(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월22일
(11) 등록번호 10-1522499
(24) 등록일자 2015년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0054913
(22) 출원일자 2014년05월08일
심사청구일자 2014년05월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR100877151 B1

기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
전병화
대전광역시 서구 둔산남로 127, 204동 803호 (목련아파트)
김국성
대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (센트럴 자이아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충정

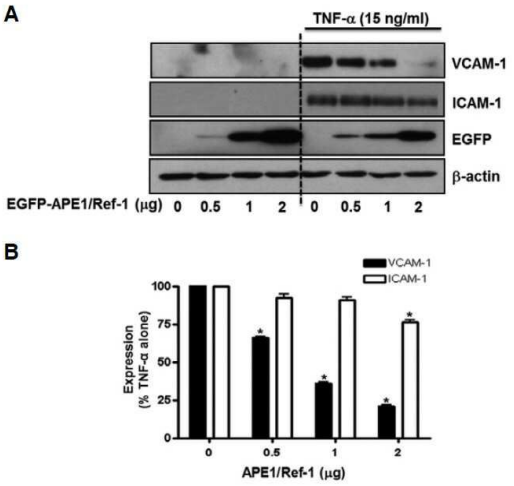
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **APE1/Ref-1 변이체를 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 APE1/Ref-1 변이체를 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 APE1/Ref-1 단백질의 N-말단으로부터 28개 아미노산이 삭제된 APE1/Ref-1 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, APE1/Ref-1 변이체(29-318)는 염증성 세포부착 분자의 발현을 저해함으로써 혈관 내피세포에서 효과적으로 항염증 활성을 나타낼 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최성아

대전광역시 서구 문정로170번길 167-13

주희경

대전광역시 서구 만년로 25, 102-701호 (강변아파트)

박명수

대전광역시 서구 관저북로 80, 209-1805호 (원앙마을2단지아파트)

강건

대전광역시 유성구 문화원로 13, 102동 902호

이유란

충청북도 보은군 보은읍 향교1길 3-3, 102동 603호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20120005766
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터육성(MRC)지원사업
연구과제명	감염신호 연관 산화환원조절 시스템 해독 및 염증 제어 기술 활용
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교
연구기간	2012.05.01 ~ 2014.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

APE1/Ref-1 단백질의 N-말단으로부터 28개 아미노산이 삭제된, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 APE1/Ref-1 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 동맥경화 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 변이체는 내피세포의 세포질에 위치함으로써 항염증 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 단백질의 시스테인 65 및 93 잔기에 의해 항염증 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 변이체를 코딩하는 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 6b에 개시된 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 APE1/Ref-1 변이체를 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 APE1/Ref-1 단백질의 N-말단으로부터 28개 아미노산이 삭제된 APE1/Ref-1 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] APE1/Ref-1 (Apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1)은 염기절제 DNA 복구 및 유전자 발현의 전사 조절과 관련된 다기능 단백질이다. APE1/Ref-1의 다기능적 특성은 산화스트레스에 대한 세포 반응의 폭넓은 연구를 통해 밝혀져 있다 (Jeon, B. H. et al., 2009 *Antioxid. Redox Signal.* 11, 571-573). APE1/Ref-1의 산화환원 및 DNA 복구 기능은 완전히 독립적이고 (Xanthoudakis, S. et al., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 23-27), *in vitro*에서 절단된 APE1/Ref-1 단백질의 분석은 산화환원 및 복구 활성이 별개의 영역에 의해 코딩됨을 나타내고 있다. 특히, N-말단 영역은 2개의 중요한 시스테인 잔기, C65와 C93으로 특징되는 산화환원 조

절 도메인을 포함한다 (Xanthoudakis, S. et al., 1992 *EMBO J.* 11, 3323-3335). APE1/Ref-1의 핵 위치이동(nuclear localization)은 N-말단 서열의 처음 20-25 아미노산에 의해 조절된다 (Jackson, E. B. et al., 2005 *Nucleic Acids Res.* 33, 3303-3312). 또한 APE1/Ref-1의 니트로소화(nitrosation)는 CRM1(chromosome region maintenance 1)-독립된 과정에서 세포질 위치이동(cytoplasmic localization)을 초래한다는 것이 보고되어 있다 (Qu, J. et al., 2007 *Nucleic Acids Res.* 35, 2522-2532). 따라서 핵 이동 및 방출(nuclear import and export) 시스템은 APE1/Ref-1의 세포내 분포를 조절할 수 있다. APE1/Ref-1은 세포질의 Rac1-조절된 활성 산소종의 생성의 조절을 통해 산화 스트레스를 억제하고 (Angkeow, P. et al., 2002 *Cell Death Differ.* 9, 717-725) 내피세포의 산화질소 합성을 활성화함으로써 산화질소 생산을 자극한다 (Jeon, B. H. et al., 2004 *Circ. Res.* 95, 902-910). 내피세포에서, APE1/Ref-1은 TNF-α-유도된 단핵구 부착을 완화시키고 혈관세포 부착 분자의 발현을 억제시킨다 (Kim, C. S. et al., 2006 *Cardiovasc. Res.* 69, 520-526). 최근, APE1/Ref-1은 p66shc의 PKCβII-매개된 세린 인산화를 저해함으로써 내피세포에서 산화된 LDL-유도성 p66shc 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다 (Lee, S. K. et al., 2011 *Cardiovasc. Res.* 91, 502-509). 따라서 혈관 염증성 질환에서 APE1/Ref-1의 보호 역할의 가능성이 제시되었다.

[0003] APE1/Ref-1은 주로 핵에서 관찰되지만, 세포질 APE1/Ref-1은 다양한 자극에 반응하는 것으로 보고되어 있다 (Choi, S. et al., 2013 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 403-407). 그러나 세포질 APE1/Ref-1의 기능적 역할은 실험적으로 밝혀지지 않았다. 현재까지, 혈관 내피세포 활성화의 통합 조절(coordinated control)에 관여하는 APE1/Ref-1의 특이적 도메인은 밝혀져 있지 않다.

[0004] 본 발명에서는, N-말단의 28개 아미노산이 삭제된 돌연변이(29-318) 및 이중 산화환원 점 돌연변이(point mutant, C65A/C93A)를 사용하여 세포질 APE1/Ref-1의 기능적 역할을 조사함으로써 내피세포에서 APE1/Ref-1의 항염증 활성에 결정적인 도메인을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서 본 발명의 목적은 혈관 내피세포의 핵이 아닌 세포질에서 일관되게 발현됨으로써 항염증 활성을 나타낼 수 있는, APE1/Ref-1 단백질의 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 APE1/Ref-1 단백질의 N-말단으로부터 28개 아미노산이 삭제된 APE1/Ref-1 변이체(29-318) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 변이체는 내피세포의 세포질에 위치함으로써 항염증 효과를 나타낼 수 있다.

[0008] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 단백질의 시스테인 65 및 93 잔기에 의해 항염증 효과를 나타낼 수 있다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 변이체를 코딩하는 유전자는 발현벡터에 삽입되어 제공될 수 있다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, APE1/Ref-1의 N-말단 28개 아미노산이 삭제된 APE1/Ref-1 변이체는 생물학적 활성을 나타내고, 야생형과 달리 세포질에 위치한다. 또한 APE1/Ref-1 변이체(29-318)의 트랜스펙션은 TNF-α-유도성 VCAM-1의 발현을 저해한다. 따라서 본 발명의 APE1/Ref-1 변이체는 혈관 내피세포에서 효과적으로 항염증 활성을 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] **도 1**은 APE1/Ref-1 과발현이 내피세포에서 TNF-α-유도성 VCAM-1 및 ICAM-1 발현을 저해한다는 것을 나타낸 도면이다. (A) APE1/Ref-1 VCAM-1, ICAM-1에 대한 웨스턴 블롯 분석은 EGFP-APE1/Ref-1-트랜스펙션된 내피세포에서 수행하였다. EGFP-APE1/Ref-1 플라스미드를 이용한 APE1/Ref-1의 이소성 발현은 TNF-α-자극된 VCAM-1 및 ICAM-1 발현을 저해하였다. (B) 도 1의 A에 대한 요약. 각 바(bar)는 평균±표준오차를 나타낸다 (n = 4).

도 2는 내피세포에서 내생성 APE1/Ref-1의 세포내 위치를 나타낸 도면이다. (A) 내생성 APE1/Ref-1은 주로 핵에 위치된다. TNF-α 처리는 내피세포에서 APE1/Ref-1 세포질 위치이동을 유도하였지만 NADPH 산화효소의 저해제인 다이페닐렌아이오도늄(DPI, 10 μM)으로 전처리된 세포에서는 그렇지 않았다. 세포들은 글라스 커버슬립 상에서 성장하였으며 DPI가 있거나 없는 상태에서 TNF-α (15 ng/ml)로 30분간 처리하였다. 세포들을 4% 파라포름알데히드로 고정하고 0.5% Triton X-100으로 투과성을 높였다. 세포들은 항-APE1/Ref-1 (green, Alexa 488), 미토콘드리아 염색용 미토트래커 레드(mitotracker red; red fluorescence), 및 핵 염색용 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole; blue fluorescence)로 면역염색 하였다. 배율 400×. 유사한 결과들은 삼중으로 실험하여 관찰하였다. (B) TNF-α-자극된 HUVECs에서 ROS 생성을 관찰하였다. 형광 이미지는 DPI가 있거나 없이 기초 조건(basal) 및 TNF-α로 자극된 HUVECs에서 ROS 수준을 보여준다. ROS의 형광 강도는 형광측정기(fluorometer)로 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다 (n = 3).

도 3은 TNF-α가 내피세포에서 APE1/Ref-1의 세포질 위치이동을 유도함을 나타낸 도면이다. (A) TNF-α 처리는 내피세포에서 APE1/Ref-1의 시토졸(cytosol)로의 신속한 위치이동을 유도하였다. 시토졸 및 핵 분획을 이용한 APE1/Ref-1에 대한 면역블로팅이 수행되었다. 각 분획은 지시된 시간 동안 TNF-α (15 ng/ml)의 처리 후 세포로부터 제조되었다. PPRP 및 α-튜불린은 각각 핵과 세포질 마커로서 사용되었다. (B) 내피세포에서 TNF-α-유도성 세포질 위치이동에 대한 렙토마이신 B 또는 시클로헥사미드의 효과. 세포를 렙토마이신 B (LMB, 10 ng/ml for 1 h) 또는 시클로헥사미드 (CHX, 10 ng/ml for 1 h)로 전-배양한 다음 TNF-α (15 ng/ml)로 30분간 자극하였다. 유사한 결과들은 삼중으로 실험하여 관찰하였다.

도 4는 N-말단 삭제 돌연변이 APE1/Ref-1 (29-318)이 내피세포에서 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 저해함을 나타낸 도면이다. (A) N-말단 삭제 돌연변이 EGFP-APE1/Ref-1 (29-318)의 면역세포화학 분석. 세포들은 미토콘드리아 염색용 미토트래커 레드(mitotracker red; red fluorescence), 및 핵 염색용 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole; blue fluorescence)로 면역염색 하였다. 병합된 이미지는 EGFP-APE1/Ref-1 (29-318)의 세포질 위치로 인해 세포질에서 녹색 형광 염색을 나타낸다. TNF-α에 반응하여 EGFP-APE1/Ref-1 (29-318) 분획의 세포내 위치는 시토졸 및 핵 분획을 이용한 웨스턴 블롯에서 확인하였다. (B) 플라스미드 트랜스펙션에 의한 EGFP-APE1/Ref-1 (1-318) 및 EGFPAPE1/Ref-1 (29-318)의 발현은 15 ng/ml에서 18시간 동안 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 현저히 저해하였다. (C) 도 4의 B에 대한 요약. 각 바(bar)는 평균±평균오차 (n = 4)를 나타낸다.

도 5는 이중 산화환원 돌연변이 APE1/Ref-1 (C65/93A)이 내피세포에서 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 증가시킴을 나타낸 도면이다. (A) 내피세포에서 이중 산화환원 돌연변이 APE1/Ref-1 (C65/93A)의 면역세포화학 분석. 세포들은 미토콘드리아 염색용 미토트래커 레드(mitotracker red; red fluorescence), 및 핵 염색용 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole; blue fluorescence)로 면역염색 하였다. 병합된 이미지는 APE1/Ref-1 (C65/93A)의 세포질 위치로 인해 세포질에서 녹색 형광 염색을 나타낸다. TNF-α에 반응하여 EGFP-APE1/Ref-1 (C65/93A) 분획의 세포내 위치는 시토졸 및 핵 분획을 이용한 웨스턴 블롯에서 확인하였다. (B) 플라스미드 트랜스펙션에 의한 HA-APE1/Ref-1 (C65A/C93A)의 발현은 15 ng/ml에서 18시간 동안 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 현저히 증가시켰다. (C) 도 5의 B에 대한 요약. 각 바(bar)는 평균±평균오차 (n = 4)를 나타낸다.

도 6은 본 발명에 따른 APE1/Ref-1(29-318)의 재조합벡터를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 APE1/Ref-1 단백질의 N-말단으로부터 28개 아미노산이 삭제된 APE1/Ref-1 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 혈관 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에서, 상기 APE1/Ref-1(Apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1)은 주로 핵에서 관찰되며, 핵에 위치하는 APE1/Ref-1은 DNA 복구, 유전자 발현의 전사 조절 및 산화 스트레스에 대한 반응조절 등의 기능을 수행한다. 그러나 APE1/Ref-1은 핵이 아닌 세포질에 위치(cytoplasmic localization)하여 항염증

활성을 나타내므로, 염증성 질환의 예방 및 치료를 위해서는 세포질에서 일관되게 발현하는 APE1/Ref-1이 필요하다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 단백질은 포유동물에서 유래된 것일 수 있다. 예들 들면, 상기 APE1/Ref-1 단백질은 인간, 원숭이, 및 설치류로 구성된 군으로부터 유래된 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 단백질은 인간으로부터 유래된 Genbank Accession No. NM_001641에 개시된 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 유전자는 Genbank Accession No. NM_001641에 개시된 염기서열을 가질 수 있다.

[0015] 이로부터 본 발명의 APE1/Ref-1 변이체는 N-말단으로부터 28개 아미노산을 삭제하여 제조된 삭제 돌연변이(deletion mutants)이며, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 변이체는 내피세포의 세포질에 위치함으로써 항염증 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, APE1/Ref-1의 내피세포 과발현으로 염증성 사이토카인인 TNF-α에 반응하여 발현되는 염증성 세포부착 분자인 VCAM-1 및 ICAM이 저해됨을 확인하였다 (도 1 참조). 특히 이러한 APE1/Ref-1의 항염증 작용은 APE1/Ref-1의 세포질 위치이동과 관련되어 있는데 (도 2 참조), 야생형 APE1/Ref-1는 TNF-α 자극에 의해 급격하게 세포질로 위치이동 하지만, 본 발명의 APE1/Ref-1 변이체는 TNF-α 처리와 관계없이 일관되게 세포질에서 발현되었다 (도 4 참조). 따라서 본 발명의 APE1/Ref-1 변이체는 염증성 세포부착 분자의 발현 저해를 통해 혈관 내피세포의 염증을 효과적으로 억제할 수 있다.

[0017] 본 발명에서, 상기 염증성 세포 부착 분자들과 염증성 혈관질환과의 관련성은 다음과 같은 염증성 혈관질환의 발병 과정에 근거한다. 동맥경화를 비롯한 혈관질환은 연령, 성별, 유전적 환경, 스트레스 등의 다양한 원인들이 복합적으로 작용하여 일어나는 염증성 질환으로 병의 발병 과정 중 동맥의 내막에 존재하는 내피세포(endothelial cell)의 손상으로 인한 기능이상이 가장 먼저 관찰된다. 손상된 내피 세포막에서 발현되는 세포간 부착분자-1 (intracellular adhesion molecule-1; ICAM-1), 혈관 세포부착분자-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1), E-selectin 등은 혈액 내 단핵세포와 결합 후, 내피세포 사이를 통과해서 동맥의 내막으로 이동하여 대식세포로 분화하고 TNF-α 등의 사이토카인을 분비, 활성산소종의 생성을 자극하여 병을 진행하는 것으로 알려져 있다 (Peter Libby, 2002, *Nature*, 420, 6917:868-874). 세포부착단백질인 ICAM-1과 VCAM-1은 초기 동맥경화가 유발된 곳의 내피세포에서 발현이 증가되는 반면, 동맥경화가 유발되지 않은 부위에서는 관찰되지 않기 때문에 (Cybulsky and Gimbrone, 1991, *Science*, 251:788-91; Sharon J. Hyduk et al., 2007, *Progress inflammation research* 2:141-174) 이를 타깃으로 하여 세포부착 분자의 발현을 저감시켜 단핵구로의 내피 부착을 억제하는 혈관 염증질환 치료용 치료제들이 개발되어 왔다 (*Gut* 1999 Mori N, Horie Y et al., 44: 186-195; *J. Agric. Food Chem.* 2005, Kwon H, Choi Y et al., 53: 5150-5157; *Molecules* 2014, 19: 1459-1480).

[0018] 또한 본 발명에서는, APE1/Ref-1 산화환원 도메인(1-127 aa)의 시스테인 65 및 93 잔기가 내피세포에서 APE1/Ref-1의 항염증 작용에 중요한 역할을 함을 밝혀내었다 (도 5 참조).

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 APE1/Ref-1 변이체를 코딩하는 유전자는 분리된 유전자 물질로서 유지될 수 있는 플라스미드 벡터의 형태로 세포내로 도입되거나 또는 염색체 내로 통합될 수 있는 선형 DNA를 세포 내로 도입할 수 있다. DNA가 세포 내로 도입될 경우, 당해 분야에 공지된 바와 같이, 염색체 내로의 DNA 혼입을 촉진시키는 시약을 첨가할 수도 있고, 혼입을 촉진시키는 DNA 서열 또한 조성물 내에 포함될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 상기 APE1/Ref-1 변이체를 코딩하는 유전자는 발현벡터에 삽입된 형태로 제공될 수 있다.

[0020] 상기 APE1/Ref-1 변이체를 코딩하는 유전자는 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터 내로 삽입시킨 후, 상기 발현벡터를 감염(infection) 또는 형질도입(transduction) 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 발현형으로 표적 세포 내에 도입시켜 유전자 치료에 사용할 수 있다.

[0021] 플라스미드 발현 벡터를 이용한 유전자 전달 방법은 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법으로서, FDA로부터 승인받은, 사람에게 사용할 수 있는 방법이다(Nabel, E. G., et al., Science, 249:1285-1288, 1990). 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다.

[0022] 본 발명에 따른 유전자를 포함하는 플라스미드 발현 벡터(plasmid expression vector)는 당업계에 공지된 방법,

예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated trans fection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 종양 세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현벡터는 도 6에 개시된 개열지도를 갖는 재조합벡터일 수 있다.

[0024] 또한 상기 벡터는 APE1/Ref-1 변이체를 코딩하는 유전자의 발현을 위해 필요한 조절 요소를 포함한다. 이러한 요소는, 예를 들면, 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 이들 요소는 바람직하게는 목적하는 APE1/Ref-1 변이체를 코딩하는 서열에 작동적으로 연결되며, 조절 요소는 바람직하게는 이들이 투여될 종에서 작동될 수 있도록 선택된다.

[0025] 본 발명에 따른 APE1/Ref-1 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0026] 또한 본 발명의 약학 조성물은 치료학적 또는 예방학적 유효양으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 단일 또는 다중 투여일 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0027] 또한 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0028] 이하, 본 발명에 따른 APE1/Ref-1의 세포질 위치이동, APE1/Ref-1 변이체, 및 시스테인 65와 93 잔기의 항염증 활성과 관련된 역할을 구체적으로 설명한다.

[0029] 축적된 증거가 나타내는 바에 따르면, APE1/Ref-1은 핵에서 DNA 복구 및 전사 조절 뿐만 아니라 산화 스트레스에 대한 세포반응을 조절함에 있어 다면적(pleiotropic) 역할을 한다. 또한 APE1/Ref-1의 핵외(extra-nuclear) 기능이 밝혀져 있다 (Jeon, B. H. et al., 2009 *Antioxid. Redox Signal*. 11, 571-573). APE1/Ref-1은 NADPH 산화효소에서 Rac1 활성화의 저해를 통해 세포내 ROS 생성을 감소시킨다 (Angkeow, P. et al., 2002 *Cell Death Differ*. 9, 717-725). MAPKs(mitogen-activated protein kinase)는 성장인자, 환경 스트레스 및 염증성 사이토카인에 의해 활성화되는 것으로 잘 알려져 있다. 이전 연구에서 아데노바이러스 유전자 전달 시스템을 이용한 APE1/Ref-1의 과발현이 내피세포에서 TNF-α-유도성 ROS 생성 및 VCAM-1을 저해한다는 것이 보고되어 있다 (Lee, H. M. et al., 2009 *Circ. Res*. 104, 219-U162). 또한 TNF-α에 의한 p38 MAPK 활성화가 APE1/Ref-1의 과발현에 의해 차단되어 그 결과 내피세포에서 TNF-α-유도성 VCAM-1의 저해가 나타난다 (Kim, C.S. et al., 2006 *Cardiovasc. Res*. 69, 520-526). TNF-α-유도성 VCAM-1은 내피세포에서 NADPH 산화효소 및 미토콘드리아 ROS와 밀접하게 관련되어 있다 (Bae, Y. S. et al., 2011 *Mol. Cells* 32, 491-509). 본 발명의 데이터는 APE1/Ref-1의 플라스미드 트랜스펙션이 내피세포에서 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 저해함을 보여주었고, 이는

사이토카인-유도성 내피세포 염증에 대한 APE1/Ref-1의 생물학적 기능을 제시하다.

[0030] APE1/Ref-1은 세포에서 아주 흔한 단백질이지만, 세포 타입에 따라 그 발현 패턴이 상이하다. APE1/Ref-1 세포내 위치는 주로 핵이지만, 세포질에서 존재 확인, 특히 높은 대사 또는 증식 상태 동안에도 보고되고 있다 (Duguid, J. R. et al., 1995 *Cancer Res*. 55, 6097-6102). 몇몇 보고는 APE1/Ref-1 발현 및 세포내 위치가 정교하게 조율됨을 제시한다. APE1/Ref-1의 세포내 분포는 핵 이동(import) 및 방출(export) 시스템 둘 다에 의해 조절될 수 있다 (Jackson, E. B. et al., 2005 *Nucleic Acids Res*. 33, 3303-3312). APE1/Ref-1은 산화 스트레스(oxidative stress) 및 산화질소 스트레스(nitrosative stress)에 반응하여 세포질과 핵 사이에서 활발한 왕복(active shuttling)이 일어난다 (Qu, J. et al., 2007 *Nucleic Acids Res*. 35, 2522-2532). 내피세포에서, APE1/Ref-1의 세포질로의 위치이동은 이미 보고되어 있다. 단백질 키나아제 C 활성화는 내피세포에서 APE1/Ref-1 세포질 위치이동의 증가를 초래한다 (Lee, S. K. et al., 2011 *Cardiovasc. Res*. 91, 502-509). 본 발명에서는, 세포질 APE1/Ref-1이 TNF-α에 반응하여 증가되고, 신생 단백질 합성 저해제인 시클로헥사미드(cycloheximide) 또는 핵 엑스포틴(nuclear exportin)의 저해제인 렙토마이신 B(leptomycin B)에 의해 차단되지 않음을 확인하였다. 이러한 데이터는 TNF-α-자극 후 세포질에서 APE1/Ref-1의 증가된 양은 대부분 내피세포에서 APE1/Ref-1의 세포질 위치이동에 기인한 것임을 시사한다 (도 2).

[0031] 대사적으로 높은 활성의 세포에서, APE1/Ref-1은 ROS 노출에 따라 서로 다른 세포 타입에서 세포질로부터 핵으로 위치이동이 일어난다. 배양 배지에 티로트로핀(thyrotropin)의 추가는 갑상선 세포에서 APE1/Ref-1의 세포질에서-핵으로 위치이동을 증가시킨다 (Tell, G. et al., 2000a *J. Mol. Endocrinol*. 24, 383-390). 과산화수소에 B 림프구의 노출은 핵의 APE1/Ref-1 단백질 수준에서 신속하고 지속적인 증가를 유도한다 (Tell, G. et al., 2000b *Nucleic Acids Res*. 28, 1099-1105). 본 발명에서, APE1/Ref-1이 내피세포의 핵에 주로 위치하고 TNF-α에 노출은 세포질 위치이동의 증가를 유도하는 것으로 관찰되었다. 그러나 APE1/Ref-1의 이러한 재위치(re-localization)를 조절하는 세포 메커니즘은 내피세포에서 명확하게 되어야 할 것으로 남아있다. 본 발명의 데이터는 TNF-α에 반응하여 APE1/Ref-1의 핵에서-세포질 위치이동이 NADPH 산화효소 저해제에 의해 차단됨을 보여준다. 이는 세포질에서 APE1/Ref-1의 존재는 내피세포에서 산화 스트레스에 대한 세포 반응들과의 관련성을 반영할 수 있음을 시사한다.

[0032] APE1/Ref-1의 삭제 돌연변이를 이용한 분석은 추정되는 NLS를 포함하는 APE1/Ref-1의 N-말단 28개 아미노산 삭제가 생물학적으로 활성이고 세포질 위치이동을 보여준다는 것을 설명하였다. APE1/Ref-1의 NLS-삭제 돌연변이가 주로 세포질에 위치하기 때문에, VCAM-1에 대한 APE1/Ref-1의 NLS 삭제 돌연변이의 저해 작용은 NF-κB 및 AP-1과 같은 몇 가지 핵 전사인자들을 조절할 수 있는 APE1/Ref-1의 핵 기능에 의해 매개되지는 않는다 (Evans, A. R. et al., 2000 *Mutat. Res*. 461, 83-108). NLS-삭제 돌연변이 APE1/Ref-1 (29-318)의 플라스미드 트랜스펙션은 야생형 APE1/Ref-1과 유사하게, TNF-α-유도성 VCAM-1의 발현을 저해한다. 이는 APE1/Ref-1의 세포질 위치가 내피세포에서 항-염증성 작용에 기여함을 의미한다.

[0033] 내피세포에서 산화환원 도메인의 기능적 활성이 여전히 잘 알려져 있지 않으며, APE1/Ref-1 삭제 돌연변이에 대한 몇몇 연구들은 1-127 아미노산 잔기의 N-말단이 시험관내에서 c-Jun 결합 복구(c-Jun binding repair)의 산화환원 활성화에 충분하고, APE1/Ref-1의 산화환원 활성들이 APE1/Ref-1의 2개의 구별되는 영역으로 코딩되어 있음을 설명하고 있다 (Xanthoudakis, S. et al., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 23-27). 따라서 APE1/Ref-1의 N-말단 1-127 아미노산 잔기는 추정되는 산화환원 도메인이다. 본 발명에서, 이중 시스테인 돌연변이의 트랜스펙션인 APE1/Ref-1 (C65A/C93A)은 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현의 증가를 유도하였다. 이는 APE1/Ref-1 산화환원 도메인의 시스테인 65 및 93에서의 산화환원 활성 부위가 내피세포의 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현에 있어서 APE1/Ref-1의 저해에 기여함을 의미한다.

[0034] 결론적으로, 본 발명의 결과는 APE1/Ref-1의 세포질 위치가 내피세포에서 관찰된 항염증 활성에 기여함을 시사한다. 특히, 시스테인 65 및 93 잔기는 내피세포에서 APE1/Ref-1의 항염증 작용에 중요한 역할을 한다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] **세포배양 및 시약**

[0037] 인간 제대정맥 내피세포(umbilical vein endothelial cells, HUVECs)는 Clonetics (USA)로부터 입수하였다. 내

피세포 성장배지, 우태아혈청 및 항생제는 Gibco (USA)로부터 구입하였다. 인간 TNF-α, DPI(diphenyleneiodonium), LMB(leptomycin B) 및 CHX(cycloheximide)는 Sigma (USA)로부터 구입하였다. VCAM-1, ICAM-1, PARP, α-튜불린 및 β-액틴에 대한 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (USA)로부터 입수하였다.

[0038] **실시예 1. APE1/Ref-1 플라스미드의 구성 및 트랜스펙션**

[0039] APE1/Ref-1의 N-말단 삭제 돌연변이(putative nuclear localization signals, NLS)는 전장 APE1/Ref-1 cDNA를 포함하는 pEGFP-APE1/Ref-1 벡터 상에서 재조합 DNA 기법을 이용하여 N-말단의 28개 아미노산을 제거(29-318)함으로써 제조하였다. 정방향 프라이머들은 *Kpn*I 부위와 함께 개시코돈인 ATG가 추가되었고, 모든 역방향 프라이머들은 5'-말단에서 *BamH*I를 포함시켰다. 사용된 프라이머는 다음과 같다: Sense : *Kpn*I-Human APE1/Ref-1 (29-318) 5'-CCG GTA CCC ATG GCA AAG AAA AAT GAC AAA GAG-3', 및 Antisense : Human APE1/Ref-1(29-318)-*BamH*I 5'-CGC GGA TCC CGC AGT GCT AGG TAT AG -3'. PCR 반응은 제조사의 설명서(Intron, Korea)에 따라 고성능 DNA 중합효소를 이용하여 수행하였다. HA-APE1/Ref-1 (C65A/C93A)은 이전에 공지된 바와 같이 (Jeon, B. H. et al., 2004 *Circ. Res.* 95, 902-910), 부위-지정 돌연변이생성으로 제조되었다. 모든 삭제 및 돌연변이는 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. HUVECs는 제조사의 설명서에 따라 Lipofectamine™ 2000 시약을 이용하여 0.5-2 μg의 APE1/Ref-1 플라스미드로 트랜스펙션되어, 20-30%의 트랜스펙션 효율을 나타내었다 (Joo, H. K. et al., 2009 *Anesthesiology* 110, 106-112). TNF-α 처리 18시간 후, 웨스턴 블롯 분석을 제조된 세포 용해물을 이용하여 수행하였다.

[0040] **실시예 2. 활성산소종(ROS)의 측정**

[0041] 세포내 ROS 생성은 H2DCFDA(dichlorofluoresceindiacetate)를 이용한 형광분석으로 측정하였다. H2DCFDA 염료는 과산화물로 산화되는 비특이적 에스테라아제로 절단되어 형광 DCF(2', 7'-dichlorofluorescein)로 산출된다. 1×10^4 세포를 96웰 플레이트에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 DPI가 있거나 없이 15 ng/ml TNF-α로 활성화시켰다. 이어서, 상기 세포를 5 μM H2DCFDA로 37℃에서 30분간 염색하였다. 형광은 형광현미경 (Carl Zeiss)하에서 관찰하였으며 그 강도는 485 nm 여기 및 530 nm 방출 필터 세트가 갖춰진 Fluorskan (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0042] **실시예 3. 웨스턴 블로팅**

[0043] 이전에 공지된 바와 같이 (Lee, S. K. et al., 2012 *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16, 199-204), 20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_3, 1 mM beta-glycerophosphate, 4 mM Na pyrophosphate, 5 mM NaF, 1% Triton X-100, 및 프로테아제 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail)을 포함하는 용해버퍼를 이용하여 얼음 상에서 세포들을 수집하였다. 상기 세포 용해물을 12,000 × g에서 15분간 원심분리하여, 상청액을 면역블로팅에 사용하였다. 단백질들은 10% SDS-PAGE 상에서 분해하여 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막에 옮겼다. 실온에서 1시간 동안 5% 탈지유로 블로킹한 후, 블롯들(blots)을 특이적인 일차항체(1:1000)로 4℃에서 밤새 반응시킨 다음, HRP(horseradish peroxidase)-결합된 이차항체로 반응시켰다. 면역반응 밴드들은 화학발광법(enhanced chemiluminescence method; Pierce Biotechnology, USA)을 이용하여 시각화하였다. 단백질 로딩 대조군과 같이, 각각의 막을 떼어내고 항-β-액틴 항체와 반응시켜 단백질 양을 정규화하였다. 핵 및 세포질 추출물은 제조사(Pierce)에 의해 제공된 설명서에 따라 핵 및 세포질 추출 시약 키트를 이용하여 제조하였다.

[0044] **실시예 4. APE1/Ref-1의 위치에 대한 면역세포화학 분석**

[0045] 면역형광 염색을 위해, 내피세포를 유리 커버슬립 상에 성장시키고 TNF-α로 처리하였다. 이전에 공지된 바와 같이 (Lee, S. K. et al., 2012 *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16, 199-204), 내생성(endogenous) APE1/Ref-1을 확인하기 위해, 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정하고 0.5% Triton X-100으로 투과성을 높인 후, 5% 소혈청알부민(BSA)로 1시간 동안 블로킹시켰다. 다음으로, 커버슬립을 1% BSA에 녹인 항-APE1/Ref-1 (dilution

1:200) 일차항체에서 25℃에서 1시간동안 반응시켰다. 세포를 세척하고 FITC-표지된 이차항체로 1시간 동안 반응시켰다. Mitotracker Red (Molecular probes) 및 DAPI는 각각 미토콘드리아 및 핵을 염색하는데 15분간 사용되었다. 일부 실험에서, APE1/Ref-1 돌연변이 단백질의 세포내 위치가 pEGFP-APE1/Ref-1 플라스미드(1 μg)로 트랜스펙션된 세포에서 관찰되었다. 커버슬립을 현미경 슬라이드 상에 올려놓고 형광 시그널을 공초점 현미경(Carl Zeiss)으로 시각화하였다.

[0046] **통계분석**

[0047] 모든 데이터는 평균±SEM으로 나타내었다. 측정된 변화에서 차이의 통계학적 유의성은 다중 비교를 위한 Dunnett's or Bonferroni's test에 따라 one-way ANOVA를 이용하여 결정하였다. 차이는 $P < 0.05$에서 유의한 것으로 간주하였다.

[0048] **실험결과 1. APE1/Ref-1의 이소성(ectopic) 과발현은 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 저해하였다.**

[0049] 우선, 본 발명자들은 TNF-α에 반응하여 염증성 세포 부착 분자인 VCAM-1 및 ICAM의 발현이 인간 내피세포에서 APE1/Ref-1 수준에 의해 조절되는지를 확인하였다. 이러한 가능성을 검토하기 위해, 세포들을 APE1/Ref-1 유전자로 트랜스펙션시켜 VCAM-1 및 ICAM-1 발현의 수준에서 변화를 확인하였다. APE1/Ref-1 플라스미드 트랜스펙션 24시간 후, 부착 분자들에 대한 웨스턴 블롯 분석을 세포 용해물을 이용하여 수행하였다. 부착 분자들의 발현 수준은 기초 조건(basal conditions) 하에서 검출되지 않았으나; 18시간 동안 TNF-α (15 ng/ml) 처리한 결과 HUVECs에서 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현이 현저하게 유도되었다. pEGFP-APE1/Ref-1 (0.5-2 μg)로 플라스미드 트랜스펙션은 부착 분자들의 발현에서 그것만으로 유도하지 않았으나; 투여량-의존적으로 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 현저히 저해하였다 (도 1). 또한 ICAM-1의 발현 수준이 TNF-α만으로 자극된 세포와 비교하여 21%까지 현저히 감소한 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 TNF-α-유도성 세포 부착 분자들의 발현이 내피세포에서 APE1/ Ref-1의 과발현에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다.

[0050] **실험결과 2. APE1/Ref-1의 세포내 위치**

[0051] 다음으로, 본 발명자들은 내생성 APE1/Ref-1의 세포내 위치가 TNF-α, 염증성 사이토카인에 의해 영향을 받았는지를 확인하였다. 내생성 APE1/Ref-1의 면역세포화학 분석은 Triton X-100으로 투과성을 높인 세포에서 수행하였다. 기저세포(basal cells)에서, APE1/Ref-1은 주로 핵에 위치하였다. TNF-α-처리된 내피세포에서, APE1/Ref-1의 면역형광 시그널을 핵 뿐만 아니라 세포질에서 검출하였으며, 이는 세포질 위치이동 및/또는 세포질 발현을 의미한다.

[0052] HUVECs에서 TNF-α 처리에 의한 ROS 생성은 DCFDA 형광 염료를 이용하여 측정하였다. TNF-α로 6시간 동안 처리된 HUVECs는 DCF로 밝게 염색되었으며, 이는 도 2의 B 형광 이미지에서 볼 수 있듯이 ROS의 생성을 의미한다. 본 발명자들은 TNF-α-유도성 ROS 생성이 NADPH 산화효소 저해제인 10 μM DPI 전처리에 의해 완전하게 보호됨을 확인하였다. DPI에 의한 TNF-α-자극된 ROS 생성의 저해와 일치하게, APE1/Ref-1의 세포질 위치이동이 약화되어 기초 조건(basal condition)과 유사하게, APE1/Ref-1은 주로 핵에 위치하였다 (도 2의 A). 이러한 결과는 NADPH 산화효소가 내피세포에서 APE1/Ref-1의 위치이동에 관련되어 있음을 의미한다.

[0053] **실험결과 3. NADPH 산화효소 저해제는 APE1/Ref-1의 세포질 위치이동을 억제하였다.**

[0054] APE1/Ref-1의 세포질 발현이 면역세포화학 분석으로 검출되었기 때문에, TNF-α에 노출이 내피세포에서 APE1/Ref-1의 세포질 위치이동을 유도하는지를 추가로 조사하였다. 도 3의 A에서 볼 수 있듯이, 핵 APE1/Ref-1은 15분 이내에 TNF-α 처리에 의해 감소되었다. 반면, 세포질 APE1/Ref-1은 시간-의존적으로 증가하였다. 그러나 TNF-α에 반응한 세포질 위치이동은 DPI의 전처리에 의해 약화되었다 (도 2). 이어서, 세포질 APE1/Ref-1이 신생 단백질 합성 또는 핵 방출(nuclear export)의 결과인지를 조사하였다. 세포질 APE1/Ref-1의 수준은 단백질 합성 저해제인 시클로헥사미드(cycloheximide, CHX; 10 ng/ml for 1 h), 또는 렙토마이신 B(leptomycin B, LMB; 10 ng/ml for 1 h)로 처리된 세포에서 측정하였다. 도 3의 B에서 볼 수 있듯이, CHX와 LMB 전처리 어느 것도 TNF-α-처리에 반응하여 세포질 APE1/Ref-1의 수준에 영향을 미치지 않았다. 종합하면, 이러한 데이터

는 TNF-α에 반응하여 증가된 세포질 APE1/Ref-1은 세포내 위치이동의 결과로 볼 수 있다.

[0055] **실험결과 4. NLS-삭제된 APE1/Ref-1은 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 저해하였다.**

[0056] 내피세포 활성화에서 세포질 APE1/Ref-1의 기능적 역할을 알아보기 위해, APE1/Ref-1의 NLS-삭제 돌연변이를 N-말단으로부터 28개 아미노산을 삭제함으로써 APE1/Ref-1(29-318)을 제조하였다. TNF-α-유도성 VCAM-1 발현에 대한 NLS-삭제된 APE1/Ref-1 돌연변이의 효과를 측정하였다. 면역세포화학 분석에 의해 관찰된 바와 같이 (도 4의 A), APE1/Ref-1의 NLS-삭제 돌연변이(29-318)는 세포질에 흩어져 위치하였다. 또한 이소성으로(ectopically) 발현된 EGFP-APE/Ref-1 또는 EGFP-APE1/Ref-1 (29-318) 단백질의 세포내 분포는 핵/세포질 부분분리(fractionation)에 의해 확인되었다. 도 4의 A에서 볼 수 있듯이, EGFP-APE/Ref-1은 주로 핵에 위치하였으며, TNF-α 자극 후 EGFP-APE1/Ref-1은 급격하게 세포질로 위치이동하였다. 그에 반해서, EGFP-APE1/Ref-1(29-318)은 TNF-α 처리에 관계없이 세포질 분획(fraction)에서 일관되게 검출되었다.

[0057] 흥미롭게도, TNF-α-유도성 VCAM-1 발현은 야생형 APE1/Ref-1 (1-318)에 의해 저해되었고 세포질 위치이동을 나타내었던 NLS-삭제 돌연변이 APE1/Ref-1 (29-318)의 트랜스펙션에 의해서도 저해되었으며, 이는 세포질 APE1/Ref-1의 항-염증 작용을 의미한다 (도 4의 B와 C).

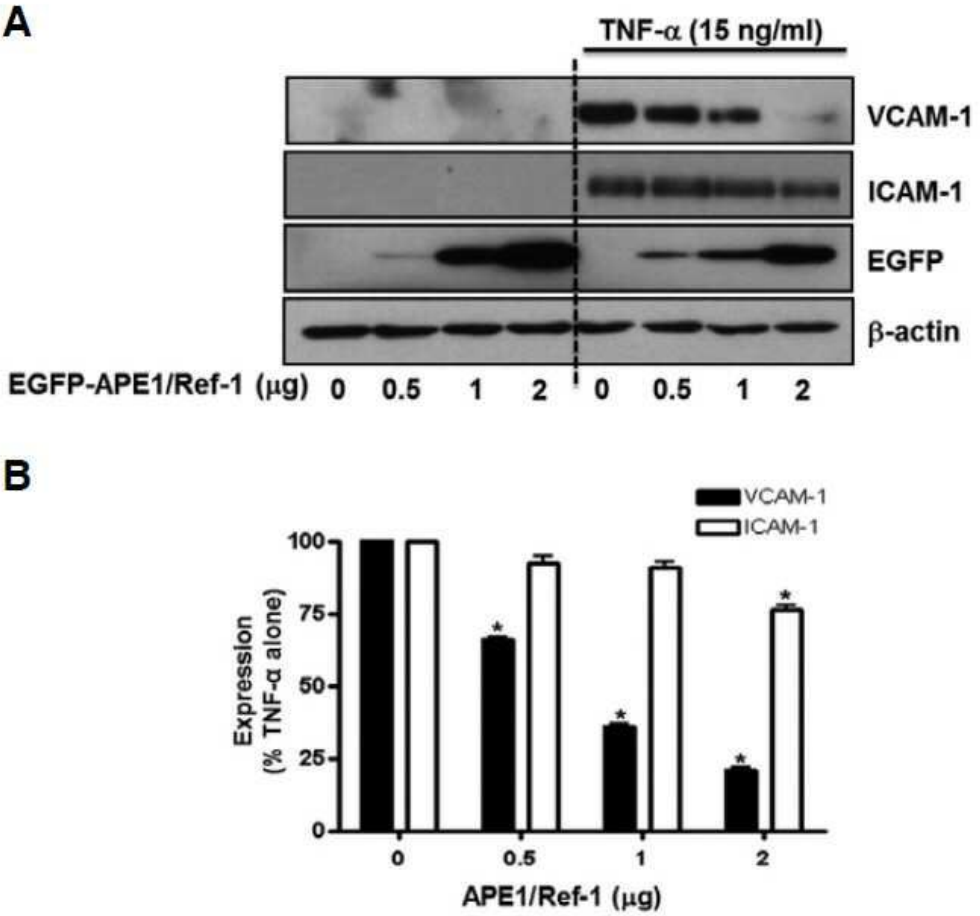
[0058] **실험결과 5. APE1/Ref-1의 산화환원 시스테인 돌연변이는 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 증가시켰다.**

[0059] TNF-α-처리된 내피세포에서 산화환원 돌연변이 APE1/Ref-1(C65A/C93A)을 이용하여 APE1/Ref-1 산화환원 기능의 역할을 더 조사하였다. 산화환원 돌연변이 APE1/Ref-1(C65A/C93A)은 점 돌연변이에 의한 APE1/Ref-1에서 시스테인 65와 93을 알라닌(alanine)으로 치환으로 제조하였다. 면역세포화학 분석으로 관찰된 바와 같이 (도 5의 A), 산화환원 돌연변이 APE1/Ref-1(C65A/C93A)은 핵에 위치하였으며 핵 마커인 DAPI와 함께 위치하였다. 또한 EGFP-APE1/Ref-1 (C65/93A) 단백질의 핵 위치는 핵/세포질 부분분리(fractionation)로 확인되었다. 산화환원 돌연변이 APE1/Ref-1(C65A/C93A) (0.5-2 μg)로 플라스미드 트랜스펙션은, 도 5의 B 및 C에 나타난 바와 같이, 투여량-의존적으로 TNF-α-유도성 VCAM-1 발현을 증가시켰다. 이러한 데이터는 산화환원 작용 부위인 APE1/Ref-1의 시스테인 65와 93이 TNF-α-활성화된 내피세포에서 APE1/Ref-1의 항-염증 작용의 원인이 됨을 의미한다.

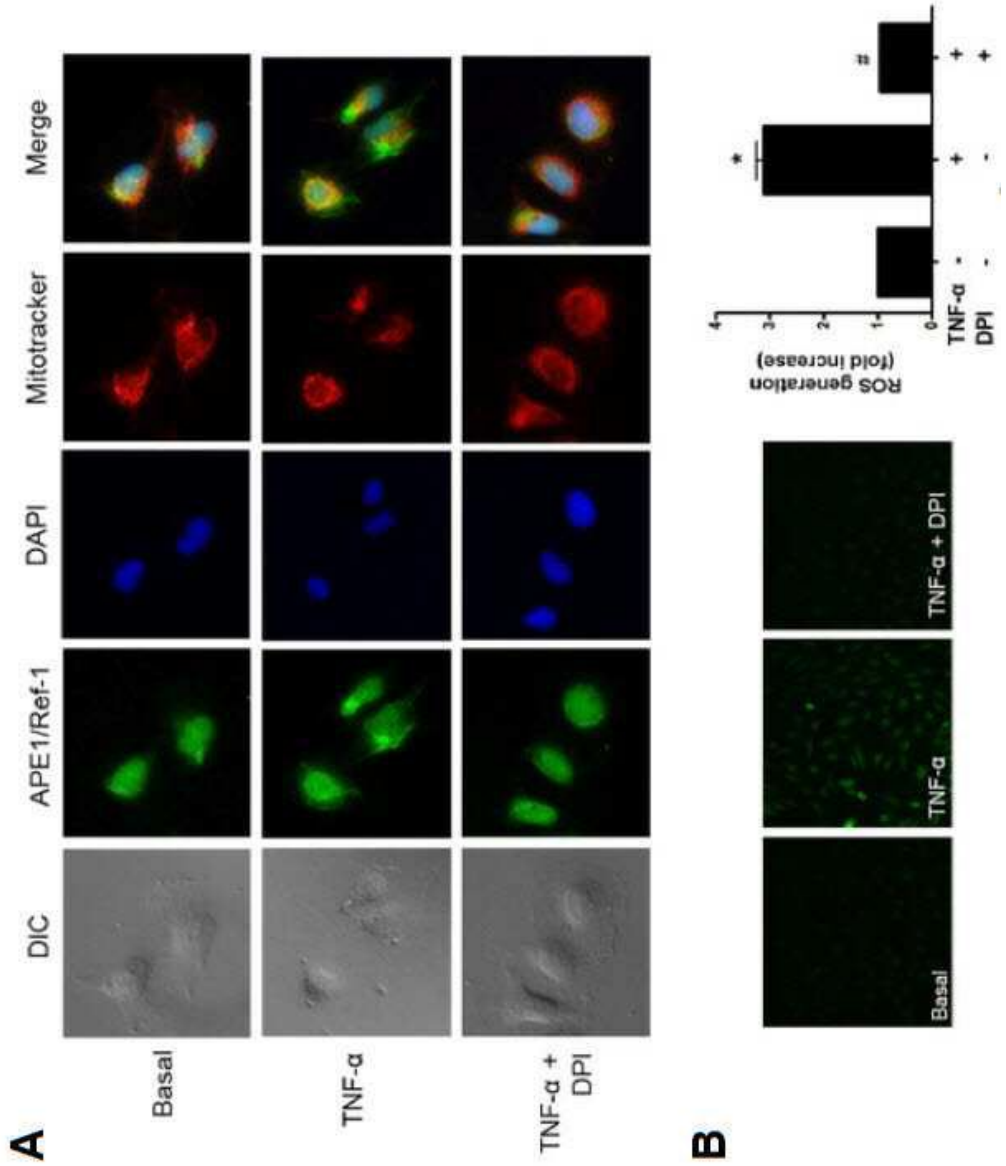
[0060] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

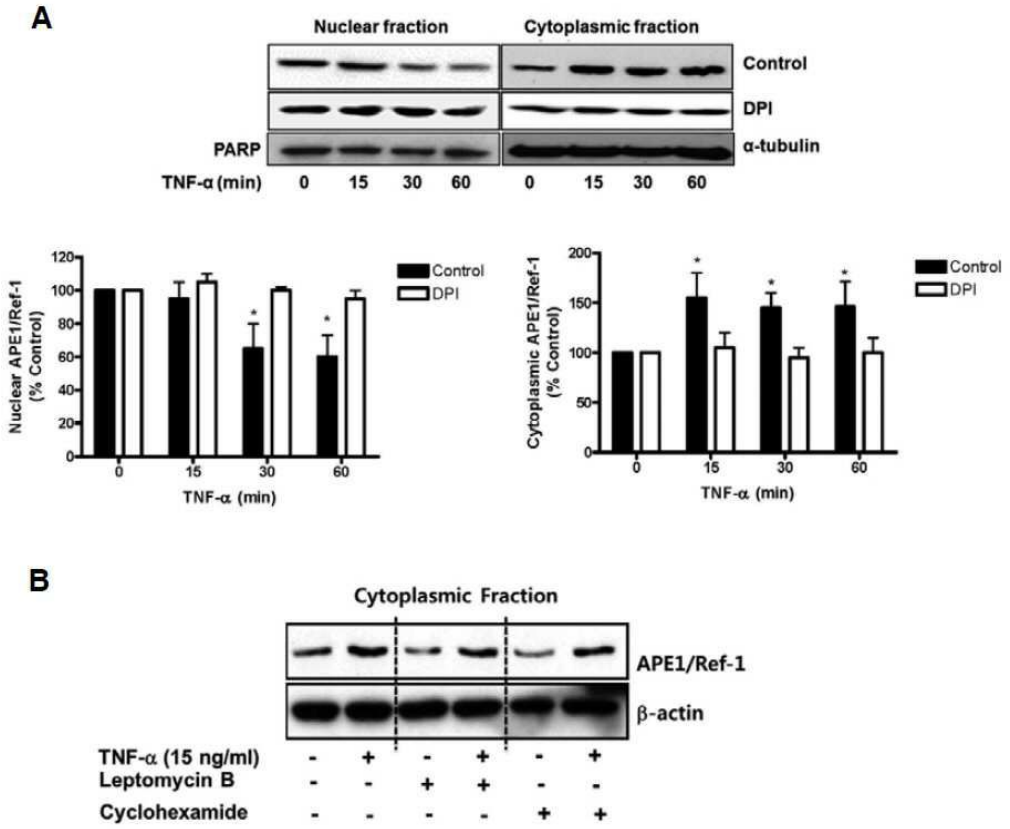
도면1


A
TNF-α (15 ng/ml)
VCAM-1
ICAM-1
EGFP
β-actin
EGFP-APE1/Ref-1 (μg) 0 0.5 1 2 0 0.5 1 2
B
VCAM-1
ICAM-1
Expression (% TNF-α alone)
100
75
50
25
0
0 0.5 1 2
APE1/Ref-1 (μg)

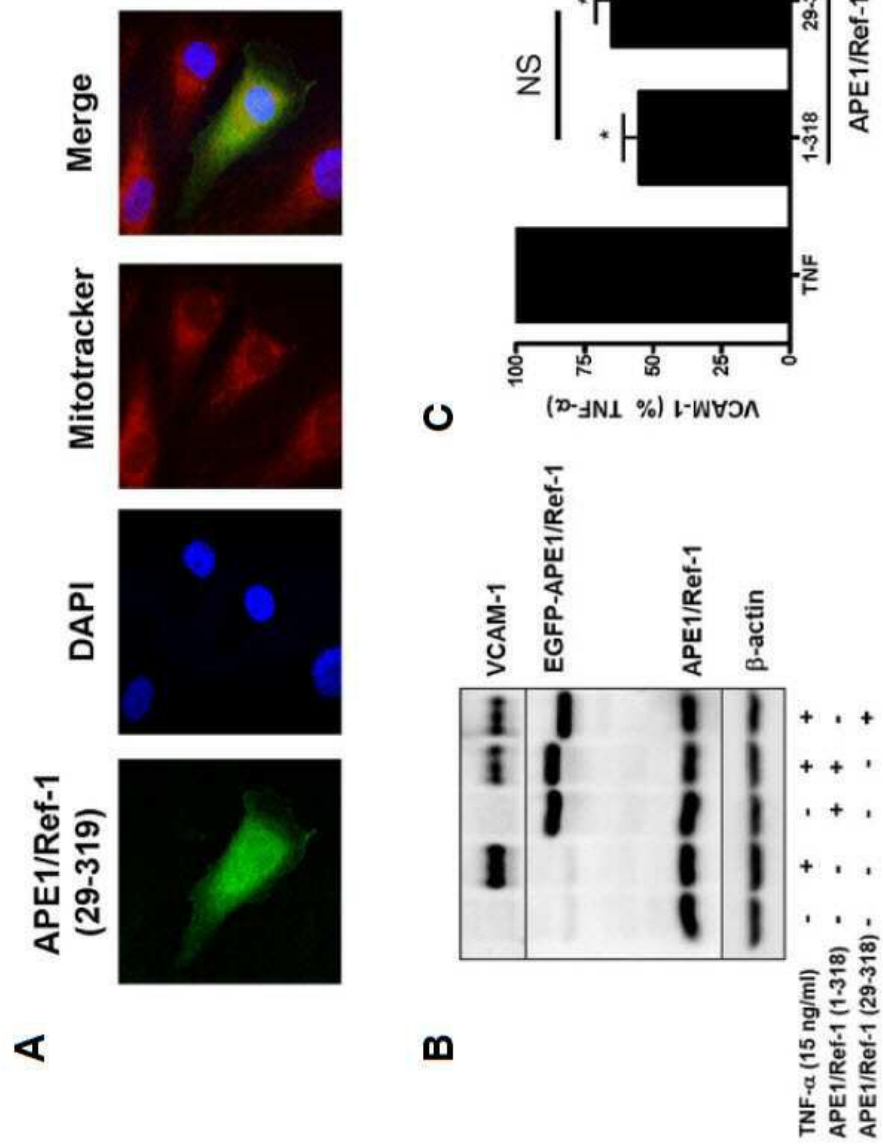
도면2


A
DIC
APE1/Ref-1
DAPI
Mitotracker
Merge
Basal
TNF-α
TNF-α + DPI
B
Basal
TNF-α
TNF-α + DPI
ROS generation (fold increase)
TNF-α
DPI

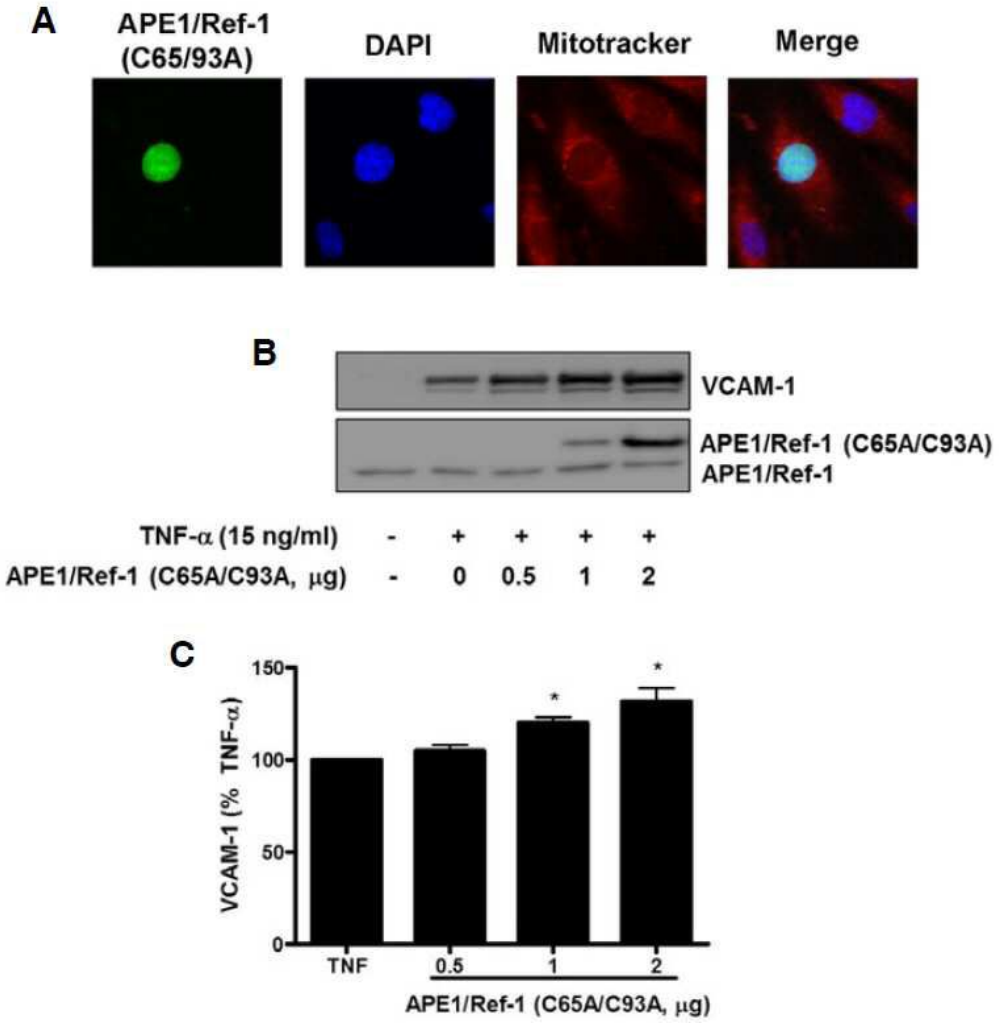
도면3


A
Nuclear fraction
Cytoplasmic fraction
Control
DPI
α-tubulin
PARP
TNF-α (min) 0 15 30 60 0 15 30 60
Nuclear APE1/Ref-1 (% Control)
Control
DPI
TNF-α (min)
Cytoplasmic APE1/Ref-1 (% Control)
Control
DPI
TNF-α (min)
B
Cytoplasmic Fraction
APE1/Ref-1
β-actin
TNF-α (15 ng/ml)
Leptomycin B
Cyclohexamide

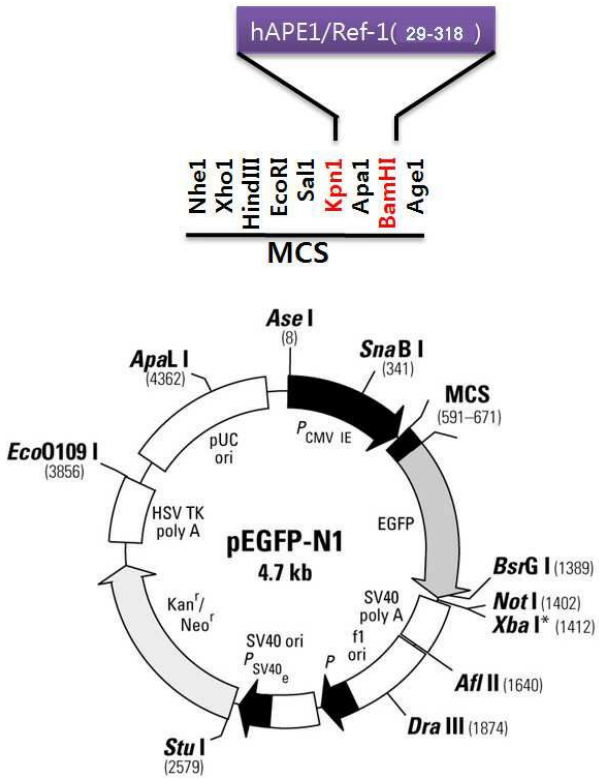
도면4


A
APE1/Ref-1 (29-319)
DAPI
Mitotracker
Merge
B
VCAM-1
EGFP-APE1/Ref-1
APE1/Ref-1
β-actin
TNF-α (15 ng/ml) - + - + +
APE1/Ref-1 (1-318) - - + + -
APE1/Ref-1 (29-318) - - - - +
C
VCAM-1 (% TNF-α)
100
75
50
25
0
TNF
NS
*
*
1-318
29-318
APE1/Ref-1

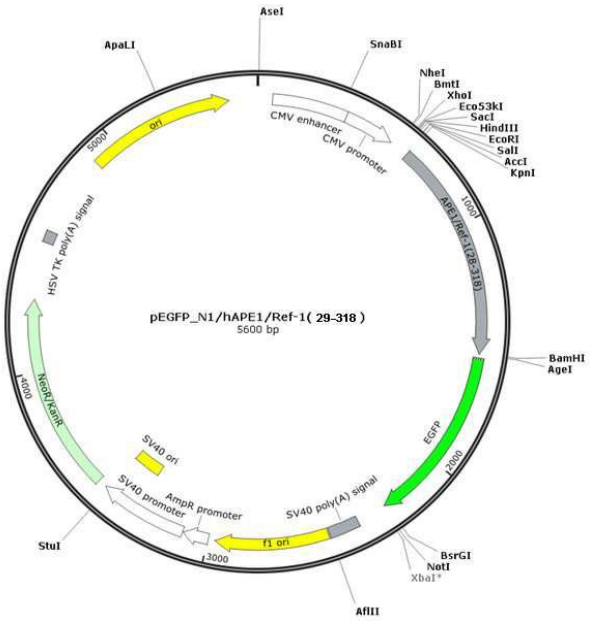
도면5


A
APE1/Ref-1 (C65/93A)
DAPI
Mitotracker
Merge
B
VCAM-1
APE1/Ref-1 (C65A/C93A)
APE1/Ref-1
TNF-α (15 ng/ml) - + + + +
APE1/Ref-1 (C65A/C93A, μg) - 0 0.5 1 2
C
VCAM-1 (% TNF-α)
150
100
50
0
*
*
TNF
0.5
1
2
APE1/Ref-1 (C65A/C93A, μg)

도면6a



도면6b



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Compositions for preventing or treating vascular inflammatory disease comprising APE1/Ref-1 mutants

<130> NP14-1089

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 291

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Lys Lys Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro Ala
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Asp Pro Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys Pro
20 25 30

Ala Thr Leu Lys Ile Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala Trp
35 40 45

Ile Lys Lys Lys Gly Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Ala Pro Asp Ile
50 55 60

Leu Cys Leu Gln Glu Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala Glu
65 70 75 80

Leu Gln Glu Leu Pro Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Ser
85 90 95

Asp Lys Glu Gly Tyr Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys Pro
100 105 110

Leu Lys Val Ser Tyr Gly Ile Gly Asp Glu Glu His Asp Gln Glu Gly
115 120 125

Arg Val Ile Val Ala Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala Tyr
130 135 140

Val Pro Asn Ala Gly Arg Gly Leu Val Arg Leu Glu Tyr Arg Gln Arg
145 150 155 160

Trp Asp Glu Ala Phe Arg Lys Phe Leu Lys Gly Leu Ala Ser Arg Lys
165 170 175

Pro Leu Val Leu Cys Gly Asp Leu Asn Val Ala His Glu Glu Ile Asp
180 185 190

Leu Arg Asn Pro Lys Gly Asn Lys Lys Asn Ala Gly Phe Thr Pro Gln
195 200 205

Glu Arg Gln Gly Phe Gly Glu Leu Leu Gln Ala Val Pro Leu Ala Asp
210 215 220

Ser Phe Arg His Leu Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ala Tyr Thr Phe Trp
225 230 235 240

Thr Tyr Met Met Asn Ala Arg Ser Lys Asn Val Gly Trp Arg Leu Asp
245 250 255

Tyr Phe Leu Leu Ser His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Cys Asp Ser Lys
260 265 270

Ile Arg Ser Lys Ala Leu Gly Ser Asp His Cys Pro Ile Thr Leu Tyr
275 280 285

Leu Ala Leu
290