



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0049978
(43) 공개일자 2025년04월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/433 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 9/04 (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/433 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0135077
(22) 출원일자 2024년10월04일
심사청구일자 2024년10월04일
(30) 우선권주장
1020230131969 2023년10월04일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
- (72) 발명자
박준범
서울특별시 양천구 신정로 290, 303동 602호 (신정동, 신트리3단지아파트)
- (74) 대리인
특허법인한얼
- (71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
- (72) 발명자
박혜원
인천광역시 중구 은하수로 412 (운남동, 영종센트럴 푸르지오자이)
(뒷면에 계속)

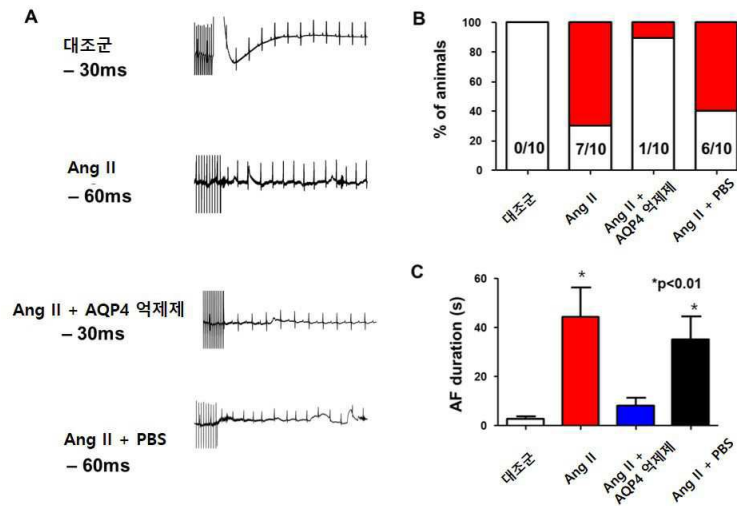
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 아쿠아포린 4 억제제의 심방세동 및/또는 심부전 치료 용도

(57) 요약

본 발명은 아쿠아포린 4 억제제의 심방세동 및/또는 심부전 치료 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61P 9/04 (2018.01)

A61P 9/06 (2018.01)

(72) 발명자

김예지

서울특별시 양천구 오목로 300(목동, 현대하이페리온2) 206동 3305호

박혜림

인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 70, 1305동 4204호 (송도동, 송도 더샵 퍼스트파크 F13-1BL)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711186647

과제번호 2-2022-1702-000-2

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업(통합)-중견연구자지원사업-(유형1-1)중견연구

연구과제명 심방세동과 치매의 공동병인 규명을 위한 아쿠아포린4 수분통로 단백질 기반 심방세동

개선 연구

과제수행기관명 이화여자대학교

연구기간 2022.09.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345362440

과제번호 69375-1

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중점연구소

연구과제명 [Ezbaro] 의과학연구소

과제수행기관명 인하대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

아쿠아포린 4(aquaporin 4; AQP4) 억제제를 유효성분으로 포함하는 심방세동(atrial fibrillation; AF), 또는 심부전(heart failure)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 IL-6, TNF- α , IL-1 β , AT1R, AKT, ERK, HMGB1, HIF-1 α , NOX2, NOX4, COX2, TGF- β , MMP9, 및 MMP2로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 mRNA, 또는 단백질의 발현을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 안지오텐신 II(angiotensin II; Ang II)에 의해 유도되는 칼슘 이온 과도 현상 또는 심장 비대화를 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 AQP4 억제제는 화합물, 펩타이드, 항체, 결합 단편, siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 앵타머인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 AQP4 억제제는 N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드(N-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)nicotinamide)인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 AQP4 억제제는 각각 서열번호 23와 24, 25와 26, 및 27과 28의 센스 및 안티센스 서열쌍으로 표시되는 siRNA인 것인, 약학적 조성물:

서열번호 23: CUGGUGGAGUAAUAAUCATT,

서열번호 24: UGAUUUUAAUCCACCAGTT,

서열번호 25: GAGUGGUGCAUGUGAUUGATT,

서열번호 26: UCAAUCACAUGCACCACUCTT,

서열번호 27: CCAUCGUCUUGACUUAUUGATT,

서열번호 28: UCAAUAGUCAAGACGAUGGTT3.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 AQP4 억제제는 서열번호 29 내지 31의 서열을 갖는 shRNA인 것인, 약학적 조성물:

서열번호 29: CGAACTGATGTTACTGGTTCAA,

서열번호 30: GGAGAGGTATTGTCTCCGTAT,

서열번호 31: GCAATTGGACATTGTTTGCAA.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아쿠아포린 4 억제제의 심방세동 및/또는 심부전 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 심방세동(atrial fibrillation; AF)은 심실상 부정맥으로 잘 알려져 있다. 동물 연구에 따르면 심방 섬유증은 심방세동의 유도 및 지속에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 심방 섬유증은 전도에서 심방간 불균일성을 유발하여 국소 재진입을 위한 기질 및 심방세동의 진행성 특성에 기여한다. 레닌-안지오텐신 시스템, 특히 안지오텐신 II(angiotensin II; Ang II)는 심방세동 동안 심장 리모델링의 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 제안되었다. 심방세동의 리모델링 과정과 관련된 주요 단백질 및 기전은 이온 채널의 발현 변화(활동 전위 지속 시간 감소 유발), Ca^{2+} 처리 단백질(세포내 Ca^{2+} 제거 및 방출 장애) 또는 코넥신(connexins, 심방 내 전도 장애)을 포함한다. 또한, 변경된 RyR2를 통한 자발적인 근형질 세망(sarcoplasmic reticulum) Ca^{2+} 방출은 AF의 트리거로 작용할 수 있으며, AF의 재진입 및 유지를 촉진하는 기질로 작용하는 섬유증을 증가시켜 AF를 유도할 수 있다. 그러나, 심방세동 유발 심방 섬유증의 발생에 중요한 정확한 하류 분자는 아직까지 불분명하며, 아직까지 심방세동의 명확한 진단법이 없는 실정이다.

[0004] 한편, 아쿠아포린 4는 수분통로 단백질로서 포유류에서 13가지 유형이 확인되었다. 신장은 인체에서 AQP가 가장 중요한 역할을 하는 기관이며 AQP2가 가장 지배적이다. 특히 AQP4는 뇌에서 그 역할이 가장 중요하며, 심장 근육에서는 AQP1, 3, 4, 7이 중요한 단백질 신호를 나타낸다. AQP4는 뇌와 심장조직 모두에서 부종발생에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. AQP4는 세포막에 단일 사합체이지만 AQP4는 다른 AQP와는 다르며, 사합체(tetramer) 또는 이합체(dimer)가 모여있는 사각형 배열로 존재하며 투수성이 가장 높은 역할을 한다.

[0005] 이러한 AQP4의 역할은 주로 허혈 모델을 중심으로 연구되었다. AQP4 녹아웃 마우스는 생체 외 허혈 재관류 모델 및 재관류 없는 생체 내 허혈 모델에서 경색 크기의 감소를 나타내는 것으로 관찰되었다. 마우스 HL-1 세포를 사용한 실험 연구에서 AQP4 억제제는 허혈 및 허혈/재관류 동안 세포사멸을 억제하는 효과를 보였다. 이와 같이 심근경색 등과 같은 심혈관 질환에서 AQP4의 역할이 연구되어 왔으나, AQP4와 AF 및/또는 심부전 사이의 연관성에 대해서는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Arie O. Verkerk et al., Int. J. Mol. Sci., 2019, 20(8): 2039.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 아쿠아포린 4(aquaporin 4; AQP4) 억제제를 유효성분으로 포함하는 심방세동(atrial fibrillation, AF), 또는 심부전(heart failure)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심방세동, 또는 심부전의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0012] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0013] 아울러, 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0015] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0017] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 아쿠아포린 4(aquaporin 4; AQP4) 억제제를 유효성분으로 포함하는 심방세동(atrial fibrillation; AF), 또는 심부전(heart failure)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 용어, "심방세동(atrial fibrillation; AF)"이란 불규칙하며(irregular) 종종 매우 빠른 심장 박동(heart rhythm)을 의미한다. 상기 불규칙한 심장 박동은 부정맥(arrhythmia)이라고도 한다. 이러한 심방세동은 심장에 혈전을 일으킬 수 있으며, 이러한 상태는 또한 심부전(heart failure) 등 기타 심장 관련 합병증의 위험을 증가시킬 수 있다. 상기 심방세동이 발생하는 동안 심방(atria)이라 불리는 심장 상부의 방은 무질서하고 chaotically 불규칙하게 박동하며, 심실(ventricles)이라 불리는 심장 하부의 방과 동기화되지 않는다. 심방세동은 다수의 환자에서 무증상일 수 있으나, 빠르고 두근거리는 심장박동, 숨가쁨 또는 현기증을 유발할 수도 있다. 본 발명에서 심방세동 관련 질환은 심방세동 또는 이에 의해 유래된 2차 질환, 예컨대 심부전을 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 용어, "심부전(heart failure)"이란, 심실이 이완되면서 전신과 폐에서 혈액을 받아들이는 충만 작용과 심실이 수축하면서 전신 및 폐로 혈액을 내보내는 박출 작용을 하면서 혈액 순환을 유지하는 장기인 심장에 각종 심장질환으로 인해 구조적 혹은 기능적 이상이 생겨 심실의 혈액 충만 또는 박출에 이상이 발생한 상태를 심부전이라 한다. 예컨대, 심부전으로 인한 증상으로는 좌심실의 충만 이상으로 인해 폐에 물이 차면 호흡곤란이 생기고, 좌심실 박출 장애로 인해 피로, 쇠약감이 생길 수 있으며, 우심실의 충만 장애로 인한 다리 부종, 복수, 흉수로 인한 호흡곤란 등의 증상이 나타날 수 있다. 예컨대, 심부전은 좌심실의 박출 기능에 따라 박출률 감소 심부전, 박출률 경도 감소 심부전, 박출률 보존 심부전으로 구분될 수 있다. 심부전의 가장 일반적인 원인은 심장 근육에 산소와 영양분을 공급하는 혈관의 일부 또는 전부가 막히는 상태인 관상동맥(심장동맥) 질환일 수 있다. 혈액 공급이 원활하지 않은 심장은 정상적으로 이완 및 수축할 수 없다. 그 외에 고혈압이 오래 지속된 경우나 기타 다양한 원인에 의해 심부전이 발생할 수 있으므로, 원인에 따라 치료 역시 다양합니다. 약물치료를 받으면 심장의 활동이 개선되고 심부전 증상이 완화됩니다. 하지만 대개 심장 기능이 정상화되지는

않으며, 계속 악화되기도 합니다. 이외 다른 원인으로는 심방세동, 심장 판막질환, 심장 근육 질환(심근병증), 또는 빈혈, 갑상선 질환, 콩팥 질환 등을 포함한 이외 기타 질환들이 있을 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물의 투여로 심방세동 및/또는 심부전의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0023] 본 발명의 용어, "아쿠아포린 4 억제제(aquaporin 4 inhibitor; AQP4 억제제)"는 AQP4 mRNA 또는 AQP4 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제를 모두 통칭하며, 구체적으로는 AQP4의 발현을 전사 수준에서 방해하여 AQP4의 발현을 감소시키는 모든 제제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 "AQP4"는 별도의 언급이 없는 한 AQP4 mRNA와 단백질을 모두 지칭하는 것으로 해석될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 AQP4 억제제는 소분자 화합물, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 아쿠아포린 4의 활성을 억제하거나, 발현을 저해할 수 있는 물질인 한 그 형태는 이에 제한되지 않는다.

[0024] 일 예로, 본 발명의 AQP4 억제제는 AQP4에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 화합물, 항체 또는 결합 단편일 수 있다.

[0025] 또 다른 일 예로, AQP4 억제제는 폴리뉴클레오티드 기반인 것일 수 있다.

[0026] 또 다른 일 예로, 본 발명의 AQP4 억제제는 AQP4 mRNA 특이적으로 RNAi 현상을 유도함으로써, 상기 AQP4를 억제하는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명에서 용어, "RNA 간섭(RNA interference, RNAi)"이란 표적 유전자의 mRNA와 상동 서열인 센스(sense) RNA와, 이와 상보적인 서열인 안티센스(anti-sense) RNA로 구성되는 이중 사슬 RNA(double strand RNA, dsRNA)를 도입함으로써 dsRNA에 의해 전사 후 표적 유전자 mRNA의 파괴를 유도하여 표적 유전자의 발현을 80% 이상 억제할 수 있는 현상으로, 유전자 침묵(silencing)으로도 명명된다.

[0028] 그 예로, 본 발명의 AQP4 억제제는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 앵타머 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 억제제는 표적 서열에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으며, 상기 표적 서열은 AQP4의 유전자 또는 mRNA일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어, "siRNA(small interfering RNA)" 및 "shRNA(small hairpin RNA)"란 RNA 간섭(RNA interference, RNAi) 또는 유전자 침묵(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다.

[0031] 상기 siRNA는 RNAi 현상을 유도하는 약 21~22bp의 짧은 dsRNA를 의미한다.

[0032] 또한, 이러한 siRNA를 장기간 동안 세포 내에서 발현시켜 표현형(phenotype)을 변화시킬 수 있는 벡터 시스템으로써, 짧은 RNA 전사체를 전사할 수 있는 RNA pol III 프로모터(예컨대, U6 프로모터, H1 프로모터 등) 하에서 siRNA의 센스 올리고뉴클레오티드 및 이와 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 적당한 개수(5~9 nt)의 루프(loop) 서열을 사이에 두고 위치하여 발현되어 짧은 헤어핀 구조의 RNA(small hairpin RNA, shRNA)가 합성되도록 하는 벡터가 개발된 바 있다. 이렇게 합성된 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소인 다이서(Dicer) 또는 Rnase III 등에 의해 절단되면서 8 내지 30 뉴클레오티드 크기의 dsRNA인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 표적 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 유전자 침묵을 유도할 수 있다.

[0033] 따라서, shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다.

[0034] 상기 siRNA의 제조방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0035] 진술한 구현에 중 다른 하나의 예로, 본 발명의 AQP4 억제제는 AQP4를 타겟으로 하는 shRNA일 수 있다. 본 발명의 AQP4를 타겟으로 하는 shRNA는 센스 올리고뉴클레오타이드 및 이와 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 상기 센스와 안티센스 올리고뉴클레오타이드 사이에 루프 서열을 포함하는 것 일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 용어, "miRNA(micro RNA)"란 세포 내에서 자연적으로 존재하는 물질로, RNAi 현상을 유도하여 특정한 유전자의 조절에 관여하는 물질을 의미한다. 본 발명의 IGFBP3의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 miRNA라면 그 종류에 한정되지 않고 본 발명에 포함될 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열은 AQP4 표적 서열에 상보적이고, 상기 서열에 결합할 수 있는 DAN 또는 RNA 서열일 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 5 내지 100 nt, 8 내지 60 nt, 10 내지 40 nt 또는 10 내지 30 nt일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여되거나, 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성된 형태로 투여될 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법은 본 발명의 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 생물/화학적 방법에 의하여 합성될 수 있다. 또한, 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 하는 형태는 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 발현시키는 재조합백터 등을 이용하여 실현할 수 있고, 이러한 방법은 본 발명의 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 따라서, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은 서열번호 2의 염기서열을 참조하여, 본 발명의 기술분야에서 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 용어, "애포타머(aptamer)"란 단일가닥 올리고뉴클레오타이드로, 20 내지 60 뉴클레오타이드 정도의 크기이며, 소정의 표적에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가지며, 항원-항체 반응처럼 특정 물질과 높은 친화력을 가질 수 있다. 애포타머는 소정의 표적에 결합함으로써, 소정의 표적의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 애포타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 또한 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 바람직하게 상기 애포타머는 AQP4 mRNA에 결합하여 AQP4의 발현 또는 활성을 저해하는 역할을 할 수 있다.
- [0043] 진술한 구현에 중 또 다른 하나의 예로, 본 발명의 AQP4 억제제는 AQP4를 타겟으로 하는 shRNA를 발현하는 백터일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 용어, "백터(vector)"란 목적하는 DNA 단편을 숙주 세포에 도입시켜 증식할 수 있는 DNA로써 클로닝 운반체(cloning vehicle)라고도 한다. "발현 백터"는 목적하는 코딩서열과, 특정 숙주생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 본 발명에서 상기 백터는 발현 백터와 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 백터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 백터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 백터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 백터 또는 코스미드 백터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있고, 플라스미드 백터로서 pDZ계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있으며, 바이러스 백터로서 아데노-연관 바이러스(AAV) 백터, 아데노바이러스 백터, 헤르페스 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터, 렌티바이러스 백터, 백시니아바이러스 백터, 폭스바이러스 백터, 단순포진바이러스 백터 등을 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 폴리뉴클레오타이드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동 재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 목적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 백터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오타이드가

숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 상기 형질전환 하는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 (CaPO_4) 침전, 염화칼슘 (CaCl_2) 침전, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열 또는 발현조절영역과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 구체적으로, 상기 AQP4 억제제는 소분자 화합물의 일종인 N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드(N-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)nicotinamide)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 예컨대, 상기 AQP4 억제제는 각각 서열번호 23와 24, 25와 26, 및 27과 28의 센스 및 안티센스 서열쌍으로 표시되는 siRNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0051] 서열번호 23: CUGGUGGAGUAAUAAUCATT,

[0052] 서열번호 24: UGAUUUAUAAACUCCACCAGTT,

[0053] 서열번호 25: GAGUGGUGCAUGUGAUUGATT,

[0054] 서열번호 26: UCAUACACAUGCACCACUUCT,

[0055] 서열번호 27: CCAUCGUCUUGACUAUUGATT,

[0056] 서열번호 28: UCAAUAGUCAAGACGAUGGTT3.

[0057] 예컨대, 상기 AQP4 억제제는 서열번호 29 내지 31의 서열을 갖는 shRNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0058] 서열번호 29: CGAACTGATGTTACTGGTTCAA,

[0059] 서열번호 30: GGAGAGGTATTGTCTTCCGTAT,

[0060] 서열번호 31: GCAATTGGACATTTGTTTGCAA.

[0061] 상기 모든 서열은 5'으로부터 3' 방향으로 제공된다.

[0063] 본 발명의 약학적 조성물은 섬유증 관련 유전자의 발현을 억제함으로써 상기 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0064] 예컨대, 본 발명의 조성물은 IL-6, TNF- α , IL-1 β , AT1R, AKT, ERK, HMGB1, HIF-1 α , NOX2, NOX4, 및 COX2 등의 염증성 인자, TGF- β , MMP9, 및 MMP2 등의 섬유증 관련 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 mRNA, 또는 단백질의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0065] 나아가, 본 발명의 조성물은 안지오텐신 II(angiotensin II; Ang II)에 의해 유도되는 칼슘 이온 과도 현상 또는 심장 비대화를 억제할 수 있다.

[0067] 바람직하게, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분으로서 AQP4 억제제를 조성물의 총중량을 기준으로 0.1 내지 75 중량%로, 보다 바람직하게는 1 내지 50 중량%로 함유할 수 있다.

[0068] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사 용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥내, 복강내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸

셀룰로즈, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0069] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토즈, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0070] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0071] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위캡슐, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0073] 이때, 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0074] 예컨대, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0075] 구체적으로, 본 발명의 조성물에서 AQP4 억제제의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 100 mg, 바람직하게는 5 내지 60 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0077] 한편, 본 발명의 조성물에서 상기 AQP4 억제제가 N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드와 같은 소분자 화합물의 형태인 경우, 이는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 제공될 수 있다. 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산가염이 유용하다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 해당 화합물의 이로인 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0078] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0079] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0080] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시

키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0081] 예컨대, 본 발명의 AQP4 억제제, N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0083] 또한, 본 발명에 따른 N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드와 같은 소분자 화합물 형태의 AQP4 억제제는, 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 수화물 등의 용매화물 및 가능한 모든 입체 이성질체를 제한없이 포함할 수 있다. 예컨대, N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드의 용매화물 및 입체이성질체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드로부터 제조할 수 있다.

[0084] 나아가, 본 발명에 따른 N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드와 같은 소분자 화합물 형태의 AQP4 억제제는 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 결정 형태로 제조될 경우 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다. 예컨대, 본 발명에서는 N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드의 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 소분자 화합물 형태의 AQP4 억제제, 예컨대, N-(1,3,4-티아디아졸-2-일)니코틴아미드의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.

[0086] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심방세동 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0087] 본 발명의 용어, "약학적 조성물" 및 "심방세동 관련 질환"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0089] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 심방세동 관련 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메주라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0090] 본 발명의 용어 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0091] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 아쿠아포린 4 억제제의 양을 의미한다.

[0092] 본 발명의 약학적 조성물은 예방 또는 치료하고자 하는 질환의 종류에 따라, 유효성분으로서 아쿠아포린 4 억제제 이외의 공지된 각 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 공지의 약물을 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 심방세

동 관련 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 경우 유효성분으로서 아쿠아포린 4 억제제 이외에 공지된 약물을 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다.

발명의 효과

[0094]

본 발명에 따른 아쿠아포린 4(AQP4) 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 안지오텐신 II(Ang II)에 의해 유도되는 염증성 인자 및 섬유증 관련 유전자의 현저한 발현 증가를 억제하여 정상 상태와 동등 또는 유사한 수준까지 감소시킬 수 있고, 나아가 심방세동 동물모델에서 심장 비대를 억제하고 관련 변수들의 변화를 억제하여 정상 개체와 동등 또는 유사한 수준으로 유지할 수 있으므로, 심방세동 또는 심부전과 같은 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0096]

도 1은 안지오텐신 II(Ang II) 및/또는 아쿠아포린 4(AQP4) 억제제 투여에 따른 세포생존율 및 염증 관련 단백질 발현 변화를 나타낸 것이다. GAPDH mRNA와 비교하여 IL-6, TNF- α , IL-1 β , AT1R, AKT, ERK, HMGB1, HIF-1 α , NOX2, NOX4 및 COX2의 발현수준을 실시간 PCR로 확인하였다(*p<0.1, vs. 대조군 HL-1 세포).

도 2는 실시간 PCR로 측정된 Ang II 및/또는 AQP4 억제제 투여에 따른 섬유화 마커 TGF- β , MMP9, 및 MMP2의 발현량(A 내지 C) 및 이들의 면역형광 공초점 현미경 이미지(D)를 나타낸 도이다(A 내지 C에서 *p<0.1, vs. 대조군 HL-1 세포).

도 3은 HL-1 세포에서 Ang II 유도 Ca^{2+} 과도 현상을 나타낸 도이다. (A)는 세포 내 칼슘 표시기 Fluo-4 AM으로 로드된 세포의 시간 경과 칼슘 이미징의 대표적인 라인 스캔을 나타낸 것으로, 각 군에서의 자발적인 칼슘 과도 현상의 대표적인 기록을 나타낸다. (B)는 각 군에서 진폭 및 주파수를 요약한 도이다. 진폭은 Ang II을 처리한 군에서 유의하게 증가하였으며, Ang II와 함께 AQP 억제제를 첨가한 군에서 상기 증가는 현저히 감소하였다. (C)는 진폭 사이의 칼슘 스파크(sparks) 분비 현상을 나타낸다. (D)는 각 군에서의 칼슘 스파크를 나타낸다. Ang II 처리한 군에서 스파크가 증가하였으며, Ang II와 함께 AQP 억제제를 첨가한 군에서 상기 증가는 현저히 감소하였다. *P<0.001 vs. 스튜던트 t-검정에 따른 대조군, n=5.

도 4는 4주 동안 Ang II로 유도된 마우스 심방세동 모델에서 AQP4 억제제의 효과를 나타낸 도이다. 대조군으로는 정상 마우스를, Ang II 군으로는 Ang II만을 처리한 마우스를, 실험군으로는 상기 Ang II 처리한 마우스에 AQP4 억제제를 처리한 마우스를, 음성 실험군으로는 상기 Ang II 처리한 마우스에 AQP4 억제제 대신 PBS를 처리한 마우스를 사용하였다. (A)는 각 군으로부터 획득한 대표적인 심장 이미지를, (B)는 각 군 마우스 심장에 대해 측정된 M-모드 초음파 이미지를, (C) 내지 (F)는 상기 각 군의 마우스에 대해 측정된 심초음파 변수 분석 결과를 나타낸다. *P<0.001 vs. 대조군, 군 당 n=5. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다.

도 5는 마우스 모델에 프로그래밍된 전기자극을 인가하여 유도한 심방세동에 대한 안지오텐신 II 및/또는 AQP4 억제제의 효과를 나타낸 도이다. (A)는 프로그래밍된 전기자극에 의해 각 군에서 유발되는 대표 이미지를, (B)는 상기 전기자극으로 유도된 각 군의 마우스에 대한 백분율을, (C)는 각 군의 마우스에 대해 측정된 상기 심방세동 유도 후 종료시까지의 시간을 나타낸다. *P<0.001 vs. 대조군, 군 당 n=5. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다.

도 6은 AAV9 형질도입 후 HL-1 세포 및 마우스 모델에서 형광 이미지를 나타낸 도이다. (a) 및 (b)는 각각 AAV9 형질도입 후 HL-1 세포에서의 녹색 형광 발현 및 마우스 심장으로의 AAV9-매개 3중 AQP4 shRNA 전달에 대한 IVIS 이미지를 나타낸 도이다.

도 7은 대조군 및 확립된 AF 마우스 모델에서의 심전도(electrocardiogram; ECG)를 나타낸 도이다.

도 8은 HL-1 세포에서 Ang II 유도 Ca^{2+} 과도 현상에 대한 AQP4 siRNA의 효과를 나타낸 도이다. 대조군으로는 정상 마우스를, Ang II 군으로는 Ang II만을 처리한 마우스를, 실험군으로는 상기 Ang II 처리한 마우스에 AQP4 siRNA를 처리한 마우스를 사용하였다. (a)는 각 군의 핵(DAPI) 및 AQP4(red) 염색된 면역형광 이미지를, (b)는 각 군에서의 자발적인 칼슘 과도 현상의 대표적인 기록을 나타내는, 세포 내 칼슘 표시기 Fluo-4 AM으로 로드된 세포의 시간 경과 칼슘 이미징의 대표적인 라인 스캔(상단), 각 군에서 진폭 및 주파수를 요약한 도(하단)이다.

진폭은 Ang II을 처리한 군에서 유의하게 증가하였으며, Ang II와 함께 AQP siRNA를 첨가한 군에서 상기 증가는 대조군과 동등한 수준까지 현저히 감소하였다.

도 9는 (a) CMV 프로모터 기반 mAQP4 과발현 플라스미드 및 (b) miR30-기반 삼중 shAQP4 녹아웃 플라스미드의 구성을 나타낸 도이다.

도 10은 대조군, AF 유도군 및 AF + AAV9-매개 AQP4 shRNA 마우스의 30 ms t심방조율(atrial pacing) 후 심전도를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 안지오텐신 II로 유도한 심방세동 세포모델의 제조 및 염증메커니즘 평가

HL-1 심방성 심장근육세포(atrial cardiomyocytes)에 안지오텐신 II(Angiotensin II; Ang II)를 처리하여 심방세동(atrial fibrillation; AF) 유도 세포모델을 제조하였다. 예시적으로, Ang II를 농도별(100, 1000, 및 5000 nM)로 투입하고, 미토콘드리아 효소의 작용에 의해 MTT가 포르마잔 염료로 환원되는 것을 기반으로 하는 CellTiter 96 비방사성 세포 증식 분석 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 세포 생존율을 분석하였다. 보다 구체적으로, 96-웰 플레이트에 HL-1 세포를 1×10^4 개 세포/웰의 밀도로 분주하고 37°C 5% CO₂에서 배양하였다. 상기 배양한 세포를 지시된 농도(0, 100, 1000 및 5000 nM)의 Ang II로 24시간 동안 처리한 후, 570 nm에서 각 웰의 흡광도를 측정하여 도 1의 A에 도시하였다. 유사한 방법으로 HL-1 세포에 Ang II를 단독으로, 및 Ang II와 AQP4 억제제(1 μ M), TGN-020(세포에 대해 10 μ M/L, 마우스에 대해 200 mg/kg)을 처리하여 준비한 시료(각각 Ang II 및 Ang II + AQP4 억제제로 표기)의 세포 생존율을 측정하여 도 1의 B에 비교하였다.

나아가, 상기 배양된 HL-1 세포로부터 분리한 RNA 샘플을 사용하여 염증 관련 유전자 발현을 분석하였다. IL-6, TNF- α , IL-1 β , AT1R, AKT, ERK, HMGB1, HIF-1 α , NOX2, NOX4 및 COX2의 발현을 Ang II 처리된 심근세포주인 HL-1 세포에서 분리된 RNA 샘플을 사용하여 분석하였다.

HL-1 세포(ATCC)는 12.5 μ g/mL 피브로넥틴 및 0.02% 젤라틴(Sigma-Aldrich; Merck KGaA)으로 코팅된 플레이트에서 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 100 μ M 노르에피네프린(Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 및 4 mM L-글루타민(Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)이 보충된 완전 클레이콤 배지(Complete Claycomb medium, SAFC Biosciences, Lenexa, KS, USA)를 사용하여 5% CO₂와 21% O₂가 있는 가습 인큐베이터에서 37°C 조건으로 배양하였다.

그 결과, HL-1 세포에서 염증 관련 유전자의 발현은 대조군보다 Ang II 군에서 더 높은 경향을 나타내었고(도 1C), Ang II (1 μ M) + AQP4 억제제 군의 HL-1 세포에서 발현은 Ang II 그룹에서 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 하기 표 1에는 각 염증성 인자의 발현을 확인하기 위해 사용된 프라이머 서열을 기재하였다.

표 1

표적 유전자	정방향 프라이머(forward primer)	역방향 프라이머(reverse primer)
IL-6	CGTGGAAATGAGAAAGAGTTGT(서열번호 1)	TCCAGTTGGTAGCATCCATC(서열번호 2)
TNF- α	CCATTCCTGAGTTCTGCAAAG(서열번호 3)	GCAAATATAAATAGAGGGGGGC(서열번호 4)
IL-1 β	AAACGGTTTGTCTTCAAC(서열번호 5)	ATGGTGAAGTCAATTATGTC(서열번호 6)
HMGB1	TGGCAAAGGCTGACAAGGCTC(서열번호 7)	GGATGCTCGCCTTTGATTTGG(서열번호 8)
HIF-1 α	CTCCCTTTTCAAGCAGCAG(서열번호 9)	GCATGCTAAATCGGAGGGTA(서열번호 10)
NOX2	CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT(서열번호 11)	CAATCCAGCTCCCACTAACATCA(서열번호 12)
NOX4	GGATCAGAGAGGTCCTAGCAG(서열번호 13)	GCAGCTACATGCACACCTGAGAA(서열번호 14)
GAPDH	CCGTGAAAAGATGACCCAG(서열번호 15)	TAGCCACGCTCGGTCAGG(서열번호 16)

[0107] 실시예 2: 심장 섬유화 반응에 대한 AQP4 억제제의 효과

[0109] 상기 실시예 1에서와 유사하게 HL-1 세포에 Ang II를 처리하여 제조한 AF 유도 세포모델에서 섬유증 관련 유전자인 TGF- β , MMP9, 및 MMP2의 발현을 확인하기 위하여 상기 HL-1 세포로부터 분리된 RNA 샘플을 분석하고, 그 결과를 도 2의 A 내지 C에 나타내었다. 도 2의 A 내지 C에 나타난 바와 같이, 섬유증 관련 유전자, TGF- β , MMP9, 및 MMP2 모두의 발현은 대조군보다 Ang II 군에서 더 높은 경향을 나타내었고, Ang II (1000 nM) + AQP4 억제제 군에서는 Ang II 군보다 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

[0110] 대조군, Ang II, 및 Ang II + AQP4 억제제 군의 각 HL-1 세포를 각각 일반 세포 배양 접시와 유연한 에너지 수확기(flexible energy harvester)에서 배양하였다. 배양된 세포를 4% 빙냉 포르말데히드(pH 7.2-7.3)로 상온에서 1시간 동안 고정하고 세척한 후 0.3% 트리톤 X-100으로 30분간 침투시켰다. 세포를 세척하고 PBS 중 5% BSA(Bovine serum albumin) 및 0.3% 트리톤 X-100으로 30분 동안 차단하였다. 세포를 세척하고 0.3% 트리톤 X-100 및 1% BSA를 포함하는 PBS를 사용하여 4°C의 저온실에서 밤새도록 TGF- β , MMP9 및 MMP2 1차 항체로 염색하였다. 세포를 세척하고 실온에서 3시간 동안 0.3% 트리톤 X-100 및 1% BSA를 포함하는 PBS를 사용하여 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 및 알렉사 555 2차 항체로 염색하였다. 이어서, 세포를 5분 동안 3회 세척하고 최종 세척 동안 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하였다. 형광 이미지는 공초점 현미경을 사용하여 촬영하고 그 결과를 도 2의 D에 나타내었다.

[0111] 도 2의 D에 나타난 바와 같이, Ang II 군에서 TGF- β , MMP9 및 MMP2는 모두 대조군에 비해 2 내지 3배 증가하였으나, Ang II + AQP4 억제제 군은 상기 섬유증 관련 유전자들의 증가를 효과적으로 억제하였다($p < 0.001$). 하기 표 2에는 각 섬유증 관련 인자의 발현을 확인하기 위해 사용된 프라이머 서열을 기재하였다.

표 2

표적 유전자	정방향 프라이머(forward primer)	역방향 프라이머(reverse primer)
TGF- β	CCACCTGCAAGACCATCGAC(서열번호 17)	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGAC(서열번호 18)
MMP9	GGACCCGAAGCGGACATTG(서열번호 19)	CGTCGTCGAAATGGGCATCT(서열번호 20)
MMP2	CCTGGACCCTGAAACCGTG(서열번호 21)	TCCCCATCATGGATTCGAGAA(서열번호 22)
GAPDH	CCGTGAAAAGATGACCCAG(서열번호 15)	TAGCCACGCTCGGTCAGG(서열번호 16)

[0114] 실시예 3: 심장세포의 칼슘 과도 현상에 대한 AQP4 억제제의 효과

[0116] 다음으로, 자발적 Ca^{2+} 과도 현상에 대한 AQP4 억제제의 효과를 조사하기 위해, HL-1 세포를 35 mm 접시 내의 1 mL의 클레이콤 배지에 시딩하고, AQP4 억제제를 HL-1 세포에 투여하여, 37°C에서 24 시간 동안 인큐베이션하여 세포와 융합시켰다. 세포를 공초점 현미경으로 관찰하여 HL-1 세포 내에서 miRNA가 제대로 전달하고 효과가 있는지 확인하고 도 3의 B 내지 D에 평가하였다.

[0117] 이때, 동적 Ca^{2+} 이미지는 공초점 현미경(LSM700; Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 획득하였다. 대조군, Ang II, Ang II + AQP4 억제제 군의 각 HL-1 세포를 이미징 용액(live cell imaging solution, 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES-Na, 5.6 mM 포도당, pH 7.4)으로 3회 세척하고 5 μ M fluo-4AM를 로딩하였다. 37°C에서 20분 동안 커버슬립을 1 mL 용량 챔버에 장착하고 488 nm 파장 아르곤 레이저 빔 또는 필터 시스템으로 여기 후 형광 측정을 위해 현미경에 배치하였다. Fluo-4는 아르곤 레이저의 488 nm 라인으로 여기시키고 505 nm 이상의 방출 신호를 수집하였다. 상기 라인 스캔 이미지는 세포의 세로 축을 따라 수집하였으며, 각 라인은 0.14 μ m 간격의 512개 픽셀로 구성되었다. 순차적 스캔 후 512 $\times$ 10,000 라인 또는 512 $\times$ 20,000 라인의 2차원 이미지를 생성하고 오프라인 분석을 위해 저장하였다. NIH 오픈 액세스 소프트웨어 ImageJ를 사용하여 이미지 시퀀스를 분석하였으며, 세포 내 Ca^{2+} 수준은 기저 형광 강도에 대한 형광 강도의 백분율로 표시하였다.

[0118] 도 3의 A에 나타난 바와 같이 대조군, Ang II, Ang II + AQP4 억제제 군의 HL-1 세포에서 얻은 자발적 Ca^{2+} 과

도 현상의 대표적인 라인 스캔 이미지를 획득하였다.

[0119] Ca^{2+} 진폭 및 과동 주파수는 대조군 대비 Ang II 군($P<0.001$, $1.0\pm0.0 \text{ F/F}_0$ to $3.5\pm0.2 \text{ F/F}_0$)에서 증가하였고, Ang II 군 대비 Ang II + AQP4 억제제 군($P<0.001$, $3.5\pm0.2 \text{ F/F}_0$ to $1.2\pm0.1 \text{ F/F}_0$)에서 회복하였다(도 3의 B). 마찬가지로, Ca^{2+} 스파이크에서도 Ang II 군 대비 Ang II + AQP4 억제제 군($2.8\pm0.2 \text{ F/F}_0$ to $1.2\pm0.1 \text{ F/F}_0$)에서 대조군과 유사한 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다.

[0121] 실시예 4: 마우스 AF 동물 모델에서 AQP4 억제제의 효과

[0123] 대조군, Ang II, Ang II + AQP4, 및 Ang II + PBS 군으로 각각 5마리씩 마우스를 정하였다. Ang II 군에는 삼투압 펌프(Osmotic pump, Alzet 2004)를 이용하여 Ang II를 1500 ng의 농도로 4주간 주입하였고, Ang II + AQP4 억제제 군은 Ang II 군과 유사하게 등쪽 부위에 삽입된 삼투압 펌프를 통해 Ang II를 투여하고, 일주일에 2회씩 총 8번 AQP4 억제제를 복강에 주사하여 실험동물을 제작하였다. Ang II + PBS 군은 음성 대조군으로서 AQP4 억제제 대신에 PBS를 투여하는 것을 제외하고는 Ang II + AQP4 억제제 군과 유사하게 제작하였다. 상기와 같이 제조한 각 군의 실험동물을 치사시켜 심장을 적출하여 관찰 분석하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0124] 도 4의 A에 나타난 바와 같이, 회수한 심장을 육안으로 관찰한 결과, 대조군에 비해 Ang II 및 Ang II + PBS 군에서 현저한 심장비대를 확인하였으며, Ang II + AQP4 억제제 군에서는 상기와 같은 심장비대가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다. 보다 정확한 확인을 위하여 심초음파 실험을 수행하고, 그 결과를 도 4의 B 내지 E에 나타내었다. 구체적으로, 각 군의 마우스를 치사하기 전 아이프란으로 호흡 마취시킨 후 가슴부위의 털을 제거하고 심장 초음파 기계를 이용하여 심장의 모양과 박동 등을 확인하고 이를 토대로 좌심실 이완기말 직경(Left ventricular end diastolic diameter; LVEDD), 좌심실 수축기말 직경(left ventricular end-systolic dimension; LVESD), 구획단축률(fractional shortening; FS), 박출계수(ejection fraction; EF) 등의 심실 기능 관련 변수를 산출하였다.

[0126] 실시예 5: 생체 내 모델에서 AF 진행에 대한 AQP4 억제제의 효과

[0128] 마지막으로, 버스트 페이싱 프로토콜을 적용하여 마우스에서의 AF 유도성을 분석하였다. 페이싱 카테터는 경정맥을 통해 우심방과 우심실에 배치되게 하며 페이싱 및 데이터 수집도 가능한 전극 카테터를 사용하였다. 모든 페이싱 연구는 마우스 초기 사이클 길이를 100 ms인 버스트를 사용하여 2초 마다 10 ms 씩 감소한 후 종료하는 프로토콜을 사용하였다. 모든 버스트 페이싱 사이에는 30초의 회복시간이 있었고, 불규칙한 심방반응이 1초이상 지속되는 경우 AF가 존재하는 것으로 간주하였다. AF에 의한 반응이 10분동안 지속되면 실험을 종료하였고, AF 발생비율과 총 지속시간은 모든 AF 에피소드의 합계로 정의되었다.

[0129] 도 5A는 버스트 페이싱 프로토콜을 사용하여 AF를 유도하는 심전도를 나타낸다. 대조군과 Ang II + AQP4 억제제 군에서는 작은 페이싱 주기길이에서 AF가 나타나지 않는 반면, Ang II와 Ang II + PBS 군에서는 큰 주기길이에서 쉽게 AF가 유도되었고(도 5B), AF가 유의적으로 길게 지속됨을 확인하였다(도 5C).

[0131] 실시예 6: AQP4 siRNA를 이용한 AQP4 녹다운의 효과

[0133] AQP4 siRNA(Santa Cruz, sc-29716)을 사용하여 HL-1 세포에서 AF에 대한 일시적인 AQP4 mRNA 녹다운의 효과를 확인하였다. 상기 실시예를 통해 AQP4 차단제인 TGN-020이 발현된 AQP4 단백질을 억제함으로써 AF에 대한 치료 효과를 나타낸 것을 고려할 때, 상기 AQP4 siRNA에 의한 AQP4 mRNA의 발현 억제는 이와 동등한 효과를 수반할 수 있을 것으로 예상되었다.

[0134] HL-1 세포를 앞선 실시예에서와 동일한 조건으로 유지하였다. AF에 대한 AQP4 억제제의 효과를 확인하기 위해,

HL-1 세포를 5 μ g/mL 피브로넥틴을 포함하는 0.02%(w/v) 젤라틴 용액으로 미리 코팅한 6-웰 플레이트에 분주하였다. 세포가 70% 컨플루언스(confluence)에 도달했을 때, 제조업자의 프로토콜(Protocol Pub. No. MAN0007825 Rev.1.0.)에 따라 리포펙타민 RNAiMAX(Invitrogen, USA)를 사용하여 상기 세포를 AQP4 siRNA(최종 siRNA 농도 100 nM, Santa Cruz, sc-29716)으로 일시적으로 형질감염시켰다. 밤새도록 형질감염 시킨 후, 상기 배지는 FBS가 없는 Ang II(1 μ M, 24h) 함유 클레이콤 배지로 교환하였다.

[0136] 실시예 7: AAV9-매개 전달에 의한 AQP4의 과발현 및 녹다운의 효과

AAV9-매개 전달을 사용하여 HL-1 심방성 심장근육세포 및 C57BL/6 마우스에서 AF에 대한 AQP4의 과발현(overexpression; OE) 및 안정한 녹아웃의 효과를 확인하였다. 또한, AAV9 형질도입(transduction)에 대한 후속 결과가 앞선 TGN-020 및 일시적인 AQP4 siRNA 처리에 대한 결과와 상응하는지 확인하였다. 시험관 내 및 생체 내 실험을 위해, CsCl-기반 정제 공정에 의해 수득한 초고순도 연구등급 AAV를 사용하였다.

[0139] 세포 형질도입

HL-1 세포를 앞선 실시예에서와 동일한 조건으로 유지하였다. AF에 대한 AQP4의 과발현(overexpression; OE) 및 안정한 녹아웃의 효과를 확인하기 위하여, HL-1 세포를 5 μ g/mL 피브로넥틴을 포함하는 0.02%(w/v) 젤라틴 용액으로 미리 코팅한 6-웰 플레이트에 분주하였다. 세포가 50% 컨플루언스에 도달했을 때, 세포를 30,000 MOI의 AAV9로 형질도입하였다. 48시간 후, 녹색 형광 발현 및 세포 크기 확장과 같은 표현형 변화를 통해 성공적인 형질도입을 확인하였다(도 6a).

[0141] 마우스 심장 형질도입

꼬리 정맥을 통해 마우스 당 3.0×10^{11} 벡터 게놈(vector genomes; vg)을 주사하여 AAV9-매개 과발현 및 shRNA 전달을 수행하였다. AAV9 주입 1주일 후, 마우스 심장으로의 전달을 IVIS 이미징으로 확인하고(도 6b), AQP4의 과발현 및 shRNA의 각각의 효과를 ECG(electrocardiogram)로 검증하였다.

[0144] 실시예 8: 심부전을 수반하는 AF 마우스 모델의 확립

심부전을 수반하는 만성 AF 동물 모델에서 AQP4의 경향 및 효과를 확인하기 위하여, 안지오텐신 II(Ang II)를 사용하여 만성 AF 모델을 제조하였다. Ang II 주입 후, 확립된 심부전을 수반하는 AF 마우스 모델을 웨스턴 블롯팅을 포함한 전기생리학 및 면역조직화학적으로 분석하였다. 다른 알려진 염증, 섬유증 및 칼슘 취급 관련 단백질(calcium handling-related proteins)과 함께, 관심 단백질인 AQP4의 발현 수준 변화를 확인하였다(도 7).

구체적으로, 상기 실험에 사용된 동물(C57BL/6J 마우스)은 8주령의 약 25 g 체중의 동물이었다. 심부전을 수반하는 만성 AF 마우스 모델을 확립하기 위하여, 안지오텐신 II(Sigma, A9525, 750ng/kg/min)를 삼투압 펌프(osmotic pump, Alzet 2004, USA)로 주입하였으며, 상기 펌프는 4주 동안 마우스의 등에 피하로 이식되었다. 모든 과정은 무균 조건 하에 수행되었다.

[0149] 실시예 9: 심장세포의 칼슘 과도 현상에 대한 AQP4 siRNA의 효과

상기 AQP4 억제제 대신에 siRNA를 처리하여 실시예 3과 유사하게 실험을 수행하였다. 측정된 면역형광 이미지가 나타낸 바와 같이, Ang II 군에서 AQP4 단백질 수준의 현저한 증가가 검출된 반면, Ang II + siAQP4 군에서는 감소된 AQP4 단백질 발현이 관찰되었다(도 8a). 칼슘 분비에 있어서도, AQP4 녹다운 군에서 즉, Ang II + siAQP4 군에서 실질적으로 감소된 칼슘 빈도 및 강도가 기록되었다(도 8b). 마우스의 ECG 데이터(도 4)와 HL-1 세포의 칼슘 분비 데이터(도 8)에 기반하여, AQP4 단백질이 칼슘 처리 단백질과 밀접한 관련이 있음을 확인하였으며, 이는 AF의 진단 및 예방을 위한 유망한 표적일 수 있음을 시사한다.

[0153] 실시예 10: shRNA를 활용한 AF에 대한 AQP4의 효과 확인

[0155] 단점이 거의 없고 지속적인 전이유전자 발현으로 낮은 면역원성 및 적은 병원성과 같은 눈에 띄는 이점으로 인해, HL-1 세포 및 C57BL/6J 마우스에 AAV(Adeno-Associated Virus) 시스템을 활용하고자 하였다. 심장으로의 높은 선택성 및 형질도입 효능을 고려하여, 11가지 항원형(serotype) 중 AAV9을 선택하였다. AAV9-매개 AQP4 과발현 및 3개 shRNA(도 9)를 RNA, 단백질 및 전기생리학(electrophysiology; EPS) 수준에서 확립된 AF-유도 마우스 모델과 비교하여, AF에 대한 AQP4의 효과를 분석하고 확인하였다.

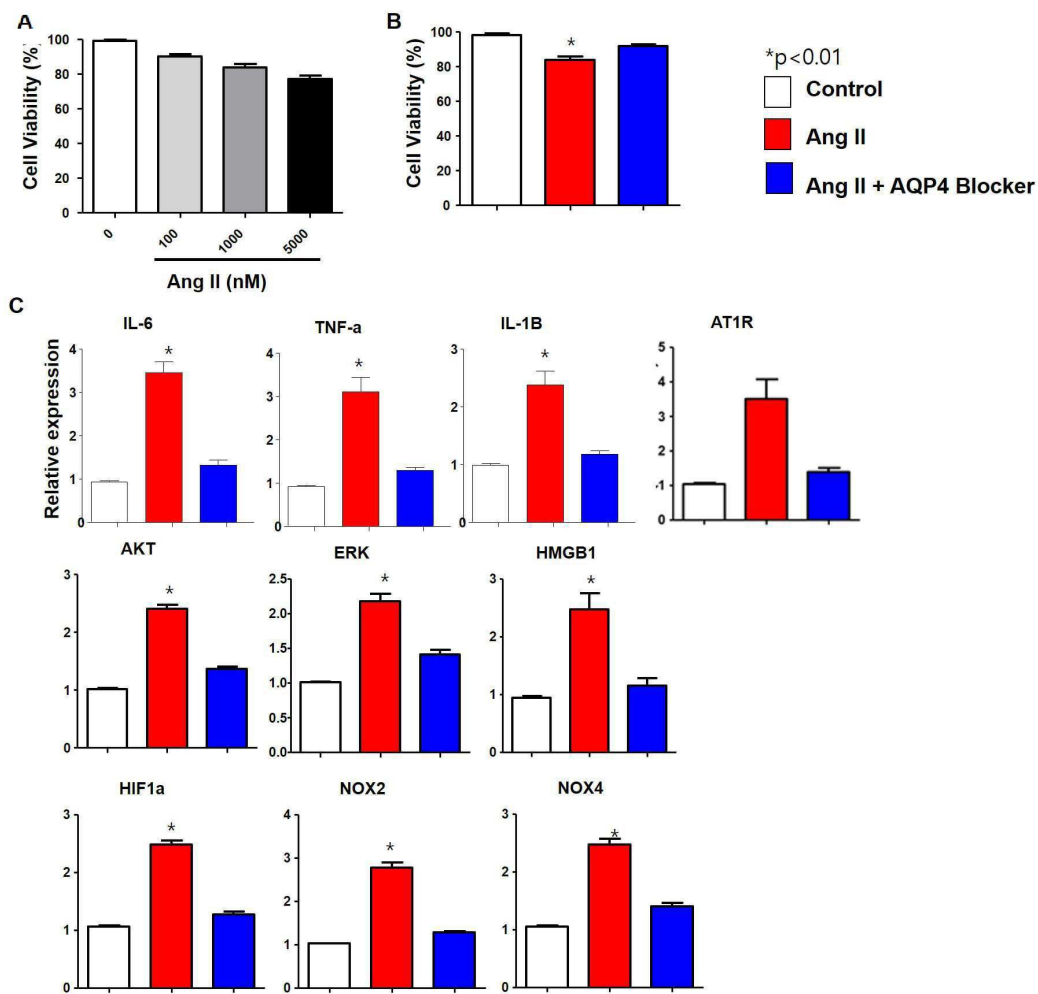
[0156] 구체적으로, AQP4의 기능적 효과를 확인하고, AQP4와 AF 간의 보다 긴밀한 연관성을 입증하기 위하여, CMV 프로모터의 제어 하에 3개 AQP4 shRNA를 포함하는 플라스미드를 복제하고, AAV9-매개 시스템을 활용하여 AF 유도에 앞서 마우스 심장에 전달하였다. 내인성 RNAi 경로 내로 shRNA의 동화(assimilation)하므로, shRNA는 siRNA 보다 훨씬 더 효과적일 수 있다. 또한, AAV9-매개 시스템을 사용함으로써, 낮은 독성 및 면역원성(immunogenicity)으로 안정하고 심장 조직 특이적인 전달을 달성할 수 있었다. 마우스 심장으로의 성공적인 전달은 IVIS 이미징으로 확인하였으며(도 6), AQP4에 대한 앞선 실시예들의 결과와 일치하여 유의미한 AF 유도성 테스트 결과를 나타내었다(도 10).

[0158] 종합적으로, 앞선 일련의 실시예에서 AQP4 억제제, siRNA, 및/또는 shRNA를 이용한 단백질 또는 mRNA 수준에서의 AQP4 발현 억제가 세포 수준은 물론 동물 모델에서 공통적으로 AF 및/또는 심부전을 유의미하게 억제하는 효과를 나타냄을 확인하였는 바, 이는 AQP4 억제가 AF 및/또는 심부전 예방 또는 치료를 위한 표적일 수 있음을 시사하는 것이다.

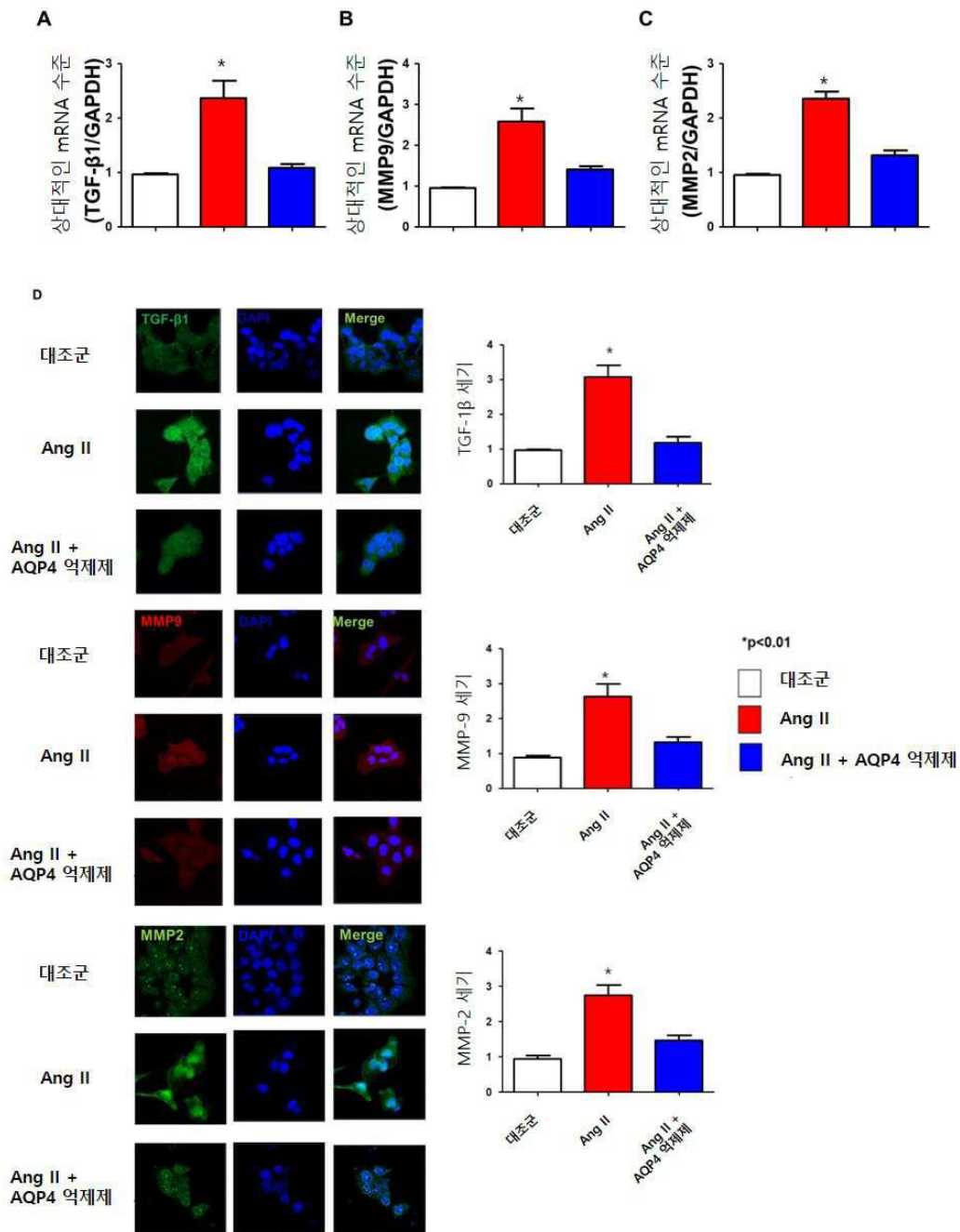
[0160] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

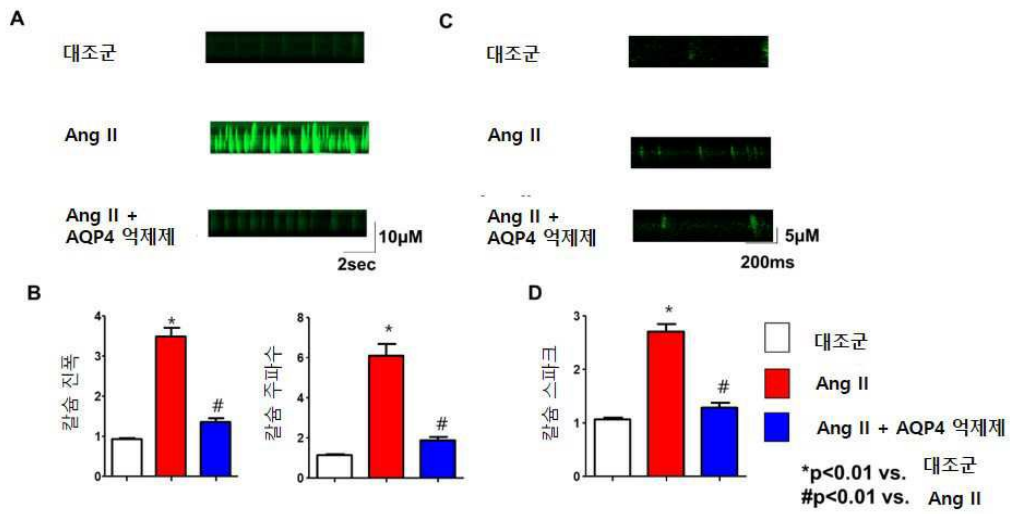
도면1



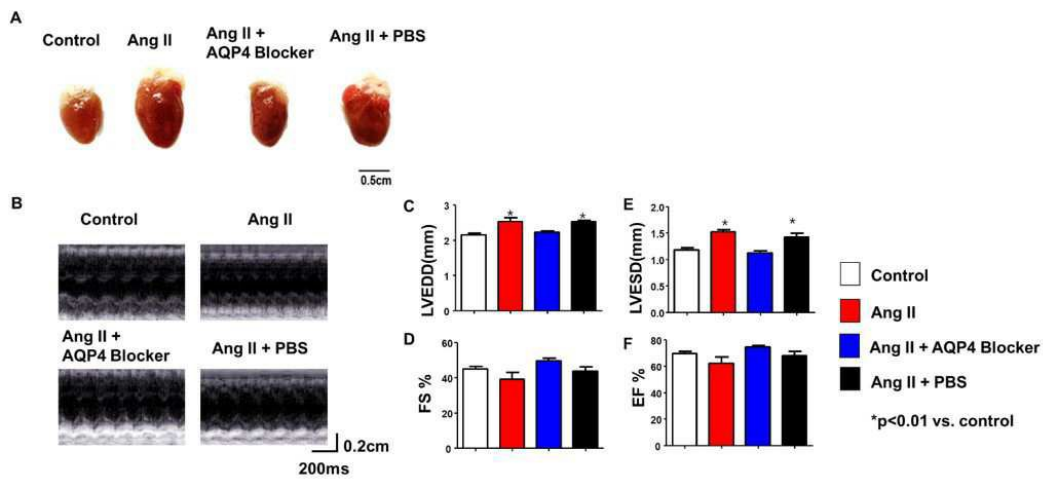
도면2



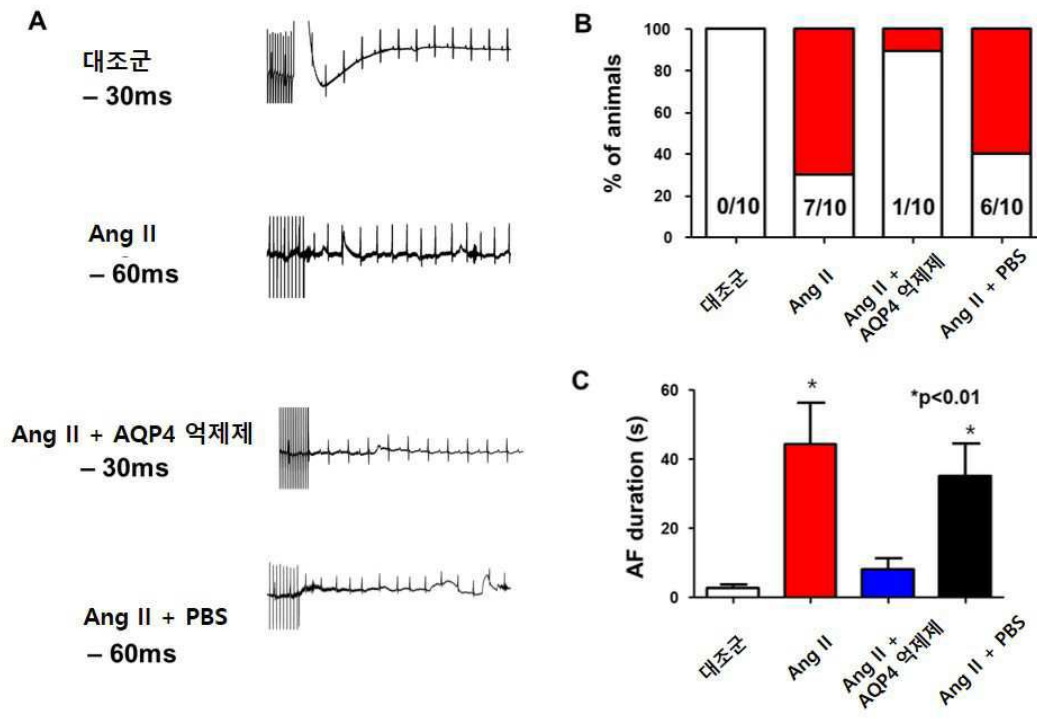
도면3



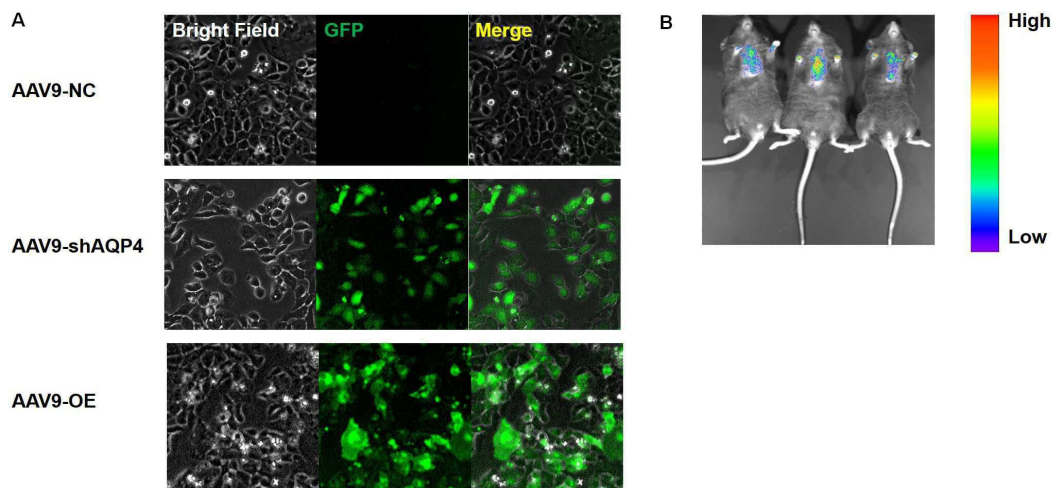
도면4



도면5



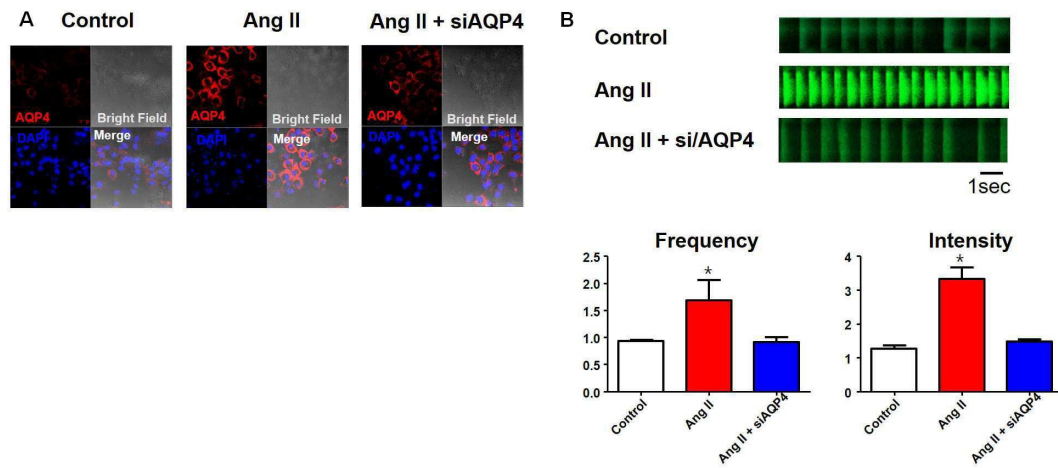
도면6



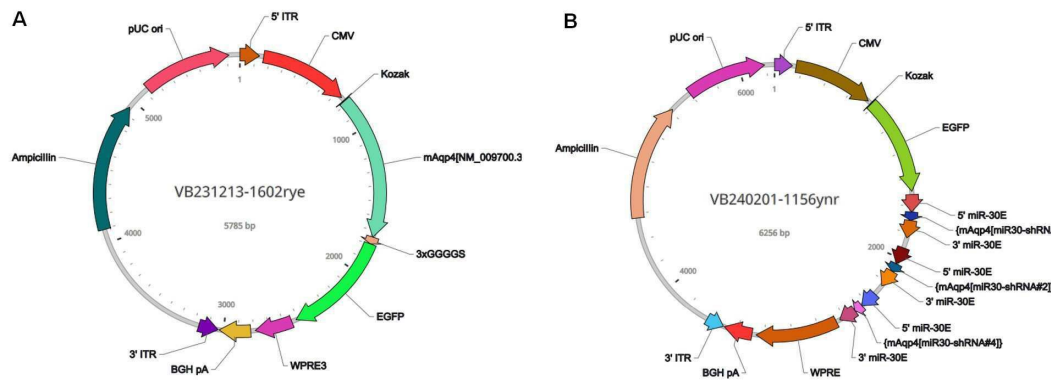
도면7



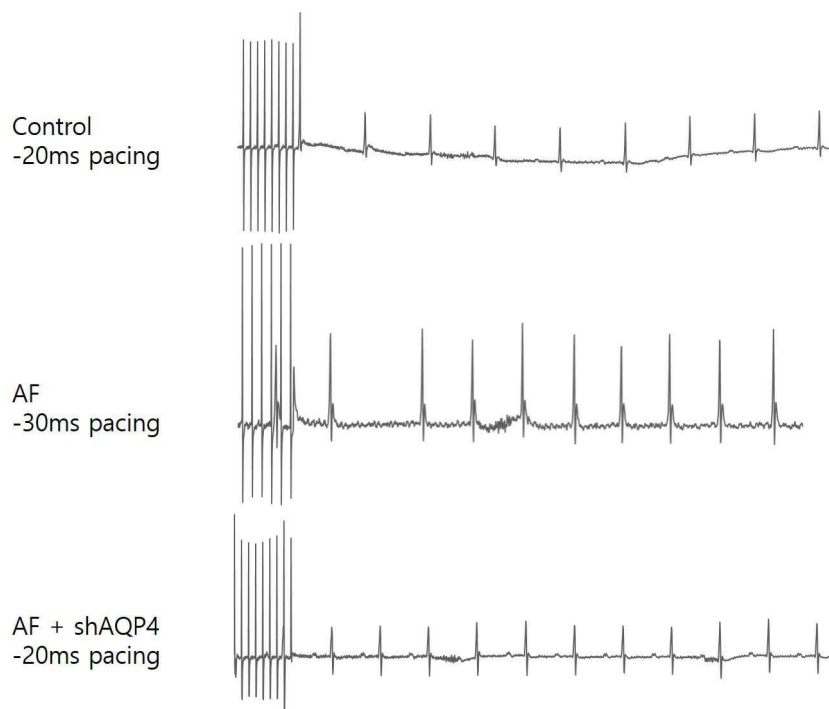
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.