



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0028213

(43) 공개일자 2015년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/06 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

A61K 49/14 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0117688

(22) 출원일자 2014년09월04일

심사청구일자 2014년09월04일

(30) 우선권주장

1020130106064 2013년09월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

권기환

서울 강남구 압구정로 401, 55동 702호 (압구정동, 한양아파트)

정지화

경기 김포시 김포한강2로 189, 702동 905호 (장기동, 고창마을풍경채아파트)

(74) 대리인

손민

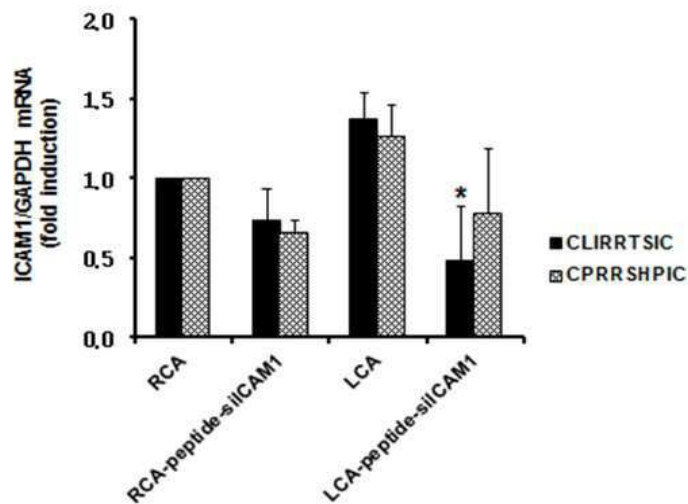
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 신규한 심혈관계 질환의 진단 및 치료용 펩티드

(57) 요약

본 발명은 기능이상(dysfunction) 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 펩티드, 상기 펩티드를 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 조성물, 상기 펩티드 또는 조성물을 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 키트 및 이의 진단 방법, 상기 펩티드를 포함하는 약물 전달 복합체, 및 이를 이용한 심혈관계 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 펩티드는 생체 내의 비정상적인 혈류 흐름에 의해 발생하는 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있으므로, 기능이상 혈관내피세포에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환의 진단, 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345166535

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업-의학첨단과학기술융합원천기술

연구과제명 혈관성형후재협착억제신기술개발(혈관재협착동물모델개발및혈관성형술후혈관재협착에 관한 임상연구)

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고, 기능이상(dysfunctional) 혈관내피세포에 결합할 수 있는 신규한 펩티드.

청구항 2

제1항의 펩티드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 41 내지 44 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 5

제4항의 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체.

청구항 6

- a) 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및,
- b) 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 목적하는 펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 서열번호 41 내지 44 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항의 펩티드를 포함하는, 심혈관계 질환의 진단용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 펩티드가 형광물질 또는 방사성 물질로 표지되는 것인 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 형광물질이 로다민(rhodamine), 탐라(TAMRA), 플루오세인, FITC(fluorescein isothiocyanate), FAM(fluorecein amidite), 보디피(bodipy), 알렉사플로어(alexa fluor), Cy3, Cy5, Cy7, 인도시아닌그린 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 방사성 물질이 ^{131}I , ^{125}I , ^{124}I , ^{64}Cu , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 심혈관계 질환이 기능이상 혈관내피세포에 의해 발병되는 것인 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 심혈관계 질환이 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥심장병 및 심근경색증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환인 것인 조성물.

청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 심혈관계 질환의 진단용 키트.

청구항 15

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 진단용 조성물을 사용하여 기능이상 혈관내피세포를 검출하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환을 진단하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 방법이

- 심혈관계 질환이 의심되는 개체의 시료를 상기 진단용 조성물에 포함된 펩티드와 반응시켜 기능이상 혈관내피세포에 결합시키는 단계;
- 기능이상 혈관내피세포에 결합된 펩티드의 수준을 측정하는 단계; 및
- 측정된 기능이상 혈관내피세포에 결합된 펩티드의 수준을 정상 대조군 시료에서 측정된 수준과 비교하여 이보다 증가하면 심혈관계 질환으로 판정하는 단계를 포함하는 것인, 진단 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 기능이상 혈관내피세포에 결합된 펩티드의 수준이 상기 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 측정되는 것인, 진단 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 기능이상 혈관내피세포에 결합된 펩티드의 수준이 단백질칩 분석, 면역측정법, 리간드 결합분석, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), SELDI-

TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), 방사선면역분석, 방사면역확산법, 오우크테로니 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동분석, 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)으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법을 이용하여 측정되는 것인, 진단 방법.

청구항 19

제1항의 펩티드, 비펩티드성 중합체 및 표적 약물이 결합된, 약물 전달 복합체.

청구항 20

제19항에 있어서, 표적 약물이 심혈관계 질환의 예방 또는 치료에 유용한 것인, 약물 전달 복합체.

청구항 21

제20항에 있어서, 표적 약물이 siRNA, microRNA 또는 안티센스 올리뉴클레오티드인 것인, 약물 전달 복합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 표적 약물이 세포접착분자인 VCAM-1 또는 ICAM-1의 발현을 특이적으로 억제하는 siRNA, microRNA 또는 안티센스 올리뉴클레오티드인 것인, 약물 전달 복합체.

청구항 23

제19항에 있어서, 비펩티드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜(PEG) 단독 중합체, 폴리프로필렌글리콜 단독 중합체, 에틸 글리콜-프로필렌글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸 에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약물 전달 복합체.

청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 약물 전달 복합체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 심혈관계 질환의 치료 및 진단용 펩티드에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 기능이 상(dysfunctional) 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 펩티드, 상기 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 펩티드를 제조하는 방법, 상기 펩티드를 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 조성물, 상기 펩티드 또는 조성물을 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 키트, 상기 펩티드를 포함하는 약물 전달 복합체, 및 상기 약물 전달 복합체를 이용하여 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 동맥경화증은 고혈압, 비만 및 당뇨병 등 다양한 위험인자들에 의한 혈관손상에서 기인한 만성 염증성 질환으로 혈관벽이 좁아지거나 막히는 질환이다. 동맥경화증은 진행됨에 따라 뇌졸중, 심근경색, 사지 허혈성 괴사 등 주요 심혈관계 질환 유발의 주원인이기도 하다.
- [0003] 동맥경화증의 발생에는 혈관내피세포의 기능 유지가 중요한데, 이를 위해서는 정상적인 혈류 흐름에 의한 적정 수준의 혈류 전단응력(shear stress)이 유지되어야 한다는 연구 결과들이 보고되고 있다. 정상적인 혈류 흐름인 층류(laminar flow)는 혈관내피세포에서 항동맥경화 유전자의 발현을 증가시키는 반면, 비정상적인 혈류 흐름인 와류성 혈류(disturbed flow)는 동맥경화증을 촉진하는 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 실제 임상에서도 동맥경화증은 와류성 혈류가 발생하는 동맥의 분지부위, 심하게 굽어지는 부분의 안쪽 부분에 주로 발생함이 보고되었다. 이들 연구 결과는 비정상적인 와류성 혈류가 혈관내피세포의 기능 이상을 유도하고 동맥경화증의 중요한 유발인자라는 점을 시사하므로, 혈관내피세포의 기능 이상은 동맥경화증 발생 초기 단계의 마커로서 인식되고 있다.
- [0005] 최근, 비정상적인 와류성 혈류 흐름을 유발시킨 동물 모델로서 경동맥 부분 결찰 모델이 확립되었는데, 상기 모델에서 부분 결찰된 좌측 경동맥(left carotid artery, LCA)은 느린 와류성 혈류에 노출됨으로써 2주 이내에 동맥경화반이 형성되며, 이로부터 좌측 경동맥 부분 결찰을 통해 발생한 비정상적인 와류성 혈류는 급성으로 혈관내피세포 기능 이상을 유도하여 동맥경화증의 발생을 촉진할 수 있다는 점이 보고되었다.
- [0006] 일반적으로 동맥경화증의 진단은 X-선 혈관조영술(X-ray angiography), 혈관내시경술(angiосcopy), 혈관내 초음파(ultrasound) 등을 사용하여 이루어지고 있는데, 이러한 진단방법은 혈관내강의 지름, 협착 정도 및 혈관벽의 두께 등을 측정하여 주로 동맥경화반의 면적을 측정하는 것이다.
- [0007] 많은 연구가들이 동맥경화증을 보다 효율적으로 진단할 수 있는 동맥경화반에 특이적인 분자들을 발굴하기 위해 노력하고 있지만, 이러한 것들은 모두 동맥경화증 발생의 초기단계 마커인 혈관내피세포의 기능적 이상을 발견하지 못하며, 이러한 이유로 비정상적인 혈류를 비롯한 여러 위험인자에 의해 발생하는 혈관내피세포의 기능 이상을 진단할 수 있는 새로운 표적분자의 발굴이 필요한 실정이다.
- [0008] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 보다 효과적으로 동맥경화증을 진단할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 무작위 펩티드 라이브러리(Random peptide library)를 이용한 파아지 디스플레이(phage display) 기법을 적용하여 와류성 혈류 흐름을 유발시킨 동물 모델의 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 펩티드를 발굴하고, 상기 펩티드를 사용할 경우 보다 효과적으로 동맥경화증을 진단할 수 있음은 물론, 동맥경화증의 예방 및 치료에도 응용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- 발명의 내용**
- 해결하려는 과제**
- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 펩티드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 상기 펩티드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩티드를 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩티드 또는 조성물을 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 키트 및 이의 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩티드, 비펩티드성 중합체 및 표적 약물이 결합된, 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약물 전달 복합체를 제공하는 것이다.

- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약물 전달 복합체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- 과제의 해결 수단**
- [0018] 본 발명자들은 보다 효과적으로 동맥경화증을 진단할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, 비정상적인 혈류 흐름인 와류성 혈류(disturbed flow)에 주목하게 되었다.
- [0019] 지금까지 알려진 바에 의하면, 혈관의 내피세포에 적정 수준의 혈류 전단응력을 부여하지 못하는 와류성 혈류가 발생할 경우 동맥경화증이 촉진된다고 알려져 있다. 이러한 와류성 혈류는 혈관의 구조적인 이상에 의하여 발생하고, 이는 동맥경화증과 같은 심혈관계 질환의 발병에 관계된 혈관내피세포에서 유발되는 유전자의 비정상적 발현과는 무관하다.
- [0020] 이에 본 발명자들은 와류성 혈류가 혈관내피세포의 이상에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환의 발병초기에 관여할 것으로 예상하고, 이러한 와류성 혈류에 의하여 유발되는 혈관내피세포의 이상을 검출할 수 있다면, 혈관내피세포의 이상에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환을 예방하거나 조기에 진단하여 효과적으로 치료할 수 있을 것으로 기대하였다.
- [0021] 이에, 혈류 전단응력을 변화시킨 동물 모델로서 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델을 제작하고, 상기 마우스 모델에서 유발된 기능이상 혈관내피세포에 무작위 펩티드 라이브러리를 이용한 생체 내 파아지 디스플레이 기법을 적용하여 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 40종의 펩티드(서열번호 1 내지 40)를 스크리닝하였다. 이 중에서 유의한 빈도(3회 이상의 빈도)를 나타내어 혈관내피세포에 특이적인 결합활성을 나타내는 펩티드는 11개 펩티드(서열번호 1-10 및 12)임을 확인하였다.
- [0022] 또한, 상기 11개의 펩티드 중에서 LCA에만 결합하거나 또는 LCA에 대한 결합빈도가 우측 경동맥(right carotid artery, RCA)에 대한 결합빈도보다 높은 수준을 나타내는 6개 펩티드를 최종 선별하고, 이를 기능이상 혈관내피세포에 특이적인 펩티드(Dysfunctional Endothelial cells-Specific Peptides, DESPs)라 명명하였다(서열번호 3, 4, 5, 8, 9 및 10).
- [0023] 다음으로, 상기 DESPs의 작용효과에 대한 시험관 내 분석을 수행하기 위하여, 먼저 정상적인 전단응력(LSS)과 비정상적인 전단응력(OSS)이 처리된 내피세포를 각각 수득하고, 이들 내피세포에서 발현되는 유전자의 발현 수준을 비교하였다. 그 결과, LSS 상태에서는 항염증 유전자의 발현이 증가하는 반면, OSS 상태에서는 염증유발 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다.
- [0024] 또한, 상기 LSS 또는 OSS 처리된 내피세포에 상기 선별된 6종의 DESPs를 발현하는 파아지를 처리하고 이들의 결합활성을 비교하였다. 그 결과, 서열번호 3, 8, 9 및 10의 펩티드를 발현하는 파아지의 결합 수준이 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 증가됨을 확인하였다.
- [0025] 아울러, 상기 DESPs의 작용효과에 대한 생체 내 분석을 수행하기 위하여, 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델의 결찰된 좌측 경동맥 부분(LCA)과 결찰되지 않은 우측 경동맥 부분(RCA)에서 유래된 혈관내피세포에서 발현되는 유전자의 발현 수준을 비교한 결과, 항염증 유전자의 발현 수준은 RCA에 비하여 LCA에서 감소되는 반면, 염증유발 유전자의 발현 수준은 RCA에 비하여 LCA에서 증가됨을 확인하였다.
- [0026] 또한, 상기 LCA와 RCA에 상기 선별된 6종의 DESPs를 발현하는 파아지를 처리하고 이들의 결합활성을 비교한 결과, 상기 서열번호 3, 8, 9 및 10의 펩티드를 발현하는 파아지가 특이적으로 LCA에 결합하고, RCA에는 결합하지 않음을 확인하였다.
- [0027] 상기 결과로부터 본 발명에서 제공하는 4종의 펩티드가 생체 내의 비정상적인 혈류 흐름에 의해 발생하는 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있음을 확인하였다. 따라서 상기 4종의 펩티드는 기능이상 혈관내피세포에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환을 진단하는데 사용될 수 있고, 상기 심혈관계 질환을 조기에 검출하여 심혈관계 질환의 발병을 예방하는데 사용할 수 있으며, 기능이상 혈관내피세포에 각종 심혈관계 질환 특이적인 치료제를 표적 특이적으로 전달하여 심혈관계 질환을 효과적으로 치료하는데 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0028] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 하기 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고, 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 펩티드를 제공한다.

[0029] 서열번호 3: CLIRRTSIC

[0030] 서열번호 8: CNLLRLTQC

[0031] 서열번호 9: CPRRSHPIC

[0032] 서열번호 10: CLHPPLTLC

[0033] 본 명세서에서 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다.

[0034] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N,

[0035] 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루타민산: E,

[0036] 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H,

[0037] 이소루신: I, 루신: L, 리신: K,

[0038] 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P,

[0039] 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W,

[0040] 타이로신: Y, 발린: V

[0041] 본 발명의 용어 "펩티드(peptide)"란, 아미드 결합(또는 펩티드 결합)으로 연결된 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미한다. 상기 펩티드의 제조방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하는 방법, 펩티드 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법, 무세포 단백질 합성법, 자동 펩티드 합성기를 이용한 방법 등과 같은, 당 분야에 널리 공지된 다양한 방법으로 제조할 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 펩티드는 기능이상 혈관내피세포의 표면에 결합할 수 있는 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드가 될 수 있다. 또한, 기능이상 혈관내피세포의 표면에 결합할 수 있다면, 상기 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의 방법으로 변이된 변이체도 본 발명에서 제공하는 펩티드의 범주에 포함될 수 있다.

[0043] 아울러, 본 발명의 펩티드는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩티드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델의 혈관내피세포를 대상으로 무작위 펩티드 라이브러리를 이용한 생체 내 파아지 디스플레이 기법을 적용하여 6종의 펩티드를 선별하고(실시예 <1-2> 및 표 1 참고), 상기 선별된 펩티드의 기능이상 혈관내피세포에 대한 결합활성을 측정하였다. 그 결과, 시험관 내에서는 상기 6종의 펩티드 중에서 4종의 펩티드(서열번호 3의 CLIRRTSIC, 서열번호 8의 CNLLRLTQC, 서열번호 9의 CPRRSHPIC, 및 서열번호 10의 CLHPPLTLC)가 결합활성을 나타내었다(도 3 참고). 생체 내에서 상기 6종의 펩티드의 결합활성을 비교한 결과, 상기 선별된 4종의 펩티드가 생체 내에서도 기능이상 혈관내피세포에 대한 결합활성을 나타냄을 확인하였다(도 5a 참고). 또한, z 스택 이미지화를 통해 파아지-양성 입자가 ECs의 세포 내강 표면에 위치하며, 선별된 DESP-발현 파아지가 다른 장기가 아닌, 결찰된 LCA의 기능이상 내피세포를 주된 표적으로 함을 확인하였다(도 5b 내지 5d 참고).

[0045] 상기 선별된 4종의 DESPs가 시험관 내 뿐만 아니라 생체 내에서도 혈관내피세포에 대한 결합활성을 나타내고, 동맥경화증이 유발될 가능성이 있는 혈관의 내피세포에 특이적으로 결합할 수 있음을 알 수 있었다.

[0046] 또한, 다양한 벽 전단응력(wall shear stress)에 노출된 대동맥 조직에서 DESP-발현 파아지의 결합을 조사한 결과, CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-발현 파아지는 와류성 혈류 지역에 선택적으로 결합하였으나, 비와류성 혈류 지역에는 결합하지 않았다(도 6a 참고). 또한, 상기 펩티드-발현 파아지의 결합은 분지혈관 구멍으로부터 멀리 떨어진 지역에서 상당히 감소하였다(도 6b 및 46c 참고). 상기 결과는 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-발현 파아지가 대

동맥의 와류성 혈류 지역에 또한 선택적으로 결합한다는 것을 나타낸다.

- [0047] 나아가, 본 발명에 따른 CLIRTSIC 및 CPRRSHPIC-발현 파아지가 인간 대동맥의 와류성 혈류 지역의 내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는지 여부를 조사하였다. 그 결과, CLIRTSIC- 및 CPRRSHPIC-발현 파아지 모두 인간 폐 동맥 시료에서 와류성 혈류 지역의 내피세포에 선택적으로 결합하였다(도 7b 및 7c 참고). 상기 결과는 CLIRTSIC- 또는 CPRRSHPIC-발현 파아지가 마우스 뿐만 아니라 인간의 기능이상 ECs에 특이성을 가지며, 상기 펩티드에 의해 인식되는 마우스 ECs의 에피토프가 인간에도 존재할 수 있을 것이라는 점을 시사한다.
- [0048] 상술한 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 펩티드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리 뉴클레오티드를 제공한다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 염기서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열번호 41의 폴리뉴클레오티드, 서열번호 8의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열번호 42의 폴리뉴클레오티드, 서열번호 9의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열번호 43의 폴리뉴클레오티드, 서열번호 10의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열번호 44의 폴리뉴클레오티드 등이 될 수 있다.
- [0050] 5'-ACG CTC ATA AGG CGA ACC AGT ATT ACG-3'(서열번호 41)
- [0051] 5'-ACG AAT CTG CTG CTT CGT ACT CAG ACG-3'(서열번호 42)
- [0052] 5'-ACG CCG CGC CGA AGC CAC CCC ATA ACG-3'(서열번호 43)
- [0053] 5'-ACG CTG CAT CCA CCT CTG ACC CTC ACG-3'(서열번호 44)
- [0054] 또한, 상기 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는 펩티드를 코딩할 수 있는 한, 상기 염기서열과 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 역시 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드의 범주에 포함될 수 있다. 바람직하게는 상기 폴리뉴클레오티드는 80% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 공지된 폴리뉴클레오티드 합성방법을 이용하여 수득할 수도 있다.
- [0056] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [0057] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 적절한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 유전자 삽입물을 포함하고, 상기 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 상기 펩티드를 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는데, 포유류 세포(예를 들어, 인간, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있다. 바람직하게는 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있다. 보다 바람직하게는 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50), λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백신시아 바이러스(vaccinia virus), 배쿨로바이러스(baculovirus) 등이 될 수 있다.
- [0059] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체

를 제공한다.

- [0060] 본 발명에서 제공하는 상기 발현벡터가 도입될 수 있는 숙주세포는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서 상기 펩티드를 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는데, 바람직하게는 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 포유류 동물 세포가 될 수 있다.
- [0061] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 상기 펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0062] 구체적으로, 본 발명의 펩티드를 제조하는 방법은
- [0063] a) 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및
- [0064] b) 상기 형질전환체를 배양하고 이로부터 상기 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0065] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 펩티드를 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0066] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 펩티드는 생체 내의 비정상적인 혈류 흐름에 의해 발생하는 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있으므로, 기능이상 혈관내피세포에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환을 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0067] 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.
- [0068] 본 발명에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 상기 정의된 광범위한 심혈관계 질환 중에서도 기능이상 혈관내피세포에 의해 유발되는 질환을 의미하는 것으로 해석될 수 있는데, 바람직하게는, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환, 심근경색증 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 동맥경화증이 될 수 있다.
- [0069] 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.
- [0070] 본 발명에서 제공하는 심혈관계 질환 진단용 조성물은 유효성분으로서 상기 서열번호 3, 8, 9 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 포함할 수 있다. 상기 펩티드는 생체내에서 기능이상 혈관내피세포에 결합하므로, 상기 펩티드의 결합여부를 확인하기 위하여 다양한 형광물질 또는 방사성 물질로 표지될 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 형광물질로는 로다민(rhodamine), 탐라(TAMRA) 등을 포함하는 로다민계; 플루오세인, FITC(fluorescein isothiocyanate), FAM(fluorecein amidite) 등을 포함하는 플루오세인계(fluorescein); 보디피계(bodipy, boron-dipyrromethene); 알렉사플로어제(alexa fluor); 및 Cy3, Cy5, Cy7, 인도시아닌그린을 포함하는 시아닌계(cyanine) 등의 염료를 사용할 수 있고, 방사성 물질로는 ^{131}I , ^{125}I , ^{124}I , ^{64}Cu , ^{68}Ga , $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 등을 사용할 수 있다.
- [0071] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 펩티드 또는 조성물을 포함하는 심혈관계 질환의 진단용 키트를 제공한다.
- [0072] 본 발명의 키트는 생체 내의 혈관내피세포에 상기 펩티드의 결합 여부를 확인함으로써 심혈관계 질환을 진단하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 펩티드의 결합여부를 확인하는데 필요한 한 종류 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.
- [0073] 구체적인 일례로서, 본 발명에 따른 심혈관계 질환의 진단용 키트는 검출가능한 형광을 발생시키는 형광물질이

결합된 펩티드와 상기 펩티드로부터 발생되는 형광을 검출할 수 있는 검출 장치를 포함할 수 있다. 또한, 상기 검출 장치에서 측정된 형광값을 보정하기 위한 보정 수단을 추가로 포함할 수 있다.

[0074] 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 검출가능한 방사능 신호를 발생시키는 방사성 물질이 결합된 펩티드와 상기 펩티드로부터 발생되는 방사능 신호를 검출할 수 있는 검출 장치를 포함할 수 있다. 또한, 생체 내에서 상기 방사능 신호를 보다 효과적으로 검출하기 위하여 혈관조영제를 추가로 포함할 수 있다.

[0075] 또한 본 발명의 범주에는 상기 펩티드 또는 조성물을 사용하여 기능이상 혈관내피세포를 검출하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환을 진단하는 방법이 포함된다.

[0076] 본 발명에 따른 진단 방법은

[0077] a) 심혈관계 질환이 의심되는 개체의 시료를 상기 진단용 조성물에 포함된 펩티드와 반응시켜 기능이상 혈관내피세포에 결합시키는 단계;

[0078] b) 기능이상 혈관내피세포에 결합된 펩티드의 수준을 측정하는 단계; 및

[0079] c) 측정된 기능이상 혈관내피세포에 결합된 펩티드의 수준을 정상 대조군 시료에서 측정된 수준과 비교하여 이보다 증가하면 심혈관계 질환으로 판정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0080] 상기에서 기능이상 혈관내피세포에 결합된 펩티드의 수준은 상기 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 측정될 수 있으며, 이들로 제한되는 것은 아니지만, 상기 측정은 단백질칩 분석, 면역측정법, 리간드 결합분석, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), 방사선면역분석, 방사면역확산법, 오우크테로니 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)를 이용하여 이루어질 수 있다.

[0081] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 펩티드, 비펩티드성 중합체 및 표적 약물이 결합된, 심혈관계 질환의 예방 또는 치료를 위한 약물 전달 복합체를 제공한다.

[0082] 본 발명의 용어 "복합체"란, 상기 펩티드와 특정 조직 또는 세포에 전달하고자 하는 표적 약물이 비펩티드성 중합체에 의해 공유적으로 결합된 물질을 의미한다. 여기서, "표적 약물"은 본 발명에 따른 펩티드에 의해 혈관내피세포로 전달될 수 있는 임의의 치료학적 효과를 갖는 약물이다. 바람직하게는 상기 표적 약물은 심혈관계 질환의 예방 또는 치료효과를 나타내는 유효성분으로서 각종 심혈관계 질환 특이적인 치료제일 수 있다. 예를 들면, 이로 제한되는 것은 아니지만, 상기 유효성분은 siRNA, microRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있고, 바람직하게는 상기 siRNA, microRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 동맥경화증을 촉진하는 인자로 알려진 대표적인 세포접착분자인 VCAM-1 또는 ICAM-1의 발현을 특이적으로 억제하는 것일 수 있다.

[0083] 본 명세서에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로서 제공된다.

[0084] 본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스 가닥(예컨대 VCAM-1 또는 ICAM-1 mRNA 서열에 상응하는 (corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(예컨대 VCAM-1 또는 ICAM-1 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일체 구조를 가질 수 있다.

[0085] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다.

[0086] siRNA 말단 구조는 예컨대 VCAM-1 또는 ICAM-1 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

- [0087] 본 발명에서 siRNA 분자는, 자기-상보성 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자 내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-루프(stem and loop) 구조를 형성하게 된다. 이 스템-루프 구조는 시험관 내 또는 생체 내에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.
- [0088] 본 발명에서 "microRNA"는 세포 내에 존재하는 작은 RNA(endogenous small RNA)의 일종으로 단백질을 합성하지 않는 DNA에서 유래되어 헤어핀-구조 전사체(hairpin-shaped transcript)로부터 생성되는 RNA 분자이다. miRNA는 표적 mRNA의 3'-UTR의 상보적 서열에 결합하여 표적 mRNA의 번역 억제 또는 불안정화를 유도함으로써, 궁극적으로 표적 mRNA의 단백질 합성을 억제하는 억제자(repressor) 역할을 하게 된다. 성숙한 microRNA 분자는 하나 이상의 mRNA에 부분적으로 상보적이며, 그 주요 기능은 유전자 발현을 하향조절하는 것(down-regulate)이다. 일반적으로 microRNA는 유전자 발현을 조절하는 약 21 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이의 단일 가닥 RNA 분자를 지칭한다.
- [0089] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 서열은, 예컨대 VCAM-1 또는 ICAM-1 mRNA에 상보적이고 VCAM-1 또는 ICAM-1 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, VCAM-1 또는 ICAM-1 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.
- [0090] 본 발명에 따른 복합체에서 "비펩티드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩티드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 본 발명에 사용가능한 비펩티드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜이다.
- [0091] 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다. 비펩티드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위인 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 펩티드와 결합되는 비펩티드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [0092] 본 발명에 사용되는 비펩티드성 중합체는 본 발명에 따른 펩티드 및 표적 약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다. 상기 비펩티드성 중합체의 양 말단 반응기의 종류에는 알데히드기, 프로피온알데히드기, 부틸알데히드기, 말레이미드(maleimide)기 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 하이드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩티드성 중합체가 양 말단에 알데히드기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하면서 비펩티드성 중합체의 양 말단에서 본 발명에 따른 펩티드 및 표적 약물과 각각 결합하는 데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아마이드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다.
- [0093] 상기 비펩티드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드기를, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온알데히드기 또는 부틸알데히드기를 가질 수 있다. 양쪽 말단에 히드록시기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 비펩티드성 중합체로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 본 발명의 약물 전달 복합체를 제조할 수 있다.
- [0094] 간략하게, 본 발명에 따른 약물 전달 복합체는
- [0095] a) 본 발명에 따른 펩티드와 비펩티드성 중합체를 반응시켜 펩티드-접합 중합체를 제조하는 단계;
- [0096] b) 상기 펩티드-접합 중합체를 표적 약물과 반응시켜 펩티드-접합 중합체/표적 약물 복합체를 제조하는 단계에 의해 수득될 수 있다.

- [0097] 상기에서 펩티드-접합 중합체는 문헌(Son S, Singha K, Kim WJ. Biomaterials 31: 6344-6354, 2010)에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0098] 또한 펩티드-접합 중합체와 표적 약물(예컨대, siRNA)를 10 내지 30 범위, 바람직하게는 1:10, 1:20 또는 1:30의 N/P 비율로 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0099] 본 발명의 일 실시예에서는, 와류성 혈류에 의해 유도된 기능이상 ECs에 대한 특이적 표적으로서 선별된 본 발명에 따른 펩티드의 효능을 평가하기 위해, 시험관 내에서 DESPs-접합 중합체(DESPs-conjugated polymer)를 이용한 siRNA 내재화(internalization)를 확인하였다. 그 결과, CCLIRTSIC- 및 CPRRSHPIC-접합 중합체 모두 LSS 조건에 비하여 OSS 조건에서 siGLO의 내재화가 대부분 증가함을 확인하였다(도 8b 참고). 상기 결과는 본 발명에 따른 DESPs인 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC가 와류성 혈류 상태에서 기능이상 ECs에 대하여 약물 또는 유전자를 부위 특이적으로 전달할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0100] 이에 본 발명자들은 본 발명에 따른 DESPs가 생체 내 유전자 전달에 있어 유망한 펩티드 서열인 것으로 판단하고 이를 이용하여 부분 경동맥 결찰 마우스에서 기능이상 ECs로의 유전자 전달 효율을 확인하였다. 이를 위해 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-접합 중합체를 각각 제조한 후 항-세포간 접합분자-1 siRNA(siICAM-1)와 10 내지 30 범위의 N/P 비율로 혼합하고 반응시켜 CLIRRTSIC-접합 중합체/siICAM-1 복합체와 CPRRSHPIC-접합 중합체/siICAM-1 복합체를 제조하였다.
- [0101] 상기와 같이 제조된 DESPs-접합 중합체/siRNA 복합체를 마우스 정맥 내로 주입한 후 경동맥의 ECs에서 ICAM-1 mRNA 수준을 측정된 결과, CLIRRTSIC-접합 중합체/siICAM1 복합체는 결찰된 LCA와 같은 와류성 혈류 영역의 내피로 귀소하여 ICAM1 mRNA 발현을 감소시킴을 확인하였다(도 9 참조).
- [0102] 상기 결과는 본 발명에 따른 DESPs가 와류성 혈류로 유도된 기능이상 ECs로의 약물 또는 유전자 전달을 위한 특이적 표적 펩티드가 될 수 있으며, 따라서 초기 동맥경화증 병소의 기능이상 ECs로 목적하는 약물 또는 유전자의 특이적 국소 전달에 유용할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0103] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 펩티드는 생체 내의 비정상적인 혈류 흐름에 의해 발생하는 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 심혈관계 질환의 예방 또는 치료효과를 나타내는 유효성분과 상기 펩티드를 결합시킨 복합체를 사용할 경우, 상기 복합체에 포함된 펩티드가 유효성분을 기능이상 혈관내피세포로 유도하게 되어, 기능이상 혈관내피세포에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환을 조기에 검출하여 심혈관계 질환의 발병을 예방하는데 사용할 수 있고, 기능이상 혈관내피세포에 각종 심혈관계 질환 특이적인 치료제를 표적 특이적으로 전달하여 심혈관계 질환을 효과적으로 치료하는데 사용할 수 있다.
- [0104] 따라서 본 발명의 범주에는 상기 약물 전달 복합체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 포함된다.
- [0105] 본 발명의 용어 "예방"이란, 상기 약학 조성물의 투여에 의해 심혈관계 질환에 의한 증상을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0106] 본 발명의 용어 "치료"란, 상기 약학 조성물의 투여에 의해 심혈관계 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0107] 상기 결합체에 포함되는 본 발명의 약물 전달 복합체의 함량은 이들의 용도 및 제형에 따라 당업자가 용이하게 선택할 수 있다.
- [0108] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 상기 복합체에 포함되는 유효성분뿐만 아니라 질환의 종류, 사용목적, 질환의 진행수준, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 통상적인 심혈관계 질환 치료제의 투여량 범위에 부합되도록 본 발명의 약학 조성물은 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 하루 동안 10 내지 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 투여할 수 있고, 보다 바람직하게는 50 내지 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 투여할 수 있으며, 가장 바람직하게는 100 내지 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 투여할 수 있다. 상기 약학 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 내지 3회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0109] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제,

현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0110] 상술한 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 약물 전달 복합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 심혈관계 질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0111] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 심혈관계 질환이 발병될 가능성이 있거나, 또는 발병된 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 심혈관계 질환을 완화 또는 치료할 수 있다.

[0112] 본 발명의 용어 "완화"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여로 심혈관계 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0113] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0114] 본 발명의 심혈관계 질환을 치료하는 방법에 있어서, 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0115]

발명의 효과

[0116] 본 발명에 따른 펩티드는 생체 내의 비정상적인 혈류 흐름에 의해 발생하는 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합할 수 있으므로, 기능이상 혈관내피세포에 의해 유발되는 각종 심혈관계 질환의 진단에 효과적으로 적용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드는 기능이상 혈관내피세포에 표적 약물을 특이적으로 전달할 수 있어 심혈관계 질환의 예방 또는 치료를 위한 약물 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0117] 도 1은 파아지 디스플레이 분석 횟수에 따른 파아지의 개수를 나타내는 그래프이다.

도 2는 혈류 전단응력의 차이로 인하여 유발되는 세포 형태의 변화 및 동맥경화증 관련 유전자의 발현 수준 변화를 비교한 사진이다. 도 2의 A는 마우스 동맥 내피세포인 iMAECs에 혈류 전단응력을 가하지 않은 대조군(static), 혈류 전단응력(LSS 또는 OSS)을 가한 실험군의 세포 형태를 나타내는 사진이다. 도 2의 B는 마우스 동맥 내피세포인 iMAECs에 혈류 전단응력을 가하지 않은 대조군(static), 혈류 전단응력(LSS 또는 OSS)을 가한 실험군에서 발현되는 동맥경화증 관련 유전자의 발현 수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이다. 도 2의 C는 인

간 제대정맥 내피세포인 HUVECs에 혈류 전단응력을 가하지 않은 대조군(static), 혈류 전단응력(LSS 또는 OSS)를 가한 실험군의 세포형태를 나타내는 사진이다. 도 2의 D는 인간 제대정맥 내피세포인 HUVECs에 혈류 전단응력을 가하지 않은 대조군(static), 혈류 전단응력(LSS 또는 OSS)를 가한 실험군에서 발현되는 동맥경화증 관련 유전자의 발현 수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 혈류 전단응력이 처리된 내피세포에 DESPs를 발현하는 파아지를 가하고 면역형광염색을 수행한 결과를 나타내는 사진 및 상기 내피세포에 결합된 파아지의 결합 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3의 A는 각각의 혈류 전단응력이 처리된 마우스 동맥 내피세포인 iMAECs에 DESPs를 발현하는 파아지를 가하고 면역형광염색을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 3의 B는 각각의 혈류 전단응력이 처리된 인간 제대정맥 내피세포인 HUVECs에 DESPs를 발현하는 파아지를 가하고 면역형광염색을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 3의 C는 각각의 혈류 전단응력이 처리된 마우스 동맥 내피세포인 iMAECs에 DESPs를 발현하는 파아지를 가하고 상기 내피세포에 결합된 파아지의 결합 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3의 D는 각각의 혈류 전단응력이 처리된 인간 제대정맥 내피세포인 HUVECs에 DESPs를 발현하는 파아지를 가하고 상기 내피세포에 결합된 파아지의 결합 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델에서 부분 결찰에 의한 혈류 전단응력 변화에 따른 동맥경화증 유발 인자의 발현 및 동맥경화증 유발을 확인한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 4의 A는 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델의 좌측 경동맥(LCA)과 우측 경동맥(RCA)에서 동맥경화증을 촉진하는 인자로 알려진 대표적인 세포접착분자인 VCAM-1과 ICAM-1의 발현 수준을 En face 염색법으로 확인한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 4의 B는 상기 LCA와 RCA의 단면을 조직염색하여 동맥경화반의 형성여부를 확인한 사진이다.

도 5a는 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델로부터 유래된 LCA와 RCA의 내피세포에 DESPs를 발현하는 파아지를 가하고 En face 염색법으로 염색한 결과를 나타내는 사진이다.

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

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

도 6a 내지 6c는 마우스 대동맥의 다양한 영역에서 내피에 대한 생체 내 파아지 결합을 나타낸 것으로, CLIRRTSIC 또는 CPRRSHPIC-발현 파아지(2×10^{11} pfu)를 LCA 결찰 후 3일째에 C57BL/6 마우스에 정맥 내로 주사하고 3시간 동안 순환시켰다. 도 6a는 마우스의 대동맥으로, 대동맥을 상이한 벽 전단응력 분포에 따라 4가지 영역으로 구분하였다: 분기점(BA), 대만곡(GC), 소만곡(LC) 및 흉대동맥(TA). 도 6b 및 6c에서는 대동맥을 적출하고 En face 염색($\times 40$ 배율)에 의해 파아지 결합의 수준을 비교하였다. 파아지 결합을 공초점현미경을 사용하여 대동맥의 분기점(BA), 대만곡(GC), 소만곡(LC) 및 흉대동맥(TA)에서 관찰하였다(적색: 파아지, 청색: 핵, 녹색: 혈관의 탄력층).

도 7a 내지 7c는 인간 조직에서의 파아지 결합을 나타내는 것으로, 인간 조직의 냉동 절편을 2×10^{11} pfu의 CLIRRTSIC 또는 CPRRSHPIC-발현 파아지와 3시간 동안 인큐베이션하였다. 도 7a는 분리된 인간 폐동맥의 전체 형태(상부)를 나타낸 것으로, 인간 폐동맥을 중심점에서 곧은(straight) L 부분과 가지를 갖는 R 부분으로 구분하였다(하부). 도 7b 및 7c는 인간 조직에서 파아지 결합의 검출을 위한 면역형광염색을 나타낸 것으로, 결합된 파아지를 항-M13 박테리오파아지 항체(적색)으로 염색하고 핵 염색은 DAPI(청색)를 이용하였다. 녹색 신호는 혈관 내 탄력층으로부터의 자가형광을 나타낸다. 파아지 결합을 상이한 벽 전단응력을 갖는 3개의 영역에서 비교하였다: L 부분의 LSS 및 OSS 영역과, R 부분의 가지 영역. 대표적인 이미지를 나타내었다.

도 8a 및 8b는 와류성 혈류 하에서 내피세포에 대한 합성 펩티드의 생체 내 활성 평가를 나타낸 것으로, HUVECs를 48시간 동안 유동 조건 또는 정적 조건에 노출시켰다. 도 8a는 와류성 혈류 하에서 기능이상 ECs에 대한 펩티드의 결합을 나타내는 것으로, 세포를 비오틴-표지된 대조군 CLNQTAIC, CCLIRRTSIC 또는 CPRRSHPIC 펩티드와 4시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 펩티드를 스트렙타비딘 접합된 Qdot(녹색)으로 염색하였고 DAPI(청색)를 이용해 핵 염색을 수행하였다($\times 10$ 배율). 도 8b는 펩티드-접합 중합체를 사용한 siRNA의 세포 내 이입을 나타내는 것으로, 세포를 대조군 CLNQTAIC-, CCLIRRTSIC- 또는 CPRRSHPIC-접합 중합체/siGLO 복합체와 상이한 N/P

비율로 4시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간 후, siGLO(적색)의 내재화를 면역형광현미경으로 검출하였다. DAPI(청색)는 핵 염색을 위해 상용되었다($\times 10$ 배율).

도 9는 펩티드-접합 중합체를 이용한 기능이상 ECs로의 siRNA의 생체 내 전달을 나타낸 것으로, CLIRRTSIC-, CPRRSHPIC- 또는 대조군 펩티드 CLNQQTATIC-접합 중합체와 siICAM1를 혼합하여 복합체를 형성하였다. 각각의 펩티드-접합 중합체/siICAM1 복합체를 부분 경동맥 결찰 후 3일째에 마우스의 정맥 내로 주사하였다. 주사하고 24 시간 후, 경동맥으로부터 ECs 내 총 RNA를 추출하고 정량하였다. ICAM1 mRNA 수준을 실시간-qPCR을 이용해 측정하였다. 막대는 3회의 개별 실험의 평균 $\pm$ SD로서 ECs 내 ICAM1 mRNA의 수준을 나타내는 것이다. *는 유의미한 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예 1: 생체 내 스트리닝을 통한 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합하는 펩티드의 선별

와류성 혈류에 의한 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합하는 펩티드를 선별하기 위하여, 혈류 진단능력을 변화시킨 동물 모델에서 생체 내 파아지 디스플레이를 수행하였다.

<1-1> 혈류 진단능력을 변화시킨 동물 모델의 제작

혈류 진단능력을 변화시킨 동물 모델로서 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델을 제작하였다.

구체적으로, 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 대상으로 좌측 경동맥(LCA)의 가지 중에서 상감상선동맥(superior thyroid artery)을 제외한 나머지 혈관들을 결찰시켜서 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델을 제작하였다. 상기 마우스 모델은 결찰된 좌측 경동맥이 급격하게 느린 와류성 혈류에 노출됨으로써 혈관내피세포의 기능 이상이 유발되고 2주 이내에 급성으로 동맥경화증이 유발되는 동물 모델이다.

<1-2> 생체 내 파아지 디스플레이 분석

상기 실시예 <1-1>에서 제작한 동물 모델과 Ph.D-C7C 파아지 디스플레이 펩티드 라이브러리 키트(New England Biolabs, Inc.)를 사용하여 생체 내 파아지 디스플레이 분석을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 제작한 마우스 모델의 꼬리정맥을 통해 상기 마우스 모델의 결찰된 좌측 경동맥(LCA, 123 case) 또는 결찰시키지 않은 우측 경동맥(RCA, 107 case)에 상기 키트의 7개의 아미노산으로 구성된 무작위 펩티드 라이브러리를 포함하는 파아지를 1×10^{11} pfu의 용량으로 주사하고, 10분간 생체 내 패닝(in vivo panning)을 수행하였다. 그런 다음, 상기 마우스 모델을 마취시키고, 생리식염수를 사용하여 결합하지 않은 파아지를 세척하였다. 경동맥 혈관내피에 결합한 파아지는 산성의 파아지 용출 완충액을 사용하여 분리하고, 알카리성의 Tris-HCl 30 μ l로 중화시켰다. 중화된 파아지 용액을 대장균 ER2738 균주에 감염시켜서 적정(titration)을 수행하고, 2회차 파아지 디스플레이 분석에 적용하기 위하여 증폭시켰다. 이러한 과정을 총 3회 반복 수행하고, 각 회수별로 얻어진 파아지의 개수를 비교하였다(도 1).

그 결과, 도 1에서 보듯이, 파아지 디스플레이 분석 횟수가 증가할 수록 LCA에 결합된 파아지의 개수는 증가하는 반면, RCA에 결합된 파아지의 개수는 크게 변화되지 않음을 알 수 있었다.

최종적으로 수득한 파아지 용액을 대장균 ER2738 균주에 감염시키고, 감염된 균주를 LB/IPTG/X-gal 플레이트에서 배양하여 청색을 나타내는 콜로니를 수득하였다. 상기 콜로니로부터 수득한 균주를 배양하고, 이로부터 파아지 DNA를 수득한 다음 이들의 서열을 분석하였다. 그로부터 혈관의 내피세포에 결합하는 40개 펩티드의 아미노산 서열을 결정하고, LCA와 RCA에서 이들의 빈도를 비교하였다(표 1).

[0129]

마우스 모델의 LCA와 RCA에서 측정된 펩티드의 빈도

서열번호	펩티드	LCA	RCA	서열번호	펩티드	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	CNLLLRTOC	5	1	28	CPIRHRPIC	1	
9	CPRRSHPIC	4		29	CRTMRIRLC	1	
10	CLHPPLTLC	6	2	30	CMRQRRNRC		2
11	CKMNIRLSC	2		31	CPRRLKRC		1
12	CILRKIRPC	4	4	32	CHQLPIRPC		1
13	CSRRTSIC	1	1	33	CPIKTTITC		1
14	CLIRLILQC	1	2	34	CRRQTSTHC		1
15	CRMKTLRC	1	1	35	CNPMTRLIC		2
16	CQPHHSIIC	1	1	36	CPIRHRPIC		1
17	CSTHIPSHC	1	1	37	CTLHKSRSRSC		1
18	CILRRRKRC	1	1	38	CTRIISNTC		1
19	CSIRIHRRC	1		39	CKLINTLKC		1
20	CSLRRHPIC	1		40	CQMTRSTIC		1

[0130]

상기 표 1에서 보듯이, 혈관내피세포에 결합하는 40개의 펩티드 중에서 유의한 빈도(3회 이상의 빈도)를 나타내어 혈관내피세포에 특이적인 결합활성을 나타내는 펩티드는 서열번호 1 내지 10 및 12의 11개 펩티드임을 확인하였다. 또한, 상기 11개의 펩티드 중에서 LCA에만 결합하거나(서열번호 9) 또는 LCA에 대한 결합빈도가 RCA에 대한 결합빈도보다 높은 수준을 나타내는(서열번호 3, 4, 5, 8 및 10) 펩티드는 6개 펩티드임을 확인하였다. 이들 확인된 6개 펩티드를 기능이상 혈관내피세포에 특이적인 펩티드(Dysfunctional Endothelial cells-Specific Peptides, DESPs)로 선별하였다.

[0131]

<1-3> DESPs의 생물정보 분석(Bioinformatic analysis)

[0132]

상기 선별된 6종의 DESPs(서열번호 3, 4, 5, 8, 9 및 10)를 2개씩 조합한(P1 및 P2) 조합물을 대상으로 생물정보 분석을 수행하여, 펩티드 1 및 2의 서열을 모두 포함하는 상동 단백질에 대한 정보를 획득하였다(표 2).

표 2

[0133]

6종의 DESPs에 대한 생물정보 분석 결과

펩티드 (서열번호)		마우스의 상동 단백질	인간의 상동 단백질
P1	P2		
10	9	latent-transforming growth factor beta-binding protein 2(LTBP2) histone-lysine methyltransferase(MLL4) germ cell-specific gene protein(GSG1)	MLL4 Bcl-2-binding component 3(JFY-1) methyl-CpG-binding domain protein 6
10	3	pro-interleukin-16(IL16) ERI1 exoribonuclease 2(ERI2)	
10	4	vacuolar protein sorting-associated protein 13C(VP13C)	dystonin
10	8	VP13C	dystonin

8	4	VP13C	dystonin mTERF domain-containing protein 3(mTERF2) Rap1 GTPase-activating protein 1(Rap1GAP)
3	5		cadherin-5 precursor(VE-cadherin) AMP deaminase 1
8	5		mitochondrial glutamate carrier 2(GC-2) tankyrase-2(TANK2)
10	5		LTBP2
3	4		MLL4
8	9		periphilin-1(gastric cancer antigen Ga50)
4	9		dynein heavy chain domain-containing protein 1(DHCD1)

[0134] 실시예 2: 혈관내피세포에 특이적으로 결합하는 펩티드(DESPPs)의 작용 효과에 대한 시험관 내 분석

[0135] 선별된 6개 종류의 DESPPs가 와류성 혈류에 의한 기능이상 혈관내피세포에 대해 특이성을 가지는지 여부를 확인하기 위해, 각각의 DESPP를 발현하는 파아지를 제작하고, 이들을 배양된 마우스 혈관내피세포인 iMAECs와 인간 혈관내피세포인 HUVECs에 처리하여 결합 활성을 측정하였다.

[0136] <2-1> 내피세포에 혈류 전단응력이 미치는 효과 분석

[0137] 마우스 동맥 내피세포인 iMAECs에 10% FBS와 50 g/ml 내피세포 성장 보충제(endothelial cell growth supplement, ECGS), 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 저당(low glucose) DMEM 배양액을 가하고 37℃, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 또한, 인간 제대정맥 내피세포인 HUVECs에 5% FBS와 LSGS(low-serum growth)를 포함하는 배양액 200 ml를 가하고, 37℃, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 상기 배양된 iMAECs와 HUVECs에 점도계(cone and plate viscometer)를 사용하여 혈류 전단응력을 가하였다. 이때, 혈류 전단응력은 정상적인 혈류 흐름과 유사한 층상(laminar) 전단응력(LSS, 25 dyne/cm²)과, 병적 상태의 와류와 유사한 진동(oscillatory) 전단응력(OSS, ±5 dyne/cm²) 조건 하에서 48시간 동안 처리하였다. 상기 LSS 또는 OSS가 처리된 세포의 형태를 현미경하에서 관찰하고, 동맥경화증 관련 유전자인 항염증 유전자(eNOS 또는 KLF2) 및 염증유발 유전자(VCAM1, ICAM1 및 MCP-1)의 발현 수준의 변화를 비교하였다(도 2).

[0138] 도 2에서 보듯이, 세포의 형태적인 면에서 살펴보면, 정상적인 혈류 흐름인 LSS 상태에서 혈관내피세포는 전단응력 흐름의 방향과 같은 방향으로 형태가 길어지는 것을 관찰할 수 있었지만, 비정상적인 OSS 상태에서는 불규칙한 방향성을 나타냄을 확인하였다. 또한, 동맥경화증 관련 유전자의 발현 수준의 측면에서 살펴보면, LSS 상태에서는 eNOS와 KLF2와 같은 항염증 유전자의 발현이 증가하는 반면, OSS 상태에서는 VCAM1, ICAM1, MCP1과 같은 염증유발 유전자의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0139] 상기 결과로부터 혈류 전단응력에 의하여 동맥경화증이 유발될 수 있음을 알 수 있다.

[0140] <2-2> 혈류 전단응력이 처리된 내피세포에 대한 DESPPs의 작용 효과

[0141] 상기 실시예 <2-1>에서 수득한 각각의 내피세포에 상기 실시예 <1-2>에서 선별한 6종의 DESPPs를 발현하는 각각의 파아지를 6×10⁶ pfu로 처리하고, 세포배양기에서 1시간 동안 반응시킨 후, 결합하지 않은 파아지들을 PBS로 세척하였다. 이어, 상기 각각의 내피세포에 4% 파라포름알데이드 용액을 처리하여 고정하고, PBS로 세척한 다음, 0.2% Triton-X를 포함하는 PBS로 20분간 처리하고, 다시 PBS로 세척하였다. 그런 다음, 상기 내피세포에 10% 당나귀 혈청(donkey normal serum)을 포함하는 용액을 처리하고 1시간 동안 반응시켜 블로킹(blocking)한 다음, M13 박테리오파아지에 대한 1차 항체를 처리하여 4℃에서 밤새 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 내피세포를 PBS로 수 차례 세척하고, 2차 항체(donkey anti-mouse IgG-FITC)를 처리한 다음 30분간 실온에서 반응시키고, DAPI로 대조염색을 수행하여 상기 내피세포의 세포핵을 염색하였다. 염색이 종료된 후, 상기 내피세포

를 PBS로 세척하고, 공초점현미경으로 Static, LSS 및 OSS 상태에서 배양된 혈관내피세포에 대한 파아지의 결합 정도를 비교 관찰하였다(도 3).

[0142] 그 결과, 도 3에서 보듯이, iMAEC 세포에서는 서열번호 3(CLIRRTSIC), 서열번호 8(CNLLLRQTQC) 및 서열번호 9(CPRRSHPIC)의 펩티드를 발현하는 파아지의 결합 수준이 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 증가되고, HUVEC 세포에서는 서열번호 3(CLIRRTSIC), 서열번호 8(CNLLLRQTQC), 서열번호 10(CLHPPLTLC) 및 서열번호 9(CPRRSHPIC)의 펩티드를 발현하는 파아지의 결합 수준이 LSS에 비해 OSS 상태에서 현저하게 증가됨을 확인하였다.

[0143] 따라서, 혈류 진단능력을 변화시킨 경동맥 부분 결찰 동물 모델에서 생체 내 파아지 디스플레이를 통해 선별된 DESPs는 와류성 혈류에 의해 유도된 기능이상 혈관내피세포에 특이적으로 결합함을 알 수 있었다.

[0144] **실시예 3: 혈관내피세포에 특이적으로 결합하는 펩티드(DESPs)의 작용 효과에 대한 생체 내 분석**

[0145] 상기 실시예 <1-2>에서 선별된 6종의 DESPs 중에서 혈류 진단능력이 처리된 내피세포에 결합하는 것은 4종의 DESPs임을 시험관 내 분석에 의해 확인하였으므로, 상기 확인된 4종의 DESPs가 생체 내에서도 동일한 효과를 나타내는지의 여부를 확인하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[0146] **<3-1> 내피세포에 혈류 진단능력이 미치는 효과 분석**

[0147] 상기 실시예 <1-1>에서 제작한 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델에서 결찰된 좌측 경동맥 부분(LCA)과 결찰되지 않은 우측 경동맥 부분(RCA)에서 어떠한 차이가 나타나는지를 En face 염색법을 사용하여 확인하였다.

[0148] 구체적으로, 상기 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델에서 좌측 경동맥(LCA)과 우측 경동맥(RCA)을 각각 적출하였다. 상기 적출한 LCA와 RCA를 PBS로 세척하고, 0.2% Triton-X가 포함된 PBS에 20분간 침지한 후 다시 PBS로 세척하였다. 그런 다음, LCA 및 RCA를 블로킹 용액(10% donkey normal serum)에 1시간 동안 침지하여 블로킹시키고, 동맥경화증을 촉진하는 인자로 알려진 대표적인 세포접착분자인 VCAM-1 또는 ICAM-1에 대한 각각의 1차 항체를 처리한 다음, 4℃에서 밤새 반응시켰다. 반응이 종료된 후, LCA 및 RCA를 PBS로 세척하고, 2차 항체인 당나귀 항-마우스 IgG-R를 처리한 다음, 실온에서 2시간 동안 반응시키고, 세포핵 염색을 위해 DAPI로 대조염색을 실시하였다. 끝으로, 상기 LCA 및 RCA를 PBS로 세척하고, 공초점현미경을 이용하여 LCA 및 RCA에서 발현된 VCAM-1 또는 ICAM-1의 발현 수준을 비교 관찰하였다(도 4의 A).

[0149] 그 결과, 도 4의 A에서 보듯이, RCA 보다는 LCA에서 동맥경화증을 촉진하는 인자로 알려진 대표적인 세포접착분자인 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현이 증가됨을 확인하였다.

[0150] 한편, 상기 LCA와 RCA의 단면을 조직염색하여 현미경으로 관찰하였다(도 4의 B). 그 결과, 도 4의 B에서 보듯이, LCA는 와류성 혈류에 노출되어 결찰하지 않은 RCA에 비해 동맥경화반이 형성됨을 확인하였다.

[0151] 상기 도 4의 결과를 종합하면, 와류성 혈류가 혈관내피세포의 기능이상의 주요 유발인자이며 동맥경화증의 진행을 촉진함을 알 수 있었다.

[0152] **<3-2> 와류성 혈류에 노출된 내피세포에 대한 DESPs의 작용 효과**

[0153] 상기 실시예 <1-1>에서 제작한 좌측 경동맥 부분 결찰 마우스 모델의 꼬리정맥을 통해 상기 실시예 <1-2>에서 선별한 6종의 DESPs를 발현하는 각각의 파아지를 주사하고, 10분간 시험관 내 패닝을 수행한 다음, 마우스를 희생시켰다. 상기 희생된 마우스의 좌심실에 10 U/ml의 헤파린이 포함된 생리식염수를 주사하여 마우스의 체내를 세척하고, 4% 파라포름알데하이드 용액을 처리하여 고정시킨 다음, 생리식염수로 세척하였으며, 이로부터 LCA와 RCA를 각각 적출하였다. 적출된 LCA와 RCA를 PBS로 세척하고, 0.2% Triton-X를 포함하는 PBS를 처리하여 20분간 반응시켰으며, 다시 PBS로 세척하고, 10% 당나귀 정상 혈청 용액을 처리하여 1시간 동안 블로킹시켰다. 그런 다음, M13 박테리오파아지에 대한 1차 항체를 처리하고, 4℃에서 밤새 반응시킨 후, PBS로 세척하고, 2차 항체인 당나귀 항-마우스 IgG-R를 처리하여 2시간 실온에서 반응시켰으며, DAPI로 대조염색을 수행하여 상기 내피세포의 세포핵을 염색하였다. 끝으로, PBS로 세척하고, 공초점현미경으로 LCA와 RCA의 내피세포에 대한 파아지의 결합 정도를 비교 관찰하였다(도 5a).

- [0154] 그 결과, 도 5a에서 보듯이, 6종의 DESPs 중에서 서열번호 3(CLIRRTSIC), 8(CNLLLRQTQC), 9(CPRRSHPIC) 및 10(CLHPPLTLC)의 펩티드를 발현하는 4종의 파아지가 특이적으로 LCA에 결합하고, RCA에는 결합하지 않음을 확인하였다.
- [0155] 따라서, 상기 선별된 4종의 DESPs가 시험관 내 뿐만 아니라 생체 내에서도 혈관내피세포에 대한 결합활성을 나타내고, 동맥경화증이 유발될 가능성이 있는 혈관의 내피세포에 특이적으로 결합할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0156] 또한, 도 5b 및 5c에 나타난 바와 같이, z 스택 이미지화를 통해 파아지-양성 입자가 ECs의 세포 내강 표면에 위치하는 것을 확인할 수 있었다. 나아가, 경동맥 결찰 모델에 정맥 투여 후 다양한 장기에서 파아지의 개수를 적정함으로써, 선별된 DESP-발현 파아지의 생체 내 분포를 추가로 조사하였다. 도 5d에 나타난 바와 같이, 선별된 DESP-발현 파아지는 다른 장기가 아닌, 결찰된 LCA의 기능이상 내피세포를 주된 표적으로 함을 알 수 있다.
- [0157] 상기 결과는 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-발현 파아지가 와류성 혈류로 유도된 기능이상 ECs에 효과적이고 특이적으로 결합한다는 것을 보여준다.
- [0158] **실시예 4: 마우스의 대동맥 내피세포로 선별된 펩티드 발현 파아지의 결합 분석**
- [0159] 상기 실시예 3에서 사용된 부분 경동맥 결찰 모델은 와류성 혈류로 인한 급성 동맥경화증 유도 모델이었다. 이어서 본 발명자들은 해부적 및 생리적으로 다양한 벽 전단응력(wall shear stress)에 노출된 대동맥 조직에서 DESP-발현 파아지의 결합을 확인하였다. 대동맥의 다양한 위치에서 ECs에 대한 파아지의 결합을 비교하였는데, 구체적으로 호 맥관(arch vessels)의 분기점(BA), 대만곡(GC), 소만곡(LC) 및 흉대동맥(TA)에 대하여 비교하였다.
- [0160] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, 상기 위치에서는 다양한 혈류 패턴에 의해 유도되는 벽 전단응력이 상이하였다. 아테로프론(atheroprone) 지역에 대응하는 BA 및 아치(arch)의 LC는 상대적으로 낮은 전단응력을 갖는 OSS를 보였다. 반면, GC 및 TA는 단방향의 비와류성(indisturbed) 혈류와 상대적으로 높은 전단응력을 보였다. 기대했던 바와 같이, CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-발현 파아지는 BA 및 아치의 LC와 같은 와류성 혈류 지역에 선택적으로 결합하였으나, 아치의 GC 및 TA를 포함하는 비와류성 혈류 지역에는 결합하지 않았다.
- [0161] 또한, 도 6b 및 46c에 나타난 바와 같이, 상기 펩티드-발현 파아지의 결합은 분지혈관 구멍으로부터 멀리 떨어진 지역에서 상당히 감소하였다.
- [0162] 결론적으로, 상기 결과는 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-발현 파아지가 대동맥의 와류성 혈류 지역에 또한 선택적으로 결합한다는 것을 시사한다.
- [0163] **실시예 5: 인간 대동맥에서 선별된 펩티드-발현 파아지의 와류성 혈류 지역에서의 결합 분석**
- [0164] 본 발명에 따른 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-발현 파아지가 인간 대동맥의 와류성 혈류 지역의 내피세포에 특이적으로 결합할 수 있는지 여부를 하기와 같이 확인하였다.
- [0165] 구체적으로, 폐엽 절제술을 받은 환자로부터 수득한 인간 엽성(lobar) 폐동맥을 즉시 처리하고, -80℃에서 냉동시켰다. 냉동 절편을 3×10^{11} pfu의 CLIRRTSIC 또는 CPRRSHPIC-발현 파아지와 함께 3시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후 PBS로 세척하여 결합하지 않은 파아지를 제거하였다. 4% 파라포름알데히드로 고정 후, 냉동 절편을 10%의 적절된 동물 혈청 함유 PBS로 블로킹하고 항-M13 박테리오파아지 항체(Abcam)와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 항-마우스 IgG-R 항체를 2차 항체로 사용하고, DAPI를 핵 대비 염색제로 사용하였다. 봉입(mounting) 후, 조직 슬라이드를 형광현미경으로 관찰하였다.
- [0166] 상기와 같이 인간 폐동맥 시료의 혈류 층류(laminar blood flow) 지역과 혈류가 진동 와류성 혈류 지역 사이에서 ECs에 대한 CLIRRTSIC 또는 CPRRSHPIC-발현 파아지의 결합을 비교하였다.
- [0167] 그 결과, 도 7b 및 7c에 나타난 바와 같이, CLIRRTSIC- 및 CPRRSHPIC-발현 파아지 모두 인간 폐동맥 시료에서 이분기점 및 분지점(bifurcation site and branching points)의 분기부 측면 벽과 같은 와류성 혈류 지역의 내피세포에 선택적으로 결합하였다. 상기 결과는 CLIRRTSIC- 또는 CPRRSHPIC-발현 파아지가 마우스 뿐만 아니라 인간의 기능이상 ECs에 특이성을 가지며, 상기 펩티드에 의해 인식되는 마우스 ECs의 에피토프가 인간에 존재할 수 있을 것이라는 점을 시사한다.

실시에 6: 와류성 혈류 상태에서 기능이상 ECs에 대한 합성 펩티드의 시험관 내 활성 평가

<6-1> DESPs-접합 중합체(DESPs-conjugated polymer)와 siRNA의 복합체 제조

본 발명에 따른 DESPs 중에서 서열번호 3의 CLIRRTSIC 및 서열번호 9의 CPRRTSIC를 펩티드 합성기(Anygen, 장성, 한국)를 사용하여 합성하였다. 상기 펩티드와 중합체(예컨대, 폴리에틸렌글리콜)의 접합과, 펩티드-접합 중합체와 siRNA의 복합체 형성은 문헌에 개시된 방법에 따라 수행하였다(Son S, Singha K, Kim WJ. Biomaterials 31: 6344-6354, 2010).

siRNA 복합체를 준비하기 위하여, DESPs-접합 중합체를 형광-표지된 siRNA(siGLO, red transfection indicator, Dharmacon, Lafayette, CA)와 10 내지 30 범위의 N/P 비율로 혼합한 후 RT에서 30분간 반응시켜 DESPs-접합 중합체/siGLO 복합체를 제조하였다. 이렇게 제조된 DESPs-접합 중합체/siGLO 복합체를 이후의 시험관 내 전달 시험에 사용하였다.

<6-2> 면역형광법을 이용한 펩티드 결합 시험

비오틴으로 표지된 CLIRRTSIC 및 CPRRTSIC 펩티드를 상기 실시예 <6-1>에서와 같이 펩티드 합성기를 사용하여 합성하였다. 각각의 비오틴-표지된 펩티드(30 μ M)를 LSS 또는 OSS 조건 하에서 48시간 동안 배양한 HUVECs에 첨가하였고, 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 4% 파라포름알데히드로 고정 후, 세포를 6% BSA 함유 PBS로 블로킹하였고, 큐닷 525 스트렙타비딘 접합체(Qdot 525 Streptavidin Conjugate, Molecular Probes)와 함께 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. DAPI를 핵 대비 염색제로 사용하였고, DESPs의 ECs 결합은 형광현미경을 통해 관찰하였다.

상기와 같이 비오틴-표지된 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC 펩티드를 사용하여 혈류가 방해된 상태에서 기능이상 ECs에 결합하는지 여부를 확인하였다. 이때 비오틴-표지 펩티드 결합의 검출을 위해, 형광 나노입자, 스트렙타비딘-결합 양자점(streptavidin-conjugated quantum dot)을 사용하였다.

그 결과, 도 8a에 나타난 바와 같이, OSS-배양 HUVECs에 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC 펩티드의 결합이 LSS-배양 HUVECs에 비하여 상당히 증가한 반면, CLNQTAIC 대조군 펩티드는 거의 결합하지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과는 본원발명에 따른 DESPs인 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC가 또한 DESPs-발현 과잉만큼 기능이상 ECs에 특이성을 가짐을 시사한다.

<6-3> DESPs-접합 중합체를 이용한 siRNA의 세포 내 이입

와류성 혈류에 의해 유도된 기능이상 ECs에 대한 특이적 표적으로서 선별된 본 발명에 따른 펩티드의 효능을 평가하기 위해, 시험관 내에서 DESPs-접합 중합체(DESPs-conjugated polymer)를 이용한 siRNA 내재화(internalization)를 확인하였다.

구체적으로, DESPs-접합 중합체를 통한 기능이상 ECs 내로의 선택적 siRNA 전달 효율을 측정하기 위해, 이를 위해 대조군 CLNQTAIC 펩티드, CCLIRRTSIC 또는 CPRRSHPIC 펩티드와 중합체(polyethylene glycol, PEG)의 화학적 결합에 의해 DESPs-접합 중합체를 제작하였다. 제작된 펩티드-접합 중합체를 적색 형광-표지 siRNA인 siGLO와 적절한 N/P 비율로 결합시킨 후, LSS 또는 OSS 조건에 48시간 동안 노출된 ECs에서 siGLO의 세포 내재화를 확인하였다. 이때 유리 상태 또는 DESPs-접합 중합체(10 내지 30 범위의 N/P 비율)와 결합된 siGLO(50 nM)를 세포에 첨가하고 4시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 내 siGLO 전달의 양성 대조군으로서, 제조사의 지시에 따라 리포펙타민 2000(Invitrogen)으로 세포를 형질도입하였다. 24시간 후에, 세포 내 siGLO를 형광현미경을 사용하여 관찰하였다.

그 결과, 도 8b에 나타난 바와 같이, CCLIRRTSIC- 및 CPRRSHPIC-접합 중합체 모두 LSS 조건에 비하여 OSS 조건에서 siGLO의 내재화가 대부분 증가하였다. 또한 siGLO의 세포내 흡수는 N/P 비율에 의존적이나, LSS 조건에서 siGLO의 비특이적 세포내 흡수는 N/P 비율의 증가에 따라 더욱 증가하였다.

상기 결과는 본 발명에 따른 DESPs인 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC가 와류성 혈류 상태에서 기능이상 ECs에 대하여 약물 또는 유전자를 부위 특이적으로 전달할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0181] 실시예 7: DESPs-접합 중합체를 이용한 siRNA의 생체 내 전달

[0182] 상기에서는 본 발명에 따른 DESPs인 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC 펩티드가 시험관 내에서 펩티드 결합 및 siRNA의 세포내 흡수 모두에서 와류성 혈류 상태에서의 기능이상 ECs에 선택적으로 결합하는 양상을 보임을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 본 발명에 따른 DESPs가 생체 내 유전자 전달에 있어 유망한 펩티드 서열인 것으로 판단하고 이를 이용하여 부분 경동맥 결찰 마우스에서 기능이상 ECs로의 유전자 전달 효율을 하기와 같이 확인하였다.

[0183] <7-1> DESPs-접합 중합체/siRNA 복합체의 제조

[0184] 먼저 DESPs-접합 중합체/siRNA 복합체를 제조하기 위하여, 상기 실시예 <6-1>에서와 같이 CLIRRTSIC 및 CPRRSHPIC-접합 중합체를 각각 제조한 후 항-세포간 결합분자-1 siRNA(siICAM-1)와 10 내지 30 범위의 N/P 비율로 혼합하였다. 수득된 혼합물을 RT에서 30분간 반응시켜 CLIRRTSIC-접합 중합체/siICAM-1 복합체와 CPRRSHPIC-접합 중합체/siICAM-1 복합체를 각각 제조하였다. 이렇게 제조된 DESPs-접합 중합체/siICAM-1 복합체를 이후의 시험관 내 및 생체 내 전달 시험을 위해 사용하였다.

[0185] <7-2> DESPs-접합 중합체/siRNA 복합체의 기능이상 ECs로의 생체 내 귀소

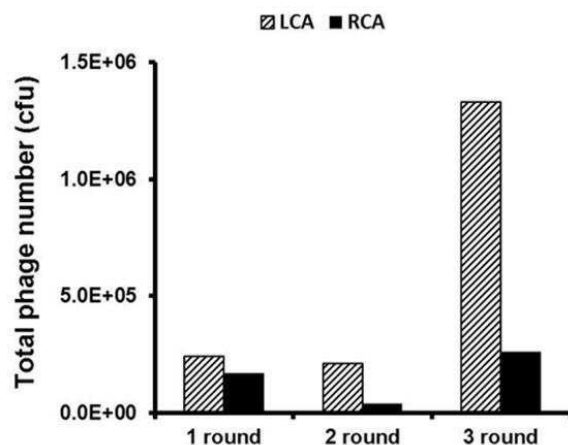
[0186] 생체 내 귀소(in vivo homing) 분석에서, 대조군 CLNQTAIC 펩티드 또는 CLIRRTSIC 또는 CPRRSHPIC-접합 중합체/항-siICAM-1(30 μ g, N/P=20) 복합체를 LCA 결찰 후 3일째에 마우스의 정맥 내로 주입하였다. 주입 24시간 후에 마우스의 경동맥을 분리하고, 결찰된 LCA 또는 결찰되지 않은 RCA의 ECs로부터 전체 RNA를 추출하였다. 경동맥의 ECs에서 ICAM-1 mRNA의 발현 수준을 qRT-PCR(StepOne Real-time PCR system, Applied Biosystems)을 이용해 측정하였다.

[0187] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, CLIRRTSIC 펩티드의 경우에는 ICAM1 mRNA의 수준이 비결찰 RCA와 비교하여 결찰 LCA에서 선택적으로 감소하였다. 그러나, 시험관 내에서 기능이상 ECs에 대한 선택적 결합을 보였음에도 불구하고 CPRRSHPIC 펩티드의 경우에는 결찰 LCA와 비결찰 RCA 사이에서 ICAM1 mRNA 수준의 감소에 있어 유의미한 차이를 보이지 않았다. 대조군 CLNQTAIC 펩티드에서는 아무런 변화가 관찰되지 않았다.

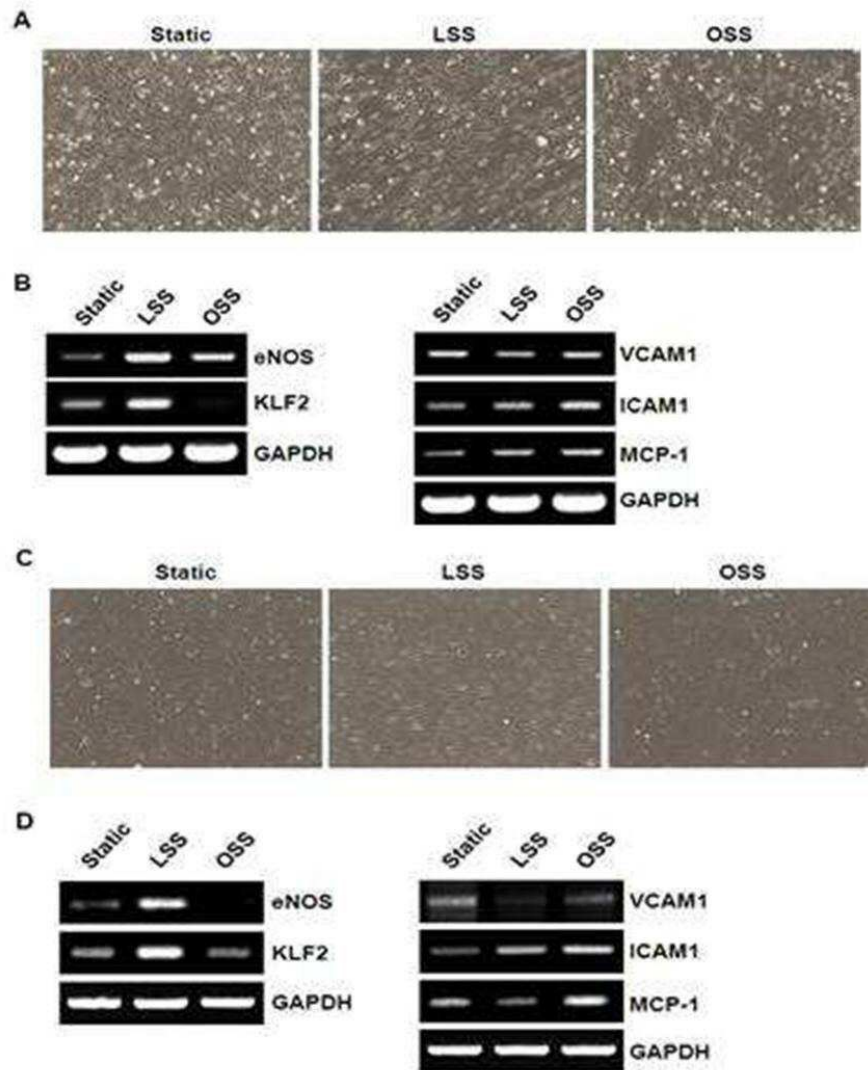
[0188] 상기 결과는 CLIRRTSIC 펩티드 서열이 와류성 혈류로 유도된 기능이상 ECs로의 약물 또는 유전자 전달을 위한 특이적 표적 펩티드가 될 수 있다는 것을 시사한다.

도면

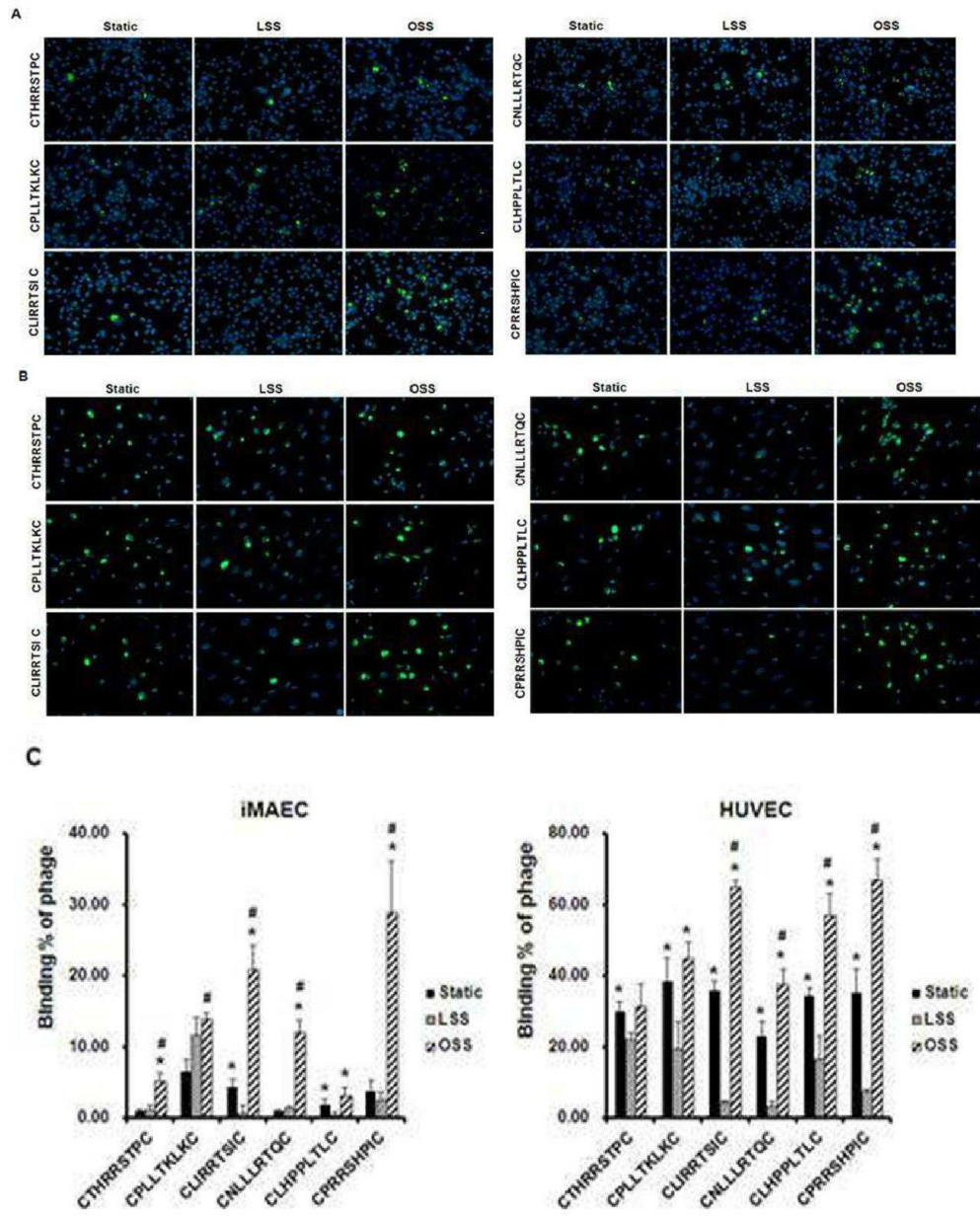
도면1



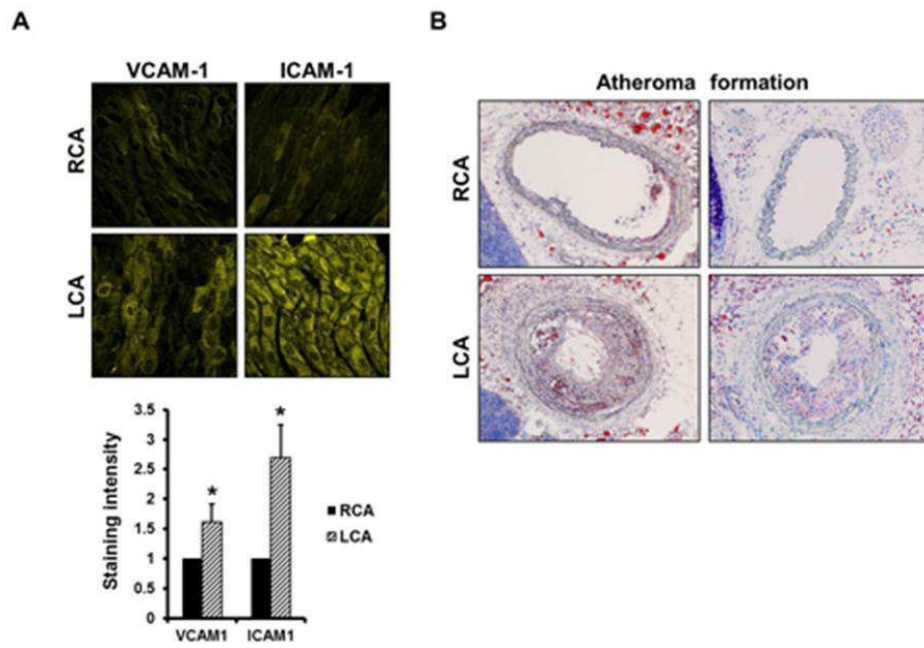
도면2



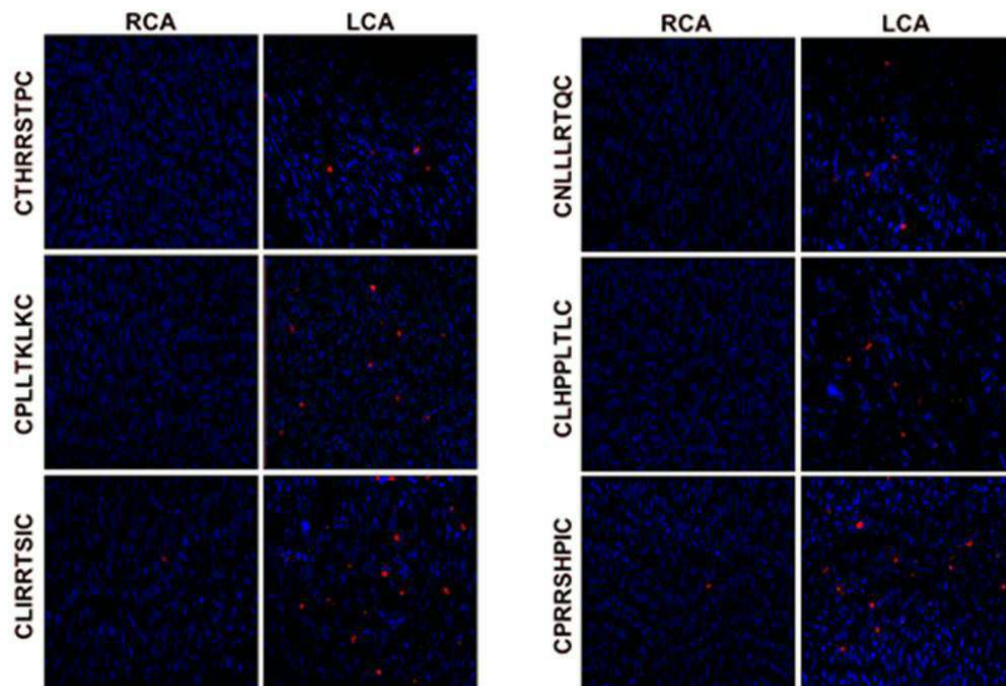
도면3



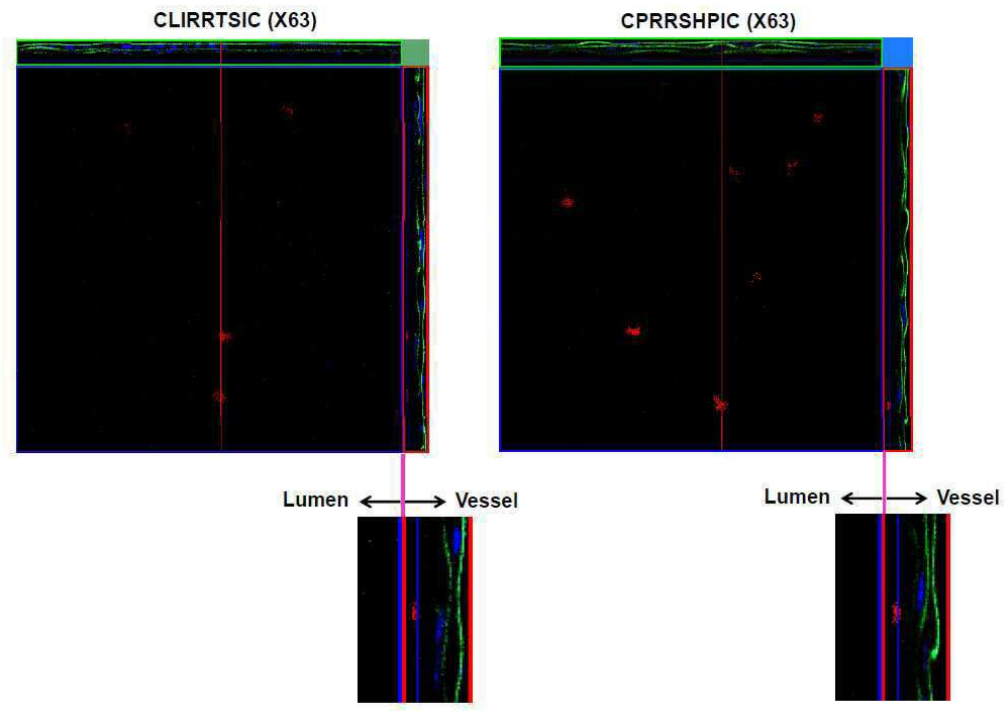
도면4



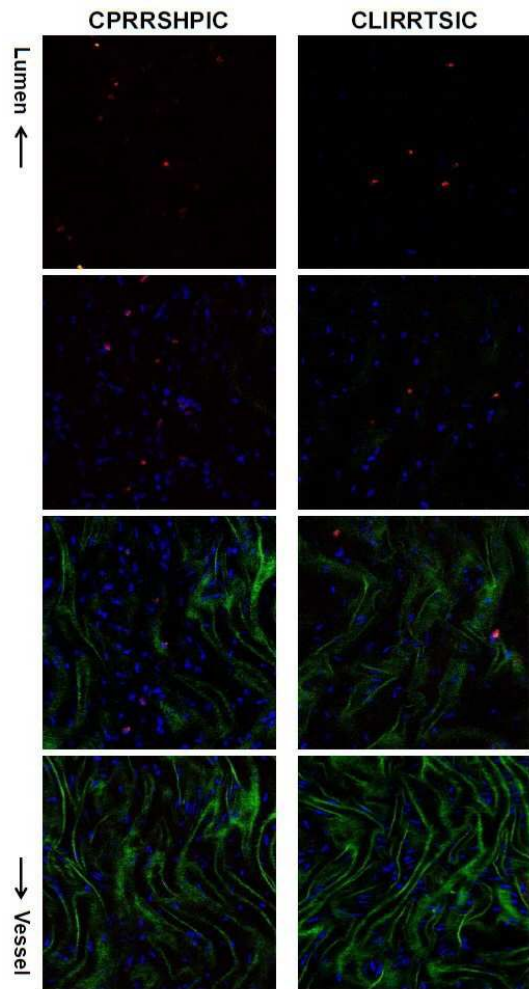
도면5a



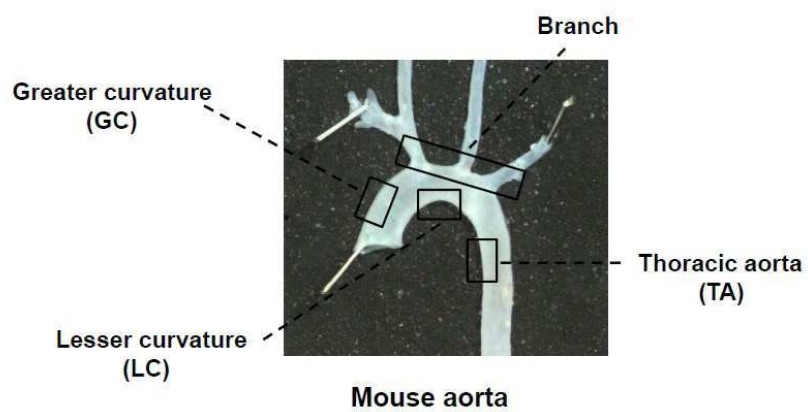
도면5b



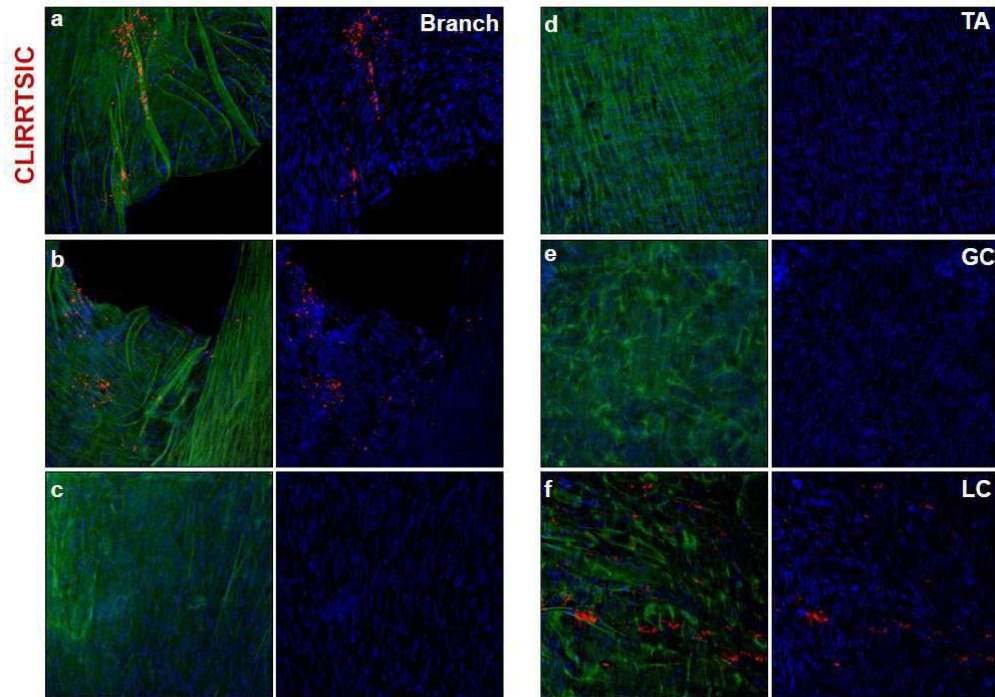
도면5c



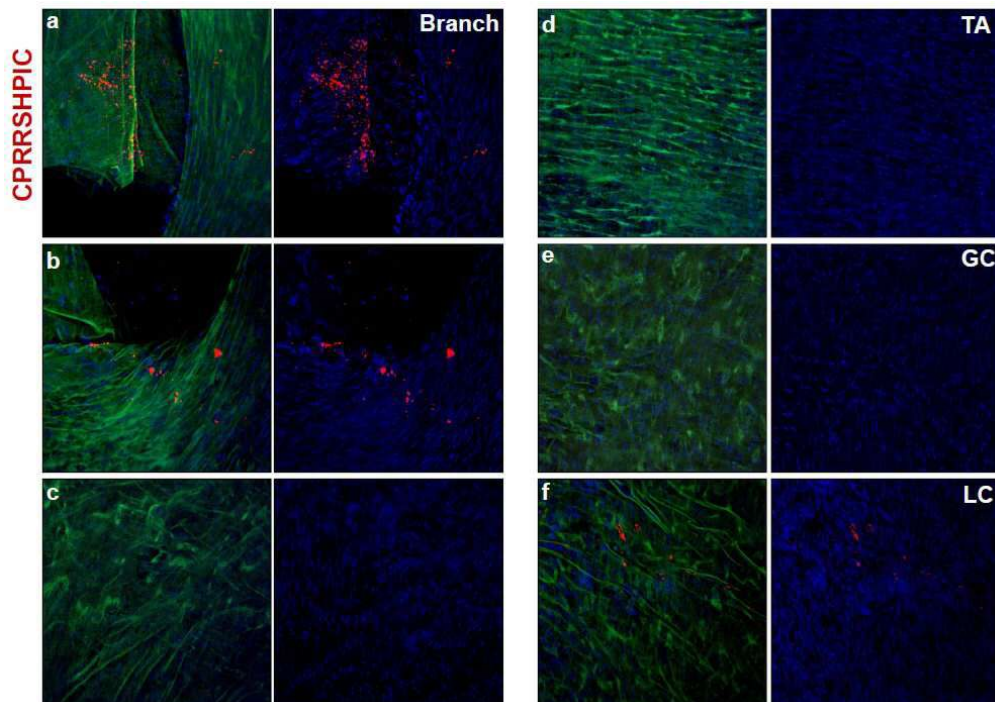
도면6a



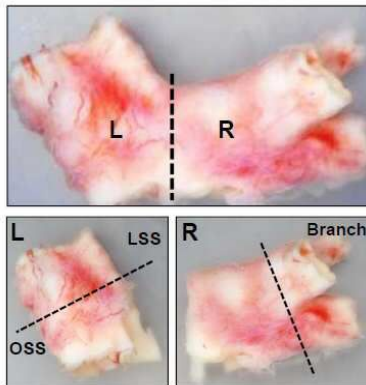
도면6b



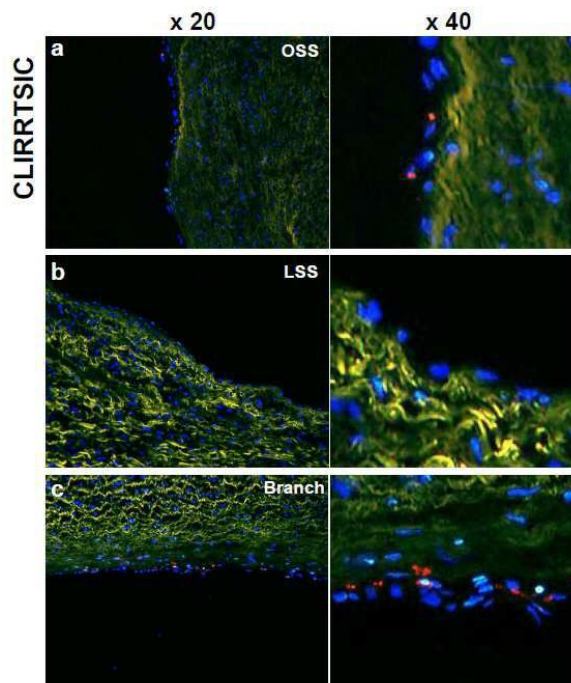
도면6c



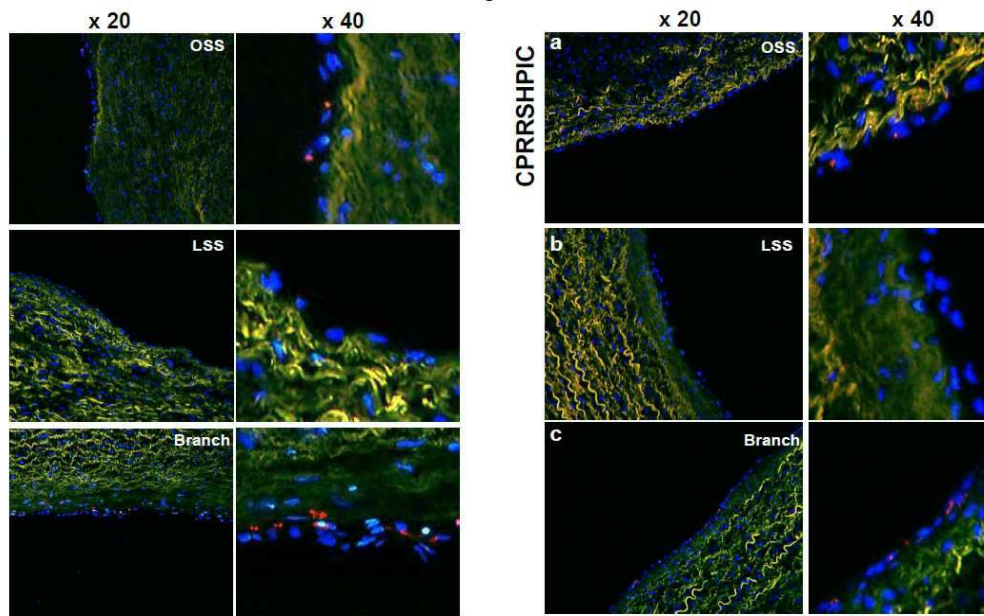
도면7a



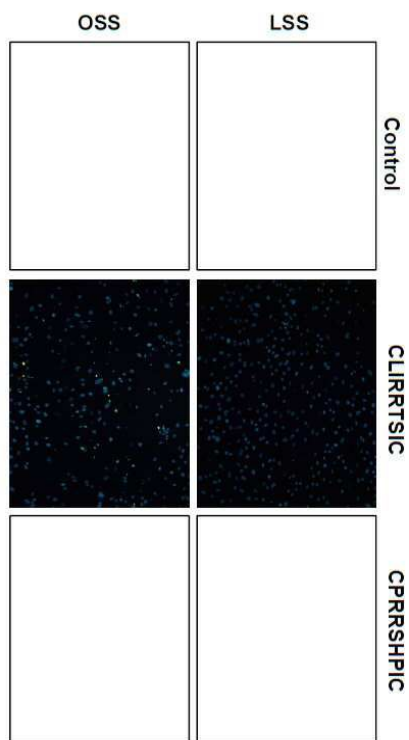
도면7b



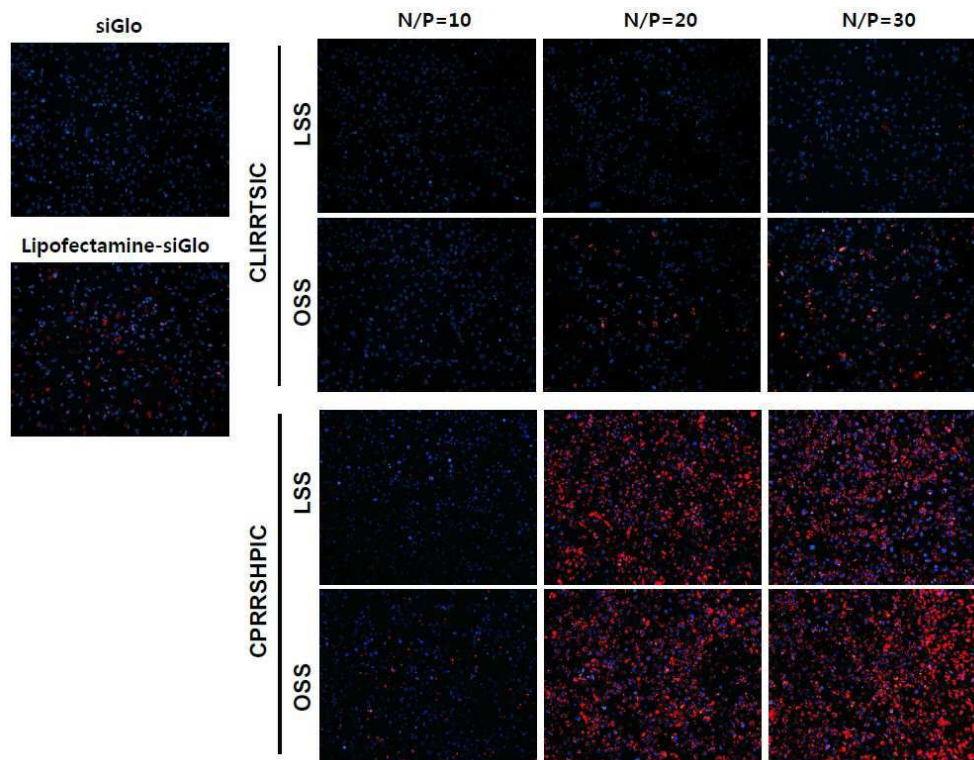
도면7c



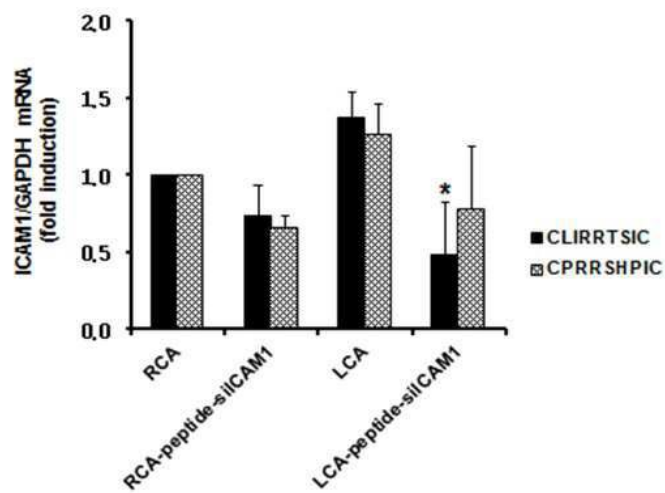
도면8a



도면8b



도면9



서열 목록

- <110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation
- <120> Novel Peptides for Diagnosing and Treating Cardiovascular Diseases

<130> PA130725-KR-P1

<150> KR 10-2013-0106064

<151> 2013-09-04

<160> 44

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 1

Cys Lys Met Thr Arg Ser Thr Ile Cys

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 2

Cys Lys Ile Met Ile Ser Ile Ser Cys

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 3

Cys Leu Ile Arg Arg Thr Ser Ile Cys

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 4

Cys Pro Leu Leu Thr Lys Leu Lys Cys

1 5

<210> 5

<211>

9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 5

Cys Thr His Arg Arg Ser Thr Pro Cys

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 6

Cys His Ile Pro Ser Ile His Ser Cys

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 7

Cys Gln Met Met Leu Ile Arg Arg Cys

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 8

Cys Asn Leu Leu Leu Arg Thr Gln Cys

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

1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide
 <400> 10
 Cys Leu His Pro Pro Leu Thr Leu Cys

1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide
 <400> 11
 Cys Lys Met Asn Ile Arg Leu Ser Cys

1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide
 <400> 12
 Cys Ile Leu Arg Lys Ile Arg Pro Cys

1 5
 <210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 13

Cys Ser Arg Arg Pro Thr Ser Ile Cys

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 14

Cys Leu Ile Arg Leu Ile Leu Gln Cys

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 15

Cys Arg Met Arg Lys Thr Leu Arg Cys

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 16

Cys Gln Pro His His Ser Ile Ile Cys

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide
 <400> 17
 Cys Ser Thr His Ile Pro Ser His Cys
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide
 <400> 18
 Cys Ile Leu Arg Arg Arg Lys Arg Cys
 1 5

 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide
 <400> 19
 Cys Ser Ile Arg Ile His Arg Arg Cys
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polypeptide
 <400> 20
 Cys Ser Leu Arg Arg His Pro Ile Cys
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 21

Cys Arg Thr Lys Leu Arg Lys Leu Cys

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 22

Cys His Met Gln Ile Met His Arg Cys

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 23

Cys Thr Arg Met Met Leu Arg Ile Cys

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 24

Cys Thr Pro Arg Gln Thr Arg Met Cys

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 25

Cys Met Leu Asn Ile Thr Arg Arg Cys

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 26

Cys Arg Lys Leu Pro Arg Ile Ser Cys

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 27

Cys Pro Leu Gln Pro Lys Ser Ile Cys

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 28

Cys Pro Ile Arg His Arg Pro Ile Cys

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 29

Cys Arg Thr Met Arg Ile Arg Leu Cys

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 30

Cys Met Arg Gln Arg Arg Asn Arg Cys

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 31

Cys Pro Arg Arg Arg Leu Lys Arg Cys

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 32

Cys His Gln Leu Pro Ile Arg Pro Cys

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 33

Cys Pro Ile Lys Thr Thr Ile Thr Cys

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 34

Cys Arg Arg Gln Thr Ser Thr His Cys

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 35

Cys Asn Pro Met Thr Arg Leu Ile Cys

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 36

Cys Pro Ile Arg His Arg Pro Ile Cys

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 37

Cys Thr Leu His Lys Ser Arg Ser Cys

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 38

Cys Thr Arg Ile Ile Ser Asn Thr Cys

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 39

Cys Lys Leu Ile Asn Thr Leu Lys Cys

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 40

Cys Gln Met Thr Arg Ser Thr Ile Cys

1 5

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide

<400> 41

acgctcataa ggccaaccag tattacg

27

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide

<400> 42

acgaatctgc tgcttcgtac tcagacg

27

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide

<400> 43

acgccgcgcc gaagccaccc cataacg

27

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide

<400> 44

acgctgcac cactctgac cctcacg

27