

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0089281
A61K 38/16 (2006.01) (43) 공개일자 2006년08월09일

(21) 출원번호 10-2005-0009875

(22) 출원일자 2005년02월03일

(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자 강상원
서울시 서대문구 대현동 144번지 럭키아파트 102동 703호
최민희
경기도 성남시 분당구 구미동 무지개마을라이프아파트 701동 501호

(74) 대리인 안소영

심사청구 : 있음

(54) 퍼록시레독신 2 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈관재협착 예방 및 치료용 약학조성물, 퍼록시레독신 2유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용하는 혈관재협착 치료제 스크리닝 방법

요약

본 발명은 퍼록시레독신 2(Prx II) 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈관 재협착(restenosis, renarrowing) 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 유효성분으로 퍼록시레독신 2이외에도 혈관 재협착을 억제하는 다른 성분들과 함께, 경동맥, 관상동맥, 말초동맥, 신동맥 등의 각종 혈관 재협착과 관련된 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 퍼록시레독신 2 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용하는 혈관재협착 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 스크리닝 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법은 혈관재협착 치료제의 탐색 및 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 8

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 정상 MEF와 Prx II^(-/-) MEF에서 PDGF 자극여부에 따른 세포내 H₂O₂의 생성정도를 관찰한 것이다.

도 2는 정상 MEF와 Prx II^(-/-) MEF에서 PDGF 자극여부에 따른 세포내 전체단백질의 인산화 정도를 관찰한 것이다.

도 3은 정상 MEF와 Prx II^(-/-) MEF에서 PDGF 자극여부에 따른 세포내 개별 신호전달 단백질의 인산화 정도를 관찰한 것이다.

도 4는 정상 MEF와 Prx II^(-/-) MEF에서 PDGF 자극여부에 따른 PDGFRb의 여러 타이로신 잔기에서의 인산화 변화를 관찰한 것이다.

도 5에서, 도 5a는 마우스 Prx II^(-/-) MEF 에 인간 Prx II 야생형 단백질을 재발현시켰을 때, 세포내 전체 단백질 및 PLCg1 의 인산화 변화를 관찰한 것이고, 도 5b는 마우스 Prx II^(-/-) MEF 에 인간 Prx II 야생형 및 불활성 돌연변이 단백질을 재발현시켰을 때, PDGF 자극여부에 따른 PDGFRb의 여러 타이로신 잔기에서의 인산화 변화를 관찰한 것이다

도 6은 마우스 Prx II^(-/-) MEF 에 인간 Prx II 야생형 단백질을 발현시켰을 때, PDGF를 향한 세포이동 정도(a) 및 이동한 세포수(b)를 나타낸 것이다.)

도 7은 인간 VSMC 에 Prx II 야생형 단백질을 과발현시켰을 때, PDGF 처리시 Prx II 단백질 발현, 전체 단백질 인산화 및 PDGFRb의 타이로신 인산화 양상을 나타낸 것이다.

도 8은 인간 VSMC 에 Prx II 단백질을 과발현시켰을 때, PDGF를 향한 세포이동 정도(a) 및 이동한 세포수(b)를 나타낸 것이다.

도 9은 Prx II^(-/-) 마우스로부터 분리 배양된 VSMC에 PDGF 처리시 PDGFRb의 타이로신 인산화 양상을 나타낸 것이다.

도 10는 정상과 Prx II^(-/-) 마우스에서의 혈관상처유발 후에 신생내막이 비후됨을 비교 관찰한 것이다.

도 11은 Prx II^(-/-) 마우스에 IgG 및 anti-PDGF 중화항체를 주사한 후 혈관상처유발에 따른 신생내막 비후 정도를 비교하여 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 혈관 재협착(restenosis, renarrowing) 예방 및 치료용 약학조성물, 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용하는 혈관재협착 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

퍼옥시레독신(Peroxiredoxin, Prx)은 생체 내에서 과산화수소 및 알킬 하이드로퍼록사이드의 스캐빈저이다(Chae, H. Z. *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**: 7017-7021, 1994). 포유동물에서는 타입 I~VI Prx 아이소자임으로 구분되며, 조직의 다양한 부분에서 관찰된다(Rhee, SG *et al.*, *IUBMB Life* **52**:35~41, 2001). 이것은 세포 내에서 강한 항산화 활성을 나타낸다. Prx 타입 VI를 제외하고 이미 알려진 모든 Prx는 전자 공여자(electron donor)로서 티오레독신(thioredoxin)을 이용하고, 그래서 티오레독신 퍼록시다제로서 알려져 있었다.

이들의 항산화 활성에 더하여, Prxs는 세포 증식 및 분화, 자연킬러세포(natural killer cell) 활성의 증강, 라디칼에 민감한 단백질의 보호, 헴(heme) 대사과정 및 세포간 신호전달과 같은 많은 세포의 기능들에 연관되어 있으며(Nemoto Y, *et al.*, *Gene* **91**:261~265, 1990; Prosperi MT, *et al.*, *Genomics*, **19**:236~241,1994; Tsuji K, *et al.*, *Biochem J.* **307**:377~381, 1995; Shau H, *et al.*, *Immunogenetics*, **40**:129~134,1994; Watabe S, *et al.*, *Biochem Biophys Res*

Commun. **213**:1010~1016, 1995; Iwahara S, *et al.*, *Biochemistry* **34**:13398~13406, 1995; Wen ST, *et al.*, *Genes Dev.* **11**:2456~2467, 1997), 배양한 동물세포에서의 퍼록시레독신의 생화학적 특성은 세포내 환원 전위(redox potential)를 유지하는데 중요한 역할을 하는 것 중의 하나임을 보여준다.

이 중, 퍼록시레독신 2 (2-cys peroxiredoxin, Prx II)은 항산화 단백질로, 혈소판유도성장인자(PDGF)와 상피세포유도성장인자(EGF)를 포함하는 성장인자들에 의해 생성되는 세포 내 H_2O_2 를 환원시켜 제거하는 퍼록시다아제이다.

Prx II는 세포질에 많이 존재하며, 단백질의 C-말단부위를 통해 인테그랄 막단백질 또는 세포막에 결합하는 것으로 알려져 있으며, H_2O_2 에 높은 친화성(K_m for $H_2O_2 < 10 \mu M$)을 가진다.

또한, Prx II는 적혈구에서 많이 발현이 되고, 세포 내에서 활성산소종(ROS)-매개된 손상에 대하여 보호하는 역할을 한다고 알려져 있고, 헤모글로빈 축적 전에 적혈구 분화 초기 단계에서 유도된다고 알려져 있다(Rabilloud T, *et al.*, *Biochem J.* **312**:699-705, 1995).

상기에서 혈소판 유도 성장인자 (platelet-derived growth factor, 이하, PDGF)는 H_2O_2 의 세포 내 생성을 통하여 다양한 신호전달 단백질들의 타이로신 인산화를 조절하는 성장인자로, 특히 혈관재형성(vascular remodeling) 동안 평활근세포(smooth muscle cells)의 증식과 이동을 위한 중요한 인자인데, 이와 관련된 Prx II는 PDGF에 의한 H_2O_2 생성의 중요한 조절자 역할을 하고 있으나 관련 신호전달에서의 정확한 기능은 밝혀지지 않았다.

이태훈 등은 퍼록시레독신 II가 결핍된 마우스 (Prx II $-/-$)에서 용혈성 빈혈이 발생됨을 관찰하여 Prx II가 마우스에서 산화적 스트레스로부터 RBC를 보호하는 역할을 함을 개시하고 있고(Lee TH *et al.*, *Blood*, **101**(12):pp5033-5038, 2003), 또한, 미국특허공개 제2002/0168353호는 정제된 타입 I 및 타입 II 퍼록시레독신을 함유하는 HIV-1 감염의 예방 및 치료용 조성물을 개시하고 있다.

한편, 재협착(restenosis / renarrowing)은 관상동맥조영술에 의한 진단으로 관상동맥성형술 후 추적 조영술 상 혈관내경의 협착이 50% 이상인 경우를 말한다. 이는 관상동맥협착증의 치료를 위한 관상동맥성형술(풍선 확장술 및 스텐트 삽입) 이후에 시술 환자의 약 30% 정도에게서 발생하고 있으며, 현재까지 심혈관계질환의 성공적 치료에 중요한 장애가 되고 있다.

재협착의 원인기작은 아직 정확하게 규명되지 않았으나, 혈관 성형술 또는 풍선 확장술 동안의 혈관 내피세포 손상 때문에 성장인자 및 사이토카인이 국소적으로 분비되고, 이들이 오토크라인(autocrine) 및 파라크라인(paracrine)을 통해 평활근세포의 증식 및 이동(smooth muscle cell proliferation and migration)을 유도함에 따라, 동맥 루멘이 좁아져서 재협착에 이르게 한다고 알려져 있다. 따라서 최근 평활근 세포의 증식이 관상동맥 성형술의 효율을 제한하는 주요한 임상상 문제로 인식되어 왔다(Bauters C, Isner JM, *Prog Cardiovasc Dis.* **40**(2):107-116, 1997, 미국특허등록 제6,780,406호, 제6,740,678호).

지금까지 재협착을 예방하거나 감소시키기 위해서 많은 노력이 시도되었고, 특히 안지오텐신 전환효소 억제제(ACE), 세포주기조절 단백질에 대한 안티센스 RNA 및 티미딘 카이네이즈 유전자를 이용하여 평활근세포 증식을 조절하려는 시도가 있었다(Rakugi *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **93**:339-346, 1994; Simons *et al.*, *Nature*, **359**:67-70, 1992; 미국특허등록 제6,780,406호).

이에 본 발명자는 이 Prx II의 세포내 기능을 밝히기 위해 꾸준히 연구한 결과, Prx II가 혈관 평활근 세포의 이동에 관여하여 혈관재협착 증상을 개선시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명에서는 Prx II 단백질을 유효성분으로 함유하며, 혈관재협착을 예방, 치료할 수 있는 약학조성물을 제공하고자 한다.

또한, 본 발명은 PrxII 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질을 함유하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물과 상기 조성물을 이용하여 혈관 재협착 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 Prx II 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈관 재협착(restenosis, renarrowing) 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

본 발명은 Prx II 단백질을 유효성분으로 함유하는, 경동맥(carotid artery), 관상동맥(coronary artery), 말초 동맥(peripheral artery), 신동맥(renal artery) 혈관 재협착의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명은 Prx II 단백질을 유효성분으로 함유하는, 이식 혈관(grafted vessel), 혈관 성형술 시술부위(angioplasted segment)에서 만성적으로(chronic) 진행되는 경화과정 및 혈관성형술에 의해 유발되는 단기적 세포증식에 의한 혈관 재협착의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물은 유효성분으로 Prx II 단백질 이외에도 추가로, 혈관 재협착 억제 활성을 갖는 물질을 함유할 수 있다.

본 발명의 유효성분인 Prx II 단백질은 성장인자의 신호전달을 통한 수용체의 타이로신 인산화를 억제하고, 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동을 억제하며, 신생내막의 비후를 억제하는 활성이 있으며, 이 단백질은 서열번호 1에 기재된 prx II 유전자의 염기서열로부터 발현될 수 있으며, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는다.

Prx II(gene loci *Prdx2*) 단백질은 세포 내 H_2O_2 를 환원시키는 퍼록시다제 2-cys Prx 중 하나로, PDGF에 의해 생성되는 H_2O_2 를 환원시켜, PDGFR β -PLC γ 1에서 자리특이적 방식으로 일어나는 인산화 억제를 통해 세포신호전달 증폭을 억제한다. 이러한 기작을 통해 혈관 손상 후 평활근 세포의 증식 및 이동을 억제하고, 신생내막의 비후를 억제하는 활성을 갖는다.

Prx II 결손 배아섬유세포는 PDGF 자극에서 H_2O_2 의 세포 내 양이 증가하고, 세포 내 단백질의 인산화가 증가된 양상을 나타낸다. 특히 PLC γ 1(phospholipase gamma1)의 타이로신 783, 1253에서 증가된 인산화를 나타내고, PDGF 수용체의 인산화 잔기 중 타이로신 579/581과 857에서만 증가된 인산화를 보여준다. 이 세포에 야생형의 Prx II 단백질을 재발현시키면 상기와 같은 현상이 되돌아가, 타이로신 인산화가 억제된다.

Prx II는 또한 인간의 평활근 세포(Primary smooth muscle cells) 및 마우스의 배아섬유아세포(mouse embryonic fibroblast)에서도 PDGFR β 의 타이로신 인산화를 위치-특이적으로 억제하고, 세포의 이동을 억제한다.

또한, Prx II-결실 마우스(Prx II^(-/-) mice)의 경동맥에서 상처유발 후 혈관 재협착 동안에 신생내막 비후(neointimal thickening)가 야생형에 비해 현저히 높다.

이렇게 혈관 재형성(vascular remodeling) 동안 Prx II 기능의 상실이 평활근 세포의 이동을 증가시키므로, 본 발명의 평활근 세포의 이동 억제 및 신생내막 비후 억제 활성을 갖는 Prx II를 유효성분으로 함유하는 약학조성물은 혈관재협착 등의 평활근 세포 이동에 의해 유발되는 의한 심혈관계 질환의 진단, 예방 및 치료용 의약품으로 사용될 수 있다(Ferns GA, et al., *Science*. 1991 Sep 6;253(5024):1129-32; Heldin CH, Westermark B. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1283-316).

본 발명은 PDGFR 신호전달에서 H_2O_2 -기반 신호조절자(signal regulator)로서 Prx II가 특별한 작용을 하며, 그로 인해 심혈관계 질환의 새로운 치료 표적 단백질이 될 수 있음을 제시한다.

본 발명의 Prx II 단백질을 유효 성분으로 함유하는 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

본 발명의 Prx II 단백질을 유효 성분으로 함유하는 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

본 발명의 Prx II 단백질을 유효 성분으로 함유하는 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

본 발명의 Prx II 단백질을 유효 성분으로 함유하는 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

본 발명의 Prx II 단백질을 유효 성분으로 함유하는 조성물의 투여량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, PrxII 단백질을 1일 1 회 내지 수회 투여시, 0.1 ng/kg ~ 10mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

본 발명은 포유류의 Prx II 유전자를 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물이 포함하는 Prx II 유전자는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 1의 다형현상(polymorphism)을 포함하는 염기서열, 서열번호 1 또는 이의 다형현상을 포함하는 유전자 단편(fragment) 염기서열 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

본 발명은 포유류의 Prx II 단백질을 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물이 포함하는 Prx II 단백질은 서열번호 2의 아미노산 구조를 갖거나, 또는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 1의 다형현상을 포함하는 염기서열 중 선택된 하나로부터 발현된 단백질, Prx II와 동등한 생리적 활성을 나타내는 Prx II 폴리펩티드 단편 중 선택된 1종 이상 일 수 있다.

본 발명의 스크리닝용 조성물은 혈관재협착 증상을 개선시키는 효과가 있다.

또한 본 발명은 상기 Prx II 유전자를 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물을 표적물질로 이용하는 혈관재협착 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명은 상기 Prx II 유전자를 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 상기 조성물에 포함된 유전자의 발현을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어지는 혈관재협착 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 Prx II 단백질을 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물을 표적물질로 이용하는 혈관재협착 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명은 상기 Prx II 단백질을 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물과 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 시험대상물질이 상기 조성물에 포함된 단백질의 기능을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계로 이루어지는 혈관재협착 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 prx II 유전자를 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.

예를 들면, 생체 외부에서(in vitro) 상기 유전자와 시험대상물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류 세포와 시험대상물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현을 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현을 측정하는 방법 등을 사용할 수 있다.

이러한 경우 본 발명의 조성물은 prx II 유전자 외에도, 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 Prx II 단백질을 포함하는 조성물과 시험대상물질 간의 반응 확인은, 단백질-단백질, 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.

예를 들면, prx II 유전자 또는 Prx II 단백질과 시험대상물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), Prx II 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.

이러한 경우 본 발명의 조성물은 Prx II로부터 발현된 단백질 외에도, 단백질의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생체 내(in vivo) 실험을 위해, 상기 단백질을 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법에서, 시험대상물질은 통상적인 선정방식에 따라 혈관 재협착 치료제로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물 등이 될 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 유전자 발현을 증진시키거나 단백질의 기능을 증진시키는 활성을 나타내는 시험대상물질 및 반대로 유전자 발현을 억제시키거나 단백질의 기능을 억제시키는 활성을 나타내는 시험대상물질은, 전자의 경우, 혈관재협착 치료제 후보물질이 될 수 있고, 후자의 경우는 시험대상물질에 대한 억제제를 개발함으로써 혈관재협착 치료제 후보물질이 될 수 있다.

이와 같은 혈관 재협착 치료제 후보물질은 이후의 혈관 재협착 치료제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 Prx II 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 증진효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 혈관 재협착 치료제를 개발할 수 있다.

이렇게 하여 얻어진 물질은 포유류의 Prx II 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질에 대해 부분적 또는 완전한 활성 증진 효과를 나타내게 되므로, Prx II 유전자 발현 억제 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능 저하에 의한 혈관 재협착, 동맥 경화, 그 외 유발되는 질환들을 억제할 수 있다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예1] Prx II에 의한 세포내 단백질 타이로신 인산화 양상 관찰

1-1) Prx II 발현여부에 따른 PDGF 자극에 대한 H_2O_2 의 생성 및 타이로신 인산화 관찰

본 실시예에서는 세포내 Prx II 발현여부에 따른 PDGF 자극시 H_2O_2 의 생성 수준 변화를 관찰하였다.

야생형 Prx II^(+/+) MEF(wild type Prx II^(+/+) mouse embryonic fibroblast) 및 Prx II^(-/-) MEFs는 Prx II^(+/-) 마우스를 교배(mating)시키고, 임신 10일째에 배(embryo)를 꺼내어 알려진 방법에 따라 준비되었다(Kang, S. W. et al., *J Biol Chem* **279**, 2535-43 (2004)). PDGF자극을 위해 PDGF-BB(25 ng/ml, Upstate)를 사용하였다.

또한, H_2O_2 생성수준을 측정하기 위해, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(H_2DCFDA , Molecular probes 사)를 사용하였다.

이것을 세포에 처리시 플라즈마 막(plasma membrane)을 지나 세포 안으로 수송된 후 내생적 에스테라제(endogenous esterase)에 의해 불투과성의 2',7'-dichlorofluorescein (H_2DCF)으로 가수분해되어 저장되는데, 이것은 세포내 H_2O_2 와 반응하여 산화되면서 488nm와 515nm에서 각각 여기(excitation) 및 방출 피크(emission peak)를 가지는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)을 형성하여 형광탐지가 가능하게 된다.

PrxII^(+/+) MEF 및 PrxII^(-/-) MEFs 세포들은 10% FBS(fetal bovine serum) 및 항생제를 함유하는 DMEM에서 배양되고, PDGF 자극 전에 0.5% FBS를 함유하는 DMEM 하에서 24시간동안 혈청고갈처리(serum starvation)하였다. PDGF 자극은 상기 세포에 25 ng/ml의 농도로 PDGF를 처리하여 자극하고, 5분, 10분, 30분 동안 처리하였다. PDGF자극 후, 세포들을 HBSS (Hepes-buffered saline solution)으로 씻고 5 mM DCFH-DA 를 넣고 5분간 더 반응시킨 후, 공초점 레이저 현미경(confocal laser microscope)을 사용하여 형광을 측정하였다(Kang, S. W. et al. *J Biol Chem* **273**, 6297-302 (1998)).

도 1a은 세포에 PDGF-BB의 자극 후 10분 경과 시에 2',7'-DCF 형광을 측정한 사진이며, PrxII^(-/-) MEFs에서는 PrxII^(+/+) MEFs에 비해 PDGF 자극 전 후 H_2O_2 생성 수준이 높음을 확인할 수 있었다.

도 1b는 시간별로 측정한 DCF의 상대적인 형광강도를 나타낸 그래프이며, 야생형 세포보다 PrxII 결실된 마우스세포에서 PDGF에 대한 H_2O_2 의 생성이 약 2배정도 높음을 알 수 있으며, H_2O_2 는 일시적으로 생성되고 30분 이내에 기본 수준으로 돌아감을 확인할 수 있었다.

1-2) 세포 단백질 타이로신 인산화 관찰

상기 1-1)과 같이 PrxII^(+/+) MEF 및 PrxII^(-/-) MEF 세포에 PDGF를 처리한 후, 시간에 따른 세포내 단백질의 인산화 정도를 확인하였다.

각 세포에서 단백질을 추출한 후, 항 인산화 항체(anti-phosphorylation antibody, 4G10, Upstate)로 면역블롯분석을 수행하여 단백질 타이로신 인산화 정도를 분석하였다. PrxII 단백질 항체(Labfrontier Co., Korea), 튜불린 항체 (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 면역블롯분석을 시행하였고, 그 결과를 도 2 에 나타내었다.

PDGF에 의해 유도되는 단백질 타이로신의 인산화를 비교해보면, 야생형 세포에 비해 PrxII^(-/-) MEFs에서 시간경과(time course)에 따른 변화와 H_2O_2 생성량 측면에서 1-1) 실험과 일치하게 극적으로 높아지는 것을 볼 수 있었다(도 2).

1-3) 포스포라이페이스 C 감마 1(phospholipase C g 1)의 인산화 관찰

PrxII 발현 여부에 따른 하위 신호전달분자(downstream signaling molecule)의 활성화를 포스포-특이적 항체(phospho-specific antibodies)로 분석해보았다.

PrxII^(+/+) MEF 및 PrxII^(-/-) MEF 세포에 PDGF를 처리한 후, 시간에 따른 Src, PLCg1, ERK2, Akt단백질의 인산화 정도를 확인하기 위해 면역블롯분석을 수행하였다. 항체는 포스포-Src 항체(phospho-Src antibodies, Biosource), 포스포-Akt 항체(Cell Signaling Technology), 포스포-ERK 항체(Cell Signaling Technology)를 사용하였고, c-Src, Akt, PDGFRb(M-20), 그리고 ERK2는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였다. PLCg1 포스포-PLCg1 (pY783과 pY1253) 항체는 참고문헌에 기술되어 있는 바에 따라 제작하였다(Sekiya F, et al., *J Biol Chem*. 2004 279(31):32181-90).

도 3의 결과를 보면, PLCg1에서 활성화를 위해 필수적인 것으로 알려져 있는 Tyr783과 Tyr1253 잔기의 인산화가 야생형 세포와 비교하여 PrxII^(-/-) MEFs에서 증가되었다. 그러나, c-Src, ERK와 Akt의 활성화-의존 인산화(activation-dependent phosphorylation)에는 영향이 없음을 확인할 수 있었다.

1-4) PrxII에 의한 PDGFRb 활성화의 인산화 자리 특이적 조절

1-4-1) 항체 제조

PDGFR β 의 잘 알려진 인산화되는 7개의 타이로신 잔기(각각은 c-Src, PI-3K의 p85 subunit, GAP, Grb2, SHP-2, PLC γ 와 같은 SH2 domain을 갖고 있는 신호전달 분자들의 결합위치를 제공한다)에 해당하는 펩티드 부위에 대한 포스포-특이적 항체를 제작하였다.

포스포-특이적 PDGFR β 항체(phospho-specific PDGFR β antibodies)의 생산에 사용된 포스포-펩타이드 항원(phospho-peptide antigens, SynPep, USA)은 다음과 같다: pY579, DGHE p HYVDPMQ; pY716, SAEL p Y-SNALPVG ; pY740, SDGG p IMDMSKDE; pY751, ESVD p IVPMLDMK; pY771, ESSN p IMAPYDNY; pY857, RDSN p HSKGSTF; pY1009, SSVL p YTAVQPNE; pY1021, GDND p HIPLPDP; (인간 PDGFR β 의 아미노산 서열에서 각각의 인산화되는 타이로신(tyrosine) 잔기의 염기는 이탤릭체로 표기하였다).

포스포-펩타이드는 글루타르알데하이드를 사용하여 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)과 결합시켜서 토끼에 주사하였다. 토끼 항혈청은 비-인산화된, 인산화된 펩티드-컨쥬게이트드 아피젤-15(Affigel-15, Bio-Rad) 아가 로즈 레진에서 연속적 크로마토그래피(sequential chromatography)를 통해 친화정제(affinity purify)하였다.

1-4-2) Prx II에 의한 PDGFR β 활성화의 인산화 자리 특이적 조절

Prx II^(+/+) MEF 및 Prx II^(-/-) MEF 세포에 PDGF를 처리한 후, 시간에 따른 PDGFR β 인산화를 면역블롯으로 분석했으며, 상기의 타이로신 잔기에 대한 항-포스포-PDGFR β 항체를 이용하여 자리 특이적 조절 양상을 확인하였다.

도 4의 결과를 보면, 야생형 세포에 비하여 Prx II^(-/-) MEFs에서 오직 Tyr 579/581과 Tyr 857 잔기에서만 인산화가 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다.

상기에서 살펴본 바와 같이, Prx II가 결실된 경우 세포내 H₂O₂가 제거되지 못해 하위 세포내 신호전달이 활성화되며, 이때 PLC γ 1의 Y783, Y1253에서, 그리고, PDGFR의 Y579/581, Y857에서 자리특이적 인산화가 일어남을 확인하였고, Prx II의 퍼옥시다제 활성이 PDGFR 인산화의 자리 특이적인 조절에 필수적임을 확인하였다.

[실시예2] Prx II를 재발현시킨 Prx II^(-/-) MEF에서의 세포이동 관찰

Prx II^(-/-) MEFs에 레트로바이러스를 이용하여 인간 Prx II-wt를 재발현시키는 Add-back rescue 실험을 수행하여 세포 단백질 인산화 및 이동에 미치는 영향을 확인하였다.

2-1) Prx II^(-/-) MEFs 세포에서 인간 Prx II-야생형 유전자 재발현 및 단백질 인산화 관찰

Prx II^(-/-) MEF 세포에 대조군과 인간 Prx II 야생형 유전자를 포함한 레트로바이러스를 발현시켜 세포내 단백질의 인산화 정도를 확인하였다.

대조군(control, C)으로 사용될 레트로바이러스 및 인간 Prx II를 암호화하는 유전자를 포함하는 레트로바이러스(human Prx II-encoding retrovirus, P)는 형질이 안정적으로 도입된 PT67 세포주와 일시적으로 도입된 포닉스-앰포 패키징 세포주(Phoenix-ampho packing cell line, <http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>)에서 얻어졌다.

야생형 Prx II 레트로바이러스 처리군은 Prx II^(-/-) MEFs에 혈청고갈처리(serum starvation) 전에 상기 레트로바이러스를 10 M.O.I.(multiplicity of infection)로 2일 동안 감염처리하여 Prx II 단백질을 발현시켰다.

상기에서 준비된 세포로부터 단백질 추출하여 전체 단백질에서의 인산화 정도 및 PLC γ 1, PDGFR β 의 타이로신 인산화를 면역블롯 분석을 통해 확인하였다.

도 5a를 보면, PDGF 처리시 Prx II가 재발현된 세포가 대조군에 비해 전체 단백질의 인산화 정도가 낮았으며, PLC γ 1의 Y783, Y1253에서 인산화도 낮음을 확인할 수 있었다.

또한 도 5b를 보면, Prx II^(-/-) MEFs에서 재발현된 Prx II의 양은 야생형 MEFs(Prx II^(+/+))에서와 비슷한 수준이었고, PDGF 자극시 PDGFRb의 타이로신 인산화 대조군과 같은 정도로 일어남을 확인할 수 있었으며, Prx II가 재발현된 세포에서 PDGFR의 Y579/581, Y857의 인산화 정도가 낮음을 확인할 수 있었다.

따라서, 재발현된 Prx II는 PLCg, PDGFRb를 포함한 단백질 타이로신 인산화를 극적으로 억제함을 확인할 수 있었다.

2-2) 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 이동 실험

상기와 같은 방법으로 Prx II를 재발현시킨 Prx II^(-/-) MEF에서의 세포이동정도를 확인하였다.

MEF 세포 이동 실험은 24-웰 트랜스웰 배양 챔버(24-well transwell culture chamber, Costar; 8-um pore size)에서 수행되었다. 트랜스웰 챔버의 막은 젤라틴 B(gelatin B, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 코팅되었고, 24-웰 플레이트에 놓여졌는데, 플레이트의 아래쪽 챔버는 PDGF-BB(25 ng/ml)와 0.1% 우혈청알부민(bovine serum albumin)을 포함하는 DMEM으로 채워졌다.

MEFs(5×10^4)를 위쪽 챔버에 넣고, 37 °C / 5% CO₂ 상태에서 6시간 동안 배양되었다. 필터의 아래쪽 면으로 이동한 세포들을 0.6% 헤마톡실린(hematoxylin)과 0.5% 에오신(eosin)으로 염색한 후, 현미경으로 관찰하고 계수하였다. 결과는 두 번의 독립적인 실험을 통해 임의로 선택된 4개의 시야(field)에서 카운팅된 세포의 수의 평균 $\pm$ S.D.로 표시되었다.

도 6의 세포 염색 결과를 보면, 대조군과 비교하여 야생형 Prx II를 재발현시킨 세포에서 세포의 수가 적게 관찰되어, PDGF 자극에 의해 유도된 섬유아세포의 증식과 이동이 Prx II에 의해 저해됨을 알 수 있었다.

[실시예 3] Prx II의 혈관 평활근 세포 이동에 대한 영향 관찰

PDGF는 혈관 재형성(vascular remodeling) 동안 평활근 세포의 증식과 이동을 위한 중요한 요소이다. 따라서 인간 및 마우스 혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)에서 일어나는 PDGFRb-PLCg1의 경로에서 Prx II에 의한 선택적인 조절을 *in vitro*에서 확인하였다.

3-1) 인간 VSMCs에서 Prx II 발현 및 세포 단백질 인산화 관찰

인간 대동맥 평활근 세포(Human aortic smooth muscle cells)는 제조사의 방법에 따라 배양하였다(Clontec Co., USA).

상기 세포들은 4 회 계대배양되었고, α -평활근 액틴(α -smooth muscle actin)에 대한 항체(Sigma)로 면역블롯팅(immunoblotting)을 수행하였다. 1차 배양세포(Primary cells)는 PDGF-BB(25 ng/ml, Upstate) 자극 전에 0.5% FBS로 24시간 동안 혈청고갈(starvation)시켰다.

대조군(control, C) 및 인간 Prx II를 암호화하는 레트로바이러스(human Prx II-encoding retrovirus, P)는 형질이 안정적으로 도입된 PT67 세포주와 일시적으로 도입된 포닉스-앰포 패키징 세포주(Phoenix-ampho packing cell line, <http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>)에서 얻어졌다.

야생형 Prx II 레트로바이러스 처리군은 VSMCs에 혈청고갈처리(serum starvation) 전에 상기 레트로바이러스를 10 M.O.I. 로 2일 동안 감염처리하여 준비되었다.

도 7의 결과를 보면, PDGF 자극 전에는 대조군(C) 및 야생형 Prx II를 암호화한 레트로바이러스 처리군(P)에서 모두 PDGFRb의 타이로신 579/581위치, 857위치, 716위치에서 인산화가 일어나지 않았으나, PDGF 자극 10분 후, 대조군의 PDGFRb의 Y579/581, Y857 잔기에서 인산화되는 정도보다 야생형 Prx II 레트로바이러스 처리군에서의 타이로신 인산화가 확연하게 감소됨을 확인할 수 있었다.

이는 인간 대동맥 VSMCs에 야생형 Prx II 발현을 더하여, Prx II가 내재적 발현 수준보다 약 3배 높게 발현됨으로써 PLCg1과 PDGFR의 Y579/581, Y857 잔기에서 인산화가 뚜렷하게 감소하는 것으로 확인되었다.

3-2) 인간VSMC 이동 시험

상기 3-1)에서 준비된 인간 대동맥 평활근 세포를 이용하여, Prx II의 세포이동에 대한 영향을 확인하였다.

대동맥 평활근 세포 이동 실험은 24-웰 트랜스웰 배양 챔버(24-well transwell culture chamber, Costar; 8- μ m pore size)에서 수행되었다. 트랜스웰 챔버의 막은 젤라틴 B(gelatin B, 1 μ g/ μ l)로 코팅되었고, 24-웰 플레이트에 놓여졌는데, 플레이트의 아래쪽 챔버는 PDGF-BB(25 ng/ml)와 0.1% 우혈청알부민(bovine serum albumin)을 포함하는 DMEM으로 채워졌다.

VSMCs(5×10^4)를 위쪽 챔버에 넣고, 37 °C / 5% CO₂ 상태에서 6시간 동안 배양되었다. 필터의 아래쪽 면으로 이동한 세포들을 0.6% 헤마톡실린(hematoxylin)과 0.5% 에오신(eosin)으로 염색한 후, 계수하였다. 결과는 두 번의 독립적인 실험을 통해 임의로 선택된 4개의 시야(field)에서 카운팅된 세포의 수의 평균 $\pm$ S.D.로 표시되었다.

도 8의 세포 염색 결과를 보면, 대조군과 비교하여 야생형 Prx II 도입한 세포에서 세포의 수가 적게 관찰되어, PDGF 자극에 의해 유도된 평활근 세포의 이동이 Prx II에 의해 저해됨을 알 수 있었다.

3-3) 마우스VSMC에서의 인산화 관찰

10주된 야생형(wild-type) 마우스 및 Prx II 결실 마우스(Prx II deficient mice)의 대동맥평활근세포(Aortic smooth muscle cells)는 기술된 방법으로 준비하였다(Ohmi, K. et al. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 154-8 (1997)).

각 세포에서 PDGF를 처리한 다음 배양하고, 단백질을 추출한 후, 면역블롯분석을 수행하여 PDGFRb 의 단백질 타이로신 인산화 정도를 분석하였다.

도 9의 결과에서 보는 바와 같이, 야생형 마우스와 Prx II^(-/-) 마우스의 동맥에서 얻어진 VSMCs에 PDGF를 처리했을 때, 야생형 마우스 세포에 비해 Prx II^(-/-) VSMCs에서 PDGFR β 의 자리 특이적인 인산화가 더 강하게 일어남을 관찰할 수 있었다.

3-4) 혈관손상 마우스 경동맥에서의 Prx II의 재협착에 대한 영향 관찰

야생형 마우스 및 Prx II^(-/-) 마우스의 경동맥에 상처를 낸 후, 재협착(restenosis) 동안 평활근세포의 신생내막(neointimal) 축적에 대한 Prx II의 영향을 in vivo에서 확인하였다.

마우스에서의 좌측총경동맥(Left common carotid artery)의 경혈관 철사 손상법(transluminal wire injury)은 기술한 대로 수행하였다(Schober, A. et al., *Circulation* **109**, 380-5 (2004)).

10주된 수컷 마우스를 마취시켜서 좌측외경동맥(left external carotid artery)을 노출시켜 그 혈관가지들(branches)을 전기로 응고시켰다. 0.016-인치 유연성 혈관확장술 유도 철사(flexible angioplasty guide wire)를 외측경동맥의 횡행동맥절개(transverse arteriotomy)를 통해 1 cm 밀어 넣었고, 내피노출(endothelial denudation)은 총경동맥을 6회 통과시켜 이루어졌다. 상처를 입힌 1주일 후에 총경동맥들은 3.7% 포르말데하이드 및 헤파린을 함유하는 식염수(heparinized saline)로 심장을 관통하는 관류-고정(transcardiac perfusion-fixation) 후 절개하고, 파라핀-포매(paraffin-embedded)하였다.

5 개의 연속적인 조직 절편(100 μ m interval and 3 μ m thickness)을 총경동맥들의 중앙 부분에서 얻었다. 각 슬라이드는 형태학적 관찰을 위해 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 중막(Medial) 및 신생내막층(neointimal layers)의 단면부위(cross-sectional areas)는 컴퓨터화 이미지 시스템(MetaMorpho imaging v5.0, Molecular Devices) 및 현미경의 카메라(CoolSNAP camera system with BX51 microscopy, Olympus)로 측정하였다.

도 10a의 결과를 보면, 상처를 내지 않은 야생형 마우스와 Prx II^(-/-) 마우스의 경동맥은 신생내막이 두꺼워지는 현상을 보이지 않았다. 이 두 마우스의 경동맥에 철사로 상처를 낸 후 비교하였을 때, Prx II^(-/-) 마우스의 신생내막층이 야생형 마우스에 비해 현저히 두꺼워진 현상을 관찰할 수 있었다. 도 8a의 화살표는 혈관 평활근 세포가 신생내막(neointima)에 축적된 것을 가리킨다.

도 10b의 막대그래프의 결과는 중막(medial) 층 대비 신생내막 플라크(neointima plaque)의 퍼센트를 나타내며(평균± S.E.M., n=5, P<0.01), Prx II^(-/-) 마우스의 경우 내막면적 증가%가 야생형에 비해 약 3배정도 높음을 확인할 수 있었다.

따라서, 혈관 재형성(vascular remodeling) 동안 Prx II 기능 상실이 평활근 세포의 이동을 증가시킴을 확인하였다.

[실시예 4] 혈장내 PDGF 중화 실험

PDGF자극에 의한 하위신호전달 체계의 활성화로 발생하는 혈관내막 비후를 억제하기 위해, 혈장 PDGF 중화(netralization) 실험을 수행하였다.

Prx II^(-/-) 마우스에 대조군 IgG와 PDGF 항체(Cat. No. AF-220-NA, R&D systems)를 경동맥에 상처내기 전, 후로 일 주일에 걸쳐 하루에 세 번씩 주입했다. -1, 0 day에는 정맥주사, + 4 day에 피하주사하였고, 한번에 체중 20 g당 5 µg IgG를 주사하였다. 그 후, 상기와 같이 마우스 좌측외경동맥에 신생내막의 두께변화를 관찰하여 그 결과를 중막(medial) 층 대비 신생내막 플라크(neointima plaque)의 퍼센트로 나타내었다(평균± S.E.M., n=4, P<0.01).

도 11의 결과를 보면, 신생내막의 비후 현상이 PDGF 항체 투여에 의해 현저히 감소하였음을 확인할 수 있었다.

이와 같이, Prx II가 PDGF 자극에 의해 유도된 평활근 세포의 이동을 저해하고, 또한, Prx II 기능의 상실이 혈관 재형성(vascular remodeling) 동안 평활근 세포의 이동을 증가시키므로, 본 발명의 약학조성물은 혈관 재협착의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, Prx II 유전자 또는 단백질을 포함하는 본 발명의 스크리닝용 조성물이 이와 반응하는 물질을 스크리닝하는데 사용됨으로써, 혈관재협착 치료제의 후보물질을 개발하는데 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

상기와 같이, Prx II가 평활근 세포의 이동을 저해하고, 또한, Prx II 기능의 상실이 혈관 재형성동안 평활근 세포의 이동을 증가시키는 효과가 있으므로, 본 발명의 Prx II를 유효성분으로 함유하는 약학조성물은 평활근 세포의 증식 및 이동으로 인한 혈관재협착의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 스크리닝 방법은 혈관재협착 치료제의 탐색 및 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

퍼록시레독신 2 (Prx II) 단백질을 유효성분으로 함유하는 혈관 재협착 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, Prx II 단백질은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 혈관 재협착 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 3.

제1항에 있어서, 혈관 재협착의 부위가 경동맥(carotid artery), 관상동맥(coronary artery), 말초 동맥(peripheral artery), 신동맥(renal artery)인 혈관 재협착의 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 4.

제1항에 있어서, 혈관 재협착의 종류는, 이식 혈관(grafted vessel), 혈관 성형술 시술부위(angioplasted segment)에서 만성적으로(chronic) 진행되는 경화과정 및 혈관성형술에 의해 유발되는 단기적 세포증식에 의한 것인 혈관 재협착의 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 5.

포유류의 prx II 유전자를 포함하는 혈관 재협착 치료제 스크리닝용 조성물.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 prx II 유전자는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 1의 다형현상을 포함하는 염기서열, 서열번호 1 또는 이의 다형현상을 포함하는 유전자 단편 염기서열 중에서 선택된 1종이상인 혈관 재협착 치료제 스크리닝용 조성물.

청구항 7.

포유류의 Prx II 단백질을 포함하는 혈관재협착 치료제 스크리닝용 조성물.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 상기 Prx II 단백질은 서열번호 2의 아미노산 구조를 갖는 단백질, 또는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 1의 다형현상을 포함하는 염기서열 중 선택된 하나로부터 발현된 단백질, Prx II와 동등한 생리적 활성을 나타내는 Prx II폴리펩티드 단편 중 선택된 1종이상인 혈관 재협착 치료제 스크리닝용 조성물.

청구항 9.

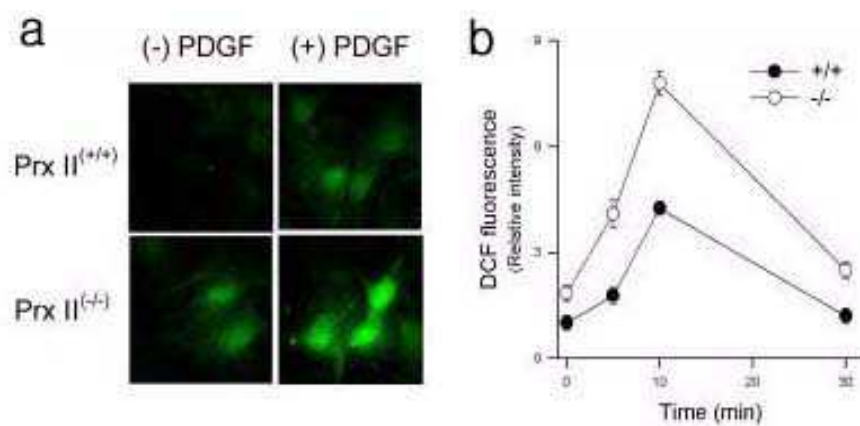
제 5항 또는 제 6항의 조성물을 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 유전자의 발현을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 혈관 재협착 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10.

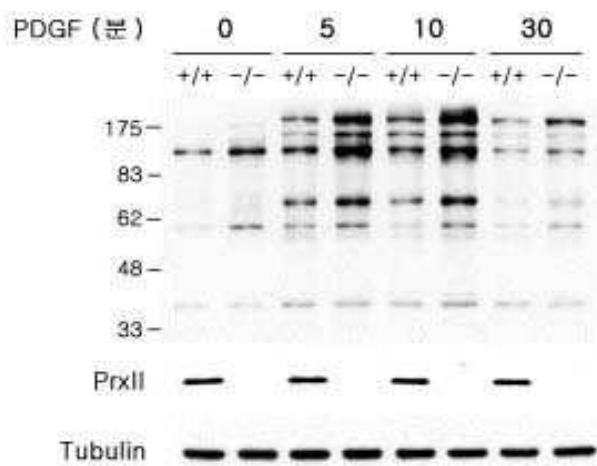
제 7항 또는 제 8항의 조성물을 표적물질로 이용하여 시험대상물질을 접촉시킨 후, 그들 사이의 반응을 확인하여, 상기 단백질의 기능을 증진시키는 활성 또는 억제하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 혈관 재협착 치료제 스크리닝 방법.

도면

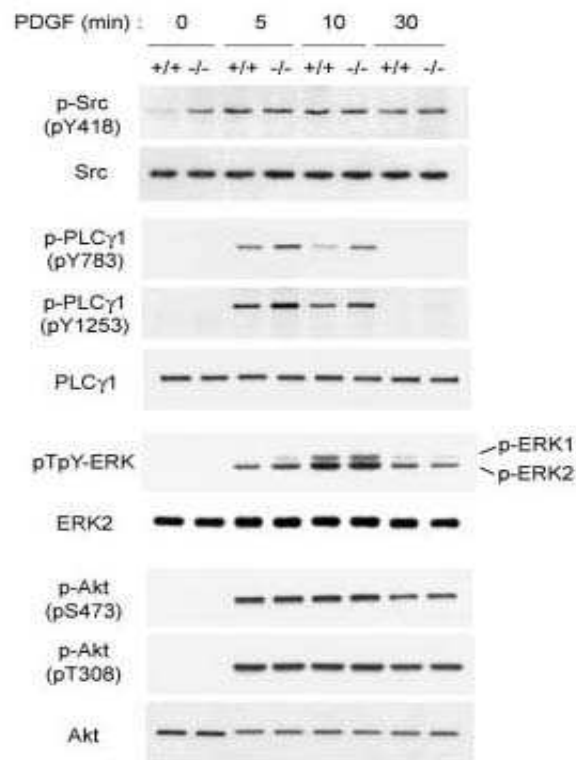
도면1



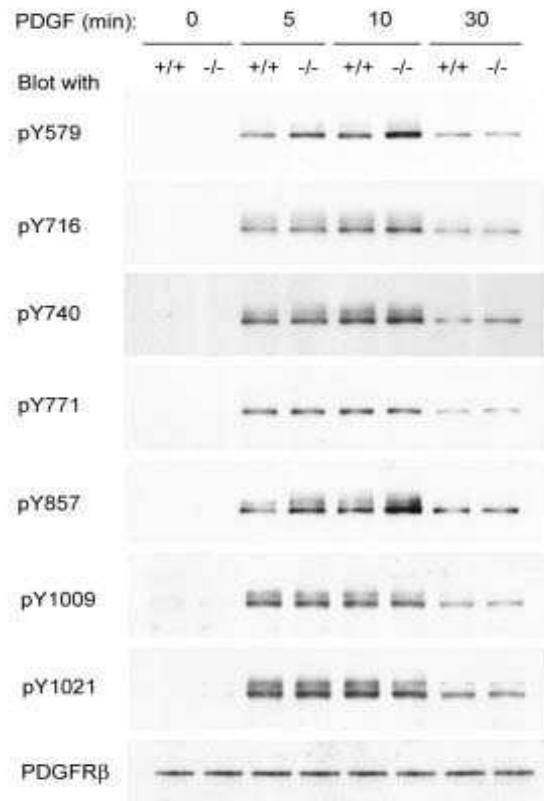
도면2



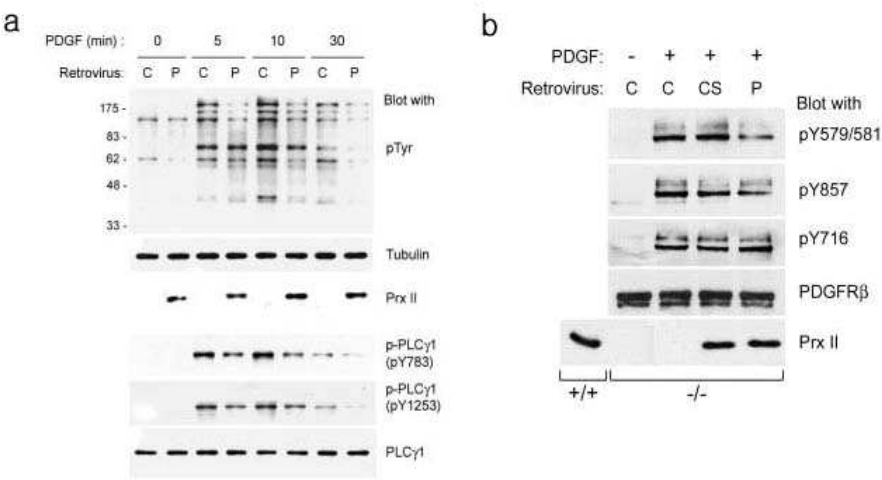
도면3



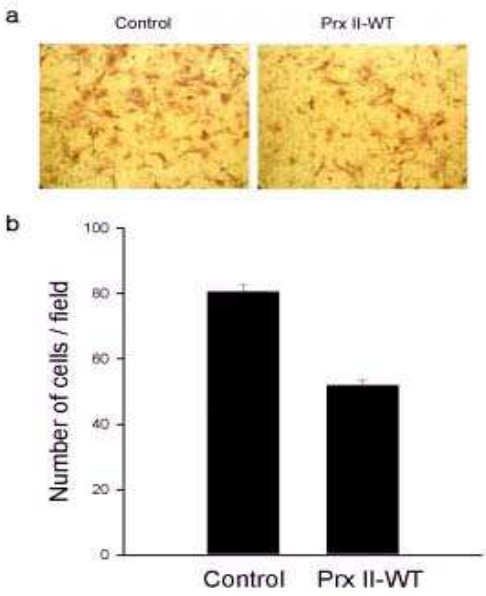
도면4



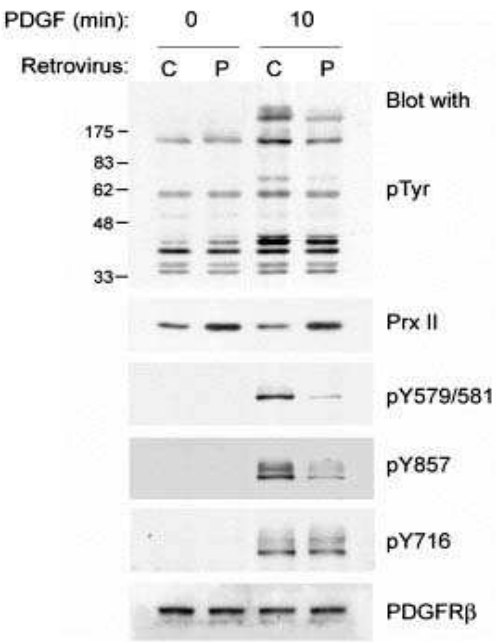
도면5



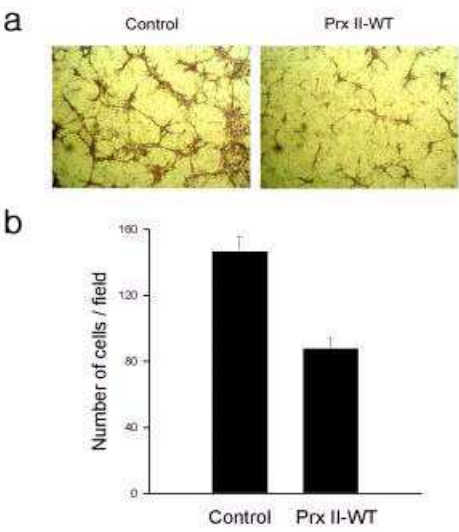
도면6



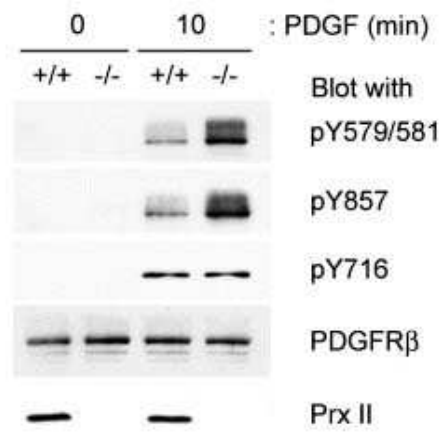
도면7



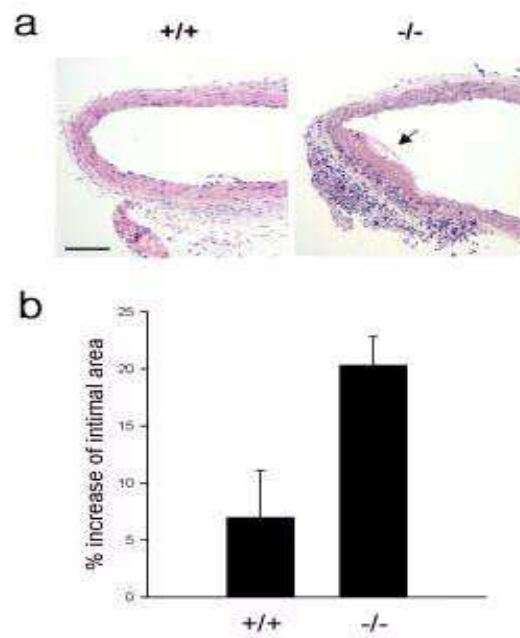
도면8



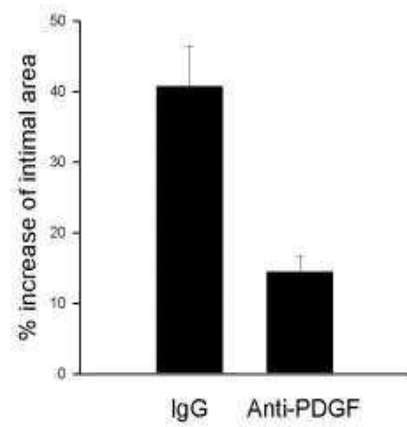
도면9



도면10



도면11



<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Pharmaceutical Composition for preventing and treating restenosis comprising peroxiredoxin 2 protein as an active ingredient and composition for screening therapeutics of restenosis comprising peroxiredoxin 2 gene or its protein product, and method for screening therapeutics of restenosis using said composition

<130> 04p-222

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1039

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1) .. (150)

<220>

<221> gene

<222> (151) .. (747)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (748) .. (1039)

<400> 1

gctcgtccgc tccctccccc gcgcgctgca cgtcttggtt cgggccgggc ataaaaggct	60
tcgcggccca gggctcactt ggcgctgaga acgcgggtcc acgcgtgtga tcgtccgtgc	120
gtctagcctt tgcccacgca gctttcagtc atggcctccg gtaacgcgcg catcggaag	180
ccagcccctg acttcaaggc cacagcgggtg gttgatggcg ctttcaaaga ggtgaagctg	240
tcggactaca aagggaagta cgtggtcctc tttttctacc ctctggactt cacttttgtg	300
tgccccaccg agatcatcgc gttcagcaac cgtgcagagg acttccgcaa gctgggctgt	360
gaagtgctgg gcgtctcggt ggactctcag ttcacccacc tggcttgat caacaccccc	420
cggaaagagg gaggcttggg cccctgaac atccccctgc ttgctgacgt gaccagacgc	480
ttgtctgagg attacggcgt gctgaaaaca gatgagggca ttgcctacag gggcctcttt	540
atcatcgatg gcaagggtgt ccttcgccag atcactgtta atgatttgcc tgtgggacgc	600

```
tccgtggatg aggctctgcg gctgggtccag gccttccagt acacagacga gcatggggaa      660
gtttgtcccg ctggctggaa gcctggcagt gacacgatta agcccaacgt ggatgacagc      720
aaggaatatt tctccaaaca caattaggct ggctaacgga tagtgagctt gtgcccctgc      780
ctaggtgcct gtgctgggtg tccacctgtg ccccccacctg ggtgccttat gctgaccag      840
gaaaggccag acctgcccct ccaaactcca cagtatggga ccctggaggg ctaggccaag      900
gccttctcat gcctccacct agaagctgaa tagtgacgcc ctcccccaag cccaccagc      960
cgcacacagg cctagaggta accaataaag tattagggaa aggtgtgaaa aaaaaaaaaa     1020
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                     1039
```

```
<210>      2
<211>     198
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens
```

```
<220>
<221>      CHAIN
<222>      (1)..(198)
<223>      peroxiredoxin 2 (Prx II)
```

```
<400>      2
Met Ala Ser Gly Asn Ala Arg Ile Gly Lys Pro Ala Pro Asp Phe Lys
  1             5             10             15

Ala Thr Ala Val Val Asp Gly Ala Phe Lys Glu Val Lys Leu Ser Asp
      20             25             30

Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr
      35             40             45

Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asn Arg Ala Glu Asp
      50             55             60

Phe Arg Lys Leu Gly Cys Glu Val Leu Gly Val Ser Val Asp Ser Gln
      65             70             75             80

Phe Thr His Leu Ala Trp Ile Asn Thr Pro Arg Lys Glu Gly Gly Leu
      85             90             95

Gly Pro Leu Asn Ile Pro Leu Leu Ala Asp Val Thr Arg Arg Leu Ser
      100            105            110

Glu Asp Tyr Gly Val Leu Lys Thr Asp Glu Gly Ile Ala Tyr Arg Gly
      115            120            125
```

Leu Phe Ile Ile Asp Gly Lys Gly Val Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn
 130 135 140

Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp Glu Ala Leu Arg Leu Val Gln
 145 150 155 160

Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Glu His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp
 165 170 175

Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro Asn Val Asp Asp Ser Lys Glu
 180 185 190

Tyr Phe Ser Lys His Asn
 195