



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006352
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 15일 (15.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0084521 2015년 6월 15일 (15.06.2015) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 권기환 (KWON, Ki Hwan); 06009 서울시 강남구 압구정로 401, 55동 702호, Seoul (KR). 정지화 (CHUNG, Ji hwa); 10083 경기도 김포시 김포한강 2로 192, 303동 1804호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한일국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

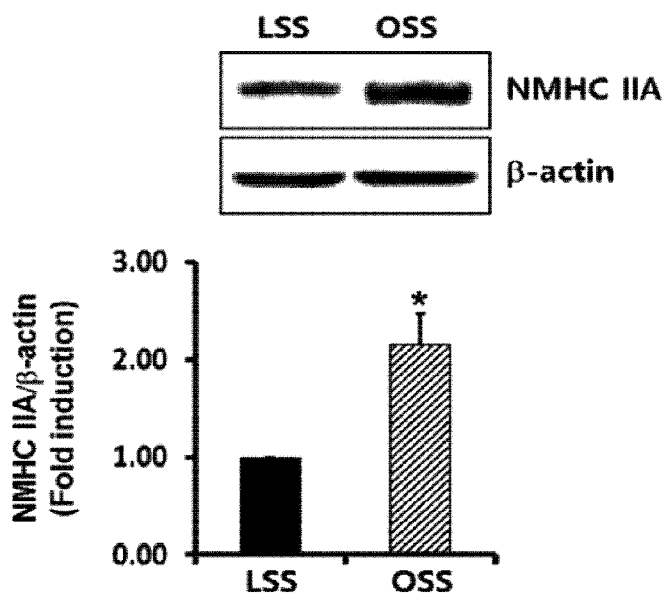
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING CARDIOVASCULAR DISEASE USING NMHC IIA

(54) 발명의 명칭: MNHC IIA를 이용한 심혈관계 질환 진단 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for cardiovascular disease diagnosis including a formulation for measuring a level of NMHC IIA, a cardiovascular disease diagnosis kit including the composition, a diagnostic method for cardiovascular disease, and a drug-delivery compound including a formulation that can combine with the NMHC IIA. By using the NMHC IIA provided in the present invention, occurrence of cardiovascular disease due to turbulent blood flow can be specifically diagnosed and thereby can widely be used for more effective cardiovascular disease treatments.

(57) 요약서: 본 발명은 NMHC IIA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 심혈관계 질환 진단용 키트, 심혈관계 질환의 진단방법 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.

명세서

발명의 명칭: MNHC IIA를 이용한 심혈관계 질환 진단 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 NMHC IIA를 이용한 심혈관계 질환 진단 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 NMHC IIA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 심혈관계 질환 진단용 키트, 심혈관계 질환의 진단 방법 및 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제를 포함하는 약물 전달 복합체에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 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.
- [4] 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 동맥경화반이 형성되며, 이로부터 좌측 경동맥 부분결찰을 통해 발생한 비정상적인 와류성 혈류는 급성으로 혈관내피세포 기능 이상을 유도하여 동맥경화증의 발생을 촉진할 수 있다는 점이 보고되었다.
- [5] 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.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 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.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 하나의 목적은 혈관내피세포에서 NMHC IIA를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 심혈관계 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 심혈관계 질환의 진단방법을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제를 포함하는 약물 전달 복합체를 제공하는 것이다.

[13]

발명의 효과

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

[15]

도면의 간단한 설명

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

- [17] 도 1b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥의 혈관내피세포에서 발현되는 염증유발 유전자인 VCAM-1과 ICAM-1의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 현미경사진 및 그래프이다.
- [18] 도 1c는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥에서 동맥경화반의 형성여부를 나타내는 현미경 사진이다.
- [19] 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.
- [20] 도 2b는 경동맥 부분결찰 동물모델의 각 장기에서 파지 디스플레이 패닝을 수행하고, 이로부터 얻어진 파지의 수를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [21] 도 3a는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 형태변화를 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.
- [22] 도 3b는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 염증관련 유전자의 발현수준 변화를 확인한 결과를 나타내는 사진이다.
- [23] 도 3c는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 형태변화를 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.
- [24] 도 3d는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 혈류전단응력에 의한 염증관련 유전자의 발현수준 변화를 확인한 결과를 나타내는 사진이다.
- [25] 도 4a는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.
- [26] 도 4b는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.
- [27] 도 4c는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [28] 도 4d는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [29] 도 5a는 6종의 DESPs를 발현시키는 파지를 투여하고 면역염색을 통해 이들이 좌측 경동맥(LCA)과 우측 경동맥(RCA)에 대한 결합여부를 확인한 결과를 나타내는 형광사진이다.
- [30] 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).
- [31] 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($p < 0.05$).
- [32] 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.

[33] 도 6a는 대동맥 조직의 해부학적 영역을 나타내는 사진이다.

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

[35] 도 6c는 대동맥의 branch 부위의 해부학적 영역을 나타내는 사진이다.

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

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

[38] 도 7b는 DESPs의 일종인 CLIRRTSIC(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.

[39] 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.

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

[41] 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.

[42] 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.

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

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

[45] 도 10c는 바이오틴이 표지된 CLIRRTSIC(서열번호 3)를 이용하여 면역침강된 HUVEC 세포유래 단백질과 항-NMHC IIA 항체를 이용한 웨스턴 블롯

분석결과를 나타내는 사진이다.

- [46] 도 11a는 LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 발현된 NMHC IIA의 발현수준에 대한 웨스턴 블롯 분석결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.
- [47] 도 11b는 LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포를 대상으로 항-NMHC IIA 항체를 이용한 면역형광염색을 수행한 결과를 나타낸 사진이다.

[48]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [49] 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 실제적으로 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.
- [50] 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.
- [51]
- [52] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 NMHC IIA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 심혈관계 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [53]
- [54] 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.

[55]

[56] 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.

[57]

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, 심장관상동맥 협착증, 협심증, 말초동맥 협착증, 허혈성동맥질환, 동맥경화성 뇌혈관질환 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.

[58]

[59] 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.

[60]

[61] 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, 로케트(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 앵타머가 될 수 있다.

[62]

[63] 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.

- [64] 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.

[65]

- [66] 본 발명의 용어 "애타머(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 애타머의 제조는 일반적인 애타머의 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.

- [67] 본 발명에 있어서, 상기 애타머는 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 애타머가 될 수 있고, 일 예로서, 상기 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 DNA 애타머가 될 수 있다.

[68]

- [69] 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).

[70]

- [71] 따라서, 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포에서는 NMHC IIA의 발현수준이 증가하고, 이처럼 발현수준이 증가된 NMHC IIA는 세포막으로 이동하며, 상기 세포막으로 이동한 NMHC IIA는 CLIRRTSIC(서열번호 3)와 결합할 수 있고, 상기 CLIRRTSIC(서열번호 3)는 siRNA와 같은 생체고분자 물질을 상기 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포로 전달할 수 있음을 알 수 있었다.

[72]

- [73] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 심혈관계 질환 진단용 조성물을 포함하는

심혈관계 질환 진단용 키트를 제공한다.

[74]

[75] 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.

[76]

[77] 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.

[78]

[79] 본 발명의 용어 "개체"란 심혈관계 질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물 등을 제한 없이 포함할 수 있다.

[80]

[81] 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 기체, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기체는 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.

[82]

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.

[83]

[84] 본 발명은 또 다른 양태로서, 생물학적 시료로부터 NMHC IIA의 발현수준을 측정하거나 또는 세포내 위치를 확인하여 심혈관계 질환을 진단하는 방법을 제공한다.

[85]

[86] 일 예로서, 본 발명에서 제공하는 심혈관계질환의 진단방법은 (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 포함할 수 있다.

[87] 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.

[88]

[89] 다른 예로서, 본 발명에서 제공하는 심혈관계질환의 진단방법은 검사대상 개체의 생물학적 시료로부터 NMHC IIA가 세포막에 존재하는지의 여부를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[90] 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.

[91] 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.

[92]

[93] 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.

[94]

[95] 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.

[96]

[97] 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.

[98] 본 발명에 있어서, 상기 약물 전달체는 심혈관계 질환을 치료하는 용도로 사용될 수 있는데, 상기 심혈관계 질환은 상술한 바와 동일하다.

[99]

[100] 본 발명의 용어 "약물"이란, 상기 NMHC IIA에 결합할 수 있는 제제를 통해 상기 NMHC IIA이 발현되는 세포 또는 조직으로 전달될 수 있는 심혈관계 질환에 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), 디엔에이아자임(DNAzyme), microRNA 또는 이들의 조합인 핵산이 될 수 있다.

[101]

[102] 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.

[103]

[104] 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.

[105]

[106] 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.

[107]

[108] 상기 반응기를 포함하는 비펩타이드성 고분자 물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-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.

[109]

[110] 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).

[111]

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 기능이상 혈관내피세포로 목적하는 약물 또는 유전자의 특이적 국소 전달에 유용할 수 있음을 알 수 있다.

[112]

발명의 실시를 위한 형태

[113]

[114] 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.

[115]

[116] 실시예 1: 기능이상 혈관내피세포에 특이적인 펩타이드의 발굴

[117]

[118] 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.

[119]

[120] 실시예 1-1: 경동맥 부분결찰 동물모델의 제작

[121]

[122] 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 기능이상이 유발되고, 2주 이내에 급성으로 동맥경화증이 유발됨을 확인하였다.

[123]

[124] 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).

[125] 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.

[126]

[127] 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).

[128] 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.

[129]

[130] 끝으로, 상기 마우스의 좌측 경동맥(LCA) 및 우측 경동맥(RCA)에서 동맥경화반의 형성여부를 확인하였다(도 1c).

[131] 도 1c는 경동맥 부분결찰 동물모델의 좌측 경동맥과 우측 경동맥에서 동맥경화반의 형성여부를 나타내는 현미경 사진이다. 도 1c에서 보듯이, 정상 혈관인 RCA에서는 동맥경화반이 형성되지 않았으나, 부분결찰된 LCA에서는 동맥경화반이 형성됨을 확인하였다.

[132]

[133] 따라서, 상기 제작된 경동맥 부분결찰 동물모델은 동맥경화 동물모델로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[134]

[135] 실시예 1-2: 파지 디스플레이 패닝

[136]

[137] Ph.D-C7C phage display peptide library kit(New England Biolabs, Inc.)를 사용하여 파지 디스플레이 패닝을 수행하였다.

[138] 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).

[139] 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.

[140]

[141] 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).

[142] 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.

[143]

[144] 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 파지 DNA를 수득한 다음, 수득한 파지 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).

[145]

[146] [표1]

마우스모델의 LCA와 RCA에서 측정된 펩타이드의 빈도

서열번호	펩타이드	LCA	RCA	서열번호	펩타이드	LCA	RCA
1	CKMTRSTIC	29	22	21	CRTKLRKLC	1	
2	CKIMISISC	19	30	22	CHMQIMHRC	1	
3	CLIRRTSIC	8	2	23	CTRMMLRIC	1	
4	CPLLTCLKC	8	4	24	CTPRQTRMC	1	
5	CTHRRSTPC	7	5	25	CMLNITRRC	1	
6	CHIPSIHSC	8	8	26	CRKLPRISC	1	
7	CQMMLIRRC	4	4	27	CPLQPKSIC	1	
8	CNLLLRTQC	5	1	28	CPIRHRPIC	1	
9	CPRRSHPIC	4		29	CRTMRIRLC	1	
10	CLHPPLTLC	6	2	30	CMRQRRNRC		2
11	CKMNIRLSC	2		31	CPRRRLKRC		1
12	CILRKIRPC	4	4	32	CHQLPIRPC		1
13	CSRRPTSIC	1	1	33	CPIKTTITC		1
14	CLIRLILQC	1	2	34	CRRQTSTHC		1
15	CRM RKTLRC	1	1	35	CNPMTRLIC		2
16	CQPHHSIIC	1	1	36	CPIRHRPIC		1
17	CSTHIPSHC	1	1	37	CTLHKSRSC		1
18	CILRRRKRC	1	1	38	CTRIISNTC		1
19	CSIRIHRRC	1		39	CKLINTLKC		1
20	CSLRRHPIC	1		40	CQMTRSTIC		1

[147]

[148] 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.

[149]

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

[151]

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

[153]

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

[155] 또한, 사람 제대정맥 내피세포인 HUVEC를 Medium 200 배지(5% FBS 및 LSGS(low-serum growth))에 접종하고, 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[156] 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).

[157] 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.

[158] 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.

[159] 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.

[160] 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.

[161]

[162] 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°C에서 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).

[163] 도 4a는 마우스 혈관내피세포인 iMAEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 도 4a에서 보듯이, 상기 iMAEC 세포에는 CLIRRTSIC(서열번호 3), CNLLLRQTQC(서열번호 8) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 파지가 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 그 결합이 증가됨을 확인하였다.

[164] 도 4b는 사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 대상으로 6종 펩타이드의 결합수준을 확인한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 도 4b에서 보듯이, 상기 HUVEC 세포에는 CLIRRTSIC(서열번호 3), CNLLLRQTQC(서열번호 8), CPRRSHPIC(서열번호 9) 및 CLHPPLTLC(서열번호 10)를 발현시키는 파지가 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 그 결합이 증가됨을 확인하였다.

[165] 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.

[166] 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.

[167]

[168] 따라서, 상기 결과를 종합하면, 상기 발굴된 6종의 펩타이드는 기능이상 혈관내피세포에 특이적인 펩타이드(Dysfunctional Endothelial cells-Specific Peptides, DESPs)임을 알 수 있었다.

[169]

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

[171]

[172] 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).

[173] 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, CLIRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)를 발현시키는 각 파지는 부분결찰된 LCA에 특이적으로 결합하는 반면, 정상적인 RCA에는 결합하지 않음을 확인하였다.

[174] 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 $\pm$ 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 5b 및 5c에서 보듯이, 상기 좌측 경동맥(LCA)에 결합된 파지는 혈관의 표면에 결합되어 있음을 확인하였다.

[175] 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 5d에서 보듯이, 세망내피계에 속하는 간과 비장을 제외한 장기 중에서, LCA에서 가장 높은 수준의 파지가 검출됨을 확인하였다.

[176]

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

[178]

[179] 상기 경동맥 부분결찰 동맥경화증 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.

[180]

[181] 먼저, 상기 경동맥 부분결찰 동맥경화증 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).

[182] 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.

[183] 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 DA)로 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.

[184] 도 6d는 DESPs의 일종인 CLIRRTSIC(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 CLIRRTSIC(서열번호 3) 및 CPRRSHPIC(서열번호 9)가 대동맥의 branch 영역 중에서도 와류성 혈류가 발생하는 NA-1과 NA-II 영역에 결합됨을 확인하였다.

[185]

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

[187]

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

[189]

[190] 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.

[191] 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).

[192]

[193] 구체적으로, 폐절제술을 받은 환자로부터 적출된 사람의 폐동맥으로부터 동결절편을 수득하고, 수득한 동결절편에 3×10^{11} pfu의 DESP를 발현하는 파지를 가하여 37°C에서 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 폐동맥 조직에 대한 파지의 결합수준을 비교하였다(도 7b 및 7c).

[194] 도 7b는 DESPs의 일종인 CLIRRTSIC(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.

[195] 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.

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

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

[198]

[199] 실시예 2: DESPs를 이용한 혈관내피세포로의 siRNA 전달

[200]

[201] 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.

[202]

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

[204]

- [205] 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.
- [206] 도 8은 사람 혈관내피세포인 HUVEC 세포에 있어서, LSS 또는 OSS 조건에 따른, DESPs의 일종인 CLIRRTSIC(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, CLIRRTSIC(서열번호 3)가 상대적으로 높은 결합활성을 나타냄을 확인하였다.
- [207]
- [208] 실시예 2-2: DESPs를 이용한 혈관내피세포로의 siRNA 전달
- [209]
- [210] 실시예 2-1에서 합성된 서열번호 3 또는 9의 아미노산 서열을 갖는 DESPs를 각각 고분자 물질인 PEG에 결합시켜서, DESPs가 결합된 고분자 물질(BPEI-SS-PEG)를 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.
- [211] 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, CLIRRTSIC(서열번호 3)는 와류성 혈류조건에서 배양된 HUVEC 세포에 특이적으로 도입되고 N/P 비율이 증가할수록 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.

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

[213]

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

[215]

[216] 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 CLNQQTIC(서열번호 41)이 결합된 BPEI-SS-PEG-siICAM1를 사용하였다.

[217] 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 LCA에서 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.

[218] 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.

[219]

[220] 실시예 3: CLIRRTSIC에 결합하는 표적 단백질 규명

[221]

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

[223]

[224] 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.

[225]

[226] 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 과쇄하여 수득한 과쇄물 1.6 mg에 3 μ g의 스트렙타비딘을 가하고, 4°C에서 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).

[227] 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.

[228]

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

[230] 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.

[231]

[232] 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).

[233] 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.

[234]

[235] 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.

[236]

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

[238]

[239] 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.

[240]

[241] 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).

[242] 도 11a는 LSS 또는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 발현된 NMHC IIA의 발현수준에 대한 웨스턴 블롯 분석결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 11a에서 보듯이, LSS 상태 보다는 OSS 상태에서 배양된 HUVEC 세포에서 NMHC IIA의 발현수준이 증가됨을 확인하였다.

[243]

[244] 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).

[245] 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.

[246] 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.

[247]

[248] 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 CLIRRTSIC(서열번호 3)와 결합할 수 있고, 상기 CLIRRTSIC(서열번호 3)는 siRNA와 같은 생체고분자 물질을 상기 와류성 혈류에 노출된 혈관내피세포로 전달할 수 있음을 알 수 있었다.

[249]

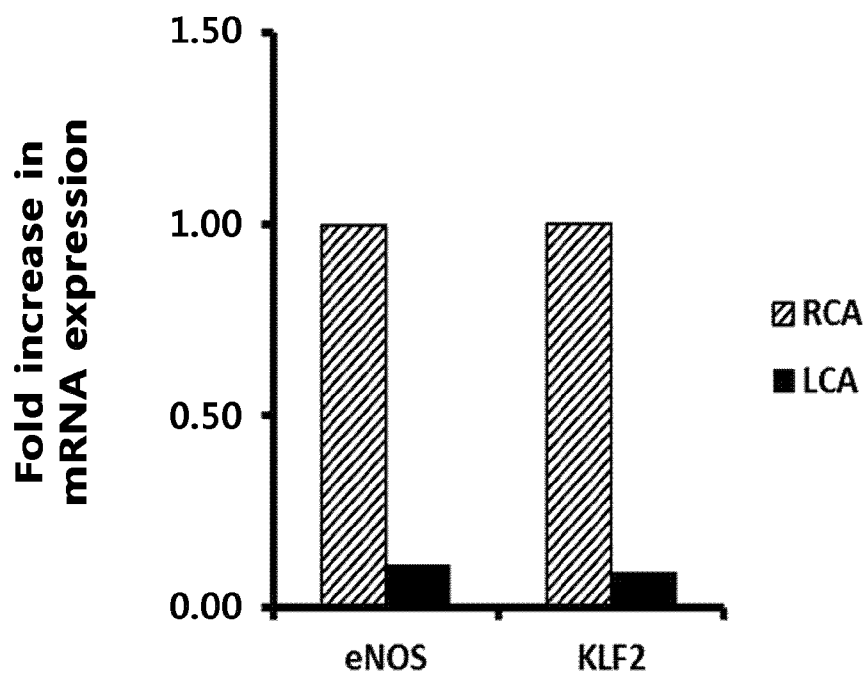
[250]

청구범위

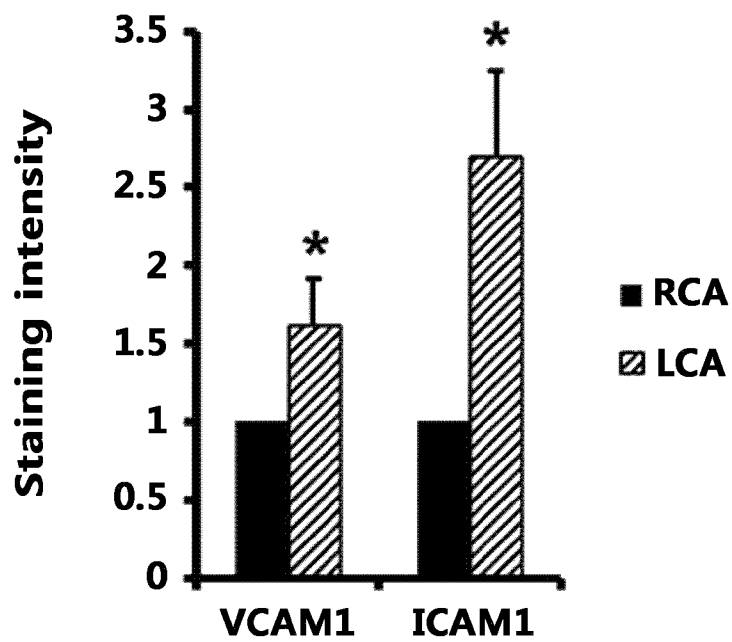
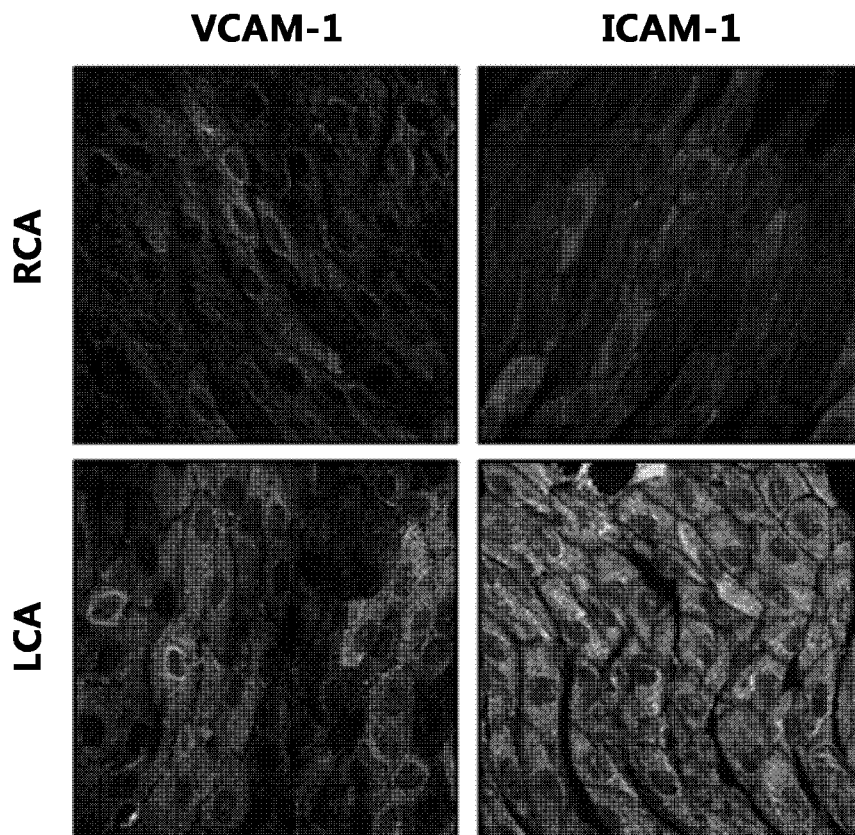
- [청구항 1] NMHC IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 심혈관계질환 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 NMHC IIA는 서열번호 42의 아미노산 서열로 구성되는 것인 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 NMHC IIA의 발현수준을 측정하는 제제는 상기 NMHC IIA에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 애포타머(aptamer)를 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 심혈관계 질환은 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 심장관상동맥 협착증, 협심증, 말초동맥 협착증, 허혈성동맥질환 또는 동맥경화성 뇌혈관질환인 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 진단방법.
- [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 진단방법.
- [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, 심장관상동맥 협착증, 협심증, 말초동맥 협착증, 허혈성동맥질환 또는 동맥경화성 뇌혈관질환인 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, 에틸 글리콜-프로필렌글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐에틸 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.

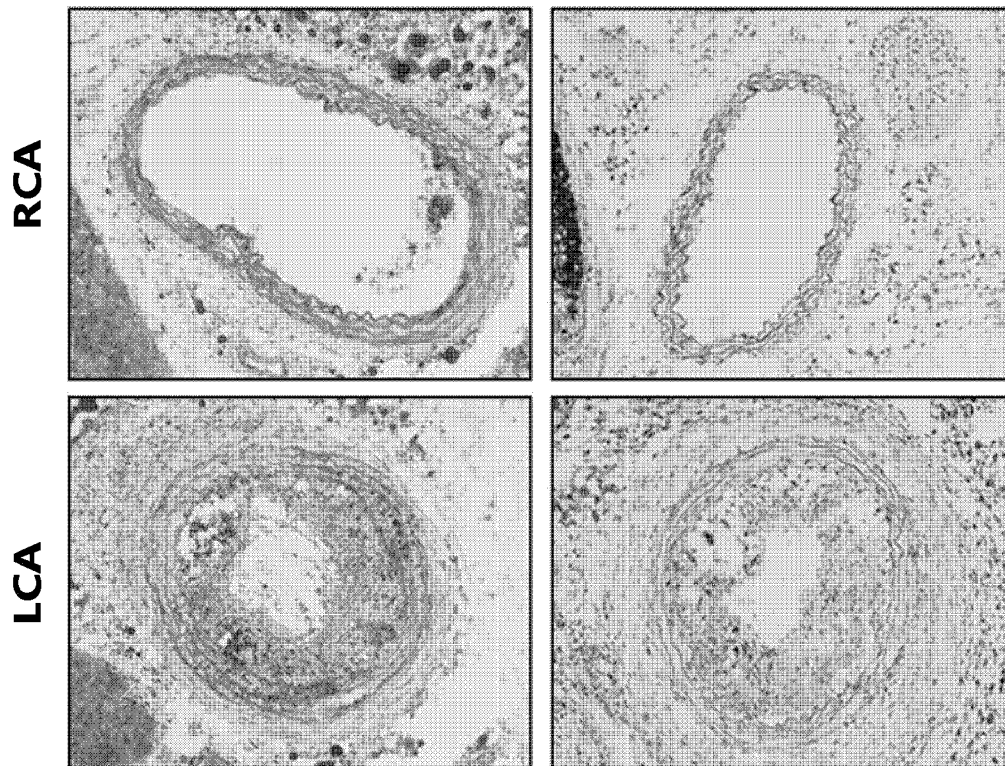
[도 1a]



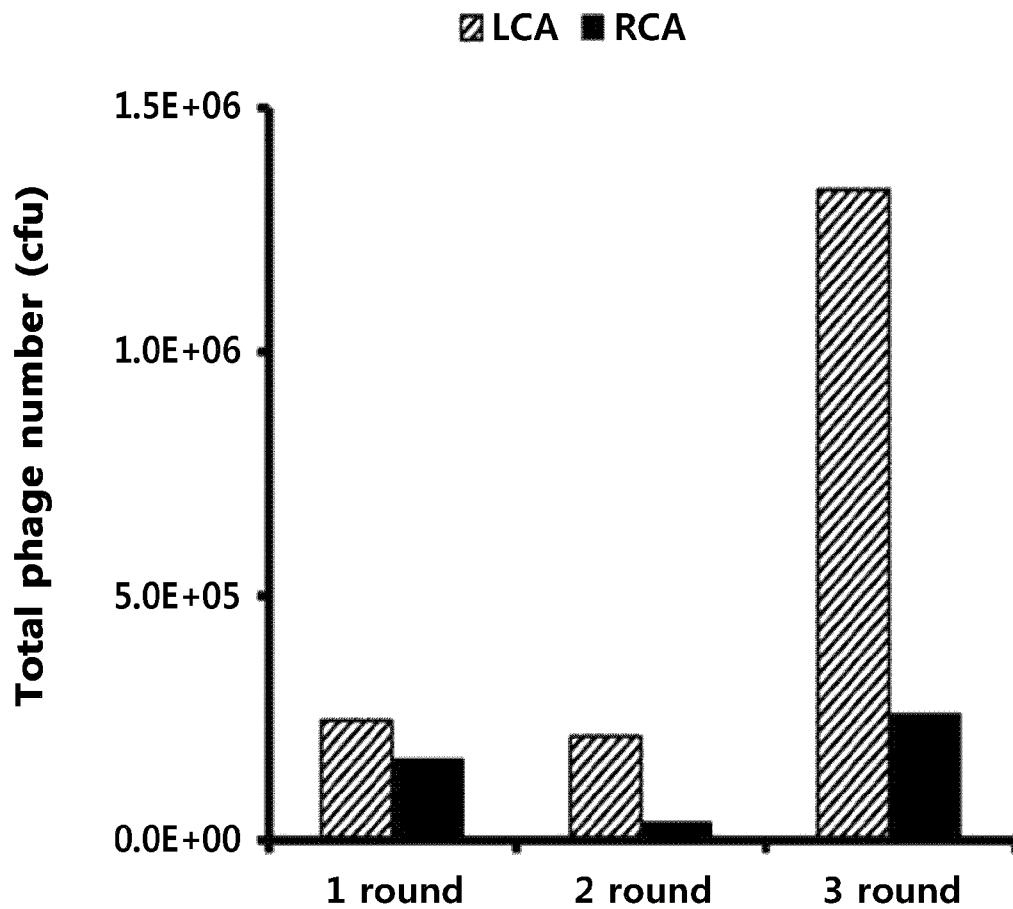
[도1b]



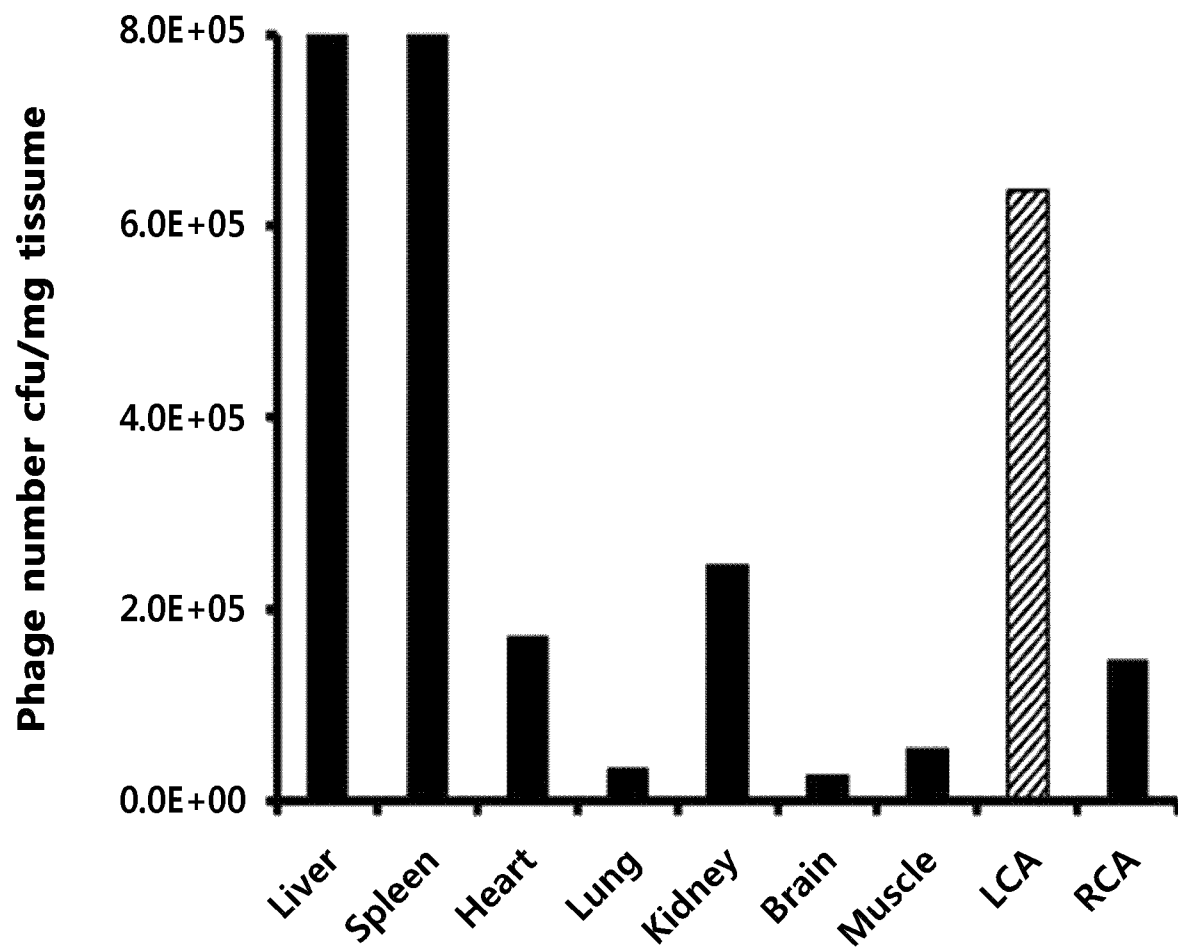
[도1c]

Atheroma formation

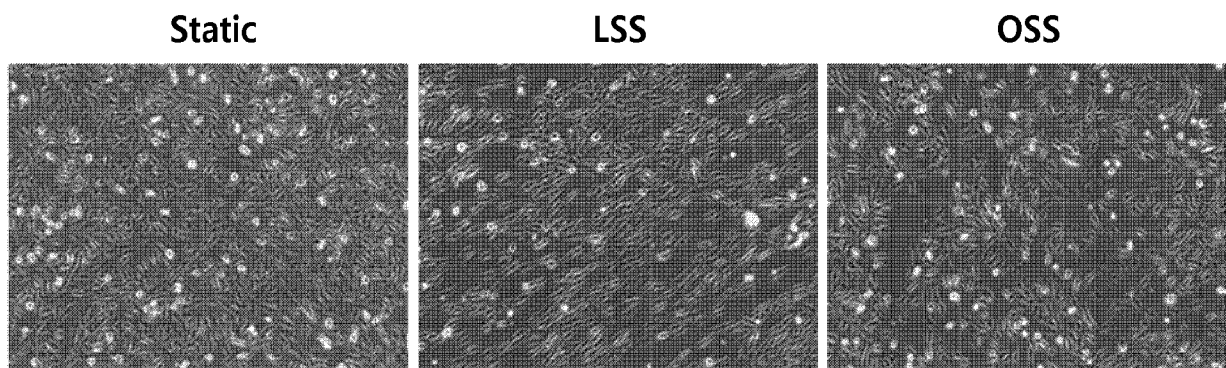
[도2a]



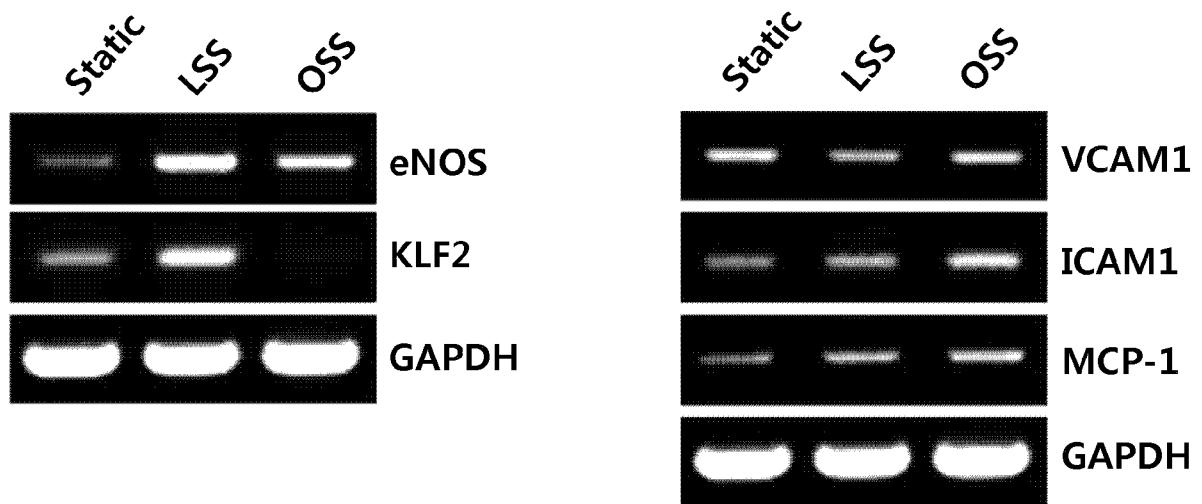
[도2b]



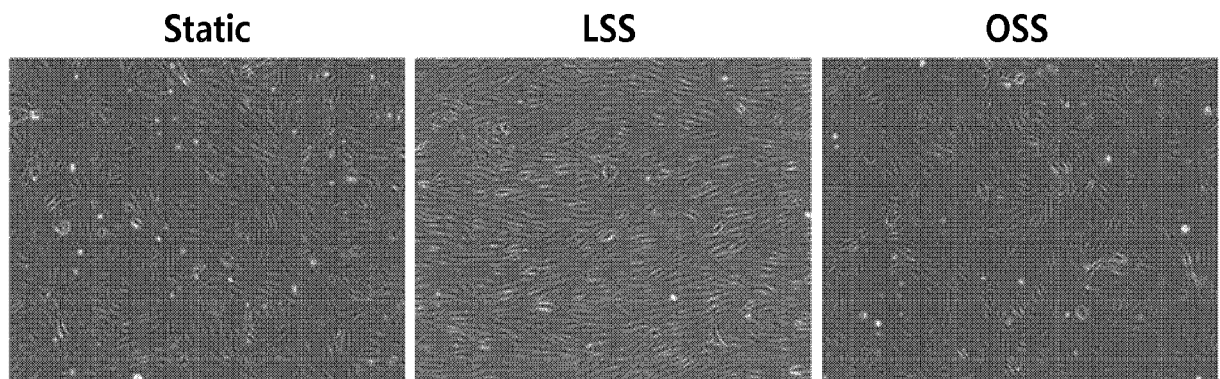
[도3a]



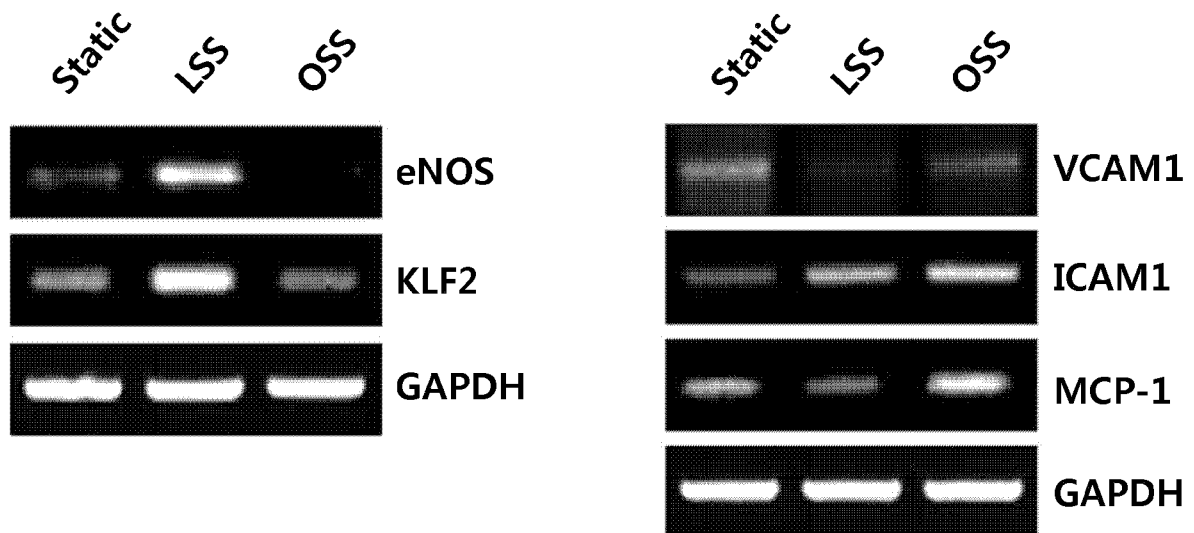
[도3b]



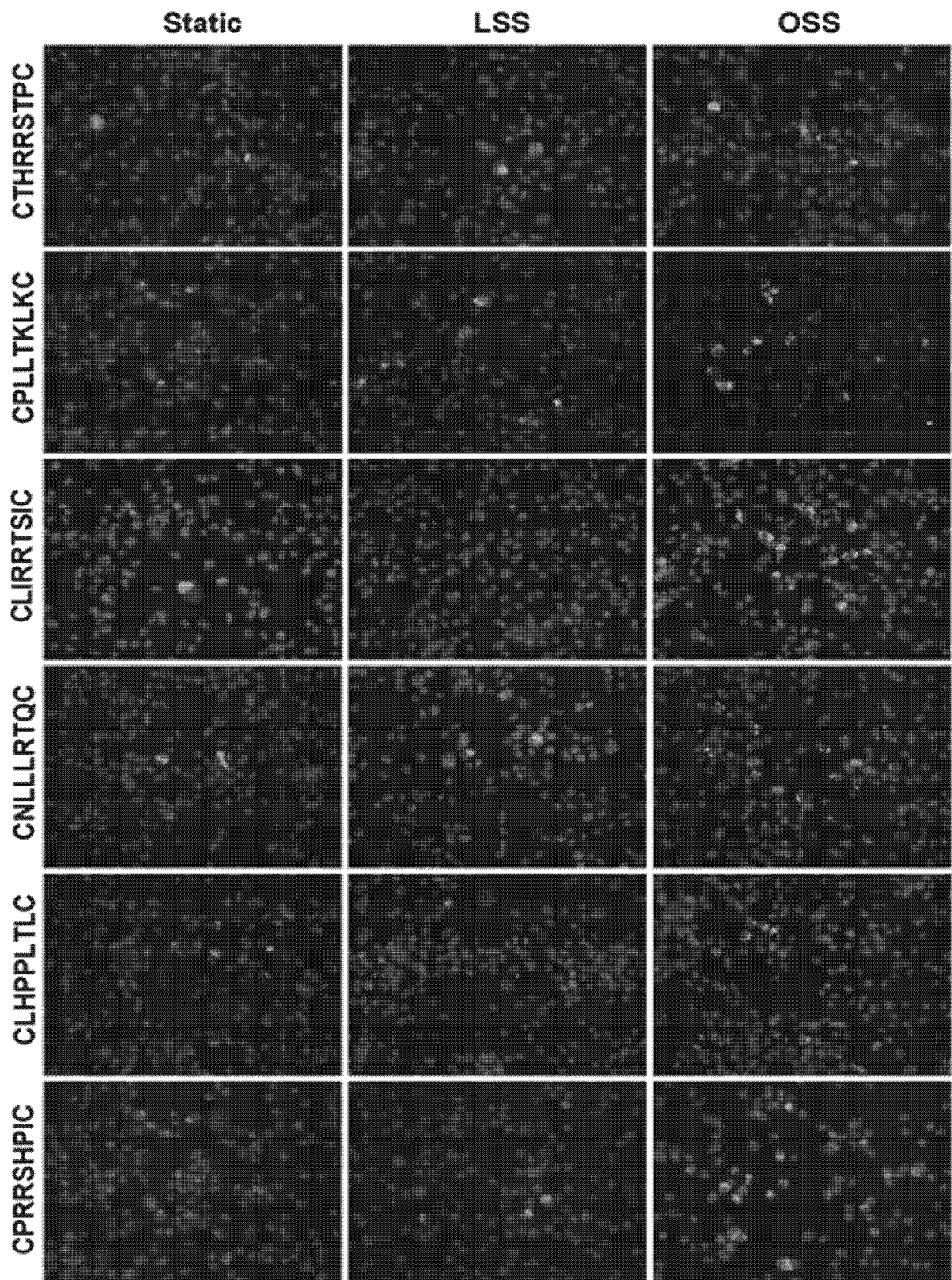
[도3c]



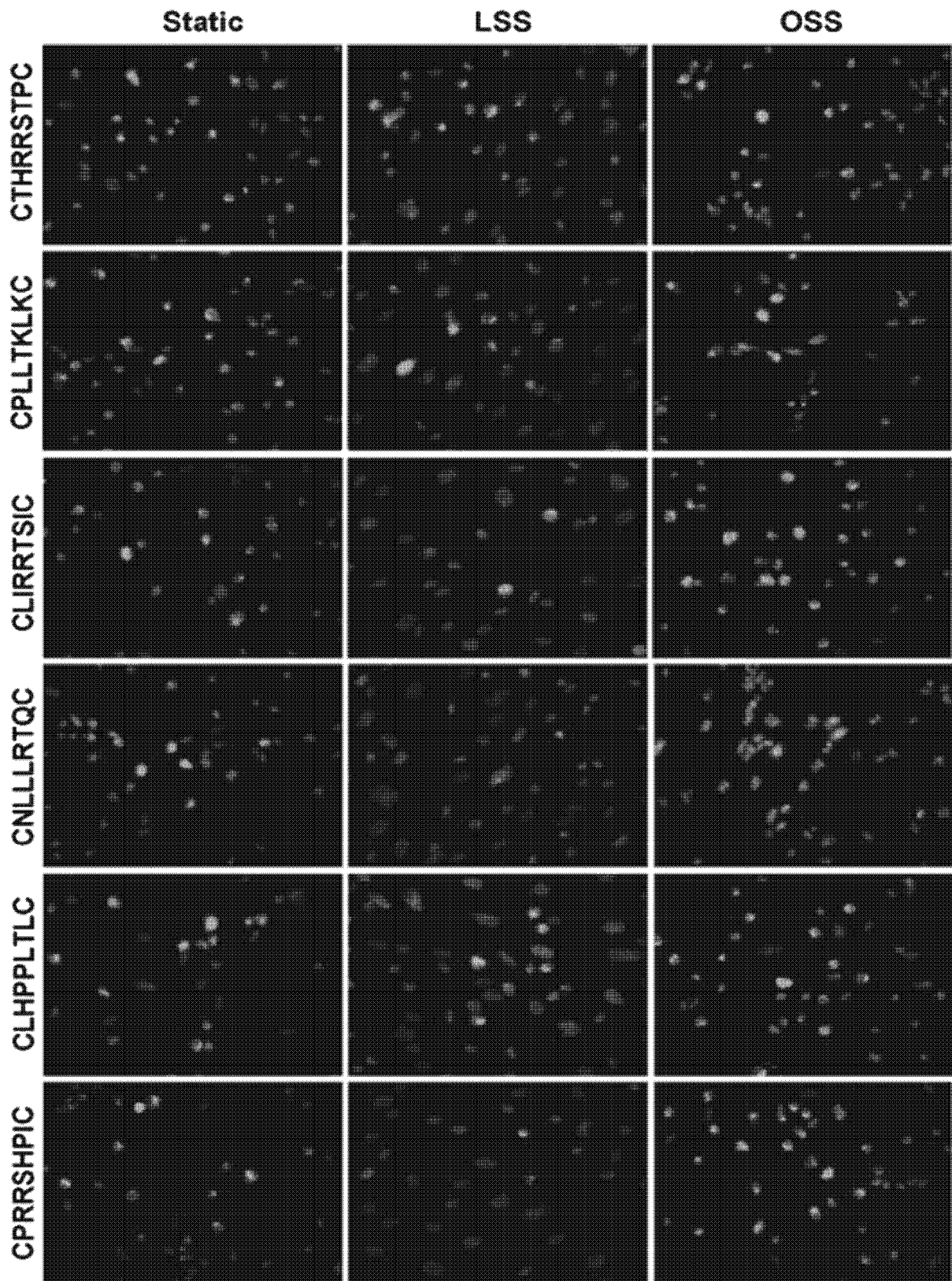
[도3d]



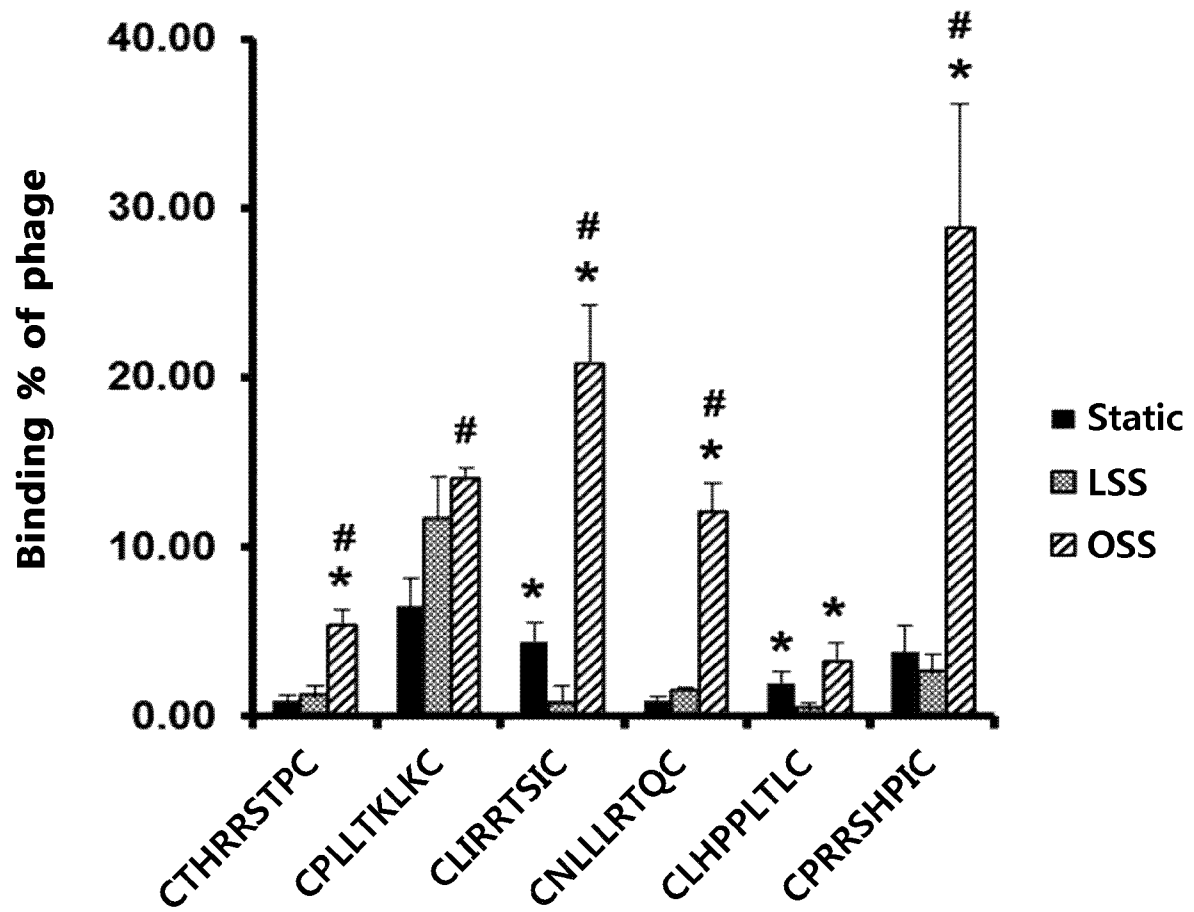
[도4a]



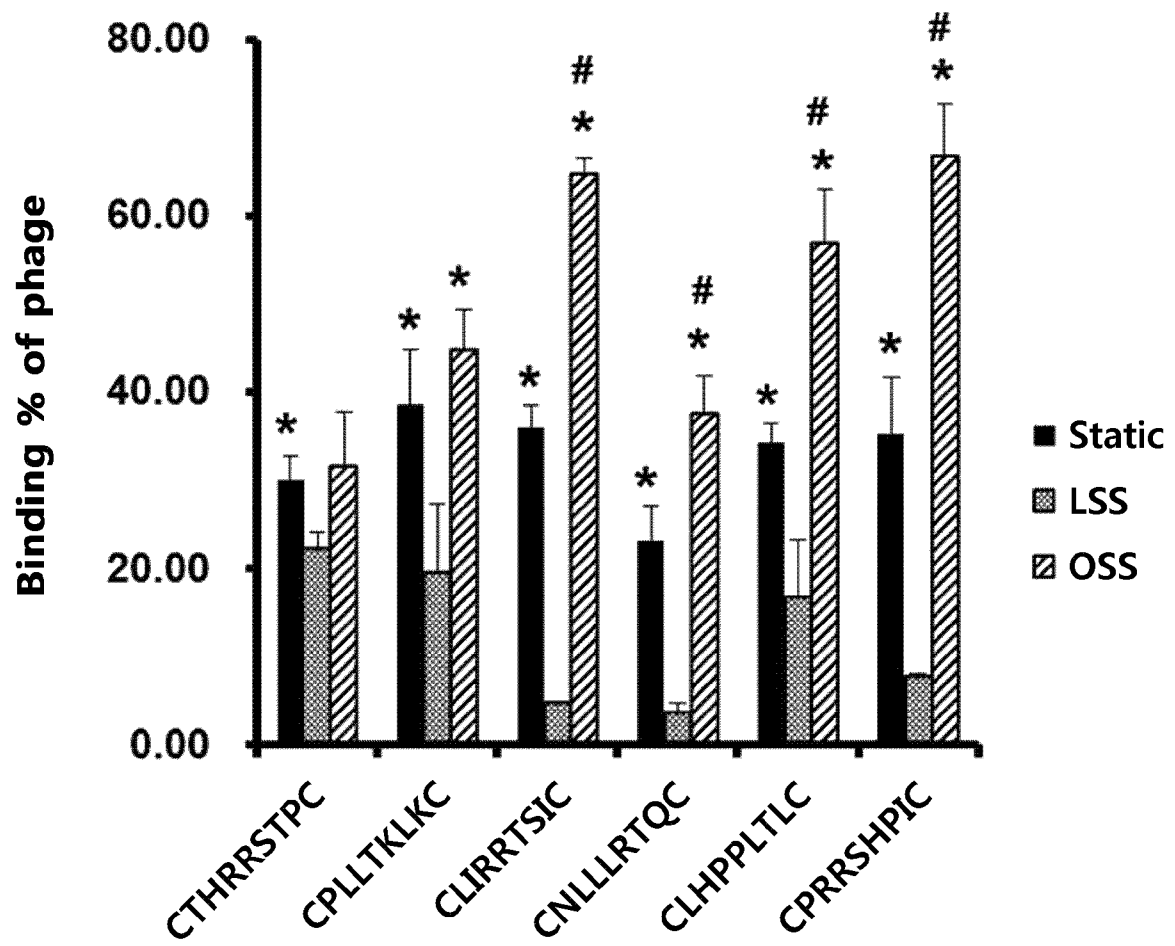
[도4b]



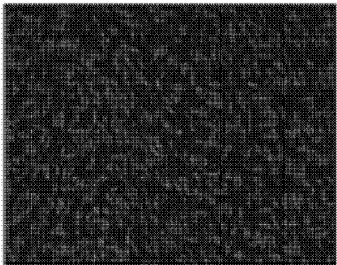
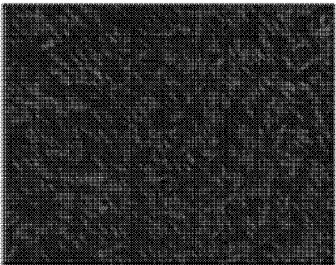
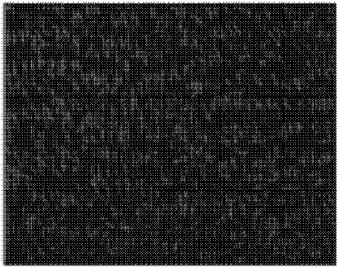
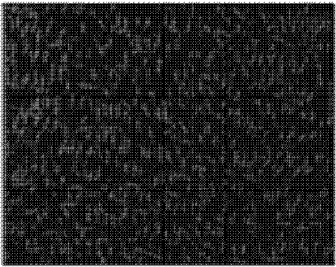
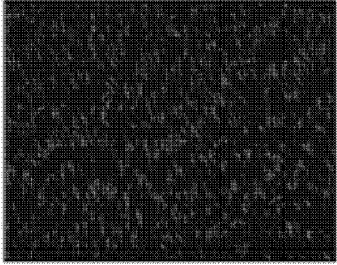
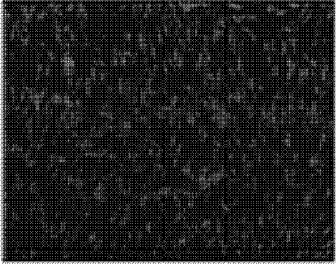
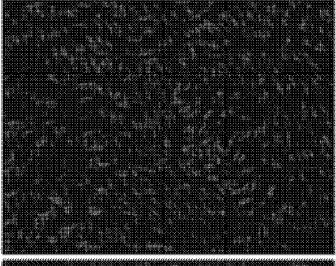
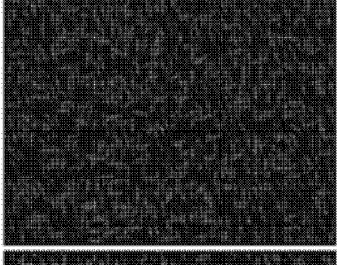
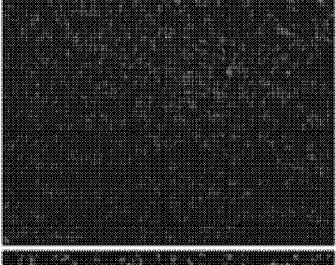
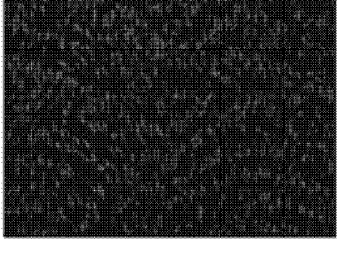
[도4c]



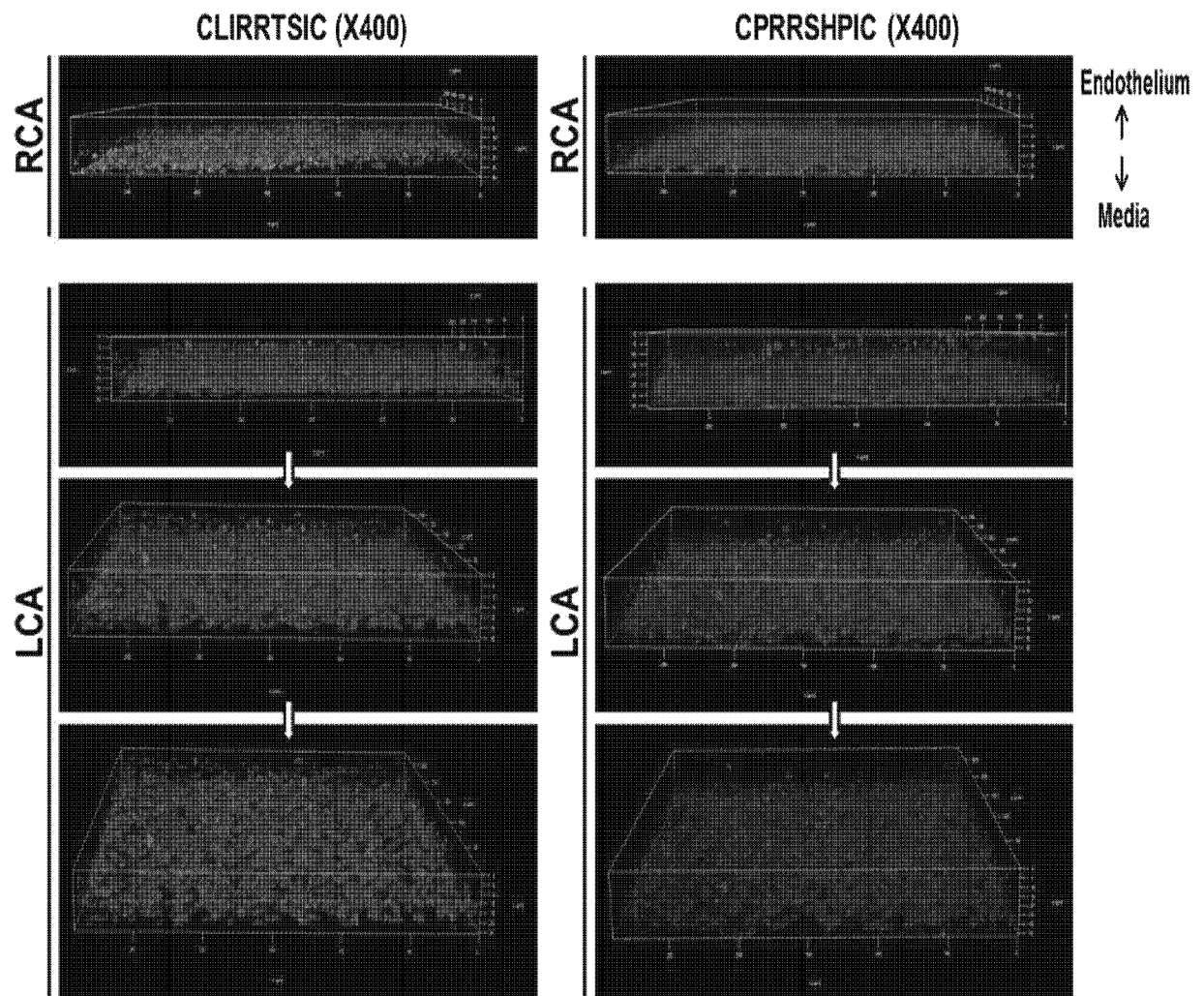
[도4d]



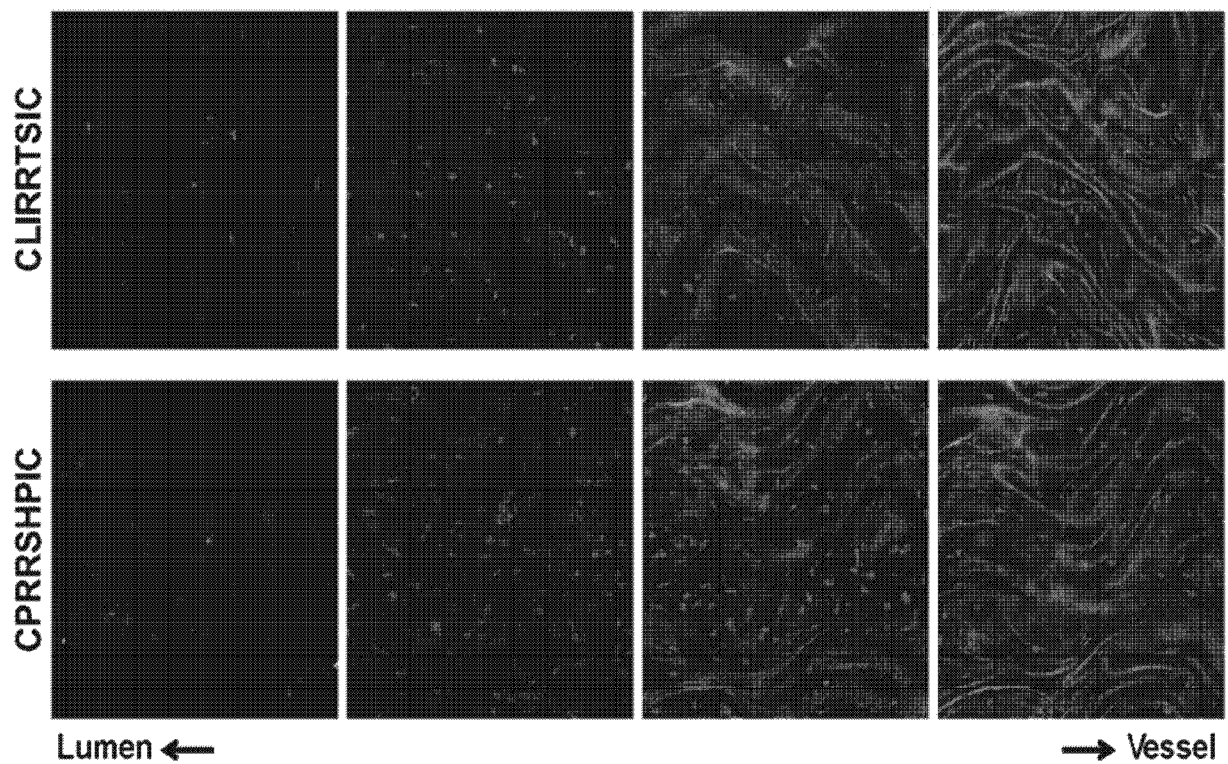
[도5a]

	RCA	LCA
CTHRRSTPC		
CPLLTCLKC		
CLIRRTSIC		
CNLLLRTOC		
CLHPPLTLC		
CPRRSHIPIC		

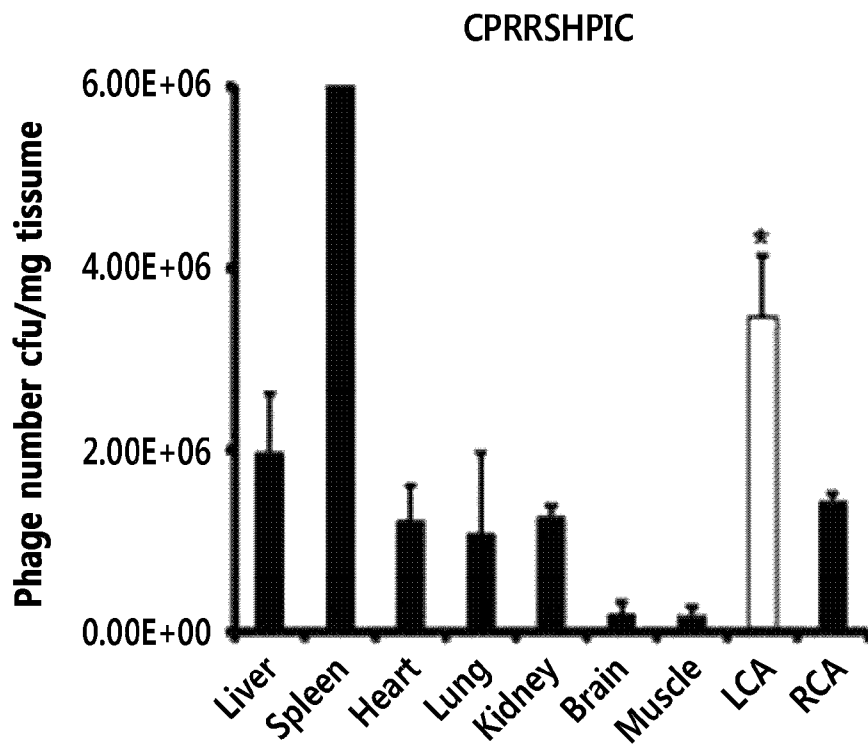
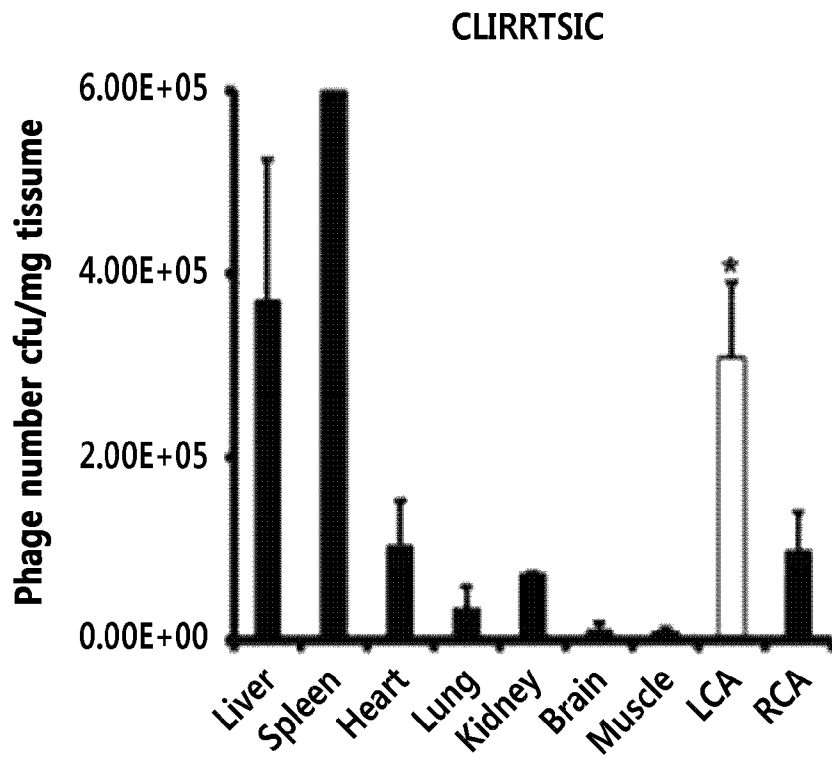
[도5b]



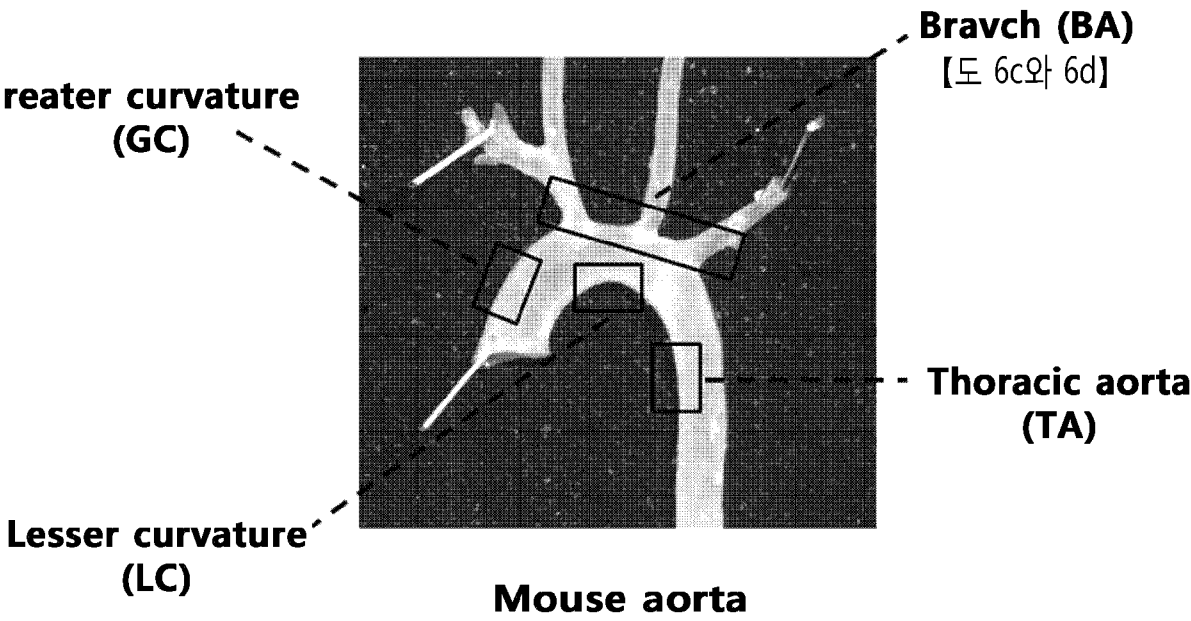
[도5c]



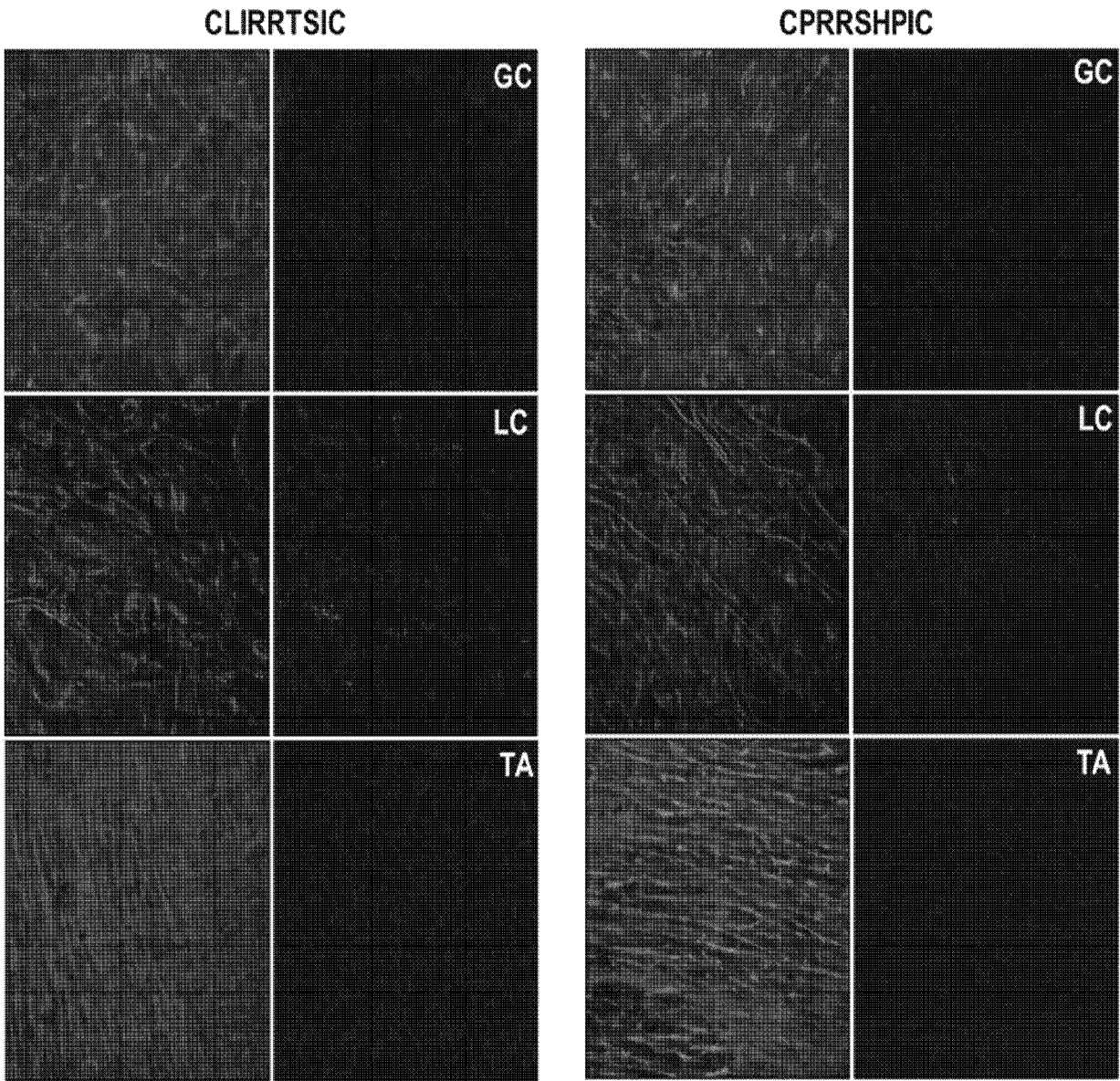
[도5d]



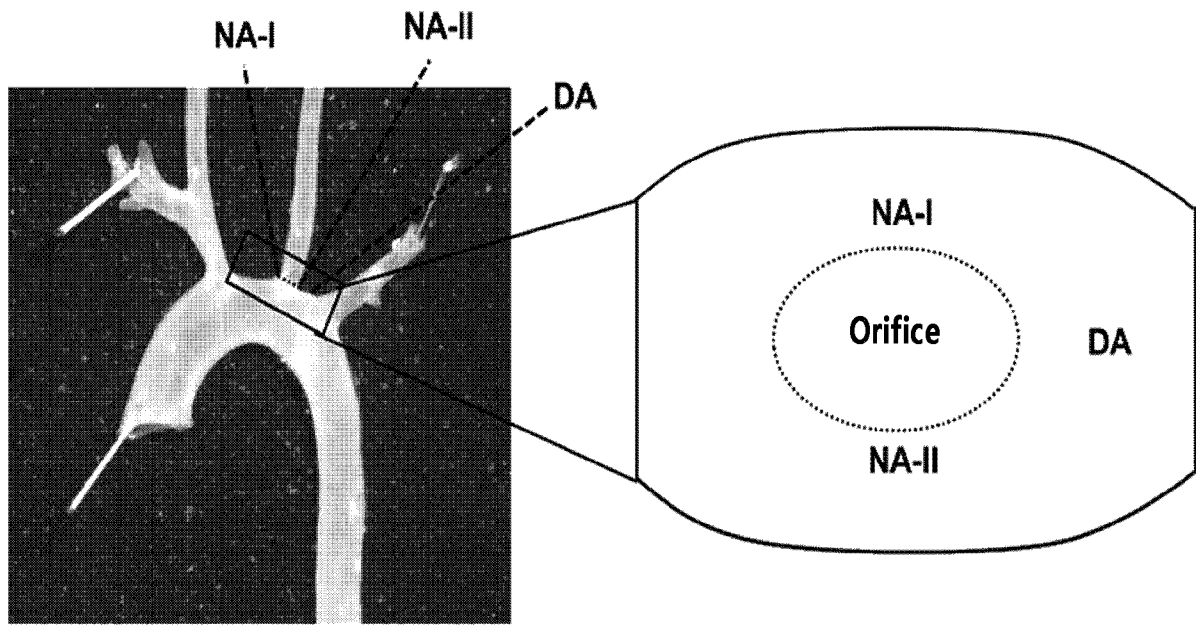
[도6a]



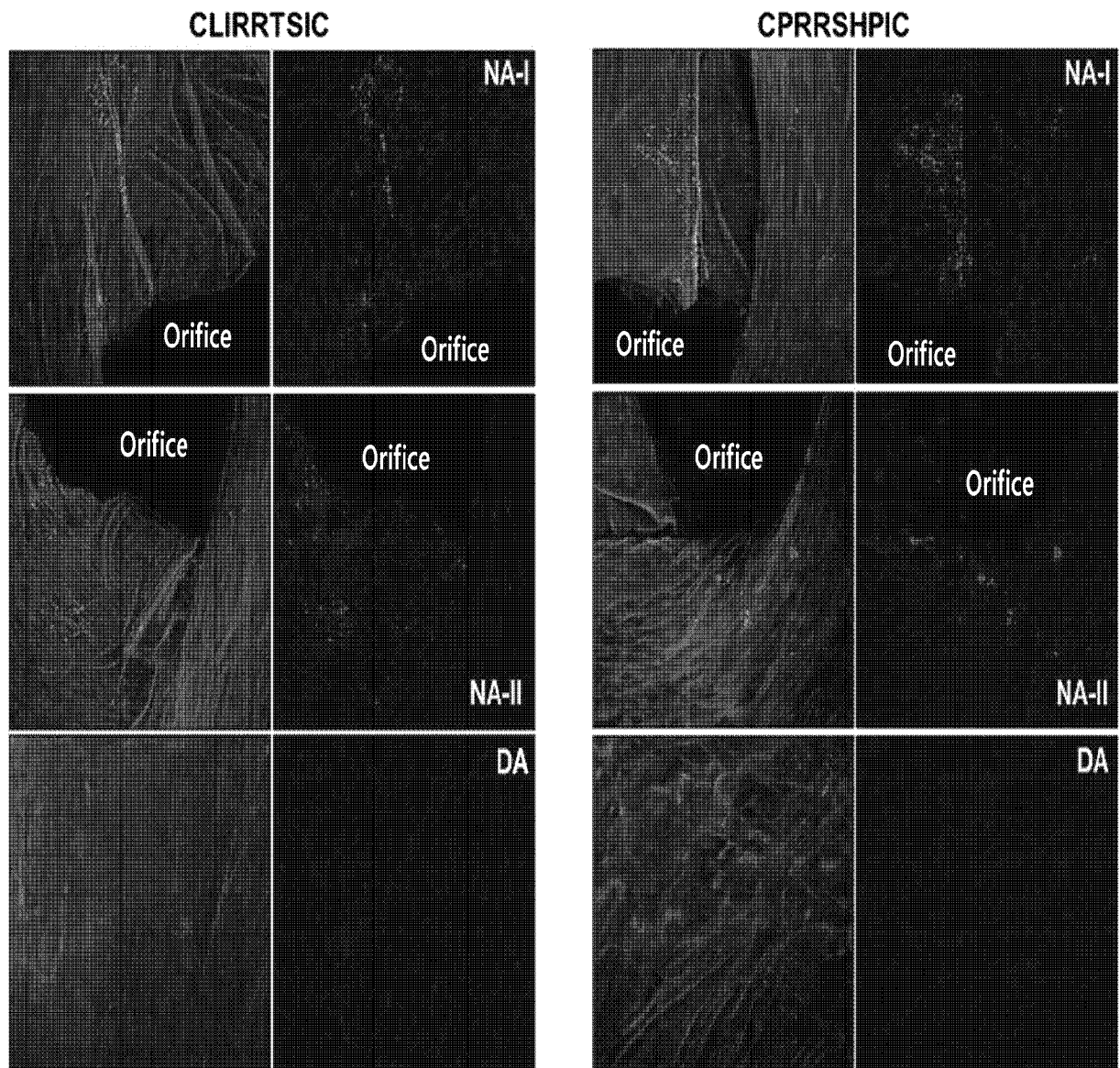
[도6b]



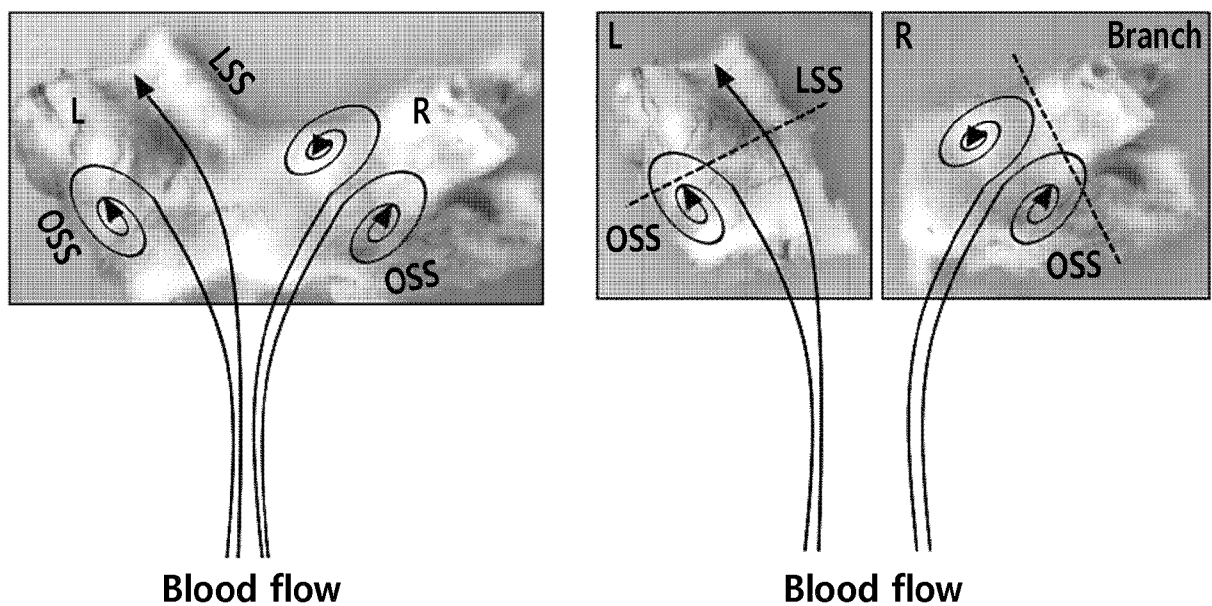
[도6c]

**Branched region (BA) in aorta**

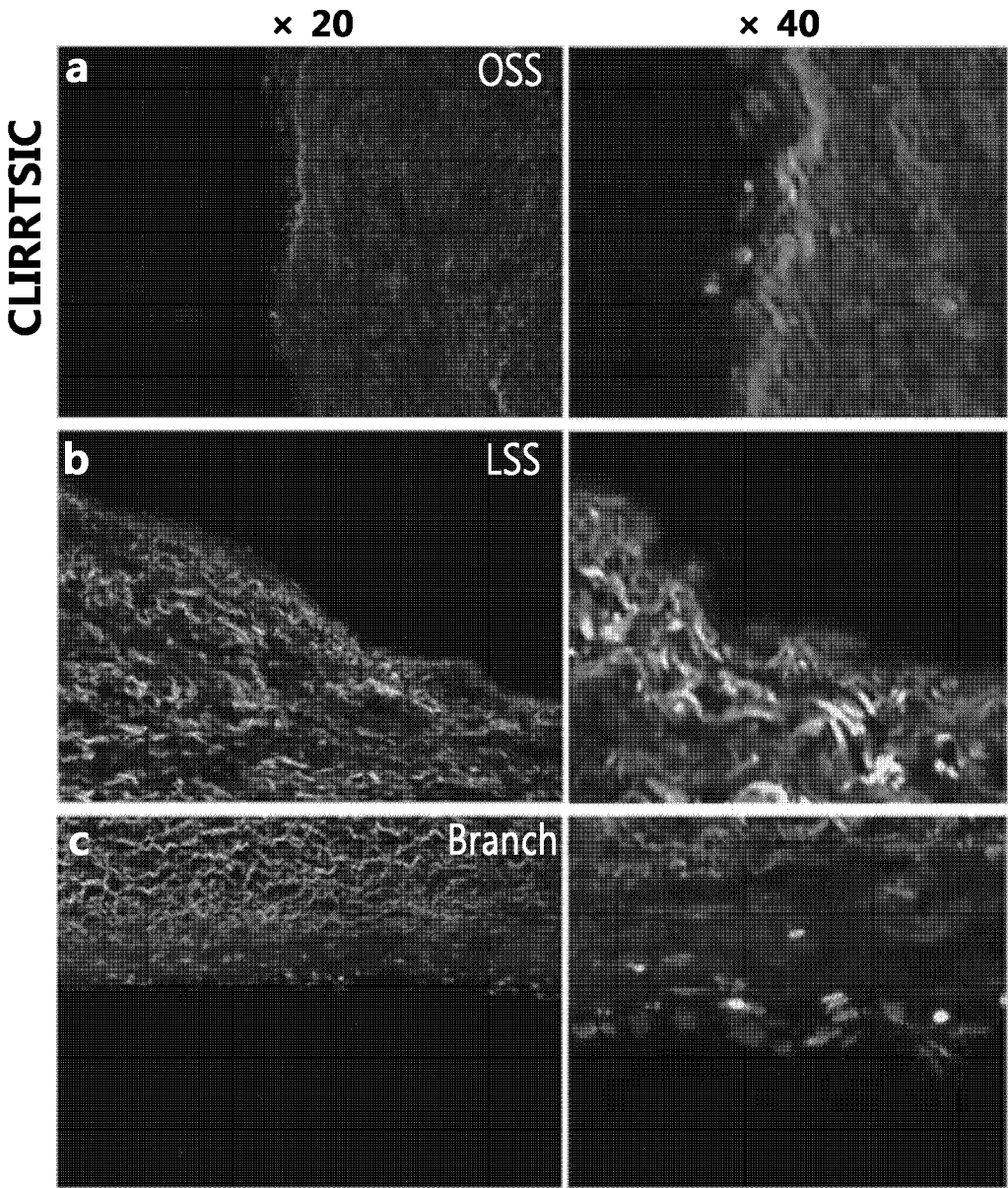
[도6d]



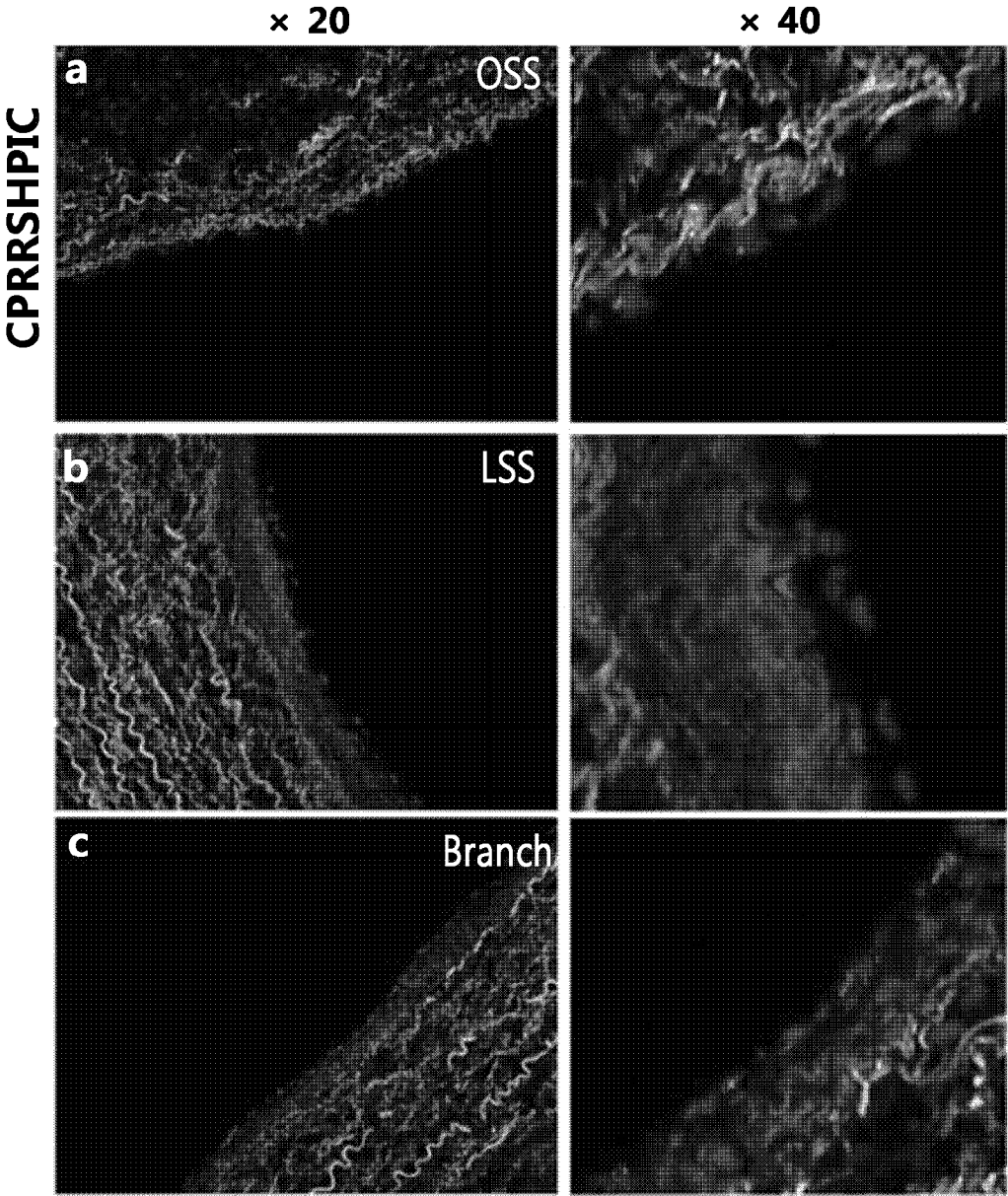
[도7a]



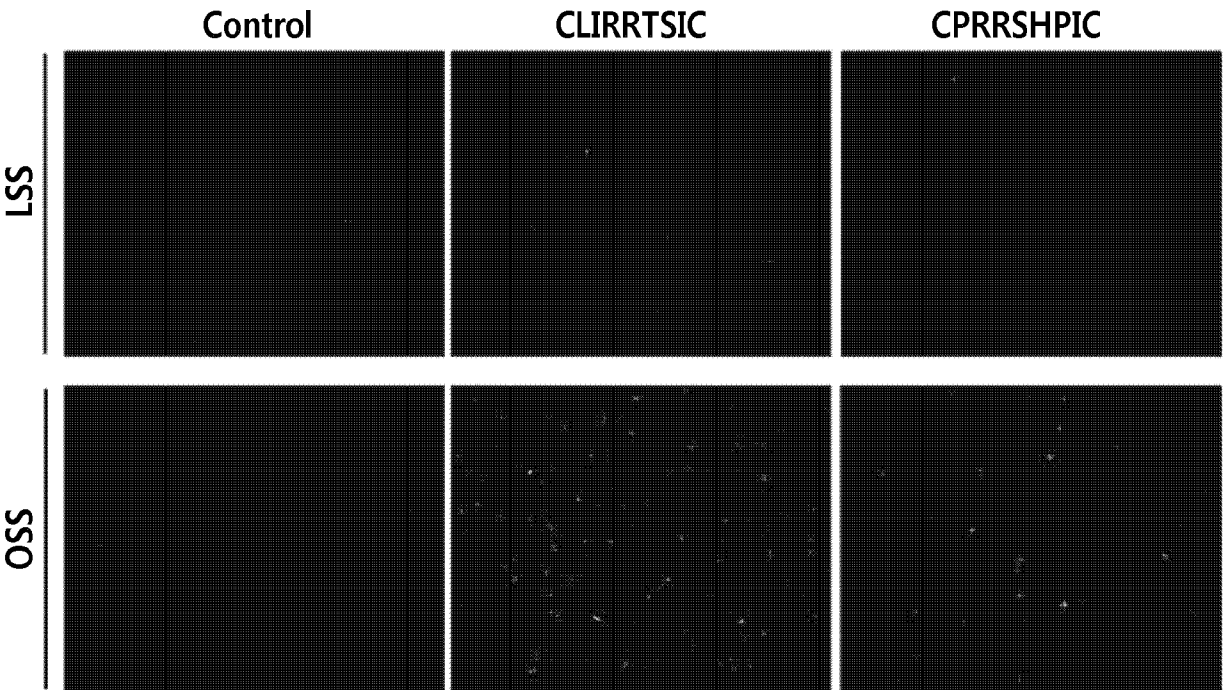
[도7b]



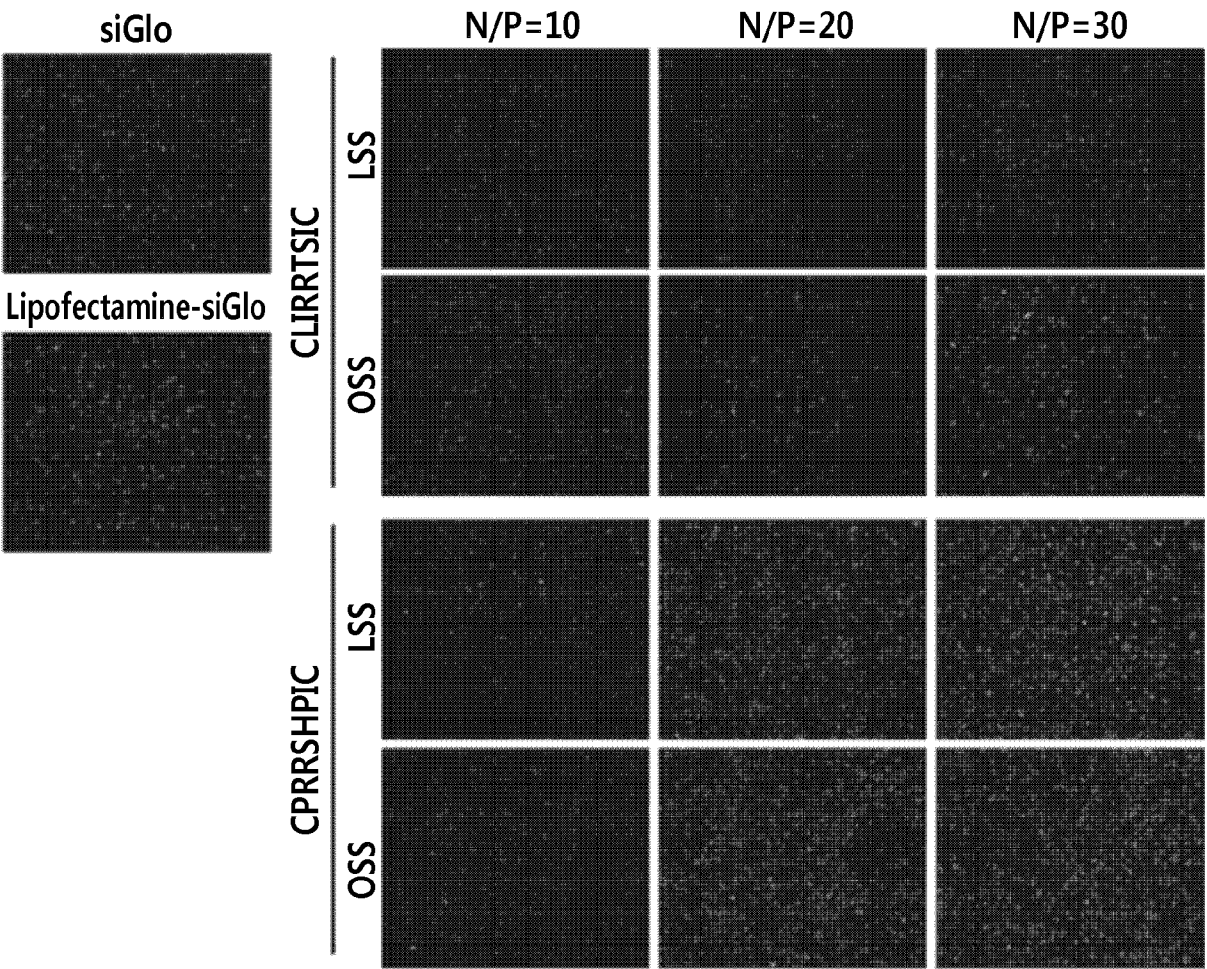
[도7c]



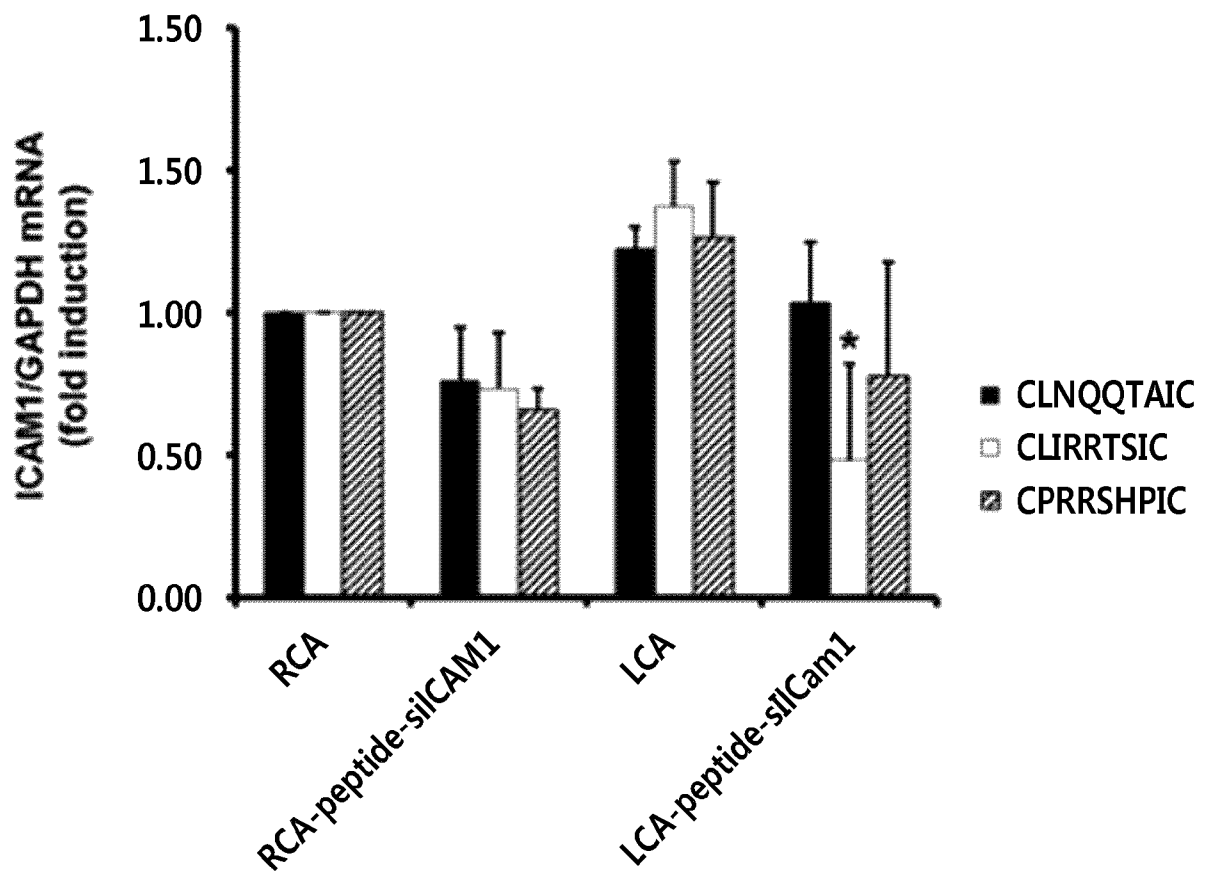
[도8]



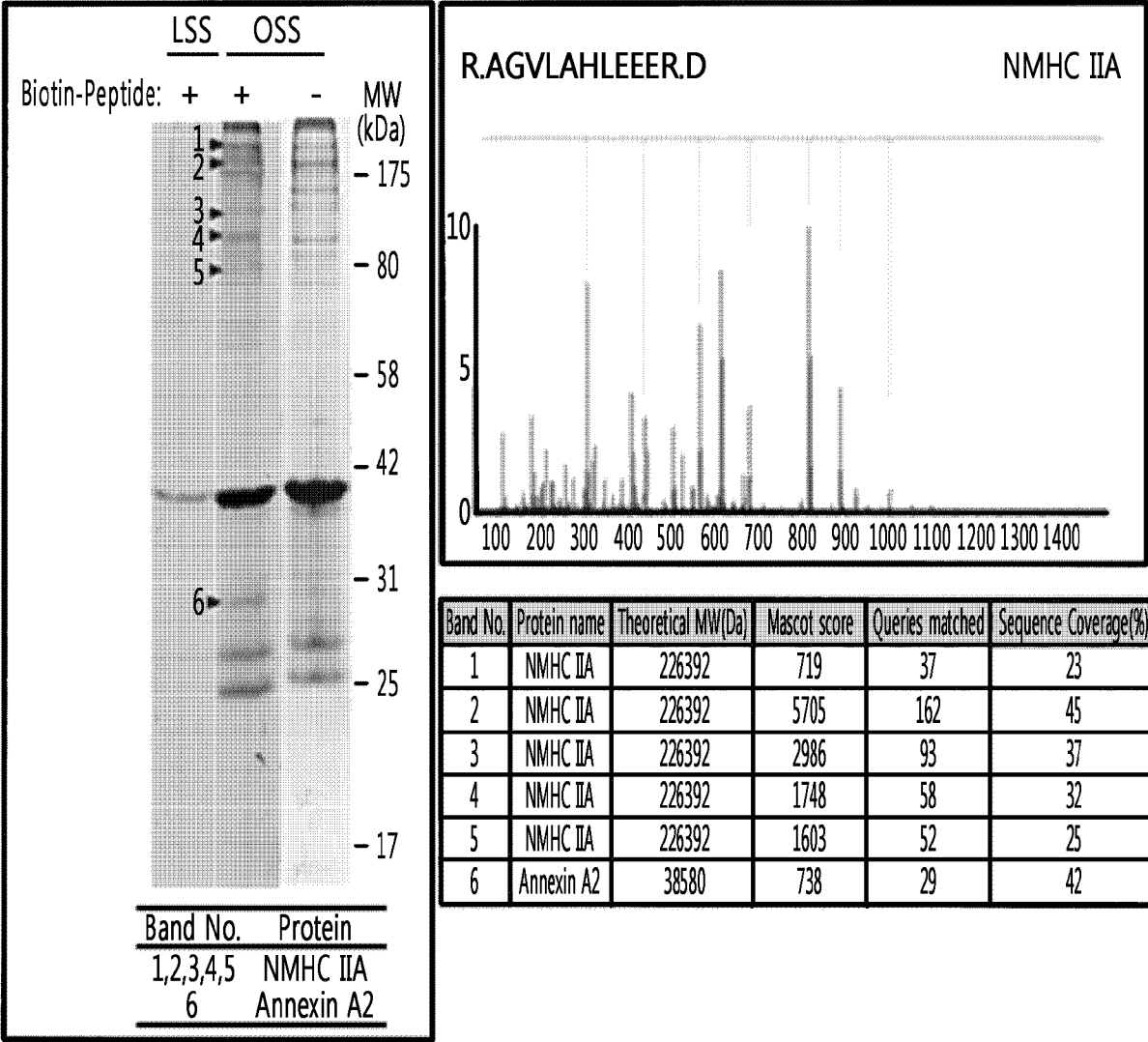
[도9a]



[도9b]

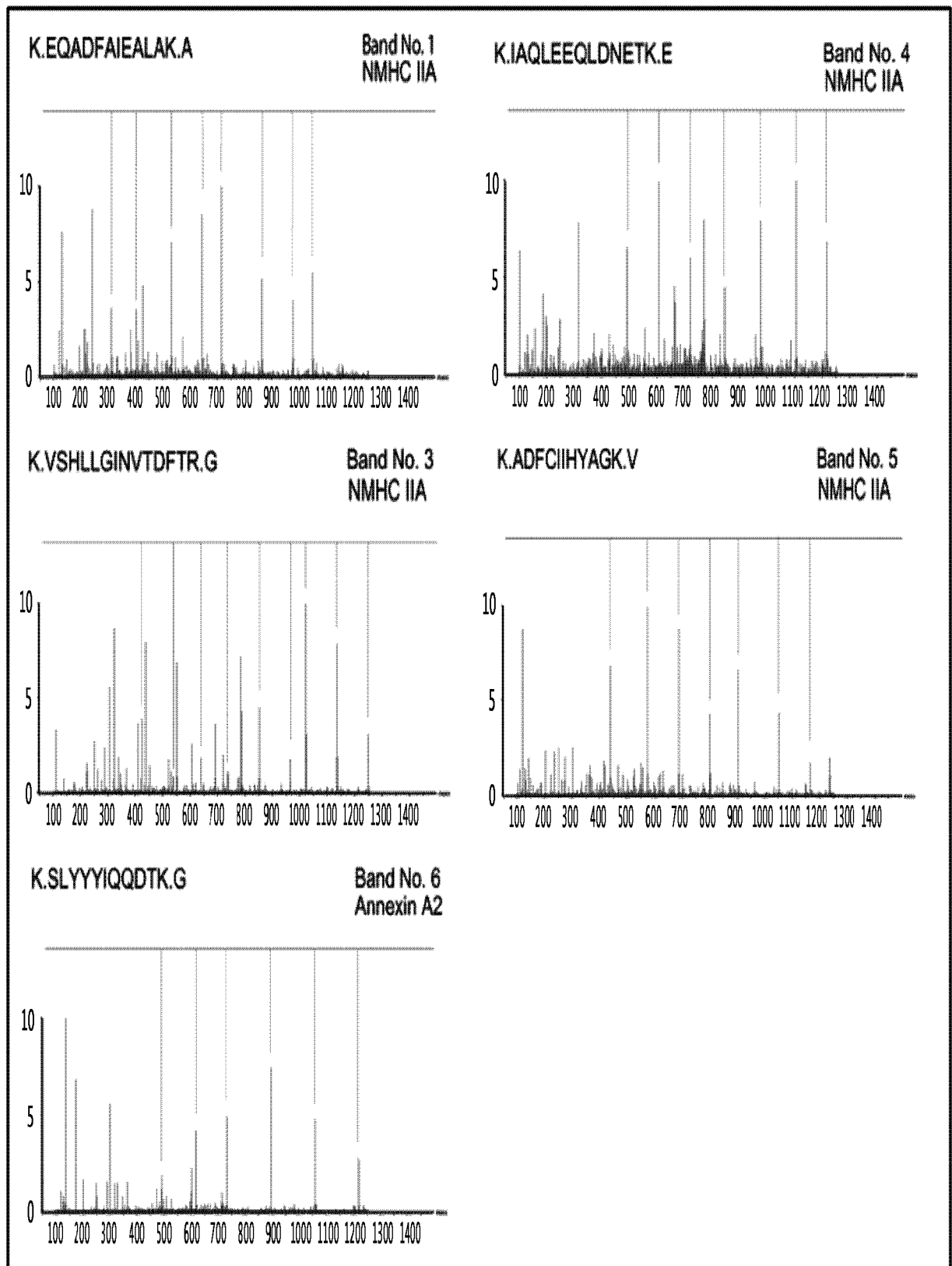


[도 10a]

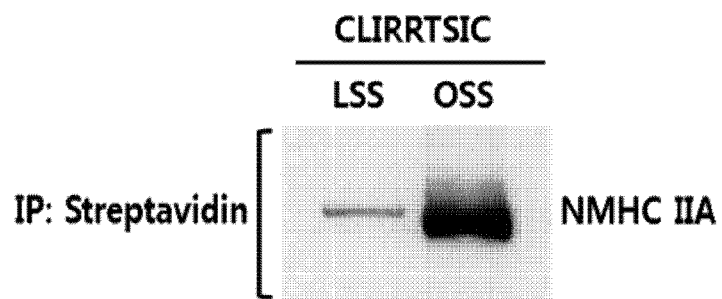


Band No.	Protein name	Theoretical MW(Da)	Mascot score	Queries matched	Sequence Coverage(%)
1	NMHC IIA	226392	719	37	23
2	NMHC IIA	226392	5705	162	45
3	NMHC IIA	226392	2986	93	37
4	NMHC IIA	226392	1748	58	32
5	NMHC IIA	226392	1603	52	25
6	Annexin A2	38580	738	29	42

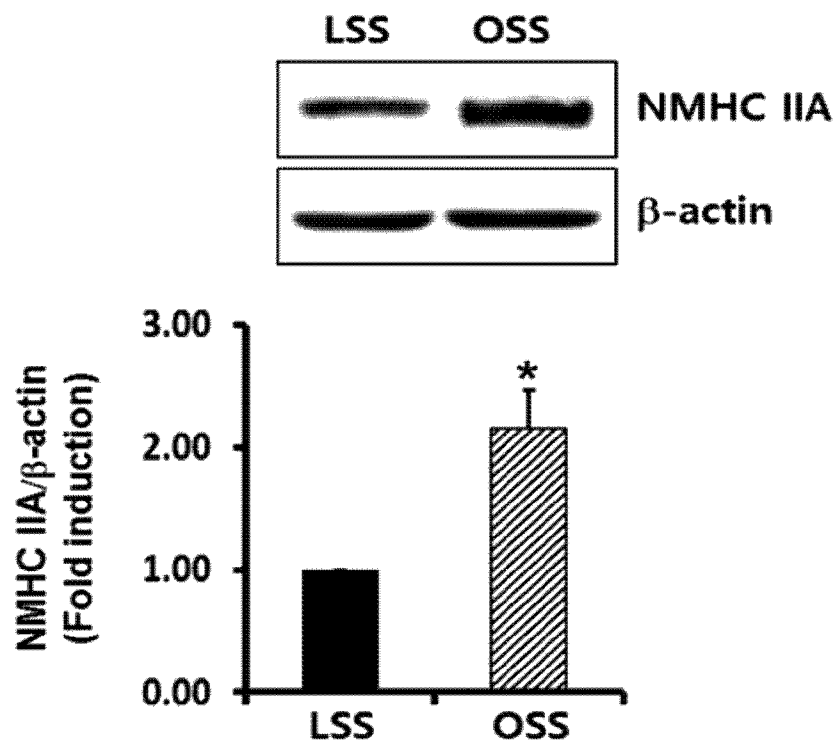
[도 10b]



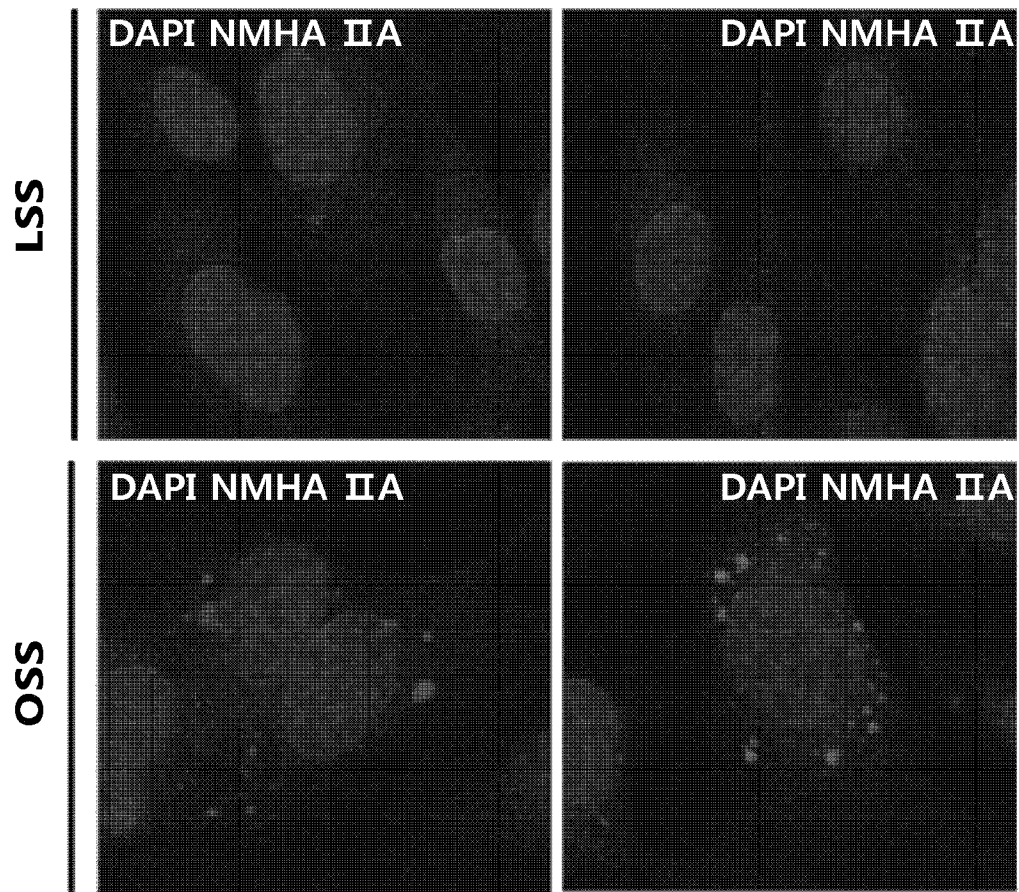
[도10c]



[도11a]



[도11b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006352**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/533(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/53; G01N 33/564; C07K 7/06; C12N 15/11; G01N 33/68; G01N 33/533; A61K 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: MYH9, NMHC-IIA, antibody, aptamer, cardiovascular disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010-006199 A2 (THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 14 January 2010 See abstract; claims 9-20; pages 36-37; figure 1.	1,3-8
Y		2,12-19
A		9-11
Y	NCBI, NCBI Reference Sequence no. NP_002464.1 (15 March 2015) See sequence.	2
Y	KR 10-2015-0028213 A (EWH A UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 13 March 2015 See claims 1, 19-21, 23.	12-19
A	ALTHAUS, Karina et al., "MYH9-related Platelet Disorders", Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2009, Vol. 35, No. 2, pages 189-203 See page 193; figure 3.	1-19
A	CN 101125146 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 20 February 2008 See the entire document.	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 OCTOBER 2016 (05.10.2016)

Date of mailing of the international search report

05 OCTOBER 2016 (05.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006352

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2010-006199 A2	14/01/2010	US 2011-0223617 A1 WO 2010-006199 A3	15/09/2011 01/04/2010
KR 10-2015-0028213 A	13/03/2015	WO 2015-034282 A1	12/03/2015
CN 101125146 A	20/02/2008	CN 101125146 B	04/05/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/533(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/53; G01N 33/564; C07K 7/06; C12N 15/11; G01N 33/68; G01N 33/533; A61K 47/48

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: MYH9, NMHC-IIA, 항체, 앵타머, 심혈관계 질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2010-006199 A2 (THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 2010.01.14 요약; 청구항 제9-20항; 페이지 36-37; 도면 1 참조.	1,3-8
Y A		2,12-19 9-11
Y	NCBI, NCBI Reference Sequence no. NP_002464.1 (2015.03.15.) 서열 참조.	2
Y	KR 10-2015-0028213 A (이화여자대학교 산학협력단) 2015.03.13 청구항 제1, 19-21, 23항 참조.	12-19
A	ALTHAUS, KARINA 등, 'MYH9-related platelet disorders', Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2009, Vol.35, No.2, 페이지 189-203 페이지 193; 도면 3 참조.	1-19
A	CN 101125146 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 2008.02.20 전체 문헌 참조.	1-19

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 10월 05일 (05.10.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 10월 05일 (05.10.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2010-006199 A2	2010/01/14	US 2011-0223617 A1 WO 2010-006199 A3	2011/09/15 2010/04/01
KR 10-2015-0028213 A	2015/03/13	WO 2015-034282 A1	2015/03/12
CN 101125146 A	2008/02/20	CN 101125146 B	2011/05/04