



등록특허 10-2549208



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월30일

(11) 등록번호 10-2549208

(24) 등록일자 2023년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01) *A61K 31/7105* (2006.01)*A61P 9/00* (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)*A61K 31/7105* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0045769

(22) 출원일자 2021년04월08일

심사청구일자 2021년04월08일

(65) 공개번호 10-2022-0139604

(43) 공개일자 2022년10월17일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100126430 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이상학

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 33동 102호
(압구정동, 현대아파트)

안수진

서울특별시 구로구 새말로9길 45, 102동 1802호(구로동, 신도림현대아파트)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 특허법인충현

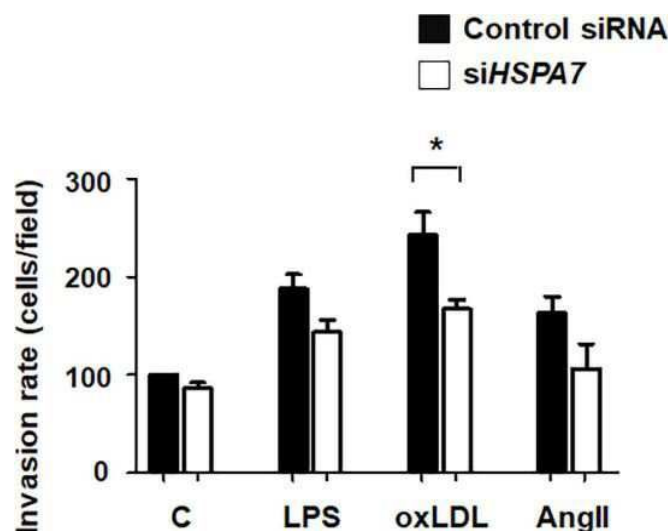
심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 심혈관 질환과 관련된 lncRNA 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 심뇌혈관 질환(cardio-cerebrovascular disease)의 진단용 조성물 및 이의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 lncRNA *HSPA7*의 발현 여부를 통해 동맥경화를 비롯한 심뇌혈관 질환의 발병 여부는 물론 향후 발병 가능성을 높은 신뢰도로 예측함으로써 치료 전략의 조기 수립을 가능케하는 중요한 임상 정보를 제공할 수 있다. 아울러, 본 발명의 심뇌혈관 질환 치료용 조성물은 *HSPA7* 발현 억제를 통해 평활근 세포의 이동을 저해하고 염증인자의 발현을 감소시켜 죽상경화반의 발생 및 진행 자체를 차단함으로써 항혈전제 투여와 같은 대증적 요법을 넘어서는 근원적인 치료제 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2b



(52) CPC특허분류

A61P 9/00 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170060337 A
 KR1020170141993 A
 KR1020210035715 A
 Exp Mol Med, 53(12):1842-1849. (2021.12.02.)
 Cardiovasc Res, 115(12):1732-1756.
 (2019.10.01.)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105402
과제번호	2019R1F1A1057952
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	유전자 적중 마우스를 통한 환자발굴 CDKAL1의 지단백 대사조절 분자기전 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345295289
과제번호	2018R1D1A1B0704385513
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원사업
연구과제명	죽상동맥경화증 고위험 환경에서 clec4d 역할규명 기반 혈관질환 제어기전 탐색
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

lncRNA *HSPA7*의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 심뇌혈관 질환(cardio-cerebrovascular disease)의 예측 또는 진단용 조성물로서,

상기 심뇌혈관 질환은 죽상경화반에 의해 유발된 것으로, 심근경색, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 혈관 협착증, 혈관 재협착증, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 lncRNA *HSPA7*의 발현량을 측정하는 제제는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

lncRNA *HSPA7*의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서,

상기 lncRNA *HSPA7*의 발현 억제제는 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임, PNA 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이고,

상기 심뇌혈관 질환은 죽상경화반에 의해 유발된 것으로, 심근경색, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 혈관 협착증, 혈관 재협착증, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 평활근세포(smooth muscle cell)의 이동을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 조성물은 IL(interleukin)-1 β 및 IL-6의 분비를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법:

- (a) lncRNA *HSPA7*을 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 시료 내 lncRNA *HSPA7*의 발현량을 측정하는 단계,

상기 lncRNA *HSPA7*의 발현량이 감소한 경우, 상기 후보물질은 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정하고,

상기 심뇌혈관 질환은 죽상경화반에 의해 유발된 것으로, 심근경색, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 혈관 협착증, 혈관 재협착증, 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 lncRNA *HSPA7*을 발현하는 세포는 평활근세포(smooth muscle cell)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 심혈관 질환과의 관련성이 새로이 규명된 lncRNA *HSPA7*를 바이오마커로 하는 심혈관 질환의 진단 방법 및 이의 발현 억제를 통한 심혈관 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 관상동맥질환과 같은 죽상경화 심혈관 질환의 위험성은 유전적 요인이 상당부분 관여한다(Lloyd-Jones, JAMA 2004). 최근 연구에서 관상동맥 질환과 관련되었으나 기능이 알려지지 않은 많은 신규 유전자 좌위가 발견되었으며, 이들 중 다수는 인간 지놈의 유전자의 비암호화 영역에 위치하는 것으로 보고되었다(McPherson, Circ Res 2016). 예를 들어, 9p21 좌위와 심근경색 간의 관계가 많은 연구팀에 의해 확인되었고, 비암호화 RNA인 ANRIL 가 이 좌위에 위치하며 세포 증식에 영향을 주는 것으로 나타났다(Congrains, Atherosclerosis 2012).

[0004] 긴 비암호화 RNA(Long noncoding RNA, lncRNA)는 비암호화 RNA 군에서 가장 큰 분자로서 다른 짧은 비암호화 RNA와 길이 면에서 차별화된다. lncRNA는 매우 다양한 기능을 하는 것으로 알려졌으며 이들의 조직, 세포 및 질환 특이성으로 인해 매력적인 치료 타겟으로 여겨진다(Pierce, ATVB 2020). lncRNA는 원거리 표적에 작용하므로, 리보핵산단백질 복합체를 안정화하고, 인산화 경로를 변환하거나, 또는 경쟁적 내인성 RNA로 작용한다(Fasolo, Cariovasc Res 2019). 수십개의 lncRNA가 동맥경화 진행에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 종래 연구에 따르면, 특정 lncRNA는 내피세포, 혈관 평활근세포(VSMC) 및 대식세포를 포함하는 동맥 내 세포를 조절한다(Pierce, ATVB 2020). 예를 들어 lncRNA H-19는 VSMC 증식을 증가시키는 반면(Ly, BBRC 2018), lncRNA-p21는 VSMC 증식을 억제한다(Wu, Circulation 2014). 몇몇 추가적인 lncRNA가 혈관세포를 조절하는 것으로 규명되었으나(Zhang, JACC 2018), 인간 혈관세포 유래 lncRNA로서 동맥경화에 영향을 미치는 lncRNA는 거의 알려지지 않았다. 한편, 마이크로 RNA(miRNA)는 분해 또는 번역 차단을 통해 표적 mRNA를 억제한다(Ono, FEBS J 2020). 몇몇 miRNA는 SMC 증식 또는 표현형 변화에 영향을 미침으로써 동맥경화에 관여하는 것으로 알려졌다(Lu, ATVB 2018).

[0005] 본 발명자들은 인간 죽상경화반(plaque)을 분석하여, 기능이 알려지지 않았던 lncRNA를 동정하고 그 기능을 확인하고자 하였다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명

의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Qingbo Xu et al., Circulation Research 86:1122-1128 (2000)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 관상동맥질환을 비롯한 심뇌혈관 질환의 유전적 위험성을 정확하게 예측할 수 있는 유효한 바이오 마커를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 긴 비암호화 RNA인 *HSPA7*이 죽상경화반(plaque)에서 특이적으로 고발현되며, 이의 발현에 의해 인간 대동맥 평활근 세포(HASMC)의 이동이 촉진되고 염증인자의 발현이 증가되어 심뇌혈관의 손상 및 혈류장애가 유발됨을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 따라서 본 발명의 목적은 심뇌혈관 질환(cardio-cerebrovascular disease)의 예측 또는 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 lncRNA *HSPA7*의 발현량을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는 심뇌혈관 질환(cardio-cerebrovascular disease)의 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명자들은 관상동맥질환을 비롯한 심뇌혈관 질환의 유전적 위험성을 정확하게 예측할 수 있는 바이오 마커를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 긴 비암호화 RNA인 *HSPA7*이 죽상경화반(plaque)에서 특이적으로 고발현되며, 이의 발현에 의해 인간 대동맥 평활근 세포(HASMC)의 이동이 촉진되고 염증인자의 발현이 증가되어 심뇌혈관의 손상 및 혈류장애가 유발된다는 사실을 발견하였다. 이에, 본 발명자들은 *HSPA7*이 심뇌혈관 질환에 대한 신뢰도 높은 예측 및 진단 마커일 뿐 아니라 유효한 치료 타겟임을 최초로 규명하였다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “심뇌혈관 질환”은 뇌와 심장에 혈액을 공급하는 혈관에 이상이 생겨 혈류량 감소 및 이에 따른 허혈성 조직 손상을 야기하는 일련의 질환을 의미하며, 허혈성 심장질환, 뇌혈관질환 및 고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증, 동맥경화증 등의 선행질환을 총칭하는 의미이다.
- [0020] 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 심뇌혈관 질환은 예를 들어 심근경색, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 혈관 협착증, 혈관 재협착증, 대동맥류 및 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “진단용 조성물”은 대상체의 상피장벽 기능 부전증의 발병 여부를 판단하거나 발병 가능성을 예측하기 위해 *HSPA7*의 발현량 측정수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 “진단용 키트”로 표현될 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 lncRNA *HSPA7*의 발현량을 측정하는 체제는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “뉴클레오타이드”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다.

- [0025] 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열은 *HSPA7*의 RNA 염기서열이다. 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다. 뉴클레오타이드의 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드는 자연계의 *HSPA7* 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 70%의 상동성, 구체적으로는 80%의 상동성, 보다 구체적으로는 90%의 상동성, 가장 구체적으로는 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0028] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 *HSPA7*의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0029] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 *HSPA7*의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3' -말단 또는 5' -말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0031] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 lncRNA *HSPA7*의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명에서 진단, 예측, 치료 또는 예방하고자 하는 심뇌혈관 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한

중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

- [0034] 본 명세서에서 용어 “발현 억제제”는 *HSPA7*의 발현 또는 활성의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 *HSPA7*의 발현 또는 활성이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, *HSPA7*에 의한 죽상경화반의 생성 및 혈관 손상이 유의하게 개선될 수 있을 정도로 *HSPA7*의 활성 또는 발현을 감소시키는 물질을 의미한다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “발현의 감소”는 *HSPA7*의 발현량이 예를 들어 대조군에 비하여 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 30% 이상 감소한 상태, 보다 더 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 *HSPA7* 발현 억제를 통해 평활근 세포의 이동을 저해하고 염증인자의 발현을 감소시켜 죽상경화반의 발생 및 진행을 차단 또는 지연시킴으로써 동맥경화를 비롯한 다양한 심뇌혈관 질환으로 인한 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0038] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 억제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 lncRNA *HSPA7*의 발현 억제제는 예를 들어 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임, PNA 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하나, 이에 제한되지 않고 lncRNA *HSPA7*와 혼성화될 수 있는 상보적인 핵산 서열을 포함함으로써 이를 특이적으로 인식하고, 이의 기능 저하를 야기하는 뉴클레오타이드 구조 상의 변형을 야기할 수 있는 모든 핵산 분자가 사용될 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 인 비보 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 RNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 RNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 RNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA분자를 의미한다.
- [0044] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.
- [0045] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로

합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.

- [0046] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 RNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 RNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹 등으로 변형될 수 있다.
- [0047] 상술한 본 발명의 발현 억제용 핵산 분자는 심뇌혈관 질환을 가진 대상체 내에서 발현시킴으로써 lncRNA *HSPA7*의 발현을 억제할 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 용어 “발현시키다”는 대상체가 외래(exogenous) 유전자를 발현하게 하거나 또는 내인성(endogenous) 유전자의 자연적 발현량을 증가시키기 위해 유전자 전달체를 이용하여 인위적으로 이를 도입함으로써 유전자가 대상체 세포 내에서 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 따라서, 용어 “발현”은 “형질전환(transformation)”, “형질감염(transfection)” 또는 “형질도입(transduction)”과 동일한 의미이다.
- [0049] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달 시스템(gene delivery system)”은 유전자를 세포 내로 운반하는 모든 수단을 의미하며, 유전자 전달은 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 평활근세포(smooth muscle cell)의 이동을 억제한다.
- [0051] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 IL(interleukin)-1 β 및 IL-6의 분비를 감소시킨다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0054] (a) lncRNA *HSPA7*을 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;
- [0055] (b) 상기 시료 내 lncRNA *HSPA7*의 발현량을 측정하는 단계,
- [0056] 상기 lncRNA *HSPA7*의 발현량이 감소한 경우, 상기 후보물질은 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [0057] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, lncRNA *HSPA7*을 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 lncRNA *HSPA7*을 발현하는 세포는 혈관 세포이며, 보다 구체적으로는 혈관 평활근세포(smooth muscle cell)이다.
- [0059] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “후보물질”은 *HSPA7*을 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 *HSPA7*의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 *HSPA7*의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 측정방법에 의해 수행될 수 있으며, 측정 결과 *HSPA7*의 활성 또는 발현량이 감소한 경우 상기 후보물질은 심뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정될 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 용어 “활성 또는 발현량의 감소”는 lncRNA *HSPA7*에 의해 유도되는 평활근 세포의 이동과 염증인자의 발현이 유의하게 억제되어 죽상경화반의 생성 및 혈관 손상이 측정 가능한 수준으로 저해될 정도로 lncRNA *HSPA7*의 발현량 또는 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 활성(activity)의 감소는 단순한 기능(function)의 감소 뿐 아니라 안정성(stability)의 감소로 기인한 궁극적인 활성 저해를 포함한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.

발명의 효과

- [0062] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0063] (a) 본 발명은 심뇌혈관 질환(cardio-cerebrovascular disease)의 진단용 조성물 및 이의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0064] (b) 본 발명은 lncRNA *HSPA7*의 발현 여부를 통해 동맥경화를 비롯한 심뇌혈관 질환의 발병 여부는 물론 향후 발병 가능성을 높은 신뢰도로 예측함으로써 치료 전략의 조기 수립을 가능케하는 중요한 임상 정보를 제공할 수 있다.
- [0065] (c) 아울러, 본 발명의 심뇌혈관 질환 치료용 조성물은 *HSPA7* 발현 억제를 통해 평활근 세포의 이동을 저해하고 염증인자의 발현을 감소시켜 죽상경화반의 발생 및 진행 자체를 차단함으로써 항혈전제 투여와 같은 대증적 요법을 넘어서는 근원적인 치료제 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1은 *HSPA7*이 인간 죽상경화반에서 발현이 증가하며 아테롬성 자극에 의해 유도됨을 보여주는 그림이다. 도 1a는 대조군 조직 대비 인간 죽상경화반에서 상이하게 발현되는 유전자에 대한 열지도를 나타내는 그림이다. 도 1b는 경화반에서 고발현 또는 저발현되는 상위 lncRNA의 목록을 보여주는 그림이다. 도 1c는 경화반 및 대조군 데이터로부터 계통 군집화 및 다차원 스케일링을 수행한 결과를 나타낸다. 도 1d는 RNA-시퀀싱을 통해 상이하게 발현되는 lncRNA를 검증한 결과를 보여준다. 상위 3개 유전자 중 *HSPA7* 만이 동맥경화성 자극, 특히 oxLDL에 의해 유의한 발현 증가를 보였다. 실험은 중복하여 수행되었으며, 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 획득하였다.

도 2는 *HSPA7*의 녹다운을 통해 HASMC의 이동과 염증성 변화가 약화됨을 보여주는 그림이다. 도 2a 및 2b는 트랜스웰 어세이로 si*HSPA7* 또는 대조군 siRNA로 24시간 동안 형질전환한 HASMC의 세포 이동을 평가한 결과를 나타낸다. 도 2c는 oxLDL 및 si*HSPA7* 처리에 따른 IL-1 β 및 IL-6의 분비 양상을 측정된 ELISA 및 qPCR 결과를 나타낸다. 도 2d는 oxLDL 및 si*HSPA7* 처리에 따른 CD68, SM22 α 및 칼포닌1의 발현 양상을 보여주는 면역형광염색 결과이다. 도 2e는 표현형 마커, 특히 *CNN1* 및 *CD68*에 대한 *HSPA7*의 효과를 qPCR로 확인한 결과이다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 획득하였다.

도 3은 *HSPA7*이 miR-223를 스폰징함으로써 HASMC의 염증성 변화를 촉진시킴을 보여주는 그림이다. 도 3a는 miRcode를 이용하여 *HSPA7* 서열이 miR-223에 대한 결합 부위를 가지고 있음을 예측한 바이오인포매틱 분석 결과이다. 도 3b는 miR-223 억제제를 처리한 HASMC에서 *FOXO1* 발현이 증가하나 si*HSPA7* 처리 후 다시 감소함을 보여주는 qPCR 결과이다. miR-223 억제제로 증가된 NF-kB 활성이 si*HSPA7* 처리 후 다시 약해졌다. 도 3c는 HASMC에 대해 동일한 처리를 한 경우 IL-1 β 및 IL-6의 분비가 miR-223 억제제에 의해 증가하나, si*HSPA7* 처리 후 다시 감소함을 보여주는 그림이다. 이는 qPCR을 통해 다시 검증되었다. 도 3d는 수축성 SMC 표현형의 마커가 miR-223 억제제에 의해 변화하지 않지만 si*HSPA7* 첨가 후 증가함을 보여주는 면역형광염색 결과이다. 도 3e는 위의 결과를 *TAGLN* 및 *CNN1*에 대한 qPCR을 이용하여 검증한 결과는 나타낸다. 도 3f는 miR-223가 AGO2-의존적으로 *HSPA7* in의 표적이 됨을 보여주는 그림이다. oxLDL의 존재와 무관하게 AGO2는 HASMC에서 상이한 발현을 보이지 않았다. RIP 어세이 결과 assay showed that *HSPA7*과 miR-223는 IgG 면역침전물에 비해 AGO2-포함 miRNP에서 더 풍부하였다. *HSPA7*는 oxLDL의 존재 하에 AGO2에 더 잘 결합하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 획득하였다.

* p < 0.05, Ang II: 안지오텐신 II, HASMC: 인간 대동맥 평활근 세포; oxLDL: 산화 저밀도 지단백질; C: 대조군; AGO: 아르거트-2; RIP: RNA 면역침강; miRNP: miRNA 리보핵산단백질, ELISA: 효소결합면역흡착검사; qPCR: 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0068] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0070] 실시예

- [0071] **실험방법**
- [0072] 실험대상 및 대동맥 조직 추출
- [0073] 연구 프로토콜(no. 4-2013-0688)은 세브란스 병원의 임상연구 윤리위원회의 승인을 받았으며, 모든 참가자들은 서면 동의서를 제공받았다. 대동맥 시료는 흉부 대동맥류의 대동맥 이식교체 수술을 받은 환자로부터 수득하였다. 시료는 숙련된 병리학자에 의해 죽상경화반의 존재 여부에 따라 분류되었다. 병변은 미국 심장 학회의 변 동된 분류기준(Virmani, ATVB 2000)에 근거하여 표본에 대한 사전 지식 없이 분류되었다.
- [0075] RNA 시퀀싱 및 lncRNA의 분류
- [0076] Ribospin RNA 추출 키트(GeneAll, Seoul, Korea)을 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. RNA 농도와 순도는 NanoDrop ND1000 분광광도계를 이용하여 측정하였다. TruSeq RNA 시료제작 키트(Illumina, San Diego, CA, US A)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 총 RNA 시퀀싱 라이브러리를 제작하였다. 시료 내 죽상경화반 유무에 따 라 상이하게 발현되는 유전자는 Cuffdiff를 이용하여 비교하였으며, $q < 0.05$ 및 2배 초과 배수 변화를 보이는 고발현 및 저발현 유전자를 동정하였다.
- [0078] 인간 대동맥 평활근 세포(HASMC) 및 기타 시약
- [0079] HASMC는 Lonza(Basel, Switzerland)에서 구입하였으며 성장인자를 함유하고 2% 우태아혈청과 페니실린/스트렙토 마이신이 보충된 SMC 기본성장배지에서 37°C로 배양하였다. 리포폴리사카라이드(LPS)와 안지오텐신 II (Ang II) 는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 HASMC 자극에 사용하였다. 저밀도 지단백질(LDL)은 건강 한 공여자의 혈장으로부터 분리하여 연속적 초원심분리를 수행하였다. LDL은 4°C에서 24시간 동안 PBS (phosphate buffered saline)로 투석하고 5 mM CuSO₄를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 산화시켰다. 에틸렌디 아민 테트라아세트산을 첨가하여 반응을 종료시키고 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance) 어세이를 통해 각 실험 전 LDL의 산화 단계를 분석하였다.
- [0081] 이동 어세이
- [0082] HASMC 이동을 평가 및 비교하기 위해, 세포에 siHSPA7 또는 대조군 siRNA를 24시간 동안 형질전환한 뒤 무혈청 배지 내 트랜스웰(Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, MD, USA)의 상부 챔버에 첨가하였다. 하부 챔버는 우태 아혈청과 SMC 기본성장배지를 채워 넣었다. 이후, LPS(10 ng/mL), oxLDL (50 mg/mL) 또는 Ang II(300 nM)를 상 부 챔버에 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 다음으로, 세포를 Diff Quik 염색 키트(Kobe, Japan)으로 염색하고 필터의 하부 표면을 형광 현미경으로 촬영하였다. 모든 처리는 이중 웰에서 수행하였다.
- [0084] RNA 시퀀싱 및 lncRNA의 분석
- [0085] 절편화 과정을 통해 약 100-400 bp가 삽입된 RNA-Seq 라이브러리를 수득하였다. Illumina TruSeq 라이브러리의 평균 삽입 크기는 약 200 bp이다. cDNA 절편에 대해 단일 'A' 염기를 3' 말단에 첨가하고 어댑터를 라이게이션 하는 말단 복구(end repair)를 수행하였다. 마지막으로, 생성물을 정제하고 PCR로 증폭하여 이중가닥 cDNA 라이 브러리를 수득하였다. 라이브러리를 Illumina HiSeq2500 플랫폼을 이용하여 KAPA 라이브러리 정량 키트로 프로 토콜 가이드 KK4855(KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)에 따라 정량하였다.
- [0087] 효소결합면역흡착검사 (ELISA)
- [0088] 세포 배양 상등액을 수집하고 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)으로 제조자의 설명서에 따라 IL-1 β 또는 IL-6의 양을 측정하였다. 96-웰 플레이트를 1 mg/웰의 포집 항체와 함께 코팅하였다. 코팅된 플레 이트를 0.05% Tween20 포함 PBS로 2회 세척하고 바이오틴 접합 2차 항체에 노출시켰다. 흡광도 450 nm에서 플레 이트를 리딩하였다. 표적 단백질은 제조자의 설명서에 따라 분석하였다.
- [0090] 면역블롯 분석
- [0091] 세포를 수집하고 1M의 HEPES(pH 7.5), 5M의 NaCl, 0.5M의 EDTA, 1% Triton X-100 및 프로테아제 억제제 각테일 (Roche, Basel, Switzerland)을 포함하는 세포 용해 완충액에 용해시켰다. 비시초닌산 단백질 어세이(Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)를 통해 단백질 농도를 측정하였다. 세포 용해물(20 mg/lane)에 대해 12.5%의 소듐도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 수행하고 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)으로 옮겼다. 막을 상온에서 1시간 동안 Tween 20 함유 TBS(Tris-buffered saline) 용액에서 5% 소혈청 알부민과 함께 배양하고 4°C에서 1차 항체와 함께 밤새 배양하였다. 다

음날, 막을 TBS로 세척하고 호스래디쉬 퍼옥시다제-접합 2차 항체와 함께 상온에서 배양하였다. 강화된 화학발광 시스템으로 단백질을 검출하였다.

[0093] *정량적 실시간 PCR (qPCR)*

[0094] Ribospin RNA 추출 키트(GeneA11, Seoul, Korea)을 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 완전성은 NanoDrop으로 분석하였으며, 분광광도계를 이용하여 흡광도 260nm에서 정량하였다. 이후, 1 µg의 RNA를 이용하여 iScript™ cDNA 합성 키트(Bio-rad, Hercules, CA, USA)으로 cDNA를 합성하였다. SYBR-green 염색 시스템으로 Light Cycler480 실시간 PCR 장비(Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 qPCR을 수행하였다. Light Cycler 소프트웨어로 β-액틴 발현에 대해 정규화된 역치 사이클 값에 기반하여 유전자 발현을 분석하였다. 증폭된 유전자 발현은 녹는점 곡선 분석으로 확인하였으며, 역전사효소나 주형 대조군은 포함되지 않았다. 분석은 2회 반복하였다.

[0096] *RNA-결합 단백질 면역침강 (RIP) 어레이*

[0097] EZ-Magna RIP 키트(Merck Millipore, Burlington, MA, USA)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 RIP 어레이를 수행하였다. HASMC를 수집하고 RIP 용해 완충액에서 용해시켰다. 세포 추출물을 항-AGO2 항체 및 IgG(Merck Millipore)가 결합된 자성비드를 포함하는 RIP 완충액에서 배양하였다. 면역침강된 RNA를 분리하고 qPCR을 수행하여 HSPA7 및 miR-223를 검출하였다.

[0099] *통계적 분석*

[0100] 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 변수 분석 후 Tukey 검정을 수행하여 사후분석을 한 각 그룹 간 연속적인 변화를 비교하였다. p<0.05인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였으며, 모든 데이터 분석에 Prism5.0 소프트웨어 패키지를 사용하였다(GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, USA).

[0102] **실험결과**

[0103] *인간 동맥경화와 연관된 lncRNA의 동정*

[0104] 죽상경화반과 관련된 lncRNA를 동정하기 위해 RNA 시퀀싱을 수행하였다. 총 380개 RNA가 경화반(plaque)과 대조군 간 상이한 발현 양상을 보이는 것으로 나타났다(도 1a). FPKM(Fragments Per Kilobase of transcripts per Million mapped read)(배수 변화>2; p<0.05) 및 대조군과 상이한 경화반에서의 유전자 발현 패턴에 기반하여 계통 군집화 및 다차원 스케일링을 수행하였다. 도 1b는 경화반에서 고발현 또는 저발현되는 상위 lncRNA를 보여준다. 다차원 스케일링으로 각 그룹 간 유전자 발현 차이를 시각화하였다(도 1c). 현저하게 상이한 발현을 보이는 3개의 lncRNA(HSPA7, LOC102724659, LINC00982)를 선정하여 추가 실험을 진행하였다. HASMC를 LPS, oxLDL 또는 AngII와 함께 배양하자 HSPA7 만이 발현이 증가하였으며, 나머지 두 lncRNA는 유의한 발현 변화를 보이지 않았다(도 1d).

[0106] *HSPA7의 녹다운은 HASMC의 이동 및 염증성 변화를 저해한다*

[0107] HSPA7의 녹다운이 HASMC 이동에 미치는 영향을 조사하기 위해, 세포에 siHSPA7 또는 대조군 siRNA를 24시간 동안 형질전환하고 LPS, oxLDL 또는 AngII의 존재 또는 부재 하에 상부 챔버에 플레이팅하였다. 24시간 뒤, 하부 챔버에서 oxLDL에 의해 촉진된 HASMC의 이동이 siHSPA7 처리 후 유의하게 억제됨을 확인하였다(도 2a 및 2b). siHSPA7 또는 대조군 siRNA를 형질전환한 뒤, HASMC에 oxLDL를 24시간 동안 처리하거나 처리하지 않았다. ELISA 및 qPCR을 통해 oxLDL 처리 후 증가된 IL-1β와 IL-6의 발현 및 분비가 siHSPA7에 의해 억제됨을 확인하였다(도 2c). 면역형광염색 결과 수축성 SMC 표현형에 대한 마커인 SM22α 및 칼포닌 1이 oxLDL에 의해 감소하며 siHSPA7에 의해 다시 회복됨을 확인하였다. 대식세포-유사 세포의 마커인 CD68의 발현은 oxLDL에 의해 증가하였으나, siHSPA7에 의해 다시 부분적으로 억제되었다(도 2d). 표현형 마커, 특히 CNN1 및 CD68에 대한 HSPA7의 효과를 qPCR로 확인하였다(도 2e).

[0109] *HSPA7는 miR-223를 스폰징함으로써 HASMC의 염증성 변화를 촉진한다*

[0110] miRcode(<http://www.mircode.org/>)를 이용하여 HSPA7와 상호작용하는 후보 miRNA를 탐색한 결과, miR-223가 HSPA7 서열에 결합할 수 있는 최적의 부위를 가지는 것으로 나타났다. miRDB(<http://mirdb.org/>)를 통해 FOXO1가 miR-223의 결합 표적임을 확인하였다(도 3a). 나아가, miR-223는 심장 기능부전 및 혈관 염증과 관련된 것으로 보고되었다. HASMC에 miR-223 억제제 및/또는 siHSPA7 또는 대조군 siRNA를 형질전환하고 50 mg/mL의 oxLDL를 24시간 동안 처리하였다. 48시간 뒤 루시페라제 활성을 측정하였다. qPCR 결과 miR-223 억제제에

의한 *FOXO1* 발현증가 효과가 *siHSPA7* 처리 후 소멸하는 것으로 나타났다. *FOXO1*는 NF- κ B의 전사 활성화 인자이다. NF- κ B 활성이 miR-223 억제에 의해 증가하였지만, 이러한 효과는 *HSPA7* 녹다운에 의해 다시 감소하였다(도 3b). HASMC에 대한 동일한 처리 후 24시간 뒤, IL-1 β 및 IL-6의 분비가 miR-223 억제제에 의해 증가하였다. 키모카인, 특히 IL-6의 분비 증가는 *siHSPA7* 처리 후 약화되었으며, 이는 qPCR을 통해 다시 확인되었다(도 3c). 면역형광 염색에서, SM22 α 및 칼포닌1은 miR-223 억제제 처리에 의해 변화하지 않은 반면, 이들 마커는 *siHSPA7* 첨가 후 증가되었다(도 3d). 이러한 결과는 특히 *TAGLN* 유전자에 대한 qPCR로 검증하였다(도 3e).

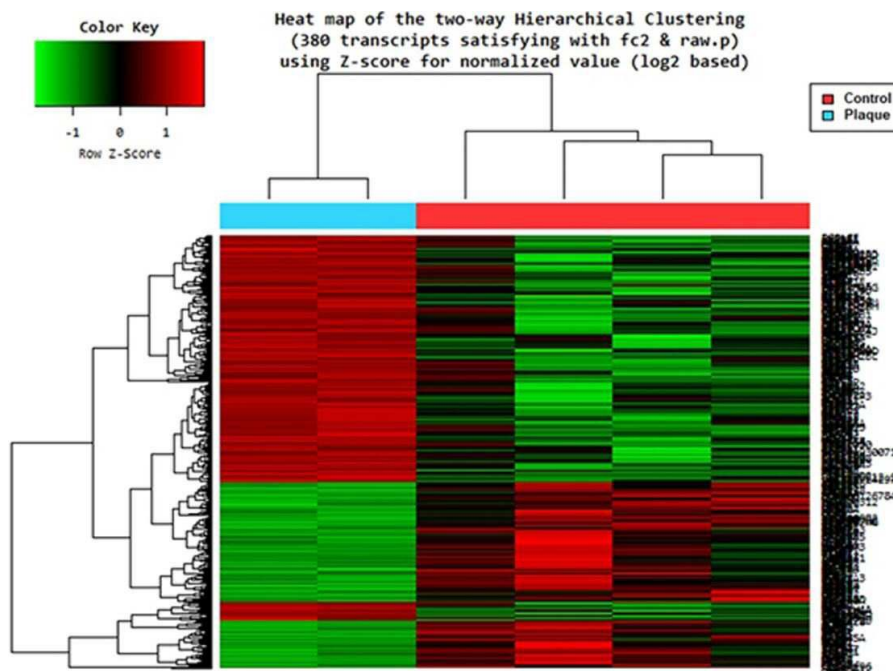
[0112] *HSPA7*는 AGO2-의존적으로 miR-223를 타겟팅한다

[0113] miRNA는 AGO2를 포함하는 miRNA 리보핵산단백질 복합체(miRNP) 형태로 존재하며, 이는 RNA-유도 사일런싱 복합체의 핵심 성분이다. *HSPA7*이 miRNP와 관련되었는지를 조사하기 위해, HASMC에서 AGO 항체를 이용하여 RIP 어레이를 수행하였다. AGO2 발현은 세포 내에서 oxLDL의 존재 여부와 무관하게 차이가 없었다. RIP 어레이 결과 *HSPA7*과 miR-223이 IgG 면역침전물에 비해 AGO2-포함 miRNP에서 증가됨을 확인하였다. 나아가, *HSPA7*은 oxLDL의 존재 하에 AGO2에 더 잘 결합하였다(도 3f).

[0115] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

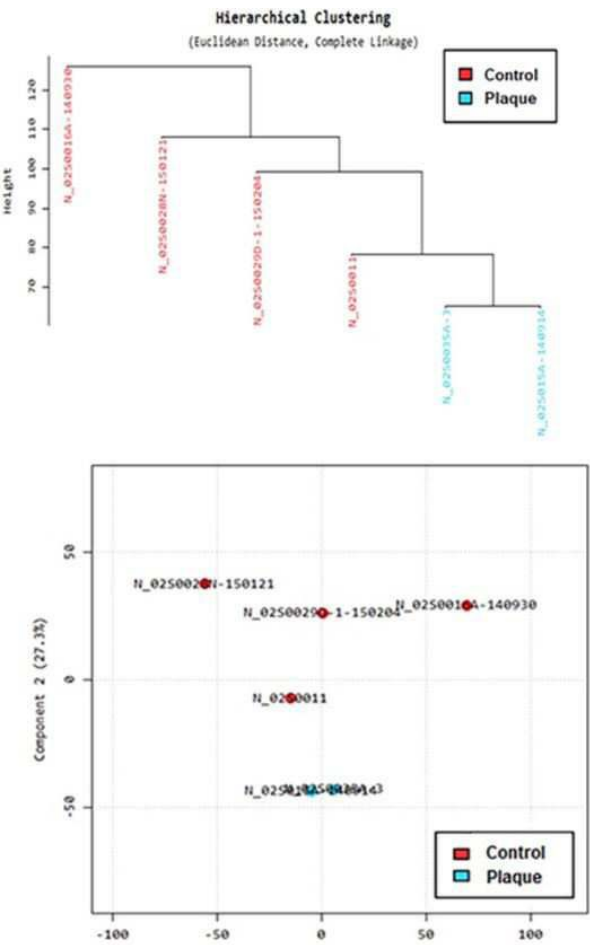
도면1a



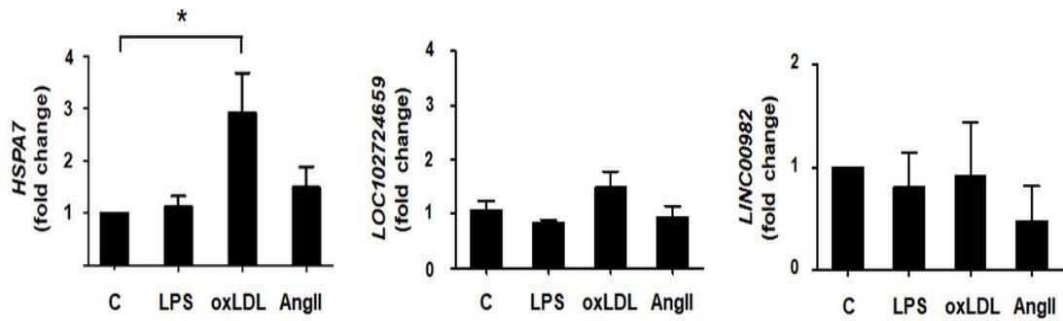
도면1b

	lncRNA accession	Chromosome	Start	Stop	Fold change	p
Up-regulated	<i>HSPA7</i>	1	161606291	161608217	6.13	4.50E-02
	<i>TYROBP</i>	19	35904401	35908309	2.85	2.70E-02
	<i>LIPE-AS1</i>	19	42397148	42652355	2.79	1.50E-03
	<i>PRDM16</i>	1	3059617	3067725	2.36	2.30E-02
	<i>LOC102724659</i>	3	46364660	46407059	2.18	4.64E-03
	<i>LAIR1</i>	19	54353624	54370556	2.09	2.11E-02
Down-regulated	<i>SLC7A7</i>	14	22773222	22819811	2.04	3.91E-04
	<i>MIR4697HG</i>	11	133896435	133901740	2.07	1.88E-03
	<i>LINC00982</i>	1	3059617	3067725	2.37	1.00E-03
	<i>LINC00312</i>	3	8571782	8574668	2.40	1.44E-02
	<i>NAV2-AS6</i>	11	19710934	19714672	2.86	1.00E-03

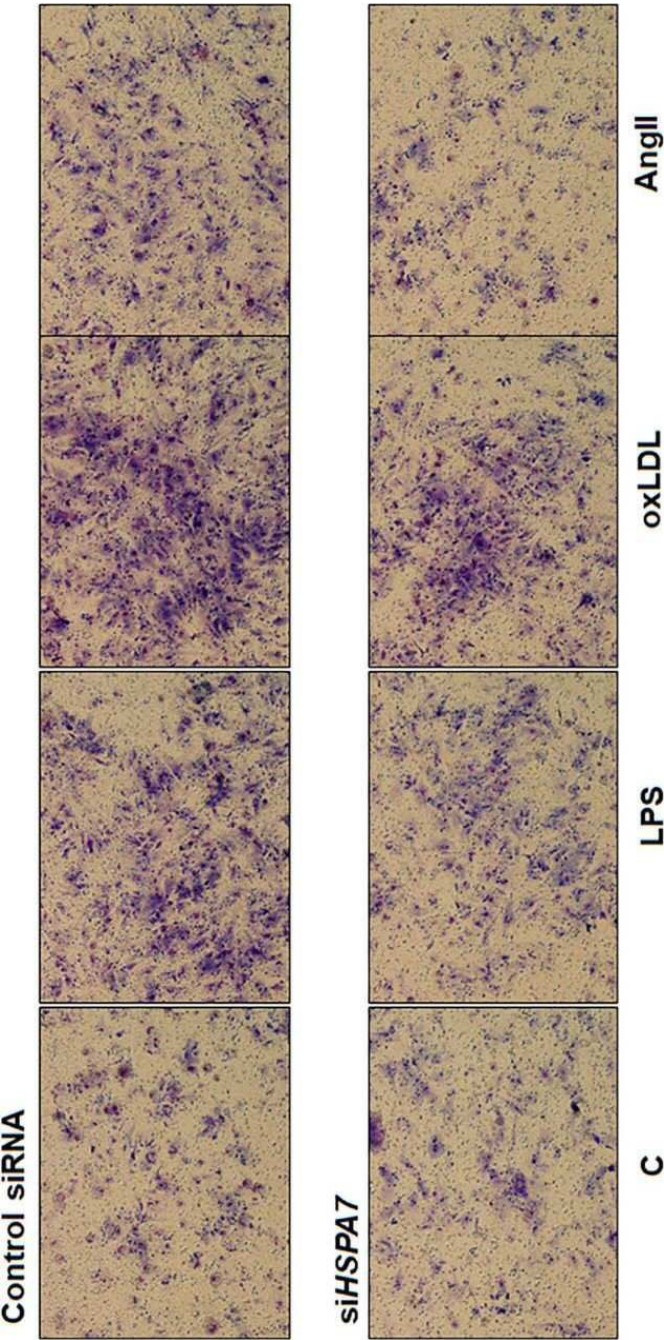
도면1c



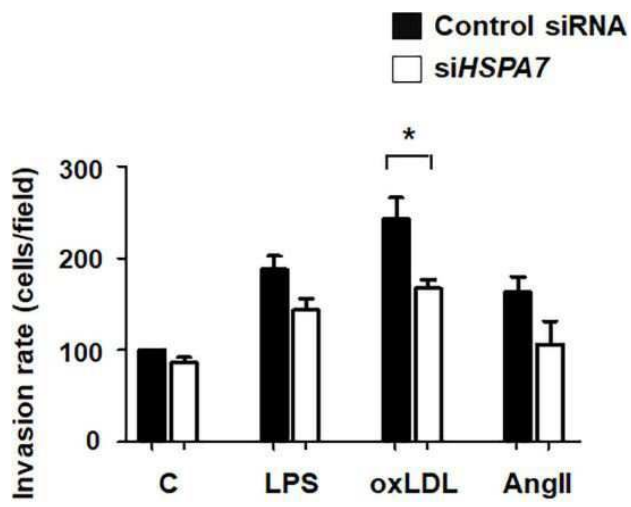
도면1d



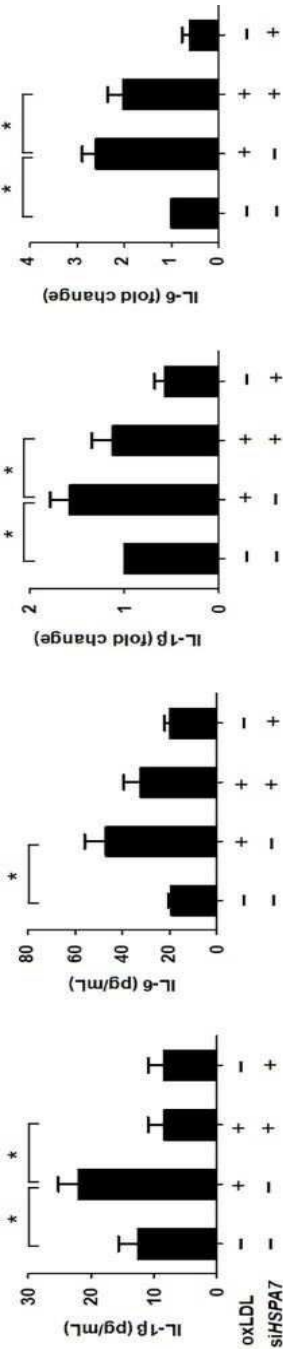
도면2a



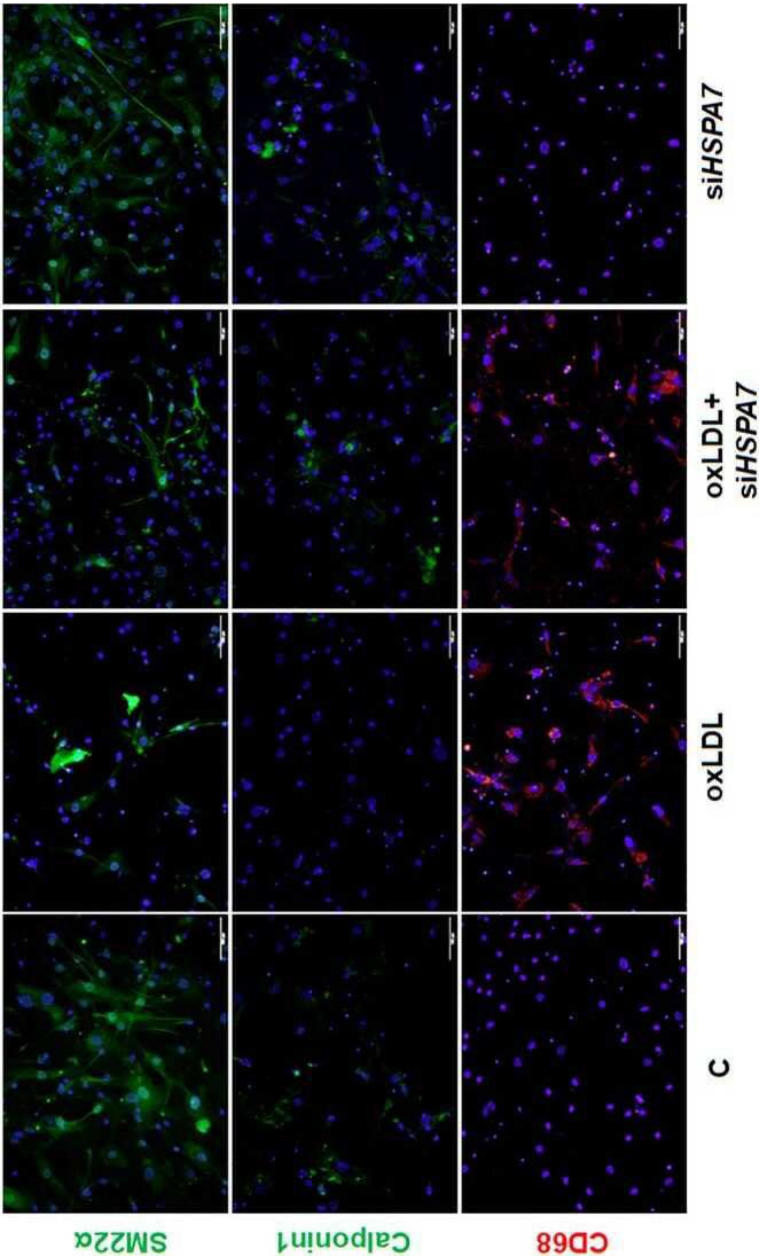
도면2b



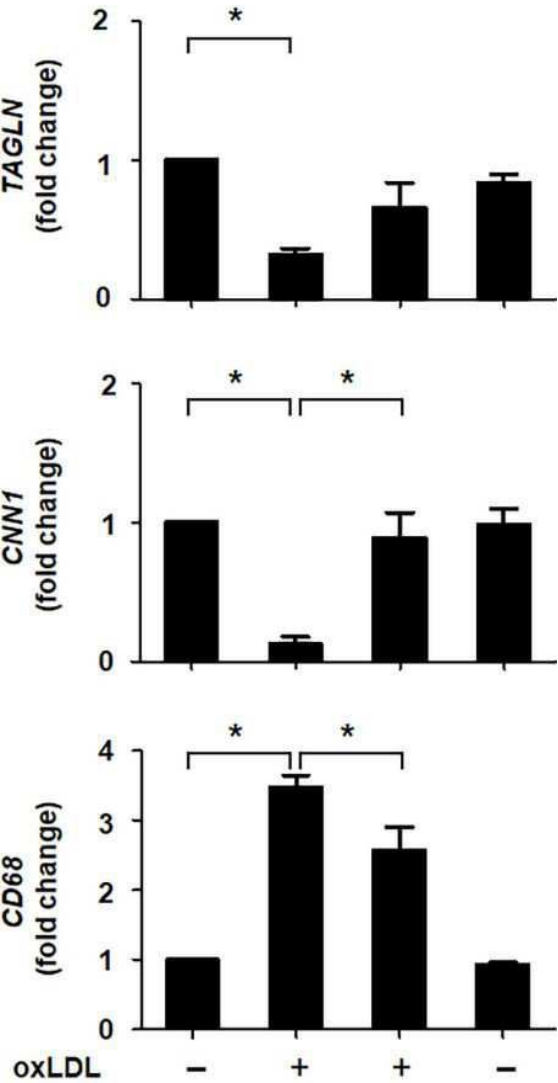
도면2c



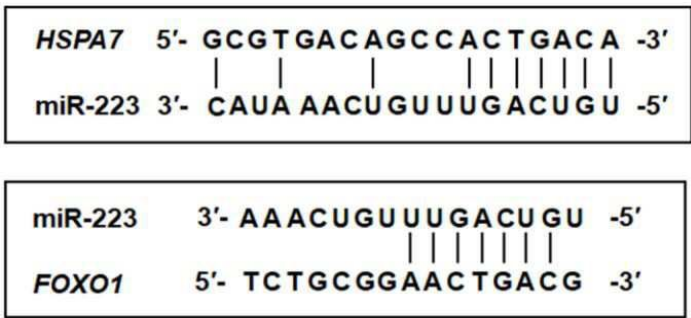
도면2d



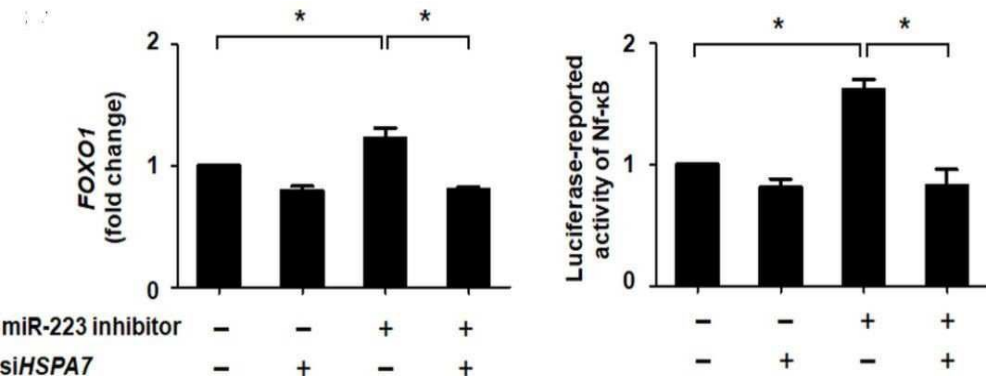
도면2e



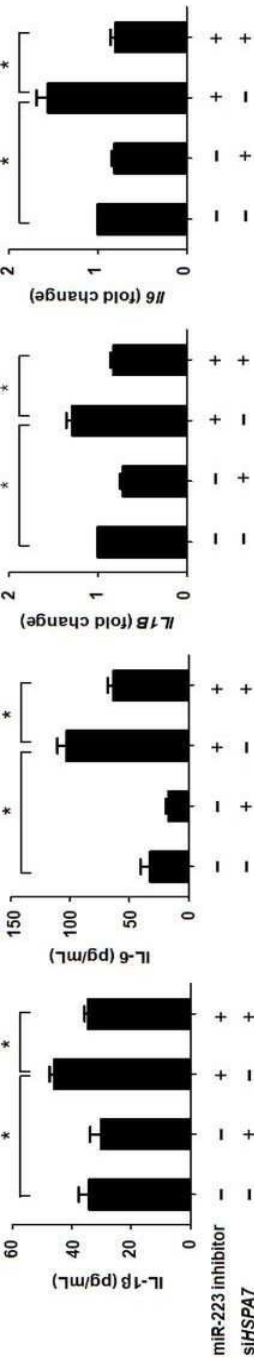
도면3a



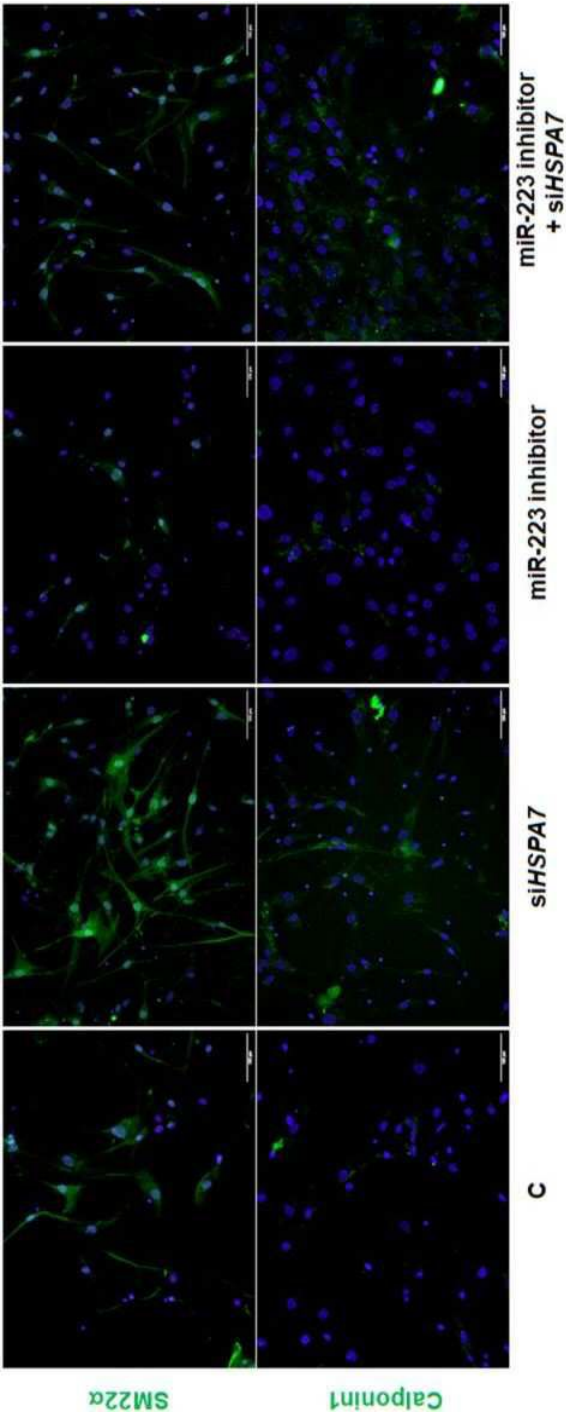
도면3b



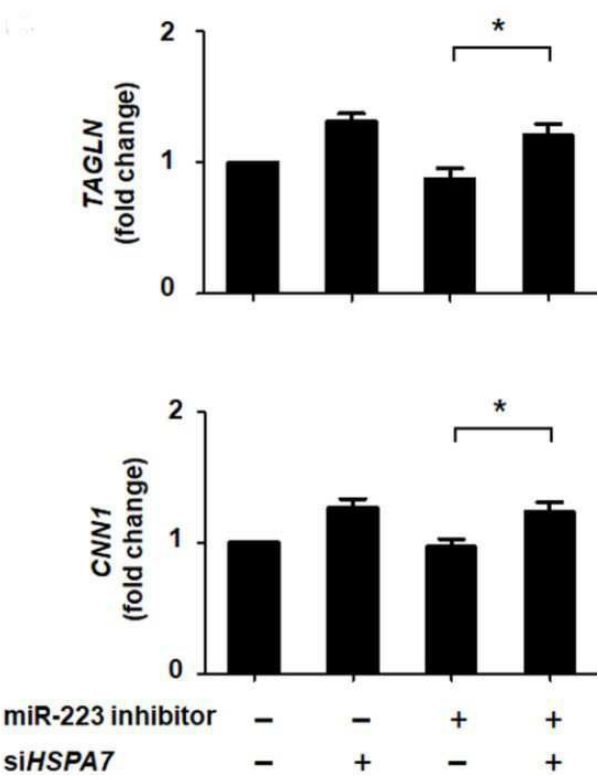
도면3c



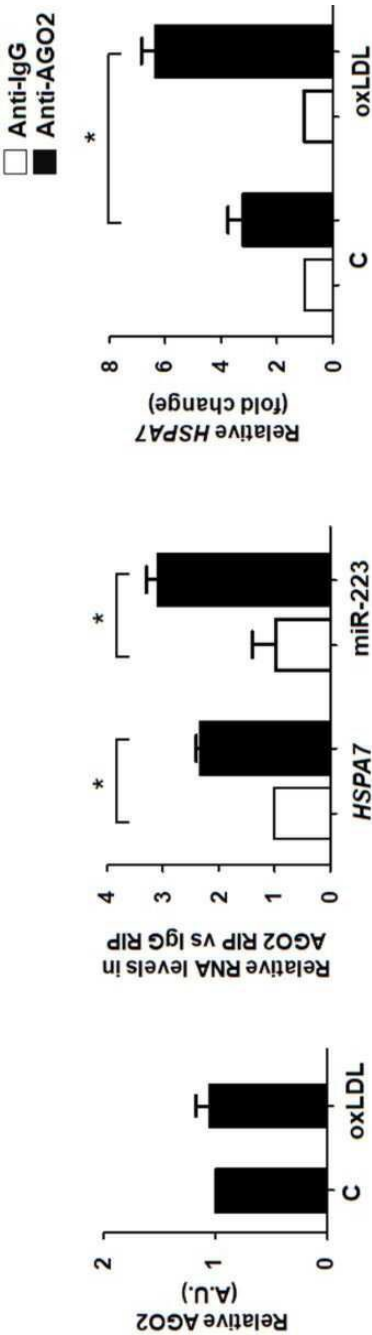
도면3d



도면3e



도면3f



서열 목록

- <110> Industry-academic cooperation foundation yonsei university
- <120> Long Noncoding RNA Implicated in Cardiovascular Disease and Use Thereof
- <130> HPC-9853
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 2493

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ccccggcggg cgggcgggag gctctcgact gggcgggaag gtgcgggaag gttcgcggcg      60
gcgggggtcgg ggaggtgcaa aaggatgaaa agcccgtgga agcggagctg agcagatccg      120
agccgggctg gcggcagaga aaccgcaggg agagcctcac tgctgagcgc ccctcgacgg      180

cggagcggca gcagcctccg tggcctccag catccgacaa gaagcttcag ccatgcaggc      240
cccacgggag ctgcgggtgg gcatcgacct gggcaccacc tactcgtgcg tgggcgtgtt      300
tcagcagggc cgctggaga tcctggccaa cgaccagggc aaccgcacca cgcccagcta      360
cgtggccttc accgacaccg agcggctggt cggggacgcg gccaagagcc aggcggccct      420
gaacccccac aacaccgtgt tcgatgccaa gcggctgac gggcgcaagt tcgcggacac      480
cacggtgcag tcggacatga agcactggcc ctccagggtg gtgagcgagg gcggcaagcc      540
caaggtgcgc gtatgtctacc gcggggagga caagacgttc taccgcagg agatctcgtc      600

catggtgctg agcaagatga aggagacggc cgaggcgtac ctgggccagc ccgtgaagca      660
cgcagtgate accgtgccca cctatttcag taactcgag cgccaggcca ccaaggacgc      720
ggggggccatc gcggggctca aggtgctgcc gatcatcaat gaggccacgg cagcagccat      780
cgcctatggg ctggaccggc ggggcgcggg aaagcgcaac gtgtcattt ttgacctggg      840
tgggggcacc ttgatgtgt cggttctctc cattgacgcc ggtgtctttg aggtgaaagc      900
cactgtctga gataccacc tgggaggaga ggacttcgac aaccggctcg tgaaccactt      960
catggaagaa ttccggcgga agcatgggaa ggacctgagc gggaacaagc gtgccctgcg      1020

caggctgcgc acagcctgtg agcgcgccaa gcgcaccccg tctccagca cccaggccac      1080
cctggagata gactccctgt tcgagggcgt ggacttttac aagtcacatc ctctgccccg      1140
ctttgaggaa ctgtgctcag acctcttcg cagcacctg gagccggtgg agaaggccct      1200
gcgggatgcc aagctggaca aggcccagat tcatgacttc gtcttggggg gagggctcca      1260
ctcgcatccc caaggtgcag aagtgtctgc aggacttctt caacggcaag gagctgaaca      1320
agagcatcaa cctgatgag gctgtggcct atgggtctgc tgtgcaggcg gccgtgttga      1380
tgggggacaa atgtgagaaa gtgcaggatc tctgtctgct ggatgtggct cccctgtctc      1440

tggggctgga gacagcaggt ggggtgatga ccacgtgat ccagaggaac gccactatcc      1500
ccaccaagca gaccagact ttaccacct actcgacaa ccagcctggg gtcttcatcc      1560
aggtgtatga ggttgagagg gccatgacca aggacaacaa cctgctgggg cgttttgaac      1620
tcattggcat cctcctgcc ccacatggag tccccagat agaggtgacg tttgacattg      1680

```

atgctaattg catcctgagc gtgacagcca ctgacaggag cacaggtaag gctaacaaga	1740
tcaccaatga caagggccgg ctgagcaagg aggaggtgga gaggatggtt catgaagccg	1800
agcagtacgg ggctgaggat gaggcccaga gggacagagt ggctgccaaa aactcgctgg	1860
aggcccatgt cticcatgtg aaaggttctt tgcaagagga aagccttagg gacaagattc	1920
ccgaagagga caggcgcaaa gtgcaagaca agtgtcagga agtccttgcc tggctggagc	1980
acaaccagct ggacagagaag gaggagtatg agcatcagaa gaggagctg gagcaaatct	2040
gtcgcccat ctctccagg ctctatgggg ggcttggtgt ccctgggggc agcagttgta	2100
gcgctcaagc ccaccagggg gacccagca ccggcccat cattgaggag gttgattgaa	2160
tggcccttcg tgataagtca gctgtgactg tcagggtat gctatgggc ttctagactg	2220
tcttctatga tcctgccctt cagagatgaa gggcttgggg gggcttccc tccaaagcta	2280
gaactttctt tccaggataa ctgaagtctt ttgacttttt ggggggaggg cggttcatcc	2340
tcttctgctt caataaaaa gtcattaatt tattaaaact tgtgtggcac tttaacattg	2400
ctttcaccta tattttgtgt attttggtac ttgtatgtat gaattttgtt atgtaaaata	2460
tagttataga cctaaataaa cttttaaaac tcc	2493