



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0038425
(43) 공개일자 2019년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0115954
(22) 출원일자 2018년09월28일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020170127550 2017년09월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
(주)벡바젠
광주광역시 북구 첨단과기로 123 ,203호(오룡동)
(72) 발명자
정동탁
미국 뉴저지주 클로스터 슈라알렌버그 로드 199
이민아
광주광역시 북구 첨단과기로 123(오룡동, 광주과학기술원 생명과학과)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 25 항

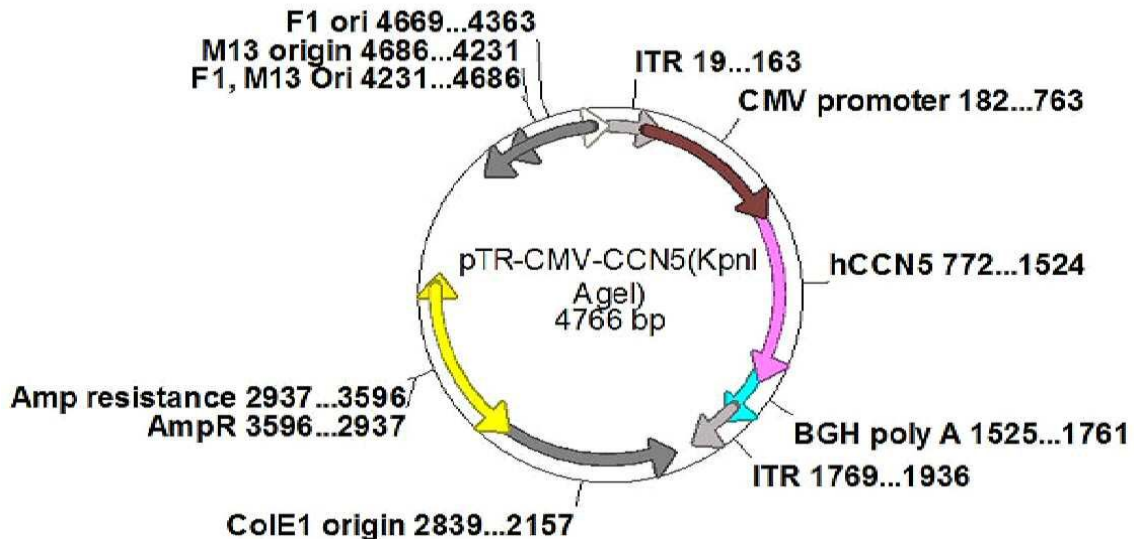
(54) 발명의 명칭 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 CCN5 단백질을 또는 이를 암호화하는 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 심방 부정맥과 심실 부정맥의 주된 발병원인인 심장의 전기적 기능이상을 유발하는 CaMKII의 병리적 활성을 억제하여 전기적 기능을 회복시키고, 구조적 기능 이상을 일으키는 근섬유아세포의 활성을 억제시킨다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 심장 부정맥을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

곽대환

경기도 용인시 기흥구 예현로 15, 103동 503호(서천동, 서그내마을에스케이아파트)

박우진

광주광역시 북구 첨단과기로 123(오룡동, 광주과학기술원 생명과학과)

명세서

청구범위

청구항 1

CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 CCN5 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 CCN5 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드는 서열번호 2로 표시되는 서열인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 유전자 컨스트럭트에 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 프로모터는 CMV 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 프로모터로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 유전자 컨스트럭트는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 더 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 유전자 컨스트럭트에 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드-CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드의 순서로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드와 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 사이에 위치하는 자가-절단(self-cleavage) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적

조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 자가-절단(self-cleavage) 서열은 Porcine teschovirus-1, Thoseaasigna virus, equine rhinitis A virus 또는 Foot-and-mouth disease virus에서 유래한 2A 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 자가-절단 서열은 Porcine teschovirus-1에서 유래한 2A 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열인 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 자가-절단 서열은 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 심장 부정맥은 심방 부정맥 또는 심실 부정맥인 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 발현벡터는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 적재된 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 발현벡터에 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드-CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드의 순서로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드와 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 사이에 위치하는 자가-절단(self-cleavage) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 17

제 13항에 있어서,

상기 발현벡터는 플라스미드 벡터 및 코스미드 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

청구항 18

CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 백시니아 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 20

제 18항에 있어서,

상기 재조합 바이러스가 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 더 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 21

제 1항, 제 13항 및 제 18항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법.

청구항 22

CCN5 단백질을 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 SERCA2a 단백질을 더 포함하는 것인, 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 24

CCN5 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법.

청구항 25

제 24항에 있어서,

상기 치료방법은 SERCA2a 단백질을 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 것인, 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 CCN5 단백질 또는 이를 암호화하는 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 심장 부정맥은 심장에서 전기적 신호의 문제로 인해, 규칙적인 심장 리듬과 효과적인 수축에 이상이 생겨 초래된 심장질환이다. 심장 부정맥의 정의는 발생부위에 따라 심방과 심실의 부정맥으로 구분된다. 구체적으로, 심방 부정맥(Atrial arrhythmia)은 심방세동(Atrial fibrillation), 심방 빈맥(Atrial tachycardia)과 부비동 부전(Sinus node dysfunction)이 있으며, 심실 부정맥(Ventricular arrhythmia)은 심실 빈맥(Ventricular tachycardia)과 심실 세동(Ventricular fibrillation)으로 구분된다(Swarminathan PD, et al. Circ Res 2012; 110:1661-1677).

- [0003] 심장 부정맥은 특히 선진국에서 상당한 이환율과 사망률의 원인이며, 심장 정지는 선진국에서 가장 큰 사망 원인 중 하나이다(Mozaffarian D, et al. Circulation 2015;131: e29-e322). 특히, 심실 부정맥은 심장 돌연사의 가장 큰 원인이며, 심장 질환의 다른 위험 요소들이 심실 부정맥을 가속시키고 증폭시킨다(Roberts-Thomson KC, et al. Nat Rev Cardiol 2011; 8:311-321). 또한, 심장 부정맥 중 심방세동은 가장 일반적인 부정맥으로, 발생률이 높아지고 있으며, 심장 부정맥 및 뇌졸중과 같은 질환의 발병율을 크게 증가시킨다(Andrada D, et al. Circ Res 2014; 114:1453-1458).
- [0004] 심장 부정맥 치료를 위한 치료법은 항부정맥제, 도관 절제술, 심실 부정맥 치료용 이식형 제세동기가 있지만 제한적 치료효과를 나타낸다. 항부정맥 치료제들의 주요 기전인 이온 채널 봉쇄는 부정맥의 만성적 치료와 예방의 한계를 보인다. 심장 부정맥 억제 임상시험에서, 조기 심실 수축의 치료 시 항부정맥제가 심근경색을 가진 환자들에서 심혈관 질환 사망률을 높이는 결과를 보였다. 현재 사용되고 있는 항부정맥제의 공통적인 부작용은 치료제가 오히려 부정맥 축진을 유발할 위험성을 내포하고 있다는 것이다(Camm J, Int cardiol 2012; 155:363-371).
- [0005] 한편, 심장 부정맥의 전기적 측면에서 CaMKII(Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein Kinase II)의 병리적 활성이 중심적 역할을 한다는 연구결과가 보고된 바 있다. CaMKII의 활성 증가는 부정맥을 촉진하는 이온채널의 과다활성, 세포 내 Ca^{2+} 항상성의 결함, 조직 손상을 야기한다. 따라서, CaMKII의 활성 억제는 효과적인 부정맥 치료 수단으로써 이용될 수 있다.
- [0006] 효과적인 심장 부정맥 치료제 개발을 위해, 병리기전의 이해와 새로운 상위 치료표적의 발굴을 통해 치료제 개발이 필요하다.
- [0007] 따라서, 본 발명은 부정맥의 개시와 유지 및 지속적 증상 악화의 치료로써 전기적 기능이상의 핵심 표적인 CaMKII와 구조적 기능이상의 주요 원인인 섬유증을 동시에 해결되는 치료제 개발에 대한 해결책을 제시하고자 한다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Swarminathan PD, Purohit A, et al., Circ Res, 110:1661-1677, 2012
- (비특허문헌 0002) Andrada D, Khairy P, et al. Circ Res 114:1453-1458, 2014
- (비특허문헌 0003) Roberts-Thomson KC, Lau DH, et al., Nat Rev Cardiol, 8:311-321, 2011
- (비특허문헌 0004) Camm J, Int cardiol 2012;155:363-371

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에 본 발명자들은 효과적인 심장 부정맥 치료제를 개발하기 위해 연구한 결과, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 유전자를 포함하는 약학적 조성물이 CaMKII의 병리적 활성을 억제하고, 근섬유아세포 활성을 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 또한, CCN5 단백질과 SERCA2a 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 약학적 조성물이 심장 부정맥 동물 모델 실험에서 전기적 기능 이상에 대해 상승적 치료효과를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 측면은, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 다른 측면은, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이

러스를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 측면은, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질을 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 심방 부정맥과 심실 부정맥의 주된 발병원인인 심장의 전기적 기능 이상을 유발하는 CaMKII의 병리적 활성을 억제하여 전기적 기능을 회복시키고, 구조적 기능 이상을 일으키는 근섬유아세포의 활성을 억제시킨다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 심장 부정맥을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 pTR-CMV-CCN5의 벡터구조를 도식화한 도면이다.
- 도 2는 pTR-CMV-SERCA2a-P2A-CCN5 벡터구조를 도식화한 도면이다.
- 도 3a는 CCN5 단백질의 심장 섬유화 억제 효과를 확인하기 위해 야생형 마우스 및 CCN5 TG 마우스를 이용한 동물실험의 개요도를 나타낸 도면이다.
- 도 3b는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 Masson's Trichrome 염색법으로 염색한 사진이다.
- 도 3c는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 Masson's Trichrome 염색법으로 염색한 심방 조직의 섬유화 정도를 정량화하여 나타낸 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).
- 도 3d는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 α -SMA의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(**: $p < 0.01$).
- 도 3e는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 Collagen I의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).
- 도 3f는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 TGF- β 1의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).
- 도 3g는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 IL-1 β 의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(*: $p < 0.05$).
- 도 3h는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 RANTES의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).
- 도 3i는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 F4/80의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(**: $p < 0.01$).
- 도 3j는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심방 조직을 적출하여

qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 MCP-1의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(**: $p < 0.01$).

도 4a는 CCN5 단백질의 심방 세동에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 야생형 마우스 및 CCN5 TG 마우스를 이용한 동물실험의 개요도를 나타낸 도면이다.

도 4b는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심장을 적출하여 심방세동을 유발하는 전기적 자극을 주어 심전도를 측정한 도면이다.

도 4c는 야생형 마우스 또는 CCN5 TG 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, 심장을 적출하여 심방세동을 유발하는 전기적 자극을 주었을 때의 심방 세동 유발 빈도를 나타낸 도면이다.

도 5a는 CCN5 단백질의 심방 세동에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 HL-1 세포를 이용한 실험의 개요도를 나타낸 도면이다.

도 5b는 HL-1 세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5 배양액을 처리하여 48시간 동안 배양한 후, HL-1 세포 내 p-CaMKII(Thr286), CaMKII, pRyR2(Ser2808), pRyR2(Ser2814), RyR2, Calsequestrin2, NCX2($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger 2) 및 GAPDH 단백질의 발현을 웨스턴 블랏을 통해 확인한 도면이다.

도 5c는 HL-1 세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, HL-1 세포 내 p-CaMKII(Thr286)/CaMKII 수치를 나타낸 도면이다(**: $p < 0.01$).

도 5d는 HL-1 세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, HL-1 세포 내 pRyR2(Ser2808)/RyR2 수치를 나타낸 도면이다(**: $p < 0.01$).

도 5e는 HL-1 세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, HL-1 세포 내 pRyR2(Ser2814)/RyR2 수치를 나타낸 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

도 5f는 HL-1 세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, HL-1 세포 내 Calsequestrin2/GAPDH 수치를 나타낸 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

도 5g는 HL-1 세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, HL-1 세포 내 NCX2/GAPDH 수치를 나타낸 도면이다(**: $p < 0.01$).

도 6a는 CCN5 단백질의 심방 세동에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 래트의 심방 섬유아세포를 이용한 실험의 개요도를 나타낸 도면이다.

도 6b는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 배양한 심방 섬유아세포를 형광면역화학법으로 염색한 사진이다.

도 6c는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 심방 섬유아세포 내 α -SMA, Collagen I, TGF- β 1 및 α -tubulin 단백질의 발현을 웨스턴 블랏을 통해 확인한 도면이다.

도 6d는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 심방 섬유아세포 내 α -SMA / α -tubulin 수치를 나타낸 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

도 6e는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 심방 섬유아세포 내 Collagen I / α -tubulin 수치를 나타낸 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

도 6f는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 심방 섬유아세포 내 TGF- β 1 / α -tubulin 수치를 나타낸 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

도 6g는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 α -SMA의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(*: $p < 0.05$).

도 6h는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 Collagen I의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(**: $p < 0.01$).

도 6i는 래트의 심방 섬유아세포에 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 48시간 동안 배양한 후, qRT-PCR을 통해 심방 조직 내 TGF- β 1의 mRNA 발현량을 측정한 도면이다(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

p<0.01).

도 7a는 AAV-CCN5 단백질의 심방 섬유화에 대한 치료 효과를 확인하기 위해 심방 섬유화 유발 마우스를 이용한 동물실험의 개요도를 나타낸 도면이다.

도 7b는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 웨스턴 블랏을 통해 CCN5의 단백질 발현을 확인한 도면이다.

도 7c는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 CCN5의 단백질 및 mRNA 발현량을 나타낸 도면이다.

도 7d는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 Masson's Trichrome 염색법으로 염색한 사진이다.

도 7e는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 Masson's Trichrome 염색법으로 염색한 심방 조직의 섬유화 정도를 정량화하여 나타낸 도면이다(*: p<0.05).

도 7f는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방조직 내 α -SMA/18s rRNA 수치를 나타낸 도면이다(*: p<0.05).

도 7g는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방조직 내 Collagen I/18s rRNA 수치를 나타낸 도면이다(*: p<0.05; **: p<0.01).

도 7h는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방조직 내 TGF- β 1/18s rRNA 수치를 나타낸 도면이다(**: p<0.01).

도 7i는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방조직 내 IL-1 β /18s rRNA 수치를 나타낸 도면이다(*: p<0.05).

도 7j는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방조직 내 RANTES/18s rRNA 수치를 나타낸 도면이다(**: p<0.01).

도 7k는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방조직 내 F4/80 /18s rRNA 수치를 나타낸 도면이다(*: p<0.05; **: p<0.01).

도 7l은 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 심방 조직을 적출하여 qRT-PCR을 통해 심방조직 내 MCP-1/18s rRNA 수치를 나타낸 도면이다(**: p<0.01).

도 8a는 AAV-CCN5 단백질의 심방세동 억제 효과를 확인하기 위해 심방세동 유발 마우스를 이용한 동물실험의 개요도를 나타낸 도면이다.

도 8b는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 측정된 심전도 결과를 나타낸 도면이다.

도 8c는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 전기자극에 대한 부정맥 발생율을 나타낸 도면이다.

도 8d는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 부정맥 유발에 필요한 전기자극의 세기를 나타낸 도면이다.

도 8e는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 측정된 Ca^{2+} 의 활동전위를 나타낸 도면이다.

도 8f는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 활동전위기50(APD₅₀)과 활동전위기75(APD₇₅)를 측정된 도면이다.

도 8g는 야생형 마우스에 안지오텐신 II를 14일 동안 투여한 후, AAV-Control 또는 AAV-CCN5를 주입하고 4주 뒤 탈분극 속도를 측정된 도면이다(*: p<0.05).

도 9a는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 단축수율(Fractional shortening) 및 6주간의 체중변화를 나타낸 도면이다.

도 9b는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 우심실(RV)에 10 Hz의 전기자극을 가하여 촬영한 광학지도를 나타낸 도면이다.

도 9c는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 우심실(RV)에 20 Hz의 전기자극을 가하여 촬영한 광학지도를 나타낸 도면이다.

도 9d는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 Ca^{2+} 의 활동전위를 측정한 도면이다.

도 9e는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 활동전위기50(APD₅₀)과 활동전위기75(APD₇₅)를 측정한 도면이다(*: p<0.05).

도 9f는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 활성전위기의 확산을 측정한 도면이다(*: p<0.05).

도 9g는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 전도 속도와 탈분극 속도를 나타낸 도면이다(***P<0.001).

도 10a는 ISO 처리 유무에 따른 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 Ca^{2+} 의 활동전위 변화를 나타낸 도면이다.

도 10b는 ISO 처리 유무에 따른 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 우심실에서의 Ca^{2+} 재분극 패턴 변화를 나타낸 도면이다.

도 10c는 ISO 처리 유무에 따른 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 활동전위기75(APD₇₅) 변화를 측정한 도면이다.

도 10d는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스에 ISO를 처리한 후 Ca^{2+} 광학지도를 나타낸 도면이다.

도 10e는 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스에 ISO를 처리한 후 활동전위기75(APD₇₅)를 측정한 도면이다(*: p<0.05).

도 10f는 ISO 처리 유무에 따른 야생형 마우스 및 심실 부정맥 유발 마우스의 탈분극 속도 변화를 나타낸 도면이다(***: p<0.001).

도 11a는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 6주간 단축수율을 나타낸 도면이다.

도 11b는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 6주간 좌심실 두께 변화를 나타낸 도면이다.

도 11c는 AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 ISO와 AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 Ca^{2+} 광학지도를 나타낸 도면이다.

도 11d는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 ISO와 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 Ca^{2+} 광학지도를 나타낸 도면이다.

도 11e는 ISO 처리에 따른 AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 Ca^{2+} 활동전위 변화를 나타낸 도면이다.

도 11f는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 좌심실에서의 Ca^{2+} 재분극 패턴을 나타낸 도면이다.

도 11g는 ISO 처리에 따른 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 활동전위기

75(APD₇₅) 변화를 나타낸 도면이다(*: p<0.05; **:p<0.01; ***: p<0.001).

도 11h는 ISO 처리에 따른 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 전도 속도를 나타낸 도면이다(*: p<0.05; ***: p<0.001).

도 11i는 ISO 처리에 따른 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 탈분극 속도를 나타낸 도면이다(**:p<0.01; ***: p<0.001).

도 12a는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스에 전기자극을 주었을 경우 나타나는 심전도 변화를 나타낸 도면이다.

도 12b는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 부정맥을 유발시키기 위해 필요한 전기자극의 세기를 나타낸 도면이다.

도 12c는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 전기자극에 대한 부정맥 발생율을 나타낸 도면이다.

도 13a는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 심장을 적출하여 Masson's Trichrome 염색법으로 염색한 사진이다.

도 13b는 야생형 마우스, AAV9-Control을 주입한 심실 부정맥 유발 마우스, AAV9-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 심실 부정맥 유발 마우스의 심장 조직 내 Nav 1.5, FAP, Connexin 43, MsrA, Kir2.1, Tubulin, SERCA2a, Smad7 및 CCN5 단백질 발현을 웨스턴 블랏을 통해 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 일 측면은, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명에서 사용하는 용어 "CCN5 단백질"이란, 혈관계 질환, 혈관신생, 종양생성, 섬유증 질환 유발, 세포 분화 및 생존과 같은 세포기능 조절에 다양한 역할을 하는 CCN족에 속하는 기질세포 단백질을 의미한다. CCN5 단백질은 다른 CCN족 단백질과 다르게 C-말단 도메인이 없으며, WISP-2, HICP, Cop1, CTGF-L 등으로도 불린다. 또한, CCN5 단백질은 250개의 아미노산 서열의 단일 폴리펩타이드 사슬로 구성되어 있다. CCN5 단백질은 N-말단에 22개의 아미노산 분비 유도 서열이 있어 세포 밖으로 분비되어 신호전달 단백질의 기능을 한다. 따라서, 상기 뉴클레오타이드가 세포에서 발현될 경우, CCN5 단백질은 세포 밖으로 분비될 수 있다. 이때, 상기 뉴클레오타이드는 mRNA 형태일 수 있다.

[0024] 구체적으로, 상기 CCN5 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산일 수 있다. 또한, 상기 CCN5 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드는 서열번호 2 또는 서열번호 41로 표시되는 서열일 수 있다.

[0025] 또한, 상기 CCN5 단백질의 단편이란, CCN5 단백질의 활성을 유지하는 한, 야생형의 CCN5의 N-말단 및/또는 C-말단의 일부가 절단된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CCN5 단백질의 단편은 N-말단 또는 C-말단으로부터 1 내지 30, 1 내지 20, 1 내지 10 또는 1 내지 5 개의 아미노산이 절단되는 것일 수 있다.

[0026] 또한, 상기 유전자 컨스트럭트에 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터 서열을 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용하는 용어 "작동적으로 결합된"이란, 뉴클레오타이드 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합위치의 어레이)과 다른 뉴클레오타이드 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절한다.

- [0028] 구체적으로, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 CCN5 단백질 유전자의 전사를 조절할 수 있다. 상기 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 유전체로부터 유래된 프로모터를 포함한다. 상기 프로모터는 심장세포에서 특이적으로 작동되는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 프로모터는 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 림프톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 프로모터는 CMV 프로모터일 수 있다.
- [0030] 상기 유전자 컨스트럭트는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 추가적으로 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 뉴클레오타이드는 mRNA 형태일 수 있다.
- [0031] 이때, 상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드는 상기 유전자 컨스트럭트에 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드-CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 순서로 포함될 수 있다. 이때, 상기 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드는 정지 코돈(stop codon)을 포함할 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드는 상기 유전자 컨스트럭트에 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드-SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 순서로 포함될 수 있다. 이때, 상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드는 정지 코돈을 포함할 수 있다.
- [0033] 또한, 유전자 컨스트럭트는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드와 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 사이에 자가-절단(self-cleavage) 서열을 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용하는 용어 "SERCA2a 단백질"이란, 근소포체 내로 ATP 에너지를 사용하여 칼슘을 재흡수하는 기능을 하는 단백질을 의미한다. 상기 SERCA2a 단백질은 HFrEF(heart failure with reduced ejection fraction) 환자들에서 발현양이 현저히 감소되어 있음이 보고된 바 있다. SERCA2a 단백질의 발현감소에 따른 근소포체 내로의 칼슘 재흡수 기능저하는 세포질 내의 칼슘 농도를 비정상적으로 높이며 심근세포의 수축-이완기능이 약화되고 미토콘드리아 내로 칼슘의 유입에 따른 유해산소 발생, 에너지 대사의 기능의 파괴 등으로 심근세포 사망의 직접적 원인으로 작용한다.
- [0035] 구체적으로, 상기 SERCA2a 단백질은 서열번호 3로 표시되는 아미노산일 수 있다. 또한, 상기 SERCA2a 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드는 서열번호 4 또는 서열번호 42로 표시되는 서열일 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 SERCA2a 단백질의 단편이란, SERCA2a 단백질의 활성을 유지하는 한, 야생형의 SERCA2a의 N-말단 및/또는 C-말단의 일부가 절단된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 SERCA2a 단백질의 단편은 N-말단 또는 C-말단으로부터 1 내지 100, 1 내지 50, 1 내지 20 또는 1 내지 10 개의 아미노산이 절단되는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 자가-절단(self-cleavage) 서열은 Porcine teschovirus-1, Thosaasigna virus, equine rhinitis A virus 또는 Foot-and-mouth disease virus에서 유래한 2A 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 구체적으로 자가-절단 서열은 Porcine teschovirus-1에서 유래한 2A 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 또한, 상기 자가-절단 서열은 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0038] 상기 Porcine teschovirus-1에서 유래한 2A 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 5로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0039] 상기 Thosaasigna virus에서 유래한 2A 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 7로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 8로 표시되는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0040] 상기 equine rhinitis A virus에서 유래한 2A 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 9로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 10으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

- [0041] 상기 Foot-and-mouth disease virus에서 유래한 2A 캡타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 11로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 11로 표시되는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 12로 표시되는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0042] 상기 유전자 컨스트럭트의 일구체예인 SERCA2a-P2a-CCN5가 세포에서 발현되면, SERCA2a 단백질은 근소포체 막에 삽입될 수 있으며, CCN5 단백질은 세포외로 배출이 일어날 수 있다. 또한, 본 발명의 유전자 컨스트럭트의 일구체예인 CCN5-P2a-SERCA2a가 세포에서 발현되면, SERCA2a 단백질은 근소포체 막에 삽입될 수 있으며, CCN5 단백질은 세포외로 배출이 일어날 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 사용하는 용어 "심장 부정맥"이란, 심장의 전기자극이 잘 만들어지지 않거나 자극의 전달이 잘 이루어지지 않아 규칙적인 수축이 계속되지 않고, 심장 박동이 비정상적으로 빨라지거나, 늦어지거나, 혹은 불규칙하게 되는 질환을 의미한다.
- [0044] 상기 심장 부정맥은 발생부위에 따라 심방 부정맥(atrial arrhythmia)과 심실 부정맥(ventricular arrhythmia)으로 구분될 수 있다. 상기 심방 부정맥(atrial arrhythmia)은 심방세동(atrial fibrillation), 심방 빈맥(atrial tachycardia) 또는 부비동 부전(sinus node dysfunction)일 수 있다. 상기 심실 부정맥은 심실 빈맥(ventricular tachycardia) 또는 심실 세동(ventricular fibrillation)일 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 유전자 컨스트럭트는 리포솜을 이용하여 세포내로 전달시킬 수 있다. 리포솜은 수상에 분산된 인지질에 의해 자동적으로 형성되며, CCN5 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 및/또는 SERCA2a 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드를 내포한 리포솜은 엔도사이토시스, 세포 표면으로의 흡착 또는 플라스마 세포막과의 융합 등의 기전을 통해 세포 내로 CCN5 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 및/또는 SERCA2a 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드를 운반할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 다른 측면은, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현백터를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0047] 상기 CCN5 단백질은 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 상술한 바와 동일하다.
- [0048] 본 발명에서 사용하는 용어 "발현백터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다.
- [0049] 또한, 상기 발현백터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리캡타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 발현백터는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 적재된 것일 수 있다. 이때, SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드는 상기 발현백터에 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드-CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 순서로 포함될 수 있다.
- [0051] 발현백터는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드와 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 사이에 자가-절단(self-cleavage) 서열을 포함할 수 있다. 상기 자가절단 서열은 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 상술한 바와 동일하다.
- [0052] 상기 발현백터는 상기 본 발명의 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 및/또는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 것일 수 있다. 이때, 사용되는 벡터는 본 발명의 CCN5 단백질 및/또는 SERCA2a 단백질을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다. 상기 발현백터는 플라스미드 벡터 및 코스미드 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0053] 상기 플라스미드 벡터는 상업적으로 개발된 pUC18 플라스미드, pBAD플라스미드, pIDTSAMRT-AMP 플라스미드 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 심장 부정맥은 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥 예방 또는 치료용 약학적 조성물

에서 상술한 바와 동일하다.

- [0055] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0056] 상기 CCN5 단백질은 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 상술한 바와 동일하다.
- [0057] 상기 바이러스는 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 부속 바이러스(Adeno-associated virus; AAV), 레트로바이러스(Retrovirus), 렌티바이러스(Lentivirus), 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 및 백신니아 바이러스(vaccinia virus) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 구체적으로, 상기 바이러스는 아데노 부속 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 상기 바이러스는 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 부속 바이러스(Adeno-associated virus; AAV), 레트로바이러스(Retrovirus), 렌티바이러스(Lentivirus), 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 및 백신니아 바이러스(vaccinia virus) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 구체적으로, 상기 바이러스는 아데노 부속 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 상기 아데노바이러스는 중간 정도의 유전체 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타겟세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다. 유전체의 양 말단은 100 내지 200 bp의 ITR(inverted terminal repeat)를 포함하며, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 시스 엘리먼트이다. 유전체의 E1 영역(E1A 및 E1B)은 바이러스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 코딩한다.
- [0060] 아데노바이러스 벡터 중에서, E1 영역이 결여된 복제 불능 아데노바이러스가 많이 이용되고 있다. 한편, E3 영역은 통상적인 아데노바이러스 벡터에서 제거되어 외래 유전자가 삽입되는 자리를 제공한다.
- [0061] 따라서, 본 발명의 CCN5 단백질 유전자는 결실된 E1 영역(E1A 영역 및/ 또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입될 수 있다. 구체적으로, CCN5 단백질 유전자는 E3 영역에 삽입될 수 있다.
- [0062] 한편, 세포 내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E1 영역(E1A 영역 및/ 또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역, 바람직하게는 E3 영역에 삽입될 수 있다. 또한, "프로모터-목적 뉴클레오타이드 서열-폴리 A 서열-IRES-CCN5 단백질 유전자가 IRES(internal ribosome entry site)에 의해 연결된 바이시스트론(bicistronic) 발현시스템에 의해서도 발현될 수 있다.
- [0063] 또한, 아데노바이러스는 야생형 지놈의 약 105% 정도까지 패키징할 수 있기 때문에, 약 2kb를 추가적으로 패키징할 수 있다. 따라서, 아데노바이러스에 삽입되는 외래 서열은 아데노바이러스의 유전체에 추가적으로 결합시킬 수도 있다.
- [0064] 아데노바이러스는 42개의 상이한 혈청형 및 A-F의 서브그룹을 갖는다. 이 중에서, 서브 그룹 C에 속하는 아데노바이러스 타입 5가 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 얻기 위한 적합하다. 아데노바이러스 타입 5에 대한 생화학 및 유전적 정보는 잘 알려져 있다.
- [0065] 아데노바이러스에 의해 운반되는 외래 유전자는 에피솜과 동일한 방식으로 복제되며, 이에 숙주세포에 대해 유전적 독성이 매우 낮다.
- [0066] 상기 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.
- [0067] 레트로바이러스 벡터를 구축하기 위하여, CCN5 단백질 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 레트로바이러스의 서열 대신에 레트로바이러스 지놈에 삽입되어 복제 불능의 바이러스를 생산한다. 바이러스를 생성하기 위하여, gag, pol 및 env 유전자를 포함하지만 LTR(long terminal repeat)와 Ψ서열은 없는 패키징 세포주를 구축한다. CCN5 단백질의 유전자, 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열, LTR 및 Ψ서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 상기 세포주에 이입하면, Ψ서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체의 생산을 가능하게 하다. 이 전사체는 바이러스로 패키징되고, 바이러스는 배지로 배출된다. 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고 농축하여 유전자 전달 시스템으로 이용한다.
- [0068] 상기 아데노-부속 바이러스(AAV)는 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 능력이 있기 때문에 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 적합하다. AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제 5,139,941호 및 제 4,797,368호에 상세하게 개시되어 있다.

- [0069] 전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피드가 옆에 위치되어 있는 목적의 유전자 서열(CCN5 단백질의 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열)을 포함하는 플라스미드 및 말단 리피드가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미드를 동시 형질전환시켜 제조된다.
- [0070] 상기 백시니아 바이러스, 렌티바이러스 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스로부터 유래된 벡터도, CCN5 단백질의 유전자 및 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 세포 내로 운반하는데 이용할 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 상기 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터 서열은 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 상술한 바와 동일하다.
- [0072] 또한, 상기 재조합 바이러스는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 적재된 것일 수 있다. 이때, 상기 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드는 상기 재조합 바이러스에 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드-CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 순서로 포함될 수 있다.
- [0073] 또한, 상기 재조합 바이러스는 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드와 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 사이에 자가-절단(self-cleavage) 서열을 포함할 수 있다. 상기 자가절단 서열은 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 상술한 바와 동일하다.
- [0074] 상기 심장 부정맥은 상술한 바와 같다.
- [0075] 본 발명에서, 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 바이러스를 유효성분으로 하는 약학적 조성물의 투여 방법은 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 실시될 수 있다. 또한, 본 발명에서 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 네이키드(naked) 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드인 경우에는, 미세주입법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 방법에 의해 유전자를 세포내로 도입시킬 수 있다.
- [0076] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용가능한 담체는 제제일 경우 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활유, 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.
- [0078] 상기 약학적 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으나, 주사제(Injections)로 제조할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성률 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, CCN5 단백질을 기준으로 하였을 때 0.0001 mg/kg(체중) 내지 100 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성률 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, 상기 약학적 조성물이 바이러스인 경우, 성인 기준 1일 1.0×10^3 내지 1.0×10^{20} 바이러스 유전체(viral genome)의 양으로 투여할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준 1일 1.0×10^3 내지 1.0×10^{20} , 1.0×10^8 내지 1.0×10^{16} , 1.0×10^{12} 내지 1.0×10^{15} 또는 1.0×10^{13} 내지 1.0×10^{14} 의 바이러스 유전체(viral genome)의 양으로 투여할 수 있다.
- [0081] 또한, 상기 약학적 조성물이 플라스미드 벡터인 경우, 성인 기준 1일 0.1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ 내지 1 mg/1 μl 의 농도로 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물이 플라스미드 벡터인 경우, 투여량은 0.1 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml 또는 그 이상, 이 사이의 모든 값과 범위를 포함할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질을 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 SERCA2a 단백질을 더 포함할 수 있다. 상기 CCN5 단백질 및 SERCA2a 단백

질은 상술한 바와 같다.

- [0083] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여하며, 비경구 투여는 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 조직에 직접 주입하는 방법 등을 포함한다.
- [0084] 본 명세서에서 "허용가능한 담체"는 모든 아래의 물질 중 일부 혹은 모든 용매, 희석제, 액체 운반체, 분산제, 현탁 보조제, 표면활성제, 등장제, 농축제, 유화제, 보존제, 고체 결합제, 운할제, 또는 그 유사제로 특정한 투여량에 적합한 것을 포함한다. Gennaro 저 Mack Publishing, Easton, Pa., 1995년 출간 Remington's Pharmaceutical Sciences Ed, 는 공지의 기술과 조성으로 의약적 조성물에 사용되는 다양한 담체를 제시한다. 의약적으로 수용 가능한 담체의 약제학적 조성의 예는 아래의 것을 포함하며 이것으로 제한되지 않는다. 글루코스, 수크로스의 당, 옥수수전분, 감자전분등의 전분, 소디움카복시메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트등의 셀룰로오스와 이의 유도체; 파우더 형태의 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아버터, 좌약용 왁스, 땅콩버터, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 대두유등의 부형제; 프로필렌 글라이콜등의 글라이콜; 에틸올레이트, 에틸라우레이트등의 에스테르; 한천; 마그네슘 하이드록사이드, 알루미늄 하이드록사이드등의 완충제; 알긴산; 발열성 물질제거 증류수; 등장 식염수; 링거액; 에틸알코올과 인산염 완충수 및 라우릴 황산 나트륨과 스테아린산 마그네슘 및 착색제, 착색제, 방출제, 코팅제, 감미료, 향미제 및 방향제, 향산화제등이 화합물 제조자의 판단에 의해 포함될 수 있다.
- [0085] 본 발명의 또 다른 측면은, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0086] 상기 약학적 조성물은 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물은 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현백터를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 나아가 상기 약학적 조성물은 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.
- [0087] 여기서 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 심장 부정맥 질환에 걸릴 수 있거나, 심장 부정맥을 앓고 있는 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다.
- [0088] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 추가적으로 SERCA2a 단백질을 개체에 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0089] 여기서 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 심장 부정맥 질환에 걸릴 수 있거나, 심장 부정맥을 앓고 있는 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다.
- [0090] 본 발명의 또 다른 측면은, CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트 및 SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0091] 여기서 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 심장 부정맥 질환에 걸릴 수 있거나, 심장 부정맥을 앓고 있는 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다.
- [0092] 본 발명의 또 다른 측면은, SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현백터 및 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현백터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0093] 여기서 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 심장 부정맥 질환에 걸릴 수 있거나, 심장 부정맥을 앓고 있는 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다.
- [0094] 본 발명의 또 다른 측면은, SERCA2a 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스 및 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0095] 여기서 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 심장 부정맥 질환에 걸릴 수 있거나, 심장 부정맥을 앓고 있는 인간 또는 다른 포유동물일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 또 다른 측면은, 심장 부정맥을 예방 또는 치료하기 위한 본 발명의 약학적 조성물의 용도를 제공한

다.

- [0097] 본 발명의 또 다른 측면은, 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 본 발명의 약학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0098] 상기 약학적 조성물은 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물은 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드가 적재된 발현백터를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 나아가 상기 약학적 조성물은 CCN5 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 심장 부정맥의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.
- [0099] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실험예와 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 제조, 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0100] **제조예 1. AAV9-CCN5 및 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5 제작**
- [0101] CCN5 단백질을 발현하기 위하여 pTR-CMV-CCN5 유전자 컨스트럭트를 제작하였다. 또한, CCN5 단백질과 SERCA2a 단백질을 동시에 발현하기 위하여 pTR-CMV-SERCA2a-P2A-CCN5 유전자 컨스트럭트를 제작하였다(도 1 및 도 2).
- [0102] 상기 유전자 컨스트럭트에서 SERCA2a 부분은 인간의 SERCA2a 단백질의 cDNA 서열로 이루어져 있다. 이어서 연결한 P2A 부분은 porcine teschovirus-1에서 유래한 자가 절단(self-cleavage) 부위로서 22개의 아미노산을 암호화하는 염기서열로 이루어져 있다. 마지막으로 CCN5 부분은 인간의 CCN5 단백질의 cDNA 서열로 이루어져 있다.
- [0103] pTR-CMV-luciferase 벡터에서 luciferase 부분을 제거하고 SERCA2a-P2A-CCN5 유전자 컨스트럭트를 대신 삽입하여 pTR-CMV-SERCA2a-P2A-CCN5 재조합 플라스미드를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드에 의해 만들어지는 단백질은 P2A 부위의 21번째 아미노산인 글리신과 22번째 아미노산인 프롤린 사이의 자가 절단에 의해 SERCA2a 부분과 CCN5 부분으로 나누어지게 된다. SERCA2a 부분은 소포체 막에 머물러서 본연의 기능을 할 수 있다. 또한, CCN5 부분은 소포체 내로 이동한 다음 시그널 펩타이드(signal peptide)가 절단된 형태로 세포 외로 분비되어 본연의 기능을 할 수 있다.
- [0104] 아데노-부속 바이러스(AAV, serotype 9)를 제작하기 위해 pds-AAV2-EGFP 벡터에 인간 CCN5 유전자를 클로닝하였다. 바이러스 패키징과 바이러스의 전달효율을 향상시키기, AAV 벡터제작 시, eGFP 시퀀스를 제거하였다. 재조합 AAV는 293T 세포를 이용해 제작하였다. 세포배양액에 있는 AAV 입자들을 모아서 황산암모늄(ammonium sulfate)으로 석출시키고, 이는 이오딕사놀 그라디언트(iodixanol gradient)를 이용한 초원심 분리를 통해 정제하였다. 원심분리를 사용하여 이오딕사놀을 Lactate Ringer's 용액과 교환하는 방법으로 여러번의 희석과 농축 공정을 거쳐서 AAV 입자들을 농축화하였다. AAV 농도는 정량적 RT-PCR과 SDS-PAGE를 이용하여 수치화하였다.
- [0105] **실험방법 1. 실험모델 제작 및 유전자 투여**
- [0106] **실험방법 1.1. CCN5 과발현 마우스 모델에서 안지오텐신 II infusion을 통한 마우스 심방세동 모델 제작**
- [0107] 실험을 위해 수컷 C57BL6 WT(Wile Type, black hair color) 마우스와 CCN5가 심장 특이적으로 과발현 되어있는 TG(Transgenic) 마우스를 사용하였다.
- [0108] 상기 CCN5-TG 마우스는 심장 특이적 발현을 유도하는 α -MHC promoter를 포함하고 있는 pNC vector(clontech,USA)에 마우스 CCN5 유전자를 서브-클로닝(sub-cloning)하였으며, C57BL/6의 수정란에 마이크로 인젝션 기법을 이용해 제작되었다. 또한, 유의한 마우스의 라인을 획득하고 유지하기 위해, MacroGen(South Korea)이라는 회사에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 서던 블랏(southern blot)을 이용해 그 마우스의 게놈상에서 CCN5가 존재함을 확인하였다.
- [0109] 모든 마우스는 8 주령 내지 10주령, 무게는 20 g 내지 25 g인 마우스를 사용하였다. Ketamine(95 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)을 복강내 주사하여 마취시키고, 안지오텐신 II(Angiotensin II)를 피하에 주입하는 방법으로 심방세동을 유발하였다. 이때, 삼투성 소형 펌프(Alzet 1002, Alzet)를 이용하여 안지오텐신 II를 하루에 3.0 mg/kg의 농도로 14일 동안 피하에 주입하였다.
- [0110] **실험방법 1.2. 안지오텐신 II infusion을 통한 마우스 심방세동 마우스 모델제작 및 바이러스 투여**
- [0111] 8주령 내지 10주령의 B6C3F1(gray hair color) 마우스에 Ketamine(95 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)을 복강 내

주사하여 마취시키고 안지오텐신 II를 피하에 주입하는 방법으로 심방세동을 유도하였다. 이때, 삼투성 소형 펌프를 이용하여 안지오텐신 II를 하루에 3 mg/kg의 농도로 2주동안 피하에 주입하였다. 안지오텐신 II infusion으로 심방세동을 유도하고 2주 후 각 마우스에 1×10^{11} vg(viral genome)의 AAV9-Control과 AAV9-CCN5를 꼬리정맥을 통하여 주입하였다

[0112] **실험방법 1.3. 안지오텐신 II infusion을 통한 마우스 심실 부정맥 마우스 모델제작 및 유전자 바이러스 투여**

[0113] 8주령 내지 10주령의 B6C3F1마우스에 Ketamine(95 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시키고, 안지오텐신 II를 피하에 주입하는 방법으로 심실 부정맥을 유도하였다. 삼투성 소형 펌프를 이용하여 안지오텐신 II를 하루에 3 mg/kg의 농도로 2주동안 피하에 주입하였다. 안지오텐신 II infusion로 심실 부정맥을 유도하고 2주 후 각 마우스에 1×10^{11} vg의 AAV9-Control, AAV9-CCN5와 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 꼬리정맥을 통하여 주입하였다

[0114] **실험방법 2. 조직염색**

[0115] 동물 모델들로부터 심장 조직을 취한 후 실온에서 5일 10%(w/v) 포르말린으로 고정시킨 다음 PBS로 세척하였다. 표본을 파라핀에 매립하고 조직 블록을 7 μ m의 두께로 절단하였다.

[0116] 섬유화 정도를 측정하기 위하여 Masson trichrome 염색을 수행하였다. 섬유화가 진행된 부위의 조직은 파란색으로, 정상적인 조직은 적색으로 염색된다. 조직 전체 중에서 섬유화가 일어난 부분의 비율을 계산하여 섬유화가 일어난 정도를 나타내었다. 이를 광학 현미경을 통해 관찰하였으며, Aperio Imagescope(Leica Biosystems) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0117] **실험방법 3. Real-time PCR을 통한 mRNA 발현양 확인**

[0118] 동물 모델들로부터 심장 조직을 취한 후 mRNA를 추출하여 qRT-PCR을 수행하였다. QuantiTect SYBR Green real time PCR Kit(Qiagen Ltd)를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 이를 통해 전사 수준을 분석하였다. Trizol(Gibco BRL)을 사용하여 심장 조직으로부터 RNA를 분리하여 이를 cDNA로 합성하였다. 다양한. Quantitative real-time PCR 조건은 37 cycles: 94 $^{\circ}$ C 10초, 57 $^{\circ}$ C 15초, 72 $^{\circ}$ C 5초이다. 실험에 사용된 프라이머의 정보는 표 1에 나타내었다.

표 1

[0119]

프라이머	서열정보	서열번호
Mouse α -SMA-F	5'- CCCACCCAGAGTGGAGAA -3'	서열번호 13
Mouse α -SMA-R	5'- ACATAGCTGGAGCAGCGTCT -3'	서열번호 14
Mouse Collagen I-F	5'- CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3'	서열번호 15
Mouse Collagen I-R	5'- GACGCTGACTTCAGGGATGT -3'	서열번호 16
Mouse TGF- β 1-F	5'- TGGAGCAACATGTGGAAGCTC -3'	서열번호 17
Mouse TGF- β 1-R	5'- CAGCAGCCGGTTACCAAG -3'	서열번호 18
Mouse IL-1 β -F	5'- TCCAGGATGAGGACATGATGAGCA -3'	서열번호 19
Mouse IL-1 β -R	5'- GAACGTCACACACACCAGCAGGTTA -3'	서열번호 20
Mouse RANTES-F	5'- TGCAGAGGACTCTGAGACAGC -3'	서열번호 21
Mouse RANTES-R	5'- GAGTGGTGTCCGAGCCATA -3'	서열번호 22
Mouse F4/80-F	5'- CCTGGACGAATCCTGTGAAG -3'	서열번호 23
Mouse F4/80-R	5'- GGTGGGACCACAGAGAGTTG -3'	서열번호 24
Mouse MCP-1-F	5'- CATCCACGTGTGGCTCA -3'	서열번호 25
Mouse MCP-1-R	5'- GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT -3'	서열번호 26
Mouse CCN5-F	5'- ATACAGGTGCCAGGAAGGTG -3'	서열번호 27
Mouse CCN5-R	5'- GTTGGATACTCGGGTGGCTA -3'	서열번호 28
Mouse GAPDH-F	5'- CTCATGACCACAGTCCATGC -3'	서열번호 29
Mouse GAPDH-R	5'- TTCAGTCTGGGATGACCTT -3'	서열번호 30
Mouse 18s rRNA-F	5'- GTAACCCGTTGAACCCATT -3'	서열번호 31
Mouse 18s rRNA-R	5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3'	서열번호 32
Rat α -SMA-F	5'- TCTGTCTCTAGCACAACTGTGAATG -3'	서열번호 33
Rat α -SMA-R	5'- TTGACAGGCCAGGGCTAGAAGGG -3'	서열번호 34
Rat Collagen I-F	5'- AATGCACTTTTGGTTTGGTCACGT -3'	서열번호 35
Rat Collagen I-R	5'- CAGCCCACTTTGCCCAACCC -3'	서열번호 36

Rat TGF- β 1-F	5'- TGTTTCGCGCTCTCGGCAGTG -3'	서열번호 37
Rat TGF- β 1-R	5'- CGGATGGCCTCGATGCGCTT -3'	서열번호 38
Rat GAPDH-F	5'- ACCCAGCCCAGCAAGGATACTG -3'	서열번호 39
Rat GAPDH-R	5'- ATTCGAGAGAAGGGAGGGCTCCC -3'	서열번호 40

[0120] 실험방법 4. 전기 생리학적 실험방법

[0121] 실험방법 4.1. CCN5 TG 마우스를 이용한 심방세동 모델에서의 심전도 측정

[0122] 심방 전기생리학 연구를 위해 랑겐도르프 시스템(Langendorff system)에 분리한 마우스 심장을 연결하여 ex vivo 상태에서 실험을 수행하였다. Krebs-Henseleit 버퍼(118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucose)를 분리한 심장에 순환시키고 95% O₂/ 5% CO₂ 가스, 37℃ 온도, 60 mmHg의 압력을 유지해주었다. 전기자극을 주기 전에 10분간 분리한 심장을 랑겐도르프 시스템에 연결하여 안정화 시켜준 후, Teflon-coated silver bipolar electrode를 우심방, 좌심방, 좌심실에 두었다. 심방세동 유발을 위해 자동 자극기(stimulator)를 이용하여 2초간의 고박동조율(burst pacing)을 3번 수행하였다. 첫 번째 2초간의고박동조율에는 40 ms의 사이클 길이(cycle length)로 펄스 지속시간(pulse duration)은 5 ms동안 자극을 주었고, 자극 후 3분간 안정화를 가졌다. 두번째 2초간의 고박동조율에서는 20 ms의 사이클 길이로 펄스 지속시간은 5ms 동안 수행하였고, 다시 3분간의 안정화를 가졌다. 마지막 2초간의 고박동조율에서는 20 ms의 사이클 길이로 펄스 지속시간은 10 ms으로 수행하였다. 적어도 1초 동안 불규칙한 R-R 간격을 보이며 불규칙하고 빠른 리듬을 보이는 심방을 심방세동으로 판단하였다.

[0123] 실험방법 4.2. AAV9-CCN5 를 주입한 마우스 심방세동 심전도 측정

[0124] 실험방법 4.1에서 수행한 랑겐도르프 시스템(Langendorff system)에 분리한 마우스 심장을 연결하여 ex vivo 상태에서 실험을 수행하였다. 구체적으로, 먼저 마우스의 혈액응고를 막기 위해 헤파린을 투여하였고, 100%의 아이소플루레인(isoflurane, Forane, USP, Baxter Healthcare Corporation)을 사용하여 마취하였다. 그 후, 마우스 심장을 적출하여 랑겐도르프 시스템에 연결하였다. 심장은 1.5 내지 2.0. min⁻¹을 통해 대동맥에 캐놀러를 달고 Tyrode solution(NaCl 130 mM, NaHCO₃ 24 mM, KCl 4 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.8 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, C₆H₁₂O₆ 5.6 mM, 1% albumin)을 순환시키고 95% O₂/ 5% CO₂ 가스, 38±1℃ 온도, 7.3 pH 내지 7.5 pH, 60 mmHg 내지 70 mmHg의 압력(Pressure Monitor BP-1, World Precision Instruments)을 유지해 주었다. 심장의 기계적 수축을 최소화하기 위해 electro-mechanical decoupler(5 mM Blebbistatin, Sigma Aldrich, USA)를 사용하였다.

[0125] 우심방에 주문 제작된 Ag-AgCl 페이스잉 전극(pacing electrode)을 두고, 다른 전극은 양쪽의 심 외막의 표면과 심장 중격(septum)에 고정하였다. 심장의 전방 표면은 반 수직적 방법으로 좌심방에서의 전기적 활동을 연속적으로 매핑하였다(Mightex BioLED Light, Source Control Module, BLS Series).

[0126] 부정맥 판단을 위해 체적 심전도 측정(Volumetric Electrocardiography)을 수행하였는데 심장의 체적 심전도 측정을 계속적으로 레코딩하기 위해 전자식 증폭기를 사용하여 150 Hz에서 증폭 및 저주파 통과 여파가 수행되었다. 또한 1 kHz의 속도로 디지털 샘플링 하였다(BioPac Systems MP150). 지속적인 부정맥의 발생을 전기적 및 광학적인 신호로 확인하기 위해, 우심방에 7 Hz의 기본 주파수(PCL=140 ms)에서 페이스하기 시작하여 점진적으로 2 Hz 내지 3 Hz의 주파수로 2 ms의 자극 지속시간을 주면서 주파수를 점진적으로 증가시켰다.

[0127] 실험방법 4.3. 심방세동 및 심실 부정맥 마우스 모델에서 광학적 지도화(Optical Mapping) 실험방법

[0128] 심장을 역 관류를 시작하고 20분 내지 30분 후 심박수가 4 Hz 내지 5Hz의 정상 상태에 도달하게 되면 15 μM의 전압민감성 염료(voltage sensitive dye, Di-4-ANEPPS, Invitrogen, Thermofisher Sciencefic) 0.3 ml을 대동맥 근처에 주입하여 심장을 염색하였다. 530 nm 파장에서 fluorophore를 여기시키기 위해서 단색광(monochromatic light, Mightex, BioLED)을 사용하였다. 방출된 파장은 long pass band필터(> 590 nm)로 필터링하고 총 3배의 배율에서 87.5 μm의 공간 해상도, 1 kHz의 프레임 속도 및 80x80 픽셀 CCD 칩(SciMeasure, SciMeasure Analytical Systems, USA)으로 투사되었다.

[0129] 수집된 원자료(raw data)는 프레임을 선택하여 마우스 심장에 최적화된 MATLAB(the Mathworks)으로 작성된 맞춤형 소프트웨어로 처리하였다. 신호에 대한 노이즈 비율을 개선하고 심장 박동에 의한 변동성을 줄이기 위해, 페이스된 리듬에서 8 내지 10개의 연속적인 박동에 대해 평균을 내었다. 이미지는 각 픽셀에서 5x5의 균일한 커널

을 사용하여 공간적으로 평균화되었으며, 기준선을 뺀 다음 최대 진폭으로 정규화하고 반전하였다. 막전위는 최소 10개의 연속 프레임 동안에 역치 값이 0.5를 넘는 지점을 활성화 시간으로 결정하였다.

[0130] **실험방법 5. 웨스턴 블로팅**

[0131] 본 실험에서 사용한 세포와 얻어진 심장을 브로드-스펙트럼 프로테아제 저해제 콕테일(Calbiochem)이 첨가된 균질액 RIPA 버퍼(0.1%(w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1%(w/v) NP-40, 0.5%(w/v) Sodium deoxycholate)를 이용해 준비하였다. 단백질을 SDS-PAGE 겔을 이용하여 크기 별로 분리하고 이를 PVDF membrane(Millipore)로 옮겼다. 5%(w/v) 탈지유로 1 시간 동안 블로킹하고 TBST로 세척한 후, 준비된 막은 p-CaMKII, CaMKII, NCX2(Na⁺/Ca²⁺ Exchanger 2), RyR2(Santa Cruz), pRyR2(Ser2808), pRyR2(Ser2814)(Badrilla), GAPDH(Laboratory made), α -tubulin, TGF- β 1, α -SMA(Sigma), Collagen I(Rockland), NaV 1.5, Connexin 43, Kir2.1(alomone lab), FAP(Fibroblast Activation Protein), MsrA(Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase), Tubulin(Abcam), SERCA2a(21 Century Biochemicals), Smad7(Invitrogen), CCN5(Genescript) 항체와 함께 반응시켰다. 이어서 membrane을 홀스래디쉬 퍼옥시다아제-컨쥬게이트 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA, USA)와 함께 반응시키고 화학발광기질(Dogen)을 사용하여 현상하였다. LAS 소프트웨어를 사용하여 블랏을 스캔하고 정량화하였다.

[0132] **실험방법 6. 심방 섬유아세포의 분리 및 배양**

[0133] 흰색 래트의 심방(atrium)에서 섬유아세포(Fibroblast)를 분리하기 위해 Sprague Dawley(SD) 흰색 래트의 심장을 사용하였다. 좌심방은 콜라겐 분해효소(Collagenase) 용액을 이용하여 조직을 분해하여 단일 세포로 분리하였다. 심방에서 분리한 세포는 먼저 50×g, 3분 동안 원심 분리하였고, 이를 통해 얻어진 상층액을 모아 다시 한번 500×g, 10분 동안 원심 분리하였다. 이를 통해 얻어진 세포층은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)과 1% 항생제가 들어있는 DMEM 배양액을 이용하여 배양하였다. 2일 내지 3일 후에 100 nM의 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 대조군 conditioned media(CM-Con) 또는 CCN5가 포함된 conditioned media(CM-CCN5)를 처리하고 48시간 후에 실험을 종료하였다. 명확한 실험 결과를 위해서 좌심방 섬유아세포는 첫번째 계대만 사용하였다.

[0134] **실험방법 7. CM-CCN5 제조**

[0135] 상기 CM-CCN5를 만들기 위해, pcDNA3.1-CCN5HA plasmid를 이용하였다. HEK293 cell을 5×10⁵ 세포수로 60 mm의 배양접시에 분주하고, 하루동안 세포를 안정화 시켰다. 그 후, pcDNA3.1-CCN5HA를 리포펙타민(Invitrogen)을 이용하여 형질주입 시켰다. 리포펙타민을 제거하기 위하여 4시간 후에 배지를 교환하였다. 그 후, 24시간 동안 배양하였고, 얻어진 배양액을 CM-CCN5라고 명명하였다.

[0136] **실험방법 8. 형광면역화학법**

[0137] 15,000개의 세포를 16 mm 커버 슬립에다 분주하고 하룻밤 동안 배양하여 안정화 시킨 뒤, 100 nM의 안지오텐신 II와 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리하여 배양한다. 4%(w/v) 파라포름알데히드 용액으로 고정하고, 0.5% Triton X-100 용액으로 세포막 침투가능화를 시킨 후, 5%(w/v) BSA 용액으로 블로킹(blocking)하였다. 그 후, anti- α -SMA(Sigma), 항체로 반응시키고, 2차 항체로는 Alexa Fluor 488(Invitrogen)을 사용하였다. Hoechst dye를 이용하여 핵을 염색하였다. 면역화학법을 수행한 세포는 Fluoview FV 1000 공초점 현미경을 사용하였다.

[0138] **실험방법 9. 심초음파 검사를 통한 심근기능 측정**

[0139] 마우스를 Ketamine(95 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)를 복강주사하여 마취시키고 심초음파 검사를 진행하였다. 2차원 영상과 M-모드 추적기능을 통하여 기록하고 단축수축(Fractional shortening)과 심실 크기의 비율을 결정하였다(GE Vivid Vision).

[0140] **실험예 1. 심방세동 모델 마우스에서 CCN5 단백질의 치료효과 확인**

[0141] **실험예 1.1. CCN5 단백질의 심방 섬유화 억제 효과 확인**

[0142] 실험방법 1.1의 방법으로 제조한 WT 마우스와 CCN5 TG 마우스에 삼투성 소형 펌프(Alzet 1002, Alzet)를 이용하여 안지오텐신 II를 하루에 3.0 mg/kg의 농도로 14일 동안 피하에 주입하였다. 2주 후, 마우스 심장을 적출하여 실험방법 2의 방법으로 조직염색하여 섬유화 정도를 확인하였다(도 3a).

[0143] 그 결과, 안지오텐신 II를 투입한 대조군 마우스 그룹에서는 약 8% 가량의 콜라겐이 심방조직 사이에 축적된 것을 보지만, 안지오텐신 II를 투입한 CCN5 TG 마우스 그룹에서는 콜라겐의 축적정도가 약 4% 정도로 매우 의미

있게 감소하였다(도 3b 및 도 3c).

[0144] 또한, 이때 변화되는 mRNA 발현을 확인하기 위해 마우스 좌심방으로부터 mRNA를 추출하여 실험방법 3의 방법으로 qRT-PCR을 수행하였다.

[0145] 그 결과, 심장 섬유화 마커 유전자인 α -SMA, Collagen I, TGF- β 1과 염증 반응 마커 유전자인 IL-1 β , RANTES(Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), F4/80, MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein 1)의 mRNA 발현은 안지오텐신 II를 투입한 대조군 마우스 그룹에서 증가하였지만, 안지오텐신 II를 투입한 CCN5 TG 마우스 그룹에서는 마커 유전자의 발현이 의미 있게 감소하였다(도 3d 내지 도 3j). 이를 통해 CCN5가 안지오텐신 II에 의해 유발된 심방 섬유화를 억제하는데 효과가 있다는 사실을 확인하였다.

[0146] **실험예 1.2. CCN5의 심방세동 억제 효과 확인**

[0147] 심방 전기생리학 연구를 위해 실험방법 4.1과 동일한 방법으로 랭겐도르프 시스템에 분리한 마우스 심장을 연결하여 ex vivo 상태에서 실험을 수행하였다. 그 결과, 안지오텐신 II를 투입한 WT 마우스에서는 6마리 중 4마리가 심방세동이 유발되었다. 하지만, 안지오텐신 II를 투입한 CCN5 TG 마우스에서는 4마리 모두 전기자극 이후에도 정상적인 심전도 결과를 보였다(도 4b 및 도 4c). 이를 통해 CCN5가 안지오텐신 II에 의해 유발된 심방세동을 억제하는 것을 확인하였다.

[0148] **실험예 1.3. CCN5의 세포내 Ca^{2+} 농도를 조절 확인**

[0149] CCN5가 심근 세포 Ca^{2+} 를 조절할 것이라 생각하고 마우스 심방 심근 세포로 알려진 HL-1 세포(sigma)를 이용하여 확인하였다. 또한, 상기 배양한 HL-1를 웨스턴 블랏으로 Ca^{2+} 농도를 조절 효과를 확인하였다.

[0150] 세포 수준의 실험에서는 CCN5의 효과를 확인하기 위해, 실험예8의 방법으로 제조한 CM-CCN5를 사용하였다. HL-1 세포에 안지오텐신 II를 처리하고 동시에 CM-Con(대조군) 또는 CM-CCN5(실험군)을 처리하였다. 48시간 후에 웨스턴 블랏으로 단백질의 변화를 관찰하였다(도 5a).

[0151] 그 결과, HL-1 세포에 400 nM의 안지오텐신 II를 처리하였을 때 CaMKII의 인산화(Thr287)가 증가되었지만, CM-CCN5를 동시에 처리한 세포에서는 CaMKII의 인산화가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 안지오텐신 II를 처리한 HL-1 세포에서 근소포체의 RyR2(Ryanodine Receptor2)의 Ser2808과 Ser2814의 과인산화가 유도되어 있지만 이를 CCN5가 억제하였다. 안지오텐신 II에 의해 증가된 NCX2(Na^+/Ca^{2+} Exchanger 2)의 발현 또한 CCN5에 의해 감소되었다. 근소포체 내의 칼슘결합 단백질인 Calsequestrin 2의 발현양은 안지오텐신 II에 의해 감소되었지만 CM-CCN5를 함께 처리한 세포에서는 이의 발현이 증가되었다(도 5b 내지 도 5g). 이를 통해 CCN5는 심근 세포를 직접적으로 조절하여 심방세동에 관여한다는 사실을 확인하였다.

[0152] **실험예 1.4. in vitro 에서 CCN5의 심방 섬유화 억제 효과 확인**

[0153] 심방(atrium)에서 섬유아세포(Fibroblast)를 분리하기 위해 Sprague Dawley(SD) 흰색 래트의 심장을 사용하였다. 실험방법 6의 방법으로 심방의 섬유아세포를 분리하였다. 분리한 섬유아세포는 2일 내지 3일 후에 100 nM의 안지오텐신 II를 처리함과 동시에 대조군 conditioned media(CM-Con) 또는 실험예8에서 제조한 CCN5가 포함된 conditioned media(CM-CCN5)를 처리하고 48시간 후에 실험을 종료하였다(도 6a). 안지오텐신 II와 CM-Con 또는 CM-CCN5를 처리한 섬유아세포에 실험방법 8과 동일한 방법으로 형광면역화학법을 수행하였다.

[0154] 그 결과, 안지오텐신 II 100 nM을 처리한 섬유아세포는 근섬유아세포로의 분화가 일어나 근섬유아세포 마커 단백질인 α -SMA를 발현하고 있었지만, CM-CCN5를 함께 처리한 섬유아세포는 α -SMA를 전혀 발현하고 있지 않았다(도 6b).

[0155] 또한, 상기 배양한 심방의 섬유아세포를 실험방법 5의 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하여 심방 섬유화 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 안지오텐신 II를 처리한 섬유아세포는 α -SMA, Collagen I, TGF- β 1의 단백질 발현이 증가하였지만, CM-CCN5를 함께 처리한 섬유아세포에서는 이 단백질들의 발현이 현저하게 감소되었다(도 6c 내지 도 6f).

[0156] 또한, 상기 배양한 심방의 섬유아세포의 mRNA 발현양을 확인하기 위해 qRT-PCR을 통해 심방 섬유화 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, CM-CCN5와 안지오텐신 II를 함께 처리한 섬유아세포에서는 α -SMA, Collagen I 및 TGF- β 1의 mRNA 발현이 control 수준으로 떨어진 것을 확인하였다(도 6g 내지 도 6i). 이를 통해 CCN5는 섬유화를 조

절하여 심방세동을 억제할 뿐 아니라 심근 세포를 직접적으로 조절하여 심방세동에 관여한다는 사실을 확인하였다.

[0157] **실험예 1.5. 심방세동 모델 마우스에서 AAV-CCN5의 심방 섬유화 억제 효과 확인**

[0158] 실험방법 1.2와 동일한 방법으로, 8주령 내지 10주령의 마우스에 3 mg/kg/day 농도의 안지오텐신 II를 주입하고, 2주가 되는 시점에 5E11 바이러스 유전체(vg) 양으로 AAV9-Control(대조군)과 AAV9-CCN5(비교군)의 바이러스를 각각 꼬리정맥에 주입하였다. 4주 후에 심방 조직을 Masson's Trichrome 염색법과 분자적 수준의 실험을 수행하였다(도 7a).

[0159] 먼저 AAV9 바이러스가 심장 특이적으로 잘 발현하였는지 확인하기 위해, 심방조직에서 CCN5의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 그 결과 AAV9-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서 CCN5 단백질이 과발현된 것을 확인하였다. 또한, 심방조직에서 CCN5의 mRNA 발현량을 확인한 결과 마찬가지로 CCN5의 mRNA가 AAV9-CCN5의 주입에 의해 증가됨을 확인할 수 있었다(도 7b 및 도 7c).

[0160] Trichrome 염색을 통해 심방의 콜라겐 축적 정도를 확인한 결과, 안지오텐신 II 주입 후 AAV9-control을 주입한 마우스에서는 약 6% 정도의 콜라겐이 심방 조직 내에 축적되었지만, AAV9-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서는 약 3% 정도로 감소한 것을 확인하였다(도 7d 및 도 7e).

[0161] 또한, 심방 조직을 이용하여 실험방법 3과 동일한 방법으로 qRT-PCR을 수행하여 섬유화 관련 마커 유전자인 α -SMA, Collagen I 및 TGF- β 1의 mRNA 발현량과 염증 관련 마커 유전자인 IL-1 β , RANTES, F4/80 및 MCP-1의 mRNA 발현량을 확인하였다. 그 결과, 안지오텐신 II에 의해서 증가한 마커 유전자들이 AAV9-CCN5에 의해서 의미 있게 감소했음을 확인할 수 있었다(도 7f 내지 도 7i). 이 결과를 통해서 AAV9-CCN5를 이용하여 심장 특이적으로 CCN5를 과발현 시킨 마우스 모델에서도 안지오텐신 II로 유도된 심방 섬유화 억제에 효과적임을 확인하였다.

[0162] **실험예 1.6. AAV9-CCN5에 의한 심방세동 억제효과 확인**

[0163] 실험방법 4.2와 동일한 방법으로 마우스 모델을 만들고, 최종적으로 6주가 되는 시점에 심장 생리학 실험을 수행하였다(도 8a). 먼저 심전도를 확인한 결과, AAV9-Control을 주입한 마우스 그룹에서는 안지오텐신 II에 의해 심방기능이 약화되어 전기자극 이후에도 계속적으로 심방세동이 유발됨을 확인하였다. 반면에 AAV9-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서는 전기자극 이후에 정상 리듬으로 회복되는 모습을 보였다. Ca^{2+} 의 활동전위(Optical signal)를 측정된 실험에서도 AAV9-Control을 주입한 그룹에서는 자극 이후에 계속적으로 전도의 불규칙성을 나타내었지만, AAV9-CCN5를 주입한 그룹에서는 자극 이후에 정상적인 심방의 활성화를 보였다(도 8b 및 도 8c).

[0164] 심전도를 분석한 결과, AAV9-Control을 주입한 마우스 그룹에서는 전기자극 이후에 5마리 중 4마리의 마우스에서 심방세동이 유발되었지만, AAV9-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서는 5마리 중 2마리의 마우스만이 심방의 이상을 보이고 나머지는 정상적인 심방의 활성화를 보였다(도 8d).

[0165] 심전도 실험 수행 시 심방세동을 유발시키기 위해 전기자극을 주는데 대조군(Sham) 그룹의 마우스에서는 심방세동을 유발하기 위해서 약 28 Hz의 자극이 필요하였지만, 안지오텐신 II와 AAV9-Control을 주입한 대조군 마우스 그룹에서는 약 20 Hz의 낮은 자극에서도 충분히 심방세동이 유발되었다. 반면, 안지오텐신 II와 AAV9-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서는 Sham그룹과 비슷한 수준인 약 25 Hz의 자극으로 높여주어야만 심방세동이 유발됨을 확인할 수 있었다(도 8e).

[0166] 실험방법 4.2에서 언급된 대로 좌심방에서의 전기적 활동을 매핑하여 Ca^{2+} 의 활동전위를 그래프화 시키고, 상기 그래프에서 활동전위기 50(APD₅₀)과 활동전위기 75(APD₇₅)가 되는 각각의 시점에서 그래프를 분석하였다. 그 결과 AAV9-Control을 주입한 그룹에 비해 AAV9-CCN5를 주입한 그룹에서 Sham 그룹과 비슷한 속도로 활동전위기가 나타남을 확인하였다(도 8f).

[0167] 각각의 그룹에서 도 8e의 그래프 기울기를 분석하였다. 이는 활동전위 탈분극에 필요한 속도를 나타낸 것인데 안지오텐신 II에 의해 느려진 탈분극에 필요한 속도가 AAV9-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서는 Sham과 비슷한 수준의 속도로 회복되었음을 확인할 수 있었다(도 8g). 이 결과를 통해 AAV9-CCN5를 이용하여 CCN5를 주입한 마우스 그룹에서도 안지오텐신 II에 의해 유도된 심방세동 현상이 확실하게 억제된다는 것을 확인하였다.

[0168] **실험예 2. 심실 부정맥 모델 마우스에서 AAV-CCN5와 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5의 치료효과 확인**

[0169] **실험예 2.1. 심실 부정맥 마우스 모델 제작**

- [0170] 실험방법 1.3의 방법으로 심실 부정맥 마우스 모델을 제작하였다. 수컷B6C3F1 WT(Wile Type, gray hair color) 마우스는 8 내지 10주령, 무게는 20 내지 25g인 마우스를 사용하였다. 안지오텐신 II를 이용하여 3 mg/kg의 농도로 2주 동안 피하에 주입하였다. 2주 후, 심장기능의 변화를 심음향도 검사 방법으로 확인하였다. 확인된 마우스들은 무작위로 선택하고 5E11 바이러스 유전체(vg) 양으로 CCN5 벡터 단독(AAV9-CCN5) 또는 CCN5 및 SERCA2a 벡터 병용(AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5)를 주입한 후, 마지막 기능평가를 위해 4주간 더 유지시켰다.
- [0171] 먼저 안지오텐신 II에 의해 심실 부정맥 마우스 모델이 잘 만들어진 것을 확인하기 위해서 대조군 마우스 그룹(Sham)과 비교군 마우스 그룹(AngII)의 심장기능을 심초음파 검사 방법으로 확인하였다. 그 결과, 수축분율은 안지오텐신 II를 피하에 주입한 마우스 그룹에서 대조군(Sham)에 비해 감소하였다. 하지만 마우스 무게에는 두 그룹 사이에 큰 차이를 보이지 않았다(도 9a).
- [0172] 심실 빈맥을 결정하기 위해 실험방법 4.3과 동일한 방법으로 우심실(RV)에 10 Hz의 전기자극(도 9b) 또는 20 Hz의 전기자극(도 9c)을 가하여 광학지도(Optical Mapping)를 작성하였다. 전기적 자극이 커질수록 실험군과 대조군 사이의 차이가 뚜렷이 나타났다. 안지오텐신 II를주입한 마우스 그룹에서는 20 Hz의 전기자극이 올 경우 국소적으로 칼슘이온 통로 등이 원래 상태로 회복되지 못하여 자극의 전달 비연속성이 보였다. 칼슘의 활동전위를 그래프화 시켜서 도 9d에 나타내었다. 그래프에서 활동전위기 50(APD₅₀)과 활동전위기 75(APD₇₅)가 되는 각각의 시점에서 그래프를 분석하였다. 그 결과, 안지오텐신 II의 주입에 의해 활동전위기가 더 빨라짐을 확인할 수 있었다(도 9e). 또한 안지오텐신 II 그룹에서 활동전위기의 확산 속도가 의미 있게 감소하였다(도 9f). 전도 속도 및 활동전위 탈분극에 필요한 속도를 분석한 결과 안지오텐신 II에 의해 매우 감소한 현상을 확인할 수 있었다(도 9g). 이를 통해 안지오텐신 II에 의해 심실 부정맥 마우스 모델이 매우 잘 만들어짐을 확인하였다.
- [0173] **실험예 2.2. 심실 부정맥 마우스 모델에서 베타-아드레날린성 수용체 길항제에 대한 효과**
- [0174] ISO(Isoproterenol)은 임상적으로 베타-아드레날린성 수용체에만 작용하여 심근의 수축력을 증가시킴으로써 심박출량을 증가시키는 약물이다. 안지오텐신 II에 의해 유도된 심실 부정맥 마우스 모델에서 Isoproterenol로 베타 수용체를 자극하였을 때 심실 내 Ca²⁺의 활동전위를 확인하였다(도 10a). 우심실에 20 Hz의 전기자극을 가하여 Ca²⁺의 재분극 패턴을 그림으로 나타내었다.
- [0175] 그 결과, 안지오텐신 II를 주입한 마우스 모델에서는 ISO를 처리하더라도 칼슘의 재분극 패턴이 느리게 나타나는 것을 확인하였다(도 10b). 활동전위기 75(APD₇₅)를 분석한 결과, 안지오텐신 II를 주입한 마우스 모델에서는 ISO 처리에 의한 활동전위기 속도가 차이가 없음을 확인할 수 있었다(도 10c).
- [0176] 심실 빈맥을 결정하기 위해 실험방법 4.3과 동일한 방법으로 우심실(RV)에 20 Hz의 전기자극을 가하여 광학지도(Optical Mapping)를 작성하였다. 그 결과, ISO를 처리한 안지오텐신 II 마우스 그룹에서는 ISO를 처리한 대조군 마우스 그룹에 비해 자극에 대한 전도 블록의 비연속성을 보였다(도 10d). 활동전위기 75(APD₇₅)를 분석한 결과, Sham 그룹에 비해 안지오텐신 II를 처리한 마우스 그룹의 활동전위기가 의미 있게 증가하였지만, ISO 처리에 의한 변화는 미미하게 나타났다(도 10e). 전도 속도를 분석한 결과, Sham에 비해 안지오텐신 II 주입한 마우스 그룹에서의 속도가 매우 느려졌지만, ISO 처리에 의해 전도속도가 회복되지는 않은 것을 확인하였다(도 10f). 이를 통해 안지오텐신 II의 주입으로 인해 베타-아드레날린성 수용체의 자극이 둔감해 진 것을 확인할 수 있었다.
- [0177] **실험예 2.3. 심실 부정맥 마우스 모델에서 AAV9-CCN5와 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5의 치료효과 확인**
- [0178] 실험예 2.3의 실험 방법으로 심실 부정맥 모델을 만들었다. 안지오텐신 II를 2주간 마우스에 주입하고, 2주가 되는 시점에 AAV9-CCN5또는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5 벡터를 마우스 꼬리정맥으로 주입하였다. 총 6주 후 실험을 종료하고 심실 부정맥 관련 실험을 수행하였다.
- [0179] 안지오텐신 II에 의해 유발된 심실 부정맥 마우스 모델에서 AAV9-CCN5와 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5에 의한 심장 기능을 확인하기 위해 심초음파 검사를 수행하였다. 안지오텐신 II에 의해 감소되었던 수축분율이 AAV9-CCN5또는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5 주입에 의해 Sham 수준의 수축분율을 나타내었다. 또한 좌심실 벽 두께(LVsd)를 분석한 결과 안지오텐신 II에 의해 감소되었던 좌심실 벽의 두께가 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5에 의해 정상수준으로 회복되었음을 확인하였다(도 11a 및 도 11b).
- [0180] Ca²⁺의 활동 전위를 광학지도를 이용하여 나타내었다. 20 Hz의 자극으로 심실에 전기자극을 주었을 때, ISO 처리에 상관없이 AAV9-CCN5 또는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서 전도가 규칙적으로 퍼져나가는

것을 확인할 수 있었다(도 11c 및 11d). 칼슘의 활동 전위를 그래프화 시켜서 도 11e에 나타내었다.

[0181] 각각의 그룹 Sham, AngII, AngII+AAV9-CCN5, AngII+ AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5에 ISO를 처리하고 재분극 지도를 그려서 분석한 결과, 안지오텐신 II 주입에 의해 느려진 재분극 현상이 AAV9-CCN5 또는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5 주입에 의해 Sham과 비슷한 패턴의 재분극 현상을 보인다는 사실을 확인하였다(도 11f).

[0182] Ca^{2+} 의 전위활동기 75(APD75)를 분석한 결과, 안지오텐신 II에 의해 증가한 전위활동기간이 AAV9-CCN5 주입에 의해서 줄어드는 패턴으로 나타났고(도 11g), AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5에 의해서는 확실하게 Sham수준으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 안지오텐신 II에 의해 느려진 전도 속도 및 탈분극 속도가 AAV9-CCN5 또는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5의 주입에 의해 정상화 됨을 확인하였다(도 11h 및 도 11i). 이를 통해 AAV9-CCN5 와 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5는 안지오텐신 II에 의한 심실 부정맥 회복에 효과가 있다는 사실을 확인하였다.

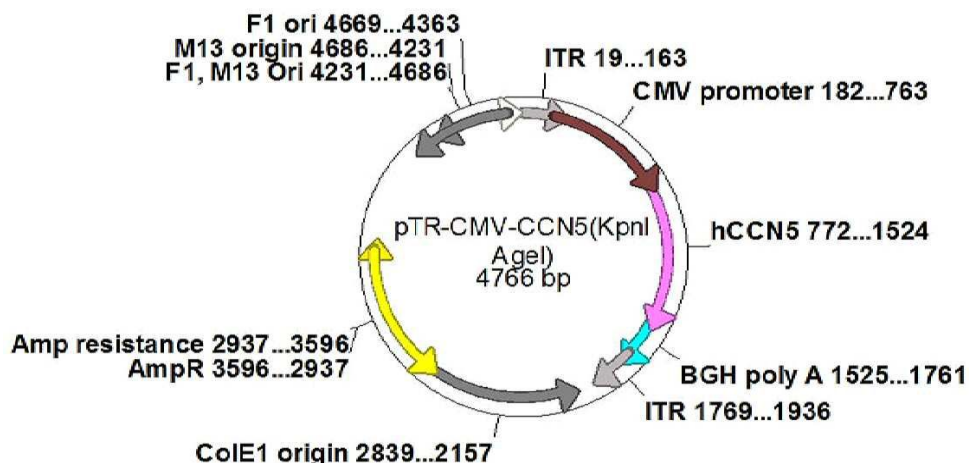
[0183] 또한, 안지오텐신 II 주입 모델에서 프로그램된 전기자극(PES)에 의해 유도된 심실 부정맥을 확인하였다(도 12a). 심실 부정맥을 유도하기 위한 자극 빈도를 분석한 결과, AngII 마우스 그룹에서는 적은 자극 빈도에도 심실 부정맥이 유도되었지만, AAV9-CCN5또는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5를 주입한 마우스 그룹에서는 Sham 그룹 수준 또는 그 이상의 자극 빈도에 의해 심실 부정맥이 유도되었다. 심실 부정맥 발생 정도를 분석한 결과, AngII 마우스 그룹의 심실 부정맥은 5/5, AngII+AAV9-CCN5 마우스 그룹은 1/5, AngII+AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5 마우스 그룹은 0/5의 에피소드로 심실 부정맥이 발생하였다(도 12b 및 도 12c).

[0184] 이러한 심장부정맥 현상은 심장 섬유화와 밀접히 관련되어 있으므로, Masson's Trichrome 염색을 통해 심장의 섬유화를 측정하였다. 그 결과, 안지오텐신 II에 의해 유발된 심장 섬유화가 AAV9-CCN5 또는 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5가 주입된 심장에서 현저히 감소되어 있음을 확인할 수 있었다(도 13a).

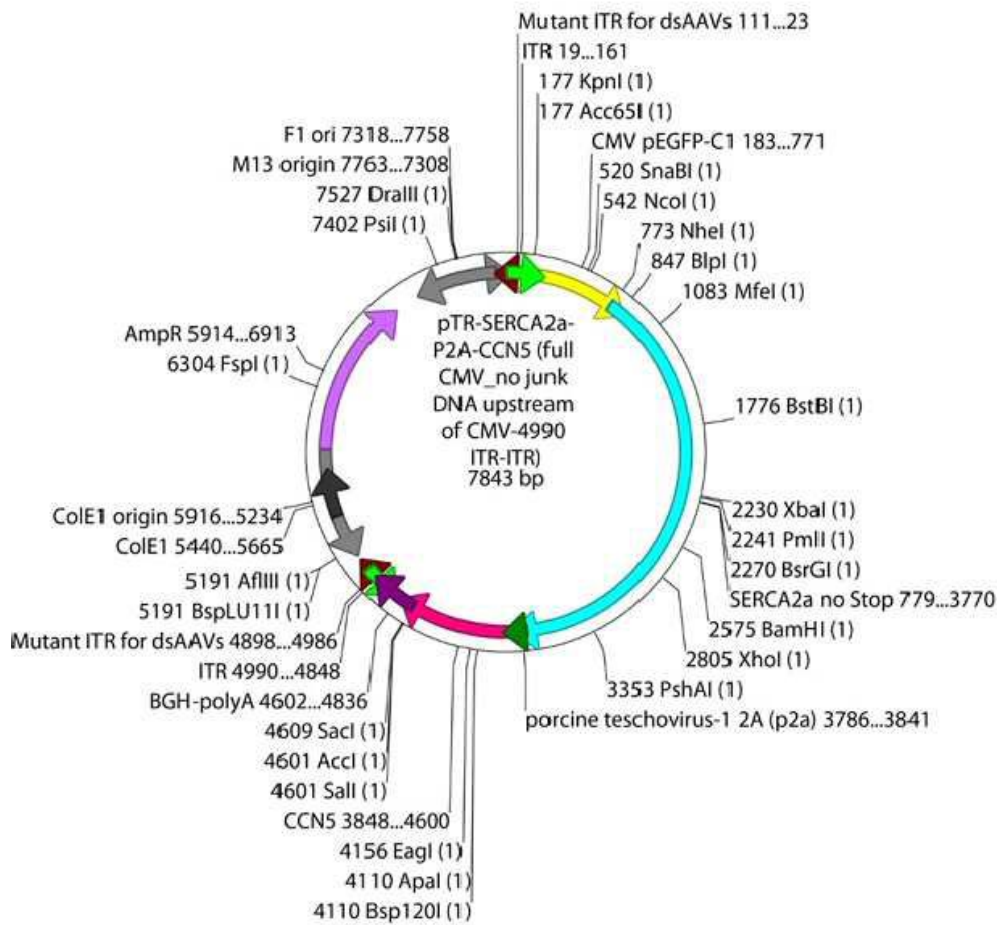
[0185] 또한 이러한 현상은 심장의 전기적 신호를 조절하는 채널관련 단백질과도 깊은 연관성이 있다. 따라서 심장 조직 내 NaV 1.5와 Connexin43 단백질의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 그 결과, 안지오텐신 II에 의해 감소한 채널관련 단백질NaV 1.5와 Connexin43의 발현이 AAV9-SERCA2a-P2A-CCN5에 의해 회복되었음을 확인하였다(도 13b). 이를 통해 CCN5 백터 단독 및 SERCA2A-CCN5 백터 병용을 이용한 유전자 치료방법은 안지오텐신 II에 의해 유도되는 심실 빈맥의 발생도 억제할 수 있음을 확인하였다.

도면

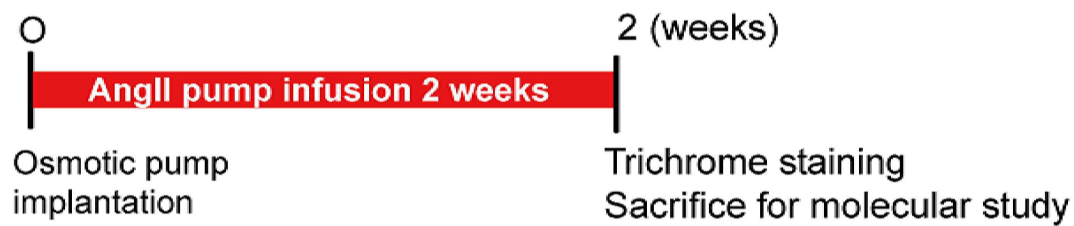
도면1



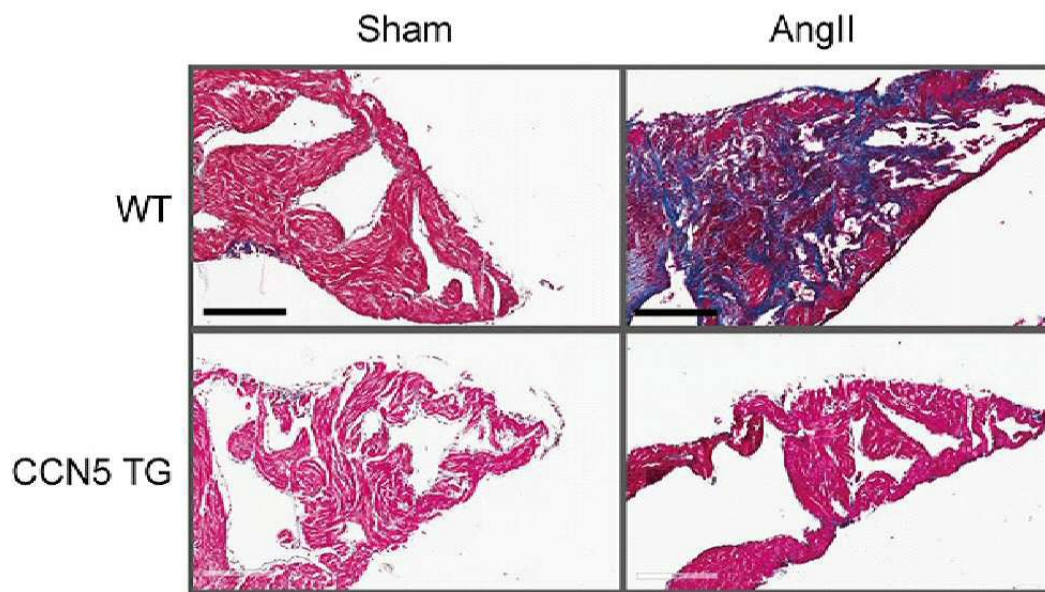
도면2



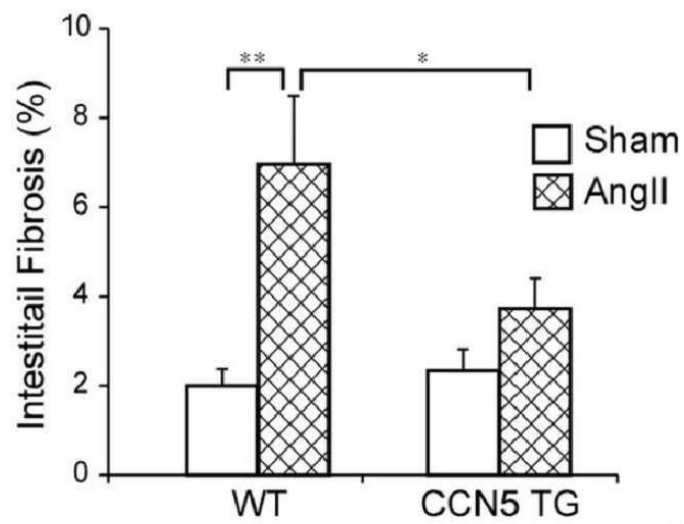
도면3a



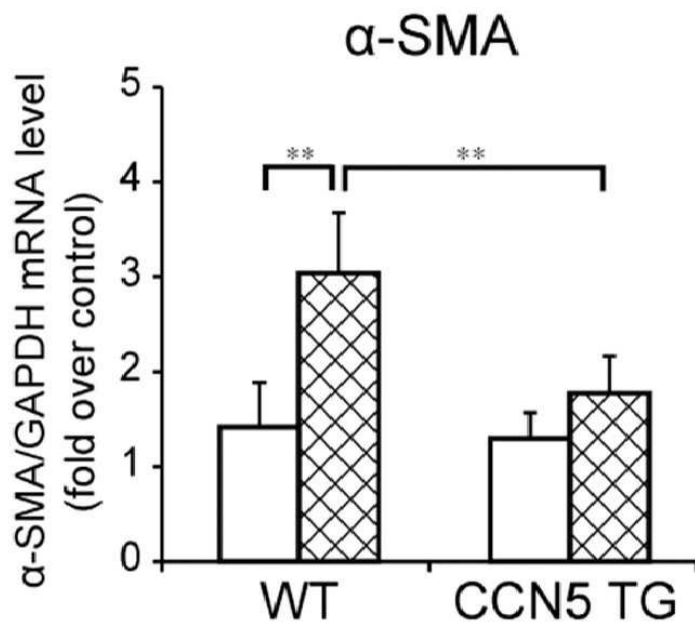
도면3b



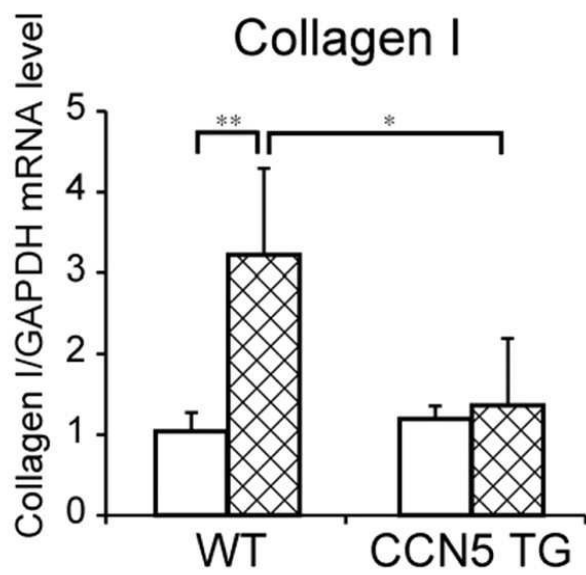
도면3c



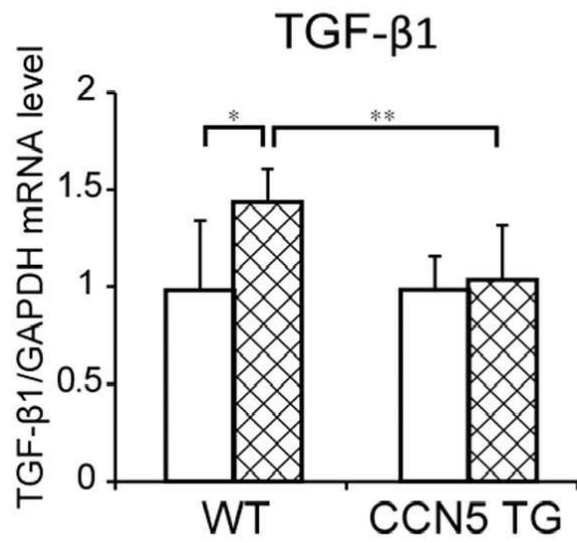
도면3d



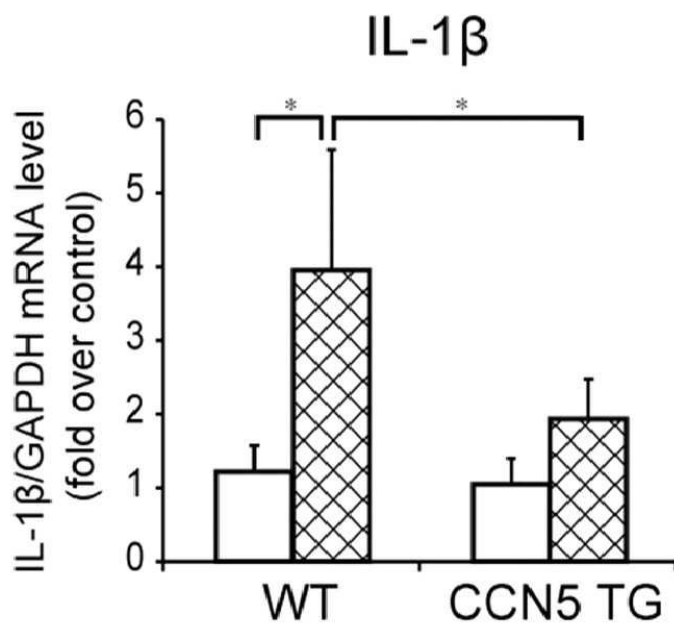
도면3e



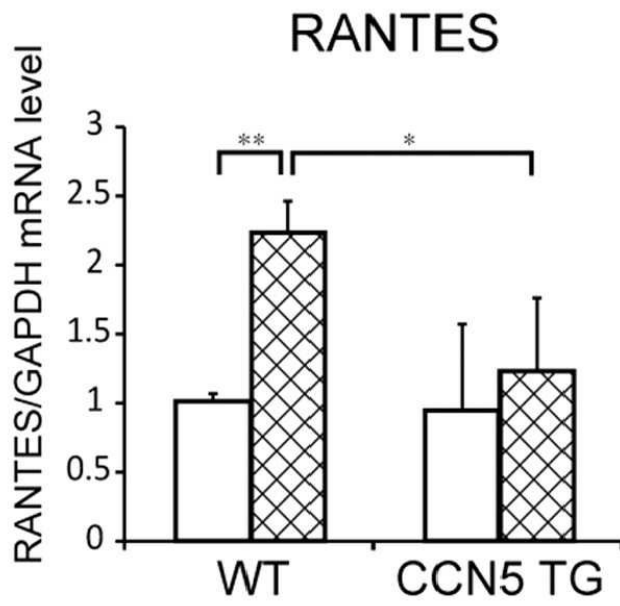
도면3f



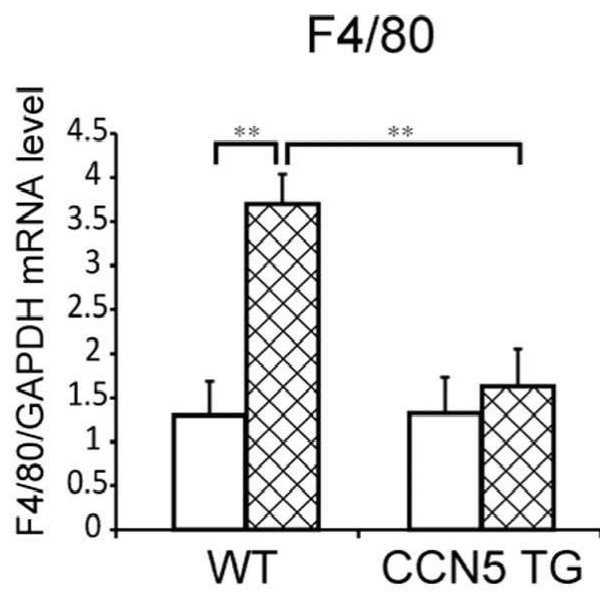
도면3g



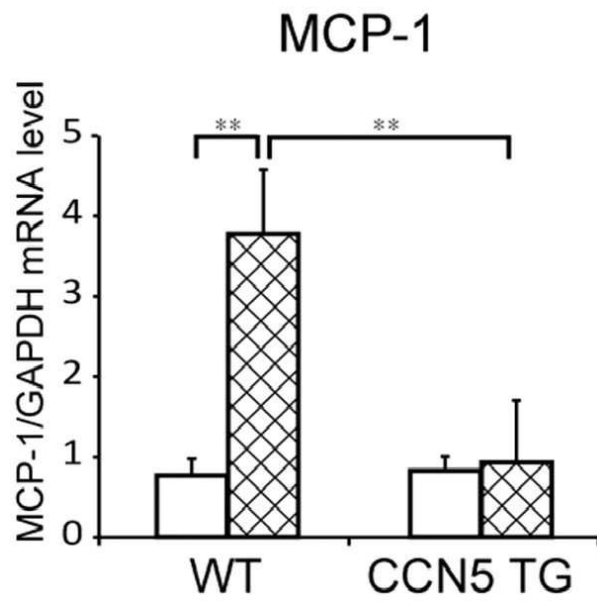
도면3h



도면3i



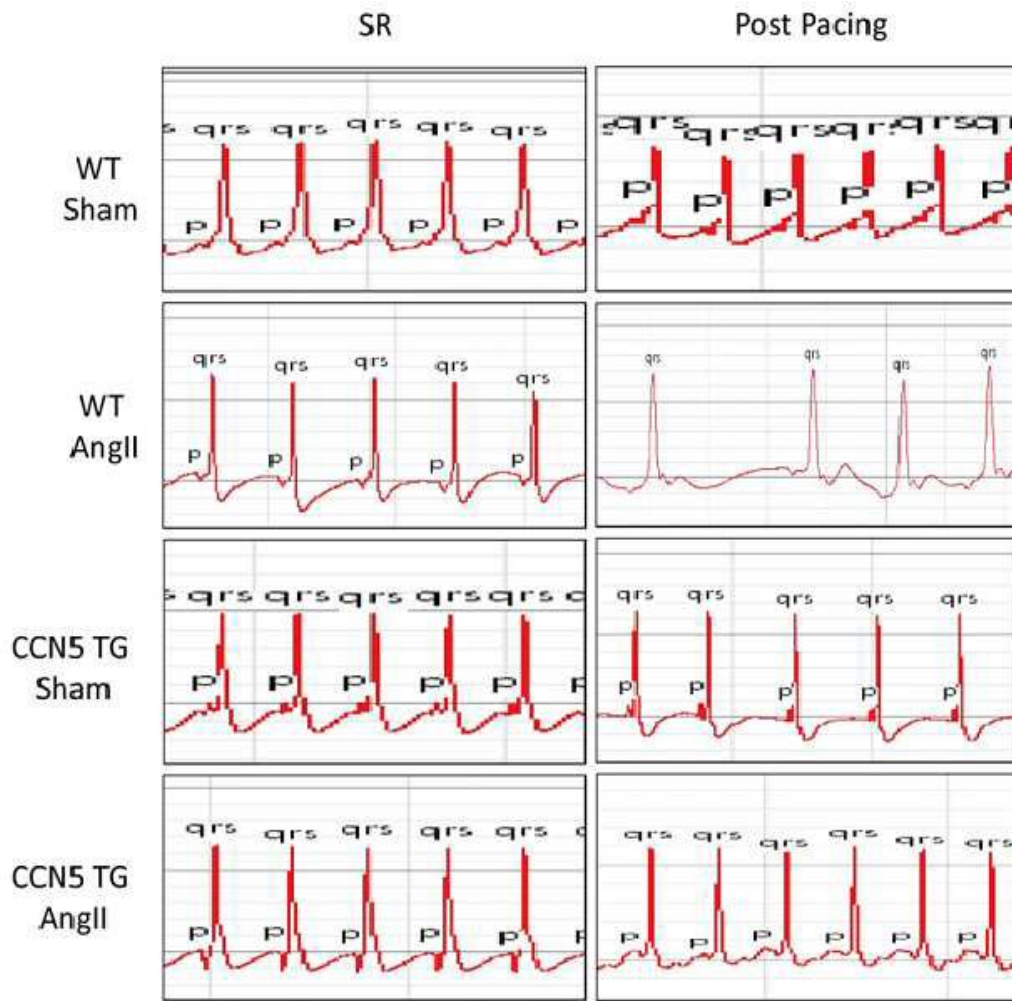
도면3j



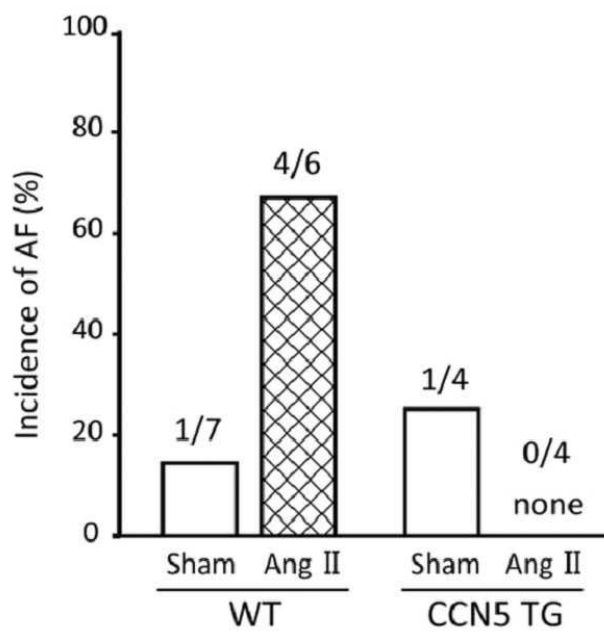
도면4a



도면4b



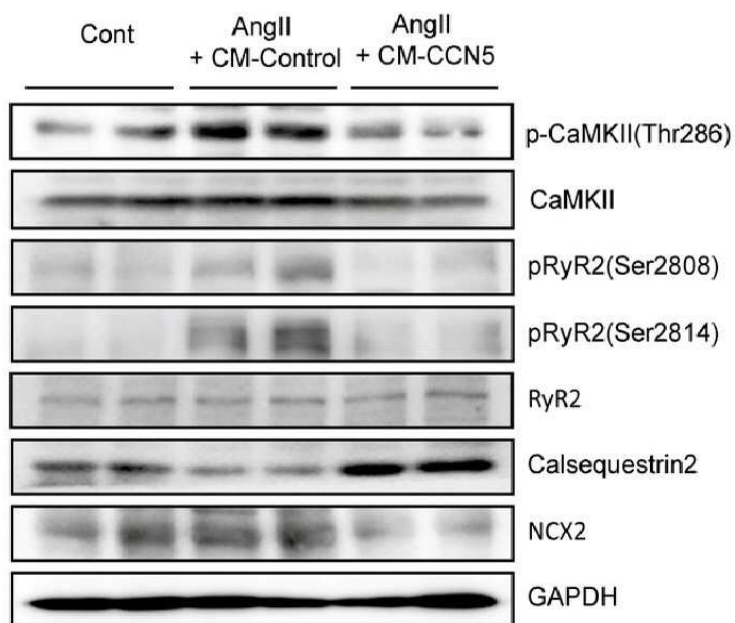
도면4c



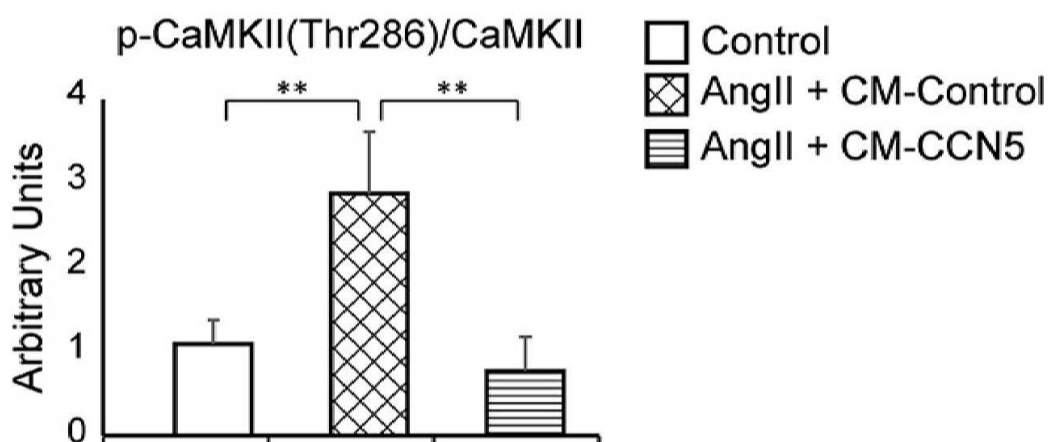
도면5a



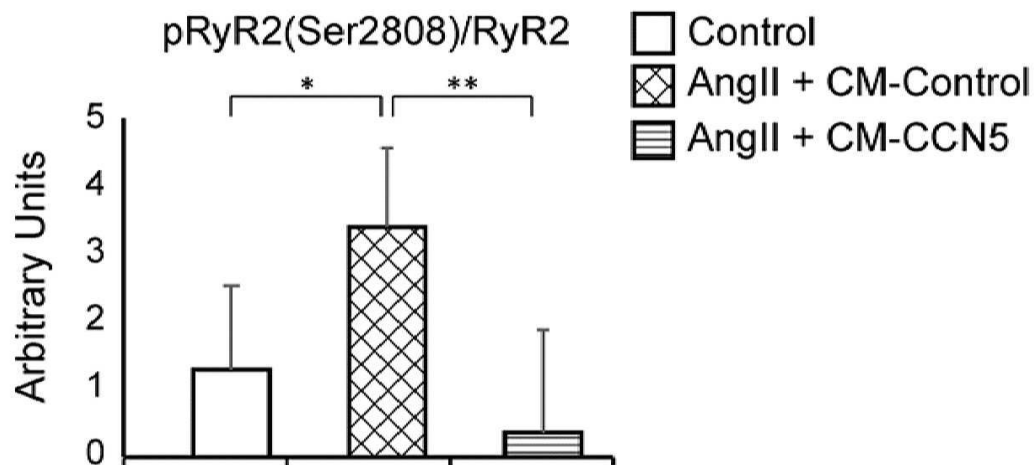
도면5b



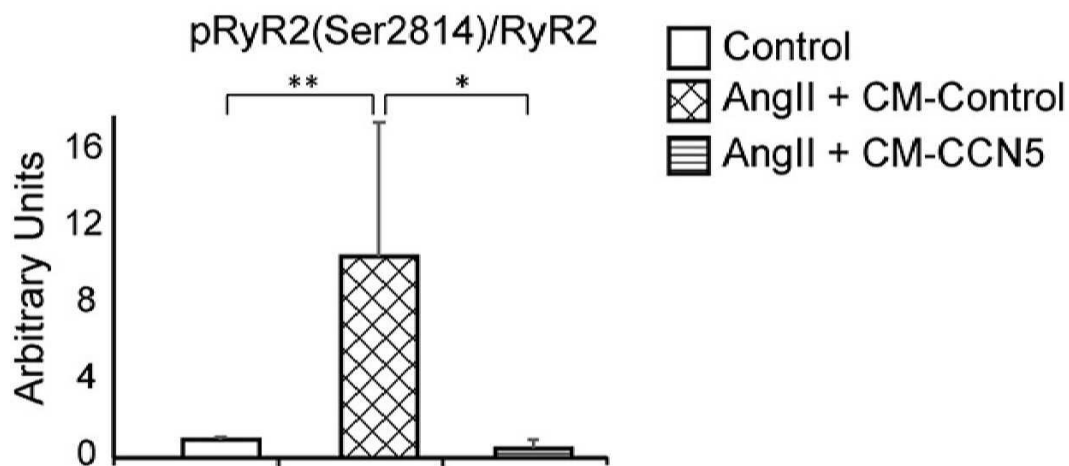
도면5c



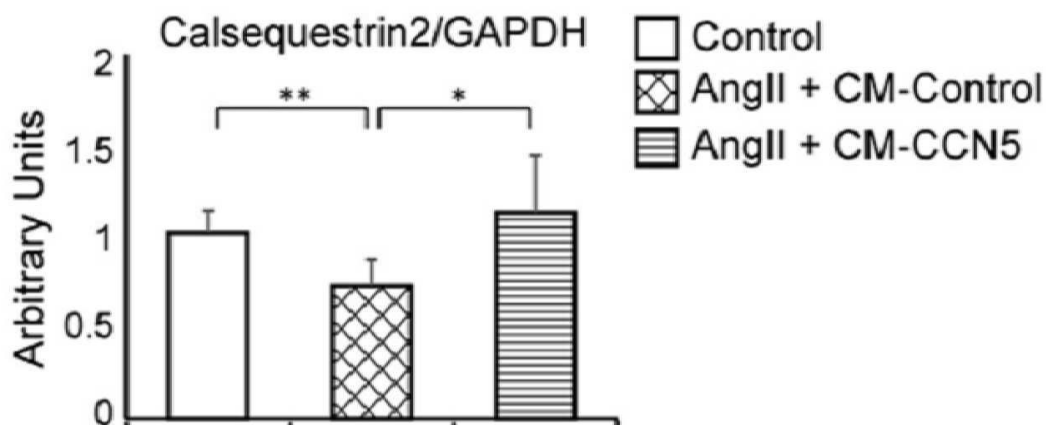
도면5d



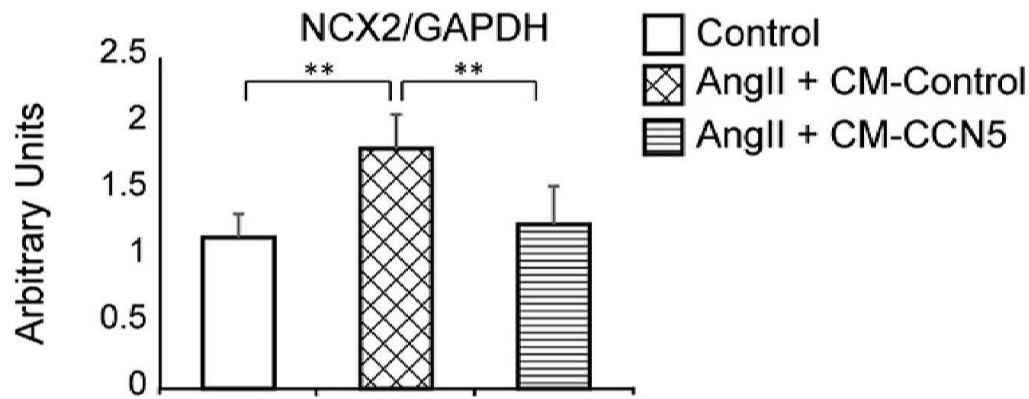
도면5e



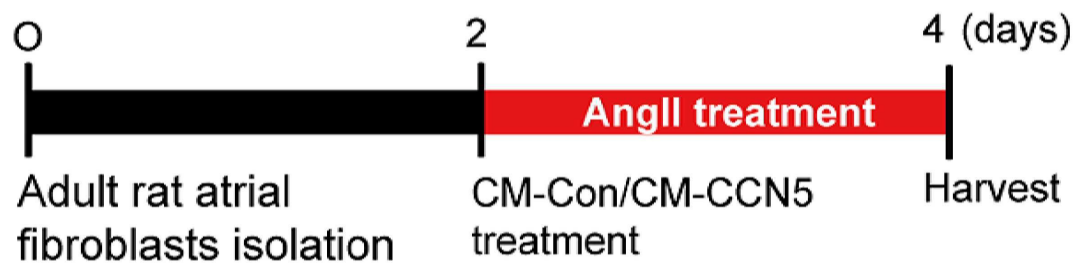
도면5f



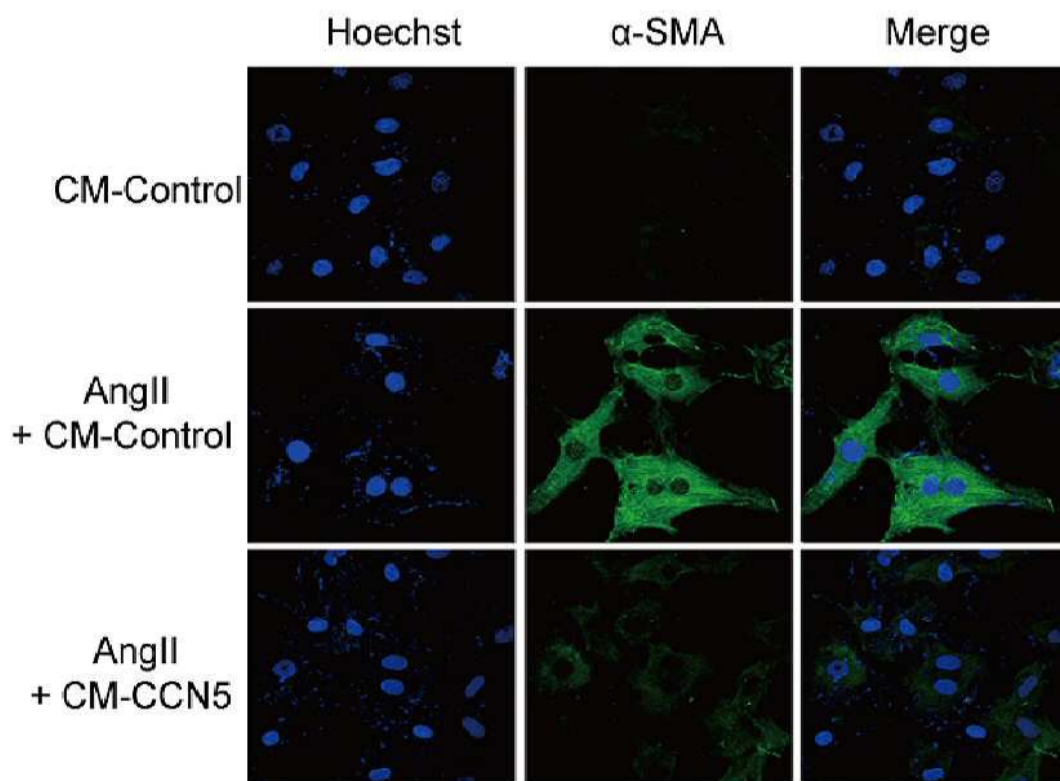
도면5g



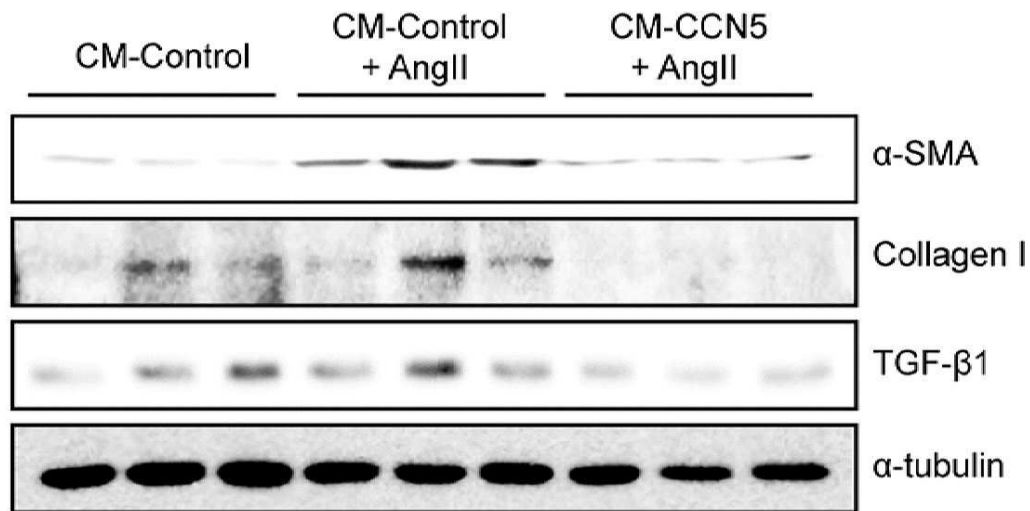
도면6a



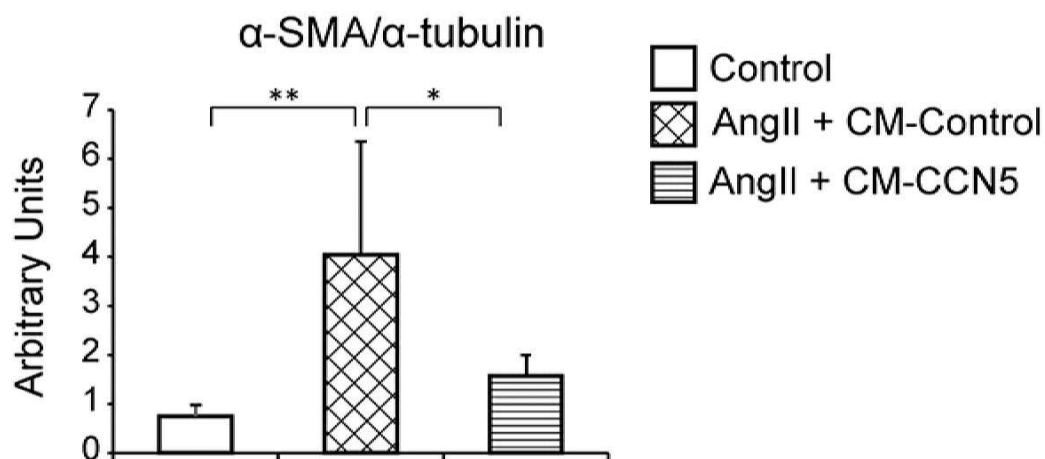
도면6b



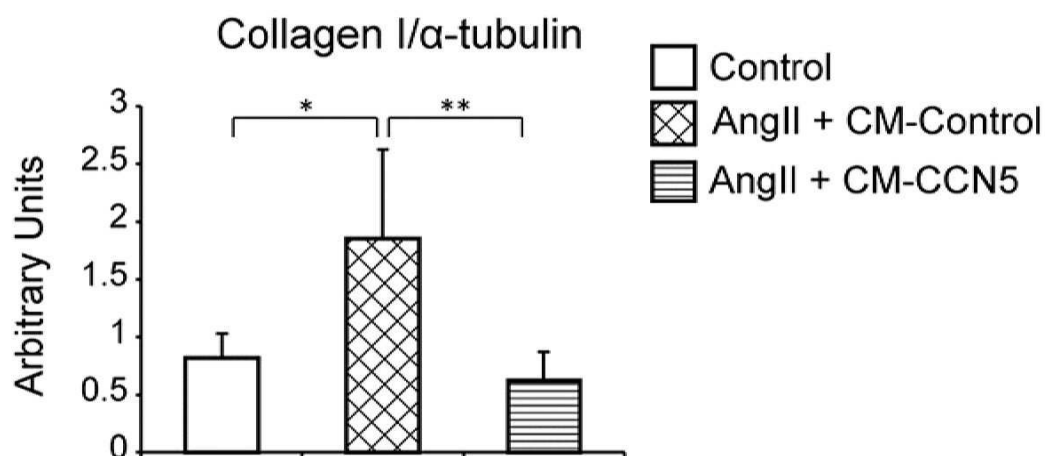
도면6c



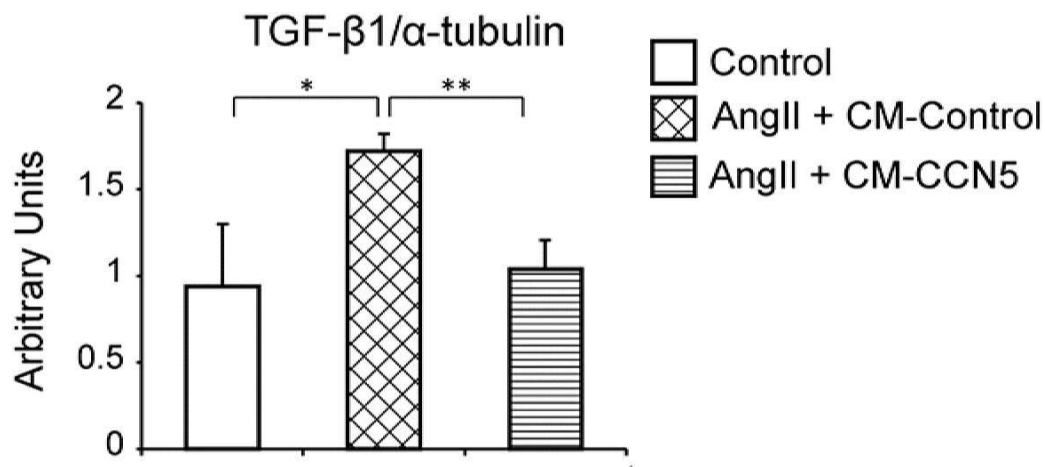
도면6d



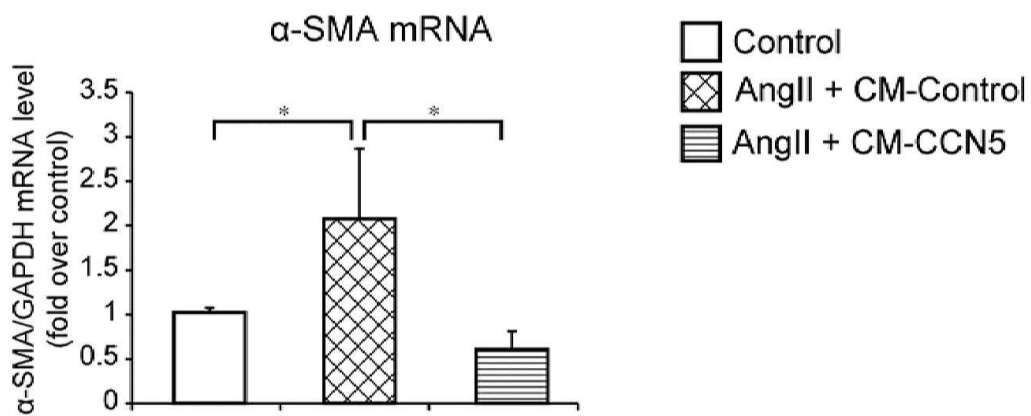
도면6e



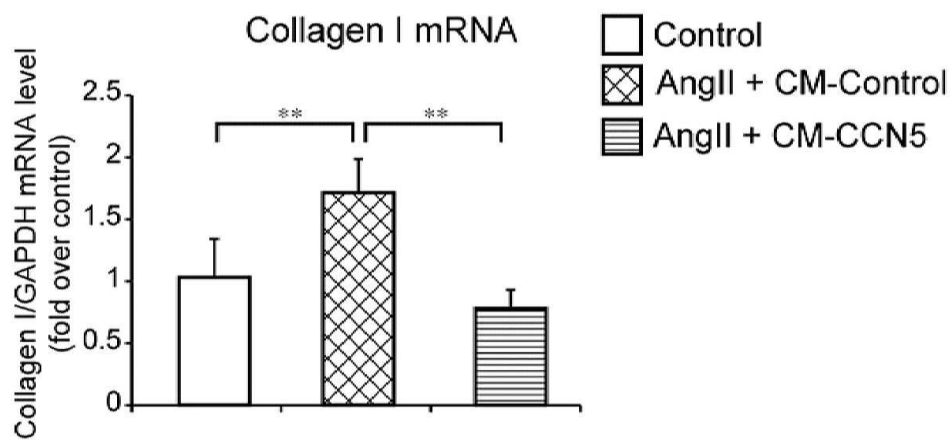
도면6f



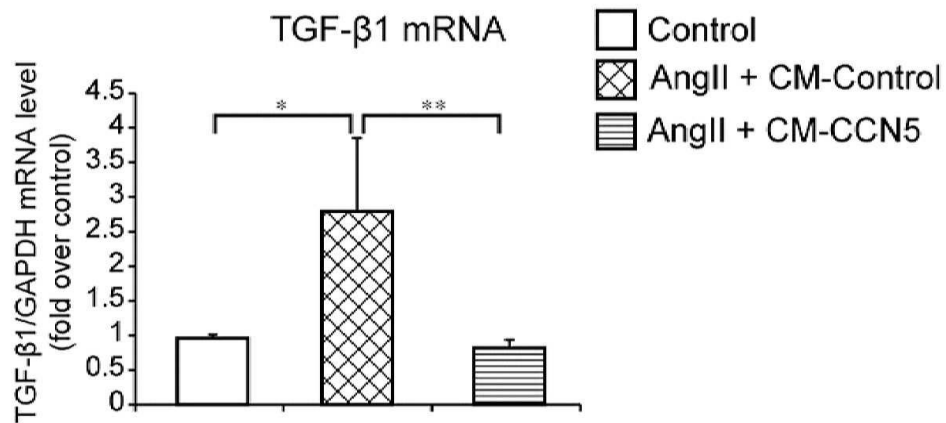
도면6g



도면6h



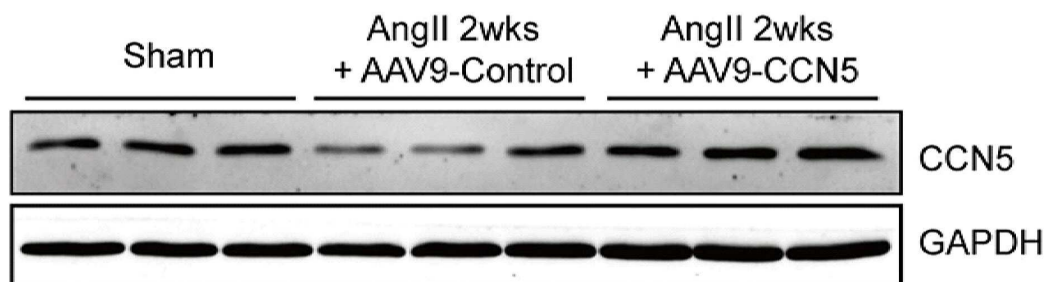
도면6i



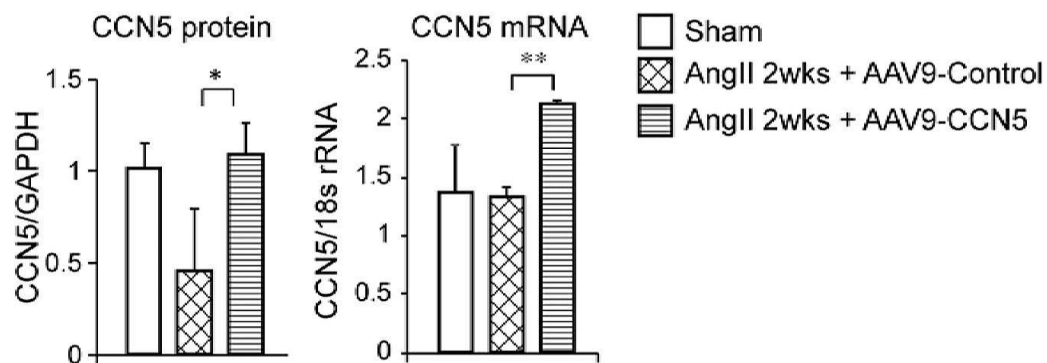
도면7a



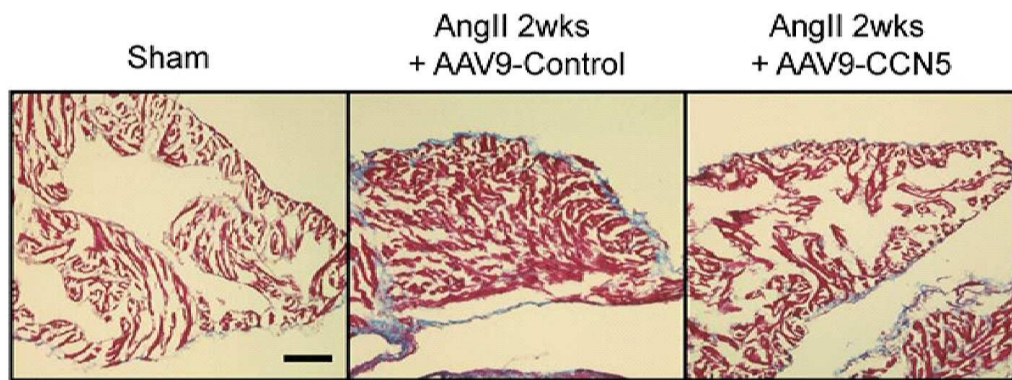
도면7b



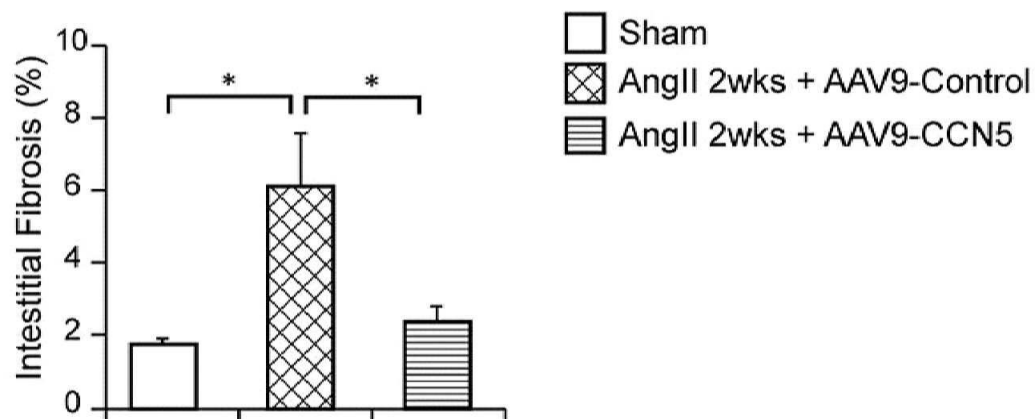
도면7c



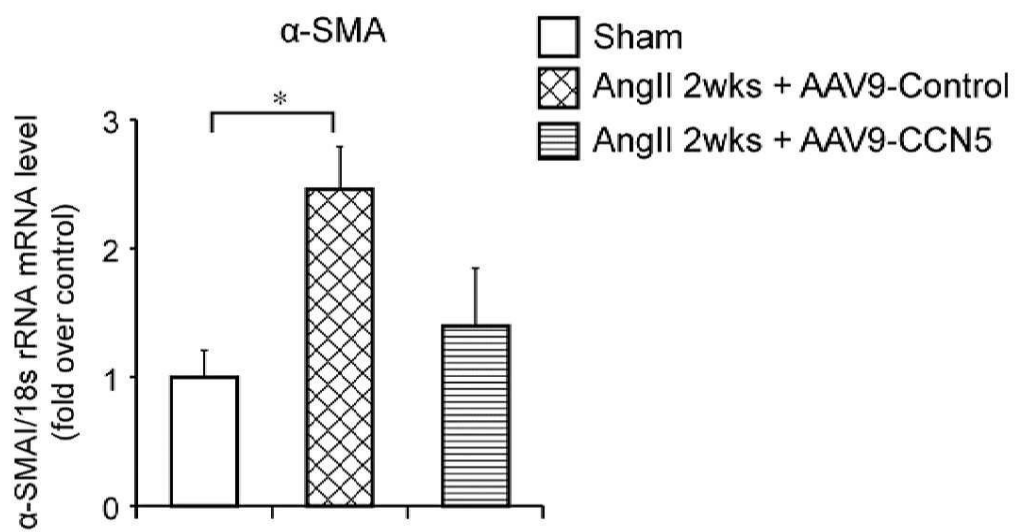
도면7d



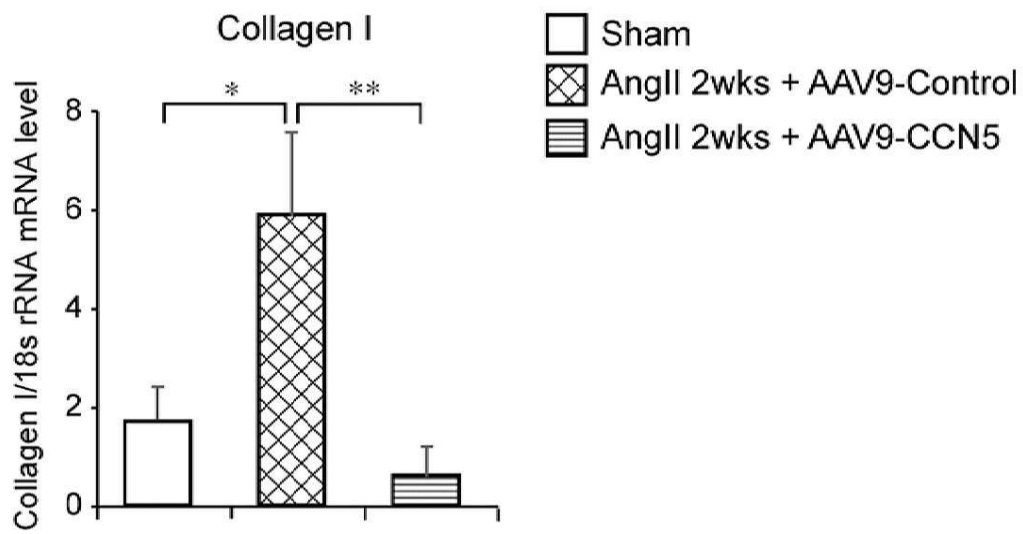
도면7e



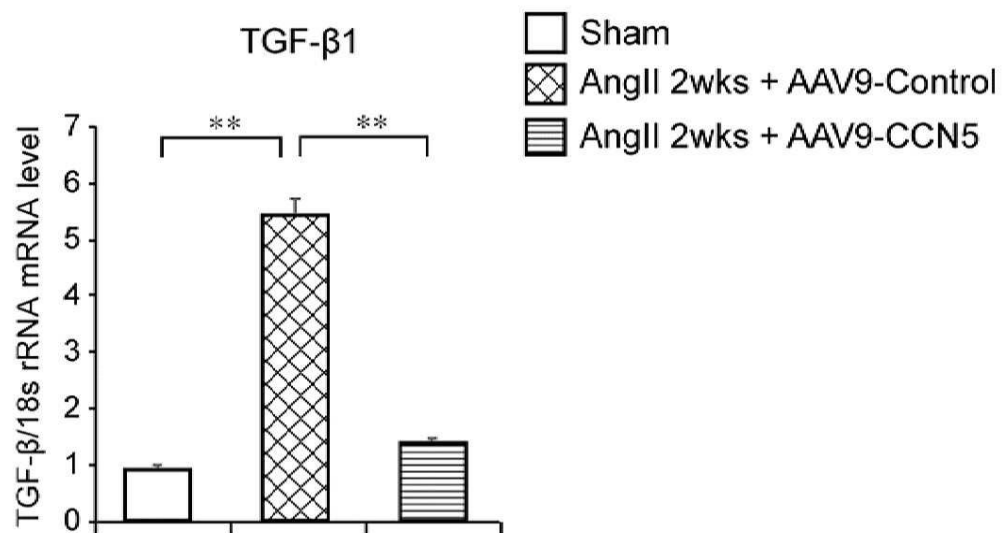
도면7f



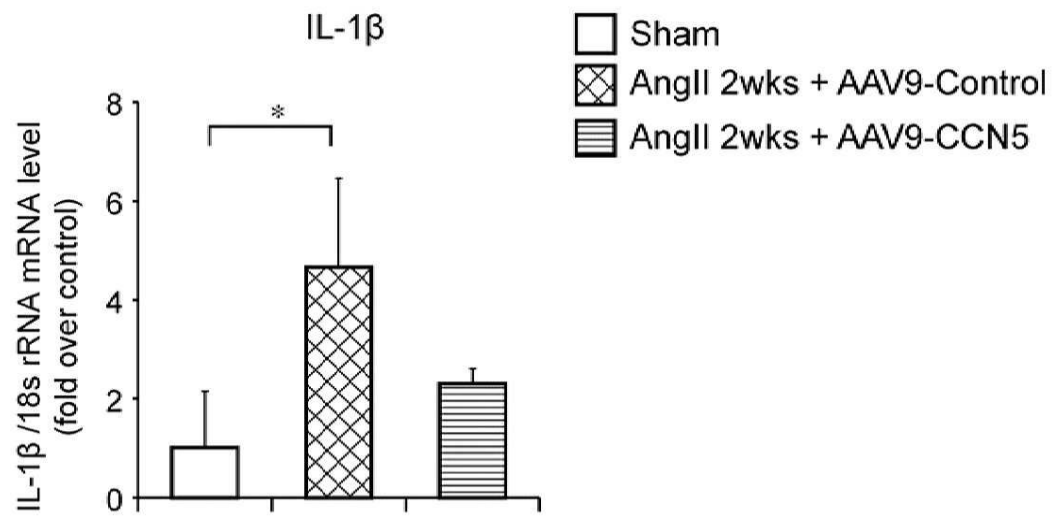
도면7g



도면7h



도면7i



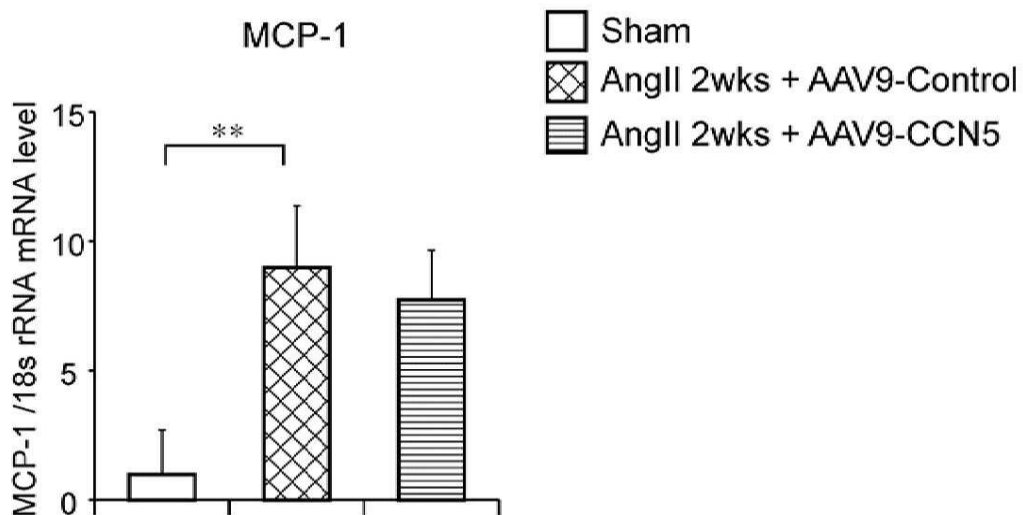
도면7j



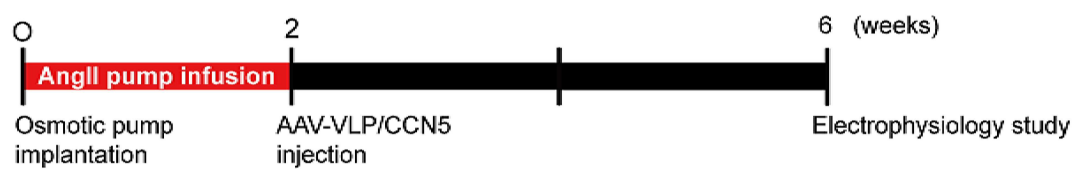
도면7k



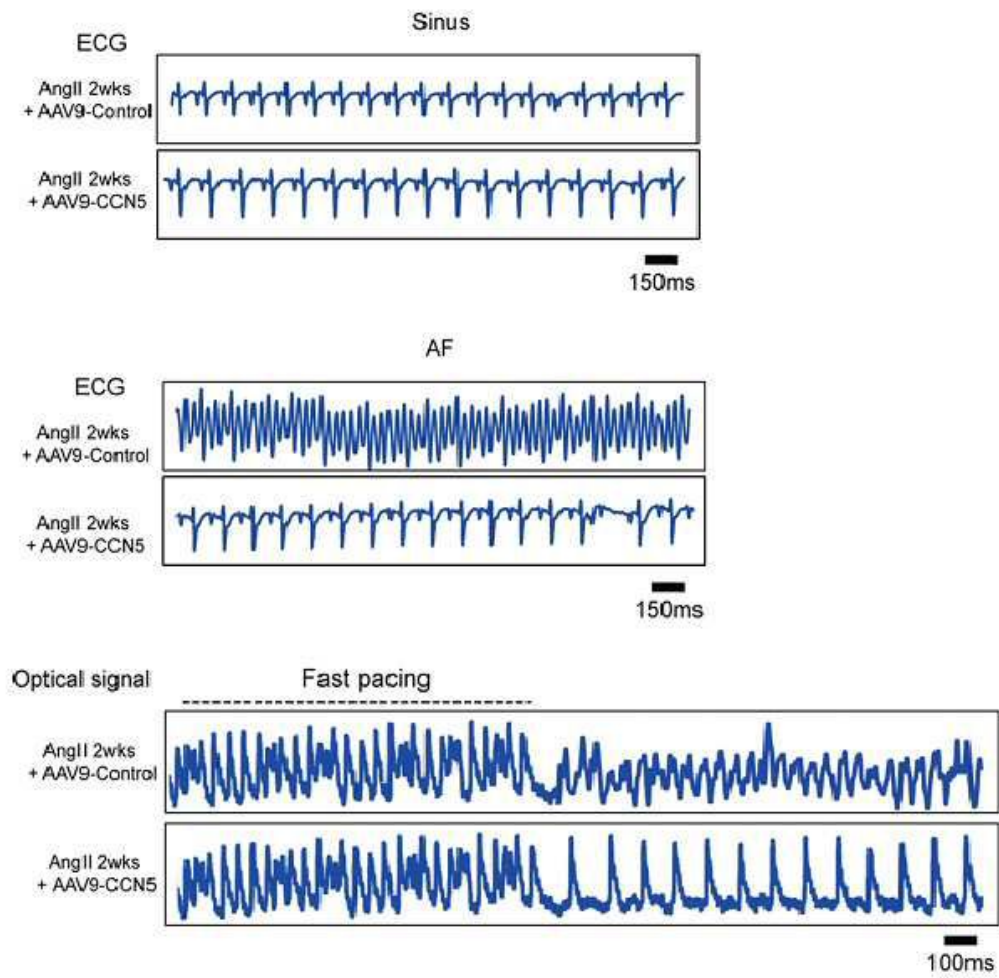
도면7l



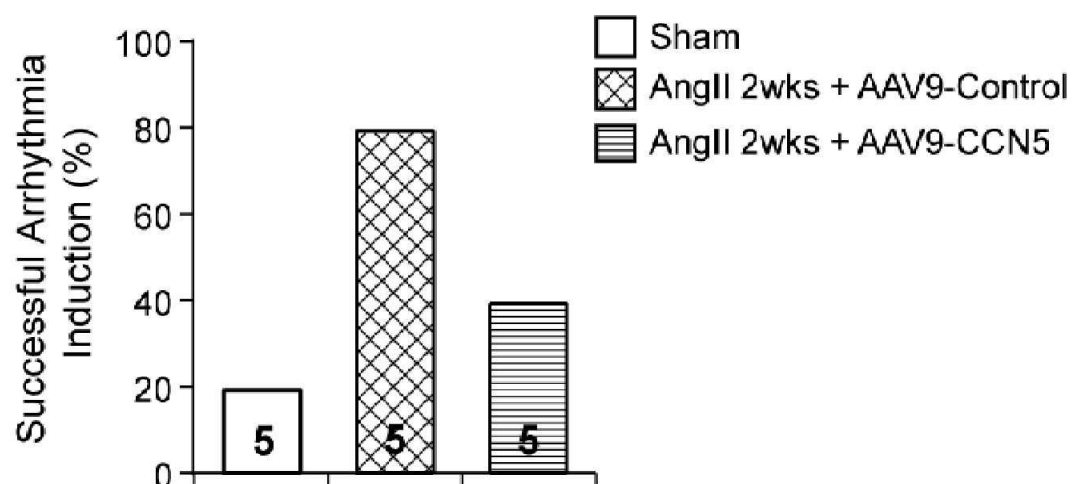
도면8a



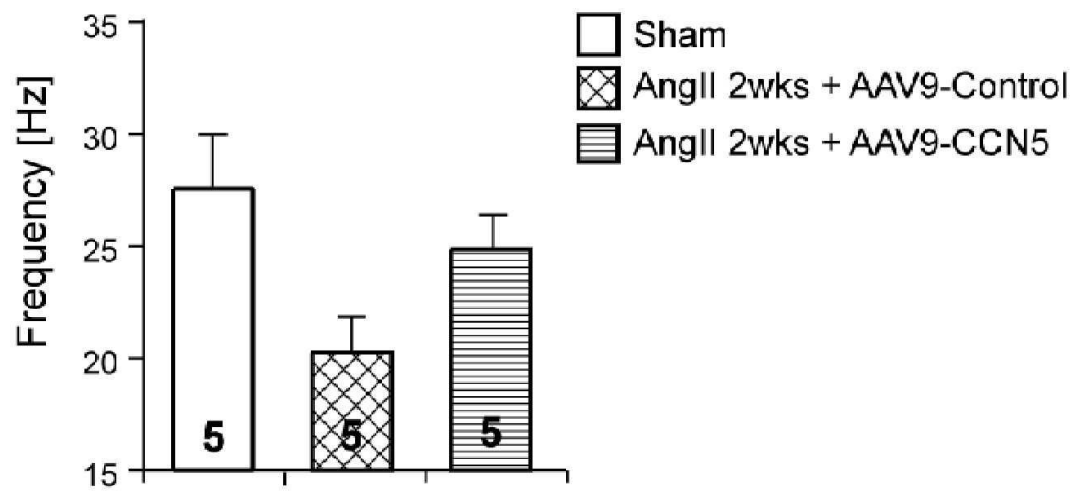
도면8b



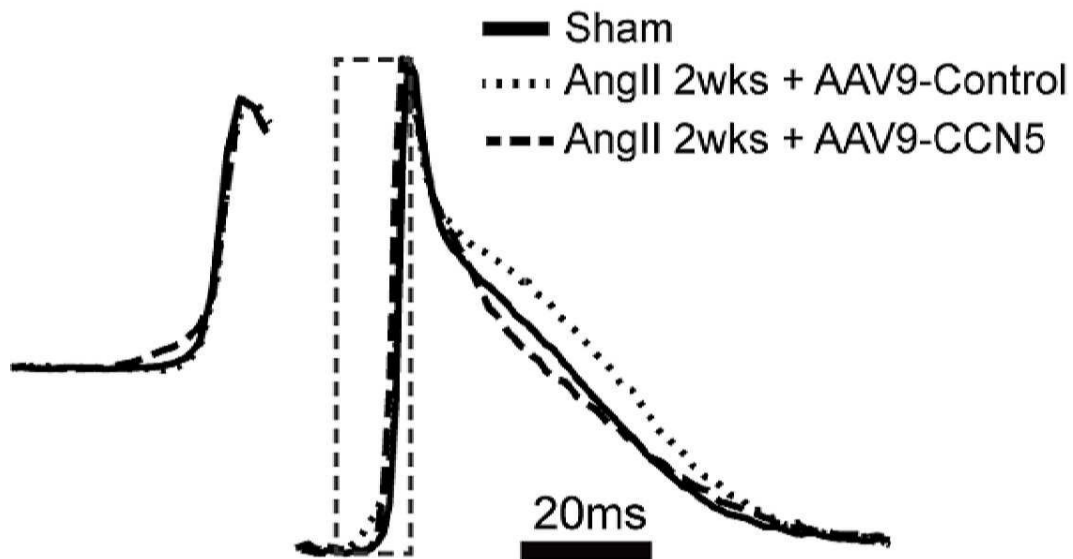
도면8c



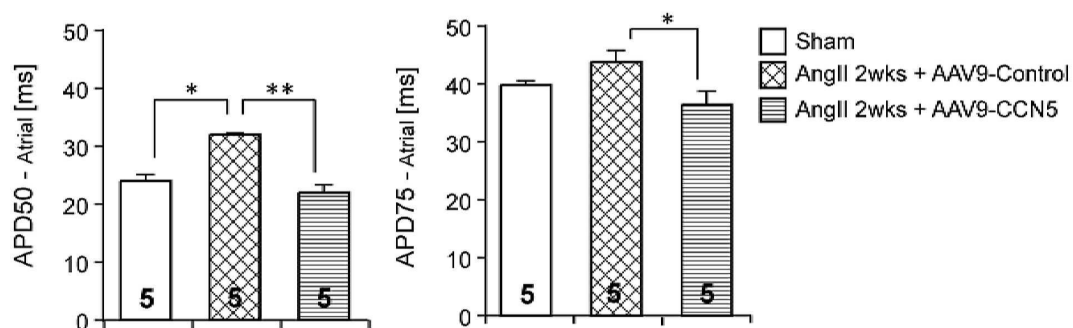
도면8d



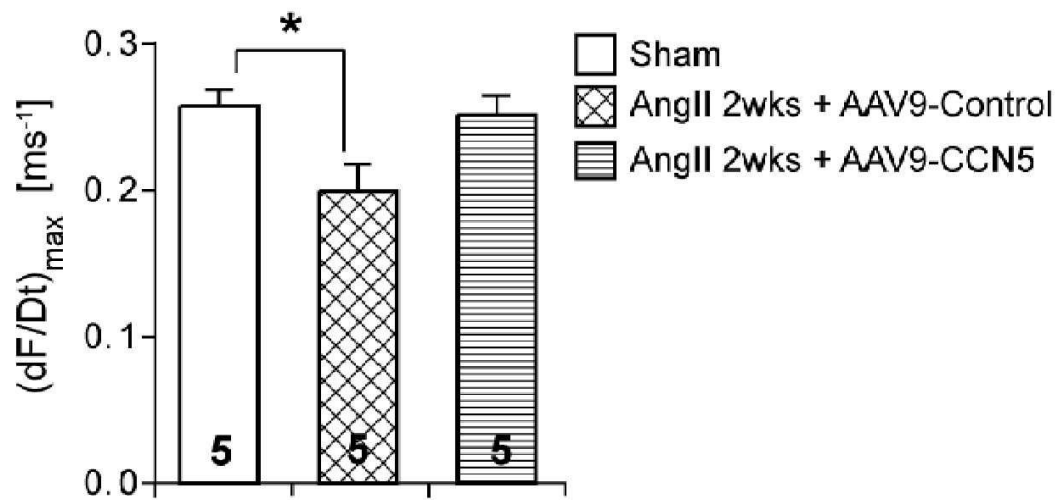
도면8e



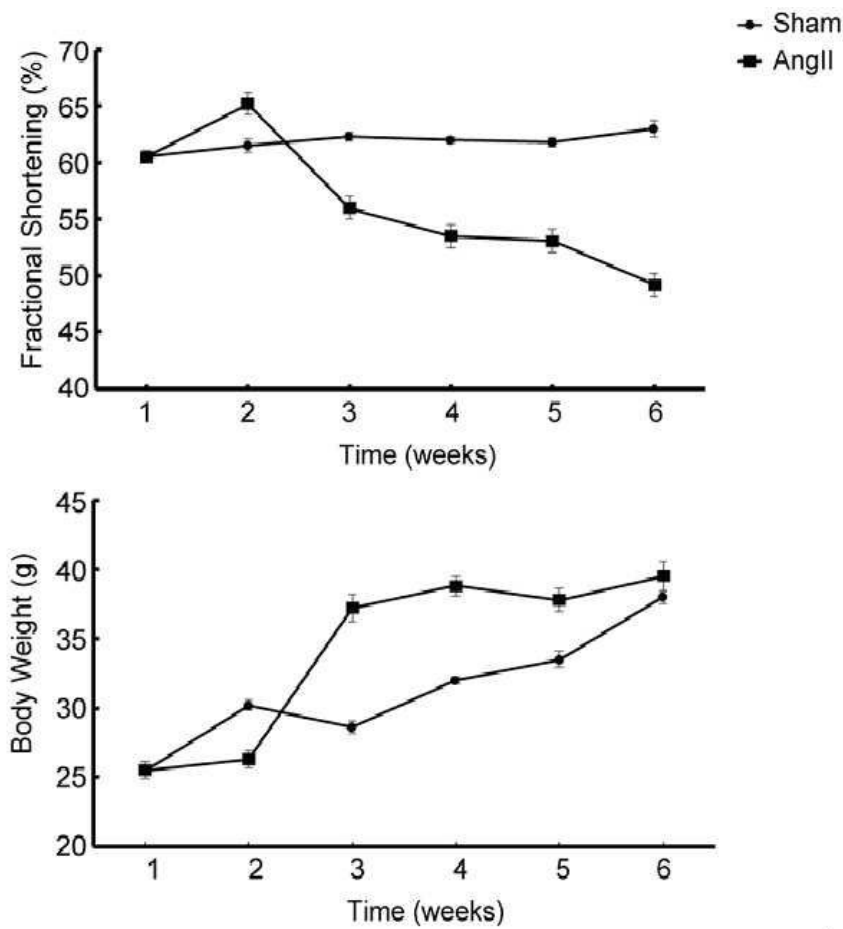
도면8f



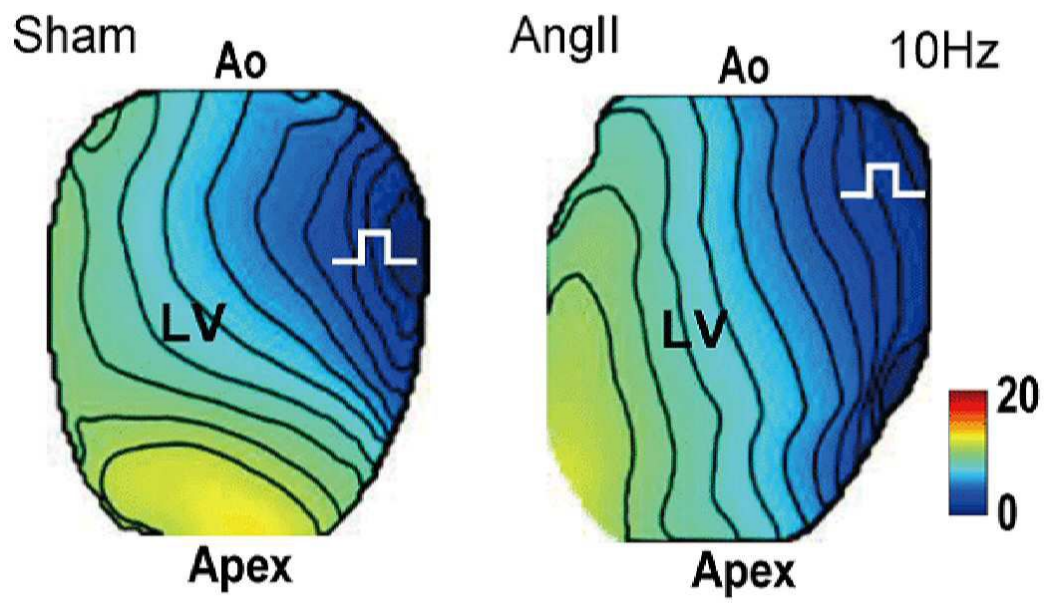
도면8g



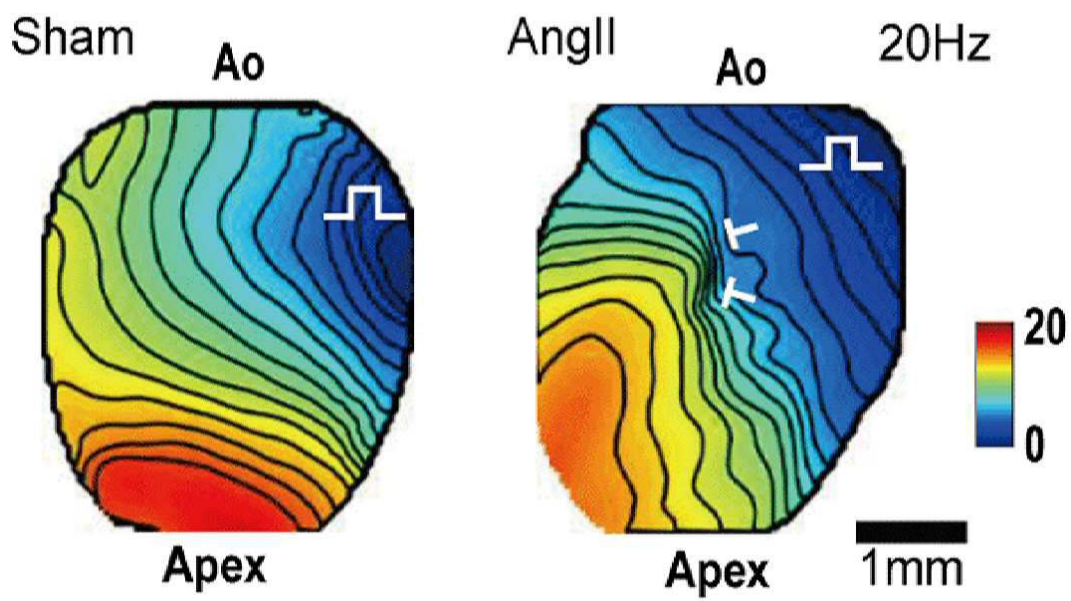
도면9a



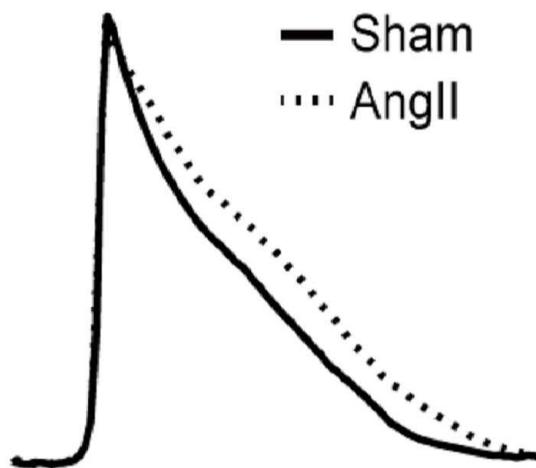
도면9b



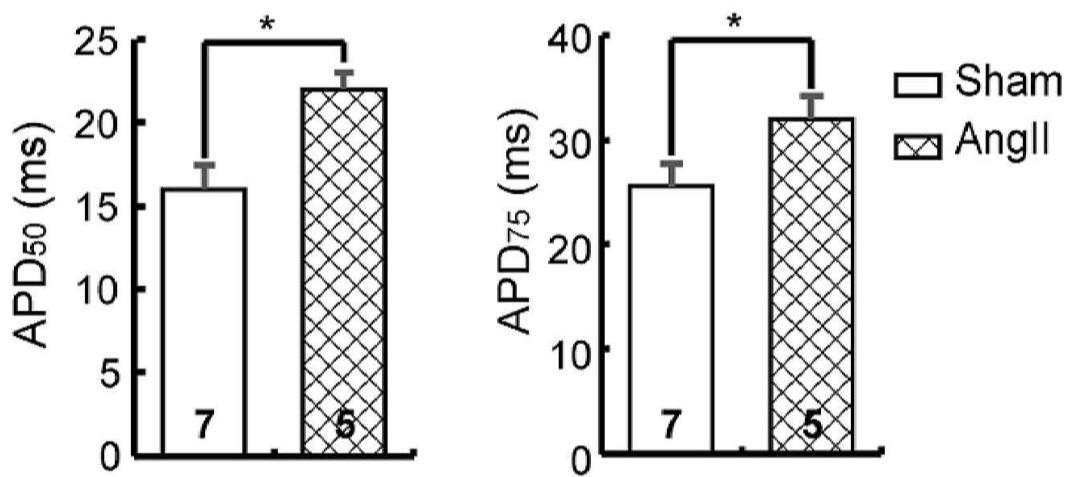
도면9c



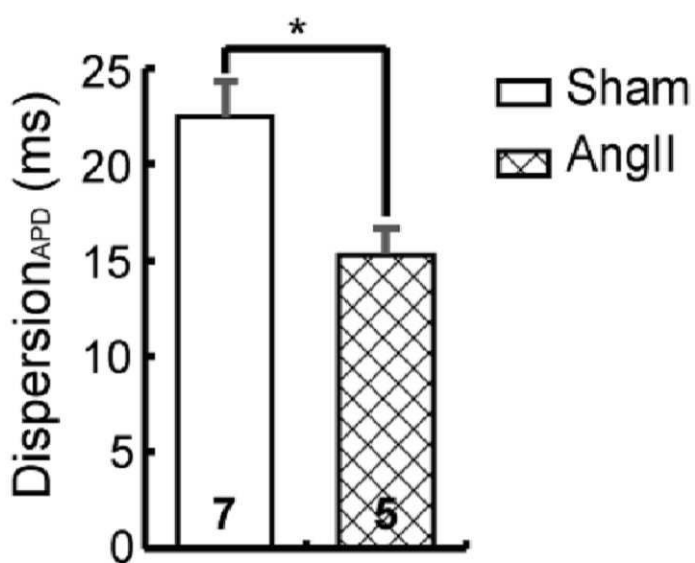
도면9d



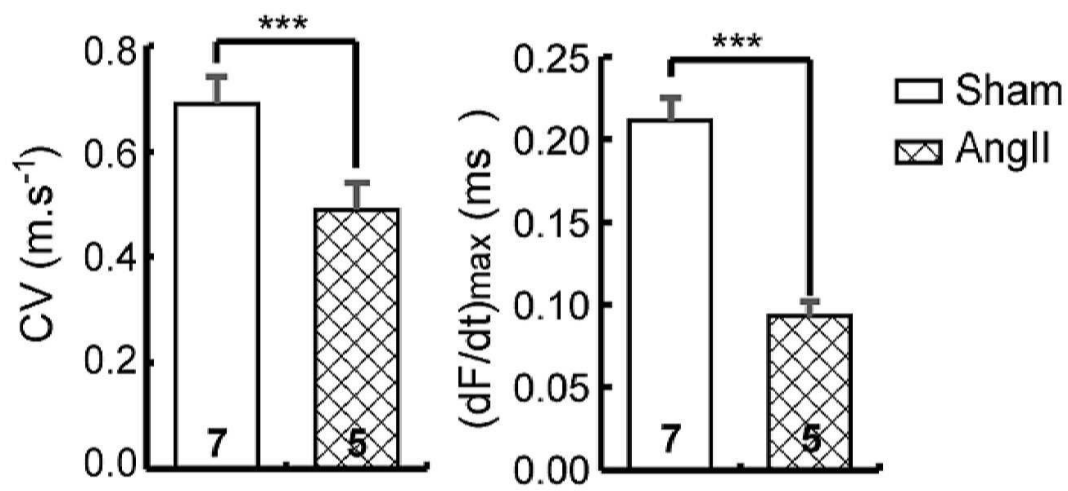
도면9e



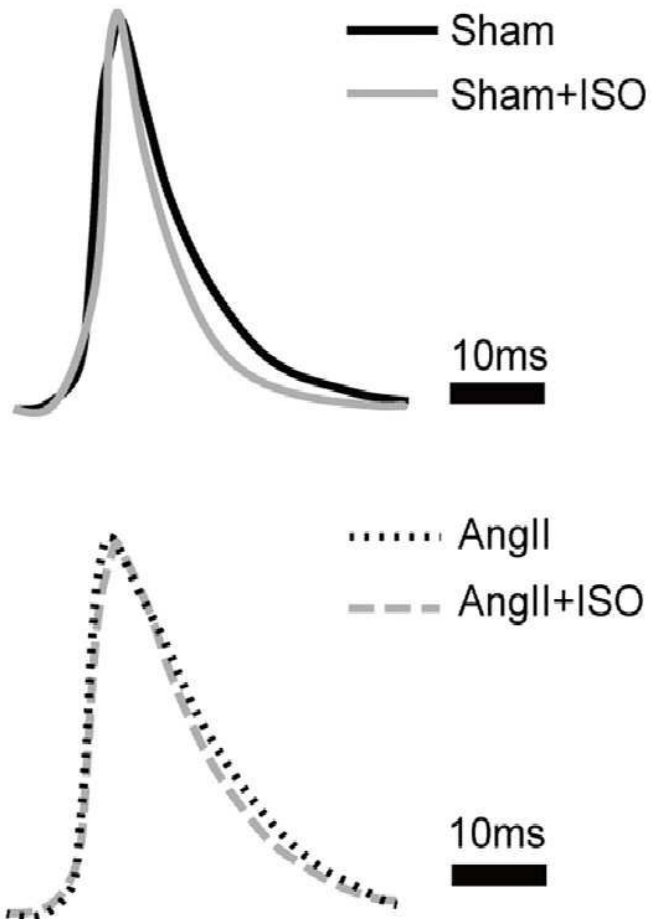
도면9f



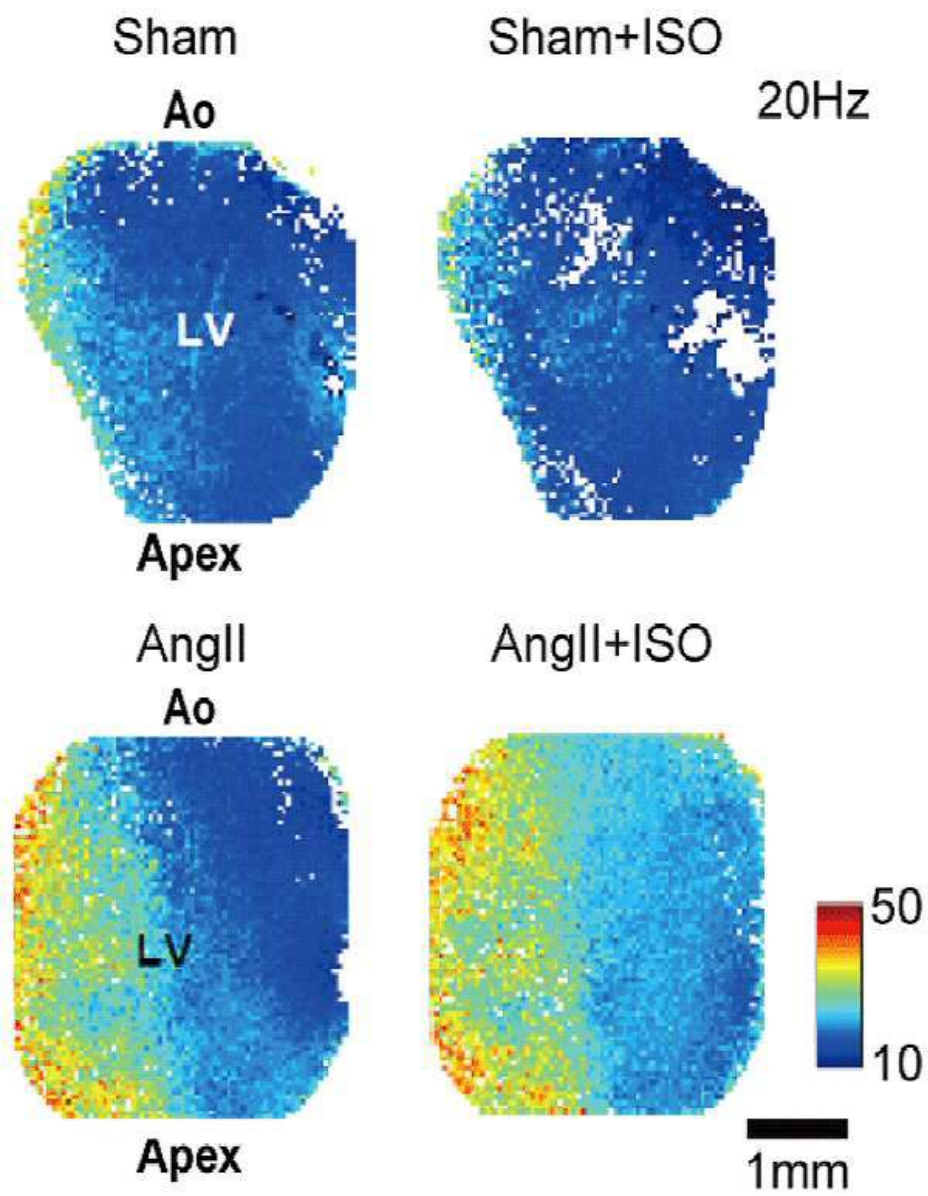
도면9g



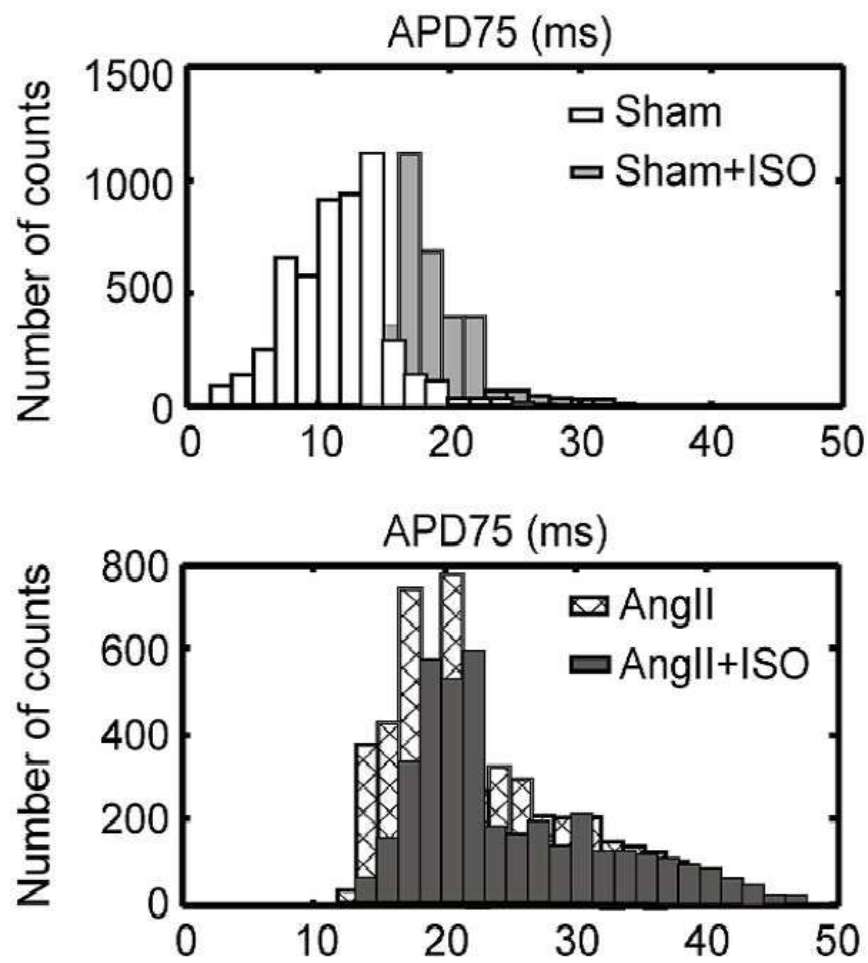
도면10a



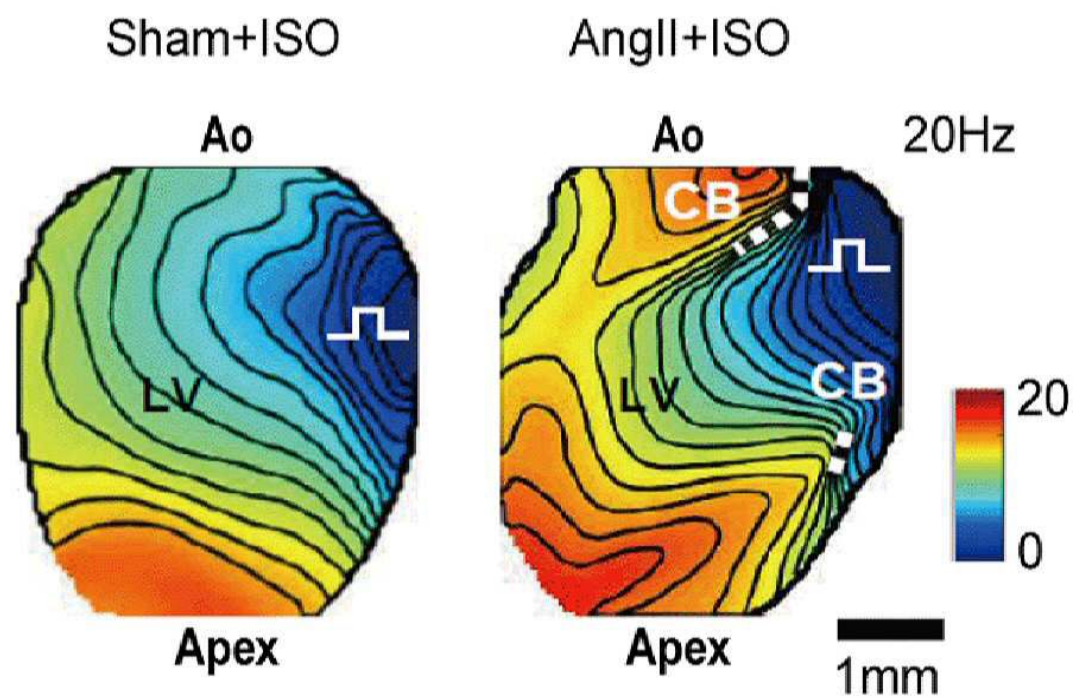
도면10b



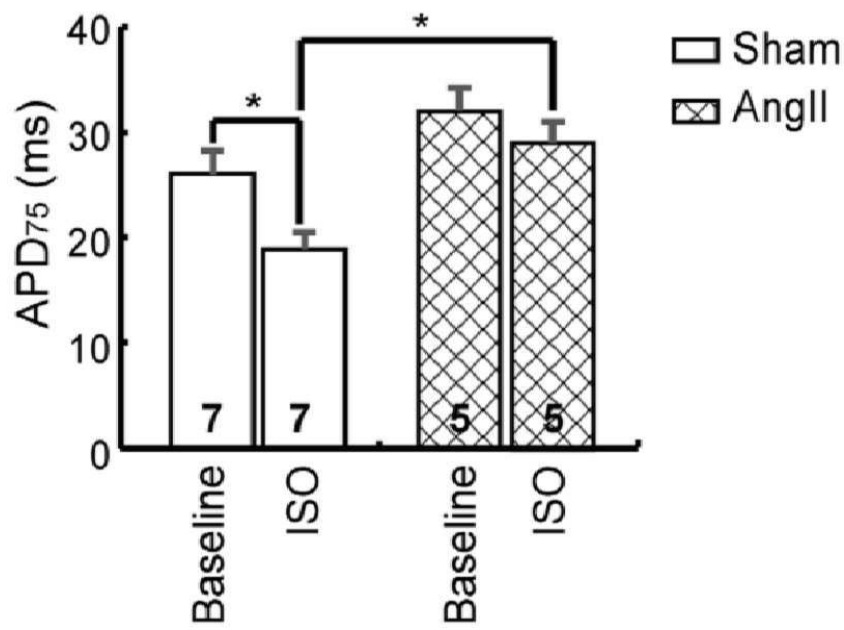
도면10c



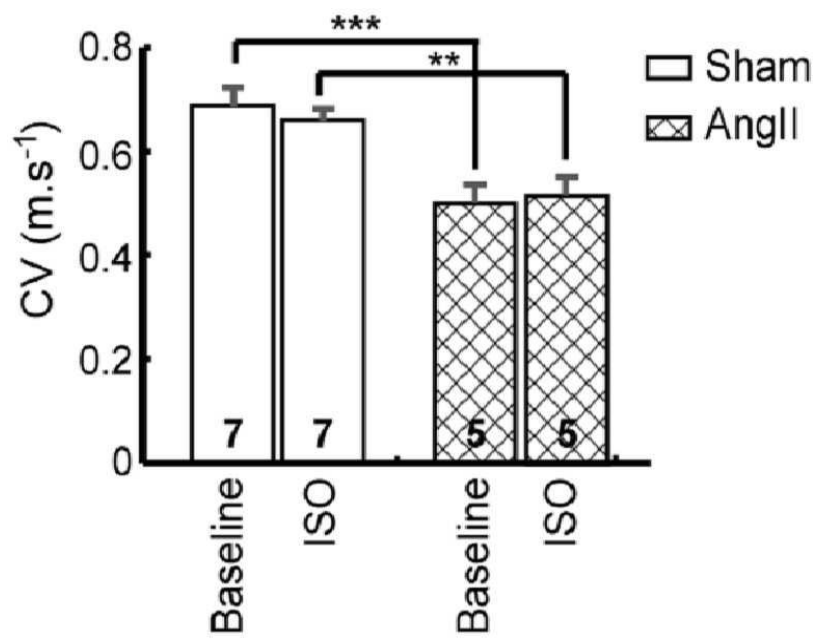
도면10d



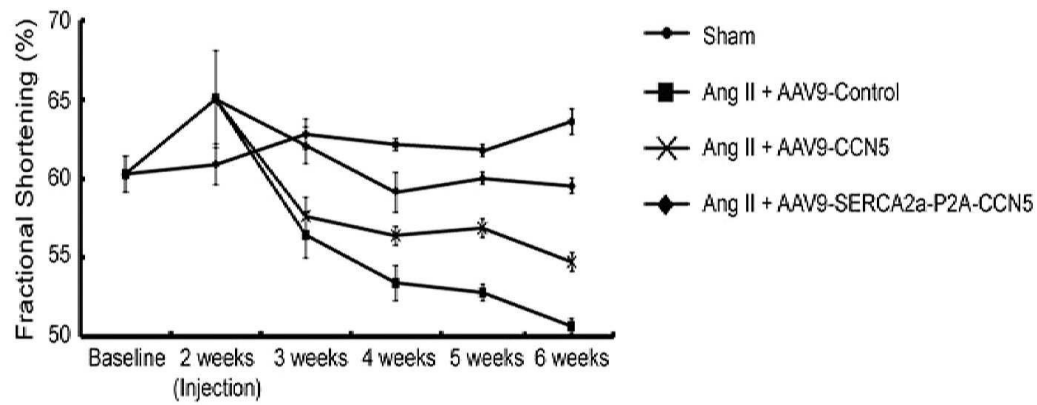
도면10e



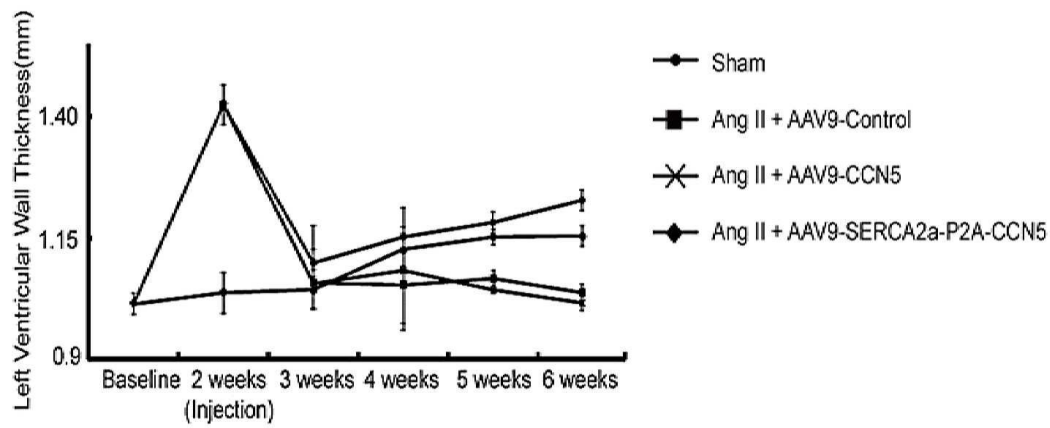
도면10f



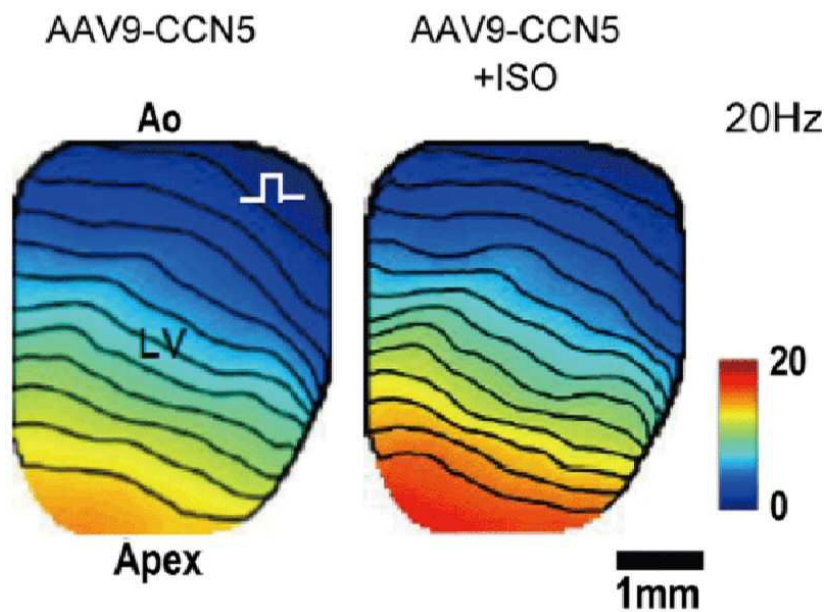
도면11a



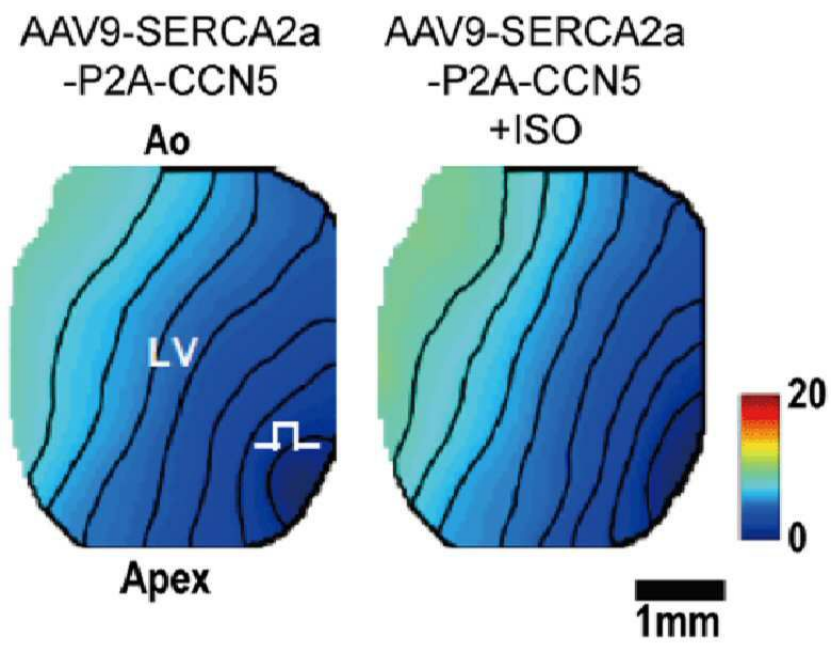
도면11b



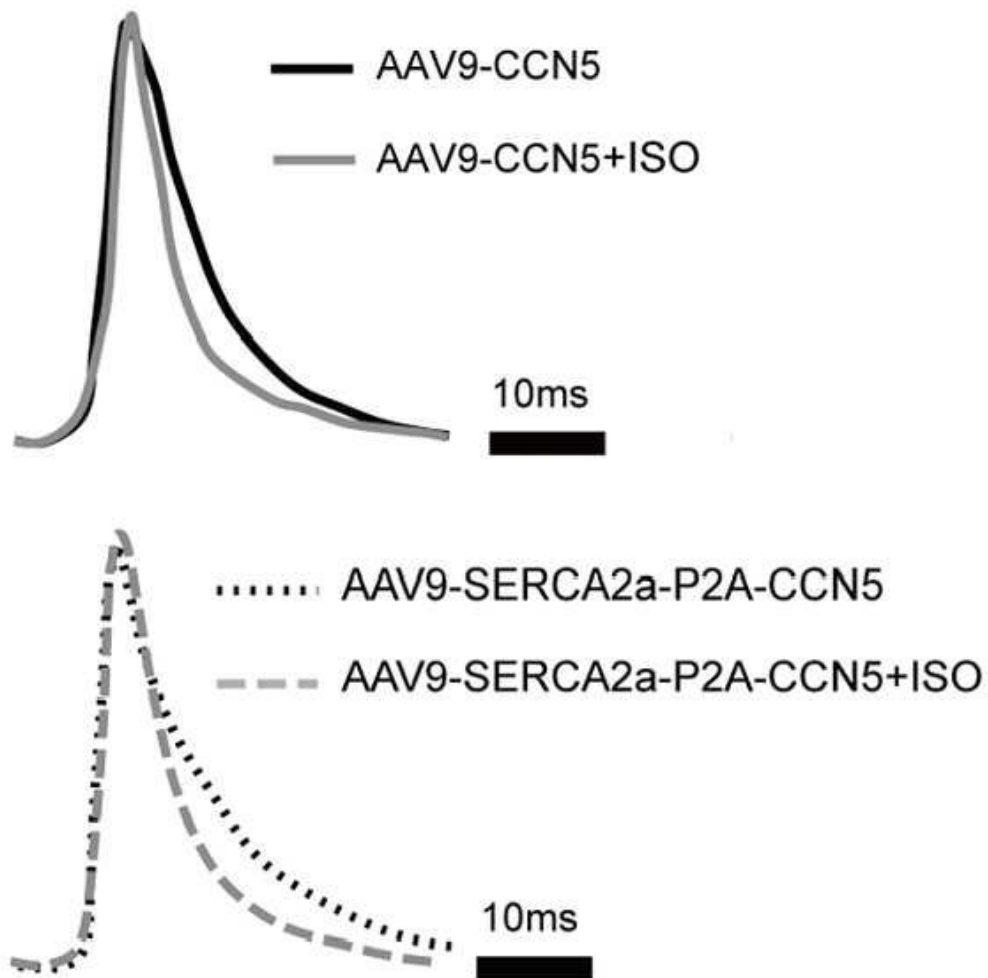
도면11c



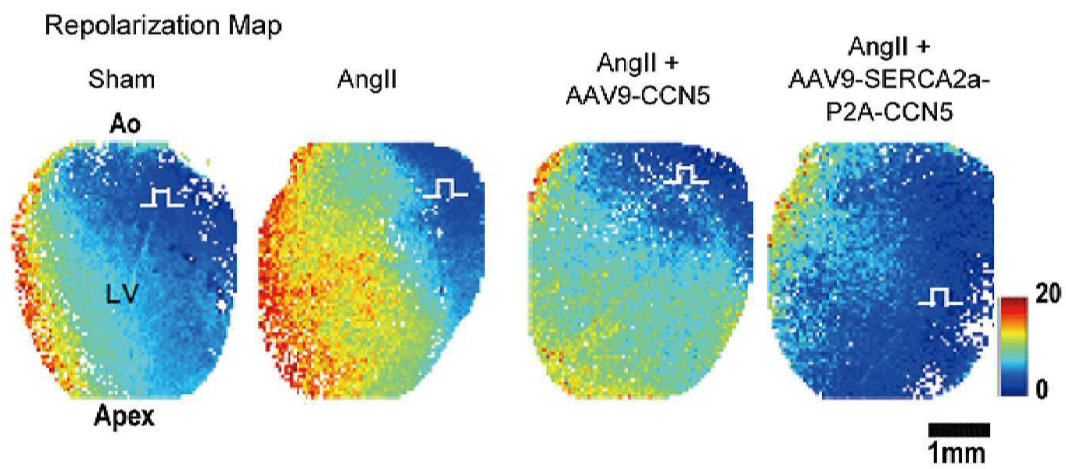
도면11d



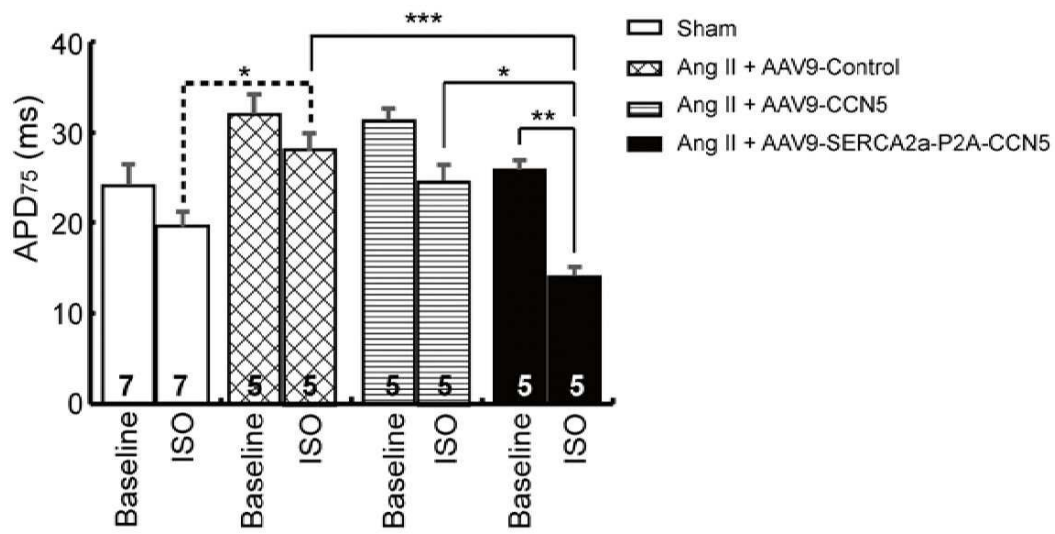
도면11e



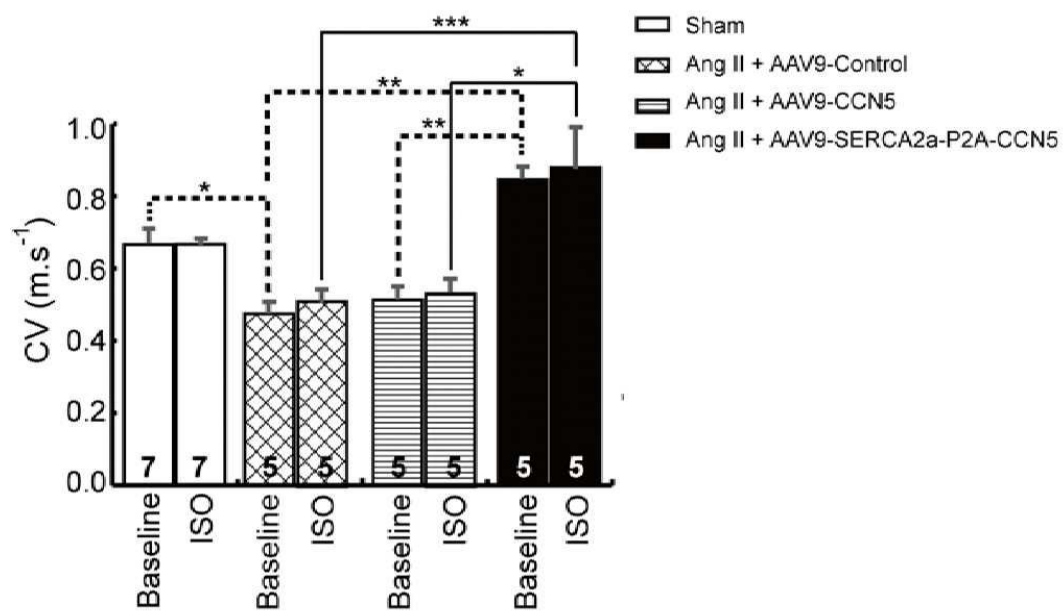
도면11f



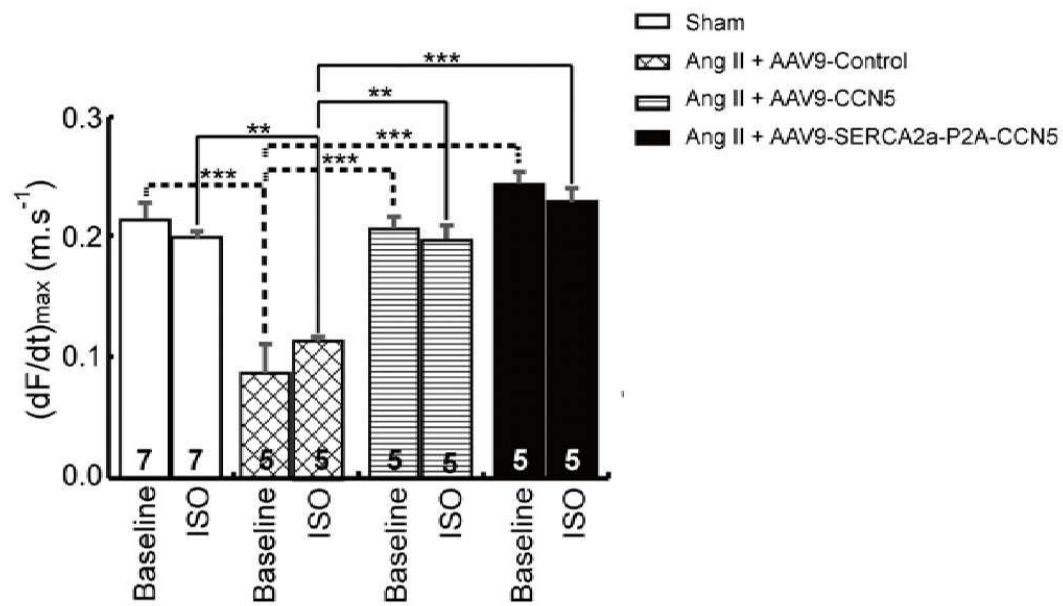
도면11g



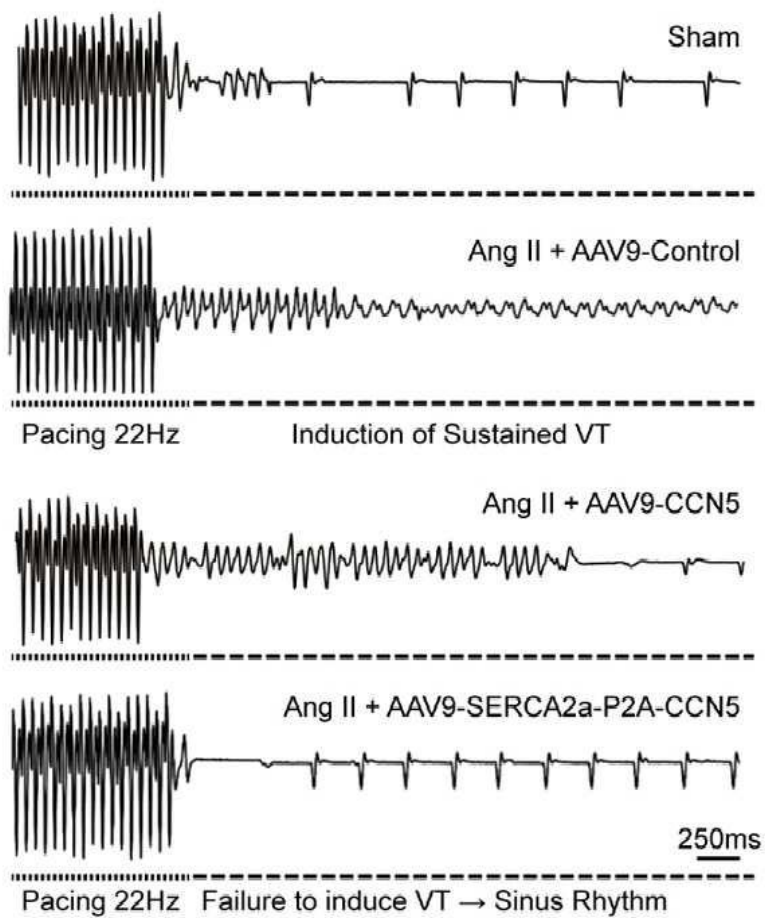
도면11h



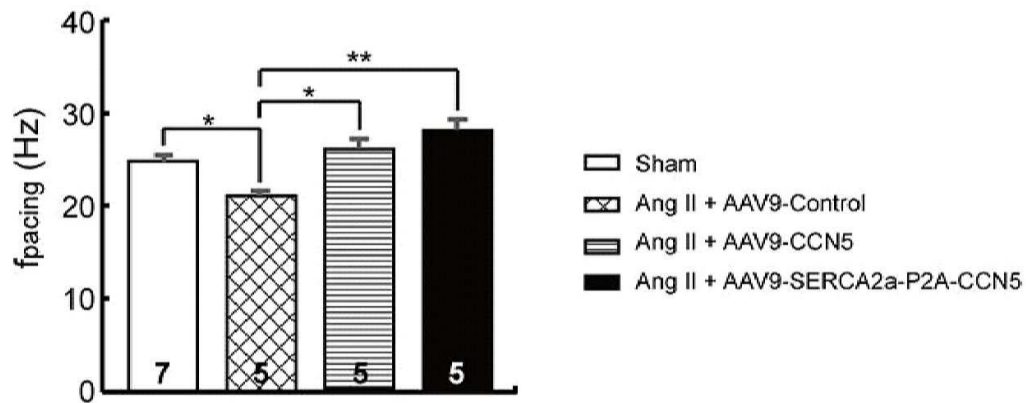
도면11i



도면12a



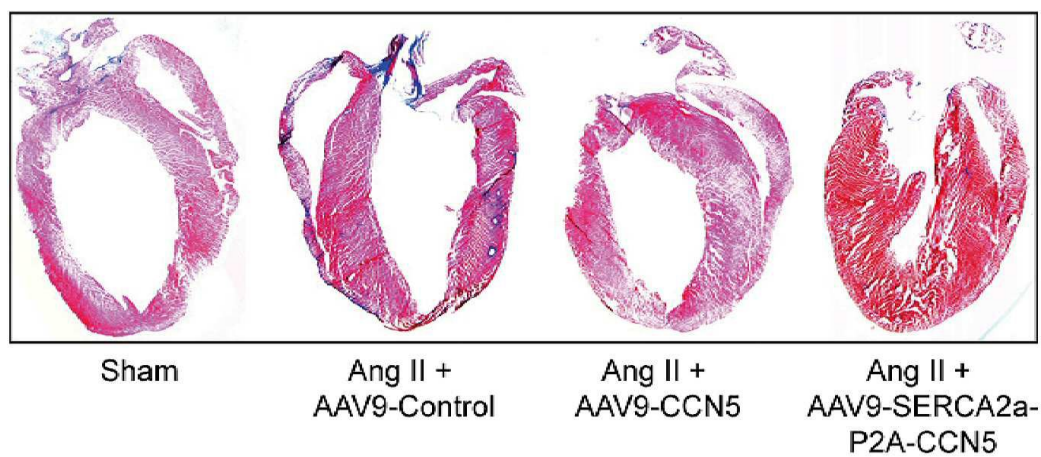
도면12b



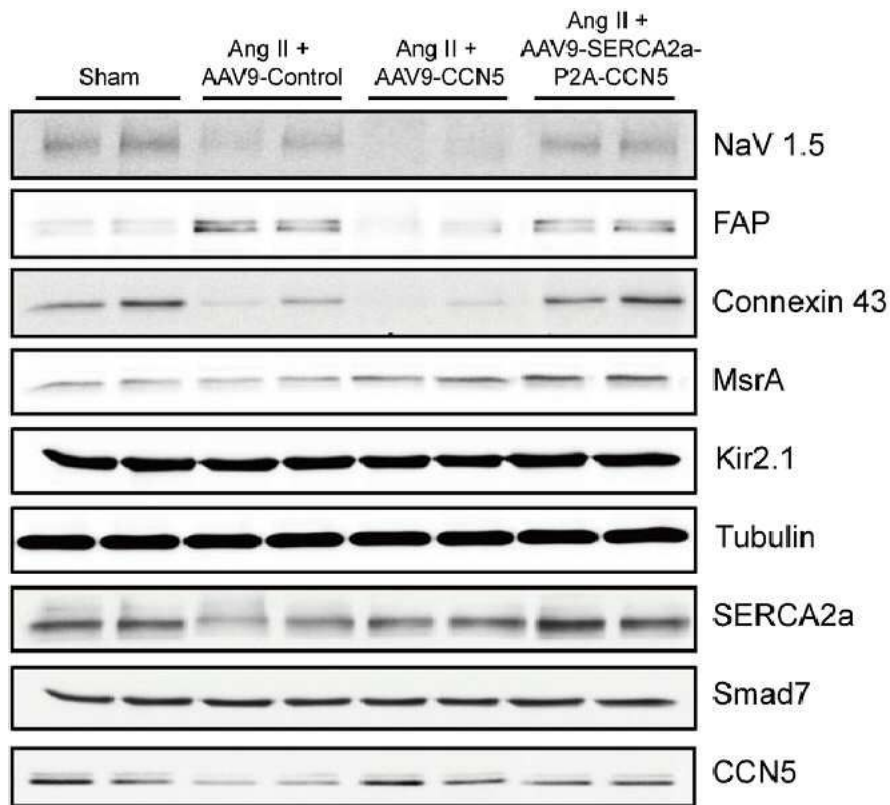
도면12c



도면13a



도면13b



서열목록

- <110> BethphaGen Inc.
- <120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CARDIAC ARRHYTHMIAS
- <130> FPD/201807-0041
- <150> KR 2017/127550
- <151> 2017-09-29
- <160> 42
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 250
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Arg Gly Thr Pro Lys Thr His Leu Leu Ala Phe Ser Leu Leu Cys

1 5 10 15

Leu Leu Ser Lys Val Arg Thr Gln Leu Cys Pro Thr Pro Cys Thr Cys

				20				25				30			
Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Arg	Cys	Pro	Leu	Gly	Val	Pro	Leu	Val	Leu	Asp
35				40				45							
Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Glu	Pro	Cys
50				55				60							
Asp	Gln	Leu	His	Val	Cys	Asp	Ala	Ser	Gln	Gly	Leu	Val	Cys	Gln	Pro
65				70				75				80			
Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Arg	Gly	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	Glu	Asp
85				90				95							
Asp	Ser	Ser	Cys	Glu	Val	Asn	Gly	Arg	Leu	Tyr	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr
100				105				110							
Phe	Gln	Pro	His	Cys	Ser	Ile	Arg	Cys	Arg	Cys	Glu	Asp	Gly	Gly	Phe
115				120				125							
Thr	Cys	Val	Pro	Leu	Cys	Ser	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Trp	Asp
130				135				140							
Cys	Pro	His	Pro	Arg	Arg	Val	Glu	Val	Leu	Gly	Lys	Cys	Cys	Pro	Glu
145				150				155				160			
Trp	Val	Cys	Gly	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Thr	Gln	Pro	Leu	Pro	Ala
165				170				175							
Gln	Gly	Pro	Gln	Phe	Ser	Gly	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Pro	Pro	Gly	Val
180				185				190							
Pro	Cys	Pro	Glu	Trp	Ser	Thr	Ala	Trp	Gly	Pro	Cys	Ser	Thr	Thr	Cys
195				200				205							
Gly	Leu	Gly	Met	Ala	Thr	Arg	Val	Ser	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Cys	Arg
210				215				220							
Leu	Glu	Thr	Gln	Arg	Arg	Leu	Cys	Leu	Ser	Arg	Pro	Cys	Pro	Pro	Ser
225				230				235				240			
Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Gln	Asn	Ser	Ala	Phe						

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 750

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgagaggca caccgaagac ccacctcttg gcctttctccc tcctctgcct cctctcaaag 60
gtgcgtaccc agctgtgccc gacaccatgt acctgcccct ggccacctcc ccgatgcccg 120
ctgggagtag ccttgggtgt ggatggctgt ggtctgtgcc gggtatgtgc acggcggctg 180
ggggagccct gcgaccaact ccacgtctgc gacgccagcc agggcctggt ctgccagccc 240
ggggcaggac ccggtggccg gggggcccctg tgcctcttgg cagaggacga cagcagctgt 300

gaggtgaacg gccgcctgta tcgggaaggg gagaccttcc agccccactg cagcatccgc 360
tgccgtgcg aggacggcgg cttcacctgc gtgccgtgt gcagcgagga tgtgcggctg 420
cccagctggg actgccccca ccccaggagg gtcgaggtcc tgggcaagtg ctgccctgag 480
tgggtgtgcg gccaaaggagg gggactgggg acccagcccc ttccagccca aggaccccag 540
ttttctggcc ttgtctcttc cctgccccct ggtgtccct gcccagaatg gagcacggcc 600
tggggacct gctcgaccac ctgtgggctg ggcatggcca cccgggtgtc caaccagaac 660
cgcttctgcc gactggagac ccagcgccgc ctgtgcctgt ccaggccctg cccacctcc 720

aggggtcgca gtccacaaaa cagtgccttc 750

<210> 3

<211> 997

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Asn Ala His Thr Lys Thr Val Glu Glu Val Leu Gly His Phe

1 5 10 15

Gly Val Asn Glu Ser Thr Gly Leu Ser Leu Glu Gln Val Lys Lys Leu

20 25 30

Lys Glu Arg Trp Gly Ser Asn Glu Leu Pro Ala Glu Glu Gly Lys Thr

35 40 45

Leu Leu Glu Leu Val Ile Glu Gln Phe Glu Asp Leu Leu Val Arg Ile

50 55 60

Leu Leu Leu Ala Ala Cys Ile Ser Phe Val Leu Ala Trp Phe Glu Glu

65 70 75 80

Gly Glu Glu Thr Ile Thr Ala Phe Val Glu Pro Phe Val Ile Leu Leu

85	90	95	
Ile Leu Val Ala Asn Ala Ile Val Gly Val Trp Gln Glu Arg Asn Ala			
100	105	110	
Glu Asn Ala Ile Glu Ala Leu Lys Glu Tyr Glu Pro Glu Met Gly Lys			
115	120	125	
Val Tyr Arg Gln Asp Arg Lys Ser Val Gln Arg Ile Lys Ala Lys Asp			
130	135	140	
Ile Val Pro Gly Asp Ile Val Glu Ile Ala Val Gly Asp Lys Val Pro			
145	150	155	160
Ala Asp Ile Arg Leu Thr Ser Ile Lys Ser Thr Thr Leu Arg Val Asp			
165	170	175	
Gln Ser Ile Leu Thr Gly Glu Ser Val Ser Val Ile Lys His Thr Asp			
180	185	190	
Pro Val Pro Asp Pro Arg Ala Val Asn Gln Asp Lys Lys Asn Met Leu			
195	200	205	
Phe Ser Gly Thr Asn Ile Ala Ala Gly Lys Ala Met Gly Val Val Val			
210	215	220	
Ala Thr Gly Val Asn Thr Glu Ile Gly Lys Ile Arg Asp Glu Met Val			
225	230	235	240
Ala Thr Glu Gln Glu Arg Thr Pro Leu Gln Gln Lys Leu Asp Glu Phe			
245	250	255	
Gly Glu Gln Leu Ser Lys Val Ile Ser Leu Ile Cys Ile Ala Val Trp			
260	265	270	
Ile Ile Asn Ile Gly His Phe Asn Asp Pro Val His Gly Gly Ser Trp			
275	280	285	
Ile Arg Gly Ala Ile Tyr Tyr Phe Lys Ile Ala Val Ala Leu Ala Val			
290	295	300	
Ala Ala Ile Pro Glu Gly Leu Pro Ala Val Ile Thr Thr Cys Leu Ala			
305	310	315	320
Leu Gly Thr Arg Arg Met Ala Lys Lys Asn Ala Ile Val Arg Ser Leu			
325	330	335	

Pro Ser Val Glu Thr Leu Gly Cys Thr Ser Val Ile Cys Ser Asp Lys
340 345 350

Thr Gly Thr Leu Thr Thr Asn Gln Met Ser Val Cys Arg Met Phe Ile
355 360 365

Leu Asp Arg Val Glu Gly Asp Thr Cys Ser Leu Asn Glu Phe Thr Ile
370 375 380

Thr Gly Ser Thr Tyr Ala Pro Ile Gly Glu Val His Lys Asp Asp Lys
385 390 395 400

Pro Val Asn Cys His Gln Tyr Asp Gly Leu Val Glu Leu Ala Thr Ile
405 410 415

Cys Ala Leu Cys Asn Asp Ser Ala Leu Asp Tyr Asn Glu Ala Lys Gly
420 425 430

Val Tyr Glu Lys Val Gly Glu Ala Thr Glu Thr Ala Leu Thr Cys Leu
435 440 445

Val Glu Lys Met Asn Val Phe Asp Thr Glu Leu Lys Gly Leu Ser Lys
450 455 460

Ile Glu Arg Ala Asn Ala Cys Asn Ser Val Ile Lys Gln Leu Met Lys
465 470 475 480

Lys Glu Phe Thr Leu Glu Phe Ser Arg Asp Arg Lys Ser Met Ser Val
485 490 495

Tyr Cys Thr Pro Asn Lys Pro Ser Arg Thr Ser Met Ser Lys Met Phe
500 505 510

Val Lys Gly Ala Pro Glu Gly Val Ile Asp Arg Cys Thr His Ile Arg
515 520 525

Val Gly Ser Thr Lys Val Pro Met Thr Ser Gly Val Lys Gln Lys Ile
530 535 540

Met Ser Val Ile Arg Glu Trp Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Arg Cys
545 550 555 560

Leu Ala Leu Ala Thr His Asp Asn Pro Leu Arg Arg Glu Glu Met His
565 570 575

Leu Glu Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Tyr Glu Thr Asn Leu Thr Phe
580 585 590

Val Gly Cys Val Gly Met Leu Asp Pro Pro Arg Ile Glu Val Ala Ser
595 600 605

Ser Val Lys Leu Cys Arg Gln Ala Gly Ile Arg Val Ile Met Ile Thr
610 615 620

Gly Asp Asn Lys Gly Thr Ala Val Ala Ile Cys Arg Arg Ile Gly Ile
625 630 635 640

Phe Gly Gln Asp Glu Asp Val Thr Ser Lys Ala Phe Thr Gly Arg Glu
645 650 655

Phe Asp Glu Leu Asn Pro Ser Ala Gln Arg Asp Ala Cys Leu Asn Ala
660 665 670

Arg Cys Phe Ala Arg Val Glu Pro Ser His Lys Ser Lys Ile Val Glu
675 680 685

Phe Leu Gln Ser Phe Asp Glu Ile Thr Ala Met Thr Gly Asp Gly Val
690 695 700

Asn Asp Ala Pro Ala Leu Lys Lys Ala Glu Ile Gly Ile Ala Met Gly
705 710 715 720

Ser Gly Thr Ala Val Ala Lys Thr Ala Ser Glu Met Val Leu Ala Asp
725 730 735

Asp Asn Phe Ser Thr Ile Val Ala Ala Val Glu Glu Gly Arg Ala Ile
740 745 750

Tyr Asn Asn Met Lys Gln Phe Ile Arg Tyr Leu Ile Ser Ser Asn Val
755 760 765

Gly Glu Val Val Cys Ile Phe Leu Thr Ala Ala Leu Gly Phe Pro Glu
770 775 780

Ala Leu Ile Pro Val Gln Leu Leu Trp Val Asn Leu Val Thr Asp Gly
785 790 795 800

Leu Pro Ala Thr Ala Leu Gly Phe Asn Pro Pro Asp Leu Asp Ile Met
805 810 815

Asn Lys Pro Pro Arg Asn Pro Lys Glu Pro Leu Ile Ser Gly Trp Leu
820 825 830

Phe Phe Arg Tyr Leu Ala Ile Gly Cys Tyr Val Gly Ala Ala Thr Val

835 840 845
 Gly Ala Ala Ala Trp Trp Phe Ile Ala Ala Asp Gly Gly Pro Arg Val
 850 855 860
 Ser Phe Tyr Gln Leu Ser His Phe Leu Gln Cys Lys Glu Asp Asn Pro
 865 870 875 880
 Asp Phe Glu Gly Val Asp Cys Ala Ile Phe Glu Ser Pro Tyr Pro Met
 885 890 895
 Thr Met Ala Leu Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Met Cys Asn Ala Leu
 900 905 910

Asn Ser Leu Ser Glu Asn Gln Ser Leu Leu Arg Met Pro Pro Trp Glu
 915 920 925
 Asn Ile Trp Leu Val Gly Ser Ile Cys Leu Ser Met Ser Leu His Phe
 930 935 940
 Leu Ile Leu Tyr Val Glu Pro Leu Pro Leu Ile Phe Gln Ile Thr Pro
 945 950 955 960
 Leu Asn Val Thr Gln Trp Leu Met Val Leu Lys Ile Ser Leu Pro Val
 965 970 975
 Ile Leu Met Asp Glu Thr Leu Lys Phe Val Ala Arg Asn Tyr Leu Glu

980 985 990

Pro Ala Ile Leu Glu

995

<210> 4

<211> 2991

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggagaacg cgcacaccaa gacggtggag gaggtgctgg gccacttcgg cgtcaacgag 60

agtacggggc tgagcctgga acaggtcaag aagcttaagg agagatgggg ctccaacgag 120

ttaccggctg aagaaggaaa aaccttgctg gaacttgatg ttgagcagtt tgaagacttg 180

ctagtttagga ttttattact ggcagcatgt atatcttttg ttttggttg gtttgaagaa 240

ggtgaagaaa caattacagc cttttagtaa cttttgttaa ttttactcat attagtagcc 300

aatgcaattg tgggtgtatg gcaggaaaga aatgctgaaa atgccatcga agcccttaag 360

gaatatgagc ctgaaatggg caaagtgtat cgacaggaca gaaagagtgt gcagcggatt	420
aaagctaaag acatagtctc tggatgatat gtagaaattg ctgttggatga caaagttcct	480
gctgatataa ggtaacttc catcaaatct accacactaa gagttgacca gtcaattctc	540
acaggatgaat ctgtctctgt catcaagcac actgatcccc tccctgaccc acgagctgtc	600
aaccaagata aaaagaacat gctgttttct ggtacaaaca ttgctgctgg gaaagctatg	660
ggagtgggtg tagcaactgg agttaacacc gaaattggca agatccggga tgaaatggtg	720
gcaacagaac aggagagaac accccttcag caaaaactag atgaatttgg ggaacagctt	780
tccaaagtc tctcccttat ttgcattgca gctcggatca taaatattgg gcacttcaat	840
gacccgggtc atggagggtc ctggatcaga ggtgctatct actactttaa aattgcagtg	900
gccctggctg tagcagccat tctgaaggt ctgcctgcag tcatcaccac ctgcctggct	960
cttggaaact gcagaatggc aaagaaaaat gccattgttc gaagcctccc gtctgtggaa	1020
acccttggtt gtacttctgt tatctgctca gacaagactg gtacacttac aacaaaccag	1080
atgtcagtct gcaggatgtt cattctggac agagtgaag gtgatacttg ttccttaat	1140
gagtttacca taactggatc aacttatgca cctattggag aagtgcataa agatgataaa	1200
ccagtgaatt gtcaccagta tgatggtctg gtagaattag caacaatttg tgctctttgt	1260
aatgactctg ctttggatta caatgaggca aagggtgtgt atgaaaaagt tggagaagct	1320
acagagactg ctctcacttg cctagtagag aagatgaatg tatttgatac cgaattgaag	1380
ggtctttcta aaatagaacg tgcaaatgcc tgcaactcag tcattaaaca gctgatgaaa	1440
aaggaattca ctctagagtt ttcacgtgac agaaagtcaa tgtcggttta ctgtacacca	1500
aataaaccaa gcaggacatc aatgagcaag atgtttgtga aggggtgtcc tgaaggtgtc	1560
attgacaggt gcacccacat tcgagttgga agtactaagg ttcctatgac ctctggagtc	1620
aaacagaaga tcatgtctgt cattcgagag tggggtagtgc gcagcgacac actgcgatgc	1680
ctggcccttg ccatcatga caaccactg agaagagaag aaatgcacct tgaggactct	1740
gccaacttta ttaaataatga gaccaatctg accttcgttg gctgcgtggg catgctggat	1800
cctccgagaa tcgaggtggc ctctccgtg aagctgtgcc ggcaagcagg catccgggtc	1860
atcatgatca ctggggacaa caagggcact gctgtggcca tctgtcgccg catcggcac	1920
tctgggcagg atgaggacgt gacgtcaaaa gctttcacag gccgggagtt tgatgaactc	1980
aaccctccg cccagcgaga cgcctgccctg aacgcccgct gttttgctcg agttgaaccc	2040
tcccacaagt ctaaaatcgt agaatttctt cagtcttttg atgagattac agctatgact	2100
ggcgtggcg tgaacgatgc tctgtctctg aagaaagccg agattggcat tgctatgggc	2160
tctggcactg cgggtggctaa aaccgcctct gagatgggtcc tggcggatga caacttctcc	2220

accattgtgg ctgccgttga ggaggggagg gcaatctaca acaacatgaa acagttcatc 2280
cgctacctca tctcgtccaa cgtcggggaa gttgtctgta ttttcctgac agcagccctt 2340
ggatttcccg aggctttgat tctgtttcag ctgctctggg tcaatctggt gacagatggc 2400

ctgcctgcca ctgcactggg gttcaaccct cctgatctgg acatcatgaa taaacctccc 2460
cggaacccaa aggaaccatt gatcagcggg tggtctcttt tccgttactt ggctattggc 2520
tgttacgtcg gcctgtctac cgtgggtgct gctgcatggt ggttcattgc tgctgacggt 2580
ggtccaagag tgccttcta ccagctgagt catttcctac agtglaaaga ggacaacccg 2640
gactttgaag gcgtggattg tgcaatcttt gaatcccat acccgatgac aatggcgctc 2700
tctgttctag taactataga aatgtgtaac gccctcaaca gcttgccga aaaccagtcc 2760
ttgtgagga tgccccctg ggagaacatc tggtctgtgg gctccatctg cctgtccatg 2820

tcactccact tctgatcct ctatgtcgaa ccttgccac tcattttcca gatcacaccg 2880
ctgaacgtga ccagtggtc gatggtgctg aaaatctcct tgcccgtgat tctcatggat 2940
gagacgtca agtttgtggc ccgcaactac ctggaacctg caatactgga g 2991

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> self-cleavage sequence derived from porcine teschovirus-1

<400> 5

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> self-cleavage sequence derived from porcine teschovirus-1

<400> 6

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcagctg gagacgtgga ggagaacctt 60

ggacct 66

<210> 7

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> self-cleavage sequence derived from Thoseaasigna virus

<400> 7
 Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 8
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> self-cleavage sequence derived from Thoseaasigna virus

<400> 8
 ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga 60
 cct 63
 <210> 9

<211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> self-cleavage sequence derived from equine rhinitis A virus
 (ERAV)

<400> 9
 Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 10
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> self-cleavage sequence derived from equine rhinitis A virus

(ERAV)

<400> 10

ggaagcggac agtgactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac 60

cctggacct 69

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> self-cleavage sequence derived from FMDV 2A

<400> 11

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20 25

<210> 12

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> self-cleavage sequence derived from FMDV 2A

<400> 12

ggaagcggag tgaacagac ttgaaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60

tccaaccctg gacct 75

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Mouse alpha-SMA

<400> 13

cccacccaga gtggagaa 18

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Mouse alpha-SMA

<400> 14

acatagctgg agcagcgtct 20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Mouse Collagen I

<400> 15

catgttcagc tttgtggacc t 21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Reverse primer for Mouse Collagen I

<400> 16

gacgctgact tcagggatgt 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Mouse TGF-beta 1

<400> 17

tggagcaaca tgtggaactc 20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Mouse TGF-beta 1

<400> 18

cagcagccgg ttaccaag 18

<210> 19

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for Mouse IL-1 beta
 <400> 19
 tccaggatga ggacatgatg agca 24
 <210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for Mouse IL-1 beta
 <400> 20
 gaacgtcaca cacaccagca ggtta 25
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Forward primer for Mouse RANTES
 <400> 21
 tgcagaggac tctgagacag c 21
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for Mouse RANTES
 <400> 22
 gagtgggtgtc cgagccata 19
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for Mouse F4/80
 <400> 23

cctggacgaa tcctgtgaag	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer for Mouse F4/80	
<400> 24	
ggtgggacca cagagagttg	20
<210> 25	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer for Mouse MCP-1	
<400> 25	
catccacgtg ttggctca	18
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer for Mouse MCP-1	
<400> 26	
gatcatcttg ctggtgaatg agt	23
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer for Mouse CCN5	
<400> 27	
atacaggtgc caggaaggtg	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Reverse primer for Mouse CCN5

<400> 28

gttgatact cgggtggcta

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Mouse GAPDH

<400> 29

ctcatgacca cagtccatgc

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Mouse GAPDH

<400> 30

ttcagctctg ggatgacctt

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Mouse 18s rRNA

<400> 31

gtaaccggtt gaacccatt

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Mouse 18s rRNA

<400> 32

ccatccaatc ggtagtagcg

20

<210> 33

<211> 27

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for Rat alpha-SMA	
<400>	33	
tctgtctcta	gcacacaact	gtgaatg
		27
<210>	34	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for Rat alpha-SMA	
<400>	34	
ttgacaggcc	agggctagaa	ggg
		23
<210>	35	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for Rat Collagen I	
<400>	35	
aatgcacttt	tggttttttg	tcacgt
		26
<210>	36	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><		
223>	Reverse primer for Rat Collagen I	
<400>	36	
cagcccaactt	tgccccaacc	c
		21
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for Rat TGF-beta 1	
<400>	37	
tgttcgcgct	ctcggcagtg	
		20

<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for Rat TGF-beta 1	
<400>	38	
cggatggcct cgatgcgctt		20
<210>	39	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for Rat GAPDH	
<400>	39	
accagccca gcaaggatac tg		22
<210>	40	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for Rat GAPDH	
<400>	40	
attcgagaga agggagggt ccc		23
<210>	41	
<211>	753	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	41	
atgagaggca caccgaagac ccacctctg gccttctccc tcctctgcct cctctcaaag		60
gtgcgtacc agctgtgccc gacaccatgt acctgcccct ggccacctcc ccgatgcccg		120
ctgggagtac cctgggtgct ggatggctgt ggctgctgcc gggtatgtgc acggcggctg		180
ggggagccct gcgaccaact ccacgtctgc gacgccagcc agggcctggt ctgccagccc		240
ggggcaggac ccggtggccg gggggccctg tgcctcttgg cagaggacga cagcagctgt		300
gaggtgaacg gccgcctgta tcgggaaggg gagaccttcc agccccactg cagcatccgc		360
tgccgtgcg aggacggcgg cttcacctgc gtgccgtgt gcagcgagga tgtgcggctg		420

cccagctggg actgccccca cccagaggagg gtcgagggtcc tgggcaagtg ctgccctgag 480

tgggtgtgcg gccaaaggagg gggactgggg acccagcccc ttccagccca aggaccccag 540

ttttctggcc ttgtctcttc cctgccccct ggtgtcccct gcccagaatg gagcacggcc 600

tggggaccct gctcgaccac ctgtgggctg ggcatggcca cccgggtgtc caaccagaac 660

cgcttctgcc gactggagac ccagcgccgc ctgtgcctgt ccaggccctg cccaccctcc 720

aggggtcgca gtccacaaaa cagtgccttc tag 753

<210> 42

<211> 2994

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

atggagaacg cgcacaccaa gacggtggag gaggtgctgg gccacttcgg cgtcaacgag 60

agtacggggc tgagcctgga acaggtcaag aagcttaagg agagatgggg ctccaacgag 120

ttaccggctg aagaaggaaa aaccttgctg gaacttgtga ttgagcagtt tgaagacttg 180

ctagttagga ttttattact ggcagcatgt atatcttttg ttttggcttg gtttgaagaa 240

ggtgaagaaa caattacagc cttttagtaa ctttttgtaa ttttactcat attagtagcc 300

aatgcaattg tgggtgtatg gcaggaaaga aatgctgaaa atgccatcga agcccttaag 360

gaatatgagc ctgaaatggg caaagtgtat cgacaggaca gaaagagtgt gcagcggatt 420

aaagctaaag acatagtcc tggatgatatt gtagaaattg ctgttgggtga caaagttcct 480

gctgatataa ggtaacttc catcaaatct accacactaa gagttgacca gtcaattctc 540

acaggatgaat ctgtctctgt catcaagcac actgatcccg tccctgaccc acgagctgtc 600

aaccaagata aaaagaacat gctgttttct ggtacaaaca ttgctgctgg gaaagctatg 660

ggagtgggtg tagcaactgg agttaacacc gaaattggca agatccggga tgaaatgggtg 720

gcaacagaac aggagagaac accccttcag caaaaactag atgaatttgg ggaacagctt 780

tccaaagtca tctcccttat ttgcattgca gtctggatca taaatattgg gcacttcaat 840

gacccggttc atggagggtc ctggatcaga ggtgctatct actactttaa aattgcagtg 900

gccttggtg tagcagccat tctgaaggt ctgcctgcag tcatcaccac ctgcctggct 960

cttggaactc gcagaatggc aaagaaaaat gccattgttc gaagcctccc gtctgtggaa 1020

acccttgggt gtacttctgt tatctgtcga gacaagactg gtacacttac aacaaaccag 1080

atgtcagttc gcaggatgtt cattctggac agagtgggaag gtgatacttg ttcccttaat 1140

gagtttacca taactggatc aacttatgca cctattggag aagtgcataa agatgataaa 1200

ccagtgaatt gtcaccagta tgatggctcg gtagaattag caacaatttg tgctctttgt	1260
aatgactctg ctttggatta caatgaggca aagggtgtgt atgaaaaagt tggagaagct	1320
acagagactg ctctcacttg cctagtagag aagatgaatg tatttgatac cgaattgaag	1380
ggctctttcta aaatagaacg tgcaaatgcc tgcaactcag tcattaaaca gctgatgaaa	1440
aaggaattca ctctagagtt ttcacgtgac agaaagtcaa tgtcggttta ctgtacacca	1500
aataaaccaa gcaggacatc aatgagcaag atgtttgtga aggggtgtcc tgaaggtgtc	1560
attgacaggt gcaccacat tcgagttgga agtactaagg ttcctatgac ctctggagtc	1620
aaacagaaga tcatgtctgt cattcgagag tggggtagtgc gcagcgacac actgcgatgc	1680
ctggccctgg ccactcatga caaccactg agaagagaag aaatgcacct tgaggactct	1740
gccaaacttta ttaaatafga gaccaatctg accttcgttg gctgcgtggg catgctggat	1800
cctccgagaa tcgaggtggc ctctccgtg aagctgtgcc ggcaagcagg catccgggtc	1860
atcatgatca ctggggacaa caaggcact gctgtggcca tctgtcgccg catcggcac	1920
ttcgggcagg atgaggacgt gacgtcaaaa gctttcacag gccgggagtt tgatgaactc	1980
aaccctccg cccagcgaga cgctgcctg aacgccgct gttttgctcg agttgaacct	2040
tcccacaagt ctaaaatcgt agaatttctt cagtcttttg atgagattac agctatgact	2100
ggcgatggcg tgaacgatgc tctgctctg aagaaagccg agattggcat tgctatgggc	2160
tctggcactg cggtggctaa aaccgcctct gagatgggcc tggcggatga caacttctcc	2220
accattgttg ctgccgttga ggaggggcgg gcaatctaca acaacatgaa acagttcatc	2280
cgctacctca tctcgtccaa cgtcggggaa gttgtctgta ttttctgac agcagccctt	2340
ggatttcccg aggcctttgat tctgttcag ctgctctggg tcaatctggt gacagatggc	2400
ctgcctgcca ctgcactggg gttcaacct cctgatctgg acatcatgaa taaacctccc	2460
cggaaaccaa aggaaccatt gatcagcggg tggctctttt tccgttactt ggctattggc	2520
tgttacgtcg gcgtgctac cgtgggtgct gctgcatggt ggttcattgc tgctgacggt	2580
ggccaagag tgccttcta ccagctgagt catctctac agtgtaaaga ggacaacccg	2640
gactttgaag gcgtggattg tgcaatcttt gaatcccat acccgatgac aatggcgctc	2700
tctgttctag taactataga aatgtgtaac gccctcaaca gcttgccga aaaccagtcc	2760
ttgtgagga tgcctccctg ggagaacatc tggctcgtgg gctccatctg cctgtccatg	2820
tactccact tctgatcct ctatgtcgaa ccttgccac tcactttcca gatcacaccg	2880
ctgaacgtga cccagtggct gatggtgctg aaaatctcct tgcccgtgat tctcatggat	2940
gagacgtca agtttgtggc ccgcaactac ctggaacctg caatactgga gtag	2994