



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0148133
(43) 공개일자 2016년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/53 (2013.01)
A61K 47/48169 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0084521
(22) 출원일자 2015년06월15일
심사청구일자 2015년06월15일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
권기환
서울특별시 강남구 압구정로 401 55동 702호 (압구정동, 한양아파트)
정지화
경기도 김포시 김포한강2로 192 303동 1804호 (장기동, 고창마을자연엔어울림아파트)
(74) 대리인
손민

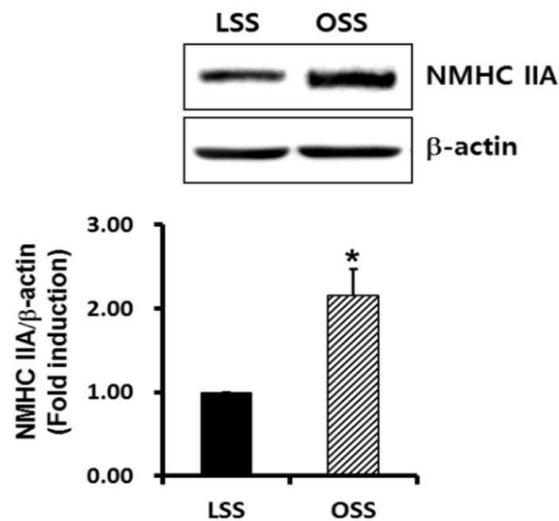
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 MNHC IIA를 이용한 심혈관계 질환 진단 및 치료방법

(57) 요약

본 발명은 NMHC IIA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 심혈관계 질환 진단용 키트, 심혈관계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제를 포함하는 약물 전달 복합체에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 NMHC IIA를 이용하면, 와류성 혈류에 의한 심혈관계 질환의 발병여부를 특이적으로 진단할 수 있으므로, 보다 효과적인 심혈관계 질환의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도11a



(52) CPC특허분류

A61K 47/48369 (2013.01)
A61K 47/48815 (2013.01)
G01N 33/533 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2800/32 (2013.01)
G01N 2800/321 (2013.01)
G01N 2800/323 (2013.01)
G01N 2800/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0019693
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업-의학첨단과학기술융합원천기술
연구과제명	혈관성형후재협착억제신기술개발(혈관재협착동물모델개발및혈관성형술후혈관재협착에 관한
임상연구)	
기 여 율	1/1
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2011.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 심혈관계질환 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 NMHC IIA는 서열번호 42의 아미노산 서열로 구성되는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 NMHC IIA의 발현수준을 측정하는 제제는 상기 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머 (aptamer)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 심혈관계 질환은 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥심장병 또는 심근경색증인 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 심혈관계 질환 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 키트는 ELISA 키트인 것인 키트.

청구항 7

(a) 검사대상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA)의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 측정된 NMHC IIA의 발현수준을 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 발현수준과 비교하는 단계를 포함하는,

심혈관계질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈관내피세포, 혈관내피세포를 포함하는 혈액 또는 혈관내피세포를 포함하는 조직인 것인 방법.

청구항 9

검사대상 개체의 생물학적 시료로부터 NMHC IIA가 세포막에 존재하는지의 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 심혈관계질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 NMHC IIA의 세포내 위치를 확인하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈관내피세포, 혈관내피세포를 포함하는 혈액 또는 혈관내피세포를 포함하는 조직인 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 확인은 항-NMHC IIA 항체를 이용한 면역형광염색법에 의하여 수행되는 것인 방법

청구항 12

NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA)에 결합할 수 있는 제제와 약물을 포함하는 심혈관계질환 치료용 약물 전달체.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 제제는 펩타이드, 항체 또는 앵타머인 것인 전달체.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 약물은 화합물, 펩타이드, 단백질, 핵산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 전달체.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 핵산은 RNA, DNA, siRNA(short interfering RNA), 앵타머, 안티센스 ODN(antisense oligodeoxynucleotide), 안티센스 RNA(antisense RNA), 리보자임(ribozyme), 디엔에이자임(DNAzyme), microRNA 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 전달체.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 심혈관계 질환은 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥심장병 또는 심근경색증인 것인 전달체.

청구항 17

제12항에 있어서,

상기 약물 전달체는 비펩타이드성 고분자 물질을 추가로 포함하는 것인 전달체.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 비펩타이드성 고분자 물질은 폴리에틸렌글리콜(PEG) 단독 중합체, 폴리프로필렌글리콜 단독 중합체, 에틸글리콜-프로필렌글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 전달체.

청구항 19

제12항에 있어서,

상기 약물 전달체는 리포솜인 것인 전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NMHC IIA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 심혈관계 질환 진단용 키트, 심혈관계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제를 포함하는 약물 전달 복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동맥경화증은 고혈압, 비만 및 당뇨병 등 다양한 위험인자들에 의한 혈관손상에서 기인한 만성 염증성 질환으로 혈관벽이 좁아지거나 막히는 질환이다. 동맥경화증은 진행됨에 따라 뇌졸중, 심근경색, 사지 허혈성 괴사 등 주요 심혈관계 질환 유발의 주원인이기도 하다. 동맥경화증의 발생에는 혈관내피세포의 기능의 유지가 중요한데, 많은 연구결과로부터 혈관내피세포의 기능을 정상으로 유지하기 위해서는 정상적인 혈류흐름(Laminar flow)에 의한 적정수준의 혈류전단응력(Shear stress)이 유지되어야 한다는 연구결과들이 보고되고 있다. 정상적인 혈류흐름인 laminar flow는 혈관내피세포에서 항동맥경화 유전자의 발현을 증가시키는 반면, 비정상적인 혈류흐름인 와류성 혈류(disturbed flow)는 동맥경화증을 촉진하는 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 실제 임상에서도 동맥경화증은 와류성 혈류가 발생하는 동맥의 분지부위, 심하게 굽어지는 부분의 안쪽 부분에 주로 발생함이 보고되었다. 이들 연구결과는 비정상적인 와류성 혈류가 혈관내피세포의 기능이상을 유도하고 동맥경화증의 중요한 유발인자라는 점을 시사하므로, 혈관내피세포의 기능이상은 동맥경화증 발생 초기 단계의 마커로서 인식되고 있다.

[0003] 최근, 비정상적인 와류성 혈류흐름을 유발시킨 동물모델로서 경동맥 부분결찰 모델이 확립되었는데, 상기 모델에서 부분 결찰된 좌측 경동맥(Left carotid artery, LCA)은 느린 와류성 혈류에 노출됨으로써 2주 이내에 동맥

경화반이 형성되며, 이로부터 좌측 경동맥 부분결찰을 통해 발생한 비정상적인 와류성 혈류는 급성으로 혈관내피세포 기능이상을 유도하여 동맥경화증의 발생을 촉진할 수 있다는 점이 보고되었다.

[0004] 이러한 동맥경화증을 효과적으로 진단하기 위한 기술을 개발하기 위하여 다양한 연구가 수행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제870233호에는 동맥경화 진단, 예방 및 치료용 펩타이드가 개시되어 있고, 국제공개특허 제2010-018870호에는 동맥 경화 병변의 검출의 정밀도를 더욱 향상시킬 수 있는 동맥 경화 진단용 폴리펩타이드 마커가 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2015-0028213호에는 기능이상(dysfunction) 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 키트가 개시되어 있다. 그러나, 이들 동맥경화증을 진단하는데 사용되는 펩타이드는 구체적인 표적 단백질이 규명되지 않아서, 상기 펩타이드를 사용하여 동맥경화증의 발병을 진단한 경우, 진단성공여부를 확인하기 위하여는 별도의 생검이 필요하다는 단점이 있었다. 이에 따라, 동맥경화증이 유발되는 혈관내피세포에서 발현되는 마커 단백질을 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 보고되지 않고 있다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 보다 효과적으로 동맥경화증을 진단할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA, Myosin-9)가 비정상적인 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포에서 발현수준이 증가될 뿐만 아니라 세포질에서 세포막으로 이동함을 확인하므로, 상기 NMHC IIA를 동맥경화증을 포함하는 다양한 심혈관계 질환의 진단용 마커로서 사용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 하나의 목적은 혈관내피세포에서 NMHC IIA를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 심혈관계 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 심혈관계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제를 포함하는 약물 전달 복합체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자들은 와류성 혈류가 혈관내피세포의 이상에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환의 발병초기에 관여할 것으로 예상하고, 이를 반영하는 동물모델인 경동맥 부분결찰 동물모델을 제작하였으며, 상기 동물모델을 이용하여 기능이상(dysfunction) 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 펩타이드, 상기 펩타이드를 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 조성물, 상기 펩타이드 또는 조성물을 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 키트 및 이의 진단 방법, 상기 펩타이드를 포함하는 약물 전달 복합체, 및 이를 이용한 심혈관계 질환의 예방 또는 치료 방법을 개발하였다(한국공개특허 제2015-0028213호). 그러나, 상기 펩타이드가 기능이상 혈관내피세포에 결합할 때, 상기 펩타이드가 실제로 결합하는 표적 단백질에 대하여는 확인하지 못하였으므로, 상기 펩타이드에 결합할 수 있는 표적단백질을 규명하였다. 그 결과, 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포에서는 NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA, Myosin-9)의 발현수준이 증가하고, 이처럼 발현수준이 증가된 NMHC IIA는 세포막으로 이동하여 상기 펩타이드와 결합함을 확인하였다.
- [0011] 따라서, 혈관내피세포에서 NMHC IIA를 검출할 수 있는 제제를 사용할 경우, 심혈관계 질환의 발병을 조기에 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 상기 NMHC IIA와 심혈관계 질환의 발병간의 상관관계는 지금까지 전혀 알려져 있지 않고, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.
- [0012] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 NMHC IIA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물을 제공한다.

- [0013] 본 발명의 용어 "NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA)"란, 마이오신 9(Myosin-9)이라고도 하고, MYH9 유전자에 의하여 발현되는 단백질을 의미한다. 상기 NMHC IIA는 다양한 질환의 진단마커로서 사용되고 있는데, 예를 들어 대장암의 간전이 진단용 마커, 성 폐쇄성 폐질환(COPD)의 급성 악화 진단용 마커 등으로 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, PRRS 바이러스의 감염을 억제하여, 상기 PRRS 바이러스의 감염억제제의 유효성분으로도 사용될 수 있다. 상기 NMHC IIA를 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다 (GenBank: NM_002473, NP_002464 등). 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 42의 아미노산 서열로 구성된 NMHC IIA를 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포에서 검출하였다.
- [0014] 본 발명의 용어 "심혈관계 질환"이란, 생체 내 순환계 시스템의 이상, 기능장애, 손상 등의 다양한 원인으로 인하여 발생하는 직접적인 질환뿐만 아니라, 이러한 직접적인 질환에 의해 파생되는 2차적 질환을 포함하는 것을 포괄적으로 의미한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 상기 정의된 광범위한 심혈관계 질환 중에서도 기능이상 혈관내피세포에 의해 유발되는 질환을 의미하는 것으로 해석될 수 있는데, 일 예로서, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥심장병, 심근경색증 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 동맥경화증이 될 수 있는데, 상기 심혈관계 질환은 혈관내피세포에서 본 발명에서 제공하는 NMHC IIA를 검출함에 의하여 그의 발병여부를 진단할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 진단은 심혈관계 질환의 발병 여부를 확인하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 용어 "NMHC IIA의 수준을 측정하는 제제"란, 혈관내피세포에서 발현되는 NMHC IIA의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미하는데, 일 예로서 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩 분석법(protein chip assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 애포타머가 될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab'')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있고, 일 예로서, NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 그의 일부가 될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 용어 "애포타머(aptamer)"란, 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는데, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있다. 상기 애포타머의 제조는 일반적인 애포타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 링커의 작용기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 -NH₂로 변형시킴으로써 이루어질 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 애포타머는 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 애포타머가 될 수 있고, 일 예로서, 상

기 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 DNA 앵타머가 될 수 있다.

- [0022] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포에서 발현되어 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 DESP가 결합할 수 있는 표적 단백질을 규명하기 위하여, HUVEC 세포에 상기 DESP의 처리여부에 따라 발현수준이 변화되는 6종의 단백질을 발굴하고(도 10a), 이들 단백질을 질량분석을 통해 동정한 결과, 상기 6종의 단백질 중 5종이 NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA, Myosin-9)임을 확인하였으며(도 10b), 상기 DESP가 NMHC IIA와 결합할 수 있는지를 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다(도 10c). 이어, 상기 NMHC IIA가 와류성 혈류에 의해 발현수준이 변화되는지를 확인한 결과, 웨스턴 블롯 분석을 통해 혈관내피세포가 와류성 혈류에 노출될 경우 그의 발현수준이 증가하고(도 11b), 세포질로부터 세포막으로 이동함을 확인하였다(도 11b).
- [0023] 따라서, 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포에서는 NMHC IIA의 발현수준이 증가하고, 이처럼 발현수준이 증가된 NMHC IIA는 세포막으로 이동하며, 상기 세포막으로 이동한 NMHC IIA는 CLIRTSIC(서열번호 3)와 결합할 수 있고, 상기 CLIRTSIC(서열번호 3)는 siRNA와 같은 생체고분자 물질을 상기 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포로 전달할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0024] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 심혈관계 질환 진단용 조성물을 포함하는 심혈관계 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 키트는 심혈관계 질환의 발병이 우려되는 개체에서 유래된 혈관내피세포로부터 시료로부터 NMHC IIA의 수준의 수준을 측정하여 심혈관계 질환의 발병여부를 진단하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 단백질의 수준을 측정하기 위한 항체, 앵타머 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.
- [0026] 본 발명의 용어 "시료"란, 심혈관계 질환이 발병된 개체에서 분리되어 NMHC IIA의 발현수준을 측정하는 직접적인 대상을 의미하고, 일 예로서 심혈관계 질환이 발병된 환자의 혈관내피세포 또는 상기 혈관내피세포를 포함하는 혈액, 조직시료 등이 될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 용어 "개체"란 심혈관계 질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0028] 구체적인 일 예로서, 본 발명의 키트는 NMHC IIA의 수준을 측정하기 위한 ELISA 키트가 될 수 있는데, 상기 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, NMHC IIA의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기재는 특별히 이에 제한되지 않으나 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC, RITC 등이 될 수 있고, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 될 수 있다.
- [0029] 다른 예로서, 본 발명의 키트는 음성 및 양성 대조군 반응을 수행하는데 필요한 시약 또는 혼성화 반응에 필요한 완충액과 같은 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 컴파트먼트에 상술한 성분들을 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명은 또 다른 양태로서, 생물학적 시료로부터 NMHC IIA의 발현수준을 측정하거나 또는 세포내 위치를 확인

하여 심혈관계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

- [0031] 일 예로서, 본 발명에서 제공하는 심혈관계질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 (a) 검사대상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA)의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 NMHC IIA의 발현수준을 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 발현수준과 비교하는 단계를 포함하는 방법이 될 수 있다.
- [0032] 상기 방법에 있어서, 상기 생물학적 시료에서 측정된 NMHC IIA의 수준이 정상 개체의 생물학적 시료로부터 측정된 수준과 비교하여 유의하게 증가하는 경우에는 상기 검사대상 개체에서 심혈관계 질환이 발병하였다고 판정할 수 있고, 유의하게 증가하지 않은 경우에는 상기 개체에서 심혈관계 질환이 발병하지 않았다고 판정할 수 있다. 이때, 상기 생물학적 시료는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 혈관내피세포, 혈관내피세포를 포함하는 혈액, 혈관내피세포를 포함하는 조직 등이 될 수 있고, 상기 NMHC IIA의 수준을 측정하는 방법은 상술한 바와 동일하다.
- [0033] 다른 예로서, 본 발명에서 제공하는 심혈관계질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 NMHC IIA의 세포내 위치를 확인하는 방법은 검사대상 개체의 생물학적 시료로부터 NMHC IIA가 세포막에 존재하는지의 여부를 확인하는 단계를 포함하는 방법이 될 수 있다. 이때, 상기 생물학적 시료는 상술한 바와 동일하고, 상기 NMHC IIA가 세포막에 존재하는지의 여부를 확인하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 항-NMHC IIA 항체를 이용한 면역형광염색법 등을 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 방법에 있어서, 검사대상 개체로부터 유래된 생물학적 시료의 세포막 부위에 NMHC IIA가 존재하는 것으로 확인된 경우에는 상기 검사대상 개체에서 심혈관계 질환이 발병하였다고 판정할 수 있고, 상기 세포막 부위에 NMHC IIA가 존재하지 않는 것으로 확인된 경우에는 상기 검사대상 개체에서 심혈관계 질환이 발병하지 않았다고 판정할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 또 다른 양태로서, NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA)에 결합할 수 있는 제제와 약물을 포함하는 심혈관계질환 치료용 약물 전달체를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 용어 "NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제"란, 혈관내피세포에서 발현되는 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 제제를 의미하는데, 일 예로서 펩타이드, 항체 또는 앵타머가 될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 용어 "약물 전달체"란, 상기 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제와 심혈관계 질환의 발병원인이 되는 NMHC IIA가 발현된 세포 또는 조직에 전달하고자 하는 약물이 결합되어, 상기 NMHC IIA이 발현된 조직 또는 세포로 상기 약물을 전달할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 약물 전달체는 심혈관계 질환을 치료하는 용도로 사용될 수 있는데, 상기 심혈관계 질환은 상술한 바와 동일하다.
- [0039] 본 발명의 용어 "약물"이란, 상기 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제를 통해 상기 NMHC IIA이 발현되는 세포 또는 조직으로 전달될 수 있는 심혈관계질환에 대한 치료학적 효과를 갖는 물질을 의미한다. 상기 약물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 심혈관계 질환의 예방 또는 치료효과를 나타내는 유효성분으로서 각종 심혈관계 질환 특이적인 치료제일 수 있고, 다른 예로서 심혈관계 질환의 예방 또는 치료효과를 나타내는 화합물, 펩타이드, 단백질, 핵산 또는 이들의 조합이 될 수 있으며, 또 다른 예로서 동맥경화증을 촉진하는 인자로 알려진 대표적인 세포접착분자인 VCAM-1 또는 ICAM-1의 발현을 특이적으로 억제하는 효과를 나타내는 RNA, DNA, siRNA(short interfering RNA), 앵타머, 안티센스 ODN(antisense oligodeoxynucleotide), 안티센스 RNA(antisense RNA), 리보자임(ribozyme), 디엔에이자임(DNAzyme), microRNA 또는 이들의 조합인 핵산이 될 수 있다.

[0040] 한편, 본 발명에서 제공하는 약물 전달체는 상기 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제와 약물을 효과적으로 결합시킬 수 있는 비펩타이드성 고분자 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 용어 "비펩타이드성 고분자 물질"이란, 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체적합성 고분자 물질을 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩티드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결될 수 있고, 이들의 분자량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 1 내지 100 kDa이 될 수 있고, 다른 예로서 1 내지 20 kDa이 될 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 비펩타이드성 고분자 물질은 상기 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제와 약물에 각각 결합하여, 상기 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제와 약물이 직접적으로 결합할 수 없는 경우에도, 상기 약물 전달체를 형성할 수 있도록 하는 역할을 수행하는데, 이를 위하여 상기 비펩타이드성 고분자 물질은 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제 및 약물과 각각 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있다. 상기 비펩타이드성 고분자 물질에 포함된 반응기는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 알데히드기, 프로피온알데히드기, 부틸알데히드기, 말레이미드(maleimide)기, 석시니미드(succinimide) 등이 될 수 있고, 특히, 상기 반응기가 알데히드기인 경우에는 비특이적 반응을 최소화하여 상기 비펩타이드성 고분자 물질이 보다 효과적으로 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제와 약물에 결합할 수 있다. 또한, 상기 반응기는 비펩타이드성 고분자 물질에 한 종류가 단독으로 포함되거나 또는 다양한 종류가 복합적으로 포함될 수 있는데, 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드기를, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온알데히드기 또는 부틸알데히드기를 가질 수도 있고, 양쪽 말단에 히드록시기를 동일하게 포함할 수도 있다.

[0043] 상기 반응기를 포함하는 비펩타이드성 고분자 물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락트-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질중합체, 키틴류, 히아루론산 등이 될 수 있고, 다른 예로서 폴리에틸렌글리콜이 될 수 있다. 뿐만 아니라, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 서열번호 3 또는 9의 아미노산 서열을 갖는 DESPs가 와류성 혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에 특이적으로 결합하고(도 8), 이 중에서도 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 DESP가 siRNA와 결합된 복합체는 와류성 혈류 조건에서 배양된 HUVEC 세포에 상기 siRNA를 특이적으로 전달할 수 있으며(도 9a), 경동맥 부분결찰 동물모델의 혈관내피세포로 상기 siRNA를 전달할 수 있음을 확인하였다(도 9b).

[0045] 상기 결과로부터, 본 발명에서 제공하는 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제가 와류성 혈류에 의하여 영향을 받은 혈관내피세포로의 약물 또는 유전자 전달을 위한 전달체가 될 수 있으며, 따라서 초기 동맥경화증 병소의 기능 이상 혈관내피세포로 목적하는 약물 또는 유전자의 특이적 국소 전달에 유용할 수 있음을 알 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명에서 제공하는 NMHC IIA를 이용하면, 심혈관계 질환의 발병여부를 특이적으로 진단할 수 있으므로, 보다 효과적인 심혈관계 질환의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1a는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥의 혈관내피세포에서 발현되는 항염증 유전자인 eNOS와 KLF2의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥의 혈관내피세포에서 발현되는 염증유발 유전자인 VCAM-1과 ICAM-1의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 현미경사진 및 그래프이다.

도 1c는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥에서 동맥경화반의 형성여부를 나타내는 현미경 사진이다.

도 2a는 좌측 경동맥(Left Carotid Artery, LCA)에서 얻어진 각 라운드별로 검출된 파지의 수와 우측 경동맥(Right Carotid Artery, RCA)에서 얻어진 각 라운드별로 검출된 파지의 수를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 각 장기에서 파지 디스플레이 패닝을 수행하고, 이로부터 얻어진 파지의 수를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3a는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 형태변화를 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

도 3b는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 염증관련 유전자의 발현수준 변화를 확인한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3c는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 형태변화를 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

도 3d는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 염증관련 유전자의 발현수준 변화를 확인한 결과를 나타내는 사진이다.

도 4a는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

도 4b는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

도 4c는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4d는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5a는 6종의 DESPs를 발현시키는 파지를 투여하고 면역염색을 통해 이들이 좌측 경동맥(LCA)과 우측 경동맥(RCA)에 대한 결합여부를 확인한 결과를 나타내는 형광사진이다.

도 5b는 혈관 내 결합된 파지의 내재화를 나타내는 것으로, 혈관의 표면 상에 결합된 파지(백색 화살표)를 공초점현미경으로 z 스택 이미지화(z stack imaging)에 의해 확인하였다(적색: 파지, 청색: 핵, 녹색: 혈관의 탄력층).

도 5c는 마우스에서 선발된 DESP-발현 파지의 생체분포를 나타낸 것으로, 조직 내 귀소 파지의 정량을 위해 경동맥을 비롯한 다양한 장기를 적출하고 파지 개수의 적정을 위해 균질화하였다. 막대는 3회의 개별 실험의 평균 $\pm$ SD로서 EC의 총 개수에 대한 결합된 파지의 비율을 나타내는 것이다. *는 간 및 비장을 제외한 다른 장기와 비교한 유의미한 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

도 5d는 상기 좌측 경동맥(LCA)에 결합된 CLIRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 각 파지가 다른 장기에 대하여도 결합할 수 있는지를 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6a는 대동맥 조직의 해부학적 영역을 나타내는 사진이다.

도 6b는 DESPs의 일종인 CLIRTSIC(서열번호 3)와 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 각각 발현시키는 파지가 대동맥 조직에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진이다.

도 6c는 대동맥의 branch 부위의 해부학적 영역을 나타내는 사진이다.

도 6d는 DESPs의 일종인 CPRRSHPIC(서열번호 9)와 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 각각 발현시키는 파지가 대동맥의 branch 조직에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진이다.

도 7a는 분리된 인간 폐동맥의 전체 형태(상부)를 나타낸 것으로, 인간 폐동맥을 중심점에서 곧은(straight) L 부분과 가지를 갖는 R 부분으로 구분하였다(하부).

도 7b는 DESPs의 일종인 CLIRTSIC(서열번호 3)를 발현시키는 파지가 폐동맥 조직에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진으로서, a는 와류성 혈류가 발생하는 영역을 나타내고, b는 정상혈류가 발생하는 영역을 나타내며, c는 branch 영역을 나타낸다.

도 7c는 DESPs의 일종인 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 파지가 폐동맥 조직에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진으로서, a는 와류성 혈류가 발생하는 영역을 나타내고, b는 정상혈류가 발생하는 영역을 나타내며, c는 branch 영역을 나타낸다.

도 8은 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 있어서, LSS 또는 OSS 조건에 따른, DESPs의 일종인 CLIRTSIC(서열번호 3) 또는 CPRRSHPIC(서열번호 9)의 결합수준을 비교한 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다.

도 9a는 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 다양한 고분자 물질(BPEI-SS-PEG-siGLO)을 도입한 결과를 나타내는 형광현미경 사진으로서, siGLO는 음성 대조군을 나타내고, Lipofectamine-siGLO는 양성 대조군을 나타낸다.

도 9b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 우측 경동맥(RCA)와 좌측 경동맥(LCA)에서 BPEI-SS-PEG 또는 BPEI-SS-PEG-siICAM1의 도입에 따른 ICAM1의 mRNA 수준변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10a는 HUVEC 세포에 바이오틴이 표지된 CLIRTSIC의 처리여부에 따라, 발현수준이 변화된 단백질을 검출한 결과를 나타내는 사진, 그래프 및 도표이다.

도 10b는 HUVEC 세포에 대한 바이오틴이 표지된 CLIRTSIC(서열번호 3)의 처리여부에 따라 발현수준이 변화된 6종 단백질을 질량분석하여 동정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10c는 바이오틴이 표지된 CLIRTSIC(서열번호 3)를 이용하여 면역침강된 HUVEC 세포유래 단백질과 항-NMHC IIA 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석결과를 나타내는 사진이다.

도 11a는 LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 발현된 NMHC IIA의 발현수준에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 11b는 LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포를 대상으로 항-NMHC IIA 항체를 이용한 면역형광염색을 수행한 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 실시예 1: 기능이상 혈관내피세포에 특이적인 펩타이드의 발굴

[0050] 혈류전단응력을 변화시킨 동물모델로서 경동맥 부분결찰 동물모델을 사용하여 혈류전단응력을 제공하는 와류성 혈류에 의해 유도되는 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합하여 상기 기능이상 혈관내피세포를 검출할 수 있는 새로운 펩타이드를 발굴하고자 하였다.

[0051] 실시예 1-1: 경동맥 부분결찰 동물모델의 제작

[0052] 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스의 좌측 경동맥(Left carotid artery, LCA)의 가지 중에서 상갑상샘동맥(superior thyroid artery)을 제외한 나머지 동맥혈관들을 결찰하여, 경동맥 부분결찰 동물모델을 제작하였다. 상기 제작된 동물모델은 결찰된 좌측 경동맥이 급격하게 느린 와류성 혈류에 노출되어 혈관내피세포의 기능 이상이 유발되고, 2주 이내에 급성으로 동맥경화증이 유발됨을 확인하였다.

- [0053] 이어, 상기 마우스의 좌측 경동맥(LCA) 및 우측 경동맥(RCA)의 각 혈관내피세포로부터 각각의 RNA를 분리하여 항염증 유전자인 eNOS와 KLF2의 발현수준을 RT-PCR을 통해 분석하였다(도 1a).
- [0054] 도 1a는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥의 혈관내피세포에서 발현되는 항염증 유전자인 eNOS와 KLF2의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1a에서 보듯이, 항염증 유전자는 정상 혈관인 RCA에 비하여 부분결찰된 LCA에서 매우 낮은 수준으로 발현됨을 확인하였다.
- [0055] 또한, 상기 마우스의 좌측 경동맥(LCA) 및 우측 경동맥(RCA)의 각 혈관내피세포로부터 각각의 RNA를 분리하여 염증유발 유전자인 VCAM-1과 ICAM-1의 발현수준을 분석하였다(도 1b).
- [0056] 도 1b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥의 혈관내피세포에서 발현되는 염증유발 유전자인 VCAM-1과 ICAM-1의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 현미경사진 및 그래프이다. 도 1b에서 보듯이, 염증유발 유전자는 정상 혈관인 RCA에 비하여 부분결찰된 LCA에서 매우 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.
- [0057] 끝으로, 상기 마우스의 좌측 경동맥(LCA) 및 우측 경동맥(RCA)에서 동맥경화반의 형성여부를 확인하였다(도 1c).
- [0058] 도 1c는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥에서 동맥경화반의 형성여부를 나타내는 현미경사진이다. 도 1c에서 보듯이, 정상 혈관인 RCA에서는 동맥경화반이 형성되지 않았으나, 부분결찰된 LCA에서는 동맥경화반이 형성됨을 확인하였다.
- [0059] 따라서, 상기 제작된 경동맥 부분결찰 동물모델은 동맥경화 동물모델로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0060] 실시예 1-2: 파지 디스플레이 패닝

- [0061] Ph.D-C7C phage display peptide library kit(New England Biolabs, Inc.)를 사용하여 파지 디스플레이 패닝을 수행하였다.
- [0062] 상기 실시예 1-1에서 제작된 경동맥 부분결찰 동물모델을 대상으로, 경동맥 부분 결찰 3일 후에 마우스의 꼬리 정맥에 1×10^{11} pfu의 파지를 주사하고, 10분간 생체내 패닝을 수행하였다. 이어, 상기 동물모델을 마취시키고, 생리식염수를 주사하여 결합되지 않은 파지를 제거하였다. 산성의 파지 용출액을 가하여 경동맥의 혈관내피세포에 결합된 파지를 분리시키고, 분리된 파지를 대장균에 감염시킨 다음, 파지수를 계수하고, 증폭시켜서 1라운드를 완료하고, 이를 3회 반복하여 총 3라운드를 수행하였다(도 2a).
- [0063] 도 2a는 좌측 경동맥(Left Carotid Artery, LCA)에서 얻어진 각 라운드별로 검출된 파지의 수와 우측 경동맥(Right Carotid Artery, RCA)에서 얻어진 각 라운드별로 검출된 파지의 수를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2a에서 보듯이, 부분결찰이 수행된 좌측 경동맥(LCA)에서 파지 디스플레이 패닝을 수행하여 얻어진 파지의 수는 3라운드를 거친 후에 급격히 증가하였으나, 부분결찰이 수행되지 않은 우측 경동맥(RCA)에서 파지 디스플레이 패닝을 수행하여 얻어진 파지의 수는 별다른 변화를 나타내지 않음을 확인하였다.
- [0064] 한편, 상기 경동맥 부분결찰 동물모델의 각 장기(간, 비장, 심장, 폐, 신장, 뇌, 근육, LCA 또는 RCA)를 대상으로, 파지 디스플레이 패닝을 수행하고, 그 결과를 비교하였다(도 2b).
- [0065] 도 2b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 각 장기에서 파지 디스플레이 패닝을 수행하고, 이로부터 얻어진 파지의 수를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2b에서 보듯이, 다수의 내피세포를 포함하는 세망내피계에 속하는 간과 비장을 제외한 장기 중에서, LCA에서 가장 높은 수준의 파지가 검출됨을 확인하였다.
- [0066] 상기 패닝을 수행하여 수득한 파지를 대장균에 감염시키고, 감염된 대장균을 LB/IPTG/X-gal 고형배지에 접종 및

배양하여 푸른색 콜로니를 수득하였다. 상기 수득한 콜로니를 배양하고 이로부터 과지 DNA를 수득한 다음, 수득한 과지 DNA의 서열을 결정하여 이로부터 발현되는 펩타이드의 아미노산 서열을 확인하였다. 결정된 서열을 비교하여, 부분 결찰한 좌측 경동맥에만 존재하거나 우측 경동맥에 비해 좌측 경동맥에 더 많이 존재하는 펩타이드를 선별하였다(표 1).

표 1

마우스모델의 LCA와 RCA에서 측정된 펩타이드의 빈도

서열번호	펩타이드	LCA	RCA	서열번호	펩타이드	LCA	RCA
1	CKMTRSTIC	29	22	21	CRTKLRLKC	1	
2	CKIMISISC	19	30	22	CHMQIMHRC	1	
3	CLIRRTSIC	8	2	23	CTRMMLRIC	1	
4	CPLLTCLKC	8	4	24	CTPRQTRMC	1	
5	CTHRSTPC	7	5	25	CMLNITRRC	1	
6	CHIPSIHSC	8	8	26	CRKLPRISC	1	
7	CQMLIRRC	4	4	27	CPLQPKSIC	1	
8	CNLLRTQC	5	1	28	CPIRHRPIC	1	
9	CPRRSHPIC	4		29	CRTMRIRLC	1	
10	CLHPPLTLC	6	2	30	CMRQRNRRC		2
11	CKMNRILSC	2		31	CPRRLKRC		1
12	CILRKIRPC	4	4	32	CHQLPIRPC		1
13	CSRRPTSIC	1	1	33	CPIKTTITC		1
14	CLIRLILQC	1	2	34	CRRQTSTHC		1
15	CRMRTLRC	1	1	35	CNPMTRLIC		2
16	CQPHHSIIC	1	1	36	CPIRHRPIC		1
17	CSTHPSHC	1	1	37	CTLHKSRSC		1
18	CILRRRKRC	1	1	38	CTRIISNTC		1
19	CSIRIHRRC	1		39	CKLINTLKC		1
20	CSLRRHPIC	1		40	CQMTRSTIC		1

상기 표 1에서 보듯이, LCA 에서만 높은 수준으로 존재하거나, RCA에 비하여 LCA에서 현저하게 수준이 증가되는 펩타이드를 검출한 결과, 서열번호 3, 4, 5, 8, 9 또는 10의 펩타이드가 LCA 에서만 높은 수준으로 존재하거나, RCA에 비하여 LCA에서 현저하게 수준이 증가되는 펩타이드임을 확인하였다.

실시예 1-3: 발굴된 펩타이드가 기능이상 혈관내피세포에 미치는 효과 검증

상기 실시예 1-2에서 발굴된 6종의 펩타이드가 기능이상 혈관내피세포에 대해 특이성을 나타내는지의 여부를, 혈관내피세포의 일종인 iMAEC 및 HUVEC를 사용하여 확인하고자 하였다.

먼저, 마우스 동맥 내피세포인 iMAEC를 DMEM 배지(10% FBS, 50 g/ml ECGS(endothelial cell growth supplement) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신)에 접종하고, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

또한, 사람 체대정맥 내피세포인 HUVEC를 Medium 200 배지(5% FBS 및 LSGS(low-serum growth))에 접종하고, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

상기 포화배양된 iMAEC 및 HUVEC에 cone and plate viscometer를 사용하여 혈류전단응력을 가하였다. 이때, 혈류전단응력은 정상 혈류와 유사한 LSS(laminar shear stress)를 25 dyne/cm²로 가하거나 또는 비정상 혈류와 유사한 OSS(oscillatory shear stress)를 ±5 dyne/cm²로 가하는 조건하에서 48시간 동안 처리하고, 이에 의하여

혈관내피세포가 받는 영향을 분석하였다(도 3a 내지 3d).

- [0074] 도 3a는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 형태변화를 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 도 3a에서 보듯이, 정상적인 혈류흐름인 LSS 상태에서 혈관내피세포는 전단응력 흐름의 방향과 같은 방향으로 형태가 길어지는 것을 관찰할 수 있었지만, 비정상적인 OSS 상태에서는 불규칙한 방향성을 나타내었다.
- [0075] 도 3b는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 염증관련 유전자의 발현수준 변화를 확인한 결과를 나타내는 사진이다. 도 3b에서 보듯이, LSS 상태에서는 eNOS와 KLF2와 같은 항염증 유전자의 발현이 증가하는 반면, OSS 상태에서는 VCAM1, ICAM1, MCP1과 같은 염증유발 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다.
- [0076] 도 3c는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 형태변화를 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 도 3c에서 보듯이, 마우스 동맥 내피세포인 iMAEC 에서 확인된 것과 동일하게, 정상적인 혈류흐름인 LSS 상태에서 혈관내피세포는 전단응력 흐름의 방향과 같은 방향으로 형태가 길어지는 것을 관찰할 수 있었지만, 비정상적인 OSS 상태에서는 불규칙한 방향성을 나타내었다.
- [0077] 도 3d는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 염증관련 유전자의 발현수준 변화를 확인한 결과를 나타내는 사진이다. 도 3d에서 보듯이, 마우스 동맥 내피세포인 iMAEC 에서 확인된 것과 동일하게, LSS 상태에서는 eNOS와 KLF2와 같은 항염증 유전자의 발현이 증가하는 반면, OSS 상태에서는 VCAM1, ICAM1, MCP1과 같은 염증유발 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다.
- [0078] 한편, 상기 배양된 2종의 세포에, 상기 실시예 1-2에서 발굴된 6종의 펩타이드 각각을 발현하는 파지를 6×10^6 pfu씩 가하여 1시간 동안 반응시킨 다음, PBS로 세척하여 결합하지 않은 파지를 제거하였다. 이어, 상기 각 내피세포를 4% 파라포름알데히드 용액으로 고정시키고, PBS로 세척하였으며, 0.2% Triton-X가 포함된 PBS를 20분 동안 가하여 천공시키고, 다시 PBS로 세척하였다. 그런 다음, 10% 당나귀 혈청 용액을 가하고 1시간 동안 블로킹시켰으며, M13 박테리오파지에 대한 1차항체를 가한 다음 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, PBS로 세척하였다. 이어, 2차항체인 당나귀의 항-마우스 IgG 항체-FITC를 가하고 30분간 실온에서 반응시켰으며, DAPI로 대조염색을 실시하였다. 끝으로, 공초점 현미경을 사용하여 전단응력이 가하여 지지 않은 안정상태, LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 혈관내피세포에 대한 파지의 결합수준을 비교하였다(도 4a 내지 4d).
- [0079] 도 4a는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 도 4a에서 보듯이, 상기 iMAEC 세포에는 CLIRRTSIC(서열번호 3), CNLLRTQC(서열번호 8) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 파지가 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 그 결합이 증가됨을 확인하였다.
- [0080] 도 4b는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 도 4b에서 보듯이, 상기 HUVEC 세포에는 CLIRRTSIC(서열번호 3), CNLLRTQC(서열번호 8), CPRRSHPIC(서열번호 9) 및 CLHPPLTLC(서열번호 10)를 발현시키는 파지가 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 그 결합이 증가됨을 확인하였다.
- [0081] 도 4c는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4c에서 보듯이, 정도의 차이는 있으나, 상기 6종의 펩타이드를 발현시키는 파지는 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 그 결합이 증가됨을 확인하였다.
- [0082] 도 4d는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4d에서 보듯이, 정도의 차이는 있으나, 상기 6종의 펩타이드를 발현시키는 파지는 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 그 결합이 증가됨을 확인하였다.
- [0083] 따라서, 상기 결과를 종합하면, 상기 발굴된 6종의 펩타이드는 기능이상 혈관내피세포에 특이적인 펩타이드(Dysfunctional Endothelial cells-Specific Peptides, DESPs)임을 알 수 있었다.

[0084] **실시예 1-4: 경동맥 부분결찰 동물모델을 이용한 DESPs의 효과검증**

[0085] 경동맥 부분결찰 동물모델의 혈관에 상기 6종의 DESPs를 발현시키는 파지를 투여하고, 10 U/ml의 헤파린을 포함하는 생리식염수로 체내를 세척하였으며, 4% 파라포름알데히드 용액으로 고정시킨 다음, 생리식염수로 다시 세척하고, 좌측 경동맥(LCA), 우측 경동맥(RCA) 및 대동맥을 적출하였으며, 적출된 조직을 PBS로 세척하였다. 상기 세척된 조직을 대상으로 하고, 2차 항체로서 당나귀의 항-마우스 IgG-R 항체를 사용하며, 2차 항체를 2시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-3과 동일한 방식으로 면역염색하였다. 공초점 현미경을 사용하여 부분 결찰된 좌측 경동맥, 결찰되지 않은 우측 경동맥 및 대동맥의 혈관내피세포에 대한 파지의 결합수준을 비교하였다(도 5a 내지 5d).

[0086] 도 5a는 6종의 DESPs를 발현시키는 파지를 투여하고 면역염색을 통해 이들이 좌측 경동맥(LCA)과 우측 경동맥(RCA)에 대한 결합여부를 확인한 결과를 나타내는 형광사진이다. 도 5a에서 보듯이, CLIRRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 각 파지는 부분결찰된 LCA에 특이적으로 결합하는 반면, 정상적인 RCA에는 결합하지 않음을 확인하였다.

[0087] 도 5b는 혈관 내 결합된 파지의 내재화를 나타내는 것으로, 혈관의 표면 상에 결합된 파지(백색 화살표)를 공초점현미경으로 z 스택 이미지화(z stack imaging)에 의해 확인하였고(적색: 파지, 청색: 핵, 녹색: 혈관의 탄력층), 도 5c는 마우스에서 선발된 DESP-발현 파지의 생체분포를 나타낸 것으로, 조직 내 귀소 파지의 정량을 위해 경동맥을 비롯한 다양한 장기를 적출하고 파지 개수의 적정을 위해 균질화하였다. 막대는 3회의 개별 실험의 평균±SD로서 EC의 총 개수에 대한 결합된 파지의 비율을 나타내는 것이다. *는 간 및 비장을 제외한 다른 장기와 비교한 유의미한 차이를 나타낸다($p < 0.05$). 도 5b 및 5c에서 보듯이, 상기 좌측 경동맥(LCA)에 결합된 파지는 혈관의 표면에 결합되어 있음을 확인하였다.

[0088] 도 5d는 상기 좌측 경동맥(LCA)에 결합된 CLIRRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 각 파지가 다른 장기에 대하여도 결합할 수 있는지를 확인한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 5d에서 보듯이, 세망내피계에 속하는 간과 비장을 제외한 장기 중에서, LCA에서 가장 높은 수준의 파지가 검출됨을 확인하였다.

[0089] **실시예 1-5: 대동맥 조직을 이용한 DESPs의 효과검증**

[0090] 상기 경동맥 부분결찰 동물경화증 동물모델은 인위적으로 와류성 혈류를 유도하여 만든 급성 모델이기 때문에, 해부/생리학적으로 항상 다양한 혈류전단응력에 노출되어 있는 대동맥 조직을 대상으로 상기 DESPs가 결합되는 부위를 확인하고자 하였다. 일반적으로, 대동맥 조직은 크게 branch, GC(Greater curvature), LC(Lesser curvature) 및 TA(Thoracic aorta)의 영역으로 구분되는데, 상기 branch와 LC 영역에서는 와류성 혈류가 발생하고, GC와 TA 영역에서는 정상적인 혈류가 발생한다고 알려져 있다(도 6a). 도 6a는 대동맥 조직의 해부학적 영역을 나타내는 사진이다.

[0091] 먼저, 상기 경동맥 부분결찰 동물경화증 동물모델에서 대동맥을 적출하고, 상기 적출된 대동맥의 각 부위에 3×10^{11} pfu의 DESP를 발현하는 파지를 가하여 37°C에서 3시간동안 반응시킨 다음, 세척하여 결합되지 않은 파지를 제거하였다. 이어, 상기 대동맥을 대상으로 하고, 2차 항체로서 항-마우스 IgG-R 항체를 사용하며, 2차 항체를 2시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-3과 동일한 방식으로 면역염색하였다. 형광현미경을 사용하여 대동맥 조직에 대한 파지의 결합수준을 비교하였다(도 6b 내지 6d).

[0092] 도 6b는 DESPs의 일종인 CLIRRTSIC(서열번호 3)와 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 각각 발현시키는 파지가 대동맥 조직에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진으로서, 본 발명에서 제공하는 6종의 DESPs 중에서 CLIRRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)가 대동맥 조직에 결합되고, 상기 대동맥 조직 중에서도 와류성 혈류가 발생하는 LC 영역에 결합됨을 확인하였다.

[0093] 또한, 대동맥 조직에서 와류성 혈류가 발생하는 branch 영역은 branch orifice에서 가까운 부위(Near Areas (NA) of orifice of branch vessels)를 NA-1과 NA-2로, 먼 부위(Distant area)를 DA로 구분하였는데, 상기의 NA-1과 NA-II는 와류성 혈류가 발생하고, DA 영역에서는 정상적인 혈류가 발생한다고 알려져 있다(도 6c). 도

6c는 대동맥의 branch 부분의 해부학적 영역을 나타내는 사진이다.

[0094] 도 6d는 DESPs의 일종인 CLIRTSIC(서열번호 3)와 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 각각 발현시키는 파지가 대동맥 조직의 branch 영역에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진으로서, 본 발명에서 제공하는 6종의 DESPs 중에서 CLIRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)가 대동맥의 branch 영역 중에서도 와류성 혈류가 발생하는 NA-1과 NA-II 영역에 결합됨을 확인하였다.

[0095] 따라서, 상기 2종의 DESPs는 와류성 혈류에 의해 유도되는 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있음을 알 수 있었다.

[0096] **실시예 1-6: DESPs가 결합되는 동맥내 위치 확인**

[0097] 상기 실시예 1-5의 결과로부터, 2종의 DESPs를 발현시키는 파지가 대동맥 조직 중에서도 와류성 혈류가 발생하는 LC와 branch 영역에 결합됨을 확인하였으므로, 상기 인간의 폐동맥을 대상으로 하여 정상혈류(LSS)와 와류성 혈류(OSS)가 발생하는 부위에 대한 상기 2종의 DESPs를 발현시키는 파지의 결합특이성을 확인하고자 하였다.

[0098] 이를 위하여 사람의 폐동맥을 중심점에서 곧은(straight) L 부분과 가지를 갖는 R 부분으로 구분하였다(도 7a). 도 7a는 분리된 사람의 폐동맥의 형태(상부)를 나타낸 것으로, 인간 폐동맥을 중심점에서 곧은(straight) L 부분과 가지를 갖는 R 부분으로 구분하였다(하부).

[0099] 구체적으로, 폐절제술을 받은 환자로부터 적출된 사람의 폐동맥으로부터 동결절편을 수득하고, 수득한 동결절편에 3×10^{11} pfu의 DESP를 발현하는 파지를 가하여 37℃에서 3시간동안 반응시킨 다음, 세척하여 결합되지 않은 파지를 제거하였다. 이어, 상기 동결절편을 대상으로 하고, 2차 항체로서 항-마우스 IgG-R 항체를 사용하며, 2차 항체를 2시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-3과 동일한 방식으로 면역염색하였다. 형광현미경을 사용하여 인간의 대동맥 조직에 대한 파지의 결합수준을 비교하였다(도 7b 및 7c).

[0100] 도 7b는 DESPs의 일종인 CLIRTSIC(서열번호 3)를 발현시키는 파지가 폐동맥 조직에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진으로서, a는 와류성 혈류가 발생하는 영역을 나타내고, b는 정상혈류가 발생하는 영역을 나타내며, c는 branch 영역을 나타낸다.

[0101] 도 7c는 DESPs의 일종인 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 파지가 폐동맥 조직에 결합된 상태를 나타내는 형광현미경 사진으로서, a는 와류성 혈류가 발생하는 영역을 나타내고, b는 정상혈류가 발생하는 영역을 나타내며, c는 branch 영역을 나타낸다.

[0102] 도 7b 및 7c에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 6종의 DESPs 중에서 CLIRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)가 사람의 폐동맥 조직에 결합되고, 상기 폐동맥 조직 중에서도 와류성 혈류가 발생하는 영역과 branch 영역에 결합됨을 확인하였다.

[0103] 따라서, 상기 2종의 DESPs는 마우스의 혈관내피세포 뿐만 아니라 사람의 혈관내피세포에도 결합할 수 있음을 알 수 있었다.

[0104] **실시예 2: DESPs를 이용한 혈관내피세포로의 siRNA 전달**

[0105] 상기 실시예 1의 결과로부터, 서열번호 3 또는 9의 아미노산 서열을 갖는 DESPs가 마우스 뿐만 아니라 사람의 혈관내피세포에 결합할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 DESPs를 사용하여 혈관내피세포에 특정 단백질의 발현을 억제할 수 있는 siRNA를 전달할 수 있는지에 대하여 확인하고자 하였다.

[0106] 실시예 2-1: HUVEC 세포에 대한 DESPs의 결합활성 분석

[0107] 상기 서열번호 3 또는 9의 아미노산 서열을 갖는 DESPs를 각각 합성하고, 이들 각 DESPs에 바이오틴을 표지하였다. 이어, LSS 또는 OSS 상태에서 48시간 동안 배양된 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 상기 바이오틴이 표지된 각 DESPs를 20 μ M의 수준으로 가하고, 4시간 동안 반응시킨 후, 상기 실시예 1-3과 동일한 방식으로 면역염색을 수행하였다. 상기 면역염색된 HUVEC 세포에 스트렙타비딘이 결합된 Qdot (525nm, green)을 가하여 반응시키고, 형광현미경을 사용하여 상기 각 DESPs의 결합수준을 비교하였다(도 8). 이때, 대조군으로는 DESPs를 처리하지 않은 HUVEC 세포를 사용하였다.

[0108] 도 8은 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 있어서, LSS 또는 OSS 조건에 따른, DESPs의 일종인 CLIRTSIC(서열번호 3) 또는 CPRRSHPIC(서열번호 9)의 결합수준을 비교한 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다. 도 8에서 보듯이, 2종류의 DESPs는 와류성 혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에는 결합되지만, 정상혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에는 결합되지 않음을 확인하였다. 또한, 상기 와류성 혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에 대한 2종류의 DESPs의 결합수준을 비교한 결과, CLIRTSIC(서열번호 3)가 상대적으로 높은 결합활성을 나타냄을 확인하였다.

[0109] 실시예 2-2: DESPs를 이용한 혈관내피세포로의 siRNA 전달

[0110] 실시예 2-1에서 합성된 서열번호 3 또는 9의 아미노산 서열을 갖는 DESPs를 각각 고분자 물질인 PEG에 결합시켜서, DESPs가 결합된 고분자 물질(BPEI-SS-PEG)을 합성하였다. 상기 BPEI-SS-PEG에 적색형광이 표지된 siRNA인 siGLO를 10:1, 20:1 또는 30:1의 비율(N/P 비율)로 가하고 실온에서 30분 동안 반응시켜서, 상기 BPEI-SS-PEG의 PEG 부분에 siGLO가 포집된 형태의 DESPs가 결합된 각각의 고분자 물질인 BPEI-SS-PEG-siGLO(N/P=10, N/P=20 또는 N/P=30)을 수득하였다. 상기 수득한 각각의 BPEI-SS-PEG-siGLO를 LSS 또는 OSS 상태에서 48시간 동안 배양된 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 도입하고, 도입된 세포에서 발현되는 적색 형광을 형광현미경으로 측정하였다(도 9a). 이때, 음성 대조군으로는 상기 고분자 물질 없이 siGLO가 도입된 세포를 사용하고, 양성 대조군으로는 리포펙타민을 사용하여 siGLO가 도입된 세포를 사용하였다.

[0111] 도 9a는 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 다양한 고분자 물질(BPEI-SS-PEG-siGLO)을 도입한 결과를 나타내는 형광현미경 사진으로서, siGLO는 음성 대조군을 나타내고, Lipofectamine-siGLO는 양성 대조군을 나타낸다. 도 9a에서 보듯이, CLIRTSIC(서열번호 3)는 와류성 혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에 특이적으로 도입되고 N/P 비율이 증가할 수록 HUVEC 세포로의 도입효율이 증가한 반면, CPRRSHPIC(서열번호 9)는 N/P=10인 경우에는 와류성 혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에 특이적으로 도입되었으나, N/P 비율이 증가하면 와류성 혈류조건 뿐만 아니라 정상 혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에 모두 도입됨을 확인하였다.

[0112] 따라서, 와류성 혈류 조건에서 배양된 HUVEC 세포에 대하여는 서열번호 3의 DESP가 특이적으로 결합함을 알 수 있었다.

[0113] 실시예 2-3: DESPs를 이용한 경동맥 부분결찰 동물모델의 혈관내피세포로의 siRNA 전달

[0114] 상기 실시예 2-2의 방법에 따라, 2종류의 DESPs가 결합된 고분자 물질(BPEI-SS-PEG)에 ICAM1에 대한 siRNA(siICAM1)를 가하고 반응시켜서 각각의 BPEI-SS-PEG-siICAM1를 수득하였다. 이어, 상기 경동맥 부분결찰 동물모델의 꼬리정맥을 통해 상기 수득한 각각의 BPEI-SS-PEG-siICAM1를 주사하거나 또는 주사하지 않고, 1일이 경과된 후, 상기 동물모델로부터 RCA와 LCA를 각각 적출하였으며, 상기 RCA와 LCA의 혈관내피세포에서 발현되는 ICAM1의 mRNA 수준을 Real time-qPCR 기법을 통해 비교하였다(도 9b). 이때, 대조군으로는 2종류의 DESPs 대신에 CLNQTAIC(서열번호 41)이 결합된 BPEI-SS-PEG-siICAM1를 사용하였다.

[0115] 도 9b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 우측 경동맥(RCA)와 좌측 경동맥(LCA)에서 BPEI-SS-PEG 또는 BPEI-SS-PEG-siICAM1의 도입에 따른 ICAM1의 mRNA 수준변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 9b에서 보듯이, BPEI-SS-PEG-siICAM1를 주사하지 않은 경동맥 부분결찰 동물모델에서는 ICAM1의 mRNA 수준이 RCA에 비하여 LCA

에서 높은 수준을 나타내었으나, BPEI-SS-PEG-siICAM1를 주사한 경동맥 부분결찰 동물모델에서는 CLIRRTSIC(서열번호 3)을 포함하는 BPEI-SS-PEG-siICAM1를 주사한 경우에만, LCA에서의 ICAM1의 mRNA 수준은 BPEI-SS-PEG-siICAM1를 주사하지 않은 LCA에 비하여 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0116] 따라서, CLIRRTSIC(서열번호 3)는 와류성 혈류에 의한 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드이며, 상기 펩타이드를 사용하면 와류성 혈류에 의한 기능이상 혈관내피세포에 목적하는 대상을 효과적으로 전달할 수 있음을 알 수 있었다.

[0117] **실시예 3: CLIRRTSIC에 결합하는 표적 단백질 규명**

[0118] **실시예 3-1: CLIRRTSIC에 결합하는 표적 단백질의 발굴**

[0119] 상기 실시예 2-3의 결과로부터 CLIRRTSIC(서열번호 3)는 와류성 혈류에 의한 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드임을 확인하였으므로, 질량분석(Mass spectrometry)을 수행하여 상기 펩타이드에 결합할 수 있는 기능이상 혈관내피세포에서 발현되는 표적 단백질을 발굴하고자 하였다.

[0120] 구체적으로, LSS 또는 OSS 상태에서 48시간 동안 배양된 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC(서열번호 3)를 가하거나 또는 가하지 않고 4시간 동안 반응시켰다. 이어, 상기 HUVEC 세포를 파쇄하여 수득한 파쇄물 1.6 mg에 3 μ g의 스트렙타비딘을 가하고, 4℃에서 하룻밤동안 반응시킨 다음, 20 μ l protein-A/G 비드를 가하고, 3시간 동안 반응시켜서 면역침강을 수행하였다. 상기 면역침강된 단백질을 전기영동하고, 각 시료별로 차이를 나타내는 단백질을 검출하였다(도 10a).

[0121] 도 10a는 HUVEC 세포에 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC의 처리여부에 따라, 발현수준이 변화된 단백질을 검출한 결과를 나타내는 사진, 그래프 및 도표이다. 도 10a에서 보듯이, HUVEC 세포에 대한 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC의 처리여부에 따라, 6종 단백질의 발현수준이 변화되었음을 확인하였다.

[0122] 상기 확인된 6종의 단백질을 대상으로, 질량분석(Mass spectrometry)을 수행하여, 상기 각 단백질을 동정하였다(도 10b).

[0123] 도 10b는 HUVEC 세포에 대한 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC(서열번호 3)의 처리여부에 따라 발현수준이 변화된 6종 단백질을 질량분석하여 동정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 10b에서 보듯이, 상기 6종의 단백질 중에서 5종은 NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA, Myosin-9)이고, 하나는 Annexin A2임을 확인하였다.

[0124] 이에, 상기 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC(서열번호 3)가 NMHC IIA와 결합할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여, 상기 면역침강된 단백질과 항-NMHC IIA 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(도 10c).

[0125] 도 10c는 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC(서열번호 3)를 이용하여 면역침강된 HUVEC 세포유래 단백질과 항-NMHC IIA 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석결과를 나타내는 사진이다. 도 10c에서 보듯이, 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC를 이용하여 면역침강된 HUVEC 세포유래 단백질이 항-NMHC IIA 항체와 결합함을 확인하였다.

[0126] 따라서, OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 CLIRRTSIC와 결합하는 표적 단백질은 NMHC IIA 이고, 상기 NMHC IIA는 혈관내피세포가 와류성 혈류에 노출될 경우, 세포표면에 존재함을 알 수 있었다.

[0127] **실시예 3-2: NMHC IIA의 세포내 발현부위 분석**

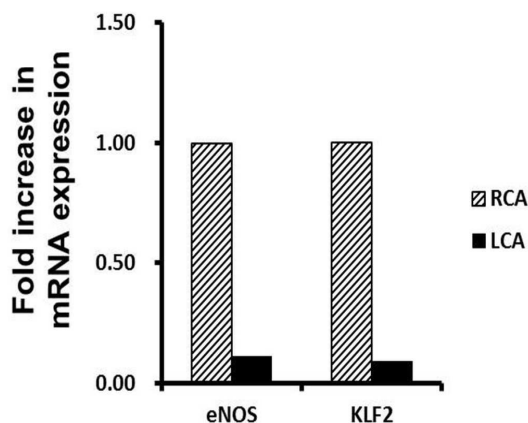
[0128] 상기 실시예 3-1의 결과로부터 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 CLIRRTSIC와 결합하는 표적 단백질은 NMHC

IIA 이고, 상기 NMHC IIA는 혈관내피세포가 와류성 혈류에 노출될 경우, 세포표면에 존재함을 확인하였으므로, 상기 OSS 조건이 NMHC IIA의 발현에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

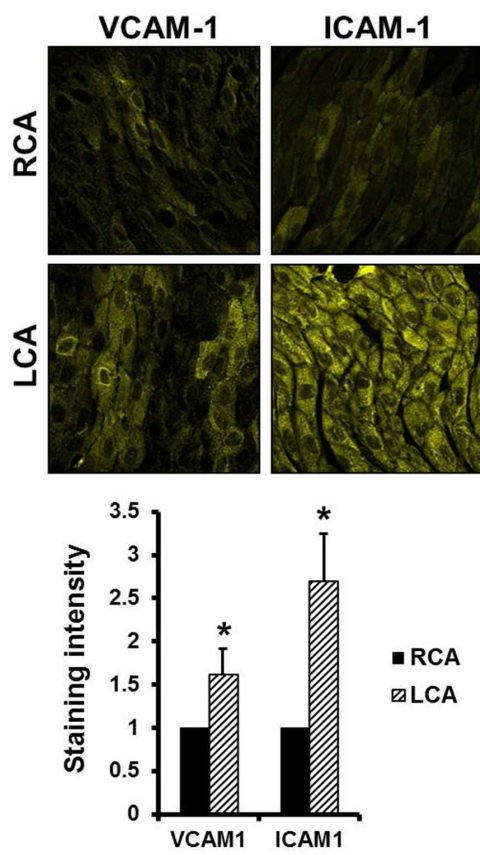
- [0129] 구체적으로, LSS 또는 OSS 상태에서 48시간 동안 배양된 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 파쇄하여 각각의 파쇄물을 수득하고, 항-NMHC IIA 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(도 11a).
- [0130] 도 11a는 LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 발현된 NMHC IIA의 발현수준에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 11a에서 보듯이, LSS 상태 보다는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 NMHC IIA의 발현수준이 증가됨을 확인하였다.
- [0131] 한편, LSS 또는 OSS 상태에서 48시간 동안 배양된 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 항-NMHC IIA 항체를 이용한 면역형광염색을 수행하고, 핵을 대상으로 DAPI 염색을 수행하였다(도 11b).
- [0132] 도 11b는 LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포를 대상으로 항-NMHC IIA 항체를 이용한 면역형광염색을 수행한 결과를 나타낸 사진이다. 도 11b에서 보듯이, LSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서는 NMHC IIA가 뚜렷하게 검출되지 않았으나, 상기 웨스턴 블롯 분석결과에 비추어 볼 때, 상기 LSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서도 NMHC IIA는 발현되지만, 상기 발현된 NMHC IIA는 세포질내에 균일하게 분포되어 있는 것으로 분석되었다. 이에 반하여, OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서는 NMHC IIA가 세포막 부위에 밀집되어 있음을 확인하였다.
- [0133] 따라서, NMHC IIA는 HUVEC 세포에서 발현되지만, 상기 HUVEC 세포가 와류성 혈류에 노출될 경우, 상기 NMHC IIA의 발현수준이 증가되고, 발현수준이 증가된 NMHC IIA는 세포막 부위로 이동함을 알 수 있었다.
- [0134] 상기 실시예 1 내지 3의 결과를 종합하면, 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포에서는 NMHC IIA의 발현수준이 증가하고, 이처럼 발현수준이 증가된 NMHC IIA는 세포막으로 이동하며, 상기 세포막으로 이동한 NMHC IIA는 CLIRTSIC(서열번호 3)와 결합할 수 있고, 상기 CLIRTSIC(서열번호 3)는 siRNA와 같은 생체고분자 물질을 상기 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포로 전달할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

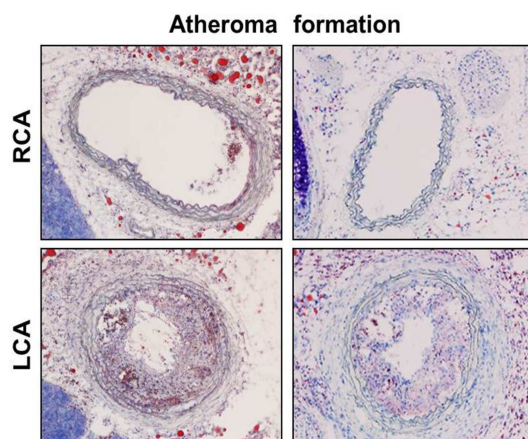
도면1a



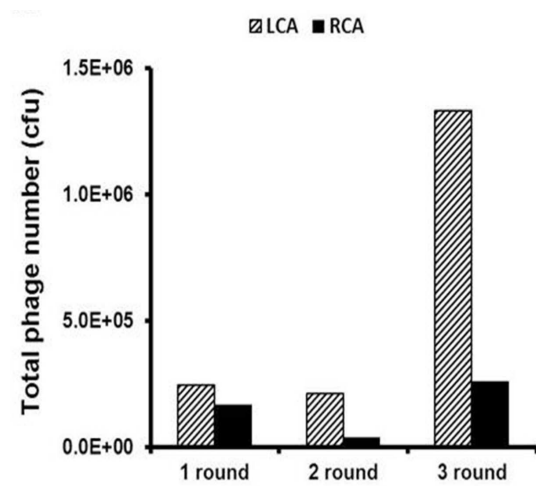
도면1b



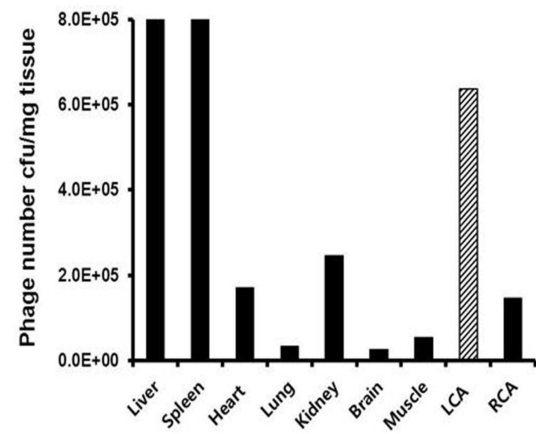
도면1c



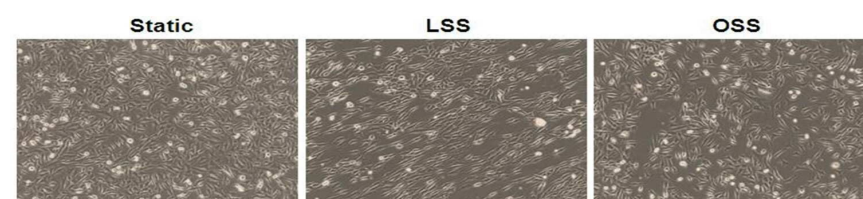
도면2a



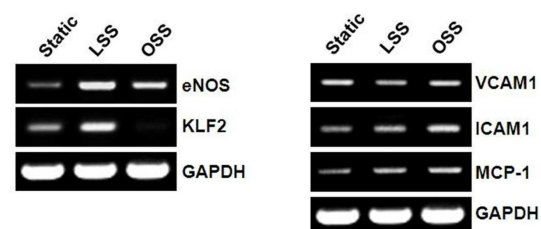
도면2b



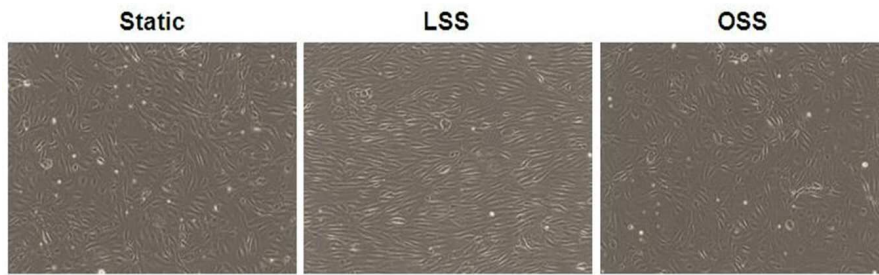
도면3a



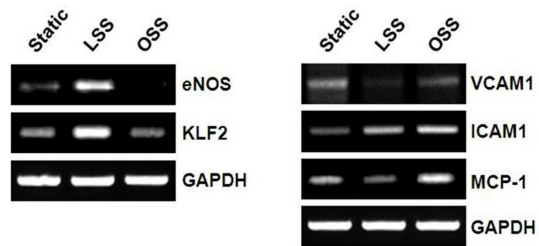
도면3b



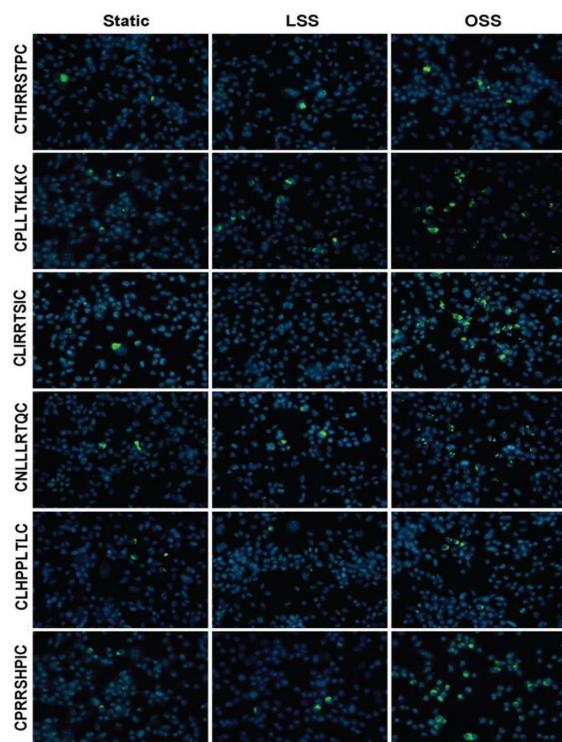
도면3c



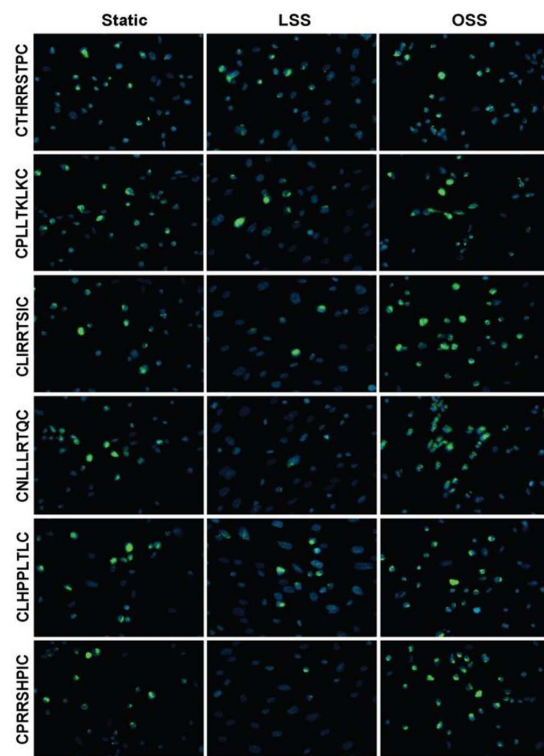
도면3d



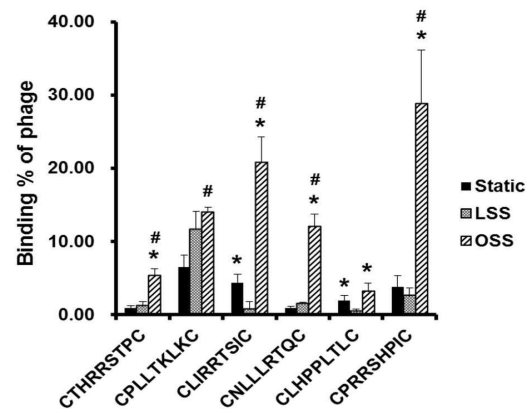
도면4a



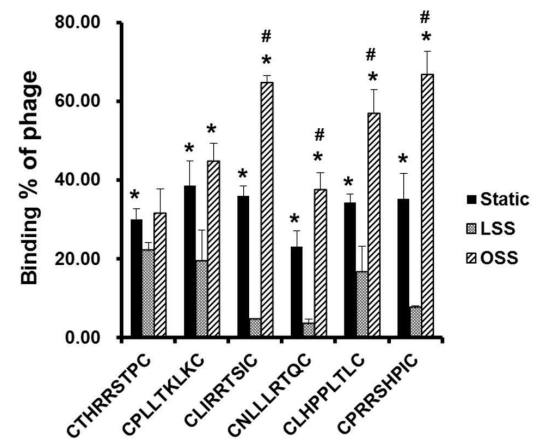
도면4b



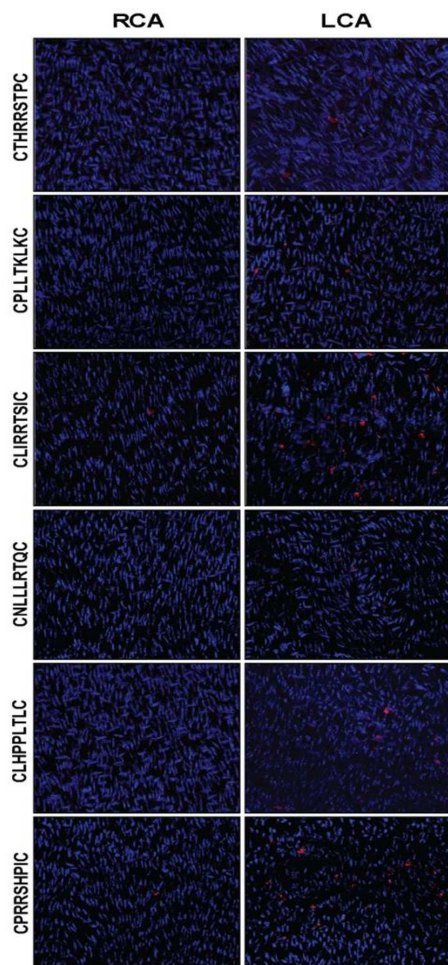
도면4c



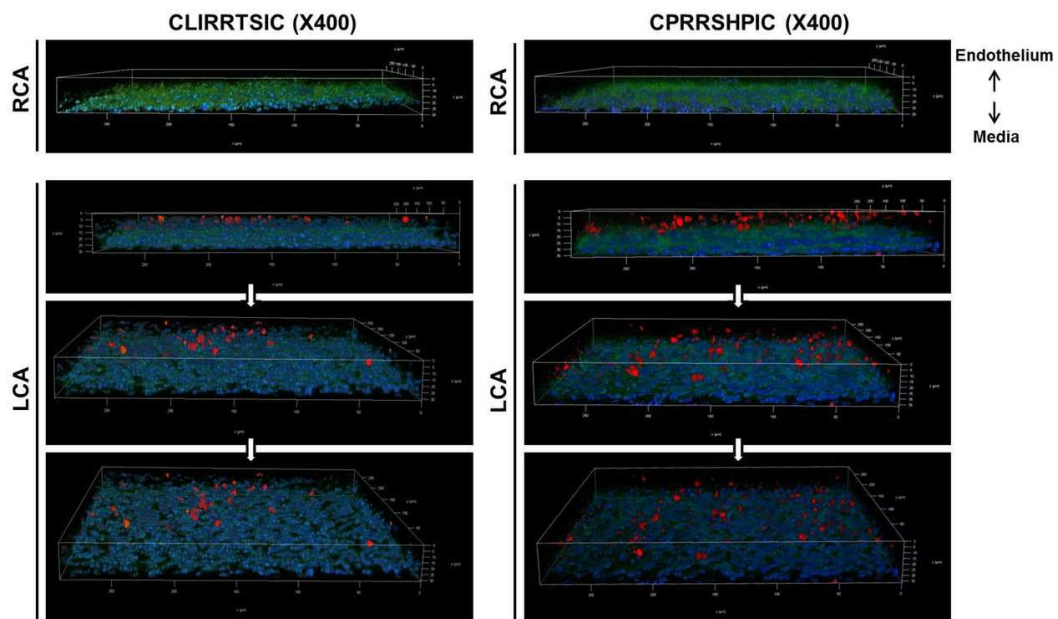
도면4d



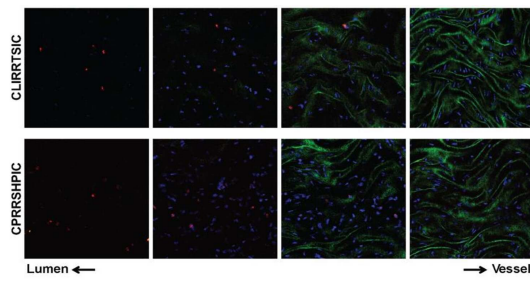
도면5a



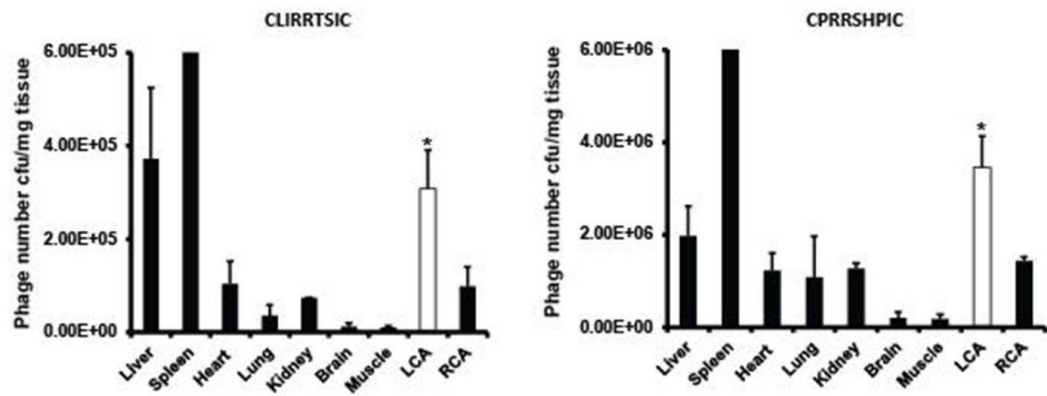
도면5b



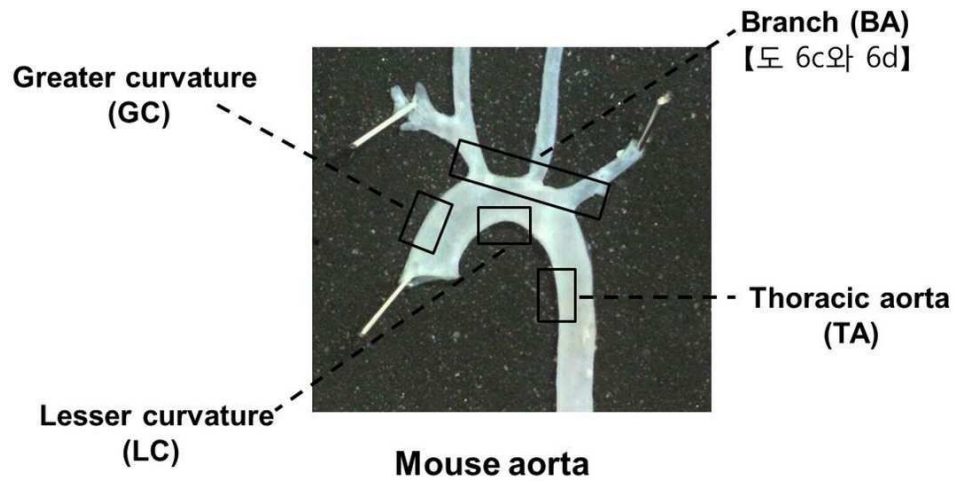
도면5c



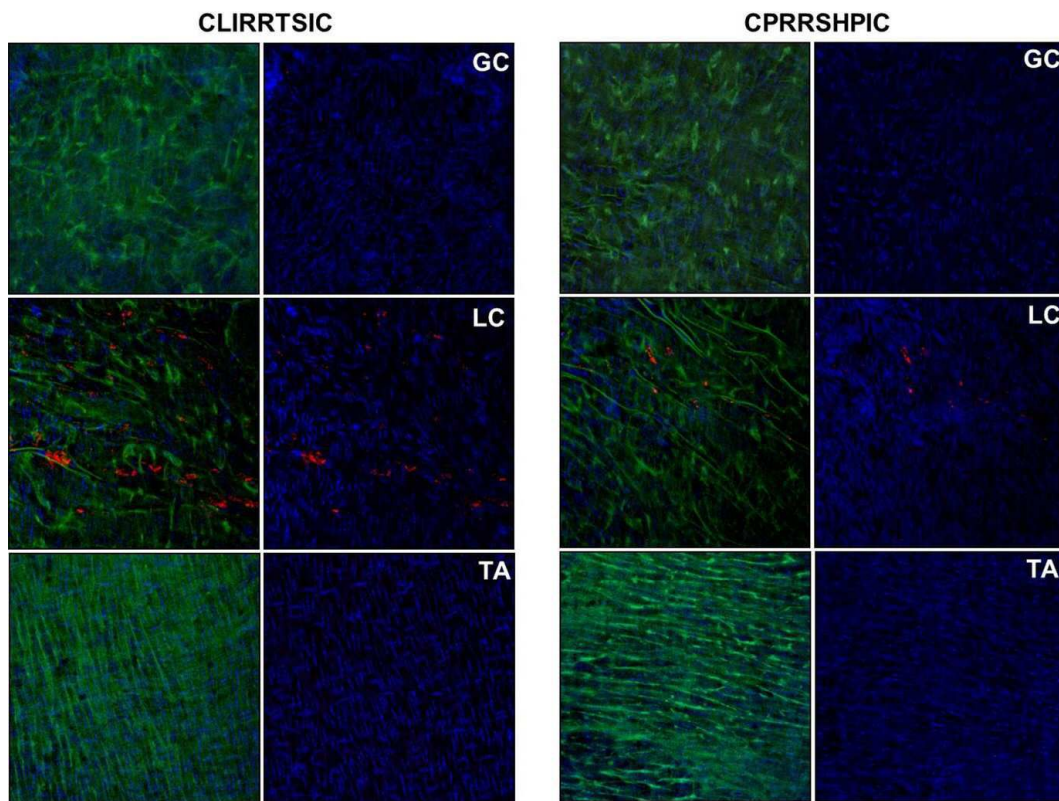
도면5d



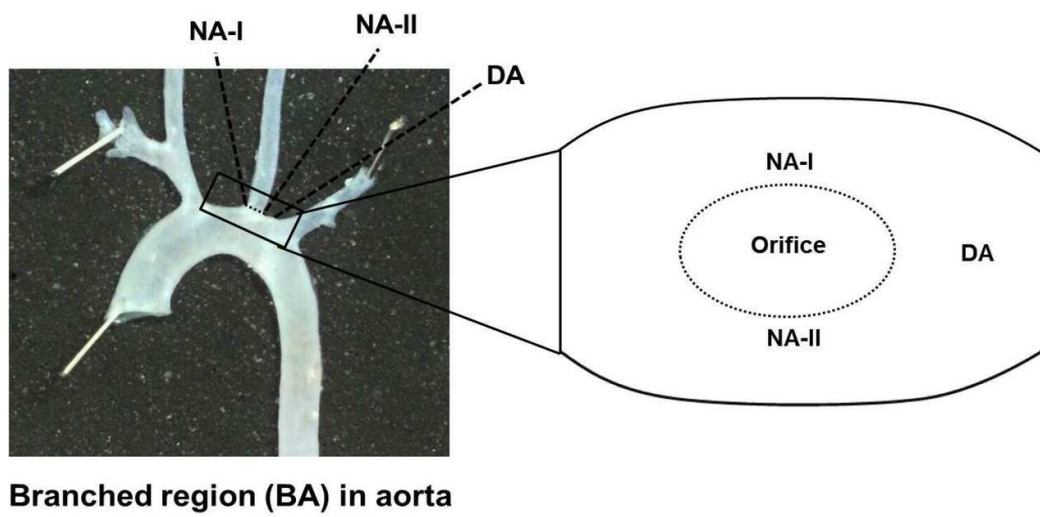
도면6a



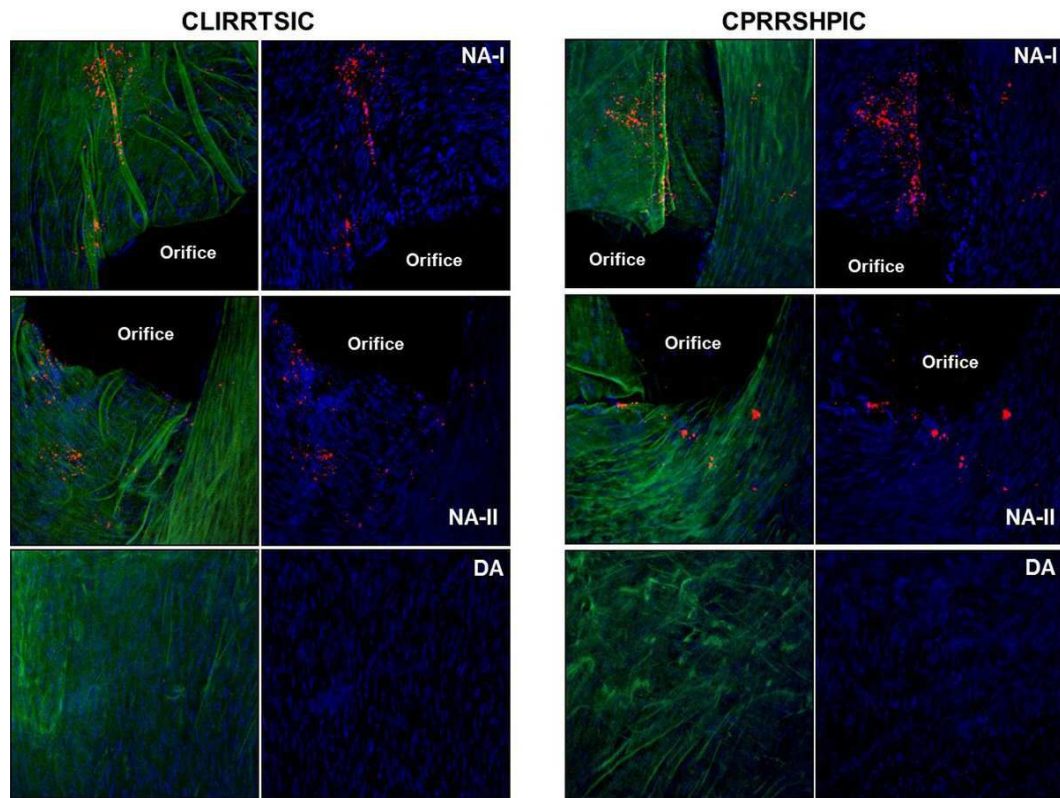
도면6b



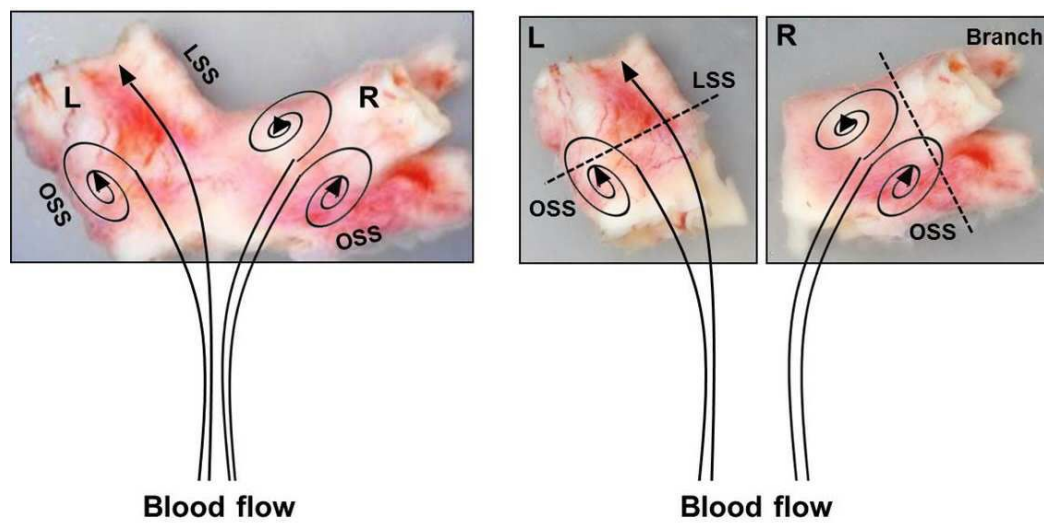
도면6c



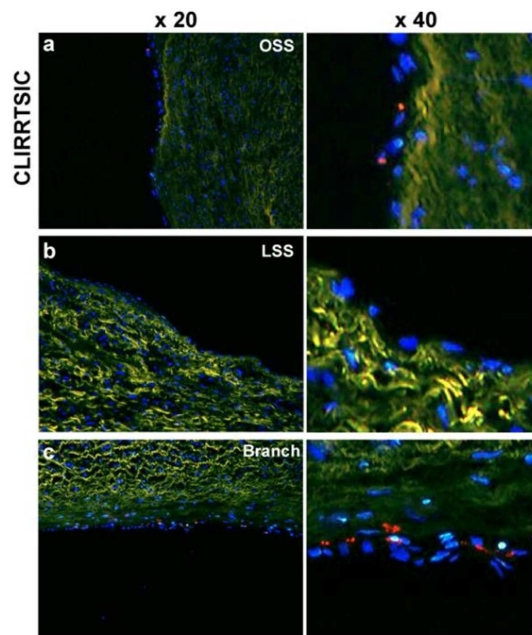
도면6d



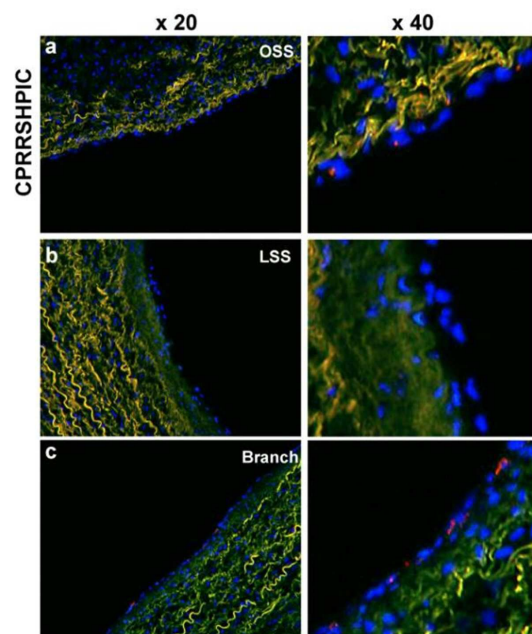
도면7a



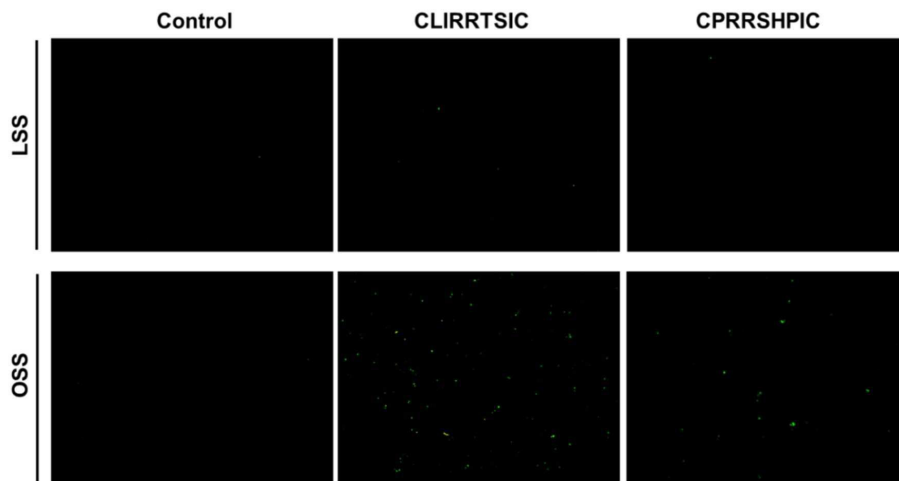
도면7b



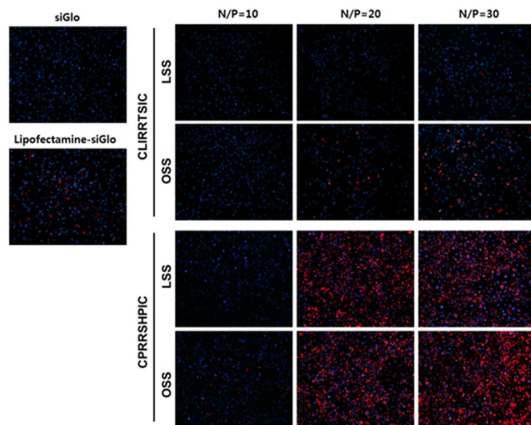
도면7c



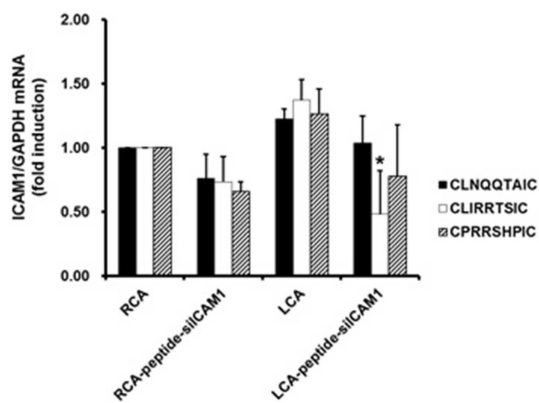
도면8



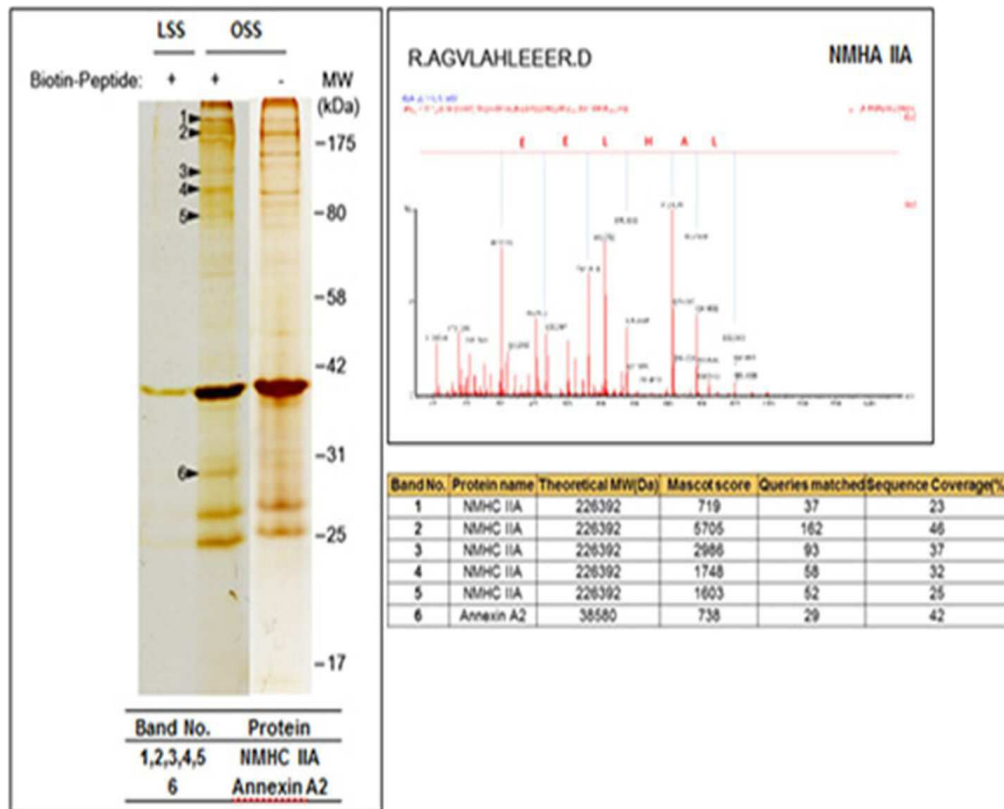
도면9a



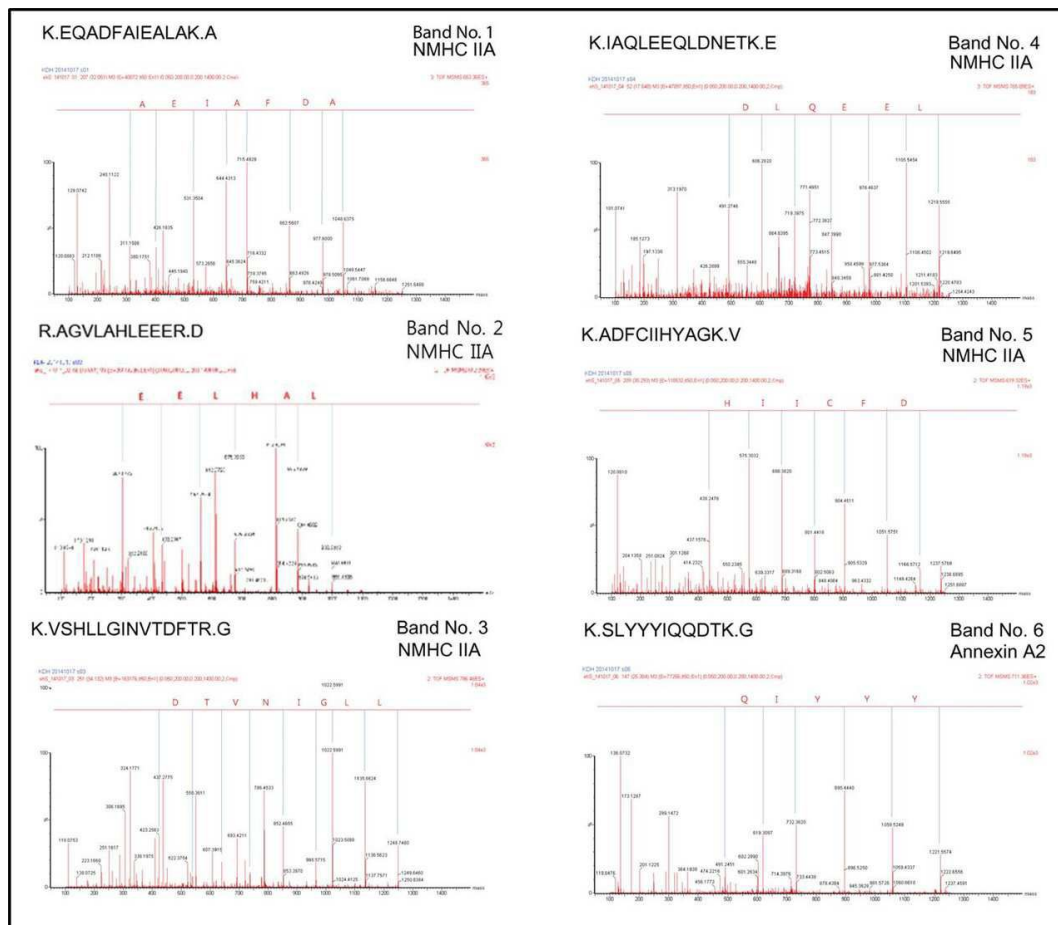
도면9b



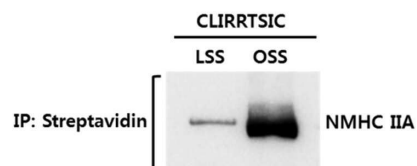
도면10a



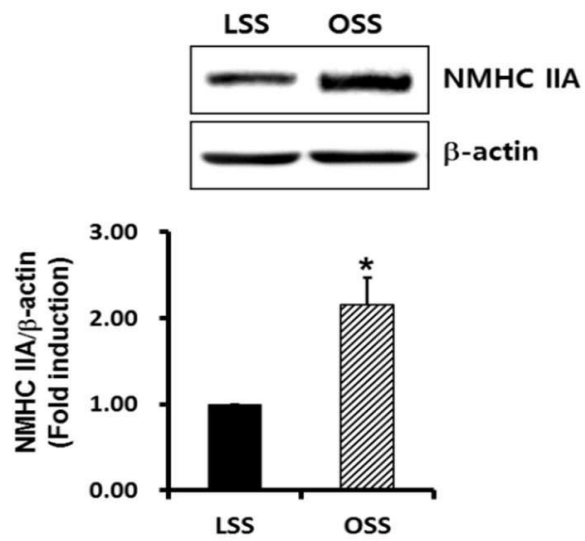
도면10b



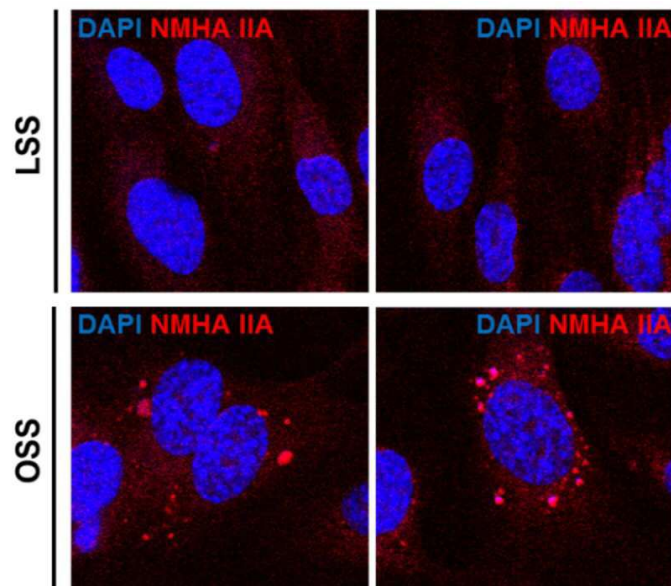
도면10c



도면11a



도면11b



서열 목록

- <110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation
- <120> Diagnostic and treating method for cardiovascular diseases using
NMHC IIA
- <130> KPA150359-KR
- <160> 42
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 1
 Cys Lys Met Thr Arg Ser Thr Ile Cys

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 2

Cys Lys Ile Met Ile Ser Ile Ser Cys

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 3

Cys Leu Ile Arg Arg Thr Ser Ile Cys

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 4

Cys Pro Leu Leu Thr Lys Leu Lys Cys

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 5

Cys Thr His Arg Arg Ser Thr Pro Cys

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 6

Cys His Ile Pro Ser Ile His Ser Cys

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 7

Cys Gln Met Met Leu Ile Arg Arg Cys

1 5

<210> 8

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 8

Cys Asn Leu Leu Leu Arg Thr Gln Cys

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide
 <400> 9
 Cys Pro Arg Arg Ser His Pro Ile Cys
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 10
 Cys Leu His Pro Pro Leu Thr Leu Cys
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 11
 Cys Lys Met Asn Ile Arg Leu Ser Cys
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 12
 Cys Ile Leu Arg Lys Ile Arg Pro Cys
 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 13

Cys Ser Arg Arg Pro Thr Ser Ile Cys

1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 14

Cys Leu Ile Arg Leu Ile Leu Gln Cys

1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 15

Cys Arg Met Arg Lys Thr Leu Arg Cys

1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400>

> 16

Cys Gln Pro His His Ser Ile Ile Cys

1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 17

Cys Ser Thr His Ile Pro Ser His Cys

1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 18
 Cys Ile Leu Arg Arg Arg Lys Arg Cys

1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide
 <400> 19
 Cys Ser Ile Arg Ile His Arg Arg Cys

1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide
 <400> 20
 Cys Ser Leu Arg Arg His Pro Ile Cys

1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide
 <400> 21
 Cys Arg Thr Lys Leu Arg Lys Leu Cys

1 5
 <210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 22

Cys His Met Gln Ile Met His Arg Cys

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 23

Cys Thr Arg Met Met Leu Arg Ile Cys

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 24

Cys Thr Pro Arg Gln Thr Arg Met Cys

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 25

Cys Met Leu Asn Ile Thr Arg Arg Cys

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 26
 Cys Arg Lys Leu Pro Arg Ile Ser Cys

1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 27
 Cys Pro Leu Gln Pro Lys Ser Ile Cys

1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 28
 Cys Pro Ile Arg His Arg Pro Ile Cys

1 5
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 29
 Cys Arg Thr Met Arg Ile Arg Leu Cys

1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide
<400>
> 30

Cys Met Arg Gln Arg Arg Asn Arg Cys

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 31

Cys Pro Arg Arg Arg Leu Lys Arg Cys

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 32

Cys His Gln Leu Pro Ile Arg Pro Cys

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 33

Cys Pro Ile Lys Thr Thr Ile Thr Cys

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 34
 Cys Arg Arg Gln Thr Ser Thr His Cys
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 35
 Cys Asn Pro Met Thr Arg Leu Ile Cys
 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 36
 Cys Pro Ile Arg His Arg Pro Ile Cys
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 37
 Cys Thr Leu His Lys Ser Arg Ser Cys
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide
 <400> 38
 Cys Thr Arg Ile Ile Ser Asn Thr Cys

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 39

Cys Lys Leu Ile Asn Thr Leu Lys Cys

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 40

Cys Gln Met Thr Arg Ser Thr Ile Cys

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 41

Cys Leu Asn Gln Gln Thr Ala Ile Cys

1 5

<210> 42

<211> 1960

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant myosin-9

<400> 42

Met Ala Gln Gln Ala Ala Asp Lys Tyr Leu Tyr Val Asp Lys Asn Phe

1 5 10 15

Ile Asn Asn Pro Leu Ala Gln Ala Asp Trp Ala Ala Lys Lys Leu Val
 20 25 30
 Trp Val Pro Ser Asp Lys Ser Gly Phe Glu Pro Ala Ser Leu Lys Glu
 35 40 45
 Glu Val Gly Glu Glu Ala Ile Val Glu Leu Val Glu Asn Gly Lys Lys
 50 55 60
 Val Lys Val Asn Lys Asp Asp Ile Gln Lys Met Asn Pro Pro Lys Phe
 65 70 75 80
 Ser Lys Val Glu Asp Met Ala Glu Leu Thr Cys Leu Asn Glu Ala Ser
 85 90 95
 Val Leu His Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Tyr Ser Gly Leu Ile Tyr Thr
 100 105 110
 Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Val Ile Asn Pro Tyr Lys Asn Leu Pro
 115 120 125
 Ile Tyr Ser Glu Glu Ile Val Glu Met Tyr Lys Gly Lys Lys Arg His
 130 135 140
 Glu Met Pro Pro His Ile Tyr Ala Ile Thr Asp Thr Ala Tyr Arg Ser
 145 150 155 160
 Met Met Gln Asp Arg Glu Asp Gln Ser Ile Leu Cys Thr Gly Glu Ser
 165 170 175
 Gly Ala Gly Lys Thr Glu Asn Thr Lys Lys Val Ile Gln Tyr Leu Ala
 180 185 190
 Tyr Val Ala Ser Ser His Lys Ser Lys Lys Asp Gln Gly Glu Leu Glu
 195 200 205
 Arg Gln Leu Leu Gln Ala Asn Pro Ile Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala
 210 215 220
 Lys Thr Val Lys Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg
 225 230 235 240
 Ile Asn Phe Asp Val Asn Gly Tyr Ile Val Gly Ala Asn Ile Glu Thr
 245 250 255
 Tyr Leu Leu Glu Lys Ser Arg Ala Ile Arg Gln Ala Lys Glu Glu Arg

260 265 270
 Thr Phe His Ile Phe Tyr Tyr Leu Leu Ser Gly Ala Gly Glu His Leu
 275 280 285
 Lys Thr Asp Leu Leu Leu Glu Pro Tyr Asn Lys Tyr Arg Phe Leu Ser
 290 295 300
 Asn Gly His Val Thr Ile Pro Gly Gln Gln Asp Lys Asp Met Phe Gln
 305 310 315 320
 Glu Thr Met Glu Ala Met Arg Ile Met Gly Ile Pro Glu Glu Glu Gln
 325 330 335

 Met Gly Leu Leu Arg Val Ile Ser Gly Val Leu Gln Leu Gly Asn Ile
 340 345 350
 Val Phe Lys Lys Glu Arg Asn Thr Asp Gln Ala Ser Met Pro Asp Asn
 355 360 365
 Thr Ala Ala Gln Lys Val Ser His Leu Leu Gly Ile Asn Val Thr Asp
 370 375 380
 Phe Thr Arg Gly Ile Leu Thr Pro Arg Ile Lys Val Gly Arg Asp Tyr
 385 390 395 400
 Val Gln Lys Ala Gln Thr Lys Glu Gln Ala Asp Phe Ala Ile Glu Ala

 405 410 415
 Leu Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Arg Met Phe Arg Trp Leu Val Leu Arg
 420 425 430
 Ile Asn Lys Ala Leu Asp Lys Thr Lys Arg Gln Gly Ala Ser Phe Ile
 435 440 445
 Gly Ile Leu Asp Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Leu Asn Ser Phe
 450 455 460
 Glu Gln Leu Cys Ile Asn Tyr Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Leu Phe
 465 470 475 480

 Asn His Thr Met Phe Ile Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Gln Arg Glu Gly
 485 490 495
 Ile Glu Trp Asn Phe Ile Asp Phe Gly Leu Asp Leu Gln Pro Cys Ile
 500 505 510
 Asp Leu Ile Glu Lys Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ile Leu Ala Leu Leu

515 520 525
 Asp Glu Glu Cys Trp Phe Pro Lys Ala Thr Asp Lys Ser Phe Val Glu
 530 535 540
 Lys Val Met Gln Glu Gln Gly Thr His Pro Lys Phe Gln Lys Pro Lys

 545 550 555 560
 Gln Leu Lys Asp Lys Ala Asp Phe Cys Ile Ile His Tyr Ala Gly Lys
 565 570 575
 Val Asp Tyr Lys Ala Asp Glu Trp Leu Met Lys Asn Met Asp Pro Leu
 580 585 590
 Asn Asp Asn Ile Ala Thr Leu Leu His Gln Ser Ser Asp Lys Phe Val
 595 600 605
 Ser Glu Leu Trp Lys Asp Val Asp Arg Ile Ile Gly Leu Asp Gln Val
 610 615 620

 Ala Gly Met Ser Glu Thr Ala Leu Pro Gly Ala Phe Lys Thr Arg Lys
 625 630 635 640
 Gly Met Phe Arg Thr Val Gly Gln Leu Tyr Lys Glu Gln Leu Ala Lys
 645 650 655
 Leu Met Ala Thr Leu Arg Asn Thr Asn Pro Asn Phe Val Arg Cys Ile
 660 665 670
 Ile Pro Asn His Glu Lys Lys Ala Gly Lys Leu Asp Pro His Leu Val
 675 680 685
 Leu Asp Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu Gly Ile Arg Ile Cys

 690 695 700
 Arg Gln Gly Phe Pro Asn Arg Val Val Phe Gln Glu Phe Arg Gln Arg
 705 710 715 720
 Tyr Glu Ile Leu Thr Pro Asn Ser Ile Pro Lys Gly Phe Met Asp Gly
 725 730 735
 Lys Gln Ala Cys Val Leu Met Ile Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn
 740 745 750
 Leu Tyr Arg Ile Gly Gln Ser Lys Val Phe Phe Arg Ala Gly Val Leu
 755 760 765

Ala His Leu Glu Glu Glu Arg Asp Leu Lys Ile Thr Asp Val Ile Ile
770 775 780

Gly Phe Gln Ala Cys Cys Arg Gly Tyr Leu Ala Arg Lys Ala Phe Ala
785 790 795 800

Lys Arg Gln Gln Gln Leu Thr Ala Met Lys Val Leu Gln Arg Asn Cys
805 810 815

Ala Ala Tyr Leu Lys Leu Arg Asn Trp Gln Trp Trp Arg Leu Phe Thr
820 825 830

Lys Val Lys Pro Leu Leu Gln Val Ser Arg Gln Glu Glu Glu Met Met
835 840 845

Ala Lys Glu Glu Glu Leu Val Lys Val Arg Glu Lys Gln Leu Ala Ala
850 855 860

Glu Asn Arg Leu Thr Glu Met Glu Thr Leu Gln Ser Gln Leu Met Ala
865 870 875 880

Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Gln Leu Gln Ala Glu Thr Glu Leu Cys
885 890 895

Ala Glu Ala Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Thr Ala Lys Lys Gln Glu
900 905 910

Leu Glu Glu Ile Cys His Asp Leu Glu Ala Arg Val Glu Glu Glu Glu
915 920 925

Glu Arg Cys Gln His Leu Gln Ala Glu Lys Lys Lys Met Gln Gln Asn
930 935 940

Ile Gln Glu Leu Glu Glu Gln Leu Glu Glu Glu Glu Ser Ala Arg Gln
945 950 955 960

Lys Leu Gln Leu Glu Lys Val Thr Thr Glu Ala Lys Leu Lys Lys Leu
965 970 975

Glu Glu Glu Gln Ile Ile Leu Glu Asp Gln Asn Cys Lys Leu Ala Lys
980 985 990

Glu Lys Lys Leu Leu Glu Asp Arg Ile Ala Glu Phe Thr Thr Asn Leu
995 1000 1005

Thr Glu Glu Glu Glu Lys Ser Lys Ser Leu Ala Lys Leu Lys Asn Lys
1010 1015 1020

His Glu Ala Met Ile Thr Asp Leu Glu Glu Arg Leu Arg Arg Glu Glu
1025 1030 1035 1040
Lys Gln Arg Gln Glu Leu Glu Lys Thr Arg Arg Lys Leu Glu Gly Asp
1045 1050 1055
Ser Thr Asp Leu Ser Asp Gln Ile Ala Glu Leu Gln Ala Gln Ile Ala
1060 1065 1070
Glu Leu Lys Met Gln Leu Ala Lys Lys Glu Glu Glu Leu Gln Ala Ala
1075 1080 1085
Leu Ala Arg Val Glu Glu Glu Ala Ala Gln Lys Asn Met Ala Leu Lys
1090 1095 1100
Lys Ile Arg Glu Leu Glu Ser Gln Ile Ser Glu Leu Gln Glu Asp Leu
1105 1110 1115 1120
Glu Ser Glu Arg Ala Ser Arg Asn Lys Ala Glu Lys Gln Lys Arg Asp
1125 1130 1135
Leu Gly Glu Glu Leu Glu Ala Leu Lys Thr Glu Leu Glu Asp Thr Leu
1140 1145 1150
Asp Ser Thr Ala Ala Gln Gln Glu Leu Arg Ser Lys Arg Glu Gln Glu
1155 1160 1165
Val Asn Ile Leu Lys Lys Thr Leu Glu Glu Glu Ala Lys Thr His Glu
1170 1175 1180
Ala Gln Ile Gln Glu Met Arg Gln Lys His Ser Gln Ala Val Glu Glu
1185 1190 1195 1200
Leu Ala Glu Gln Leu Glu Gln Thr Lys Arg Val Lys Ala Asn Leu Glu
1205 1210 1215
Lys Ala Lys Gln Thr Leu Glu Asn Glu Arg Gly Glu Leu Ala Asn Glu
1220 1225 1230
Val Lys Val Leu Leu Gln Gly Lys Gly Asp Ser Glu His Lys Arg Lys
1235 1240 1245
Lys Val Glu Ala Gln Leu Gln Glu Leu Gln Val Lys Phe Asn Glu Gly
1250 1255 1260
Glu Arg Val Arg Thr Glu Leu Ala Asp Lys Val Thr Lys Leu Gln Val

1265 1270 1275 1280
 Glu Leu Asp Asn Val Thr Gly Leu Leu Ser Gln Ser Asp Ser Lys Ser
 1285 1290 1295
 Ser Lys Leu Thr Lys Asp Phe Ser Ala Leu Glu Ser Gln Leu Gln Asp
 1300 1305 1310
 Thr Gln Glu Leu Leu Gln Glu Glu Asn Arg Gln Lys Leu Ser Leu Ser
 1315 1320 1325
 Thr Lys Leu Lys Gln Val Glu Asp Glu Lys Asn Ser Phe Arg Glu Gln
 1330 1335 1340

 Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Lys His Asn Leu Glu Lys Gln Ile Ala
 1345 1350 1355 1360
 Thr Leu His Ala Gln Val Ala Asp Met Lys Lys Lys Met Glu Asp Ser
 1365 1370 1375
 Val Gly Cys Leu Glu Thr Ala Glu Glu Val Lys Arg Lys Leu Gln Lys
 1380 1385 1390
 Asp Leu Glu Gly Leu Ser Gln Arg His Glu Glu Lys Val Ala Ala Tyr
 1395 1400 1405
 Asp Lys Leu Glu Lys Thr Lys Thr Arg Leu Gln Gln Glu Leu Asp Asp

 1410 1415 1420
 Leu Leu Val Asp Leu Asp His Gln Arg Gln Ser Ala Cys Asn Leu Glu
 1425 1430 1435 1440
 Lys Lys Gln Lys Lys Phe Asp Gln Leu Leu Ala Glu Glu Lys Thr Ile
 1445 1450 1455
 Ser Ala Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asp Arg Ala Glu Ala Glu Ala Arg
 1460 1465 1470
 Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ser Leu Ala Arg Ala Leu Glu Glu Ala
 1475 1480 1485

 Met Glu Gln Lys Ala Glu Leu Glu Arg Leu Asn Lys Gln Phe Arg Thr
 1490 1495 1500
 Glu Met Glu Asp Leu Met Ser Ser Lys Asp Asp Val Gly Lys Ser Val
 1505 1510 1515 1520
 His Glu Leu Glu Lys Ser Lys Arg Ala Leu Glu Gln Gln Val Glu Glu

1525	1530	1535	
Met Lys Thr Gln Leu Glu Glu Leu Glu Asp Glu Leu Gln Ala Thr Glu			
1540	1545	1550	
Asp Ala Lys Leu Arg Leu Glu Val Asn Leu Gln Ala Met Lys Ala Gln			
1555	1560	1565	
Phe Glu Arg Asp Leu Gln Gly Arg Asp Glu Gln Ser Glu Glu Lys Lys			
1570	1575	1580	
Lys Gln Leu Val Arg Gln Val Arg Glu Met Glu Ala Glu Leu Glu Asp			
1585	1590	1595	1600
Glu Arg Lys Gln Arg Ser Met Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Leu Glu			
1605	1610	1615	
Met Asp Leu Lys Asp Leu Glu Ala His Ile Asp Ser Ala Asn Lys Asn			
1620	1625	1630	
Arg Asp Glu Ala Ile Lys Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala Gln Met Lys			
1635	1640	1645	
Asp Cys Met Arg Glu Leu Asp Asp Thr Arg Ala Ser Arg Glu Glu Ile			
1650	1655	1660	
Leu Ala Gln Ala Lys Glu Asn Glu Lys Lys Leu Lys Ser Met Glu Ala			
1665	1670	1675	1680
Glu Met Ile Gln Leu Gln Glu Glu Leu Ala Ala Ala Glu Arg Ala Lys			
1685	1690	1695	
Arg Gln Ala Gln Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Asp Glu Ile Ala Asn			
1700	1705	1710	
Ser Ser Gly Lys Gly Ala Leu Ala Leu Glu Glu Lys Arg Arg Leu Glu			
1715	1720	1725	
Ala Arg Ile Ala Gln Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Gln Gly Asn			
1730	1735	1740	
Thr Glu Leu Ile Asn Asp Arg Leu Lys Lys Ala Asn Leu Gln Ile Asp			
1745	1750	1755	1760
Gln Ile Asn Thr Asp Leu Asn Leu Glu Arg Ser His Ala Gln Lys Asn			
1765	1770	1775	

Glu Asn Ala Arg Gln Gln Leu Glu Arg Gln Asn Lys Glu Leu Lys Val
 1780 1785 1790
 Lys Leu Gln Glu Met Glu Gly Thr Val Lys Ser Lys Tyr Lys Ala Ser
 1795 1800 1805
 Ile Thr Ala Leu Glu Ala Lys Ile Ala Gln Leu Glu Glu Gln Leu Asp
 1810 1815 1820
 Asn Glu Thr Lys Glu Arg Gln Ala Ala Cys Lys Gln Val Arg Arg Thr
 1825 1830 1835 1840
 Glu Lys Lys Leu Lys Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Asp Glu Arg Arg
 1845 1850 1855
 Asn Ala Glu Gln Tyr Lys Asp Gln Ala Asp Lys Ala Ser Thr Arg Leu
 1860 1865 1870
 Lys Gln Leu Lys Arg Gln Leu Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Gln Arg
 1875 1880 1885
 Ala Asn Ala Ser Arg Arg Lys Leu Gln Arg Glu Leu Glu Asp Ala Thr
 1890 1895 1900
 Glu Thr Ala Asp Ala Met Asn Arg Glu Val Ser Ser Leu Lys Asn Lys
 1905 1910 1915 1920
 Leu Arg Arg Gly Asp Leu Pro Phe Val Val Pro Arg Arg Met Ala Arg
 1925 1930 1935
 Lys Gly Ala Gly Asp Gly Ser Asp Glu Glu Val Asp Gly Lys Ala Asp
 1940 1945 1950
 Gly Ala Glu Ala Lys Pro Ala Glu
 1955 1960