

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0054440
(43) 공개일자 2023년04월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7009638
(22) 출원일자(국제) 2021년08월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년03월21일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2021/050928
(87) 국제공개번호 WO 2022/036411
국제공개일자 2022년02월24일
- (30) 우선권주장
2020902986 2020년08월21일 오스트레일리아(AU)
- (71) 출원인
더 유니버시티 오브 웨스턴 오스트레일리아
오스트레일리아 웨스턴 오스트레일리아 6009 크롤
리 스테링 하이웨이 35
- (72) 발명자
홀, 리비아
오스트레일리아 웨스턴 오스트레일리아 6009 네드
랜즈 모나쉬 애비뉴 34/95
- (74) 대리인
특허법인다나

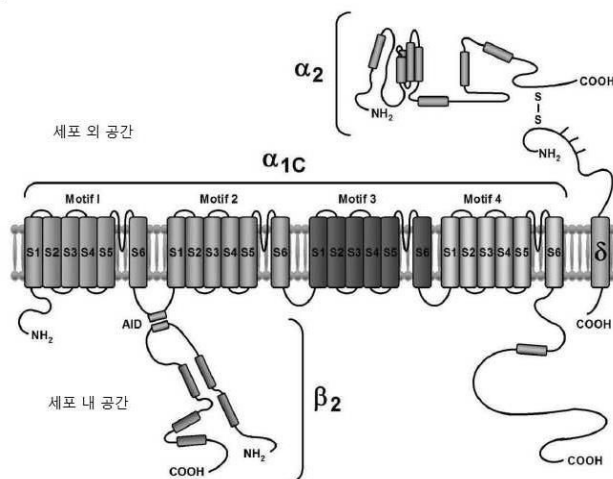
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 심근 손상의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 L-형 Ca^{2+} 채널에 결합하는 펩타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 심근 손상의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 9/10 (2018.01)

C07K 14/705 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이의 변이체로서:

QQX1EEDX2KGYLDWITQAE

여기서 X1은 Q, E 또는 R을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이고; 및

여기서 X2는 L 또는 E를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이며;

여기서 상기 펩타이드는 서열번호 1로 구성되지 않는 것인,

펩타이드 또는 이의 변이체.

청구항 2

서열번호 4 내지 7의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 펩타이드 또는 이의 변이체로서, 여기서 상기 펩타이드는 서열번호 1로 구성되지 않는 것인, 펩타이드 또는 이의 변이체.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부분; 및

하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부분:

RKKRRQRRRZaa

을 포함하는 펩타이드 또는 이의 변이체로서:

여기서 Zaa는 6-아미노 헥산산(6-amino hexanoic acid)인,

펩타이드 또는 이의 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 2를 포함하는 펩타이드에 대해 적어도 75%; 적어도 80%; 적어도 85%; 적어도 90%; 적어도 95%; 적어도 96%; 적어도 97%; 적어도 98%; 및 적어도 99%의 서열 상동성의 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 펩타이드.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 펩타이드는 표 3에 제시된 적합한 아미노산 치환으로부터 선택된 서열번호 2에 대한 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는, 펩타이드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 세포 내 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 움직임을 조절하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 세포 내 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 결합을 조절하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장 세포

내 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 심근 손상은 심장 비대증을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 대상체의 심장 내 심장 세포에서 세포내 Ca^{2+} 수준이 감소되거나 실질적으로 유지되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 심장 비대증을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 심근 섬유증의 진행을 늦추는 방법.

청구항 14

대상체의 심장 세포 내 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 움직임을 조절하기 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 용도.

청구항 15

대상체의 심장 내 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널 알파-상호작용 도메인에 대한 결합을 조절하기 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 용도.

청구항 16

대상체의 심장 세포 내 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하기 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 용도.

청구항 17

재관류 동안 및/또는 이후 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 용도.

청구항 18

대상체에서 심근 섬유증의 진행을 늦추기 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 용도.

청구항 19

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 20

대상체의 심장에서 재관류 손상을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 용도.

청구항 21

대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 치료, 예방 또는 개선하는 약제의 제조에 있어서의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 용도.

청구항 22

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 펩타이드, 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 약학, 예방 또는 치료 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 그 사용 지침을 함께 포함하여 적절한 용기에 포장한, 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 L-형 Ca^{2+} 채널에 결합하는 펩타이드 및 심장 비대증(cardiac hypertrophy)을 포함하는 심근 손상을 예방 및 치료하기 위한 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 펩타이드 및 펩타이드를 포함하는 치료 조성물의 투여에 의해 심근 손상의 영향을 치료, 예방 또는 개선하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 배경 기술에 대한 다음의 논의는 단지 본 발명에 대한 이해를 용이하게 하기 위한 것이다. 논의는 언급된 자료가 출원의 우선일 당시 일반적인 지식의 일부이거나 일부였다는 것을 인지하거나 인정하는 것이 아니다.

[0003] 병리학적 심장 비대증 (심장 근육의 비후)는 스트레스; 고혈압과 같은 질병; 심근 경색을 포함하는 심장 근육 손상; 신경호르몬; 또는 대기 일산화탄소로 인한 저산소증을 유발하는 오염에 대한 반응으로 인간이나 다른 동물에서 발생할 수 있다.

[0004] 가족성 비대성 심근병증(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)은 전 세계적으로 약 200명 중 1명에게 영향을 미치는 심장 비대증을 특징으로 하는 유전성 심장 질환이다 (*J. Am. Coll. Cardiol.* 65 (12) (2015) 1249-1254). 이는 40세 미만의 사람들에서 심장 돌연사의 주요 원인이다. 약물 요법 및 중격근절제술(septal myectomy)과 같은 외과적 개입은 HCM을 앓고 있는 환자의 증상을 관리하는 데 사용된다.

[0005] 특정 유전적 돌연변이는 HCM의 발달과 관련이 있다. 심장 트로포닌(cTn)은 3개의 서브유닛 (cTnT, cTnI 및 cTnC)으로 구성된 육종 단백질 복합체이며 심장 수축 및 이완 조절에 중요한 역할을 한다. 전체 cTn 복합체는 TnT를 통해 트로포미오신에 고정된다. TnI는 세포내 칼슘의 변화에 반응하여 수축을 조절한다. 이완된 상태에서 TnI는 액틴-미오신 상호작용을 억제한다. 칼슘이 TnC에 결합하면 TnI는 액틴-미오신 상호작용을 허용하는 구조적 변화를 겪으며, 결과적으로 수축한다.

[0006] cTnI 유전자 TNNI3의 돌연변이는 HCM을 가진 유전자형 가족의 약 3-5%를 차지한다. cTnI 돌연변이를 유발하는 인간 HCM Gly203Ser는 심첨 및 심실 비대, 일부 사례에서는 상심실 및 심실 부정맥을 특징으로 한다. 또한, HCM은 근세포 리모델링, 근섬유 혼란 및 에너지 대사의 변화를 특징으로 한다. MYH7 유전자의 돌연변이, 특히 alphaMHCArg403Ser 돌연변이도 HCM 사례의 약 40%를 차지하는 것으로 알려져 있다.

[0007] HCM 환자의 증상을 관리하는 데 사용되는 약물 요법에는 칼슘 채널 길항제, β -차단제, 칼슘 채널 차단제, 아미오다론 (Pacerone) 또는 디소피라마이드 (Norpace)가 포함될 수 있다. 칼슘 채널 차단제인 딜티아젠펜(Diltiazem)은 협심증 및 심장 부정맥과 같은 HCM 증상을 치료하는 데 사용된다. 그러나 이러한 약물은 음성 수축성 (수축성) 효과와 심부전으로 이어지는 혈압 감소를 유발할 수 있다.

[0008] 항부정맥 약물 요법에는 아미오다론, 디소피라마이드, 안지오텐신 수용체 차단제, 프로파페논, 안지오텐신-전환효소(ACE) 억제제 및 퍼렉실린이 포함된다. 이러한 약물들은 부정맥 예방에 효과가 없다. 삽입형 제세동기 요법의 외과적 삽입은 돌연사를 예방할 수 있지만 환자의 사회경제적, 심리적 비용은 상당하다.

[0009] 이러한 치료는 심장 비대 및 HCM의 증상을 관리하는 데 도움이 될 수 있지만, 현재 환자의 심장 비대 발생을 역

전시키거나 예방할 수 있는 약리학적 치료는 존재하지 않는다.

[0010] 심장 비대는 HCM을 앓지 않는 환자에게도 나타난다. 관상동맥의 완전 또는 부분적 폐쇄로 인해 심장 비대가 나타나는 환자는 일반적으로 재관류 요법, 예를 들어 혈전용해 요법, 경피적 관상동맥 중재술(PCI) 또는 우회 수술을 사용하여 치료한다. 그러나 재관류 요법 후 허혈 기간 후 혈액 공급이 심장 조직으로 돌아오면 재관류 손상이 발생할 수 있다. 허혈 기간 동안 혈액에서 영양분과 산소가 부족하면 순환이 회복되어 염증과 산화적 손상이 발생하는 상태가 된다. 이것은 정상적인 기능의 회복보다는 산화 스트레스의 증가로 인해 발생한다.

[0011] L-형 칼슘 채널

[0012] 긴 또는 L-형 Ca^{2+} 채널은 심장 펌핑을 위한 귀중한 근육 수축을 생성하는 심장 근세포로의 칼슘 유입의 주요 경로이다. 세포내 칼슘과 산화 스트레스의 증가는 L-형 Ca^{2+} 채널을 통한 유입 증가 또는 비대를 유도하는 채널의 알파 서브유닛의 과발현과 함께 심장 비대증의 병태생리에 관여한다.

[0013] 기공을 형성하는 L-형 Ca^{2+} 채널 알파-1(α_1) 서브유닛의 1차 구조는 4개의 상동 반복 모티프(I-IV)로 구성되며, 각각은 6개의 추정 막관통 세그먼트(S1-S6)로 구성된다 (도 1). 막관통 세그먼트 사이의 세포질 루프는 이들이 연결되는 모티프에 따라 이름이 지정된다. 또한 이황화물 가교를 통해 알파 서브유닛에 연결된 세포외 서브유닛인 α_2 , δ 및 γ 서브유닛과, 완전히 세포내인 L-형 Ca^{2+} 채널 베타-2(β_2) 서브유닛이 있다. β_2 서브유닛의 구조는 4개의 베타 서브유닛 이소형(β_1 - β_4) 중 하나로 표현될 수 있다. 모든 이소형은 친수성, 비글리코실화 및 세포막에 닿아있는 (membrane-spanning) 영역이 없는 세포 내이다. β_2 이소형은 AID(alpha-interaction domain)라고 하는 모든 복제된 고전압 활성화 α_1 서브유닛 이소형의 반복 I과 II 사이의 세포질 링커에서 고도로 보존된 모티프에 단단히 결합되어 있다.

[0014] L-형 Ca^{2+} 채널은 또한 미토콘드리아 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 하며, 여기에는 칼슘-의존적 및 칼슘-비의존적 메커니즘이 모두 포함된다. 원형질막의 전압-클램프 또는 DHP 수용체 작용제 BayK(-)와 함께 L-형 Ca^{2+} 채널의 활성화는 세포내 및 미토콘드리아 칼슘, NADH 생성, 과산화물 생성 및 wt 심장 근세포에서 칼슘-의존 방식으로 대사 활성을 증가시키기에 충분하다. L-형 Ca^{2+} 채널의 활성화는 또한 칼슘-비의존적 방식으로 미토콘드리아 막 전위(Ψ_m)를 증가시킨다. 이 반응은 F-액틴 탈중합체의 존재 하에서 감쇠되어 반응이 부분적으로 F-액틴을 통한 L-형 Ca^{2+} 채널과 미토콘드리아 간의 상호작용에 의존한다는 것을 나타낸다. L-형 Ca^{2+} 채널은 세포골격 네트워크를 통해 L-형 Ca^{2+} 채널과 미토콘드리아 사이의 구조적-기능적 소통을 통해 미토콘드리아 기능에 영향을 미치며, 이후 박동마다 발생하는 L-형 Ca^{2+} 채널의 구조적 변화가 따른다.

[0015] HCM 환자는 L-형 Ca^{2+} 채널과 미토콘드리아 간의 소통 및 대사 활동의 변화를 보인다. 구체적으로, cTnI-G203S 근세포는 L-형 Ca^{2+} 채널 비활성화 속도가 더 빠르고, L-형 Ca^{2+} 채널 활성화에 반응하여 Ψ_m 및 미토콘드리아 대사 활성(인간 조건과 일치)이 증가한다. 이러한 변화는 또한 심근병증이 아직 발생하지 않은 cTnI-G203S 마우스의 심장에서 분리된 근세포에서도 발생하며, 이는 L-형 Ca^{2+} 채널 동역학 및 대사 활동의 변화가 심근병증 발병에 선행함을 나타낸다.

[0016] 채널의 알파 서브유닛은 재관류 및 칼슘 과부하 동안 심장 근육을 보호하는 것을 목표로 하는 여러 치료법의 타겟이었다. 이러한 치료법의 예에는 알파 서브유닛에 대한 단일클론 항체; 디히드로피리딘, 벤조디아제핀(Benzodiazepine) 및 페닐알칼라민과 같은 Ca^{2+} 채널 길항제를 포함한다. Ca^{2+} 채널 차단제는 L-형 Ca^{2+} 채널의 $\alpha_1\text{C}$ 서브유닛 영역에 특이적으로 결합하지만, 이러한 약물은 심근 억제 및 심부전을 유발할 수 있기 때문에 제한적인 성공을 거둔 것으로 밝혀졌다.

[0017] AID-펩타이드

[0018] WO/2013/113060에서, 본 발명자들은 L-형 Ca^{2+} 채널의 β_2 서브유닛의 이동을 AID에 대해 유도된 펩타이드와 제한하는 것이 β_2 서브유닛과 α_1 서브유닛의 상호작용을 방지한다는 것을 관찰을 하였다. 본 발명자들은 WO/2013/113060에서 β -상호작용 도메인(BID)이 보존된 소수성 틈을 통해 AID와 상호작용한다는 가설을 세웠다.

α_1 서브유닛의 I-II 루프는 세포 표면 발현을 제한하는 소포체 유지 신호를 포함한다. β_2 서브유닛은 유지 신호에 의해 부과된 억제제를 역전시키고 L-형 Ca^{2+} 채널 α_1 서브유닛의 생물물리학적 특성을 조절할 수 있으며, 전류-전압 관계의 왼쪽으로의 이동을 생성하고, 이는 α_1 서브유닛 전압-센서 영역의 S4 영역의 개입과 일치한다.

[0019] WO/2013/113060에 제시된 바와 같이, 본 발명자들은 심장 근육 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID와 상호작용하는 서열 QQLEEDLKKGYLDWITQAE(서열번호 1), (AID 펩타이드)의 펩타이드를 개발하였고, 따라서 해당 β_2 서브유닛과 L-형 Ca^{2+} 채널 α_1 소단위의 AID의 상호작용을 방지한다. 펩타이드-결합된 β_2 소단위는 α_1 소단위의 세포 표면 발현을 제한하는 소포체 보유 신호에 의해 부과된 α_1 소단위에 대한 억제제를 역전시킬 수 없다. 이로 인해 L-형 Ca^{2+} 채널의 활성화가 제한되고 미토콘드리아 에너지 소비가 감소한다.

[0020] 그러나 심장 비대증을 효과적으로 치료하거나 예방하기 위해서는 β_2 서브유닛과 L-형 Ca^{2+} 채널의 AID의 상호작용을 방해하는 개선된 효력을 갖는 추가적인 펩타이드의 개발이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0021] 발명자들은 AID 펩타이드의 활성이 펩타이드의 구성에 의존한다는 것을 발견하였다. 특히, 본 발명자들은 AID 펩타이드 서열에서 세 번째 및 일곱 번째 아미노산의 제한된 치환이 L-형 Ca^{2+} 의 AID와 β_2 서브유닛의 상호작용에서 이 펩타이드가 생성하는 파괴 능력에 예상치 못한 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0022] 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은 하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이의 변이체를 제공한다:

[0023] QQX₁EEDX₂KGYLDWITQAE (서열번호 2)

[0024] 여기서 X₁은 Q, E 또는 R을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이고; 및

[0025] 여기서 X₂는 L 또는 E를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이다.

[0026] 바람직하게는, 상기 펩타이드는 서열번호 1로 구성되지 않는다.

[0027] 바람직하게는, 본 발명은 하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 이의 변이체를 제공하고:

[0028] QQX₁EEDX₂KGYLDWITQAE (서열번호 2)

[0029] 여기서 X₁은 Q, E 또는 R을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이고; 및

[0030] 여기서 X₂는 L 또는 E를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이며;

[0031] 여기서 상기 펩타이드는 서열번호 1로 구성되지 않는다.

[0032] 바람직하게는, 상기 펩타이드는 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다. 보다 바람직하게는, 상기 펩타이드는 인간 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다.

[0033] 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 4-7의 아미노산 서열 중 어느 하나 또는 그의 변이체를 포함하는 펩타이드를 제공하며, 여기서 상기 펩타이드는 서열번호 1로 구성되지 않는다. 바람직하게는, 상기 펩타이드는 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다. 보다 바람직하게는, 상기 펩타이드는 인간 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다.

[0034] 제2 측면에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부분; 및 하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부분:

[0035] RKKRRQRRRZaa (서열번호 3)

[0036] 을 포함하는 펩타이드 또는 이의 변이체를 제공하고:

- [0037] 여기서 Zaa는 6-아미노 헥산산(6-amino hexanoic acid)이다. 바람직하게는, 상기 펩타이드는 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다. 보다 바람직하게는, 상기 펩타이드는 인간 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다.
- [0038] 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 2를 포함하는 펩타이드에 대해 적어도 75%; 적어도 80%; 적어도 85%; 적어도 90%; 적어도 95%; 적어도 96%; 적어도 97%; 적어도 98%; 및 적어도 99%의 서열 상동성의 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드는 표 3에 제시된 적합한 아미노산 치환으로부터 선택된 서열번호 2에 대한 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0039] 제3 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 움직임을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0040] 제4 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 결합을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0041] 바람직하게는, 상기 펩타이드는 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛과 L-형 Ca^{2+} 채널의 알파 서브유닛 간의 상호작용을 방지하여 채널의 활성화를 방지한다.
- [0042] 제5 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0043] 제6 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0044] 바람직하게는 상기 심근 손상은 심장 비대증을 포함한다. 바람직하게는, 심장 비대증 및/또는 산화 스트레스가 감소된다. 보다 바람직하게는, 대상체의 심장 내 심장 세포에서 세포내 Ca^{2+} 수준은 대상체의 심장에 있는 심장 세포에서 약간 감소하거나 실질적으로 유지된다. 대상체는 바람직하게는 포유동물이고 보다 바람직하게는 인간이다. 가장 바람직하게는, 상기 대상체는 비대성 심근병증을 앓고 있다.
- [0045] 제7 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 심장 비대증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 대상체는 비대성 심근병증을 앓고 있다.
- [0046] 제8 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장 내 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 움직임을 조절하기 위한 본 발명의 펩타이드의 용도를 제공한다.
- [0047] 제9 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하기 위한 본 발명의 펩타이드의 용도를 제공한다.
- [0048] 제10 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 본 발명의 펩타이드의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 재관류 동안 및/또는 이후에 사용한다.
- [0049] 제11 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0050] 제12 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 치료, 예방 또는 완화하기 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 펩타이드의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 상기 심근 손상은 심장 비대증이다.
- [0051] 제13 측면에서, 본 발명은 본 발명의 펩타이드; 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 약학, 예방 또는 치료 조성물을 제공한다.
- [0052] 제14 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 심근 섬유증의 진행을 늦추는 방법을 제공한다.
- [0053] 제15 측면에서, 본 발명은 대상체에서 심근 섬유증의 진행을 늦추기 위한 본 발명의 펩타이드의 용도를 제공한다.

[0054] 제16 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스의 영향을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 키트를 제공하며, 여기서 키트는 사용 지침과 함께 적절한 용기에 포장된 적어도 하나의 본 발명의 펩타이드를 포함한다.

[0055] 제17 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널 알파-상호작용 도메인에 대한 결합을 조절하기 위한 본 발명의 펩타이드의 용도를 제공한다.

[0056] 제18 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장에서 재관류 손상을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 펩타이드의 용도를 제공한다.

[0057] 본 발명의 추가 특징은 본 발명의 여러 비제한적인 실시예에 대한 이하의 설명에서 보다 완전하게 설명된다. 이 설명은 본 발명을 예시하기 위한 목적으로만 포함된다. 위에서 설명한 바와 같이 본 발명의 광범위한 요약, 개시 또는 설명에 대한 제한으로 이해되어서는 안된다.

도면의 간단한 설명

[0058] 설명은 첨부된 도면을 참조하여 이루어질 것이다.

도 1은 4개의 상동 반복 모티프(I-IV)로 구성된 기공-형성 L-형 Ca^{2+} 채널 알파-1(α_1) 서브유닛의 기본 구조를 나타낸 그림으로, 각 모티프는 6개의 추정 막 통과 세그먼트(S1-S6)로 구성된다. $\alpha_2\delta$ 는 이황화 결합(S-S)을 통해 연결된 막 통과 단백질(δ)과 세포 외 α_2 단백질로 구성된다. β_2 는 α -상호 작용 도메인(AID)을 통해 α_{1C} 의 모티프 1과 2 사이의 링커에 결합된 세포 내 단백질이다.

도 2는 β 서브유닛에 대한 각 돌연변이 펩타이드, 전장 AID 펩타이드 및 딜티아젠펜(diltiazem)의 평균 결합 친화도($K_{0.5}$)를 보여주는 경쟁 결합 분석 결과를 보여준다.

도 3은 야생형 심장 근세포의 산화 스트레스 반응에 대한 돌연변이 펩타이드의 효과를 보여준다.

도 4는 wt 근세포에서 대사 활동과 산소 소비의 척도인 플라보단백질 산화에 대한 돌연변이 펩타이드의 효과를 보여준다.

도 5는 비대화된 cTnI-G203S 돌연변이 마우스 심장에서 분리한 근세포에서 대사 활동 및 산소 소비의 척도인 플라보단백질 산화에 대한 돌연변이 펩타이드의 효과를 보여준다.

도 6은 CK 및 LDH(괴사 지표) 방출, 및 생체 외에서 20분 동안 무-운동 허혈에 노출된 심장에서 환원 글루타치온 대 산화 글루타치온(GSH:GSSG)의 비율로 측정된 산화 스트레스에 대한 돌연변이 펩타이드의 효과를 보여준다.

도 7은 본 출원서에서 참조한 서열 표를 보여준다.

도 8은 10 μM AID(S)-TAT 또는 AID-TAT를 투여한 cTnI-G203S 마우스의 심초음파 파라미터를 보여준다.

도 9는 0, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM 및 100 μM 의 펩타이드에 노출시킨 후 각 돌연변이 펩타이드, 전장 AID 펩타이드 및 딜티아젠펜의 β 서브유닛에 대한 평균 결합 친화도($K_{0.5}$)를 보여주는 경쟁 결합 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 변이체 펩타이드에 대한 cTnI.2 (wt) 및 cTnI-G203S (돌연변이) 심근세포의 시험관 내 노출이 플라보단백질 산화의 변화로 평가된 원래 AID-TAT보다 대사 활동을 회복하는 데 더 효과적이라는 것을 설명한다.

도 11은 변이체 펩타이드에 대한 cTnI.2 (wt) 및 cTnI-G203S (돌연변이) 심근세포의 시험관 내 노출이 JC-1 형광의 변화로 평가된 원래 AID-TAT보다 대사 활동을 회복하는 데 더 효과적이라는 것을 설명한다.

도 12는 cTnI-G203S (돌연변이) 마우스를 AID-TAT 변이체 펩타이드로 생체 내 처리해도 혈압이 변하지 않음을 보여준다.

도 13은 cTnI-G203S 마우스를 AID-TAT 변이체 펩타이드로 생체 내에서 처리해도 독성이 없음을 보여준다.

도 14는 cTnI-G203S 마우스를 AID-TAT 변이체 펩타이드로 생체 내에서 처리하면 섬유증의 진행이 느려진다는 것을 보여준다.

도 15는 10 μ M AID(S), 10 μ M AID-TAT, 5 μ M AID_{P7}-TAT, 5 μ M AID_{P14}-TAT, 5 μ M AID_{P15}-TAT 또는 5 μ M AID_{P16}-TAT에 노출된 마우스의 심초음파 파라미터를 보여준다.

도 16은 *cTnI-G203S* 마우스를 AID-TAT 변이체 펩타이드로 생체 내에서 처리하면 비대증의 진행이 느려진다는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 목록

하기 표 1은 본 명세서에서 언급된 서열의 목록을 제시한다:

표 1

서열번호	이름	서열
서열번호 1	AID 펩타이드	QQLEEDLKGyLDWITQAE
서열번호 2	변이체 AID 펩타이드	QQX ₁ EEDX ₂ KGYLDWITQAE
서열번호 3	TAT 펩타이드	RKKRRQRRRZaa
서열번호 4	변이체 P7	QQEEDLKGyLDWITQAE
서열번호 5	변이체 P14	QEEEDLKGyLDWITQAE
서열번호 6	변이체 P15	QEEEDEKGYLDWITQAE
서열번호 7	변이체 P16	QREEDLKGyLDWITQAE
서열번호 8	핵 국소화 신호	GRKKR
서열번호 9	단백질 전달 도메인	YGRKKRRQRRR
서열번호 10	AID[S] 펩타이드	QKILGEWDLAQYTDQELE
서열번호 11	변이체 P1	DLKGyLDWITQAE
서열번호 12	변이체 P4	LEEDLKGyLDWITQAE
서열번호 13	변이체 P6	KGYLDWITQAE
서열번호 14	변이체 P10	DLKGyLDWITQA
서열번호 15	변이체 P11	DLKGyLDWITQ
서열번호 16	변이체 P12	DLKGyLDWIT
서열번호 17	변이체 P13	QQLEEDLKGFLDAATQAE

당업자는 본 명세서에 기술된 발명이 구체적으로 기술된 것 이외의 변형 및 수정이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 그러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명은 또한 명세서에 언급되거나 지시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물을 개별적으로 또는 집합적으로 포함하며, 임의의 또는 모든 조합 또는 단계 또는 특징 중 임의의 2개 이상을 포함한다.

본 발명은 단지 예시의 목적으로 의도된 본 명세서에 기술된 특정 구현예에 의해 범위가 제한되지 않는다. 기능적으로 등가인 제품, 조성물 및 방법은 본 명세서에 기술된 바와 같이 본 발명의 범위 내에 명확하게 포함된다.

여기에 인용된 모든 간행물 (특허, 특허 출원, 저널 기사, 실험실 매뉴얼, 서적 또는 기타 문서 포함)의 전체 공개 내용은 참조로 포함된다. 참조 중 어느 것도 선행 기술을 구성하거나 본 발명과 관련된 분야에서 일하는 사람들의 일반적인 일반 지식의 일부임이 인정되는 것은 아니다.

본 명세서 전체에서, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다", 또는 "포함하는"과 같은 변형은 명시된 정수 또는 정수의 그룹을 포함하지만 다른 정수 또는 정수의 그룹을 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

본 명세서에서 사용된 선택된 용어에 대한 다른 정의는 본 발명의 상세한 설명 내에서 찾아볼 수 있으며 전체적으로 적용될 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 다른 모든 과학 및 기술 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

본 명세서에 설명된 발명은 하나 이상의 값의 범위(예를 들어, 크기, 변위 및 전계 강도(field strength) 등)를 포함할 수 있다. 값의 범위는 범위를 정의하는 값 및 경계를 정의하는 값에 바로 인접한 값과 동일하거나 실질적으로 동일한 결과를 초래하는 범위에 인접한 값을 포함하여 범위 내의 모든 값을 포함하는 것으로 이해된다.

- [0068] 본 발명의 특징은 이제 이하의 비-제한적 설명 및 실시예를 참조하여 논의될 것이다.
- [0069] 변이체 AID 펩타이드
- [0070] 본 발명은 하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다:
- [0071] QQX₁EEDX₂KGYLDWITQAE (서열번호 2)
- [0072] 여기서 X₁은 Q, E 또는 R을 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이고; 및
- [0073] 여기서 X₂는 L 또는 E를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산이다.
- [0074] 바람직하게는 상기 펩타이드는 L-형 Ca²⁺ 채널 β₂ 서브유닛의 BID에 결합한다. 보다 바람직하게는, 상기 펩타이드는 인간 L-형 Ca²⁺ 채널 β₂ 서브유닛의 BID에 결합한다. 가장 바람직하게는, 상기 펩타이드는 서열번호 1에 비해 더 큰 친화도로 L-형 Ca²⁺ 채널 β₂ 서브유닛의 BID에 결합한다.
- [0075] 본 발명은 인간 L-형 Ca²⁺ 채널 α₁ 서브유닛 (서열번호1)의 고도로 보존된 AID 모티프에 대한 변이체를 포함하는 분리된 펩타이드를 제공한다.
- [0076] 놀랍게도, 본 발명자들은 L-형 Ca²⁺ 채널 β₂ 서브유닛의 BID에 대한 펩타이드의 결합 친화도를 향상시키는 원래 AID-펩타이드에서 특정 아미노산에 대한 다수의 변이체를 확인하였다.
- [0077] 한 측면에서, 결합 친화도의 개선은 시험관내 및/또는 생체내에서 펩타이드의 개선된 기능성을 초래한다. 한 측면에서, 본 발명의 펩타이드는 원래 AID 펩타이드와 비교하여 L-형 Ca²⁺ 채널의 불활성화 속도를 더 늦출 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 펩타이드는 시험관내 또는 생체내에서 동일한 효과를 생성하기 위해 원래 AID 펩타이드와 비교하여 더 낮은 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0078] 본 발명자들은 위치 X₁ 및 X₂에서의 특정 변이가 원래 AID 펩타이드와 비교하여 BID에 대한 펩타이드의 결합 친화도를 증가시키는데 효과적임을 확인하였다. 예를 들어, 원래 AID 펩타이드는 위치 X₁에 소수성 아미노산 류신을 갖지만, 일부 구현예에서는 위치 X₁에서 음전하(예: 글루탐산), 양전하(예: 아르기닌) 또는 극성 비하전(예: 글루타민) 아미노산으로의 변이가 있으며, 각각은 원래 AID 펩타이드와 비교하여 BID에 대한 펩타이드의 결합 친화성을 증가시킨다.
- [0079] BID에 대한 본 발명의 펩타이드의 결합 친화도는 SDS-PAGE 분석을 포함하여 당업계에 널리 공지된 다수의 기술에 의해 측정될 수 있다.
- [0080] 바람직하게는, 상기 펩타이드는 약학적으로 허용 가능한 형태로 제공된다.
- [0081] 바람직하게는 상기 펩타이드는 QQLEEDLKGYLDWITQAE (서열번호 1)가 아니다.
- [0082] 바람직하게는 상기 펩타이드는 독성이 없다. 가장 바람직하게는, 상기 펩타이드는 신장 독성 및/또는 간 독성을 나타내지 않는다. 신장 독성은 당 업계에 알려진 방법으로 측정할 수 있으며, 여기에는 Quantichrom Urea 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA) 및 Quantichrom Creatinine 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA)를 각각 사용하여 요소 및 크레아티닌 농도를 평가하는 방법이 포함된다. 간 독성은 Alanine Transaminase 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA) 및 Aspartate Transaminase 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA)를 각각 사용하여 알라닌 트랜스아미나아제 (ALT) 및 아스파르트산 트랜스아미나아제 (AST) 농도를 평가하는 것을 포함하는 당 업계에 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0083] 본 발명은 더욱 바람직하게는 하기 표에 기재된 서열번호 4-7의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다:

표 2

서열번호	펩타이드	아미노산 서열
서열번호 4	변이체 P7	QQQEEEDLKGYLDWITQAE

서열번호 5	변이체 P14	QQEEDLKGyLDWITQAE
서열번호 6	변이체 P15	QQEEDLKGyLDWITQAE
서열번호 7	변이체 P16	QQREEDLKGyLDWITQAE

[0085] 본 발명의 펩타이드는 재조합, 천연 또는 합성일 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 펩타이드의 의도된 목적을 방해하지 않을 희석제, 보조제 또는 담체(나노입자 포함)와 혼합될 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 또한 실질적으로 정제된 형태일 수 있으며, 이 경우 일반적으로 제제 내의 단백질의 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%가 본 발명의 펩타이드인 제제 내의 펩타이드를 포함할 것이다. 본원에서 사용되는 용어 '펩타이드'는 적어도 2개의 아미노산 단량체의 사슬을 지칭하는 용어 '폴리펩타이드'와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0086] 일부 구현예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열번호2 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드 부분의 하나 이상의 반복을 포함한다.

[0087] 변이체

[0088] 본 발명은 다음의 변이체를 추가로 포함한다; (1) 서열번호 2의 아미노산 서열; 또는 (2) 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열. 바람직하게는, 상기 변이체는 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다. 보다 바람직하게는, 상기 펩타이드는 인간 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 결합한다. 가장 바람직하게는, 상기 변이체는 서열번호 1에 비해 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 더 높은 친화도로 결합한다.

[0089] 바람직하게는 상기 변이체는 (1) 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 (2) 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 75% 서열 상동성; 적어도 80%; 적어도 85%; 적어도 90%; 적어도 95%; 적어도 96%; 적어도 97%; 적어도 98% 및 적어도 99%로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열 상동성을 갖는다. 바람직하게는, 상기 변이체는 QQLEEDLKGyLDWITQAE가 아니다.

[0090] 본원에서 사용되는 용어 "% 서열 상동성"은 예를 들어 다음과 같이 계산될 수 있다. 쿼리 서열은 CLUSTAL W 알고리즘을 사용하여 표적 서열에 정렬된다 (Thompson et al, Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994)). 정렬된 서열 중 하나, 예를 들어 가장 짧은 서열에 해당하는 윈도우에서 비교가 이루어진다. 일부 경우에 윈도우는 표적 서열에 의해 정의될 수 있다. 다른 경우에, 윈도우는 쿼리 서열에 의해 정의될 수 있다. 각 위치의 아미노산 잔기를 비교하고, 표적 서열에서 동일한 대응을 갖는 쿼리 서열 내 위치의 백분율을 % 서열 상동성으로 보고한다.

[0091] (1) 서열번호 2의 아미노산 서열; (2) 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열의 변이체는 (1) 서열번호 2의 아미노산 서열; 또는 (2) 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열과 실질적으로 상동이지만 (1) 서열번호 2의 아미노산 서열; 또는 (2) 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가지며, 이는 하나 이상의 아미노산이 화학적으로 변형되거나 아미노산 유사체로 치환되었기 때문이다. 바람직하게는, (1) 서열번호 2의 아미노산 서열; 또는 (2) 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열의 변이체를 생성하기 위한 서열에 대한 임의의 변화는 또한 아미노산 치환에 더하여 아미노산 결실 및/또는 아미노산 첨가를 포함할 수 있다.

[0092] 아미노산 치환은 바람직하게는 당업자에게 공지된 보존적 아미노산 치환이다. 예를 들어, 당업자는 치환에 대해 확인된 특정 아미노산과 공유되는 동일한 클래스의 아미노산 내에서 아미노산을 선택함으로써 아미노산 치환을 수행할 수 있다. 적합한 아미노산 치환의 예는 하기 표 3에 제시되어 있다.

표 3

아미노산	보존적 치환의 예
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala

His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys
Trp (W)	Phe, Tyr
Thr (T)	Ser
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine

[0094] 본 발명의 펩타이드 변이체는 또한 추가 펩타이드에 대한 융합을 포함하는데, 예를 들어 추가 펩타이드 서열이 추출 및 정제를 돕기 위해 본 발명의 펩타이드에 융합된다. 추가적인 융합 펩타이드 파트너의 예에는 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (GST), 핵사히스티딘, GAL4 (DNA 결합 및/또는 전사 활성화 도메인) 및 β -갈락토시다제가 포함된다. 추가적인 펩타이드 파트너와 본 발명의 펩타이드 사이에 단백질분해 절단 부위를 포함하여 추가적인 펩타이드 서열을 제거하는 것이 또한 편리할 수 있다. 바람직하게는 추가 펩타이드는 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 BID에 대한 본 발명의 펩타이드의 결합을 방해하지 않을 것이다.

[0095] AID-TAT 융합 펩타이드

[0096] 바람직한 형태에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부분; 및

[0097] 하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 부분:

[0098] RKKRRQRRRZaa (서열번호 3)

[0099] 을 포함하는 펩타이드 또는 이의 변이체를 추가로 제공하고:

[0100] 여기서 Zaa는 6-아미노 헥산산이다.

[0101] 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 펩타이드의 펩타이드 부분은 TAT 펩타이드를 암호화한다. 인간 면역결핍 바이러스 1로부터의 트랜스-활성화 전사 활성화인자 (TAT)는 펩타이드와 같은 부착된 분자를 세포 내로 전달하는 것으로 당업계에 알려진 세포-투과 펩타이드다. 따라서, 임의의 특정 메커니즘에 얽매이지 않고, 본 발명의 펩타이드의 TAT 펩타이드 부분은 세포내이입을 통해 또는 원형질막을 가로지르는 직접적인 전위에 의해 심장 세포로 펩타이드의 수송을 촉진하는 것으로 생각된다. 도메인 내에서 발견되는 핵 국소화 신호인 GRKKR(서열번호 8)은 TAT의 세포 핵으로의 추가적인 전위를 매개한다. 이 도메인의 생물학적 역할과 전달의 정확한 메커니즘은 현재 알려져 있지 않다. 단백질 전달 도메인의 아미노산 서열은 YGRKKRRQRRR(서열번호 9)이다.

[0102] 그러나, 본 발명의 펩타이드는 펩타이드의 심장 또는 다른 세포로의 수송을 보조하거나 용이하게 하는 다른 또는 추가적인 펩타이드 부분을 포함할 수 있고, 또는 예를 들어 세포 내에서 다른 것들 중에서 본 발명의 펩타이드의 위치를 확인하는 등의 다른 이점을 제공할 수 있다.

[0103] 일부 구현예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 2를 포함하는 펩타이드 부분 및 서열번호 3을 포함하는 펩타이드 부분 또는 이들의 변이체의 하나 이상의 반복을 포함한다.

[0104] 폴리뉴클레오타이드

[0105] 본 발명은 또한, 서열번호 2-7을 포함하는 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 아미노산 코드의 퇴화로 인하여, 수많은 상이한 폴리뉴클레오타이드가 유전자 코드의 퇴화의 결과로 동일한 펩타이드를 암호화할 수 있다는 것은 당업자에 의해 이해될 것이다. 또한, 당업자는 일상적인 기술을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 펩타이드 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오타이드 치환을 만들어 본 발명의 폴리펩타이드가 발현될 특정 숙주 유기체의 코돈 사용을 반영할 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0106] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 mRNA와 같은 RNA 형태이거나, 예를 들어 클로닝에 의해 얻어지거나 합성 생산된 cDNA 및 게놈 DNA를 포함하는 DNA 형태일 수 있다. DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 단일 가닥

DNA 또는 RNA는 센스 가닥으로도 알려진 부호화 가닥이거나 안티-센스 가닥이라고도 하는 비-부호화 가닥일 수 있다. 그들은 또한 합성 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드에 대한 다수의 상이한 유형의 변형이 당업계에 공지되어 있다. 여기에는 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 백본, 분자의 3' 및/또는 5' 말단에 아크리딘 또는 폴리리신 사슬의 추가가 포함된다. 본 발명의 목적을 위해, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 당업계에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 생체내 활성 또는 수명을 향상시키기 위해 수행될 수 있다.

[0107] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드가 이중 가닥인 경우, 듀플렉스의 두 가닥은 개별적으로 또는 조합하여 본 발명에 포함된다. 폴리뉴클레오타이드가 단일 가닥인 경우, 그 폴리뉴클레오타이드의 상보적인 서열도 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0108] "분리된" 폴리뉴클레오타이드(들)에 대한 언급은 원래 환경에서 제거된 폴리뉴클레오타이드, DNA 또는 RNA를 의미한다. 예를 들어, 벡터에 포함된 재조합 DNA 분자는 본 발명의 목적을 위해 분리된 것으로 간주된다. 분리된 DNA 분자의 추가적인 예는 이중 숙주 세포에서 유지되는 재조합 DNA 분자 또는 용액에서 정제된(부분적으로 또는 실질적으로) DNA 분자를 포함한다.

[0109] 분리된 RNA 분자는 본 발명의 DNA 분자의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사물을 포함한다. 본 발명의 분리된 펩타이드는 합성 생성된 이러한 분자를 추가로 포함한다.

[0110] 상기한 바와 같이, 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2 및 4-7의 아미노산 서열에 의해 암호화되는 펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 오히려 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 펩타이드에 대한 부호화 서열 및 프리(pre)-, 또는 프로(pro)- 또는 프리프로(prepro)- 단백질 서열과 같은 리더 또는 분비 서열을 암호화하는 것과 같은 추가 서열을 포함할 수 있다; 전술한 추가의 부호화 서열이 있거나 없는 펩타이드의 부호화 서열은 추가의 비-부호화 서열과 함께 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 예를 들어 인트론 및 전사된 것과 같은 비-부호화 5' 및 3' 서열, 전사, mRNA 처리 (스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호, 예를 들어 mRNA의 리보솜 결합 및 안정성, 포함)에서 역할을 하는 비-번역 서열; 추가 기능성을 제공하는 것과 같은 추가 아미노산을 부호화하는 추가 부호화 서열. 바람직하게는, 추가 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열에 의해 암호화되는 펩타이드를 포함한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드는 또한 N 말단 메티오닌이 결합된 펩타이드를 암호화하는 것들을 포함한다.

[0111] 본 발명은 또한 본 발명의 펩타이드의 변이체를 암호화하는 본 발명의 핵산 분자의 변이체에 관한 것이다.

[0112] 이러한 변이체는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 뉴클레오타이드 치환, 결실 또는 부가에 의해 생성된 것들을 포함한다. 비-천연 발생 변이체는 당업자에게 공지된 돌연변이 유발 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 상기 변이체는 부호화 영역, 비-부호화 영역 또는 둘 다에서 변형될 수 있다. 부호화 영역의 변형은 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 생성할 수 있습니다. 이들 중에서 특히 바람직한 것은 암호화된 펩타이드의 특성 및 활성을 변경하지 않는 침묵 치환, 첨가 및 결실이다. 또한 이와 관련하여 특히 바람직한 것은 보존적 치환이다.

[0113] 또한, 축퇴 변이체가 아닌 핵산 분자의 경우, L-형 Ca^{2+} 채널 $\hat{a}_2$ 소단위체 BID와 상호작용할 수 있는 것과 같은 전체 폴리펩타이드의 하나 이상의 특성을 갖는 본 발명의 펩타이드를 합리적인 수로 암호화할 것이라는 사실도 당업계에서 인지될 것이다. 이는 숙련된 기술자가 단백질 기능에 현저하게 영향을 미칠 가능성이 적거나 가능성이 없는 아미노산 치환(예: 하나의 지방족 아미노산을 두 번째 지방족 아미노산으로 대체)을 충분히 알고 있기 때문이다.

[0114] 벡터 및 숙주 세포

[0115] 본 발명의 펩타이드의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자는 표준 연결 기술을 사용하여 적절한 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 상기 벡터는 일반적으로 사용되는 특정 숙주 세포에서 기능하도록 선택된다 (즉, 상기 벡터는 핵산 분자의 증폭 및/또는 핵산 분자의 발현이 발생할 수 있도록 숙주 세포 기구와 양립가능하다). 본 발명의 펩타이드의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자는 원핵생물, 효모, 곤충 (배칼로바이러스 시스템) 및/또는 진핵생물 숙주 세포에서 증폭/발현될 수 있다. 숙주 세포의 선택은 펩타이드가 번역-후 변형 (예: 글리코실화 및/또는 인산화)되는지 여부에 부분적으로 의존할 것이다. 그렇다면 효모, 곤충 또는 포유류 숙주 세포가 바람직하다.

- [0116] 일적으로, 임의의 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 플라스미드 유지 및 외인성 뉴클레오타이드 서열의 복제 및 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 특정 구현예에서 집합적으로 "플랭킹 서열 (flanking sequence)"로 지칭되는 이러한 서열은 일반적으로 다음의 뉴클레오타이드 서열 중 하나 이상을 포함할 것이다: 프로모터, 하나 이상의 인핸서 서열, 복제 원점, 전사 종결 서열, 도너 및 억셉터 스플라이스 부위를 함유하는 완전한 인트론 서열, 펩타이드 분비를 위한 리더 서열을 암호화하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현될 펩타이드를 암호화하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 영역, 및 선별가능한 마커 요소.
- [0117] 본 발명을 실시하기 위한 바람직한 벡터는 박테리아, 곤충 및 포유동물 숙주 세포와 양립가능한 것들이다. 이러한 벡터에는 특히 pCRII, pCR3, 및 pcDNA3.1 (Invitrogen Company, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Publication No. WO 90/14363) 및 pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY)가 포함된다.
- [0118] 추가의 적합한 벡터에는 코스미드, 플라스미드 또는 변형된 바이러스가 포함되나 이에 제한되지 않지만, 벡터 시스템은 선택된 숙주 세포와 양립가능해야 한다는 것이 이해될 것이다. 이러한 벡터에는 플라스미드, 예컨대 Bluescript[®] 플라스미드 유도체 (고 카피수 ColE1-기반 파지미드, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), Taq-Taq-증폭 PCR 생성물을 복제하기 위해 설계된 PCR 복제 플라스미드 (예: TOPO[™] TA Cloning[®] Kit, PCR2.1[®] 플라스미드 유도체, Invitrogen, Carlsbad, CA), 및 포유동물, 효모 또는 배콜로바이러스 발현 시스템 (pBacPAK 플라스미드 유도체, Clontech, Palo Alto, CA)과 같은 바이러스 벡터가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0119] 벡터가 구축되고 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 분자가 벡터의 적절한 부위에 삽입된 후, 완성된 벡터는 증폭 및/또는 융합 단백질 발현을 위해 적합한 숙주 세포에 삽입될 수 있다. 본 발명의 펩타이드에 대한 발현 벡터의 선택된 숙주 세포로의 형질전환은 형질감염, 감염, 염화칼슘, 전기천공법, 미세주사법, 리포펙션 또는 DEAE-텍스트란 방법 또는 다른 공지된 기술을 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로 사용될 숙주 세포 유형에 따라 달라질 것이다. 이들 방법 및 다른 적합한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 Sambrook *et al.*, supra에 설명되어 있다.
- [0120] 숙주 세포는 원핵 숙주 세포(예: 대장균) 또는 진핵 숙주 세포(예: 효모 세포, 곤충 세포 또는 척추동물 세포)일 수 있다. 상기 숙주 세포는 적절한 조건에서 배양될 때, 배양 배지(숙주 세포가 배지로 분비하는 경우) 또는 이를 생산하는 숙주 세포(분비되지 않는 경우)에서 직접 수집할 수 있는 펩타이드를 합성한다. 적절한 숙주 세포의 선택은 원하는 발현 수준, 활성에 바람직하거나 필요한 펩타이드 변형, 이러한 활성(예: 글리코실화 또는 인산화) 및 생물학적 활성 분자로의 접합의 용이성과 같은 다양한 요인에 따라 달라질 것이다.
- [0121] 다수의 적합한 숙주 세포가 당업계에 공지되어 있고, 다수는 American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209로부터 입수 가능하다. 예시로서 포유동물 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소 세포 (CHO) (ATCC No. CCL61); CHO DHFR-세포 (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4216-4220 (1980)); 인간 배아 신장 (HEK) 293 또는 293T 세포 (ATCC No. CRL1573); 또는 3T3 세포 (ATCC No. CCL92)가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 포유동물 숙주 세포의 선택 및 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝 및 스크리닝, 생성물 생산 및 정제 방법은 당업계에 공지되어 있다. 다른 적합한 포유동물 세포주는 원숭이 COS-1 (ATCC No. CRL1650) 및 COS-7세포주 (ATCC No. CRL1651) 세포주, 및 CV-1 세포주 (ATCC No. CCL70)이다. 추가의 예시적인 포유동물 숙주 세포는 형질전환된 세포주를 포함하는 영장류 세포주 및 설치류 세포주를 포함한다. 정상 이배체 세포, 1차 조직의 시험관내 배양으로부터 유래된 세포집단 (cell strains) 및 1차 외식체도 또한 적합하다. 후보 세포는 유전형적으로 선택 유전자가 부족하거나 우세하게 작용하는 선택 유전자를 포함할 수 있다. 다른 적합한 포유동물 세포주는 마우스 신경모세포종 N2A 세포, HeLa, 마우스 L-L-929 세포, 스위스 유래 3T3라인, Balb-c 또는 NIH 마우스, BHK 또는 HaK 햄스터 세포주를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니며, 이들은 ATCC에서 이용 가능하다. 이들 각각의 세포주는 단백질 발현 분야의 당업자에게 공지되어 있고 이용 가능하다.
- [0122] 유사하게, 본 발명에 적합한 숙주 세포로서 유용한 것은 박테리아 세포이다. 예를 들어, 대장균의 다양한 균주 (예: HB101, (ATCC No. 33694) DH5 α , DH10 및 MC1061 (ATCC No. 53338))는 생명공학 분야에서 숙주 세포로 잘 알려져 있다. *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, 기타 *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, 등의 다양한 균주도 이 방법에 사용될 수 있다.

- [0123] 당업자에게 공지된 많은 효모 세포 균주가 또한 본 발명의 펩타이드 발현을 위한 숙주 세포로서 이용 가능하다. 바람직한 효모 세포는 예를 들어 *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Pichia pastoris*를 포함한다.
- [0124] 추가적으로, 필요한 경우, 곤충 세포 시스템이 본 발명의 방법에 이용될 수 있다. 이러한 시스템은 예를 들어 Kitts *et al.*, *Biotechniques*, 14:810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4:564-572 (1993); and Lucklow *et al.* (*J.al.*, *J. Virol.*, 67:4566-4579 (1993))에 설명되어 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf-9 및 Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA)이다.
- [0125] 본 발명의 글리코실화된 펩타이드를 발현시키기 위해 트랜스제닉(transgenic) 동물을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 트랜스제닉 우유-생산 동물 (예를 들어, 소 또는 염소)을 사용하고 동물 우유에서 본 글리코실화 펩타이드를 얻을 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 생산하기 위해 식물을 사용할 수도 있다. 그러나, 일반적으로 식물에서 발생하는 글리코실화는 포유동물 세포에서 생성된 것과 다르며, 인간 치료 용도로 적합하지 않은 글리코실화된 생성물을 초래할 수 있다.
- [0126] 치료 조성물
- [0127] 치료 조성물은 본 발명의 범위 내에 있다. 본 발명의 펩타이드는 본 발명의 조성물을 생산하기 위해 다양한 성분과 조합될 수 있다. 이러한 조성물은 투여 방식에 적합하도록 선택된 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 제형 제제와 혼합된 치료적 유효량의 본 발명의 펩타이드 또는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 약학적 조성물은 또한 투여 방식에 적합하도록 선택된 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 제형 제제와 혼합된 본 발명의 하나 이상의 펩타이드의 치료적 유효량을 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 조성물은 약학적 조성물 (인간 또는 동물용일 수 있음)을 생성하기 위해 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제와 조합된다. 적합한 담체 및 희석제는 예를 들어 인산염-완충 식염수와 같은 등장 식염수 용액을 포함한다. 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 용매, 분산 매질, 코팅제, 향균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 성분과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 치료 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 성분이 또한 조성물에 혼합될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 통합된 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (1995, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) 참조.
- [0128] 약학적 조성물은 예를 들어 조성물의 pH, 삼투압농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 살균성, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 흡착 또는 침투를 변형, 유지 또는 보존하기 위한 제형 물질을 함유할 수 있다. 적합한 제형 물질은 아미노산(예: 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신); 향균제; 항산화제(예: 아스코르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨); 완충액(예: 붕산염, 중탄산염, Tris-HCl, 구연산염, 인산염 또는 기타 유기산); 증량제(예: 만니톨 또는 글리신); 킬레이트제(예: 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)); 착화제(예: 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-시클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린), 충전제; 단당류, 이당류; 및 기타 탄수화물(예: 글루코스, 만노스 또는 텍스트린); 단백질(예: 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제, 향료 및 희석제; 유화제; 친수성 폴리머(예: 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩타이드; 염-형성 반대 이온(예: 나트륨); 방부제(예: 벤잘코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소); 용매(예: 글리세린, 프로필렌글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당 알코올(예: 만니톨 또는 소르비톨); 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제(예: 플루로닉, PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트, 에센셜 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 티록사폴); 안정성 향상제(수크로스 또는 소르비톨); 장성 강화제(예: 알칼리 금속 할로겐화물, 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨), 전달 비히클, 희석제, 부형제 및/또는 약학적 보조제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0129] 최적의 약학적 조성물은 예를 들어 의도된 투여 경로, 전달 형식 및 원하는 투여량에 따라 당업자에 의해 결정될 것이다. 이러한 조성물은 본 발명의 펩타이드의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 제거 속도에 영향을 미칠 수 있다. 약학적 조성물의 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료적 적용에 따라 달라진다. 본 발명에 따라 제조된 약학적 조성물은 본 발명의 펩타이드가 심장 비대증 또는 산화 스트레스를 포함하는 본원에 기술된 질병 또는 장애의 원인 물질과 접촉하게 하는 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다.
- [0130] 약학적 조성물에서 주요한 비히클 또는 담체는 본질적으로 수성 또는 비수성일 수 있다. 예를 들어, 적합한 비히클 또는 담체는 비경구 투여용 조성물에서 통상적인 다른 물질로 보충된 주사용수, 생리 식염수, 용액 또는 인공 뇌척수액일 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수가 추가의 예시적인 비히클이다. 다른 예시적인 약학적 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 Tris 완충액, 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세테이트 완충액을 포함

하며, 이는 소르비톨 또는 그에 대한 적절한 대체물을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 약학적 조성물은 저장을 위해 원하는 정도의 순도를 갖는 선택된 조성물을 동결 건조된 케이크 또는 수용액 형태의 선택적 제형 제제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 또한, 펩타이드 생성물은 수크로스와 같은 적절한 부형제를 사용하여 동결건조물로 제형화될 수 있다.

[0131] 약학적 조성물은 비경구 전달이 가능할 수 있다. 대안적으로, 상기 조성물은 경구와 같은 소화관을 통해 전달될 수 있다. 이러한 약학적으로 허용 가능한 조성물의 제조는 당업계의 기술 범위 내에 있다.

[0132] 상기 제형 성분은 투여 부위에 허용되는 농도로 존재한다. 예를 들어, 완충제는 조성물을 생리학적 pH 또는 약간 더 낮은 pH, 일반적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에서 유지하기 위해 사용된다.

[0133] 비경구 투여가 고려되는 경우, 본 발명에서 사용하기 위한 치료 조성물은 발열원이 없고, 약학적으로 허용되는 비히클에 본 발명의 원하는 펩타이드를 포함하는 비경구적으로 허용 가능한 수용액의 형태일 수 있다. 비경구 주사에 특히 적합한 비히클은 활성제가 적절하게 보존된 멸균 등장액으로 제형화된 멸균 증류수이다. 또 다른 제제는 주입 가능한 마이크로스피어, 생분해성(bio-erodible) 입자, 고분자 화합물(예: 폴리락트산, 산 또는 폴리글리콜산) 또는 비드 또는 리포솜과 같은 제제를 사용하여 원하는 분자의 제형화를 포함할 수 있으며, 이는 데포 주사로 전달될 수 있는 제품의 제어 또는 지속 방출을 제공한다. 히알루론산도 사용될 수 있으며, 이는 순환에서 지속 시간을 촉진하는 효과가 있을 수 있다. 원하는 분자의 도입을 위한 다른 적절한 수단은 이식가능한 약물 전달 장치를 포함한다.

[0134] 특정 제형이 경구 투여될 수 있다는 것도 고려된다. 본 발명의 한 구현예에서, 이러한 방식으로 투여되는 본 발명의 펩타이드는 정제 및 캡슐과 같은 고체 투여 형태의 배합에 통상적으로 사용되는 담체와 함께 또는 담체 없이 제형화될 수 있다. 예를 들어, 캡슐은 생체이용률이 최대화되고 사전-분해가 최소화되는 위장관 지점에서 제제의 활성 부분을 방출하도록 설계될 수 있다. 활성제의 흡수를 촉진하기 위해 추가 제제가 포함될 수 있다. 희석제, 향료, 저융점 왁스, 식물성 오일, 윤활제, 현탁제, 정제 분해제 및 결합제 또한 사용될 수 있다.

[0135] 또 다른 약학적 조성물은 정제의 제조에 적합한 비-독성 부형제와 혼합된 유효량의 본 발명의 펩타이드를 포함할 수 있다. 정제를 멸균수 또는 다른 적절한 비히클에 용해시켜, 용액을 단위 용량 형태로 제조할 수 있다. 적합한 부형제는 불활성 희석제, 예를 들어 탄산칼슘, 탄산나트륨 또는 중탄산염, 락토스 또는 인산칼슘; 또는 결합제, 예를 들어 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 또는 윤활제, 예를 들어 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 또는 탈크를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0136] 지속- 또는 제어-전달 제형에서 본 발명의 펩타이드를 포함하는 제형을 포함하는 추가적인 약학적 조성물은 당업자에게 명백할 것이다. 리포솜 담체, 생분해성 미립자 또는 다공성 비드 및 데포 주입과 같은 다양한 기타 지속- 또는 제어-전달 수단을 제형화하는 기술도 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 약학적 조성물의 전달을 위한 다공성 중합체 미립자의 제어 방출을 기술하는 PCT 출원 번호 PCT/US93/00829 참조. 지속-지속-방출 제제의 추가 예시는 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 성형 물품 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함한다. 지속 방출 매트릭스는 폴리에스테르, 하이드로겔, 폴리락티드, L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루탐산의 공중합체, 에틸렌 비닐 아세테이트 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산을 포함할 수 있다. 지속-방출 조성물은 또한 당업계에 공지된 임의의 여러 방법에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 포함할 수 있다.

[0137] 생체내 투여를 위해 사용되는 약학적 조성물은 일반적으로 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조되는 경우, 이들 방법을 사용하는 멸균은 동결건조 및 재구성 전 또는 후에 수행될 수 있다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조된 형태 또는 용액 상태로 보관될 수 있다. 또한, 비경구 조성물은 일반적으로 멸균 액세스 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 팩 또는 바이알에 배치된다.

[0138] 약학적 조성물이 제형화되면, 용액, 현탁액, 겔, 에멀전, 고체 또는 탈수 또는 동결건조 분말로서 멸균 바이알에 보관할 수 있다. 이러한 제형은 즉시 사용 가능한 형태 또는 투여 전에 재구성을 필요로 하는 형태(예: 동결건조된 형태)로 저장될 수 있다.

[0139] 예를 들어, 치료적으로 사용되는 약학적 조성물에서 활성제의 유효량은 치료적 맥락 및 목적에 따라 달라질 것이다. 따라서, 당업자는 치료를 위한 적절한 투여량 수준이 전달되는 분자, 활성제가 사용되는 적응증, 투여 경로 및 환자의 크기(체중, 신체 표면 또는 장기 크기) 및 상태(연령 및 일반 건강)에 따라 부분적으로 달라질 것임을 이해할 것이다. 따라서 임상적은 최적의 치료 효과를 얻기 위해 용량을 적정하고 투여 경로를 변경할 수 있다. 일반적인 복용량은 상기 언급한 요인에 따라 약 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 에서 최대 약 100 mg/kg 또는 그 이상의 범위

일 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 투여량은 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 에서 약 100 mg/kg 의 범위일 수 있고; 또는 1 $\mu\text{g/kg}$ 에서 약 100 mg/kg ; 또는 5 $\mu\text{g/kg}$ 에서 약 100 mg/kg 의 범위일 수 있다.

[0140] 투여 빈도는 활성제의 약동학적 매개변수 및 사용된 제형에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 임상적으론 원하는 효과를 달성하는 용량에 도달할 때까지 조성물을 투여할 것이다. 따라서 상기 조성물은 단일 용량으로, 또는 2회 이상의 용량(동일한 양의 원하는 분자를 함유하거나 함유하지 않을 수 있음)으로 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가 정제는 당업자에 의해 통상적으로 이루어지며, 통상적으로 수행되는 업무 범위 내에 있다. 적절한 용량-반응 데이터를 사용하여 적절한 용량을 확인할 수 있다.

[0141] 상기 펩타이드 또는 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물은 다양한 치료 요법으로 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 펩타이드 또는 약학적 조성물은 매시간, 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일마다 1회, 3일마다 1회, 매주 1회, 2주마다 1회, 매월 1회, 2개월마다 1회, 6개월마다, 및 1년에 1회 투여될 수 있다. 적절한 요법은 치료할 상태의 특성에 기초하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 상기 펩타이드 또는 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물은 주 3회 투여될 수 있다.

[0142] 약학적 조성물의 투여 경로는 공지된 방법 (예: 경구, 정맥내, 관상동맥내, 복강내, 뇌내(실질내), 뇌실내, 근육내, 안구내, 동맥내, 문맥내 또는 병변내 경로에 의한 주사; 지속 방출 시스템 또는 이식)에 따른다. 원하는 경우, 상기 조성물은 단회 주사에 의해 또는 연속적 주입에 의해, 또는 이식 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0143] 대안적으로 또는 추가로, 상기 조성물은 원하는 분자가 흡수되거나 캡슐화된 멤브레인, 스폰지 또는 다른 적절한 물질의 이식을 통해 국소적으로 투여될 수 있다. 이식 장치가 사용되는 경우, 상기 장치는 임의의 적합한 조직 또는 기관에 이식될 수 있으며, 원하는 분자의 전달은 확산, 시한-방출 단회, 또는 연속 투여를 통해 이루어질 수 있다.

[0144] 일부 경우에, 생체 외 방식으로 본원의 약학적 조성물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 환자로부터 제거된 세포, 조직 또는 기관은 약학적 조성물에 노출된 후 세포, 조직 및/또는 기관이 이어서 환자에게 다시 이식된다.

[0145] 다른 형태에서, 나노입자는 본 발명의 펩타이드 전달을 위한 담체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 나노입자는 구형 고분자 나노입자일 수 있다. 나노입자는 무엇보다도 비특이적 생체 분포 및 표적화, 및 수용성 부족과 같은 기존 치료 전달의 일부 한계를 극복하는 것으로 나타났다. 따라서, 나노입자는 본 발명의 펩타이드를 심장세포로 전달하여 펩타이드로 환자를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0146] 한 측면에서, 본 발명의 펩타이드는 덴드론화 중합체의 사용을 통해 전달된다. 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드는 선형 덴드론화 중합체(denpolys)의 사용을 통해 전달된다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드는 선형 덴드론화 중합체와 착화되어 중합체-펩타이드 나노입자를 형성한다. 상기 폴리머-펩타이드 나노입자는 세포 내로 전달될 수 있다.

[0147] 숙련된 의료인이 임의의 특정 환자에 대한 최적의 투여 경로 및 투여량을 쉽게 결정할 수 있기 때문에 본원에 기술된 투여 경로는 단지 지침으로만 의도된다.

[0148] 본 발명의 펩타이드에 대한 용도 및 방법

[0149] 본 발명은 L-형 Ca^{2+} 채널 알파-상호작용 도메인에 대한 결합을 조절하기 위한 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체;를 포함하는 펩타이드의 용도를 제공한다. 이것은 바람직하게는 심장 세포에서 세포 내적으로 발생한다.

[0150] 본 발명은 대상체의 심장 내 근세포와 같은 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 움직임을 조절하기 위한 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체;를 포함하는 펩타이드의 용도를 제공한다.

[0151] 이와 관련하여, 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3, 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 내 근세포와 같은 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널 β_2 서브유닛의 움직임을 조절하는 방법을 제공한다.

- [0152] 알파-상호작용 도메인에 대한 펩타이드의 결합은 L-형 Ca^{2+} 채널의 활성화 및 불활성화 동안 β_2 서브유닛의 움직임을 방지할 수 있다. β_2 서브유닛은 알파 서브유닛의 불활성화를 용이하게 하기 위해 제안되기 때문에, 이는 전류의 불활성화를 지연시킬 수 있다.
- [0153] 본 발명의 펩타이드로 치료될 수 있는 대상체는 인간뿐만 아니라 다른 포유동물 및 동물을 포함할 것이다.
- [0154] 일 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장 내 근세포와 같은 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하기 위한 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체;를 포함하는 펩타이드의 용도를 제공한다.
- [0155] 이와 관련하여, 본 발명은 또한 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장 내 근세포와 같은 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0156] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 예방하거나 감소시키기 위한 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체;를 포함하는 펩타이드의 용도를 제공한다.
- [0157] 이와 관련하여, 본 발명은 또한 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 예방하거나 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0158] 심근 손상에는 심장 비대증이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 심장 비대증이 감소되거나 예방되지만 세포내 Ca^{2+} 수준은 대상체의 심장에서 감소되거나 실질적으로 유지된다. 실질적으로 유지된다는 것은 심장 비대 전과 같이 대상체에서 정상적으로 관찰되는 것과 동일하거나 근접한 Ca^{2+} 수준을 나타낸다.
- [0159] L-형 Ca^{2+} 채널에 대한 본 발명의 펩타이드의 결합은 미토콘드리아 산소 소비 또는 대사를 감소시킨다. 펩타이드가 기공-형성 $\alpha 1C$ 서브유닛이 아닌 β_2 서브유닛을 고정화하기 때문에, 이는 칼슘 유입을 실질적으로 변경하지 않고 발생할 수 있다. 이것은 칼슘 유입을 변경하지 않는 농도($1\mu\text{M}$)에서 발생할 수 있기 때문에, 칼슘 유입을 감소시키는 임의의 제제가 수축성을 감소시킬 수 있으므로 심장 비대증을 치료하거나 예방하는 데 사용하기에 바람직한 제제일 수 있다.
- [0160] 따라서, 본 발명은 L-형 Ca^{2+} 채널 활성을 조절함으로써 대상체의 심근 세포에서 손상 및/또는 산화 스트레스를 예방하거나 감소시키는 치료법으로서 본 발명의 펩타이드에 대한 용도 및 방법을 제공한다.
- [0161] 본 발명의 펩타이드는 심장 비대증이 발병했거나 발병할 위험이 있는 환자에서 심장 비대증을 치료하거나 예방하기 위해 투여될 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 또한 재관류 요법 동안 및 이후에 대상체에서 심근 경색 후 허혈성 심근 세포에 대한 손상 및/또는 산화 스트레스를 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 상기 펩타이드는 재관류 전, 후 또는 동안 투여될 수 있다.
- [0162] 이와 관련하여, 본 발명은 또한 환자의 심근 손상을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 약제의 제조에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열; 또는 서열번호 2, 및 서열번호 3의 아미노산 서열;을 포함하는 펩타이드의 용도를 제공한다.
- [0163] 본 발명은 또한 환자의 심근 손상, 및/또는 심근 세포의 산화 스트레스를 치료, 예방 또는 개선하기 위한 약제의 제조에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2, 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체;를 포함하는 펩타이드의 용도를 제공한다.
- [0164] 대상체에서 심장 비대 또는 HCM을 치료하는 데 유용한 다른 치료제, 또는 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 감소시키는 것을 보조하는 다른 제제와 함께 병용하여 본 발명의 펩타이드를 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 병용은 펩타이드를 포함하는 컨쥬게이트를 사용할 수 있고 또는 요법이 제제의 순차적 투여를 수반하거나 포함할 수 있다. 이러한 치료제의 예는 일부 비제한적 예로서 N-아세틸시스테인, 환원된 글루타티온, TAT-접합 카탈라아제 또는 TAT-접합 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제와 같은 항산화제를 포함할 수 있다.
- [0165] 상기 펩타이드는 다양한 방법을 통해, 예를 들어 특정 상황에 따라 그리고 의사에 의해 적절하다고 간주되는 치

료제로서 투여될 수 있다.

- [0166] 일 비제한적 예에서, 본 발명의 펩타이드는 흉통 및 관상 동맥 폐색(심근 경색) 진단으로 입원 후 병원에서 혈관 조영술 또는 혈관 성형술 시 심장 전문의/의사에 의해 관상 동맥을 통해 투여될 수 있다.
- [0167] 또 다른 비제한적인 예에서, 본 발명의 펩타이드는 심근병증의 발병 전에 HCM 환자들에게 투여될 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 심근병증이 발병할 위험이 있는 환자에게 복강 내 주입 또는 관상 동맥을 통해 투여될 수 있다. 심근병증 발병의 예방은 심실 내 중격막 두께 또는 후벽 두께의 감소와 심장 초음파 검사에서 좌심실 확장 기말(end-diastolic) 치수의 증가로 측정될 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 체내에서 본 발명의 펩타이드의 반감기가 Cav1.2 채널 단백질의 전환율과 일치하는 약 3 내지 4일이 될 가능성이 있다는 것을 근거로, 주 3회 정도 투여될 수 있다 (Catalucci et al., *The Journal of Cell Biology* 184, 923-933 (2009)에 기재된 바와 같음).
- [0168] 투여된 치료 조성물의 효과는 표준 진단 절차에 의해 모니터링될 수 있다.
- [0169] 예를 들어, 펩타이드의 유효성은 한 실시예에서 심장 초음파(심장 기능의 초음파 분석)에 의해 모니터링될 수 있다. 손상의 크기는 근육 효소의 혈액으로의 방출과 심전도(ECG)의 변화로 평가할 수 있다.
- [0170] 치료 방법
- [0171] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 내 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 움직임을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0172] 본 발명은 또한 서열번호 2의 아미노산 서열; 또는 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 내 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 결합을 조절하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 펩타이드는 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛과 L-형 Ca^{2+} 채널의 알파 서브유닛 간의 상호 작용을 방지한다.
- [0173] 본 발명은 또한 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2, 및 서열번호 3의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장 내 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0174] 본 발명은 또한 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2, 및 서열번호 3의 아미노산, 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0175] 본 발명의 방법은 심장 비대를 감소시킬 수 있지만 대상체의 심장에서 세포 내 Ca^{2+} 수준을 실질적으로 유지할 수 있다.
- [0176] HCM을 앓고 있는 환자는 심근병증이 발병하기 전에도 Ψ_m 및 미토콘드리아 대사 활동이 증가하고, L-형 Ca^{2+} 채널 불활성화 속도가 더 빠르다. 따라서, L-형 Ca^{2+} 채널 불활성화 속도를 증가시키고 미토콘드리아 대사 활성을 감소시킬 수 있는 본 발명의 펩타이드의 투여는 HCM 환자에서 심장 비대증의 발병을 예방하는데 사용될 수 있다.
- [0177] 바람직하게는, 상기 치료 방법 또는 용도는 칼슘 채널 길항제로 치료할 때 발생할 수 있는 혈관 확장 효과 또는 음성 근수축(negative inotropic) 효과를 유발하지 않는다.
- [0178] 일 측면에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2, 및 서열번호 3의 아미노산, 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장에서 심장 비대증을 예방하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 대상체는 HCM을 앓고 있다.
- [0179] 추가 측면에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체; 또는 서열번호 2, 및 서열번호 3의 아미노산, 또는 이의 변이체를 포함하는 펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 심근 섬유화의 진행을 늦추는 방법 또는 용도를 제공한다.
- [0180] 추가 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 심장 세포에서

L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛의 결합을 조절하기 위한 방법 또는 용도를 제공하며, 여기서 상기 방법은 QQLEEDLKGyLDWITQAE (서열번호1)를 투여하는 방법과 비교하여 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널의 베타 서브유닛 결합을 조절하는 데 효과적이다.

[0181] 추가 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하기 위한 방법 또는 용도를 제공하며, 여기서 상기 방법은 QQLEEDLKGyLDWITQAE (서열번호1)를 투여하는 방법과 비교하여 대상체의 심장 세포에서 L-형 Ca^{2+} 채널을 조절하는 데 효과적이다.

[0182] 추가 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 펩타이드를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 감소시키는 방법 또는 용도를 제공하며, 여기서 상기 방법은 QQLEEDLKGyLDWITQAE (서열번호1)를 투여하는 방법과 비교하여 대상체의 심장에서 심근 손상 및/또는 산화 스트레스를 감소시키는 데 효과적이다.

[0183] 본원에서 사용되는 용어 "대상체"는 일반적으로 인간; 농장 동물 (예: 양, 염소, 돼지, 소, 말, 라마); 반려동물 (예: 개, 고양이); 영장류; 새 (예: 닭, 거위 및 오리); 물고기; 및 파충류와 같은 포유동물을 포함한다. 상기 대상체는 바람직하게는 인간이다.

[0184] 상기 기재된 상태의 치료를 위한 본 발명의 조성물의 유효 투여량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 동물인지 여부 및 기타 투여되는 약물을 포함하는 많은 상이한 요인에 따라 달라진다. 안전성과 효능을 최적화하기 위해 치료 용량을 적정할 필요가 있다.

[0185] 다음 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석되어야 하며 어떠한 방식으로든 개시 내용의 나머지 부분을 제한하지 않는다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로만 포함된다. 이들은 상기 제시된 발명의 광범위한 요약, 개시 또는 설명에 대한 제한으로 이해되어서는 안 된다. 더 이상의 설명 없이, 당업자는 전술한 설명을 사용하여 본 발명을 최대한으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 전술한 예시와 이하의 예시에서, 모든 온도는 보정되지 않은 섭씨 온도로 표시되며; 달리 명시되지 않는 한, 모든 부분과 백분율은 중량 기준이다.

[0186] 실시예

[0187] 실시예 1 - AID-펩타이드의 합성

[0188] 심장 $\alpha 1\text{C}$ 서브유닛의 세포질 I-II 링커 내 $\alpha 1\text{C}-\beta 2\text{a}$ 상호작용 도메인 (AID)에 해당하는 펩타이드는 아미노산 서열 QQLEEDLKGyLDWITQAE (서열번호1)를 사용하여 합성되었다. 스크램블된(비활성) 조절 펩타이드(AID[S])도 서열 QKILGEWDLAQYTDQELE (서열번호 10)로 합성되었다. 필요한 경우, 세포-침투 TAT 서열을 6-아미노 헥산산(6-Ahx) (RKKRRQRRR) (서열번호 3)을 통해 AID 또는 AID(S)에 연결하여 AID-TAT 및 AID(S)-TAT 펩타이드를 생성하였다.

[0189] 변이체 AID-펩타이드도 표 4에 열거된 바와 같이 합성되었다. 원래 AID-TAT 서열에 기초하여, 변이체 서열은 본래 서열의 아미노 말단 및/또는 카복실 말단을 절단하거나 아미노산에서 점 돌연변이를 유도함으로써 생성되었다.

표 4

[0190] 변이체 AID-펩타이드.

펩타이드	아미노산 서열	서열번호
변이체 P1	DLKGyLDWITQAE	서열번호 11
변이체 P4	LEEDLKGyLDWITQAE	서열번호 12
변이체 P6	KGyLDWITQAE	서열번호 13
변이체 P7	QQEEDLKGyLDWITQAE	서열번호 4
변이체 P10	DLKGyLDWITQA	서열번호 14
변이체 P11	DLKGyLDWITQ	서열번호 15
변이체 P12	DLKGyLDWIT	서열번호 16
변이체 P13	QQLEEDLKGFLDAATQAE	서열번호 17
변이체 P14	QQEEDLKGyLDWITQAE	서열번호 5
변이체 P15	QQEEDLKGyLDWITQAE	서열번호 6
변이체 P16	QQREEDLKGyLDWITQAE	서열번호 7

[0191] 실시예 2 - 결합 분석 - NHS 자성 비드

[0192] β_2 서브유닛에 대한 각각의 변이체 펩타이드의 친화도는 결합 경쟁 분석을 통해 조사되었다.

[0193] PureProteome™ NHS FlexiBind Magnetic Bead (Cat. #LSKMAGN04, Merck)는 제조업체의 권장 사항에 따라 사용되었다. NHS flexibind 자성 비드에 아미노핵산산 연결 AID 펩타이드를 2mg/mL 이상의 농도로 결합시켜 펩타이드로 비드를 포화시켰다. 비드는 결합을 준비하기 위해 먼저 평형 완충액 (1mM HCL)으로 프라이밍 되었다. 상기 Ahx-AID 펩타이드를 세척/커플링 버퍼 (PBS, pH 7.4)에 용해시키고 비드에 첨가하였다. 비드-AID 펩타이드 혼합물을 실온에서 2시간 동안 300rpm의 속도로 멀티플레이트 셰이커에서 균일하게 혼합되도록 방지하였다. 비-특이적 결합을 줄이기 위해 비드를 실온에서 1시간 동안 Quench 완충액 (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 8.0)에서 인큐베이션 하였다. 세척 후 심장 용해물을 증가하는 농도의 변이체 펩타이드에 첨가하여 표 5에 나타난 농도에서 AID 결합 비드와의 경쟁적 결합을 허용하였다.

[0194] [표 5]

[0195] 다양한 농도의 전체 심장 용해물에서 β_2 서브유닛에 AID/변이체 펩타이드를 사전-결합하기 위한 샘플 준비.

최종 펩타이드 농도	스톡(Stock) 펩타이드 농도 (μ M)	200 μ L 에 필요한 스톡 펩타이드의 부피 (μ L)	200 μ L 에 필요한 β_2 용해물 샘플의 부피 (μ L)	200 μ L 에 필요한 세척/커플링 버퍼의 부피 (μ L)
1nM	1	2	100	98
30 nM	1	6	100	94
100 nM	1	20	100	80
1 μ M	10	20	100	80
10 μ M	100	20	100	80

[0196]

[0197] AID-펩타이드 결합 비드는 표 5에서 제조된 5개의 샘플에 대해 5개의 분취량(aliquot)으로 분할되었다. 전체 심장 용해물은 각각의 펩타이드-결합 비드에 첨가되어 실온에서 2시간 동안 경쟁적 결합을 허용하였다.

[0198] 완료되면 컨쥬게이트를 결합 완충액으로 세척하여, 결합되지 않은 분획을 제거하였다. SDS 샘플 완충액을 비드에 첨가한 다음, 튜브를 95℃에서 5분 동안 가열하였다. 용출된 샘플을 -20℃에 보관하고 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 각 변이체의 결합 친화력을 확인하였다.

[0199] 실시예 3 - 결합 분석 - 스트렙타비딘 비드

[0200] 스트렙타비딘 다이아비드 및 비오틴화 펩타이드의 사용은 결합 친화성 분석을 개선하기 위해 개발되었다. 펩타이드는 초기에 EZ-link amine-PEG11-biotin (Spacer arm: 53.2 Å, Thermofisher Scientific, Cat. #26136)을 사용하여 비오틴화 되었으며, 이는 0.1M MES 버퍼 (((2-N-morpholino)- ethanesulfonic acid)에 용해되었다. 반응 직전에, 0.1M EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)를 MES 완충액에 용해하였다. AID 펩타이드의 완전한 비오틴화를 달성하기 위해서는, 펩타이드에 대한 50배 몰 과량의 비오틴이 필요했으며, 필요한 각 성분의 총 부피는 표 6과 같았다.

[0201] [표 6]

[0202] 하나의 완전한 분석에 충분한 AID 펩타이드의 비오틴화를 달성하는 데 필요한 각 구성 요소의 부피.

	양/반응 (nM)	스톡 농도 (conc) (mM)	부피/반응 (μl)	변이체 AID의 각 버전에 대한 용량- 반응 곡선 (농도 범위: 0 nM -100 μM = 6 반응)
AID	0.02	0.1	0.2	1.2 μl
MES		100	9.8	58.8 μl
amine-PEG ₁₁ -biotin	1	1	1	6 μl
EDC	0.2	0.1	2	12 μl
Total			13	78 μl

[0203]

[0204] 표 4에 표시된 비오틴화 펩타이드의 각 78 μL 샘플은 6회의 반응에 충분했으며, 표 7에 따라 다양한 농도의 변이체 AID 펩타이드로 심장 용해물을 다시 제조한 농도 범위를 포괄하였다.

[0205] [표 7]

[0206] 다양한 농도에서 전체 심장 용해물의 β₂ 서브유닛에 AID/변이체 펩타이드를 사전-결합하기 위한 샘플 준비.

최종 펩타이드 농도	스톡 펩타이드 농도 (μM)	스톡 펩타이드 부피 (μl)	심장 용해물 부피 (μl)	PBS (μl)	총합 (μl)
0	-	-	15.4	34.6	50
10 nM	0.1	5	15.4	29.6	50
100 nM	1	5	15.4	29.6	50
1 μM	10	5	15.4	29.6	50
10 μM	100	5	15.4	29.6	50
100μM	1000	5	15.4	29.6	50

[0207]

[0208] 78 μL 분취량의 비오틴화 AID-펩타이드를 스트렙타비딘 다이아비즈 (비오틴화 펩타이드 200 pmol당 다이아비즈 1mg)와 실온에서 30분간 혼합하였다. 심장 용해물 (100 g)을 실온에서 2시간 동안 변이체 펩타이드와 함께 인큐베이션 하였다. 비드에서 결합되지 않은 펩타이드를 모두 제거한 후, 실온에서 2시간 동안 사전-결합된 심장 용해물과 혼합하였다. 결합되지 않은 분획을 제거하였다. 켄주게이트를 95℃에서 5분간 가열한 후, 샘플 버퍼를 용출하고 -20℃에서 보관하여 SDS-PAGE 분석을 실시하였다.

[0209] 실시예 4 - SDS-PAGE를 이용한 결합 친화도 분석

[0210] 결합 친화도 분석 결과의 모든 샘플을 분석하기 위해 SDS-PAGE를 사용하였다. 10 웰 Mini-Protean TGX Stain-Free Gels (Biorad)에 각 샘플 25 μL를 로드하였다. β₂ 서브유닛 (68kDa)의 존재를 확인할 수 있도록 분자량 래더 (Precision Protein Western C)도 샘플과 함께 로드하였다. 젤은 30mA의 정전류로 35분 동안 PowerPac 3000으로 구동되는 Biorad 전기영동 탱크에서 실행되었다. 완료되면 젤을 니트로셀룰로오스 멤브레인 위에 놓고 3분 동안 TransBlot Turbo로 옮겼다. 멤브레인을 차단 완충액 (5% BSA)에 1시간 동안 둔 다음, 토끼 항-Cav β2 다클론 1차 항체 (Alomone Labs #ACC-105)와 함께 4℃에서 하룻밤 인큐베이션 하였다. 멤브레인을 TBST로 10분씩 세 번 세척한 후 5% BSA에 염소 항-토끼 IgG(H+L)-HRP 켄주게이트 2차 항체 (Abcam #ab97080, 사전 흡수됨)를 넣고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 단백질 밴드를 시각화하기 위해 ImageLab 소프트웨어를 사용하여 Luminata Crescendo, Western HRP Substrate (Merck Millipore) 및 ChemiDoc imager (Biorad)를 사용하였다. Cav β2에 해당하는 멤브레인의 밴드 강도를 정량화하기 위해 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 밀도 측정 분석을 수행하였다.

[0211] 각 변이체에 대해 평균 K_{0.5}를 계산하였다. 이 값은 도 2와 아래 표에 나와 있다. 변이체 P7, P14, P15, 및 P16은 원래 AID 펩타이드보다 표적 β₂ 서브유닛에 대해 더 큰 결합 친화력(더 낮은 K_{0.5})을 보였다.

[0212] 실시예 5 - 성인 마우스 심근 세포의 분리

[0213] 심장을 절제하기 전에 복강 내 주사를 통해 펜토바르비톤 나트륨(240 mg/kg)으로 성인 수컷 C57BL/6J 마우스를 마취하였다. 심실 근세포를 분리하였다. 마우스 심장을 대동맥을 통해 Langendorff 장치에 캐놀라로 삽입하고

120 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.8 KCl, 2.2 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄ 및 11 포도당 (pH = 7.35, 37℃에서 O₂/CO₂)이 포함된 Krebs-Henseleit Buffer(KHB)를 37℃에서 4분 동안 역행적으로 관류시켰다. 그런 다음 2.4 mg/ml 콜라게나아제 B가 보충된 KHB를 3분 동안 심장에 관류한 다음, 40 μM 칼슘이 있는 상태에서 8분 동안 관류하였다. 관류 후, 대동맥과 심방을 제거하고 심실을 부드럽게 떼어내고 분쇄하여 근세포를 현탁액으로 해리하였다. 근세포 현탁액을 3분간 500 RPM으로 원심분리하고, 상층액을 버린 후, 다음을 포함하는 무칼슘 HEPES-완충 용액(HBS)에 근세포를 재현탁 하였다: (mM 단위) 140 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl₂, 5.5 HEPES, 11 포도당 (37℃에서 pH = 7.4)에 3 mM EGTA의 존재 또는 부재 (0 mM 칼슘 JC-1 실험의 경우). 칼슘 함유(흡수) 실험을 위해, 칼슘을 다시 적정하여 최종 세포 외 농도가 2.0mM에 도달하도록 하였다.

[0214] 실시예 6 - 심장 근세포 기능의 시험관 내 평가

[0215] 모든 시험관 내 연구는 37℃에서 새로 분리한 근세포에서 수행되었다. 형광은 인버티드 Nikon TE2000-U 현미경에 부착된 Hamamatsu Orca ER 디지털 카메라를 사용하여 기록하였다. 0.5-1 μM AID(S)-TAT, AID-TAT, 펩타이드 6 또는 펩타이드 7로 20분 인큐베이션 한 후, 개별 근세포의 형광 신호를 Metamorph 6.3을 사용하여 정량화하여 수동으로 추적한 세포 영역의 신호 강도를 측정하였다. 세포가 포함되지 않은 동등한 영역은 배경에 사용되고 차감되었다.

[0216] 세포 내 칼슘 수준 평가

[0217] 형광 지표인 Fura-2 AM (Fura-2, 1 μM, ex 340/380 nm, em 510 nm, 분자 프로브)을 사용하여 심장 근세포에서 세포 내 칼슘을 모니터링 하였다. 비-괴사/비-사멸 농도의 H₂O₂ (30 μM)를 5분 동안 근세포에 처리한 후 10U/ml 카탈라아제를 처리하여 산화 스트레스를 유도하였다. 340/380nm 여기 및 510nm 방출에서의 형광을 30 μM H₂O₂ (5분) 및 10U/ml 카탈라아제(5분)에 노출 전후 50ms 노출로 1분 간격으로 측정하였다. 비율측정 340/380nm 신호를 정량화하고 기준선 전-처리 평균의 백분율로 보고하였다.

[0218] 결과는 도 3(a)에 나타내었다. 도 3(a)는 과산화수소 자극(H₂O₂)에 의해 유도된 세포 내 칼슘 증가에 대한 펩타이드의 효과를 보여준다. P7만이 H₂O₂에 따른 Fura 2의 증가를 변화시켰다. 돌연변이체 P7은 H₂O₂에 의해 유도된 세포 내 Ca²⁺ (Fura 2) 및 과산화물 생성 (DHE)의 증가를 감소시키는 데 AID-TAT보다 더 효과적이었으며 미토콘드리아 막 전위(JC-1)에도 AID-TAT와 유사한 영향을 미쳤다.

[0219] 세포 내 과산화물 수준 평가

[0220] 형광 지표 디하이드로에티움 (DHE, 5 μM, 515-560 nm ex filter, 590 long pass em, Merck)을 사용하여 심장 근세포에서 과산화물 생성을 평가하였다. 형광 이미지는 30 μM H₂O₂ (5분) 및 10U/ml 카탈라아제(5분)에 노출 전후에 200ms 노출로 1분 간격으로 촬영하였다. 형광은 1-10분(전-처리)에 걸쳐 20-40분(처리)에 측정된 신호 기울기의 백분율 변화로 보고되었다.

[0221] 결과는 도 3(b)에 나타내었다. 펩타이드 7은 펩타이드 6, AID-TAT 또는 AID(S)-TAT에 비해 통계적으로 유의한 방식으로 과산화물의 생성을 감소시켰다.

[0222] 미토콘드리아 막 전위의 시험관 내 평가

[0223] 5,5',6,6'-테트라클로로-1,1',3,3'-테트라에틸벤지미다졸릴카보시아닌 요오드화 형광 (JC-1: 200nm, ex 480nm, em 580/535nm, 분자 프로브)에서의 변화를 평가하여 심장 근세포에서 미토콘드리아 막 전위(Ψ_m)를 모니터링 했다. Ψ_m의 변화를 측정하기 전에 최소 3시간 동안 칼슘이 없는 HBS (0mM 칼슘, 3mM EGTA 보충)에서 근세포를 인큐베이션 하였다. 형광 이미지는 30 μM H₂O₂ (5분) 및 10U/ml 카탈라아제(5분)에 노출되기 전후 2분마다 촬영하였다 (노출 = 50ms). 비율측정 580/535nm 형광 신호를 정량화하고 기준선 전-처리 평균의 백분율로 보고하였다. 각 실험이 끝날 때 40mM NaCN을 첨가하여 Ψ_m을 붕괴시키고, JC-1 신호가 Ψ_m을 나타내는지 확인하였다.

[0224] 결과는 도 3(c)에 나타내었다. AID-TAT와 펩타이드 7만이 미토콘드리아 막 전위를 감소시켰다.

[0225] 미토콘드리아 플라보단백질 산화의 시험관 내 평가

[0226] 자가 형광을 사용하여 전술한 방법 (480nm ex, 535nm em)을 기반으로 심장 근세포의 플라보단백질 산화를 측정 하였다. 형광 이미지는 L-형 Ca²⁺ 채널 작용제인 BayK(-)에 노출 전후에 1초간 노출하여 1분 간격으로 촬영하였

다. 형광은 기준선 전-처리 평균의 백분율로 보고되었다.

[0227] 돌연변이 펩타이드 (P6-TAT, P7-TAT, P14-TAT 및 P15-TAT) 및 AID-TAT 펩타이드의 결과는 야생형 심장 근세포는 도 4에, HCM 심장의 근세포는 도 5에 나타내었다. 결과는 P7, P14 및 P15는 HCM 심장에서 AID-TAT 펩타이드와 비교하여 플라보단백질 산화를 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, P7은 야생형 심장에서 AID-TAT 펩타이드와 비교하여 플라보단백질 산화를 통계적으로 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다.

[0228] 실시예 7 - 심근 허혈-재관류 손상 평가

[0229] 성체 수컷 기니피그를 심장 절제 전에 복강 내 주사를 통해 펜토바르비톤 나트륨 (240 mg/kg)으로 마취하였다. 기니피그 심장을 대동맥을 통해 랑겐도르프 장치에 캐놀라로 삽입하고 (mM) 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.8 KCl, 2.2 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 11 포도당 및 1.5 CaCl₂ (pH = 7.35, 37°C에서 O₂/CO₂)를 포함하는 Ca²⁺ 함유 KHB로 37°C에서 7mL/min의 속도로 30분간 역행적으로 관류시켰고, 30분간 무-유동 허혈, 이후 전술한 대로 30분간 재관류했다.

[0230] 허혈 전 20분 및 25분, 및 재관류 후 20분 및 30분에 관류액을 채취하였다. 재관류 직전에 Ca²⁺-함유 KHB 용액에 0.5-10 μM AID(S)-TAT, AID-TAT, 펩타이드 6 또는 펩타이드 7의 단일 용량을 첨가하였다. 허혈 전후에 채취한 관류액에서 크레아틴 키나아제(CK) 및 젖산 탈수소효소(LDH) 활성을 측정하고, 허혈 후 값을 허혈 전 값으로 정규화 하였다.

[0231] 각 샘플에 대해, 10 μL의 관류액을 100 μL의 CK 효소 시약(CK NAC-활성화 진단 키트, Randox Laboratories)에 첨가하고 분광광도계 (PowerWave XS, BioTek, 340 nm)를 사용하여 30°C에서 15분 동안 흡광도 증가율을 기록하였다. CK 활성은 다음의 공식에 따라 계산하였다:

$$CK \text{ 활성}(U/L) = 4127 \times \left(\frac{\Delta A_{340nm}}{min} \right)$$

[0232]

[0233] 결과는 도 6(a)에 나타내었다. AID-TAT, P7-TAT(1 μM) 및 P7-TAT(0.5 μM) 샘플에서 CK 활성은 AID(S)-TAT 펩타이드에 비해 감소하였다. P7-TAT (1 μM) 및 P7-TAT (0.5 μM) 모두에서 P6-TAT 펩타이드에 비해 CK 활성이 감소하였다. P7-TAT (0.5 μM)는 적어도 AID-TAT (1 μM)만큼 효과적이었다.

[0234] LDH 활성을 측정하기 위해, 각 샘플 150 μL를 50 μL의 LDH 시약 (50mM 이미다졸 완충액, 375 μM NADH, 피루베이트 및 0.05% BSA, pH = 7)과 혼합하고 분광광도계 (PowerWave XS, BioTek, 340nm)를 사용하여 25°C에서 15분 동안 흡광도 감소율을 기록하였다. LDH 활성은 다음의 공식에 따라 계산하였다:

$$LDH \text{ 활성}(U/mL) = \frac{\frac{\Delta A_{340nm}}{min} (Test) - \frac{\Delta A_{340nm}}{min} (Blank) \times 3 \times (\text{희석 비율})}{6.22 \times 0.15}$$

[0235]

[0236] 결과는 도 6(b)에 나타내었다. LDH는 AID-TAT, P7-TAT (1 μM) 및 P7-TAT (0.5 μM) 샘플에서 AID(S)-TAT 펩타이드에 비해 감소하였다. P7-TAT (0.5 μM)는 적어도 AID-TAT (1 μM)만큼 LDH를 감소시켰다.

[0237] GSH:GSSG를 측정하기 위해, 허혈-재관류 프로토콜에 따라 전체 심장 조직을 즉시 균질화하고, 제조업체의 지침에 따라 GSH:GSSG 비율 검출 분석 키트 (abcam, ab205811)를 사용하여 GSH 및 GSSG 수준을 평가하였다. 총 글루타치온과 GSH는 FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, ex 485-12nm, em 520nm)를 사용하여 측정하였다. GSSG는 총 글루타치온에서 GSH를 빼서 계산하였다.

[0238] 결과는 도 6(c)에 나타내었다. 1 μM의 AID-TAT 샘플은 통계적으로 유의한 GSH:GSSG 비율의 증가를 보이지 않았지만, 10 μM의 AID-TAT 샘플은 통계적으로 유의한 GSH:GSSG 비율의 증가를 보였다. 1 μM 및 0.5 μM의 P7-TAT 샘플은 10 μM의 AID-TAT 샘플에 비해 통계적으로 유의한 GSH:GSSG 비율의 증가를 보였다.

[0239] CK 활성, LDH 활성의 감소와 GSH:GSSG 비율의 증가는 각각 산화 스트레스의 감소를 나타낸다. 결과는 P7-TAT를 투여하면 이러한 각 마커와 관련하여 산화 스트레스가 감소한다는 것을 보여준다. 또한, P7-TAT는 산화 스트레스를 줄이는 데 AID-TAT보다 더 효과적이었으며, 동일한 농도에서 더 우수한 결과를 얻거나 AID-TAT에 비해 더 낮은 용량의 P7-TAT로 유사한 결과를 얻었다.

[0240] 실시예 8 - cTnIG203S 마우스에 AID-TAT 예방적 투여

[0241] 비대성 심근병증이 발병하기 전 5주 동안 주 3회 복강 내 주사를 통해 10 μ M AID-TAT를 cTnIG203S 돌연변이 마우스에 투여하였다. 상기 펩타이드를 인산 완충 식염수(PBS)에 용해하였고, 5주 동안 투여한 10 μ M AID-TAT의 총 양은 0.9mg였다. 심초음파 검사에서 심실 중격 두께의 감소와 좌심실 확장기말 치수의 증가로 입증된 바와 같이 투여는 비대증의 발생을 예방하였다. 분획 단축도 개선되었다. 결과는 도 8에 나타내었다. 결합된 AID-TAT 펩타이드는 Cav1.2 채널 단백질의 전환율과 일관되게 3-4일 지속된다는 가설을 세웠기 때문에 AID-TAT 펩타이드는 일주일에 3회 투여하였다.

[0242] 실시예 9 - 시험관 내 I_{Ca-L} , β_2 서브유닛에 대한 결합은 AID_{P7}, AID_{P14}, AID_{P15} 및 AID_{P16}의 결합 친화도 증가를 보여준다

[0243] 본 실험에서는, 원래 AID 펩타이드와 비교하여, 표 8에 제시된 AID 펩타이드 변이체의 결합 효능을 조사하기 위해 결합 친화도 분석을 사용하였다.

[0244] [표 8]

펩타이드	아미노산 서열
원래 AID-TAT (전장 활성)	QQLEEDLKGyLDWITQAE
AID(S)-TAT (스크램블 비활성)	QKILGEWDLAQYTDQELE
AID _{P1} -TAT 돌연변이	QQLEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P4} -TAT 돌연변이	QQLEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P6} -TAT 돌연변이	QQLEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P7} -TAT 돌연변이	QQQEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P10} -TAT 돌연변이	QQLEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P11} -TAT 돌연변이	QQLEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P12} -TAT 돌연변이	QQLEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P13} -TAT 돌연변이	QQLEEDLKGFLDAATQAE
AID _{P14} -TAT 돌연변이	QQEEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P15} -TAT 돌연변이	QQEEEDLKGyLDWITQAE
AID _{P16} -TAT 돌연변이	QQREEDLKGyLDWITQAE

[0245]

[0246] 원래 AID의 비오틴화 (TAT 없음): 각 반응 (용량-반응 곡선은 6개의 반응으로 구성됨)에 대해, 0.02 nM AID-TAT를 비오틴화 용액 (1 nM 아민-PEG₁₁-비오틴 및 0.2 nM EDC를 함유하는 0.1M MES 완충액)에서 실온에서 2시간 동안 교반(400rpm)하면서 인큐베이션 하였다. 그런 다음 친화성 비드 (Dynabeads M-280 스트렙타비딘, ThermoFisher Scientific)를 실온에서 30분 동안 교반 (400rpm)하면서 비오틴화 AID 펩타이드와 함께 인큐베이션 하였다. 그 후, 비오틴화 AID-코팅 친화성 비드를 초기에 PBS 중 0.1% BSA로 세척한 다음 3분 동안 PBS로 세번 세척하였다.

[0247] Cav β 2 서브유닛에 관심 있는 사전-결합 AID(TAT 없음) 돌연변이 펩타이드: AID 돌연변이 펩타이드를 연속적으로 희석(0, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M)하고 전술한 대로 교반(400rpm)하면서 실온에서 2시간 동안 심장 동질체 및 세포질 단백질 제제로부터 100 μ g의 Cav β 2 서브유닛과 인큐베이션 하였다 (Haase H, Podzuweit T, Lutsch G, Hohaus A, Kostka S, Lindschau C, et al. Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNK. *FASEB J.* 1999;13(15):2161-72; Hohaus A, Poteser M, Romanin C, Klugbauer N, Hofmann F, Morano I, et al. Modulation of the smooth-muscle L-type Ca²⁺ channel α 1 subunit (α 1C-b) by the beta2a subunit: a peptide which inhibits binding of beta to the I-II linker of α 1 induces functional uncoupling. *Biochem J.* 2000;348 Pt 3:657-65; Haase H, Striessnig J, Holtzhauer M, Vetter R, Glossmann H. A rapid procedure for the purification of cardiac 1,4-dihydropyridine receptors from porcine heart. *Eur J Pharmacol.* 1991;207(1):51-9).

[0248] AID-친화성 비드와 Cav β 2 서브유닛의 경쟁적 결합: Cav β 2-AID 돌연변이 펩타이드 희석액을 비오틴화된 AID-코팅 친화성 비드와 함께 실온에서 2시간 동안 부드럽게 교반(400rpm)하면서 인큐베이션 하였다. 샘플을 자석 스탠드에 올려놓고 친화성 비드가 자석으로 이동할 수 있도록 하였다. 상층액을 제거하고 1배 샘플 완충액

(62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% 글리세롤, 100mM DTT, 0.002% 브로모페놀 블루)으로 95℃에서 5분 동안 처리하였다. 결과 단백질을 면역 블롯으로 분석하였다.

[0249] 용량-반응 곡선을 사용하여, AID 펩타이드에 비해 AID_{P7}-TAT, AID_{P14}, AID_{P15} 및 AID_{P16}에서 감소된 K_{0.5} 값이 발견되었으며, 이는 이러한 변이체가 AID 영역에 더 강한 결합 친화력을 가지고 있음을 나타낸다 (도 9). 도 9에서 n은 기술적 복제 수를 나타낸다. P 값은 Mann-Whitney t-검정에 의해 결정된 AID(S)-TAT와 비교하여 표시된다. 추가 시험관 내 및 생체 내 실험은 이들 4개의 펩타이드에 초점을 맞췄다.

[0250] 실시예 10 - 시험관 내에서 cTnI-G203S 심근세포를 AID-TAT 변이체에 노출시키면 Ψ_m 및 플라보단백질 산화를 회복하는 데 더 효과적이다

[0251] 본 실험에서 wt 근세포는 20분 동안 0.1, 0.5 또는 1 μ M에 사전-노출되었고 플라보단백질 산화와 Ψ_m 의 변화를 평가하였다.

[0252] 미토콘드리아 막 전위 측정: 형광 표지 5,5',6,6'-테트라클로로1,1',3,3'-테트라에틸벤지미다졸릴카보시아닌 요오드화물 (JC-1)을 사용하여 전술한 대로 미토콘드리아 막 전위(Ψ_m)를 측정하였다 (Viola HM, Arthur PG, Hool LC. Transient exposure to hydrogen peroxide causes an increase in mitochondria-derived superoxide as a result of sustained alteration in L-type Ca²⁺ channel function in the absence of apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res.* 2007;100(7):1036-44). 형광 신호는 인버티드 Nikon TE2000-U 현미경에 부착된 Hamamatsu Orca ER 디지털 카메라로 측정하였다. 이미지는 50ms 노출로 2분 간격으로 획득하였다. Metamorph 6.3 (Version 7.10.3)을 사용하여 수동으로 근세포를 추적하여 신호를 정량화 하였다. 세포가 포함되지 않은 동등한 영역은 배경으로 사용되었고 차감되었다. 약물 첨가 전 6분과 첨가 후 4분 동안 기록된 580nm/535nm 비율 측정 형광 값의 평균을 구하고 형광 비율의 변화를 기본 평균 대비 백분율 증가로 보고하였다. 신호가 Ψ_m 을 나타내는지 확인하기 위해 각 실험이 끝날 때 40mM NaCN을 첨가하여 Ψ_m 을 붕괴시켰다. 또한, 각 실험에서 개별 580 및 535 신호를 평가하여 형광 표지가 Ψ_m 을 정확하게 측정하고 있는지 확인하였다. 칼슘이 없는 실험의 경우, Ψ_m 의 변화를 측정하기 전에 최소 3시간 동안 세포를 칼슘이 없는 HBS (3mM EGTA 및 200nM JC-1이 보충됨)에 노출시켰다.

[0253] 미토콘드리아 플라보단백질 산화 측정: 전술한 방법을 기반으로 플라보단백질 자가 형광을 사용하여 플라보단백질 산화를 측정하였다 (Yaniv Y, Juhaszova M, Lyashkov AE, Spurgeon HA, Sollott SJ, Lakatta EG. Ca²⁺-regulated-cAMP/PKA signaling in cardiac pacemaker cells links ATP supply to demand. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(5):740-8). 여기 480nm 및 방출 535nm에서의 형광은 인버티드 Nikon TE2000-U 현미경에 부착된 Hamamatsu Orca ER 디지털 카메라로 측정하였다. 형광 이미지는 200ms 노출로 1분 간격으로 획득하였다. Metamorph 6.3 (Version 7.10.3)을 사용하여 수동으로 근세포를 추적하여 신호를 정량화 하였다. 세포가 포함되지 않은 동등한 영역은 배경으로 사용되었고 차감되었다. 약물 첨가 전 5분과 첨가 후 5분에 걸쳐 기록된 형광 값의 평균을 구하고 형광 비율의 변화를 기본 평균 대비 백분율 증가로 보고하였다. 각 실험이 끝날 때 FCCP(50 μ M) 및 NaCN(40 mM)을 첨가하여 플라보단백질 산화의 최대 및 최소를 나타내는 각각의 최대 및 최소 형광값을 얻었다.

[0254] 채널을 활성화하고 미토콘드리아 기능을 평가하기 위해 I_{Ca-L} 작용제인 BayK(-)를 사용하였다. 이전 발견과 일관되게, 10 μ M 비활성 스크램블 펩타이드(AID(S)-TAT)가 있는 경우 BayK(-)는 BayK(-) 단독 적용으로 유도된 반응과 유사한 플라보단백질 산화의 증가를 유도하였다 (도 10A-C) (Viola HM, Shah AA, Johnstone VPA, Cserne Szappanos H, Hodson MP, Hool LC. Characterization and validation of a preventative therapy for hypertrophic cardiomyopathy in a murine model of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(37):23113-24). 또한, 1 μ M AID-TAT 펩타이드에 wt 근세포를 노출시키면 BayK(-) 반응이 유의하게 약화되는 것으로 밝혀졌다 (도 10A). 1 μ M에서, 펩타이드 변이체 AID_{P7}-TAT, AID_{P14}-TAT 및 AID_{P15}-TAT는 원래 AID-TAT와 마찬가지로 wt 근세포의 반응을 약화시키는 데 효과적이었다 (도 10A). 0.5 μ M 농도에서, 원래 AID-TAT는 BayK(-)에 대한 반응을 약화시키지 못한 반면, AID_{P7}-TAT, AID_{P14} 및 AID_{P15}는 효과적이었다 (P < 0.05). 0.1 μ M 농도에서, 원래 AID-TAT 펩타이드나 AID-TAT 펩타이드 변이체 모두 효과가 없었다 (도 10B-C). cTnI-G203S 근세포에서, 0.5 μ M AID-TAT는 반응을 약화시키지 않았지만, AID_{P7}-TAT 및 AID_{P14}-TAT는 BayK(-) 노출로 인한 플라보단백질 산화의 증가를 유의하게 약화시켰다 (각각 P < 0.01 및 P < 0.05) (도 10D). 도 10은 1 μ M

AID(S)-TAT가 존재하고 표시된 대로 변이체 펩타이드 농도가 증가함에 따라 10 μ M BayK(-)에 노출되기 전과 후의 *cTnI.2 wt* 및 *cTnI-G203S* 돌연변이 근세포의 평균 $\pm$ SEM 플라보단백질 형광을 보여준다. N = 동물 수, n = 심근세포 수. P 값은 Kruskal-Wallis 테스트에 의해 결정된 AID(S)-TAT와 비교하여 표시된다.

[0255] 플라보단백질 산화의 시험관 내 평가에서 얻은 결과를 바탕으로, 미토콘드리아 막 전위(Ψ_m)의 변화에 대한 0.5 μ M AID-TAT 변이체의 영향을 추가로 조사하였다. 실험은 전술한 대로 칼슘이 없는 조건에서 JC-1 형광을 사용하여 수행되었다 (Viola H, Johnstone V, Cserne Szappanos H, Richman T, Tsoutsman T, Filipovska A, et al. The L-type Ca(2+) channel facilitates abnormal metabolic activity in the cTnI-G203S mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. J Physiol. 2016;594(14):4051-70; Viola HM, Shah AA, Johnstone VPA, Cserne Szappanos H, Hodson MP, Hool LC. Characterization and validation of a preventative therapy for hypertrophic cardiomyopathy in a murine model of the disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(37):23113-24) 이전 연구와 일관되게, BayK(-)의 적용은 10 μ M AID(S)-TAT의 존재 하에서 Ψ_m 의 증가를 유도하였으며, 이는 *wt* 및 *cTnI-G203S* 근세포 모두에서 BayK(-) 단독과 비교할 만했다 (도 11A-B). *wt* 및 *cTnI-G203S* 근세포 모두에서, 0.5 μ M AID-TAT에의 노출은 BayK(-)에 대한 반응을 약화시키는 데 효과적이지 않은 것으로 나타났지만, 0.5 μ M AID_{P7}-TAT, AID_{P14}-TAT 및 AID_{P15}-TAT는 반응을 유의하게 약화시키는 것으로 나타났다 (도 11A-B). 이러한 데이터는 시험관 수준에서, AID_{P7}-TAT와 AID_{P14}-TAT가 *cTnI-G203S* 근세포에서 미토콘드리아 대사 활동을 정상화하는 데 가장 효과적이라는 것을 나타낸다. 도 11은 표시된 바와 같이 1 μ M AID(S)-TAT 및 0.5 μ M의 변이 펩타이드가 있는 상태에서, 10 μ M BayK(-)에 노출되기 전과 후의 *cTnI.2 wt* 및 *cTnI-G203S* 돌연변이 근세포의 JC-1 형광의 평균 $\pm$ SE를 보여준다. N = 동물 수, n = 심근세포 수. P 값은 Kruskal-Wallis 테스트에 의해 결정된 AID(S)-TAT와 비교하여 표시된다.

[0256] 실시예 11 - 생체 내에서 AID-TAT 변이체로 cTnI-G203S 마우스를 처리해도 혈압이 변하지 않는다

[0257] 방법

[0258] 인간 질병을 유발하는 *cTnI-G203S*를 암호화하는 인간 cTnI 유전자를 발현하는 20~30주령의 수컷 마우스를 생성하여 생체 내 연구에 사용하였다. 배경으로, 이 마우스는 20주에서 25주 사이에 HCM의 특징적인 특징이 발병한다 (Viola H, Johnstone V, Cserne Szappanos H, Richman T, Tsoutsman T, Filipovska A, et al. The L-type Ca(2+) channel facilitates abnormal metabolic activity in the cTnI-G203S mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. J Physiol. 2016;594(14):4051-70; Viola HM, Shah AA, Johnstone VPA, Cserne Szappanos H, Hodson MP, Hool LC. Characterization and validation of a preventative therapy for hypertrophic cardiomyopathy in a murine model of the disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(37):23113-24; Tsoutsman T, Chung J, Doolan A, Nguyen L, Williams IA, Tu E, et al. Molecular insights from a novel cardiac troponin I mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol. 2006;41(4):623-32). 정상적인 인간 트로포닌 I 유전자를 발현하는 연령-일치 수컷 마우스를 대조군으로 사용했으며 야생형(*wt*)으로 표시하였다. 생체 내 연구를 위해, 20주령의 *cTnI-G203S* 마우스를 복강 내 주사를 통해 총 5주 동안 주 3회 10 μ M AID(S)-TAT (2mg/kg) 또는 5 μ M AID-TAT 돌연변이 펩타이드로 처리하였다. 펩타이드는 인산 완충 식염수(PBS)에 용해되었고, 5주 동안 투여된 10 μ M AID-TAT 돌연변이 펩타이드의 총 양은 0.9mg였다. 5주 동안 투여된 5 μ M AID-TAT 돌연변이 펩타이드의 총량은 0.45mg였다. 성별에 따른 반응의 잠재적 차이를 제거하기 위해 수컷 마우스를 활용하였다. 사용된 마우스 수는 N으로 표시된다.

[0259] 치료 요법 시작 전, 초기 주사 1시간 후 (급성), 및 5주 치료 요법 완료 후 혈압을 평가하였다. 마우스의 혈압 측정은 CODA 비-침습적 혈압 시스템 (Tail-Cuff Method, Kent Scientific Corporation)을 통해 얻었다. 의식이 있는 마우스를 체중에 따라 적절한 크기의 구속 장치에 넣고 혈압을 평가하기 위해 사전-설정된 매개변수 (Henrietta의 소프트웨어 세부 정보)를 총 15주기 동안 실행하였다 (처음 5주기는 적응을 위해 수행됨). 평균 10회 측정이 사용되었다.

[0260] 결과

[0261] 수축기 및 이완기 혈압은 첫 번째 투여 1시간 전, 첫 번째 투여 1시간 후 (급성 반응), 및 5주 치료 요법 종료 시점 (만성 반응)을 포함하여 3가지 시점에 기록되었다. 임의의 시점에서 임의의 AID-TAT 변이체로 치료한 마우스에서 수축기 또는 이완기 혈압의 유의미한 변화는 관찰되지 않았다 (도 12). 이러한 데이터는 상기 펩타이드가 칼슘 채널 길항제 (예: 딜티아젠프)로 치료할 때 발생할 수 있는 혈관 확장 효과나 음성 근수축 효과를 유발하지 않음을 나타낸다. 도 12는 10 μ M AID(S)-TAT, 5 μ M AID_{P7}-TAT, 5 μ M AID_{P14}-TAT, 5 μ M AID_{P15}-TAT 또는 5

μM AID_{P16}-TAT로 치료한 *wt* 및 *cTnI-G203S* 마우스의 혈압 측정값의 (A-B) 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다 (3x/wk/5wk). 측정은 표시된 대로 치료 시작 전 (Pre), 최초 주사 1시간 후 (Post 1 hr inj.) 또는 5주 치료 요법 후 (Post)에 수행되었다. N = 표시된 마우스 수. P = Kruskal-Wallis 테스트에 의해 결정된 ns.

[0262] 실시예 12 - 시험관내 독성

[0263] 형광 표지인 요오드화 프로피듐 (P4170; Sigma Aldrich)을 사용하여 심장 근세포에서 시험관 내 AID-TAT 돌연변이 펩타이드 독성을 평가하였다. 여기 480nm 및 방출 580nm에서 형광은 인버티드 Nikon TE2000-U 현미경에 부착된 Hamamatsu Orca ER 디지털 카메라로 측정하였다. 형광 이미지는 $1\mu\text{M}$ AID_{P7}-TAT (P7-TAT), AID_{P14}-TAT (P14-TAT), AID_{P15}-TAT (P15-TAT) 또는 AID_{P16}-TAT (P16-TAT)로 초기 20분간 사전-인큐베이션하고 염료로 5분간 인큐베이션 한 후 50ms 노출을 사용하여 획득하였다. 독성의 증거는 관찰되지 않았다.

[0264] 실시예 13 - 생체 내에서 AID-TAT 변이체로 *cTnI-G203S* 마우스를 처리해도 독성이 없다

[0265] 생체 내 독성 파라미터

[0266] 마우스를 $5\mu\text{M}$ AID(S)-TAT, AID_{P7}-TAT (P7-TAT), AID_{P14}-TAT (P14-TAT) 또는 AID_{P15}-TAT (P15-TAT) 또는 AID_{P16}-TAT 3x/wk/5wk로 처리하였다 (동일한 15회 용량). 상기 펩타이드를 인산 완충 식염수(PBS)에 용해하였고, 5주 동안 투여한 $5\mu\text{M}$ AID-TAT 돌연변이 펩타이드의 총량은 0.45mg였다. 각 펩타이드 용량을 투여하기 전에 체중을 기록하였다. 체중의 5-10% 감소는 독성을 나타낼 수 있으며, 과학적 목적으로 사용되는 동물의 복지 증진을 위한 지침 (NHMRC 2008)에 따라 University of Western Australia 동물윤리위원회에서 권장하는 대로 추가 모니터링이 필요하다. 치료 요법이 완료된 후, 마우스를 마취하고 말기 혈액을 수집하였다. 혈액을 실온에서 20분 동안 리튬-헤파린 튜브에 넣어 응고되도록 두었다. 혈장을 4°C에서 10분간 3000g으로 원심분리를 사용하여 분리하였다. 신장 독성을 측정하기 위해, 요소 및 크레아티닌 농도를 각각 Quantichrom Urea 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA) 및 Quantichrom Creatinine 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA)를 사용하여 평가하였다. 간 독성을 측정하기 위해 Alanine Transaminase 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA) 및 Aspartate Transaminase 분석 키트 (BioAssay Systems, Hayward, CA)를 사용하여 ALT(alanine transaminase) 및 AST(aspartate transaminase) 농도를 각각 측정하였다. 분석은 분광 광도계 (CLARIOstar, BMG LABTECH)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 수행되었다.

[0267] 결과

[0268] 5주간의 생체 내 치료 요법을 완료한 후, 말기 혈장을 채취하여 신장 및 간 독성을 평가하였다. AID(S)-TAT로 처리한 *wt* 및 *cTnI-G203S* 마우스의 혈장과 비교하여, 요소 또는 알라닌 트랜스아미나제(ALT)의 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 AID-TAT 변이체 치료가 신장 또는 간 독성을 유발하지 않음을 나타낸다 (도 13A-B). 또한, 모든 치료 프로토콜 기간 동안 체중의 유의한 감소는 관찰되지 않았다 (도 13C). 전반적으로, 이러한 데이터는 AID-TAT 변이체를 가진 *cTnI-G203S* 마우스의 생체 내 치료가 독성이 없음을 나타낸다. 도 13은 표시된 대로 $10\mu\text{M}$ AID(S)-TAT, $5\mu\text{M}$ AID_{P7}-TAT 또는 $5\mu\text{M}$ AID_{P14}-TAT 또는 AID_{P15}-TAT 또는 AID_{P16}-TAT (3x/wk/5wk)로 처리한 *wt* 및 *cTnI-G203S* 마우스의 혈장에서 요소(A) 및 ALT(B) 농도의 평균 $\pm$ SEM을 보여준다. N = 마우스 수. P = 분산분석(ANOVA) 및 Kruskal-Wallis 테스트에 의해 결정되는 ns (A-B). (C) 표시된 대로 $5\mu\text{M}$ AID(S)-TAT, $5\mu\text{M}$ AID_{P7}-TAT, $5\mu\text{M}$ AID_{P14}-TAT, $5\mu\text{M}$ AID_{P15}-TAT 및 $5\mu\text{M}$ AID_{P16}-TAT (3x/wk/5wk, 총 동일한 15회 용량)로 처리한 *cTnI-G203S* 마우스에서 기록된 체중의 평균 $\pm$ SEM. N = 표시된 마우스 수. 빨간색 선은 5% 체중 감소 임계치를 나타낸다.

[0269] 실시예 14 - 생체 내에서 심근병증 전 단계의 *cTnI-G203S* 마우스를 AID-TAT 변이체로 처리하면 섬유증 진행이 느려진다

[0270] 방법

[0271] 치료 요법이 완료된 후, 마우스 심장을 추출하고 약간의 수정을 가하여 전술한 방법을 기반으로 Masson's Trichrome 염색을 준비하였다 (Van De Vlekkert D, Machado E, d'Azzo A. Analysis of Generalized Fibrosis in Mouse Tissue Sections with Masson's Trichrome Staining. *Bio Protoc.* 2020;10(10):e3629). 심장을 PBS로 세척하고 10% 완충 포르말린 식염수 (FSAL-5L; Hurst Scientific, AUS)에서 하룻밤 고정하였다. 고정 후, 심장을 PBS에서 10분간 3회 세척하고 30% 수크로스 용액 (PBS 중)에서 하룻밤 인큐베이션 했다. 밤새 인큐베이션 후, 심장을 Tissue-Tek OCT 화합물 (IA018; ProSciTech, AUS)로 코팅하고 ~2ml OCT가 함유된 4cm 깊이의 원

통형 알포일 몰드에 넣었다. 몰드를 이소펜탄으로 채워진 튜브에 넣고 액체 질소가 들어 있는 용기에 넣어 심장 조직을 천천히 얼렸다. 조직 샘플은 냉동 절단을 할 때까지 -80℃에서 보관하였다.

[0272] 심장을 7 μM 섹션으로 절단하여 따뜻한 (RT) 수퍼프로스트 슬라이드에 수집하고 염색할 때까지 -80℃에서 보관하였다.

[0273] Masson's trichrome 염색 전에 열 평형을 달성하기 위해, 슬라이드를 -80℃에서 -20℃로 하룻밤 동안 옮겼다. 하룻밤 인큐베이션 후, 슬라이드를 -20℃에서 RT로 1시간 동안 옮긴 후 흐르는 탭 H_2O 에서 2분간 세척하여 OCT 를 제거하고 Bouin 용액에 하룻밤 동안 2차 고정하였다. Bouin 용액을 완전히 제거하기 위해 흐르는 H_2O 에서 슬라이드를 5분간 1-3회 세척하였다. 다음의 단계를 사용하여 슬라이드를 염색하였다: Celestine Blue (5분), 흐르는 탭 H_2O (2분), Harris Hemotoxylin (5분), 흐르는 탭 H_2O (2분), 증류 H_2O (2분), Ponceau-Fuchsin (10분), 증류 H_2O (20초), Phosphomolybdic acid (4분), Aniline Blue (1분) 및 1% 아세트산(1분). 그런 다음 슬라이드를 여과지로 블롯 건조하고 전술한 대로 탈수, 클리어링 및 장착 단계를 수행하였다 (Van De Vlekkert D, Machado E, d'Azzo A. Analysis of Generalized Fibrosis in Mouse Tissue Sections with Masson's Trichrome Staining. *Bio Protoc.* 2020;10(10):e3629).

[0274] 마우스의 심장 섬유화 수준을 관찰하기 위해, 조직학적 분석을 위하여 각 동물에 대해 최소 15개의 현미경 필드 섹션을 무작위로 선택하였다. 심장 섹션 이미지는 20배율의 Nikon 직립형 광학현미경 (DS-Qi2, Japan)을 사용하여 획득하고 ImageJ(NIH)를 사용하여 분석하였다. Masson's trichrome 염색 섹션에서 전체 심근 면적에 대한 파란색 면적의 비율을 사용하여 콜라겐 축적을 분석하였다. 두 명의 연구자가 맹검으로 조직학적 특징에 대한 분석을 수행하였다.

[0275] **결과**

[0276] 심근 섬유증이 HCM의 특징이라는 것은 잘 알려져 있다 (O'Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol.* 2007;357:271-96). 심근 섬유증은 비대성 심장에서 현저하게 증가하는 콜라겐이 풍부한 세포 외 기질이다 (Haase H, Striessnig J, Holtzhauer M, Vetter R, Glossmann H. A rapid procedure for the purification of cardiac 1,4-dihydropyridine receptors from porcine heart. *Eur J Pharmacol.* 1991;207(1):51-9). 콜라겐 축적 및 섬유화 증가는 부적응적이고 심장 이완 손상과 관련이 있으며, 따라서 심부전 위험을 증가시킨다 (Tang H, Viola HM, Filipovska A, Hool LC. Ca(v)1.2 calcium channel is glutathionylated during oxidative stress in guinea pig and ischemic human heart. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(8):1501-11).

[0277] 여기에서는 20주령의 전-비대성 *cTnI-G203S* 마우스에 5 μM AID-TAT 변이체 펩타이드(3x/wk/5wk)를 처리하여 섬유증의 발병과 진행에 대한 효능을 평가하였다. 펩타이드를 인산 완충 식염수(PBS)에 용해하였고, 5주 동안 투여한 5 μM AID-TAT 변이체 펩타이드의 총 양은 0.45mg였다. 5주간의 치료 요법 후, 마우스 심장을 추출하여 고정하고 냉동 절단을 위해 OCT에 삽입하였다. 심장 조직 섹션의 콜라겐 침착은 근육 조직(빨간색 염색), 핵(보라색/검정색 염색) 및 콜라겐(파란색 염색)을 나타내는 Masson's Trichrome 염색을 사용하여 시각화했다. Nikon Upright Microscope을 사용하여 이미지를 획득하고 ImageJ 컬러 임계값을 사용하여 콜라겐 부피 비율(%)을 측정했다. HCM의 발병과 일관되게, 우리는 10 μM AID(S)-TAT로 치료한 *cTnI-G203S* 마우스에서 좌심실 후벽 콜라겐 부피 비율(CVF, %)이 *wt* 근세포에 비해 유의하게 증가한다는 것을 발견하였다 (도 14). 이는 5 μM AID_{P7}-TAT(P7-TAT)로 처리한 *cTnI-G203S* 마우스에서 유의하게 감소하였다 (도 14). 도 14는 다음을 나타낸다: (A) 좌심실 심장 조직의 대표적 섹션. 스케일 바 = 50 μM . (B) 10 μM AID(S)-TAT, 5 μM AID_{P7}-TAT 또는 5 μM AID_{P14}-TAT (3x/wk/5wk)로 처리한 후 25주령 *wt* 및 25주령 *cTnI-G203S* 마우스의 심장 절편에서 얻은 LV 콜라겐 부피 비율(%). N = 표시된 마우스 수. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 보고되었으며; P 값은 Kruskal-Wallis 테스트에 의해 결정된 *cTnI-G203S* AID(S)-TAT와 비교한 것이다.

[0278] 실시예 15 - 생체 내에서 심근병증 전 단계의 *cTnI-G203S* 마우스를 AID 펩타이드 변이체로 처리하면 비대성 심근병증 발병을 예방한다

[0279] **방법**

[0280] 좌심실 기능을 측정하기 위한 심초음파 연구는 전술한 대로 Vivid™ 7 IQ ultrasound system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)에서 i13L 프로브를 사용하여 가벼운 메톡시플루란 마취를 한 마우스에 대해 수행되었다

(Viola H, Johnstone V, Cserne Szappanos H, Richman T, Tsoutsman T, Filipovska A, et al. The L-type Ca(2+) channel facilitates abnormal metabolic activity in the cTnI-G203S mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *J Physiol*. 2016;594(14):4051-70; Viola HM, Shah AA, Johnstone VPA, Cserne Szappanos H, Hodson MP, Hool LC. Characterization and validation of a preventative therapy for hypertrophic cardiomyopathy in a murine model of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(37):23113-24; Viola HM, Johnstone VPA, Cserne Szappanos H, Richman TR, Tsoutsman T, Filipovska A, et al. The Role of the L-Type Ca(2+) Channel in Altered Metabolic Activity in a Murine Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1(1-2):61-72). 각 *N*은 각 치료 그룹에 대한 *wt* 또는 *cTnI-G203S* 마우스의 정량적 측정값의 평균을 나타낸다.

[0281] 결과

[0282] *cTnI-G203S* 마우스의 심장 초음파 평가는 생후 약 21주부터 HCM 특성의 발달을 보여준다 (Viola H, Johnstone V, Cserne Szappanos H, Richman T, Tsoutsman T, Filipovska A, et al. The L-type Ca(2+) channel facilitates abnormal metabolic activity in the cTnI-G203S mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *J Physiol*. 2016;594(14):4051-70; Viola HM, Shah AA, Johnstone VPA, Cserne Szappanos H, Hodson MP, Hool LC. Characterization and validation of a preventative therapy for hypertrophic cardiomyopathy in a murine model of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(37):23113-24). 이전 발견과 일관되게, 생후 25주까지 20주령 *cTnI-G203S* 마우스를 10 μ M AID(S)-TAT로 처리하였고 (10 μ M, 3x/wk/5wk) (펩타이드를 인산 완충 식염수(PBS)에 용해하였고, 5주 동안 투여한 10 μ M AID-TAT 변이체 펩타이드의 총 양은 0.9mg), AID(S)-TAT로 치료한 *wt* 연령 일치 마우스에 비해 좌심실 말단 직경(LVEDd 및 LVEDs)이 유의하게 감소하고, 분획 단축(FS), 박출률(EF), 좌심실 후벽 두께(LVPWd 및 LVPWs) 및 심실중격(IVDs)이 유의하게 증가하였다 (도 15). 또한, 연령이 일치하는 *cTnI-G203S* 마우스에 10 μ M AID-TAT를 처리한 결과, AID(S)-TAT를 처리한 *cTnI-G203S* 마우스에 비해 FS, EF, IVSd, LVEDd, LVEDs 및 LVPWd가 회복된 것으로 나타났다 (도 15). 도 15는 다음을 나타낸다: LVEDd, 이완기 좌심실 말단 직경; LVEDs, 수축기 좌심실 말단 직경; FS, 분획 단축; EF, 박출률; LVPWd, 이완기 좌심실 후벽; LVPWs, 수축기 좌심실 후벽; IVDd, 이완기 심실중격; IVDs, 수축기 심실중격; HR, 심박수. *N* = 마우스 수. 값은 평균 $\pm$ 표준편차(SEM)로 보고되었으며, *P* 값은 Kruskal-Wallis 테스트에 의해 결정된 *cTnI-G203S* AID(S)-TAT와 비교한 것이다.

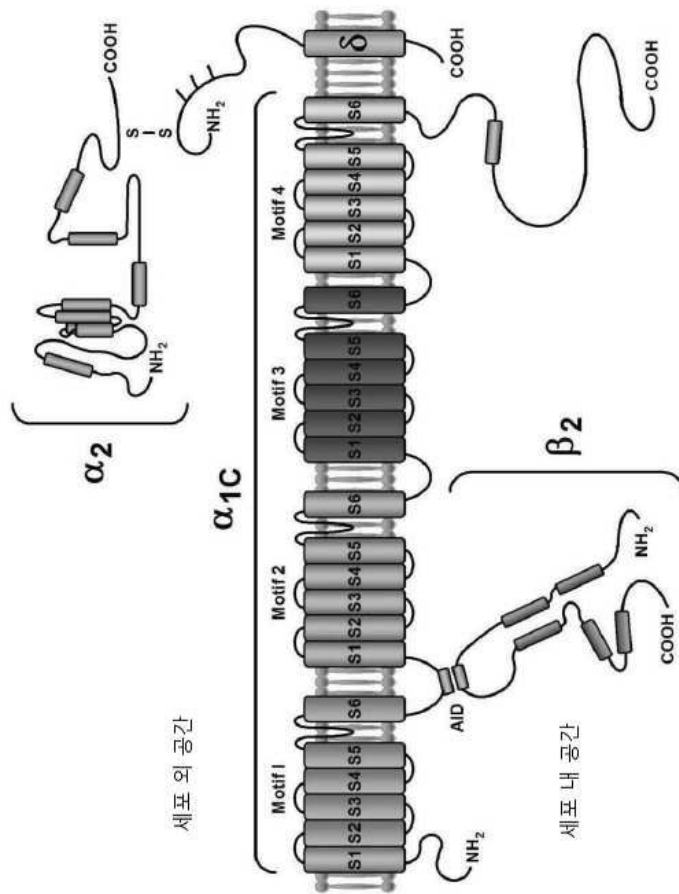
[0283] 20주령의 전-비대성 *cTnI-G203S* 마우스를 5 μ M AID-TAT 변이체로 치료한 후 동일한 치료 프로토콜 (3x/wk/5wk)을 사용하여 그 효능을 조사하였다. 심장 형태와 기능을 평가하기 위해 5주 치료 전후에 마우스를 대상으로 심장 초음파 검사를 실시하였다. 5 μ M AID_{P7}-TAT(P7-TAT)로 *cTnI-G203S* 마우스를 치료한 결과, 10 μ M AID-TAT와 유사한 방식으로 AID(S)-TAT에 비해 FS, EF, IVSs, LVPWd 및 LVPWs가 효과적으로 회복되었다 (도 15). LVEDd와 LVEDs는 증가하고 IVDs는 감소하는 경향이 관찰되었다 (도 15). 흥미롭게도, 5 μ M AID_{P7}-TAT(서열번호 4 - TAT)로 치료한 25주령의 *cTnI-G203S* 마우스는 10 μ M AID-TAT로는 달성할 수 없었던 LVPWs 및 IVSs의 현저한 감소를 보여주었다 (도 15). *cTnI-G203S* 마우스를 5 μ M AID_{P14}-TAT(P14-TAT)로 치료하면 모든 심초음파 매개변수(LVEDd 제외)가 효과적으로 회복되었다. 여기에는 10 μ M AID-TAT에 의해 변경되지 않은 일부 매개변수(FS, EF, IVSd, IVSs, LVEDs, LVPWd 및 LVPWs)가 포함되었다. LVEDd가 증가하는 경향이 관찰되었다. 다른 코호트에 서는, 5 μ M AID_{P15}-TAT(P15-TAT)로 치료했을 때 FS, EF, IVSd, IVSs 및 LVPWs가 효과적으로 회복된 반면, 5 μ M AID_{P16}-TAT(P16-TAT)로 치료했을 때는 IVSd 및 IVSs만 회복된 것으로 나타났다.

[0284] 펩타이드로 마우스를 치료한 후 심장 무게 대 체중 비율의 변화로 평가되는 비대증 발병에 미치는 영향도 조사하였다. 그 결과, 5 μ M AID_{P7}-TAT (P7-TAT) 또는 5 μ M AID_{P14}-TAT (P14-TAT)로 치료하면 심장 무게/체중이 유의하게 감소하여 비대증이 퇴행하는 것으로 나타났다 (도 16). 도 16은 10 μ M AID(S)-TAT, 10 μ M AID-TAT, 5 μ M AID_{P7}-TAT, 5 μ M AID_{P14}-TAT, 5 μ M AID_{P15}-TAT 또는 5 μ M AID_{P16}-TAT로 처리한 *wt* 및 *cTnI-G203S* 마우스의 심장 무게 대 체중 비율 측정값의 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. *n* = 표시된 마우스 수. Kruskal-Wallis 테스트에 의해 결정된 *cTnI-G203S* AID(S)-TAT와 비교하여 **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

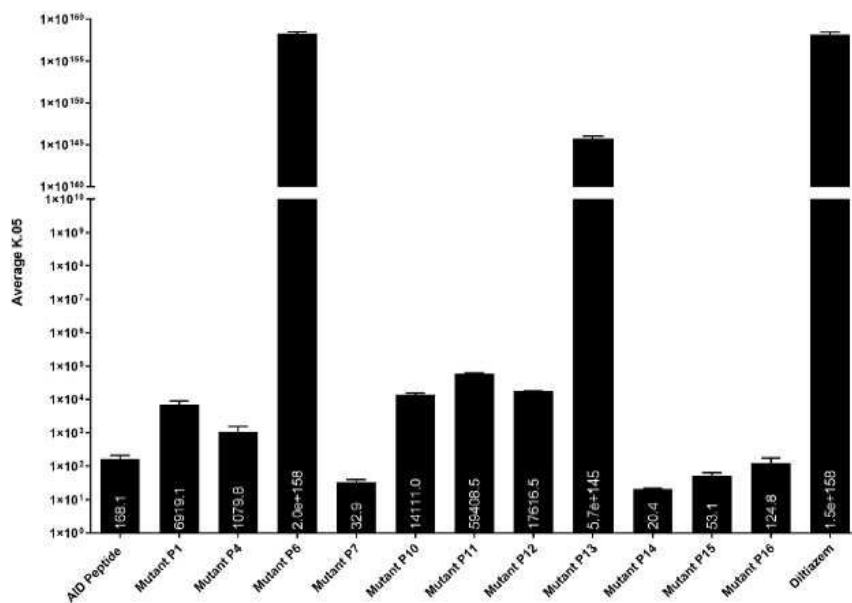
[0285] 전반적으로, 이 데이터는 본 발명의 펩타이드로 비대증이 발병하기 전에 치료하면 비대증 발병을 예방하고, 섬유증을 퇴행시키며 *cTnI-G203S* 마우스에서 심장 기능을 개선한다는 것을 나타낸다. 변이체 펩타이드는 비대증 예방에 있어 원래 AID-TAT보다 더 효과적이다.

도면

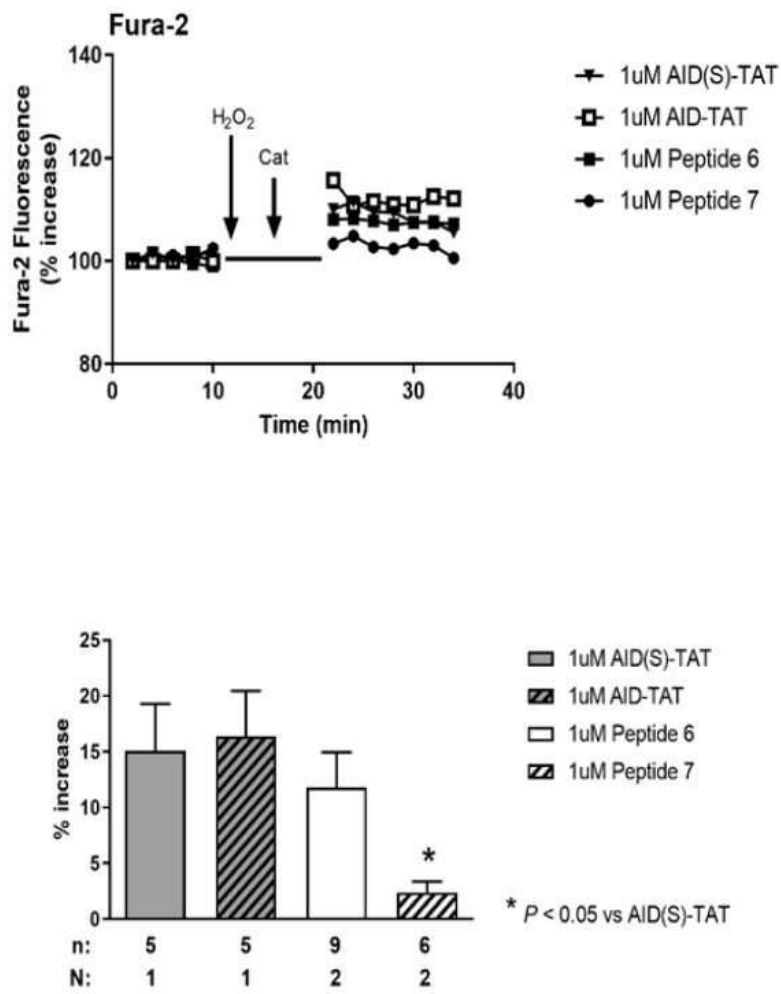
도면1



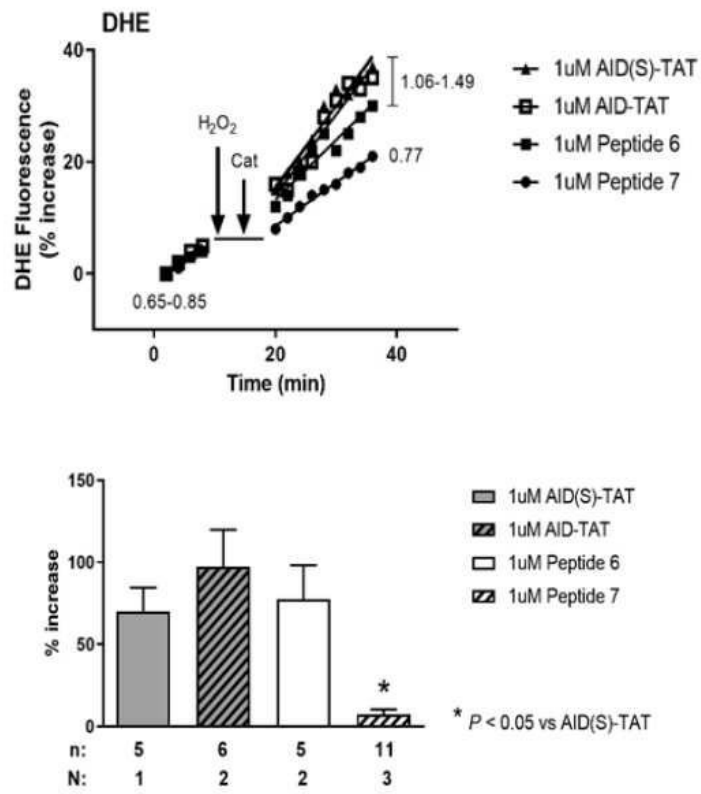
도면2



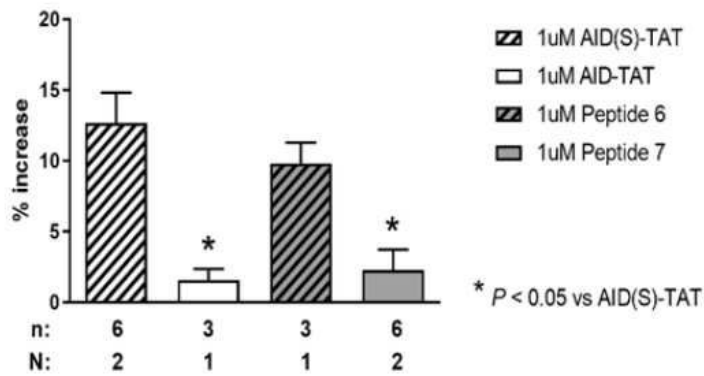
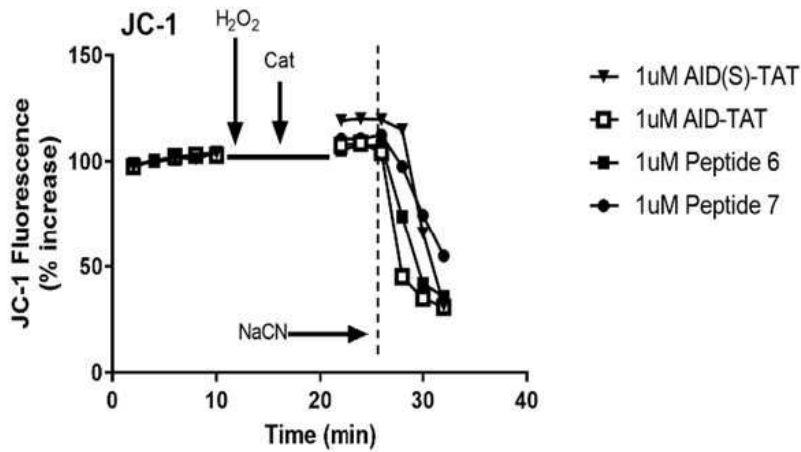
도면3a



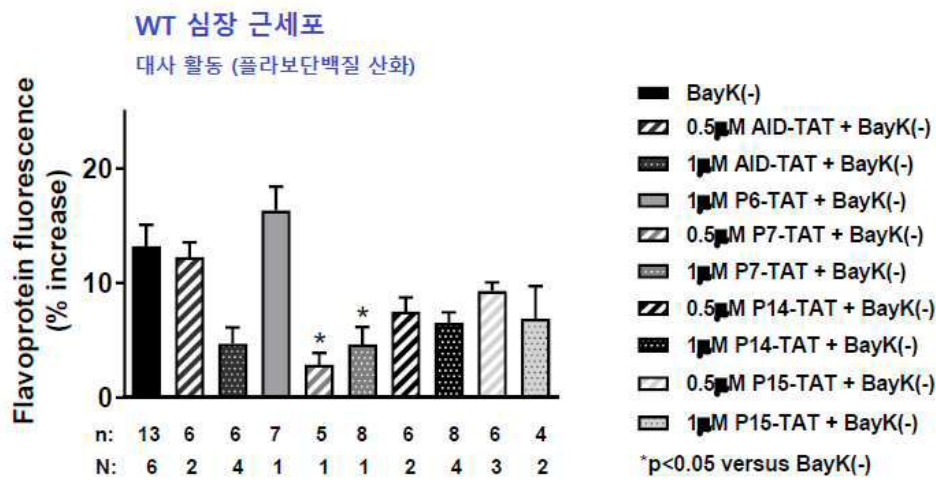
도면3b



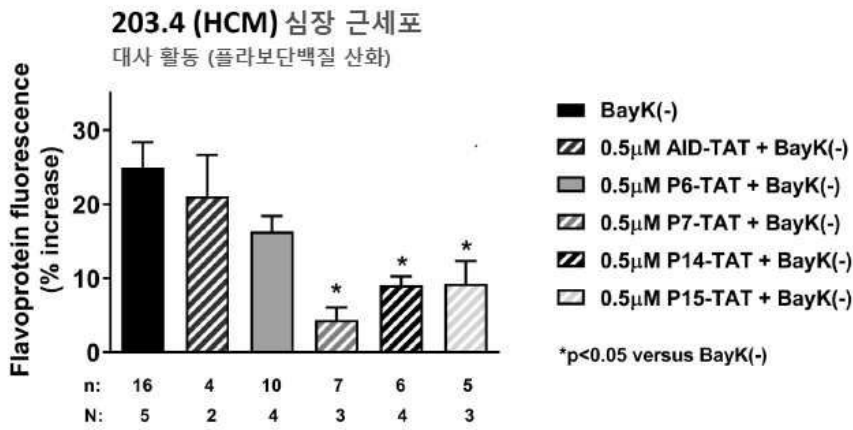
도면3c



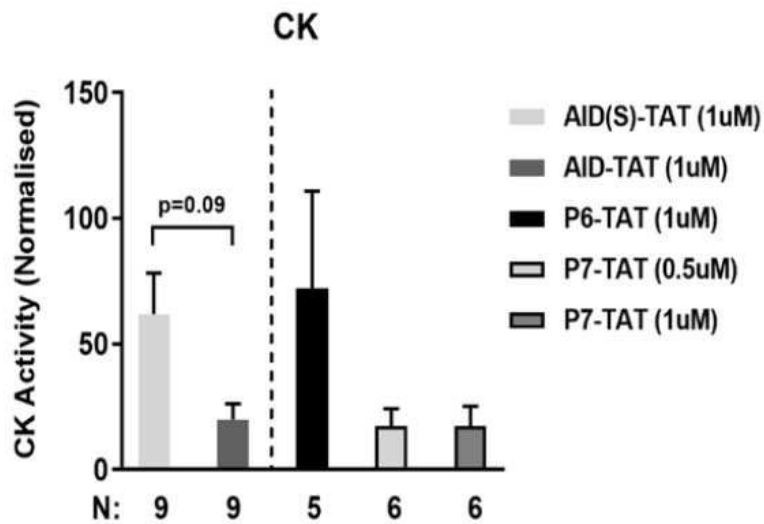
도면4



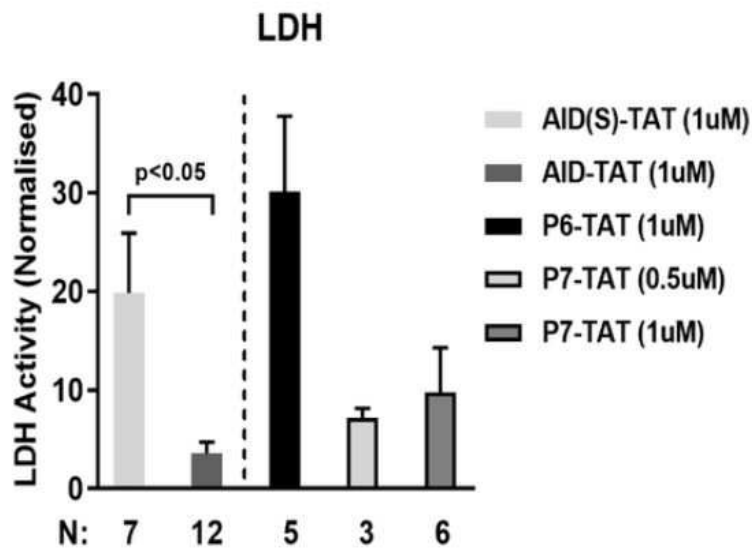
도면5



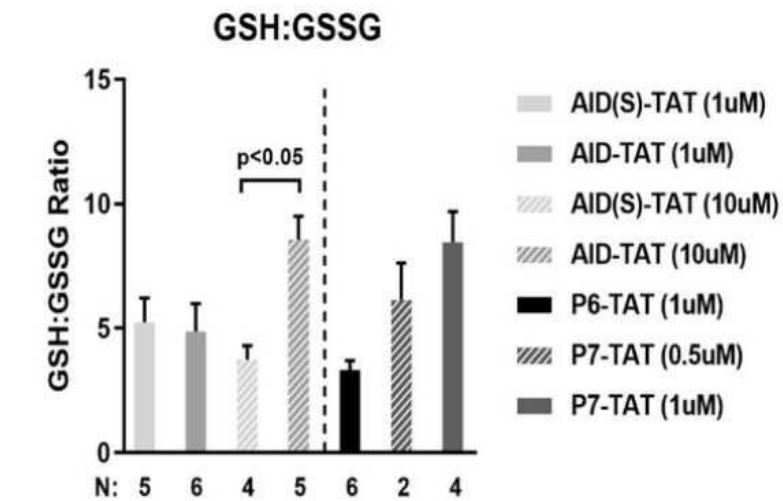
도면6a



도면6b



도면6c



도면7

SEQ ID NO	Sequence	Description
SEQ ID NO: 1	QQLEEDLKGYLDWITQAE	AID Peptide
SEQ ID NO: 2	QQX ₁ EEDX ₂ KGYLDWITQAE	본 발명의 Variant AID Peptide
SEQ ID NO: 3	RKKRRQRRRZaa	TAT Peptide
SEQ ID NO: 4	QQQEEDLKGYLDWITQAE	Variant P7
SEQ ID NO: 5	QQEEEDLKGYLDWITQAE	Variant P14
SEQ ID NO: 6	QQEEEDEKGYLDWITQAE	Variant P15
SEQ ID NO: 7	QQREEDLKGYLDWITQAE	Variant P16
SEQ ID NO: 8	GRKKR	TAT의 핵 국소화 신호
SEQ ID NO: 9	YGRKKRRQRRR	TAT의 단백질 전달 도메인
SEQ ID NO: 10	QKILGEWDLAQYTDQELE	AID scrambled peptide
SEQ ID NO: 11	DLKGYLDWITQAE	Variant P1
SEQ ID NO: 12	LEEDLKGYLDWITQAE	Variant P4
SEQ ID NO: 13	KGYLDWITQAE	Variant P6
SEQ ID NO: 14	DLKGYLDWITQA	Variant P10
SEQ ID NO: 15	DLKGYLDWITQ	Variant P11
SEQ ID NO: 16	DLKGYLDWIT	Variant P12
SEQ ID NO: 17	QQLEEDLKGFDAATQAE	Variant P13

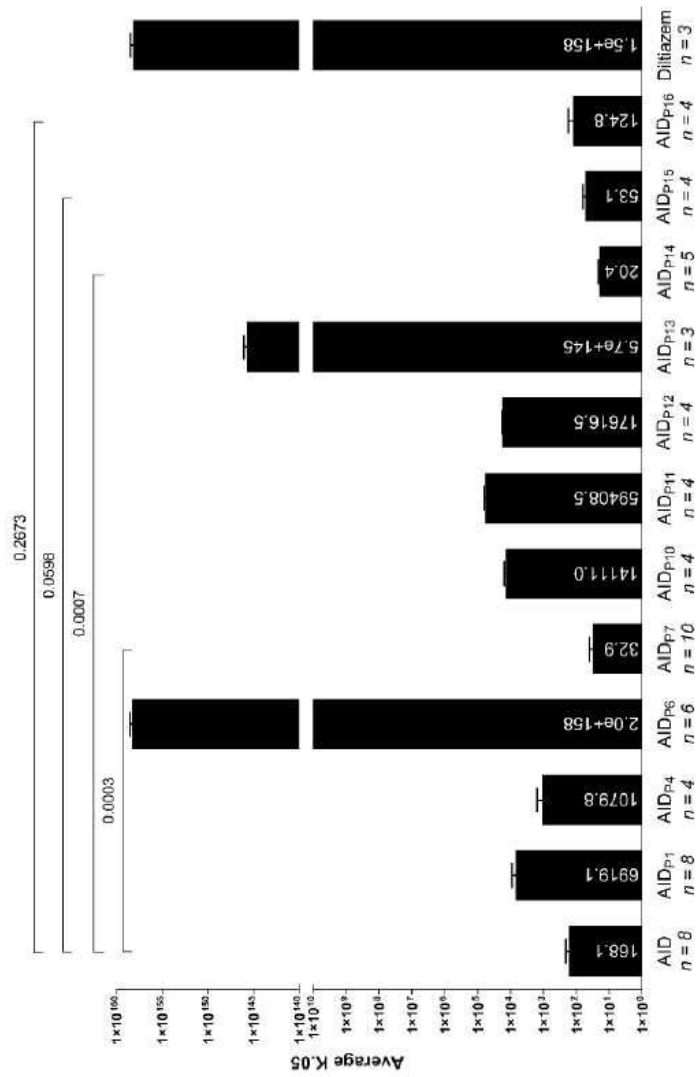
도면8

10 μ M AID(S)-TAT 또는 AID-TAT를 투여한 cTnl-G203S 마우스의 심초음파 파라미터.

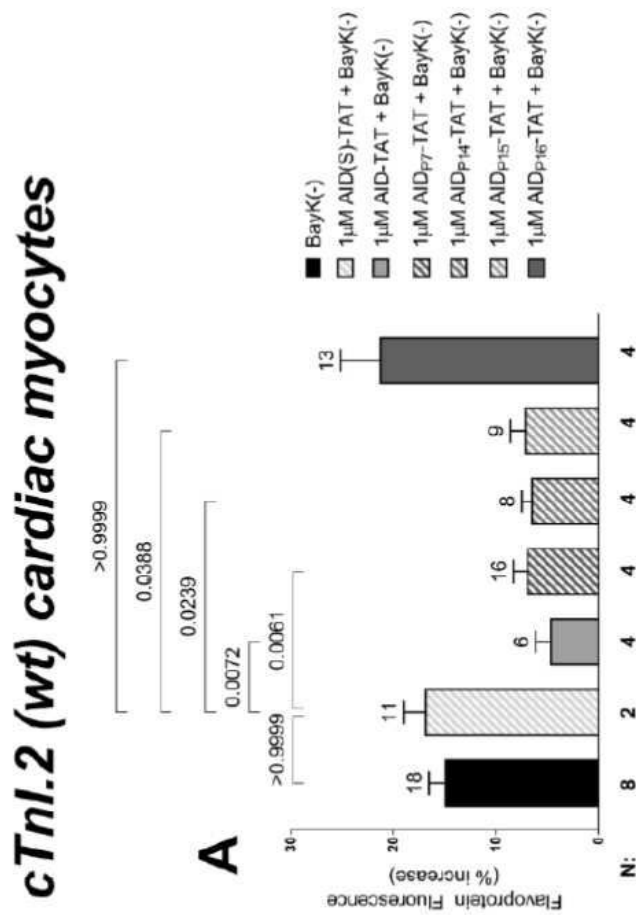
LVEDD	LVESD	FS	LVDPW	LVSPW	IVDS	IVSS	HW:BW	HR
(mm)	(mm)	(%)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mg/g)	(bpm)
PRE HCM TREATMENT (from 20 weeks)								
25 week old wt, AID(S)-TAT (n=4)								
3.56	2.31	35.08	1.26	1.42	0.76	0.86	4.33	450
± 0.12	± 0.06	± 1.11	± 0.08	± 0.05	± 0.01	± 0.01	± 0.07	± 37
25 week old cTnl-G203S, AID(S)-TAT (n=7)								
3.08*	1.62*	47.39*	1.31	1.43	0.85*	0.96*	5.14*	450
± 0.06	± 0.05	± 0.81	± 0.03	± 0.04	± 0.01	± 0.02	± 0.10	± 22
25 week old cTnl-G203S, AID-TAT (n=6)								
3.33†	2.06†	38.26†	1.23	1.37	0.73†	0.82†	4.70†	452
± 0.06	± 0.08	± 1.61	± 0.03	± 0.03	± 0.00	± 0.01	± 0.17	± 26
POST HCM TREATMENT (from 30 weeks)								
35 week old cTnl-G203S, AID-TAT (n=5)								
3.18	1.67	48.48	1.26	1.43	0.95	1.05	5.81	450
± 0.07	± 0.05	± 1.07	± 0.03	± 0.06	± 0.03	± 0.02	± 0.21	± 19

LVEDD, 좌심실 이완기말 직경 (left ventricular end diastolic diameter); LVESD, 좌심실 수축기말 직경 (left ventricular end systolic diameter); FS, 분획 단축 (fractional shortening); LVDPW, 이완기의 좌심실 후벽; LVSPW, 수축기의 좌심실 후벽수축기 좌심실 후벽; IVDS, 이완기 심실 중격; IVSS, 수축기 심실 중격.
 평균 $\pm$ SEM으로 보고된 값; wt AID(S)-TAT와 비교하여 *P < 0.05, Kruskal-Wallis 검정에 의해 결정된 cTnl-G203S AID(S)-TAT와 비교하여 † P < 0.05

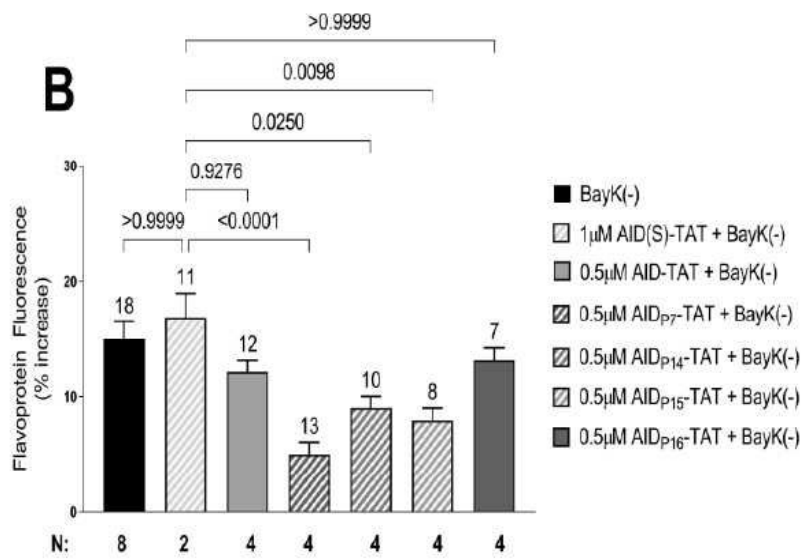
도면9



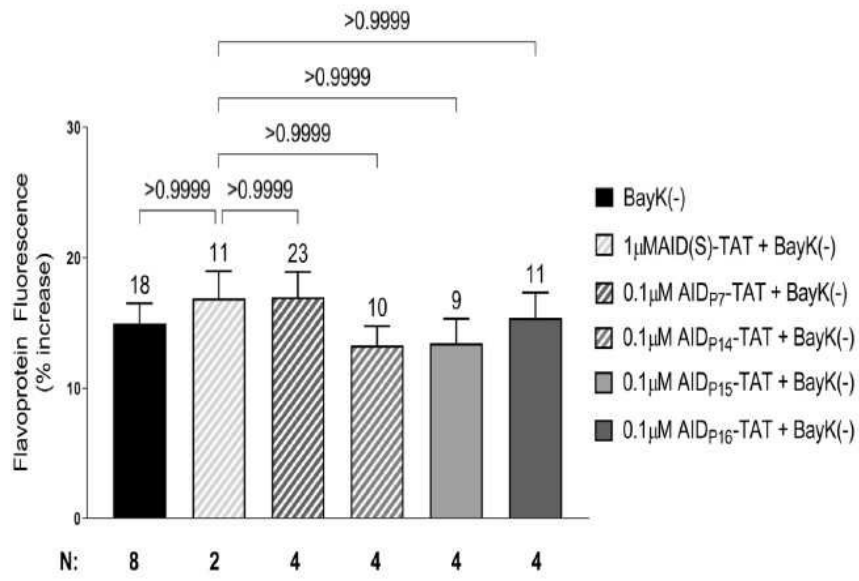
도면10a



도면10b

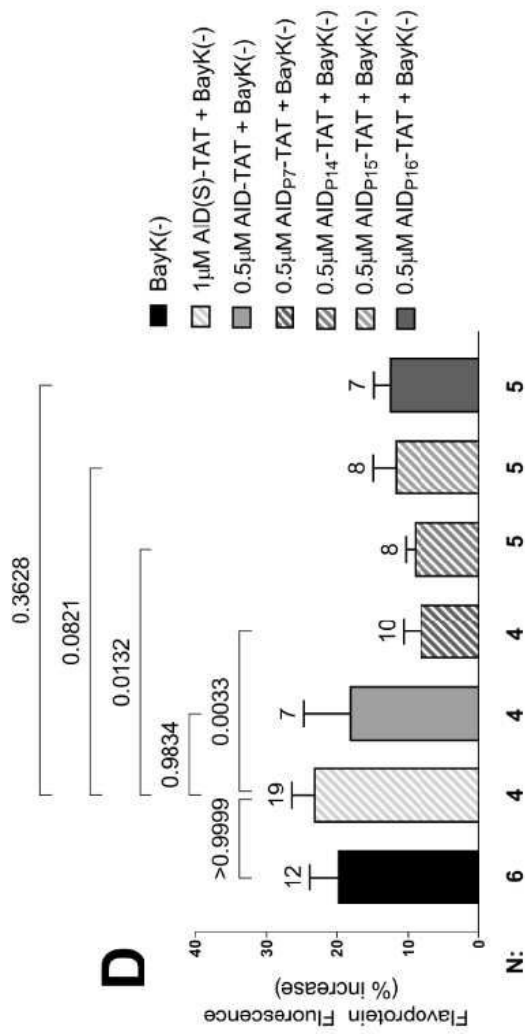


도면10c



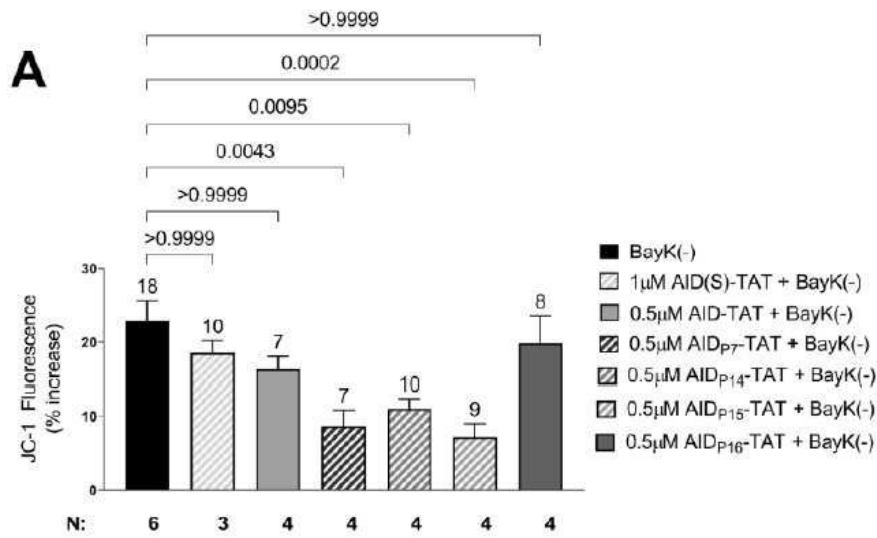
도면10d

cTnl-G203S (mutant) cardiac myocytes

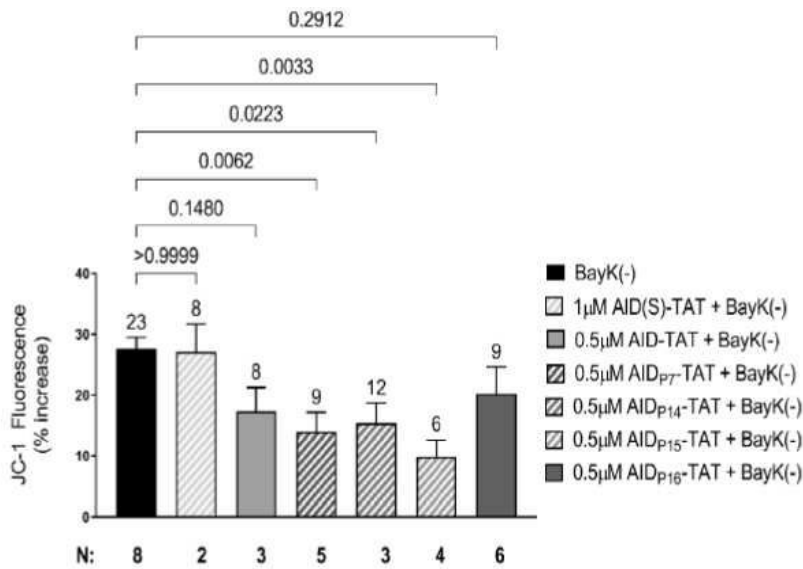


도면11a

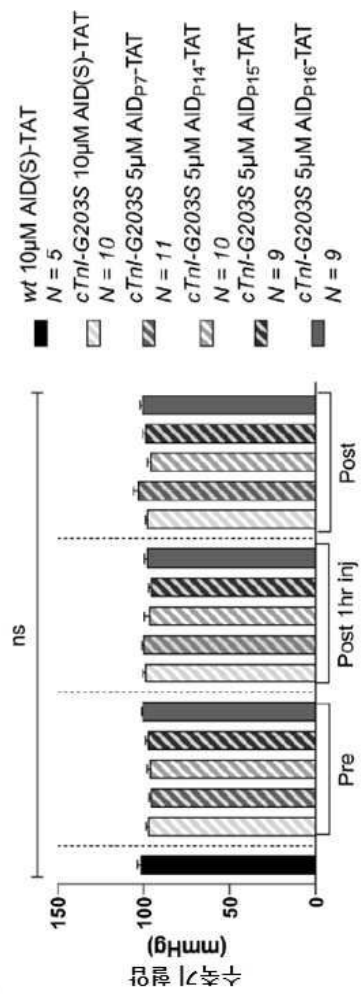
cTnl.2 (wt) cardiac myocytes



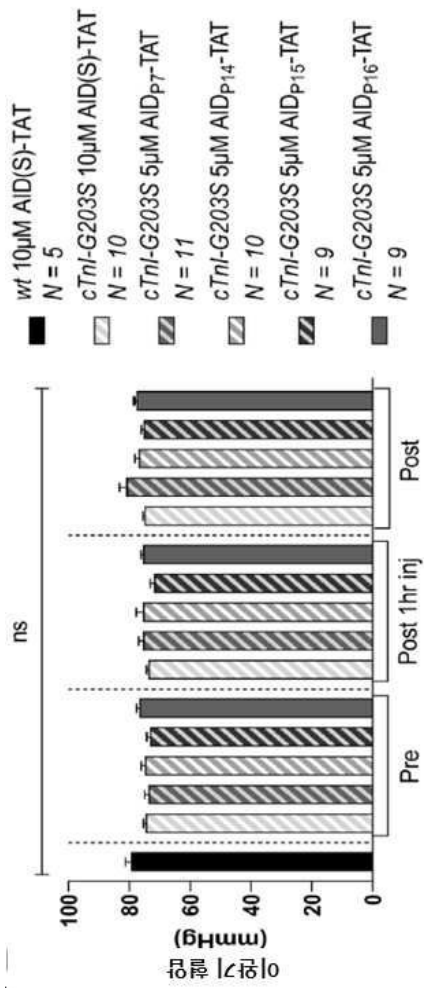
도면11b



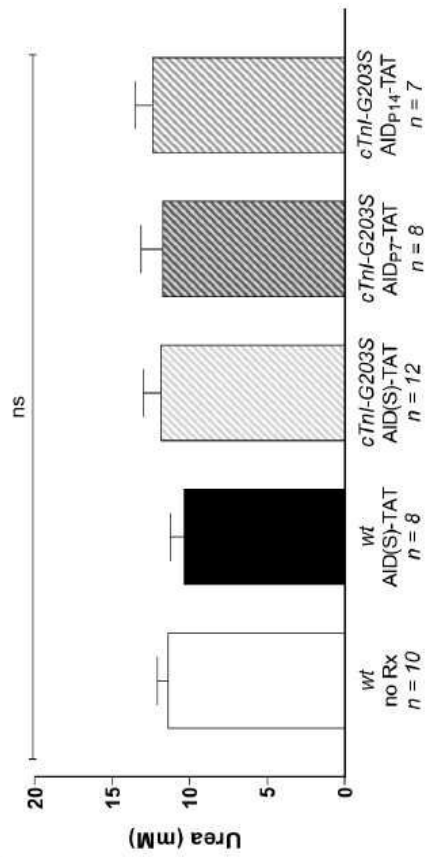
도면12a



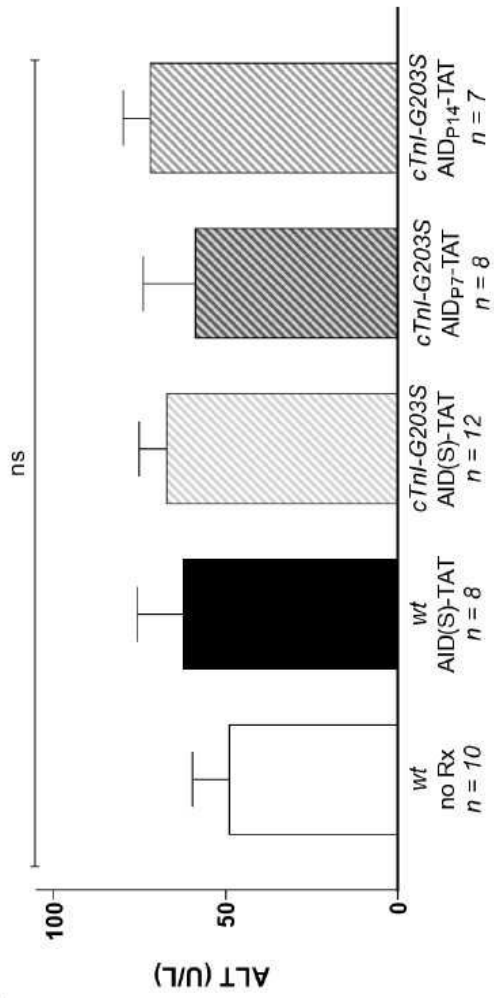
도면12b



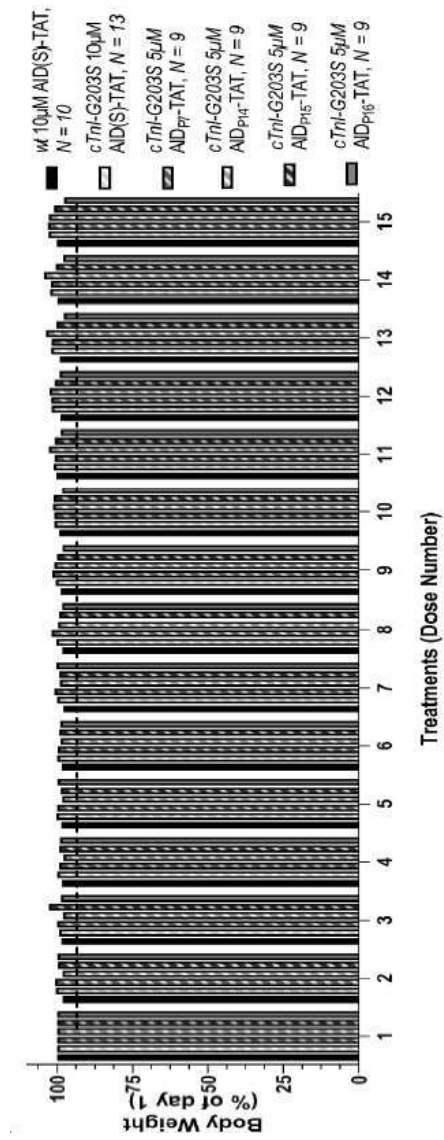
도면13a



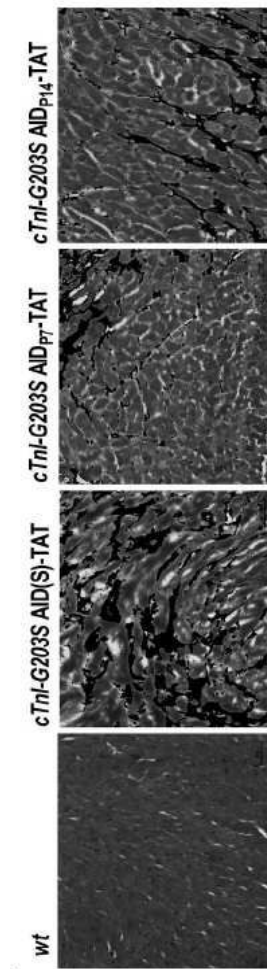
도면13b



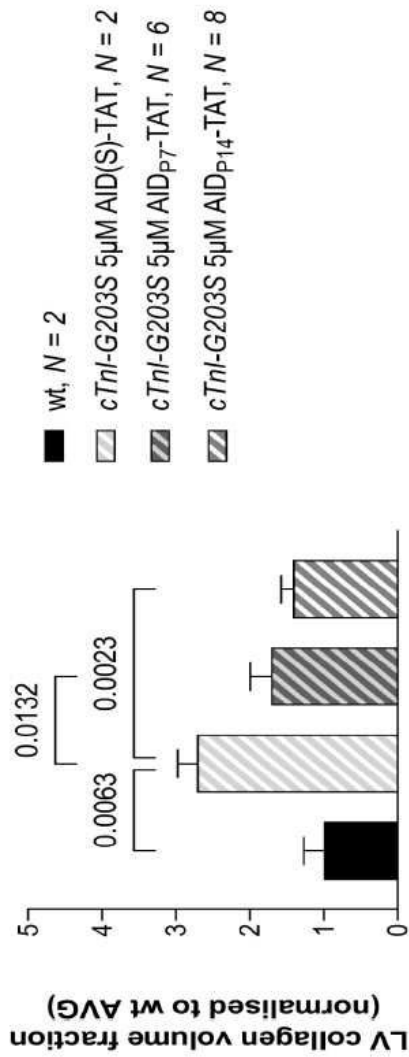
도면13c



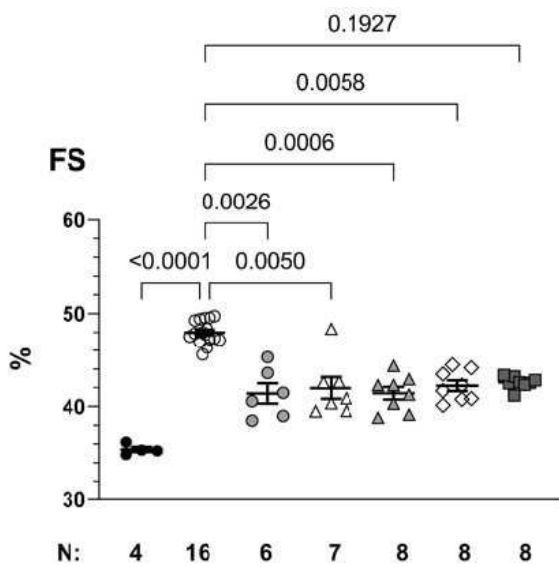
도면14a



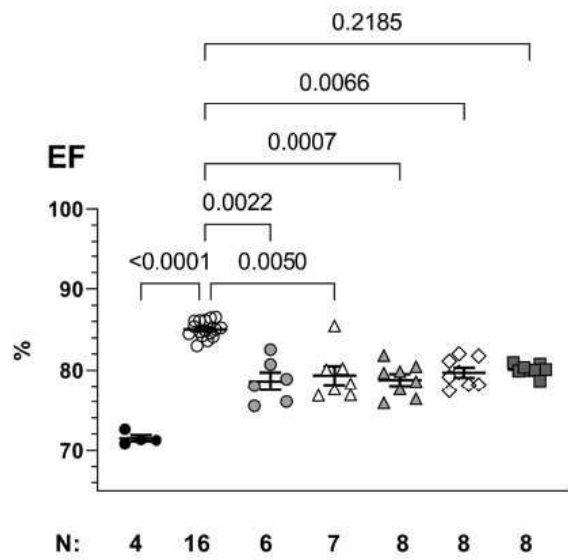
도면14b



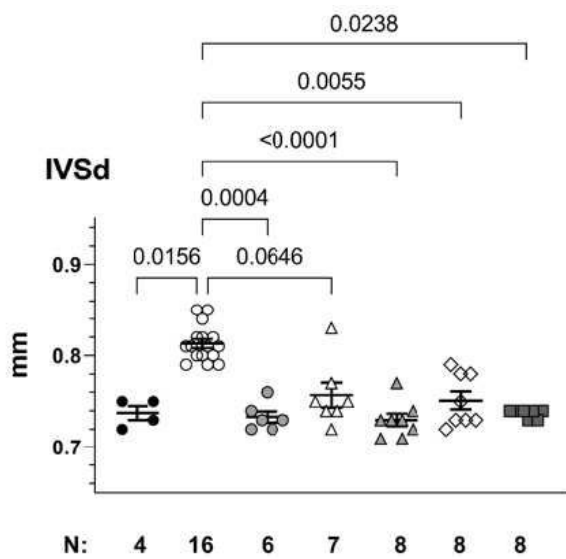
도면15a



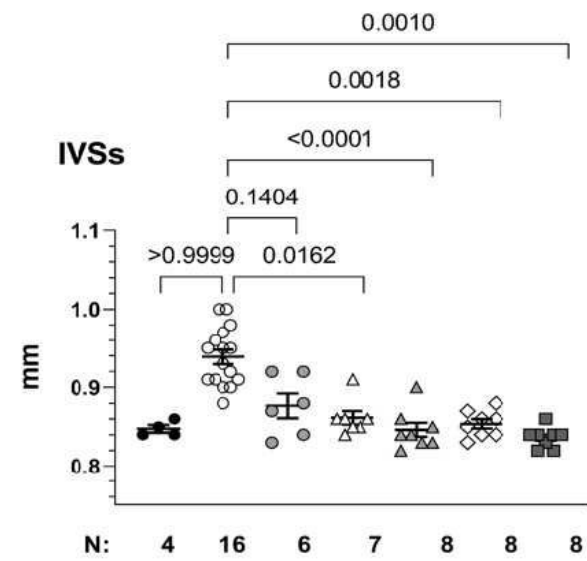
도면15b



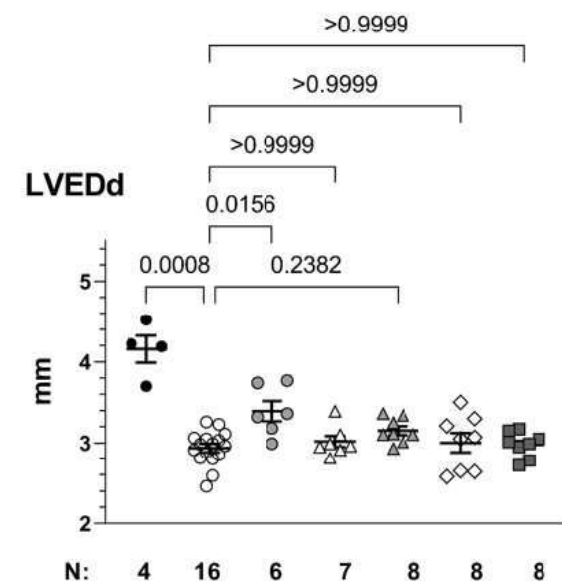
도면15c



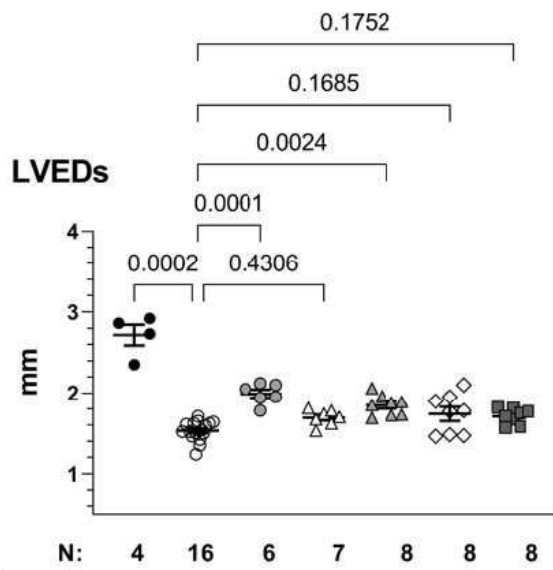
도면15d



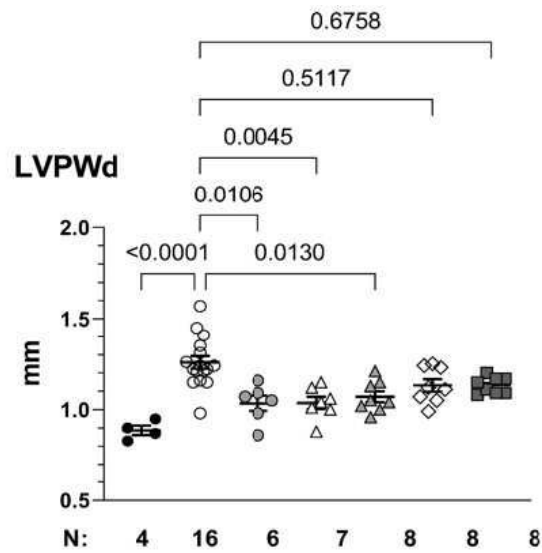
도면15e



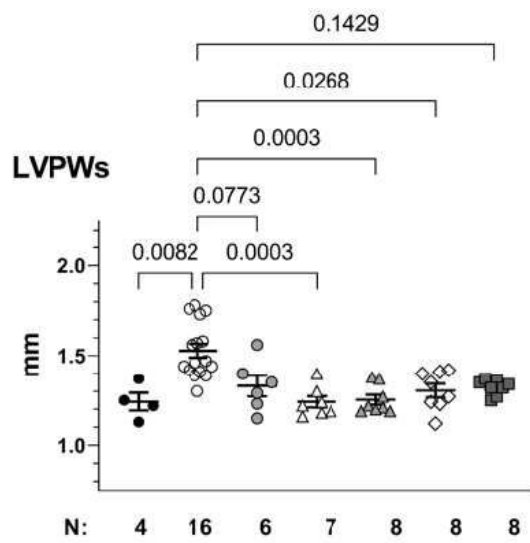
도면15f



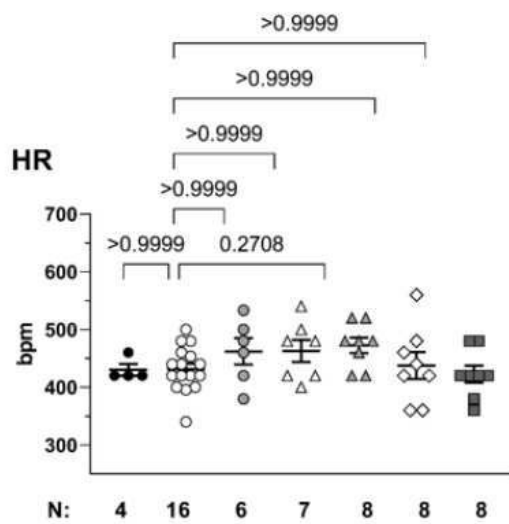
도면15g



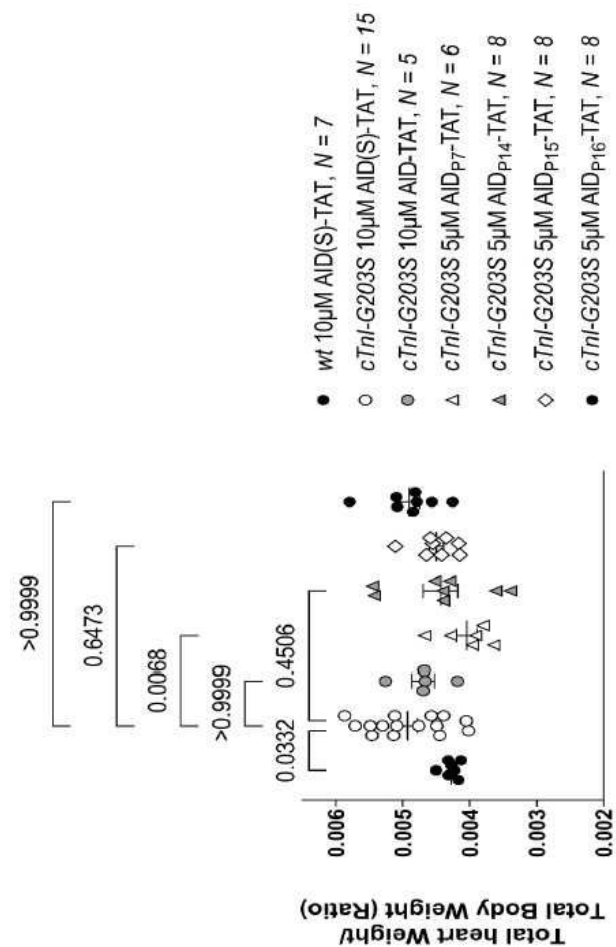
도면15h



도면15i



도면15j



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> University of Western Australia
- <120> PEPTIDES FOR USE IN THE TREATMENT OR PREVENTION OF MYOCARDIAL DAMAGE
- <130> 289086
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Unknown
- <220><223> AID Peptide
- <400> 1

Gln Gln Leu Glu Glu Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln

1 5 10 15

Ala Glu

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220

><223> Variant AID Peptide

<400> 2

Gln Gln X Glu Glu X Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln

1 5 10 15

Ala Glu

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> TAT Peptide

<400> 3

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Zaa

1 5

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P7

<400> 4

Gln Gln Gln Glu Glu Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln

1 5 10 15

Ala Glu

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Varian P14

<400> 5

Gln Gln Glu Glu Glu Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln

1 5 10 15

Ala Glu

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P15

<400> 6

Gln Gln Glu Glu Glu Asp Glu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln

1 5 10 15

Ala Glu

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P16

<400> 7

Gln Gln Arg Glu Glu Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln

1 5 10 15

Ala Glu

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Nuclear Localisation Signal

<400> 8

Gly Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Protein transduction domain

<400

> 9

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> AID [S] Peptide

<400> 10

Gln Lys Ile Leu Gly Glu Trp Asp Leu Ala Gln Tyr Thr Asp Gln Glu

1 5 10 15

Leu Glu

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P1

<400> 11

Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln Ala Glu

1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P4

<400> 12

Leu Glu Glu Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln Ala Glu

1 5 10 15

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P6

<400> 13

Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln Ala Glu

1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P10

<400> 14

Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P11

<400> 15

Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr Gln

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P12

<400> 16

Asp Leu Lys Gly Tyr Leu Asp Trp Ile Thr

1 5 10

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Variant P13

<400> 17

Gln Gln Leu Glu Glu Asp Leu Lys Gly Phe Leu Asp Ala Ala Thr Gln

1 5 10 15

Ala Glu