(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0143135
(43) 공개일자 2017년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0076776
(22) 출원일자 2016년06월20일
심사청구일자 2017년04월19일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
서석효
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 45 일산자이아파트 406동 804호
최신규
서울특별시 도봉구 노해로69길 103 110동 1003호 (창동,동아청솔아파트)
김지애
서울특별시 강서구 양천로14길 37 101동 307호 (방화동,신안1차아파트)
(74) 대리인
손민

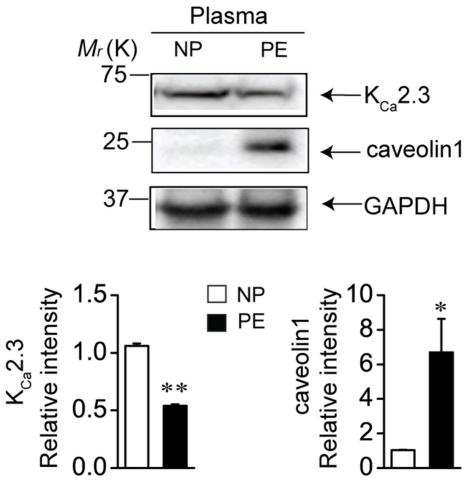
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **KCa2.3 채널 단백질을 이용한 혈관내피세포 기능 부전 진단용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 KCa2.3 채널 단백질을 이용한 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트, 상기 조성물 또는 키트를 이용한 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위한 정보의 제공방법 및 혈관내피세포의 기능 부전 또는 개선 유도 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 카베올린-1, 클라트린, Rab5C, EEA1 또는 KCa2.3 채널의 발현 수준을 측정 및 비교하면, 혈관내피세포에서 기능부전을 진단할 수 있으므로, 혈관 질환을 조기진단 할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/042 (2013.01)
G01N 2800/321 (2013.01)
G01N 2800/323 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A2010851
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-일반연구자지원사업-기본연구
연구과제명 스핑고지질과 활성산소에 의한KCa1.1 발현 변화 기전 연구
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

KCa2.3 채널 단백질의 수준 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물에 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1으로 이루어진 군에서 각각 선택되는 하나 이상의 단백질의 수준 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것인, 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인, 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 혈관내피세포의 기능 부전은 동맥경화증, 고혈압 및 당뇨병 관련 혈관질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환을 야기시키는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 따른 조성물을 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인, 키트.

청구항 8

(a) 분리된 생물학적 시료를 정상 혈관내피세포에 처리하는 단계;

(b) 상기 (a)단계의 혈관내피세포에서 (i) KCa2.3 채널의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계에서 측정된 (i)를 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위한 정보의 제공방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 (b)단계에서 (ii) 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 추가적으로 측정하고,

측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 하기의 식으로 계산된 비율을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법;

비율 = (ii)/(i).

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준은 상기 유전자의 mRNA 수준인 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 유전자의 mRNA 수준은 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩을 사용하여 측정하는 것인, 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 단백질 수준은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbentassay)로 구성된 군으로부터 선택되는 분석법을 이용하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 13

(a) 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 분리된 세포에 처리하는 단계;

(b) 상기 후보 물질을 처리한 세포에서 (i) KCa2.3 채널의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계에서 (i)가 후보 물질을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질로 선별하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포 기능 부전 유도 물질의 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 (ii) 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 추가적으로 측정하고,

측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 하기의 식으로 계산된 비율이 후보 물질을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질인 것으로 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법;

비율 = (ii)/(i).

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 KCa2.3 채널 단백질을 이용한 혈관내피세포 기능 부전 진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 KCa2.3 채널 단백질을 이용한 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트, 상기 조성물 또는 키트를 이용한 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위한 정보의 제공방법 및 혈관내피세포의 기능 부전 또는 개선 유도 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 이온 채널들은 막전압을 결정하며, 이를 통해 세포 내 Ca^{2+} 농도와 흥분성을 조절하는 등 세포 기능에 큰 영향을 미친다. 이온채널은 통과시키는 이온 종류에 따라 Na^{+} 채널, Ca^{2+} 채널, K^{+} 채널 등으로 분류된다. 세포 내 Ca^{2+}에 의해 활성화되는 K^{+} 채널에는 여러 가지 종류가 있는데 혈관내피세포에는 KCa1.1 채널, KCa2.3 채널, KCa3.1 채널 등이 있다. 혈관내피세포에서 이 세 채널은 각각 다른 역할을 하는데, KCa2.3 채널은 KCa3.1 채널과 함께 혈관 평활근 수축성을 조절하며, 혈관내피세포 증식을 유도하여 새로운 혈관형성(angiogenesis)에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Tharp DL, Bowles DK, 2009, Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 7, 1-11).

[0003] 혈관내피세포는 NO를 분비하거나 과분극을 유발하여 혈관평활근을 이완시킨다. 혈관내피세포에서 세포내 Ca^{2+}이 증가하면 eNOS가 활성화되어 NO를 생성 및 분비하고 세포내 cGMP 농도를 증가시켜 혈관평활근을 이완시킨다. 그리고, 세포내 Ca^{2+} 증가에 의해 KCa3.1 채널과 KCa2.3 채널이 활성화되어 혈관내피세포가 과분극되면 혈관평활근이 과분극되고, 혈관평활근 과분극은 막전압 의존선 Ca^{2+} 채널을 닫아 혈관평활근을 이완시킨다. 이와 함께 혈관내피세포 과분극은 세포내 Ca^{2+} 유입을 증가시켜 NO 생성을 촉진한다.

[0004] NO에 의한 혈관이완과 혈관내피세포 과분극에 의한 혈관이완은 서로 보완적으로 작용하기도 한다. 노화 혹은 고혈압 등 혈관질환 등에서 산화성 스트레스가 증가하면 NO 생성이 감소하는 반면, KCa3.1 채널과 KCa2.3 채널 발현이 증가하고, 그 결과로서 혈관내피세포 과분극에 의한 이완이 증가하여 NO 감소에 의한 내피세포 의존성 이완 감소를 보완한다.

[0005] 혈관내피세포 KCa3.1 채널과 KCa2.3 채널은 혈관 수축성 조절 등 유사한 기능을 하지만 이온채널의 특성과 분포 등에는 차이가 있다. 특히, 혈관내피세포에서는 KCa2.3 채널이 KCa3.1 채널에 비해 단일 채널 당 전류의 크기가 작은 반면, 단위 면적 당 이온채널의 수는 많아 전체 세포막을 통한 이온전류의 크기에는 큰 차이가 없기 때문에, KCa3.1 채널과 KCa2.3 채널이 혈관내피세포 기능에 미치는 영향은 서로 비슷하다고 할 수 있다. 그러나,

KCa2.3 채널은 KCa3.1 채널과는 달리 카베올린과 밀접하게 분포되어 있고, 혈관평활근세포와 인접한 세포막에 위치하며, 혈관내피세포 뿐만 아니라 신경세포에 존재하고, 적혈구에는 존재하지 않으며, 단위 면적 당 이온채널의 수가 더 많아, 혈관질환을 유발하는 인자들에 의한 채널 단백질의 발현 변화를 보다 명확하게 확인할 수 있다.

[0006] 한편, 임신성고혈압, 당뇨병 등 여러 가지 혈관질환에서 발병 가능성을 조기 진단하거나 진행상태를 간편하게 진단을 할 수 있는 새로운 진단법의 필요성이 대두되고 있다. 현재, 임신성 고혈압의 경우 발병 가능성을 조기 진단하기 위한 목적으로 위험인자들(나이 등), 도플러를 이용하여 측정한 자궁 동맥 혈류 측정, 혈장에서 측정한 임신성 고혈압 유발물질(sFlt-1) 농도 등과 같은 다양한 방법들이 사용되고 있는 실정이며, 동맥경화증, 당뇨병 등의 경우, 혈관 조영술, CT angiography, Dopper Sono 등의 방법으로 혈류와 혈관 구경을 측정하여 혈관질환의 진행 정도를 진단하는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 상기 방법들은 대부분 질병이 발병된 후, 일정수준 진행되어 그 결과로서 혈관의 구조적 변화(혈관 구경변화)가 확인된 후에야 적용할 수 있다는 문제점이 있다. 최근 세계적인 제약회사인 로슈에서는 sFlt-1/PDGF의 비로 자간전증 발생 가능성을 조기진단하기 위하여 sFlt-1와 PDGF의 혈청 농도를 측정하는 진단키트를 개발하여 시판 중에 있다.

[0007] 혈관내피세포는 혈장과 직접 접촉하므로 혈장에 존재하는 산화 저밀도 지질 단백질(oxidized low density-lipoprotein, oxLDL), 고혈당 등과 이들 물질에 의해 발생하는 수퍼옥사이드와 같은 ROS 등의 다양한 혈관질환 유발물질에 의해 혈관내피세포 기능 부전이 발생할 수 있다고 알려져 있다. 예를 들어, 임신성 고혈압과 동맥경화증의 경우, 혈중 산화 저밀도 지질 단백질에 의해, 당뇨병성 혈관질환의 경우 고혈당에 의해 혈관내피세포 기능 부전이 발생한다.

[0008] 혈관내피세포 기능 부전은 혈관질환에서 관찰되는 혈관구경 감소 등 혈관의 구조적 변화를 유발하고, 이러한 구조적 변화에 의하여 혈관내부의 저항이 증가하여 혈압 증가 등 혈관질환의 증상이 나타나므로, 혈관의 구조적 변화가 일어나기 전에 혈관내피세포 기능 부전을 확인할 수 있다면, 혈관질환을 조기에 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 혈관질환의 경과, 예후, 치료효과 등을 보다 효과적 확인할 수 있을 것으로 예상되고 있다. 그러나, 환자의 혈관내피세포 기능 부전을 직접적으로 확인하는 방법이 아직까지는 개발되지 않고 있는 실정이다.

[0009] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 혈관질환 환자들을 보다 효과적으로 관리하고 치료하기 위해 혈관내피세포 기능 부전을 진단할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 환자의 혈장 또는 혈청을 처리한 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널과 KCa2.3 채널의 세포막 발현을 조절하는 카베올린(caveolin-1), 클라트린(clathrin), Rab5C, 혹은 EEA1의 발현 수준를 측정하면, 환자의 혈관내피세포의 기능 부전을 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 혈관내피세포 기능 부전 진단을 위한 정보의 제공방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 하나의 양태는 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물을 제공한다.

[0015] 일 양태에서, 상기 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물은 KCa2.3 채널 단백질의 수준 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물일 수 있다. 아울러, 상기 조성물은 카베올린-1(caveolin-1), 클라트린(clathrin), Rab5C 및 EEA1(Early Endosome Antigen 1)으로 이루어진 군에서 각각 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 혈관내피세포 기능 부전이 혈관질환을 유발하지만 인체에서 혈관내피세포 기능 부전을 직접 측정할 수 있는 방법이 없으나, 본 발명의 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물을 이용하면 혈관내피세포 기능 부전 진단을 통해서 혈관질환을 조기 진단, 경과, 예후 및 치료효과 진단이 가능하다. 예를 들어, 임신성 고혈압의 경우, 고

혈압 발생 이전에 본 발병의 조성물을 이용하여 혈관내피세포의 기능 부전 발생과 임신성 고혈압의 발병 가능성을 진단하고, 이를 통해 새로운 예방법 및 치료법 개발이 가능하게 된다. 동맥경화증 및 당뇨병 관련 혈관질환의 경우에도 본 발명의 조성물을 이용한 혈관내피세포 기능 부전 진단으로 혈관질환의 증상이 나타나기 이전에도 혈관질환의 진행상태를 파악하고 이를 통해 경과, 예후 및 치료 효과 진단이 가능하다.

[0017] 본 발명에서 사용된 용어, "KCa2.3 채널(small conductance calcium-activated potassium channel, subfamily N, member 4)"은 세포 내 칼슘에 의해 활성화되는 헤테로테트라머(heterotetramer) 형태의 전압-비의존성 포타슘 채널을 의미한다. 혈관내피세포 KCa2.3 채널은 과분극을 유발하여 혈관을 이완시키는 한편, 과분극은 세포 내 Ca^{2+} 유입을 증가시켜 eNOS에 의한 NO 생성을 촉진하여 혈관을 이완시킨다. 그러므로, 혈관내피세포 KCa2.3 채널 발현 감소는 혈관내피세포 기능 부전을 유발하며, KCa2.3 채널 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하여 혈관내피세포의 기능 부전을 확인할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용된 용어, "카베올린-1(caveolin-1)"은 대부분의 세포 타입에서 볼 수 있는 카베올레 플라즈마막(caveolae plasma membrane)의 주요 구성요소로, Ras-ERK 경로에서 인테그린의 결합에 있어 초기 단계 및 세포주기 진행과 관련이 있다. 혈관내피세포의 기능 부전에 있어서, KCa2.3 채널과 카베올린-1의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다. 본 발명의 카베올린-1 서열정보는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 등과 같은 공지의 데이터 베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 카베올린-1은 NCBI GenBank Acession NO. NM_001172897.1, NM_001243064.1, NM_031556.3 또는 NM_001135818.1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명에서 사용된 용어, “클라트린(clathrin)”은 베지클을 코팅하는 단백질의 하나로서, 3개의 중쇄와 3개의 경쇄로 구성된 3개의 가지를 갖는 트리스켈리온 형태를 나타내는 단백질을 의미한다. 상기 3개의 가지는 상호작용하여 베지클을 감싸는 다면성 격자(polyhedral lattice)를 형성할 수 있다. 혈관내피세포의 기능 부전에 있어서, 클라트린과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다. 본 발명의 클라트린 서열정보는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 등과 같은 공지의 데이터 베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 클라트린은 NCBI GenBank Acession NO. NM_001288653.1, NM_001003908.1, NM_019299.1 또는 XM_001136053.4일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명에서 사용된 용어, “Rab5C”는 GTP 가수분해 효소(GTPase)의 하나로 초기 엔도좀(early endosomes)과 세포막(plasma membrane)간의 융합을 조절하여 멤브레인 트래픽 (membrane traffic)을 조절하는 역할을 하는 단백질을 말한다. 혈관질환 유발물질에 의한 혈관내피세포의 기능 부전에 있어서, Rab5C과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다. 본 발명의 Rab5C 서열정보는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 등과 같은 공지의 데이터 베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Rab5C는 NCBI GenBank Acession NO.CR541901.1, AB232595.1, NM_001105840.2 또는 NM_001246383.1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어, “EEA1(Early Endosome Antigen 1)”은 초기 엔도좀에 위치하여, 엔도좀 트래픽킹(endosomal trafficking)에서 중요한 역할을 한다. 혈관내피세포의 기능 부전에 있어서, EEA1의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다. 본 발명의 EEA1 서열정보는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 등과 같은 공지의 데이터 베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 EEA1는 NCBI GenBank Acession NO. NM_003566.3, NM_001001932.3, NM_001108086.1 또는 XM_522610.5일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명에서 사용된 용어, “혈관내피세포”는 혈관 확장과 수축, 혈관 평활근의 증식과 이동, 혈전생성과 용해 등 혈관항상성을 유지하는 역할을 한다.

[0023] 본 발명에서 사용된 용어, “혈관내피세포의 기능 부전”은 혈관내피세포가 제 기능을 하지 못해 혈관 확장과 수축, 혈관 평활근의 증식과 이동, 혈전생성과 용해 등과 관련하여 혈관항상성이 깨어지고, 이에 의해 혈관질환의 원인이 되는 것을 의미한다. 혈관내피세포의 기능 부전은 혈관벽 손상과 혈관 수축성 증가를 초래하며, 이를 통해 혈관질환이 발생하게 된다. 본 발명에서 혈관 질환은 고혈압, 동맥경화증, 당뇨병성 혈관질환 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 고혈압은 임신성 고혈압일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 상기 혈관질환은 혈관내피세포의 기능 부전 정도로 혈관질환의 진행상태를 알 수 있으며, 이러한 혈관내피세포의 기능 부전은 혈관질환 유발 물질들에 의해서 유발되는데, 이 물질들은 ROS를 발생하는 등 여러 가지 경로를

통해 혈관내피세포 기능 부전을 유발하고, 혈관내피세포의 기능 부전이 진행되면서 혈관질환이 발병한다. 상기 혈관질환 유발물질은 혈관내피세포의 KCa2.3 채널, 카베올린-1, 클라트린, Rab5C, EEA1 등의 발현 수준에 영향을 미친다.

[0025] 본 발명에 있어서 상기 혈관질환 유발 물질은 산화 저밀도지질단백질(oxidized low-density lipoprotein), 리소포스파티딜콜린 (Lysophosphatidylcholine, LPC), VEGF를 억제하여 임신성 고혈압을 유발시키는 물질(sFlt-1), 고혈당, 수퍼 옥사이드 아니온 도너(superoxide anion donor) 등 산화성 스트레스 증가물질들일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에서 용어 “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 혈관내피세포의 기능 부전 여부를 확인하는 것으로서, 이를 통해 혈관내피세포의 기능 부전으로 인한 혈관질환 발병여부를 조기에 예측할 수 있다.

[0027] 본 발명에 사용된 용어 "mRNA 수준 측정"이란 혈관내피세포의 기능 부전을 진단하기 위해 분리된 세포에서 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 유전자들의 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 구체적으로 프라이머 쌍 또는 프로브이며, 상기 유전자들의 핵산 정보가 GeneBank 등에 알려져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.

[0029] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0030] 구체적으로, 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위해, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1으로부터 선택되는 단백질의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머 쌍"은 표적 유전자 서열을 인지하는 정방향 및 역방향의 프라이머로 이루어진 모든 조합의 프라이머 쌍을 포함하나, 구체적으로, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성을 부여할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브 분자의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 구체적으로는 PNA (peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA 일 수 있으며, 가장 구체적으로는 PNA이다. 또한, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체외에서 제조된 것을 포함하는 것으로 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 상기 유전자들의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 유전자 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 길이는 6 내지 100 염기, 구체적으로 8 내지 60 염기, 보다 구체적으로, 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드를 합성하는 한가지 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 다중클로닝부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 상기 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않

도록 하는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명에 사용된 용어 "단백질 수준 측정"이란 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위해 분리된 세포에서 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 마커 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정이다. 상기 마커 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 발현 수준을 확인할 수 있으며, 구체적으로 항체를 이용하지 않고 단백질 발현 수준 자체를 측정한다.

[0035] 상기 단백질 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbentassay) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0036] 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위해 구체적으로 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 KCa2.3 채널, 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1으로부터 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에 사용된 용어 "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 KCa2.3 채널, 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1 중에서 선택되는 하나 이상의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[0038] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는, 혈관내피세포에 혈관질환 유발물질들(임신성 고혈압 환자의 혈청, oxLDL, LPC, 고혈당 등)을 처리하여 KCa2.3 채널, 카베올린(caveolin-1), 클라트린(clathrin)의 단백질 발현 수준을 확인한 결과, KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준이 감소하는 반면, caveolin-1, clathrin 단백질의 발현 수준은 증가함을 확인하였다. 이를 통해 혈관질환 유발물질에 의해 유도되는 혈관내피세포의 기능 부전을 KCa2.3 채널 또는 caveolin-1, clathrin의 발현 수준을 측정하여 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0040] 본 발명의 다른 일 실시예에서는, 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 혈청을 처리한 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널과 caveolin-1 단백질 발현 정도를 분석한 결과, 임신성 고혈압 환자의 혈청을 처리한 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준이 감소하고 caveolin-1의 발현 수준은 증가하는 것을 확인하였다.

[0041] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는, oxLDL, LPC 및 고혈당이 정상 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널 단백질 발현 수준에 미치는 효과를 분석한 결과, oxLDL, LPC 및 고혈당에 의해 KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준이 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 임신성 고혈압, 당뇨병의 혈관질환 합병증 등에서 혈청 속 물질인 oxLDL, 고혈당 등이 혈관내피세포의 KCa2.3 채널 발현을 비정상적으로 감소하여 혈관내피세포 기능부전이 유도된다는 것을 알 수 있었다.

[0042] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는, 혈관질환유발물질에 의한 KCa2.3 채널 단백질 발현 수준 감소에 항 카베올린-1 항체, 항 클라트린 항체 등이 미치는 효과를 분석한 결과, 이들 물질에 의해 회복되는 것을 확인하였다.

[0043] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는, 혈관질환유발물질의 처리에 의하여 EEA1 또는 Rab5C 단백질의 발현수준이 증가함을 확인하였다.

[0044] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는, 혈관질환유발물질에 의한 KCa2.3 채널과 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준 감소와 항 카베올린-1 항체에 의한 채널 단백질 발현 수준 회복이 KCa3.1 채널에 비해 KCa2.3 채널이 더 크게 일어남을 확인하였다.

[0045] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물을 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트를 제공한다. 구체적으로, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.

[0046] 또한, 상기 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[0047] 구체적으로, 상기 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 각 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 구체적으로 약 10 bp 내지 30 bp 의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNAse, RNAse 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0048] 구체적으로, 상기 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0049] 또한, 구체적으로, 상기 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 KCa3.1 채널, 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0050] 또한, 구체적으로, 상기 진단용 키트는 5분내 분석결과를 알 수 있는 신속한 테스트를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 래피드(rapid) 키트 일 수 있다. 래피드 키트는 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 래피드 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 래피드 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이항체와 2차 항체가 고정된 나이트로 셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수패드와 샘플 패드 등 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0051] 또한, 구체적으로, 상기 진단용 키트는 질량 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 MS/MS 모드인 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다. SIM(Selected Ion Monitoring)이 질량분석기의 소스 부분에서 한 번 충돌하여 생긴 이온을 이용하는 방법인 반면, MRM은 상기 한 번 깨진 이온 중에서 특정 이온을 한 번 더 선택하여 연속적으로 연결된 또 다른 MS의 소스를 한 번 더 통과시켜 충돌시킨 후 이 중에서 얻은 이온들을 이용하는 방법이다. 보다 구체적으로 SIM에서는 선택한 정량이온이 혈장에서도 검출되는 이온인 경우에 정량에 방해가 될 수 있다는 문제점이 있다. 반면, MRM을 이용하는 경우, 같은 질량을 가진 이온이라도 한 번 더 깨지면 분자구조가 달라지면서 차별화된 경향을 나타내므로, 이를 정량이온으로 사용하게 되면 백그라운드에서 방해되는 피크가 제거되어 한 층 더 깨끗한 베이스 라인을 얻을 수 있다. 따라서, 질량 분석시에 MRM 모드를 사용함으로써 보다 우수한 분석 감도에서 원하는 물질들을 동시에 분석할 수 있다. 상기 MRM(Multiple reaction monitoring) 분석 방법들을 통하여, 혈관내피세포의 기능 부전으로 유발되는 혈관질환 환자에서 정상 대조군에서의 단백질 발현 수준과 혈관내피세포의 기능 부전이 있는 개체에서의 단백질 발현 수준을 비교할 수 있고, 혈관내피세포의 기능 부전 진단 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량 증감여부를 판단하여, 혈관내피세포의 기능 부전 여부를 진단할 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

[0053] 구체적으로, 본 발명의 방법은 (a) 분리된 생물학적 시료를 정상 혈관내피세포에 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 혈관내피세포에서 (i) KCa2.3 채널의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계에서 측정된 (i)를 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위한 정보의 제공방법일 수 있다.

[0054] 또한, 상기 방법은 상기 (b)단계에서 (ii) 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1으로 이루어진 군에서 선택되는

하나 이상의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 추가적으로 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 (ii)/(i)의 식으로 계산된 비율을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 상기 카베올린-1, 클라트린, Rab5C, EEA1 및 KCa2.3 채널은 혈관내피세포의 기능 부전을 가지는 개체에서 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 상기 발현 수준이 변화하면 혈관 기능 부전을 진단하고 이를 통해 혈관질환을 조기 진단, 진행상태 진단이 가능할 것이다.

[0056] 본 발명에서 사용된 용어 "생물학적 시료"는 혈관내피세포의 기능 부전 의심 개체의 혈관내피세포 기능 부전 여부를 진단하기 위하여 상기 개체로부터 수집한 시료를 의미한다. 예를 들어, 전혈, 혈장, 혈청, 이들의 분획 또는 이들에 함유된 세포 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0057] 구체적으로, 혈관내피세포의 기능 부전 의심 개체의 생물학적 시료의 상기 (i) KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 단백질 발현 수준 또는 유전자 발현 수준보다 낮을 경우, 또는 (ii) 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 또는 EEA1 단백질의 발현 수준 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 단백질의 발현 수준 또는 유전자의 발현 수준보다 높을 경우, 혈관내피세포의 기능 부전으로 판단할 수 있다.

[0058] 보다 구체적으로, 상기 (ii)/(i)의 비율이 정상 대조군 시료의 비율보다 높은 경우, 혈관내피세포의 기능 부전으로 판단할 수 있다.

[0059] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준은 mRNA 발현 수준을 측정하거나 비교할 수 있다.

[0060] 상기 mRNA 발현 수준 측정 또는 비교는 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩 등을 사용할 수 있으나, 본 발명은 이들에 제한되는 것이 아니다. 상기 측정 방법들을 통하여 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 혈관내피세포의 기능 부전으로 유발되는 혈관질환 환자의 mRNA 발현량을 확인할 수 있고, 이들 발현량 정도를 비교함으로써 혈관질환 여부를 진단 또는 예측할 수 있다.

[0061] 본 발명의 상기 단백질 발현 수준은 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 측정 및 비교할 수 있다. 상기 항체와 생물학적 시료 내의 해당 단백질이 항원-항체 복합체를 형성하도록 하고, 이를 검출하는 방법을 이용한다.

[0062] 본 발명에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체 복합체의 검출은 당업계에 공지된 바와 같은 방법, 예를 들어 분광학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 및 기타 방법을 이용하여 검출할 수 있다.

[0063] 본 발명의 목적상, 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LCMS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbentassay) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명의 또 하나의 다른 양태는 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0065] 구체적으로, 본 발명의 혈관내피세포 기능 부전 유도 물질의 스크리닝 방법은 (a) 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 분리된 세포에 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질을 처리한 세포에서 (i) KCa2.3 채널의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 (i)가 후보 물질을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질로 선별하는 단계를 포함한다.

[0066] 아울러, 상기 방법은 상기 (b) 단계에서 (ii) 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 추가적으로 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 (ii)/(i)의 식으로 계산된 비율이 후보 물질을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질인 것으로 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명에서 상기 분리된 세포는 혈관내피세포 기능 부전이 유발되지 않은 세포(정상세포) 또는 개체로부터 분리된 세포를 의미하며, 구체적으로 혈액 또는 혈관에서 분리된 세포, 더욱 구체적으로, 혈관내피세포 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본 발명에서 사용된 용어 "후보 물질(test agent)"은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 이들로 한정되지는 않으나, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기분자(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 또한, 천연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다.

[0069] 본 발명의 일 실시예에서는 혈관질환 유발물질인 LPC를 정상 혈관내피세포에 처리하였을 때, KCa2.3 채널 단백질은 감소하고 카베올린-1 또는 클라트린 단백질의 발현 수준은 증가하였다. 이를 통해 정상 혈관내피세포에 혈관내피세포 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질을 처리한 후 상기 단백질의 발현 수준을 측정하여 상기 후보 물질이 혈관내피세포 기능 부전을 유도할 수 있는지 여부를 판단할 수 있음을 알 수 있었다.

발명의 효과

[0070] 본 발명의 카베올린-1, 클라트린, Rab5C, EEA1 또는 KCa2.3 채널의 발현 수준을 측정 및 비교하면, 혈관내피세포에서 기능부전을 진단할 수 있으므로, 혈관 질환을 조기진단 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 혈장을 처리한 정상 혈관내피세포에서의 KCa2.3 채널과 카베올린 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블럿으로 비교 측정 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다. *와 **는 대조군(정상 산모 혈청을 처리한 혈관내피세포)와 비교하여 각각 p<0.05와 P<0.01를 의미한다(NP: 정상 산모, PE: 임신성 고혈압 환자, EC: 혈관내피세포).

도 2는 혈관질환 유발물질인 산화 저밀도 지질 단백질(oxidized low density-lipoprotein, oxLDL)(A) 및 LPC(B)이 혈관내피세포 KCa2.3 채널 단백질 발현 수준에 미치는 영향을 웨스턴 블럿으로 비교 측정 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다. 한편, *와 **는 대조군(혈관질환 유발물질을 처리하지 않은 혈관내피세포)과 비교하여 각각 P<0.05와 P<0.01를 의미한다.

도 3은 혈관질환 유발물질인 고혈당(B)이 혈관내피세포 KCa2.3 채널 단백질 발현 수준에 미치는 영향을 웨스턴 블럿으로 비교 측정 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다. 한편, **는 대조군(혈관질환 유발물질을 처리하지 않은 혈관내피세포)과 비교하여 P<0.01를 의미한다.

도 4는 혈관질환 유발물질인 임신성고혈압 환자 혈청(A) 및 LPC(B)에 의한 혈관내피세포 KCa2.3 채널 단백질 발현 수준 감소에 미치는 항 카베올린-1 항체의 영향을 웨스턴 블럿으로 비교 측정 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다. 한편, *와 **는 대조군(항 카베올린-1 항체을 처리하지 않은 혈관내피세포)과 비교하여 각각 P<0.05와 P<0.01를 의미한다.

도 5는 혈관질환 유발물질인 LPC에 의한 혈관내피세포 KCa2.3 채널 단백질 발현 수준 감소에 미치는 항 클라스친 항체의 영향을 웨스턴 블럿으로 비교 측정 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다. 한편, **는 대조군(항 클라스린 항체을 처리하지 않은 혈관내피세포)과 비교하여 P<0.01를 의미한다.

도 6은 LPC 처리된 혈관내피세포에서 LPC의 처리수준에 따른 EEA1 또는 Rab5C 단백질의 발현수준 변화를 분석한 결과를 나타내는 웨스턴블럿 사진 및 그래프이다.

도 7은 혈관질환 유발물질인 임신성고혈압 환자 혈청(A) 및 고혈당(B)이 혈관내피세포 KCa2.3 채널과 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준 감소에 미치는 정도를 웨스턴 블럿으로 측정 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다. 한편, **는 대조군과 비교하여 P<0.01를 의미한다.

도 8은 혈관질환 유발물질인 임신성고혈압 환자 혈청(A) 및 LPC(B)에 의한 혈관내피세포 KCa2.3 채널과 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준 감소에 미치는 항 카베올린-1 항체의 효과를 웨스턴 블럿으로 비교 측정 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하

기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1: 혈관질환 환자의 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널과 카베올린-1 단백질 발현 수준 분석**

[0074] 혈관질환 환자의 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널 발현 감소와 카베올린-1의 발현 증가가 혈장 또는 혈청 속에 있는 혈관질환 유발물질에 의해 일어나는지를 규명하기 위해 정상 산모와 임신성 고혈압 환자 혈장을 노출시킨 혈관내피세포에서의 KCa2.3 채널과 카베올린-1 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블럿으로 측정하고, 비교분석하였다 (도 1).

[0075] 그 결과, 정상 산모의 혈장에 노출시킨 혈관내피세포와 비교할 때, 임신성 고혈압 환자의 혈장에 노출시킨 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널의 단백질 발현 수준이 현저하게 감소하는 반면 카베올린-1의 발현은 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다.

[0076] 따라서, 임신성 고혈압이 발병하는 경우 혈관내피세포의 카베올린-1의 발현이 비정상적으로 증가하고 KCa2.3 채널의 발현 수준이 비정상적으로 감소하여 혈관내피세포 기능부전이 유도된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] **실시예 2: 혈관질환 유발물질이 처리된 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널 단백질 발현 수준 분석**

[0078] 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널 발현 감소가 혈관질환 유발물질에 의해 일어나는지를 규명하기 위해, 혈관내피세포 기능 부전을 유발하는 것으로 알려진 oxLDL, LPC 그리고 고혈당이 혈관내피세포에서의 KCa2.3 채널의 발현 수준에 미치는 효과를 비교 분석하였다.

[0079] 상기 실험 결과, 혈관질환 유발물질인 oxLDL, LPC (도 2), 또는 고혈당(도 3)에 의해서도 혈관내피세포에서의 KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준이 감소하였다.

[0080] 따라서, 임신성 고혈압, 당뇨병의 혈관질환 합병증 등에서 혈장 또는 혈청 속 물질인 oxLDL, 고혈당 등이 혈관내피세포의 KCa2.3 채널 발현 수준을 비정상적으로 감소시켜 혈관내피세포 기능부전이 유도된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] **실시예 3: 혈관질환 유발물질이 처리된 혈관내피세포에서 카베올린-1의 역할 분석**

[0082] 혈관질환 유발물질에 의한 혈관내피세포 KCa2.3 채널 단백질 발현 감소에 caveolin-1이 관여함을 규명하기 위해 임신성고혈압 환자 혈장 혹은 LPC를 처치한 정상 혈관내피세포에 항 카베올린-1 항체를 처치한 후, 웨스턴 블럿을 이용하여 KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준을 측정하였다.

[0083] 그 결과, 항 caveolin-1 항체 처치에 의하여 임신성 고혈압 환자 혈장 (도 4의 A) 또는 LPC (도 4의 B)에 의한 KCa2.3 채널 단백질 감소가 회복되어 증가함을 확인하였다.

[0084] 따라서 상기 결과에 비추어 볼 때, 혈관질환 유발물질에 의한 KCa2.3 채널 단백질 발현 감소에 카베올린-1이 관여함을 알 수 있었다.

[0085] 이는 혈관질환 유발물질에 의해 유도되는 혈관내피세포의 기능 부전을 KCa2.3 채널 또는 카베올린-1 의 발현 수준을 측정하여 진단할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0086] 또한, 이는 정상 혈관내피세포에 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리한 후, KCa2.3 채널 또는 카베올린-1 의 단백질 발현 수준을 측정하여 상기 후보 물질이 혈관내피세포 기능 부전을 유도할 수 있는지 여부를 판단할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0087] **실시예 4: 혈관질환 유발물질이 처리된 혈관내피세포에서 클라트린의 역할 분석**

[0088] 혈관질환 유발물질에 의한 혈관내피세포 KCa2.3 채널 단백질 발현 감소에 클라트린이 관여함을 규명하기 위해 LPC를 처치한 정상 혈관내피세포에 항 클라트린 항체를 처치한 후, 웨스턴 블럿을 이용하여 KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준을 측정하였다.

[0089] 그 결과, 항 클라트린 항체 처치에 의하여 LPC에 의한 KCa2.3 채널 단백질 감소가 회복되어 증가함을 확인하였다 (도 5).

[0090] 따라서 상기 결과에 비추어 볼 때, 혈관질환 유발물질에 의한 KCa2.3 채널 단백질 발현 감소에 클라트린이 관여함을 알 수 있었다.

[0091] 이는 혈관질환 유발물질에 의해 유도되는 혈관내피세포의 기능 부전을 KCa2.3 채널 또는 클라트린의 발현 수준을 측정하여 진단할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0092] 또한, 이는 정상 혈관내피세포에 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리한 후, KCa2.3 채널 또는 클라트린의 단백질 발현 수준을 측정하여 상기 후보 물질이 혈관내피세포 기능 부전을 유도할 수 있는지 여부를 판단할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0093] **실시예 5: 혈관질환 유발물질 처리에 따른 혈관내피세포내 EEA1 또는 Rab5C 단백질의 발현 수준 분석**

[0094] 정상 혈관내피세포에 혈관질환 유발물질을 처리한 후, 웨스턴 블럿을 이용하여 EEA1 또는 Rab5C 단백질의 발현 수준을 측정하였다(도 6). 이때, 혈관질환 유발물질로는 0, 3, 10 또는 30 μM의 LPC를 사용하였다.

[0095] 도 6에서 보듯이, 혈관질환 유발물질의 처리수준이 증가할 수록 EEA1 또는 Rab5C 단백질의 발현수준이 증가함을 확인하였다.

[0096] **실시예 6: 혈관질환 유발물질이 처리된 혈관내피세포에서 KCa2.3 채널과 KCa 3.1 채널의 발현 수준 비교 분석**

[0097] 혈관질환 유발물질들이 혈관내피세포 KCa2.3 채널과 KCa3.1 채널 단백질의 발현에 미치는 영향을 비교 분석하기 위하여, 정상 산모 혹은 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청에 노출된 혈관내피세포 (도 7의 A)에서 그리고 고혈당에 노출된 혈관내피세포 (도 7의 B)에서 KCa2.3 채널과 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블럿을 이용하여 측정하였다.

[0098] 도 7에서 보듯이, 혈관질환 유발물질에 의한 KCa2.3 채널 단백질 발현 감소가 KCa3.1 채널 단백질 감소에 비해 더 크게 나타남을 확인하였다.

[0099] 한편, 정상 산모 혹은 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청에 노출된 혈관내피세포 (도 8의 A)에서 그리고 LPC에 노출된 혈관내피세포 (도 8의 B)에서 항 카베올린-1에 의한 KCa2.3 채널과 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준 회복 정도를 웨스턴 블럿을 이용하여 측정하였다.

[0100] 도 8에서 보듯이, 항 카베올린-1에 의한 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준 회복 정도 보다는 KCa2.3 채널 단백질의 발현 수준 회복 정도가 더욱 명확히 나타남을 확인하였다.

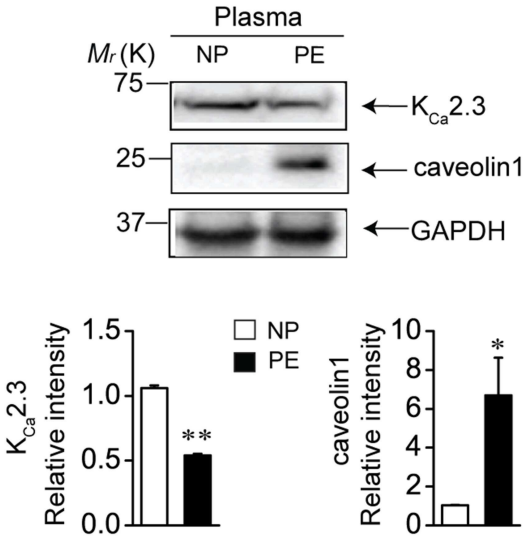
[0101] 따라서, 상기 결과에 비추어 볼 때, 혈관질환 유발물질에 의한 혈관내피세포 기능 부진 진단은 KCa3.1에 비해 KCa2.3이 더 명확함을 확인할 수 있었다.

[0102] 이를 통해, 혈관내피세포 기능 진단은 KCa3.1 채널의 발현 수준 보다 KCa2.3 채널의 발현 수준이 더 정확함을 알 수 있었다.

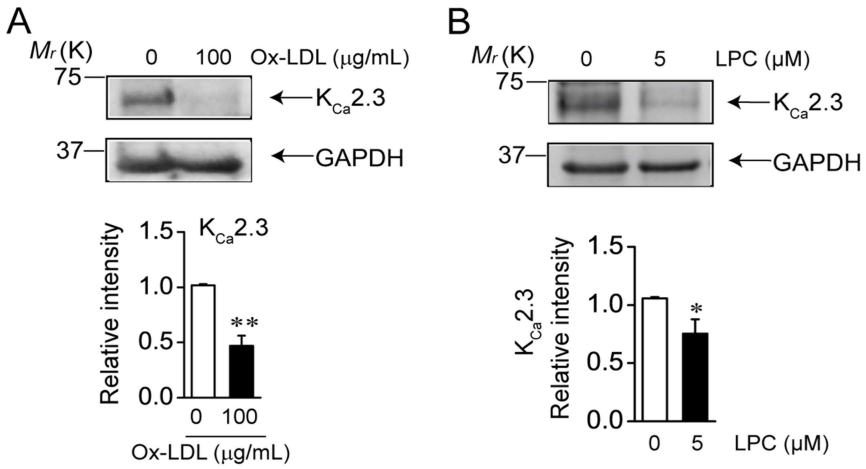
[0103] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

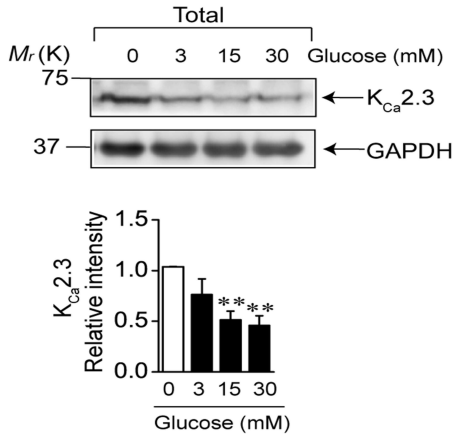
도면1


Plasma
Mr (K)
NP
PE
75
25
37
KCa2.3
caveolin1
GAPDH
KCa2.3 Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
**
NP
PE
caveolin1 Relative intensity
10
8
6
4
2
0
*

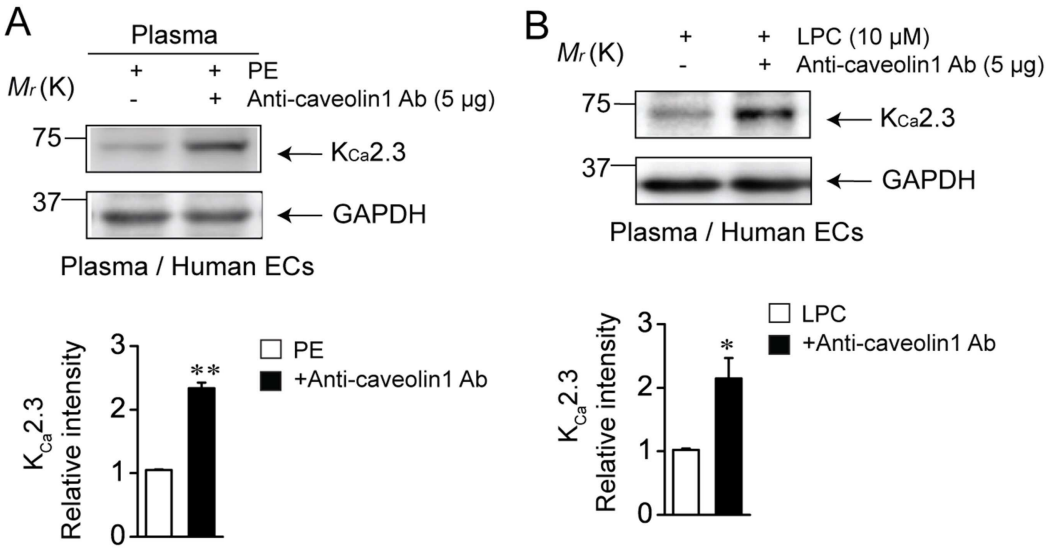
도면2


A
Mr (K)
0
100
Ox-LDL (μg/mL)
75
37
KCa2.3
GAPDH
KCa2.3
Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
**
0
100
Ox-LDL (μg/mL)
B
Mr (K)
0
5
LPC (μM)
75
37
KCa2.3
GAPDH
KCa2.3
Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
*
0
5
LPC (μM)

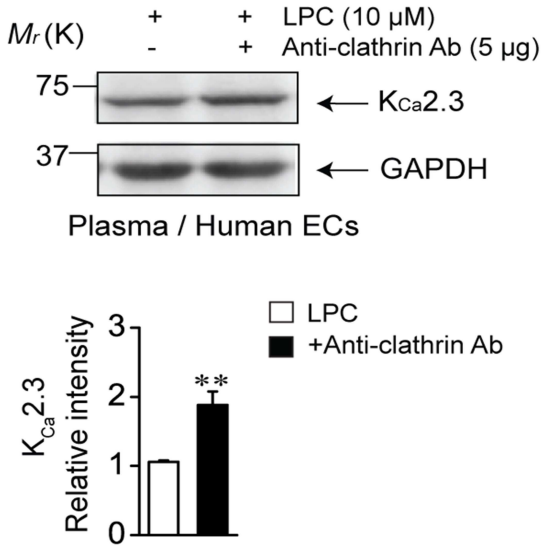
도면3


Total
Mr (K)
0 3 15 30 Glucose (mM)
75
37
KCa2.3
GAPDH
KCa2.3 Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
0 3 15 30
Glucose (mM)

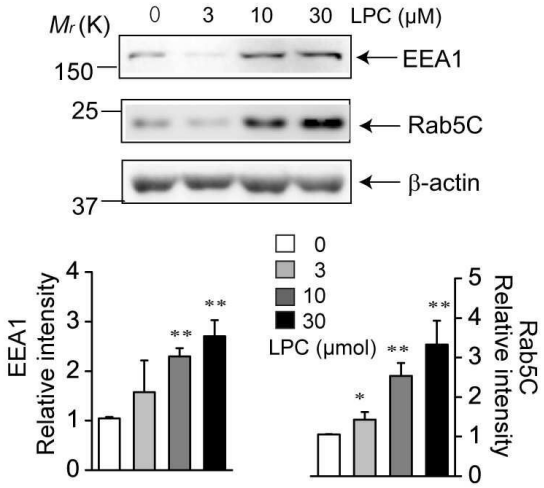
도면4


A
Plasma
Mr (K)
+ + PE
- + Anti-caveolin1 Ab (5 μg)
75
37
KCa2.3
GAPDH
Plasma / Human ECs
KCa2.3 Relative intensity
3
2
1
0
**
PE
+Anti-caveolin1 Ab
B
Mr (K)
+ + LPC (10 μM)
- + Anti-caveolin1 Ab (5 μg)
75
37
KCa2.3
GAPDH
Plasma / Human ECs
KCa2.3 Relative intensity
3
2
1
0
*
LPC
+Anti-caveolin1 Ab

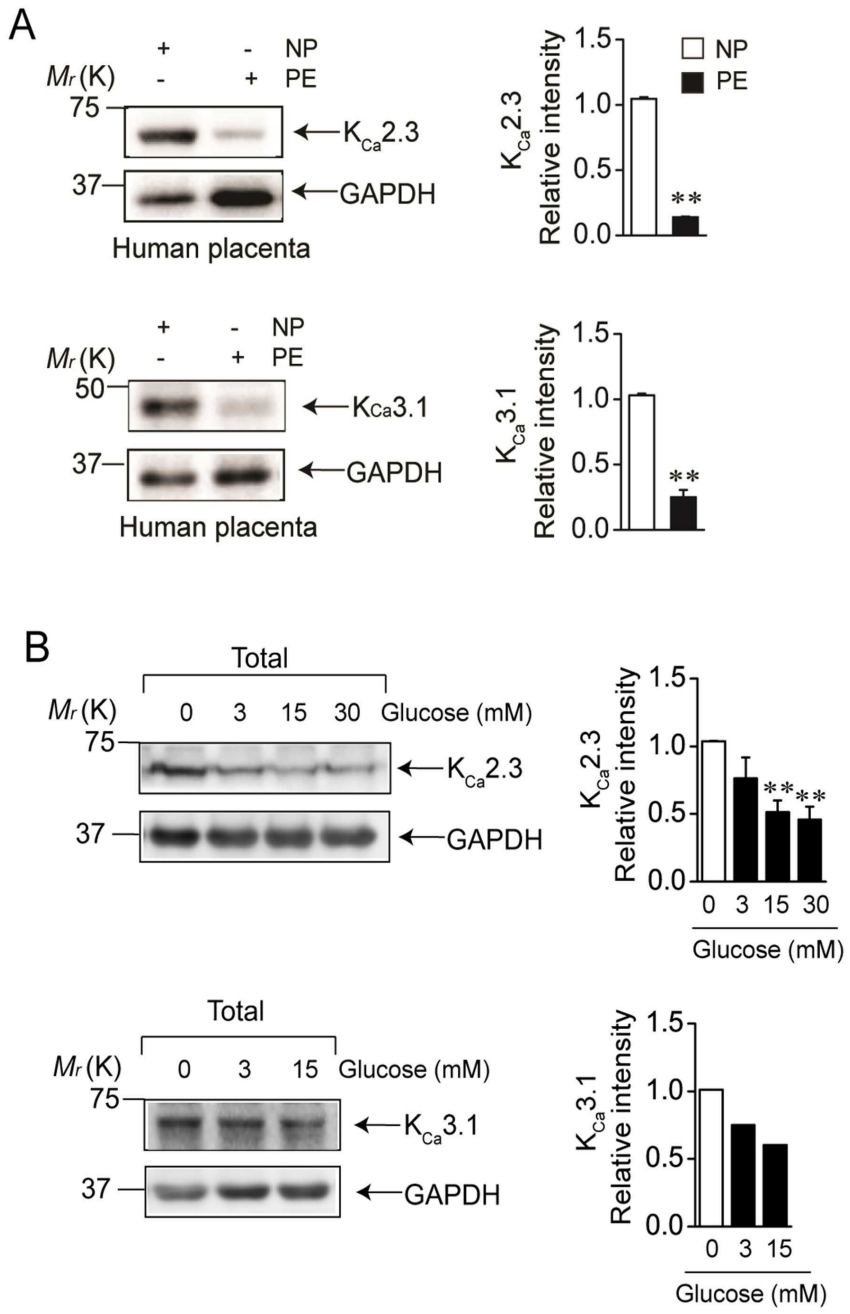
도면5


Mr (K)
+ + LPC (10 μM)
- + Anti-clathrin Ab (5 μg)
75
37
KCa2.3
GAPDH
Plasma / Human ECs
KCa2.3 Relative intensity
3
2
1
0
**
LPC
+Anti-clathrin Ab

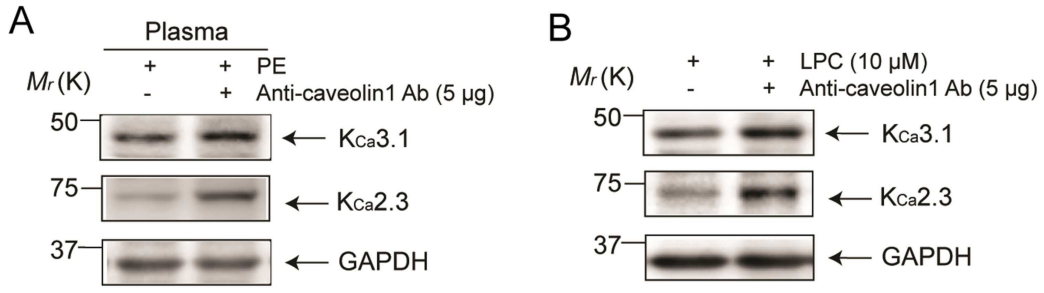
도면6


Mr (K)
0
3
10
30
LPC (μM)
150
EEA1
25
Rab5C
37
β-actin
EEA1 Relative intensity
Rab5C Relative intensity
LPC (μmol)
**
*

도면7


A
+ - NP
Mr(K) - + PE
75
KCa2.3
37
GAPDH
Human placenta
KCa2.3 Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
NP
PE
**
+ - NP
Mr(K) - + PE
50
KCa3.1
37
GAPDH
Human placenta
KCa3.1 Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
**
B
Total
Mr(K) 0 3 15 30 Glucose (mM)
75
KCa2.3
37
GAPDH
KCa2.3 Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
0 3 15 30
Glucose (mM)
Total
Mr(K) 0 3 15 Glucose (mM)
75
KCa3.1
37
GAPDH
KCa3.1 Relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
0 3 15
Glucose (mM)

도면8


A
Plasma
Mr(K) + + PE
- + Anti-caveolin1 Ab (5 μg)
50
KCa3.1
75
KCa2.3
37
GAPDH
B
Mr(K) + + LPC (10 μM)
- + Anti-caveolin1 Ab (5 μg)
50
KCa3.1
75
KCa2.3
37
GAPDH