



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0122685
(43) 공개일자 2016년10월24일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 38/17</i> (2006.01) <i>A61K 38/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 38/17</i> (2013.01)
 <i>A61K 38/00</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0132868(분할)
 (22) 출원일자 2016년10월13일
 심사청구일자 2016년10월13일
 (62) 원출원 특허 10-2014-0108423
 원출원일자 2014년08월20일
 심사청구일자 2014년08월20일</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 김국성
 대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대흥동, 센트럴자이)</p> <p>정설훈
 대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대흥동, 센트럴자이)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인충정</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 6 항

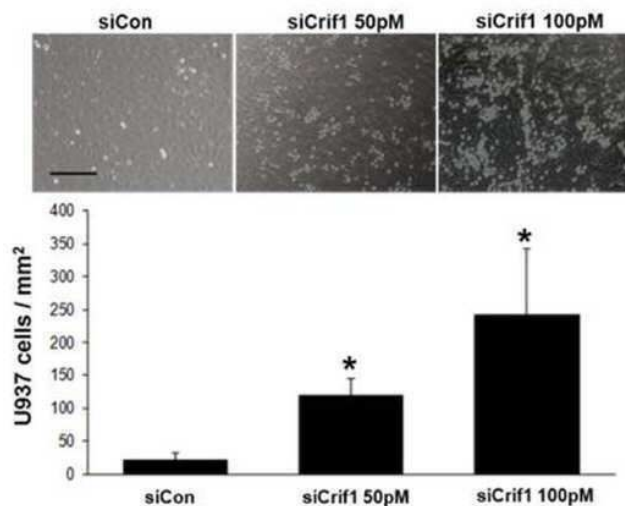
(54) 발명의 명칭 CRIF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CRIF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, CRIF1 단백질을 이용한 심혈관질환 진단용 키트, 및 CRIF1 단백질을 이용한 심혈관질환의 진단에 필요한 정보제공방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, CRIF1 결핍으로 유도된 미토콘드리아 기능장애가 ROS 생성을 자극하여, 내피세포 활성화를 초래하고 p66shc에 의한 내피세포 활성화를 부분적으로 매개함을 확인하였다. 따라서 CRIF1 단백질 또는 유전자는 내피세포 기능장애와 관련된 혈관질환의 진단 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도5a



(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

(72) 발명자

하르샤 나가르

대전광역시 중구 대흥로 7-6 (문화동), 404호

송민호

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 306동 1202호
(문화동, 센트럴파크3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013053005

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구-기본연구

연구과제명 아스피린과 Histone Deacetylase-3에 의한 혈소판 eNOS 조절 연구 및 이를 활용한 심혈관계 질환 치료 기법 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 CRIF1(CR6 Interacting Factor 1) 단백질 및 상기 CRIF1 단백질은 서열번호 2로 표시되는 유전자로 코딩하는 것을 포함하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 유전자는 플라스미드 발현 벡터 또는 바이러스 벡터에 삽입되는 것을 특징으로 하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 CRIF1 단백질은 내피세포에서 CRIF1 결핍으로 인한 내피세포 활성화 및 혈관 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

서열번호 2로 표시되는 유전자로 코딩된 CRIF1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 심혈관질환 진단용 키트.

청구항 5

제 6 항에 있어서,

상기 키트는 면역분석(immunoassay)용인 것을 특징으로 하는 심혈관질환 진단용 키트.

청구항 6

내피세포 활성화 및 혈관 염증으로 유발되는 심혈관질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 혈관 내피세포에서 항원항체반응을 통해 서열번호 2로 표시되는 유전자로 코딩된 CRIF1 단백질을 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CRIF1을 포함하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 CRIF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, CRIF1 단백질을 이용한 심혈관질환 진단용 키트, 및 CRIF1 단백질을 이용한 심혈관질환의 진단에 필요한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 산화 스트레스는 다수의 심혈관질환과 관련된 시그널링 경로들을 제어함으로써 혈관 항상성에 악영향을 미친다. 산화 스트레스는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성과 제거 사이의 불균형에 기인한다. 정상세포

에서, ROS 형성은 다양한 시그널링 경로를 조절하지만, 심혈관질환에서, ROS는 항산화적 방어를 압도하여 손상 (damage)을 일으킨다 (Cai H, et al. 2000 *Circ Res* 87: 840-844).

[0003] 미토콘드리아는 혈관 병리생리학에서 중요한 역할을 하는 진핵세포의 매우 역동적인 세포기관이다 (Davidson SM 2010 *Cardiovasc Res* 88: 58-66). 미토콘드리아는 당뇨, 산화형 저밀도지질단백(oxidized low-density lipoprotein, oxLDL), 노화, 흡연 및 전단 스트레스(shear stress)와 같은 심혈관질환에 대한 전통적인 위험인자들의 잠재적 타겟이다 (Davidson SM, et al. 2007 *Circ Res* 100: 1128-1141). 또한 미토콘드리아 손상은 ROS의 증가 및 죽상동맥경화증의 진행과 함께 내피세포 기능(endothelial function)에 영향을 미친다 (Davidson SM 2010 *Cardiovasc Res* 88: 58-66). 다수의 서로 다른 ROS 생성 부위가 미토콘드리아 내에서 확인되었으며, 가장 활성인 것은 OXPHOS(oxidative phosphorylation) 복합체 I와 복합체 III이다 (Cadenas E, et al. 2000 *Free Radic Biol Med* 29: 222-230; Chrysostomou V, et al. 2013 *Curr Opin Pharmacol* 13: 12-15). OXPHOS는 미토콘드리아 내막(inner mitochondrial membrane)에 삽입되어 있는 5중 서브유닛 복합체들로 구성되어 있다. 전자들은 복합체 I (NADH dehydrogenase), II (succinate-ubiquinoneoxidoreductase), III (ubiquinol-cytochromeoxidoreductase), 및 IV (cytochrome c oxidase)로 구성되는, ETC(electron transport chain)를 통해 NADH로부터 산소분자로 옮겨진다. 복합체 V (ATP synthase)는 ADP와 무기인(inorganic phosphate)을 모아 ATP를 합성한다 (Thorburn DR 2004 *Nat Genet* 36: 13-14). 미토콘드리아가 내피세포의 ATP 생성에 필요하지 않을 수는 있지만, 미토콘드리아 활성은 ROS를 통해 시그널링을 조절하는데 중요하다. 대부분의 세포에서, 미토콘드리아 호흡(mitochondrial respiration)은 ROS 생성의 상당한 부분을 설명하고 (Robinson BH 1998 *J Inherit Metab Dis* 21: 598-603), 내피세포에서 ROS는 미토콘드리아 호흡의 부산물로서 생성된다 (Fink BD, et al. 2005 *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E71-79). 따라서 일반적인 원리는 미토콘드리아 ROS 시그널이 일어나 다른 세포의 근원(sources)으로부터 ROS 생성을 촉발시키는 것으로 보인다 (Daiber A 2010 *Biochim Biophys Acta* 1797: 897-906).

[0004] CRIF1은 미토콘드리아에 존재하며 폴리펩티드 탈출구(polypeptide exit tunnel) 근처에 위치한, 큰 미토리포솜(mitochondrial) 서브유닛과 관련되어 있다. CRIF1의 결핍은 mtDNA-암호화된 신생 OXPHOS 폴리펩티드의 비정상적인 합성 및 미토콘드리아 내막으로의 결함이 있는 삽입과 같은, 다양한 결함을 초래한다 (Ryu MJ, et al. 2013 *PLoS Genet* 9: e1003356). CRIF1의 결핍은 OXPHOS 복합체 I, III 및 IV에서 결함(assembly)의 실패 뿐만 아니라 상당히 낮은 수준의 CCCP(carbonyl cyanide *m*-chloro phenyl hydrazine)-자극된 미토콘드리아의 산소소비량 및 높은 수준의 미토콘드리아 ROS로 인한 미토콘드리아 기능의 저하를 초래한다 (Kim SJ, et al. 2012 *Cell Metab* 16: 274-283).

[0005] p66shc는 어댑터 단백질의 shcA 패밀리에 속하는 어디에서나 발현되는 단백질이다. 포유동물의 Shc 어댑터 단백질은 46, 52, 66 kDa의 3가지 이소폼(p46shc, p52shc, p66shc)을 갖는다. p66shc는 산화환원 효소로 작용하는 유일한 이소폼이며 미토콘드리아 ROS 생성 및 산화 시그널의 변환(translation)에 관련되어 있다 (Shi Y, et al. 2011 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2090-2097). 맥관구조(vasculature)에서, p66shc는 죽상동맥경화증(atherosclerosis)과 같은 병리생리학적 이상과 관련된 내피세포 기능장애(endothelial dysfunction)에서 중요한 역할을 한다 (Camici GG, et al. 2008 *J Appl Physiol* 105: 1628-1631). 다양한 성장인자와 사이토카인에 의한 자극에 반응하여, shcA 단백질들은 티로신 잔기에서 인산화된다 (Rozakis-Adcock M, et al. 1992 *Nature* 360: 689-692). 그러나 p66shc는 H₂O₂ 또는 자외선으로 인한 산화 스트레스에 노출 후 ser36에서 우선 인산화된다 (Nemoto S, et al. 2002 *Science* 295: 2450-2452). ser36에서 인산화는 산화 스트레스에 대한 민감성(susceptibility)을 증가시키며 필수적이고 산화적 손상에 의해 나타나는 세포사멸 반응에 매우 중요하다 (Skulachev VP 2000 *IUBMB Life* 49: 177180).

[0006] 본 발명에서는, CRIF1 결핍으로 유도된 미토콘드리아 기능장애가 ROS 생성을 자극하여, 내피세포 활성화를 초래하고 p66shc에 의한 내피세포 활성화를 부분적으로 매개하는 것으로 가정하고, 이를 이용하여 내피세포 기능장애와 관련된 혈관질환의 진단 및 치료에 CRIF1을 이용할 수 있을 것으로 판단하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 혈관 내피세포 활성화 및 혈관염증으로 유발되는 질환의 치료에 이용하기 위한, CRIF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은, CRIF1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 심혈관질환 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 내피세포 활성화 및 혈관 염증으로 유발되는 심혈관질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 혈관 내피세포에서 항원항체반응을 통해 CRIF1 단백질을 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 CRIF1(CR6 Interacting Factor 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서, 상기 CRIF1은 내피세포에서 CRIF1 결핍으로 인한 내피세포 활성화 및 혈관 염증을 억제함으로써 심혈관질환의 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 CRIF1 결핍 시 p66shc를 통해 산화 스트레스가 유도되고 (도 2c와 d 참조), VCAM-1과 같은 부착 분자들의 발현이 유도되어 염증성 백혈구의 보충을 초래한다 (도 5a 참조). 이러한 p66shc는 맥관구조(vasculature)에서 죽상동맥경화증(atherosclerosis)과 같은 병리생리학적 이상과 관련된 내피세포 기능장애(endothelial dysfunction)에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 (Camici GG, et al. 2008 *J Appl Physiol* 105: 1628-1631), 또한 p66shc이 미토콘드리아 내 ROS 생성에서 작용하는 중요한 역할 및 심혈관질환과의 관련성을 밝혀져 있기 때문에 (Martin-Padura I, et al. 2008 *Endothelium* 15: 276-287; Rota M, et al. 2006 *Circ Res* 99: 42-52), 결핍된 CRIF1을 치료적으로 보충 또는 회복시킴으로써 CRIF1 결핍으로 유발된 내피세포의 기능장애를 개선시켜 최종적으로 심혈관질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0012] 본 발명의 조성물에서, 상기 CRIF1 단백질은 미토콘드리아에 주로 위치되고 CR6/gadd45-상호작용하는 단백질로서 미토콘드리아 리보솜의 단백질 구성성과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다 (Kim SJ, et al. 2012 *Cell Metab* 16: 274-283). 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 CRIF1 단백질은 공지의 단백질로서 그 유래는 특별히 한정되지는 않으나, 바람직하게는 포유동물에서 유래된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 CRIF1 단백질은 인간, 원숭이 및 설치류로 구성된 군에서 유래된 것일 수 있다.

[0013] 하나의 예로서, 상기 CRIF1 단백질은 인간에서 유래된 서열번호 1 (GenBank accession No. AAL85877)의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 염기서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 어떠한 염기서열일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2(GenBank accession No. AF479749.1)의 염기서열일 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물에서, 상기 CRIF1을 코딩하는 유전자는 분리된 유전자 물질로서 유지될 수 있는 플라스미드 벡터의 형태로 세포내로 도입되거나 또는 염색체 내로 통합될 수 있는 선형 DNA를 세포 내로 도입할 수 있다. DNA가 세포 내로 도입될 경우, 당해 분야에 공지된 바와 같이, 염색체 내로의 DNA 혼입을 촉진시키는 시약을 첨가할 수도 있고, 혼입을 촉진시키는 DNA 서열 또한 조성물 내에 포함될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 상기 CRIF1 단백질을 코딩하는 유전자는 발현벡터에 삽입된 형태로 제공될 수 있다.

[0015] 상기 CRIF1 단백질을 코딩하는 유전자는 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터 내로 삽입시킨 후, 상기 발현벡터를 감염(infection) 또는 형질도입(transduction) 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 발현형으로 표적 세포 내에 도입시켜 유전자 치료에 사용할 수 있다.

[0016] 플라스미드 발현 벡터를 이용한 유전자 전달 방법은 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법으로서, FDA로부터 승인받은, 사람에게 사용할 수 있는 방법이다(Nabel, E. G., et al., *Science*, 249:1285-1288, 1990). 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다.

[0017] 본 발명에 따른 유전자를 포함하는 플라스미드 발현 벡터(plasmid expression vector)는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 숙주세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., *J. Bio. Chem.*, 267:963-967, 1992; Wu and Wu, *J. Bio. Chem.*, 263:14621-14624, 1988).

- [0018] 또한 상기 벡터는 CRIF1 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 위해 필요한 조절 요소를 포함한다. 이러한 요소는, 예를 들면, 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 이들 요소는 바람직하게는 목적하는 CRIF1 단백질을 코딩하는 서열에 작동적으로 연결되며, 조절 요소는 바람직하게는 이들이 투여될 중에서 작동될 수 있도록 선택된다.
- [0020] 본 발명에 따른 CRIF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기재, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명의 약학 조성물은 치료학적 또는 예방학적 유효양으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 약학 조성물의 1일 투여량은 0.001-1000 mg/kg이다.
- [0022] 또한 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 CRIF1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 심혈관질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 실시예에서, 내피세포 ROS 생성은 농도-의존적 방식으로 Crif1-억제된 세포에서 증가되었으며 (도 2a 참조), 증가된 ROS는 ER 스트레스를 자극하여 (도 3 참조) UPR(unfolded protein response)을 활성화시키는데, 이는 염증반응을 유도하고 (Zhang K 2010 Int J Clin Exp Med 3: 33-40). 또한 CRIF1 결핍은 내피세포에서 농도 의존적 방식으로 염증성 단백질인 VCAM-1 단백질의 발현을 증가시키므로 (도 4a와 b 참조), 진단 대상 개체에서 CRIF1의 부족 또는 결핍을 확인함으로써 혈관 염증이나 혈관 내피세포의 활성화로 유발되는 심혈관질환을 효과적으로 진단할 수 있게 된다.
- [0026] 본 발명에서, 상기 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조하거나, 또는 상업적으로 이용가능한 항체를 구입하여 사용할 수 있다. 예를 들어, anti-CRIF1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)사로부터 입수하여 사용할 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다.
- [0027] 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

- [0028] 또한 본 발명에서 앵타머(aptamer)는, CRIF1 단백질에 특이적으로 결합하는 올리고핵산 또는 펩티드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K “Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine”. J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. “An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library”. Proc Natl Acad Sci USA. 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0029] 본 발명의 진단용 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트일 수 있다.
- [0030] 상기 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유세포 측정법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 상기 키트는 또한 마이크로 어레이일 수 있으며, 이때 마이크로어레이의 고상 표면에 항체 또는 앵타머가 고정화 되어 있을 수 있다.
- [0032] 또한 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 내피세포 활성화 및 혈관 염증으로 유발되는 심혈관질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 혈관 내피세포에서 항원항체반응을 통해 CRIF1 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 정보제공방법은, CRIF1 단백질 결핍 시 심혈관질환의 원인이 되는 내피세포 활성화 및 혈관 염증이 일어남을 처음으로 확인한 본 발명의 데이터에 기초한 것으로, 진단 개체에서 CRIF1 단백질의 검출을 통해 용이하게 수행될 수 있으며, 심혈관질환의 위험도에 관한 정보를 효과적으로 제공할 수 있다는 점에서 그 활용성이 또한 높을 것으로 판단된다.
- [0037] 이하, 본 발명에 따른 CRIF1 단백질과 미토콘드리아 ROS 생성, 내피세포 활성화, 및 심혈관질환 사이의 관련성에 대하여 좀 더 자세히 설명한다.
- [0039] 미토콘드리아에 주로 위치되고 CR6/gadd45-상호작용하는 단백질(Kim SJ, et al. 2012 *Cell Metab* 16: 274-283)인, CRIF1은 미토콘드리아 리보솜의 단백질 구성성분과 상호작용한다. 또한 미토콘드리아 OXPHOS 복합체들의 번역과 삽입의 조절에 특이적으로 관련되어 있다. CRIF1의 결핍은 OXPHOS 복합체들의 급격한 증가 및 미토콘드리아 ROS 생성의 증가, 뿐만 아니라 미토콘드리아 기능장애를 나타내는 미토콘드리아 막 전위의 변화를 유도하였다. 흥미롭게도, OXPHOS 복합체 I, III 및 IV는 뇌-특이적 Crif1 녹아웃 마우스에서 감소되었으며 (Kim SJ, et al. 2012 *Cell Metab* 16: 274-283), 복합체 I, III, IV 및 V는 Crif1이 결핍된 지방-유래 줄기세포에서 감소되었다 (Ryu MJ, et al. 2013 *Mol Cells* 35: 134-141). 본 발명에서, OXPHOS 복합체 I, III 및 IV는 Crif1-결핍된 MS-1 세포에서 감소되었다 (도 1의 A). 따라서 CRIF1 결핍에 의한 OXPHOS 복합체들의 조절은 세포 타입에 좌우될 수 있다.
- [0040] ROS는 산화적 인산화의 부산물로서 미토콘드리아에서 끊임없이 생성되는데 세포 시그널링의 조절에서 생리학적으로 중요한 역할을 한다. 따라서 미토콘드리아는 ATP 생성에 기여할 뿐만 아니라 ROS의 조절을 통해 내피세포 항상성을 조절한다. 다른 세포들과 비교하여, 내피세포는 당분해 대사(glycolytic metabolism)에 매우 의존한다. 그러나 미토콘드리아의 OXPHOS 서브유닛들이 비록 에너지 생산에 제한된 역할을 하지만, 그들이 ROS 생성의 주요 근원이므로 생리학적으로 현저한 역할을 할 수 있다. 최근 연구들은 증가된 미토콘드리아 ROS 형성 및 산화적 미토콘드리아 DNA 손상이 내피세포 기능장애와 관련이 있음을 제시하였다 (Wenzel P, et al. 2008 *Cardiovasc Res* 80: 280-289). 미토콘드리아의 산화 스트레스와 내피세포에서 내피세포 기능장애 사이의 관련성에 대한 급속한 기술 발달과는 대조적으로, 미토콘드리아 기능장애가 어떻게 내피세포 활성화 및 혈관 염증을

유발하는지에 대해서는 상대적으로 거의 알려져 있지 않다. 본 발명은 내피세포에서 미토콘드리아 기능을 유지하는데 중요한 신규한 성분으로서 CRIF1을 확인하였다.

[0041] 이전 연구들은 p66shc이 미토콘드리아 내 ROS 생성에서 작용하는 중요한 역할 및 그것의 심혈관질환과의 관련성을 밝혀내었다 (Martin-Padura I, et al. 2008 *Endothelium* 15: 276-287; Rota M, et al. 2006 *Circ Res* 99: 42-52). 또한 p66shc이 세포내 산화환원 균형 및 산화 스트레스 수준을 조절하는데 매우 중요하고 p66shc 유전자를 결핍시킨 세포에서 세포내 자유 라디칼이 감소한다는 증거가 있다 (De Marchi E, et al. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 564961). 세틴 인산화 후, p66shc은 시토솔에서 미토콘드리아 내막 공간으로 이동하고 여기서 미토콘드리아 H_2O_2 생성을 유도하여, 나아가 H_2O_2 수준을 증가시킨다 (Trinei M, et al. 2009 *Aging (Albany NY)* 1: 503-510). 이러한 방식으로 p66shc은 자가-촉발된 제어 루프(self-triggered control loop)를 통해 그 자신의 활성화를 유지하거나 증가시킬 수 있다 (Pinton P, et al. 2008 *Cell Cycle* 7: 304-308). 따라서 p66shc이 미토콘드리아 및 내피세포 기능장애를 초래하는 ROS 생성 및 산화 스트레스를 조절하는 것으로 현재 널리 받아들여지고 있다. 그러나 미토콘드리아 기능장애-유도된 내피세포 기능장애 및 혈관 염증에서 p66shc의 역할은 아직 밝혀져 있지 않다.

[0042] 본 발명에서, Crif1 억제한 후 ser36 잔기에서 p66shc의 증가된 인산화를 확인하였다 (도 2의 B). p66shc의 ser36 인산화가 산화 스트레스 유도 자극에 의해 촉발되고 (Pacini S, et al. 2004 *Mol Cell Biol* 24: 1747-1757) p66shc의 활성이 단순히 ser36에서 p66shc의 인산화에 달려있음은 이미 알려져 있다. 또한 본 발명의 데이터는 p66shc의 증가된 인산화가 시토솔에서 ROS 생성을 촉발하여, 전체 ROS 수준에서 추가 상승을 일으킨다는 사실과 일치한다 (도 2의 A). 또한 p66shc 억제한은 MS-1 세포의 미토콘드리아 및 시토솔 ROS 모두에서 증가를 나타내었으며 (도 2의 C와 D), 이는 p66shc이 미토콘드리아 기능장애-유도된 내피세포 활성화에서 중요한 역할을 함을 의미한다. 미토콘드리아와 시토솔 ROS 및 미토콘드리아 기능장애-유도된 ER 스트레스 반응을 저해하는 것 외에도, p66shc 억제한은 VCAM-1 발현 및 내피세포에 대한 단핵구의 부착을 저해하였다. 이러한 결과는 p66shc이 미토콘드리아 기능장애에 의해 촉발되는 내피세포 기능장애의, 유일한 매개인자는 아니지만, 우성인자임을 의미한다.

[0043] 결론적으로, 본 발명의 데이터는 미토콘드리아 기능장애와 내피세포 활성화 사이의 관련성에 대한 새로운 이해를 제공한다. 이러한 결과는 Crif1 결핍이 p66shc의 증가된 인산화 및 증가된 산화 스트레스를 통해 미토콘드리아 기능장애와 내피세포 활성화를 유발한다는 것을 뒷받침한다. 따라서 미토콘드리아 OXPHOS 능력은 p66shc-매개된 내피세포 활성화의 위험도를 결정하는 중요한 인자가 될 가능성이 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따르면, CRIF1은 결핍은 내피세포에서 미토콘드리아 OXPHOS 기능을 손상시키고 p66shc를 통해 ROS 생성을 유도한다. 또한 CRIF1은 결핍은 내피세포에서 ER 스트레스 반응의 자극을 유도하고 염증성 단백질인 VCAM-1의 발현을 증가시켜 내피세포 기능장애와 혈관 염증이 유발된다. 따라서 본 발명의 CRIF1은 내피세포 기능장애 및 혈관 염증과 관련된 혈관질환의 진단 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 Crif1-억제된 세포에서 OXPHOS 복합체의 소실 및 미토콘드리아 기능장애를 나타낸 것이다.
 도 2는 p66shc이 Crif1-억제된 세포에서 CRIF1 결핍-유도된 미토콘드리아 ROS 및 시토솔 ROS 생성을 매개함을 나타낸 것이다.
 도 3은 eIF2- α 인산화(p-eIF2 α) 및 CHOP 단백질 발현이 Crif1-억제된 세포에서 상향 조절됨을 나타낸 것이다.
 도 4는 p66shc이 Crif1-억제된 세포에서 CRIF1-유도된 VCAM-1 발현을 매개함을 나타낸 것이다.
 도 5는 p66shc이 내피세포(HUVECs)에 대한 단핵구의 CRIF1 결핍-유도된 부착을 매개함을 나타낸 것이다.
 도 6은 내피세포에서 Crif1 siRNA로 트랜스펙션 시킨 후 CRIF1 단백질의 발현이 억제됨을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] **실시예 1. 세포 배양 및 트랜스펙션**

[0049] 마우스 MS-1 내피세포는 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 5% 우태 아혈청, 10 U/ml 페니실린 및 10 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 배양하였다. 인간 제대정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)는 Clonetics (San Diego, CA, USA)로부터 구입하여 Lonza (Walkersville, MD)에서 구입한 EGM(Endothelial Growth Medium)-2에서 배양하였다. 서브-컨플루언트(sub-confluent)하게 증식하고 있는 HUVECs를 2-8 계대(passages)에서 사용하였다. U937 단핵구(monocytes)는 Clonetics로부터 구입하여 Walgene Inc. (Daegu, South Korea)로부터 구입한 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. MS-1 세포 및 HUVECs는 Crif1에 대한 siRNA (마우스 siRNA 서열: 센스 5' - AAUAGUUCUGGAAGCGAGCACUCC-3' , 안티센스 5' -GGAGUGCUCGCUCCAGGAACUAUU-3' , 및 인간 siRNA 서열: 센스 5' -UGGAGGCCGAAGAACGCGAAUGGUA-3' , 안티센스 5' -UACCAUUCGCGUUCUUCGGCCUCCA-3') 및 음성대조군 siRNA로 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입한 Lipofactamine 2000 시약을 이용하여 제조사의 권고사항에 따라 트랜스펙션 시켰다.

[0051] **실시예 2. 항체 및 웨스턴 블로팅**

[0052] 토끼 다클론 항-Crif1, 토끼 다클론 항-VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)로부터 구입하였다. 마우스 단클론 CHOP(C/EBP homology protein), 토끼 단클론 eIF2(eukaryotic initiation factor 2)- α 항체들은 Cell signaling (USA)으로부터 구입하였다. OXPHOS 복합체 서브유닛들(NDUFA9, SDHA, UQCRC2, COX4 및 ATP5A1)에 대한 마우스 단클론 항체들은 Invitrogen으로부터 구입하였으며, 마우스 다클론 항-phospho-ser36-p66shc 항체는 Calbiochem (CA, USA)로부터, 토끼 다클론 항-Shc 항체는 BD Biosciences (NJ, USA)로부터 구입하였다. 전체-세포 용해물 30 μ g의 웨스턴 블로팅은 적절한 일차 및 이차 항체들을 이용하여 수행하였다. 블롯들(blots)은 Pharmacia-Amersham (Freiburg, Germany)로부터 입수한 화학발광 분석 키트를 이용하여 이미지화하였고, 밴드 강도는 Bio-Rad (Hercules, CA)로부터 입수한 Gel Doc 2000 Chemi Doc 시스템과 Quantity One 소프트웨어를 이용하여 정량화하였다. 값들은 β -액틴 로딩 대조군에 대해 정규화하였다.

[0054] **실시예 3. 미토콘드리아 ROS의 측정**

[0055] 내피세포에서 미토콘드리아 ROS의 수준은 Invitrogen로부터 입수한 MitoSOX로 측정하였다. 대조군 또는 Crif1 siRNA로 트랜스펙션 48시간 후, 세포들을 PBS로 두 번 세척하고, 트립신 처리한 후, 세포 현탁액을 3 mM MitoSOX가 첨가된 완전 배지(complete medium)에서 37°C로 배양하였다. 배양 동안, 각 샘플을 매 5분마다 휘저어 시약이 ROS와 충분히 반응하게 하였다. 형광 백그라운드를 감소시키기 위해, 530 nm의 여기(excitation)와 590 nm의 방출(emission)로 Fluoroskan Ascent 형광 리더(Thermo Scientific)를 이용하여 MitoSOX 레드와 형광 강도를 검출하기 전에 각 샘플을 PBS로 두 번 세척하였다.

[0057] **실시예 4. 미토콘드리아 막 전위의 측정**

[0058] 대조군 또는 Crif1 siRNA로 트랜스펙션 후 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)의 변화를 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine, TMRE) 염료를 이용하여 측정하였다. TMRE는 미토콘드리아로 위치이동하는 막 전위에 반응하는 염료이다. TMRE의 형광 강도는 미토콘드리아 막 전위에 정비례한다. 트랜스펙션 48시간 후, 세포들을 PBS로 두 번 세척하고, 트립신 처리한 후 세포 현탁액을 수집하였다. TMRE (100 nM)를 각 샘플에 첨가하고, 세포들을 어두운 데에서 37°C, 15분간 완전배지에서 배양하였다. 배양 동안, 각 샘플을 매 5분마다 휘저었다. 형광 백그라운드를 감소시키기 위해, 530 nm의 여기(excitation)와 590 nm의 방출(emission)로 Fluoroskan Ascent 형광 리더를 이용하여 형광 강도를 검출하기 전에 각 샘플을 PBS로 두 번 세척하였다.

[0060] **실시예 5. 과산화수소 측정**

[0061] 내피세포의 H_2O_2 수준은 제조사의 설명서에 따라 Molecular Probes (Invitrogen)사의 Amplex Red Hydrogen Peroxide 분석 키트를 이용하여 측정하였다. 간략히 설명하면, 반응 혼합물은 KRPG(Krebs-Ringer phosphate) 버퍼(145 mM NaCl, 5.7 mM sodium phosphate, 4.86 mM KCl, 0.54 mM $CaCl_2$, 1.22 mM $MgSO_4$, 5.5 mM glucose, pH 7.35)에 50 μ M Amplex Red와 0.1 U/ml HRP을 포함하였다. 각각의 반응 용량은 100 μ l이고, 20 μ l 용량의 KRPG 버퍼에 현탁된 1.5×10^4 세포를 100 μ l 반응 혼합물에 첨가하였다. 음성대조군으로, 세포가 없는 20 μ l KRPG 버퍼를 별개의 100 μ l 용량의 반응 혼합물에 첨가하였다. Amplex Red는 H_2O_2 에 특이적으로 반응한다. HRP가 있는 상태에서 H_2O_2 에 의한 Amplex Red의 산화는 높은 형광성의 레조루핀(resorufin)을 생성한다. 생성된 레조루핀의 수준은 530 nm의 여기(excitation)와 590 nm의 방출(emission)로 Fluoroskan Ascent를 이용하여 정량화하였다.

[0063] 실시예 6. 산소소비율

[0064] 산소소비율(Oxygen consumption rate, OCR)은 Seahorse XF-24 analyzer (Seahorse Bioscience)를 이용하여 측정하였다. OCR 측정 전날, 센서 카트리지를 교정버퍼(calibration buffer; Seahorse Bioscience)로 37°C에서 교정하였다. 대조군 또는 Crif1 siRNA로 트랜스펙션 48시간 후, 세포들을 탄산수소나트륨과 페놀 레드(phenol red)가 없는 XF 분석 배지로 두 번 세척하고 교정 전 45분 내지 1시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 각 미토콘드리아 저해제의 첨가 후 그 다음의 저해제들의 주입 전 세 번의 판독을 수행하였다. 사용된 미토콘드리아 저해제는 올리고마이신(oligomycin, 2 μ g/ml), CCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine, 10 μ M) 및 로테논(rotenone, 2 μ M)이었다. OCR은 센서 카트리지 및 Seahorse XF-24에 의해 자동적으로 계산되고 기록되었다. 플레이트를 모으고 단백질 농도를 계산하여 각 웰에서 대략 동등한 수의 세포가 있었음을 확인하였다.

[0066] 실시예 7. 실시간 PCR

[0067] 세포로부터 총 RNA를 AGPC(acid guanidinium thiocyanatephenolchloroform) 방법을 이용하여 분리하였다. cDNA는 MAXIME RT Premix kit (iNTRON biotechnology, South Korea)를 이용하여 총 RNA로부터 제조하였다. 실시간 PCR은 Super Script III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 함께 Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 마우스 VCAM-1에 대한 프라이머는 다음과 같다: 센스 5' -TGAACCCAAACAGAGGCAGAG-3', 안티센스 5' -GGTATCCCATCCTTGAGCAG-3'. 마우스 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)는 내부대조군으로 사용하였다. 마우스 GAPDH에 대한 프라이머는 다음과 같다: 센스 5' -ATGACATCAAGAAGGTGTG-3', 안티센스 5' -CATACCAGG AAAATGAGCTTG-3'. 해리곡선을 모니터링하여 프라이머-다이머의 비정상적인 형성을 체크하였다. 결과는 상대적인 정량 방법($\Delta\Delta Ct$)으로 해석하였다.

[0069] 실시예 8. 아데노바이러스 감염

[0070] p66shc에 대한 shRNA를 암호화하는 재조합 아데노바이러스(Adp66shcRNAi)는 Dr. Kaikobad Irani (University of Pittsburgh)로부터 입수하였다. 재조합 아데노바이러스는 p66shc cDNA의 45-63 염기에 해당하는 19-mer 서열을 갖는 짧은 헤어핀 루프 RNA를 암호화한다. 이 뉴클레오타이드들은 N-말단 CH_2 도메인의 330-bp 코딩 영역에 있으며 p66shc mRNA에 고유한 것이다. Adp66shc는 이전에 공지된 바와 같이 (He TC, et al. 1998 *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514), AdEasy 시스템을 이용하여 제조하였다. 10-1,000 범위의 MOI(multiplicity of infection)에서 상기 아데노바이러스로 MS-1 세포를 6웰 조직배양 플레이트에서 감염시켰다. 감염 24시간 후, 총 p66shc의 단백질 발현은 웨스턴 블롯 분석으로 측정하였다. 이 후, 상기 아데노바이러스를 그 다음 실험에 100 MOI로 사용하였다. 삽입 LacZ 유전자를 암호화하는, 아데노바이러스 β -갈락토시다아제(Ad β gal)는 실험을 위한 대조군 바이러스로서 사용하였다.

[0072] 실시예 9. 세포 부착 분석

[0073] HUVECs는 상술한 바와 같이 Adp66shcRNAi 또는 AdLacZ (대조군)으로 24시간 동안 감염시키고 Crif1 siRNA로 48

시간 동안 트랜스펙션 시켰다. U937 세포는 HUVECs와 37℃에서 30분간 어두운 데에서 배양하였다. 단핵구 부착은 세포를 카운트함으로써 정량화하였다. U937 없이 HUVEC를 포함하는 웰은 블랭크로 사용하였다.

[0075] 실험결과 1. CRIF1 결핍은 내피세포에서 미토콘드리아 OXPHOS 기능을 손상시킨다.

[0076] CRIF1은 마우스 배아 섬유아세포의 미토콘드리아에 위치하는데, 미토콘드리아 OXPHOS는 뇌 특이적 Crif1 녹아웃 마우스에서 손상된다 (Kim SJ, et al. 2012 *Cell Metab* 16: 274-283). 따라서 본 발명자들은 내피세포에서 미토콘드리아 기능에 대한 CRIF1의 기능을 처음으로 조사하였다. 배양된 내피세포에서 CRIF1 단백질의 발현을 억제하기 위해, MS-1 세포를 Crif1 siRNA로 트랜스펙션 시켰다. Figure S1A에 나타난 바와 같이, CRIF1 발현은 트랜스펙션 48시간 후 대조군 siRNA와 비교하여 50 및 100 pmol에 의해 현저하게 감소하였다. 시간-의존적 실험을 위해, 72시간의 배양 기간에 걸쳐 100 pmol의 Crif1 siRNA를 사용하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, CRIF1 단백질의 가장 효율적인 녹아웃은 트랜스펙션 후 배양 24시간 및 48시간 사이로 나타났다. 이러한 실험에 기초하여, 본 발명자들은 100 pmol의 Crif1 siRNA의 농도 및 48시간의 배양 기간을 선택하여 그 다음의 실험 동안 CRIF1 단백질의 효과적인 녹아웃을 달성하였다. 실험의 다음 단계에서, 본 발명자들은 Crif1 Crif1을 억제하는 것이 MS-1 세포에서 OXPHOS 복합체 서브유닛들의 단백질 발현을 하향-조절하는지를 확인하였다. NDUF9 (복합체 I), UQCRC2 (복합체 III) 및 COX4 (복합체 IV)의 발현 수준은 대조군 siRNA로 유도된 것과 비교하여 CRIF1 결핍에 의해 현저히 저해되었으며 (도 1a), 반면 다른 OXPHOS 복합체들의 발현 수준은 변화가 없었다.

[0077] 미토콘드리아 OXPHOS 기능에 대한 CRIF1 결핍의 효과를 검토하기 위해, 다음으로 MS-1 세포에서 미토콘드리아 ROS 생성 및 MMP를 조사하였다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 트랜스펙션 48시간 후 대조군 siRNA와 비교하여 100 pmol Crif1 siRNA의 경우 MitoSox 형광 강도에서 현저한 증가가 있었다. 미토콘드리아 ROS 생성에서 이러한 관찰된 변화는 상대적으로 증가된 TMRE 형광으로 나타난 바와 같이, 대조군 세포와 비교하여 Crif1-억제된 세포의 과분극화(hyperpolarization)에 의해 일어났다 (도 1c). TMRE는 미토콘드리아 내막(inner mitochondrial membrane, IMM)에 걸쳐서 전위(electric potential)에 따라 축적된다. 또한 산소소비율(OCR)은 Crif1-억제된 세포에서 현저하게 감소되었다 (도 1d). 세포들은 ATP 합성효소를 저해하는 올리고마이신에 먼저 노출되었고, 대조군 및 Crif1-억제된 MS-1 세포 사이에서 OCR의 예상된 감소가 유도되었다. 미토콘드리아 최대 호흡 용량(respiratory capacity)을 측정하기 위해, 다음으로 미토콘드리아 호흡의 언커플러(uncoupler)인, CCCP로 세포를 처리하였다. 세포들은 CCCP에 반응하여 정상적으로 OCR을 증가시켜 양성자기울기(proton gradient) 및 미토콘드리아 기능을 유지하였다. Crif1 억제된 세포들은 대조군 세포와 비교하여 CCCP 처리 후 OCR의 증가가 거의 없었으며, 이는 이들 세포가 대조군 보다 더 작은 여분의 호흡 용량을 가진다는 것을 의미한다. 또한 복합체 I 저해제인 로테논의 투여는 OCR을 저해하였다. 이러한 데이터는 CRIF1 결핍이 내피세포에서 미토콘드리아 OXPHOS 기능의 상실을 초래함을 의미한다.

[0079] 실험결과 2. p66shc는 내피세포에서 CRIF1 결핍-유도된 ROS를 매개한다.

[0080] 증가된 미토콘드리아 ROS는 NADPH 산화효소를 자극하여, MS-1 세포에서 시토졸 ROS 수준의 증가를 초래한다 (Wenzel P, et al. 2008 *Cardiovasc Res* 80: 280-289). p66shc는 산화 스트레스의 조절에 있어 핵심 단백질이다. 따라서 본 발명자들은 MS-1 세포에서 ROS 생성에 대한 CRIF1 결핍의 역할을 조사하였다. 전반적으로, 세포 ROS 생성은 농도-의존적 방식으로 대조군 세포와 비교하여 Crif1-억제된 세포에서 증가되었다 (도 2a). 본 발명자들이 p66shc가 내피세포에서 CRIF1 결핍으로 유도된 ROS 생성을 매개하는지를 평가할 때, CRIF1 결핍이 ser36에서 p66shc의 인산화를 증가시키지만, p66shc의 총 단백질 수준에는 아무런 변화가 없음을 확인하였다 (도 2b). 그러나 p66shc에 대한 shRNA를 암호화하는 아데노바이러스(Adp66shcRNAi)를 이용한 p66shc 녹아웃은 MS-1 세포의 미토콘드리아 ROS 수준 뿐만 아니라 시토졸 ROS 수준에서 CRIF1 결핍-유도된 증가를 차단하였다 (도 2c와 d). 이러한 데이터는 p66shc가 내피세포에서 CRIF1 결핍-유도된 산화 스트레스에서 중요한 역할을 함을 의미한다.

[0082] 실험결과 3. CRIF1 결핍은 MS-1 세포에서 ER 스트레스 반응의 자극을 유도한다.

[0083] ROS와 같은 세포내 자유 라디칼은 ER 스트레스와 산화 스트레스 사이의 크로스토크에 대한 주요 매개인자로서 작용한다. ROS는 ER 스트레스를 자극하여 UPR(unfolded protein response)을 활성화시키는데, 이는 염증반응을 유도한다 (Zhang K 2010 *Int J Clin Exp Med* 3: 33-40). CRIF1 결핍이 ROS 생성을 증가시키기 때문에, 본 발명

자들은 CRIF1 결핍이 내피세포에서 ER 스트레스를 자극하는지를 조사하였다. CRIF1 결핍은 이들 세포에서 eIF2- α 인산화 및 CHOP 발현을 현저하게 자극하였다 (도 3).

[0085] **실험결과 4. p66shc은 MS-1 세포에서 CRIF1 결핍-유도된 VCAM-1을 매개한다.**

[0086] ROS는 내피세포에서 VCAM-1과 같은 염증성 단백질의 상향조절을 매개하여 혈관의 활성화를 유도한다 (Marui N, et al. 1993 *J Clin Invest* 92: 1866-1874). 따라서 CRIF1 결핍이 VCAM-1 발현에서 어떠한 변화를 유도하는지를 조사하였다. CRIF1 결핍은 내피세포에서 농도 의존적 방식으로 VCAM-1 단백질 및 mRNA 발현을 증가시켰다 (도 4a와 b). 다음으로, p66shc이 VCAM-1 발현에서 CRIF1 결핍 유도된 증가를 매개하는지를 확인하였다. VCAM-1 발현의 CRIF1 결핍-유도된 증가는 Adp66shcRNAi를 이용한, p66shc 발현의 녹아웃에 의해 현저하게 무더졌다 (도 4c와 d).

[0088] **실험결과 5. p66shc는 HUVECs에 대한 단핵구의 CRIF1 결핍-유도된 부착을 매개한다.**

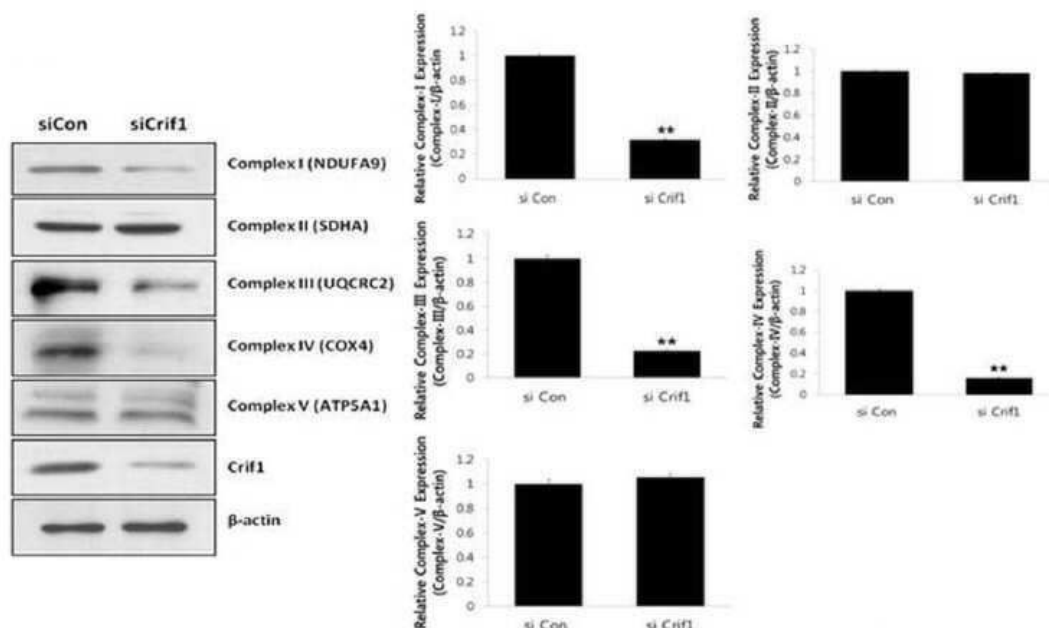
[0089] 내피세포에서 VCAM-1과 같은 부착 분자들의 발현은 염증성 백혈구의 보충을 초래한다. 혈관 내피세포에 대한 이들 백혈구의 부착은 내피세포에 대한 부착 분자들의 상향-조절에 의존한다. 따라서 본 발명에서는 p66shc이 내피세포에 대한 단핵구의 CRIF1 결핍-유도된 부착의 원인이 되는지를 조사하였다. 본 발명자들은 세포 부착 분석을 수행하여 Crif1-억제된 HUVECs에서 CRIF1 또는 p66shc 녹다운 후 HUVECs에 대한 단핵구 U937 세포의 부착을 조사하였다. 도 5a에 나타난 바와 같이, CRIF1 결핍은 HUVECs에 대한 U937 세포의 부착을 자극하였다. 또한 이러한 단핵구 부착의 증가는 Crif1-억제된 세포에서 p66shc의 녹다운에 의해 현저하게 차단되었으며, 이는 p66shc이 이러한 부착을 매개한다는 것을 의미한다 (도 5b).

[0091] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다.

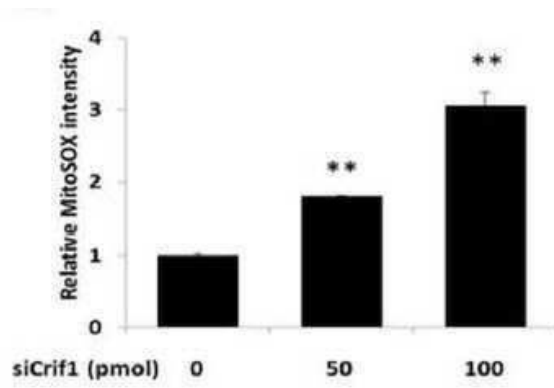
[0092] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

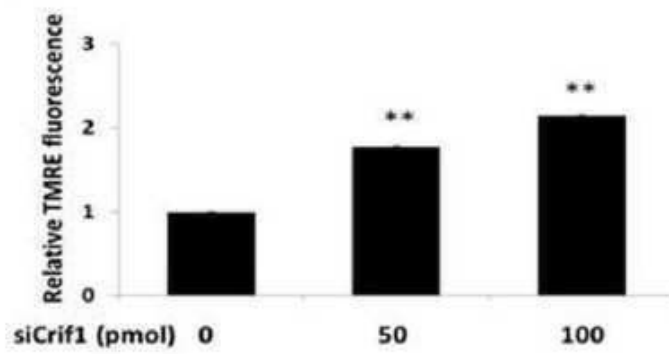
도면1



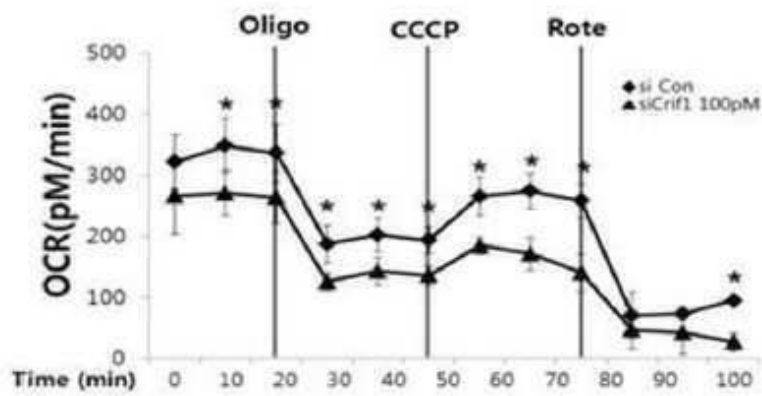
도면1b



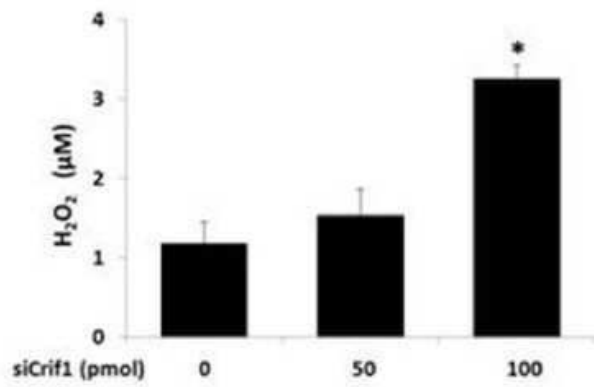
도면1c



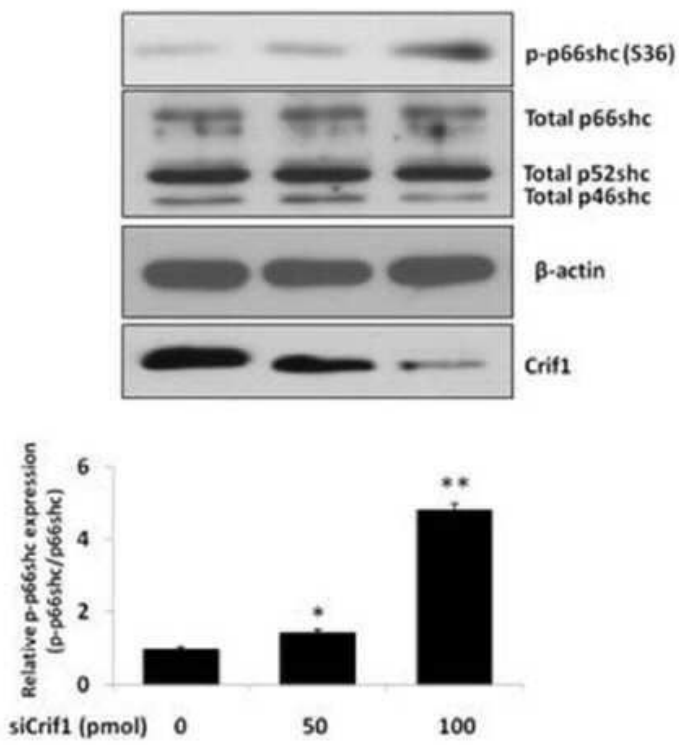
도면1d



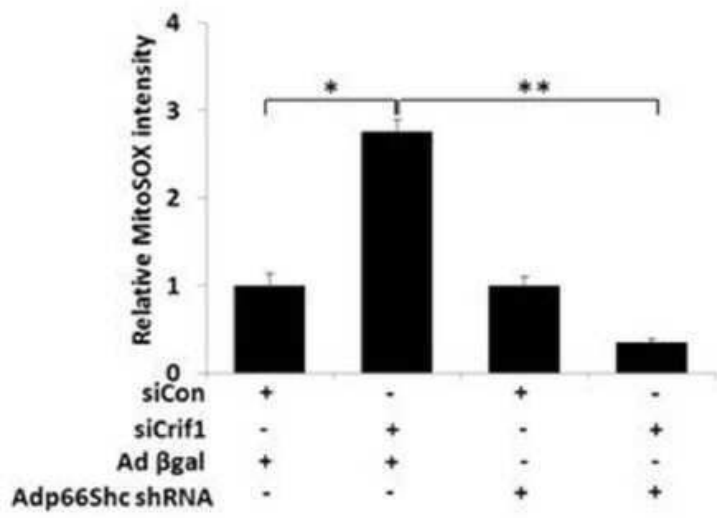
도면2a



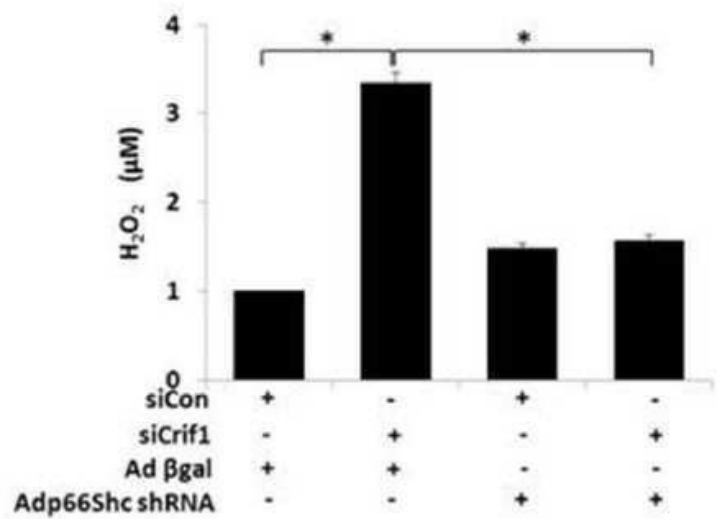
도면2b



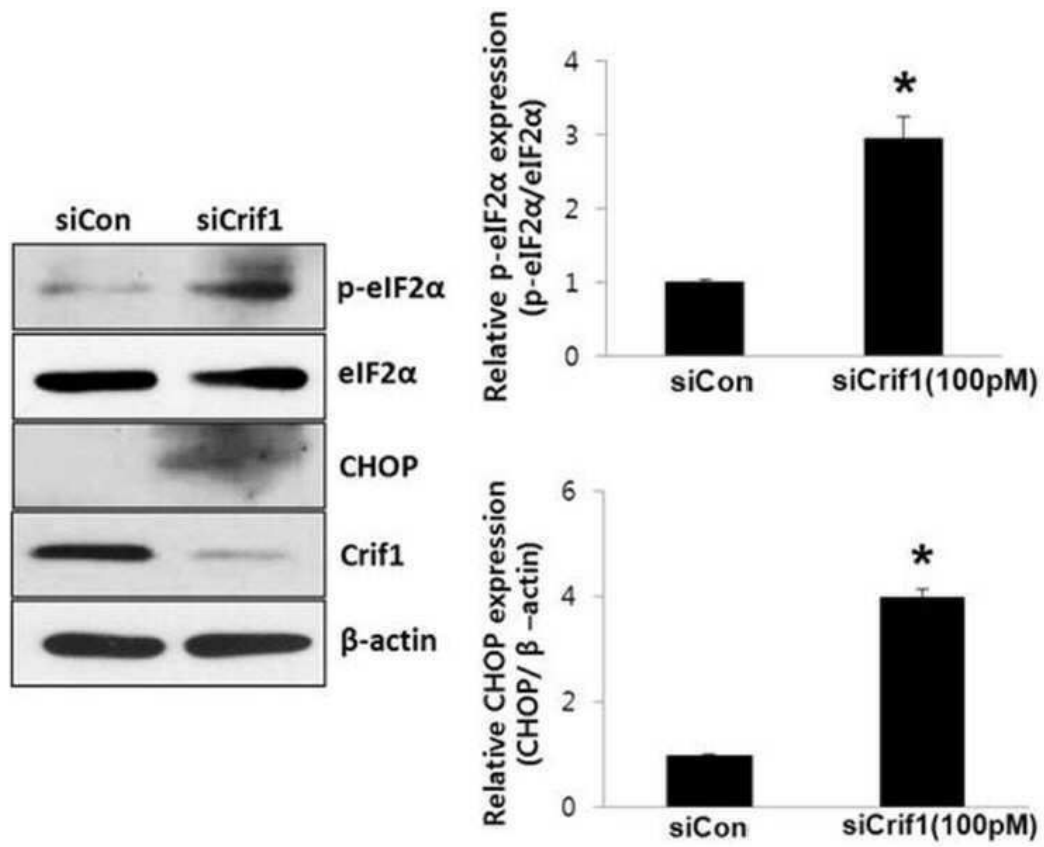
도면2c



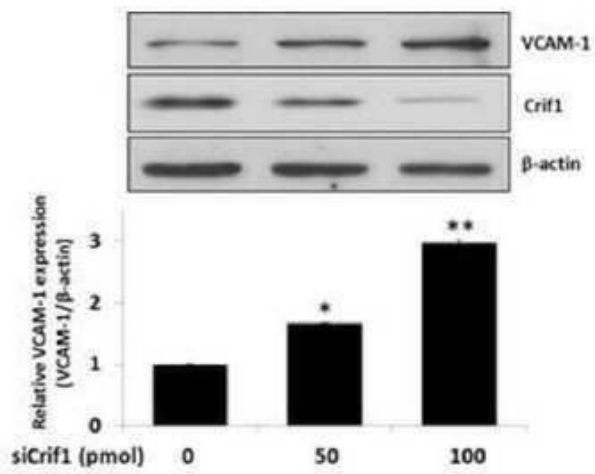
도면2d



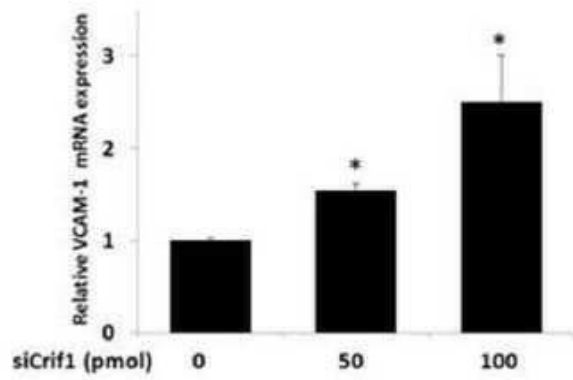
도면3



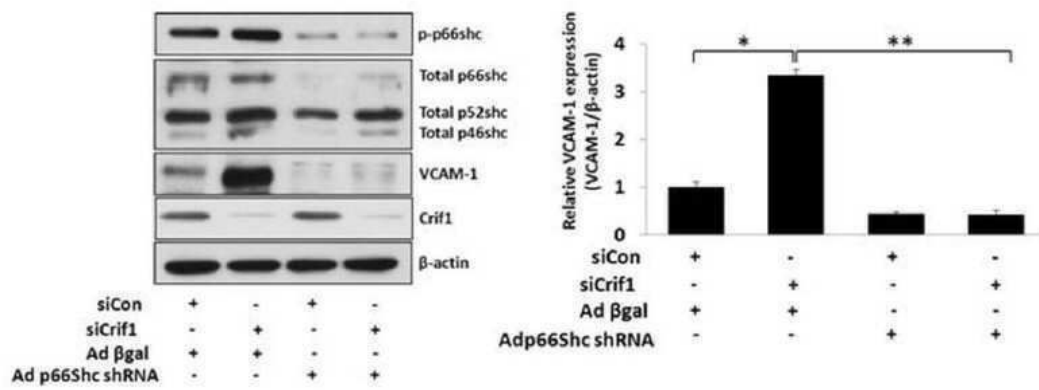
도면4a



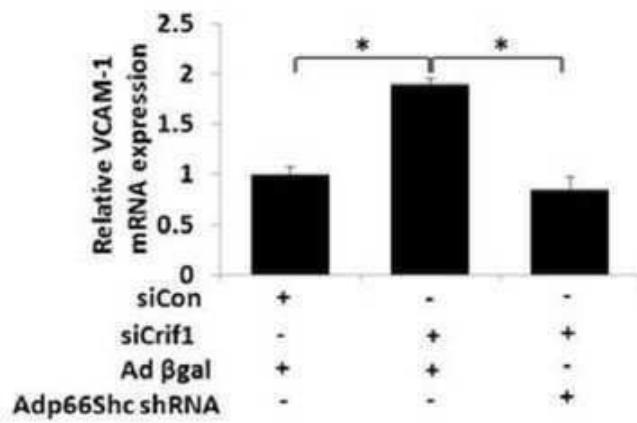
도면4b



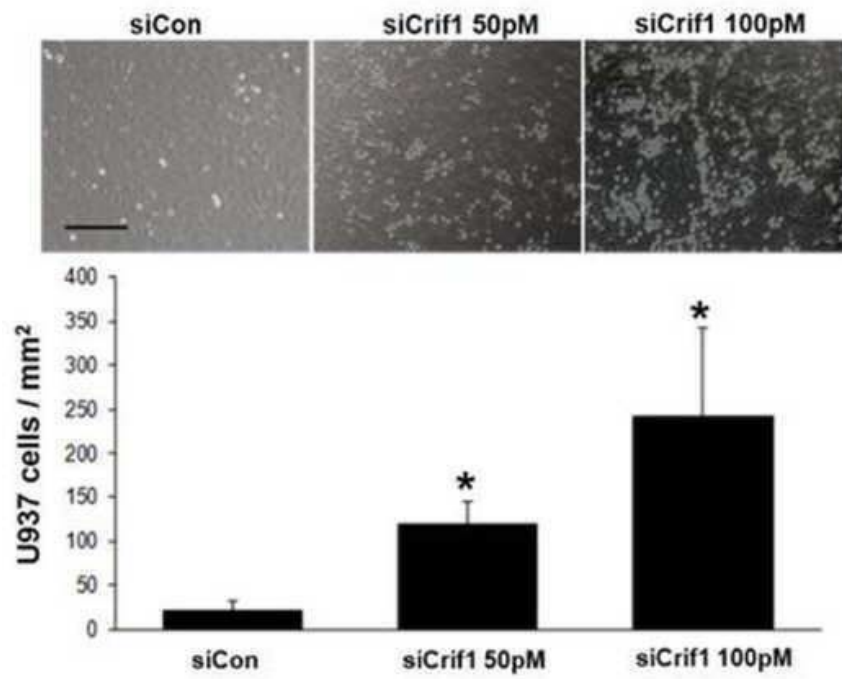
도면4c



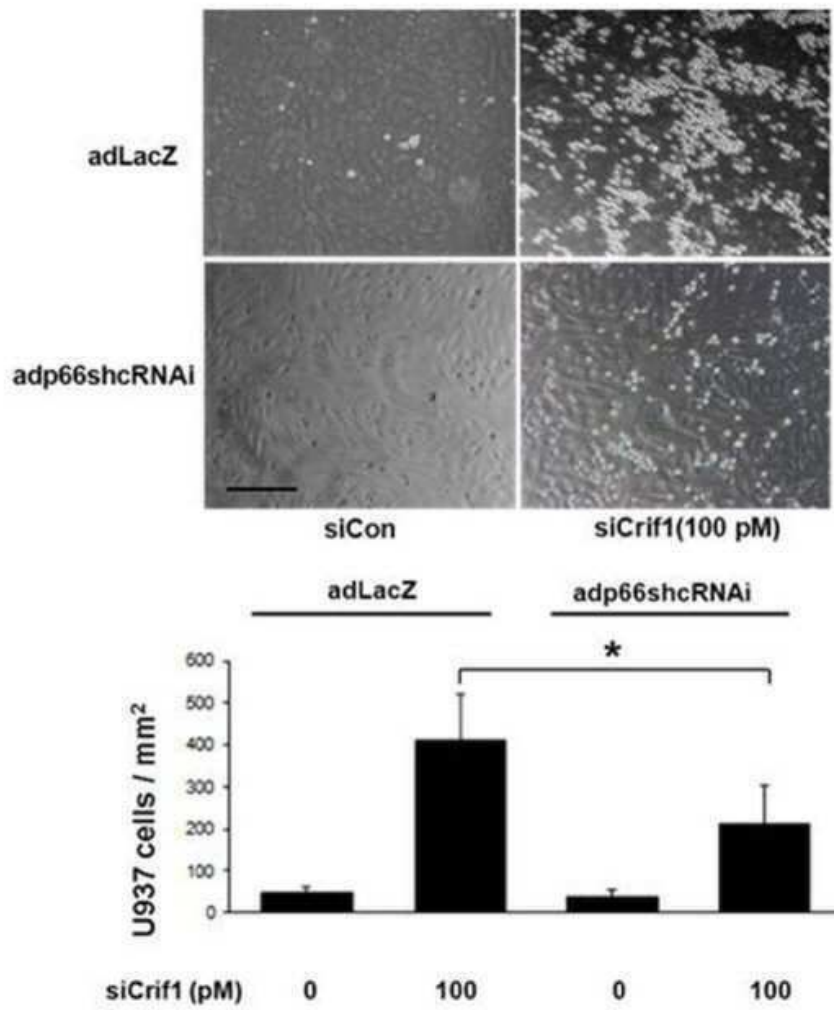
도면4d



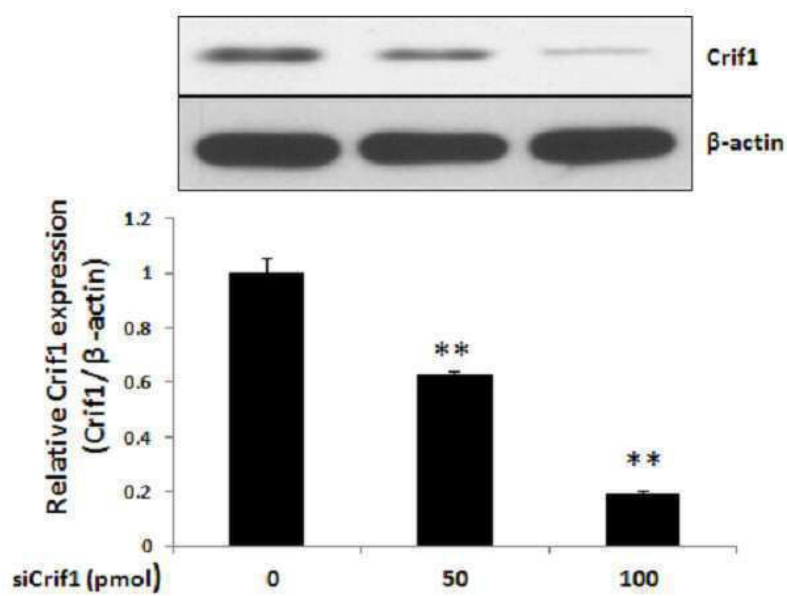
도면5a



도면5b



도면6



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 <120> Compositions for preventing or treating cardiovascular disease
 comprising CRIF1
 <130> NP14-1181
 <160> 2
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 1

Met Ala Ala Ser Val Arg Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gly Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Leu Ala Pro Gly Ser Arg Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Pro Pro Arg
 20 25 30
 Arg Arg Pro Gly Pro Arg Trp Pro Asp Pro Glu Asp Leu Leu Thr Pro
 35 40 45
 Arg Trp Gln Leu Gly Pro Arg Tyr Ala Ala Lys Gln Phe Ala Arg Tyr
 50 55 60
 Gly Ala Ala Ser Gly Val Val Pro Gly Ser Leu Trp Pro Ser Pro Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Arg Glu Leu Glu Ala Glu Glu Arg Glu Trp Tyr Pro Ser Leu
 85 90 95
 Ala Thr Met Gln Glu Ser Leu Arg Val Lys Gln Leu Ala Glu Glu Gln
 100 105 110
 Lys Arg Arg Glu Arg Glu Gln His Ile Ala Glu Cys Met Ala Lys Met
 115 120 125
 Pro Gln Met Ile Val Asn Trp Gln Gln Gln Arg Glu Asn Trp Glu
 130 135 140
 Lys Ala Gln Ala Asp Lys Glu Arg Arg Ala Arg Leu Gln Ala Glu Ala
 145 150 155 160
 Gln Glu Leu Leu Gly Tyr Gln Val Asp Pro Arg Ser Ala Arg Phe Gln

165	170	175	
Glu Leu Leu Gln Asp Leu Glu Lys Lys Glu Arg Lys Arg Leu Lys Glu			
180	185	190	
Glu Lys Gln Lys Arg Lys Lys Glu Ala Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala			
195	200	205	
Ala Val Ala Gln Asp Pro Ala Ala Ser Gly Ala Pro Ser Ser			
210	215	220	
<210>	2		
<211>	744		
<212>	DNA		
<213>	homo sapiens		
<400>	2		
ctgtgaggac cccgcacagc caagatggcg gcgtccgtgc gacaggcacg cagcctacta			60
ggtgtggcgg cgacctggc cccgggttcc cgtggctacc gggcgcggcc gccccgcgc			120
cgcaggccgg gaccccggtg gccagacccc gaggacctcc tgaccccgcg gtggcagctg			180
ggaccgcgt acgcggctaa gcagttcgcg cgttacggcg ccgcctccgg ggtgggtcccc			240
ggttcgttat ggccgtcgcc ggagcagctg cgggagctgg aggccgaaga acgcgaatgg			300
taccagagcc tggcgacat gcaggagtcg ctgcgggtga agcagctggc cgaagagcag			360
aagcgtcggg agaggagca gcacatcgca gagtgcattg ccaagatgcc acagatgatt			420
gtgaactggc agcagcagca gcgggagaac tgggagaagg cccaggctga caaggagagg			480
agggcccgac tgcaggctga ggcccaggag ctcttgggct accaggtgga cccaaggagt			540
gcccgttcc aggagctgct ccaggaccta gagaagaagg agcgcaagcg cctcaaggag			600
gaaaaacaga aacggaagaa ggaggcgcga gctgctgcat tggctgcagc tgtggctcaa			660
gaccagcag cctctggggc acccagctcc tgaggctttg tcccttccca ataaagcctg			720
ctacctggca gtacctga agaa			744