 비율로 계산하였다.

6. 정량적 RT-PCR

TRI 시약(Sigma)을 사용하여 총 RNA 를 분리하고 *ImProm II* 역전사효소(Promega) 및 올리고-dT 프라이머를 사용하여 역전사를
 5 수행하였다. PCR 은 형광 염료로서 SYBR 그린(Takara) 및 수동적 참조염료로서 ROX(Takara)을 구비한 ABI PRISM 시퀀스 디텍터 시스템 7500(Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였다.

랫트 PCR 프라이머로는 다음의 것을 사용하였다:

(i) ANF, 5' -CTG CTT CGG GGG TAG GAT TG-3' 및 5' -TGA CAC ACC
 10 ACA AGG GC;

(ii) CCN2, 5' -TAG CAA GAG CTG GGT GTG TG-3' 및 5' -TTC ACT
 TGC CAC AAG CTG TC-3'

및 (iii) CCN5, 5' -TTA GCA CTT GTG GTG GCT TG-3' 및 5' -CCA
 TTG AGA GAA GGC AGA GG-3' .

15 마우스 PCR 프라이머로는 다음의 것을 사용하였다:

(i) ANF, 5' -ACC TGC TAG ACC ACC TGG AGG AG-3' 및 5' -CCT TGG
 CTG TTA

TCT TCG GTA CCG-3'

(ii) β -MHC, 5' -GAC GAG GCA GAG CAG ATC GC 및 5' -GGG CTT CAC
 20 AGG CAT CCT TAG CC-3'

(iii) α -SKA, 5' -TGA GAC CAC CTA CAA CAG CA-3' 및 5' -CCA
 GAG CTG TGA TCT CCT TC-3'

(iv) 콜라겐 1, 5' - CGA AGG CAA CAG TCG CTT CA 및 5' -GGT CTT
 GGT GGT TTT GTA TTC GAT;

25 (v) TGF- β 1, 5' -GTG TGG AGC AAC ATG TGG AAC TCT A-3' 및 5' -
 TTG GTT CAG CCA CTG CCG TA-3'

(vi) GAPDH, 5' -TCC GTG TTC CTA CCC CCA ATG 및 5' -GGG AGT TGC
 TGT TGA AGT CGC.

7. 심장초음파검사

마우스를 마취시키고 흉부의 모를 제거하였다. 심장초음파는 파워비전 6000(TOSHIBA) 기구 및 12-MHz 마이크로프로브(PLM-1204AT, TOSHIBA)를 사용하여 수행하였다. 단축 관찰 및 2 차원 M 모드를 사용하여 심장을 스캔하였다.

8. 웨스턴 블롯 분석

RIPA 완충액(0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 소듐 디옥시콜레이트(Boston BioProducts) 및 프로테아제 억제 각테일(Boehringer Mannheim, Germany)의 조합을 사용하여 심근 조직을 용해하여 용해물을 얻었다. 총 200 μ g의 심근 조직 용해물을 SDS-PAGE 로 분리하고 PVDF 막(Schleicher & Schuell, Germany)으로 이전시켰다. 상기 막은 5% 무지방유로 블록킹하고 CCN2(Abcam, USA), CCN5(Santa Cruz, USA), 포스포-Smad 2(Cell Signaling, USA), Smad 2/3(Cell Signaling, USA) 및 Smad4(Cell Signaling, USA), Smad7(Invitrogen, USA) 및 α -액티닌(Cell Signaling, USA)에 대한 항체와 반응시켰다. 1 차 항체와의 반응은 냉실에서 하룻밤동안 수행하였다. 그 다음 상기 막을 홀스래디쉬 페록시다제(HRP Jackson ImmunoResearch)와 접합시킨 2 차 항체와 반응시키고, 화학 발광 기질(PerkinElmer)을 사용하여 현상하였다.

9. 통계자료

데이터는 평균 $\pm$ SD 값으로 표현하였다. 그룹 평균은 스튜던트 테스트 또는 본페로니(Bonferroni) 사후 테스트를 구비한 한 방향 ANOVA(Statview V5.0, SAS)를 사용하여 비교하였다. $P < 0.05$ 는 통계학적으로 중요하게 고려되었다.

실험결과

1. 심근세포에 있어, CCN2 및 CCN5 는 각각 호-심근비대(pro-hypertrophic) 및 반-심근비대(anti-hypertrophic) 인자이다.

중전 연구에서, 본 발명자들은 심근비대증의 발전 및 정상적인 심장으로 돌아오는 회복과정에 관한 모델을 보고한 바 있으며, 심장의 리모델링 과정동안 다르게 발현되는 수개의 유전자를 분리하였다. 이들 중에서, CCN2 및 CCN5 가 특히 흥미로웠다.

마이크로어레이 분석법을 사용하여 수행했던 중전 연구에서 관찰된 발현 패턴을 확인하기 위하여 정량적 RT-PCR 을 수행하였다(도 1A). 심근비대조건(TAC14) 하에서 CCN2 및 CCN5 는 모두 업레귤레이션 되었다. 그러나, 회복 기간 동안에는, CCN5 는 상승된 상태를 유지한 반면(TAC-R1) CCN2 는 급격히 다운레귤레이션 되었다. 이러한 발현 패턴에 기초하여, 본 발명자들은 CCN2 및 CCN5 가 각각 심근비대증의 발전 및 회복에 관여한다는 가설을 세웠다. 이 가설을 검증하기 위해, 우리는 CCN2 및 CCN5 를 발현하는 재조합 아데노 바이러스인 AdCCN2 및 AdCCN5 를 제작하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과 AdCCN2 및 AdCCN5-감염 심근세포는 단백질 발현을 나타내었으나, 비감염 또는 AdLacZ-감염 심근세포는 그렇지 않았다.

CCN2 및 CCN5 밴드의 외관상 분자량은 각각 41 kDa 및 31 kDa 이었으며, 이는 그들의 계산된 분자량 값과 일치하는 것이다(도 1B). 감염 후 24 시간 시점에 PE 를 첨가하여 심근세포 배양을 48 시간 동안 촉진하였다(도 1C).

현미경으로 세포 표면적을 측정하여 평가하였을 때, 상기 PE 처리는 비감염 및 AdLacZ-감염 심근세포 크기를 현저히 증가시켰다. AdCCN2 로 감염시킨 경우는 PE 존재 또는 부존재 모든 경우에 세포 크기가 현저히 증가하였다. 반면에, AdCCN5 감염은 PE-유도 세포 크기 증가를 완전히 억제하였다(도 1D). 심근세포 비대적 반응의 또 다른 특징은 α -액티닌 항체 면역 염색에 의해 탐지될 수 있는 근절의 현저한 재배열이다. PE-처리 또는 AdCCN2 감염이 근절을 현저하게 재배열시키는 반면에, AdCCN5 감염은 PE-유도 근절의 재배열을 억제하였다(도 1E). AdCCN2 및 AdCCN5 를

함께 감염시키면, AdCCN5 는 AdCCN2-유도 세포 크기 증가 및 근절의 재배열을 억제하였다(도 1F 및 G). 이러한 결과는 CCN2 및 CCN5 가 각각 호-심근비대(pro-hypertrophic) 및 반-심근비대적(anti-hypertrophic) 요소로서 작용함을 의미하고, CCN5 가 CCN2 에 대하여 음성 도미넌트 분자로서 작용함을 의미한다.

2. CT 도메인은 심근비대적 효능(hypertrophic effect)에 있어 중요하다.

CCN 단백질은 4 개의 구별되는 구조 도메인을 포함하는데, 예외적으로 CCN5 는 CT 도메인을 결여하고 있다. 종전의 연구는 CT 도메인이 단독으로 심근세포 비대를 유도할 수 있다는 것을 보였다. CCN2 및 CCN5 에서 CT 도메인의 역할을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 두개의 추가적인 아데노 바이러스를 제작하였다.

AdCCN2 Δ T 컨스트럭트는 CT 도메인을 결여한 CCN2 단백질을 인코딩하며, AdCCN5/CT 컨스트럭트는 CCN2 의 CT 도메인과 융합된 CCN5 단백질을 인코딩한다.

웨스턴 블롯 분석 결과, AdCCN2 Δ T 및 AdCCN5/CT 으로 감염된 심근세포에서의 단백질 발현을 확인하였다(도 2A). 감염 후 24 시간 시점에 PE 를 첨가하여 심근세포 배양을 48 시간 동안 촉진하였다(도 2B). 세포 크기 증가 및 근절 재배열 관점에서 평가하였을 때, CCN2 Δ T 및 CCN5/CT 의 효능은 각각 CCN5 및 CCN2 의 효능과 별반 차이가 없었다(도 2C 및 D). 이러한 결과는 CT 도메인이 CCN2 의 하이퍼트로픽 효능에 있어서 필수적인 역할을 함을 지시하며, CCN 단백질은 CT 도메인이 삭제된 경우 음성 도미넌트 분자로 작용할 수 있음을 지시한다. 이러한 데이터는 CCN5 가 천연의 음성 도미넌트 분자라는 가설을 뒷받침한다.

3. 인 비보에서 CCN2 과발현은 심근비대증을 유도하지 않는다.

인 *비보*에서 CCN2 의 역할을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 α -MHC(myosin heavy chain) 프로모터의 조절하 CCN2 를 발현하는 형질전환(TG) 마우스를 제조하였다(도 3A).

5 웨스턴 블롯 분석법은 상기 TG 마우스에서의 심근 CCN2 발현이 야생형(WT) 한배자손보다 4 배 높아졌음을 나타낸다(도 3B). CCN2 TG 마우스 및 WT 한배자손은 4 주간 대동맥 교차 협착(TAC) 상태에 둔 후, 심장의 형태학적 변화 및 전사 변화를 관찰하였다.

심장중량(HW) 대비 체중(BW) 비율 및 단면 면적(CSA)을 평가했을 때, CCN2 TG 마우스는 기준선에서 심근 비대증을 일으키지 않았을 뿐만 아니라 TAC 에 대해서도 증가된 하이퍼트로픽 반응을 일으키지 않았다(도 3C 및 D). 태아 유전자(예컨대, ANF, β -MHC, 및 SKA(skeletal-actin))의 유도는 심근비대증의 특징이다. 적량적 RT-PCR 분석결과, CCN2 TG 마우스의 경우 기준선에서 이러한 하이퍼트로픽 마커 유전자의 유도는 관찰되지 않았고, 또한 TAC 에 대해서도 현저히 증가하지는 않았다(도 3E).

15 β -MHC 의 경우는 예외였는데, CCN2 TG 마우스에서 상기 유전자의 TAC-의존적 업레귤레이션은 현저하게 증가하였다. 인 *비보*에서 CCN2-유도 심근비대증을 촉진하기 위해서 아직 알려지지 않은 다른 요소가 요구될 가능성이 있다.

20 4. 인 *비보*에서 CCN5 과발현은 압력 과부하-유도성 심근비대증을 억제한다.

인 *비보*에서 CCN5 의 역할을 조사하기 위하여, 우리는 CCN5 TG 마우스를 제조하였다(도 4A).

25 웨스턴 블롯 분석 결과, TG 마우스에서 심장 CCN5 발현은 WT 한배자손에서 보다 2 배 높았다(도 4B). CCN5 TG 마우스 및 WT 한배자손을 TAC 상태에 4 주간 두었다. TAC-유도성 심근 비대증은 HW/BW 비율 및 CSA 의 현저한 증가로 특징지어지는데, 이는 CCN5 TG 마우스에서 의미심장하게 억제되었다(도 4 C 및 D). 적량적 RT-PCR 분석 또한 TAC 에 의한 태아 유전자의 유도가 CCN5 TG 마우스에서 현저하게 억제되었음을 보여준다(도

4E). 이러한 결과는 CCN5 가 분리된 심근세포에서뿐만 아니라, 인
비/보에서도 반-심근비대 인자로서 기능함을 나타낸다.

5. 압력 과부하-유도성 심근 섬유증은 CCN2 TG 마우스에서 악화되나, CCN5
5 TG 마우스에서는 억제된다.

CCN2 가 TGF- β -매개 섬유증에 관여된다는 사실이 종전에 보고되어
왔다. TG 마우스 및 WT 한배자손을 TAC 상태에 4 주간 두고, 심장 단편을
트립크롬 염색으로 시험하였다(도 5A). TAC 는 섬유증을 현저하게
유도하였는데, 이는 트립크롬 염색된 섬유영역 증가 및 섬유증 마커
10 유전자인 콜라겐 1 과 TGF- β 의 증가된 발현으로부터 알 수 있다. 트립크롬
염색은 이러한 TAC-유도 섬유증이 CCN2 TG 마우스에서 크게 악화되었으나,
CCN5 TG 마우스에서는 현저하게 억제되었음을 보여준다(도 5B). 또한,
정량적 RT-PCR 은 CCN2 TG 마우스에서 콜라겐 1 및 TGF- β 의 업레귤레이션이
현저하게 격화된 반면, CCN5 TG 마우스에서는 억제되었음을 보여주고
15 있다(도 5C 및 D). 이러한 데이터는 CCN2 및 CCN5 가 각각 호-섬유증(pro-
fibrotic) 및 반-섬유증(anti-fibrotic) 요소라는 가설을 뒷받침한다.

6. CCN5 는 압력 과부하로 인한 심장 대상부전을 예방한다.

4 주간의 TAC 이후 심장 기능을 평가하기 위하여 초음파 심장
20 검진을 수행하였다.

TAC 과정을 겪은 WT 한배자손은 대조군(sham-operated) 마우스와
비교하여 전형적으로 분획 수축률(fraction shortening: FS)의 18 내지 20%
감소를 보였다. CCN2 TG 마우스는 FS 의 32% 감소를 보였는데, 이는 대조군
마우스와 비교하여 훨씬 두드러지는 것이었다(도 6A). 반면에 동일한
25 실험조건하에서 CCN5 TG 마우스에서는 FS 의 감소가 전혀 관찰되지
않았다(도 6B). CCN5 에 의한 심근비대증 및 섬유증의 억제는 TAC 에 의해
발생하는 심장 악화 또한 예방하는 것으로 보였다. 상기 결과를 하기 표
1 에 정리하였다.

【표 1】

Table 1. Echocardiographic Parameters in Sham and after AB in WT and CCN2, CCN5 TG Mice

	CCN2 WT			CCN2 TG			CCN5 WT			CCN5 TG		
	Sham n=8	TAC 4wks n=8		Sham n=8	TAC 4wks n=8		Sham n=8	TAC 4wks n=10		Sham n=10	TAC 4wks n=10	
BW, g	26.0±2.41	24.7±1.89		24.3±2.51	24.3±1.71		29.6±2.45	28.6±2.69		29.5±3.42	27.1±2.05	
MSTD, mm	0.85±0.08	0.94±0.14		0.78±0.07 ^d	1.04±0.28 ^a		0.83±0.08	1.03±0.13 ^a		0.89±0.10	0.93±0.13 ^d	
MSTS, mm	1.63±0.17	1.69±0.26		1.59±0.16	1.68±0.24 ^b		1.67±0.12	1.67±0.23		1.70±0.13	1.76±0.20	
EF	92.9±0.83	84.4±7.44		92.6±1.51	77.5±5.07		94.7±1.21	80.0±3.85 ^a		94.1±1.52	93.8±2.10 ^c	
FS %	59.1±1.46	48.5±8.30 ^b		59.3±3.33	40.6±4.60 ^{ad}		64.2±3.37	48.3±6.59 ^a		63.1±3.57	62.1±4.70 ^c	

^aP<0.01 vs Sham^bP<0.05 vs Sham^cP<0.01 vs NL^dP<0.05 vs NL

7. CCN5 는 TGF- β -SMAD 신호 경로를 억제한다.

세포질 단백질인 SMAD 는 세포 내 TGF- β 시그널을 매개하는 것으로 알려져 있다. TGF- β 는 SMAD2 및 SMAD3 의 인산화를 증가시키는데, 이들은 SMAD4 와 헤테로트라이머를 형성한다. 이 복합체는 핵 안으로 이동하여 목표 유전자의 전사를 활성화한다. SMAD7 는 이러한 신호 경로에서 억제적 역할을 한다. 본 발명의 발명자들은 CCN2 및 CCN5 가 TGF- β -SMAD 신호 경로에 영향을 주는지 여부를 판정하기 위하여 웨스턴 블롯을 수행하였다(도 7). 블롯 결과를 농도계로 판정해 보면, TAC 과정을 겪은 CCN2 TG 마우스의 경우 Smad2 및 Smad4 단백질 인산화 수준이 모두 증가한 반면, CCN5 TG 마우스에서는 약간 감소하였다. 또한, CCN2 TG 마우스에서 SMAD7 의 수준은 현저하게 감소하였으나, CCN5 TG 마우스에서는 상승된 상태로 남아있었다. 이러한 데이터는 CCN2 및 CCN5 가 TGF- β -SMAD 신호 경로를 조절함을 가리킨다.

15 결과분석 및 추가논의

본 발명의 연구에서, 본 발명자들은 CCN 족의 두 멤버인 CCN2 및 CCN5 가 각각 호-심근비대적 및 반-심근비대적 요소임을 밝혀내었다. 그 뿐만 아니라 본 발명자들은 이러한 분자들이 압력 과부하-유도 심장 섬유증에 대하여 반대되는 효능을 가짐을 보였다.

CCN2 는 PE 의 존재 및 부존재 하에서 세포 성장 및 근절 재배열을 유도한 반면, CCN5 는 PE-유도 비대적 현상을 억제하였다. CT 도메인이 삭제된 경우, CCN2 는 CCN5 처럼 행동하였다(도 2A-D). 이러한 결과는 이전에 보고된 바와 같이[12] CCN2 의 하이퍼트로픽 활성화에 있어서 CT 도메인이 결정적인 역할을 함을 가리킨다. 함께 감염시킨 경우 CCN5 는 CCN2-유도 비대적 현상을 억제하였는데(도 2E 및 F), 이는 CCN5 가 CCN2 에 대하여 음성적 도미넌트 분자로서 작용함을 제시한다.

본 발명자들은 CCN2 는 현저하게 압력 과부하-유도 심장 섬유증을 촉진함을 밝혀내었다(도 5). 아직 알려지지 않은 분자가 인 비보에서

CCN2 의 프로-하이퍼트로픽 효능에 요구될 가능성이 있으나, 프로-피브로틱 효능에 대해서는 그렇지 않다.

또한 본 발명자들은 CCN5 가 압력 과부하-유도 심근비대증 및 섬유증(도 4 및 5), 그리고 대상부전(도 6)을 억제함을 밝혀냈었다. CCN2
5 및 CCN5 사이의 균형이 심근비대증 및 섬유증 상태를 결정한다는 가설은 장래 연구 주제가 될 수 있을 것이다.

CCN 단백질은 상술한 바와 같이 구별되는 4 개의 도메인을 포함하는데, CCN5 는 예외적으로 CCN2 의 심근비대적 활성화에 결정적인 CT 도메인을 결여한다. 본 발명의 연구에서 하나의 흥미로운 발견은
10 CCN2 에서의 CT 도메인 삭제는 CCN2 을 CCN5-유사 음성 도미넌트 분자로 만든다는 것이다. CCN5 는 그것의 온전한 vWC 도메인을 통하여 TGF- β 에 결합할 수 있지만, CT 도메인이 결여된 경우 TGF- β 가 그것의 수용체로 결합하는 것을 방해할 가능성이 있다. 추가적인 생화학적 분석으로 상기 가설을 시험하는 것이 옳을 것이다.

본 발명자들은 TGF- β 시그널링이 CCN2 및 CCN5 에 의해 조절됨을
15 보였다. 수개의 연구는 TGF- β 시그널링이 심근비대증 및 섬유증에 관여함을 제안하였다[33]. TG 마우에서 TGF- β 의 과발현은 심근세포의 과도한 성장으로 특징지어지는 심근비대증 및 섬유증을 초래한 반면[34], 중화 항체를 사용한 TGF- β 표적 붕괴 또는 차단은 심근비대증을
20 억제하였다[35]. 최근, SMAD4 는 심근세포의 과다성장에서 아폽토시스로의 변천을 유발하는 것으로 알려졌다[36]. 따라서, 압력 과부하 상태에서 CCN5 에 의한 심장 기능 보존은 CCN5 에 의한 TGF- β -SMAD 신호 경로의 억제에서 비롯된 것으로 판단된다. 심장 섬유증은 병리학적 비대증의 전형적인 특징이며 콜라겐 축적으로 인한 세포 외 기질의 확장으로
25 특성화된다[37].

CCN2 는 TGF- β 프로-피브로틱 활성을 매개하는 프로-피브로틱 요소 중의 하나이다. CCN5 에 의한 심장 섬유증의 억제는 CCN5 에 의한 CCN2 의 직접적인 억제에서 기인할 수 있다. 결론적으로 본 발명의 데이터는 CCN5 가

인 비트로 및 인 비보 모두에서 병리학적 자극에 대응한 심근비대증 및 섬유증을 억제함을 보여준다.

CCN5 는 TGF- β -SMAD 신호 경로를 차단함에 의해 이러한 안티-하이퍼트로픽 및 안티-피브로틱 효능을 행사한다. 따라서 우리는 CCN5 및
5 CCN2 Δ CT 단백질이 심근비대증, 섬유증, 심근증(cardiomyopathy), 심부전(heart failure) 및 심장대상부전 치료제로서의 신규한 용도를 가짐을 제안한다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지
10 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참고문헌

- 15 [1] Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, 341(17):1276-83(1999).
- [2] Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med*, 121(5):363-71(1994).
- 20 [3] Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(1):H8-H16(2005).
- [4] Molkenstein JD, Dorn GW, 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, 63:391-426(2001).
- 25 [5] Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*, 363(9402):62-4(2004).
- [6] Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*, 14(5):608-16(2002).

- [7] Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*, 32(10):1805-19(2000).
- 5 [8] Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol*, 21(6):473-82(2002).
- [9] Matsui Y, Sadoshima J. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and
- 10 hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 37(2):477-81(2004).
- [10] Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, et al. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 30(11):2411-22(1998).
- 15 [11] Yun SH, Shin JO, Lim BK, Kim KL, Gil CO, Kim DK, et al. Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Cocksackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse. *Virus Res*, 126(1-2):62-8(2007).
- [12] Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, et al.
- 20 Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 370(2):274-8(2008).
- [13] Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, et al. Correction: Connective Tissue Growth Factor Overexpression in Cardiomyocytes Promotes Cardiac Hypertrophy and Protection against
- 25 Pressure Overload. *PLoS One*, 4(9)(2009).
- [14] Zhang R, Averboukh L, Zhu W, Zhang H, Jo H, Dempsey PJ, et al. Identification of rCop-1, a new member of the CCN protein family, as a

negative regulator for cell transformation. *Mol Cell Biol*, 18(10):6131-41(1998).

[15] Delmolino LM, Stearns NA, Castellot JJ, Jr. COP-1, a member of the CCN family, is a heparin-induced growth arrest specific gene in
5 vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 188(1):45-55(2001).

[16] Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, et al. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*,
10 95(25):14717-22(1998).

[17] Lake AC, Castellot JJ, Jr. CCN5 modulates the antiproliferative effect of heparin and regulates cell motility in vascular smooth muscle cells. *Cell Commun Signal*, 1(1):5(2003).

[18] Lake AC, Bialik A, Walsh K, Castellot JJ, Jr. CCN5 is a growth
15 arrest-specific gene that regulates smooth muscle cell proliferation and motility. *Am J Pathol*, 162(1):219-31(2003).

[19] Mason HR, Lake AC, Wubben JE, Nowak RA, Castellot JJ, Jr. The growth arrest-specific gene CCN5 is deficient in human leiomyomas and inhibits the proliferation and motility of cultured human uterine
20 smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod*, 10(3):181-7(2004).

[20] Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol*, 107(3):404-11(1996).

25 [21] Kireeva ML, Latinkic BV, Kolesnikova TV, Chen CC, Yang GP, Abler AS, et al. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res*, 233(1):63-77(1997).

- [22] Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol*, 178(2):169-75(2003).
- [23] Ball DK, Surveyor GA, Diehl JR, Steffen CL, Uzumcu M, Miranda MA, et al. Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective
5 tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biol Reprod*, 59(4):828-35(1998).
- [24] Yang DK, Choi BY, Lee YH, Kim YG, Cho MC, Hong SE, et al. Gene profiling during regression of pressure overload-induced cardiac
10 hypertrophy. *Physiol Genomics*, 30(1):1-7(2007).
- [25] Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*, 267(15):10551-60(1992).
- 15 [26] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 322(22):1561-6(1990).
- [27] Katz AM. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of
20 prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med*, 322(2):100-10(1990).
- [28] Hardt SE, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 63(3):500-9(2004).
- [29] Chen Y, Abraham DJ, Shi-Wen X, Pearson JD, Black CM, Lyons KM, et
25 al. CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell*, 15(12):5635-46(2004).

[30] Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol*, 4(8):599-604(2002).

[31] Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*, 327(2):125-30(1993).

[32] McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, 73(3):421-4(1993).

[33] Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, 63(3):423-32(2004).

[34] Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, et al. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(3):H1253-62(2002).

[35] Zhao XY, Zhao LY, Zheng QS, Su JL, Guan H, Shang FJ, et al. Chymase induces profibrotic response via transforming growth factor-beta 1/Smad activation in rat cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 310(1-2):159-66(2008).

[36] Heger J, Peters SC, Piper HM, Euler G. SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. *J Cell Physiol*, 220(2):515-23(2009).

[37] Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*, 39(2):258-63(2002).

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음을 포함하는 심부전 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

- (a) (i) CCN(Cyr61, CTGF, and Nov)5 단백질을 코딩하는
 5 뉴클레오타이드 서열 또는 (ii) CCN2 에서 CT 도메인이 결손된 CCN2 Δ CT
 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 담체의
 약제학적 유효량; 및
 (b) 약제학적으로 허용되는 담체.

10 【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 CCN5 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드
 서열은 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을
 특징으로 하는 약제학적 조성물.

15 【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 CCN2 Δ CT 단백질을 코딩하는
 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 2 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을
 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

20 【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 유전자 담체는 플라스미드, 재조합
 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV),
 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 배시니아
 바이러스, 리포솜 또는 니오솜인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

25

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 유전자 담체는 재조합 아데노바이러스인
 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 심부전은 심근비대증(cardiac hypertrophy), 심근증(cardiomyopathy), 관상 동맥 경화증, 심근 경색, 심장 판막증, 고혈압 또는 심장 섬유화(cardiac fibrosis)에 의해 유발된
5 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 CCN5 단백질 또는 CCN2 ΔCT 단백질은 TGF-β-SMAD 신호 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

10

【청구항 8】

다음을 포함하는 심부전 예방 또는 치료용 억제학적 조성물:

(a) (i) CCN5 단백질 또는 (ii) CCN2 에서 CT 도메인이 결손된 CCN2 ΔCT 단백질의 억제학적 유효량; 및

15

(b) 억제학적으로 허용되는 담체.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 CCN5 단백질은 서열목록 제 3 서열에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

20

【청구항 10】

제 8 항에 있어서, 상기 CCN2 ΔCT 단백질은 서열목록 제 4 서열에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

25

【청구항 11】

다음의 단계를 포함하는 심부전(heart failure) 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법:

(a) CCN5 단백질의 유전자를 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 CCN5 단백질 유전자의 발현을 분석하는 단계, 상기 시험물질이 CCN5 단백질 유전자의 발현을 증가시키면 심부전 예방 또는
5 치료제로 판단한다.

【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 상기 세포는 심장으로부터 유래한 세포인 것을
특징으로 하는 방법.

10

【청구항 13】

제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 유전자 발현의 분석은 CCN5
유전자의 RNA 또는 CCN5 단백질을 측정하여 실시되는 것을 특징으로 하는
방법.

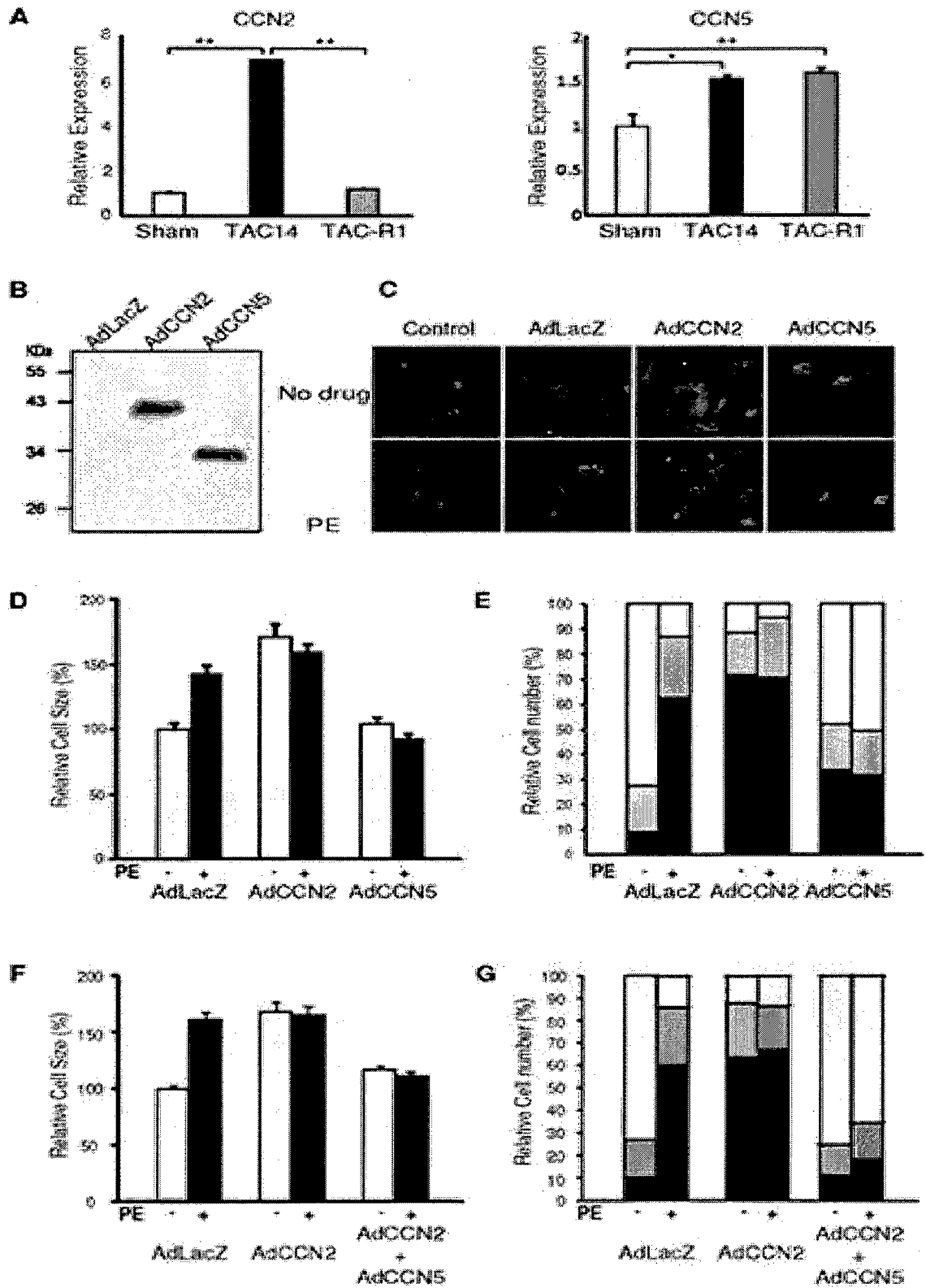
15

【청구항 14】

상기 제 1 항 내지 제 10 항의 약제학적 조성물을 필요로 하는
대상(Subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 심부전 예방 또는 치료방법.

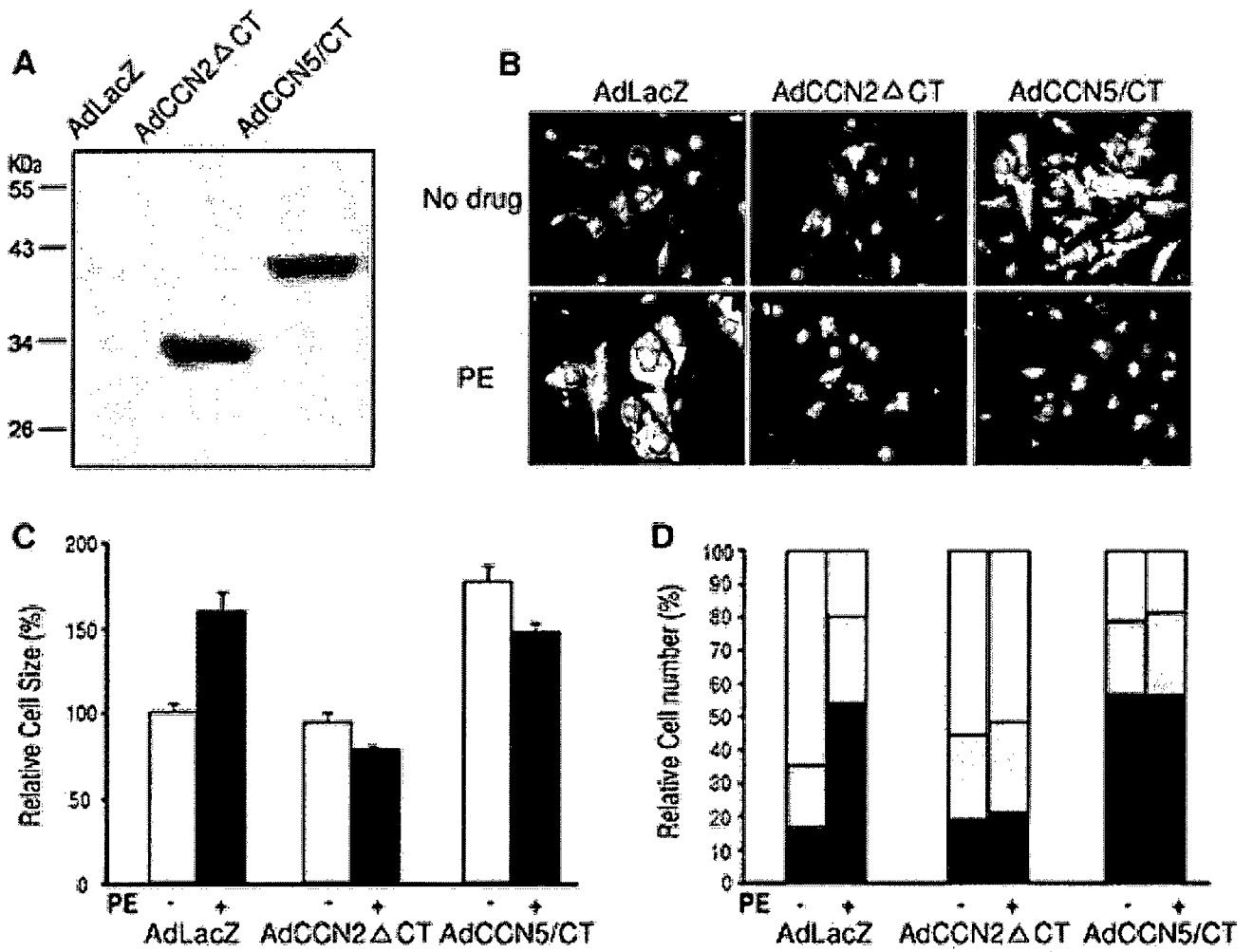
1/6

51



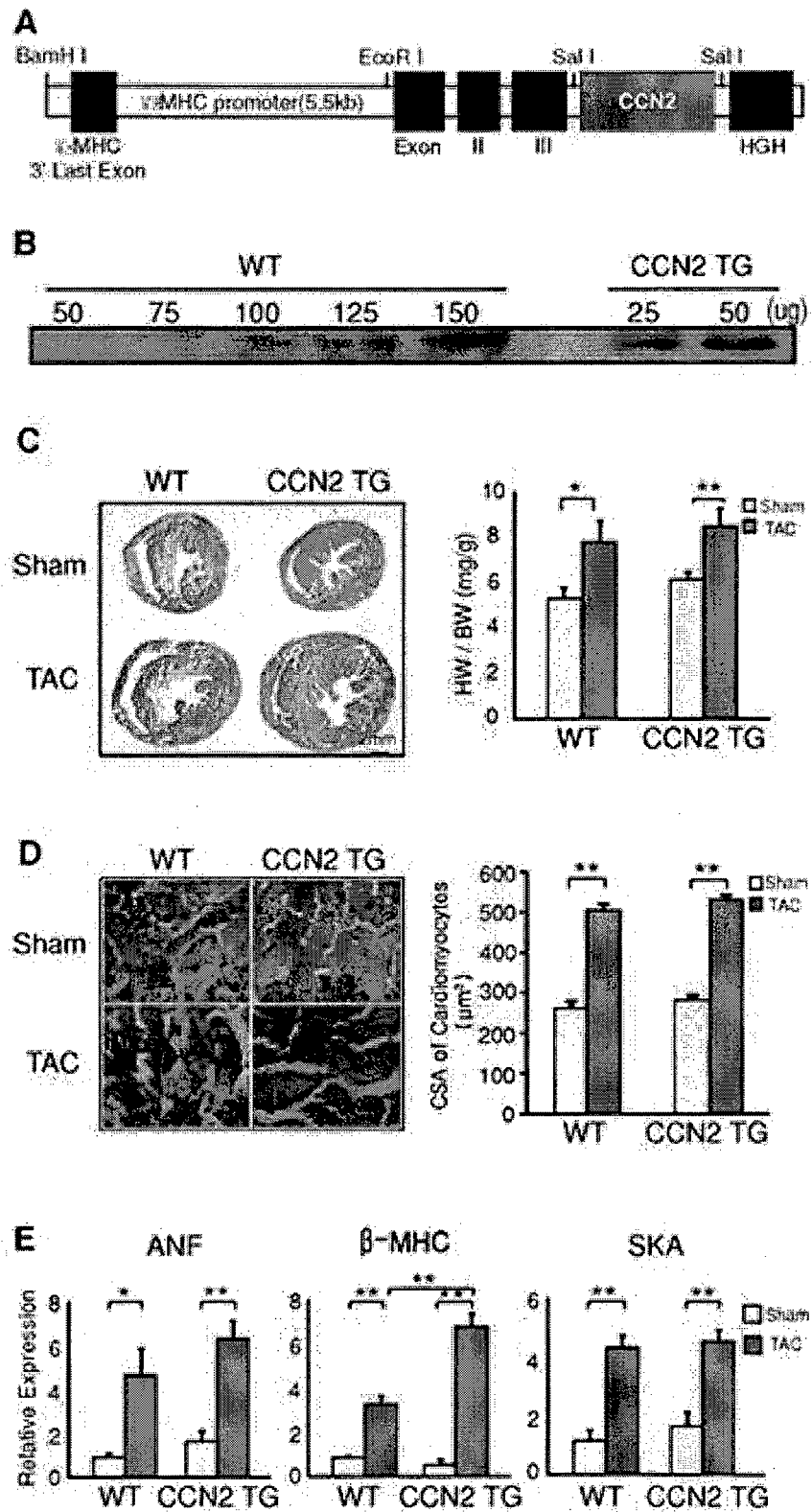
2/6

도 2



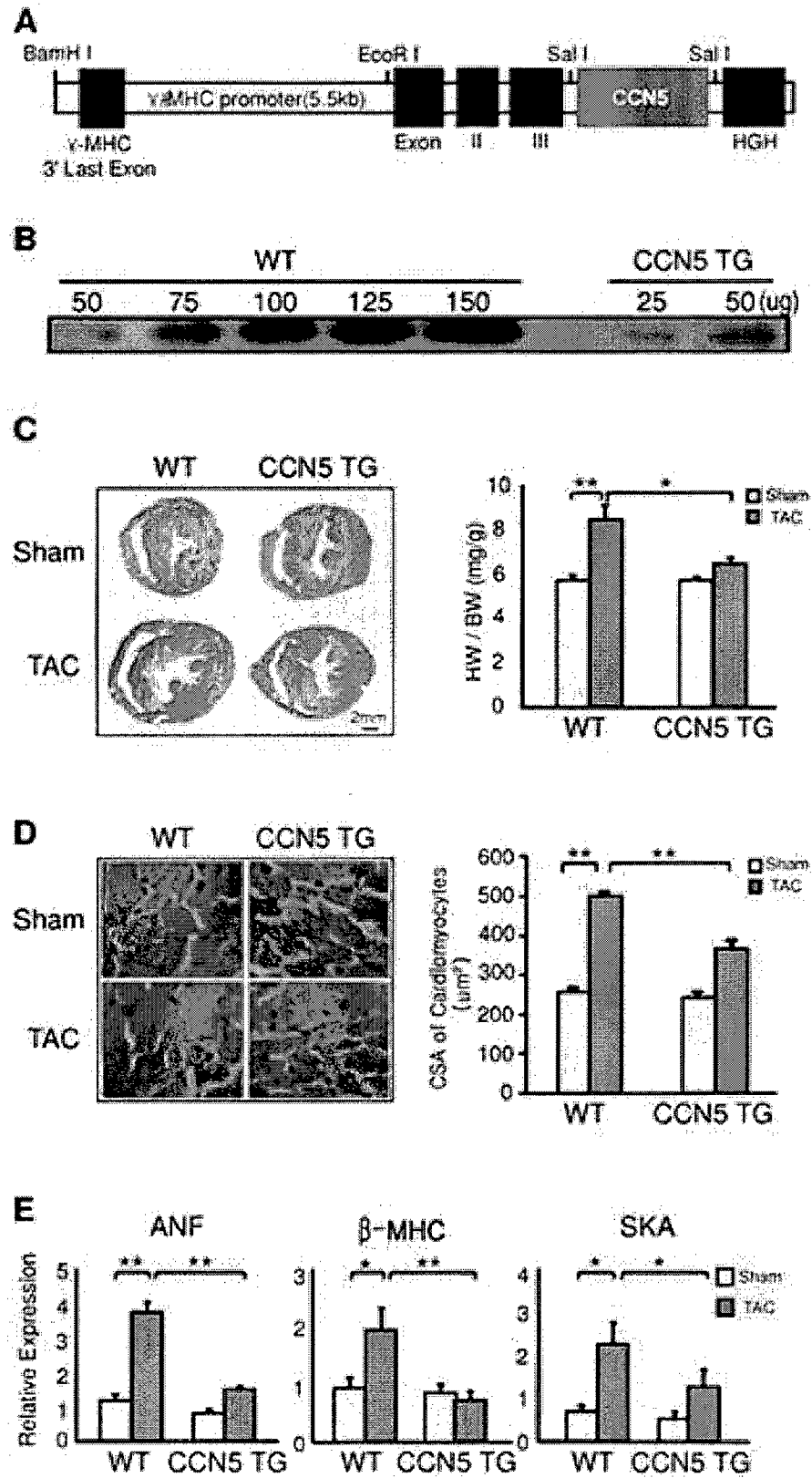
3/6

도 3



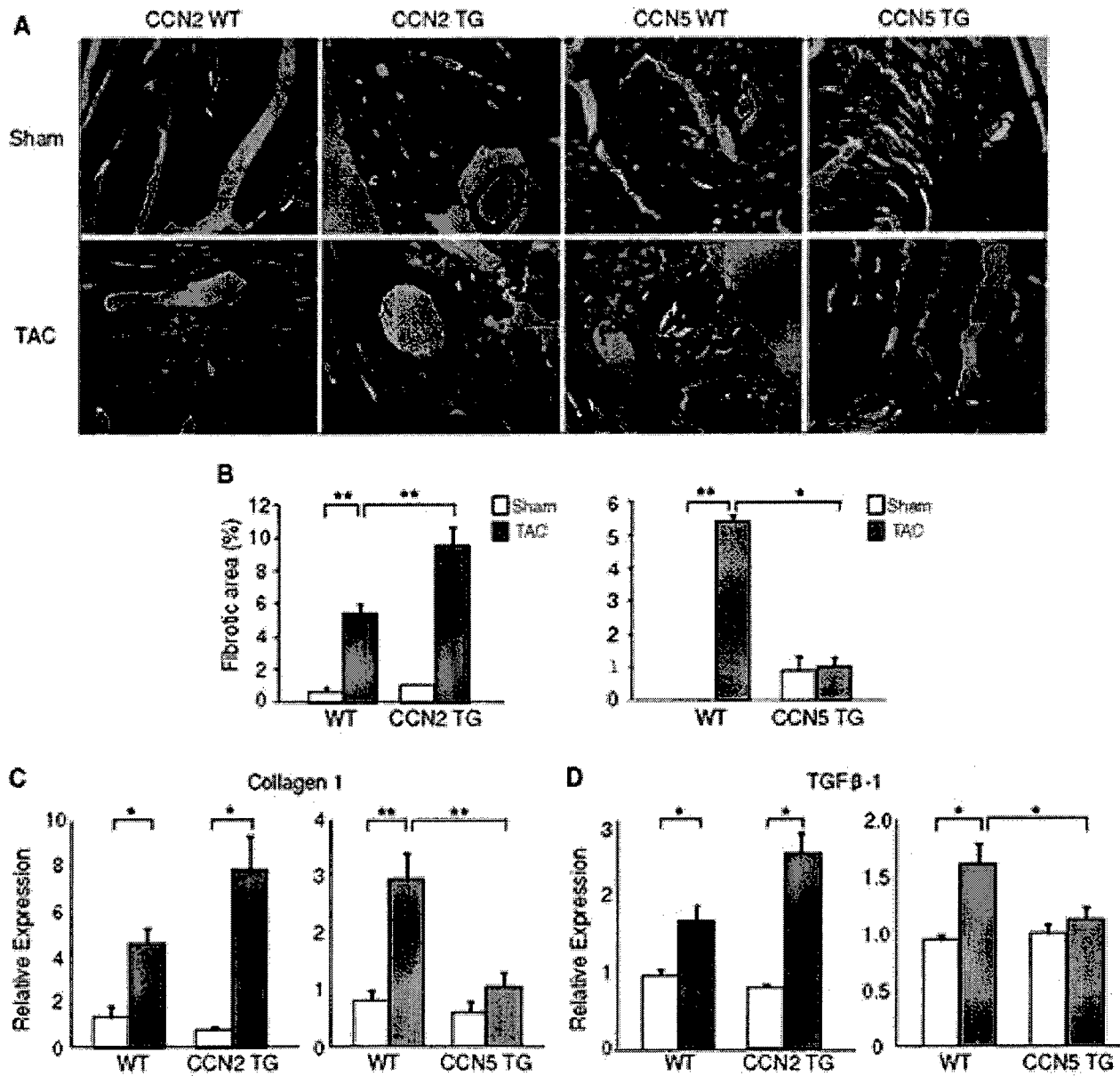
4/6

도 4



5/6

도 5



6/6

Figure 6

