

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 7월 7일 (07.07.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/081229 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/7105 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2009/007902

(22) 국제출원일: 2009년 12월 29일 (29.12.2009)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

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

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University-Industry Collaboration Foundation)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 번지 이화여자대학교, 120-750 Seoul (KR).

(72) 발명자: **김**

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **강상원 (KANG, Sang Won)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 잠원동 53-15 강변아파트 4 동 1101 호, 137-794 Seoul (KR). **강동훈 (KANG, Donghoon)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 야탑동 탑마을아파트 609-701, 463-070 Gyeonggi-do (KR). **이두재 (LEE, Doo Jae)** [KR/KR]; 서울특별시 서

초구 방배본동 삼호아파트 3 동 403 호, 137-759 Seoul (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)** 등; 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 Seoul (KR).

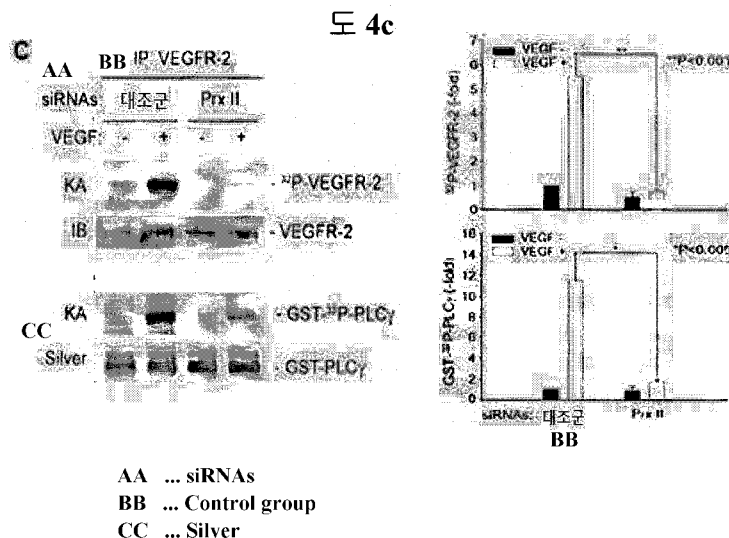
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR INHIBITING ANGIOGENESIS

(54) 발명의 명칭 : 혈관신생 억제용 약제학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition including a Peroxiredoxin II (Prx II) inhibitor, to a method for inhibiting angiogenesis, and to a screening method for inhibiting angiogenesis by using Prx II. According to the present invention, the expression of the Prx II gene or the Prx II protein can be inhibited by increasing oxidative inactivation of a VEGF-induced receptor tyrosine kinase (RTK) and reducing VEGF signaling, and using same to screen a novel anti-angiogenesis agent. Accordingly, the composition and method of the present invention can be used for the prevention or treatment of various diseases, ailments, and conditions related to angiogenesis.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2011/081229 A1

**규칙 4.17 에 의한 선언서:**

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 퍼록시레독신 II(Prx II) 억제제를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 억제방법, 및 Prx II 를 이용한 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF-유도된 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시켜 VEGF 시그널링을 감소시키며 이를 이용하여 신규한 항혈관신생 물질을 스크리닝할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 혈관신생과 관련된 다양한 질환, 질병 또는 상태를 예방 또는 치료하는 데 이용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

혈관신생 억제용 억제학적 조성물

5 【기술 분야】

본 발명은 퍼록시레독신 II(Prx II) 억제제를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 억제방법, 및 Prx II 를 이용한 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

10 【배경 기술】

동맥 벽은 주로 혈관 평활근세포(VSMC) 및 혈관 내피세포(VEC)로 이루어져 있으며 염증, 고혈압, 지방 침전 등과 같은 여러 가지 환경에 따라 손쉽게 손상된다. 예를 들어, 지방 소립(lipid droplet), 지방이 축적된 거대세포 및 괴사성 세포체를 포함하는 아테롬성 동맥경화 플라크(plaque)의 형성 및 파열은 내피 손상을 야기하여 혈전증을 일으킨다(Mackman N., Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 2008 Feb 21;451(7181): 914-918; Glass, C. K. and Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 2001 Feb 23;104(4): 503-516). 더 나아가, 플라크를 제거하여 폐색성 혈관 면적을 확장시키는 풍선 카테터(balloon catheter)의 임상적 이용은 항상 병증 또는 근처 부위에서 내피세포의 대량 탈락(denudation)을 동반한다. 이에 따라, 인공 물질의 이식 후에, 내막 증식 및 혈전증이 재발하여 혈관의 혈관성형(angioplastic) 부위가 재협착이라 불리는 과정을 통해 폐색된다. 따라서, 혈관 내피의 회복은 손상된 동맥 혈관의 치료에서 매우 중요한 단계이다. 혈관계(vasculature)에 관여하는 시그널 전달과정에 있어서, PDGF/PDGFR- β 및 VEGF/VEGFR-2(KDR/Flk-1 로 불리기도 함) 경로는 각각 VSMCs 및 VECs 의 증식, 화학주성 이동 및 생존을 조절하는 주요한 성장인자 시그널링이다(Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2006 May 7(5): 359-371; Heldin, C. H. and Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth

factor. *Physiol Rev.*, 1999 Oct 79(4): 1283-316). VEGFR 및 PDGFR 은 7 개의 세포외 면역글로불린 도메인, 막관통 도메인 및 분할 키나제 도메인을 갖는다는 점에서 수용체 타이로신 키나제(RTK) 슈퍼패밀리의 같은 아군(subclass)에 속한다. 그들은 많은 다운스트림 시그널링 이벤트를
5 공유한다. 손상된 동맥 혈관에서 PDGF/VEGF 시그널링의 상호 간 조절이 내피세포의 재생과 함께 VSMCs 의 신생내막 증식(neointimal hyperplasia)을 억제하기 위해 일차적으로 필요하다.

최근에, 초과산화물($O_2^{\bullet-}$) 및 과산화수소(H_2O_2) 같은 활성산소종(ROS)이 수용체-매개된 신호전달과정에서 이차 전달자로서
10 포함되어 있음이 알려지고 있다(Rhee, S. G., Cell signaling. H_2O_2 , a necessary evil for cell signaling. *Science*, 2006 Jun 30; 312(5782): 1882-3; Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.*, 2003 Apr 15(2): 247-254). 흥미롭게도, PDGF 는 혈관 평활근세포(VSMC)에서 ROS 의 세포내 발생을 유도하는 첫 번째
15 성장인자이다(Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K. and Finkel, T. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995 Oct 13 270(5234): 296-299). 본 발명 초기의 개척 연구에서, 카탈라제를 이용하여 ROS 인 H_2O_2 이 포함되어 있음을 밝혔다. 이후, 수용체-매개된 ROS 생산 및 이의
20 다운스트림 시그널링 이벤트와의 연관성에 대한 많은 예들이 보고되어졌으며(Lander, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.*, 1997 Feb 11(2): 118-24), 많은 경우에서 단백질 타이로신 포스파타제(PTP)의 산화적 불활성화가 상술한 시그널링 기능에 아래에 존재하는 기작일 것으로 추측되었다(Rhee,
25 S. G., Bae, Y. S., Lee, S. R., and Kwon, J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE.*, 2000 Oct 10 2000(53): PE1). 또한, ROS 의 기능은 혈관신생 과정 뿐 아니라, VEGF/VEGFR-2 시그널링 경로에 포함되어 있다(Roy, S., Khanna, S., and Sen, C. K. Redox regulation of the VEGF
30 signaling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing.

Free Radic Biol Med., 2008 Jan 15 44(2): 180-192; Abid, M. R., Spokes, K. C., Shih, S. C., and Aird, W. C. NADPH oxidase activity selectively modulates vascular endothelial growth factor signaling pathways. *J Biol Chem.*, 2007 Nov 30 282(48): 35373-85.; Colavitti, R., Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Borrello, S., Waltenberger, J., Galeotti, T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem.*, 2002 Feb 1 277(5): 3101-8). NADPH 산화효소가 두 RTK(VEGFR 및 PDGFR) 시그널링 경로에서 ROS-발생 효소로 제안되었다(Ushio-Fukai, M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal.*, 2007 Jun 9(6): 731-9; Bae, Y. S., Sung, J. Y., Kim, O. S., Kim, Y. J., Hur, K. C., Kazlauskas, A., Rhee, S. G. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.*, 2000 Apr 7 275(14): 10527-31). 하지만, VEGF 시그널링에서 내인성 ROS 조절자나 ROS 의 활동 기작(mode)에 대해서는 어떠한 연구도 이루어져 있지 않다.

알킬 과산화물 환원효소/Prx 산화환원 효소 슈퍼패밀리에 속하는 포유류의 2-cys 퍼록시레독신(2-cysPrx) 소그룹의 멤버들은 ROS 를 해당 알코올로 환원(시키는 새로운 형태의 산화환원 효소이다. 예를 들어, 티오레독신 및 티오레독신 환원효소로 구성된 전자-수송(electron-conveying) 시스템을 통해 NADPH로부터 유래한 전자를 이용하여 H₂O₂ 를 물로 환원시킨다(Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S., Woo, H. A. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.*, 2005 Apr 17(2): 183-9). 다섯 개의 포유류 2-cysPrx 아이소형 중에서, 두 개의 세포질 아이소형인 Prx I 및 Prx II 이 수용체-매개된 신호전달과정에 포함되어 있다(Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S., Woo, H. A. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.*, 2005 Apr 17(2): 183-9). 특히, 본 발명자들은 Prx II 가 PDGF 시그널링에서 H₂O₂-매개된 단백질 타이로신 인산화의 음성적인 내인성

조절자라는 것을 최근에 밝혔다(Choi, M. H., Lee, I. K., Kim, G. W., Kim, B. U., Han, Y. H., Yu, D. Y., Park, H. S., Kim, K. Y., Lee, J. S., Choi, C., Bae, Y. S., Lee, B. I., Rhee, S. G., Kang, S. W. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II.

- 5 *Nature*, 2005 May 19 435(7040): 347-53). 즉, Prx II-결핍된 배아 섬유아세포 및 VSMCs 에서, PDGF-BB 에 대한 반응으로 H_2O_2 의 세포내 레벨이 증가되고 PDGFR- β 의 Tyr 857 및 Tyr 579/581 위치에서 자가 인산화가 선택적으로 증가되었다. 이로 인해서, 포스포리파제 C- γ 1 의 활성이 증가되어서 PDGF-BB 를 향한 증식 및 화학주성 이동이 증가되었다. 막
- 10 PTP 의 불활성화-재활성화 주기가 Prx II 에 의한 PDGFR- β 인산화의 선택적 조절의 아래에 위치한 기작으로 제안되었다(Kang, S. W., Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., Choi, M. H. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol Med.*, 2005 Dec 11(12): 571-8).

15

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.

20

【발명의 상세한 설명】

- 본 발명자들은 신규한 항혈관신생 물질을 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 세포 내 2-cys 퍼록시레독신(2-cysPrx), 예컨대 퍼록시레독신 II(Prx II)의 발현을 억제(약화)하면 VEGF
- 25 시그널링을 감소시킴으로써 혈관신생을 억제할 수 있으며, 이를 이용하여 다양한 혈관신생-관련 질환, 질병 또는 상태를 치료 또는 예방할 수 있다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 혈관신생 억제용 억제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

- 30 본 발명의 다른 목적은 혈관신생 억제방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명,
5 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈관신생억제용 약제학적 조성물을 제공한다.

10 본 발명의 다른 양태에 따르면, Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제방법을 제공한다.

본 발명자들은 신규한 항혈관신생 물질을 발굴하고자 예의 연구
15 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 세포 내 2-cys 퍼록시레독신(2-cysPrx), 예컨대 퍼록시레독신 II(Prx II)의 발현을 억제(약화)하여 VEGF 시그널링을 감소시킴으로써 혈관신생을 억제할 수 있으며, 이를 이용하여 다양한 혈관신생-관련 질환, 질병 또는 상태를 치료 또는 예방할 수 있다는 것을 발견되었다.

20 퍼록시레독신(Prx)는 살아있는 생물체에서 과산화수소 및 알킬 과산화물을 제거하는 기능을 한다(Chae, H. Z. *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 91: 7017-7021(1994)). 포유류에는 독특한 여섯 개의 Prx 아이소형(Prx I-Prx VI)이 있으며 다양한 조직에서 발현한다. 이들은 인 *비보*에서 항-산화 활성을 가지는 것으로 알려져왔다. 또한, Prx 는 세포
25 증식 및 분화, NK(natural killer)세포 활성의 증진, 래디컬-민간성 단백질의 보호, heme 대사 및 세포 내 시그널링 같은 다양한 세포 내 기능들에 관여한다. 다양한 생화학적 연구 결과에 따르면, Prx 가 세포내 산화환원 상태를 유지하기 위해 매우 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. 특히, Prx II 는 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF) 및 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)를 포함하는
30 성장인자에 대한 반응으로 생산되는 내인성 H_2O_2 를 제거하는 세포 내

퍼옥시다제로, 세포질에 풍부하며 내재성 막단백질 또는 세포막에 결합할 수 있다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 Prx II 는 VECs(vascular endothelial cells)에서 VEGF(vascular endothelial growth factor) 시그널링을
5 양성적으로(positively) 조절한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Prx II 는 세포 내, 보다 바람직하게는 혈관 내피세포(vascular endothelial cells, VECs) 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 제거하는 활성을 가진다. Prx II 는 세포 내 활성 산소종(특히, H_2O_2)을 제거함으로써, VEGFR(vascular
10 endothelial growth factor receptor)의 산화적 불활성화를 억제할 수 있다. 따라서, Prx II 를 조절하여 VEGF 시그널링을 조절할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF(vascular endothelial growth factor) 시그널링을 감소시킨다. 본 명세서에서 용어 “Prx II 단백질
15 억제(inhibition of the Prx II protein)”는 Prx II 단백질의 발현 억제 또는 활성 억제를 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 Prx II 단백질의 활성을 억제하는 것이다.

보다 상세하게는, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 억제는 활성화된 VEGFR, 바람직하게는 VEGFR-2, 즉 VEGFR-2 인산화의
20 감소를 유발하여 VEGF 시그널링을 감소시킨다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 억제에 따라 상술한 VEGFR-2 에서 951 번째, 1059 번째, 1175 번째, 및 1214 번째 타이로신 잔기들의 인산화가 감소된다. 이는 VEGFR-2 의 활성 감소를 초래하기 때문에 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 억제를
25 통해 VEGF 시그널링을 감소시킬 수 있다(참조: 도 5).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질의 억제를 통하여 억제되는 시그널링은 VEGF-A, VEGF-C 또는 VEGF-E 에 의해 매개되는 시그널링이고, 보다 바람직하게는 VEGF-A 에 의해 매개되는 시그널링이다.

30 본 발명에 따르면, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 세포 내 VEGF 시그널링의 억제 또는 감소를 유발하여

다운스트림 시그널링 분자들의 발현 또는 활성을 감소시킨다. 이러한 VEGF 시그널링의 억제 또는 감소는 세포의 증식 및 화학주성(chemostatic) 이동을 감소시켜 혈관신생을 억제시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 VEGF 시그널링의
5 억제 또는 감소는 내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 또는 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 억제하거나, 또는 VEGF-유도된 cGMP의 생산을 감소시킨다.

본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF-유도된 수용체
10 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시킨다. 보다 바람직하게는, 상술한 RTK는 VEGFR-2의 RTK이다.

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
15 잔기만을 선택적으로 표지하는 형광표지된 말레이미드를 사용하였다. 하기의 실시예에서 볼 수 있듯이, Prx II 억대된 VECs에서 VEGFR-2의 시스테인 잔기의 산화가 현저히 증가됨을 확인할 수 있었다(참조: 도 6).

상술한 바와 같이, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 억제제는 VEGFR-2의 활성화, 즉 인산화를 억제하여 혈관신생을
20 억제한다. 이러한 VEGFR-2의 활성화 억제는 VEGFR-2의 다운스트림 시그널링을 억제함으로써, 다양한 약리학적 활성을 발휘한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 억제제는 e-NOS와 ERK의 VEGF-유도된 활성화를 선택적으로 저해하고, VEGF에 의해 유도되는 혈관내피세포의 증식, 이동 및 튜브형성을 억제하며,
25 결과적으로 혈관신생을 억제한다.

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
30 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 켈로이드, 상처 과립화, 류마티스 관절염, 골관절염,

자가면역 질환, 크론씨병, 아테롬성 동맥경화, 캣 스크래치 질환, 퀘양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환이다.

- 5 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 자가면역질환은 알로페시아 그레아타(alopecia greata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 아디슨 질환, 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, Churg-Strauss 증후군, 반흔성유천포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론씨병, 원판성 낭창, 복태성복합한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 켈레인 바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, IgA
- 10 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,
- 15 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포 동맥염, 퀘양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 염증성 질환의
- 25 예는, 천식, 엔세팔리티스(encephilitis), 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.

- 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는
- 30 치료될 수 있는 질병, 질환 또는 상태는 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증,

아테롬성 동맥경화 플라크 내에서의 모세혈관 증식, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 아테롬성 동맥경화, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환이다.

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.

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

본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 억제제의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

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, 텍스트로스, 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.

본 발명의 약제학적 조성물은 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.

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
5 0.001-100 mg/kg(체중)이다.

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
10 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 조성물에서 유효성분으로 이용되는 Prx II 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II 단백질의 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 올리고뉴클레오타이드, 항체, 펩타이드, 작은 분자량의 화합물 및 천연추출물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
15

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

본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA 의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 서열은 Prx II mRNA 에 상보적이고 Prx II mRNA 에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을
20 의미하고, Prx II mRNA 의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al.,
30 *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55(1995)). 핵산 골격은

포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 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, 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 핵실아미노-카르보닐-옥시콜에스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제 5,138,045 호, 제 5,218,105 호 및 제 5,459,255 호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(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.

본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업계에

공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다(Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55:334-358(1999).

본 명세서에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 억제 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다.

본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스 가닥(Prx II mRNA 서열에 상응하는 (corresponding) 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.

siRNA는 RNA 끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(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.

siRNA 말단 구조는 Prx II 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

본 발명에서 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-

앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi 를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

본 발명에서 Prx II 단백질의 억제, 특히 활성을 억제하는 이용되는 억제제는 바람직하게는 Prx II 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드, 5 작은 분자량의 화합물 또는 천연추출물이다.

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 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and 10 Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제 4,816,56 호) 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. and Lane, D., *Using Antibodies: A* 15 *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan , *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991 에 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 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 Prx II 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 20 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

Prx II 에 특이적으로 결합하여 Prx II 의 활성을 억제할 수 있는 펩타이드는 당업계에 공지된 통상의 방법, 예를 들어 파아지 디스플레이 방식으로 얻을 수 있다(Smith GP, "Filamentous fusion phage: novel 30 expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". *Science* 228 (4705):1315-1317(1985); Smith GP, Petrenko VA, "Phage display". *Chem. Rev.* 97(2):391-410(1997)).

Prx II 의 활성을 억제하는 작은 분자량의 화합물은 후술하는 스크리닝 방법을 통하여 용이하게 얻을 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) Prx II 단백질 또는
 5 Prx II 를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을
 처리하는 단계; 및 (b) 상기 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II 의 발현을
 분석하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법으로, 상기
 시험물질이 Prx II 의 활성 또는 발현을 억제시키면 혈관신생 억제제로
 판단된다.

10 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 스크리닝 하여 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.

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

본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 Prx II 단백질은
 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어,
 20 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대,
 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린
 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(fluorescein Isothiocyanate),
 25 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine 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.

30 검출가능한 표지가 레이블링된 Prx II 단백질 또는 시험물질을
 이용하는 경우, Prx II 단백질과 시험물질 사이의 결합 발생 여부는

표지로부터 나오는 시그널을 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 and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), *o*-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

택일적으로, 시험물질의 Prx II 단백질로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 Prx II 단백질에 결합하는 지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 셀이 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시험물질과 Prx II 단백질 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., *Science* 257:1906-1912(1992)).

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

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., *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura et al., *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel et al., *BioTechniques* 14, 920-924,

1993; Iwabuchi et al., *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; 및 WO 94/10300). 이 경우, Prx II 단백질을 베이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, Prx II 단백질에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝할 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 전사인자(예컨대, GAL-4)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 인 비보에서 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.

본 발명의 방법에 따르면, 우선 Prx II 단백질에 분석하고자 하는 시험물질을 접촉시킨다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 Prx II 단백질의 활성화에 영향을 미치는 지 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), Brandon 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 어드레스블 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.

- 5 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.

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

- 본 발명의 스크리닝 방법을 Prx II 의 발현을 분석하여 실시하는 경우, 15 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 and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 20 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.

- RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시험물질을 처리한 25 세포에서 총 RNA 를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제 1 쉘 cDNA 를 제조한다. 이어, 제 1 쉘 cDNA 를 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.

- 30 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 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 스크리닝 방법에 의해
 5 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
 10 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

15 (a) 본 발명은 퍼록시레독신 II(Prx II)를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 억제방법, 및 이를 이용한 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

(b) 본 발명에 따르면, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF-유도된 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine
 20 kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시켜 VEGF 시그널링을 감소시킨다.

(c) 또한, Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제를 이용하여 신규한 항혈관신생 물질을 스크리닝할 수 있다.

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

25

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 Prx II 억제가 VEGF 에 대한 내피세포 반응성을 감소시킨다는 것을 나타낸다. A. VSMCs 및 VECs 에서 Prx I 및 Prx II 의 발현 레벨을 나타낸다. B. VECs 에서 VEGF-유도된 ROS 생산을 측정
 30 결과이다(n = 3, *P < 0.001). C 및 D. VECs 에서 VEGF-유도된 타이로신 인산화를 테스트한 결과이다. E. VEGF-처리된 VECs 에서 다운스트림

시그널링 분자의 활성화를 보여준다. F. VECs 에서 cGMP 레벨의 측정된 그래프이다($n = 4$, $*P < 0.02$).

도 2 는 VEGF 로 자극된 VECs 에서 Prx I 억제의 효과를 나타낸다. 루시퍼라제 siRNA(대조군) 및 Prx I siRNA 를 VECs 에 24 시간 동안 트랜스펙션한 후, 성장인자 보충물의 부재 하에서 0.5% 우태아혈청을 포함하는 EGM 배지에서 24 시간 동안 추가적으로 배양하였다. A. VECs 에서 VEGF-유도된 ROS 생산을 측정한 결과이다. 대표적인 이미지가 보여진다. 데이터는 현미경 상에서 관찰되는 30-50 개의 세포로부터 얻어진 평균적인 DCF 형광의 평균 $\pm$ 평균값의 표준오차이다($n = 3$, CONT siRNA -VEGF 군과 비교하여 N.S. 유의하지 않음). B. Prx I 억제에 의한 HAEC 의 VEGF-유도된 타이로신 인산화를 보여주는 결과이다.

도 3 는 Prx II 억제가 VEGF 에 대한 내피세포 표현형의 변형을 직접적으로 보여준다. A 및 B. VEGF-의존적 VEC 증식(A) 및 화학주성 이동(B)을 보여주는 그래프이다($n = 3$, $**P < 0.002$, $***P < 0.005$). C. VEGF-유도된 VECs 의 튜블 형성을 테스트한 결과이다($n = 4$, $**P < 0.001$). 대표적인 블롯들이 보여진다($n = 3$).

도 4 는 Prx II 가 VEGFR-2 수용체 타이로신 키나제의 산화적 불활성화를 조절한다는 것을 나타낸다. A. VEGF 에 의해 유도된 VEGFR-2 의 타이로신 위치-특이적 인산화. 그래프에 있는 데이터는 포스포-특이적 밴드 대 상응하는 VEGFR-2 밴드의 상대적인 강도를 나타내는 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다($n = 4$, $*P < 0.005$, $**P < 0.002$, $***P < 0.0001$). B. VEGF-처리된 VECs 에서 VEGFR-2 TRK 활성화를 테스트한 결과이다. VEGFR-2 및 GST-PLC γ 1 에 대한 인/비트로 키나제 어세이를 수행한 결과이다. 데이터는 RTK 활성의 유도배수(fold induction)를 평균 $\pm$ 표준편차로 나타낸 것이다($n = 3$, $*P < 0.005$, $**P < 0.001$). C. 인간 Prx II 야생형(P) 및 활성-제거(activity-dead) 돌연변이(CS)를 발현하는 Prx II^{-/-} VECs 에서 VEGFR-2 활성화를 측정한 결과이다. 대표적인 블롯이 보여진다($n = 3$). D. H₂O₂-처리된 VECs 에서 VEGFR-2 및 MAPK 인산화 정도를 나타내는 결과이다. 그래프에 있는 데이터는 pY 1175 밴드 대 상응하는 VEGFR-2 밴드의 상대적인 강도를 나타내는 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다($n = 3$, $*P < 0.001$).

도 5 는 VEGFR 발현(A), VEGF 결합(B) 및 PTPase 활성(C)에 대한 Prx II 억다운의 효과를 나타낸다. 어세이 전에 루시퍼라제 siRNA(C) 및 Prx II siRNA(P)를 VECs 에 24 시간 동안 트랜스펙션하였다. A. 전체 RNA 를 추출한 후 지정된 유전자에 대한 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR 을 실시하였다. B. VECs 가 24 시간 동안 혈청-결핍된 후 80 pM 125 I-VEGF 와 지정된 시간 동안 반응되었다. 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 세 번 린스한 후 γ -신틸레이션 카운터(Wallac, MicroBeta[®] TriLux 1450)에서 방사능을 측정하였다. C. 제조자의 프로토콜에 따라 폴리-(Glu₄-pTyr) 펩타이드로 코팅된 96-웰 플레이트에서 PTPase 활성(Universal tyrosin phosphatase assay kit, Takara Bio., MK-411)을 측정하였다. $y=1.390x^{-0.783}$ (x = PTP 활성, y = OD₄₅₀) 방정식을 이용하여 PTPase 활성을 계산하였다. 데이터는 PTPase 활성에 대한 평균 $\pm$ 표준편차이다($n = 3$).

도 6 은 VEGFR-2 의 산화적 불활성화가 시스테인 잔기의 산화에 의한 것임을 보여주는 결과이다. A. 반응성 시스테인과 플루오로포어-컨쥬게이션된 말레이미드의 도식을 나타낸다. B. Prx II-제거된 VECs 에서 DTT 환원 전 및 후의 VEGF-2 에서 반응성 시스테인의 표지를 보여주는 결과이다. 데이터는 형광 밴드 대 상응하는 VEGFR-2 밴드의 상대적인 강도를 나타내는 평균 $\pm$ 표준편차를 의미한다($n = 3$, $*P < 0.005$).

도 7 은 Prx II 가 마우스 VEC 의 VEGF 의존적 혈관신생능력을 조절함을 보여주는 *엑스 비보* 결과이다. 생쥐의 흉부 대동맥을 적출한 후 저장 배지에서 조심스레 조각을 낸 후 성장인자가 포함되지 않은 Matrigel[™] 에서 배양시키거나 Matrigel[™] 을 생쥐의 복부 피하조직에 이식한 후 일주일 후 이식되어진 부분을 적출하여 관찰하였다. A. WT 및 Prx II^{-/-} 마우스 대동맥 조각들을 VEGF 유무에 따라 배양시켰으며 정해진 배양 날짜(1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 및 14 일)에 신생 혈관의 상을 현미경으로 관찰하였으며, 대표적인 이미지들이 보여진다. B. 상술한 A 의 결과를 정량적으로 나타낸 그래프이다. 데이터는 각 시간대에 대동맥에서 뻗어나온 신생혈관에서 형성된 가짓점의 개수를 대표값으로 평균 $\pm$ 평균값의 표준오차(S.E.M)로 나타낸 것이다($n = 4$ 또는 6, KO VEGF+ 군과 비교하여 $**P < 0.05$, $*P < 0.01$). C. 데이터는 각 시간대에 대동맥에서 뻗어나온 신생혈관의 밀도를 측정하여 평균 $\pm$ 평균값의 표준오차(S.E.M)로 나타낸

것이다($n = 4$ 또는 6 , KO VEGF+ 군과 비교하여 $**P < 0.05$, $*P < 0.01$). D. WT 및 Prx II^{-/-} 마우스 피하조직에 이식되어진 매트릭셀을 적출하여 대표적인 이미지를 보여준다. E. 각 군의 피하조직 내 이식되어진 매트릭셀에서 추출되어진 헤모글로빈의 양을 드랩킨 시약(Drabkin's reagent)에 의해 측정하여 평균 $\pm$ 평균값의 표준오차(S.E.M)로 나타낸 것이다($n=3$ 또는 4 , KO VEGF+ 군과 비교하여 $*P < 0.01$).

도 8 은 Prx II 의 제거가 종양조직 내 혈관신생의 조절을 통하여 암 진행을 억제함을 보여주는 인 비보 결과이다. 마우스의 등에 일정한 수의 인간 피부 흑색종양세포를 투입한 후 3 주후 증식되어진 종양덩어리를 적출하고 관찰하였다. A. WT 및 Prx II^{-/-} 마우스 피하조직에서 증식되어진 종양의 대표적인 이미지를 보여준다. B. 종양의 무게를 측정하여 평균 $\pm$ 평균값의 표준오차(S.E.M)로 나타낸 것이다($n = 6$, KO 군과 비교하여 $P < 0.001$). C. 종양의 부피를 측정하여 평균 $\pm$ 평균값의 표준오차(S.E.M)로 나타낸 것이다($n = 6$, KO 군과 비교하여 $P < 0.02$). D. 각 군에서 적출된 종양피의 냉동절편에서 PECAM-1(CD31) 및 핵(DAPI)의 면역형광 공동-염색을 보여주는 결과이다. 대표적인 이미지가 보여진다($n = 3$). E. D 에서 얻어진 이미지에서 CD31 에 염색된 영역의 명암농도를 측정하여 평균 $\pm$ 평균값의 표준오차(S.E.M)로 나타낸 것이다($n = 3$).

【실시예】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

30 실험재료

포스포-eNOS(pS1177), eNOS, pTpY-p38, p38, pTpY-ERK, 포스포-VEGFR-2(pY951 및 pY1175)에 대한 항체는 Cell Signalling Technology로부터 구입하였다. 항-포스포타이로신(4G10) 및 포스포-VEGFR-2(pY1214 및 pY1059)에 대한 항체는 Upstate로부터 구입하였다.

5 항-PDGFR- β (M-20), KDR/Flk-1, c-Src 및 ERK2에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였다. VEGF-A(인간 VEGF₁₆₅)는 R&D Systems(#293-VE)로부터 구입하였다. 포스포-PDGFR- β (pY857)에 대한 항체는 AbFrontier (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 항-액틴(Ab-2)는 Calbiochem로부터 구입하였다. 항-튜블린 및 모든 화학 시약은 Sigma-

10 Aldrich로부터 구입하였다. 포스포-PLC γ 1(pY783) 및 PLC γ 1은 친절하게도 리수구(Sue Goo Rhee) 박사님으로부터 제공받았다. 알렉스-488 및 알렉스-568에 컨쥬게이션된 이차항체는 Molecular Probes로부터 구입하였다.

인간 Prx II에 대한 siRNA 서열은 5'-CGCUUGUCUGAGGAUUACGUU-3'(Prx II-1) 및 5'-GACGCUUGUCUGAGGAUUAUU-3'(Prx II-2)였다. 기재된 바와 같이, Prx II-1 siRNA가 본 연구에서 주로 이용되었다. 래트 Prx II에 대한 네 개의 siRNA 서열(5'-GCAACGCGCACAUCCGAAAUU-3', 5-GAUCACAGUCAACGACCUAUU-3', 5'-AGAAUUACGGCGUGUUGAAUU-3' 및 5'-ACGCUGAGGACUCCGAAAUU-3')의 혼합물이 래트 경동맥 풍선 상처 실험에 이용되었다. 인간 Prx I에 대한

20 siRNA 서열은 5'-ACUCAACUGCCAAGUGAUUUU-3'(Prx I-1) 및 5'-CCACGGAGAUCAUUGCUUUUU-3'(Prx I-2)였다. 대조군 루시페라제 siRNA를 포함한 모든 siRNA들은 Dharmacon으로부터 구입하였다.

세포배양

25 인간 대동맥으로부터 유래된 EC(HAEC)는 Lonza(Walkersville, USA)로부터 구입하였다. EC를 성장인자들이 보충된 내피세포 기초배지-2(EBM-2, Lonza)에서 배양하였다. 이후, EC를 트립신 처리(trypsinization)로 계대배양하고 패시지 7까지의 세포들을 연구에 이용하였다. 인간 대동맥으로부터 유래된 SMC(HASMC)는

30 Lonza(Walkersville, USA)로부터 구입하였다. HASMC를 성장인자들이 보충된 평활근세포 기초배지(SmBM, Lonza)에서 패시지 7까지 배양시켰다.

모든 세포 배양을 37°C에서 5% CO₂ 를 포함하는 습도유지 공기 하에서 실시하였다.

인 비트로 세포 기능 어세이

- 5 증식 어세이(proliferation assay)를 위해, HASMCs 또는 HAECs 를 트랜스펙션 복합체를 포함하는 96-웰 플레이트에 4,000 세포/웰의 밀도로 80 μ l씩 분주하였다. 트랜스펙션 후 24 시간 쉼, HASMC 또는 HAEC 를 혈청-결핍(serum-starved) 배지에서 24 시간 동안 배양한 후 각각 25 ng/ml 의 PDGF-BB 및 VEGF-A 가 보충된 SmBM 기초배지 및 EBM-2
- 10 기초배지에서 24 시간 동안 배양하였다. 세포 증식의 정도가 제조자의 프로토콜(WST-1 세포 증식 어세이 키트; Roche Diagnostics, USA)에 따라 WST-1 표지 후에 포르마잔 생산물의 발색 측정(600 nM WST-1 시약; 450 nm 에서의 흡광도)으로 나타낸다. 이동 어세이를 24-웰 트랜스웰 배양 챔버(Costar; 8 μ m 동공 크기)에서 실시하였다. 필터의 밑면을 젤라틴
- 15 B(1 μ g/ μ l)로 코팅하여 1 시간 동안 공기 중에서 건조하였다. HASMC(4×10^4) 또는 HAEC(6×10^4)를 트랜스펙션 복합체를 포함하는 위 챔버에 첨가하였다. 24 시간 후, 트랜스펙션된 HASMCs 또는 HAECs 이 하룻밤 동안 혈청-결핍되었다. 25 ng/ml 의 PDGF-BB 및 VEGF-A 용액이 각각 성장인자를 포함하는 기초배지에서 제조되어 아래 챔버에 첨가되었다.
- 20 위 챔버 웰이 0.5% 우태아혈청(FBS; HyClone)을 포함하는 각각의 기초배지로 채워졌다. 챔버를 37°C, 5% CO₂ 하에서 8 시간 동안 유지하였다. 반응 후, 비-이동 세포를 필터의 위에서 제거하였다. 필터의 아래로 이동한 세포를 0.6% 헤마톡실린 및 0.5% 에오신으로 염색하였다. 세 개의 이미지를 각각의 필터로부터 취한 후, 이동된 세포의 수를 카운팅하여
- 25 평균값을 구하였다.

면역침전 및 웨스턴 블롯팅

- 지정된 시간에서 세포 배지를 흡입(aspiration)하여 제거하고 세포를 20 mM 헤페스(pH 7.0), 1% 트라이톤 X-100, 150 mM NaCl, 10% 글라이세롤,
- 30 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM AEBF, 아프로티닌(5 μ g/ml) 및 류펩틴(5 μ g/ml)을 포함하는 추출 완충액에서

용해시켰다. 서로 다른 시료의 단백질 양을 브렛포드 시약(Bio-Rad)을 이용하여 정량하였다. 면역침전을 위해, 수득한 상등액(120 μ g 단백질)을 단백질-G 세파로오스 CL-4B(Amersham Biosciences) 비드로 미리 깨끗하게 한 후 2 μ g의 항-flk-1 항체와 하룻밤 동안 반응시키고, 20 μ l의 단백질 G 비드를 첨가한 후 4°C에서 3 시간 동안 추가적으로 반응시켰다. 5 면역복합체를 1 ml의 추출 완충액으로 세 번 세척하였다. 면역블롯팅을 위해, 세포 용해물을 5× 라엠리(Laemmli) 시료 완충액과 혼합하여 5 분 동안 끓였다. 각 시료에서, 15 μ g을 취하여 10% SDS 폴리아크릴아마이드 젤(SDS-PAGE)에 전기영동하였다. 분리된 단백질을 트리스-글라이신 완충액을 이용하여 젤로부터 전기영동적으로 나이트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 비특이적 결합을 차단하기 위해, 막을 5% 탈지유(nonfat milk)가 첨가된 0.5% Tween-20을 포함하는 TBS(Tris-buffered saline; TBST)와 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 상술한 블롯들을 5% 탈지유 또는 BSA가 첨가된 TBST에서 각각의 일차 항체와 4°C에서 하룻밤 동안 15 반응시켰다. TBST로 세척한 후, 블롯들을 호스 래디쉬 퍼록시데이즈-견유게이션된 양 항-마우스 면역글로불린(IgG; 1:5000 희석) 또는 염소 항-토끼 IgG(1:3000 희석)과 45 분 동안 상온에서 반응시켰다. Amersham ECL™ 검출 시스템(GE healthcare)을 이용하여 특이한 단백질 밴드들을 검출하였다. 이후, 면역블롯이 37°C에서 67 mM Tris(pH 6.7), 2% SDS 및 20 100 mM 2-머캅토에탄올을 포함하는 용액에서 60 분 동안 웨이킹을 통해 스트립된 후 판 항체로 재프로빙되었다.

인 비트로 키나제 어세이

대조군 및 Prx II siRNA으로 트랜스펙션된 HAECs로부터 추출된 세포 용해물을 제조하였다. 상술한 바와 같이, 각 용해물로부터 동량의 단백질을 취하여 래빗 항-flk-1(sc-504) 항체로 면역침전시켰다. 참고문헌(Lee JH *et al.* *Biochem. J.* 382, 631-639(2004); 및 Choi MH *et al.* Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*, 435, 347-353(2005))에 기술된 것에서 약간 30 변형시켜, 침전물을 이용하여 인 비트로 키나제 어세이를 실시하였다. 면역침전물을 5 μ Ci의 P³²-ATP 및 0.5 μ g GST-PLC γ 1을 포함하는 30 μ l

키나제 완충액(20 mM HEPES(pH 7.5), 20 mM $MgCl_2$, 20 mM β -글라이세르포스페이트 및 200 μM Na_3VO_4)과 30°C에서 10 분 동안 반응시켰다. SDS 샘플 버퍼를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 시료를 끓인 후 7% SDS-PAGE 에 전기영동하였다. 젤을 80°C 진공 하에 건조시켜 방사능사진
5 촬영하였다.

활성산소종 측정

성장인자(25 ng/ml) 처리 또는 비처리 후, 세포를 페놀 레드 없는 내피세포 기초배지(EBM, Lonza)로 세척하고 5 μM 5,6-클로로메틸-2',7'-다이클로로다이하이드로플루오레신 다이아세테이트(CM-H₂DCFDA)(Molecular Probe)와 37°C에서 5 분 동안 반응시켰다. 이후, 세포를 페놀 레드 없는 EBM 으로 세척한 후 형광 현미경(Axiovert 200 Basic standard, Zeiss, Germany)으로 즉시 분석하였다.

반응성 시스테인 표지

모든 단계들은 혐기성 배양기 내에서 실시되었다. 티올-변형 시약인 Cy3/Cy5-말레이미드(GE healthcare)로 표지하여 VEGFR-2 산화환원 상태를 모니터링하였다. 200 μl 의 Cy3-말레이미드(200 μM)와 반응시킨 후, 세포를 용해 완충액[20 mM HEPES buffer(pH 7.0), 150 mM NaCl, 10% 글라이세롤, 1% 트라이톤 X-100, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 5 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 1 mM AEBSF 및 A/L(5 $\mu g/ml$)]으로 용해시켰다. 동량의 용해물을 100 mM Cy3-말레이미드를 포함하는 완충액에서 10 분 동안 얼음에서 재현탁하였다. 시료에 1 mM DTT 를 10 분 동안 상온에서 처리하여 반응을 정지시켰다. Cy3-표지된 용해물을 래빗 항-flk-1(sc-504)와 하룻밤 동안 4°C에서 반응시킨 후 단백질 G 비드를 첨가하였다. 산화된 시스테인 잔기를 환원시키기 위해, 면역침전된 용해물에 5 mM DTT 를 처리하여 10 분 동안 상온에서 반응시켰다. 환원된 VEGFR-2 들을 100 μM Cy5-말레이미드로 상온에서 30 분 동안 추가적으로 표지하였다. 이중 표지된 면역침전물을 2× 샘플 버퍼에 녹인 후 SDS-PAGE 에서 분리하였다. 표지된 VEGFR-2 의 형광 이미지를 Typhoon™ 9410 이미저(GE Healthcare)로 스캐닝하고 ImageQuant™ 으로 정량분석하였다.

랫트 경동맥의 풍선-손상 모델

이전에 보고된 바와 같이, 2F 포가티 풍선 카테터를 이용하여 정상 래트의 좌측 경동맥에 삽입하여 풍선 손상을 유발하였다. 10-주령된 수컷
 5 래트를 마취한 후, 좌측 외부 경동맥을 노출시켜 브랜치를 전기적으로 응집시켰다. 외부 경동맥의 횡행 동맥 절개를 통해 카테터를 1 cm 정도 밀어넣었으며 총경동맥(common carotid artery)을 따라 세 번에 걸친 패스(pass)를 통해 내피세포 제거(endothelial denudation)를 완료하였다. 손상 후 한 주 또는 10 일 쯤에 총경동맥을 3.7% 포름알데하이드를 포함하는
 10 헤파린이 함유된 염을 이용한 경심막 관류-고정(transcardiac perfusion-fixation) 후에 절개하여 파라핀에 임베드하였다. 총경동맥의 중간 부위로부터 다섯 개의 연속된 조직 절편(sections; 100 μ m 간격 및 3 μ m 두께)을 얻었다. 각 슬라이드를 헤마톡실린-에오신으로 염색하였다.

15 형태계측학적 분석

이전에 보고된 바와 같이 분석 소프트웨어(NIH Image 1.62; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html>)를 사용하여, H&E 염색된 절편에서 네 개의 다른 부위(루멘, 내막, 중막 및 전체 혈관 부위)를 측정하였다(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21; 201-
 20 207(2001); BMC Cardiovascular Disorders 2002, 2:16(2002)). 간략하게 살펴보면, 루멘 표면, 속탄력층(internal elastic lamina, IEL) 및 외탄력층(external elastic lamina, EEL)에 의해 둘러싸인 부위들을 결정하였다. 내막 부위는 IEL 에 의해 한정되는 부위로부터 루멘 부위를 차감하여 결정하였으며 중막 부위는 EEL 에 의해 한정되는 부위로부터
 25 IEL 에 의해 한정되는 부위를 차감하여 계산하였다. 분석을 위해, 각 동물에서 세 개의 절편들의 평균값을 이용하였다.

경동맥에서 siRNA 또는 화학 물질의 국소적 운반

경동맥의 풍선 손상 전에, 제조자의 프로토콜에 따라 siPORTTMNeoFXTM 시약(Ambion)을 이용하여 트랜스펙션 혼합물(200 nM Prx II siRNA 또는
 30 대조군 siRNA)을 제조하였다. 펀치 풍선 카테터를 이용하여 200 μ l Opti-

MEM 으로 풍선-손상된 부위를 세척하였다. 펀치 풍선 카테터로 각 트랜스펙션 혼합물을 총경동맥을 따라 주입하였다. 15 분 동안 반응한 후, 폐색된 좌측 총경동맥에서의 혈류를 재관류하였다.

5 면역형광 염색

VEGFR-2(Santa Cruz, 1:200 희석), α -평활근 액틴(Calbiochem, 1:300 희석) 및 PECAM-1(Santa Cruz, 1:200 희석)의 위치를 조사하기 위해, 래트에서 형광-컨쥬게이션된 항체를 이용하여 면역형광 이중 염색을 실시하였다. 모든 형광-표지된 시료를 형광을 위해 Vectashield 마운틴 배지로 마운팅하였다(Vectro Laboratories). LSM510 공초점 레이저 주사현미경(Zeiss)을 이용하여 면역형광 이미지를 얻었다.

TUNEL 어세이

상술한 바와 같이, 경동맥 절편을 풍선-손상 후 10 일 후에 파라핀 절편(3 μ m 두께)으로 제조하였다. 절편들을 0.1% 트라이톤 X-100 을 포함하는 PBS 에서 10 분 동안 반응시켰다. 이후, 제조자의 프로토콜에 따라 인/시투 세포 사멸 검출 키트, 플루오레신(Roche Diagnostics Corp.)를 이용하여 TUNEL 반응을 37°C에서 60 분 동안 실시하였다. 세포의 핵을 DAPI 로 카운터 염색하였다.

인 비트로 튜브 어세이

50,000 개의 HAECs/웰을 첨가하기 전에, 성장인자-감소된 매트릭젤(Matrigel) 매트릭스(BD Bioscience, cat # 354230)를 12-웰 플레이트에 균일하게 플레이팅(150 μ l/웰)하여 50,000 HAECs/웰을 첨가하기 전에 37°C에서 30 분 동안 반응시켰다. 세포를 25 ng/ml VEGF-A 를 포함하거나 또는 포함하지 않는 0.5% 혈청 배지와 함께 오버레이하였다. 분주 후 18 시간 후에 다섯 개의 임의적인 곳에서 사진 촬영을 실시하였으며 내피 내 튜브를 원형(enclosing) 튜브로 정량화하였다.

30 단백질 타이로신 포스파타제 어세이

모든 단계들은 혐기성 배양기 내에서 실시되고 시약을 어세이 시작 전에 가스 제거하였다. Takak Bio.로부터 구입한 Universal tyrosine phosphatase assay kit(cat. MK-411)를 이용하여 PTP 활성을 분석하였다. 간략하게는, 각 용해물을 포스파타제 반응 용액으로 연속적으로 20 배 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-HRP 를 각 웰에 첨가하여 반응시켰다. 기질-반응된 웰에서 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

10

VEGF 결합 어세이

상술한 방법을 변형하여 ^{125}I -VEGF 결합을 분석하였다(*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G1088-G1096(2002)). 간략하게 살펴보면, 5×10^3 개의 세포를 96-웰 플레이트에 분주한 후 하룻밤 동안 배양하였다. 세포를 18 시간 동안 혈청-결핍시켰다. 결합 완충액(25 mM HEPES-buffered-DMEM 및 0.1% BSA)으로 세척한 후, 세포를 80 pM ^{125}I -VEGF 와 결합 완충액에서 5 분 동안 37°C로 반응시켰다. 세포를 결합 완충액으로 네 번 세척한 후, 0.1 N NaOH 에 수용화시켰다. MicroBeta[®] TriLux 1450 을 이용하여 방사능을 측정하였다.

20

마우스 대동맥 내피세포의 제조

8-주령된 Prx II^{+/+} 동물 및 이의 Prx II^{-/-} 한배 새끼에서 흉대동맥(thoracic aortas)을 채취하여 지방 조직을 제거하였다. 마이크로 스프링 가위를 이용해 대동맥을 2-3 mm 링으로 가로질러 절단(cross-section)하였다. 대동맥 조각을 24-웰 배양접시에서 300 μl 의 젤성 매트릭젤(BD Bioscience cat# 354234)에 위치시킨 후, 내피세포 스프라우트(epithelial sprout)가 발생할 때까지 성장인자들이 보충된 EBM-2 배지에서 37°C, 95% 공기/5% CO₂ 배양기에서 7 일 동안 배양시켰다. 이후, 매트릭젤에서 자라나는 내피세포 스프라우트를 제거하지 않도록 대동맥 조각을 주의깊게 제거하고 마우스 대동맥 내피세포(MAEC)를 배양하였다. 세포를 Dispase(BD Bioscience cat# 354235)로 패시지한 후

30

0.1% 젤라틴-코팅된 배양접시에 플레이팅하였다. 모든 실험에서 이용된 세포는 패시지 3 을 초과하지 않았으며 특이적 내피세포 마커인 CD31/PECAM 에 대한 항체를 이용하여 동정하였다.

5 대동맥 링 어세이

기존의 알려진 방법(Nissanov, *et al.*, Automatic vessel segmentation and quantification of the rat aortic ring assay of angiogenesis. *Lab Invest.* 73: 734-739(1995))을 약간 변형하여 2 mm 의 흉대동맥 링을 250 μ l 의 성장인자-감소된 매트릭젤(BD Bioscience cat# 354230) 위에 임베드시키고 200 μ l 의 2% FBS 및 VEGF-A₁₆₅(25 ng/ml; R&D System)이 보충된 EBM-2 배지 또는 2% FBS 만이 보충된 EBM-2 배지를 오버레이하였다. 타임-랩스 컨트라스트 현미경법(time-lapse contrast microscopy)을 이용하여 미세혈관 성장(microvessel outgrowth)을 시각화하였다. Nissanov 등의 방법에 따라, 자동화 프로그램 Image-Pro Plus vesion 6.2(Media Cybernetics)을 이용하여 각 대동맥 링으로부터 성장하는 미세혈관의 수 및 최대 길이는 측정하였다.

혈관 투과성 어세이

혈관 투과성 어세이를 위해, 풍선 손상 후 일주일 쯤에 100 μ l 의 5% 에반스 블루를 마우스에 정맥 내 주입하였다. 30 분 후에, 마우스를 PBS 로 5 분 동안 관류시킨 후, 손상되지 않은 외측 경동맥 및 손상된 경동맥 모두로부터 경동맥을 제거하였다. 제거된 경동맥을 해부하고 수직으로 오픈하여 위상차 현미경(배율: $\times 20$)에서 관찰하였다. 정량을 위해, 혈관들로부터 누출된 에반스 블루를 55°C에서 하룻밤 동안 포름아마이드로 추출하고 12,000 rpm 에서 10 분 동안 원심분리하였다. 상등액을 수득하여 620 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 에반스 블루 다이의 백그라운드 값을 740 nm 에서 측정하여 경동맥에서의 에반스 블루 다이의 값에서 차감하였다.

30 주사전자현미경

에반스 블루로 염색된 부위가 내피세포-제거된(deendothelialized) 부위이며 에반스 블루로 염색되지 않은 부위가 내피세포-재형성된 부위라는 것을 증명하기 위해, 풍선-손상 과정 후 7 일 후에 다섯 마리의 동물들을 죽였다. 상술한 바와 같이, 인 비보에서 포스페이트-완충된 2.5% 5 글루타르알데하이드로 관류 고정을 실시하였다. 혈관들을 수직으로 절단하여 오픈하고 실리콘-코팅된 디쉬에 평평하게 고정시킨 후에 사진을 찍었다. 이후, 혈관들을 2.5% 글루타르알데하이드로 24 시간 동안 추가적으로 고정하고 PB 로 린스한 후, 1% 오스뮴 테트록사이드와 반응시키고 일련의 에탄올 희석액으로 탈수시켰다. 조직을 임계점 건조한 10 후 은교질액(colloidal silver paste)을 이용하여 주사전자현미경 스테브에 마운트하였다. 금/백금으로 스퍼터-코팅한 후, 표본들을 주사전자현미경으로 관찰하였다.

통계 분석

15 모든 인 비트로 어세이는 최소 세 번 반복하였으며 데이터를 시그마 Plot 8.0 소프트웨어에서 Students t 테스트로 분석하였다. 이미지들은 NIH Image 1.62 로 분석하였다. 통계적 유의성(P 값)이 결정되었다.

실험결과

20 Prx II 는 정상적인 VEGF 시그널링에 필요한 조절자이다.

혈관신생은 VEGF 에 반응하여 기존의 혈관으로부터 혈관내피세포 (VEC)들이 증식과 이동하게 되는 과정을 포함하므로(Olsson A. *et al.*, *Nature Reviews Molecular and Cell Biology*, 7: 359-371(2006)), 본 발명자들은 인간 대동맥 VECs 에서 VEGF 시그널링의 2-cysPrx 에 의한 25 산화환원(redox) 조절에 관심을 가졌다. 흥미롭게도, Prx I 및 Prx II 발현의 레벨이 VSMC 에서의 레벨과 비교하여 VECs 에서 더 높았다(도 1A). 이러한 사실을 토대로, 본 발명자들은 VECs 이 더 높은 산화적 부담을 가진다는 것을 추측할 수 있었다. 이러한 가능성을 테스트하기 위해, 5,6-클로로메틸-2',7'-다이하이드로-클로로플루오레신 다이아세테이트 30 (DCF)라 불리는 산화물-감지(oxidant-sensitive) 형광 다이올을 이용하여 Prx I- 및 Prx II-제거된 VECs 에서 ROS 레벨을 조사하였다. Prx II 의 제거는

대조군 VECs 에서 기본 ROS 레벨의 현저한 증가(약 5 배)를 초래하였으며, VEGF 처리는 약 2 배의 ROS 레벨의 증가를 초래하였다(도 1B). 이와 대조적으로, Prx I 의 제거는 기본 ROS 레벨 뿐 아니라 VEGF-유도된 ROS 레벨에, 더 나아가 VEGF 에 대한 반응에서 단백질의 타이로신 인산화에도, 아무런 영향을 미치지 않았다(도 2). 이러한 결과는 Prx II 가, 유일하지는 않을 지라도, VECs 에서 기본 ROS 레벨을 억제하는 주요한 산화환원 효소라는 것을 나타낸다.

다음으로, VEGF 시그널링 및 VEC 기능 상에 Prx II 의 역할을 연구하였다. PDGF 시그널링에서 Prx II 의 기능과 대조적으로, Prx II 의 제거는 대조군 세포와 비교하여 VEGF 에 대한 반응에서 단백질의 타이로신 인산화의 전체적인 감소를 초래하였다(도 1C 및 1D). 이후, 다운스트림 시그널링 이펙터(effector) 및 세포 표현형(cellular phenotypes)을 조사하였다. 조사된 VEGF 수용체-2(VEGFR-2)의 다운스트림에 있는 시그널링 분자들 중에서, 내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 및 MAPK(mitogen-activated protein kinase, ERK)의 활성화가 대조군 세포와 비교하여 Prx II-제거된 VECs 에서 현저하게 감소하였다(도 1E). 감소된 eNOS 활성화와 함께, VEGF-유도된 cGMP 생산이 Prx II-제거된 VECs 에서 뚜렷하게 감소하였다(도 1F). Prx II 에 의한 VEGF 시그널링의 하향-조절을 실증하기 위해, VEC 기능에 대한 인 비트로 어세이를 실시하였다. Prx II-제거된 VECs 는 대조군 세포와 비교하여 VEGF 에 대한 반응에서 증식 및 화학주성 이동의 명확한 감소를 나타냈다(도 3A 및 도 3B). 반면, Prx II 는 VSMCs 에서와 달리 TNF- α 로 처리된 VECs 에서 단백질 부착에 있어서 효과를 나타내지 않았으므로 (도 3C), 이는 세포 시그널링에서 Prx II 의 역할이 세포 형태-특이적(cell type-specific)이라는 것을 의미한다. 더 나아가, Prx II-제거된 세포에서 VEGF 에 대한 반응으로 VECs 의 튜블 형성이 매우 현저하게 감소하였다(도 3D). 전체적으로, 상술한 결과들은 Prx II 가 VEGF 시그널링을 조절함으로써 VEC 기능을 조절하는 신규한 조절자라는 것을 증명한다.

Prx II 는 산화적 불활성화로부터 VEGFR-2 타이로신 키나제를 보호한다.

상술한 포스포타이로신 블롯은 VEGFR-2 (~220 kDa)에 상응하는 위치에 단백질 밴드의 변화, 특히 인산화의 변화가 명백하였음을 보여주었다. 이에 따라, 위치-특이적 포스포항체를 이용하여 VEGFR-2의 인산화를 조사하였다. VEGFR-2의 네 개의 알려진 타이로신 잔기 상에

5 자가인산화가 Prx II 발현을 넥-다운시킴에 따라 전체적으로 뚜렷하게 감소하였지만, VEGFR-2의 레벨은 변하지 않았다(도 4A). 네 개의 타이로신 잔기 중에서, Y951 및 Y1175의 인산화에서 차이가 명백하였는데, 이는 Prx II^{-/-} 마우스로부터 분리된 대동맥 VECs에서 확인할 수 있었다(도 4B).

10 이와 대조적으로, VEGFR-2 인산화를 포함하는 VEGF-유도된 타이로신 인산화는 Prx I-제거된 VECs에서 변화하지 않았는데(도 2B), 이는 VEGFR-2 시그널링의 조절이 Prx II-특이적이라는 것을 다시 한번 증명하고 있다.

본 발명자들은 Prx II-조절된(regulatable) 내인성 ROS가 VECs에서 VEGFR 인산화를 어떻게 조절하는 지에 대한 기작을 연구하였다. 본 연구에서 이용된 VEGF₁₆₅가 VECs에서 VEGFR-1 및 VEGFR-2 모두에 결합할 수

15 있고(Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.*, 2003 Jun 9(6): 669-76), VEGFR-1이 VEGF의 유인 수용체(decoy receptor)로 알려져 있다(Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., Peng, J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out

20 mice. *Development*, 1999 Jul 126(13): 3015-25; Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., Ferrara, N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.*, 1994 Oct 14, 269(41): 25646-54)는 것을 고려하여,

25 본 발명자들은 Prx II-제거된 VECs에서 VEGFR-1 및 VEGFR-2의 ROS-매개된 발현의 가능성을 조사하였다. VEGFR-1 및 VEGFR-2의 발현은 대조군 및 Prx II-제거된 VECs에서 실제로 동일하였으므로(도 5A), 이는 VEGFR-1이 Prx II의 부재 하에서 VEGFR-2 활성화의 하향-조절에 기여할 수 없다는 것을 의미한다.

30 한편, VEGFR-2 자가인산화가 전체적으로 억제되었기 때문에, 본 발명자들은 VEGFR-2 RTK 또는 PTP 활성이 Prx II-제거된 VECs에서 직접적으로 영향받는 지 여부를 조사하였다. 놀랍게도,

침전된 VEGFR-2 단백질 자체 및 외인성 기질인 GST-PLC γ 1 에 대한 인
비트로 키나제 활성 어세이에서 보여지는 바와 같이, VEGFR-2 의 VEGF-
유도된 RTK 활성은 대조군 세포와 비교하여 Prx II-제거된 VECs 에서 거의
완벽하게 사라졌다(도 4C). 이와 대조적으로, 내인성 PTPase 활성은 Prx
5 II 발현의 녹-다운에 의해 영향받지 않았다(도 5C). VECs 에 결합된 ¹²⁵I-
VEGF 의 정량에 의해 확인한 바와 같이, VEGFR-2 의 VEGF 결합능도 Prx II
발현의 녹-다운에 의해 영향받지 않았다(도 5B). 따라서, 상술한
결과들은 VEGFR-2 RTK 활성이 내인성 ROS 의 직접적인 타겟이라는 것을
보여준다.

- 10 2-cysPrx 는 다양한 퍼록사이드 기질들(가장 바람직하게는, H₂O₂)을
환원시킬 수 있는 산화환원 효소의 한 클래스이다(Peskin, A. V., Low, F.
M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., Winterbourn, C. C.
The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H(2)O(2) is not reflected
in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem.*,
15 2007 Apr 20, 282(16): 11885-92; Cordray, P., Doyle, K., Edes, K., Moos,
P. J., Fitzpatrick, F. A. Oxidation of 2-Cys-peroxiredoxins by
arachidonic acid peroxide metabolites of lipoxygenases and
cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.*, 2007 Nov 9, 282(45): 32623-9). 또한,
2-cysPrx 는 산화적 스트레스 하에서 샤페론 분자로서 기능한다는 것도
20 알려져 있다(Lim, J. C. et al. Irreversible oxidation of the active-
site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced
molecular chaperone activity. *J Biol Chem.*, 2008 Oct 24, 283(43):
28873-80; Jang, H. H. et al. Two enzymes in one; two yeast
peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a
25 peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, 2004 May 28,
117(5): 625-35). 이와 관련한 논란을 확인하기 위해, 본 발명자들은 두
개의 실험을 실시하였다. 첫 번째 실험으로, VECs 를 외인성 확산성
H₂O₂ 에 노출시켰다. H₂O₂ 의 농도 증가는 VEGF 자극에 의해 유도된 VEGFR-2
자가인산화 및 RTK 활성을 점차적으로 억제하였는데(도 4D), 이는 H₂O₂ 가
30 Prx II-조절성(regulatable) ROS 의 활성 분자(acting molecule)일 수
있음을 의미한다. 두 번째 실험으로, 인간 Prx II 의 재주입(add-back)

발현을 위해 $\text{Prx II}^{-/-}$ VECs 를 레트로바이러스로 감염시켰다. 야생형 Prx II 는 VEGF 에 대한 반응에서 VEGFR-2 인산화를 완벽하게 회복(rescue)시켰으나, 활성-제거(activity-dead) 돌연변이된 Prx II (활성 부위의 시스테인 잔기가 세린 잔기로 치환된 돌연변이)는 VEGF 에 대한
 5 반응에서 VEGFR-2 인산화를 회복시키지 못했다(도 4B). 이러한 결과는 Prx II 의 퍼옥시다제 활성이 필요하다는 것을 의미한다. 상술한 결과들을 종합하여 보면, Prx II 에 의한 세포내 H_2O_2 의 제거가 VEGFR-2 의 산화적 불활성화에 대한 보호 기작으로 추측된다.

10 Prx II 는 활성산소종에 의한 VEGFR-2 의 시스테인 산화를 막는다.

단백질에서 활성산소종에 의한 산화는 대부분의 경우 시스테인 잔기의 산화를 포함한다. 이를 확인하기 위하여 시스테인잔기 특이적인 화학변형체인 말레이미드를 이용하여 Prx II 녹다운 전후의 VEGFR-2 의 시스테인 산화 정도를 측정하였다(도 6A). 대조군 세포와 Prx II 가
 15 녹다운된 세포에서 먼저 환원된 시스테인을 녹색 형광체(green fluorophore; Cy3)-컨쥬게이션된 말레이미드로 변형시키고 VEGFR-2 를 면역침강하여 산화된 시스테인을 환원시킨 후 적색 형광체(red fluorophore; Cy5)-컨쥬게이션된 말레이미드로 변형하여 각각을 정량하였다. 그 결과, Prx II 녹다운된 세포에서는 시스테인이 산화된 VEGFR-2 의
 20 시스테인의 산화정도가 3 배 가량 증가됨을 확인할 수 있었다(도 6B). 이는 Prx II 녹다운에 의해 증가된 활성산소종이 VEGFR-2 의 시스테인 잔기를 산화하였음을 보여주는 결과이다.

$\text{Prx II}^{-/-}$ VECs 는 VEGF 유도하에서 감소된 혈관신생 능력을 가진다.

25 Prx II 에 의해 VEGF 시그널링이 조절된다는 결과를 바탕으로 실제 VEC 의 혈관신생과정을 엑스 비보 및 인 비보 모델을 통하여 조사하였다. 우선, 대조군 양생형과 $\text{Prx II}^{-/-}$ 마우스로부터 분리된 흉대동맥(thoracic aorta)의 절편을 VEGF 를 포함하는 콜라겐 플레이트에 올려놓아 배양함으로써 VEC 의 혈관신생능력을 조사하였다. 얻어진 이미지로부터
 30 배양일에 따른 가지점(branch point) 및 혈관 밀도(vessel density)를 정량한 결과 $\text{Prx II}^{-/-}$ VEC 는 대조군 야생형 VEC 에 비해 혈관신생 능력이

유의하게 감소하였다(도 7A-7C). 본 실험 결과를 통하여, *인 비트로*에서 관찰된 결과가 실제 마우스에서 채취된 대동맥 링의 VEC 에서도 재현된다는 것을 입증하였다. 더 나아가, VEGF 를 포함하는 매트릭젤을 직접 대조군 야생형 및 *Prx II^{-/-}* 마우스로 이식하여 매트릭젤로 성장하는 혈관신생의 정도를 정량하였다. 동량의 VEGF 가 주입되었지만 야생형과 비교하여 *Prx II^{-/-}* 마우스에서는 매트릭젤로의 혈관신생이 거의 일어나지 않음을 확인할 수 있었다(도 7D-7E). 종합적으로, *Prx II* 에 의한 VEGF 의존적 VEC 의 증식과 이동의 조절은 *엑스 비보* 및 *인 비보*에서 VEC 의 혈관신생의 조절을 유도함을 알 수 있다.

Prx II 유전자의 제거는 암조직 내의 혈관신생을 억제하여 암 성장을 억제한다.

혈관신생을 일으키는 여러 가지 병리적 상황이 있지만 대표적인 것은 암조직 내로의 혈관신생을 들 수 있다. 암세포는 영양분과 산소의 공급을 위해 VEGF 를 왕성히 생성 분비함으로써 주변 혈관으로부터 EC 를 이동시켜(*mobilize*) 암조직 내로 혈관신생을 유도한다. *Prx II* 가 VEC 에서 VEGF 시그널링을 조절한다면 암조직 내의 혈관신생에도 관여할 것으로 추정되는데, 이를 증명하기 위해 마우스에서 흑색종 세포를 사용한 피하 이식(*subcutaneous implantation*) 실험을 수행하였다. 야생형 마우스로 주입된 흑색종 세포는 3 주 후 거대한 암덩어리를 형성하였다. 하지만 *Prx II^{-/-}* 마우스로 주입된 흑색종 세포에 의해 형성된 암덩어리는 무게와 부피에 있어서 현저히 감소되었다(도 8A-8C). 이러한 암 생성의 억제가 혈관신생의 감소에 의한 것인지를 조사하기 위해, 채취된 암덩어리의 냉동 절편을 혈관내피세포의 마커인 CD31 에 대해 면역형광 염색을 진행하였다. *Prx II^{-/-}* 마우스에서 형성된 melanoma 암덩어리에는 대조군 야생형 마우스의 암덩어리와 비교하여 CD31⁺ VEC 가 현저히 감소되어 있었다(도 8D-8E). 이는 *Prx II* 의 제거된 혈관내피세포는 암조직으로부터 VEGF 가 분비되어도 이동되지 않는 다시 말해 VEGF 에 대해 낮은 반응성을 보인다는 것을 확인하는 결과이다.

혈관신생 억제제의 스크리닝

인간 대동맥으로부터 유래된 세포를 37℃에서 5% CO₂ 를 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 7 까지 배양된 세포에 시험물질(예컨대, 화학물질, 펩타이드 또는 천연추출물)을 처리하여 배양한다. 이후, 각 세포에서 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II 의 발현을 분석하며, 이때 상술한 시험물질이 Prx II 의 활성 또는 발현을 억제시키면 혈관신생 억제제로 판단된다.

Prx II 단백질의 활성 변화를 *인 비보*에서 측정하기 위해, 대조군 세포 및 시험물질이 처리되어 배양된 세포에서 활성산소종의 레벨을 측정한다. 각 세포를 페놀 레드 없는 내피세포 기초배지(EBM, Lonza)로 세척하고 5 μ M 5,6-클로로메틸-2',7'-다이클로로다이하이드로플루오레신 다이아세테이트(CM-H₂DCFDA)(Molecular Probe)와 37℃에서 5 분 동안 반응시킨다. 이후, 세포를 페놀 레드 없는 EBM 으로 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 레벨이 증가하며, Prx II 단백질의 활성이 증가된 경우에는 형광 레벨이 감소한다. Prx II 단백질의 활성 변화를 *인 비트로*에서 측정하는 경우, 각 세포를 20 ml 의 20 mM HEPES-NaOH 완충용액(1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM AEBSF, 펩스타틴 1 μ g/ml, 루페틴 5 μ g/ml, 아프로티닌 5 μ g/ml, pH 7.0)에서 균질화시킨다. 전기 균질현탁액을 15,000×g 에서 4℃에서 30 분 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 μ l 레진 체적)와 혼합한다. 전기 레진을 1 ml 의 버퍼 B 로 2 회 세척하고, 100 내지 500 mM NaCl 이 함유된 버퍼 B 를 이용하여, 단계구배로 용출하여 활성분획을 얻고 Prx II 에 대한 항체를 이용한 면역블롯방법을 이용하여, Prx II 를 수득한다. 수득된 Prx II 10 μ g을 2.5 μ M yTrx1(효모에서 유래된 티오레독신), 400 nM yTrxR(효모에서 유래된 티오레독신 환원효소), 200 μ M NADPH, 1 mM EDTA 및 50 μ l HEPES-NaOH 완충용액(50 mM; pH 6.0-8.0)와 혼합한 다음, 100 μ M H₂O₂ 를 첨가한다. 이어, 30℃에서 3 분 동안 Agilent UV8453 분광 광도계(Hewlett Packard, USA)에서 340 nm 의 흡광도를

모니터링하여, NADPH 의 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 II 의 발현을 유전자 레벨에서 측정하기 위해, 대조군 및 시험물질-처리된 세포에서 mRNA 를 추출하여 각각 cDNA 를 합성한다. 합성된 cDNA 를 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 μ l의 cDNA(10 ng), 10 mM Tris HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 250 μ M dNTPs, 1U 의 *Taq* 폴리머라제, 1.5 mM MgCl₂ 및 10 pmole 의 각 프라이머를 포함하는 20 μ l의 반응 용액에서 실시한다. PCR 반응 조건은 95°C에서 5 분 동안 초기 변성한 후, 95°C에서 30 초 동안 변성하는 단계, 58-65°C에서 30 초 동안 어닐링하는 단계 및 72°C에서 30 초 동안 연장하는 단계를 포함하는 25-30 사이클을 수행하고 72°C에서 7 분 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 II 의 발현이 증가된 경우에는 대조군에 비해 시험물질이 처리된 세포에서 Prx II 의 PCR 증폭 산물이 증가하며, Prx II 의 발현이 감소된 경우에는 Prx II 의 PCR 증폭 산물이 감소한다.

또한, Prx II 의 발현을 단백질 레벨에서 측정하기 위해, 지정된
시간에서 세포 배지를 흡입하여 제거하고 대조군 및 시험물질-처리된
세포를 20 mM 헤페스(pH 7.0), 1% 트라이톤 X-100, 150 mM NaCl, 10%
글라이세롤, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM
AEBSF, 아프로티닌(5 μ g/ml) 및 류펩틴(5 μ g/ml)을 포함하는 추출
완충액에서 각각 용해시킨다. 서로 다른 시료의 단백질 양을 브렛포드
시약(Bio-Rad)을 이용하여 정량한다. 각 시료에서, 15 μ g을 취하여 10%

SDS 폴리아크릴아마이드 겔(SDS-PAGE)에 전기영동한다. 분리된 단백질을 트리스-글라이신 완충액을 이용하여 겔로부터 전기영동적으로 나이트로셀룰로오스 막으로 옮긴다. 비특이적 결합을 차단하기 위해, 막을 5% 탈지유(nonfat milk)가 첨가된 0.5% Tween-20 을 포함하는

5 TBS(Tris-buffered saline; TBST)와 상온에서 1 시간 동안 반응시킨다. 상술한 블롯들을 5% 탈지유 또는 BSA 가 첨가된 TBST 에서 각각의 일차 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨다. TBST 로 세척한 후, 블롯들을 호스 래디쉬 퍼록시데이즈-컨쥬게이션된 양 항-마우스 면역글로불린(IgG; 1:5000 희석) 또는 염소 항-토끼 IgG(1:3000 희석)과 45 분 동안 상온에서

10 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 60 분 동안 웨이킹을 통해 스트립된 후 튜블린 항체로 재프로빙한다. 시험물질에 의해 Prx II 단백질의 양이 증가된 경우에는

15 대조군에 비해 시험물질이 처리된 세포에서 Prx II 밴드의 세기가 증가하며, Prx II 단백질의 양이 감소된 경우에는 Prx II 밴드의 세기가 감소한다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한

20 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 억제제를 유효성분으로 포함하는
5 혈관신생억제용 약제학적 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF(vascular endothelial growth factor) 시그널링을
10 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 VEGF는 VEGF-A, VEGF-C 또는 VEGF-E인 것을
15 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 2 항에 있어서, 상기 VEGF 시그널링의 감소는 내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 또는 MAPK(mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated
20 kinase)의 활성화를 억제하거나, 또는 VEGF-유도된 cGMP의 생산을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II
25 단백질 억제는 VEGF-유도된 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 RTK는 VEGFR-2의 RTK인 것을 특징으로 하는
30 조성물.

【청구항 7】

제 1 항에 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, 5 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, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방을 위한 조성물인 것을 특징으로 하는 10 조성물.

【청구항 8】

Prx II(peroxiredoxin II) 유전자의 발현 억제제 또는 Prx II(peroxiredoxin II) 단백질의 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 15 억제방법.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF(vascular endothelial growth factor) 시그널링을 20 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 상기 VEGF는 VEGF-A, VEGF-C 또는 VEGF-E인 것을 25 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제 9 항에 있어서, 상기 VEGF 시그널링의 감소는 내피세포 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 또는 MAPK(mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated 30 kinase)의 활성화를 억제하거나, 또는 VEGF-유도된 cGMP의 생산을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제 8 항에 있어서, 상기 Prx II 유전자의 발현 억제 또는 Prx II 단백질 억제는 VEGF-유도된 수용체 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)의 산화적 불활성화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제 12 항에 있어서, 상기 RTK는 VEGFR-2의 RTK인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제 8 항에 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, 염증 또는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방을 위한 방법인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 15】

(a) Prx II 단백질 또는 Prx II를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 Prx II 단백질의 활성 또는 Prx II의 발현을 분석하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제제의 스크리닝 방법으로, 상기 시험물질이 Prx II의 활성 또는 발현을 억제시키면 혈관신생 억제제로 판단된다.

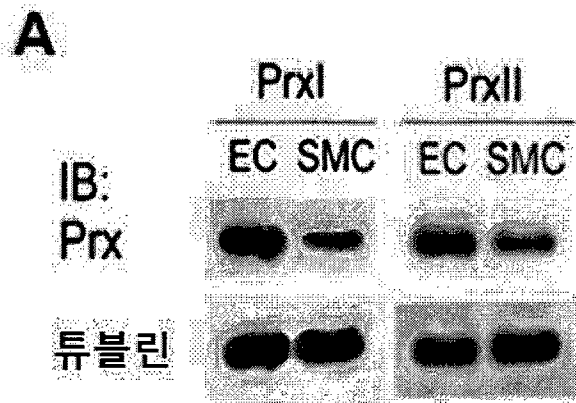
【청구항 16】

제 15 항에 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,

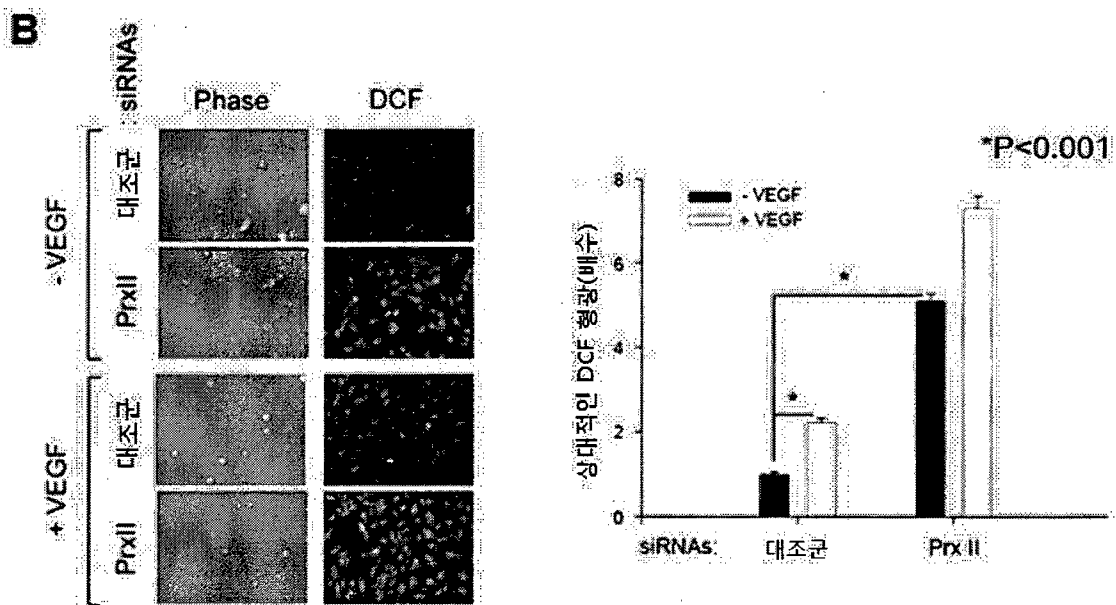
- 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증 또는
- 5 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

1/16

도 1a

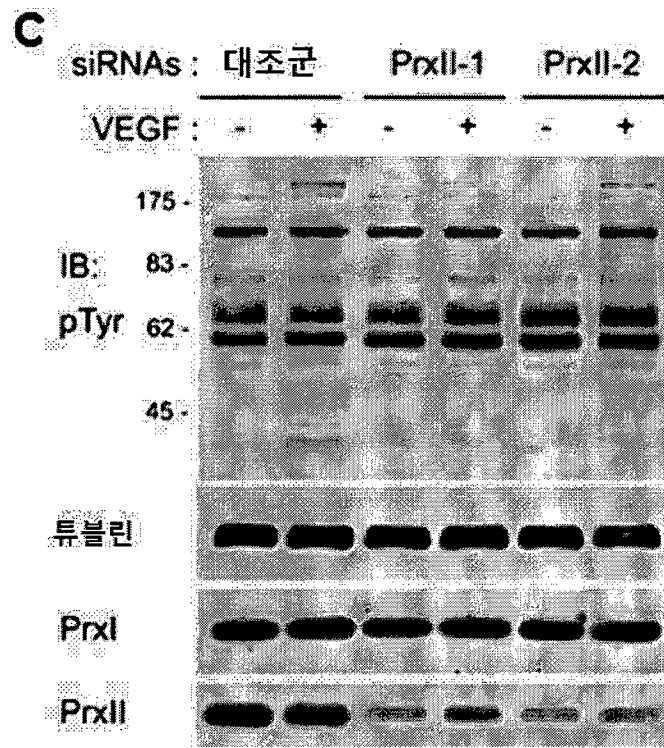


도 1b

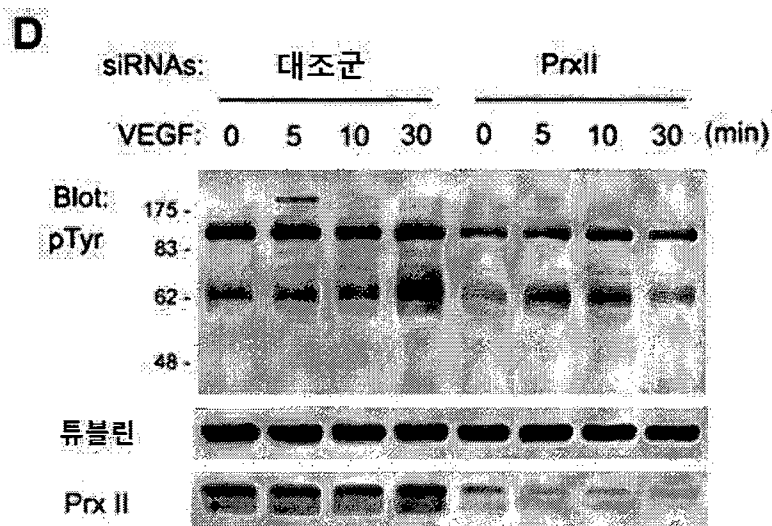


2/16

도 1c

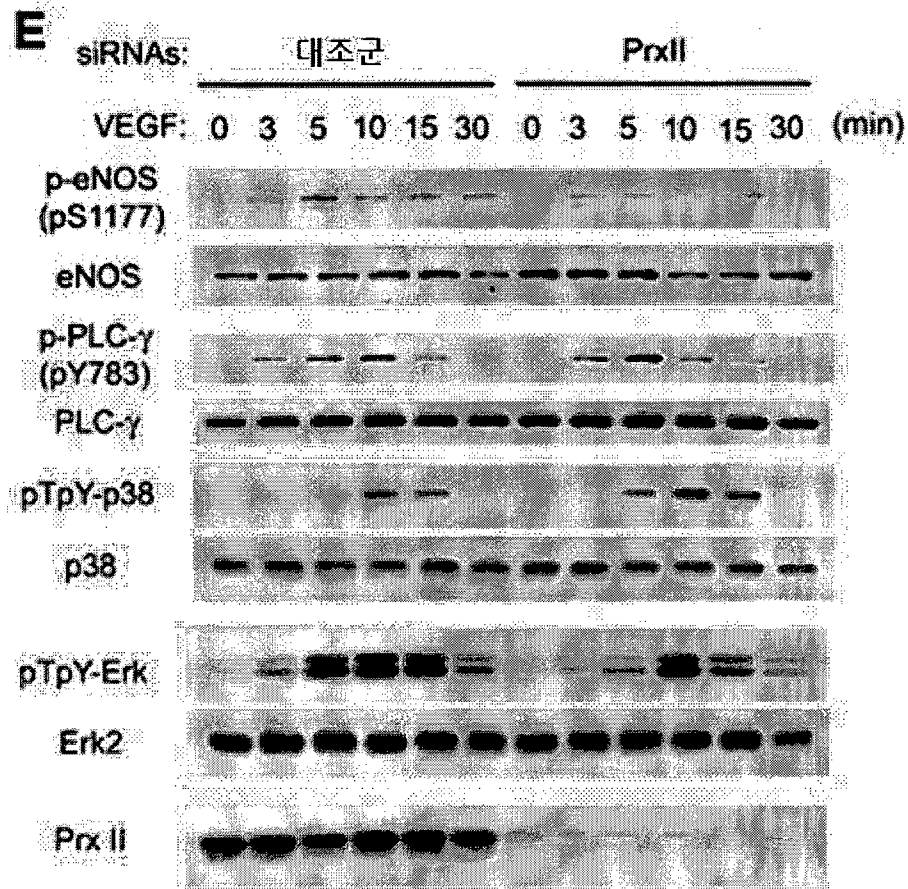


도 1d



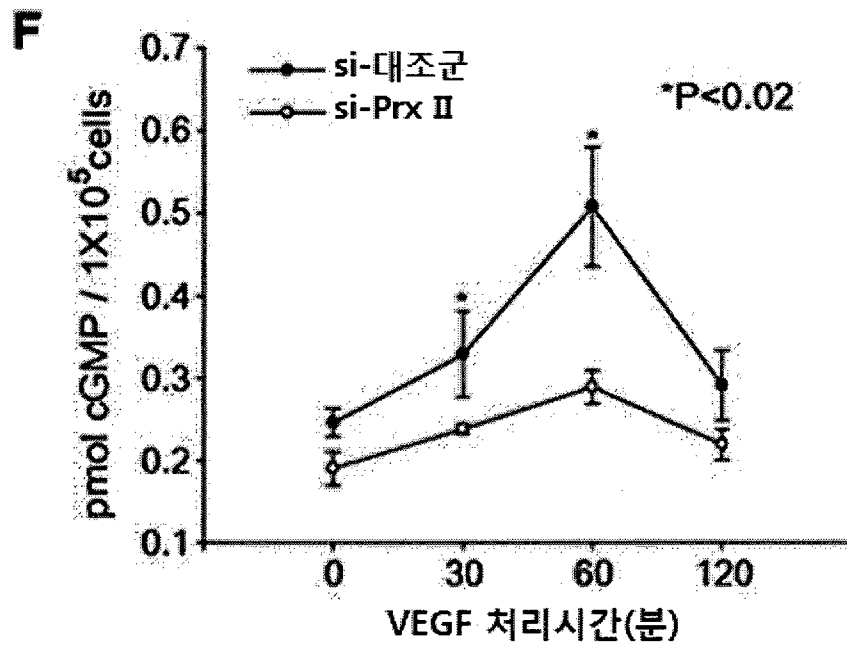
3/16

도 1e



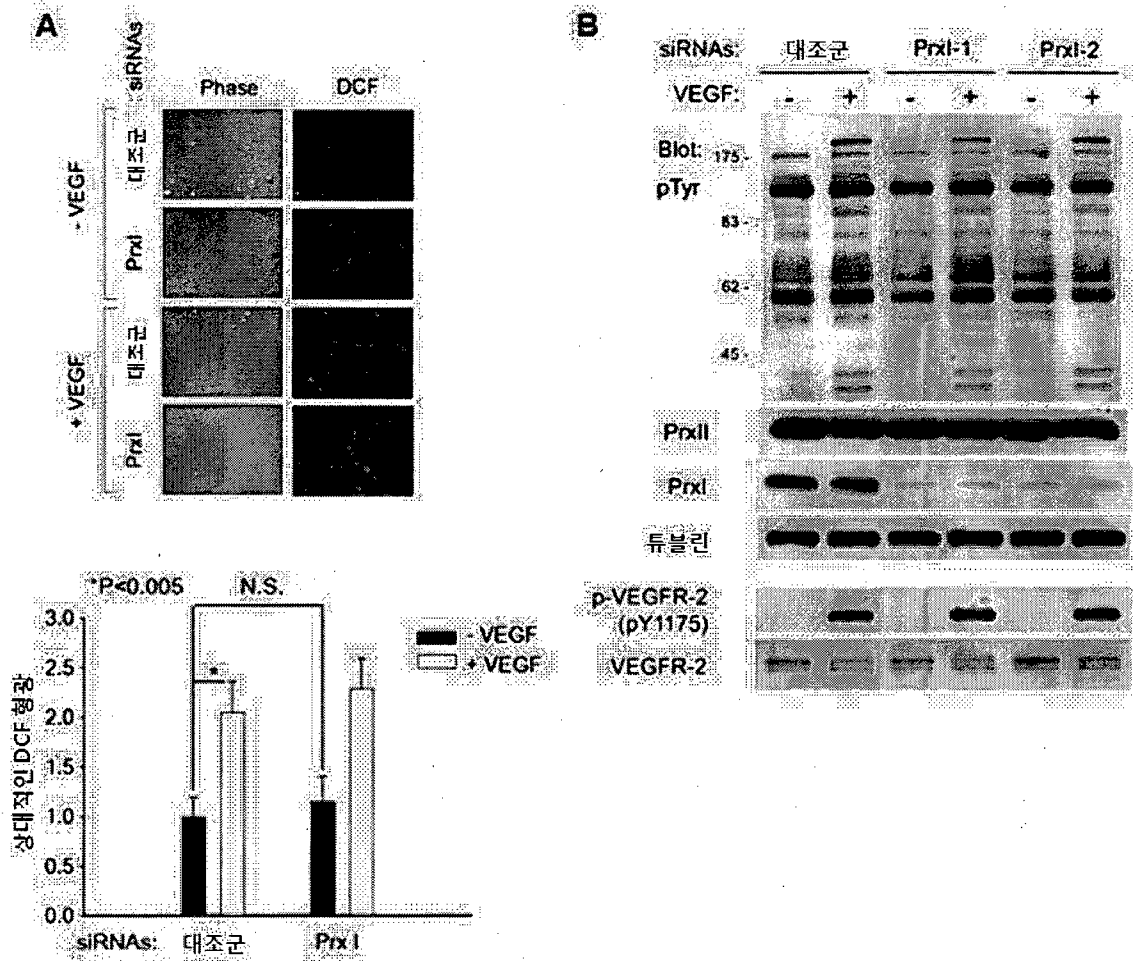
4/16

도 1f



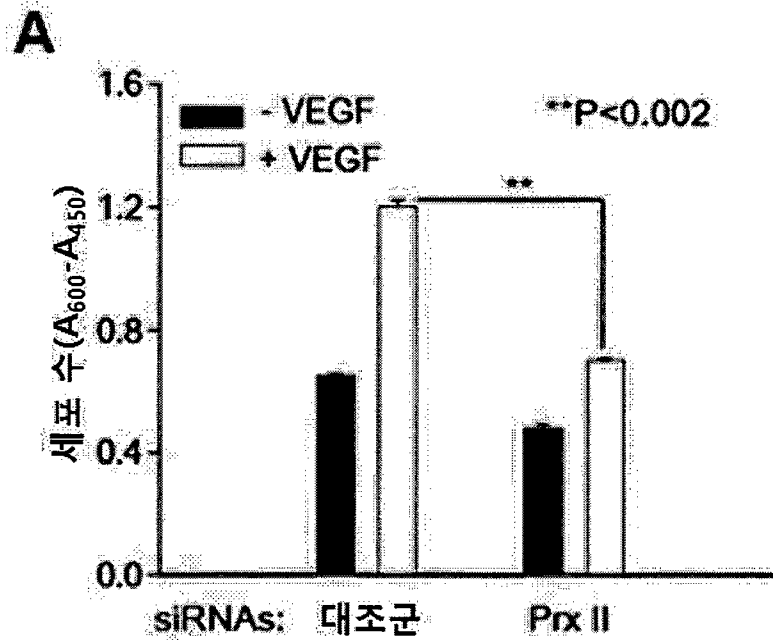
5/16

도 2

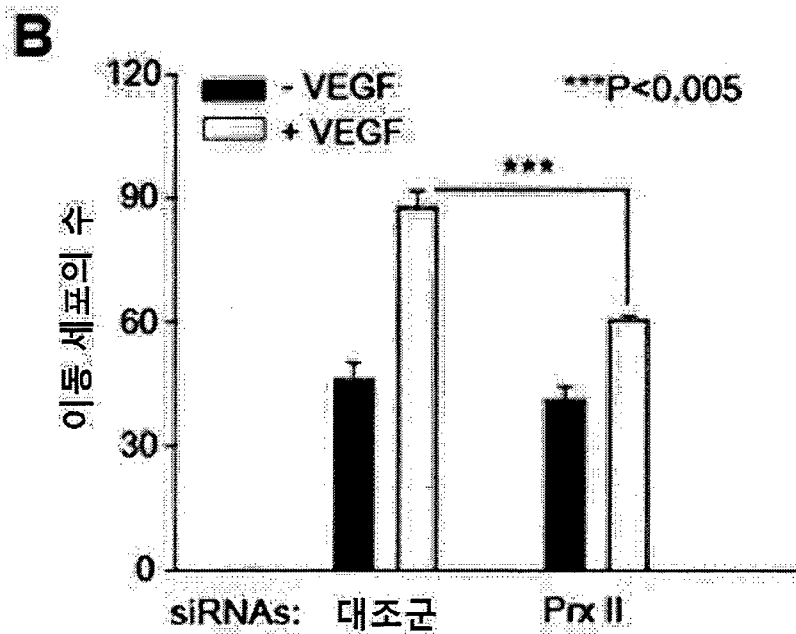


6/16

도 3a

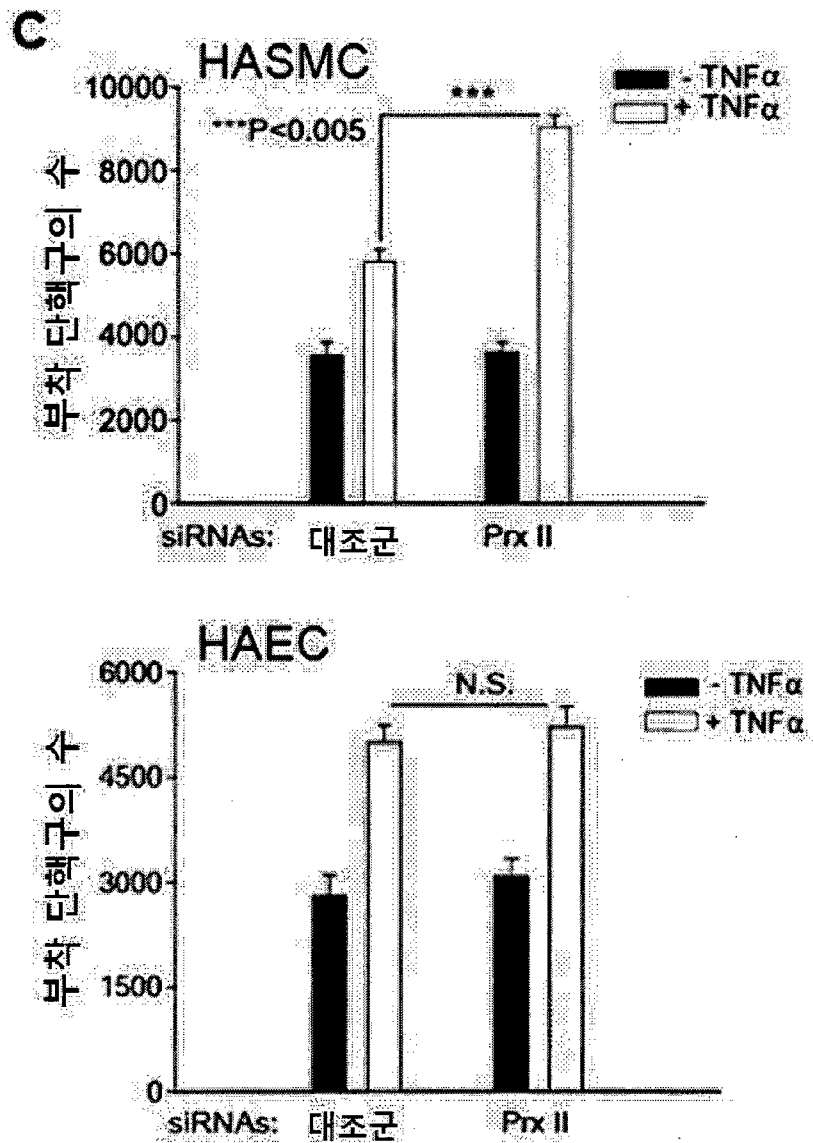


도 3b



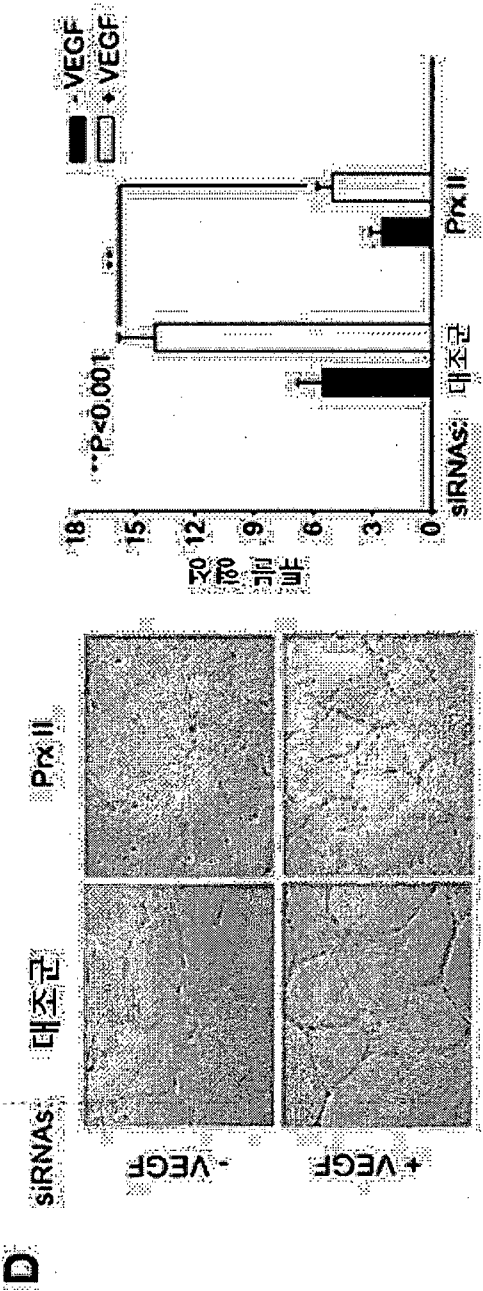
7/16

도 3c



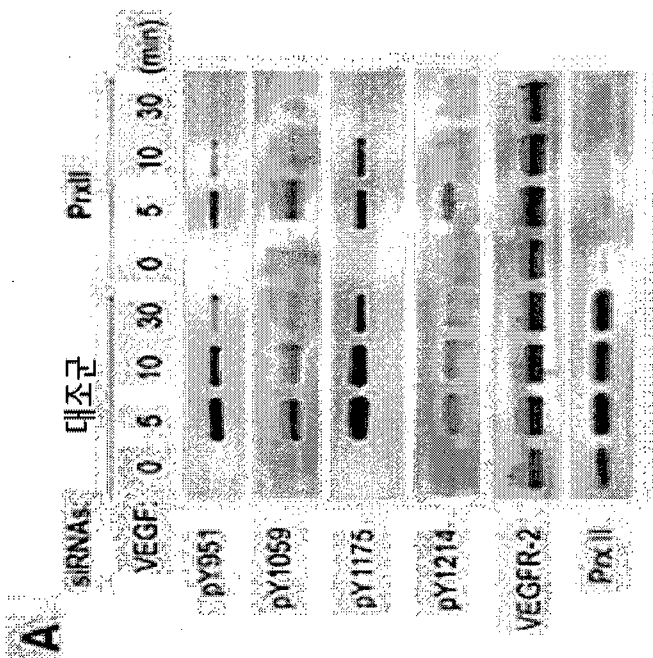
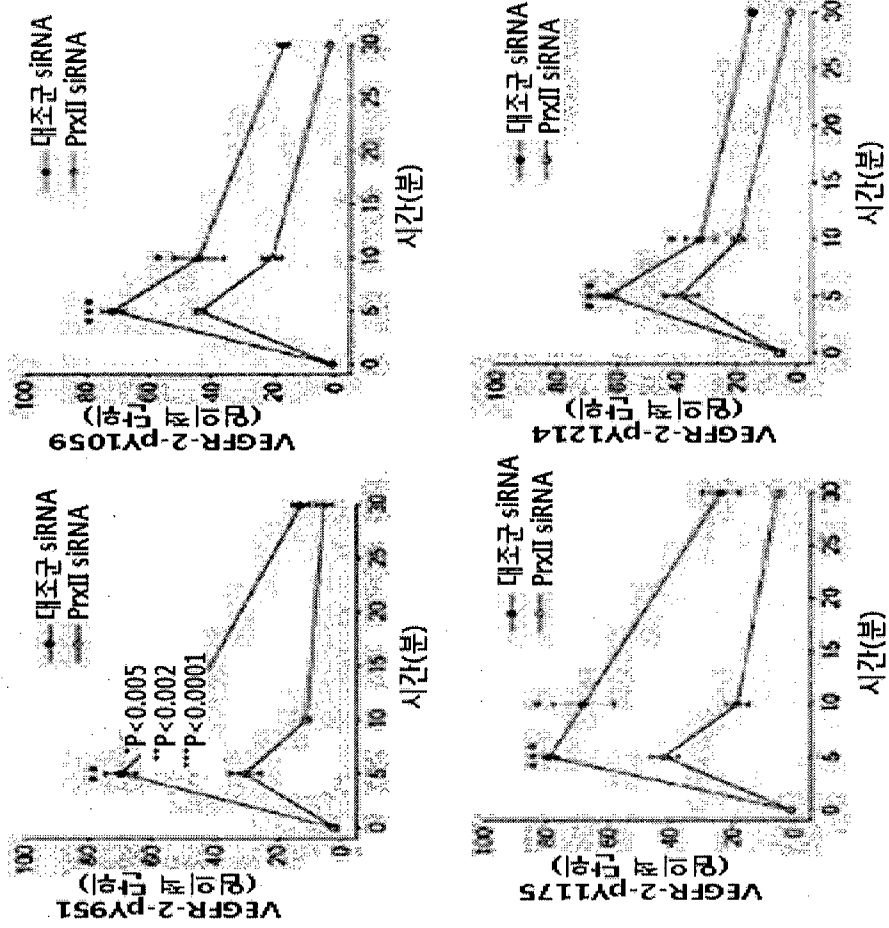
8/16

도 3d



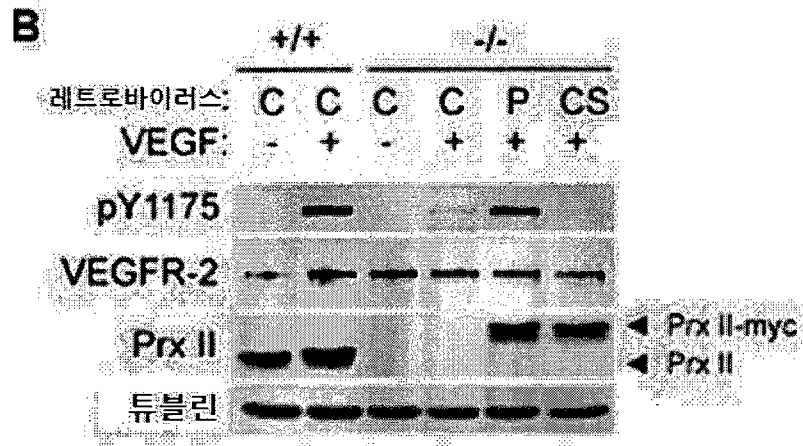
9/16

도 4a



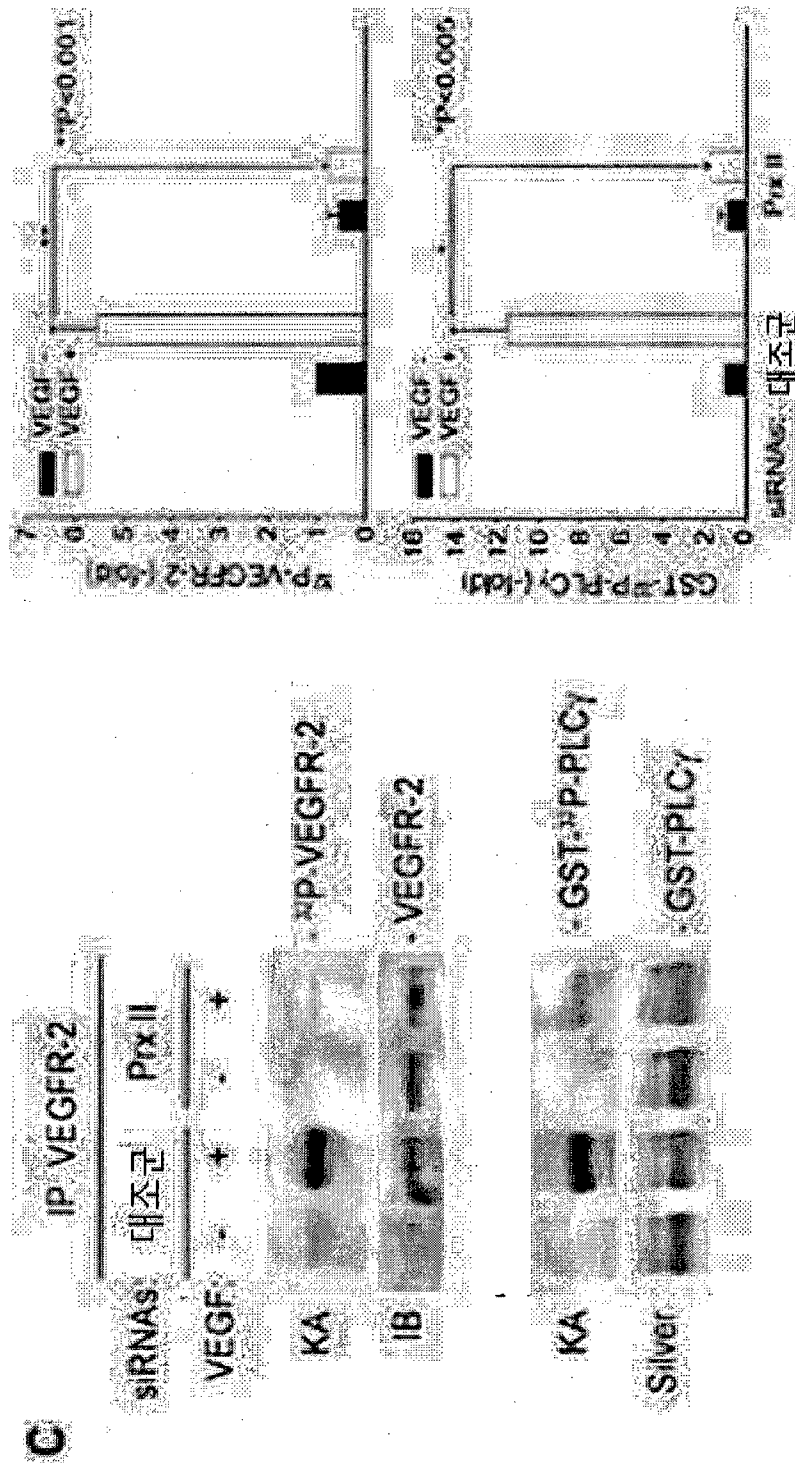
10/16

도 4b



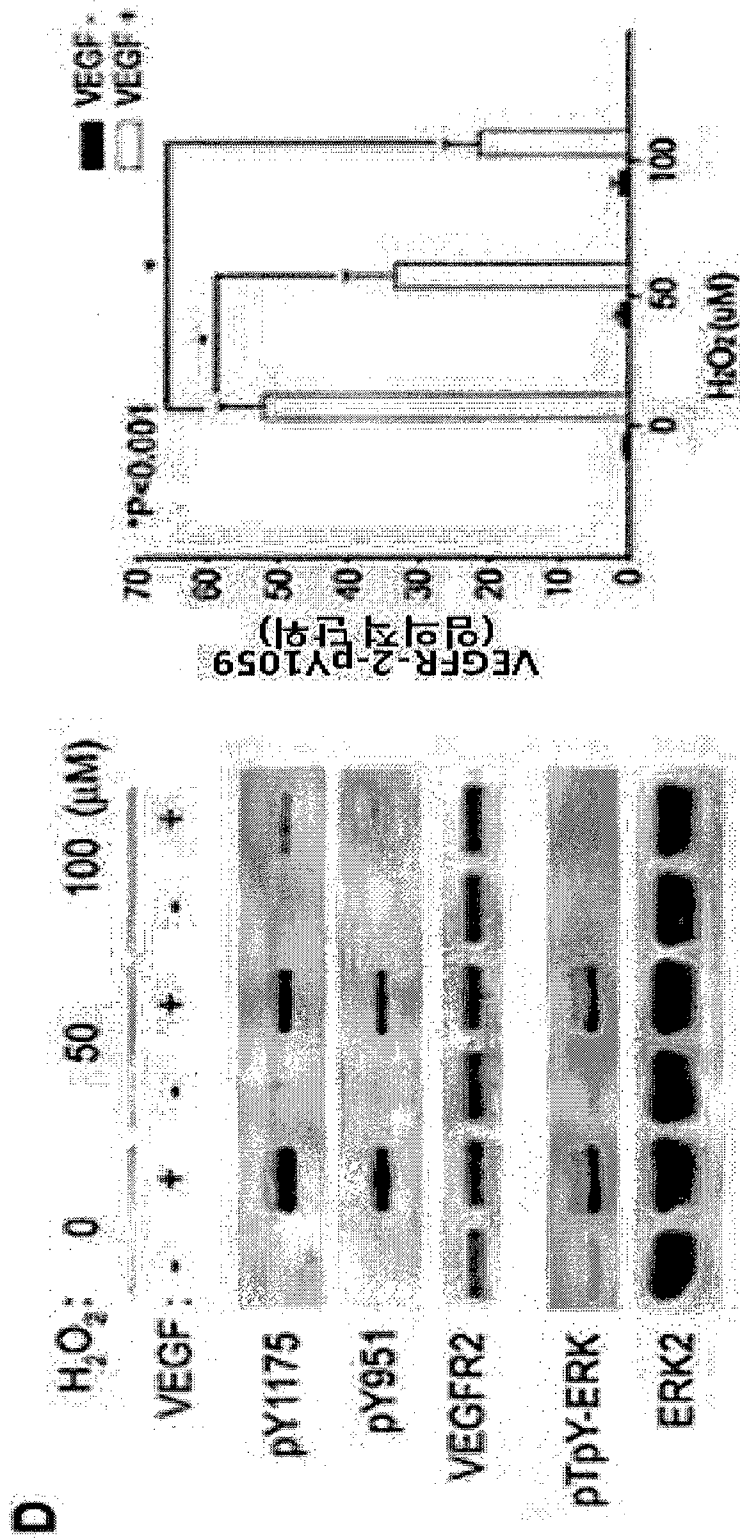
11/16

도 4c



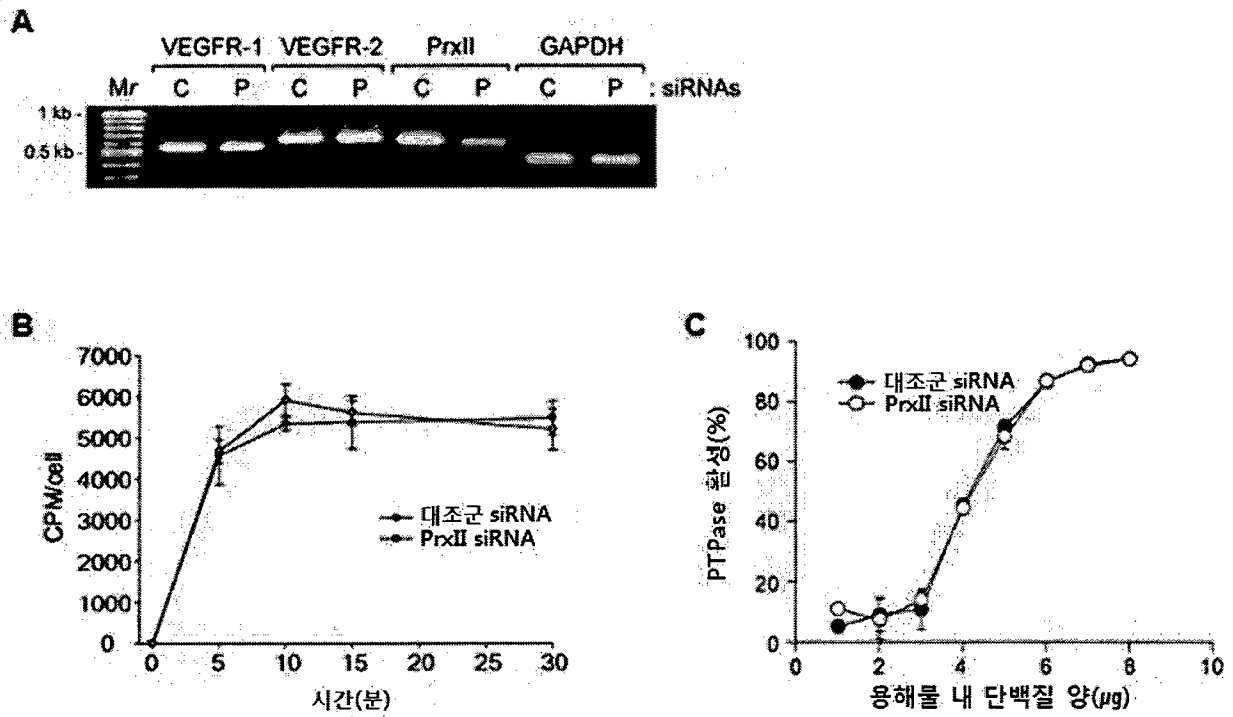
12/16

도 4d



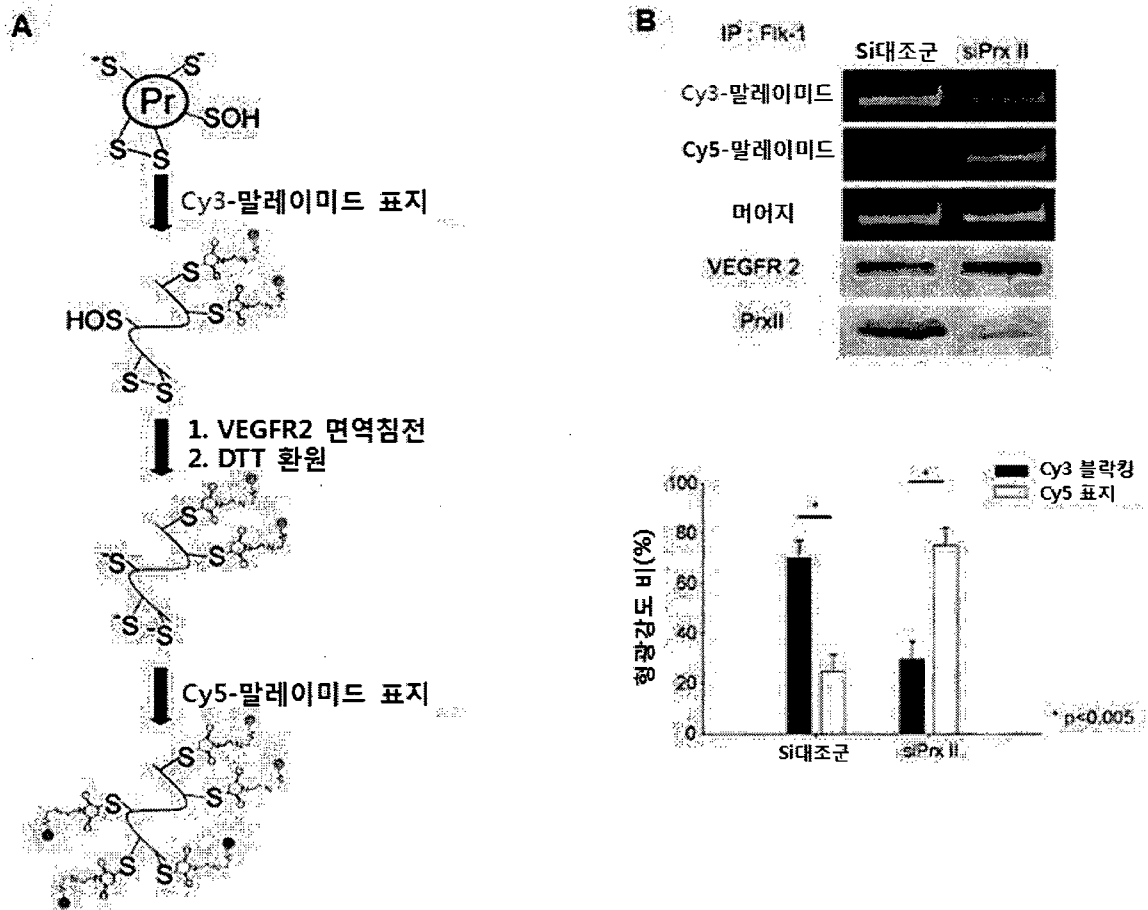
13/16

도 5



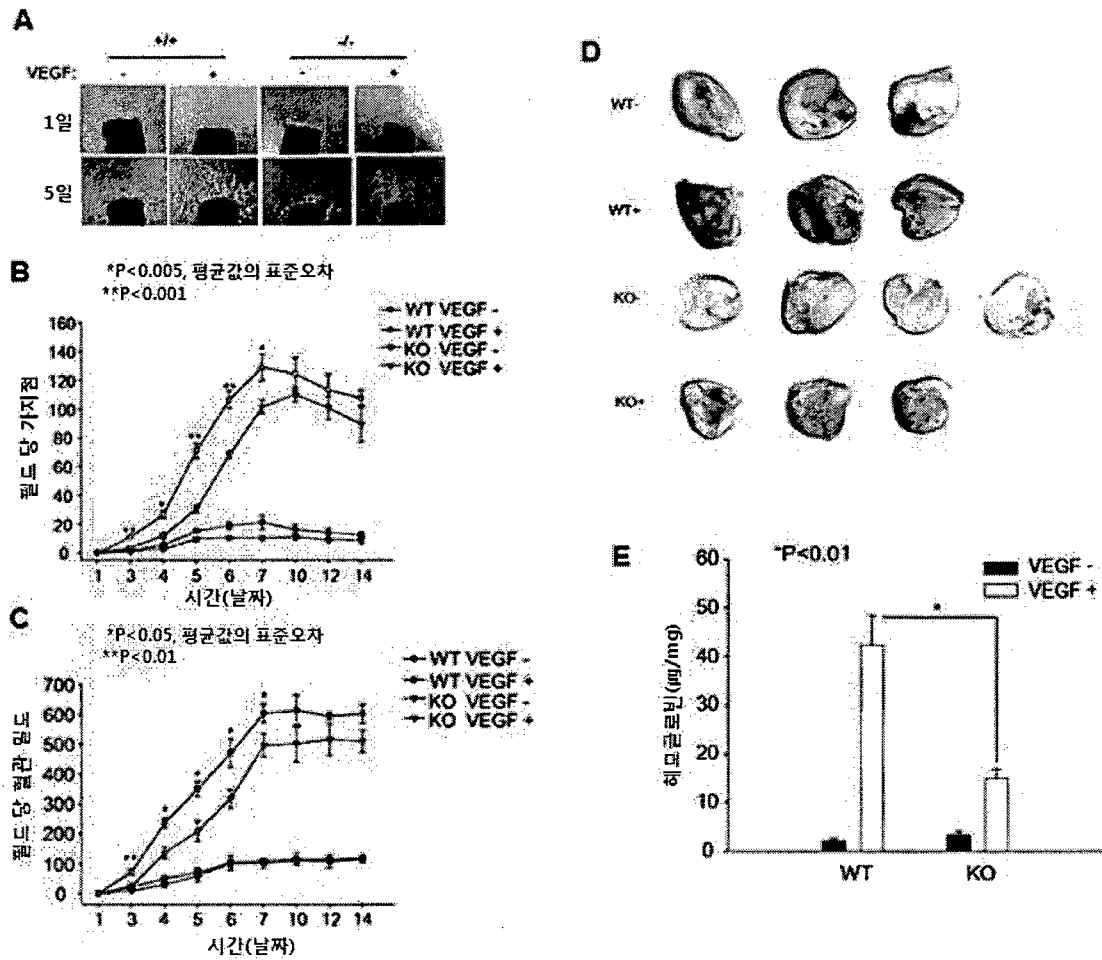
14/16

도 6



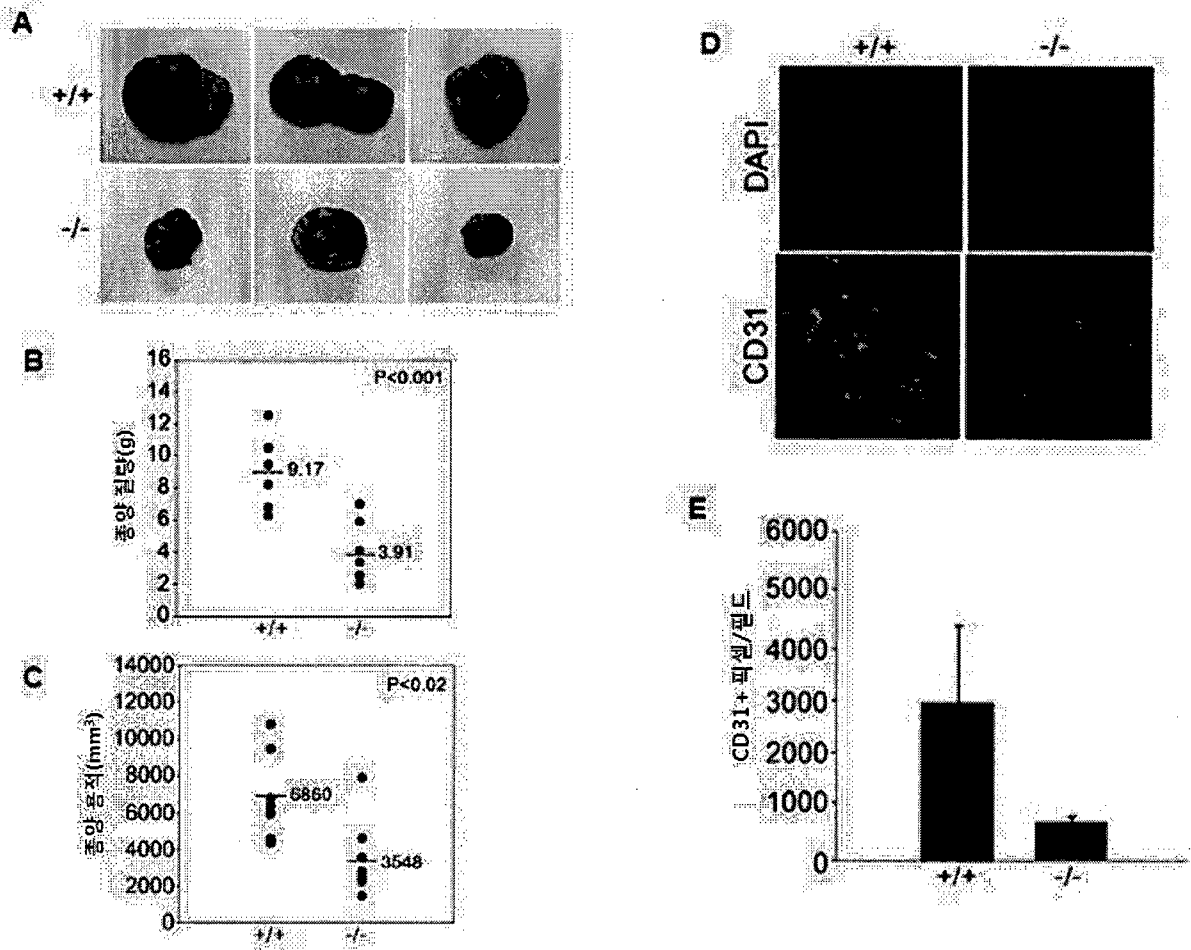
15/16

도 7



16/16

도 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/007902**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/7105(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 31/715(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 35/00(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 31/7105; A61K 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: peroxiredoxin 2, angiogenesis, cancer, VEGF

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Okamoto Hiroaki et al., Comparative proteomic profiles of meningioma subtypes. Cancer research : the official organ of the American Association for Cancer Research, Inc., v.66 no.20, pp.10199-10204 (2006) See page 10203.	1-7
A	US 2005-0233992 A1 (SILVIU ITESCU) 20 October 2005 See claims 72 and 75.	1-7
A	ChangXin-Zhong et al., Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of breast cancer. Breast cancer research: BCR, v.9 no.6 (2007) http://breast-cancer-research.com/content/9/6/R76 See page 10.	1-7
A	KimJoo-Heon et al., Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. Clinical Cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, v.14 no.8, pp.2326 - 2333 (2008) See abstract and page 2326.	1-7



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

28 FEBRUARY 2011 (28.02.2011)

Date of mailing of the international search report

28 FEBRUARY 2011 (28.02.2011)

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/KR2009/007902

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.: **8-16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - Claims 8 to 14 pertain to a method for treatment of the human by surgery or therapy, or to a diagnostic method, and thus pertain to the subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
 - Claims 15 and 16 pertain to a method for treatment of the human by surgery or therapy, or to a diagnostic method in case cell exist in the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of 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 SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2009/007902

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
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
		JP 2005-534290 A	17.11.2005
		US 2003-0199464 A1	23.10.2003
		US 2004-0247564 A1	09.12.2004
		US 2007-172467 A1	26.07.2007
		US 7887796 B2	15.02.2011
		WO 03-090512 A2	06.11.2003
		WO 03-090512 A3	06.11.2003

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

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

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐

서면

☒

전자적 형태

b. 제출시기

☒

출원시 국제출원에 포함

☐

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

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

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

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

1. ☒ 청구항: 8-16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
- 청구항 제8항 내지 제14항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 청구항 제15항 및 제16항은 세포가 인체 내에 존재하는 경우에는, 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 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.

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/7105(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 31/715(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/7105; A61K 48/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: peroxiredoxin 2, angiogenesis, cancer, VEGF		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Okamoto Hiroaki et al., Comparative proteomic profiles of meningioma subtypes. Cancer research : the official organ of the American Association for Cancer Research, Inc., v.66 no.20, pp.10199-10204 (2006) 페이지 10203 참조.	1-7
A	US 2005-0233992 A1 (SILVIU ITESCU) 2005.10.20 청구항 72 및 75 참조.	1-7
A	ChangXin-Zhong et al., Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of breast cancer. Breast cancer research: BCR, v.9 no.6 (2007) http://breast-cancer-research.com/content/9/6/R76 페이지 10 참조.	1-7
A	KimJoo-Heon et al., Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. Clinical Cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, v.14 no.8, pp.2326-2333 (2008) 요약 및 페이지 2326 참조.	1-7
☐ 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 2011년 02월 28일 (28.02.2011)		국제조사보고서 발송일 2011년 02월 28일 (28.02.2011)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 최승희 전화번호 82-42-481-8740 

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

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

JP 2005-534290 A

2005. 11. 17

US 2003-0199464 A1

2003. 10. 23

US 2004-0247564 A1

2004. 12. 09

US 2007-172467 A1

2007. 07. 26

US 7887796 B2

2011. 02. 15

WO 03-090512 A2

2003. 11. 06

WO 03-090512 A3

2003. 11. 06