

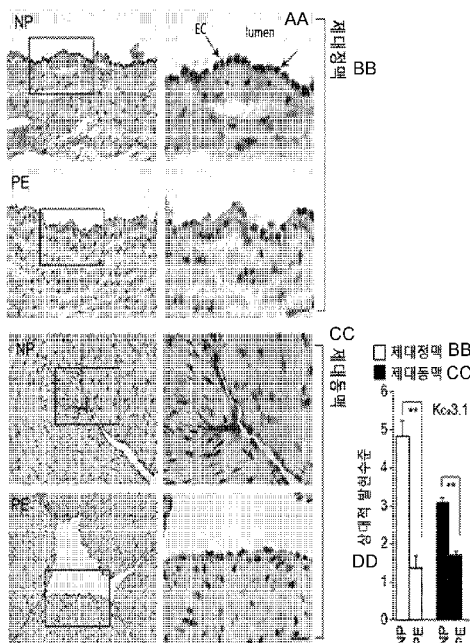


- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/68* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/011223
- (22) 국제출원일: 2016년 10월 7일 (07.10.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0141197 2015년 10월 7일 (07.10.2015) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 서석효 (SUH, Suk Hyo); 10323 경기도 고양시 일산동구 위시터 4로 45, 406동 804호, Gyeonggi-do (KR). 최진규 (CHOI, Shin Kyu); 06978 서울시 동작구 상도로 55길 47 201동 603호, Seoul (KR). 김지애 (KIM, Ji Ae); 07609 서울시 강서구 양천로 14길 37, 101동 307호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, 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, DJ, 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, KW, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR VASCULAR ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION DIAGNOSIS, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 혈관내피세포 기능 부전 진단용 조성물 및 이의 용도



AA ... Lumen
BB ... Umbilical vein
CC ... Umbilical artery
DD ... Relative expression levels

(57) Abstract: The present invention relates to a composition, kit, and method for vascular endothelial cell dysfunction diagnosis and a method for screening a substance which induces the dysfunction or improved function of vascular endothelial cells. The method provided according to the present invention allows, when used, for the diagnosis of vascular endothelial cell dysfunction by using the expression levels of marker proteins, such as Rab5C, clathrin, caveolin-1, and early endosome antigen 1 (EEA1), and thus can be widely used for early diagnosis of various vascular diseases triggered by vascular endothelial cell dysfunction.

(57) 요약서: 본 발명은 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물, 키트, 혈관내피세포 기능 부전의 진단방법 및 혈관내피세포의 기능 부전 또는 개선 유도 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 방법을 이용하면, Rab5C, 클라트린(clathrin), 카베올린-1(caveolin-1), EEA1(Early Endosome Antigen 1) 등의 마커 단백질의 발현수준을 이용하여 혈관내피세포의 기능부전 여부를 진단할 수 있으므로, 혈관내피세포의 기능부전에 의해 발병되는 다양한 혈관 질환의 조기진단에 널리 활용될 수 있을 것이다.



(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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 혈관내피세포 기능 부전 진단용 조성물 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 혈관내피세포 기능 부전 진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물, 키트, 혈관내피세포 기능 부전의 진단방법 및 혈관내피세포의 기능 부전 또는 개선 유도 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 세포의 기능은 이온 채널에 의해 매우 민감하게 조절된다. 이온 채널은 세포막을 통한 이온의 흐름을 조절하여 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 채널이 있다. 혈관내피세포에서 이 세 채널은 각각 다른 역할을 하는데, KCa3.1 채널은 혈관내피세포 과분극을 유발하여 혈관 수축성을 조절하며(Tharp DL, Bowles DK, 2009, Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 7, 1-11), 새로운 혈관형성에 중요한 역할을 한다. 혈관내피세포 이외의 세포들에서도 이들 채널들은 세포 기능 조절에 중요한 역할을 한다. 또한, KCa3.1 채널은 적혈구, 섬유아세포, 증식하는 혈관평활근 세포, 그리고 면역세포(T 세포와 B 세포) 등에 분포하고 있으며 이들 세포의 기능을 조절하는데 기여한다.
- [4] 상기 혈관내피세포는 혈관 구경과 수축성 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 혈관내피세포는 NO를 분비하거나 내피세포 의존성 과분극을 유발하여 혈관평활근을 이완시키고 혈관 수축성을 조절한다. KCa3.1 채널이 세포내 칼슘에 의해 활성화되면 혈관내피세포는 과분극되며, 혈관내피세포 과분극은 세포 내 Ca^{2+} 유입을 유발시켜 NO 생성을 촉진한다. 그러므로, KCa3.1 채널은 혈관내피세포 과분극뿐만 아니라 NO 분비를 유발하여 혈관평활근 수축성을 조절한다. 또한, 고혈압과 같은 혈관질환에서 NO에 의한 혈관이완이 감소하면 과분극에 의한 이완이 이를 보완하여 혈관평활근 수축성 증가를 억제한다.
- [5] 이러한 혈관내피세포의 기능이 정상적으로 수행되지 못하면, 이로 인하여 다양한 혈관 질환들이 발병될 수 있다. 예를 들어, 혈관내피세포의 기능에 중요한 역할을 하는 KCa3.1 채널이 정상적으로 작동하지 않으면 고혈압과 같은 혈관질환을 유발할 수 있다고 알려져 있는데, 실제로 KCa3.1 채널 결핍 마우스(KCa3.1 채널 knockout mice)에서 고혈압이 발생할 수 있고, KCa3.1 채널의 발현 감소는 임신성 고혈압 등의 질환을 유발한다고 알려져 있다.

- [6] 혈관내피세포는 혈장과 직접 접촉하므로 혈장 속 혈관질환유발물질에 의해 혈관내피세포 기능 부전이 발생한다. 이러한 혈관질환 유발물질로는 산화 저밀도 지질 단백질(oxidized low density-lipoprotein, oxLDL), 고혈당 등과 이들 물질에 의해 발생하는 수퍼옥사이드와 같은 ROS 등이 있다. 예를 들어, 임신성 고혈압과 동맥경화증의 경우, 혈중 산화 저밀도 지질 단백질에 의해, 당뇨병성 혈관질환의 경우 고혈당에 의해 혈관내피세포 기능 부전이 발생한다. 그 결과 혈관 수축성 증가 및 혈관 구경 감소가 유발하고, 혈관 저항 증가에 의해 혈류가 방해받아 조직으로의 가스 및 영양공급이 원활하게 이루어지지 못해 혈관질환을 유발하게 된다. 이와 같은 혈관질환 유발물질들은 혈관내피세포 KCa3.1 채널의 발현을 감소시켜 혈관내피세포 기능 부전을 유발한다고 알려져 있다(Choi S et al, 2013a, Free Radic Biol Med, 57, 10-21).
- [7] 혈관질환은 혈관내피세포 기능 이상에 의해 혈관의 구조적 변화 곧 혈관구경 감소가 유발되어야 발생하므로, 혈관내피세포 기능 이상은 혈관의 구조적 변화에 선행하여 일어난다. 그러므로 혈관내피세포 기능 부전 진단은 혈관질환 조기 진단(발병 가능성을 혈관의 구조적 변화가 오기 전에 진단), 경과 및 예후 진단, 치료 효과 진단 등에 활용될 수 있다.
- [8] 현재, 임신성 고혈압에서는 조기 진단 목적으로 위험인자들(나이 등), 도플러를 이용하여 자궁 동맥 혈류 측정, 혈장에서 임신성 고혈압 유발물질(sFlt-1, endoglin) 측정 등과 같은 다양한 방법이 사용되고 있으나, 임신 초기에는 발병 가능성을 정확하게 진단할 수 있는 방법이 개발되지 않았다. 이에 따라, 동맥경화증, 당뇨병 등의 경우, 혈관 조영술, CT angiography, Doppler Sono 등의 방법으로 혈류와 혈관 구경을 측정하여 혈관질환의 진행 정도를 진단하고 있으나, 상기 방법들을 사용하면, 질병이 진행되어 혈관의 구조적 변화(혈관 구경변화)가 유발된 후에야 진단이 가능하다는 문제점이 있다.
- [9] 또한, 당뇨병에서는 대부분 혈관질환 합병증이 발생하며 환자의 50-80 %가 심혈관질환으로 사망함에도 불구하고 당뇨병 환자에서 혈관질환 합병증의 진행 정도를 정확하게 예측할 수 있는 방법이 아직도 개발되지 않고 있는 실정이다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 혈관질환 환자들을 보다 효과적으로 관리하고 치료하기 위해, 보다 효과적으로 혈관내피세포 기능 부전을 진단할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 피검자의 혈장 또는 혈청을 처리한 혈관내피세포 또는 피검자의 적혈구에서 Rab5C, 클라트린(clathrin), 카베올린(caveolin-1), EEA1(Early Endosome Antigen 1) 및 KCa3.1 채널의 발현 수준을 측정할 경우, 혈관내피세포의 기능 부전을 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 하나의 목적은, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은, 혈관내피세포 기능 부전의 진단방법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은, 혈관내피세포의 기능 개선 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은, 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 발명에서 제공하는 방법을 이용하면, Rab5C, 클라트린(clathrin), 카베올린-1(caveolin-1), EEA1(Early Endosome Antigen 1) 등의 마커 단백질의 발현수준을 이용하여 혈관내피세포의 기능부전 여부를 진단할 수 있으므로, 혈관내피세포의 기능부전에 의해 발병되는 다양한 혈관 질환의 조기진단에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 제대혈관 혈관내피세포에서의 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 비교한 결과를 나타낸다. **는 대조군(정상 산모 조직 또는 혈관내피세포)와 비교하여 $P < 0.01$ 를 의미한다(NP: 정상 산모, PE: 임신성 고혈압 환자, EC: 혈관내피세포).
- [22] 도 1a는 정상 산모와 임신성 고혈압 환자 제대정맥(왼쪽)과 제대동맥(오른쪽)에서 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 면역혈관염색법으로 비교한 현미경 사진 및 그래프이다.
- [23] 도 1b는 정상 산모와 임신성 고혈압 환자 제대정맥 조직에서 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 비교 또는 측정한 사진 및 그래프이다.
- [24] 도 1c는 배양한 제대정맥 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 비교 또는 측정한 사진 및 그래프이다.
- [25] 도 1d는 정상 산모와 임신성 고혈압 환자 제대정맥에서 배양한 혈관내피세포에서 KCa3.1 전류를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [26]
- [27] 도 2는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청이 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸다(NP: 정상 산모, PE: 임신성 고혈압 환자).

- [28] 도 2a는 임신성 환자 혈장 또는 혈청이 혈관내피세포 KCa3.1 채널의 발현 수준에 미치는 영향과 이에 대한 항산화제의 효과를 나타낸 사진 및 그래프이다.
- [29] 도 2b는 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청에서 NOX2(NADPH oxidase 2)의 단백질 발현 수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.
- [30] 도 2c는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청에 의한 NOX2의 단백질 발현 수준 증가와 KCa3.1 채널의 단백질 발현 수준 감소에 미치는 항-LOX1 항체(anti-LOX1 antibody)의 영향을 나타내는 사진 및 그래프이다(LOX1: lectin-like ox-LDL receptor-1, tempol 및 tiron: 항산화제). 이때, **는 대조군(정상산모 혈장 또는 혈청을 처리한 혈관내피세포)과 비교하여 $P < 0.01$ 를 의미하고, #는 LOX1 항체를 처리하지 않은 상태에서 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청을 처리한 군과 비교하여 $P < 0.05$ 를 의미한다.
- [31]
- [32] 도 3a는 혈관질환 유발물질인 산화 저밀도 지질 단백질(oxidized low density-lipoprotein, oxLDL)이 혈관내피세포 KCa3.1 채널단백질 발현 수준에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 이때, *와 **는 대조군(혈관질환 유발물질을 처리하지 않은 혈관내피세포)과 비교하여 각각 $P < 0.05$ 와 $P < 0.01$ 를 의미한다.
- [33] 도 3b는 혈관질환 유발물질인 고혈당이 혈관내피세포 KCa3.1 채널단백질 발현 수준에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 이때, *와 **는 대조군(혈관질환 유발물질을 처리하지 않은 혈관내피세포)과 비교하여 각각 $P < 0.05$ 와 $P < 0.01$ 를 의미한다.
- [34]
- [35] 도 4는 ROS가 혈관내피세포 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 그래프 및 사진이다. 상기 도 4는 수퍼 옥사이드 도너인 잔틴 및 잔틴 옥시데이즈 혼합물(Xantine 및 Xantine oxidase mixture, X/XO), 및 항산화제(tempol, tiron)의 처리가 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준에 미치는 영향을 나타낸다. 이때, **는 대조군(X/XO 또는 항산화제를 처리하지 않은 혈관내피세포)과 비교하여 $P < 0.01$ 를, #와 ##는 X/XO (100 μ M/100 mU/ml)를 처리한 혈관내피세포와 비교하여 각각 $P < 0.05$ 와 $P < 0.01$ 를 의미한다.
- [36]
- [37] 도 5는 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널 단백질의 분해에 caveolin-1이 관여함을 확인한 결과를 나타낸다(NP: 정상 산모, PE: 임신성 고혈압 환자).
- [38] 도 5a는 혈관질환 유발물질인 LPC가 혈관내피세포 caveolin-1의 단백질 발현 수준에 미치는 영향과 이에 대한 항산화제의 효과를 나타내는 사진 및 그래프이다.
- [39] 도 5b는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청이 혈관내피세포 caveolin-1 단백질의 발현 수준에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- [40] 도 5c는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청에 의한 혈관내피세포 KCa3.1 채널

발현 수준 감소가 카베올린-1에 의해 유발됨을 나타내는 사진이다. 이때, **는 대조군과 비교하여 $P < 0.01$ 를 의미한다.

[41]

[42] 도 6은 혈관질환 유발물질 처리에 따른 clathrin, EEA1(Early Endosome Antigen 1)의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸다.

[43] 도 6a는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청을 처리한 혈관내피세포의 세포막에서 KCa3.1 채널, clathrin의 단백질 발현 수준을 관찰한 결과를 나타내는 사진이다.

[44] 도 6b는 LPC를 처리한 혈관내피세포의 세포막에서 KCa3.1 채널, clathrin의 단백질 발현 수준을 관찰한 결과를 나타내는 사진이다.

[45] 도 6c는 X/X0의 농도별 처리에 따른 EEA1 및 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 비교한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[46]

[47] 도 7a는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청을 10 %, 25 %, 100 % 농도로 희석하여 노출한 혈관내피세포에서 Rab5C 단백질의 발현 수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

[48] 도 7b는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청을 10 %, 25 %, 100 % 농도로 희석하여 노출한 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

[49] 도 7c는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청을 10 %, 25 %, 100 % 농도로 희석하여 노출한 혈관내피세포에서 EEA1 단백질의 발현 수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

[50]

[51] 도 8은 정상 산모와 임신성 고혈압 산모로부터 채취한 혈액에서 분리한 적혈구를 이용하여 KCa3.1 채널 및 Rab5C 단백질의 발현 수준을 측정한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다(NP: 정상 산모, PE: 임신성 고혈압 환자).

[52]

[53] 도 9는 혈관내피세포에서 TBHP 처리가 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[54]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

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

[56]

[57] 일 양태에서, 상기 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물은 KCa3.1 채널으로 이루어진 군과 카베올린-1(caveolin-1), Rab5C, 클라트린(clathrin), 및 EEA1(Early Endosome Antigen 1)으로 이루어진 군에서 각각 선택되는 하나

이상의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물일 수 있다.

[58]

[59] 혈관내피세포 기능 부전이 혈관질환을 유발하지만 인체에서 혈관내피세포 기능 부전을 직접 측정할 수 있는 방법이 없다. 따라서, 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, 고혈압 발생 이전에 본 발명의 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.

[60]

[61] 본 발명의 용어 “카베올린-1(caveolin-1)”은 대부분의 세포 타입에서 볼 수 있는 카베올레 플라즈마 막(caveolae plasma membrane)의 주요 구성요소로, Ras-ERK 경로에서 인테그린의 결합에 있어 초기 단계 및 세포주기 진행과 관련이 있다. 혈관내피세포의 기능 부전에 있어서, KCa3.1 채널과 카베올린-1의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.

[62]

상기 카베올린-1의 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 Accession NO. NM_001172897.1, NM_001243064.1, NM_031556.3 또는 NM_001135818.1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[63]

[64] 본 발명의 용어 “Rab5C”는 GTP 가수분해 효소(GTPase)의 하나로 초기 엔도솜(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, Rab5C와의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.

[65]

상기 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 Accession NO. CR541901.1, AB232595.1, NM_001105840.2 또는 NM_001246383.1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[66]

[67] 본 발명의 용어 “클라트린(clathrin)”은 베키클을 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.

[68] 상기 클라트린의 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.

[69]

[70] 본 발명의 용어 “EEA1(Early Endosome Antigen 1)”은 초기 엔도솜에 위치하여, 엔도솜 트래픽킹(endosomal trafficking)에서 중요한 역할을 한다. 혈관내피세포의 기능 부전에 있어서, EEA1의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.

[71] 상기 EEA1의 서열정보는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 등과 같은 공지의 데이터 베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 EEA1은 NCBI GenBank Acession NO. NM_003566.3, NM_001001932.3, NM_001108086.1 또는 XM_522610.5일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[72]

[73] 본 발명의 일 실시예에서는 혈관내피세포에 혈관질환 유발물질들(임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청, oxLDL, LPC, 고혈당 등)을 처리하여 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1의 단백질 발현 수준을 확인한 결과, KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준이 감소하는 반면, 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 및 EEA1의 단백질 발현 수준은 증가함을 확인하였다. 이를 통해 혈관질환 유발물질에 의해 유도되는 혈관내피세포의 기능 부전을 KCa3.1 채널, 카베올린-1, 클라트린, Rab5C 또는 EEA1의 발현 수준을 측정하여 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[74] 본 발명의 다른 일 실시예에서는 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청의 희석 정도에 따라 Rab5C 및 EEA1 단백질의 발현 수준을 확인한 결과, Rab5C 및 EEA1 단백질의 발현 수준은 증가함을 확인하였고, 1/10 정도의 임신성 고혈압 유발 인자만으로도 Rab5C 및 EEA1 단백질 발현 수준이 증가함을 확인하였다. 이처럼 적은 양으로도 상기 마커의 발현 수준을 측정하여 혈관내피세포의 기능 부전을 진단할 수 있으므로, 혈관질환 발명 가능성을 예측 또는 조기 진단할 수 있다.

[75]

[76] 본 발명에서 상기 개체는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 구체적으로 인간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[77]

[78] 본 발명의 용어 “혈관내피세포”는 혈관의 구조를 형성하는 주요 세포의 하나를

의미하는데, 주로 혈관 확장과 수축, 혈관 평활근의 증식과 이동, 혈전생성과 용해 등 혈관항상성을 유지하는 역할을 수행한다.

[79] 본 발명의 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 증상을 의미한다. 상기 혈관내피세포의 기능 부전은 혈관벽 손상과 혈관 수축성 증가를 초래하며, 이를 통해 혈관질환이 발생하게 된다.

[80] 본 발명에서 상기 혈관내피세포의 기능 부전에 의해 유발되는 혈관 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 고혈압, 동맥경화증, 당뇨병성 혈관질환 또는 이들의 조합일 수 있고, 다른 예로서, 임신성 고혈압일 수 있다.

[81] 상기 혈관 질환은 혈관내피세포의 기능 부전에 의해 유발되기 때문에, 혈관내피세포의 기능 부전의 수준에 따라 혈관 질환의 진행상태를 알 수 있고, 상기 혈관 질환을 유발하는 물질에 의하여 상기 혈관내피세포의 기능 부전이 유발될 수도 있다. 또한, 상기 혈관내피세포의 기능 부전은 혈관내피세포의 KCa3.1 채널 발현 수준을 변화시킬 수 있기 때문에, 상기 혈관 질환을 유발하는 물질에 의하여 혈관내피세포의 KCa3.1 채널 발현 수준이 영향을 받을 수도 있다.

[82] 본 발명에 있어서, 상기 혈관질환 유발 물질은 혈관내피세포의 기능 부전을 유발시키거나, 혈관 질환의 발병을 유발시키거나 또는 혈관내피세포의 KCa3.1 채널 발현 수준을 변화시킬 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 산화성 스트레스를 증가시키는 물질이 될 수 있고, 다른 예로서, 산화성 스트레스를 증가시킬 수 있는 산화 저밀도지질단백질(oxidized low-density lipoprotein), 리소포스파티딜콜린 (Lysophosphatidylcholine, LPC), 임신성 고혈압 유발물질(sFlt-1, endoglin), 고혈당, 수퍼 옥사이드 아니온 도너(superoxide anion donor) 등이 될 수 있다.

[83]

[84] 본 발명의 용어 “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 일련의 행위를 의미한다.

[85] 본 발명의 목적상, 상기 진단은 혈관내피세포의 기능 부전 여부를 확인하는 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있으며, 이를 통해 혈관내피세포의 기능 부전으로 인한 혈관질환 발병여부를 조기에 예측할 수 있다.

[86]

[87] 한편, 본 발명의 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물은 KCa3.1 채널 단백질 또는 이의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[88] 본 발명의 용어 “KCa3.1 채널(intermediate conductance calcium-activated potassium channel, subfamily N, member 4)”은 세포 내 칼슘에 의해 활성화되는 헤테로테트라머(heterotetramer) 형태의 전압-비의존성 포타슘 채널을 의미한다. 혈관내피세포의 KCa3.1 채널은 과분극을 유발하여 혈관을 이완시키는 한편, 과분극은 세포 내 Ca^{2+} 유입을 증가시켜 eNOS에 의한 NO 생성을 촉진하여

혈관을 이완시킨다. 상기 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널의 발현이 감소되면, 혈관내피세포 기능 부전이 유발될 수 있기 때문에, KCa3.1 채널 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 분석함으로써, 상기 혈관내피세포의 기능 부전이 유발되었는지의 여부를 확인할 수 있다.

[89] 본 발명의 일 실시예에서, 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 제대정맥과 제대동맥조직에서 KCa3.1 채널 단백질 발현 정도를 분석한 결과, 임신성 고혈압 환자에서 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준이 감소하는 것을 확인하였다.

[90] 본 발명의 다른 일 실시예에서, 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청, oxLDL, LPC 및 고혈당이 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준에 미치는 효과를 분석한 결과, 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청, oxLDL, LPC 및 고혈당에 의해 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준이 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 임신성 고혈압, 당뇨병의 혈관질환 합병증 등에서 혈장 또는 혈청 속 물질인 oxLDL, 고혈당 등이 혈관내피세포의 KCa3.1 채널 발현을 비정상적으로 감소하여 혈관내피세포 기능부전이 유도된다는 것을 알 수 있었다.

[91] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 혈관내피세포에서 산화성 스트레스가 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준에 미치는 효과를 분석한 결과, 산화제 처리를 통해 KCa3.1 채널 단백질 발현이 감소함을 확인하였으며, 항산화제에 의해 회복되는 것을 확인하였다. 이를 통해 산화성 스트레스에 의해 혈관내피세포의 기능 부전이 야기되며, KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 측정하여 산화성 스트레스 수준을 측정할 수 있음을 알 수 있었다.

[92]

[93] 한편, 여러 단계로 희석한 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청에 노출된 정상 혈관내피세포 (HUVECs)에서 KCa3.1 채널 단백질의 발현을 측정한 결과, 희석 정도에 따라 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준이 감소하며 1/10 정도로 희석해도 발현 수준 감소를 확인할 수 있으므로, 상기 KCa3.1 채널의 발현 수준을 측정하면, 혈관질환 발병 가능성을 예측하거나 조기 진단할 수 있음을 확인하였다.

[94]

[95] 본 발명의 용어 "mRNA 수준 측정"이란 혈관내피세포의 기능 부전을 진단하기 위해 분리된 세포에서 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 유전자들의 발현 정도를 확인하는 방법의 하나로써, mRNA의 양을 정량분석하는 방법을 의미한다. 상기 mRNA 수준을 측정하기 위한 구체적인 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 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 등을 사용할 수 있다.

[96] 상기 mRNA 수준을 측정하기 위하여 사용되는 제제는 구체적으로 프라이머

쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드이며, 상기 유전자들의 핵산 정보가 GeneBank 등에 알려져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 디자인할 수 있다.

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

[98]

[99] 본 발명의 용어 "프라이머 쌍"은 본 발명에서 제공하는 KCa3.1 채널, Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1을 코딩하는 유전자 서열을 인지하여 증폭시킬 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 각 유전자에 결합할 수 있는 정방향 및 역방향의 프라이머로 이루어진 모든 조합의 프라이머 쌍이 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 각 유전자에 대하여 특이성 및 민감성을 갖고 결합할 수 있는 프라이머 쌍이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머는 그의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열로 구성되어, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 높은 특이성을 갖는 프라이머 쌍 일 수 있다.

[100]

[101] 본 발명의 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. 상기 프로브의 구성물질은 상기 표적물질과 특이적으로 결합할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA, DNA 등이 될 수 있고, 다른 예로서, cDNA, 게놈 DNA 등과 같은 DNA; 게놈 RNA, mRNA 등과 같은 RNA; 및, 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등과 같은 단백질이 될 수 있다.

[102]

[103] 본 발명의 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 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 가지 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 않도록 하는 것이 바람직하다.

[104]

[105] 본 발명의 용어 "단백질 수준 측정"이란 혈관내피세포의 기능 부전 진단을 위해 분리된 세포에서 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 마커 단백질인 KCa3.1 채널, Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 의미한다.

[106] 상기 단백질 수준을 측정하는 방법은 본 발명에서 제공하는 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 마커 단백질인 KCa3.1 채널, Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1의 발현수준을 측정할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 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 immunosorbent assay) 등이 될 수 있다.

[107] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 수준을 측정하는 방법은 혈관내피세포의 기능 부전을 진단하기 위하여, 상기 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 마커 단백질인 KCa3.1 채널, Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 방법으로 해석될 수 있다.

[108]

[109] 본 발명의 용어 "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다.

[110] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 마커 단백질인 KCa3.1 채널, Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[111] 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 등을 모두 포함할 수 있고, 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하는데, 일 예로서, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등을 들 수 있다.

[112]

[113] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물을 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트를 제공한다.

[114]

[115] 본 발명에서 제공하는 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트, MRM(Multiple reaction monitoring) 키트 등이 될 수 있다.

[116]

[117] 상기 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 추가로 포함할 수 있다.

[118] 일 예로서, 상기 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 bp의 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), 멸균수등을 포함할 수 있다.

[119] 다른 예로서, 상기 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 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[120] 또 다른 예로서, 상기 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 KCa3.1 채널, Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 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.

[121] 또 다른 예로서, 상기 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.

- [122] 또 다른 예로서, 상기 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.

[123]

- [124] 또 다른 양태로서, 본 발명은 혈관내피세포의 기능 부전을 진단하는 방법을 제공한다.

[125]

- [126] 상기 Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 KCa3.1 채널은 혈관내피세포의 기능 부전을 가지는 개체에서 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 상기 발현 수준이 변화하면 혈관내피세포의 기능 부전을 진단할 수 있고, 이를 통해 혈관질환의 발병여부를 조기 진단하거나 또는 발병된 혈관질환의 진행상태를 진단할 수 있다.

[127]

- [128] 하나의 예시로서, 본 발명의 혈관내피세포의 기능 부전 진단방법은 (a)

혈관내피세포의 기능 부전이 의심되는 개체의 생물학적 시료에서 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 수준(i)을 정상 대조군 시료로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함한다.

[129]

[130] 상기 방법에 있어서, 단백질 또는 mRNA 수준 측정에 대하여는 상기에서 정의한 바와 동일하다.

[131]

[132] 본 발명의 용어 "생물학적 시료"는 혈관내피세포의 기능 부전 의심 개체의 혈관내피세포 기능 부전 여부를 진단하기 위하여 상기 개체로부터 수집한 시료를 의미하는데, 혈관내피세포의 기능 부전을 확인할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 전혈, 혈장, 혈청, 이들의 분획 또는 이들에 함유된 세포, 적혈구 등이 될 수 있다.

[133]

[134] 아울러, 상기 방법은 상기 (a)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[135]

또한, 상기 방법은 상기 (a)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 (i)/(ii)의 식으로 계산된 비율을, 정상 대조군 시료로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[136]

[137] 상기 방법에 있어서, 혈관내피세포의 기능 부전이 의심되는 개체의 생물학적 시료에서 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1의 단백질 또는 mRNA 수준이 정상 대조군 시료로부터 측정한 것보다 상대적으로 높은 수준을 나타내거나 또는 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준이 정상 대조군 시료로부터 측정한 것보다 상대적으로 낮은 수준을 나타낼 경우에는, 상기 개체에서 혈관내피세포의 기능 부전이 나타난 것으로 판정할 수 있다.

[138]

특히, 상기 개체로부터 산출된 (i)/(ii)의 비율이 정상 대조군 시료로부터 산출된 것보다 상대적으로 높은 수준을 나타내는 경우, 상기 개체에서 혈관내피세포의 기능 부전이 나타난 것으로 판정할 수 있다.

[139]

[140] 본 발명의 일 실시예에서, 적혈구에서 KCa3.1 채널과 Rab5C 단백질의 발현 수준을 확인한 결과, KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준은 감소하고 Rab5C 단백질의 발현 수준은 증가함을 확인하였다. 이를 통해 KCa3.1 채널 단백질 및 Rab5C 단백질의 발현 수준을 적혈구에서 측정하여 혈관내피세포 기능 부전을 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[141]

[142] 다른 예시로서, 본 발명의 혈관내피세포의 기능 부전 진단방법은 (a) 혈관내피세포의 기능 부전이 의심되는 개체의 생물학적 시료를 정상

혈관내피세포에 처리하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 생물학적 시료가 처리된 혈관내피세포에서 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 수준(i)을 상기 생물학적 시료가 처리되지 않은 정상 혈관내피세포로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함한다.

[143]

[144] 상기 방법에 있어서, 단백질 또는 mRNA 수준 측정에 대하여는 상기에서 정의한 바와 동일하다.

[145]

[146] 아울러, 상기 방법은 상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[147]

또한, 상기 방법은 상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 (i)/(ii)의 식으로 계산된 비율을, 생물학적 시료가 처리되지 않은 정상 혈관내피세포로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[148]

[149] 상기 방법에 있어서, 혈관내피세포의 기능 부전이 의심되는 개체의 생물학적 시료가 처리된 혈관내피세포에서 측정된 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1의 단백질 또는 mRNA 수준이, 상기 생물학적 시료가 처리되지 않은 정상 혈관내피세포로부터 측정한 것보다 상대적으로 높은 수준을 나타내거나 또는 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준이 상기 생물학적 시료가 처리되지 않은 정상 혈관내피세포로부터 측정한 것보다 상대적으로 낮은 수준을 나타낼 경우에는, 상기 개체에서 혈관내피세포의 기능 부전이 나타난 것으로 판정할 수 있다.

[150]

특히, 상기 개체의 생물학적 시료가 처리된 혈관내피세포에서 산출된 (i)/(ii)의 비율이, 상기 생물학적 시료가 처리되지 않은 정상 혈관내피세포로부터 산출된 것보다 상대적으로 높은 수준을 나타내는 경우, 상기 개체에서 혈관내피세포의 기능 부전이 나타난 것으로 판정할 수 있다.

[151]

[152] 또 다른 양태로서, 본 발명은 혈관내피세포의 기능 개선 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[153]

[154] 상술한 바와 같이, 혈관내피세포의 기능 부전이 발생되면, 상기 Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 KCa3.1 채널의 발현수준이 변화되므로, 이로부터 Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 KCa3.1 채널의 변화된 발현수준이 정상 수준으로 회복되는 경우에는 혈관내피세포의 기능 부전이 해소되는 것으로 예측할 수 있다.

[155]

따라서, 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 예측되는

후보물질을 기능 부전이 발생된 혈관내피세포에 처리하고, 상기 후보물질이 처리된 혈관내피세포에서 발현되는 혈관내피세포의 기능 부전 마커인 Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 KCa3.1 채널의 발현수준을 측정한 다음, 측정된 각 마커의 발현수준이 정상 수준으로 회복되는지의 여부를 확인함으로써, 상기 후보물질이 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있는지의 여부를 판정할 수 있다.

[156]

[157] 구체적으로, 본 발명의 혈관내피세포의 기능 개선 유도 물질의 스크리닝 방법은 (a) 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 분리된 세포에 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질을 처리한 세포 내 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 마커의 수준과 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 세포에서 측정된 마커의 수준을 비교하는 단계를 포함한다.

[158]

[159] 본 발명에 있어서, 상기 후보물질은 혈관내피세포의 기능 부전을 조절할 수 있는 물질을 의미하는데, 일 예로서, 기능 부전이 발생된 혈관내피세포를 정상 상태로 회복시키거나, 또는 상기 혈관내피세포의 기능 부전을 완화, 개선 또는 치료할 수 있는 효과를 나타내거나 또는 유도할 수 있을 것으로 예상되는 물질이 될 수 있고, 다른 예로서, 혈관내피세포로부터 기능 부전을 발생시키거나 또는 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 물질이 될 수 있다.

[160] 상기 후보물질은 혈관내피세포의 기능 부전을 조절하는 효과를 나타낼 것으로 예상되는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 천연 산물(natural product), 합성 화합물 등이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기분자(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등이 될 수 있다.

[161]

[162] 본 발명에 있어서, 상기 분리된 세포는 상기 후보물질의 혈관내피세포 기능 개선을 유도할 수 있는지의 여부를 확인하기 위한 표적으로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 혈관내피세포 기능 부전이 유발된 개체로부터 분리된 세포가 될 수 있고, 다른 예로서, 혈관내피세포 기능 부전이 유발된 개체의 혈액 또는 혈관에서 분리된 세포가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 혈관내피세포 기능 부전이 유발된 개체의 혈액에서 분리된 적혈구 또는 상기 개체의 혈관에서 분리된 혈관내피세포가 될 수 있다.

[163]

[164] 아울러, 상기 방법은 상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA

수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [165] 또한, 상기 방법은 상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 (i)/(ii)의 식으로 계산된 비율을, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[166]

- [167] 상기 방법에 있어서, 후보물질이 처리된 세포에서 측정된 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1의 단백질 또는 mRNA 수준이, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 측정된 것보다 상대적으로 낮은 수준을 나타내거나 또는 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준이 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 측정된 것보다 상대적으로 높은 수준을 나타낼 경우에는, 상기 후보물질이 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 판정할 수 있다.

- [168] 특히, 상기 후보물질이 처리된 세포에서 산출된 (i)/(ii)의 비율이, 상기 후보물질이 처리되지 않은 세포로부터 산출된 것보다 상대적으로 낮은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보물질이 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 판정할 수 있다.

[169]

- [170] 본 발명의 일 실시예에서는 혈관내피세포에 혈관 기능 개선 유도 물질인 TBHP를 처리하였을 때, KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준은 농도에 유의하게 증가함을 확인하였다. 이는 KCa3.1 채널 발현 수준의 증가가 혈관내피세포 기능을 개선할 수 있음이 알려져 있으므로(Chadha PS et al, 2010, J Pharmacol Exp Ther, 335(2), 284-293), 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질을 처리한 후 KCa3.1 채널의 단백질 발현 수준을 측정하여, 상기 후보 물질이 혈관내피세포 기능 개선을 유도할 수 있는지 여부를 판단할 수 있음을 시사하는 것이다.

[171]

- [172] 또 다른 양태로서, 본 발명은 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[173]

- [174] 상술한 바와 같이, 혈관내피세포의 기능 부전이 발생되면, 상기 Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 KCa3.1 채널의 발현수준이 변화되므로, 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 예측되는 후보물질을 혈관내피세포에 처리하고, 상기 후보물질이 처리된 혈관내피세포에서 발현되는 혈관내피세포의 기능 부전 마커인 Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 KCa3.1 채널의 발현수준을 측정한 다음, 측정된 각 마커의 발현수준이 변화되는지의 여부를 확인함으로써, 상기 후보물질이 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있는지의 여부를 판정할 수 있다.

[175]

- [176] 구체적으로, 본 발명의 혈관내피세포의 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 세포 내 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 마커의 수준과 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 세포에서 측정된 마커의 수준을 비교하는 단계를 포함한다.
- [177]
- [178] 본 발명에 있어서, 상기 후보물질 및 분리된 세포는 앞서 정의한 바와 동일하다.
- [179]
- [180] 아울러, 상기 방법은 상기 (b) 단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [181] 또한, 상기 방법은 상기 (b) 단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 (i)/(ii)의 식으로 계산된 비율을, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [182]
- [183] 상기 방법에 있어서, 후보물질이 처리된 세포에서 측정된 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1 또는 EEA1의 단백질 또는 mRNA 수준이, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 측정한 것보다 상대적으로 높은 수준을 나타내거나 또는 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준이 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 측정한 것보다 상대적으로 낮은 수준을 나타낼 경우에는, 상기 후보물질이 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 판정할 수 있다.
- [184] 특히, 상기 후보물질이 처리된 세포에서 산출된 (i)/(ii)의 비율이, 상기 후보물질이 처리되지 않은 세포로부터 산출된 것보다 상대적으로 높은 수준을 나타내는 경우, 상기 후보물질이 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 판정할 수 있다.
- [185]
- [186] 본 발명의 일 실시예에서는 혈관질환 유발물질인 LPC 또는 X/XO를 정상 혈관내피세포에 처리하였을 때, KCa3.1 채널 단백질은 감소하고 카베올린-1, 클라트린, EEA1 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.
- [187] 발명의 실시를 위한 형태

[188]

[189] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[190]

[191] 실시예 1: 혈관질환 환자에서 혈관내피세포 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준 분석

[192]

[193] 혈관질환 환자의 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널 발현 감소가 일어나는지를 규명하기 위해, 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 혈관내피세포에서의 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 비교 분석하였다.

[194]

제대정맥과 제대동맥 조직에서 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준을 조직학적 분석법(도 1의 A), 웨스턴 블롯(도 1의 B)으로 측정하였으며, 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 제대정맥에서 혈관내피세포를 분리 배양하여 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준(도 1의 C)과 KCa3.1 전류의 크기(도 1의 D)를 측정하였다. KCa3.1 채널 단백질 발현 수준을 측정하기 위해, RQVRLKHRKLREQV(서열번호 1)의 아미노산 서열을 가지는 항체를 이용하였다.

[195]

그 결과, 정상 산모와 비교할 때, 임신성 고혈압 환자에서 혈관내피세포 KCa3.1 채널의 단백질 발현 수준이 현저하게 감소하며, KCa3.1 전류 크기도 감소하는 것으로 확인되었다.

[196]

따라서, 임신성 고혈압이 발병하는 경우 혈관내피세포의 KCa3.1 채널의 발현 수준이 비정상적으로 감소하여 혈관내피세포 기능부전이 유도된다는 것을 확인할 수 있었다.

[197]

[198] 실시예 2: 혈관질환 유발물질에 의한 혈관내피세포 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준 분석

[199]

[200] 혈관질환 환자의 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널 발현 감소가 혈장 또는 혈청 속에 있는 혈관질환 유발물질에 의해 일어나는지를 규명하기 위해, 정상 산모와 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청, oxLDL, LPC 그리고 고혈당이 혈관내피세포에서의 KCa3.1 채널의 발현 수준에 미치는 효과를 비교 분석하였다.

[201]

상기 실험 결과, 정상 산모 혈장 또는 혈청에 노출된 혈관내피세포와 비교할 때, 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청에 노출된 혈관내피세포에서 ROS를 생성하는 NOX2 단백질의 발현 수준이 증가하고 KCa3.1 채널의 단백질 발현 수준이 현저하게 감소하는 것으로 확인되었다(도 2의 B). 이러한 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청의 노출된 혈관내피세포에서의 KCa3.1 채널 발현 수준의 감소는 항산화제(도 2의 A) 또는 LOX-1에 대한 항체(도 2의 C)에 의해

억제되었다. 즉, 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청은 LOX-1을 통해 NOX2 단백질의 발현 수준을 증가시켜 ROS 생성을 증가시키고 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준 감소를 유발하였으며, 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청의 주요 혈관질환 유발물질은 oxLDL일 가능성을 알 수 있었다. 그리고, oxLDL, 또는 고혈당에 의해서도 혈관내피세포에서의 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준이 감소하였다(도 3).

[202] 따라서, 임신성 고혈압, 당뇨병의 혈관질환 합병증 등에서 혈장 또는 혈청 속 물질인 oxLDL, 고혈당 등이 혈관내피세포의 KCa3.1 채널 발현 수준을 비정상적으로 감소시켜 혈관내피세포 기능부전이 유도된다는 것을 확인할 수 있었다.

[203]

[204] 실시예 3: 혈관내피세포에서 산화성 스트레스에 따른 KCa 3.1 채널의 발현 수준 분석

[205]

[206] KCa3.1 채널 발현에 미치는 산화성 스트레스의 영향을 규명하기 위해, 정상 산모의 혈관내피세포와 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청에 노출된 혈관내피세포에서 산화제인 수퍼옥사이드 아니온 도너(superoxide anion donors)가 KCa3.1 채널 단백질에 미치는 영향을 웨스턴 블롯을 이용하여 측정하였다. 그리고 각 샘플에서 대조군으로서 α -튜불린(α -tubulin) 또는 β -액틴(β -actin)의 발현 수준을 측정하였다.

[207] 상기 실험 결과, 산화제(X/XO) 처리에 의하여 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준이 감소하였고, 산화제에 의한 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준 감소는 항산화제 처리에 의해 회복되었다(도 4),

[208] 따라서, 상기 결과에 비추어 볼 때, 혈관내피세포에서 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준감소는 산화성 스트레스 정도 특히 수퍼옥사이드 아니온에 의존함을 확인할 수 있었으며, KCa3.1 채널의 발현 수준을 측정하여 혈관내피세포에 가해지는 산화성 스트레스 특히 수퍼옥사이드 아니온의 수준을 알 수 있음을 확인할 수 있었다.

[209] 이를 통해, 혈관질환 유발인자에 의해 발생한 산화성 스트레스에 의해 KCa3.1 채널의 발현 수준이 감소되고, 혈관내피세포의 기능 부전이 야기됨을 알 수 있었다.

[210]

[211] 실시예 4: 혈관질환 유발물질 처리에 따른 혈관내피세포 caveolin-1, clathrin, Rab-5C, EEA1 단백질의 발현 수준 분석

[212]

[213] 정상 혈관내피세포에 혈관질환 유발물질을 처리한 후, 웨스턴 블롯을 이용하여 caveolin-1, clathrin, Rab-5C, EEA1 및 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준을 측정하였다(도 5와 도 6). Caveolin-1, clathrin, Rab5C, EEA1 단백질 발현 수준을

측정하기 위해, 각각 MADELSEKQVYDAHTKEID (서열번호 2), PQLMLTAGPSVAVPPQAPFGYGYTAPPYGGPQPGFGYS (서열번호 3), ASRGATRPNGPNT (서열번호 4), FCAECSAKNALTPSSKKPVR (서열번호 5)의 아미노산 서열을 가지는 항체를 이용하였다.

- [214] 그 결과, LPC 또는 임신성 고혈압 환자 혈장 또는 혈청을 처리하였을 때, caveolin-1 단백질의 발현 수준이 증가하였으며, 면역침강법으로 caveolin-1과 KCa3.1 채널 단백질이 같이 있음을 확인하였다(도 5의 C). 그리고 이러한 혈관질환 유발 물질에 의하여 KCa3.1 채널 단백질이 감소하였으며 동시에 clathrin 및 세포 내 EEA1 단백질 발현 수준은 증가하였다(도 6의 C, 도 7). 한편 세포막 내에서도 혈관질환유발물질에 의해 KCa3.1는 감소하고 clathrin은 증가하였다(그림 6의 A, B).
- [215] 따라서 상기 결과에 비추어 볼 때, 혈관질환 유발물질에 의해 caveolin-1, clathrin, EEA1 단백질 증가를 유발됨을 알 수 있었다.
- [216] 이는 혈관질환 유발물질에 의해 유도되는 혈관내피세포의 기능 부전을 KCa3.1 채널 또는 caveolin-1, clathrin, EEA1의 발현 수준을 측정하여 진단할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [217] 또한, 이는 정상 혈관내피세포에 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리한 후, KCa3.1 채널 또는 caveolin-1, clathrin, EEA1의 단백질 발현 수준을 측정하여 상기 후보 물질이 혈관내피세포 기능 부전을 유도할 수 있는지 여부를 판단할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [218]
- [219] 실시예 5: 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청 희석 정도에 따른 혈관내피세포에서의 KCa3.1 채널, Rab5C, EEA1 단백질 발현 수준 분석
- [220]
- [221] 인간 혈관내피세포에 처리된 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청 희석 정도가 KCa3.1 채널 단백질 및 이의 발현 수준 감소를 유발하는 Rab5C와 EEA1 단백질의 발현 수준에 미치는 영향을 분석하기 위해, 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청을 배양액과 혼합하여 혈장 또는 혈청의 농도가 10, 25, 100 % (희석을 하지 않음) 등으로 한 용액에 배양한 인간 혈관내피세포를 24 시간 동안 노출시킨 후, 웨스턴 블롯을 이용하여 KCa3.1 채널 단백질, small GTPase의 발현 정도를 통해 Rab5C 단백질의 발현 수준, EEA1 단백질의 발현 수준을 측정하였다. 그리고 각 샘플에서 대조구로서 β -액틴 (β -actin)의 발현 수준을 측정하였다.
- [222] 그 결과, 임신성 고혈압 환자의 혈장 또는 혈청에 노출된 혈관내피세포에서 희석 정도에 비례하여 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준은 감소하지만 Rab5C 및 EEA1 단백질 발현 수준은 증가하는 것으로 확인되었다(도 7).
- [223] 따라서, 상기 결과에 비추어 볼 때, 임신성 고혈압이 완전히 발현된 경우와 비교하여 약 1/10 정도의 임신성 고혈압 유발 인자만으로도 Rab5C 및 EEA1

단백질의 발현 수준이 증가하고, 혈관내피세포 KCa3.1 채널 단백질 발현 수준의 감소를 유발함을 확인할 수 있었다.

- [224] 이를 통해, 혈관내피세포의 기능 부전을 유발하는 인자들의 농도가 낮은, 완전히 질환이 발병하기 전 단계에서 KCa3.1 채널, Rab5C, EEA1 단백질의 발현 수준을 측정하여 혈관내피세포의 기능 부전을 진단할 수 있음을 알 수 있는 바, 상기 마커의 발현 수준을 측정하면 혈관질환 발병 가능성을 예측 또는 조기 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[225]

- [226] 실시예 6: 적혈구에서 KCa3.1 채널과 Rab5C의 단백질 발현 수준 분석

[227]

- [228] 혈관내피세포 기능 부전 환자에서 혈관내피세포와 적혈구의 KCa3.1 채널, Rab5C 및 클라트린의 발현 경향이 동일한지 확인하기 위해, 정상 산모와 임신성 고혈압 환자에서 채취한 혈액에서 웨스턴 블롯을 이용하여 KCa3.1 채널, Rab5C 및 클라트린 단백질의 발현 수준을 측정하였다. 그리고 각 샘플에서 대조구로서 β -액틴 (β -actin)의 발현 수준을 측정하였다.

- [229] 그 결과, 대조군(정상 산모의 적혈구)에 비하여 임신성 고혈압 환자 적혈구에서 혈관내피세포와 유사하게 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준은 감소하고 Rab5C 및 클라트린 단백질의 발현 수준은 증가하는 것으로 확인되었다(도 8).

- [230] 따라서, 상기 결과에 비추어 볼 때, 임신성 고혈압 환자에서 혈관내피세포 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준은 적혈구에서 KCa3.1 채널 단백질 또는 Rab5C, 클라트린 등을 측정하여 알 수 있음을 확인할 수 있었다.

[231]

- [232] 실시예 7: TBHP 처리에 따른 혈관내피세포 KCa3.1 채널 단백질의 발현 수준 분석

[233]

- [234] 혈관내피세포에 혈관 기능 개선 유도 물질인 TBHP를 처리한 후, 웨스턴 블롯을 이용하여 KCa3.1 채널의 발현 수준을 측정하였다.

- [235] 그 결과, KCa3.1 채널 발현이 TBHP 처리에 의하여 농도에 유의하게 증가함을 확인하였다(도 9).

- [236] 이는 KCa3.1 채널 발현 수준의 증가가 혈관내피세포 기능을 개선할 수 있음이 알려져 있으므로(Chadha PS et al, 2010, J Pharmacol Exp Ther, 335(2), 284-293), 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질을 혈관내피세포에 처리한 후 KCa3.1 채널의 단백질 발현 수준을 측정하여 상기 후보 물질이 혈관내피세포 기능 개선을 유도할 수 있는지 여부를 판단할 수 있음을 시사하는 것이다.

[237]

- [238] 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 실시예들은 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.

[239]

청구범위

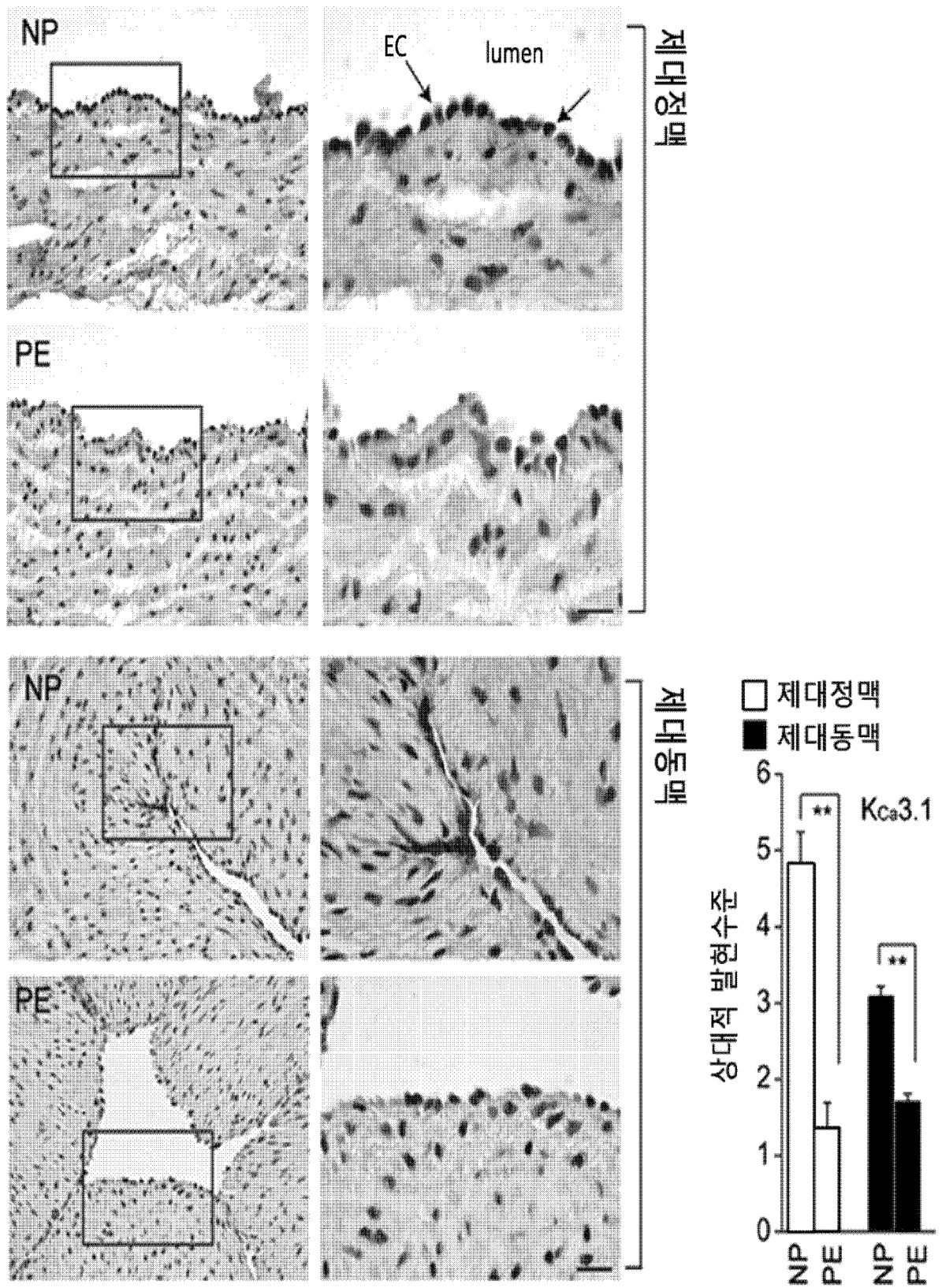
- [청구항 1] (a) 혈관내피세포의 기능 부전이 의심되는 개체의 생물학적 시료에서 (i) Rab5C, 클라트린(clathrin), 카베올린-1(caveolin-1), EEA1(Early Endosome Antigen 1) 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및
(b) 상기 측정된 수준(i)을 정상 대조군 시료로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단방법.
- [청구항 2] (a) 혈관내피세포의 기능 부전이 의심되는 개체의 생물학적 시료를 정상 혈관내피세포에 처리하는 단계;
(b) 상기 (a)단계의 생물학적 시료가 처리된 혈관내피세포에서 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 측정된 수준(i)을 상기 생물학적 시료가 처리되지 않은 정상 혈관내피세포로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단방법.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 혈관내피세포의 기능 부전이 의심되는 개체로부터 분리된 전혈, 혈장, 혈청, 적혈구 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 시료인 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 마커의 mRNA 수준 측정은 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 칩 분석법으로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법을 이용하여 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 마커의 단백질 수준 측정은 마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 마커의 단백질 수준 측정은 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 구성되는 군으로부터 선택되는 방법을 이용하여 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 상기 혈관내피세포의 기능 부전은 동맥경화증, 고혈압 또는 당뇨병 관련 혈관질환의 발병을 야기시키는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 (a)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 (a)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 하기의 식으로 계산된 비율을, 정상 대조군 시료로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법;
비율 = (i)/(ii).
- [청구항 10] 제2항에 있어서,
상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제2항에 있어서,
상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 하기의 식으로 계산된 비율을, 생물학적 시료가 처리되지 않은 정상 혈관내피세포로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법;
비율 = (i)/(ii).
- [청구항 12] Rab5C, 클라트린(clathrin), 카베올린-1(caveolin-1), EEA1(Early Endosome Antigen 1) 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 조성물은 KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 14] 제12항 또는 제13항에 있어서,
상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것인, 조성물.
- [청구항 15] 제12항 또는 제13항에 있어서,
상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA로부터 유래된 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인, 조성물.
- [청구항 16] 제12항 또는 제13항의 조성물을 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 진단용 키트.

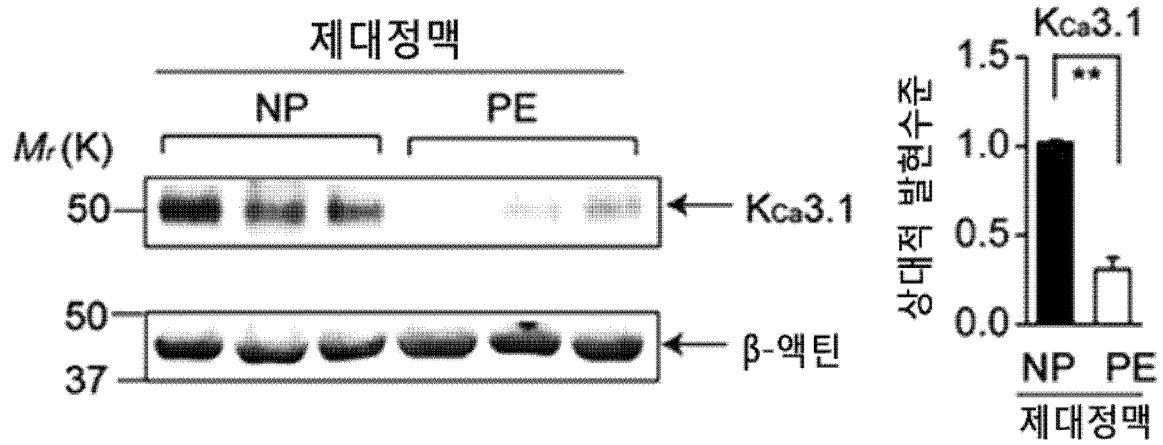
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인, 키트.
- [청구항 18] (a) 혈관내피세포의 기능 개선을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 분리된 세포에 처리하는 단계;
(b) 상기 후보 물질을 처리한 세포 내 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 (b) 단계에서 측정된 마커의 수준과 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 세포에서 측정된 마커의 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 개선 유도 물질의 스크리닝 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 20] 제18항에 있어서,
상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 하기의 식으로 계산된 비율을, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법;
$$\text{비율} = (i)/(ii).$$
- [청구항 21] (a) 혈관내피세포의 기능 부전을 유도할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 분리된 세포에 처리하는 단계;
(b) 상기 후보 물질을 처리한 세포 내 (i) Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 마커의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 (b) 단계에서 측정된 마커의 수준과 후보 물질이 처리되지 않은 분리된 세포에서 측정된 마커의 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 혈관내피세포의 기능 부전 유도 물질의 스크리닝 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 23] 제21항에 있어서,
상기 (b)단계에서 (ii) KCa3.1 채널의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하고, 측정된 (i) 및 (ii)를 이용하여 하기의 식으로 계산된 비율을, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 세포로부터 계산된 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법;

$$\text{비율} = (i)/(ii).$$

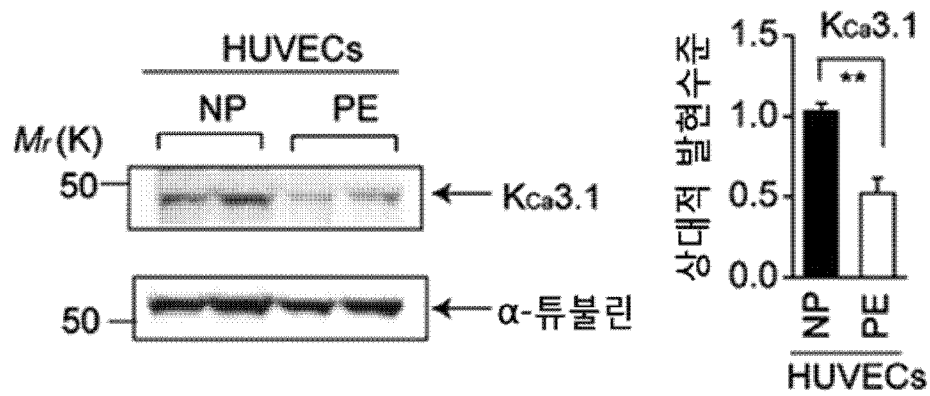
[도 1a]



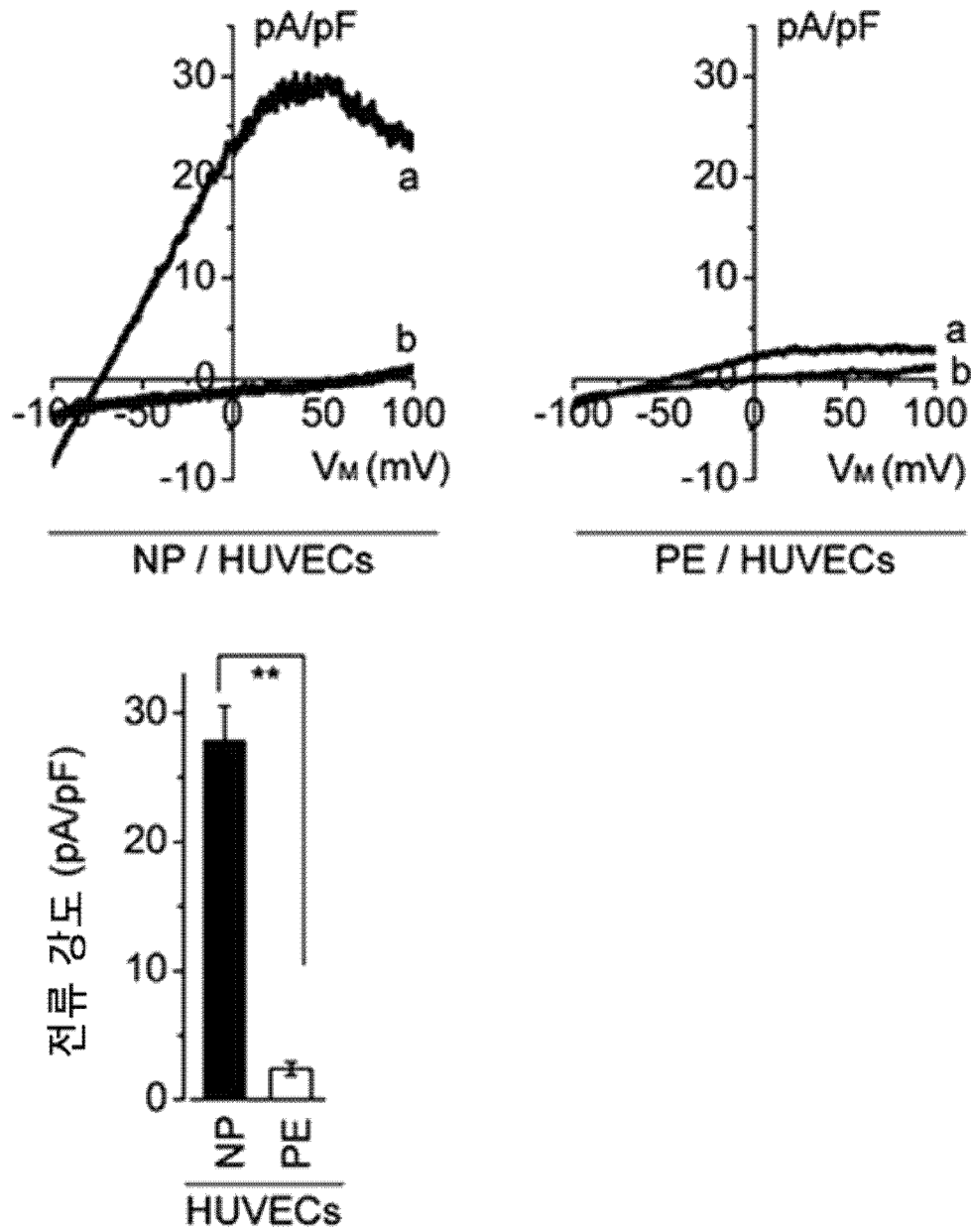
[도1b]



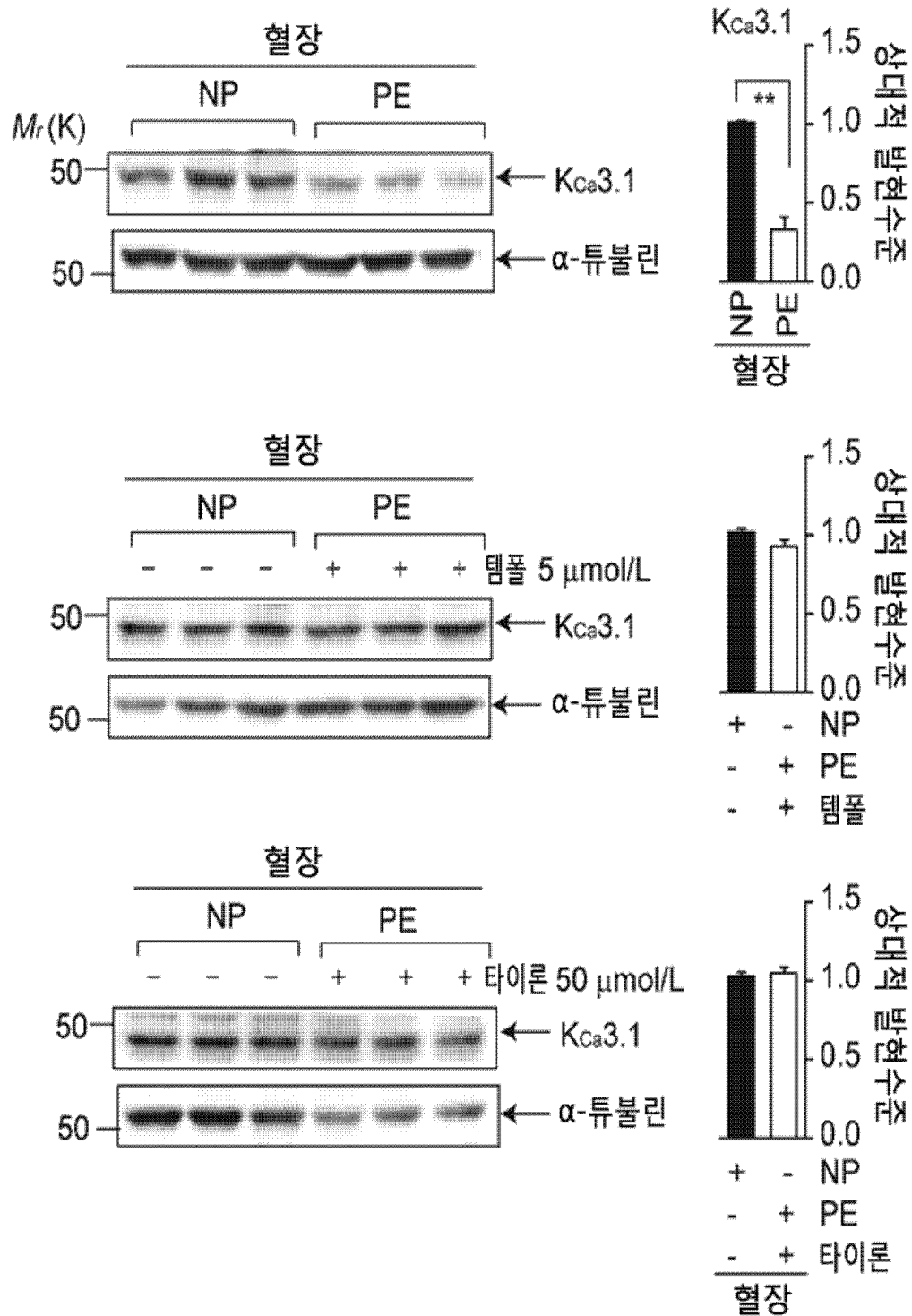
[도1c]



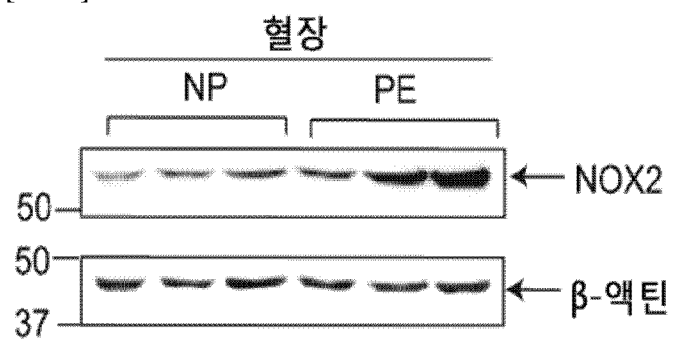
[도1d]



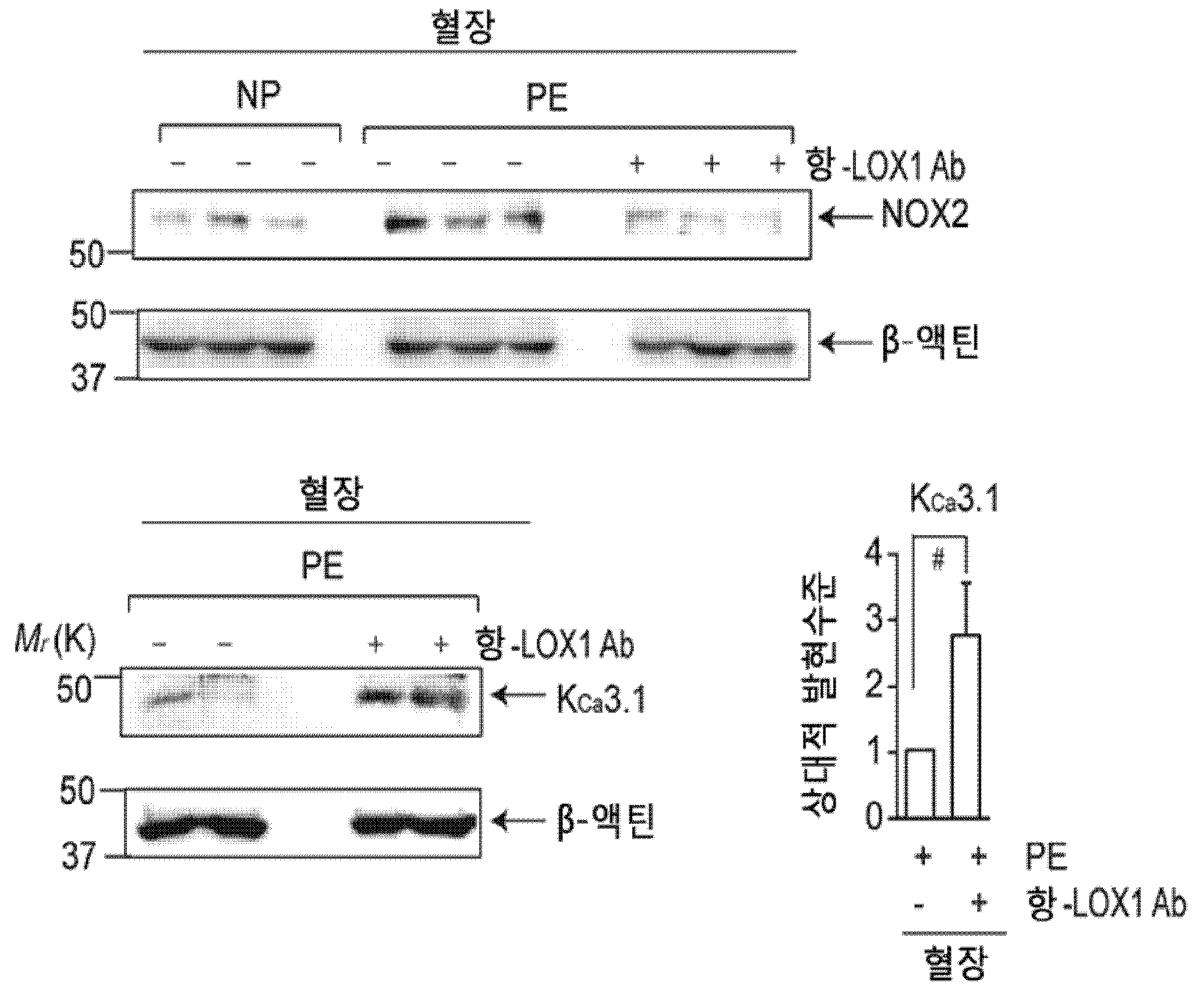
[도2a]



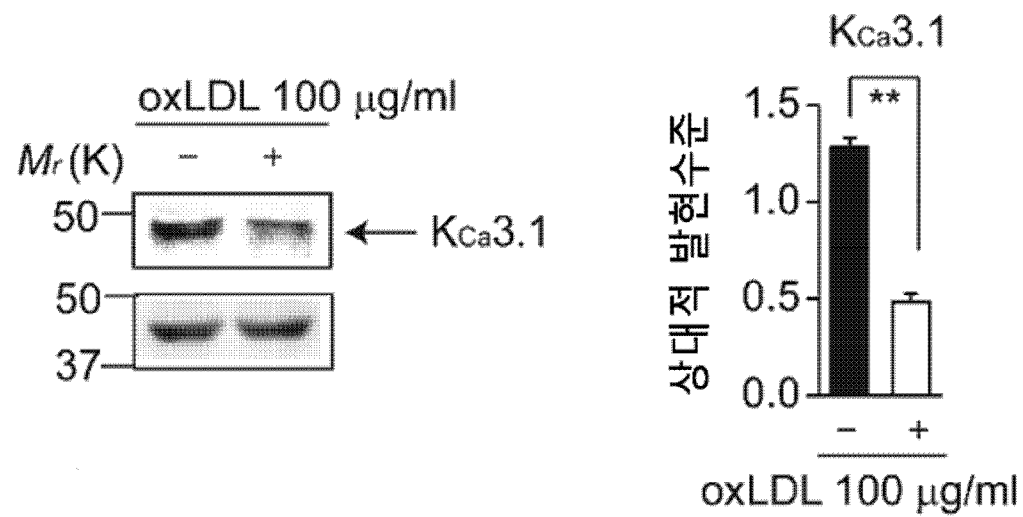
[도2b]



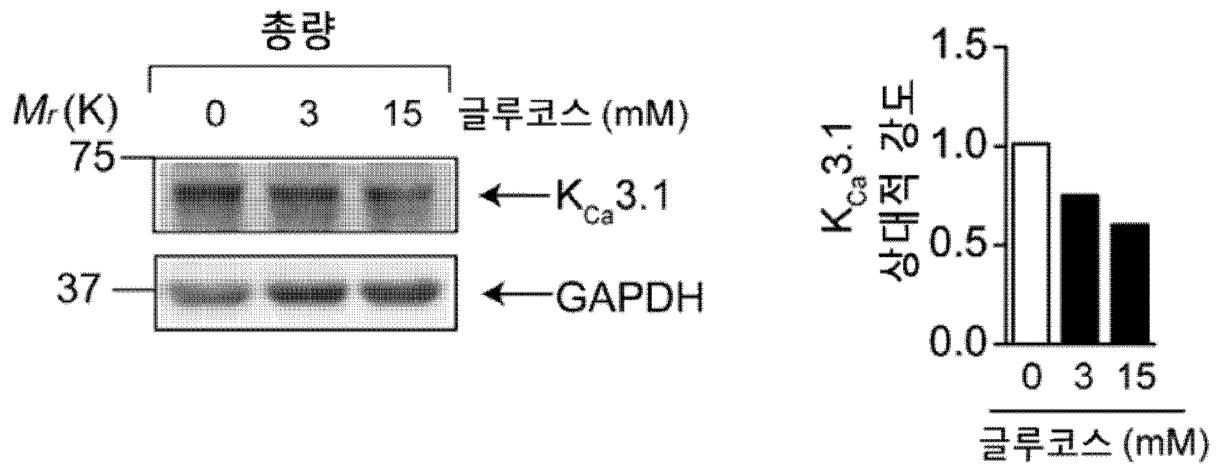
[도2c]



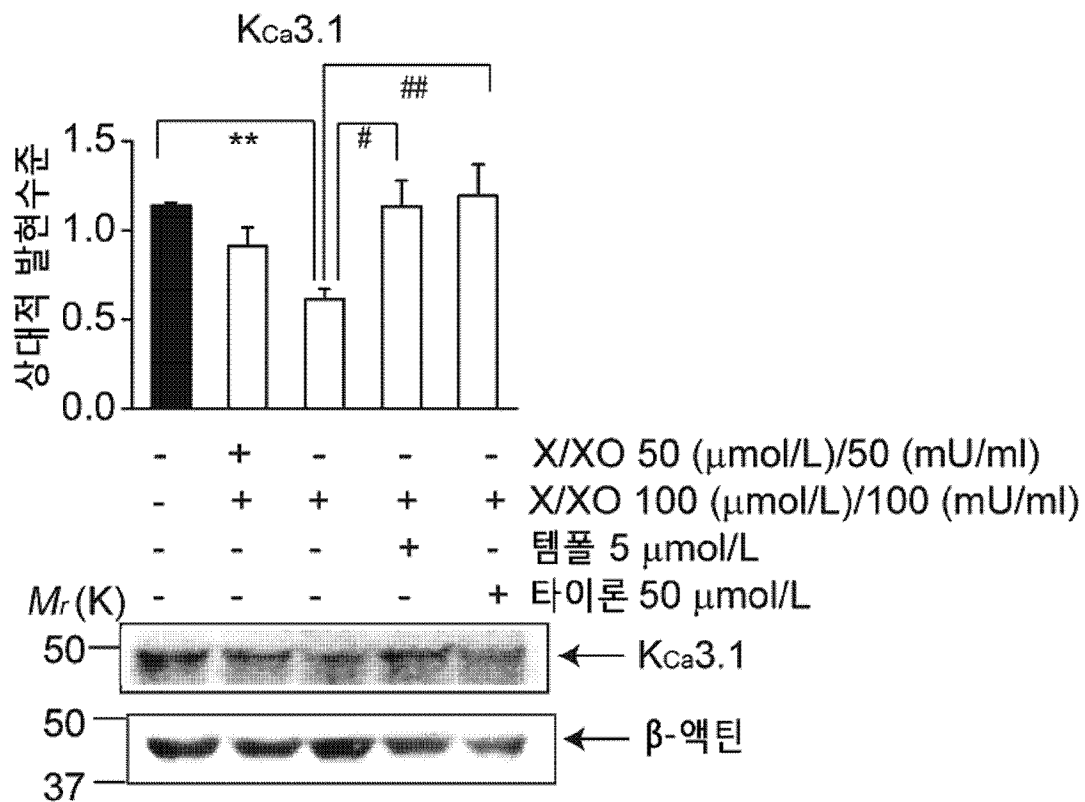
[도3a]



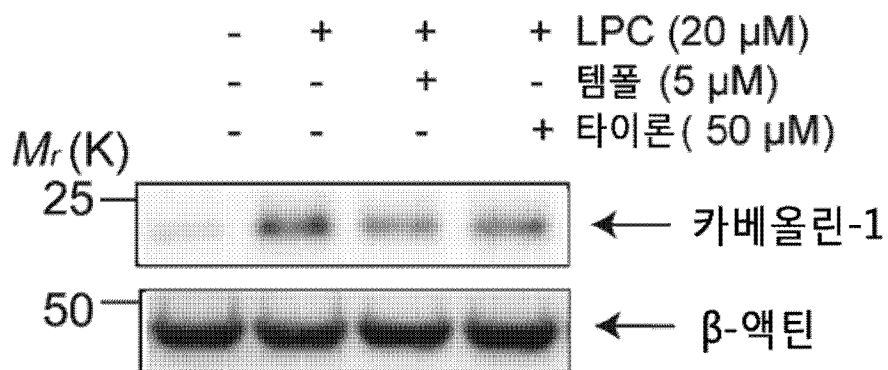
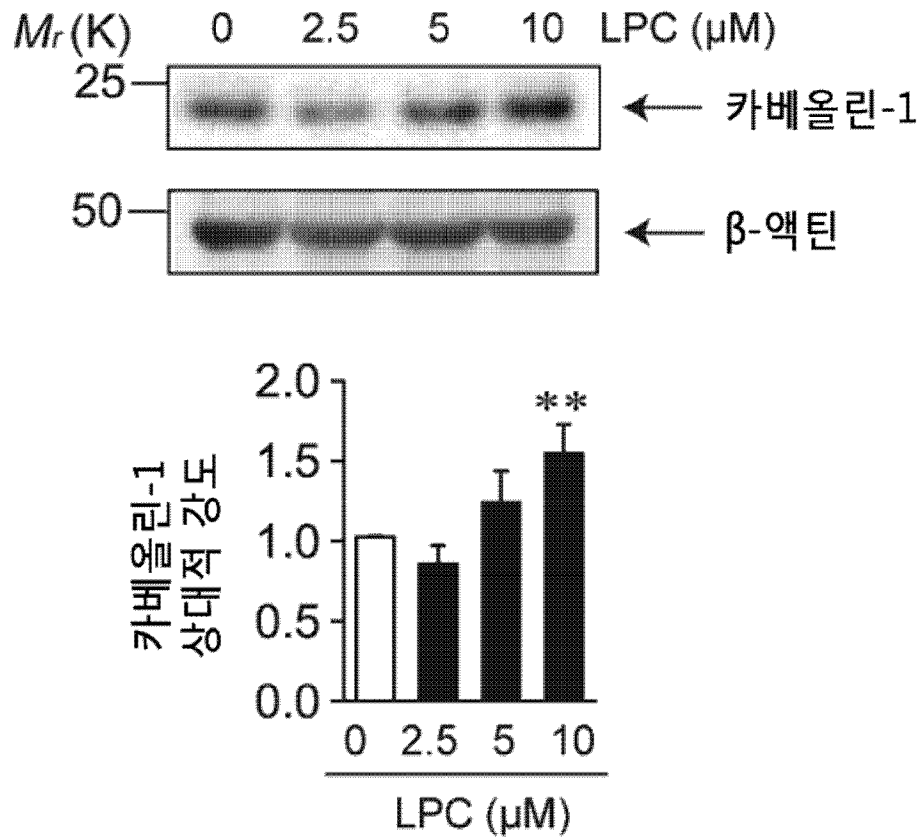
[도3b]



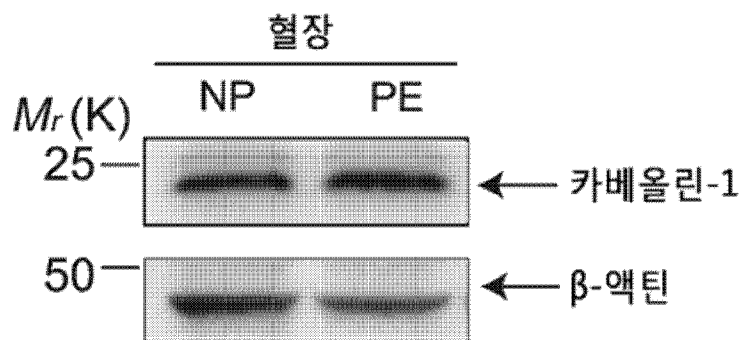
[도4]



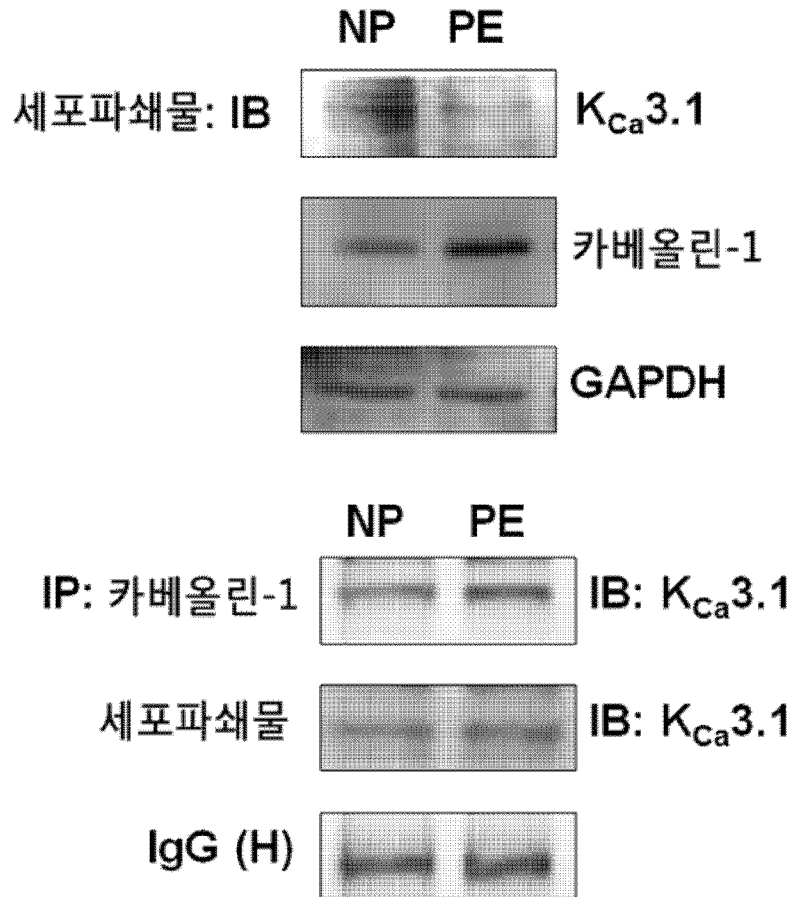
[도5a]



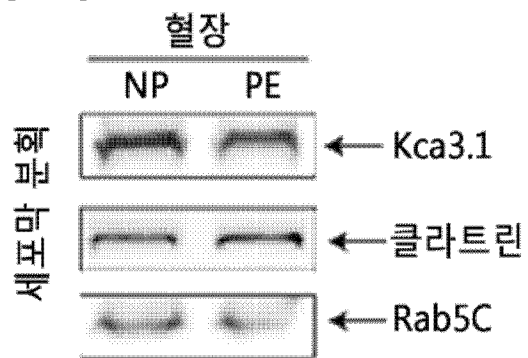
[도5b]



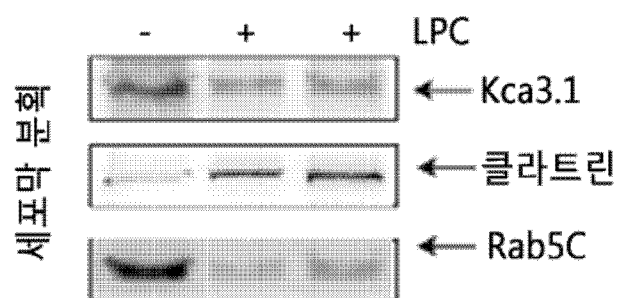
[도5c]



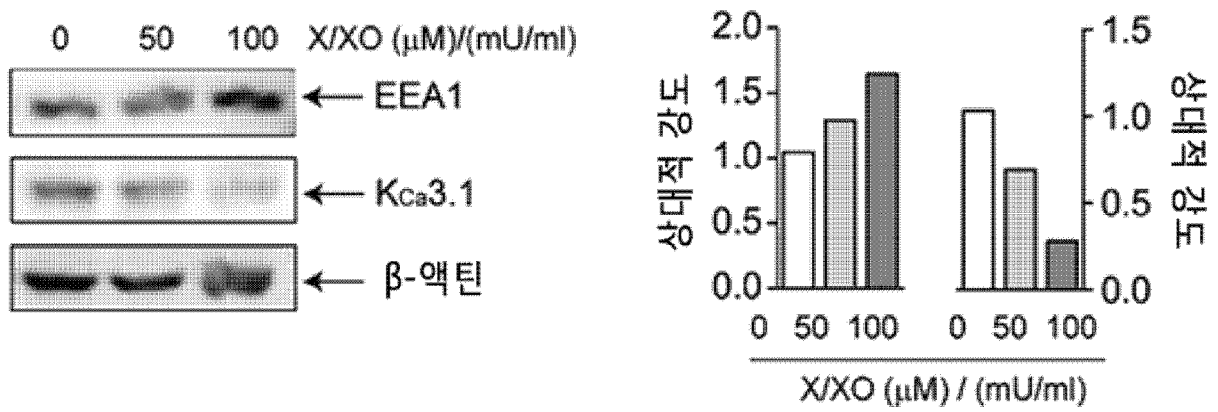
[도6a]



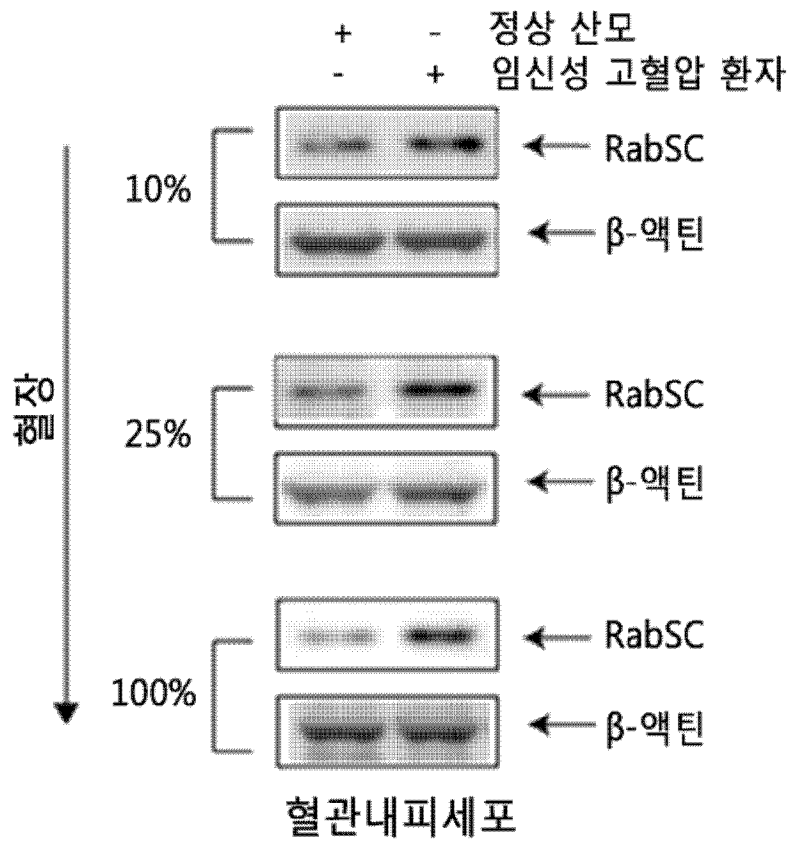
[도6b]



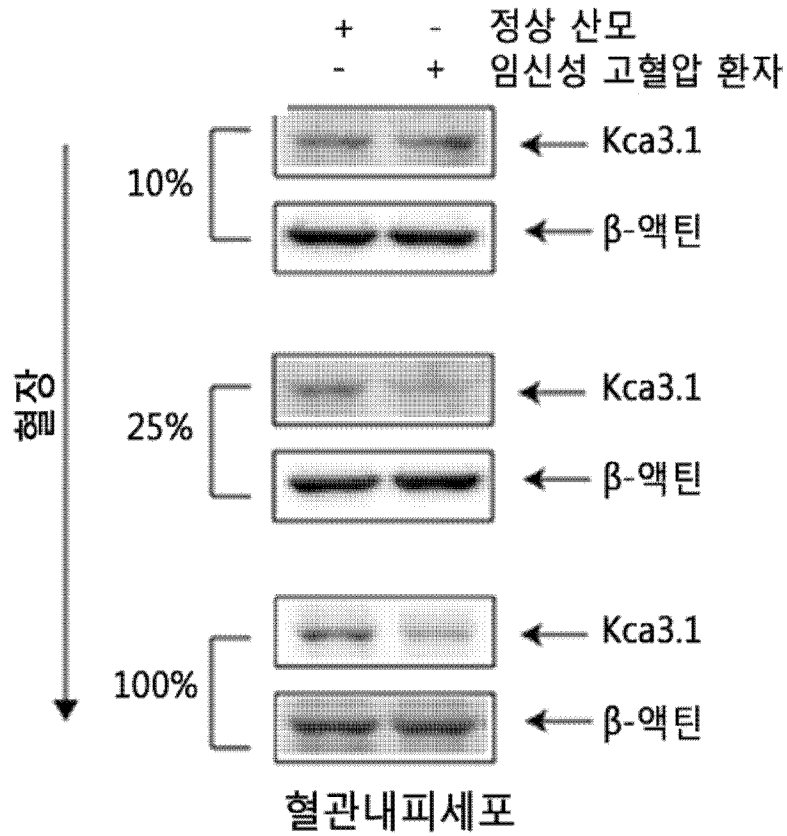
[도6c]



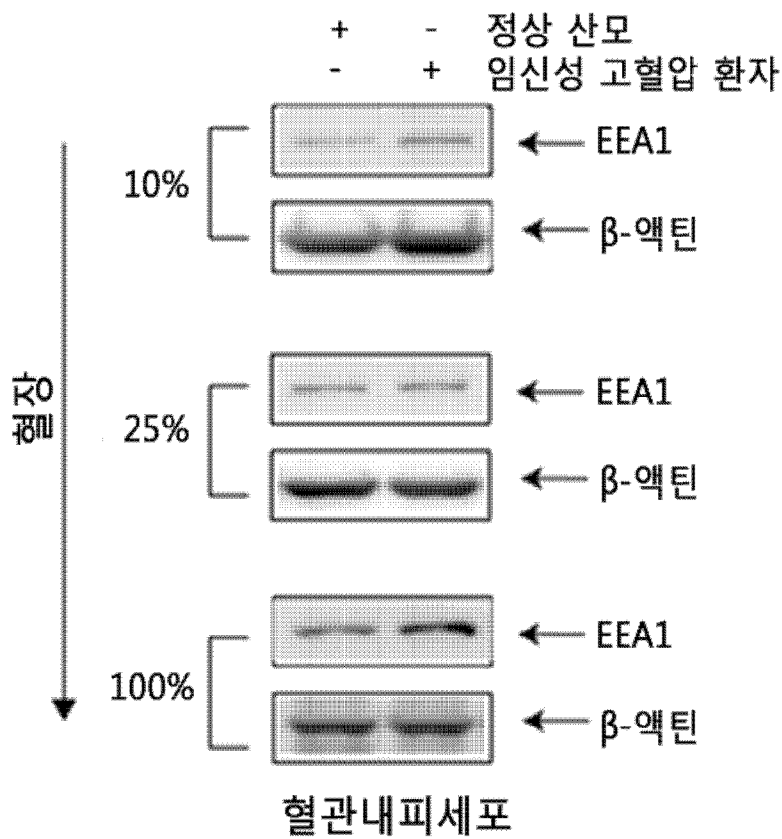
[도7a]



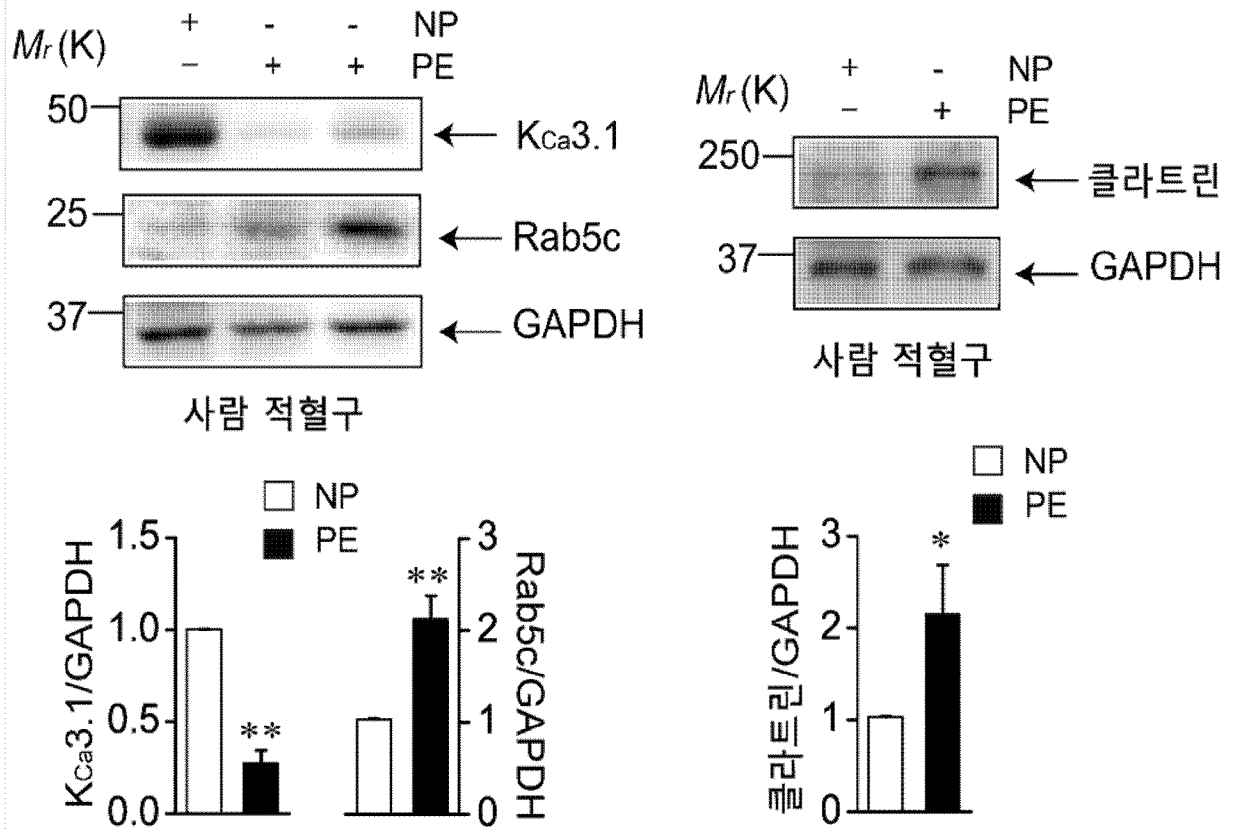
[도7b]



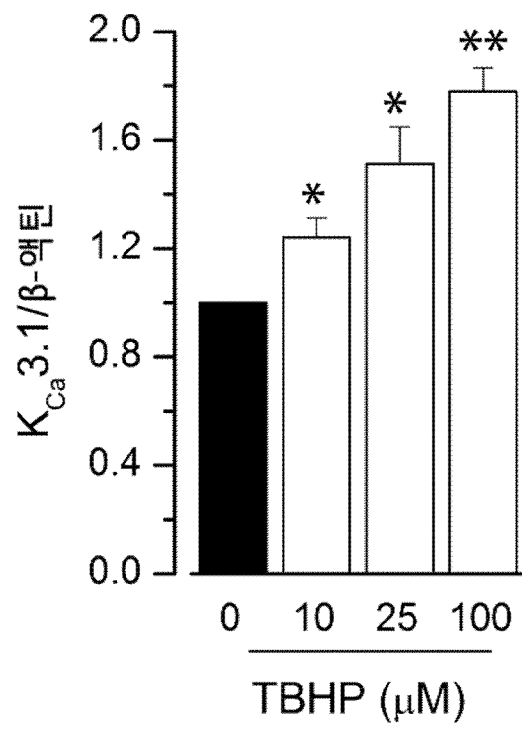
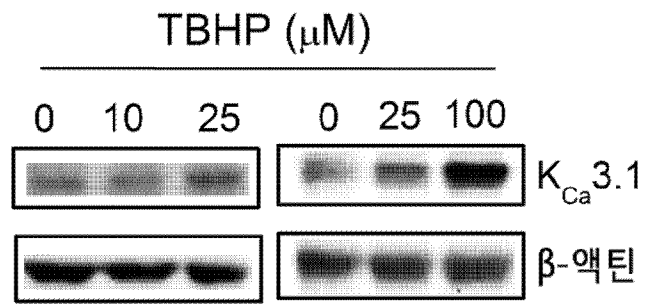
[도7c]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(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)

C12Q 1/68; A61K 39/395; C07K 19/00; C07K 16/18; C12N 15/13; A61K 48/00; G01N 33/574; G01N 33/68

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: endothelial cell, malfunction, Rab5C, clathrin, caveolin-1, EEA1, marker, diagnosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FERNANDEZ-HERNANDO et al., "Endothelial-specific Overexpression of Caveolin-1 Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient Mice", The American Journal of Pathology, vol. 177, no. 2, pages 998-1003 (August 2010) See abstract; pages 1001 and 1002.	1-7,12,14-18,21
Y		8-11,13,19,20,22,23
Y	KR 10-1517689 B1 (EWH A UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 04 May 2015 See paragraphs [0002], [0003] and [0021].	8-11,13,19,20,22,23
A	KR 10-2015-0085459 A (LG LIFE SCIENCES LTD.) 23 July 2015 See claims 13-38.	1-23
A	KR 10-1552021 B1 (EWH A UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 09 September 2015 See paragraphs [0002]-[0005]; claims 1 and 5-12.	1-23
A	ACHCAR et al., "Loss of Caveolin and Heme Oxygenase Expression in Severe Pulmonary Hypertension", Chest, vol. 129, no. 3, pages 696-705 (March 2006) See the entire document.	1-23



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

06 FEBRUARY 2017 (06.02.2017)

Date of mailing of the international search report

06 FEBRUARY 2017 (06.02.2017)

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

International application No.

PCT/KR2016/011223

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUH, Suk-Hyo et al., "The Underlying Mechanisms of Vascular Endothelial and Smooth Muscle Dysfunctions in Preeclampsia Patient", Ministry of Health and Welfare, Health & Medical Technology R&D Program Final Report, Research Managing Department: EWHU UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION (18 June 2012) See the entire document.	1-23
A	DRAB et al., "Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-disrupted Mice", Science, vol. 293, pages 2449-2452 (28 September 2001) See the entire document.	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/011223

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1517689 B1	04/05/2015	KR 10-2015-0040712 A	15/04/2015
KR 10-2015-0085459 A	23/07/2015	WO 2015-108328 A1	23/07/2015
KR 10-1552021 B1	09/09/2015	KR 10-2015-0059550 A	01/06/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; A61K 39/395; C07K 19/00; C07K 16/18; C12N 15/13; A61K 48/00; G01N 33/574; G01N 33/68

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: 혈관내피세포, 기능 부전, Rab5C, 클라트린, 카베올린-1, EEA1, 마커, 진단

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	FERNANDEZ-HERNANDO 등, 'Endothelial-specific overexpression of caveolin-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice', The American Journal of Pathology, 177권, 2호, 페이지 998-1003 (2010.08) 초록; 페이지 1001 및 1002 참조.	1-7, 12, 14-18, 21
Y		8-11, 13, 19, 20, 22, 23
Y	KR 10-1517689 B1 (이화여자대학교 산학협력단) 2015.05.04 단락 [0002], [0003] 및 [0021] 참조.	8-11, 13, 19, 20, 22, 23
A	KR 10-2015-0085459 A (주식회사 엘지생명과학) 2015.07.23 청구항 13-38 참조.	1-23
A	KR 10-1552021 B1 (이화여자대학교 산학협력단) 2015.09.09 단락 [0002]-[0005]; 청구항 1 및 5-12 참조.	1-23
A	ACHCAR 등, 'Loss of caveolin and heme oxygenase expression in severe pulmonary hypertension', Chest, 129권, 3호, 페이지 696-705 (2006.03) 전체 문헌 참조.	1-23

☒ 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

2017년 02월 06일 (06.02.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 02월 06일 (06.02.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	서석효 등, ‘자간전증에서 혈관내피세포와 혈관평활근세포 기능부전 발생 기전 연구’, 보건복지부 보건의료기술진흥사업 최종보고서, 주관연구기관: 이화여자대학교 산학협력단 (2012.06.18) 전체 문헌 참조.	1-23
A	DRAB 등, ‘Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice’, Science, 293권, 페이지 2449-2452 (2001.09.28) 전체 문헌 참조.	1-23

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1517689 B1	2015/05/04	KR 10-2015-0040712 A	2015/04/15
KR 10-2015-0085459 A	2015/07/23	WO 2015-108328 A1	2015/07/23
KR 10-1552021 B1	2015/09/09	KR 10-2015-0059550 A	2015/06/01