(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011 년 7 월 7 일 (07.07.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/081465 A9

(51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/009540

(22) 국제출원일: 2010 년 12 월 29 일 (29.12.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2009-0132296 2009 년 12 월 29 일 (29.12.2009) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 내, 120-750 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **강상원 (KANG, Sang Won)** [KR/KR]; 서울 서초구 잠원동 53-15, 강변아파트 4 동 1101 호, 137-030 Seoul (KR). **강동훈 (KANG, Dong Hoon)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 야탑동 탑마을아파트 609-701, 463-070 Gyeonggi-do (KR). **이두재 (LEE, Doo Jae)** [KR/KR]; 서울 서초구 방배본동 삼호아파트 3 동 403 호, 137-069 Seoul (KR).

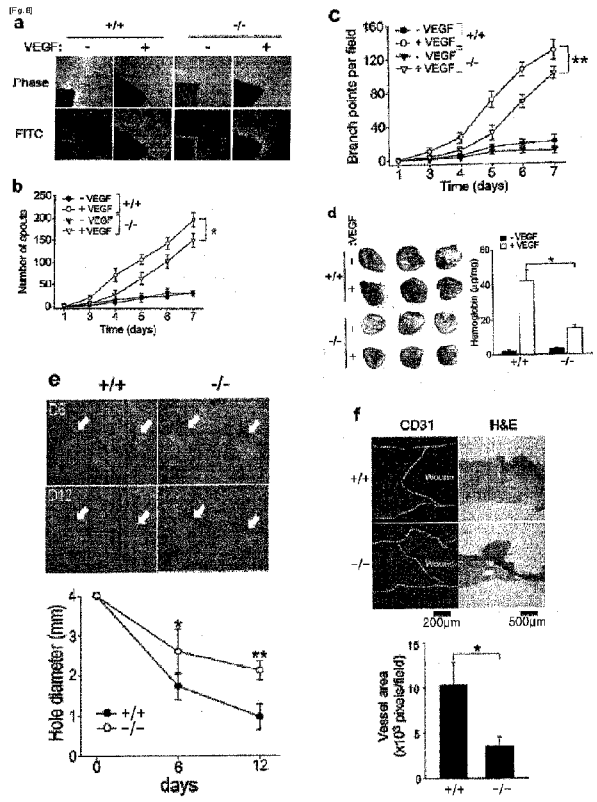
(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공항타워 6 층 한얼국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR SUPPRESSION OF VASCULARIZATION

(54) **발명의 명칭** : 혈관신생 억제용 약제학적 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition for suppression of vascularization including peroxy redoxine II (prx II) suppressants and the screening method and kit of vasculization suppressants using prx II. According to the present invention, the suppression of prx II gene expression or the suppression of prx II protein activation increases oxidative deactivation of VEGF receptor tyrosine kinase, RTK, and decreases VEGF signal transmission, and using this property, it is able to screen new suppressants for vascularization. Thus, the composition and method of the present invention can be used to prevent and treat a variety of diseases or conditions related to vascularization.

(57) **요약서**: 본 발명은 퍼록시레독신 II(Prx II) 억제제를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 Prx II를 이용한 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법 및 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제는 VEGF 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시켜 VEGF 신호전달을 감소시키며 이를 이용하여 신규한 혈관신생 억제물질을 스크리닝할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 혈관신생과 관련된 다양한 질환, 질병 또는 상태를 예방 또는 치료하는 데 이용될 수 있다.

WO 2011/081465 A9

OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일: 2011 년 11 월 17 일

(48) 본 정정판 공개일: 2012 년 2 월 2 일

(15) 정정사항에 관한 정보:
2012 년 2 월 2 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 혈관신생 억제용 약제학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 퍼록시레독신 II(Prx II) 억제제를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 Prx II를 이용한 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경기술

[2] 혈관계(vasculature)에 관여하는 신호 전달과정에 있어서, PDGF/PDGFR-β 및 VEGF/VEGFR-2(KDR/Flk-1로 불리기도 함) 경로는 각각 VSMCs 및 VECs의 증식, 화학주성 이동 및 생존을 조절하는 주요한 성장인자 신호전달이다(Olsson, A.K. 등 Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2006 May 7(5): 359-371; Heldin, C. H. 및 Westermark, B. Physiol. Rev., 1999 Oct 79(4): 1283-316). VEGFR 및 PDGFR은 7개의 세포외 면역글로불린 도메인, 막관통 도메인 및 분할 키나제 도메인을 갖는다는 점에서 수용체 타이로신 키나제(RTK) 수퍼패밀리의 동일한 아군(subclass)에 속한다. 이들은 많은 다운스트림 신호전달 이벤트를 공유한다.

[3] 최근에, 초과산화물(O_2^-) 및 과산화수소(H_2O_2)와 같은 활성산소종(ROS)이 수용체-매개된 신호전달 과정에서 이차 전달자로서 관여하고 있음이 알려지고 있다(Rhee, S.G., Science, 2006 Jun 30; 312(5782): 1882-3; Finkel, T. Curr. Opin. Cell Biol., 2003 Apr 15(2): 247-254). 흥미롭게도, PDGF는 혈관 평활근세포(VSMC)에서 ROS의 세포내 발생을 유도하는 첫 번째 성장인자이다(Sundaresan, M. 등, Science, 1995 Oct 13 270(5234): 296-299). 본 발명 초기의 개척 연구에서, 과산화수소 분해효소(catalase)를 이용하여 ROS인 H_2O_2가 성장인자에 의해 유도되고 수용체 매개된 신호전달 과정에 관여하고 있음을 밝혔다. 이후, 수용체-매개된 ROS 생산 및 이의 다운스트림 신호전달 과정과의 연관성에 대해 보고되었으며(Lander, H.M. FASEB J., 1997 Feb 11(2): 118-24), 대부분 경우에서 단백질 타이로신 포스파타제(PTP)의 산화적 불활성화가 상술한 신호전달 경로의 다운스트림에 존재하는 기작일 것으로 추측되었다(Rhee, S.G. 등, Sci. STKE., 2000: 2000(53)). 또한, ROS는 혈관신생 뿐만 아니라, VEGF/VEGFR-2 신호전달 경로에도 관여한다(Roy, S. 등, Free Radic. Biol. Med., 2008 44(2): 180-192; Abid, M.R. 등, J. Biol. Chem., 2007 282(48): 35373-85; Colavitti, R. 등, J. Biol. Chem., 2002 277(5): 3101-8). NADPH 산화효소가 두 RTK(VEGFR 및 PDGFR) 신호전달 경로에서 ROS-발생 효소로 제안되었다(Ushio-Fukai, M. Antioxid. Redox Signal., 2007 9(6): 731-9; Bae, Y.S. 등, J. Biol. Chem., 2000 275(14): 10527-31). 그러나, VEGF 신호전달에서 내인성 ROS 조절자나 ROS의 활동 기작(mode)에 대해서는 어떠한 연구도 이루어져 있지 않다.

[4] 알킬 과산화물 환원효소/Prx 산화환원효소 수퍼패밀리에 속하는 포유류의

2-cys 퍼록시레독신(2-cysPrx) 소그룹의 멤버들은 ROS를 해당 알코올로 환원시키는 새로운 형태의 산화환원효소이다. 이들은 티오레독신 및 티오레독신 환원효소로 구성된 전자-수송(electron-conveying) 시스템으로부터 제공되는 전자를 이용하여 H_2O_2를 물로 환원시킨다(Rhee, S.G. 등, Curr. Opin. Cell Biol., 2005 17(2): 183-9). 5개의 포유류 2-cysPrx 아이소형 중에서, 2개의 세포질 아이소형인 Prx I 및 Prx II가 수용체-매개된 신호전달 과정에 관여하는 것으로 보고되었다(Rhee, S.G. 등, Curr. Opin. Cell Biol, 2005 17(2): 183-9). 특히, 본 발명자들은 Prx II가 PDGF 신호전달에서 H_2O_2-매개된 단백질 타이로신 인산화의 음성적인 내인성 조절자라는 것을 최근에 규명하였다(Choi, M.H. 등, Nature, 2005 435(7040): 347-53). 상기 보고에 따르면, Prx II-결핍된 배아 섬유아세포 및 혈관 SMCs에서, PDGF-BB에 대한 반응으로 H_2O_2의 세포 내 수준이 증가하고 PDGFR-β의 Tyr 857 및 Tyr 579/581 위치에서 자가 인산화가 선택적으로 증가하였다. 이로 인해, 포스포리파제 C-γ1의 활성이 증가하고 PDGF-BB를 향한 증식 및 화학주성 이동이 증가하였다. 또한, 막 PTP의 불활성화-재활성화 주기는 Prx II에 의한 PDGFR-β 인산화의 선택적 조절의 다운스트림에 위치한 기작으로 제안되었다(Kang, S.W. 등, Trens Mol, Med., 2005 11(12): 571-8).

[5] 한편, 종래에는 혈관신생을 억제하기 위해서 VEGF (혈관 내피 성장 인자) 신호전달의 억제에 관한 연구가 있어왔으나, 종래기술에서는 초기에는 혈관신생이 억제되는 듯한 양상을 보이다가 혈관신생이 더욱 공격적으로 이루어지는 부작용이 있었다. 또한, 종래의 혈관신생억제의 경우 암세포로 항암제가 전달되는 경로까지 억제되어 결국은 암세포가 더욱 공격적으로 변하는 부작용이 있었다.

[6] 본 발명자들은 신규한 혈관신생 억제물질을 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 세포 내 2-cys 퍼록시레독신(2-cysPrx) 중 특히 퍼록시레독신 II(Prx II)의 발현을 억제(약화)하면 VEGF 신호전달의 감소를 통해 혈관신생을 억제할 수 있으며,혈관신생만을 단순 억제하는 종래의 기작과는 달리, Prx II가 혈관신생을 억제할 뿐만 아니라 암세포에서는 세포사멸의 효과도 가지므로, 하나의 타겟을 억제함으로써 혈관신생억제 및 암세포 사멸을 동시에 달성할 수 있다는 것을 밝혀내었다. 또한, 암 뿐만 아니라 다양한 혈관신생-관련 질환, 질병 또는 상태를 치료 또는 예방할 수 있음을 발견하고서, 본 발명을 완성하였다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명의 목적은 혈관신생 억제용 약제학적 조성물 및 상기 조성물을 이용한 혈관신생 억제방법을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 다른 목적은 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법 및 키트를 제공하는

것이다.

[10] 본 발명의 목적 및 이점은 하기 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 이해될 것이다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 (a) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현을 분석하는 단계; 및 (b) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현이 시험물질을 처리하지 않은 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현에 비하여 억제되면 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제제 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현은 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석할 수 있다.

[14] 본 발명의 스크리닝 방법은 (a) 시험물질을 Prx II, 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 실험군을 준비하는 단계; (c) Prx II를 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; (d) 상기 (c)단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 대조군을 준비하는 단계; (e) 상기 실험군과 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계; 및 (f) 실험군의 흡광도가 대조군의 흡광도보다 감소하면 상기 시험물질을 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함할 수 있다.

[15] 또한, 본 발명은 Prx II 단백질 및 반응완충용액을 포함하는 혈관신생억제제 스크리닝 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 티오레독신, 티오레독신 환원효소, NADPH 및 H_2O_2를 더 포함할 수 있다.

[16] 또한, 본 발명은 Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제방법을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 혈관신생 억제용 의약의 제조에 있어서, Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[18] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[19] (a) 본 발명은 퍼록시레독신 II(Prx II)를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 이를 이용한 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법 및 키트에 관한 것이다.

[20] (b) 본 발명에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적

불활성화를 증가시켜 VEGF 신호전달을 감소시킨다.

[21] (c) 또한, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 활성 억제를 이용하여 신규한 혈관신생억제 물질을 스크리닝할 수 있다.

[22] (d) 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 혈관신생과 관련된 다양한 질환, 질병 또는 상태를 예방 또는 치료하는 데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 Prx II 넉다운이 VEGF에 대한 내피세포 반응성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[24] a 및 b. PrxII 넉다운된 HAECs에서 VEGF에 의한 티로신(tyrosine)의 면역블롯 분석(IB). 총 티로신 인산화(pTyr)가 항-phosphoTyr 항체에 의하여 검출되었다(4G10).

[25] c. VEGF 처리된 HAECs에서의 내피 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)와 분열제 활성 단백 키나아제(mitogen-activated protein kinase, MAPK, ERK)의 활성. 그래프의 데이터는 비-포스포 밴드에 대응하는 강도를 이용하여 표준화한 후 포스포-특이적 밴드의 상대적 강도를 평균±표준편차로 나타내었다(n=5, *P< 0.005, **P< 0.002). d. HAECs에서의 cGMP 수준 측정(n=4, *P<0.02). e 및 f. VEGF 유도된 HAECs의 증식(e) 및 주화성(f) 이동(n=3, *P<0.005). g. VEGF 유도된 관형성. 데이터는 대조군 세포에 대한 면적(field)당 총 관 길이의 백분율이다. 그래프의 막대는(e - g) 평균±표준편차를 나타낸다.

[26]

[27] 도 2-3은 VEGFR2 수용체 티로신 키나제는 H_2O_2에 의해 불활성화된다는 것을 나타낸다.

[28] 도 2의 a. HAECs에서 PrxII 넉다운에 의한 기저 H_2O_2 수준의 상승. b. 과산화수소 분해효소에 의한 기저 H_2O_2의 제거. PrxII 넉다운된 HAECs가 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-결합된 과산화수소분해효소와 18시간동안 반응되었다(n=3, *P<0.001). 그래프의 데이터는 50-80개 세포로부터 평균된 상대적 DCF 형광 수준을 나타낸다(평균±표준편차, n=3, *P<0.01). c. VEGF 유도된 VEGFR2의 티로신 위치-특이적 인산화. 포스포-특이적 밴드가 정량되고 대응 VEGFR2 밴드의 강도에 의하여 표준화되었다. 그래프의 데이터는 상대적 밴드 강도의 평균±표준편차이다 (n=4, *P<0.005, **P< 0.002, ***P< 0.0001) d. VEGF-처리된 HAECs에서의 VEGFR2 RTK 활성화. VEGFR2 및 GST-PLCγ1 에 대한 시험관 내 RTK 키나아제 활성(KA)이 나타난다. 막대는 RTK활성 유도 배수의 평균±표준편차를 나타낸다(n=3, *P<0.005, **P< 0.001).

[29] 도 3의 a. H_2O_2 전처리된 HAECs에서의 VEGF에 반응한 VEGFR2 RTK 활성화. 그래프의 막대는 RTK활성 유도 배수의 평균±표준편차를 나타낸다(n=3, *P <0.001). b.VEGF-의존성 VEGFR2 RTK 활성화의 DTT 환원에 의한 복원. VEGFR2 는 PrxII siRNA-형질감염된 또는 H_2O_2 (100μM)전처리된 HAECs로부터

면역침전되어 VEGF로 자극되거나 자극되지 않았고 DTT로 10분동안 반응되었다. 활성은 2회 실험으로부터 평균되었고, 처리되지 않은 샘플(레인1)에 대한 증가 배수로서 나타난다. c. PrxII+/+ 및 PrxII-/- MAECs에서의 PrxII+/+ 및 PrxII-/- MAECs활성화. d. PrxI+/+ 및 PrxI-/- MAECs에서의 VEGFR2활성화. e.인간 PrxII의 야생형(WT) 또는 비활성 시스테인 돌연변이(CS)를 인코딩하는 레트로바이러스로 감염된 PrxII-/- MAECs 에서의 VEGFR2활성화. 3c - 3e, 3회의 독립적인 실험의 대표적인 세트가 도시되었다.

[30]

[31] 도 4-5는 Cys1206 는 VEGFR2의 산화적 불활성화에 필요하다는 것을 나타낸다.

[32] 도 4의 a. 플루오로포어-결합된 말레이미드를 이용한 대조군 및 PrxII siRNA 형질감염된 HAECs로부터의 VEGFR2의 차등 시스테인 표지. 대표적 이미지가 나타나있다. 그래프의 막대는 대응 VEGFR2밴드로 표준화된 후 상대적 형광 강도의 평균±표준편차이다(n=3, *P<0.005). b. 293T세포에서 이소성으로(ectopically) 발현된 마우스 VEGFR2 (mVEGFR2) WT 및 CS 돌연변이의 H_2O_2유도된 불활성화. c. VEGFR2 WT 및 C1199S 돌연변이의 H_2O_2 유도된 불활성화의 DTT 환원에 의한 가역성. VEGFR2 WT 및 C1199S 는 H_2O_2 (100μM) 전처리된 293T세포로부터 면역침전되었고 293T와 10분동안 반응되었다. d. a에서 수행된 바와 같이 H_2O_2 존재 또는 부재하에 처리된 293T 세포에서 발현된 mVEGFR2의 플루오로포어-결합된 말레이미드를 이용한 차등 시스테인 표지(n=3, *P<0.005). e. HAECs에서의 mVEGFR2 C1206S 돌연변이의 VEGF 유도된 활성화. 세포는 PrxII 넉다운되었다. 발현된 mVEGFR2 는 항-HA 항체를 이용하여 면역침전되었다. f. mVEGFR2 WT 및 C1206S를 발현하는 HAECs의 관 형성. 나타난 바와 같이, VEGFR2 RTK 저해제 SU5416 (1 μM) 가 VEGF 처리 전에 1시간동안 전처리되었다. 데이터는 처리되지 않은 대조군 세포에 대하여 필드(field)당 총 관 길이의 백분율이다(평균±표준편차, n=8, *P <0.05, **P<0.01).

[33] 도 5의 a. mVEGFR2 WT 및 CS 돌연변이의 H_2O_2 유도된 이동성 변화. mVEGFR2를 발현하는 293T 세포의 추출물이 DTT 존재(R) 및 부존재(NR) 하에 끓여졌다. Red, 환원 형태; Oxi, 산화 형태. 10mM DTT 처리된 샘플(R)은 VEGFR2의 완전히 환원된 형태의 대조군과 함께 로딩되었다. b. 변성 겔 상에서의 내인성 인간 VEGFR2의 DTT 의존성 이동성 변화. H_2O_2 로 처리된 HAECs 및 HUVECs 의 추출물은 증가되는 농도의 DTT 존재 하에 끓여졌다.

[34]

[35] 도 6-7은 PrxII, VEGFR2 및 NOX4 는 지질 뗏목/포낭에 함께 위치한다는 것을 나타낸다.

[36] 도 6의 a. VEGF로 보충된 혈청의 존재 또는 부재하에 처리된 HAECs 로부터 분리된 지질 뗏목/포낭 분획 내에서의 PrxII, VEGFR2, 및 NOX4 검출. 분획 번호 및 자당 농도가 나타나있다. b. 면역금-염색된 HAECs의 TEM 이미지. 왼쪽

이미지에서 박스 부분이 확대되었다. VEGFR2 및 PrxII 는 검은색 및 빨간색 화살표로 각각 표시되었다. c. 세포막에서 카베올린-1 및 NOX4 이 함께 위치함(화살표 머리로 표시).

[37] 도 7의 a. 및 b. PrxII 단독 넉다운 또는 PrxII/NOX 이중 넉다운된 HAECs 에서의 H_2O_2 생산(a. n=3, *P<0.005) 및 VEGFR2 활성화(b). c 및 d. HAECs내 VEGFR2 활성화에 있어서, 카베올린-1 넉다운(c, n=3, *P<0.001) 또는 콜레스테롤-결합제(d)에 의하여 파괴된 포낭의 효과. 카베올린-1 넉다운 및 MβCD 처리는 VEGF 처리 전에 20시간 및 12시간동안 각각 수행되었다. e 및 f. 과산화수소 분해효소를 인코딩하는 아데노바이러스로 감염된 PrxII-넉다운된 HAECs에서의 H_2O_2 생산(e, n=3, *P<0.005, **P<0.001) 및 VEGFR2 (f) 활성화. Cat-Cyto 세포질 과산화수소 분해효소; Cat-Caax 포낭-표적화된 과산화수소 분해효소. 3회의 독립된 실험의 대표적인 세트가 나타나있다.

[38]

[39] 도 8-10은 PrxII 결핍은 상처 부위 및 종양에서 혈관신생을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[40] 도 8의 a 및 c. PrxII+/+ 및 PrxII-/- 마우스의 대동맥 링으로부터 미세혈관의 성장. 5일째 대동맥 외식편으로부터 성장한 세포는 FITC-렉틴으로 염색되었다. 대표적인 상대조(phase contrast) 및 형광 이미지(a) 가 나타나 있다. 발아(b) 및 가지점(c)의 개수가 각 이미지로부터 계수되었다(mean ± S.D., n=6, *P<0.05, **P<0.01). d. PrxII+/+ 및 PrxII-/- 마우스에 이식된 매트리겔 플러그 내에서의 VEGF-유도된 혈관신생. 혈관신생은 매트리겔 플러그 내 헤모글로빈 양을 측정함으로써 정량되었다(mean ± S.D., n=5, *P<0.01). 매그트리겔 플러그의 대표적인 도면이 도시되었다. e. PrxII+/+ 및 PrxII-/- 마우스의 피부에서의 창상 치유. 6일 및 12일에서의 창상 부위(화살표)의 대표적 도면. 구멍 직경은 창상 페리미터 트레이싱에 의하여 측정되었다(그룹 당 n=5 마우스, *P<0.005, **P<0.001). f. 초기 창상에서의 혈관 밀도(6일째). 혈관 면적은 필드(field)당 CD31+ 픽셀의 개수를 나타낸다(그룹 당 n=5 마우스, *P<0.005). 대표적인 H&E 및 CD31 염색 이미지가 나타나있다.

[41] 도 9의 a 및 b. 루이스 폐 암종 (LLC) 및 B16F10 흑색종 세포로 이식된 PrxII+/+ 및 PrxII-/- 마우스에서의 종양 성장. 22일째에, 종양 조직이 제거되고, 계량되고 디지털 카메라PrxII+/+ 및 PrxII-/- 로 사진찍었다. 종양 크기는 부피(그룹 당 n=16 마우스, *P<0.05, **P<0.01) 및 중량(그룹 당 n=10 마우스, *P<0.01)으로 표시되었다. c 및 d. 유사한 크기의 2주 종양내 혈관 밀도. 혈관 면적은 필드 당 CD31+ 픽셀의 개수를 나타낸다(그룹 당 n=6 마우스, *P<0.01). 대표적인 이미지가 도시되었다. 8e - 9d 데이터는 평균 ± 평균값의 표준오차이다.

[42] 도 10은 ECs내 PrxII, VEGFR2, 및 NOX4 로 구성된 H_2O_2 신호전달복합체(signalosome) 에 대한 도식 모델. NOX4가 항상 활성이 있는것으로 알려져 있으므로, VEGF 의존성 NOX4 활성화의 메커니즘은 아직

알려지지 않았다. Y, C, 및 P 는 티로신, 시스테인, 및 인산을 각각 나타낸다.

[43]

[44] 도 11은 항산화 효소가 넉다운된 HAECs 에서의 VEGFR에서의 티로신 인산화를 나타낸다.

[45] a. 특이적인 siRNA를 이용한 HAECs에서의 Prx I, Prx II, 및 GPx1 넉다운. 반딧불 루시퍼라제(CONT) 에 특이적인 siRNA 가 대조군으로서 사용되었다. b - e. PrxI (b), GPx1 (c), PrxIII (d), 및 PrxIV (e)에 특이적인 siRNA로 형질감염된 HAECs에서의 VEGFR에서의 티로신 인산화. 3회의 독립적인 실험의 대표적인 세트가 도시되었다.

[46]

[47] 도 12는 HUVECs (a) 및 HMVECs (b)에서의 PrxII 넉다운의 VEGFR 신호전달에 대한 영향을 나타낸다.

[48] HUVECs 및 HMVECs 는 24시간동안 대조군 siRNA또는 PrxII siRNA 로 형질감염되고, 18시간동안 0.5% FBS 를 포함하는 특정 배지에서 혈청기아상태로 있었다. 그 후 세포들은 10분동안 VEGF (25ng/ml) 로 자극되었고, 면역블롯을 위하여 분해되었다. 3회의 독립적인 실험의 대표적인 세트가 도시되었다.

[49]

[50] 도 13은 VEGF처리된 HAECs에서의 다운스트림 신호전달 분자의 활성화(도 1c 연관)를 나타낸다.

[51] 그래프의 데이터는 대응 비-포스포 밴드의 강도에 의하여 표준화된 후 포스포-특이적 밴드의 상대적 강도의 평균±표준편차이다(n=5). 대표적인 블롯이 도시되었다.

[52]

[53] 도 14는 ERK 및 eNOS 저해의 VEGF에 반응한 EC 증식 및 이동에 대한 영향을 나타낸다.

[54] a. HAECs에서의 ERK 저해를 위한 MEK1 저해제 PD98059의 적정. PD98059 의 최적 농도는 ERK 인산화를 모니터링함으로써 결정되었다. b 및 c. VEGF유도된 증식 및 이동은 MEK1 저해제 PD98059 (b, 10 μM) 또는 eNOS 저해제 L-NAME (c, 3 mM)로 1시간동안 전처리된 HAECs 에서 측정되었다. 데이터는 평균±표준편차를 나타낸다(n=3, *P<0.01, **P<0.005; N.S., 유의하지 않음).

[55]

[56] 도 15는 PrxII 넉다운된 HAECs 에서의 VEGFR1 및 VEGF 결합의 조사 결과를 나타낸다.

[57] a. PrxII 넉다운된 HAECs 에서의 VEGFR 전사체의 발현 수준. 대조군(C) 또는 PrxII 넉다운(P)된 HAECs로부터 추출된 총 RNA혼합물을 이용하여 RT-PCR 가 수행되었다. b. PrxII 넉다운된 HAECs에서의 VEGFRs 단백질 수준. HAECs 는 PrxII siRNA 및/또는 VEGFR1 (R1) siRNAs로 24시간동안 형질감염되고,

면역블롯을 위하여 분해되었다. c 및 d. VEGF 유도된 증식(c) 및 이동(d) 이 (d) 및/또는 VEGFR1 넉다운된 HAECs에서 측정되었다(n=3, *P<0.01, **P<0.005). e. HAECs (5,000 cells)는 18시간동안 혈청결핍되고 지적된 기간동안 80pM ^{125}I-VEGF와 반응되었다. 세포들은 인산 완충 용액으로 3회 세척되고 방사능 수준이 γ-섬광계수기(Wallac, MicroBeta^{TR} TriLux 1450)를 이용하여 측정되었다. 세포당 VEGFR2 분자의 개수가 125I-VEGFR2 (3907.2 cpm/fmol)의 특이적 활성을 이용하여 계산되었다. 데이터는 평균±표준편차를 나타낸다.

[58]

[59] 도 16은 PrxII 넉다운의 FGF-2 신호전달에 대한 영향을 나타낸다.

[60] a. IMR-90 인간 폐 섬유아세포에서의 FGF-2 유도된 단백질 티로신 인산화 및 ERK 활성화. IMR-90 세포는 24시간동안 혈청 결핍되었고 10분동안 IMR-90 로 자극되었다. b. HAECs 및 HUVECs. 에서의 단백질 티로신 인산화 및 ERK 활성화에 대한 FGF-2 의 용량 의존성. 세포들은 10분동안 지정된 용량의 FGF-2로 자극되었다. c. 대조군 또는 PrxII siRNA로 형질감염된 HAECs 에서의 FGF-2 유도된 티로신 인산화. 3회의 독립적 실험의 대표적 세트가 도시되었다.

[61]

[62] 도 17은 PrxI 및 GPX1 넉다운의 VEGF 유도된 VEGF 생산 및 VEGFR2 활성화에 대한 영향을 나타낸다.

[63] PrxI (a 및 c) 및 GPx1 (b 및 d)의 넉다운은 HAECs에서 VEGF에 의하여 유도된 H_2O_2 생산 또는 VEGFR2 활성화 어느 것에도 영향을 미치지 않았다. 그래프의 데이터는 평균±표준편차를 나타낸다(n=3, *P<0.005, N.S. 유의하지 않음). 3회의 독립적 실험의 대표적인 블롯이 나타나있다.

[64]

[65] 도 18은 외인성 H_2O_2의 VEGFR2 활성화 및 2-cys Prx 과산화에 대한 영향을 나타낸다.

[66] a. H_2O_2는 VEGF에 반응한 VEGFR2 활성화를 감소시킨다. HAECs 는 10분동안 지정된 농도의 H_2O_2 로 전처리되고 5분동안 VEGF 로 자극되었다. 그래프의 데이터는 대응되는 VEGFR2 밴드의 강도에 의하여 표준화된 후 포스포-VEGFR2 밴드의 상대적 강도의 평균±표준편차이다(n=3, *P<0.001). ERK 활성화는 감소된 VEGFR2 인산화와 나란하게 감소되었다. b. 마이크로몰 범위의 H_2O_2 는 2-cys Prxs의 과산화를 유도하지 않았다. HAECs는 10분동안 지정된 농도의 H_2O_2로 처리되고 과산화된 2-cys Prx (Prx-SO2)에 특이적인 항체를 이용하여 면역블롯되었다. 오직 1 mM H_2O_2 만이 약간 PrxI 및 PrxIII의 과산화를 유도하였다. 이는 특정 siRNA(C, 대조군 siRNA; I, PrxI siRNA; II, PrxII siRNA; III, PrxIII siRNA)의 형질감염에 의하여 확인되었다. 하나의 Prx 아이소형의 넉다운은 다른 아이소형의 과산화를 촉진시킨다는 것이 나타났다(Prx-SO2 블롯 참고). 3회의 실험의 대표적인 세트가 나타나있다.

[67]

[68] 도 19-20은 마우스 VEGFR2 활성은 산화-민감성임을 나타낸다.

[69] 도 19의 a. RTKs의 펩티드 서열의 정렬. VEGFR2는 세포외 도메인, 막통과 도메인, 막근접 도메인, 2개의 분리된 키나아제 도메인(KD1 및 KD2) 및 C 말단 도메인(위)으로 구성되어 있다. VEGFRs에 보존된 6개의 시스테인 잔기가 화살표로 표시되었다. 상기 시스테인 잔기 주변의 인간(h) 및 마우스(m)의 PDGFR, VEGFR, 및 FGF 아이소형의 1차 서열이 정렬되었다(아래). b. 293T 세포에서의 마우스 VEGFR2 (mVEGFR2) 의 발현. c. 293T 세포에서 외인성 발현된 마우스 VEGFR2 의 VEGF 유도된 활성화에 대한 외인성 H_2O_2 의 영향.

[70] 도 20의 a 및 b. Y1059 (a) 및 Y1175 (b)상의 mVEGFR2 인산화의 정량. 3회 실험으로부터 획득한 블롯이 정량화되었다. 그래프의 데이터는 대응 VEGFR2 밴드의 강도에 의하여 표준화된 후 포스포- VEGFR2 밴드의 상대적 강도의 평균±표준편차이다(n=3, *P< 0.005, **P< 0.001, N.S. 유의하지 않음).

[71]

[72] 도 21은 HAECs에서의 NOX 아이소형의 발현을 나타낸다.

[73] a. HAECs 에서의 NOX 아이소형의 NOX 수준이 실시간 qPCR에 의하여 측정되었다. 데이터는 NOX1 mRNA 수준에 대한 차이 배수로 나타난다(n=4, 평균±표준편차). b. HAECs의 추출물에서의 NOX4의 면역블롯 검출. 항 NOX4 토끼 항혈청은 항원성 펩티드-결합 아가로오스 비드를 사용하여 친화성-정제되었다. 화살표머리는 내인성 NOX4 단백질을 표시한다. c. HAECs에서의 NOX4 단백질의 면역형광 염색. 대조군 또는 NOX4 넉다운된 HAECs는 PBS 내 3.7% 파라포름알데히드로 고정되고 항 NOX4 항체(1:300 희석)로 염색되었다. 핵은 DAPI로 표지되었다.

[74]

[75] 도 22-23은 다양한 세포 구획에의 인간 과산화수소 분해효소의 표적화된 발현을 나타낸다.

[76] 도 22의 a. HAECs 에서 상이한 세포 구획으로 표적화된 인간 과산화수소 분해효소의 아데노바이러스 발현(세포질에 대해서는 Cat-Cyto, 미토콘드리아에 대해서는 Cat-Mito, 세포막 내 지질 뗏목/포낭에 대해서는 Cat-Caax). 세포는 대조군 또는 PrxII siRNA로 형질감염되고, 이어서 지정된 아데노 바이러스 용액의 순차적인 희석액으로 감염된다. 과산화수소 분해효소 및 PrxII 발현의 면역블롯 분석이 수행되었다. b. 24시간동안 지정된 아데노바이러스로 감염된 HeLa 및 NIH3T3 세포의 세포 내 분획. 감염된 세포는 Dounce 호모게나이저를 사용하여 저장액(hypotonic)에서 분해되었다. 500 ㎍에서의 원심분리로 깨지지 않은 세포를 제거한 후에 정제된 용해물(lysate)은 100,000㎍에서 초원심분리되었다. 상등액(S) 및 펠렛(P) 이 각각 세포질 및 막 분획으로서 수집되었다. HeLa 세포의 내인성 과산화수소 분해효소가 표시되었다(화살표머리). c. 세포질 상등액(sup) 및 막 펠렛(ppt)에서의 과산화수소 분해효소의 활성 분석. 과산화수소 분해효소의 활성은 30 mM H_2O_2

를 포함하고 있는 인산칼륨 완충액(pH 7.0) 에서 240 nm에서 분광측광학적(spectrophotometrically)으로 측정되었다. N.d. 는 검출되지 않음을 의미. 블롯은 3회 실험의 대표적인 것임.

[77] 도 23은 PrxII siRNA 형질감염된 HAECs에서 증가된 기저 H_2O_2 수준의 과산화수소 분해효소의 표적화된 발현에 의한 제거. 세포는 PrxII siRNA 로 형질감염되고, 24시간 이후 지정된 아데노바이러스의 순차적인 희석액으로 감염되었다. 그래프의 데이터는 3회의 실험으로부터의 상대적 형광 수준의 평균±표준편차를 나타낸다.

[78]

[79] 도 24는 VEGF 자극에 의해 유도된 H_2O_2 생산이 VEGFR2 매개 신호전달에 관여함을 나타낸다. 이는 VEGF-매개 신호전달에 H_2O_2의 생산이 필요하다는 기존에 알려진 사실을 뒷받침한다.

[80] 과산화수소 분해효소의 도입에 의한 VEGF 의존적 세포내 H_2O_2의 제거. HAECs는 18시간동안 지정된 용량으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-과산화수소 분해효소로 전처리되었다. 그래프의 막대는 50-80개의 세포로부터의 상대적인 DCF 형광의 평균±표준편차이다(n=3, *P<0.01). b. HAECs에서의 VEGF 의존적 티로신 인산화의 과산화수소 분해효소에 의한 감소. 티로신 인산화 신호는, 비록 약하지만, 과산화수소 분해효소의 용량이 증가함에 의하여 점차적으로 감소되었다. c. VEGF 의존적 H_2O_2 생산에 대한 NOX 넉다운의 영향. HAECs 는 대조군 또는 지정된 NOX siRNAs로 형질감염되었다. 그래프의 막대는 50-80개의 세포로부터의 상대적인 DCF 형광의 평균±표준편차이다(*P<0.01). d. HAECs에서의 VEGFR2 활성화에 대한 NOX 넉다운의 영향. 3회의 실험의 대표적인 것이 나타나있다. 내인성 NOX4 수준이 NOX 2 넉다운에 의하여 증가하였다.

[81]

[82] 도 25는 PTPase 활성에 대한 Prx II 넉다운의 효과를 나타낸다. 제조자의 프로토콜에 따라 폴리-(Glu_4-pTyr) 펩타이드로 코팅된 96-웰 플레이트에서 PTPase 활성(Universal tyrosin phophatase assay kit, Takara Bio., MK-411)을 측정하였다. $y=1.390x^{-0.783}$(x = PTP 활성, y = OD_{450}) 방정식을 이용하여 PTPase 활성을 계산하였다. 데이터는 PTPase 활성에 대한 평균 ± 표준편차이다(n = 3).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[83] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.

[84] 또한, 본 발명은 (a) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현을 분석하는 단계; 및 (b) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현이 시험물질을 처리하지 않은 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의

발현에 비하여 억제되면 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제제 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현은 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석할 수 있다.

[85] 본 발명의 스크리닝 방법은 (a) 시험물질을 Prx II, 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 실험군을 준비하는 단계; (c) Prx II를 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; (d) 상기 (c)단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 대조군을 준비하는 단계; (e) 상기 실험군과 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계; 및 (f) 실험군의 흡광도가 대조군의 흡광도보다 감소하면 상기 시험물질을 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함할 수 있다.

[86] 또한, 본 발명은 Prx II 단백질 및 반응완충용액을 포함하는 혈관신생억제제 스크리닝 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 티오레독신, 티오레독신 환원효소, NADPH 및 H_2O_2를 더 포함할 수 있다.

[87] 또한, 본 발명은 Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제방법을 제공한다.

[88] 본 발명은 세포 내 퍼록시레독신 II(Prx II)의 발현 또는 활성을 억제하여 VEGF 신호전달을 감소시킴으로써 혈관신생을 억제할 수 있으며, 이를 이용하여 다양한 혈관신생-관련 질환, 질병 또는 상태를 치료 또는 예방할 수 있음을 확인하였다.

[89] 퍼록시레독신(Prx)은 살아있는 생물체에서 과산화수소 및 알킬 과산화물을 제거하는 기능을 한다(Chae, H.Z. 등, Proc. Nat. Acad. Sci., 1994 91: 7017-7021). 포유류에는 다양한 조직에서 발현되는 독특한 6개의 Prx 아이소형(Prx I-Prx VI)이 존재하며, 이들은 생체 내 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 또한, Prx는 세포 증식 및 분화, NK(natural killer) 세포 활성의 증진, 라디컬-민감성 단백질의 보호, heme 대사 및 세포 내 신호전달 같은 다양한 세포 내 기능들에 관여한다. 다양한 생화학적 연구 결과에 따르면, Prx가 세포 내 산화환원 상태를 유지하기 위해 매우 중요한 역할을 담당한다는 것이 밝혀졌다. Prx II는 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF) 및 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)를 포함하는 성장인자에 대한 반응으로 생산되는 내인성 H_2O_2를 제거하는 세포 내 퍼록시다제로 알려져 있으며, 세포질에 풍부하며 내인성 막단백질 또는 세포막에 결합할 수 있다.

[90] 본 발명에 따르면, Prx II는 VECs(vascular endothelial cells)에서 VEGF(vascular endothelial growth factor) 신호전달을 양성적으로(positively) 조절한다.

[91] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Prx II는 세포 내, 바람직하게는 혈관내피세포(vascular endothelial cells, VECs) 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 제거하는 활성을 가진다. Prx II는

VEGF 자극과 상관없이 세포 내 기저 활성산소종(특히, H_2O_2)을 제거함으로써 VEGFR(vascular endothelial growth factor receptor)의 산화적 불활성화를 억제할 수 있다. 따라서 Prx II를 조절하여 VEGF 신호전달을 조절할 수 있다.

[92] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제는 VEGF(vascular endothelial growth factor) 신호전달을 감소시킨다.

[93] 보다 상세하게는, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제는 활성화된 VEGFR, 바람직하게는 VEGFR-2 인산화의 감소를 유발하여 VEGF 신호전달을 감소시킨다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제에 의해 VEGFR-2에서 951번째, 1059번째, 1175번째, 및 1214번째 타이로신 잔기들의 인산화가 감소된다. 이는 VEGFR-2의 활성 감소를 초래하기 때문에 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제를 통해 VEGF의 활성 감소를 초래하여 VEGF 신호전달을 감소시킬 수 있다. 중요한 것은, 2-cys Prxs의 다른 아이소형인 Prx I, PrxIII 내지 Prx IV 어느 것도 VEGFR의 티로신 인산화에 대해 Prx II와 같은 효과를 나타내지 않았다는 것이다. 또한, 이러한 Prx II의 특이적인 VEGF 신호전달 조절 기능은 다른 종류의 혈관내피세포, 예를 들어, 사람 탯줄 혈관 내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell)과 사람 폐 미세혈관내피세포 (Human lung microvascular endothelial cell)등에서도 동일하게 관찰되었으므로 혈관내피세포에 일반적인 기능이라 할 수 있다.

[94] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제를 통하여 억제되는 신호전달은 VEGF-A, VEGF-C 또는 VEGF-E에 의해 매개되는 신호전달이고, 보다 바람직하게는 VEGF-A에 의해 매개되는 신호전달이다.

[95] 본 발명에 따르면, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 활성 억제는 세포 내 VEGF 신호전달의 억제 또는 감소를 유발하여 상기 신호전달 경로의 다운스트림에 위치하는 신호전달 분자들의 발현 또는 활성을 감소시킨다. 이러한 VEGF 신호전달의 억제 또는 감소는 세포의 증식 및 화학주성(chemostatic) 이동을 감소시켜 혈관신생을 억제시킨다.

[96] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 활성 억제를 통한 VEGF 신호전달의 억제 또는 감소는 내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 또는 ERK(extracellular signal-regulated kinase, MAPK)의 활성화를 억제하거나, 또는 VEGF-유도된 cGMP의 생산을 감소시킨다.

[97] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 활성 억제는 VEGF 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시킨다. 보다 바람직하게는, 상술한 RTK는 VEGFR-2의 RTK이다. VEGFR-1은 Prx II-제거된 ECs에서의

VEGF 신호전달의 하향 조절과 관련이 없다.

[98] 구체적으로, PrxII 넉다운된 경우, VEGF 자극과 상관없이 혈관내피세포의 ROS의 기저 수준(basal level)이 증가한다. 이와 대조적으로, PrxI와 GPx1 어느 것도 ROS의 기저 수준에 영향을 미치지 않았다 또한, Prx II의 실질적 기질을 확인하기 위하여, H_2O_2를 H_2O로 변화시키는 효소인 과산화수소 분해효소(catalase)를 인위적으로 도입한 결과 PrxII 넉다운에 의해 증가된 ROS 수준을 배경 수준(background level)으로 복귀(return)시키므로, 이로부터 H_2O_2가 Prx II의 실질적 기질(actual substrate)임을 확인할 수 있다. 상기 증가된 기저 H_2O_2은 VEGFR2 RTK 활성을 저해한다. PrxII 넉다운은 ECs에서의 단백질 수준 및 VEGF-VEGFR2 결합력을 변화시키지는 않는다. 또한 내인성 PTPase 활성은 Prx II 발현의 넉다운에 의해 영향받지 않았다.

[99]

[100] 한편, PrxII를 추가재발현(add-back expression)시켰을 때, 야생형 PrxII의 경우 VEGFR2 활성을 복원하였으나, PrxII의 비활성 시스테인 돌연변이(mutant)에서는 그러하지 않았다. 이러한 결과는 PrxII의 페록시다아제 활성(peroxidase activity)이 산화에 대한 VEGFR2 보호에 필수적임을 의미하는 것이다.

[101] 본 발명에서, 상술한 VEGFR-2의 산화적 불활성화는 ROS-매개된 반응성 시스테인 잔기를 통해 이루어진다. 보다 상세하게는, VEGFR-2의 산화환원-조절에 시스테인 잔기가 관여한다는 것을 증명하기 위해 시스테인 잔기만을 선택적으로 표지하는 형광표지된 말레이미드를 사용하였다. 본 발명의 구체예에서, Prx II 넉다운된 VECs에서 VEGFR-2의 시스테인 잔기의 산화가 현저히 증가됨을 확인할 수 있었다. 특히, C1206 잔기가 직접적 산화 부위로서의 VEGFR2 RTK 활성 산화환원 조절에 포함되고, 산화된 VEGFR2에서 Cys1206 술펜산 및 Cys1199 잔기 사이에 이황화 결합(disulfide bond)이 형성되어 C1206 술펜산이 안정화되고 Cys 1199 잔기는 VEGFR2 C1206 잔기 산화의 가역성에 필수적이라는 것이 확인되었다.

[102]

[103] 본 발명에서, PrxII와 VEGFR2 단백질이 지질 뗏목/포낭에 함께 위치하고, NOX4가 ECs에서 기저 H_2O_2의 주된 발생자임이 확인되었다. 본 발명의 구체적 실시예에서, NOX4와 PrxII의 이중 넉다운은 VEGF에 의한 VEGFR2 활성을 완벽하게 복원하였고, ECs에서 카베올린-1이 넉다운되었을 때, VEGFR-2 활성은 PrxII 넉다운에 의한 영향을 더 이상 받지 않았다. 또한, PrxII는 ECs에서 VEGF 자극과 상관없이 NOX4-유래 H_2O_2에 의한 산화로부터 VEGFR2를 보호하고 이는 지질 뗏목/포낭 미소도메인 내 H_2O_2의 국소적 작용임을 확인하기 위하여, 원래 퍼옥시좀에서 H_2O_2를 분해하는 기능을 가지는 과산화수소 분해효소를 인위적으로 변형시켜 여러 세포 기관으로 도입한 결과 막-표적화되도록 변형시킨 경우에만 ECs에서 PrxII 넉다운에 의하여 손상된 VEGFR2 활성을

복원하였다. 정리하면, Cys1206 잔기 특이적인 VEGFR2의 산화환원 민감성은 포낭에 존재하는 NOX4로부터 유래된 국소적 H_2O_2 때문이며, 따라서 PrxII에 의한 보호는 VEGF에 의한 VEGFR2 활성에 대하여 중요하다는 것을 의미한다.

[104]

[105] 상술한 바와 같이, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제제는 VEGFR-2의 활성화, 즉 인산화를 억제하여 혈관신생을 억제한다. 이러한 VEGFR-2의 활성화 억제는 VEGFR-2의 다운스트림 신호전달을 억제함으로써, 다양한 약리학적 활성을 발휘한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제제는 eNOS와 ERK의 VEGF-유도된 활성화를 선택적으로 저해하고, VEGF에 의해 유도되는 혈관내피세포의 증식, 이동 및 튜브형성을 억제하며, 결과적으로 혈관신생을 억제한다. PrxII 결핍이 VEGF-의존적 혈관 성장을 저해한다는 것은 ex vivo 실험 및 생체 내(in vivo) 실험에서 증명되었으며, 구체적으로, 창상(cutaneous wounding)이 유발된 마우스에서 상처 가장자리에서의 혈관 밀도는 WT 마우스에 비해 PrxII-/- 마우스에서 훨씬 적게 관찰되었고, 종양 이종 이식(tumor xenograft) 모델에서 WT 에 비해 PrxII-/- 마우스에서 종양 성장이 느렸다.

[106] 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질병, 질환 또는 상태는 혈관신생과 관련된 다양한 질환을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질환은 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 암, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 아테롬성 동맥경화, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증성 질환 또는 신경퇴행성 질환이다.

[107] 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 자가면역질환은 원형탈모증(alopecia areata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 아디슨병(Morbus addisonii), 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근병증, 복강 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성 피로 면역이상 증후군, 만성염증성 탈수초 다발성 신경병증, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 반흔성유천포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론씨병, 원판성 낭창, 복태성복합한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 귈레인 바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, IgA 신경염, 연소자성 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합성 연결 조직 질환, 다발성 경화증, 타입 I 또는 면역-매개 당뇨병, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결정성 다발동맥염, 다발연골염, 자가면역성 다선 증후군,

류마티스 다발성근통, 다발성 근염과 피부근염, 일차성 무감마글로불린혈증, 일차성 담증성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[108] 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 염증성 질환의 예는, 천식, 뇌염(encephalitis), 염증성 장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 알러지, 폐혈병성 쇼크증, 폐섬유증, 미분화 척추관절증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염에 의한 만성 염증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[109] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 암은 뇌암, 신경 내분비 암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 부신암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[110] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질 활성 억제제의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[111] 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제제의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[112] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[113] 본 발명은 Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제, 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제방법에 관한 것이다. 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입,

근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여 및 점안 투여 등으로 투여할 수 있다.

[114] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 ㎎/kg(체중)이다.

[115] 또한, 본 발명은 혈관신생 억제용 의약의 제조에 있어서, Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제, 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

[116] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[117] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 이용되는 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 올리고뉴클레오타이드, 항체, 앱타머, 단일사슬 가변영역 단편, 펩타이드, 작은 분자량의 화합물 및 천연추출물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[118] 바람직하게는, Prx II 유전자의 발현 억제제는 Prx II 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드이다.

[119] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 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 올리고뉴클레오타이드 서열은 Prx II mRNA에 상보적이고 Prx II mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, Prx II mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[120] 상기 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, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 치환된 당

모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히, 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-다이아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜에스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 제조방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[121] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 다중클로닝부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[122] 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은 인간 Prx II 의 염기 서열(서열번호 37)의 염기 서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다(Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides 및 Antisense RNA : Novel Pharmacological 및 Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., Antisense RNA gene therapy for studying 및 modulating biological processes. Cell. Mol. Life Sci., 55:334-358(1999).

[123] 본 명세서에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 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 넉다운(knockdown) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에

응용되었다.

[124] 본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스 가닥(Prx II mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(Prx II mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.

[125] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 불일치(mismatch)(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 팽창/돌출(bulge)(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다.

[126] siRNA 말단 구조는 Prx II 유전자의 발현을 RNA 간섭(RNA interference, 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.

[127] 본 발명에서 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 염기)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-루프 구조(stem-loop structure)를 형성하게 된다. 이 스템-루프 구조는 시험과 내 또는 생체 내에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다. 본 발명의 siRNA 는 서열번호 1 내지 4 로 구성된 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[128] 본 명세서에서 용어 "앱타머(aptamer)"는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 앱타머는, 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앱타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 앱타머는 또한, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 본 발명의 앱타머의 길이는 특별히 한정되지 않고, 통상 약 15~약 200 뉴클레오티드일 수 있지만, 예컨대 약 100 뉴클레오티드 이하이고, 바람직하게는 약 80 뉴클레오티드 이하이며, 보다 바람직하게는 약 60 뉴클레오티드 이하이고, 가장 바람직하게는 약 45 뉴클레오티드 이하일 수 있다. 본 발명의 앱타머의 길이는 또한, 예컨대 약 18, 20 또는 25 뉴클레오티드 이상일 수 있다. 총 뉴클레오티드수가 적으면, 화학합성 및 대량 생산이 보다 용이하고, 또한 비용면에서의 장점도 크다. 또한 화학수식도 용이하고, 생체내 안정성도 높으며, 독성도 낮다.

[129] 본 발명의 앱타머는, SELEX법 및 그 개량법[예컨대 Ellington et al., Nature, 1990 346, 818-822; Tuerk et al., Science, 1990 249, 505-510]을 이용함으로써 제작할 수 있다. SELEX법이란, 10-14개 정도의 상이한 뉴클레오티드 서열을 갖는

올리고뉴클레오티드의 풀로부터, 표적 물질에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 선별해오는 방법이다. 사용되는 올리고뉴클레오티드는 40잔기 정도의 랜덤 서열을 프라이머 서열로 끼운 구조를 하고 있다. 이 올리고뉴클레오티드 풀을 표적 물질과 회합시켜, 필터 등을 이용하여 표적 물질에 결합한 올리고뉴클레오티드만 회수한다. 회수한 올리고뉴클레오티드는 RT-PCR로 증폭하고, 이것을 다음 라운드의 주형으로서 이용한다. 이 작업을 10회 정도 반복함으로써, 표적 물질과 특이적으로 결합하는 앱타머를 취득할 수 있다. SELEX법으로는 라운드수를 늘리거나, 경합 물질을 사용함으로써, 표적 물질에 대하여 보다 결합력이 강한 앱타머가 농축되고, 선별될 수 있다. 따라서, SELEX의 라운드수를 조절하거나, 및/또는 경합 상태를 변화시킴으로써, 결합력이 상이한 앱타머, 결합 형태가 상이한 앱타머, 결합력이나 결합 형태는 동일하지만 염기 서열이 상이한 앱타머를 얻을 수 있다. 또한, SELEX 법에는 PCR에 의한 증폭 과정이 포함되지만, 그 과정에서 망간 이온을 사용하는 등으로 변이를 부여함으로써, 보다 다양성이 풍부한 SELEX를 행하는 것이 가능해진다.

[130] 또한, 앱타머는 종래 SELEX 기법 이외에, 복합 타겟, 즉 살아있는 세포 및 조직에 대해 Cell-SELEX 기법을 이용하여 얻을 수 있는데(Guo et al. Int. J. Mol. Sci., 9(4): 668, 2008), Cell-SELEX 기법은 표면 마커 타겟이 알려져 있지 않을 때조차도, 질환 세포에 대한 앱타머를 개발할 수 있게 하는 장점이 있다. 게다가, 분리된 상태에서는 그 본래의 특성을 나타내지 않을 수도 있어, 생리적 상태에 있는 타겟 단백질은 선별과정에서 더 기능적인 접근을 가능하게 하기 때문에, Cell-SELEX 기법은 종래의 SELEX 과정에 비하여 장점을 가지고 있다.

[131] 한편, 앱타머는, 인산기의 마이너스 전하를 이용한 이온결합, 리보오스를 이용한 소수성 결합 및 수소결합, 핵산염기를 이용한 수소결합이나 스태킹(stacking)결합 등 다양한 결합 양식에 의해 표적 물질과 결합한다. 특히, 구성 뉴클레오티드의 수만큼 존재하는 인산기의 마이너스 전하를 이용한 이온결합은 강하게, 단백질의 표면에 존재하는 리신이나 아르기닌의 플러스 전하와 결합한다. 이 때문에, 표적 물질과의 직접적인 결합에 관련되어 있지 않은 핵산염기는 치환할 수 있다. 특히, 스템 구조의 부분은 이미 염기쌍이 만들어져 있고, 또한 이중 나선 구조의 내측을 향하고 있기 때문에, 핵산 염기는, 표적 물질과 직접 결합하기 어렵다. 따라서, 염기쌍을 다른 염기쌍으로 치환하여도 앱타머의 활성은 감소하지 않는 경우가 많다. 루프 구조 등 염기쌍을 만들지 않은 구조에서도, 핵산 염기가 표적 분자와의 직접적인 결합에 관여하지 않는 경우에, 염기의 치환이 가능하다. 예컨대, 리보스의 2' 위치에 있어서, 히드록실기가 임의의 원자 또는 기로 치환되어 있는 뉴클레오티드일 수 있다. 이러한 임의의 원자 또는 기로서는, 예컨대, 수소 원자, 불소 원자 또는 -O-알킬기 (예:-O-CH3), -O-아실기 (예, -O-CHO), 아미노기(예, -NH2)로 치환되어 있는 뉴클레오티드를 들 수 있다. 이와 같이 앱타머는, 표적 분자와의 직접적인 결합에 관련되어 있는 관능기를 치환 또는 삭제하지 않는 한, 그 활성을

유지한다.

[132] 또한, 앱타머는 화학 합성이 가능하기 때문에 개질이 용이하다. 앱타머는 MFOLD 프로그램을 이용하여 2차 구조를 예측하거나, X선 해석이나 NMR 해석에 의해 입체 구조를 예측함으로써, 어떤 뉴클레오티드를 치환 또는 결손하는 것이 가능한지, 또한 어디에 새로운 뉴클레오티드를 삽입 가능한지 어느 정도 예측할 수 있다. 예측된 새로운 서열의 앱타머는 용이하게 화학 합성할 수 있고, 그 앱타머가 활성을 유지하고 있는지의 여부를 기존의 분석계에 의해 확인할 수 있다.

[133] 본 발명의 앱타머는, 결합성, 안정성, 약물 송달성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오티드의 당잔기(예, 리보오스)가 수식된 것일 수 있다. 당잔기에서 수식되는 부위로서는, 예컨대 당잔기의 2'위, 3'위 및/또는 4' 위의 산소원자를 다른 원자로 치환한 것 등을 들 수 있다. 수식의 종류로서는, 예컨대 플루오로화, O-알킬화(예, O-메틸화, O-에틸화), O-알릴화, S-알킬화(예, S-메틸화, S-에틸화), S-알릴화, 아미노화(예, -NH)를 들 수 있다. 이러한 당잔기의 개질은, 자체 공지의 방법에 의해 행할 수 있다(예컨대 Sproat et al.,Nucle. Acid. Res. 1991 19, 733-738; Cotton et al., Nucl. Acid. Res. 1991 19, 2629-2635; Hobbs et al., Biochemistry 1973 12, 5138-5145 참조).

[134] 본 발명의 앱타머는 또한, 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 개질(예, 화학적 치환)된 것일 수 있다. 이러한 개질으로서는, 예컨대 5위 피리미딘 개질, 6 및/또는 8위 푸린 개질, 환외(環外) 아민에서의 개질, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모 또는 5-요오드-우리실으로의 치환을 들 수 있다.

[135] 또한 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성이도록, 본 발명의 앱타머에 포함되는 인산기가 개질될 수 있다. 예컨대 P(0)0기가, P(0)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(O)NR2(아미데이트), P(O)R, R(O)OR', CO 또는 CH2(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH2-CH2-)으로 치환될 수 있다〔여기서 각각의 R 또는 R'은 독립적으로, H이거나, 또는 치환되어 있거나, 또는 치환되어 있지 않은 알킬(예, 메틸, 에틸)이다〕. 연결기로서는, -O-, -N- 또는 -S-가 예시되고, 이들의 연결기를 통하여 인접하는 뉴클레오티드에 결합할 수 있다.

[136] 개질은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 개질을 포함할 수 있다. 개질은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, Myristoyl, Lithocolic-oleyl, Docosanyl, Lauroyl, Stearoyl, Palmitoyl, Oleoyl, Linoleoyl, 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 항암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 개질에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.

[137] 또한, 앱타머를 리포좀이나 나노입자의 표면에 부착함으로써, 리포좀이나 나노입자 내부에 탑재된 항암제, 독신, 암성장 저해 유전자, siRNA (small

interfering RNA) 등을 표적 세포로 선택적으로 전달할 수 있다.

[138] 본 발명에서 Prx II 단백질의 억제, 특히 활성을 억제하는데 이용되는 억제제는 바람직하게는 Prx II에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드, 작은 분자량의 화합물 또는 천연추출물이다.

[139] 본 발명에서 이용될 수 있는 Prx II 단백질에 특이적으로 결합하여 활성을 억제하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. Prx II 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법, 예를 들어, 융합 방법(Kohler 및 Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. 및 Lane, D., Using Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan , Current Protocols In immunology, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있고 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 Prx II 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[140] 본 발명에서 항체는 단일사슬 가변영역 단편(scFv)을 포함할 수 있다. 상기 단일사슬 가변영역 단편은 "경사슬의 가변성 부위(VL)-링커-중사슬의 가변성 부위(VH)"로 구성될 수 있다. 상기 링커는 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위를 인위적으로 연결하는 작용을 하는 일정 길이의 아미노산 서열을 의미한다.

[141] Prx II에 특이적으로 결합하여 Prx II의 활성을 억제할 수 있는 펩타이드는 당업계에 공지된 통상의 방법, 예를 들어 파아지 디스플레이 방식으로 얻을 수 있다(Smith GP, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". Science 228 (4705):13151317(1985); Smith GP, Petrenko VA, "Phage display". Chem. Rev.. 97(2):391410(1997)).

[142] Prx II의 활성을 억제하는 작은 분자량의 화합물은 후술하는 스크리닝 방법을 통하여 용이하게 얻을 수 있다.

[143] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현을 분석하는 단계; 및 (b) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현이 시험물질을 처리하지 않은 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현에 비하여 억제되면 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제제 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현은 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석할

수 있다.

[144] 본 발명의 혈관신생 억제제 스크리닝 방법에 있어서, Prx II 단백질의 활성을 억제하는 혈관신생 억제제는 Prx II 단백질의 활성을 억제하거나 또는 Prx II 단백질에 결합하는 물질을 스크리닝하여 실시할 수 있다. 이 경우, Prx II 단백질로서, 분리된 형태의 Prx II 또는 세포 내에 포함되어 있는 Prx II 단백질 등 어떠한 형태의 것도 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 혈관신생 억제제 스크리닝 방법은, (a) 시험물질을 Prx II, 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 실험군을 준비하는 단계; (c) Prx II를 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계; (d) 상기 (c)단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 대조군을 준비하는 단계; (e) 상기 실험군과 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계; 및 (f) 실험군의 흡광도가 대조군의 흡광도보다 감소하면 상기 시험물질을 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 티오레독신 및 티오레독신 환원효소는 효모에서 유래된 것이 바람직하다.

[145] 또한, Prx II를 특이적으로 억제하는 물질을 스크리닝하기 위하여, Prx I(염기서열: 서열번호 38), III(염기서열: 서열번호 39), IV(염기서열: 서열번호 40) 및 V(염기서열: 서열번호 41)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상에 대하여 (a) 내지 (f) 단계를 추가로 수행하여, Prx I, III, IV 및 V로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 실험군의 흡광도가 대조군의 흡광도와 차이가 없는 경우, 상기 시험물질을 혈관신생 억제제로 판단할 수 있다. 흡광도는 340nm에서 측정할 수 있다.

[146] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고성능(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.

[147] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 Prx II 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 표지될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제, β-갈락토시다아제 및 β-글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14}, I^{125}, P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지(예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluoresein Isothiocyanate), 로다민(rhodamine) 6G, 로다민 B, TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM), 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.

[148] 검출가능한 표지가 표지된 Prx II 단백질 또는 시험물질을 이용하는 경우, Prx II 단백질과 시험물질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 신호를 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는

경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl 및 pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), *o*-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

[149] 택일적으로, 시험물질의 Prx II 단백질로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 표지 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 Prx II 단백질에 결합하는지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 세포가 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시험물질과 Prx II 단백질 사이의 결합에 대한 지시자로 이용될 수 있다(McConnell et al., Science257:19061912(1992)).

[150] 시험물질의 Prx II 단백질과의 결합 능력은 실시간 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다(Sjol및er & Urbaniczky, Anal. Chem.,. 63:2338-2345(1991), 및 Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol.5:699-705(1995)). BIA는 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 표지 없이 실시할 수 있다(예컨대, BIAcore™). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

[151] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은, 투-하이브리드 분석 또는 쓰리-하이브리드 분석 방법에 따라 실시할 수 있다(U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., Cell72, 223232, 1993; Madura et al., J. Biol. Chem. 268, 1204612054, 1993; Bartel et al., BioTechniques14, 920924, 1993; Iwabuchi et al., Oncogene8, 16931696, 1993; 및 W0 94/10300). 이 경우, Prx II 단백질을 "베이트(bait)" 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, Prx II 단백질에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이브리드 시스템은 분할 가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대, 하나의 컨스트럭트에서, Prx II-코딩 폴리뉴클레오타이드를 공지의 전사 인자(예컨대, GAL4)의 DNA 결합 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 다른 컨스트럭트에서, 분석 대상의 단백질("프레이" 또는 "시료")을 코딩하는 DNA 서열을 상기 공지의 전사인자의 활성화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다.

만일, 베이트 및 프레이가 생체 내에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, LacZ)의 전사를 촉발하게 된다. 리포터 유전자의 발현을 검출할 수 있으며, 이는 분석 대상의 단백질이 Prx II 단백질과 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 혈관신생 억제용 물질로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[152] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 Prx II 단백질에 분석하고자 하는 시험물질을 접촉시킨다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 Prx II 단백질의 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시료는 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시료는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Br및on Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[153] 이어, 시험물질이 처리된 Prx II 단백질의 활성을 측정한다. 측정 결과, Prx II 단백질의 활성이 하향-조절(down-regulation)되는 것이 측정되면, 상기 시험물질은 혈관신생 억제제로 판정될 수 있다.

[154] 본 발명의 스크리닝 방법을 Prx II의 발현을 분석하여 실시하는 경우, Prx II 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufma et al., *Molecular 및 Cellular Methods in Biology 및 Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A*

Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인 시투(in situ) 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

[155] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시험물질을 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제1쇄 cDNA를 제조한다. 이어, 제1쇄 cDNA를 주형으로 이용하고, Prx II 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 Prx II 유전자의 발현량 변화를 측정한다.

[156] Prx II 단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, Prx II 단백질의 양의 변화는 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경재 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[157] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 스크리닝 방법에 의해 발견된 혈관신생 억제제는 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 아테롬성 동맥경화, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[158] 또한, 본 발명은 상기 스크리닝 방법을 수행하기 위한 혈관신생 억제제 스크리닝 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 Prx II 단백질 및 반응완충용액을 포함할 수 있고, 추가적으로 티오레독신, 티오레독신 환원효소, NADPH 및 H_2O_2를 더 포함할 수 있다. 상기 티오레독신 및 티오레독신 환원효소는 효모에서 유래된 것일 수 있다. 또한, Prx의 반응을 위한 EDTA를 더 포함할 수 있고, 반응완충용액인 HEPES-NaOH 완충용액(pH 6.0-8.0)을 포함할 수 있으며, H_2O_2는 반응 산물을 검출하기 위한 것이다. 반응의 안정성을 향상시키기 위하여, 상기 구성요소에 글리세롤을 추가로 포함할 수도 있다. 본 발명자의 국내공개특허 제10-2006-0020140호의 내용이 참조로서 포함된다. 또한, Prx II 특이적인 억제제 물질을 스크리닝 하기 위하여 Prx I, III, IV 및 V로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 대조군으로서 상기 키트에 더 포함할 수 있다.

[159]

[160] 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 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 실시를 위한 형태

[161] 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.

[162]

[163] **항체들**

[164]

[165] pS1177-eNOS, eNOS, pY783-PLCγγ1, pTpY-p38, p38, pTpY-ERK, pYVEGFR2 (pY951 와 pY1175) 및 flotillin-2에 대한 항체들은 Cell Signaling Technology사로부터 제공되었다. Flk-1 (sc-504, sc-6251), Flt-1 (sc-316), 및 ERK2 (sc-154-G)의 항체들은 Santa Cruz biotechnology사로부터 제공되었다. 항-포스포티로신(anti-phosphotyrosine) (4G10), 항-pY1214-KDR 및 항-pY1059-KDR 항체들은 Upstate biotechnology사로부터 제공되었다. 카베올린(Caveolin)-1에 대한 항체들은 BD biotechnology사로부터 제공되었다. 항-알파-튜블린은 Sigma-Aldrich 사로부터 제공되었다. Alexa Fluor 488 결합 토끼 항-염소 및 Alexa Fluor 568 결합 토끼 항-마우스 이차 항체들은 Invitrogen 사로부터 제공되었다. PrxIII, PrxIV, GPx1, 과산화된 2-cys Prxs와 같이 과산화수소 분해효소(catalase)에 대한 토끼 폴리클로날 항체들은 Abfrontier 사로부터 제공되었다. PrxI 및 PrxII 에 대한 토끼 폴리클로날 항혈청은 항원재조합단백질을 결합시킨 아가로스 비드를 사용하여, 생산 및 친화성-정제하였다. NOX4 특이적인 토끼 항체는 인간 NOX4 단백질 서열 유래의 3가지 다른 펩타이드를 혼합하여 면역반응을 통하여 생산하였다. 항-NOX4 항혈청은 항원펩타이드가 결합된 아가로스 비드를 사용하여 친화성-정제하였다.

[166]

[167] **세포배양**

[168]

[169] 인간 대동맥내피세포 (HAEC), 인간 대동맥평활근세포 (HASMC), 인간 대정맥내피 세포 (HUVEC), 및 인간 폐모세혈관내피세포 (HMVEC) 들은 Clonetics-Bio Whittaker 사로부터 제공되었다. HAECs 와 HUVECs 는 전체 영양소가 포함된 Endothelial Basal Medium (EBMTM-2) SingleQuotes라 배지 (Clonetics-BioWhittaker; HAEC 와 HUVEC에 대해 Cat no. cc-4176, HAMEC 에 대해 Cat no. cc-4147)에서 5% CO_2가 포함된 습식 배양기에서 37℃로 배양하였다. SMC는 전체 영양소가 함유된 Smooth Muscle Cell Basal Medium (SmBMTM) SingleQuots® 배지(Cat no. cc-4149)에서 배양하였다. 일반적으로 7~8번 계대 배양한 세포를 연구에 사용하였다.

[170]

[171] 또한, 18주령의 마우스로부터 얻어진 흉대동맥으로부터 마우스 대동맥내피세포들을 (MAECs) 분리하여 사용하였다. 지방조직 제거 후, 마이크로 스프링 가위를 이용하여 2~3 mm 링 내에서 대동맥을 교차절단하였다. 대동맥 조각들을 300 μl의 액상 매트리겔(BD Bioscience cat# 354234)이 채워진 24 웰 접시에 옮기고, 37℃에서 7일간 배양하여 내피싹(endothelial sprout)이 발현되도록 하였다. 내피싹이 손상되지 않도록 조심스럽게 대동맥링을 제거한 다음, 분리된 세포들을 선별하고, 세포를 Dispase(BD Bioscience cat# 354235)로 패시지한 후 0.1% 젤라틴-코팅된 배양접시에 플레이팅하여 추가적으로 4일간 배양하였다. 모든 실험에서 이용된 세포는 패시지 3을 초과하지 않았다. 분리된 세포들의 순도는 CD31 염색을 통하여 확인하였다.

[172]

[173] **siRNA와 형질감염**

[174]

[175] 인간 Prx II에 대한 4가지 siRNA 이중가닥 서열은 5'-CGCUUGUCUGAGGAUUACGUU-3' (#1, 서열번호 1), 5'-AGGAAUAUUUCUCCAAACAUU-3' (#2, 서열번호 2), 5'-GACGCUUGUCUGAGGAUUAUU-3'(#3, 서열번호 3) 및 5'-UCAAAGAGGUGAAGCUGUCUU-3' (#4, 서열번호 4)을 사용하였다. Prx II siRNA 이중가닥 #1을 연구에 주로 사용하였다. 인간 Prx I 에 대한 4가지 siRNA 이중가닥 서열은 5'-ACUCAACUGCCAAGUGAUUUU-3' (#1, 서열번호 5), 5'-CCACGGAGAUCAUUGCUUUUU-3' (#2, 서열번호 6), 5'-GGUCAAUACACCUAAGAAAUU-3' (#3, 서열번호 7) 및 5'-UAUGCCAGAUGGUCAGUUUUU-3' (#4, 서열번호 8); 인간 GPx1에 대해서는 5'- GCAAGGUACUACUUAUCGAUU-3' (#1, 서열번호 9), 5'-UGAAUUCCCUCAAGUACGUUU-3' (#2, 서열번호 10), 5'-GGAGAACGCCAAGAACGAAUU-3' (#3, 서열번호 11) 및 5'-GCAACCAGUUUGGGCAUCAUU-3' (#4, 서열번호 12)을 사용하였다. Prx III 특이적 siRNA는 이전에 보고된 Chang, T.S. 등(Chang, T.S. 등, *J Biol Chem* 2004 279 (40), 41975-41984)에 기재된 것을 사용하였다. 반딧불 루시퍼라제 siRNA는 Dharmacon사로부터 합성되거나 제공되었다. 인간 VEGFR1 (Cat No. sc-29319), VEGFR2 (Cat No. sc-29318), 및 PrxI V (Cat No. sc-40835)에 대한 siRNA 이중가닥은 Santa Cruz Biotechnology사로부터 제공되었다. 인간 NOX4에 특이적인 siRNA 서열은 5'-GUCAACAUCCAGCUGUACC-3'(서열번호 13)을 사용하였다. 인간 카베올린-1 siRNA 5'-GCAUCAACUUGCAGAAAGAUU-3'(서열번호 14)는 Qiagen사로부터 제공되었다. 특별한 언급이 없는 경우, 내피세포(ECs)는 리포펙타민(lipofectamine) RNAi MAX™ (Invitrogen)을 사용하여, 24시간동안

siRNA 이중가닥으로 형질감염하였다. 형질감염된 세포들을 VEGF 활성화 전에 0.5% 우태아혈청이 함유된 배지에서 추가적으로 18시간동안 혈청기아상태로 만들었다.

[176]

[177] **내피세포 기능 분석**

[178]

[179] 세포 증식 연구를 위해, HAECs 은 siRNA-형질감염 시약 혼합물들이 들어있는 96-웰 플레이트에 4000 세포/웰의 밀도로 최종부피가 80μl가 되도록 접종하였다. 형질감염 24시간 후 세포를 24시간 혈청결핍시키고, VEGF-A_{165} (25 ng/ml, Cat no. 293-VE, R&D systems)가 함유된 EBM-2 기본배지에서 추가적으로 24시간 방치했다. 세포증식정도는 WST-1 세포 증식 어세이 키트 (Roche Diagnostics, USA)를 사용하여 측정되었고, 세포 수는 600nm에서의 탁도를 뺀 후 450nm에서의 흡광도로서 3번 반복하여 측정한 평균값으로 표현되었다.

[180]

[181] 이동(migration) 분석은 24-웰 Transwell 배양 챔버 내에서 수행하였다. 필터의 바닥은 gelatin B (1mg/ml)로 코팅하고, 1시간동안 공기 중에서 건조하였다. HAECs (6 X 10^3)를 형질감염 복합물이 포함된 상단 챔버에 첨가했다. 24시간 후, 형질감염된 HAEC를 하루밤동안 혈청결핍시켰다. 0.5% BSA를 함유한 기본배지로 제조한 VEGF-A (25ng/ml)용액을 하단 챔버에 첨가하였다. 상단 챔버의 웰은 0.5% BSA를 함유한 기본배지로 채웠다. Transwell 챔버들은 37℃/5% CO2에서 8시간 배양하였다. 배양 후, 이동하지 않은 세포들은 필터의 상단으로부터 제거하고, 필터의 하단으로 이동한 세포는 0.6% 헤마톡실린(hematoxylin)과 0.5% 에오신(eosin)으로 고정하고 염색하였다. 염색된 세포들은 사진을 찍고, 수를 확인하였다. 이동한 세포의 수는 두 웰의 평균으로 하였다.

[182]

[183] 관 생성을 위해 HAECs (50,000 세포/웰)을 성장인자 감소된 매트리겔(Matrigel) 매트릭스(BD Bioscience, cat # 354230)를 코팅한 12-웰 배양 접시에 접종하였다. 세포들은 VEGF-A (25ng/ml) 결핍 또는 첨가된 0.5% 혈청 함유 EBM-2배지 내에서 18시간 배양하였다. 그 후에, 시료당 무작위적으로 보여지는 다섯 곳을 선택하여 얻어진 세포이미지를 Image-Pro Plus version 6.2 (Media Cybernetics)을 사용하여, 관의 전체길이를 정량적으로 분석하였다.

[184]

[185] **면역침전, 시험관 내 키나아제 분석 및 면역블롯 분석**

[186]

[187] 적절한 시기에 배양 배지를 흡입 제거하고, 세포들을 20mM Hepes (pH 7.0), 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 10% 글리세롤, 1mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM DTT, 5mM Na3VO4, 5mM NaF, 1mM AEBSF, aprotinin (5μg/ml) 및 leupeptin

(5μg/ml)으로 이루어진 추출용 완충용액(TEB)을 이용하여 분해하였다. 잠시동안 원심분리한 후, 시료의 단백질 함량을 Bradford reagent (Bio-Rad)를 사용하여 정량하였다. 면역침전을 위해 상기 방법으로 얻어진 상등액(120 μg 단백질)을 1시간동안 미리 세척된 protein-A/G Sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham Biosciences) 10μl에 관련된 항체 2 μg과 함께 하루밤 동안 반응시키고, 추가로 protein-A/G Sepharose beads 20μl를 넣고 4℃에서 3시간 동안 반응하였다. 면역복합체들은 1ml의 TEB로 3회 세척하였고, 그것들을 시험관 내 키나아제 분석 또는 면역블롯에 사용하였다.

[188]

[189] 시험관 내 키나아제 분석은 이전에 보고된 Choi, M.H. 등 (Choi, M.H. 등, *Nature* 2005 435 (7040), 347-353)에 기재된 바대로 수행하였다. 간략히 요약하면, 래빗 항-flk-1(sc-504) 항체로 침전된 면역복합체들은 5μg 의 γ-32[P]-ATP 와 GST-PLCγ1 0.5μg 이 함유된 인산화효소 완충용액(20mM HEPES pH 7.5, 20mM MgCl2, 20mM β-glycerophosphate 및 200μM Na3VO4) 30 μl에서 30℃, 10분간 배양되었다. 반응은 SDS 시료 완충용액을 첨가함으로서 정지되었다. 시료를 끓인 후, SDS 변성 겔 상에서 분리되었다. 겔은 감압건조 후, 방사능 사진 촬영에 사용되었다.

[190]

[191] 면역블롯을 위해 세포 가수분해물 또는 면역침전강물을 5X Laemmli 시료 완충용액과 혼합하고 5분간 끓였다. 시료들은 SDS 변성 겔에서 분리되고, 니트로셀룰로오스 막으로 전기적인 힘으로 옮겨진 후, 면역블롯에 이용되었다. 비특이적 결합을 차단하기 위해, 막을 5% 탈지유(nonfat milk)가 첨가된 0.5% Tween-20을 포함하는 TBS(Tris-buffered saline; TBST)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상술한 블롯들을 5% 탈지유 또는 BSA가 첨가된 TBST에서 각각의 일차 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후, 블롯들을 호스래디쉬 퍼록시데이즈-컨쥬게이션된 양 항-마우스 면역글로불린(IgG; 1:5000 희석) 또는 염소 항-토끼 IgG(1:3000 희석)과 45분 동안 상온에서 반응시켰다. Amersham ECL™ 검출 시스템(GE healthcare)을 이용하여 단백질 밴드들을 검출하였다. 충분한 결과를 얻지 못한 경우, 막을 67 mM Tris (pH 6.7), 2% SDS, 100mM 2-mercaptoethanol 내에서 37℃로 60분간 흔들어주면서 벗겨내고, 적절한 항체들로 다시 결합시켰다.

[192]

[193] **단백질 티로신 포스파타제(PTP) 분석**

[194]

[195] 모든 단계들은 혐기성 배양기 내에서 실시되고 시약을 분석 시작 전에 가스 제거하였다. TAkak Bio.로부터 구입한 Universal 티로신 포스파타제 분석 키트(cat. MK-411)를 이용하여 PTP 활성을 분석하였다. 간략하게 요약하면, 각 용해물을 포스파타제 반응 용액으로 연속적으로 20배 이상 희석하였다. 세 번의

독립적인 실험으로, 표준 대조군 및 각 시료의 연속 희석액을 PTP 기질-고정된 웰에 첨가하였다. 희석된 시료의 첨가는 탈인산화를 유발한다. 세척 및 차단 후에, 항-포스포타이로신-HRP를 각 웰에 첨가하여 반응시켰다. 기질-반응된 웰에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[196]

[197] **활성산소종의 관찰 및 측정**

[198]

[199] HAECs은 페놀 레드 (EBM, Lonza)가 제거된 내피세포 기본배지로 세척되고, 37℃에서 5분간 5μM 5,6-클로로메틸-2',7'-다이클로로다이히드로플루오레세인 다이아세테이트 (CM-H2DCFDA) (Molecular Probe)로 직접 반응시켰다. EBM으로 간단히 세포를 세척한 후, 형광 현미경(Axiovert 200 Basic st및ard, Zeiss, Germany)을 이용하여 형광이미지를 얻었다. 상대적 DCF 형광은 백그라운드 형광을 제거한 후 50~80 개의 세포들로부터 형광 수준을 평균하여 계산하였다.

[200]

[201] **역전사-PCR**

[202]

[203] 전체 RNA는 Trizol (Invitrogen)를 사용하여 HAECs 로부터 분리되었고, M-MLV 역전사효소 (Promega)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. RT-PCR은 다음과 같은 프라이머들을 사용하여 수행되었다: 인간 Prx II를 위하여, (sense) 5'-CCGCTCGAGATGGCCTCCGGTAACGCG-3'(서열번호 15) 및 (antisense) 5'-CGGGATCCCTAATTGTGTTTGGAGAA-3'(서열번호 16); 인간 VEGFR-1를 위하여, (sense) 5'-ATTTGTGATTTTGGCCTTGC-3'(서열번호 17) 및 (antisense) 5'-CAGGCTCATGAACTTGAAAGC-3'(서열번호 18); 인간 VEGFR2를 위하여, (sense) 5'-GTGACCAACATGGAGTCGTG-3(서열번호 19) 및 (antisense) 5'-CCAGAGATTCCATGCCACTT-3'(서열번호 20); GAPDH를 위하여, (sense) 5'-TTCATTGACCTCAACTACAT-3' (서열번호 21) 및 (antisense) 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTT-3'(서열번호 22).

[204]

[205] 실시간 정량적 PCR(qPCR)을 위해, 10배 희석된 HAEC cDNA 8μl를 SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 10μl 및 각각의 primer (10μM) 1μl와 혼합하였다. PCR반응은 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) 내에서 40 사이클 (95℃ 로 15초, 그리고 60℃ 로 1분)로 3번 반복하여 수행하였다. 반응 사이클 완료 후, 용융점(melting point)을 이용하여 특이도를 확인하였다. PCR 결과는 내인성 β-actin의 2-ΔΔCt 값과 비교하여 정량하였다.

[206] 인간 NOX 아이소형(isoform)에 대한 유전자 특이적 프라이머는 Quiagen 사로부터 제공되었다: *h*NOX1 (QT00025585), *h*NOX2 (QT01751869), *h* NOX3(QT00044737), *h*NOX4(QT00057498), *h*NOX5(QT00021924), *h*

DUOX1(QT00038346) 및 *h*DUOX2(QT00012236); β-actin에 대한 특이적 프라이머는 (sense) 5'- TGGATCAGCAAGCAGGAGTAT-3' (서열번호 23) 및 (antisense) 5'-GCATTTGCGGTGGCAGAT-3'(서열번호 24)이다.

[207]

[208] 위치지정돌연변이

[209]

[210] 마우스 VEGFR2 (mVEGFR2)의 전체 cDNA를 포함하는 플라스미드는 Open Biosystems (mRNA accession number, BC020530) 사로부터 제공되었다. mVEGFR2의 암호화 서열은 정방향과 역방향 프라이머(5'-AATCACGCGGCCGC ACCATGGAGAGCAAGGCGCTGCTAGC-3'(서열번호 25) 및 5'-AATCAC CTCGAGAACAGGAGGTGAGCGCAGTGTGG-3'(서열번호 26) (*Not*I 및 *Xho*I 부위를 각각 밑줄로 나타내었다))를 사용한 중합효소 연쇄반응을 이용하여 증폭한 후 제한효소를 이용한 절단 및 부착을 통해 pBluescript SK- (Stratagene)내로 보조 클로닝하였다. 텐덤(tandem) 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 에피토프 태그(3×)를 *Sal*I 와 *Xho*I 부위를 이용하여 mVEGFR2의 카르복실 말단에 첨가하였다. Cys에서 Ser으로 대체한 위치지정돌연변이는 다음과 같은 프라이머들을 이용하여 QuickChange kit (Stratagene)를 사용하여 수행하였다: C815S를 위하여 5'-TTGCCCTTGGATGAGCGCTCT GAACGCTTGCCTTATGAT-3'(서열번호 27), C860S를 위하여 5'-GACAAGACAGCGACTTCCAAAACAGTAGCCGTCAAG-3'(서열번호 28), C1005S를 위하여 5'-ACCTTGGAGCATCTCATCTCT TACAGCTTCCAAGTGGCT-3'(서열번호 29), C1114S를 위하여 5'-GGGTCAAGATTGATGAAGAATTTTCTAGGAGATTGAAAGAAGGAACTAG -3'(서열번호 30), C1199S를 위하여 5'-GCCTACCTCACCTGTTTCCTCT ATGGAGGAAGAGGAAGTGTG-3'(서열번호 31), C1206S를 위하여 5'-GTATGGAGGAAGAGGAAGTGTCCGACCCCAAATTCCATTATGAC-3'(서열 번호 32). 대체된 염기는 밑줄로 표시하였다. 인프레임 HA 표지된 mVEGFR2 야생형(WT) 및 CS 돌연변이의 암호화 서열을 포함하는 *Not*I/*Xho*I 절편을 pQ-CXIX 레트로바이러스발현 벡터(Clontech)내로 서브클로닝하였다. 모든 구성물들은 핵산서열확인을 통해 확인하였다. 형질감염 효율의 증가를 위해 pQ 벡터는 PvuI를 통한 절단으로 선형으로 만들었다.

[211]

[212] 반응성 시스테인 티올의 형광표지

[213]

[214] VEGFR-2 산화환원 상태를 모니터링하기 위하여, HAECs 는 대조군 또는 Prx II siRNAs로 24시간동안 형질감염시키고, 18시간동안 혈청결핍시켰다. 세포들은 차가운 인산 완충 식염수로 간단하게 세척하고, 액체질소 내에서 얼린 후, 혐기성 챔버로 옮겼다. 세포들은 100μM 의 Cy3-말레이미드 (GE Healthcare)를

포함하는 TEB 내에서 분해되었고, 실온에서 30분간 반응하여 환원된 티올로 표지되었다. 1mM DTT로 반응을 정지시킨 후에 Cy3-말레이미드 표지된 시료의 동일한 양을 항-VEGFR2 항체를 이용한 면역침전에 사용하였다. 면역침전물들을 5mM DTT로 20분간 배양하여 환원시키고, TEB로 3차례 세척하였다. 면역침전물들은 100μM의 Cy5-말레이미드(GE Healthcare)로 실온에서 30분간 재표지시키고, TEB로 세척하였다. 이중 표지된 면역침전물들은 2X 시료 완충용액 내에서 끓인 후, SDS-PAGE 겔상에서 분리하였다. 형광이미지들은 Typoon 9400 variable mode imager (GE Healthcare)를 사용하여 얻었고, 형광의 수준은 ImageQuant version 5.2 (Molecular Dynamics)로 정량하였다.

[215] mVEGFR2를 암호화하는 pQ 플라스미드가 형질감염된 293T 세포들에서 과산화수소 의존적 시스테인 산화의 관찰은, mVEGFR2 침전을 위하여 항-HA 항체를 사용하는 것을 제외하고는 동일한 표지 방법으로 수행하였다.

[216]

[217] **재조합 바이러스의 생산**

[218]

[219] Prx II 발현 레트로바이러스의 생산에서 Myc 항원제시부위로 표지한 인간 Prx II 야생형 및 C52S/C172S (CS) 돌연변이의 전체 cDNA는 pQ 벡터의 *Not*I 와 *Xho*I 부위 사이에 클로닝하였다. 293T 세포들은 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 에 15cm 디쉬 당 7×10^6 세포의 밀도로 접종하고, 인산칼슘(calcium phosphate)법으로 gag/pol, VSV-G, 및 레트로바이러스 플라스미드를 각각 20μg 사용하여 형질감염시켰다. 형질감염 6시간 후, 배지를 새로운 생육배지로 교환하였다. 레트로바이러스가 함유된 상등액은 형질감염 후, 24시간과 48시간 두 경우를 선택하여, 0.45μm 주사기형 필터로 여과하여 세포찌꺼기를 제거하고, -80℃로 보관하였다. 재조합 아데노바이러스 플라스미드는 박테리아 상동 재조합 시스템(He, T.C. 등, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 95 (5), 2509-2514)으로 생산하였다. 카르복실 말단 퍼옥시좀 표적 서열 (-Lys-Ala-Asn-Leu-COOH) 이 제거된 세포질 표적 인간 과산화수소 분해효소 (Cat-Cyto)는 다음과 같은 정방향 및 역방향 프라이머 (5'-GGGGTACCATGGCTGACAGCCGG-3'(서열번호 33) 및 5'-GCGGCAAGGGAGTAATCTAGAGC-3'(서열번호 34); *Kpn*I 와 *Xba*I 부위는 밑줄로 표시)를 사용하여 HeLa cDNA 라이브러리로부터 PCR방법으로 클로닝하였다. PCR 산물은 pShuttle-CMV 벡터 내로 보조 클로닝하였다. 미토콘드리아 표적 인간 과산화수소 분해효소(Cat-Mito)는 정방향 프라이머 5'-CCCAAGCTTGCTGACAGCCGG-3'(서열번호 35)(*Hind*III부위는 밑줄로 표시)를 제외하고는 같은 방식으로 PCR 방법으로 클로닝하였다. 그 후에, 인간 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase)-2의 미토콘드리아 표적 서열(MTS)을 암호화하는 합성 뉴클레오타이드 쌍을 *Kpn*I 와 *Hind*III 부위를

이용하여 과산화수소 분해효소의 아미노 말단의 5' 부위에 연결하였다. 세포막 표적 인간 과산화수소 분해효소 (Cat-Caax) 역시 역방향 프라이머 5'-GCGGCAAGGGAG*TGCAAGTGTGTGCTCTCC*TAATCTAGAAAC-3'(서열번호 36) (H-Ras의 지질화 서열(CAAX box, -Cys-Lys-Cys-Val-Leu-Ser-)을 이텔릭체로 하고, *Xba I* 부위를 밑줄로 표시)를 제외하고는 같은 방식으로 PCR 방법으로 클로닝하였다. 변형된 과산화수소 분해효소를 암호화하는 pShuttle-CMV 벡터는 *Pme*I을 이용하여 선형으로 만들고, 재조합 아데노바이러스가 존재하는 BJ583 박테리아 세포 내로 전기 천공법으로 도입하였다. 아데노바이러스의 생산, 정제 및 적정은 이전에 보고된 He, T.C. 등의 방법으로 수행하였다.

[220]

[221] **VEGF 결합 분석**

[222]

[223] HAECs (5 X 10^3 세포/웰)는 96-웰 플레이트 상에서 배양하고 18시간 동안 혈청결핍 시켰다. 배양된 세포들은 결합완충용액(25mM HEPES (pH 7.4), 0.1% BSA를 포함하는 혈청이 제거된 DMEM) 내로 옮기고, ^{125}I-표지 VEGF(80pM; PerkinElmer Life Science)로 처리하였다. 차가운 결합완충용액으로 4회 세척한 후, 세포를 0.1N NaOH로 녹였다. 수용체 결합 방사능은 gamma counter를 사용하여 확인하였다.

[224]

[225] **계면활성제 불용성 막의 준비**

[226]

[227] HAECs (5 X 10^7)를 차가운 MBS (25mM 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES), pH6.5, 0.15M NaCl)로 2회 세척하고, MBS 내에서 접시로부터 긁어내었다. 현탁액을 4℃의 Dounce 호모게나이저 내에서 2% Triton X-100 이 함유된 MBS를 첨가하며, 0.2% Triton X-100으로 균질화하였다. 4℃에서 10분간 반응 후, 세포를 2ml의 80% 자당(sucrose)이 함유된 MBS와 초원심분리용 관의 아래쪽에서 혼합하고 균질화했다. 5-30% 불연속 자당 농도구배 상태를 만들고 (계면활성제가 빠진 MBS 내에 5% 자당 / 30% 자당이 함유된 용액 각각 4ml), SW41 rotor (Beckman Instruments,Palto Alto, CA, USA)를 이용하여 39,000 rpm으로 18시간 동안 초원심분리를 수행하였다. 12개의 1ml 분획을 얻어내고, 면역블롯을 위한 SDS-PAGE 분석에 사용하였다.

[228]

[229] **면역 금 투과 전자현미경법(immunogold-transmission electron microscopy)**

[230]

[231] HAECs (6 X 10^6 cells)는 0.5% 글루타르알데하이드가 함유된 PBS 로 실온에서 5분간 고정 및 회수하였다. 차가운 멸균수로 세척한 후, 4℃에서 알코올류를 이용하여 탈수소화하였다. 이를 LR White 레진 (London Resin, Berkshire, Engl및)으로 4℃에서 스며들게하고, 젤라틴 캡슐 내 LR White 레진에

흡착시켰다. 레진의 다량체화를 50℃ 에서 24시간 동안 수행하였다. 70nm 두께의 순차적인 절편(시료당 120-200 절편)을 formvar코팅된 니켈 그리드에 부착하였다. 절편들은 50mM 글라이신 내에서 실온에서 5분간 반응하였다. PBS로 세척 후, 절편들을 실온에서 30분간 3% BSA로 반응하였다. 그것들을 실온에서 2시간 동안 일차항체들(PBS로 1:100 희석한 토끼 폴리클로날 Prx II [LF-PA0091] 과 마우스 모노클로날 Flk-1 [sc-6251])로 반응하였다. Tween-PBS(PBS 에 0.5% Tween-20가 첨가된)로 5회 세척한 후, 절단면을 20nm 또는 40nm 지름의 콜로이드 금이 결합된 항-토끼 또는 항-마우스 IgG + IgM 항체들(PBS로 1:20 희석됨, BB International)로 실온에서 2시간 동안 처리하였다. Tween-PBS로 3회 세척한 후, 절단면을 멸균수로 세척한 후, 4% 우라닐 아세테이트로 5분간 염색하고 구연산염으로 5분간 중화했다. 일차항체의 특이성을 확인하기 위해, 절편들의 처리를 일차 항체만 빠진 동일한 과정으로 수행하였다. 이중 염색을 위하여, 이차 항원에 대하여 일차와 이차 항체반응이 반복되었다. 최종적으로, 시료는 Tecnai G2 Spirit Twin 투과 전자 현미경 (FEI company, USA) 및 JEM ARM 1300S 고-전압 전자 현미경(JEOL, Japan)로 관찰하였다.

[232]

[233] **동맥링 분석**

[234]

[235] 흉대동맥 링(1 mm 두께)을 250 μl의 성장인자 감소된 메트리겔(BD Bioscience cat #354230) 위에 올리고 200μl 의 2% FBS를 함유하거나 VEGF-A (25ng/ml)가 제거된 EBM-2를 첨가하였다. 배지는 주3회 교환하였다. 미세혈관 외부성장은 저속촬영 위상차현미경법과 FITC 부착 BS-1 렉틴(Sigma)으로 염색한 후에 레이저 공초점 현미경법을 이용하여 확인하였다. 발아(Spouting) 혈관들의 수와 각 동맥링으로부터 생성된 분지점은 Image-Pro Plus version 6.2 (Media Cybernetics)를 사용하여 수치화하였다.

[236]

[237] **메트리겔 플러그 분석**

[238]

[239] Prx II+/+ 와 Prx II-/- 한배(littermate) 마우스(7-8 주령)에 100 ng 의 VEGF-A가 함유된 메트리겔 400 μl를 피하 주사하였다. 각 마우스에 VEGF-A가 포함되거나 포함되지 않은 두가지 메트리겔 구조물을 넣었다. 마우스를 7일 후 살처분하여, 메트리겔 플러그를 조심스럽게 꺼내고 부착된 조직을 제거하였다. 플러그들은 조직학적 연구를 위해 Olympus Digital Still camera c-5060로 촬영하였다. 플러그들은 헤모글로빈 농도를 측정하기 위해 5ml 의 Drabkin's 시약(Sigma)을 사용하여 녹여졌다.

[240]

[241] **동물실험 및 치료방법**

[242]

[243] 8주령의 수컷 Prx II-/- 넉아웃 마우스와 야생형 대조군은 본 연구자들의 무균동물사육시설 내에서 사육되었다. 모든 동물의 실험은 실험동물의 사용과 케어에 있어 내부 가이드라인(Ewha Womans University, Korea)을 준수하여 수행되었다. 종양 이식 모델을 만들기 위해, 마우스를 이소플루란 가스 흡입을 통해 마취시키고, B16F10 흑색종 세포 (5×10^5 cells) 또는 루이스 폐암 세포 (LLC) (5×10^5 cells)를 현탁시킨 PBS 200μl를 피하 주사하였다. 주사 후, 종양생장 크기를 캘리퍼스를 사용하여 측정하고, 그들의 부피는 가장 긴 부분의 지름과 가장 짧은 부분의 지름을 a 와 b로 하여 $V=a\times b^2/2$의 공식으로 계산하였다. 상처 치유 모델은 Cho, C.H. 등(Cho, C.H. 등., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 103 (13), 4946-4951)에 나타나있는 것을 사용하였다. 4 mm 피부용 생검 펀치(Stiefel Laboratories, Germany)를 이용하여 8주령 수컷 Prx II 넉아웃 마우스 및 야생형 대조군의 등쪽 피부에 2개 상처를 내었다. 상처들은 SP-570UZ digital camera (Olympus)로 촬영하였다. 피부 구멍의 지름(mm)은 ImageJ program (NIH)을 이용한 사진 분석에 의해 상처 주위의 흔적으로부터 계산되어졌다. 상처를 낸 후 6일 및 12일 뒤에 확인시간 당 최소 5마리에 생긴 상처들을 확인하였다.

[244]

[245] **형태학적 분석**

[246]

[247] 마우스를 지정된 날짜에 마취하였다. 마우스 조직들은 헤파린 처리된 염분과 1% 파라포름알데하이드를 함유한 PBS로 전신 혈관 관류를 이용하여 고정한 후, 그 용액을 제거하고 슬라이드에 그대로 또는 OCT 화합물을 첨가하여 올려놓았다.

[248] 냉동 조직은 Cryo 챔버 (Leica)내에서 20 μm의 두께로 교차 절단되었다. 실온에서 1시간동안 5% 정상 염소 혈청 (Vector Laboratories)이 함유된 PBST (0.3% Triton X-100 가 함유된 PBS)로 블로킹한 후, 절단된 조직을 항-마우스 CD31 항체, hamster clone 2H8 (Chemicon)으로 4℃에서 하룻밤 동안 반응하였다. 수 차례의 PBST 세척 후, 시료를 Cy3 결합 항-햄스터 IgG 항체 (Jackson ImmunoResearch)로 실온에서 2시간 동안 반응하였다. 대조군 실험을 위해, 일차항체를 빼고 동일하게 수행하였다. 형광신호들은 조직 절편당 무작위적으로 1.25 mm2 넓이의 세 곳을 100 배의 배율로, 아르곤과 헬륨-네온 레이저(Carl Zeiss)를 이용한 LSM 510 Meta 공초점 현미경을 사용하여 관찰하였다. 혈관의 형태학적 측정은 ImageJ program (NIH)을 이용한 사진 분석법을 사용하여 CD31+ 픽셀을 조직 절편 상에 표시하였다.

[249]

[250] **통계**

[251]

[252] 데이터는 SigmaPlot 8.0 software를 사용하여 스튜던트 티검정법으로

분석하였고, 통계 유의도(*P* 값)를 확인하였다. $P < 0.05$를 의미있는 것으로 하였다.

[253]

[254] 실험결과

[255] **PrxII는 VEGF 신호를 양성 조절한다.**

[256]

[257] 인간 대동맥 혈관내피세포(human aortic ECs, HAECs)에서 세 종류의 세포질 항산화 효소(cytosolic antioxidant enzyme)가 발견되었다 (도 11a). 따라서, 본 발명자는 siRNA(small interfering RNA)-매개의 넉다운(knockdown) 전략을 이용하여 HAECs에서 어떠한 효소가 VEGF 매개의 신호전달에 영향을 미치는지에 대하여 조사하였다. Prx I, Prx II 또는 GPx1를 표적으로 하는 4가지 siRNA는 표적 단백질의 발현을 85-95% 감소시켰다 (도 11a). 적어도 서로 다른 2개의 siRNAs를 형질감염시켜 상기 3가지 효소를 넉다운시켰을 때, PrxII 발현의 넉다운은 대조군 세포에 비해 VEGFR에서의 티로신(tyrosine)의 인산화 감소를 야기하였다 (도 1a 및 도 11b 및 11c). 2-cys Prxs의 다른 아이소형인 PrxIII (미토콘드리아 형태)와 PrxIV (세포외 형태) 어느 것도 VEGFR에서의 티로신 인산화와 같은 효과를 나타내지 않았다(도 11d 및 11e). 이러한 결과는 세포 항산화효소(cellular antioxidant enzymes) 중에서도 Prx II가 가장 효과적임을 의미한다. 또한, VEGFR에서의 티로신 인산화는 HUVECs과 HMVEC에서 PrxII를 넉다운시킴으로써 하향 조절되었고, 이것은 일반적인 EC 유형 세포에서의 VEGF 신호전달에 대한 PrxII의 양성 조절 효과를 뒷받침한다 (도 12).

[258]

[259] 다음으로 본 발명자는, 주요 VEGF-매개의 신호전달 경로의 활성화에 대해 조사하였다. 조사한 다섯 가지 분자 중, 대조군 세포에 비해 HAECs에서 PrxII 넉다운에 의해 내피 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)와 MAPK(mitogen-activated protein kinase, ERK)의 활성이 상당히 하향 조절되었다 (도 1c 및 도 13). eNOS의 활성 감소와 함께, HAECs에서 PrxII 넉다운에 의해 VEGF-유도된 cGMP 생성도 상당히 감소하였다 (도 1d). ERK와 eNOS 활성이 EC 증식 및/또는 VEGF에 의한 EC 이동을 감소시켰기 때문에 (도 14), 본 발명자는 시험관 내 세포 기능 분석을 실시하였다. 실제로, 대조군 세포에 비해 HAECs의 PrxII 넉다운은 HAECs의 증식과 주화성 이동(chemotactic migration), VEGF에 의한 관형성(tube formation)을 상당히 감소시켰다 (도 1e - 1g).

[260] VEGF-VEGFR2 신호전달에 미치는 PrxII의 선택특이적 효과를 입증하기 위해, 우리는 다양한 대조군 실험을 수행하였다.

[261] 우선, 본 발명자들은 Prx II-조절되는 내인성 ROS가 VECs에서 VEGFR 인산화를 어떻게 조절하는 지에 대한 기작을 연구하였다. 본 연구에서 이용된 $VEGF_{165}$가 VECs에서 VEGFR-1 및 VEGFR-2 모두에 결합할 수 있고, VEGFR-1이

VEGF의 유인 수용체(decoy receptor)로 알려져 있다는 것을 고려하여, 본 발명자들은 Prx II-제거된 VECs에서 ROS-매개된 VEGFR-1 발현 가능성을 조사하였다. 그 결과, VEGFR-1의 발현은 대조군 및 Prx II-제거된 VECs에서 실제적으로 동일하였다. 또한, PrxII 넉다운이 VEGF-의존적 증식과 HAECs 이동에 어떠한 영향도 미치지 않았다 (도 15a - 15d). 이러한 결과는 VEGFR-1은 PrxII 부재에 의한 VEGF 신호전달의 하향 조절과 관련이 없다는 것을 의미한다.

[262] 두번째로, ECs에서 ERK를 강하게 활성화시키는, VEGF/PDGF 패밀리에 포함되는 섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor-2, FGF-2)에 대하여 조사하였다. FGF-2는 비록 티로신 인산화 유도는 거의 하지 않았음에도 불구하고, 섬유아세포 뿐만 아니라 ECs에서도 ERK 활성화를 유도하였다 (도 16a 및 16b). 그럼에도 불구하고, ECs에서의 PrxII 넉다운은 FGF-2에 의해 유도된 ERK 활성화를 방해하지 않았다 (도 16c).

[263]

[264] 정리하면, 이러한 결과는 PrxII는 ECs에서의 VEGF-VEGFR2 신호전달을 선택적으로 조절한다는 것을 증명하는 것이다.

[265]

[266] **PrxII는 산화적 불활성화로부터 VEGFR2 티로신 키나제를 보호한다.**

[267]

[268] 본 연구에서는 세포질 페록시다아제(cytosolic peroxidase enzymes)를 다루고 있기 때문에, VEGF에 의한 세포내(intracellular) ROS 수준의 변화를 산화제-민감한 형광 염료(fluorescent dye)인 5,6-클로로메틸-2',7'-다이하이드로-클로로플루오레세인 다이아세테이트(CM-H2DCFDA)를 이용하여 조사하였다. 대조군 세포에 VEGF를 처리하였을 때에는 ROS 수준이 2배 정도 증가한 반면, PrxII를 넉다운 시켰을 때는 VEGF를 처리하지 않은 상태의 ROS의 기저 수준(basal level)이 대략 5배 정도 증가하였다 (도 2a). 이와 대조적으로, PrxI와 GPx1 어느 것도 ROS의 기저 수준 및 VEGF-유도된 ROS 생성에 영향을 미치지 않았다 (도 17). 또한, 원래 퍼옥시좀에서 H_2O_2를 H_2O로 분해시키는 효소인 과산화수소 분해효소(catalase)를 인위적으로 변형시켜 세포막으로 도입시킨 경우 PrxII 넉다운에 의해 증가된 기저 ROS 수준을 배경 수준(background level)으로 복귀(return)시켰으며 (도 2b) 이로부터 H_2O_2가 PrxII의 실질적 기질(actual substrate)임을 확인하였다. 따라서, PrxII는 HAECs에서의 H_2O_2 기저 수준을 억제하는 일차 페록시다아제(primary peroxidase enzyme)임을 확인하였다.

[269]

[270] 따라서, PrxII 부재는 H_2O_2의 기저 수준은 증가시키지만, VEGF-유도된 EC 활성은 감소시킨다. 이는 VEGF-매개 신호전달에 H_2O_2의 발생이 필요하다는 기존에 알려진 사실과는 구별된다. PrxII 부재에 의해 유도된 이러한 두 결과를 연관짓기 위해, 일단 위치-특이적 포스포항체(site-specific phosphoantibody)를

이용하여 VEGFR2 자기인산화(autophosphorylation) 수준을 조사하였다. 그 결과, VEGF 자극에 의해 유도된 4가지의 티로신 잔기에서의 VEGFR2 자기인산화는 대조군 siRNA에 비해 PrxII 넉다운에 의해 확연하게 감소하였다 (도 2c). 네 개의 타이로신 잔기 중에서, Y951 및 Y1175의 인산화에서 차이가 명백하였다. HUVECs과 HMVECs에서 동일한 결과가 관찰되었고(도 12), ECs에 대한 일관된 VEGF-VEGFR2에서의 PrxII의 양성 조절 역할을 재확인하였다.

[271]

[272] VECs에 결합된 ^{125}I-VEGF의 정량에 의해 확인한 바와 같이, PrxII 넉다운이 ECs에서의 단백질 수준과 VEGF-VEGFR2 결합력을 변화시키지 않았기 때문에, 본 발명자는 VEGFR2 RTK 활성이 H_2O_2 산화에 의해 저해될 수 있을 것이라 판단하였다. 따라서, 기질로서 VEGFR2와 GST-PLCγ1를 이용하여 시험관 내 키나아제 분석을 수행하였다. 특히, VEGF-유도된 VEGFR2 RTK 활성은 대조군 세포에 비해 HAEC에서의 PrxII 넉다운에 의해 거의 완벽하게 사라졌다(도 2d). 이와 대조적으로, 내인성 PTPase 활성은 Prx II 발현의 넉다운에 의해 영향받지 않았다(도 26).

[273]

[274] 이것은 증가된 기저 H_2O_2이 VEGFR2 활성을 저해한다는 것을 의미한다. 외인성(exogeneous) 산화제에 의해서도 가능한지 테스트하기 위해, 다양한 농도의 H_2O_2 용액을 HAECs에 직접 처리하였다. H_2O_2 전처리는 농도 의존적 방식으로 VEGFR2 RTK 활성의 VEGF-의존적 유도를 억제하였고, 이것은 시험관 내 키나아제 분석과 VEGFR 인산화에서 확인되었다 (도 3a 및 도 18a). 다양한 암세포에서 H_2O_2-매개의 과산화(hyperoxidation)에 의해 2-cysPrx가 불활성화된다고 보고되었기 때문에, 본 발명자는 과산화된(hyperoxidized) 2-cysPrx에 특이적인 항체(anti-Prx-SO2 antibody)를 이용하여 PrxII의 산화 상태를 확인하였다. 그 결과 외인성-추가된(exogenously-added) 최대 100uM까지의 마이크로몰 농도의 H_2O_2에 의해 2-cysPrx 과산화가 유도되지 않았다 (도 18b). 밀리몰 농도에서 조차, H_2O_2는 PrxI와 PrxIII의 과산화를 약간만 유도하였을 뿐, PrxII의 과산화는 유도하지 않았다. 이러한 결과는 외인성(exogenous) H_2O_2는 PrxII가 아닌, VEGFR2를 직접적으로 목표로 한다는 것을 증명한다.

[275] VEGFR2 산화의 화학적 특성을 입증하기 위해, PrxII siRNA가 형질감염되었거나 H_2O_2가 처리된 HAECs로부터 VEGFR2가 면역침전되었고, 환원제인 다이티오트레이톨(dithiothreitol, DTT)와 함께 배양하였다. 그 결과, DTT 환원은 PrxII 넉다운 또는 H_2O_2 처리에 의해 파괴된 RTK 활성을 완벽히 복원하였고, 이것은 DTT가 처리된 대조군 샘플에서의 활성화된 RTK 수준과 비슷해졌다 (도 3b). 이러한 결과는 H_2O_2-매개의 VEGFR2 산화가 가역적임을 명확하게 의미한다.

[276] RNA 간섭에 의해 관찰되는 내피세포 VEGFR2 신호전달에서의 PrxII의 선택적 조절 역할을 생체 내에서 확인하기 위하여, 본 발명자는 PrxI-/-, PrxII-/-

마우스로부터 마우스 대동맥내피세포(MAEC)를 준비하였다. 시험관 내 결과와 마찬가지로, VEGFR2 인산화는 야생형(WT) 세포에 비해 PrxII-/- MAECs에서 상당히 감소하였지만, Prx I-/- MAECs에서는 감소하지 않았다 (도 3c 및 3d).

[277] 또한, 인간 PrxII의 추가재발현(add-back expression)에 의해 PrxII-/- MAECs가 구제(rescued)되었을 때, VEGF에 의해 야생형 PrxII는 VEGFR2 활성을 복원하였다. 반면, PrxII의 비활성 시스테인 돌연변이(mutant)에서는 그러하지 않았다(도 3e). 이러한 결과는 PrxII의 페록시다아제 활성(peroxidase activity)이 산화에 대한 VEGFR2 보호에 필수적임을 의미하는 것이다.

[278]

[279] **<u>Cys1206는 VEGFR2 RTK 활성의 redox 조절 부위이다.</u>**

[280]

[281] 신호전달 단백질 또는 효소의 산화환원 조절은 포함된 반응성 시스테인 잔기의 H_2O_2-매개된 산화와 연관되기 때문에, 본 발명자는 시스테인 잔기의 차등 형광 표지를 통하여 이것이 VEGFR2에도 적용되는 것인지를 확인하였다. 형광 염료(Cy3 및 Cy5)와 결합된 말레이미드는, 중성(neutral) pH 15에서 반응성 시스테인 잔기의 티올 그룹의 표지에 사용되었다. 환원된 시스테인 티올 정도(extent)를 나타내는 Cy3-말레이미드 표지 수준은 PrxII 넉다운에 의해 감소하였다; 반면, 산화된 시스테인 티올 정도를 나타내는 Cy5-말레이미드 표지 수준은 3배 가량 증가하였다 (도 4a). 이러한 결과는 VEGFR2에도 반응성 시스테인 잔기가 존재함을 의미하는 것이다.

[282]

[283] PrxII 넉다운에 의해서도 VEGF-VEGFR2 상호작용이 변하지 않았던 점을 근거로 하여, 반응성 시스테인은 VEGFR2의 세포질 도메인(cytoplasmic domain)에 반드시 존재해야 할 것이다. 이에 따라, PDGFR/VEGFR/FGFR RTKs의 아미노산 서열이 VEGFRs에 존재하는 시스테인 잔기 후보군을 검색하기 위하여 정렬되었다 (도 19a). Cys815, Cys860, Cys1005, Cys1114, Cys1199 및 Cys1206 (마우스 VEGFR2 기준)를 포함하는 6개의 시스테인 잔기는 VEGFRs의 세포질 도메인에서 특이적으로 발견되었다.

[284]

[285] 마우스 VEGFR2(mVEGFR2)의 Cys를-Ser로 치환하는 (CS) 돌연변이를 만들어서 293T 세포에서 H_2O_2-매개의 산화 민감성에 대하여 테스트하였다 (도 19b). 대조군 실험을 통하여, 293T 세포에서 발현되는 야생형(WT) mVEGFR2는 HAECs에서의 내인성 인간 VEGFR2와 유사하게 H_2O_2의 농도-의존적 방식으로 불활성화되었음을 보여주었다(도 19c). mVEGFR2의 WT과 CS 돌연변이를 발현하는 293T 세포는 H_2O_2와 함께 또는 H_2O_2 없이 전처리되었고, 이후 VEGF를 처리하였다. 어떠한 시스테인 돌연변이도 그 자체로 VEGF에 의해 유도된 VEGFR2 활성에 영향을 미치지 않았다 (도 4b). 산화적 처리시(oxidative challenge), C1206S 돌연변이만 H_2O_2-매개 불활성화에 대하여 완전한 저항을

가졌던 반면, WT와 다른 CS 돌연변이는 H_2O_2-매개 불활성화에 취약하였다 (도 4b). VEGFR2-WT, -C1199S, 그리고 -C1206S의 인산화 수준을 정량화함으로써, C1199S 돌연변이는 H_2O_2의 존재 하에 부분적으로 VEGF 자극에 반응을 보인다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명자는 C1199S 돌연변이의 산화가 가역적인지 여부를 확인하였다. WT과는 다르게, 산화된 C1199S 돌연변이의 RTK 활성은 DTT 환원에 의해 복원되지 않았고(도 4c), 이것은 Cys 1199 잔기는 VEGFR2 C1206 잔기 산화의 가역성에 필수적이라는 것을 의미한다.

[286]

[287] C1199 잔기는 이황화 결합을 형성함으로써 C1206 술펜산(sulfenic acid, -SOH)을 안정화시키는 부위로 작용할 것이라는 가설을 입증하기 위하여, 비환원성 변성 겔 상에서 mVEGFR2 WT 및 CS 돌연변이의 전기영동적 이동성을 살펴보았다. mVEGFR2 단백질을 발현하는 293T 세포가 외인성 H_2O_2로 처리되었을 때, WT 뿐만 아니라 C1144S 돌연변이의 이동성도 처리되지 않은 샘플에서보다 더욱 빨랐다(도 5a). mVEGFR2 단백질의 HA태그를 이용한 면역블롯 분석도 동일한 결과를 보여주었다. 따라서, 상기 결과는 산화된 VEGFR2 단백질이 사슬 내 이황화 결합을 포함한다는 것을 나타낸다. 그러나, C1199S 및 C1206돌연변이는 모두 이동성 변화를 나타내지 않았고, 이는 분명하게 산화된 VEGFR2에서는 이황화 결합이 Cys1206 술펜산 및 Cys1199 잔기 사이에 형성된다는 것을 나타낸다. 내인성 VEGFR2에 대하여 이러한 점을 확인하기 위하여, 본 발명자는 HAECs를 외인성 H_2O_2로 처리하였다. 면역블롯 분석에서도, 처리되지 않은 샘플에 비하여 H_2O_2-처리된 샘플에서 VEGFR2의 빠른 이동성이 나타났다. 이는 티올 환원제 다이티오트레이톨(DTT)의 농도가 증가함에 따라 점점 환원된 형태로 변화하는 것이다(도 5b). 사슬간 이황화결합을 가진 VEGFR2 이량체에 해당하는 면역 반응성 밴드는 존재하지 않았다.

[288]

[289] 또한 본 발명자는 Cys1206만이 반응성 시스테인 잔기라는 것을 입증하기 위해 mVEGFR2 WT과 CS 돌연변이에서의 시스테인 티올의 형광 표지를 실시하였다(도 4d). HAECs로부터 얻은 결과와 일치하여, H_2O_2 처리 후에 WT에서의 Cy3 표지 수준은 감소하였고, Cy5 표지 수준은 정반대였다. 예상대로, C1114S 돌연변이는 실질적으로 WT과 동일하였다. 이와 대조적으로, C1206S에서의 Cy3와 Cy5 표지 수준은 거의 기본 수준이었다. 따라서, 이 결과는 Cys1206만이 H_2O_2 뿐만 아니라 말레이미드와 반응하는 시스테인 티올임을 명확하게 증명한다.

[290]

[291] 다음으로 본 발명자는, PrxII 넉다운을 이용하여 HAECs에서 C1206S 돌연변이가 기능을 하는지에 대하여 조사하였다. mVEGFR2 WT과 C1206S 돌연변이는 내인성 인간 VEGFR2가 넉다운된 HAECs에서 발현되었다. PrxII

넉다운된 HAECs에서 mVEGFR2 WT가 VEGF 자극에 의해 활성화되지 않았던 반면, C1206S 돌연변이는 대조군 세포의 WT 만큼이나 활성화되었다(도 4e). 또한, 대조군 세포에서 WT와 마찬가지로, PrxII 넉다운을 한 HAECs에서 C1206S 돌연변이는 VEGF-유도된 관형성을 효과적으로 매개하였다(도 4f). VEGFR2 WT과 C1206S에 의한 관형성은 VEGFR2 RTK 억제제인 SU5416에 의해 완벽히 차단되었고, 이것은 VEGFR2 RTK 활성이 필수적임을 의미한다. 분명하게도, 이러한 결과는 C1206 잔기는 정상적인 VEGFR2 활성에 포함되지 않지만, 직접적 산화 부위로서의 VEGFR2 RTK 활성 산화환원 조절에 포함된다는 것을 의미한다.

[292]

[293] **PrxII/VEGFR2/Nox4는 지질 뗏목/포낭(lipid raft/caveolae)에 공간적으로 함께 위치한다.**

[294]

[295] PrxII가 산화로부터 VEGFR2를 보호하는 미세환경(microenvironment)을 이해하기 위해, 우리는 H_2O_2 발생자로서의 NOX 효소와 함께 PrxII 및 VEGFR2의 세포 내 위치를 조사하였다. PrxII와 VEGFR2의 일부가 다양한 세포 유형의 지질 뗏목/포낭(lipid raft/caveolae)에 분포되어있다고 보고된 바 있다. 이를 확인하기 위하여, VEGF-A가 첨가된 혈청의 존재/부재 조건에서 배양된 HAECs로부터 계면활성제-불용성 막 분획을 획득하였다(도 6a). 계면활성제-불용성 가벼운 분획(분획 번호 4 및 5)은 마커 단백질(카베올린-1(caveolin-1), 플로틸린-2(flotillin-2))로 나타난 바와 같이 지질 뗏목/포낭이 풍부하였다. 실제로, 혈청 처리 여부에 관계없이 PrxII와 VEGFR2의 상당량이 ECs의 지질 뗏목/포낭 분획에서 검출되었다(도 6a). 반면, PrxI은 혈청 처리 이후 지질 뗏목/포낭 분획에서 나타났다. VEGFR2와 함께 PrxII의 막 위치를 현미경 수준으로 입증하기 위해서, 우리는 투과전자현미경(transmission electron microscopy)을 이용하여 면역금(immunogold) 염색을 실시하였다. PrxII는 20-nm 금 입자를 포함하는 이차 항체로 표지된 반면, VEGFR2는 40-nm 금 입자를 포함하는 이차 항체로 표지되었다. 그 결과, 세포내 소낭성/액포 구조(intracellular vesicular/vacuolar structures) 뿐만 아니라, 세포막의 함입된 구조에서 2개의 금 입자가 발견되었다(도 6b). 또한, 대부분의 40-nm 입자는 1개 또는 2개의 20-nm 입자와 밀접하게 관련이 있었고, 이것은 PrxII와 VEGFR2 단백질이 함께 공간적으로 위치함을 직접적으로 입증하는 것이다. 세포질 단백질로 알려진 PrxII 분자 대부분이 HAECs의 세포내의 막 구조에서 발견이 되었다는 것은 주목할 만하다.

[296] 다음으로 본 발명자는, NOX 효소의 세포 내 분포를 조사하였다. 실시간 PCR 결과, NOX4 mRNA 수준이 다른 아이소형의 수준보다 3배 높았으므로 (도 21a), HAECs 내 주요 NOX 아이소형이 NOX4임이 확인되었다. 따라서, 본 발명자는 NOX4 위치를 확인하기 위하여 NOX4-특이적 항체를 생산하였다. 면역블롯과

면역염색을 함으로써, NOX4 항체가 내인성 NOX4 단백질에 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다 (도 21b 및 21c). 최근, NOX4가 미토콘드리아와 핵에 위치한다는 여러 연구들이 보고되었다. 이와 일치하여, NOX4 단백질의 상당 부분이 핵과 미토콘드리아 위치를 나타내는 핵주변 부위에서 관찰되는 것을 확인하였다.

[297] 특히, 세포막에서 발견되는 면역반응성 신호는 카베올린-1과 함께 위치하였다(도 6c). 이것은 지질 뗏목/포낭에 존재하는 NOX4 위치를 보여주는 새로운 증거이다.

[298]

[299] 다음으로, 지질 뗏목/포낭에서 이러한 산화환원 효소들이 어떻게 연관되어 있는지에 대하여 조사하였다. HAECs에서 PrxII와 NOX2 또는 NOX4를 넉다운하였을 때, NOX4 넉다운만이 PrxII 넉다운에 의해 증진된 H_2O_2의 기저 수준을 배경 수준으로 되돌렸다. 이러한 결과는 NOX4가 HAECs에서 기저 H_2O_2의 주된 발생자임을 의미한다. 보다 명확하게, NOX2가 아닌, NOX4와 PrxII의 이중 넉다운은 VEGF에 의한 VEGFR2 활성을 완벽하게 복원하였다 (도 7b). NOX2 넉다운은 NOX4 발현을 보상적 유도(compensatory induction)하고, VEGFR2 인산화의 추가적인 감소를 야기할 수 있다. 따라서, 이러한 결과는 진행이 중단된 ECs에서 PrxII는 NOX4-유래 H_2O_2에 의한 산화로부터 VEGFR2를 보호한다는 것을 의미한다. 그리고, 지질 뗏목/포낭 구조가 이러한 산화환원회로에 중요한지 확인하기 위해, 카베올린-1 넉다운 또는 콜레스테롤 격리(sequestration)를 이용하였다. HAECs에서 카베올린-1이 넉다운되었을 때, VEGFR-2 활성은 PrxII 넉다운에 의한 영향을 더 이상 받지 않았다(도 7c). 콜레스테롤-결합제(methyl-β-cyclodextrin, MβCD)의 처리 또한 PrxII 넉다운된 HAECs에서 대조군 세포에서와 같은 정도로 VEGFR2 활성화를 복원하였다 (도 7d). 포낭 미소도메인(caveolae microdomain)에서의 PrxII의 국소적 역할을 확인하기 위해, 본 발명자는 PrxII-부재 ECs에서의 다양한 세포 기관에 대하여, 원래 퍼옥시좀에서 H_2O_2를 분해하는 기능을 가지는 과산화수소 분해효소와 같은 아무런 관련이 없는 페록시데이즈를 인위적으로 변형시켜 여러 세포 기관으로 도입 처리하는 변위 실험(displacement experiment)을 설계하였다 (도 22a). 지질 뗏목/포낭 표적화를 위하여, 과산화수소 분해효소 C-말단의 페록시좀 표적화 서열(-KANL-COOH)이 팔미토일화 부위 및 H-Ras 단백질 22의 CAAX 모티프를 포함하는 펩티드 서열(6개 아미노산)로 교체되었다 (도 22b 및 22c). PrxII 넉다운 세포를 이러한 과산화수소 분해효소-발현 아데노바이러스로 감염시키면, 미토콘드리아-표적이 아니라 세포질- 및 막-표적 과산화수소 분해효소가 바이러스 역가-의존적으로 PrxII 넉다운에 의해 증진된 세포 H_2O_2를 효과적으로 제거하였다(도 7e 및 도 23). 그러나, VEGFR2 활성화가 조사되었을 때, 막-표적화되도록 변형시킨 경우에만 HAECs에서 PrxII넉다운에 의하여 손상된 VEGFR2 활성화를 복원하였다(도 7f). 이는 VEGF-매개 신호전달을

위하여 VEGF-유도된 H_2O_2가 발생되는 것과 별도로, PrxII가 ECs에서 VEGF 자극과 상관없이 NOX4-유래 H_2O_2에 의한 산화로부터 VEGFR2를 보호하는 기능을 하고 이는 지질 뗏목/포낭 미소도메인 내 H_2O_2의 국소적 작용임을 확인할 수 있었다.

[300]

[301] 정리하면, 이러한 결과는 Cys1206 잔기 특이적인 VEGFR2의 산화환원 민감성은 포낭에 존재하는 NOX4로부터 유래된 H_2O_2 때문이며, 따라서 PrxII에 의한 보호는 VEGF에 의한 VEGFR2 활성에 대하여 중요하다는 것을 의미한다.

[302]

[303] **PrxII 결핍은 신생혈관형성을 억제한다.**

[304]

[305] PrxII의 존재는 VEGFR2 활성에 대한 전제조건이었기 때문에, PrxII 결핍은 VEGF에 의해 유도된 신생혈관형성에 부정적으로 영향을 미칠 것이라 추정되었다. 이를 확인하기 위하여, 본 발명자는 ex vivo 시스템에서 PrxII-/- MAECs의 혈관신생 활성을 측정하였다. 대동맥 링 분석을 VEGF를 첨가 또는 첨가하지 않고 매트리겔에서 수행하였다. 미세혈관 내피세포는 VEGF 처리에 의해 대동맥 외식편(explant) 밖으로 성장하였고, FITC-결합 BS-1 렉틴을 식별함으로써 확인되었다 (도 8a). VEGF 처리에 의해 유도된 미세혈관에서의 발아와 가지점(branching point)은 WT 외식편에 비해 PrxII-/- 대동맥 외식편에서 훨씬 적었다 (도 8b 및 8c). 이러한 결과는 PrxII 결핍은 VEGF-의존적 미세혈관 성장을 저해한다는 것을 의미하는 것이다. 또한, WT와 PrxII-/- 마우스의 피하에 이식된 매트리겔 플러그에서 MAECs의 혈관신생활성을 조사하였다. 플러그에 함유된 헤모글로빈의 양에 의해 확인한 결과, PrxII-/- 마우스에서의 VEGF-유도된 혈관 형성은 WT 마우스에 비해 상당히 좋지 않았다(도 8d). 이러한 결과는 플러그에 존재하는 CD31+ 세포량과 일치했다.

[306] 다음으로 본 발명자는 생체 내 혈관신생 모델에서 PrxII의 결핍이 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 창상(cutaneous wounding)을 유발하기 위하여, WT과 PrxII-/- 마우스의 등부위 피부를 두껍게 잘라내었다. 창상 복원(Wound closure) 정도는 WT 마우스에 비해 PrxII-/-의 피부에서 낮았다(도 8e). 창상 부위(수술 6일 뒤)를 CD31로 염색했을 때, 상처 가장자리에서의 혈관 밀도는 WT 마우스에 비해 PrxII-/- 마우스에서 훨씬 적게 관찰되었다 (도 8f).

[307] 암세포는 신생혈관을 모으기 위해 VEGF를 왕성하게 생산하여 주변혈관으로부터 EC를 이동시켜 암조직으로 혈관신생을 유도하기 때문에, 본 발명자는 종양 이종 이식(tumor xenograft) 모델에서 PrxII의 향-혈관신생 활성을 조사하였다. 루이스 폐 암종(Lewis lung carcinoma, LLC)과 B16 흑색종 세포(B16 melanoma cells)는 WT과 PrxII-/- 마우스의 피하에 이식되었다. WT 에 비해 PrxII-/- 마우스에서 종양 성장이 느렸으며, 이는 주사 3주 후 종양 볼륨과 무게가 40 - 50% 감소한 것을 근거로 하였다 (도 9a 및 9b). 또한, 비슷한 크기의 2주차

종양에 대하여 혈관 밀도를 조사하였을 때, WT 에 비해 PrxII-/- 마우스에서 종양이 현저히 적었으며(LLC 종양에 대하여, WT 마우스에서는 165 ± 42 mg, PrxII-/- 마우스에서는 130 ± 24 mg; B16F10 종양에 대하여, WT 마우스에서는 150 ± 34 mg, PrxII-/- 마우스에서는 100 ± 26 mg)(도 9c 및 9d), 이것은 PrxII-/- MAECs의 감소한 혈관신생활성이 종양 성장을 지연시켰다는 것을 의미하는 것이다. 이러한 암 생성의 억제가 혈관신생의 감소에 의한 것인지를 조사하기 위해, 채취된 암동어리의 냉동 절편을 혈관내피세포의 마커인 CD31에 대해 면역형광 염색을 진행하였다. Prx $II^{-/-}$ 마우스에서 형성된 흑색종 종양에는 대조군 야생형 마우스의 종양과 비교하여 $CD31^{+}$ VEC가 현저히 감소되어 있었다. 이는 Prx II의 제거된 혈관내피세포는 암조직으로부터 VEGF가 분비되어도 이동되지 않는 다시 말해 VEGF에 대해 낮은 반응성을 보인다는 것을 확인하는 결과이다.

[308]

[309] 정리하면, *ex vivo* 및*in vivo* 결과는 내피세포의 PrxII는 산화적 불활성화에 대하여 VEGFR2를 보호하는 향-혈관신생 요소라는 것을 강하게 의미한다.

[310]

[311] **혈관신생 억제제의 스크리닝**

[312] 인간 대동맥으로부터 유래된 세포를 37℃에서 5% CO_2를 포함하는 습도유지 공기 하에서 배양한다. EC(HAEC) 및 SMC(HASMC)를 이용하는 경우, 각각 내피세포 기초배지-2(EBM-2) 및 기초배지(SmBM)에서 배양한다. 패시지 7까지 배양된 세포에 시험물질(예컨대, 화학물질, 펩타이드 또는 천연추출물)을 처리하여 배양한다. 이후, 각 세포에서 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현을 분석하며, 이때 상술한 시험물질이 Prx II의 활성 또는 발현을 억제시키면 혈관신생 억제제로 판단된다.

[313] Prx II 단백질의 활성 변화를 *생체 내*에서 측정하기 위해, 대조군 세포 및 시험물질이 처리되어 배양된 세포에서 활성산소종의 수준을 측정한다. 각 세포를 페놀 레드 없는 내피세포 기초배지(EBM, Lonza)로 세척하고 5 μM 5,6-클로로메틸-2',7'-다이클로로다이하이드로플루오레신 다이아세테이트(CM-H_2DCFDA)(Melecualr Probe)와 37℃에서 5분 동안 반응시킨다. 이후, 세포를 페놀 레드 없는 EBM으로 세척한 후 형광 현미경(Axiovert 200 Basic standard, Zeiss, Germany)으로 즉시 분석한다. 시험물질에 의해 Prx II 단백질의 활성이 감소된 경우에는 대조군에 비해 시험물질이 처리된 세포에서 형광 수준이 증가하며, Prx II 단백질의 활성이 증가된 경우에는 형광 수준이 감소한다. Prx II 단백질의 활성 변화를 *시험관 내*에서 측정하는 경우, 각 세포를 20 ml의 20 mM HEPES-NaOH 완충용액(1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM AEBSF, 펩스타틴 1 ㎍/ml, 루펩틴 5 ㎍/ml, 아프로티닌 5 ㎍/ml, pH 7.0)에서 균질화시킨다. 전기 균질현탁액을 15,000×g에서 4℃에서 30분 동안 원심분리하여, 상층액을 수득하고, 1.5 ml 용량의 원심분리용 튜브에서

버퍼 B(20 mM HEPES-NaOH, pH 7.0 및 1 mM EDTA)로 예비-평형된 DEAE-세파로오스(200 ㎕ 레진 체적)와 혼합한다. 전기 레진을 1 ml의 버퍼 B로 2회 세척하고, 100 내지 500 mM NaCl이 함유된 버퍼 B를 이용하여, 단계구배로 용출하여 활성분획을 얻고 Prx II에 대한 항체를 이용한 면역블롯방법을 이용하여, Prx II를 수득한다. 수득된 Prx II 10 ㎍을 2.5 μM yTrx1(효모에서 유래된 티오레독신), 400 nM yTrxR(효모에서 유래된 티오레독신 환원효소), 200 μM NADPH, 1 mM EDTA 및 50 ㎕ HEPES-NaOH 완충용액(50 mM; pH 6.0-8.0)와 혼합한 다음, 100 μM H_2O_2를 첨가한다. 이어, 30℃에서 3분 동안 Agilent UV8453 분광 광도계(Hewlett Packard, USA)에서 340 nm의 흡광도를 모니터링하여, NADPH의 산화 정도를 측정한다. 시험물질에 의해 Prx II 단백질의 활성이 감소된 경우에는 대조군에 비해 시험물질이 처리된 세포군에서 흡광도의 값이 감소하며, Prx II 단백질의 활성이 증가된 경우에는 흡광도의 값이 증가한다. Prx II를 특이적으로 억제하는 물질을 스크리닝하기 위하여, Prx I, III, IV 및 V에 대하여 (a) 내지 (f) 단계를 추가로 수행하여, Prx I, III, IV 및 V를 포함하는 실험군의 흡광도가 대조군의 흡광도와 차이가 없는 경우, 상기 시험물질을 혈관신생 억제제로 판단한다.

[314] Prx II의 발현을 유전자 수준에서 측정하기 위해, 대조군 및 시험물질-처리된 세포에서 mRNA를 추출하여 각각 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA를 템플레이트로 이용하여 당업계에 잘 알려진 PCR 방법을 통해 PrxII 유전자를 검출한다. PCR 프라이머 세트의 특이성 및 최적성을 BLAST(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 및 올리고뉴클레오타이드 특성 계산 프로그램(http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)으로 결정한다. PCR 증폭은 1 ㎕의 cDNA(10 ng), 10 mM Tris HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 250 dNTPs, 1U의 *Taq* 폴리머라제, 1.5 mM $MgCl_2$ 및 10 pmole의 각 프라이머를 포함하는 20 ㎕의 반응 용액에서 실시한다. PCR 반응 조건은 95℃에서 5분 동안 초기 변성한 후, 95℃에서 30초 동안 변성하는 단계, 58-65℃에서 30초 동안 어닐링하는 단계 및 72℃에서 30초 동안 연장하는 단계를 포함하는 25-30 사이클을 수행하고 72℃에서 7분 동안 추가 연장한다. PCR 증폭은 PTC-220 DNA 엔진 다이아드 PCR 기계(MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)에서 실시한다. 증폭 산물을 2% SeaKem LE 아가로오스 젤(FMC Bioproducts, Philadelphia, PA, USA)에서 전기영동한 후 EtBr 염색으로 시각화한다. 시험물질에 의해 Prx II의 발현이 증가된 경우에는 대조군에 비해 시험물질이 처리된 세포에서 Prx II의 PCR 증폭 산물이 증가하며, Prx II의 발현이 감소된 경우에는 Prx II의 PCR 증폭 산물이 감소한다.

[315] 또한, Prx II의 발현을 단백질 수준에서 측정하기 위해, 지정된 시간에서 세포 배지를 흡입하여 제거하고 대조군 및 시험물질-처리된 세포를 20 nM 헤페스(pH 7.0), 1% 트라이톤 X-100, 150 mM NaCl, 10% 글라이세롤, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Na_3VO_4, 5 mM NaF, 1 mM AEBSF, 아프로티닌(5 ㎍/ml)

및 류펩틴(5 μg/ml)을 포함하는 추출 완충액에서 각각 용해시킨다. 서로 다른 시료의 단백질 양을 브렛포드 시약(Bio-Rad)을 이용하여 정량한다. 각 시료에서, 15 μg을 취하여 10% SDS 폴리아크릴아마이드 젤(SDS-PAGE)에 전기영동한다. 분리된 단백질을 트리스-글라이신 완충액을 이용하여 젤로부터 전기영동적으로 나이트로셀룰로오스 막으로 옮긴다. 비특이적 결합을 차단하기 위해, 막을 5% 탈지유(nonfat milk)가 첨가된 0.5% Tween-20을 포함하는 TBS(Tris-buffered saline; TBST)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨다. 상술한 블롯들을 5% 탈지유 또는 BSA가 첨가된 TBST에서 각각의 일차 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨다. TBST로 세척한 후, 블롯들을 호스 래디쉬 퍼록시데이즈-컨쥬게이션된 양 항-마우스 면역글로불린(IgG; 1:5000 희석) 또는 염소 항-토끼 IgG(1:3000 희석)과 45분 동안 상온에서 반응시킨다. Amersham ECL™ 검출 시스템(GE healthcare)을 이용하여 Prx II 단백질 밴드를 검출한다. 이후, 검출된 신호의 표준화를 위하여 면역블롯을 37℃에서 67 mM Tris(pH 6.7), 2% SDS 및 100 mM 2-머캅토에탄올을 포함하는 용액에서 60분 동안 쉐이킹을 통해 스트립된 후 튜블린 항체로 재프로빙한다. 시험물질에 의해 Prx II 단백질의 양이 증가된 경우에는 대조군에 비해 시험물질이 처리된 세포에서 Prx II 밴드의 세기가 증가하며, Prx II 단백질의 양이 감소된 경우에는 Prx II 밴드의 세기가 감소한다.

[316]

[317] 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.

청구범위

[청구항 1] Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈관신생억제용 약제학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 발현 억제제 또는 활성 억제제는 Prx II에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앱타머, 항체 및 단일사슬 가변영역 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 siRNA 는 서열번호 1 내지 4 로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제는 VEGF(vascular endothelial growth factor) 신호전달을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 VEGF는 VEGF-A, VEGF-C 또는 VEGF-E인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 VEGF 신호전달의 감소는 내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 또는 ERK(extracellular signal-regulated kinase, MAPK)의 활성화를 억제하거나, 또는 VEGF-유도된 cGMP(cyclic guanosine monophosphate)의 생성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제는 VEGF-유도된 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 RTK는 VEGFR-2의 RTK인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 산화적 불활성화는 세포막 내 지질 뗏목/포낭 미소도메인 내 H_2O_2에 의하여 발생하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 활성 억제는 VEGF 자극과 상관없이 세포 내 기저 활성산소종 수준을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성

동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증성 질환 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방을 위한 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 12] (a) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현을 분석하는 단계; 및

(b) 시험물질을 처리한 후 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현이 시험물질을 처리하지 않은 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현에 비하여 억제되면 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제제 스크리닝 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현을 세포 내에서 또는 시험관 내에서 분석하는 방법.

[청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 Prx II의 발현 분석은 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯팅, cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 인 시투 혼성화 반응, 방사능면역분석, 면역침전 또는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)방법을 이용하여 수행되는 방법.

[청구항 15] (a) 시험물질을 Prx II, 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 실험군을 준비하는 단계;

(c) Prx II를 티오레독신(Trx), 티오레독신 환원효소(TrxR), NADPH 및 완충용액과 혼합하여 반응시키는 단계;

(d) 상기 (c)단계의 반응물을 H_2O_2와 혼합하여 반응시켜 대조군을 준비하는 단계;

(e) 상기 실험군과 대조군의 흡광도를 각각 측정하고, 측정된 흡광도를 비교하는 단계; 및

(f) 실험군의 흡광도가 대조군의 흡광도보다 감소하면 상기 시험물질을 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제제 스크리닝 방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 티오레독신 및 티오레독신 환원효소는 효모에서 유래된 것인 방법.

[청구항 17] 제15항에 있어서, Prx II 대신 Prx I, III, IV 및 V로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상에 대하여 (a) 내지 (f) 단계를 추가로 수행하여, Prx I, III, IV 및 V로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 실험군의 흡광도가 대조군의 흡광도와 차이가

없는 경우, 상기 시험물질을 혈관신생 억제제로 판단하는 방법.

[청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 혈관신생 억제제는 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증성 질환 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 19] Prx II 단백질 및 반응완충용액을 포함하는 혈관신생억제제 스크리닝 키트.

[청구항 20] 제19항에 있어서, 티오레독신, 티오레독신 환원효소, NADPH 및 H_2O_2를 더 포함하는 혈관신생억제제 스크리닝 키트.

[청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 티오레독신 및 티오레독신 환원효소는 효모에서 유래된 것인 혈관신생억제제 스크리닝 키트.

[청구항 22] 제20항에 있어서, Prx I, III, IV 및 V로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 대조군으로서 더 포함하는 혈관신생억제제 스크리닝 키트.

[청구항 23] Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제방법.

[청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 발현 억제제 또는 활성 억제제는 Prx II에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앱타머, 항체 및 단일사슬 가변영역 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

[청구항 25] 제24항에 있어서, 상기 siRNA 는 서열번호 1 내지 4 로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

[청구항 26] 제23항에 있어서, 상기 방법은 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증성 질환 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방을 위한 방법인 것을

특징으로 하는 방법.

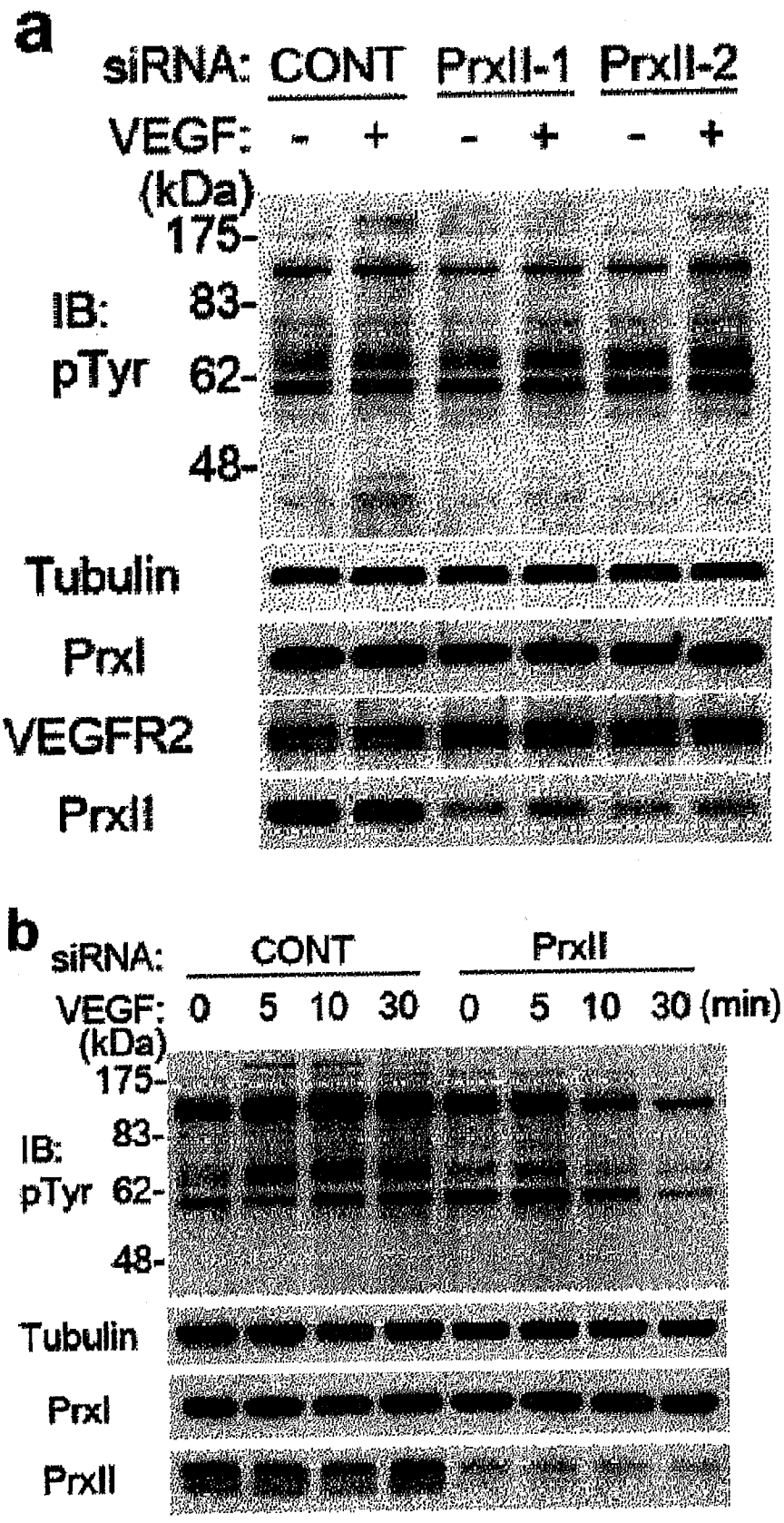
[청구항 27] 혈관신생 억제용 의약의 제조에 있어서, Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 활성 억제제의 용도.

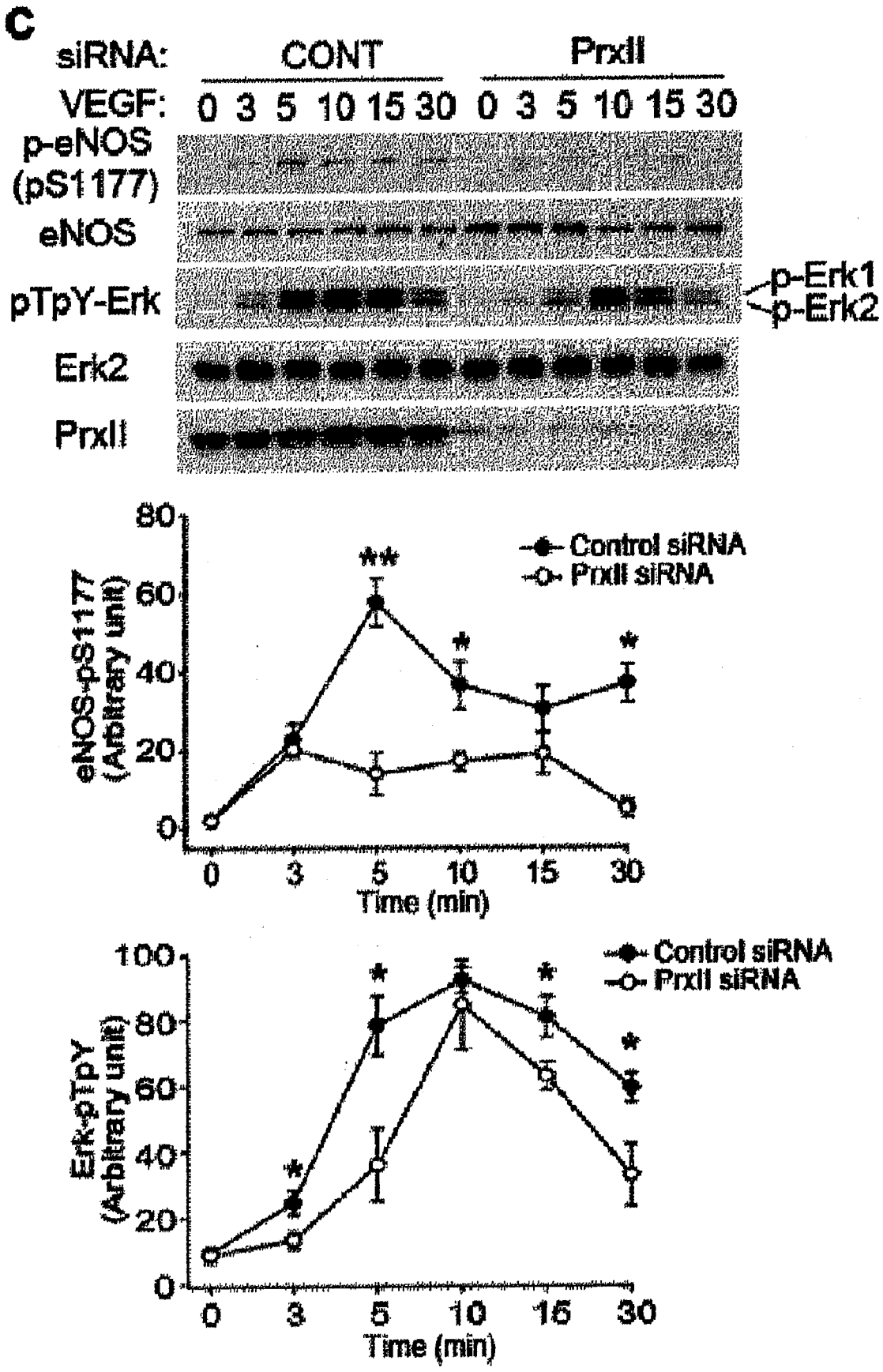
[청구항 28] 제27항에 있어서, 상기 발현 억제제 또는 활성 억제제는 Prx II에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 앱타머, 항체 및 단일사슬 가변영역 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 용도.

[청구항 29] 제28항에 있어서, 상기 siRNA 는 서열번호 1 내지 4 로 구성된 군으로부터 선택된 것인 용도.

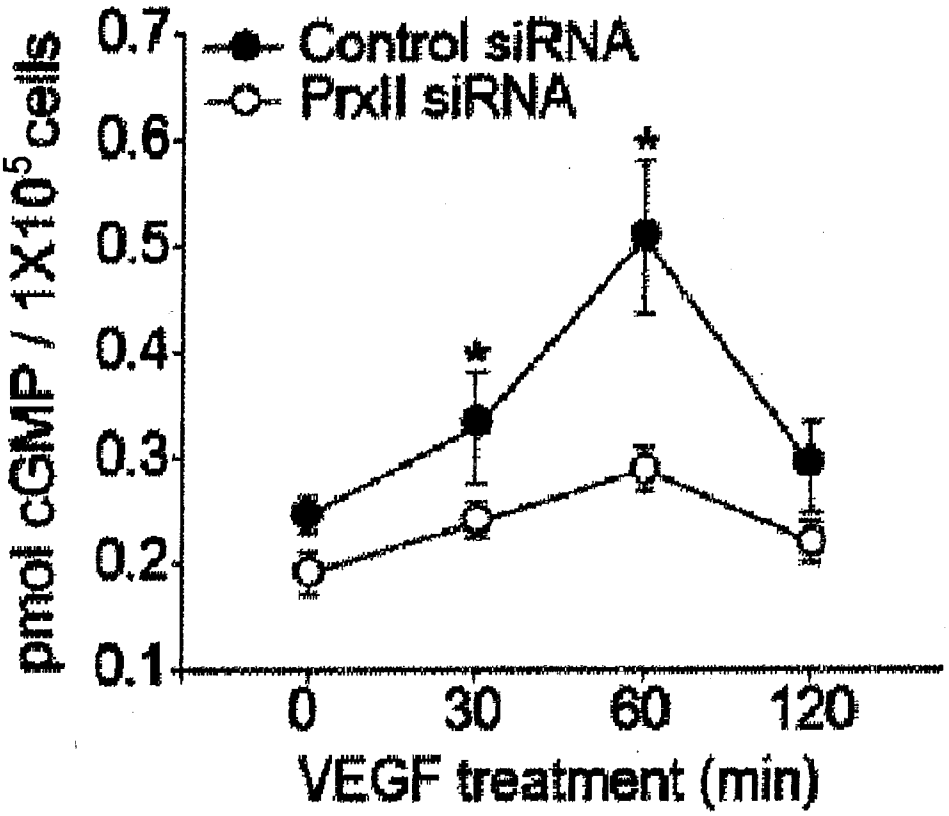
[청구항 30] 제27항에 있어서, 상기 용도는 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증성 질환 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방 용도인 것을 특징으로 하는 용도.

[Fig. 1]

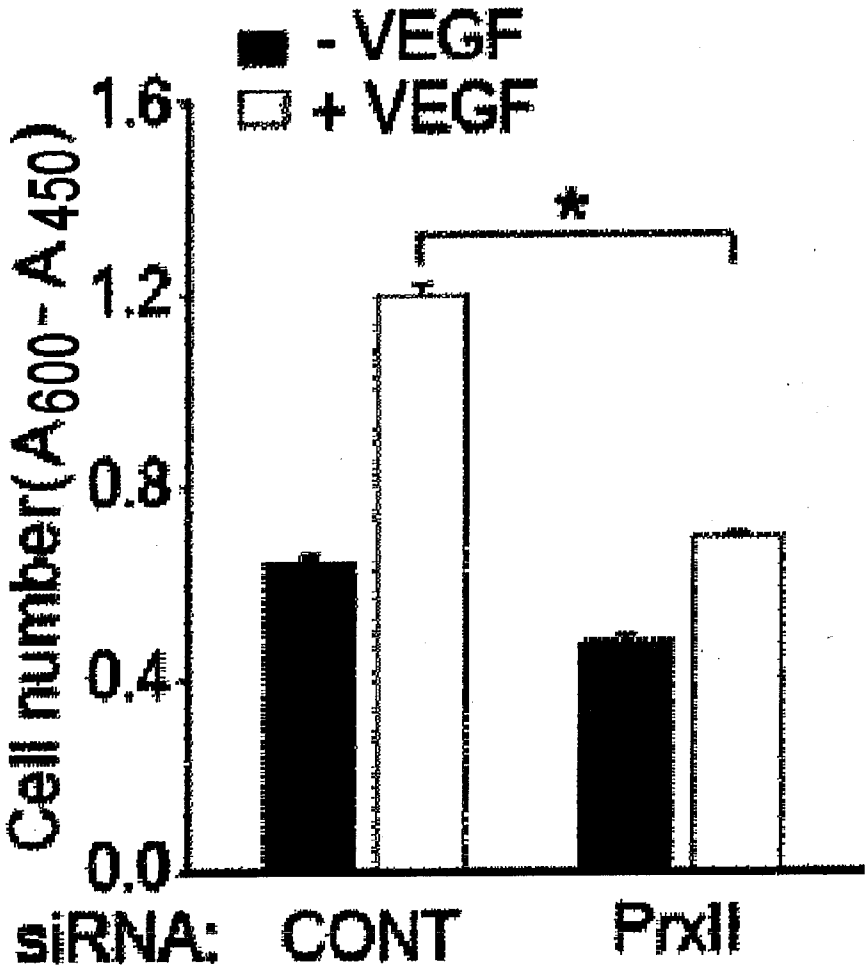

a
siRNA: CONT PrxII-1 PrxII-2
VEGF: - + - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxI
VEGFR2
PrxII
b
siRNA: CONT PrxII
VEGF: 0 5 10 30 0 5 10 30 (min)
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxI
PrxII

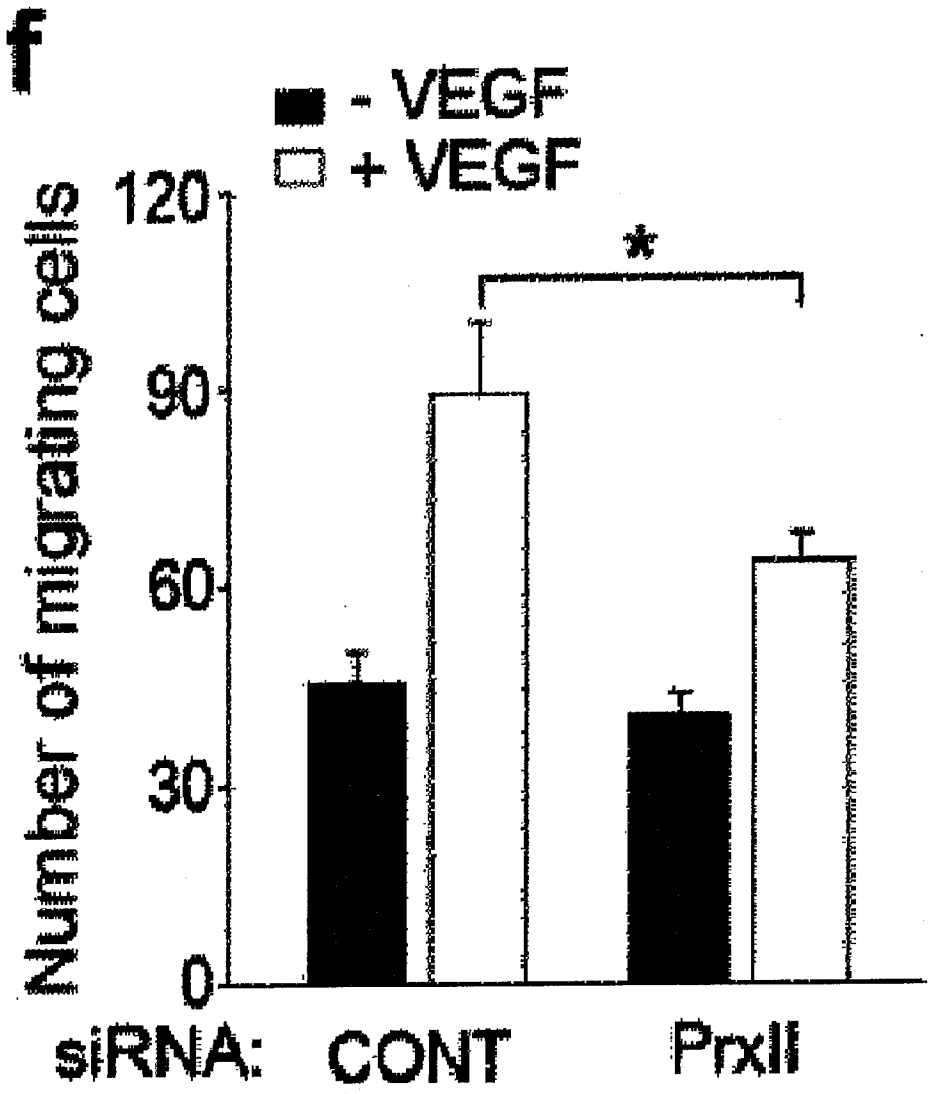

c
siRNA:
CONT
PrxII
VEGF:
0 3 5 10 15 30 0 3 5 10 15 30
p-eNOS (pS1177)
eNOS
pTpY-Erk
p-Erk1
p-Erk2
Erk2
PrxII
eNOS-pS1177 (Arbitrary unit)
Control siRNA
PrxII siRNA
Time (min)
Erk-pTpY (Arbitrary unit)
Control siRNA
PrxII siRNA
Time (min)

d

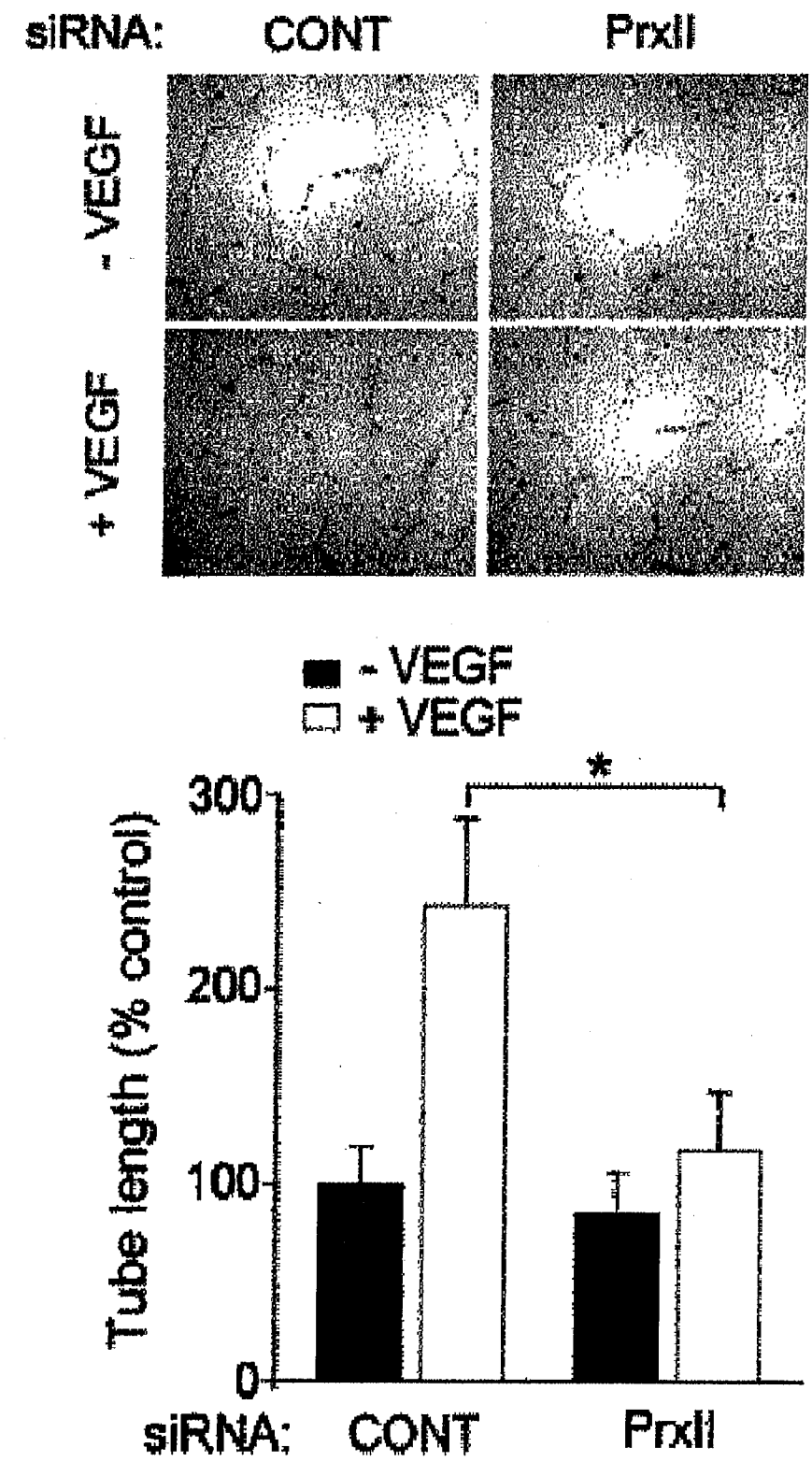

Control siRNA
PrxII siRNA
pmol cGMP / 1X10^5 cells
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
30
60
120
VEGF treatment (min)
*
*

e

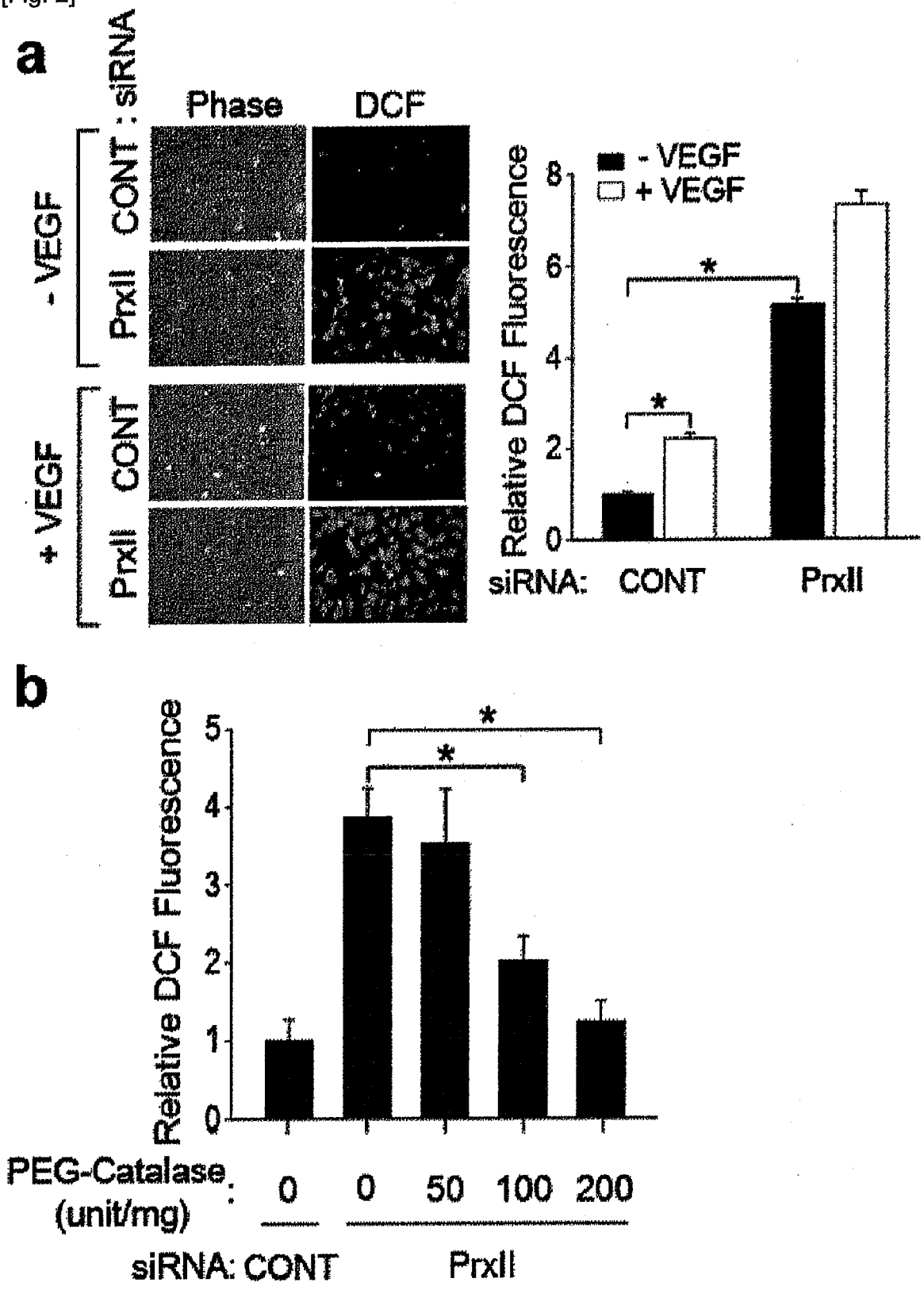

- VEGF
+ VEGF
Cell number(A_{600} - A_{450})
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
*
siRNA: CONT
Prxll

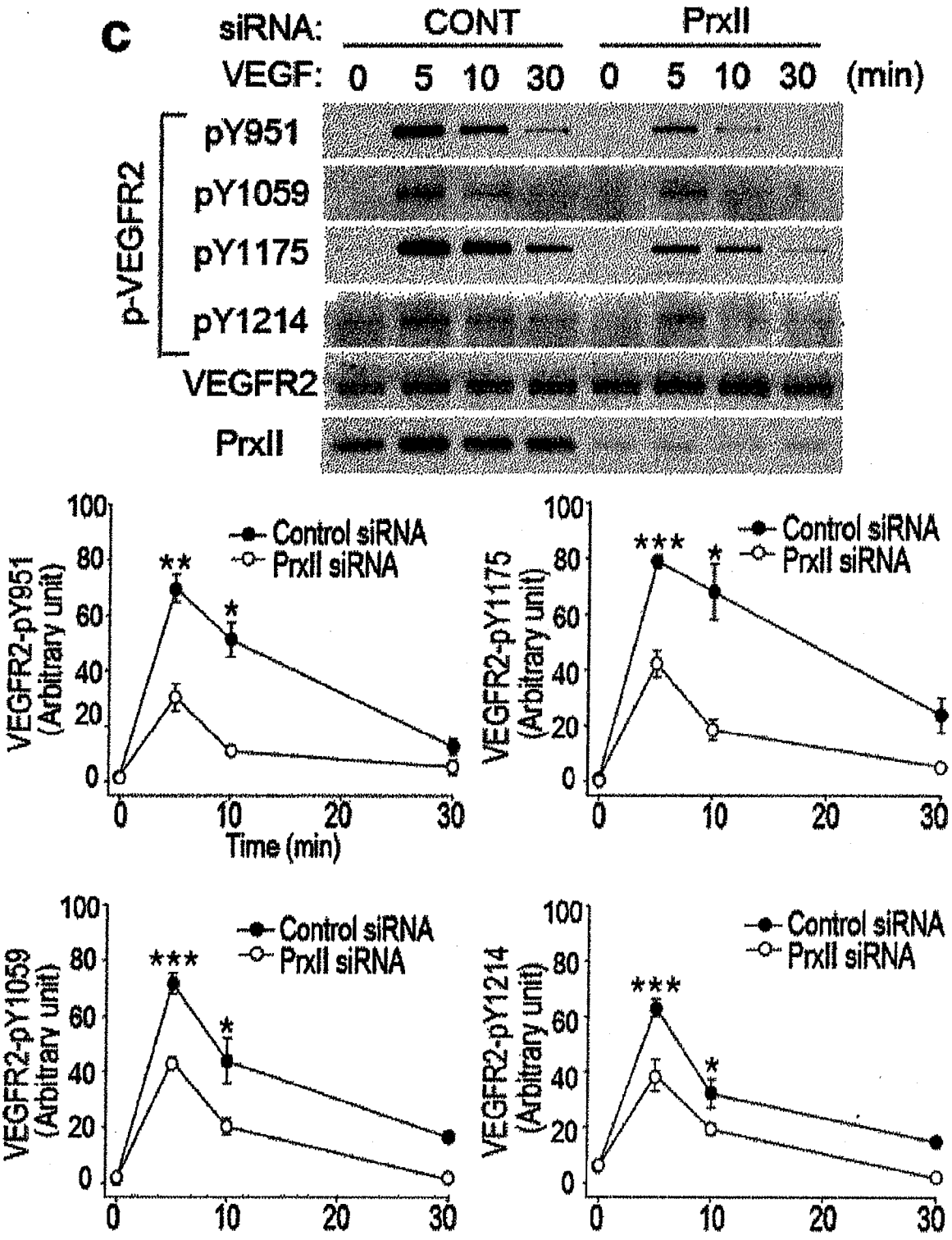

f
- VEGF
+ VEGF
Number of migrating cells
120
90
60
30
0
*
siRNA:
CONT
PrxII

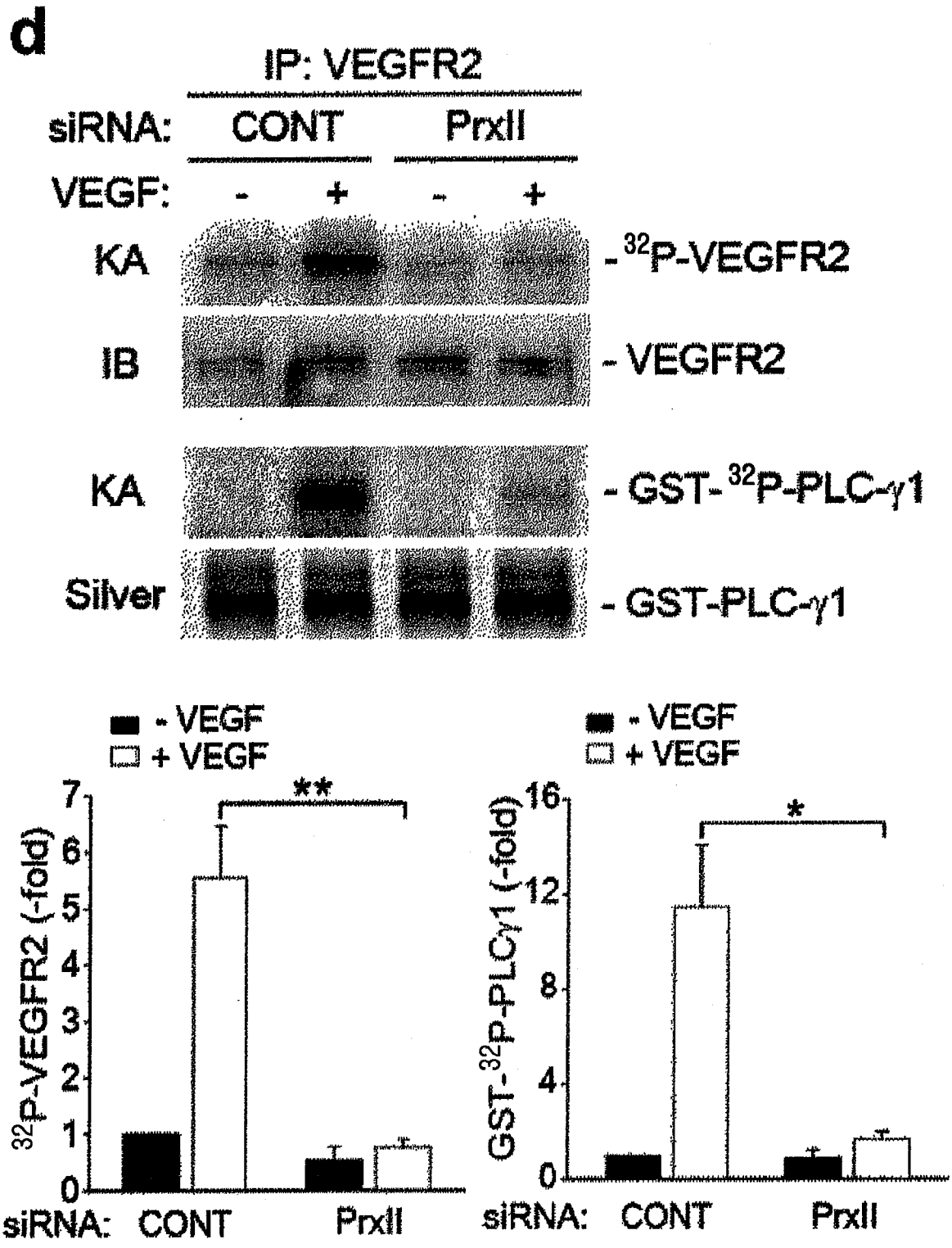
g


siRNA: CONT PrxII
- VEGF
+ VEGF
- VEGF
+ VEGF
*
Tube length (% control)
300
200
100
0
siRNA: CONT PrxII

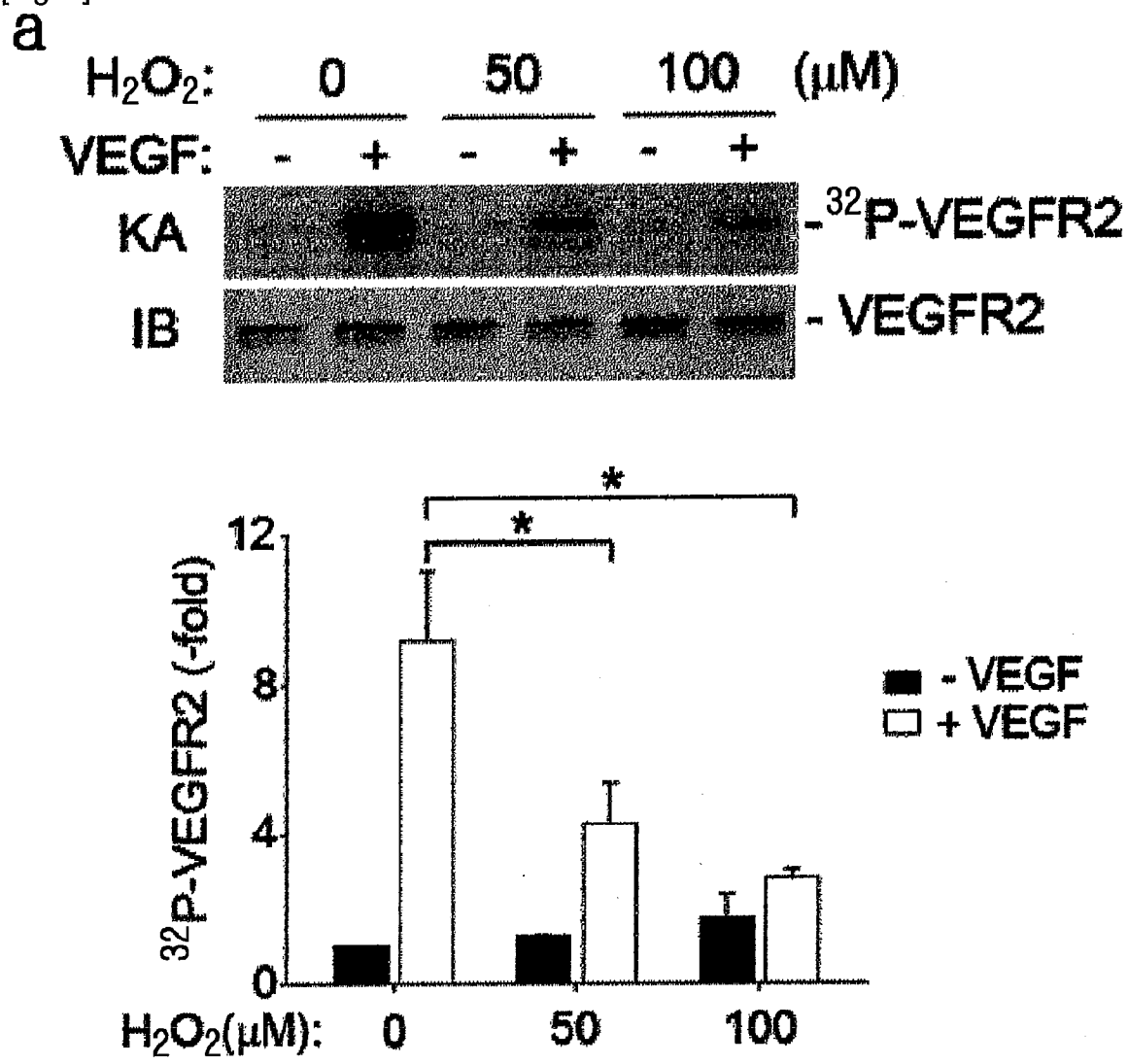
[Fig. 2]

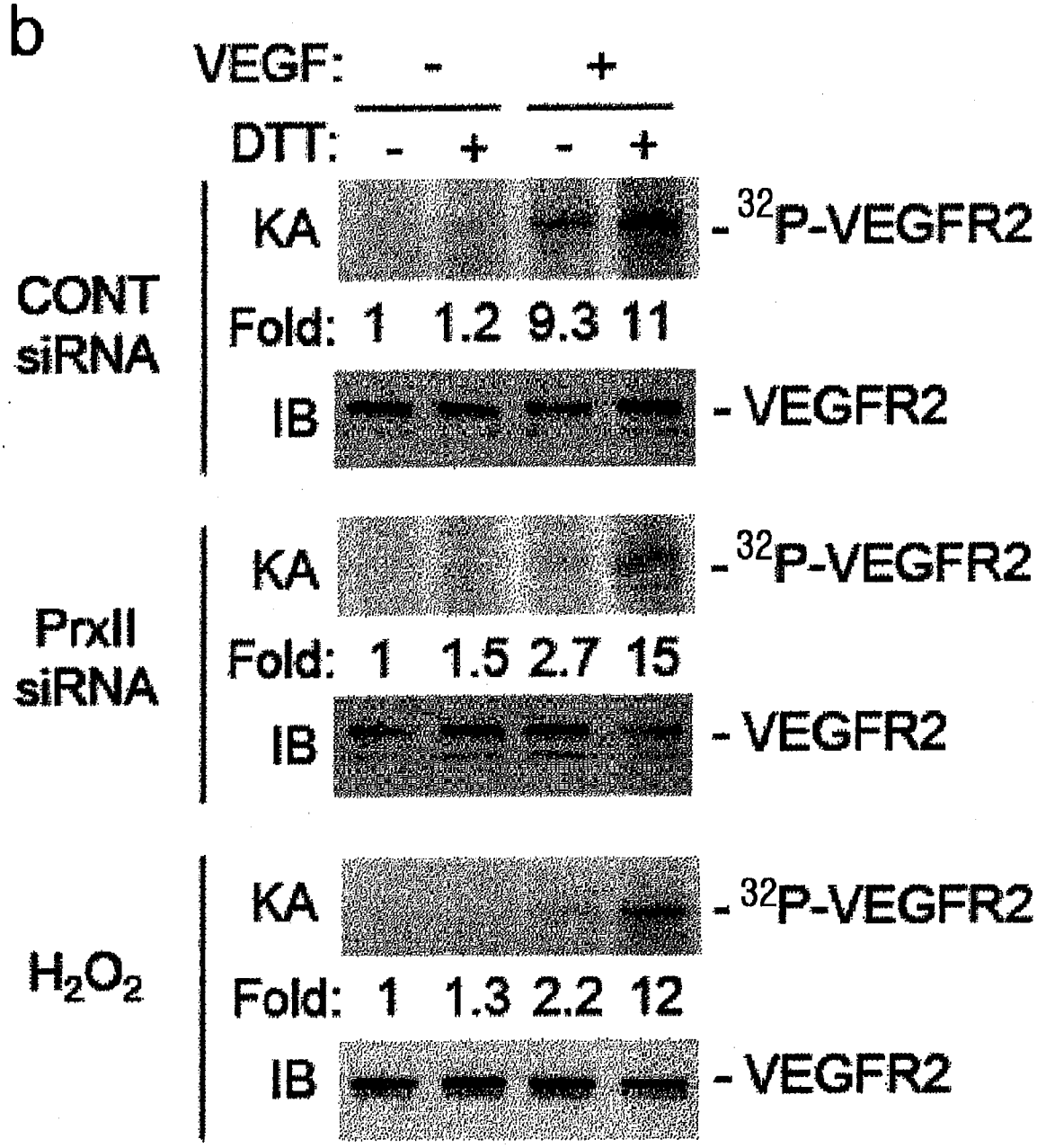

a
siRNA : CONT
PrxII
- VEGF
+ VEGF
Phase
DCF
Relative DCF Fluorescence
- VEGF
+ VEGF
siRNA: CONT
PrxII
b
Relative DCF Fluorescence
PEG-Catalase (unit/mg) : 0 0 50 100 200
siRNA: CONT
PrxII

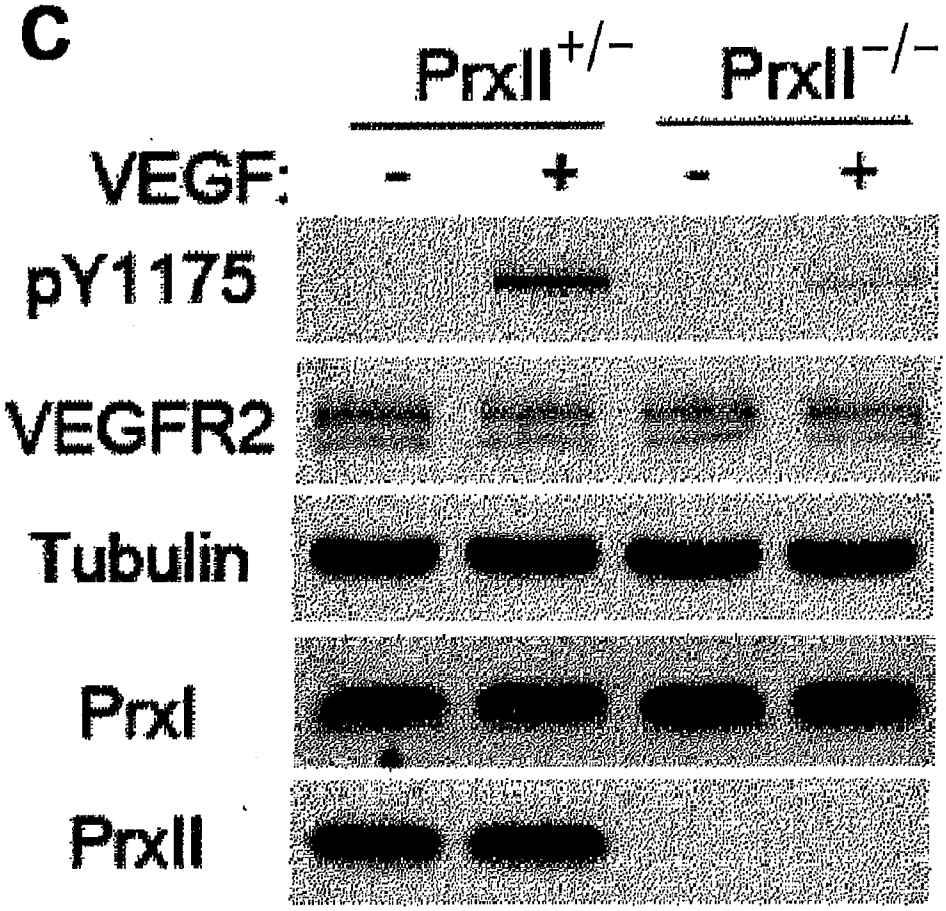

C
siRNA: CONT PrxII
VEGF: 0 5 10 30 0 5 10 30 (min)
p-VEGFR2
pY951
pY1059
pY1175
pY1214
VEGFR2
PrxII
Control siRNA
PrxII siRNA
VEGFR2-pY951 (Arbitrary unit)
VEGFR2-pY1175 (Arbitrary unit)
VEGFR2-pY1059 (Arbitrary unit)
VEGFR2-pY1214 (Arbitrary unit)
Time (min)

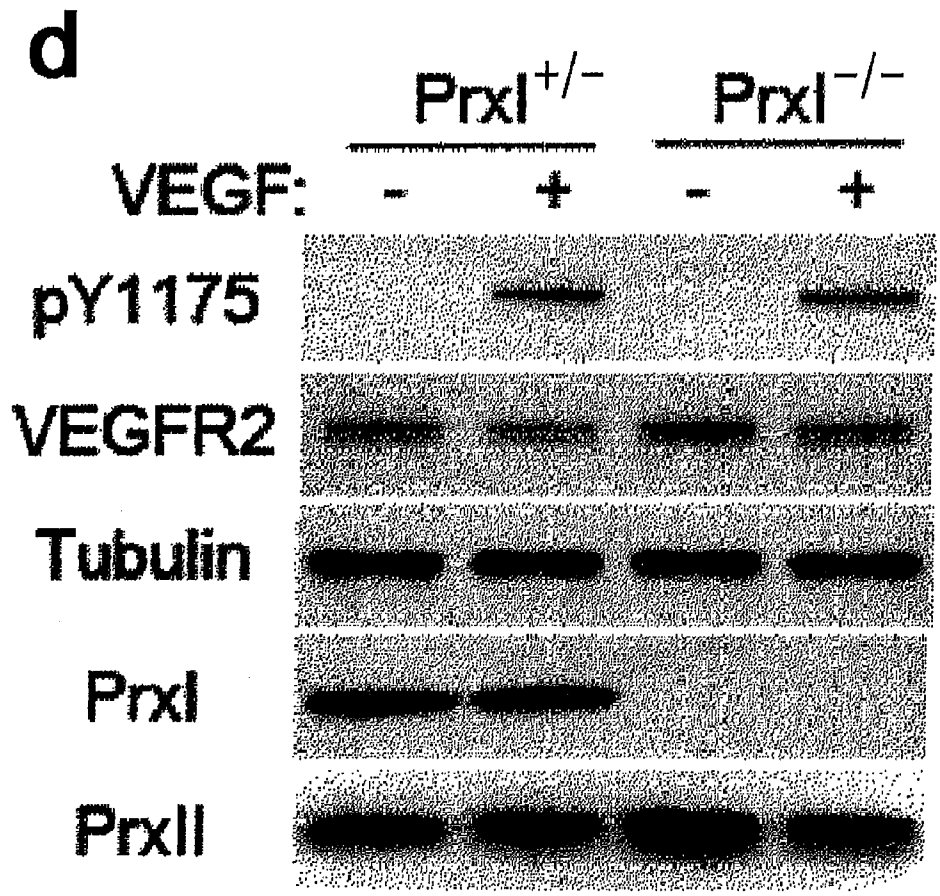

d
IP: VEGFR2
siRNA: CONT PrxII
VEGF: - + - +
KA
- 32P-VEGFR2
IB
- VEGFR2
KA
- GST-32P-PLC-γ1
Silver
- GST-PLC-γ1
- VEGF
+ VEGF
32P-VEGFR2 (-fold)
0 1 2 3 4 5 6 7
**
siRNA: CONT PrxII
- VEGF
+ VEGF
GST-32P-PLCγ1 (-fold)
0 4 8 12 16
*
siRNA: CONT PrxII

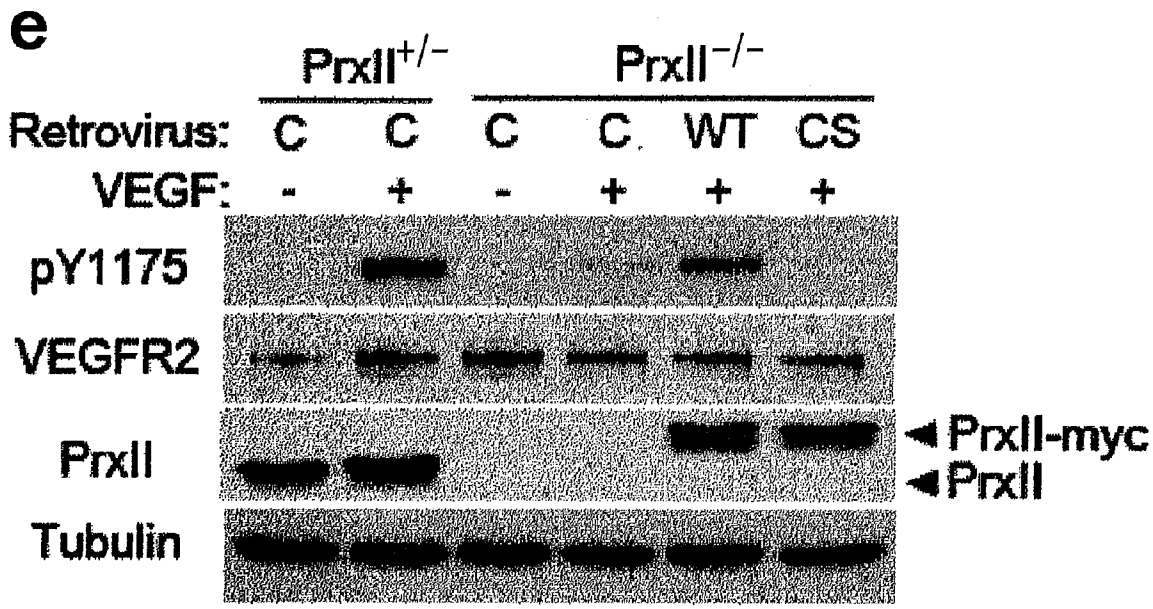
[Fig. 3]


a
H2O2: 0 50 100 (μM)
VEGF: - + - + - +
KA
IB
-32P-VEGFR2
- VEGFR2
32P-VEGFR2 (-fold)
12
8
4
0
*
*
- VEGF
+ VEGF
H2O2(μM): 0 50 100

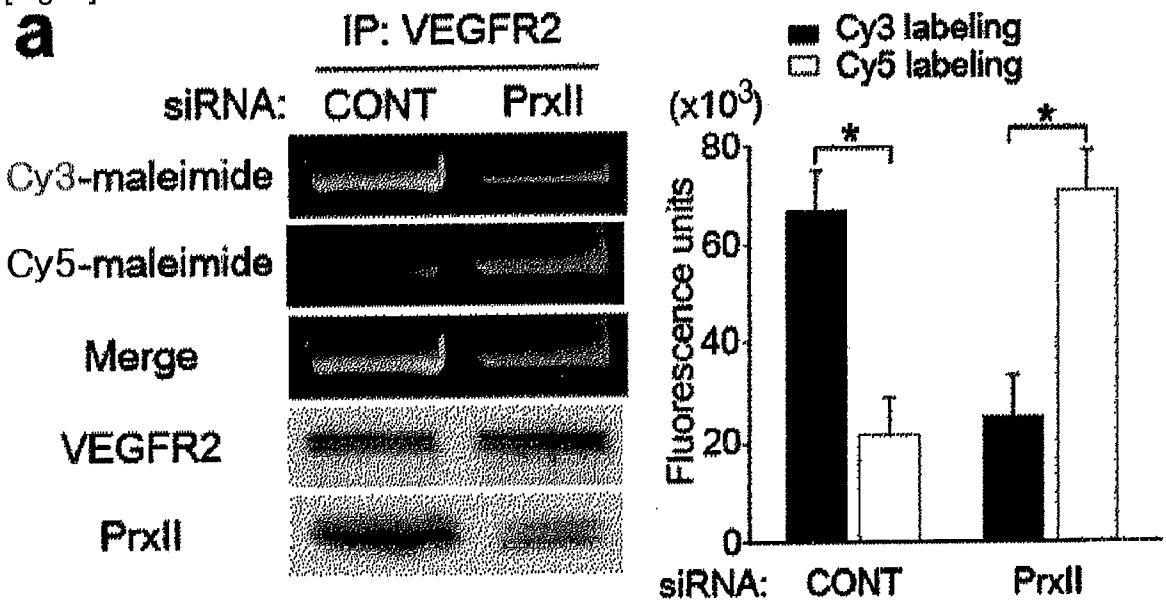

b
VEGF: - +
DTT: - + - +
CONT siRNA
KA
- 32P-VEGFR2
Fold: 1 1.2 9.3 11
IB
- VEGFR2
PrxII siRNA
KA
- 32P-VEGFR2
Fold: 1 1.5 2.7 15
IB
- VEGFR2
H2O2
KA
- 32P-VEGFR2
Fold: 1 1.3 2.2 12
IB
- VEGFR2

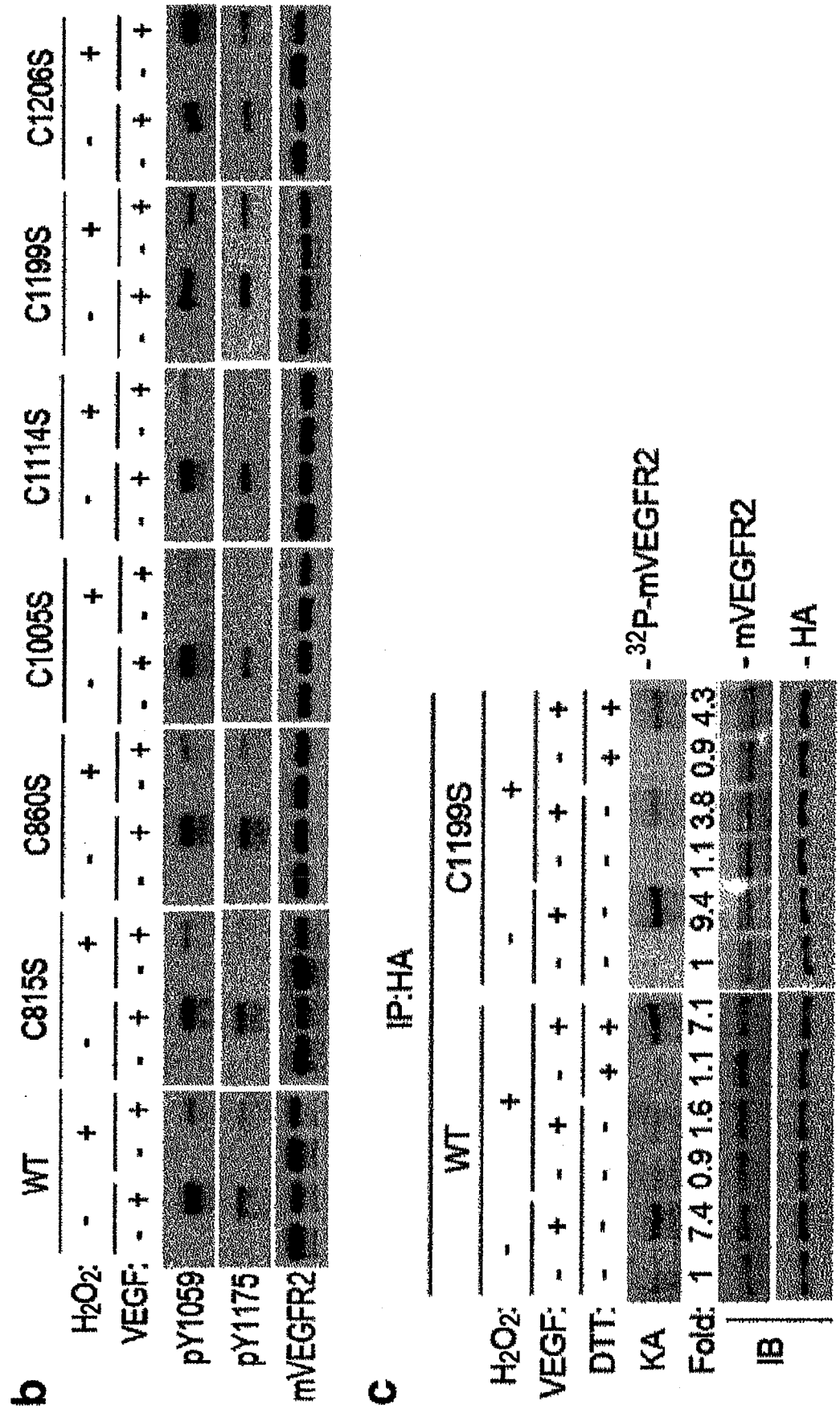

C
PrxII+/−
PrxII−/−
VEGF:
-
+
-
+
pY1175
VEGFR2
Tubulin
PrxI
PrxII

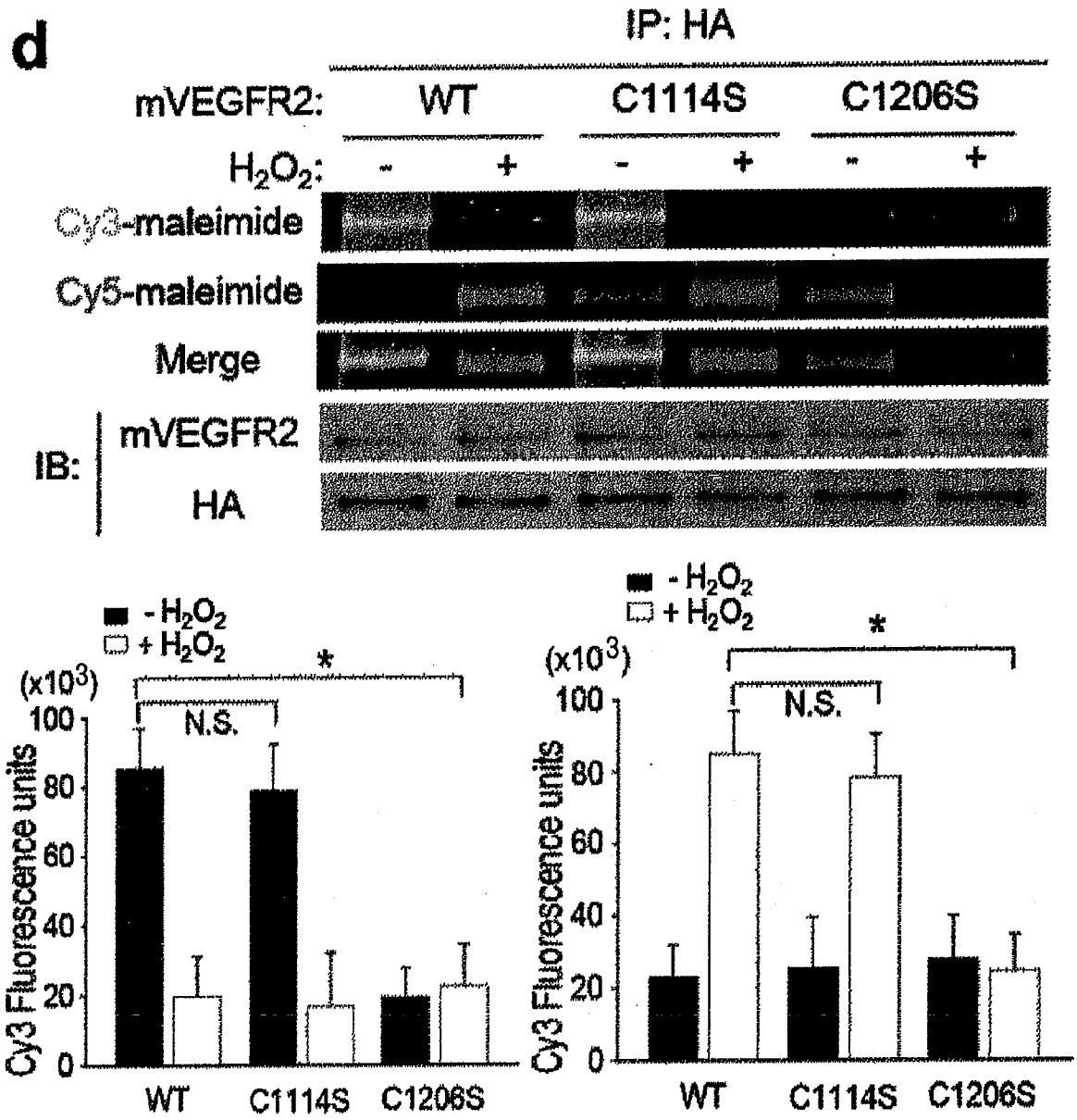

d
Prxl+/−
Prxl−/−
VEGF: - + - +
pY1175
VEGFR2
Tubulin
Prxl
PrxII

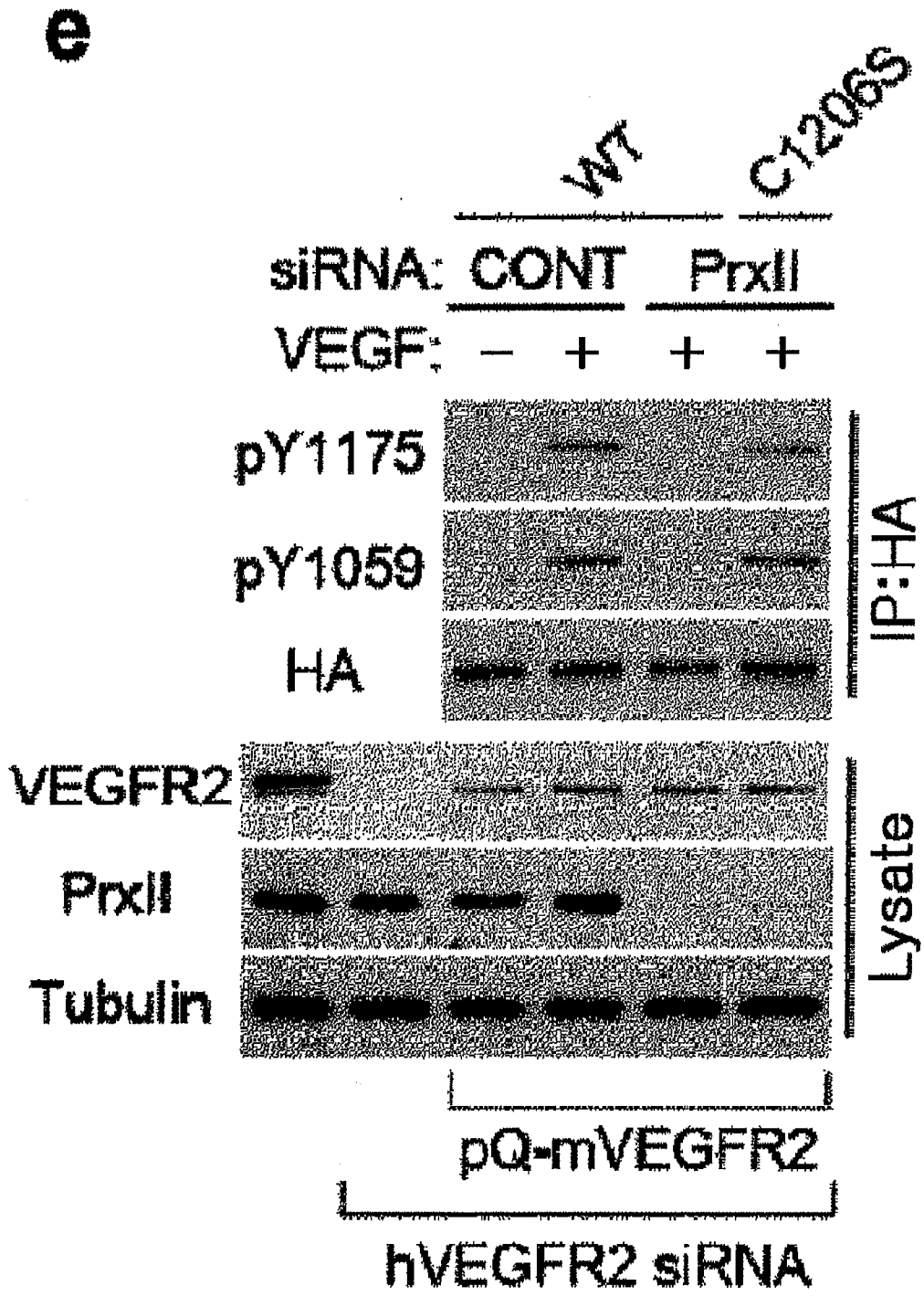

e
PrxII+/−
PrxII−/−
Retrovirus: C C C C WT CS
VEGF: - + - + + +
pY1175
VEGFR2
PrxII
Tubulin
◀PrxII-myc
◀PrxII

[Fig. 4]

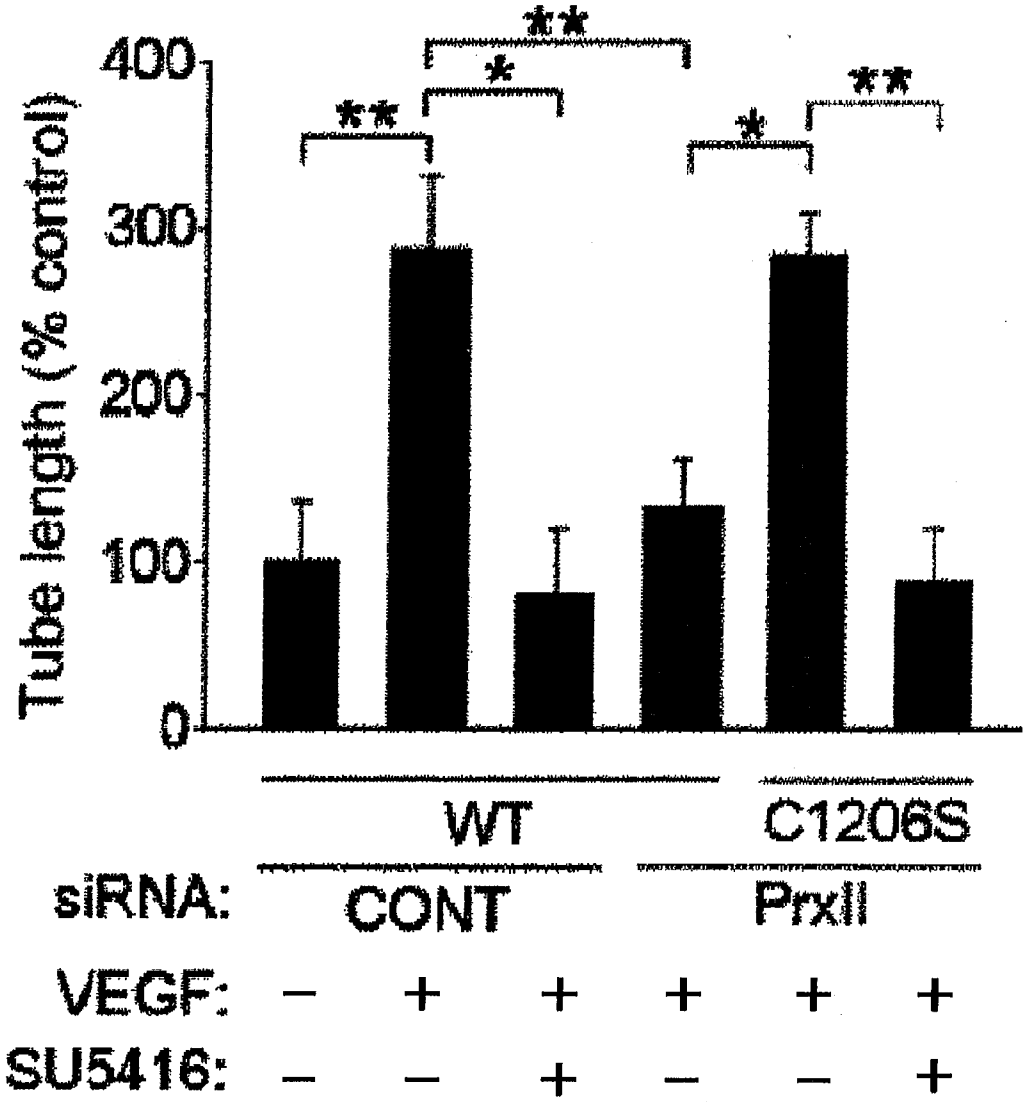

a
IP: VEGFR2
siRNA: CONT PrxII
Cy3-maleimide
Cy5-maleimide
Merge
VEGFR2
PrxII
Cy3 labeling
Cy5 labeling
(x10^3)
Fluorescence units
80
60
40
20
0
*
*
siRNA: CONT PrxII


b
WT
C815S
C860S
C1005S
C1114S
C1199S
C1206S
H2O2:
VEGF:
pY1059
pY1175
mVEGFR2
c
IP:HA
WT
C1199S
H2O2:
VEGF:
DTT:
KA
Fold: 1 7.4 0.9 1.6 1.1 7.1 1 9.4 1.1 3.8 0.9 4.3
IB
-32P-mVEGFR2
- mVEGFR2
- HA

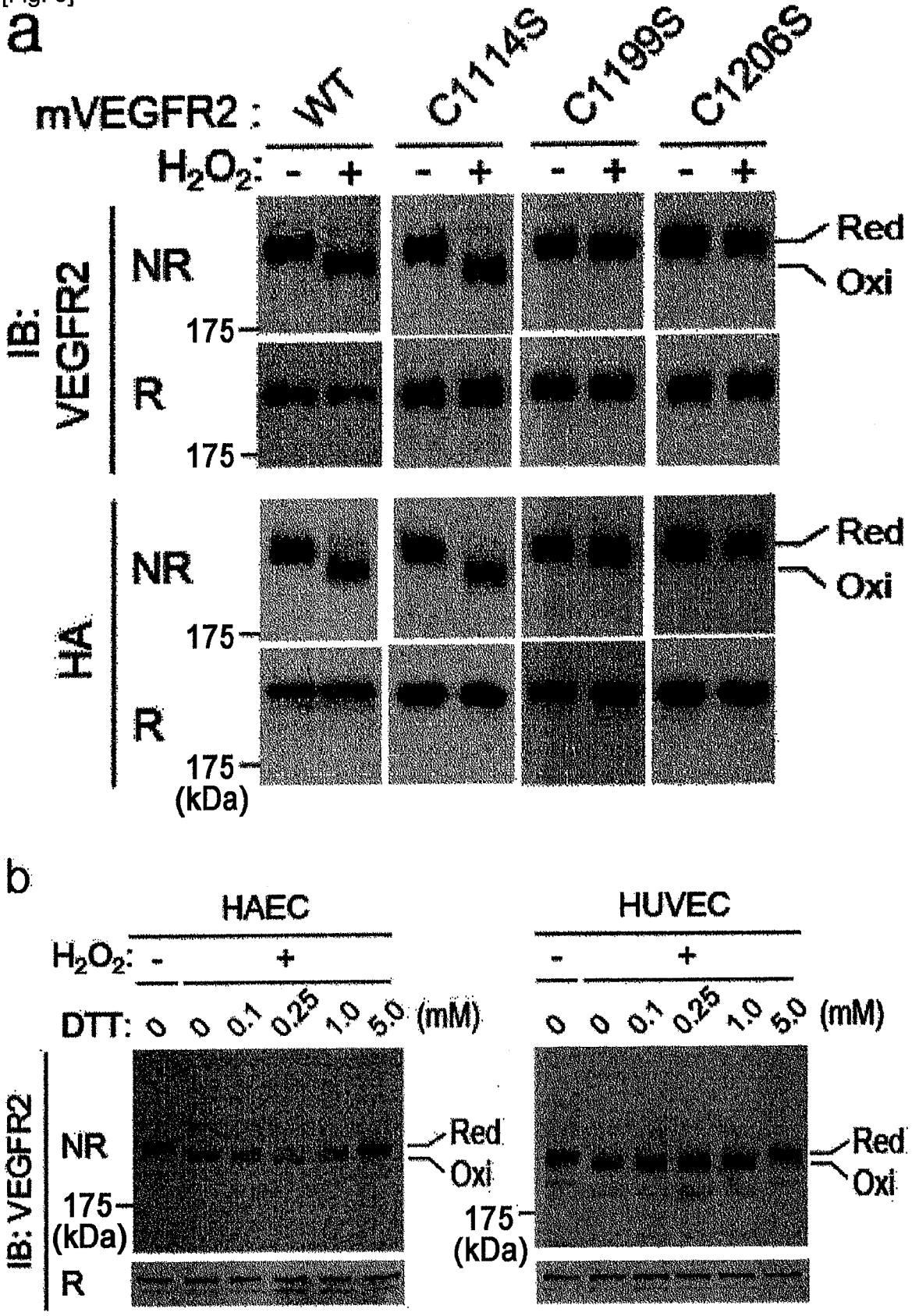

d
IP: HA
mVEGFR2: WT C1114S C1206S
H2O2: - + - + - +
Cy3-maleimide
Cy5-maleimide
Merge
IB: mVEGFR2
HA
- H2O2
+ H2O2
(x10^3)
Cy3 Fluorescence units
N.S.
*
WT
C1114S
C1206S


e
WT
C1206S
siRNA: CONT PrxII
VEGF: − + + +
pY1175
pY1059
HA
IP:HA
VEGFR2
PrxII
Tubulin
Lysate
pQ-mVEGFR2
hVEGFR2 siRNA

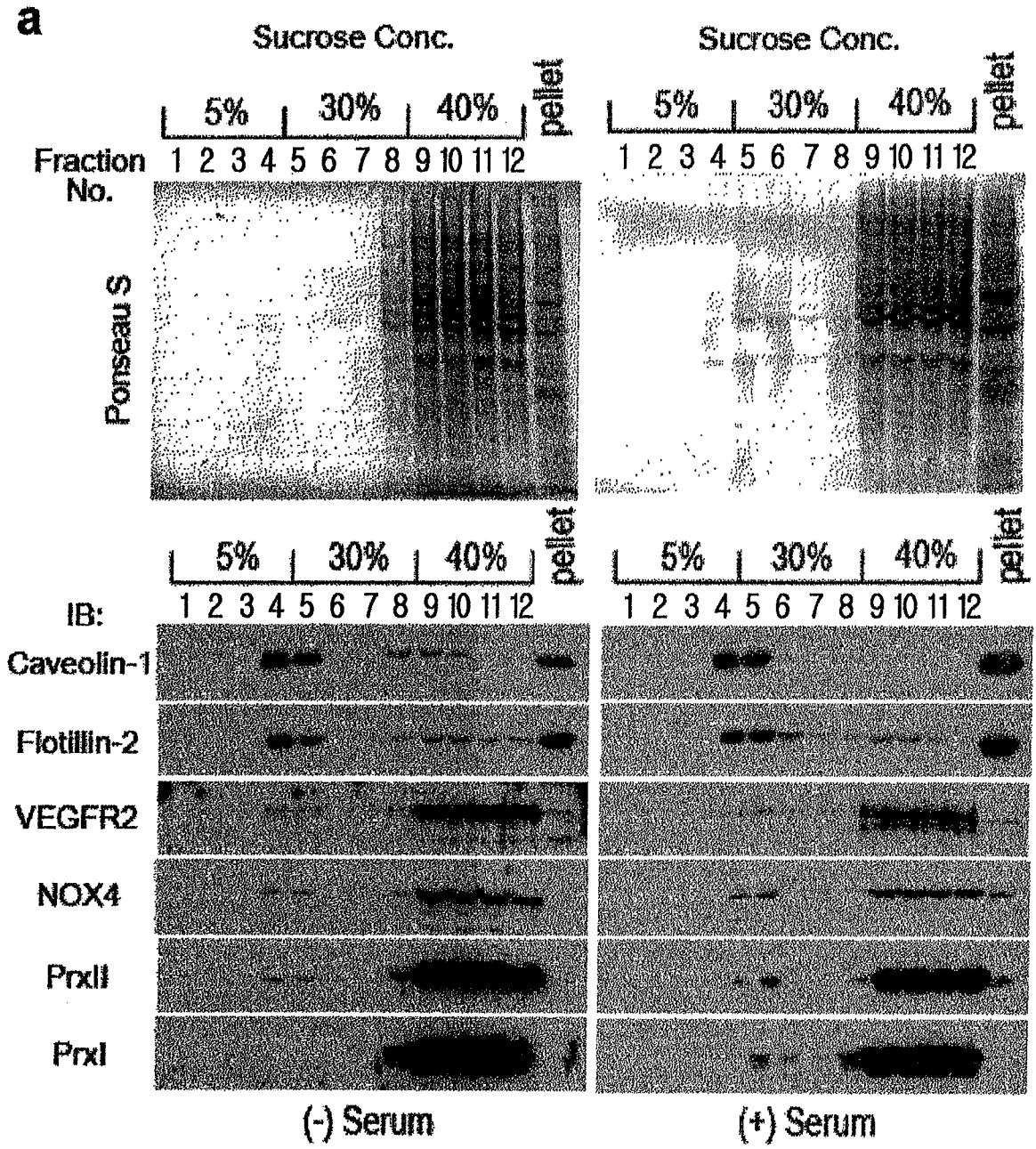
f


Tube length (% control)
400
300
200
100
0
**
*
**
*
**
WT
C1206S
siRNA:
CONT
Prxll
VEGF: – + + + + +
SU5416: – – + – – +

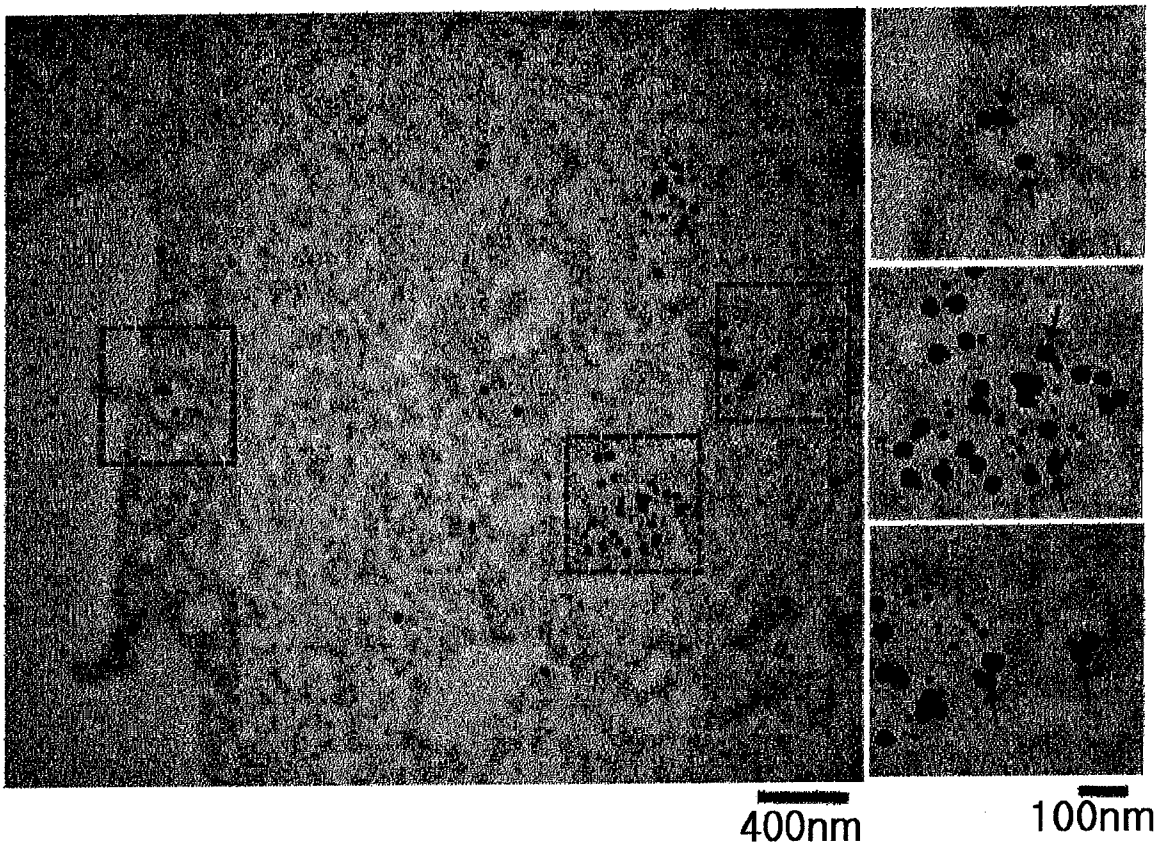
[Fig. 5]


a
mVEGFR2 : WT C1114S C1199S C1206S
H2O2: - + - + - + - +
IB: VEGFR2
NR
175
R
175
Red
Oxi
HA
NR
175
R
175
(kDa)
Red
Oxi
b
HAEC
HUVEC
H2O2: - + - +
DTT: 0 0 0.1 0.25 1.0 5.0 (mM)
0 0 0.1 0.25 1.0 5.0 (mM)
IB: VEGFR2
NR
175
(kDa)
R
Red
Oxi
175
(kDa)
Red
Oxi

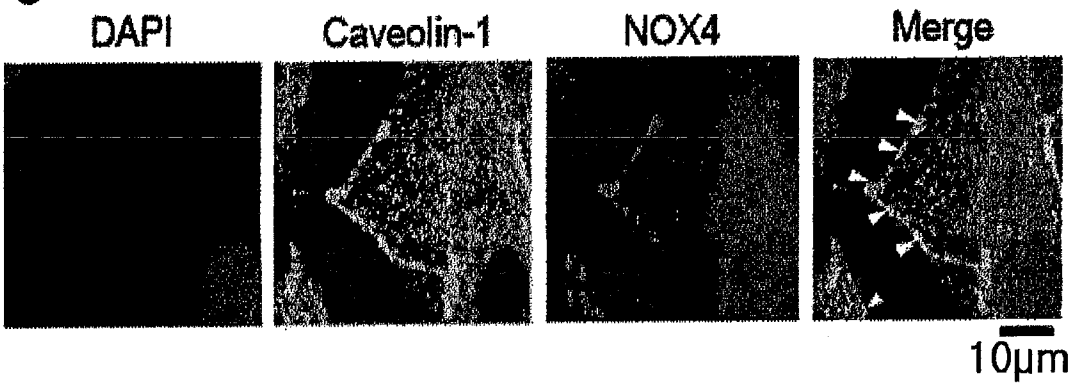
[Fig. 6]


a
Sucrose Conc.
Sucrose Conc.
5%
30%
40%
pellet
Fraction No.
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Ponseau S
IB:
Caveolin-1
Flotillin-2
VEGFR2
NOX4
PrxII
PrxI
(-) Serum
(+) Serum

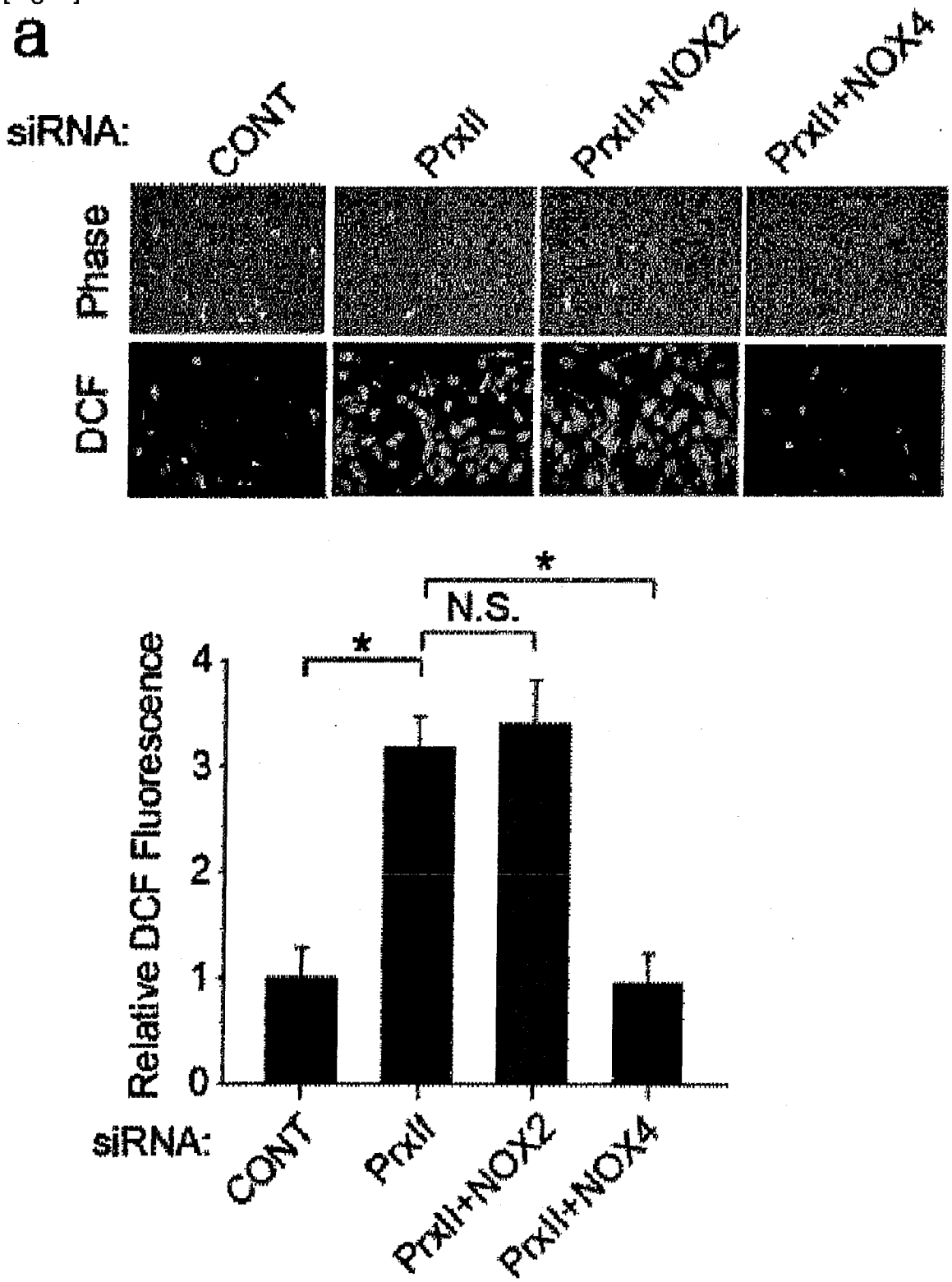
b



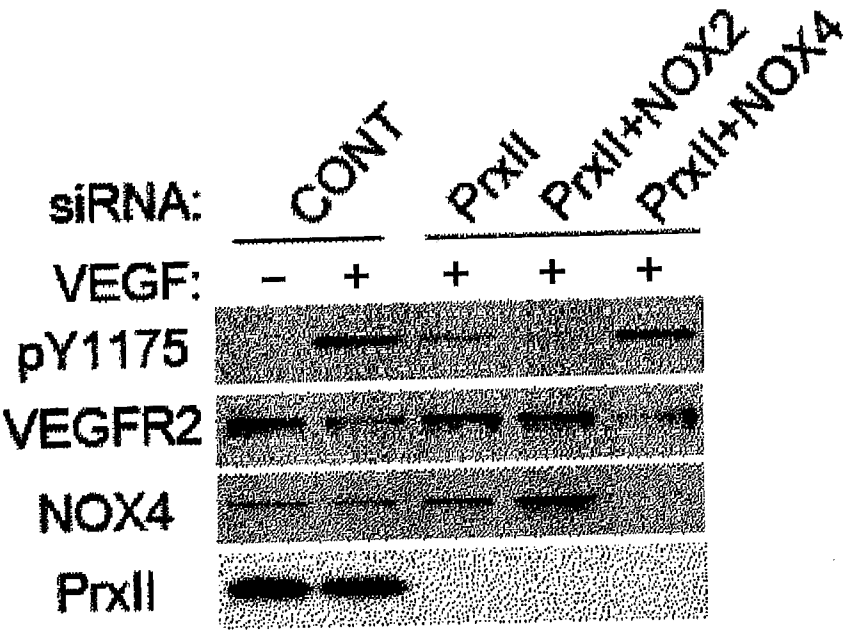
c



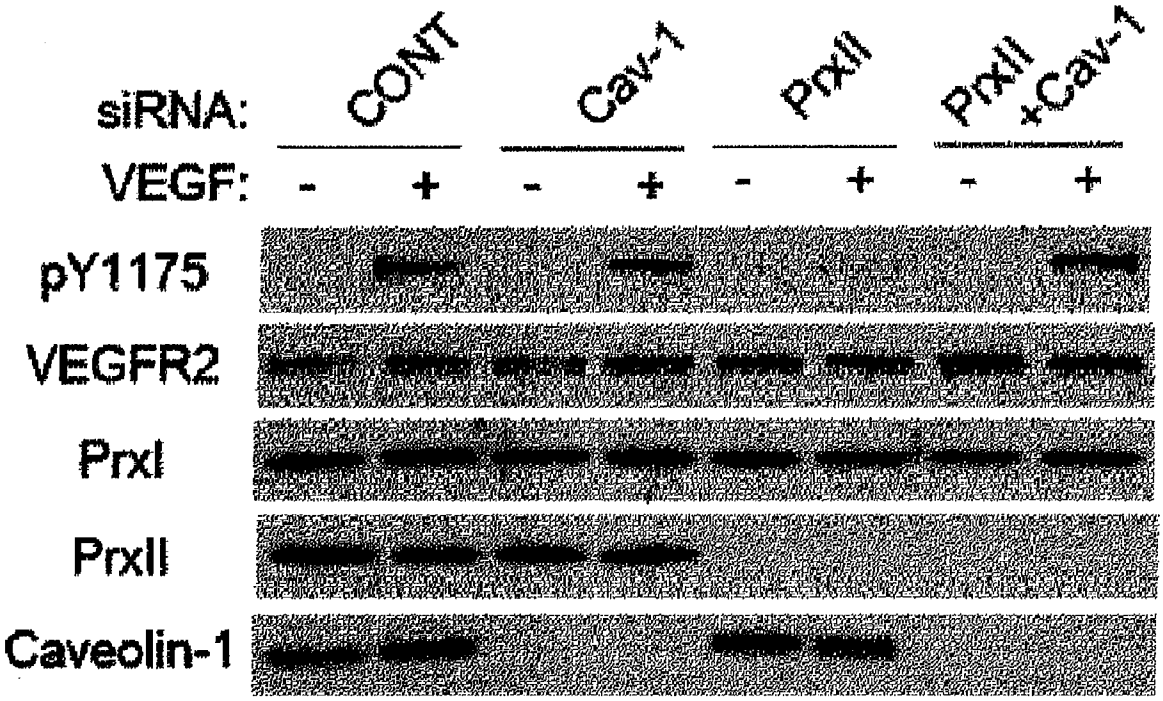
[Fig. 7]

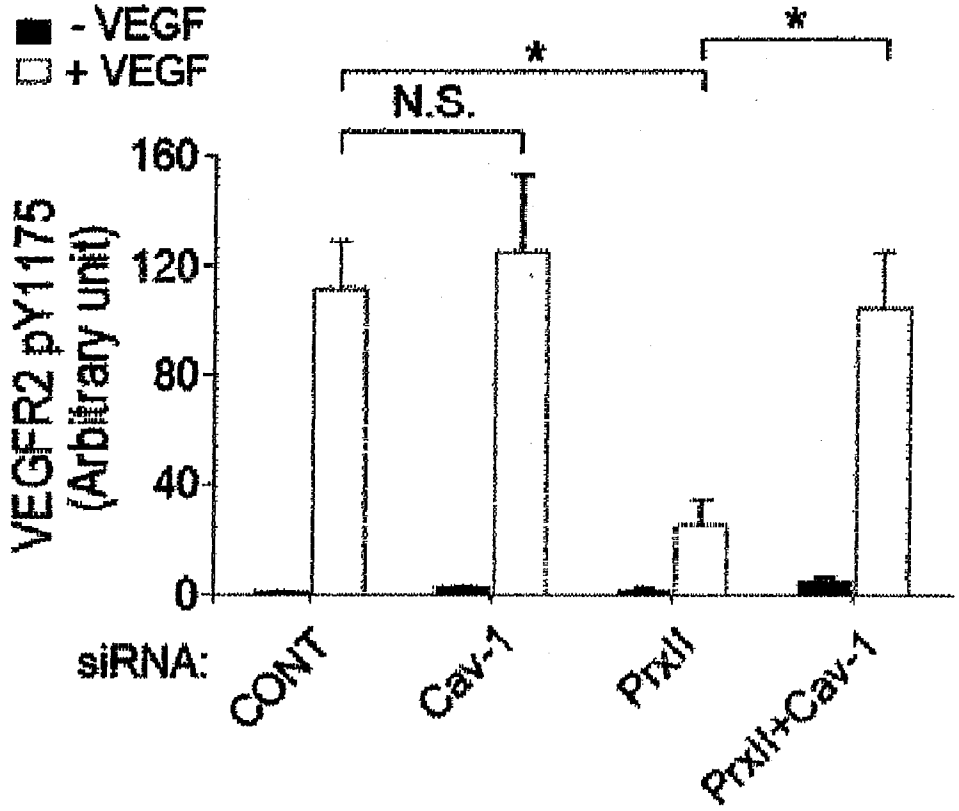

a
siRNA:
CONT
Prxll
Prxll+NOX2
Prxll+NOX4
Phase
DCF
*
N.S.
*
Relative DCF Fluorescence
0
1
2
3
4
siRNA:
CONT
Prxll
Prxll+NOX2
Prxll+NOX4

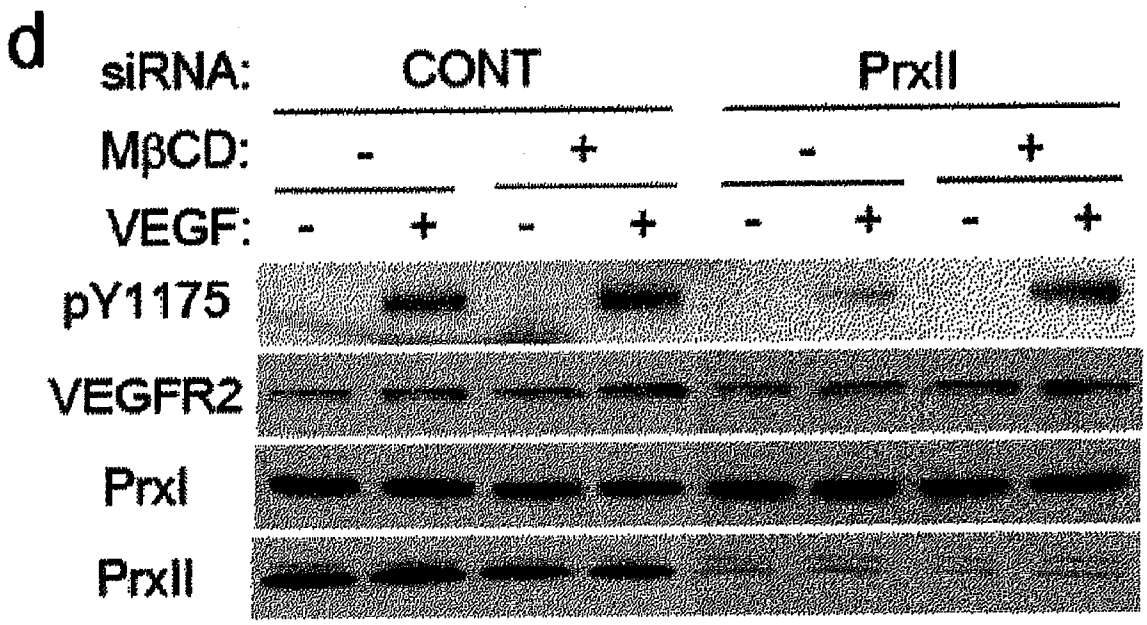
b


siRNA:
CONT
PrxII
PrxII+NOX2
PrxII+NOX4
VEGF:
– + + + +
pY1175
VEGFR2
NOX4
PrxII

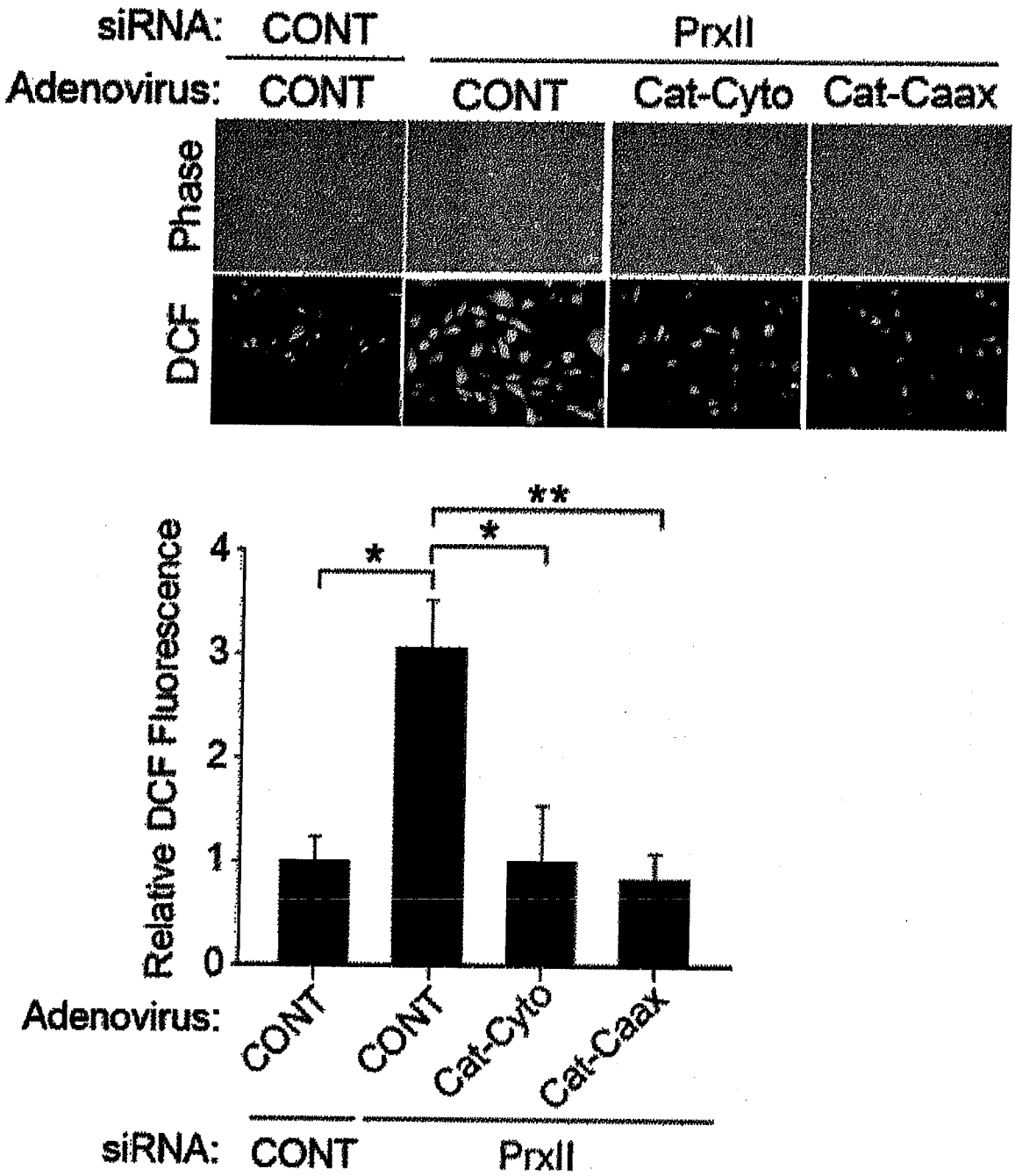
C


siRNA:
CONT
Cav-1
PrxII
PrxII +Cav-1
VEGF: - + - + - + - +
pY1175
VEGFR2
PrxI
PrxII
Caveolin-1

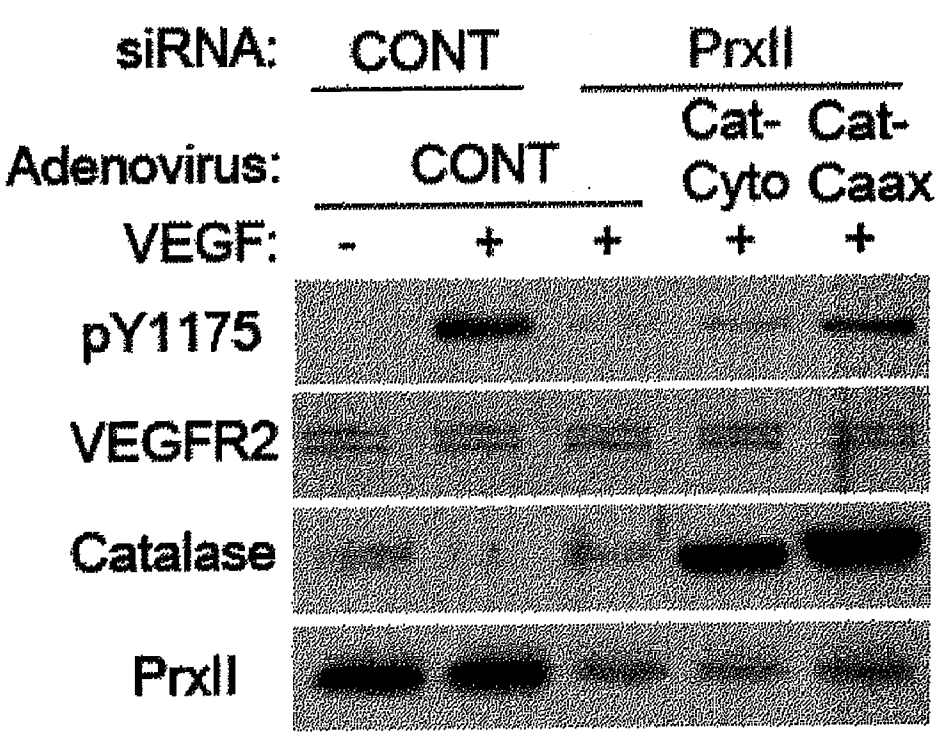

- VEGF
+ VEGF
*
*
N.S.
VEGFR2 pY1175 (Arbitrary unit)
160
120
80
40
0
siRNA:
CONT
Cav-1
PrxII
PrxII+Cav-1


d
siRNA:
CONT
PrxII
MβCD:
-
+
-
+
VEGF:
- + - + - + - +
pY1175
VEGFR2
PrxI
PrxII

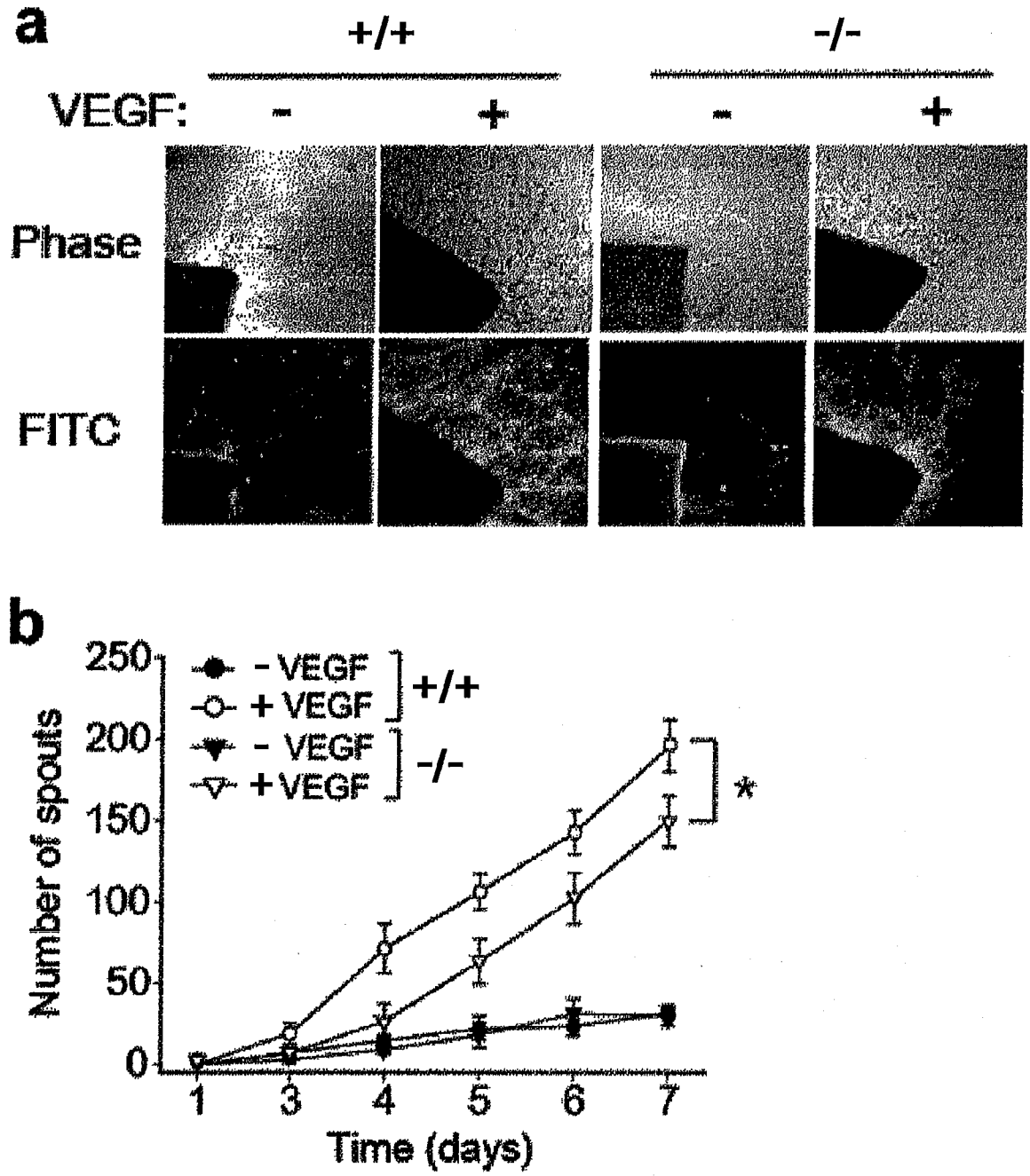
e

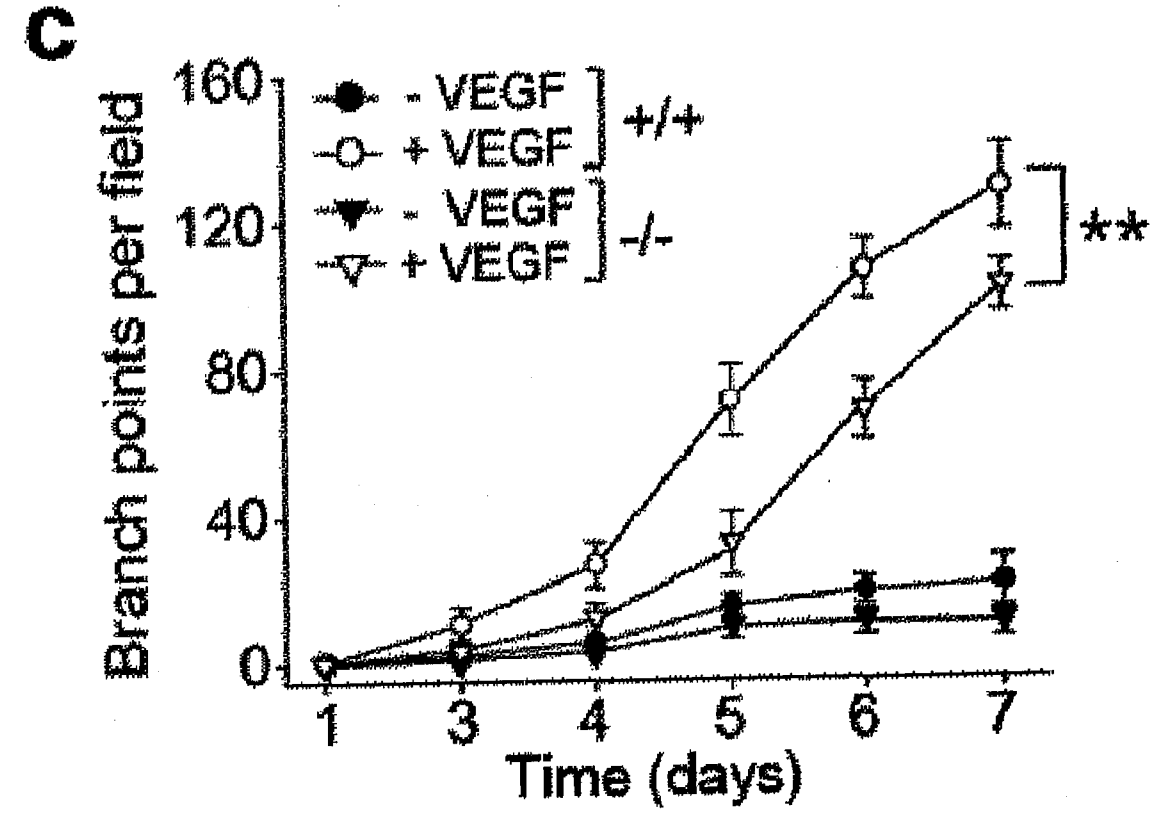

siRNA: CONT PrxII
Adenovirus: CONT CONT Cat-Cyto Cat-Caax
Phase
DCF
Relative DCF Fluorescence
0
1
2
3
4
*
*
**
Adenovirus: CONT CONT Cat-Cyto Cat-Caax
siRNA: CONT PrxII

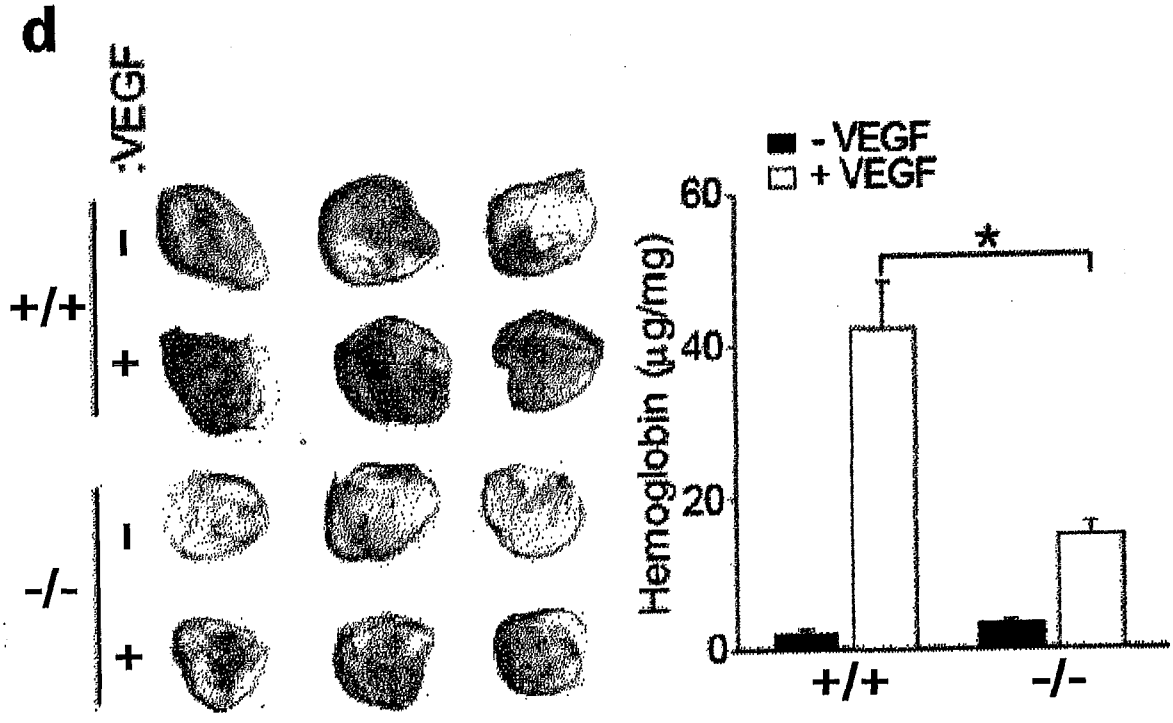
f

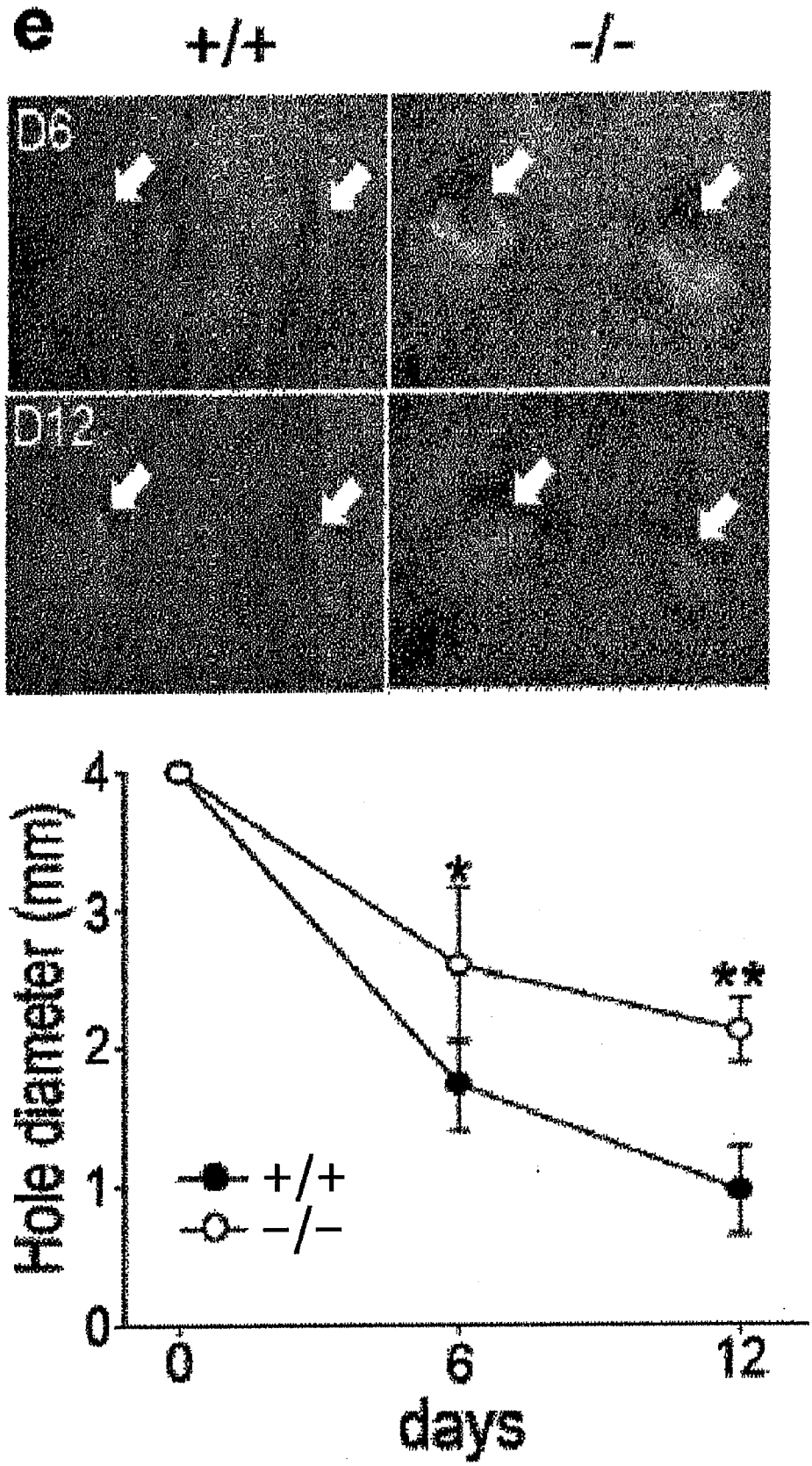

siRNA:
CONT
PrxII
Adenovirus:
CONT
Cat-Cyto
Cat-Caax
VEGF:
-
+
+
+
+
pY1175
VEGFR2
Catalase
PrxII

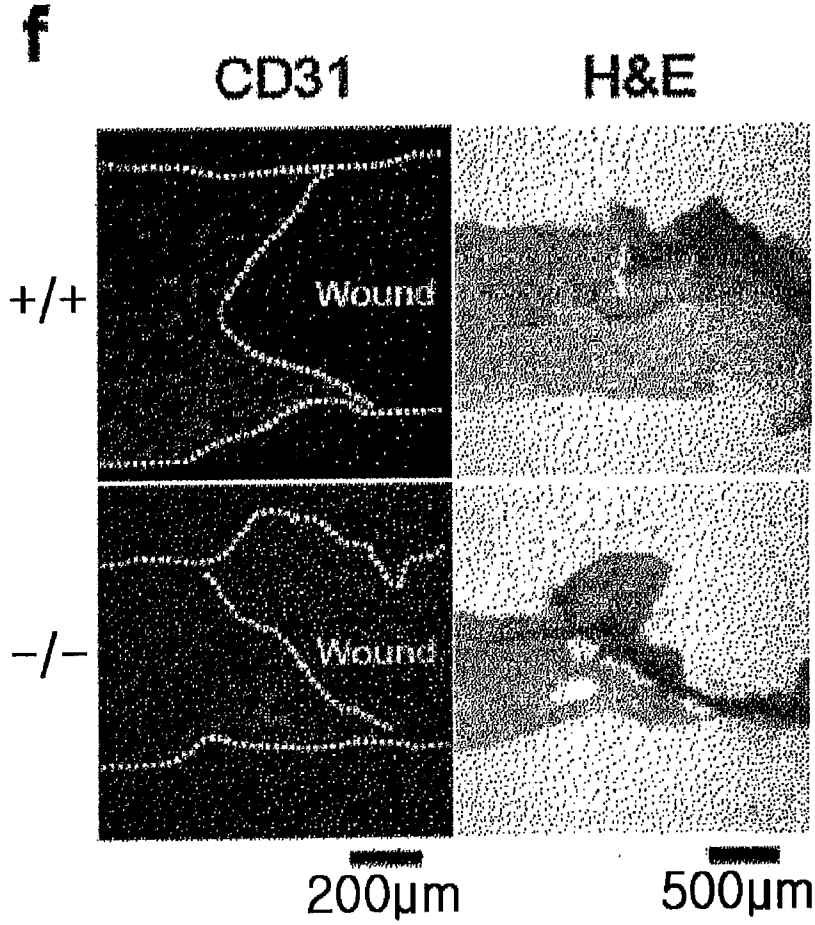
[Fig. 8]

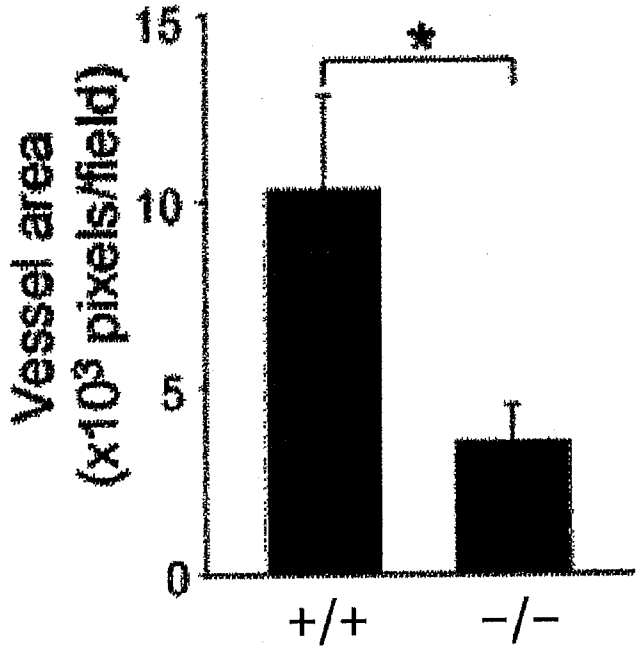

a
+/+
-/-
VEGF:
-
+
-
+
Phase
FITC
b
Number of spouts
250
200
150
100
50
0
- VEGF
+ VEGF
+/+
- VEGF
+ VEGF
-/-
*
1
3
4
5
6
7
Time (days)


c
Branch points per field
160
120
80
40
0
- VEGF
+ VEGF
- VEGF
+ VEGF
+/+
-/-
**
1
3
4
5
6
7
Time (days)

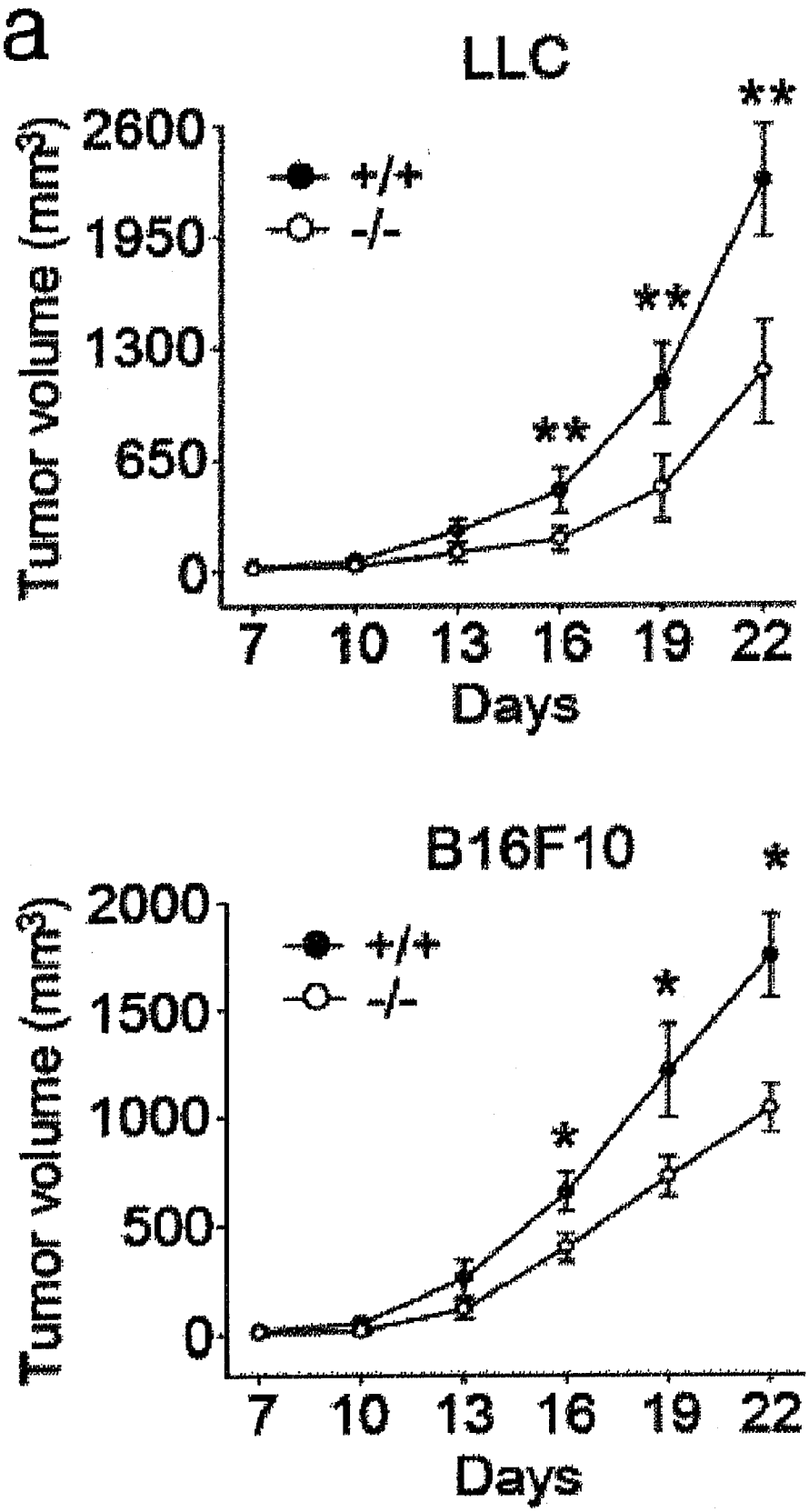

d
:VEGF
+/+
-/-
-
+
-
+
- VEGF
+ VEGF
Hemoglobin (μg/mg)
60
40
20
0
*
+/+
-/-

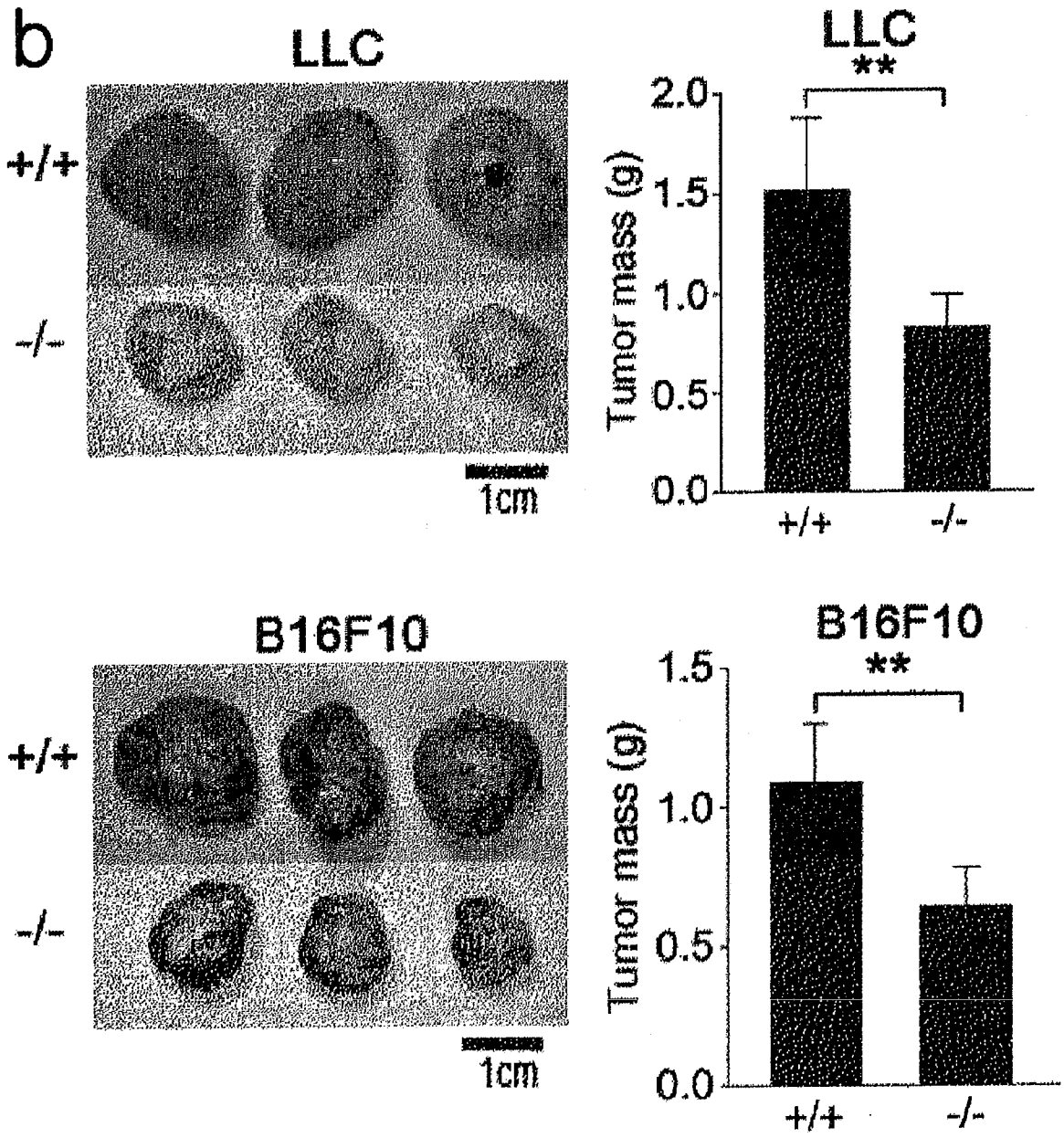

e
+/+
-/-
D6
D12
Hole diameter (mm)
0
1
2
3
4
*
**
+/+
−/−
0
6
12
days

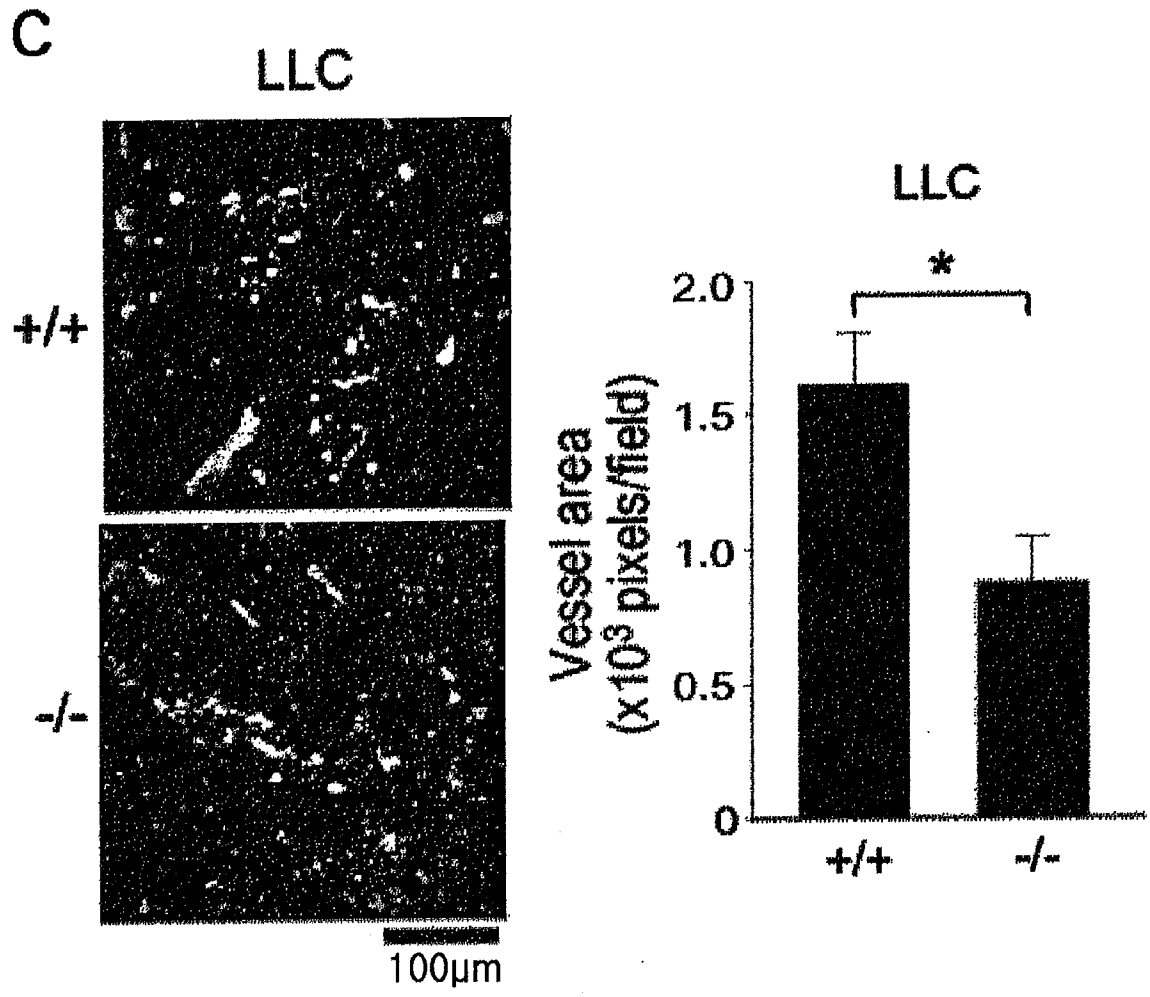

f
CD31
H&E
+/+
−/−
Wound
Wound
200μm
500μm

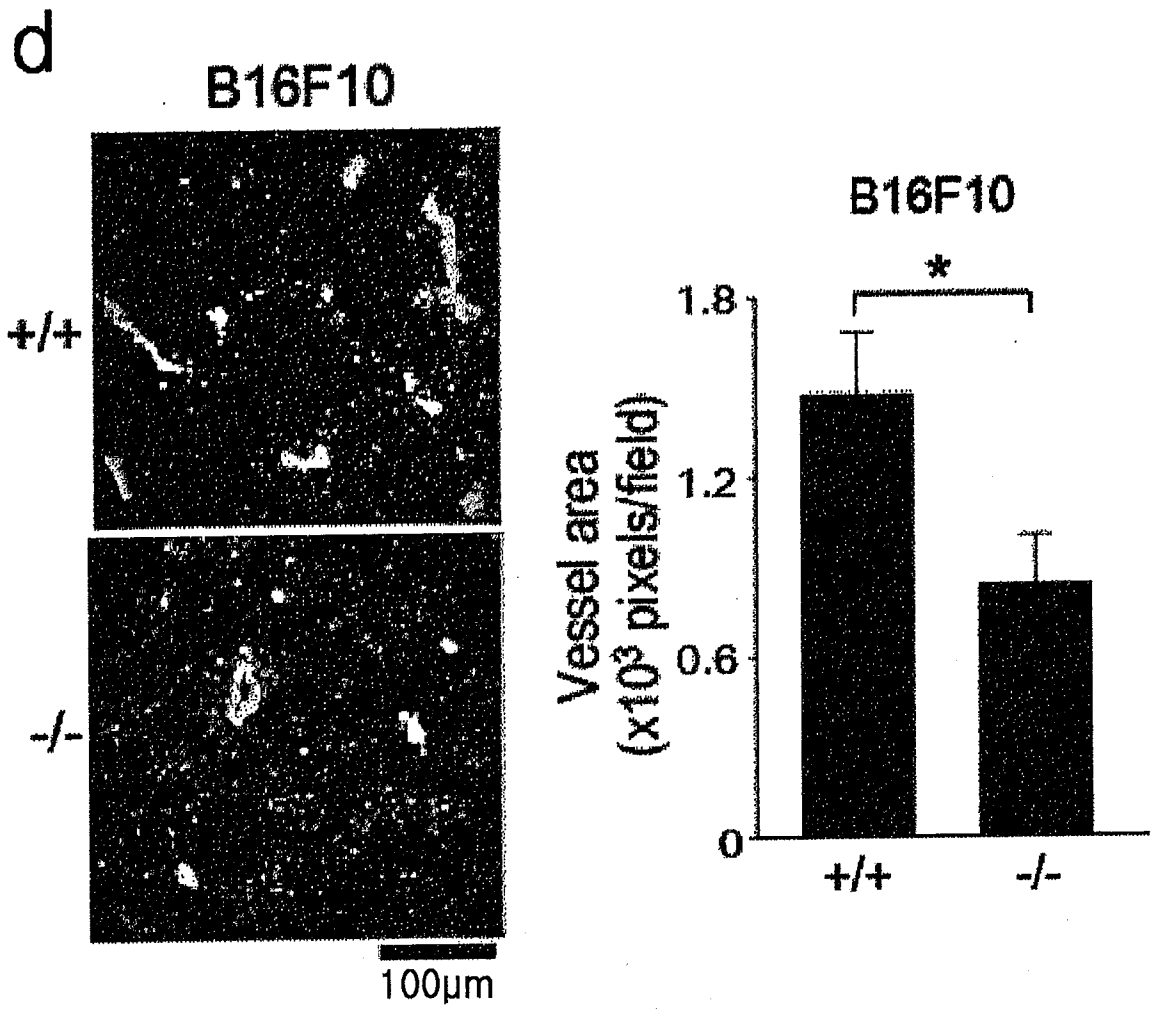

Vessel area
(x10³ pixels/field)
15
10
5
0
*
+/+
−/−

[Fig. 9]

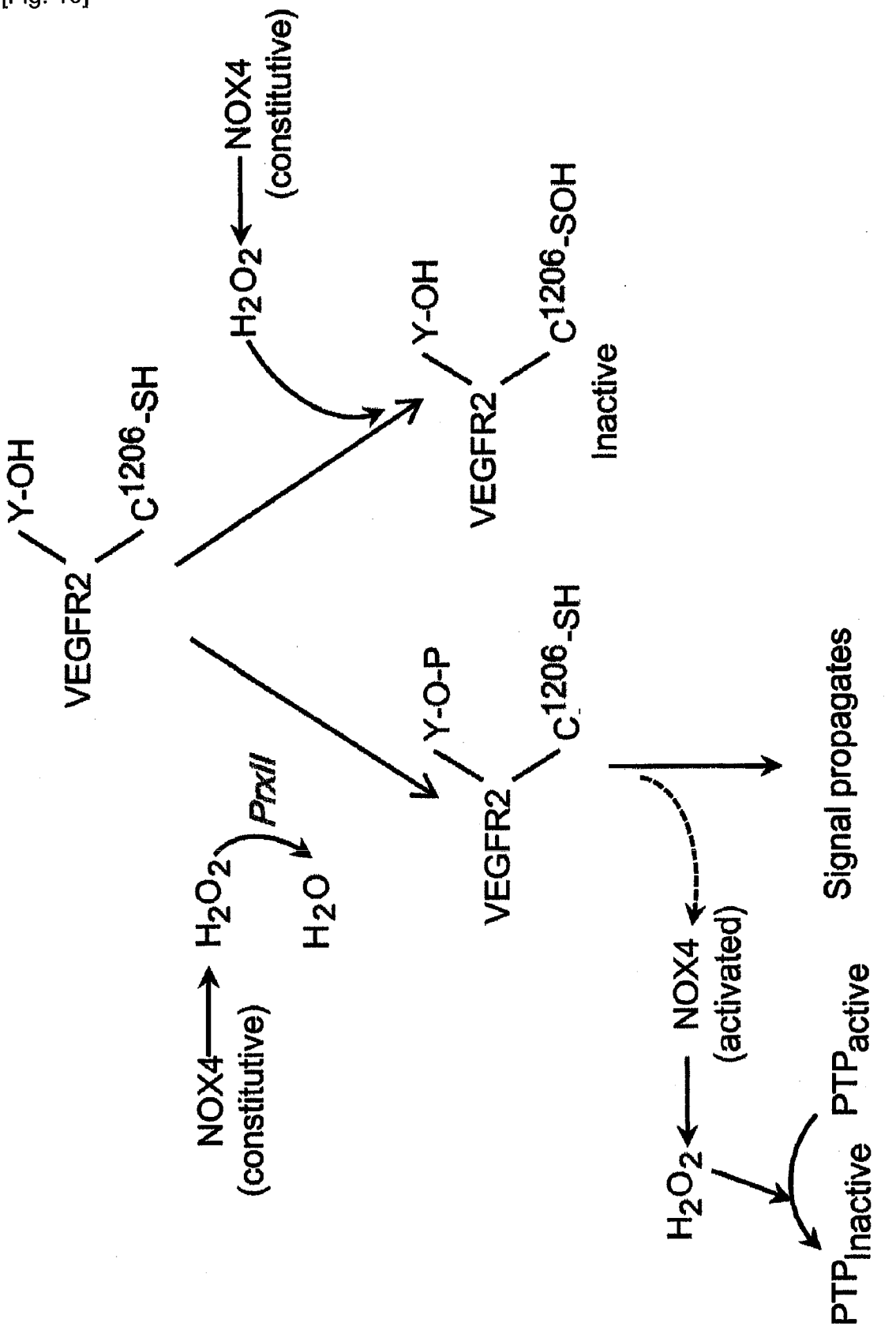

a
LLC
Tumor volume (mm3)
2600
1950
1300
650
0
+/+
-/-
**
**
**
7
10
13
16
19
22
Days
B16F10
Tumor volume (mm3)
2000
1500
1000
500
0
+/+
-/-
*
*
*
7
10
13
16
19
22
Days


b
LLC
+/+
-/-
1cm
LLC
**
Tumor mass (g)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
+/+
-/-
B16F10
+/+
-/-
1cm
B16F10
**
Tumor mass (g)
1.5
1.0
0.5
0.0
+/+
-/-

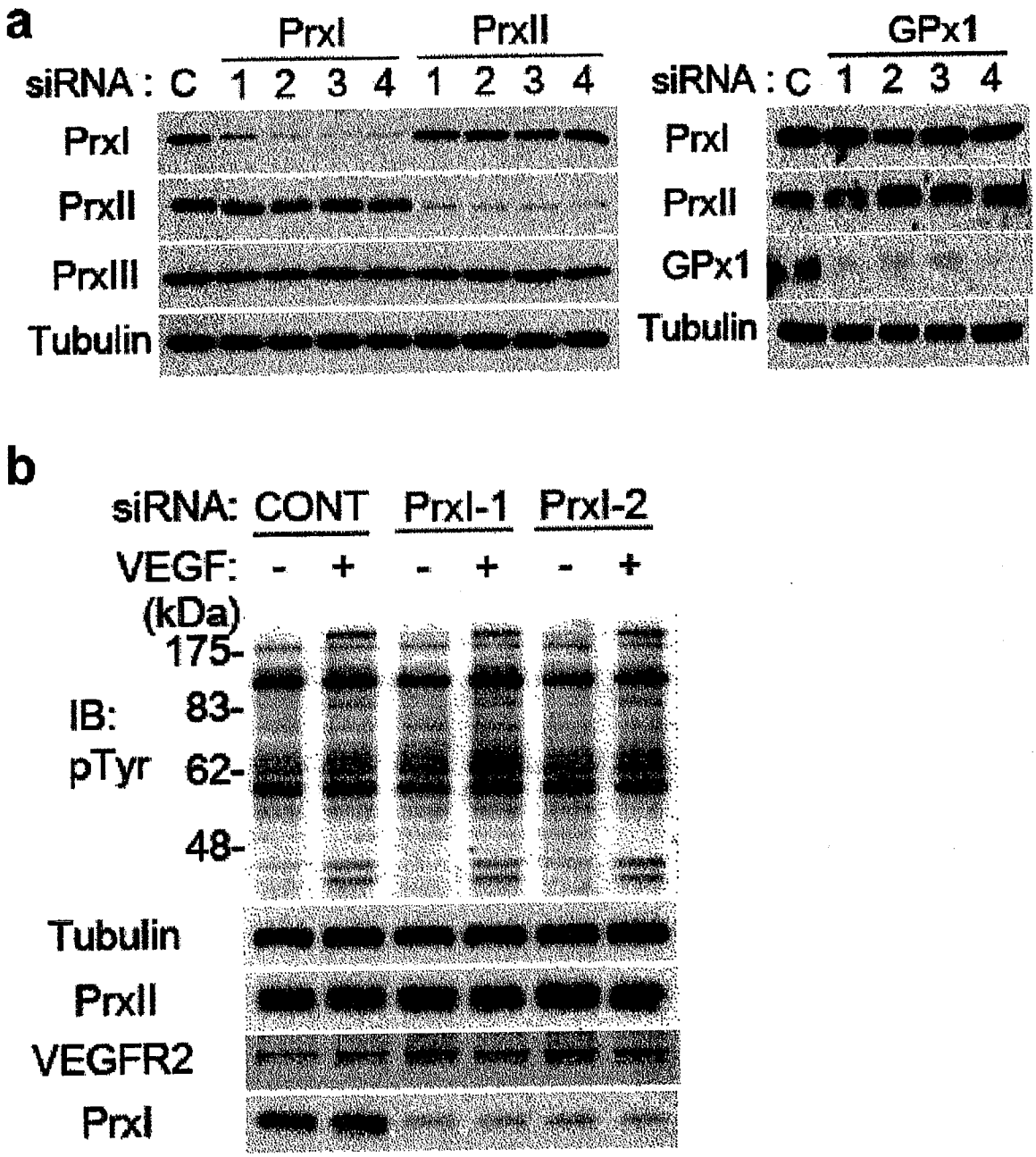

C
LLC
+/+
-/-
100μm
LLC
*
Vessel area
(x10³ pixels/field)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
+/+
-/-

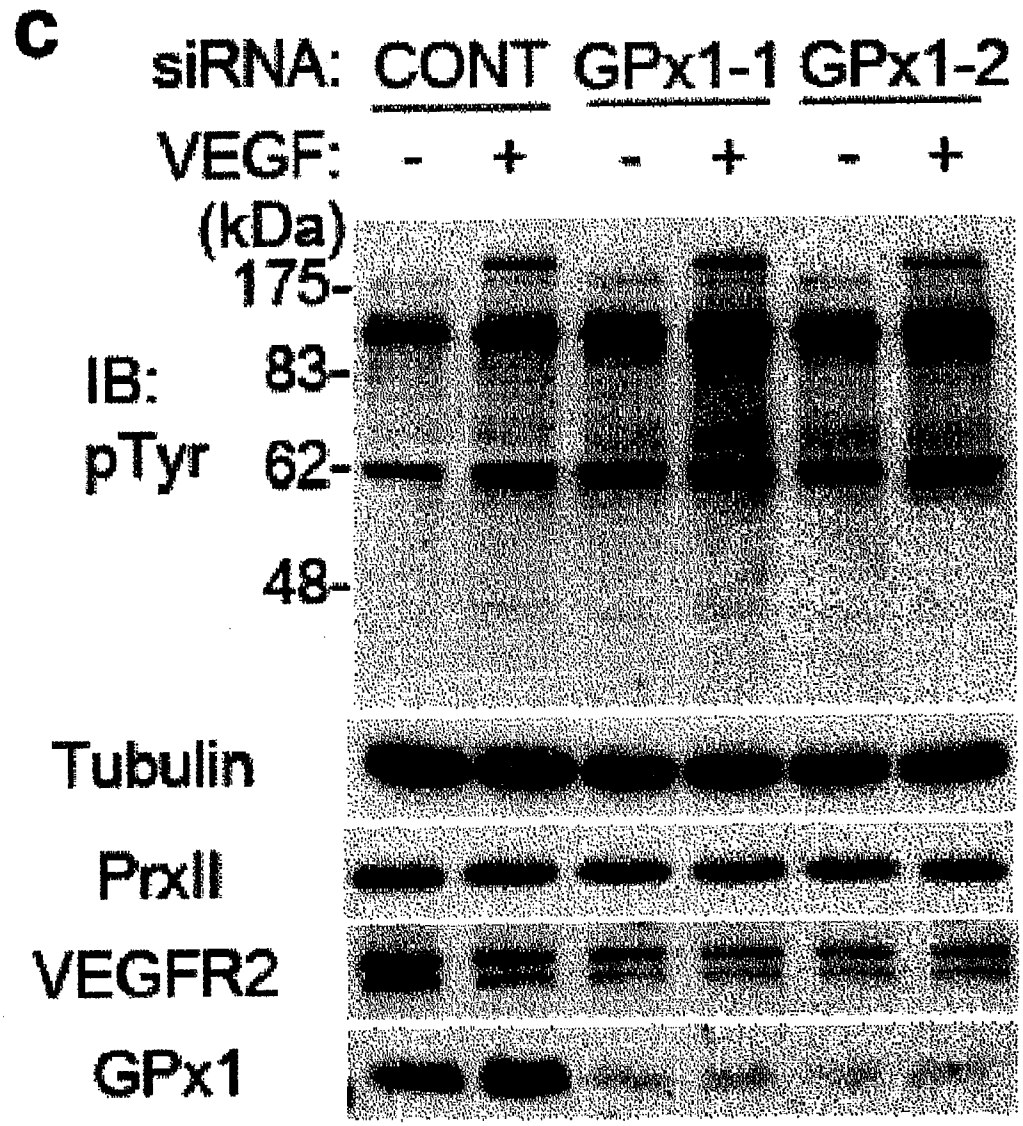

d
B16F10
+/+
-/-
100μm
B16F10
*
Vessel area
(x10³ pixels/field)
1.8
1.2
0.6
0
+/+
-/-

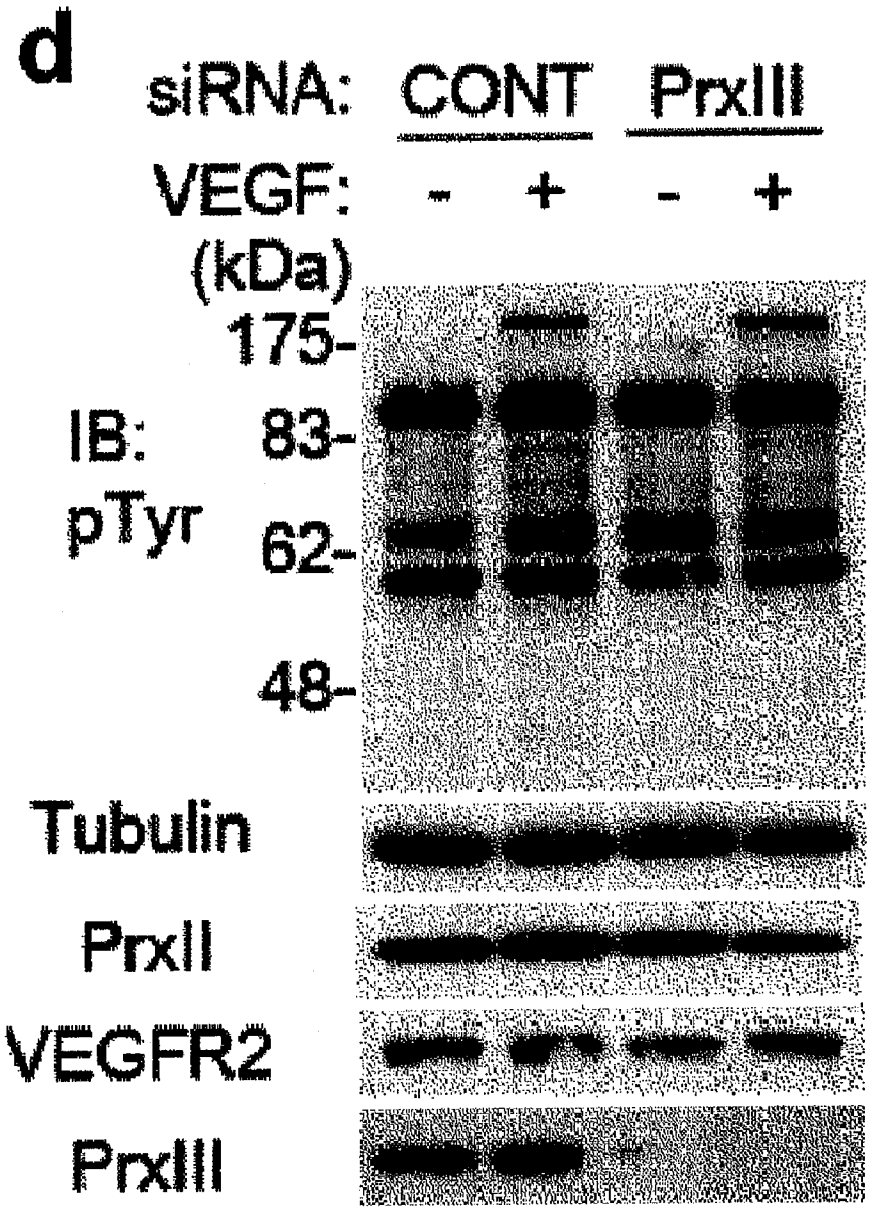
[Fig. 10]


Y-OH
C1206-SH
VEGFR2
H2O2
NOX4
(constitutive)
Y-OH
C1206-SOH
VEGFR2
Inactive
Y-O-P
C1206-SH
VEGFR2
PrxII
H2O2
H2O
NOX4
(constitutive)
NOX4
(activated)
H2O2
PTPactive
PTPInactive
Signal propagates

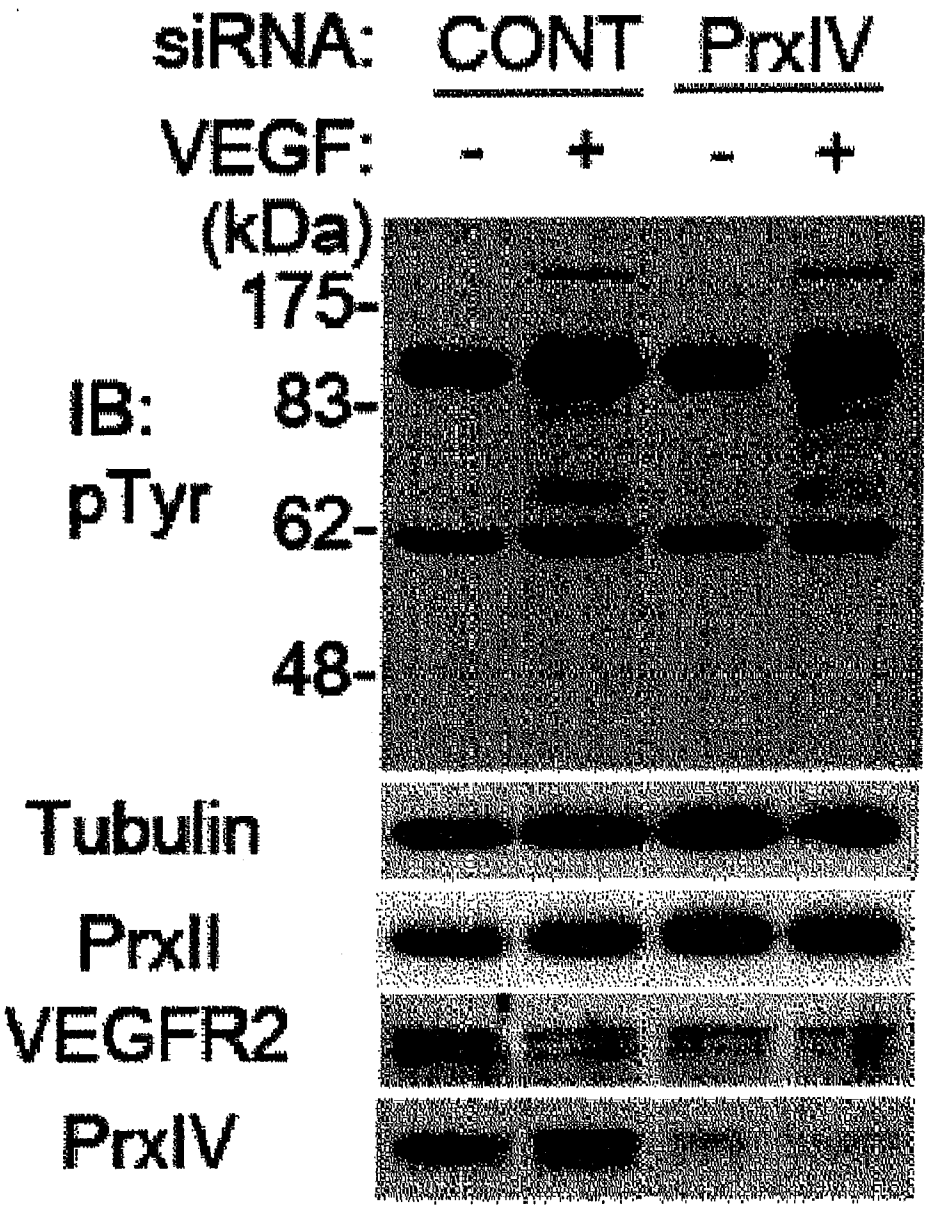
[Fig. 11]


a
PrxI
PrxII
GPx1
siRNA : C 1 2 3 4 1 2 3 4
siRNA : C 1 2 3 4
PrxI
PrxII
PrxIII
Tubulin
PrxI
PrxII
GPx1
Tubulin
b
siRNA: CONT PrxI-1 PrxI-2
VEGF: - + - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxII
VEGFR2
PrxI

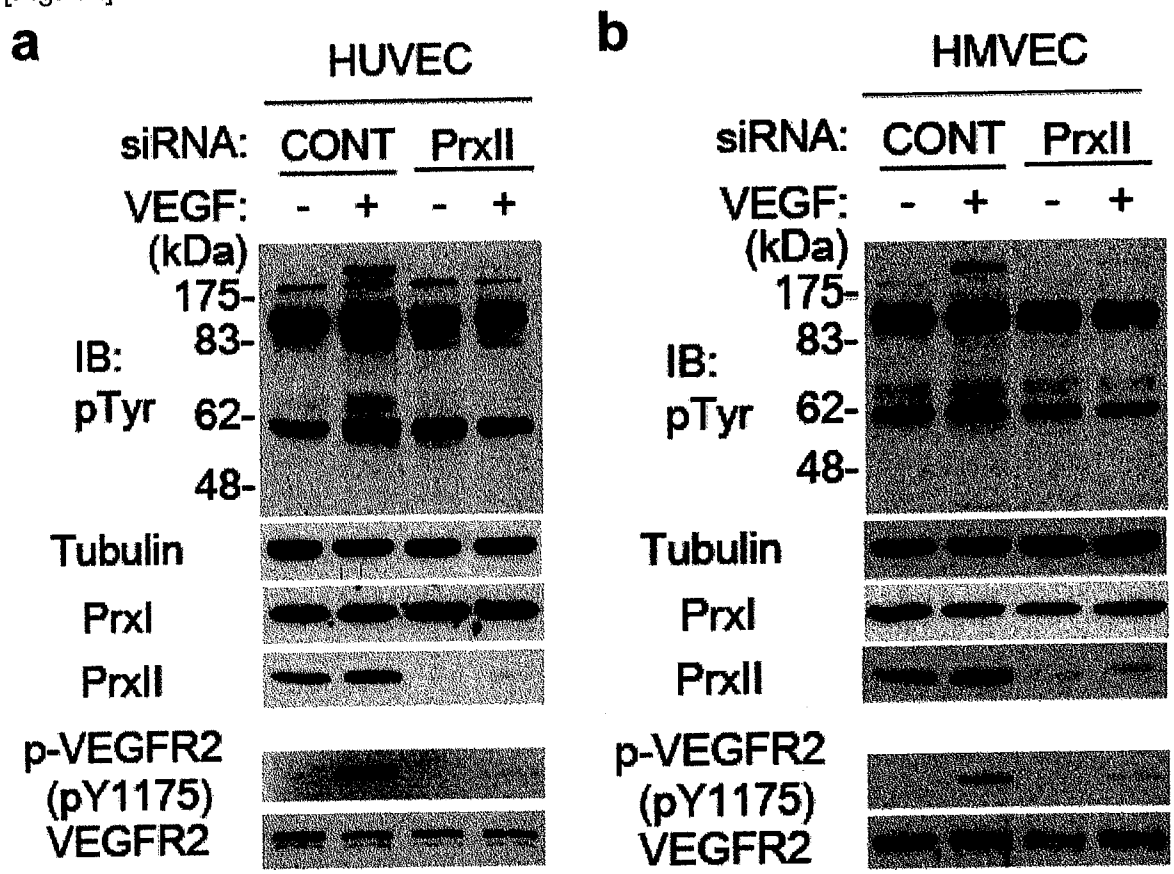

c
siRNA: CONT GPx1-1 GPx1-2
VEGF: - + - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxII
VEGFR2
GPx1


d
siRNA: CONT PrxIII
VEGF: - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB: pTyr
Tubulin
PrxII
VEGFR2
PrxIII

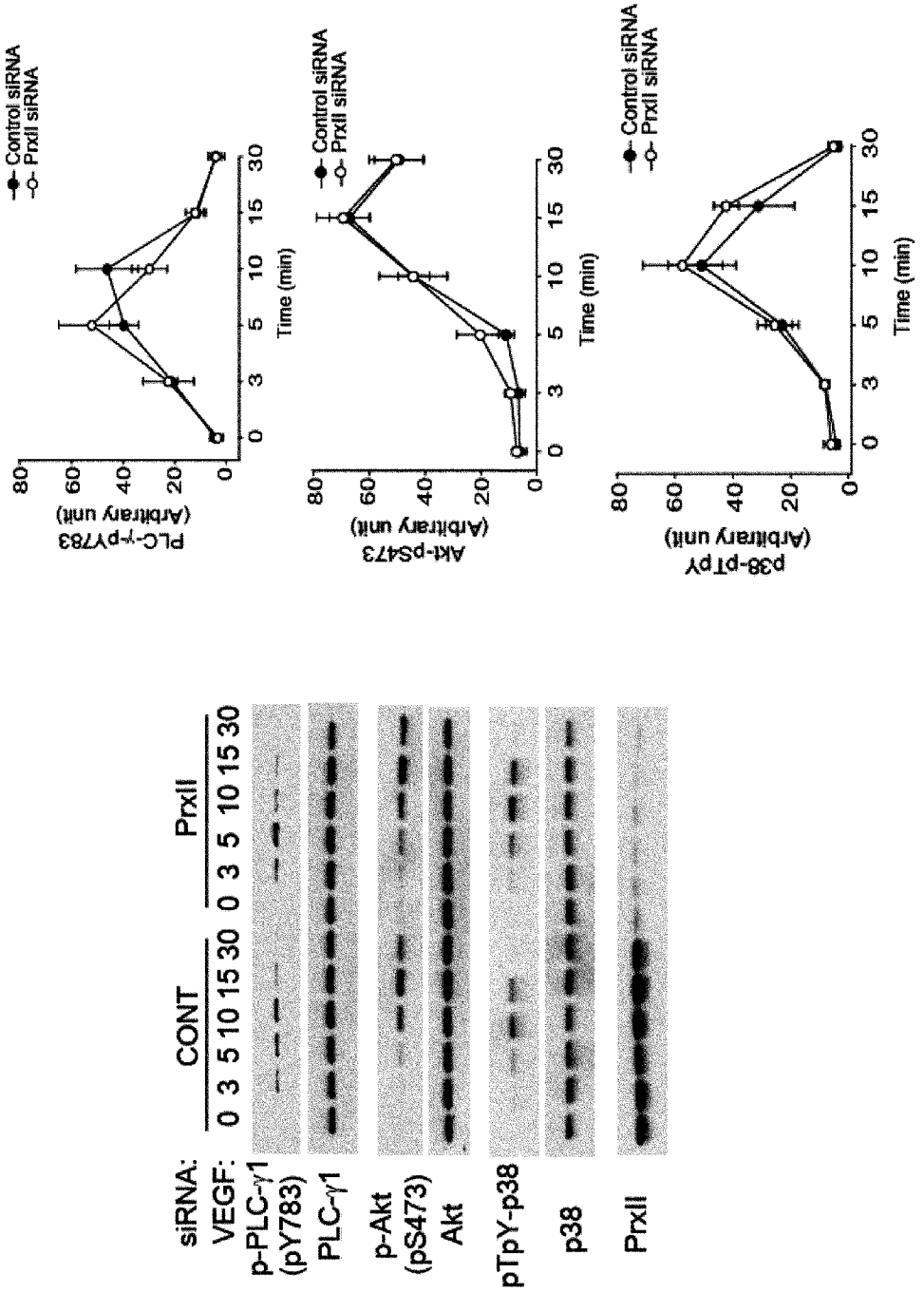
e


siRNA: CONT PrxIV
VEGF: - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxII
VEGFR2
PrxIV

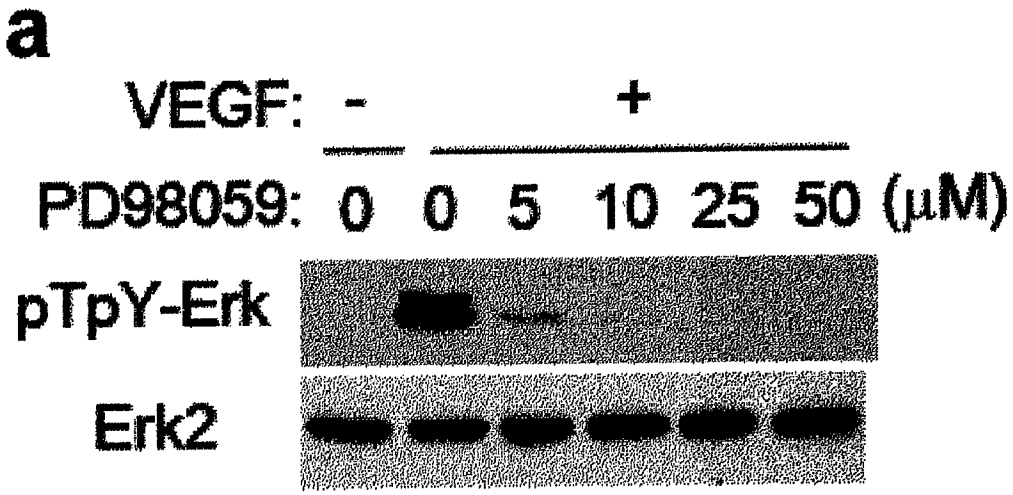
[Fig. 12]

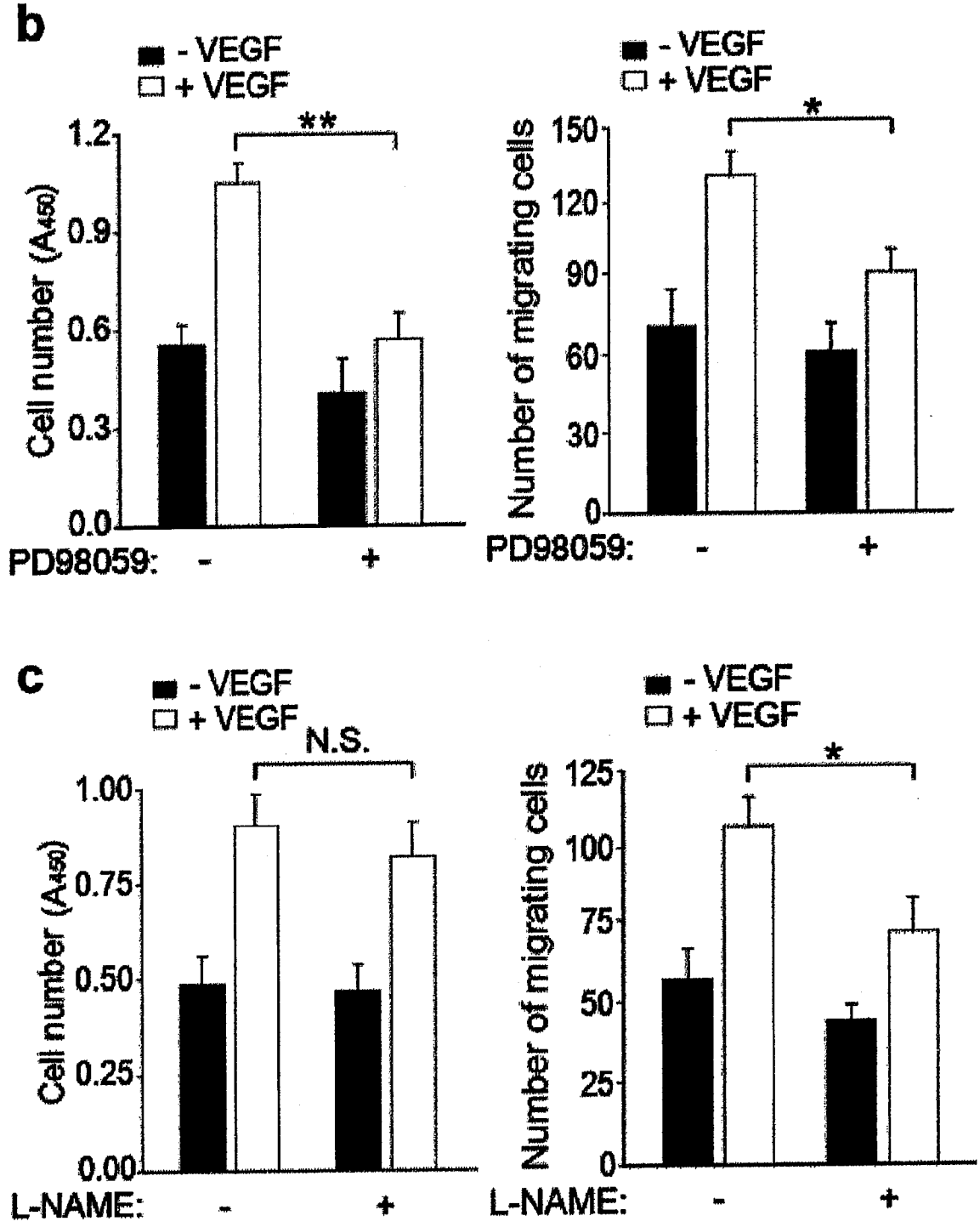

a
HUVEC
siRNA: CONT PrxII
VEGF: - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxI
PrxII
p-VEGFR2
(pY1175)
VEGFR2
b
HMVEC
siRNA: CONT PrxII
VEGF: - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxI
PrxII
p-VEGFR2
(pY1175)
VEGFR2

[Fig. 13]

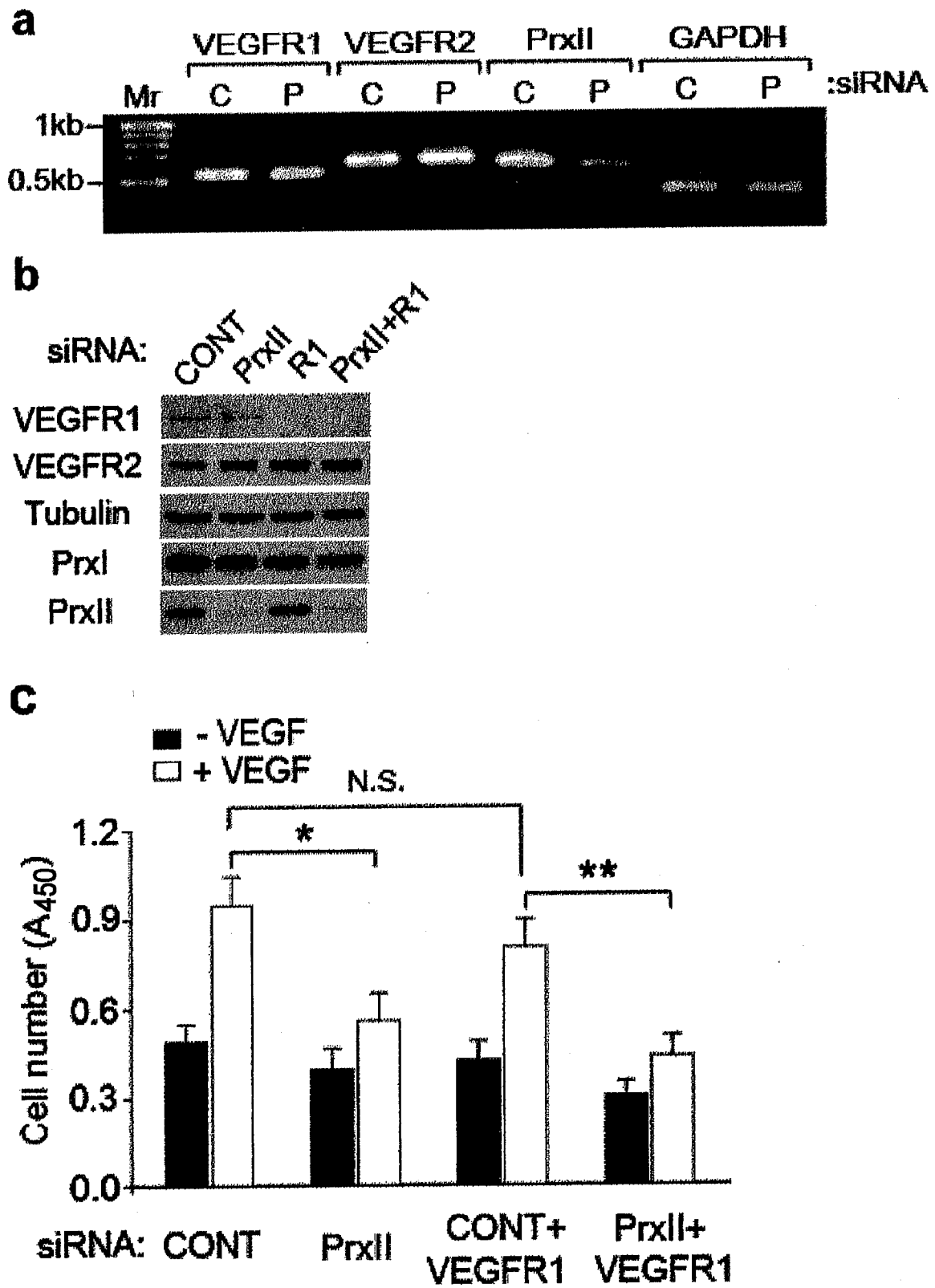

Control siRNA
PrxII siRNA
PLC-γ-pY783 (Arbitrary unit)
Akt-pS473 (Arbitrary unit)
p38-pTpY (Arbitrary unit)
Time (min)
0 3 5 10 15 30
0 20 40 60 80
siRNA:
VEGF:
CONT
PrxII
p-PLC-γ1 (pY783)
PLC-γ1
p-Akt (pS473)
Akt
pTpY-p38
p38
PrxII

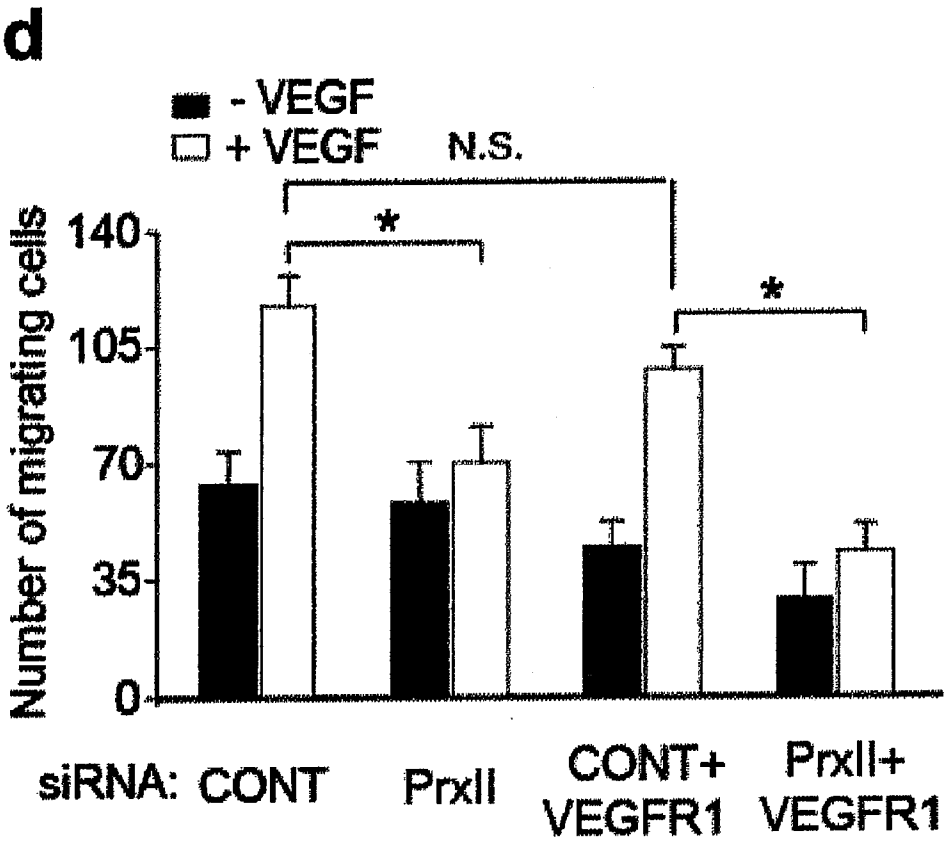
[Fig. 14]

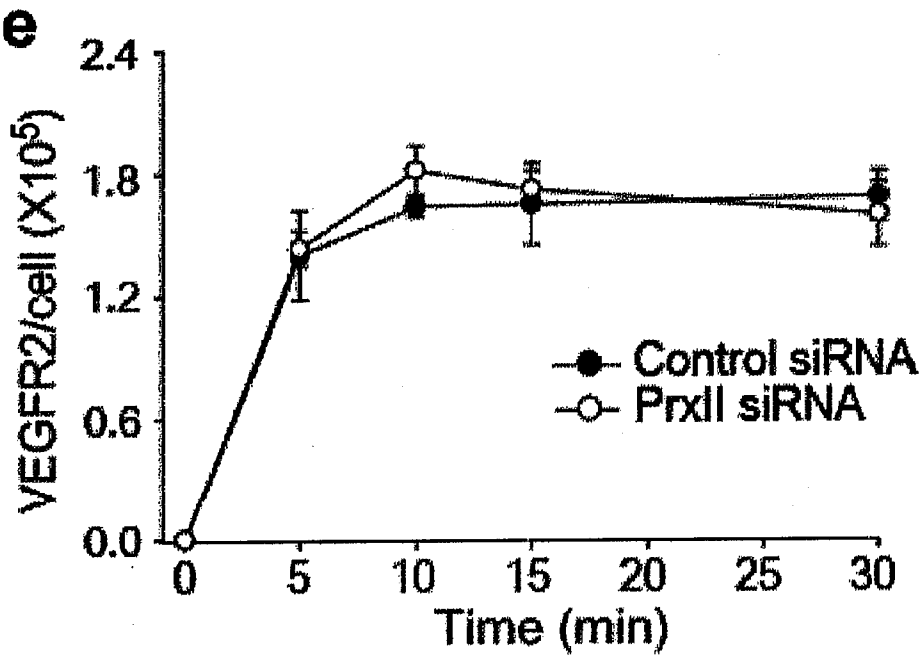



b
- VEGF
+ VEGF
**
Cell number (A450)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
PD98059: - +
- VEGF
+ VEGF
*
Number of migrating cells
150
120
90
60
30
0
PD98059: - +
c
- VEGF
+ VEGF
N.S.
Cell number (A450)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
L-NAME: - +
- VEGF
+ VEGF
*
Number of migrating cells
125
100
75
50
25
0
L-NAME: - +

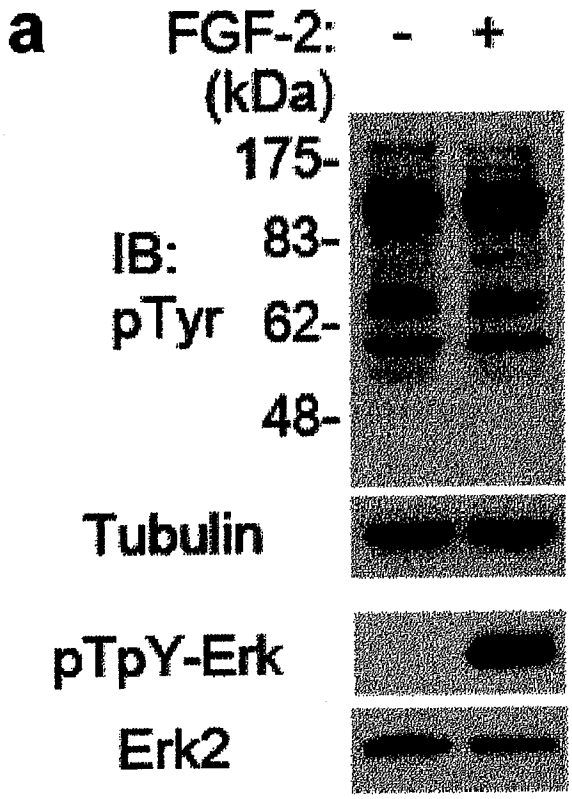
[Fig. 15]

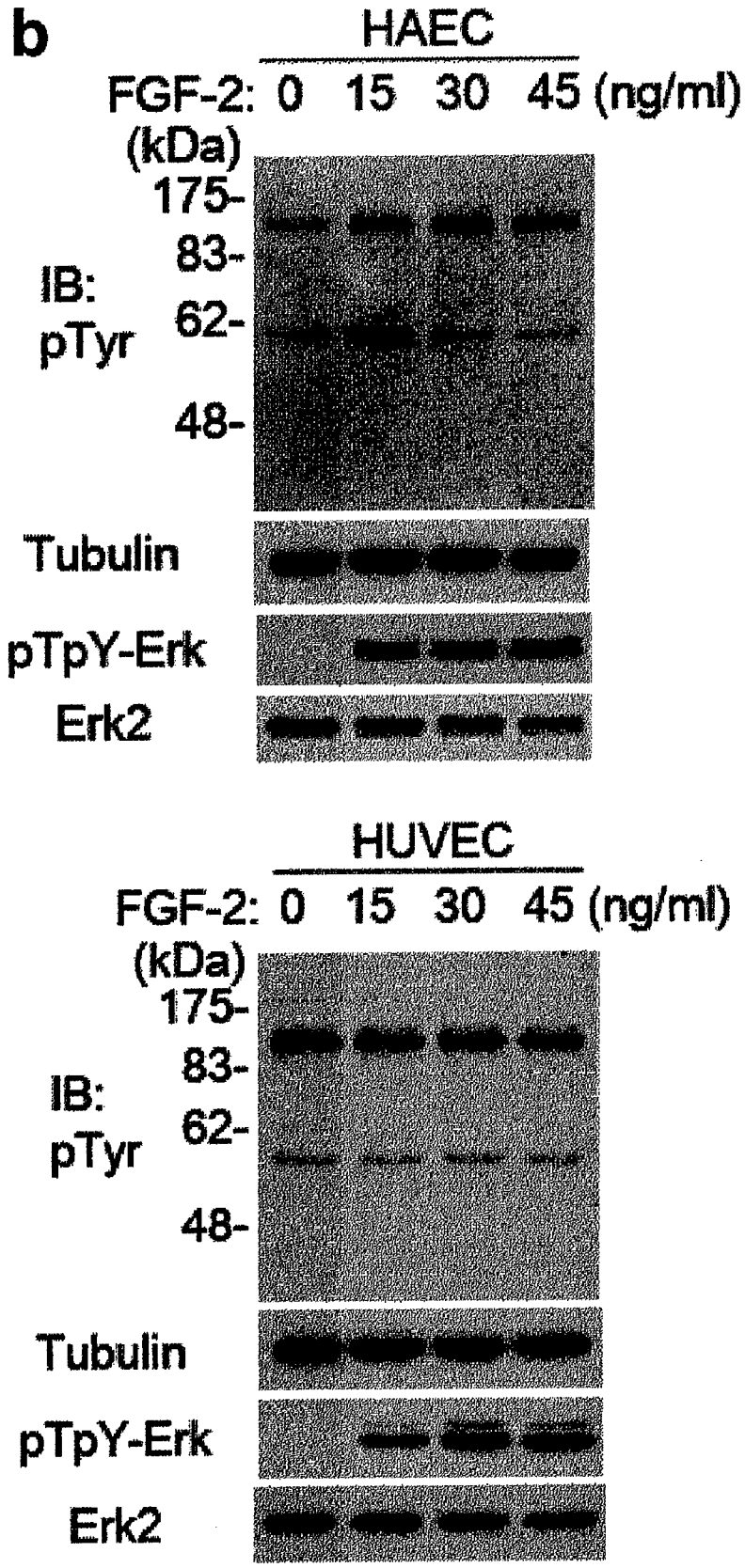

a
VEGFR1
VEGFR2
PrxII
GAPDH
Mr
C
P
C
P
C
P
C
P
:siRNA
1kb
0.5kb
b
siRNA:
CONT
PrxII
R1
PrxII+R1
VEGFR1
VEGFR2
Tubulin
PrxI
PrxII
c
- VEGF
+ VEGF
N.S.
*
**
Cell number (A450)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
siRNA: CONT
PrxII
CONT+ VEGFR1
PrxII+ VEGFR1

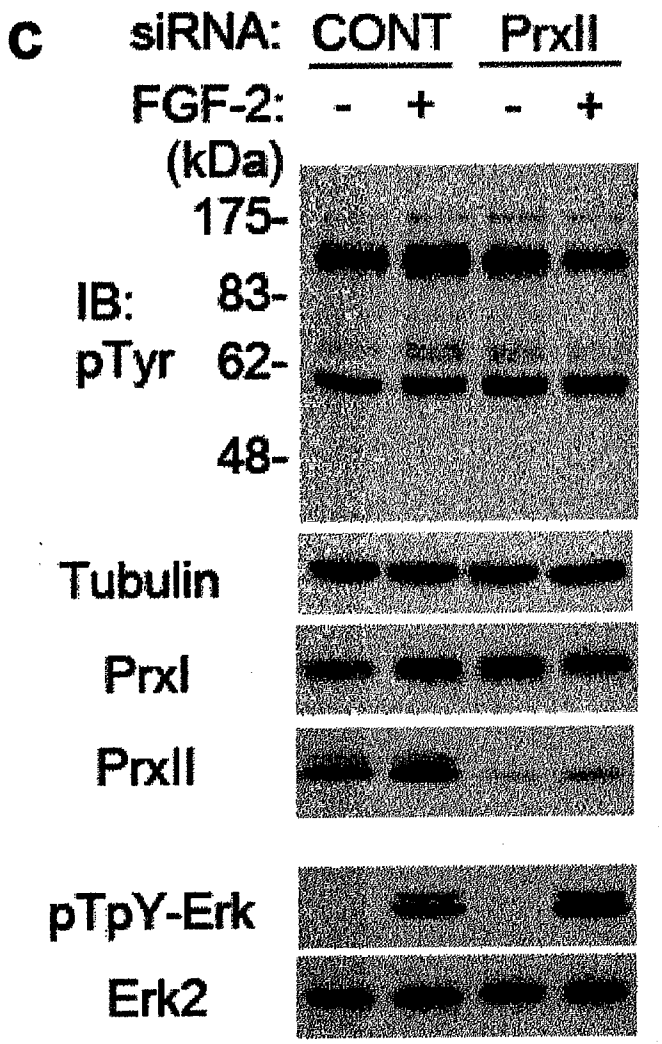

d
- VEGF
+ VEGF
N.S.
*
*
Number of migrating cells
140
105
70
35
0
siRNA: CONT
PrxII
CONT+ VEGFR1
PrxII+ VEGFR1


e
VEGFR2/cell (X10^5)
2.4
1.8
1.2
0.6
0.0
0
5
10
15
20
25
30
Time (min)
Control siRNA
PrxII siRNA

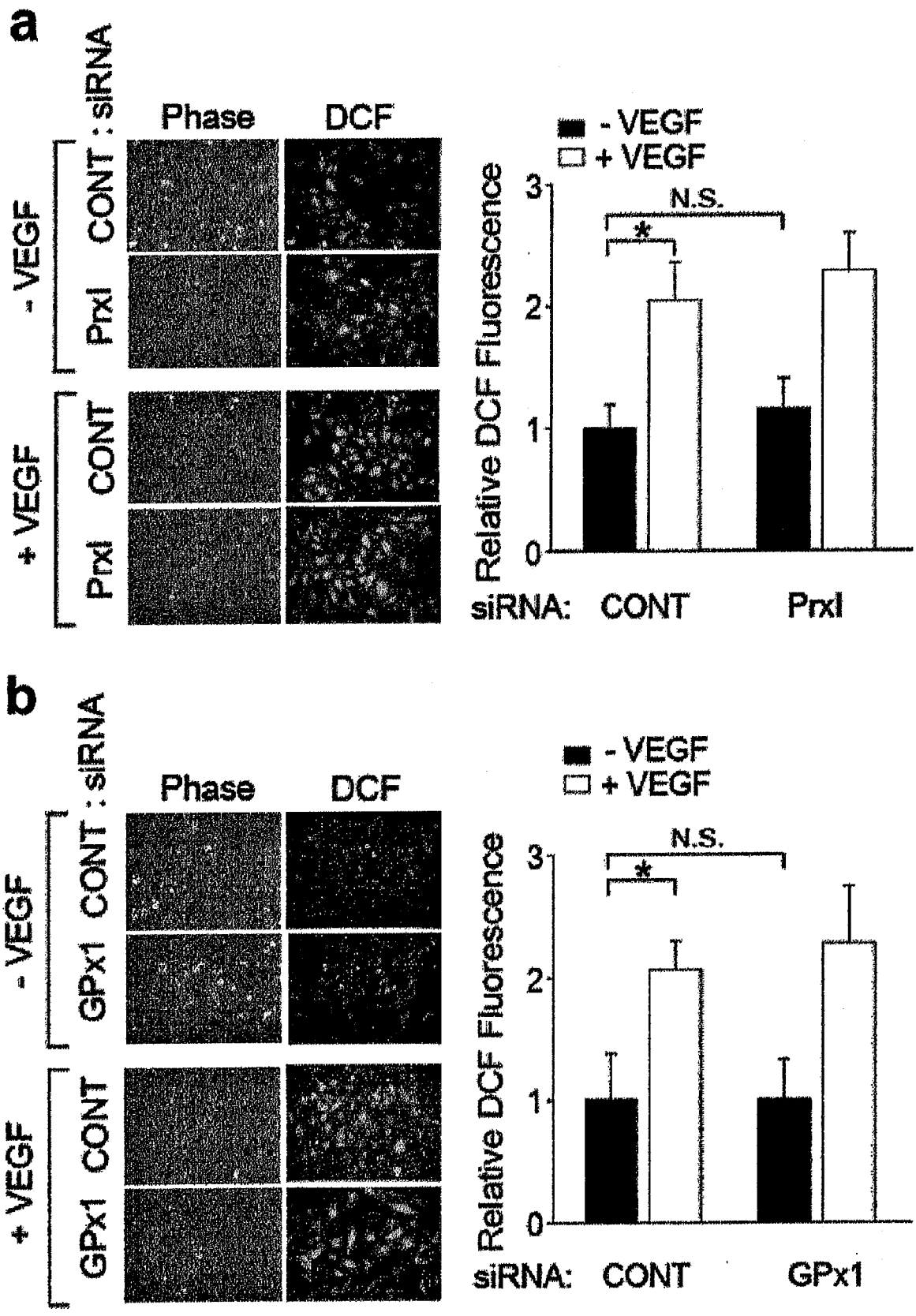
[Fig. 16]



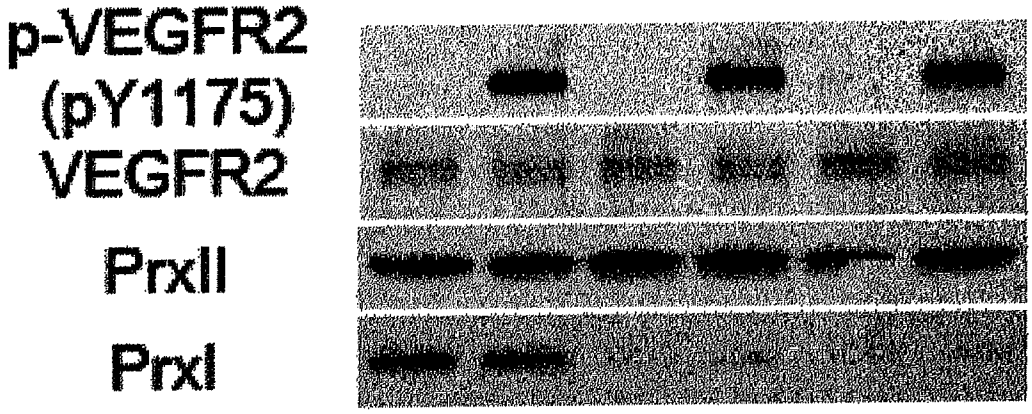

b
HAEC
FGF-2: 0 15 30 45 (ng/ml)
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
pTpY-Erk
Erk2
HUVEC
FGF-2: 0 15 30 45 (ng/ml)
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
pTpY-Erk
Erk2


c
siRNA: CONT PrxII
FGF-2: - + - +
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
PrxI
PrxII
pTpY-Erk
Erk2

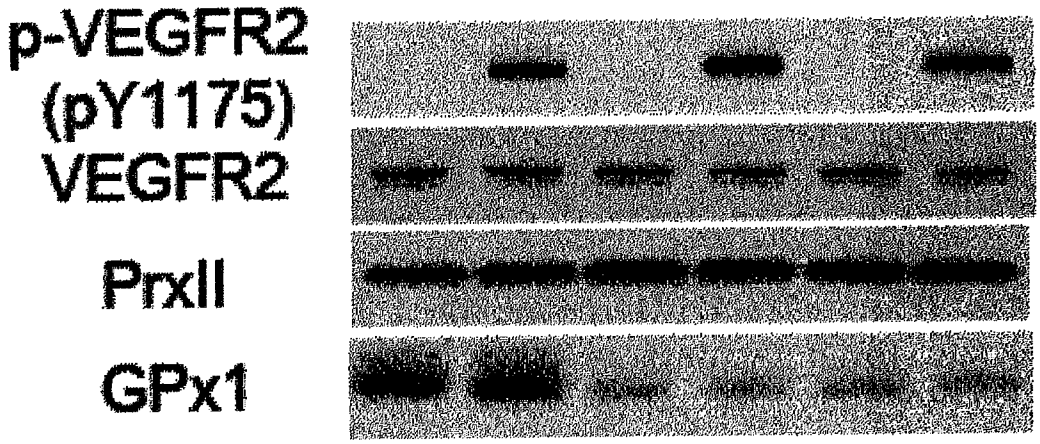
[Fig.17]


a
- VEGF
+ VEGF
CONT : siRNA
CONT
Prxl
Phase
DCF
- VEGF
+ VEGF
N.S.
*
Relative DCF Fluorescence
0
1
2
3
siRNA: CONT Prxl
b
- VEGF
+ VEGF
CONT : siRNA
CONT
GPx1
Phase
DCF
- VEGF
+ VEGF
N.S.
*
Relative DCF Fluorescence
0
1
2
3
siRNA: CONT GPx1

c

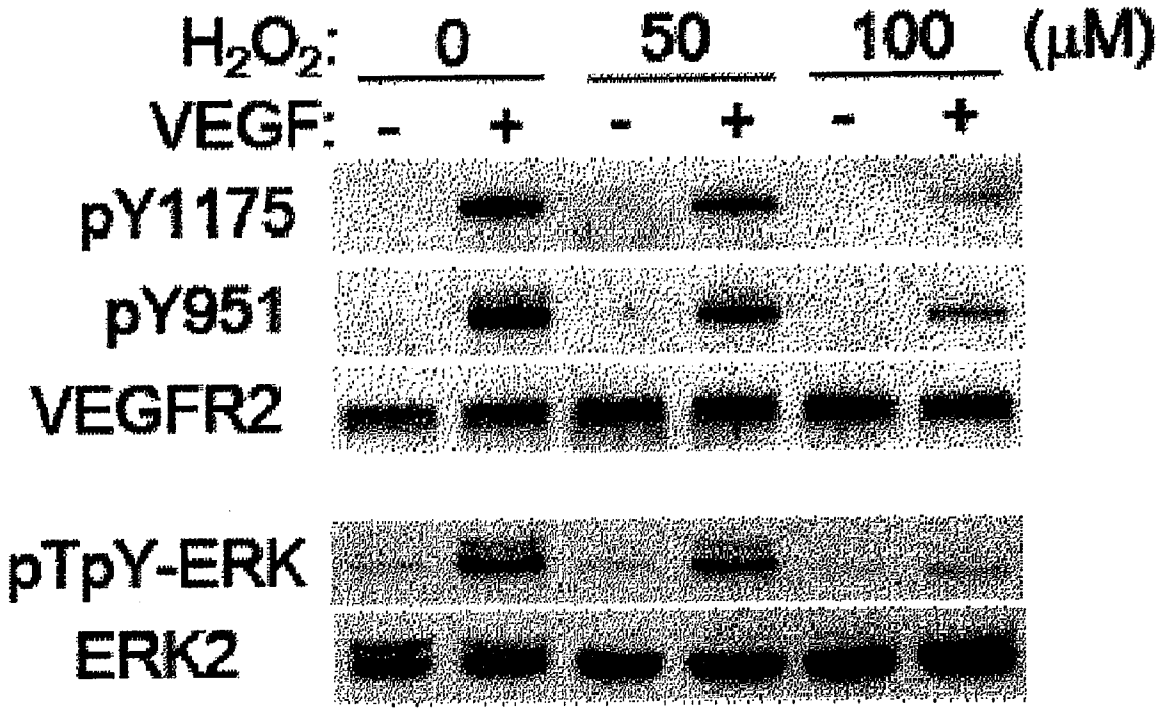

p-VEGFR2
(pY1175)
VEGFR2
PrxII
PrxI

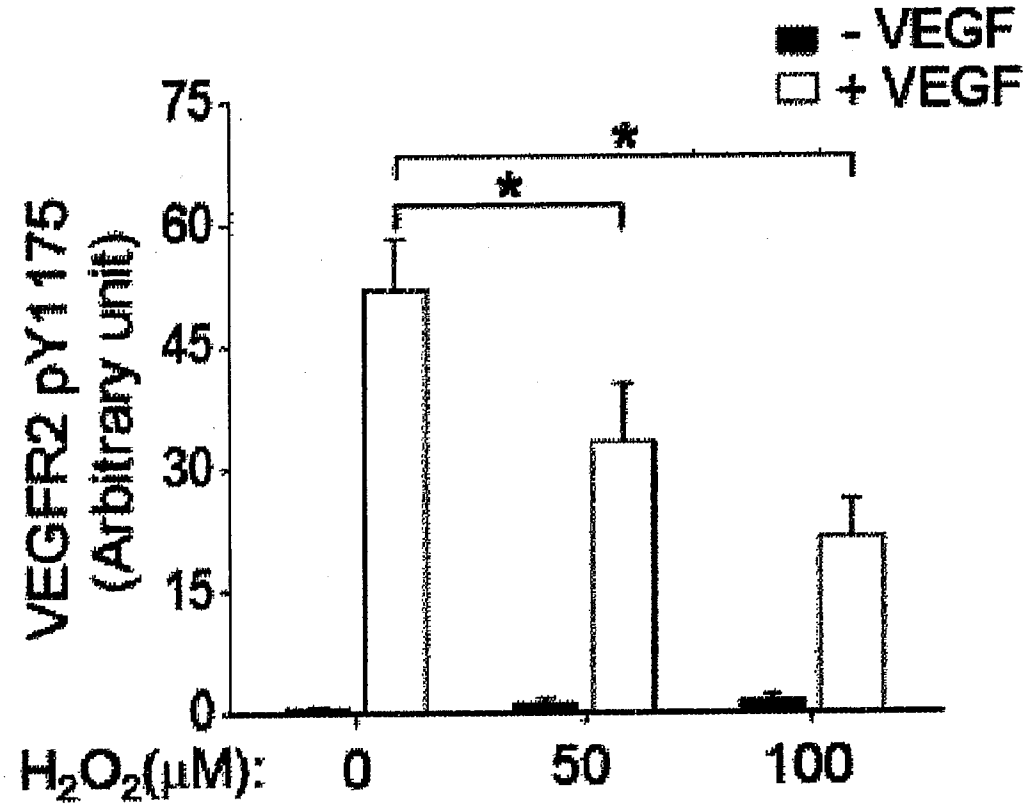
d

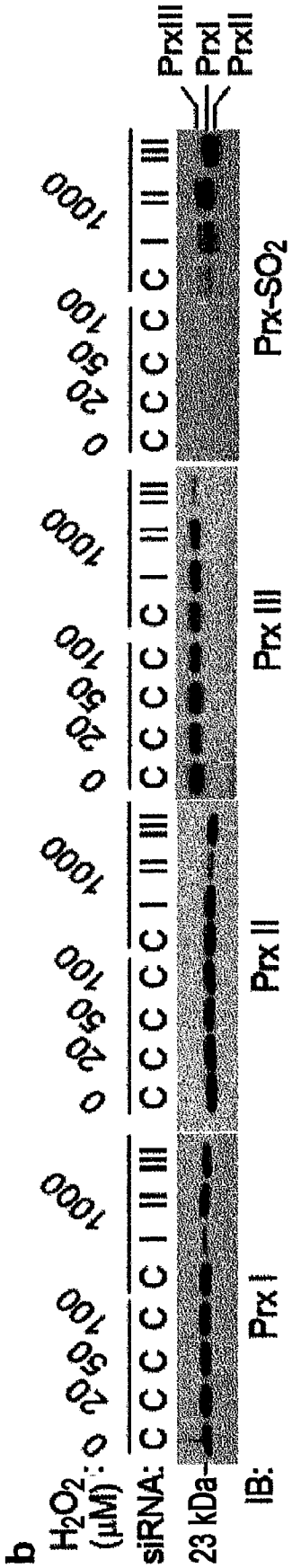

p-VEGFR2
(pY1175)
VEGFR2
PrxII
GPx1

[Fig.18]

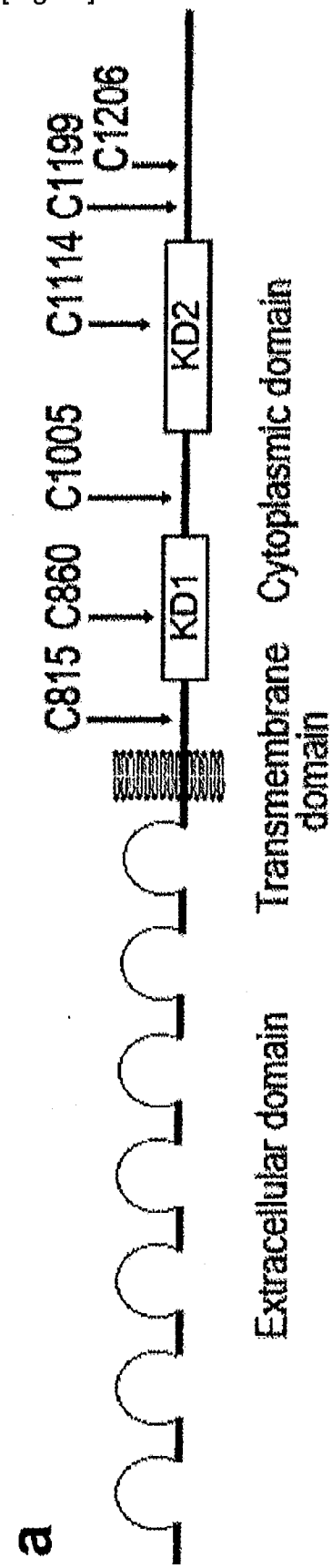
a


H2O2: 0 50 100 (μM)
VEGF: - + - + - +
pY1175
pY951
VEGFR2
pTpY-ERK
ERK2


- VEGF
+ VEGF
VEGFR2 pY1175 (Arbitrary unit)
75
60
45
30
15
0
*
*
H2O2(μM): 0 50 100


b
H2O2 (μM):
siRNA:
23 kDa
IB:
Prx I
Prx II
Prx III
Prx-SO2
PrxIII
PrxI
PrxII

[Fig.19]


a
C815
C860
C1005
C1114
C1199
C1206
KD1
KD2
Extracellular domain
Transmembrane domain
Cytoplasmic domain

Cys 815

hPDGFRα	584	SR----------	585
mPDGFRα	584	SR----------	585
hPDGFRβ	591	ST----------	592
mPDGFRβ	590	ST----------	591
hVEGFR1	801	PDEVPLDEQCERLPYDASK	819
mVEGFR1	802	PDEVPLDEQCERLPYDASK	820
hVEGFR2	808	PDELPLDEHCERLPYDASK	826
mVEGFR2	806	PDELPLDERCERLPYDASK	824
hVEGFR3	819	PGEVPLEEQCEYLSYDASQ	837
mVEGFR3	819	PGEVPLEEQCEYLSYDASQ	837
hFGFR1	467	ED----------PR	470
mFGFR1	467	ED----------PR	470
hFGFR2	470	ED ----------PK	473
mFGFR2	470	ED----------PK	473
hFGFR3	461	AD----------PK	464
mFGFR3	455	AD----------PK	458
hFGFR4	456	LD----------PL	459
mFGFR4	453	LD----------PL	486

Cys 860

hPDGFRα	616	S--RSQPVMKVAVKMLKPT	632
mPDGFRα	616	S--RSQPVMKVAVKMLKPT	632
hPDGFRβ	623	S--HSQATMKVAVKMLKST	639
mPDGFRβ	622	S--HSQATMKVAVKMLKST	638
hVEGFR1	850	K--KSPTCRTVAVKMLKEG	866
mVEGFR1	851	K--KSPTCRTVAVKMLKEG	867
hVEGFR2	857	D--KTATCRTVAVKMLKEG	873
mVEGFR2	855	D--KTATCKTVAVKMLKEG	871
hVEGFR3	868	H--KGSSCDTVAVKMLKEG	884
mVEGFR3	868	N--KGSSCDTVAVKMLKEG	884
hFGFR1	501	DKDKPNRVTKVAVKMLKSD	519
mFGFR1	501	DKDKPNRVTKVAVKMLKSD	519
hFGFR2	504	DKDKPKEAVTVAVKMLKDD	522
mFGFR2	504	DKDKPKEAVTVAVKMLKDD	522
hFGFR3	495	DKDRAAKPVTVAVKMLKDD	513
mFGFR3	489	DKDRTAKPVTVAVKMLKDD	507
hFGFR4	490	DPARPDQASTVAVKMLKDN	508
mFGFR4	487	DPSRPDQTSTVAVKMLKDN	505

Cys1005

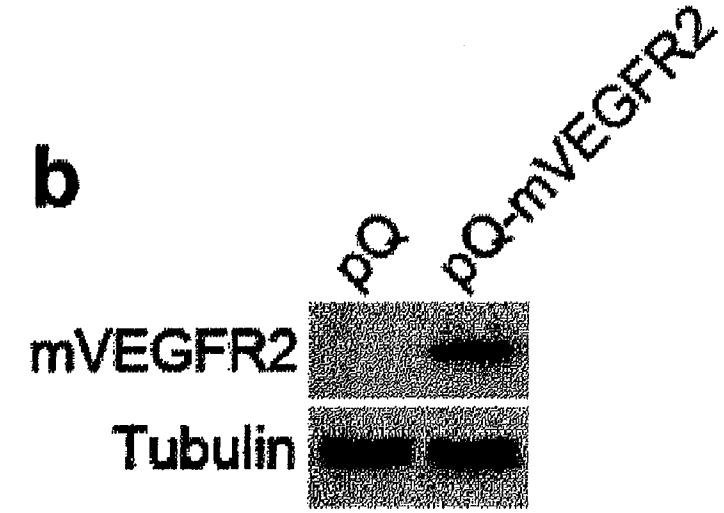
hPDGFRα	790	LTLLDLLSFTYQVARGMEF	808
mPDGFRα	790	LTLLDLLSFTYQVARGMEF	808
hPDGFRβ	798	LSYMDLVGFSYQVANGMEF	816
mPDGFRβ	797	LSYTDLVGFSYQVANGMDF	815
hVEGFR1	994	ITMEDLISYSFQVARGMEF	1012
mVEGFR1	994	LTMEDLISYSFQVARGMEF	1012
hVEGFR2	1000	LTLEHLICYSFQVAKGMEF	1018
mVEGFR2	998	LTLEHLICYSFQVAKGMEF	1016
hVEGFR3	1009	LTMEDLVCYSFQVARGMEF	1027
mVEGFR3	1009	LTMEDLVCYSFQVARGMEF	1027
hFGFR1	595	LSSKDLVSCAYQVARGMEY	613
mFGFR1	595	LSSKDLVSCAYQVARGMEY	613
hFGFR2	598	MTFKDLVSCTYQLARGMEY	616
mFGFR2	598	MTFKDLVSCTYQLARGMEY	616
hFGFR3	589	LTFKDLVSCAYQVARGMEY	597
mFGFR3	583	LTCKDLVSCAYQVARGMEY	591
hFGFR4	584	LSFPVLVSCAYQVARGMQY	592
mFGFR4	581	LSFPALVSCAYQVARGMQY	599

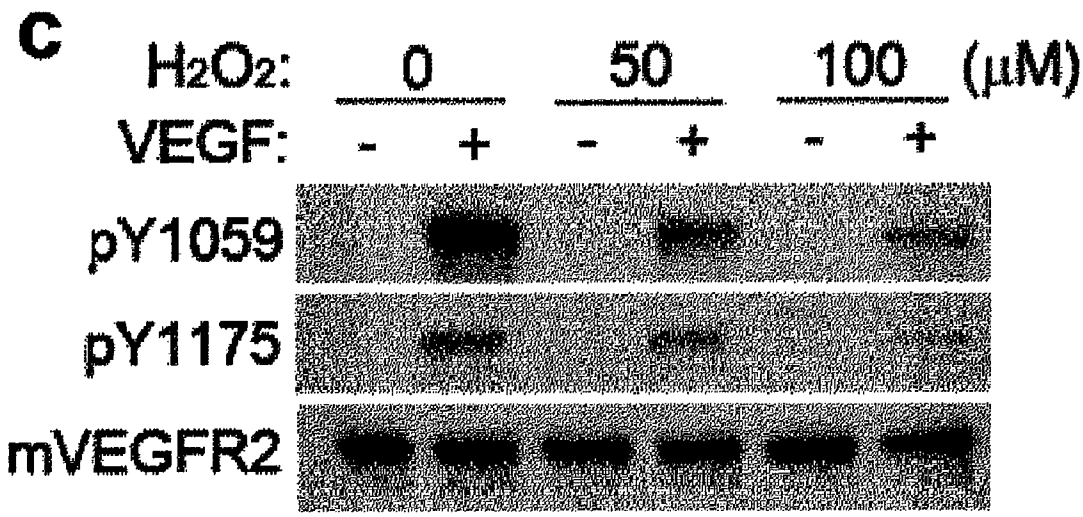
Cys1114

hPDGFRα	890	LGG-TPYPGMMVDSTFYNK	908
mPDGFRα	890	LGG-TPYPGMMVDSTFYNK	908
hPDGFRβ	898	LGG-TPYPELPMNEQFYNA	916
mPDGFRβ	897	LGG-TPYPELPMNDQFYNA	915
hVEGFR1	1094	LGG-SPYPGVQMDEDFCSR	1112
mVEGFR1	1094	LGG-SPYPGVQMDEDFCSR	1112
hVEGFR2	1100	LGA-SPYPGVKIDEEFCRR	1118
mVEGFR2	1098	LGA-SPYPGVKIDEEFCRR	1116
hVEGFR3	1109	LGA-SPYPGVQINEEFCQR	1127
mVEGFR3	1109	LGA-SPYPGVQINEEFCQR	1127
hFGFR1	695	LGG-SPYPGVPVEELFK-L	712
mFGFR1	695	LGG-SPYPGVPVEELFK-L	712
hFGFR2	698	LGG-SPYPGIPVEELFK-L	715
mFGFR2	698	LGG-SPYPGIPVEELFK-L	715
hFGFR3	689	LGG-SPYPGIPVEELFK-L	706
mFGFR3	683	PGGPSPYPGIPVEELFK-L	701
hFGFR4	683	LGG-SPYPGIPVEELFS-L	701
mFGFR4	680	LGG-SPYPGIPVEELFS-L	698

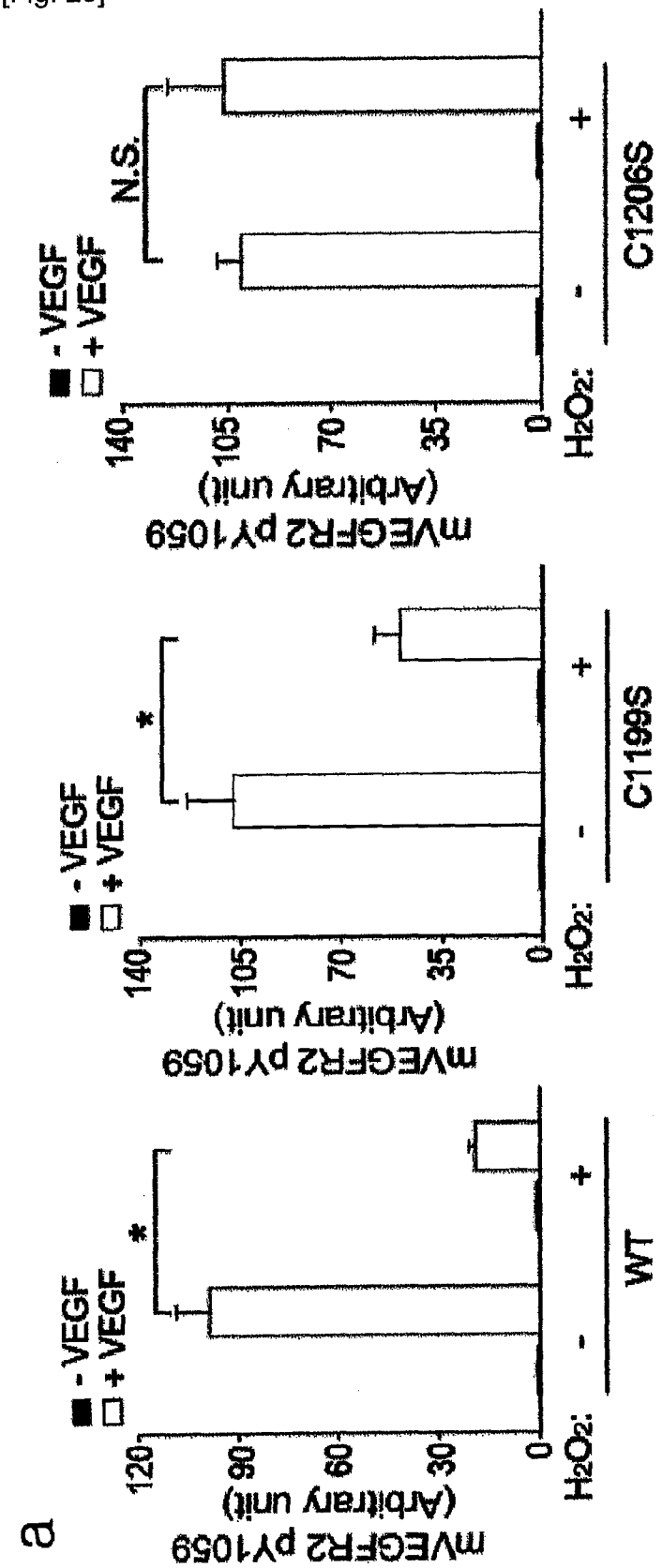
Cys1199
Cys1206

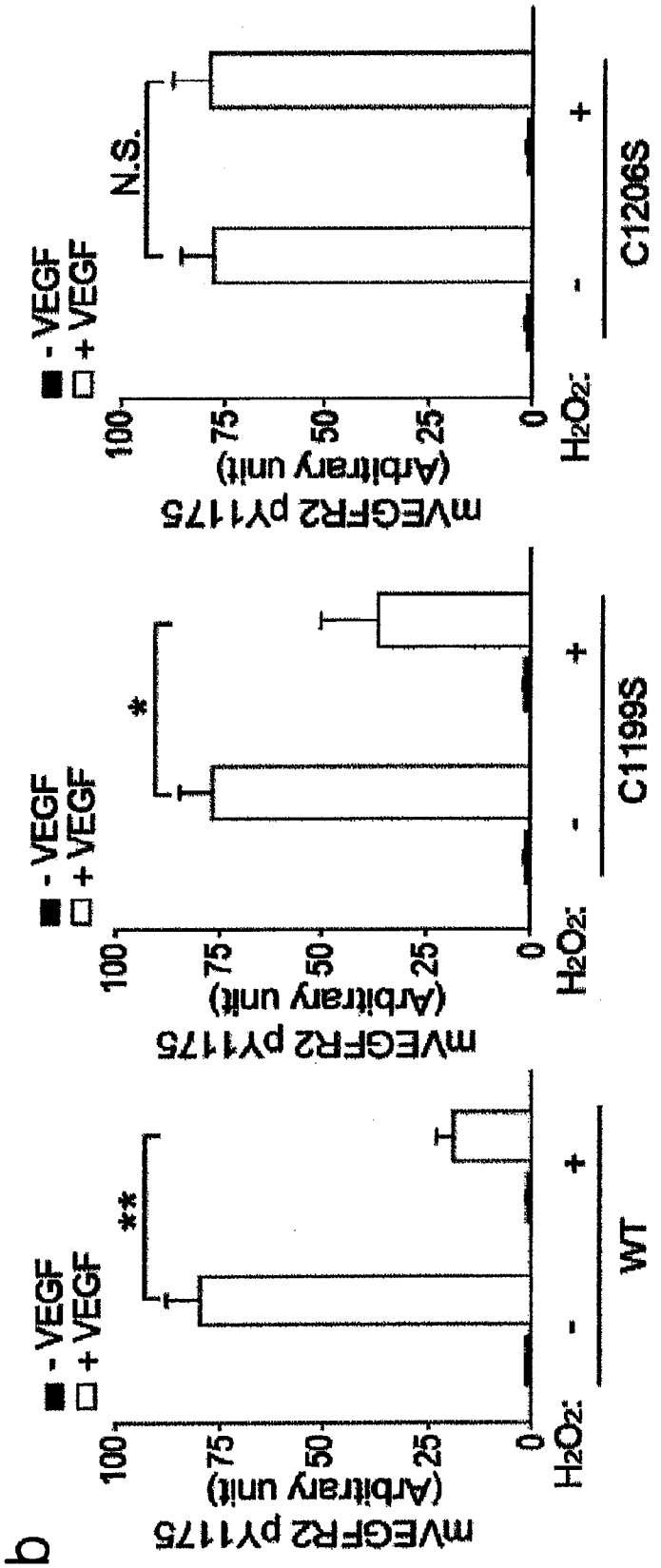
hPDGFRα	982	VDSDNAYIGVTYKNEEDKL	1000
mPDGFRα	982	VDSDNAYIGVTYKNEEDKL	1000
hPDGFRβ	990	ARLPGFHG---LRSPLDTS	1005
mPDGFRβ	989	ARFPGIHS---LRSPLDTS	1004
hVEGFR1	1184	YSTPAFSEDFFKES-ISAP	1201
mVEGFR1	1184	YSTPTFSEDLFKDG-FADP	1201
hVEGFR2	1192	LSLPTSPVSCMEEEEVCDP	1210
mVEGFR2	1190	LSLPTSPVSCMEEEEVCDP	1208
hVEGFR3	1200	SQVSTMALHIAQADAEDSP	1218
mVEGFR3	1200	MQASTTALHITEADADDSP	1218
hFGFR1	786	STCSSGEDSVFSHEPLPEE	804
mFGFR1	786	STCSSGEDSVFSHEPLPEE	804
hFGFR2	789	S-CSSGDDSVFSPDPMPYE	807
mFGFR2	789	S-CSSGDDSVFSPDPMPYE	807
hFGFR3	780	S-SSSGDDSVFAHDLLP--	795
mFGFR3	775	S-SSSGDDSVFTHDLLP--	790
hFGFR4	774	T-CSSS-DSVFSHDPLPLG	790
mFGFR4	771	T-CSSS-DSVFSHDPLPLE	787


b
pQ
pQ-mVEGFR2
mVEGFR2
Tubulin

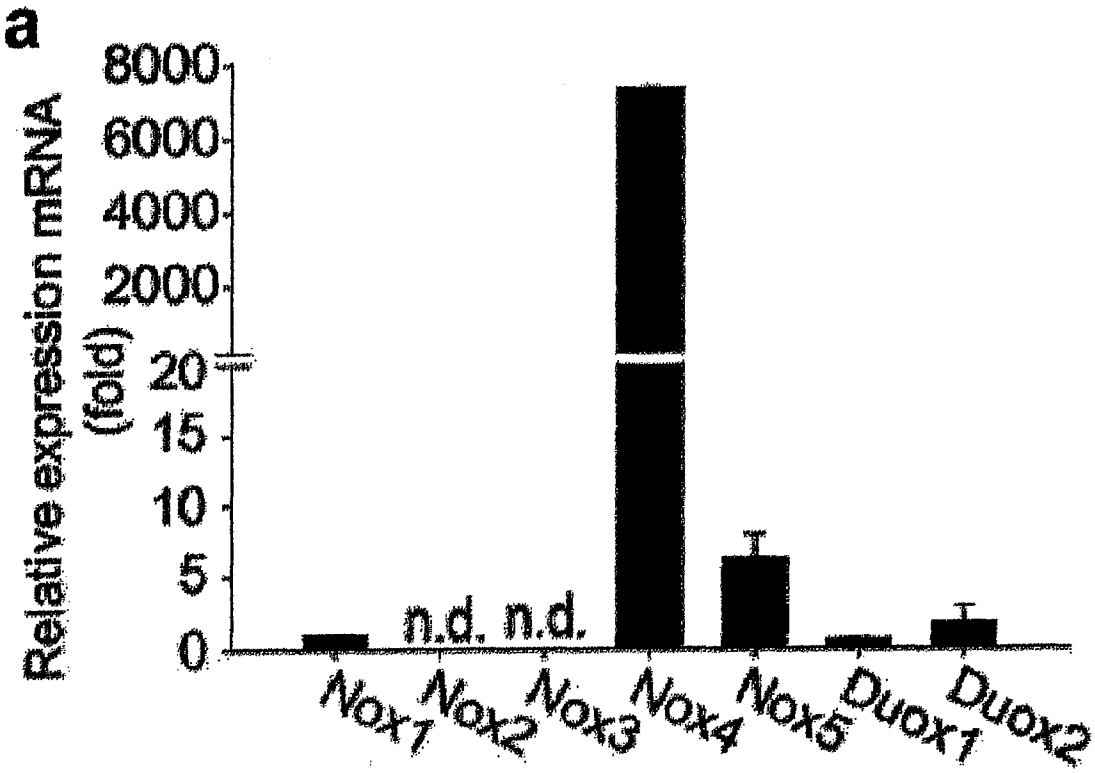

c
H2O2: 0 50 100 (μM)
VEGF: - + - + - +
pY1059
pY1175
mVEGFR2

[Fig. 20]

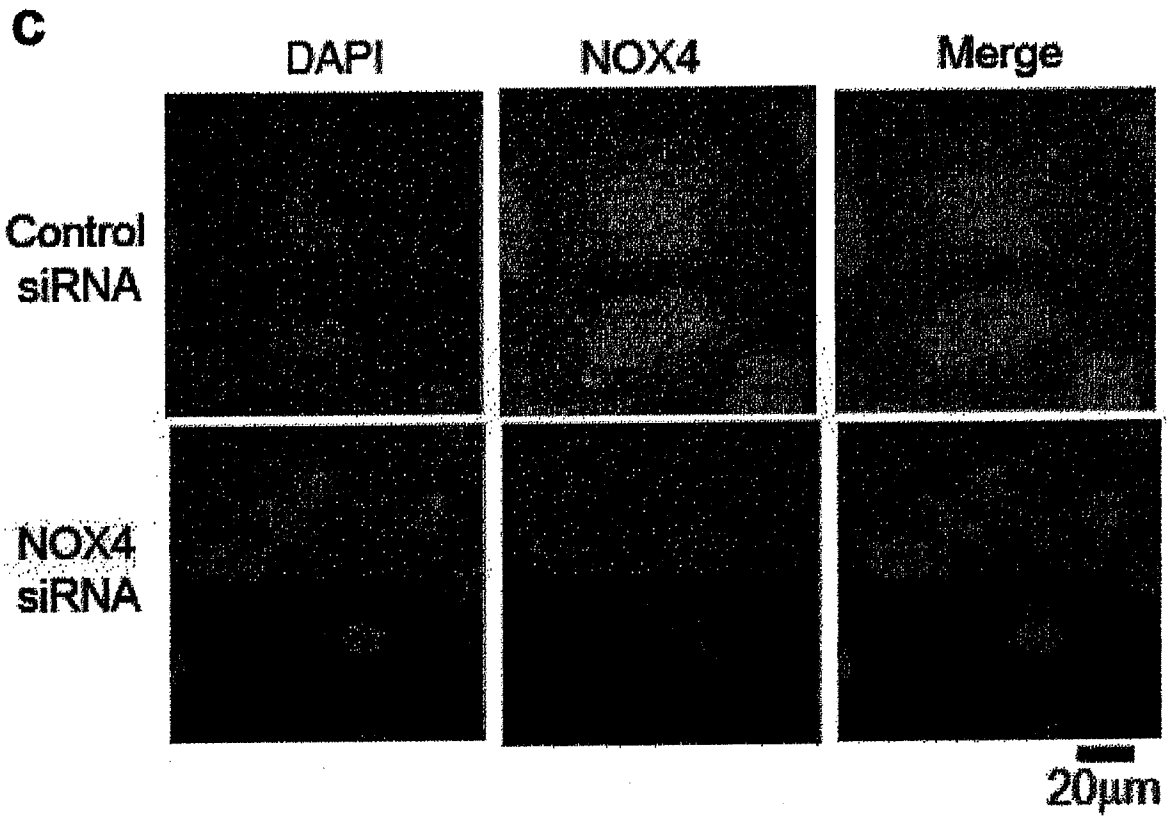

a
mVEGFR2 pY1059
(Arbitrary unit)
120
90
60
30
0
- VEGF
+ VEGF
*
H2O2:
-
+
WT
mVEGFR2 pY1059
(Arbitrary unit)
140
105
70
35
0
- VEGF
+ VEGF
*
H2O2:
-
+
C1199S
mVEGFR2 pY1059
(Arbitrary unit)
140
105
70
35
0
- VEGF
+ VEGF
N.S.
H2O2:
-
+
C1206S


b
mVEGFR2 pY1175
(Arbitrary unit)
100
75
50
25
0
■ - VEGF
□ + VEGF
**
*
N.S.
H2O2:
-
+
WT
C1199S
C1206S

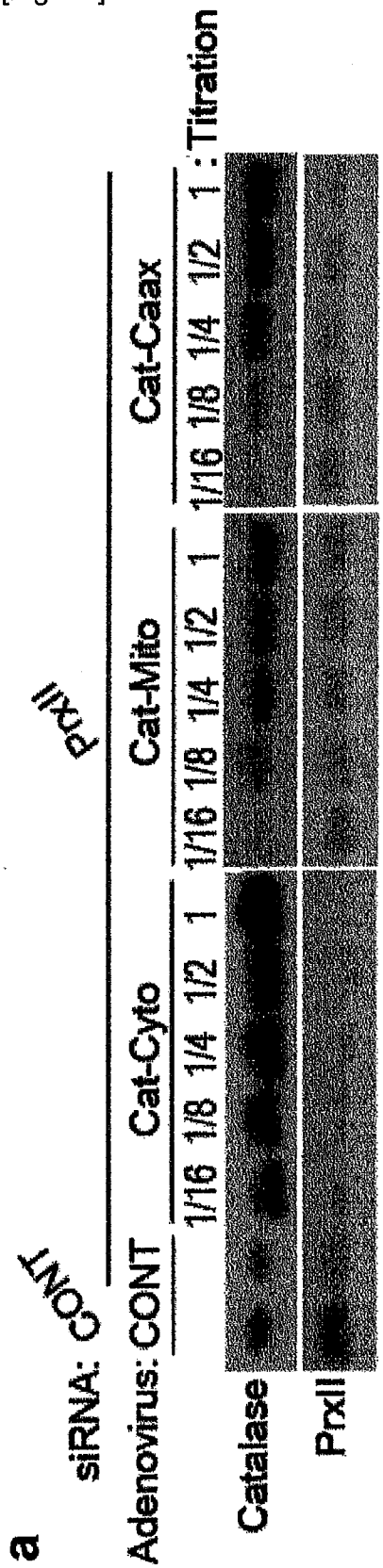
[Fig. 21]

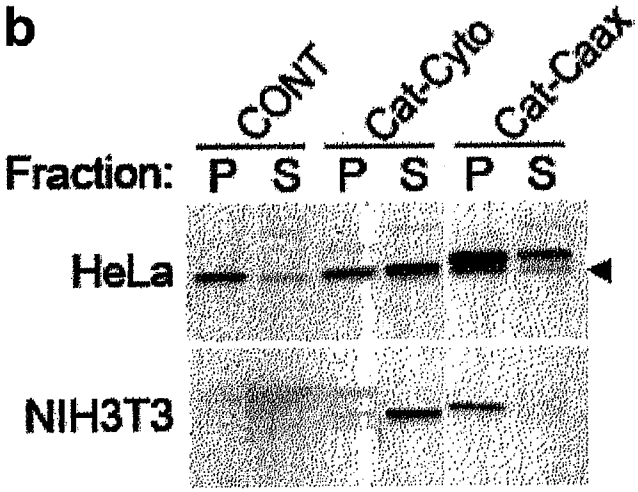

a
Relative expression mRNA (fold)
8000
6000
4000
2000
20
15
10
5
0
n.d. n.d.
Nox1
Nox2
Nox3
Nox4
Nox5
Duox1
Duox2

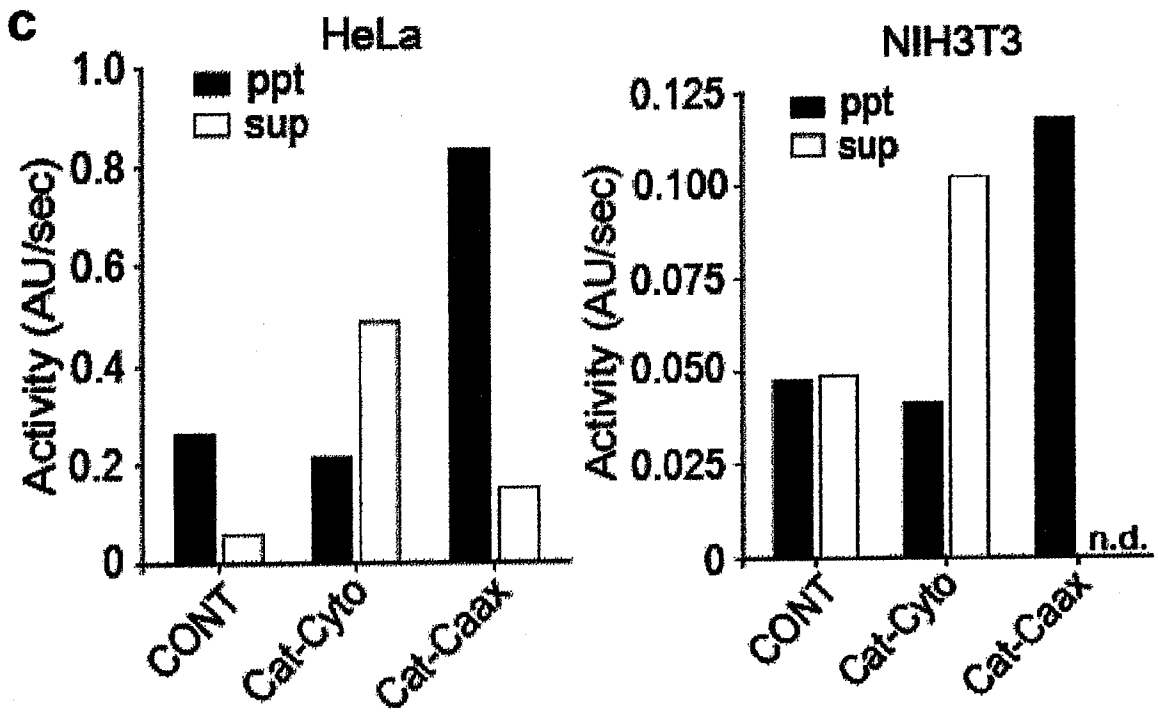

b
siRNA:
CONT
NOX4
(kDa)
175-
83-
62-
48-
32-
IB:
NOX4
Tubulin


C
DAPI
NOX4
Merge
Control siRNA
NOX4 siRNA
20μm

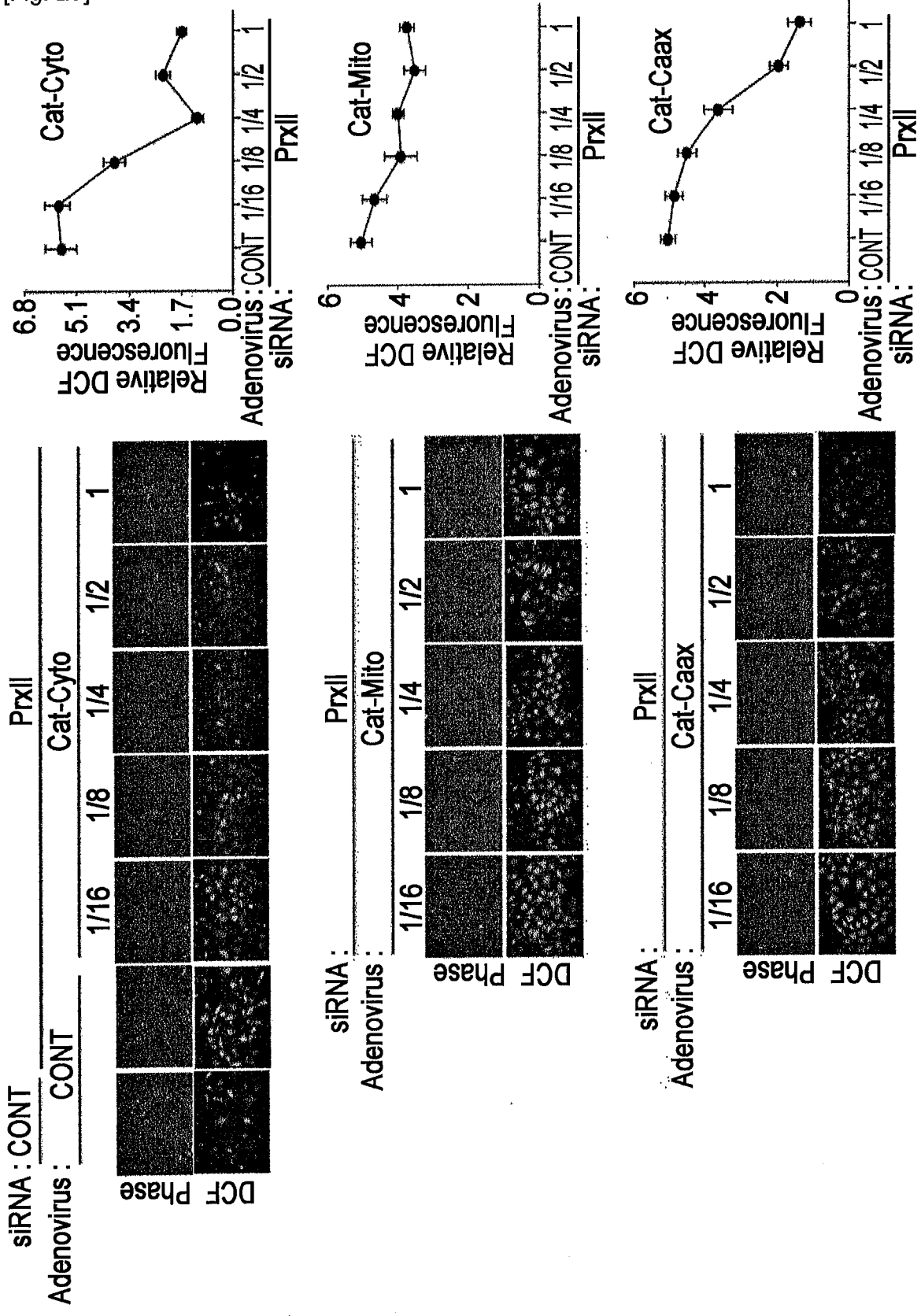
[Fig. 22]


a
siRNA: CONT
PrxII
Adenovirus: CONT
Cat-Cyto
Cat-Mito
Cat-Caax
1/16 1/8 1/4 1/2 1 1/16 1/8 1/4 1/2 1 1/16 1/8 1/4 1/2 1 : Titration
Catalase
PrxII

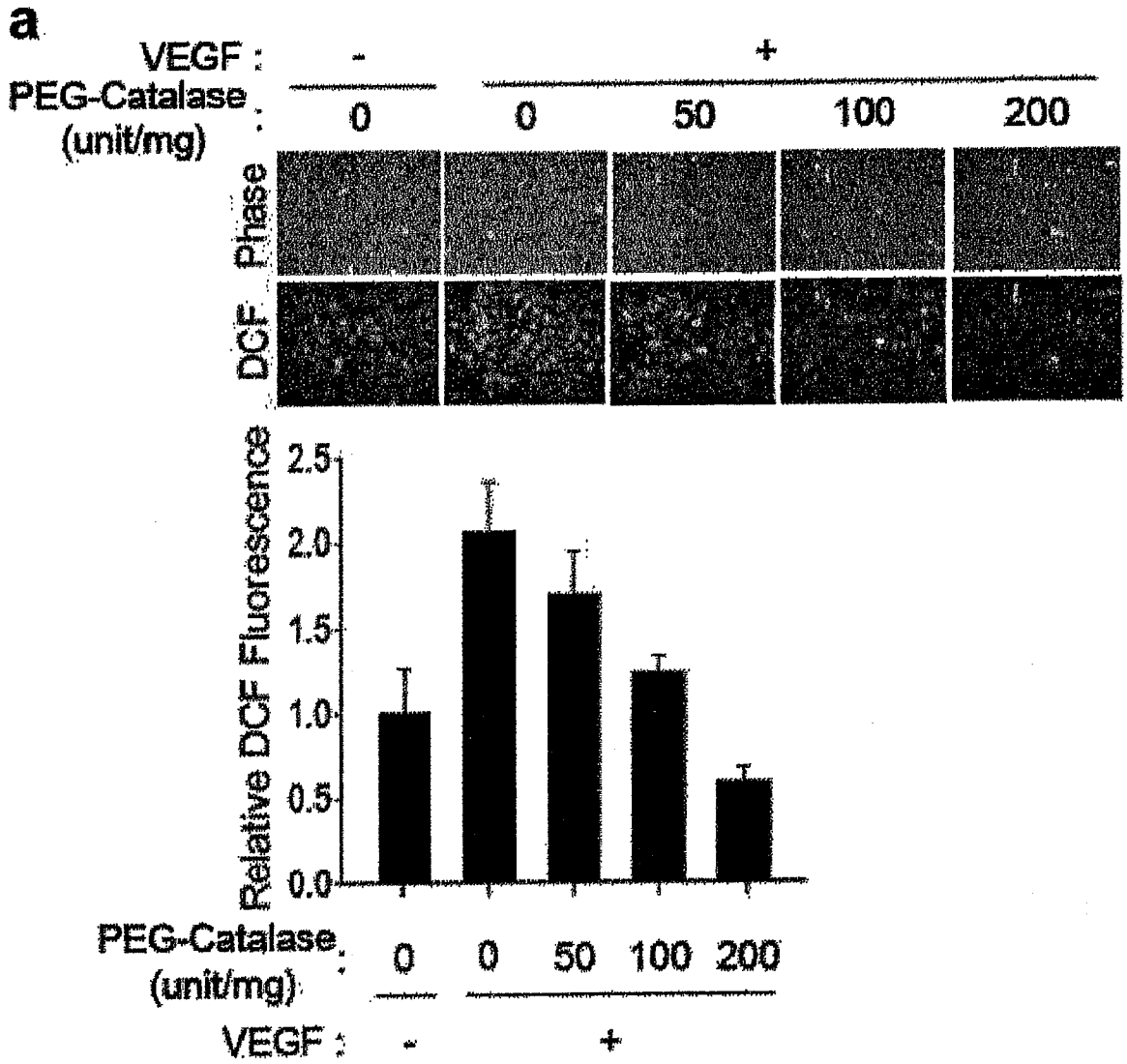

b
CONT
Cat-Cyto
Cat-Caax
Fraction:
P S P S P S
HeLa
NIH3T3

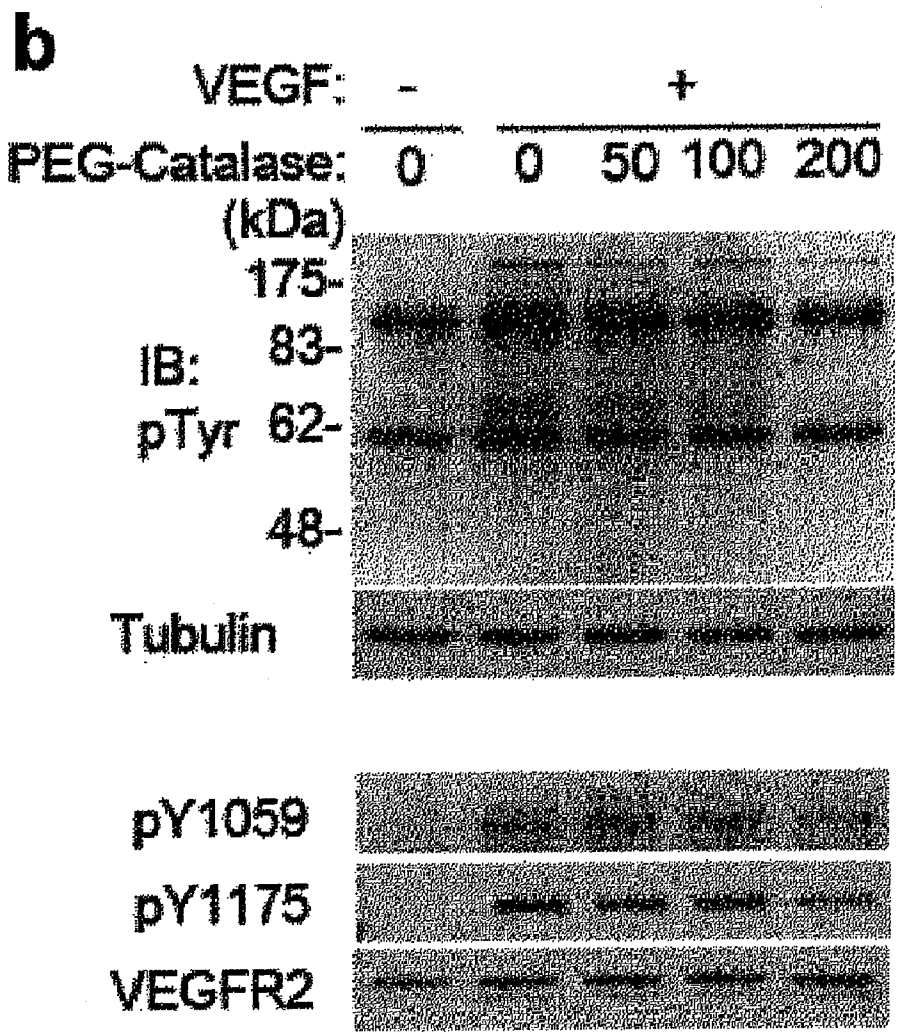

c
HeLa
ppt
sup
Activity (AU/sec)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CONT
Cat-Cyto
Cat-Caax
NIH3T3
ppt
sup
Activity (AU/sec)
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0
n.d.
CONT
Cat-Cyto
Cat-Caax

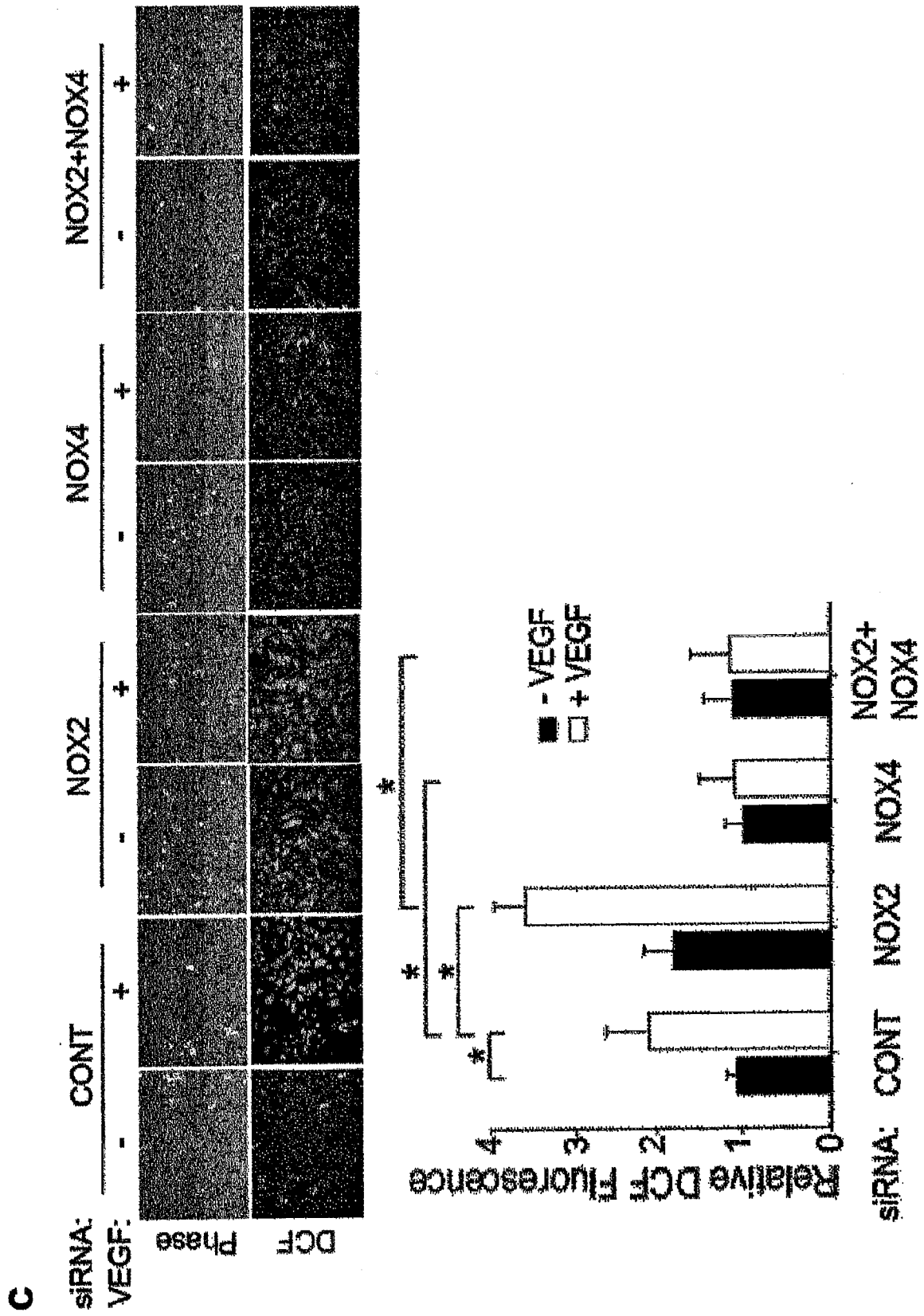
[Fig. 23]


Cat-Cyto
Cat-Mito
Cat-Caax
Relative DCF Fluorescence
6.8
5.1
3.4
1.7
0.0
6
4
2
0
Adenovirus : CONT 1/16 1/8 1/4 1/2 1
siRNA : PrxII
siRNA : CONT
Adenovirus : CONT
1/16 1/8 1/4 1/2 1
DCF Phase

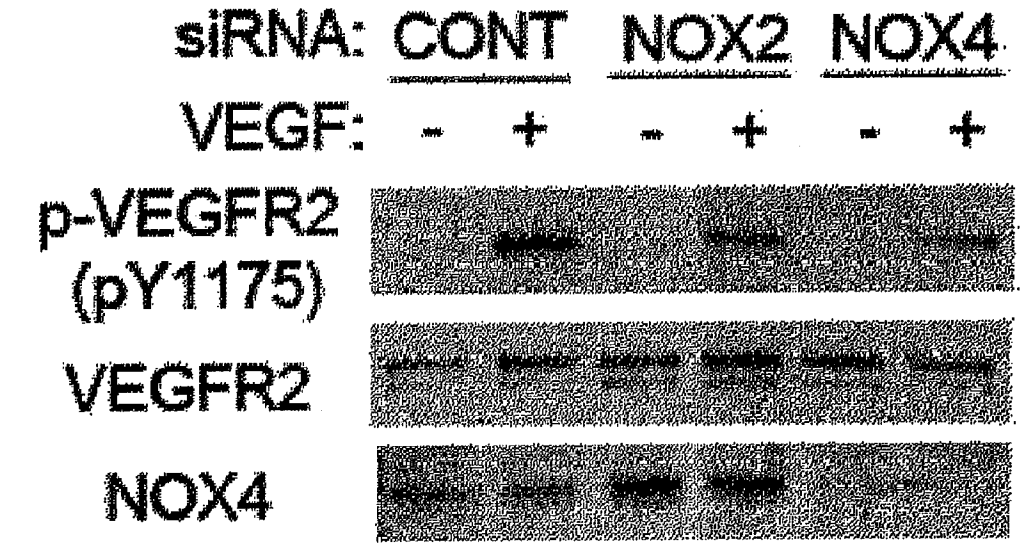
[Fig. 24]


a
VEGF : - +
PEG-Catalase (unit/mg) : 0 0 50 100 200
Phase
DCF
Relative DCF Fluorescence
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PEG-Catalase (unit/mg) : 0 0 50 100 200
VEGF : - +

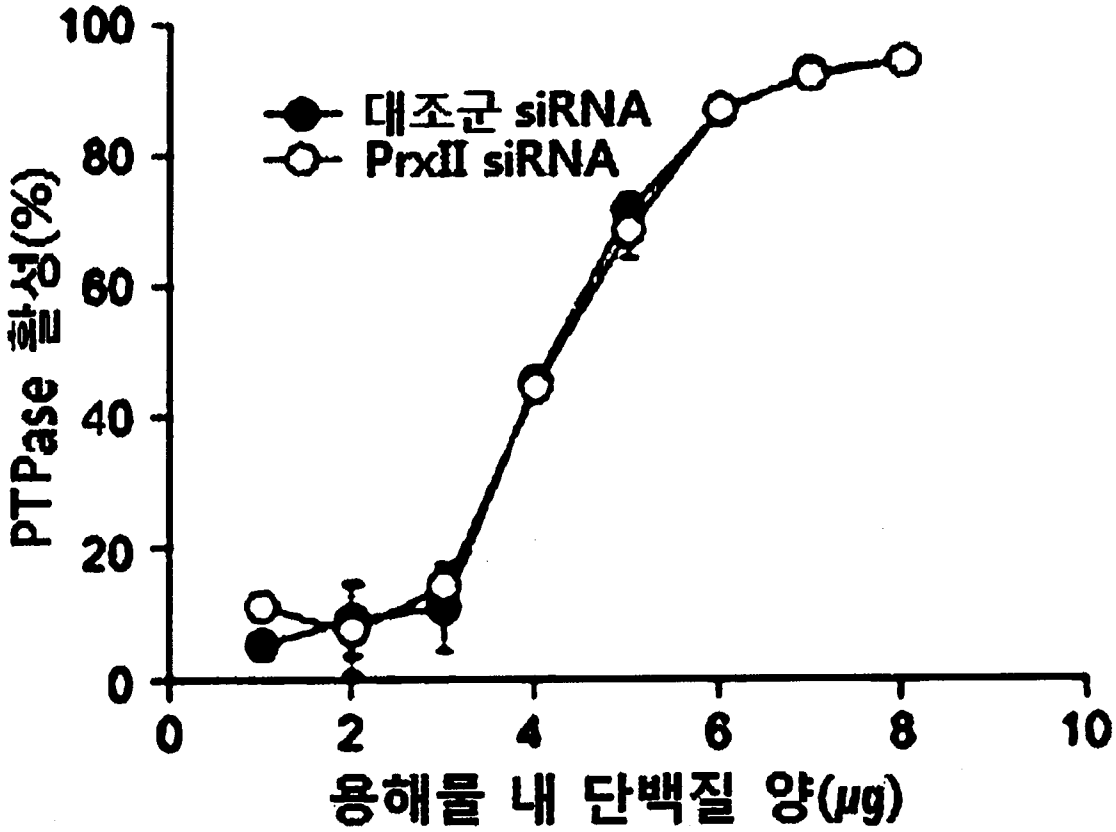

b
VEGF: - +
PEG-Catalase: 0 0 50 100 200
(kDa)
175-
83-
62-
48-
IB:
pTyr
Tubulin
pY1059
pY1175
VEGFR2


C
siRNA:
VEGF:
CONT
NOX2
NOX4
NOX2+NOX4
Phase
DCF
Relative DCF Fluorescence
- VEGF
+ VEGF
siRNA: CONT NOX2 NOX4 NOX2+ NOX4

d



[Fig. 25]


100
80
60
40
20
0
PTPase 활성(%)
대조군 siRNA
PrxII siRNA
0
2
4
6
8
10
용해물 내 단백질 양(μg)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2010/009540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; G06F 19/18; C12N 15/12; C12N 15/113; A61K 48/00; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal), PubMed, Google

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2002-0069392 A (PHARMGENIA CO., LTD.) 04 September 2002 See abstract, the claims.	1-22,27-30
A	KR 10-0605308 B1 (CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 26 July 2006 See abstract, the claims.	1-22,27-30
A	US 2005-0233992 A1 (SILVIU ITESCU) 20 October 2005 See the claims.	1-22,27-30
A	KR 10-0258016 B1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 01 June 2000 See abstract, the claims.	1-22,27-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 SEPTEMBER 2011 (28.09.2011)	**29 SEPTEMBER 2011 (29.09.2011)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2010/009540

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **23-26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 23-26 are a method for suppression of angiogenesis and pertain to a method for treatment of human. Thus, the claims relate to subject matter for which the International Searching Authority is not required to carry out a search under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/KR2010/009540

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2002-0069392 A	04.09.2002	NONE	
KR 10-0605308 B1	26.07.2006	NONE	
US 2005-0233992 A1	20.10.2005	AU 2003-231090 A1	10.11.2003
		AU 2003-231090 B2	01.10.2009
		CA 2482996 A1	06.11.2003
		CN 100379751 C0	09.04.2008
		CN 1662548 A	31.08.2005
		CN 1662548 C0	09.04.2008
		EP 1501852 A2	02.02.2005
		EP 2292631 A1	09.03.2011
		JP 2005-534290 A	17.11.2005
		JP 2011-137011 A	14.07.2011
		US 2003-0199464 A1	23.10.2003
		US 2004-0247564 A1	09.12.2004
		US 2007-0172467 A1	26.07.2007
		US 7887796 B2	15.02.2011
		WO 03-090512 A2	06.11.2003
		WO 03-090512 A3	06.11.2003
KR 10-0258016 B1	01.06.2000	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2010/009540

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 38/16; G06F 19/18; C12N 15/12; C12N 15/113; A61K 48/00; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), PubMed, Google

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2002-0069392 A (주식회사 팜제니아) 2002.09.04 요약; 청구항 참조.	1-22,27-30
A	KR 10-0605308 B1 (전남대학교산학협력단) 2006.07.26 요약; 청구항 참조.	1-22,27-30
A	US 2005-0233992 A1 (SILVIU ITESCU) 2005.10.20 청구항 참조.	1-22,27-30
A	KR 10-0258016 B1 (한국과학기술연구원) 2000.06.01 요약; 청구항 참조.	1-22,27-30

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2011년 09월 28일 (28.09.2011)	**2011년 09월 29일 (29.09.2011)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
박정웅
전화번호 82-42-481-8131

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2010/009540

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **2**의 계속**)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **23-26**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제23-26항은 혈관신생 억제방법을 청구하고 있으며, 이는 사람의 치료 방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **3**의 계속**)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2010/009540

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2002-0069392 A	2002.09.04	없음	
KR 10-0605308 B1	2006.07.26	없음	
US 2005-0233992 A1	2005.10.20	AU 2003-231090 A1	2003.11.10
		AU 2003-231090 B2	2009.10.01
		CA 2482996 A1	2003.11.06
		CN 100379751 C0	2008.04.09
		CN 1662548 A	2005.08.31
		CN 1662548 C0	2008.04.09
		EP 1501852 A2	2005.02.02
		EP 2292631 A1	2011.03.09
		JP 2005-534290 A	2005.11.17
		JP 2011-137011 A	2011.07.14
		US 2003-0199464 A1	2003.10.23
		US 2004-0247564 A1	2004.12.09
		US 2007-0172467 A1	2007.07.26
		US 7887796 B2	2011.02.15
		WO 03-090512 A2	2003.11.06
		WO 03-090512 A3	2003.11.06
KR 10-0258016 B1	2000.06.01	없음	