

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 5월 11일 (11.05.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/078291 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 38/17 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/011638

(22) 국제출원일: 2016년 10월 17일 (17.10.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0154680 2015년 11월 4일 (04.11.2015) KR

(71) 출원인: 충남대학교산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) [KR/KR]; 34143 대전시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교), Daejeon (KR).

(72) 발명자: 전병화 (JEON, Byeong Hwa); 35398 대전시 서구 둔산남로 127 목련아파트 204-803, Daejeon (KR). 최성아 (CHOL, Sunga); 35250 대전시 서구 문정로 170 번길 167-13, Daejeon (KR). 박명수 (PARK, Myoung Soo); 35358 대전시 서구 관저북로 80 원앙마을 2 단지아파트 209-1805, Daejeon (KR).

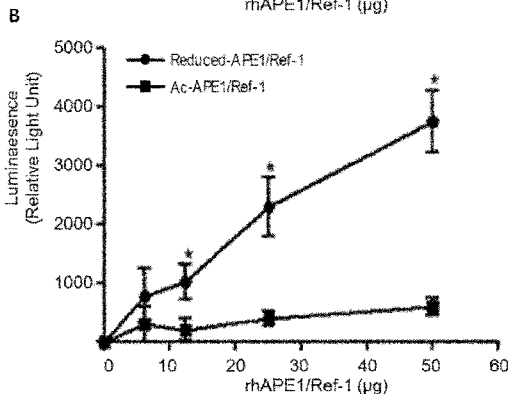
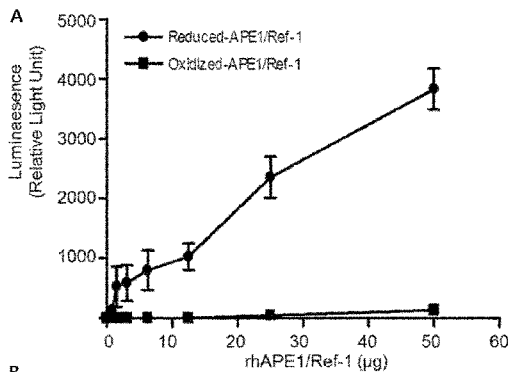
(74) 대리인: 김원준 (KIM, Wonjoon); 35203 대전시 서구 둔산대로 117 번길 66, 골드벤처타워 205, Daejeon (KR).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION AND TREATMENT OF INFLAMMATION CONTAINING REDUCED-TYPE REDOX-REGULATING PROTEIN-1

(54) 발명의 명칭 : 환원형 산화환원조절단백-1를 함유하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for prevention and treatment of inflammation, which contains APE1/Ref-1 of a type with excellent anti-inflammatory activity and can exhibit anti-inflammatory efficacy as a separated APE1/Ref-1 itself and, more specifically, to a pharmaceutical composition for prevention and treatment of inflammation, which contains reduced-type APE1/Ref-1 as an effective component.

(57) 요약서: 본 발명은 항염증 활성이 우수한 형태의 APE1/Ref-1를 함유하며 분리된 APE1/Ref-1 그 자체로서 항염증 효능을 나타낼 수 있는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 환원형 APE1/Ref-1을 유효성분으로 함유하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

WO 2017/078291 A1



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 환원형 산화환원조절단백-1를 함유하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항염증 효과가 우수한 형태의 산화환원조절단백-1을 함유하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 동맥경화와 같은 혈관질환의 초기병변은 주로 혈관내피세포의 염증반응이 원인이 된다(Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26). 염증은 주로 혈관 내피세포에 단핵구와 같은 염증세포가 부착되는 것에 의해 매개된다. 단핵구는 혈관내피세포들과 상호작용이 일어나지 않고 혈류를 따라 흘러갈 뿐이므로 혈관벽과의 접촉이 거의 일어나지 않는 반면, 염증반응이 일어나면, 활성화된 단핵구는 대식세포로 변화되고 이후 혈관내피세포와 상호작용이 일어나 염증세포가 혈관벽에 달라붙는 반응이 매개된다. 이러한 염증반응은 혈관내피세포의 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 단백질의 발현이 주요 표지인자로 알려져 있어, VCAM-1의 발현억제물질은 염증으로 인한 혈관질환의 치료물질로 활용되고 있다.
- [4] 혈관 염증 반응에서 대식세포에서 분비된 종양괴사인자- α (TNF- α , Tumor necrosis factor- α)는 TNF- α 수용체(주로 TNFR1)와의 결합에 의해 다수의 이차 염증 매개자에 직접적인 영향을 미쳐 활성 산소종(ROS)의 생성 및 NF- κ B(nuclear factor- κ B)의 활성화에 영향을 미친다. 핵 내에서 활성화된 NF- κ B는 사이토카인, 케모카인 및 부착 분자를 포함하는 염증 장애의 발병에 포함되는 유전자의 전사를 조절한다. 따라서 초기 TNF- α 의 활성을 차단하는 약물을 사용하여 혈관 염증을 치료하는 것이 매우 유리할 수 있으며 부작용을 최소화하거나 중복된 세포내 시그널링을 차단할 수 있다. 예를 들어, 대표적인 약제인 infliximab, adalimumab과 etanercept는 TNF- α 항체 또는 TNFR1-Fc 유사체로 TNF- α 가 그 수용체와 결합하는 것을 억제하며 모두가 현재 염증 질환의 치료에 사용되고 있다. TNFR1은 TNF 수용체 슈퍼패밀리의 일종으로 세포외의 시스테인이 많은 도메인(CRD, cysteine-rich domain)을 통해 TNF와 결합할 수 있는 사이토카인 수용체의 그룹이다. TNFR1은 리간드인 동형삼량체인 TNF- α 의 인식을 위하여 각각의 4개의 CRDs에서 세 개의 이황화결합을 형성하는 6개의 공통적인 시스테인 잔사를 갖는다. TNF- α /TNFR1 복합체의 구조를 고려하여 몇몇 연구들은 TNF- α /TNFR1 상호작용의 주요 부위, TNFR1 루프의 단백질 유사체 또는 TNF- α 에 직접적으로 결합하는 소분자에 기반한 TNF- α 저해제의 개발을 보고하였다.

- [5] 한편, 산화환원조절단백-1(APE1/Ref-1, Apurinic apyrimidinic endonuclease 1/Redox factor-1)은 다른 단백질의 산화-환원 반응성에 영향을 주는 다 기능 단백질로써 염증반응이 유도된 세포로부터 분비된다. APE1/Ref-1은 많은 전사인자들을 조절하며 C-말단 영역은 염기 절단 DNA 복구와, N-말단 영역은 산화환원 활성과 관련이 있다. APE1/Ref-1의 전사인자에 대한 환원성 조절은 여러 전사인자의 DNA 결합 영역에서 산화형 시스테인 잔기를 환원시키는 것에 이루어지는 것으로 알려져 있다. 또한, 아데노바이러스를 이용하여 APE1/Ref-1을 혈관내피세포에 과발현시킨 경우 TNF- α 에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현이 억제되고, 혈관내피세포에 단백질의 유착이 억제된다는 것이 밝혀진 바 있다.
- [6] 본 발명자들은 이에 세포 내로의 유입이 용이하도록 항염증 기전을 갖는 APE1/Ref-1과 Tat 단백질을 융합하여 세포내로의 도입이 용이하도록 한 세포투과성 산화환원인자-1 융합단백질이 혈관내피세포에 효과적으로 투과되어 혈관염증 치료에 효과적임을 등록특허 제0877151호에서 게시한 바 있다. APE1/Ref-1은 산화 스트레스에 반응하여 핵과 세포질 사이를 이동한다. 등록특허 제1522499호에서는 N-말단으로부터 28개의 아미노산이 삭제된 APE1/Ref-1의 변이체가 APE1/Ref-1이 핵이 아닌 세포질에서 일관되게 발현됨을 확인하고, 이들 변이체가 혈관 내피세포에서 효과적으로 항염증 활성을 나타냄을 보고하였다.
- [7] 이와 더불어 종래의 연구들은 APE1/Ref-1이 세포외로 분비될 가능성을 보고하고 있다. 루프스와 폐암 환자에게서는 APE1/Ref-1에 대한 자기항체가 발견되었는데, 이는 APE1/Ref-1이 숙주의 면역 체계에 노출되었음을 시사한다. 내독성 쥐의 혈액과 방광암 환자의 혈액에서는 APE1/Ref-1의 발현량의 증가가 관측되어 APE1/Ref-1이 분비된 단백질로서 기능을 함을 나타낸다. 이러한 보고들은 평상 시 APE1/Ref-1은 세포 내에서 과다 생성된 ROS억제 등을 통한 항염증 기능을 수행하지만, APE1/Ref-1 단백질이 배출되는 특정상황, 예를 들면 패혈증이나 암 등의 조건에서는 세포 밖에서의 작용이 새로운 작용 target으로 역할을 담당하고 있음을 시사한다. 이에 본 발명자들은 APE1/Ref-1이 분비된 형태로서 항염증활성을 나타냄을 확인하고 APE1/Ref-1을 세포 밖으로 배출될 수 있도록 한 유리형 APE1/Ref-1 융합단백질 및 이를 유효성분으로 하는 항염증 약학조성물에 대해 출원번호 10-2014-183331호로 출원하여, 10-1607282호로 등록받은 바 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 종래 기술에 의한 APE1/Ref-1의 항염증 효과에 관한 발명을 더욱 진전시킨 것으로서, 항염증 활성이 우수한 형태의 APE1/Ref-1를 함유하여 염증

예방 및 치료에 더욱 효과적인 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 분리된 APE1/Ref-1 그 자체로서 항염증 효능을 나타낼 수 있는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 환원형 APE1/Ref-1을 유효성분으로 함유하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

- [13] 세포 내에서 발현된 APE1/Ref-1은 아세틸화에 의해 Ac-APE1/Ref-1의 형태로 세포 외로 분비되며, 세포 외로 분비된 Ac-APE1/Ref-1은 다시 탈아세틸화 된 상태로 TNFR-1의 이황화결합을 환원시키는 것에 의해 TNFR-1의 구조를 변화시키고 이로 인하여 TNF- α 와 TNFR1과의 결합을 통한 염증 시그널링의 조절에 중요한 역할을 담당한다. 즉, APE1/Ref-1의 환원 활성화는 염증 반응의 억제에 중요한 역할을 담당한다.

- [14] APE1/Ref-1은 세포 내의 산화적 스트레스 뿐 아니라 발현된 단백질의 분리, 정제 및 보관 과정에서도 쉽게 산화되며, 이를 본 명세서에서는 산화형 APE1/Ref-1(oxidized APE1/Ref-1)이라 하였다. 이에 반해 환원 활성을 갖는 APE1/Ref-1을 환원형 APE1/Ref-1(reduced APE1/Ref-1)이라 하였다. APE1/Ref-1이 세포 내 조건 또는 일반적인 조건에서는 쉽게 산화형으로 변하기 때문에 환원형을 유지할 수 있도록 하기 위해서는 조성물 중 APE1/Ref-1은 환원제와 혼합된 상태로 함유되는 것이 바람직하다. 여기서 환원제라 함은 조성물로서 인체에 무해한 성분이라면 어떤 것이라도 사용이 가능하며, 하기 실시예에서는 DTT(dithiothreol)을 예로 그 결과를 기재하였으나 이에 한정되는 것이 아니라 타이올 (-SH)기를 보호, 유지하는 환원제군으로 인체에 무해한 것은 어떤 것이라도 사용할 수 있다. 상기 특성을 나타내는 환원제로는 DTT(dithiothreol), 디티오에리트레톨(Dithioerythritol), 글루타티온(GSH, L-glutathione), 메르캅토에탄올(BME, b-mercapto ethanol), 아스코빅 산(Ascorbic acid), N-아세틸시스테인(NAC, N-acetylcysteine), 토코페롤(Tocopherol), 데페로자민(Deferoxamine), 염화제일주석 (Tin(II) chloride) Sn^{2+} 이온을 함유하는 화합물, 중아황산 소다(Sodium metabisulfite)나 아황산 소다(Sodium sulfite)와 같은 설파이트(Sulfite)계 화합물, TCEP-HCl(Tris(2-Carboxyethyl) phosphine hydrochloride), 옥살산(Oxalic acid), 인산(phosphorous acid) 그리고 황산제일철(ferrous sulfate)와 같이 Fe^{2+} 이온을 함유하는 화합물을 예로 들 수 있으며, 상기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물을 사용할 수 있다.

- [15] 또한, 상기 환원형 APE1/Ref-1은 APE1/Ref-1 단백질을 코딩하는 유전자가 발현백터 내에 포함된 형태로 상기 발현백터를 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 감염 또는 형질도입하여 발현시킨 후 정제할 수 있는데, 단백질의

분리, 정제 보관 과정에서 산화되어 산화형으로 바뀌는 것을 방지하기 위하여 발현 후 환원제와 혼합된 상태로 분리 및 정제하는 것이 더욱 바람직하다. 이때 사용되는 환원제는 전술한 환원제와 동일하다.

- [16] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 피부도말제제, 경구, 정맥주사 및 근육주사형태로 제형화할 수 있다. 또한 피부의 염증이 발생 시 바르는 소염제나, 캡슐이나 정제의 경구투여제제로 만들어 염증질환치료 및 예방용 약으로 이용될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 생체내 기능조절 특히 활성산소 및 유전인자복구, 혈관염증치료제, 패혈증, 암에 기인한 염증질환 등의 모든 치료법에 응용될 수 있으며 APE1/Ref-1 중에서도 항염증 효과가 우수한 환원형의 APE1/Ref-1을 분리된 단백질의 형태로 활성을 유지하게 하여 안정한 형태로 사용할 수 있어 염증 질환의 예방 및 치료에 더욱 간편하게 용이하게 사용할 수 있다.
- [17] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[18]

발명의 효과

- [19] 이상과 같이 본 발명은 항염증 활성을 나타낼 수 있는 형태의 APE1/Ref-1 단백질 자체를 함유하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, APE1/Ref-1 중 항염증 활성이 우수한 형태를 규명하는 것에 의해 염증 예방 및 치료에 더욱 효과적인 조성물을 제공할 수 있다.
- [20] 또한 본 발명에 의하면 단백질이 분리된 상태로서 항염증 효과가 우수하기 때문에 유전자 치료가 아닌 체내 섭취 또는 주사로도 용이하게 이용하여 염증 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[21]

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 아세틸화에 따른 배출형 APE1/Ref-1이 VCAM-1의 발현에 미치는 영향을 보여주는 이미지 및 그래프.
- [23] 도 2는 내피 세포에서 TSA의 처리시간과 농도에 따라 아세틸화 후 배출되는 APE1/Ref-1 분비와 탈아세틸화를 보여주는 이미지 및 그래프.

- [24] 도 3은 항 APE1/Ref-1 항체를 이용한 VCAM-1의 발현에 대한 APE1/Ref-1의 영향을 보여주는 이미지 및 그래프.
- [25] 도 4는 ROS 생성에 대한 APE1/Ref-1의 영향을 보여주는 그래프.
- [26] 도 5는 pET28b/hAPE1/Ref-1 플라스미드의 개열지도.
- [27] 도 6은 APE1/Ref-1의 형태에 따른 환원 활성을 생화학적으로 측정한 결과를 보여주는 그래프.
- [28] 도 7은 APE1/Ref-1의 형태에 따른 환원 활성을 바이오틴-스위치 에세이로 측정한 결과를 보여주는 그래프.
- [29] 도 8은 분비된 APE1/Ref-1에 의한 TNF- α /TNFR1 염증 시그널링의 억제 기작을 보여주는 이미지 및 그래프.

[30]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[32]

[33] 실시예

- [34] 하기 실시예에서 모든 통계처리는 GraphPad Prism v.5.01(La Jolla, CA, USA) 소프트웨어로 시행하였다. 대조군과 시험군에서 측정된 수치의 차이에 대한 통계적 유의성은 Dunnett's or Bonferroni's multiple comparison tests에 따라 one-way ANOVA(analysis of variance)를 이용하여 결정하였다. 차이는 $P < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주하였다.

[35] 실시예 1 : VCAM-1의 발현에 대한 아세틸화/디아세틸화의 영향 평가

- [36] HDACi(histone deacetylase inhibitor)인 TSA(trichostatin A)는 TNF- α 로 자극된 내피세포에서 VCAM-1의 발현을 저해하지만, 혈관계에서 항염증 효과를 나타내는 기작은 아직 불명확하다. 따라서, TSA로 처리한 TNF- α 자극된 내피세포에서 VCAM-1의 발현 억제 기작을 시험하였다.

- [37] 인간 제대정맥 내피세포(umbilical vein endothelial cells, HUVECs)는 Clonetics (USA)로부터 입수하였으며, $5 \times 10^5/\text{ml}$ 의 개수로 희석된 HUVEC 배양 세포를 60 mm plate에 분주하고, 내피세포 성장배지(Lonza, USA), 37°C , 5% CO_2 조건의 수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 이후 TSA(1 또는 $10\mu\text{M}$)를 전처리하고 TNF- α (15ng/ml)를 처리하여 추가로 12시간 배양하였다. TNF- α 와 TSA 모두를 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 세포 내 VCAM-1 발현을 확인하기 위해 약물이 처리된 세포는 RIPA buffer를 이용하여 세포를 용해 시켰으며, Bradford단백질 정량법을 이용하여 세포내 단백질을 정량 후 웨스턴 블랏에 의해

VCAM-1 발현을 확인하였다. 도 1의 A는 웨스턴블랏의 결과를 보여주는 이미지 및 그래프로, TNF- α 의 자극으로 인하여 증가된 VCAM-1의 발현이 TSA에 의해 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다. 하기 모든 도면에서 Ref-1은 APE1/Ref-1을 의미한다.

- [38] TSA에 의해 유도된 아세틸화가 TNF- α 로 자극된 내피세포에서의 VCAM-1 발현 감소와 관련되어 있는 지 확인하기 위하여, β -galactosidase(Ad β -gal), 전장 APE1/Ref-1(AdAPE1/Ref-1), HDAC3(Histone deacetylase 3, AdHDAC3)를 엔코딩하는 아데노바이러스를 Cardiovascular Research 91(3), 502-509, 2011에 기재된 방법에 의해 각각 제작하였다.
- [39] 먼저, 상기 제작된 Ad β -gal, AdHDAC3를 100 MOI로 HUVECs을 감염시켰다. 바이러스를 감염 2시간 후 결합되지 않은 바이러스를 제거하기 위하여 바이러스가 없는 배지로 교체하고 24시간 동안 배양 한 후 TSA를 1 μ M의 농도로 처리한 후 각 단백질의 아세틸화를 확인하기 위하여 12시간 추가로 배양하였다. 세포 내 단백질의 아세틸화를 확인하기 위하여 아세틸화된 형태의 리신을 항-아세틸-리신(anti-acetyl-lysine) 항체를 사용하여 면역침강시켰다(Biochemical and biophysical research communications 435 403-407, 2013). 도 1의 B는 면역침강 결과를 보여주는 이미지 및 그래프로, HDAC3가 과발현된 세포에서는 아세틸화가 관측되지 않으며 TSA의 처리에 의해 아세틸화된 리신이 증가함을 보여준다.
- [40] 도 1의 C는 상기에서 제작된 아데노바이러스를 사용하여 APE1/Ref-1 또는 HDAC3의 과발현이 TNF- α 로 자극된 HUVECs에서 VCAM-1의 발현에 미치는 영향을 관측한 것이다. HUVECs에 도 1의 C에 기재된 바이러스와 MOI로 감염시킨 뒤 2시간 후 결합되지 않은 바이러스를 제거하기 위하여 배지를 교체하고 24시간 동안 배양하였다. 바이러스가 감염된 HUVECs에 15ng/ml의 TNF- α 를 처리하여 12시간 동안 추가 배양한 후 VCAM-1의 발현을 확인 하였다. 면역 블랏팅에 의해 분석한 결과를 도 1의 C에 도시하였다. 도 1의 C에서 확인할 수 있듯이 TNF- α 로 자극된 HUVEC에서 VCAM-1의 발현은 AdHDAC3의 감염에 의해 약 130% 정도로 증가하였으나, AdAPE1/Ref-1의 감염에 의해 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 TNF- α 로 자극된 내피 세포에서의 VCAM-1의 발현은 아세틸화/디아세틸화에 의해 조절됨을 시사한다.
- [41]
- [42] **실시예 2 : TSA로 처리된 내피 세포에서 APE1/Ref-1 분비의 관측**
- [43] 이전 연구에서 본 발명자들은 아세틸화된 APE1/Ref-1(Ac-APE1/Ref-1)이 TSA로 처리된 인간 배아 신장 내피세포(HEK293T)에서 세포내 아세틸화 후에 분비됨을 보고한 바 있다. TSA 매개의 아세틸화가 HUVEC에서의 APE1/Ref-1의 분비에도 영향을 미치는 지 확인하였다.
- [44] HUVECs를 1 μ M의 TSA(trichostatin A)로 도 2에 기재된 시간에 따라 처리하였다. 배양 상등액에서 분비된 아세틸화된 형태의 Biochemical and

biophysical research communications 435 403-407, 2013에 기재된 방법에 따라 APE1/Ref-1은 화학적으로 침전시키고 항APE1/Ref-1 항체를 사용하여 면역브랏팅을 실시한 후 그 결과를 도 2의 A에 도시하였다. 세포 단백질의 오염이 없음을 확인하기 위하여 항- β -actin 항체를 함께 사용하였으며, 동일한 단백질 농도를 확인하기 위하여 미확인 단백질을 Ponceau S 염색으로 분석하였다. 분비된 APE1/Ref-1의 양은 TSA 처리 후 0.5~1시간에 최고에 달하며, 이후 점차 감소하였다. 도 2의 A는 TSA 처리된 세포의 배양액에서 분비된 APE1/Ref-1이 검출됨을 보여준다. 세포 외로 분비된 APE1/Ref-1의 양을 ELISA에 의해 정량한 결과를 보여주는 도 2의 B로부터 배양액 중 최대 값은 TSA 처리 1시간 후의 2.7ng/100 μ l임을 확인할 수 있다. 이는 TSA에 의해 매개된 아세틸화가 APE1/Ref-1의 세포외 분비를 유도함을 시사한다.

- [45] APE1/Ref-1의 분비가 아세틸화에 의해 조절됨을 확인하기 위하여 항 아세틸-리신 항체를 사용하여 분비된 APE1/Ref-1의 아세틸화를 확인하였다. HUVECs를 1 μ M의 TSA(trichostatin A)로 도 2의 C에 기재된 시간에 따라 처리하였다. 배양액을 세포 잔해물이 포함되지 않도록 수집하고 항APE1/Ref-1로 면역침강 시킨 후 항 아세틸-리신 또는 단클론성 항APE1/Ref-1 항체로 면역분석을 실시하였다. 도 2의 C는 그 결과를 도시한 이미지 및 그래프로 TSA의 처리는 초기에 대조군에 비해 분비된 Ac-APE1/Ref-1의 증가를 야기하였다. 0.5시간 이후 아세틸 기는 빠르게 제거되었으나, APE1/Ref-1은 6시간까지도 검출되어 아세틸화되지 않은 APE1/Ref-1의 형태로 존재함을 나타내었다.

- [46] 이러한 결과로부터 TSA에 의해 매개된 아세틸화는 Ac-APE1/Ref-1의 분비를 유도한다는 사실을 확인해 주었다.

[47]

- [48] 실시예 3 : VCAM-1 발현 억제에 대한 Ac-APE1/Ref-1의 역할 평가

- [49] 세포외로 분비된 APE1/Ref-1의 기능적인 역할을 확인하기 위하여 TNF- α 로 자극된 HUVEC에서 항-APE1/Ref-1 항체가 VCAM-1의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

- [50] HUVEC를 IgG 또는 항-APE1/Ref-1로 1 시간동안 전처리한 후 TSA 및 TNF- α (15ng/ml)로 처리하고 추가로 12시간 배양하였다. 이후 RIPA buffer를 이용하여 세포를 용해 시켰으며, Bradford 단백질 정량법을 이용하여 세포내 단백질을 정량 후 웨스턴 블랏에 의해 VCAM-1 발현을 확인하였다. 도 3은 웨스턴블랏의 결과를 주는 이미지 및 그래프로, 먼저 도 3의 A에서 TNF- α 의 자극에 의해 VCAM-1의 발현은 크게 증가하였으나, TSA, IgG 또는 항-APE1/Ref-1만을 처리한 경우에는 VCAM-1은 발현되지 않아 TSA, IgG 또는 항-APE1/Ref-1 자체는 VCAM-1의 발현에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

- [51] 도 3의 B에서 확인할 수 있듯이 TSA에 의해 매개되는 아세틸화는 TNF- α 에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현을 크게 감소시키나, 항-APE1/Ref-1 항체에 의해

APE1/Ref-1를 제거하는 경우 TSA에 의한 VCAM-1의 발현 억제효과가 사라졌다. 이는 VCAM-1의 발현 억제효과가 TSA 자체로 인한 효과가 아닌 TSA에 의해 아세틸화되어 세포외로 분비된 APE1/Ref-1의 기능적인 역할에 기인함을 명백히 나타낸다.

[52]

[53] 실시예 4 : ROS의 생성에 대한 Ac-APE1/Ref-1의 역할 평가

[54] TNF- α 로 자극된 HUVECs에서 염증 시그널링에는 세포내 ROS 생성이 포함된다. TNF- α 로 자극된 내피세포에서 분비된 APE1/Ref-1이 세포내 ROS 또는 미토콘드리아의 수퍼옥사이드 생성에 미치는 영향을 FEBS letters 586 1349-1355, 2012에 기재된 방법에 따라 각각 DCFDA(dichlorofluorescein diacetate) 형광 프로브와 미토콘드리아 수퍼옥사이드 지시제인 MitoSOX를 이용하여 측정하였다.

[55] 사전 실험에서 ROS는 TNF- α 의 자극 후 6시간에 최대가 됨을 확인함에 따라, HUVEC를 IgG (1 μ g/ml) 또는 항-APE1/Ref-1(1 μ g/ml)로 1시간 전처리한 후 TSA(10 μ M)로 1시간동안 추가로 처리하였다. 이후 TNF- α (15 ng/ml)로 6시간 동안 자극하였으며 100 μ M H₂O₂와 50 μ M antimycin A를 각각 양성 대조군으로 하였다.

[56] 도 4의 A와 B는 각각의 결과를 보여주는 그래프로, TNF- α 의 자극에 의해 세포내 ROS는 대조군에 비해 약 2배로 증가함을 보여준다. TNF- α 의 자극에 의해 증가된 ROS는 TSA의 처리에 의해 대조군과 유사한 수치로 감소하여 TNF- α 로 자극된 HUVEC에서 TSA에 의한 항 염증 효과가 ROS 생성 저해에 기인함을 시사하였다. TSA에 의해 매개된 아세틸화에 의해 분비된 APE1/Ref-1이 TNF- α 로 자극된 HUVEC에서 ROS의 생성에도 영향을 미침을 확인하기 위하여 항-APE1/Ref-1 처리에 의한 효과를 확인한 결과에서, VCAM-1의 발현에 대한 결과와 마찬가지로 TSA에 의한 ROS 저해 효과가 사라짐을 확인하였다. IgG의 처리는 ROS 생성에 영향을 미치지 않았다. 상기 결과들은 TSA 매개의 아세틸화에 의하여 분비된 APE1/Ref-1이 세포내 ROS 생성을 저해하여, 분비된 APE1/Ref-1의 항염증 효과가 항-APE1/Ref-1 항체의 작용에 의해 사라짐을 의미한다.

[57] 미토콘드리아 ROS 생성에 대한 도 4의 B는 TNF- α 의 자극에 의한 미토콘드리아 ROS의 생성이 TSA의 처리에 의해 약 60% 정도 감소하지만, 항-APE1/Ref-1의 처리에 의해 ROS 생성이 TSA 처리 전과 동일하게 다시 증가하여 항염증 시그널링에서 분비된 APE1/Ref-1의 기능적 역할을 확인할 수 있었다. 역시 IgG의 처리는 미토콘드리아 ROS 생성에 영향을 미치지 않았다.

[58] 종합적으로, 상기 결과들은 분비 후 아세틸화된 APE1/Ref-1이 아닌 환원형 APE1/Ref-1이 TNF- α 와 TNFR1과의 결합을 통한 염증 시그널링의 조절에 중요한 역할을 하는 것을 증명한다.

[59]

[60] 실시예 5 : APE1/Ref-1의 TNFR1에 대한 환원 효능 확인

[61] 분비된 APE1/Ref-1이 탈아세틸화된 후, 환원력에 의해 TNFR1-매개의 염증 시그널링을 유도하는 지 확인하였다. 재조합 인간 APE1/Ref-1(rh APE1/Ref-1)의 환원활성을 전구체인 proluciferin을 이용하여 혼합물에서 환원형 rh APE1/Ref-1에 의해 환원됨으로써 생성된 루시페린을 루시페라제가 반응하여 나타내는 형광 강도에 의해 측정하였다.

[62] 1) APE1/Ref-1의 제조

[63] 먼저 환원형 재조합 APE1/Ref-1을 제조하기 위하여 전장 인간 APE1/Ref-1 cDNA pET28b 벡터에 도입하여 제작한 pET28b/hAPE1/Ref-1 플라스미드(도 5의 개열지도 참조, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 435, 621-626)를 E.Coli BL21(DE3)에 넣어 형질전환 시킨 후 kanamycin(50 μ g/ml)이 첨가된 LB plate에 도말 하여 37°C incubator에 14~16시간 배양하였다. 배양된 여러 colony중 하나의 colony를 획득하여 kanamycin(50 μ g/ml)이 포함된 LB broth 150ml에서 12시간 배양하였다. 준비된 LB broth 850ml에 배양한 E.Coli를 넣어 전체 흡광도가 0.4~0.6이 될 때까지 배양하고 값이 0.4~0.6이 되면 1mM IPTG (Isopropyl- β -thiogalactoside)를 첨가하여 37°C shaking incubator에서 4시간 동안 배양시켜 재조합 APE1/Ref-1 발현을 유도하였다. 단백질을 발현이 유도된 E.Coli를 5000rpm, 5분 동안 원심분리 하여 pallet을 모으고, pallet에 재현탁 버퍼 (50mM Tris-Cl, 500mM NaCl, pH 8.0) 100ml을 넣고 잘 풀어준 다음 얼음 위에서 초음파 분해를 실시하였다. APE1/Ref-1 단백질을 정제하기 위하여 초음파 분해 30분 후 12000rpm, 15분 조건으로 원심분리하여 상층액을 수거하고, 단백질을 포함한 상층액을 Ni-NTA 아가로스 컬럼에 흘려주면서 컬럼의 레진과 결합을 유도하였다. 비특이적 결합으로 레진에 붙어있는 단백질을 제거하기 위해 10mM imidazole로 충분히 씻은 후 농도를 올려 500mM imidazole을 사용하여 레진에 결합되어 있는 APE1/Ref-1 단백질을 획득하였다. 획득한 APE1/Ref-1 단백질을 PD-10 desalting column kit를 이용하여 salt를 제거하여 정제하였다. 정제된 단백질은 단백질 분해 억제제(complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche)를 넣어 질소탱크에 넣어 보관하며 사용하였다. 본 방법에 의해 제조된 APE1/Ref-1은 하기 환원 효능의 검정 실험에서 산화형 APE1/Ref-1(oxidized APE1/Ref-1)임을 확인할 수 있었다.

[64]

[65] 2) 환원형 APE1/Ref-1의 제조

[66] 하기 실시예에 기재하는 바와 같이 1)에서 정제된 APE1/Ref-1의 환원 활성이 관측되지 않음에 따라 APE1/Ref-1의 제조 및 분리과정에서 APE1/Ref-1이 대부분 산화되기 때문으로 판단하고, 제조, 분리 및 정제과정에서 산화를 방지하여 환원형 APE1/Ref-1을 제조하였다.

[67] 보다 상세하게는, 1)과 동일한 방법에 의해 APE1/Ref-1의 발현을 유도한 후 분리 및 정제 과정에서 사용한 용액에 1mM 농도의 DTT(dithiothreitol)을 추가로

함유하도록 하여 환원형 APE1/Ref-1를 제조하였으며, 최종적으로 정제된 단백질은 단백질 분해 억제제(complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche)와 1mM DTT를 넣어 질소탱크에 넣어 보관하며 사용하였다.

[68]

[69] 3) APE1/Ref-1의 형태에 따른 환원 활성 평가

[70] rh APE1/Ref-1의 환원활성은 환원제 기질과 루시페린 검출시약을 포함하는 NAD(P)H-Glo Detection System(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 생화학적으로 측정하였다. 추가적으로 rh APE1/Ref-1의 활성은 기질인 rh TNFR1과 함께 biotin-스위치를 사용하여 확인하였다.

[71] 생화학측정을 위한 시료의 제조는 APE1/Ref-1를 안정화하기 위하여 최종 50 μ M DTT를 함유하는 PBS로 2배씩 순차적으로 희석하여 제조하였으며, 측정된 발광 강도에서 50 μ M DTT 만을 함유하는 시료의 발광 강도의 값을 뺀 값을 측정값으로 하였다. 도 6은 NAD(P)H-Glo Detection System을 사용하여 기질인 proluciferin과의 반응에 의해 생성된 발광 강도를 측정한 결과로, A는 DTT를 사용하지 않고 제조한 APE1/Ref-1(산화형 APE1/Ref-1)과 환원형 APE1/Ref-1 비교 결과이며, B는 환원형 APE1/Ref-1과 Ac-APE1/Ref-1의 비교결과이다. 도 6에서 환원형 APE1/Ref-1 (reduced APE1/Ref-1)는 농도에 비례하여 환원활성이 증가하는 것을 보여주는 반면 산화형 APE1/Ref-1(oxidized APE1/Ref-1)와 Ac-APE1/Ref-1의 경우에는 환원형 APE1/Ref-1에 비해 발광 강도의 증가가 유의적이지 않았다. DTT를 포함하여 분리, 정제 및 보관된 환원형 APE1/Ref-1에 비해 DTT를 포함하지 않고 분리, 정제 및 보관된 APE1/Ref-1이 환원활성이 크게 차이가 나는 것으로부터 APE1/Ref-1은 분리, 정제 및 보관 과정에서 쉽게 산화되어 산화형으로 변화하는 것을 시사하였다. 또한 환원활성을 나타내는 발광강도가 Ac-APE1/Ref-1에서는 변화되지 않고, 환원형 APE1/Ref-1에서만 증가한 것으로부터 분비된 APE1/Ref-1은 분비 후의 배양 상등액에서 근거리분비(paracrinally) 및 자가분비(autocrinally)에 의해 다른 산화된 단백질을 환원시킬 수 있을 것이라고 기대하였다.

[72] 세포 외로 분비된 APE1/Ref-1의 역할을 규명하기 위하여 rh APE1/Ref-1가 티올기의 산화를 통하여 6개의 이황화결합을 갖는 rh TNFR1을 직접적으로 산화시키는 지 관측하였다. 이를 위하여 TNFR1을 기질로 하여 바이오틴-스위치 에세이를 수행하였다(도 7에서 왼쪽 그림). 보다 상세하게는 1 μ g의 rh TNFR1(Thermo Inc., USA)를 HEN buffer (250 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, pH 7.7), 50°C에서 10 mM methyl methanethiosulfonate (MMTS)와 함께 20분간 배양하고, 과량의 MMTS를 ZEBA 스핀 컬럼(Abcam, USA)을 3회 통과시켜 제거하였다. TNFR1의 세포 외 영역에서 이황화결합의 환원을 위하여, rh TNFR1을 1) 또는 2)에서 제조한 APE1/Ref-1나 Ac-APE1/Ref-1 5 μ g과 함께 반응시켰다. DTT만을 사용한 반응을 양성 대조군으로 하였다. rh APE1/Ref-1 또는 rh TNFR1만을 함유한 시료에 대해서도 분석하였다. 각 시료들은 1 mM

ascorbate와 4 mM biotin-HPDP

(N-[6-(biotinamido)hexyl]-3-pyridyldithio)-propionamide)를 함유하는 labelling buffer를 상온에서 1시간동안 교대로 보충하였다. 반응하지 않은 biotin-HPDP은 Zeba spin column로 제거하고, 완충액을 neutralization buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% TritonX-100, pH7.7)로 교체하였다. biotin이 결합된 단백질은 변성과정 없이 30 μ l streptavidin-agarose (Invitrogen-Life Technologies, USA)를 사용하여 4°C에서 밤새 침강시켰다. 펠렛을 0.6M NaCl을 함유하는 neutralization buffer로 5회 세척하고, 환원제를 포함하지 않는 SDS sample buffer로 분리시켜 항-TNFR-1 항체를 사용하여 rh TNFR1을 면역블랏에 의해 검출하였다.

- [73] 도 7은 검출 결과를 보여주는 이미지로 Lane 1: APE1/Ref-1 (5 μ g), Lane 2: TNFR1 (1 μ g), Lane 3: APE1/Ref-1 (5 μ g) + TNFR1 (1 μ g), Lane 4: APE1/Ref-1 (5 μ g) + DTT (10 mM), Lane 5: DTT (10 mM), Lane 6: Acetylated APE1/Ref-1 (5 μ g), Lane 7: Acetylated APE1/Ref-1 + DTT (10 mM), Lane 8: TNFR1 (1 μ g)의 분석 결과이다. 세 번의 반복실험에서 유사한 결과를 얻을 수 있었으며, 대표적인 이미지를 도시하였다.
- [74] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 산화형의 APE1/Ref-1이나 아세틸화된 APE1/Ref-1은 rh TNFR1의 환원을 유도하지 않았으며, DTT 자체나 환원형 APE1/Ref-1은 rh TNFR1에 대한 환원 활성을 나타내었다. 또한 환원형 APE1/Ref-1의 환원 활성은 DTT에 비해 현저하게 우수하여 환원형 APE1/Ref-1의 환원 활성이 시료 중에 함유된 DTT가 아닌 환원형 APE1/Ref-1의 환원성에 기인한 것임을 확인할 수 있다. 산화된 형태의 rh APE1/Ref-1 또는 Ac-APE1/Ref-1은 DTT 존재하에서도 환원활성을 나타내지 않았다. 위의 결과는 분비된 형태의 Ac-APE1/Ref-1가 그 자체로서가 아닌, 디아세틸화된 후의 환원형 APE1/Ref-1로서 rh TNFR1의 환원을 유도함을 나타낸다.
- [75]
- [76] 실시예 6 : 염증 시그널링 억제 기작 확인
- [77] 분비된 APE1/Ref-1에 의한 TNF- α /TNFR1 염증 시그널링의 억제 기작을 확인하기 위하여 p66^{shc}과 MAPK가 관여되어 있는지 확인하였다.
- [78] HUVEC를 TSA (10 μ M), IgG (1 μ g/ml) 또는 anti-APE1/Ref-1(1 μ g/ml)로 전처리한 후 TNF- α 로 자극하여 배양하였다. RIPA buffer를 이용하여 얻은 세포용해액으로부터 면역블랏팅에 의해 p-p66^{shc} 및 p-p38 MAPK의 발현을 분석하고 그 결과를 도 8에 도시하였다.
- [79] 도 8의 A와 B에서 보여주듯이, TNF- α 가 처리된 내피세포의 Ser36에서 p66^{shc}의 인산화 정도는 크게 증가하였으며, TSA의 처리에 의해 약 50% 정도로 감소하였다. 이는 ROS 생성에 대한 결과와 일치하며, p66^{shc} 억제는 항 APE1/Ref-1 항체의 처리에 의해 TNF- α 처리된 세포와 유사한 수준으로 회복되었다. 이에 더하여 TNF- α 에 의해 유도된 p66^{shc}의 Ser-인산화에서 MAPK의

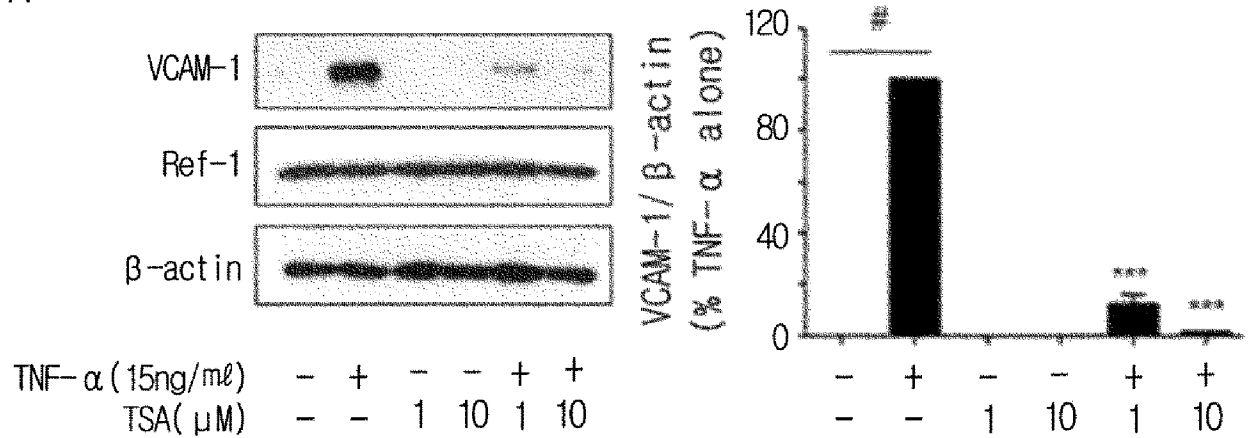
활성을 확인하였다. TNF- α 와 TSA로 처리된 세포를 APE1/Ref-1 항체와 함께 배양하면, p66^{shc}의 인산화 억제는 회복되었으나, JNK 또는 ERK는 영향을 받지 않아(테이터 미도시) JNK나 ERK는 TNF- α 로 자극된 세포에서 분비된 APE1/Ref-1에 의한 항염증 시그널링에 포함되어 있지 않음을 나타내었다. 즉, JNK나 ERK가 아닌 p66^{shc}와 p38이 TNF- α 로 자극된 세포에서 분비된 APE1/Ref-1를 통한 항염증 시그널에 포함됨을 시사한다.

청구범위

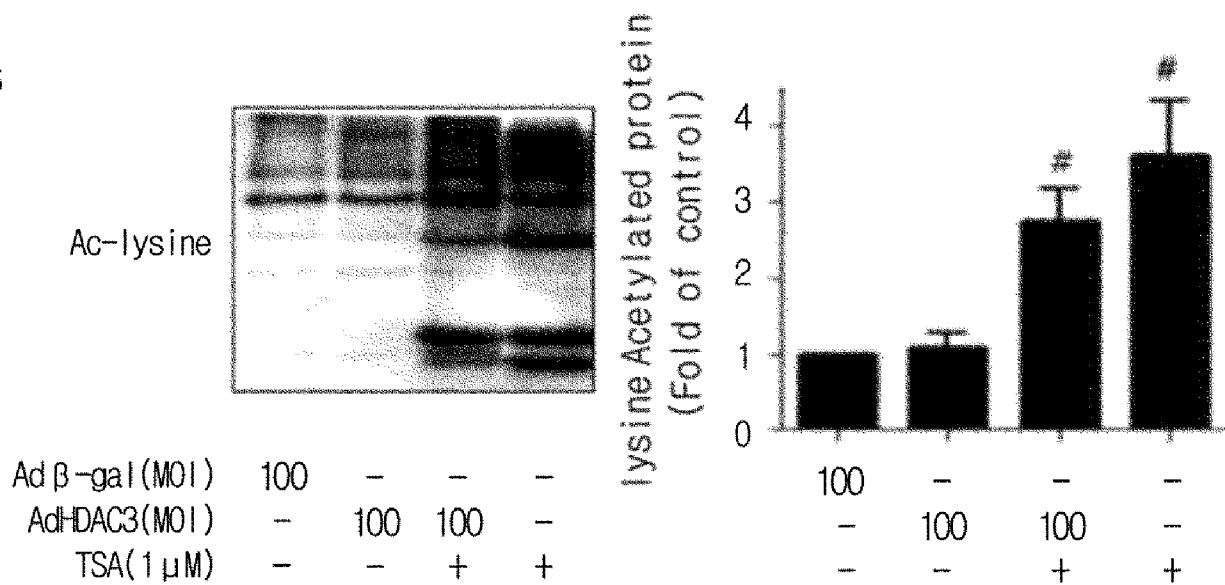
- [청구항 1] 환원형 APE1/Ref-1을 유효성분으로 함유하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 환원형 APE1/Ref-1은 환원제와 혼합된 상태로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 환원형 APE1/Ref-1은 APE1/Ref-1 유전자를 포함하는 발현벡터를 사용하여 발현 후 환원제와 혼합된 상태로 분리 및 정제하는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,
상기 환원제는 DTT(dithiothreol), 디티오에리트리톨(Dithioerythritol), 글루타티온(GSH, L-glutathione), 메르캅토에탄올(BME, b-mercapto ethanol), 아스코빅 산(Ascorbic acid), N-아세틸시스테인(NAC, N-acetylcysteine), 토코페롤(Tocopherol), 데페로자민(Deferoxamine), 염화제일주석 (Tin(II) chloride), 황산제일철(ferrous sulfate), 중아황산 소다(Sodium metabisulfite), 아황산 소다(Sodium sulfite), TCEP-HCl(Tris(2-Carboxyethyl) phosphine hydrochloride), 옥살산(Oxalic acid), 인산(phosphorous acid)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 염증은 혈관 염증 또는 패혈증인 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 피부도말제제, 경구제, 정맥주사제 또는 근육주사제로 제형화되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[도1]

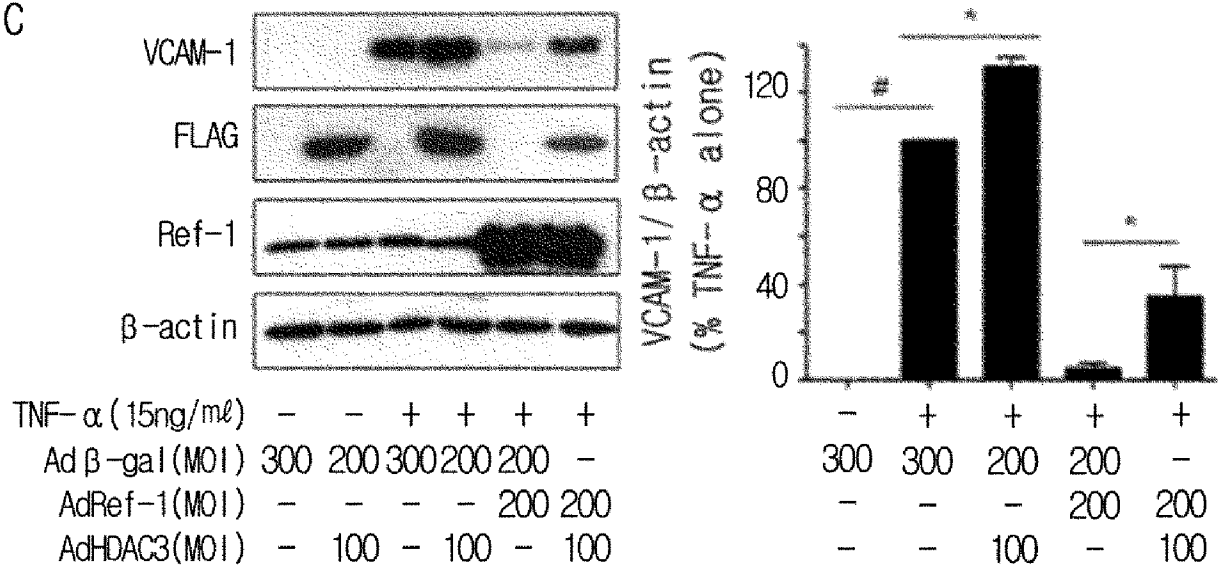
A



B

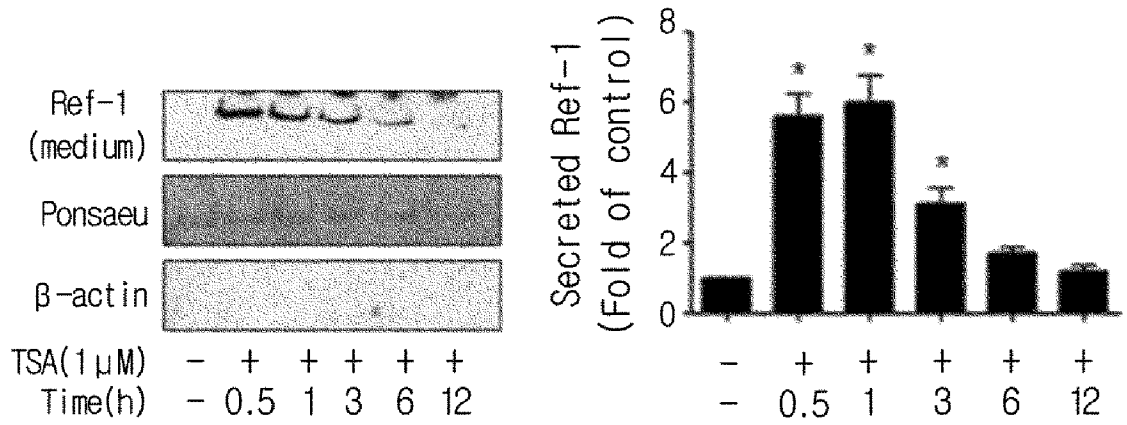


C

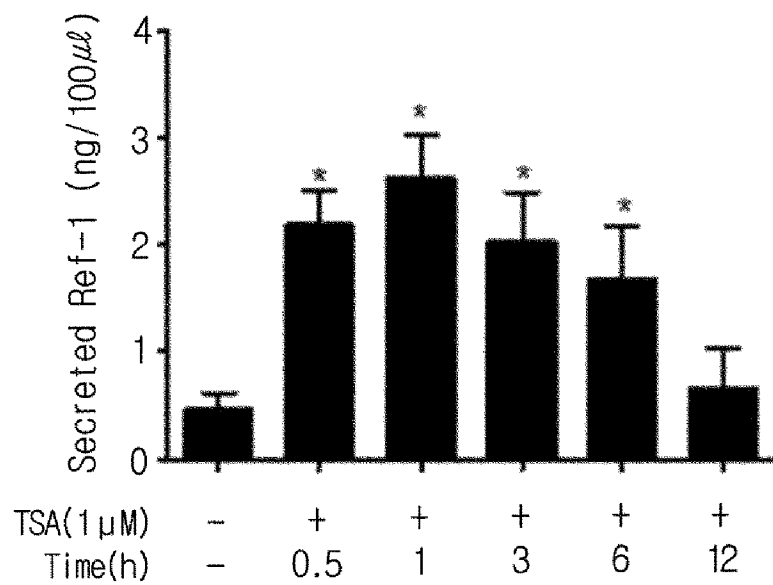


[도2]

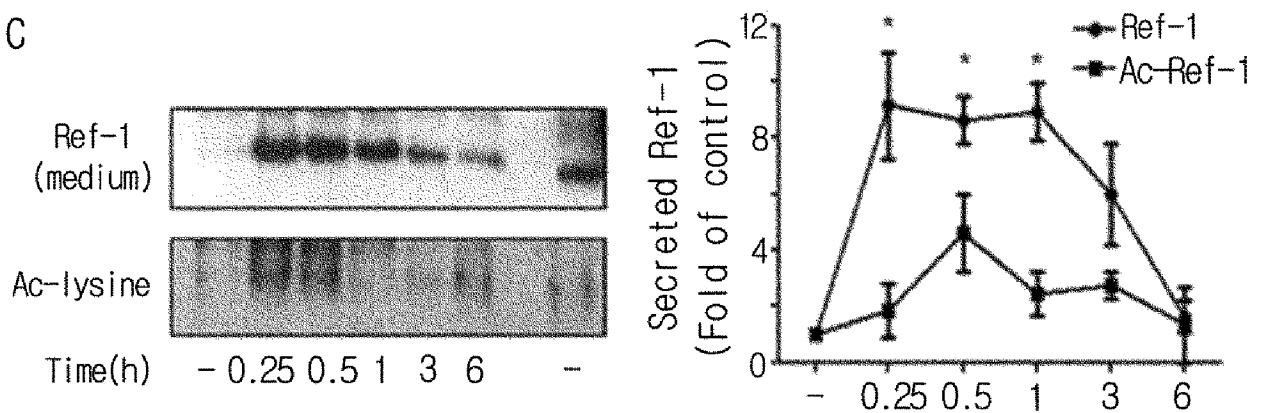
A



B

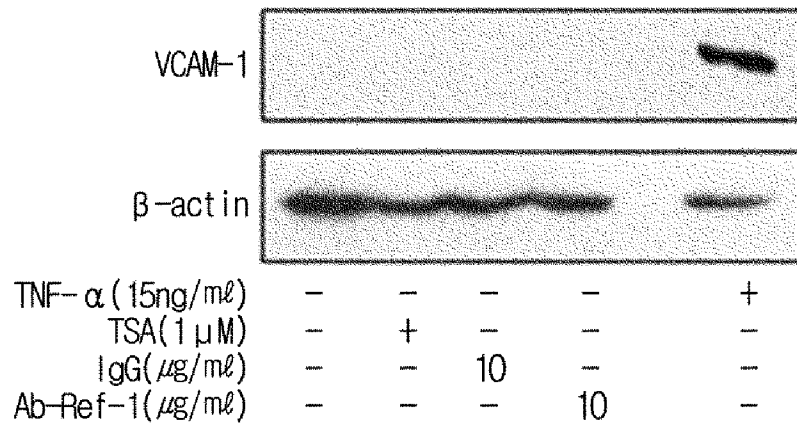


C

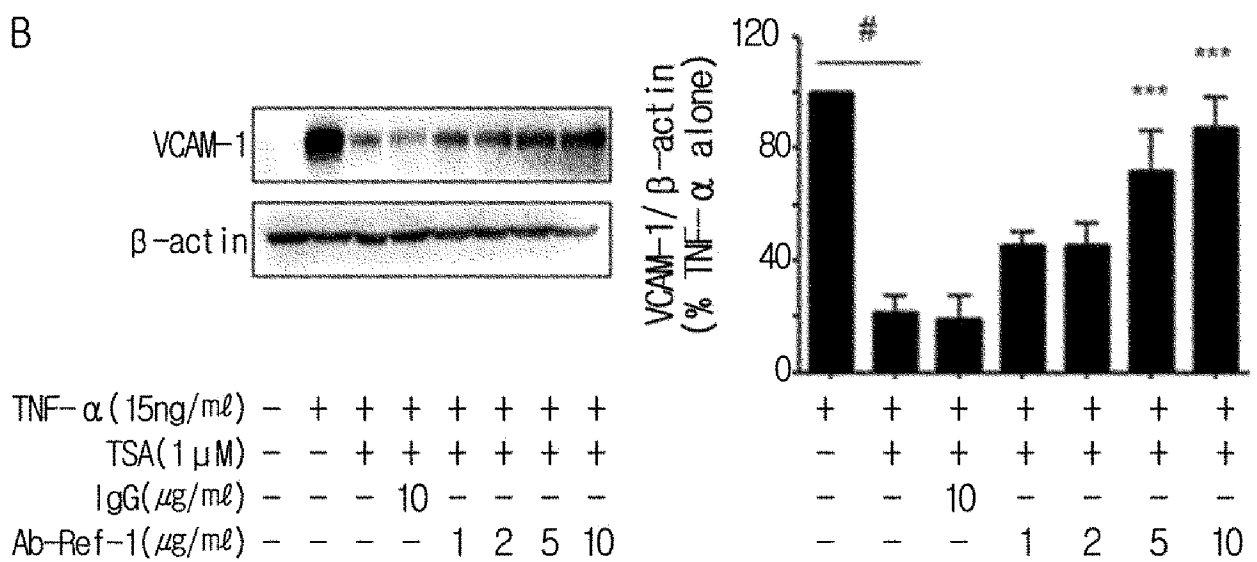


[도3]

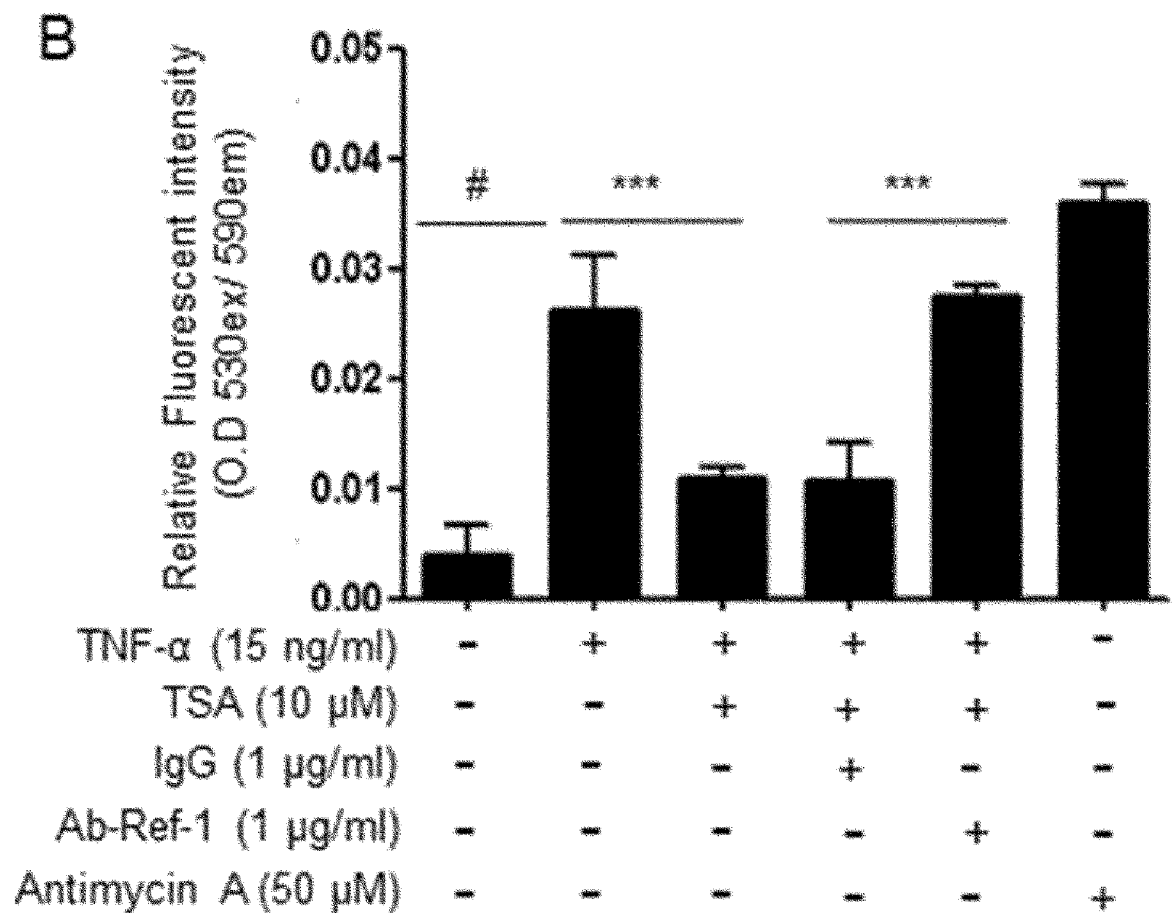
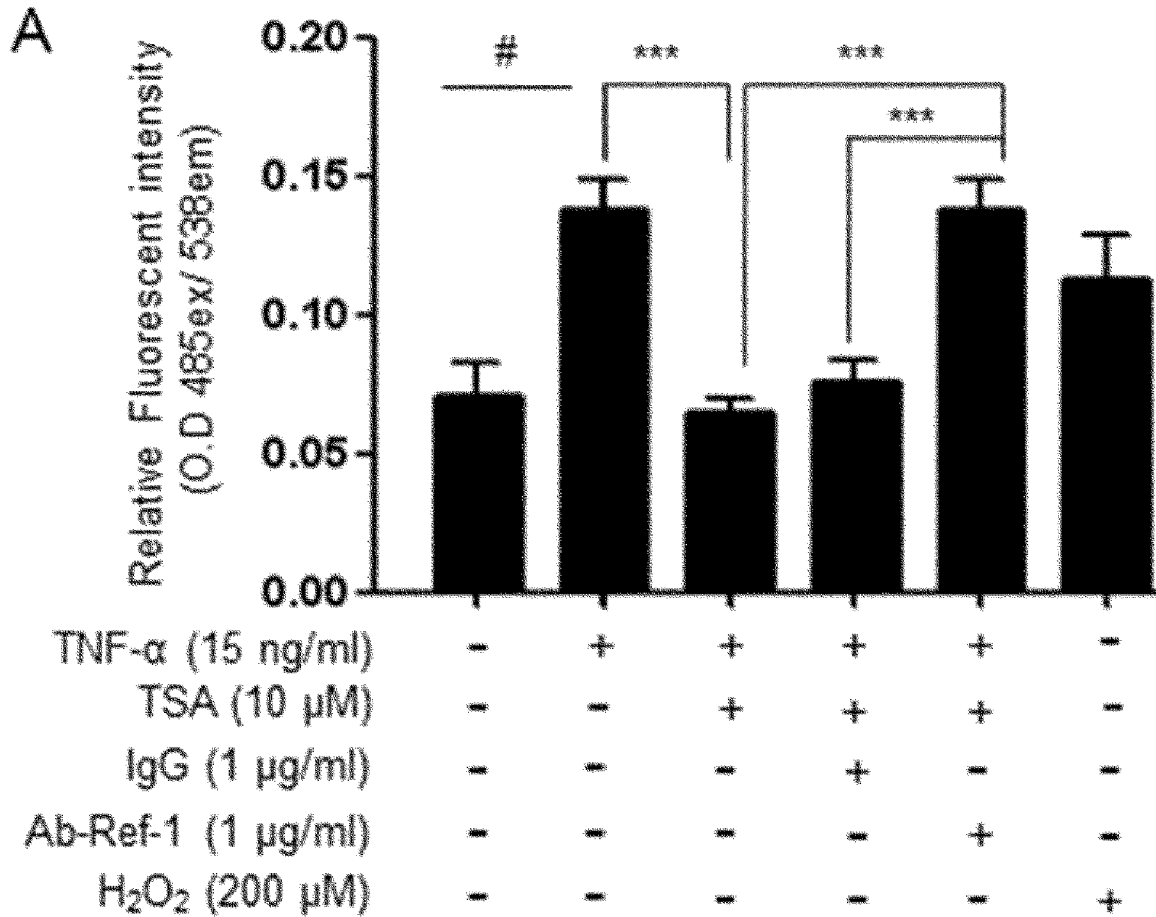
A



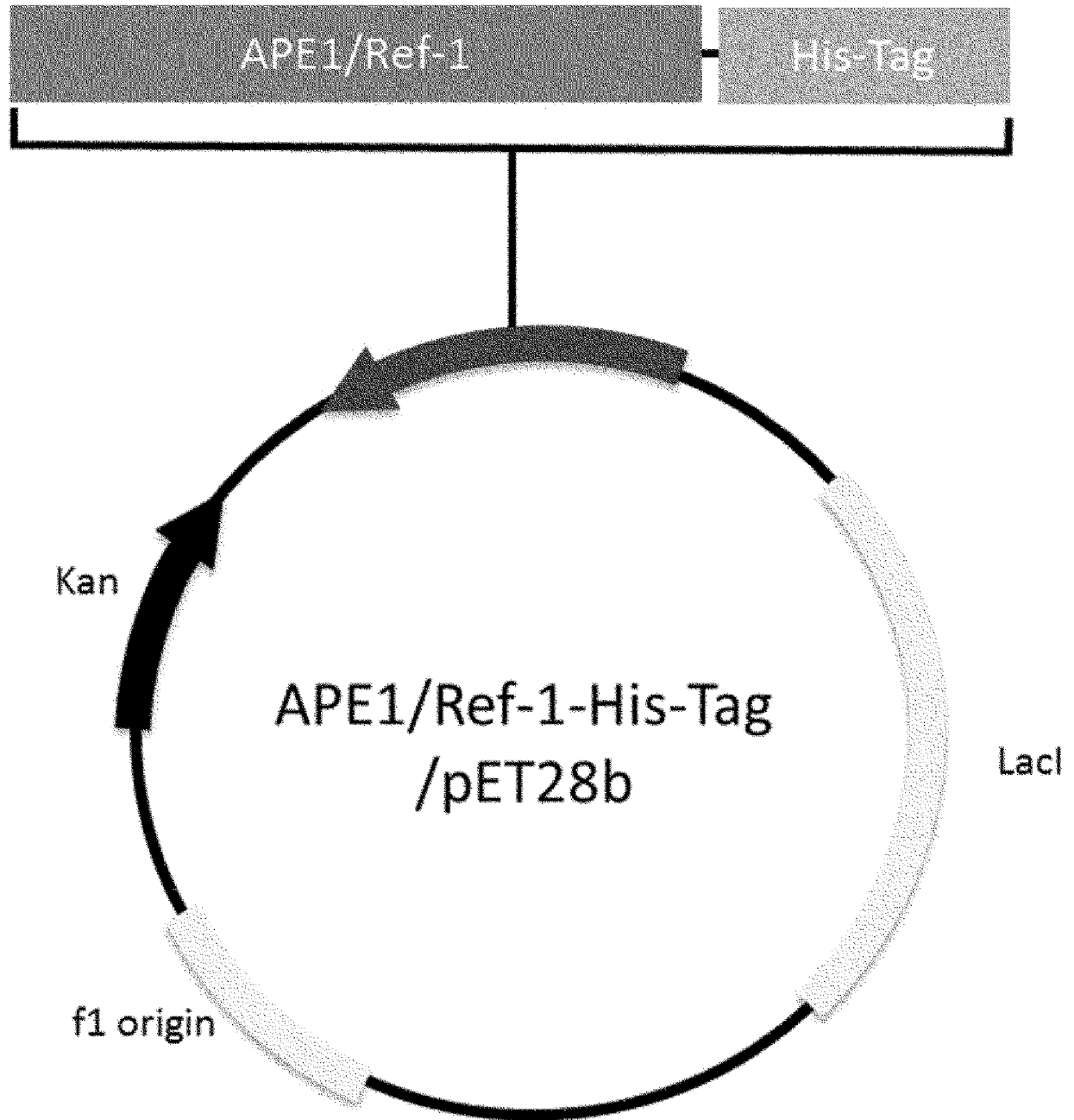
B



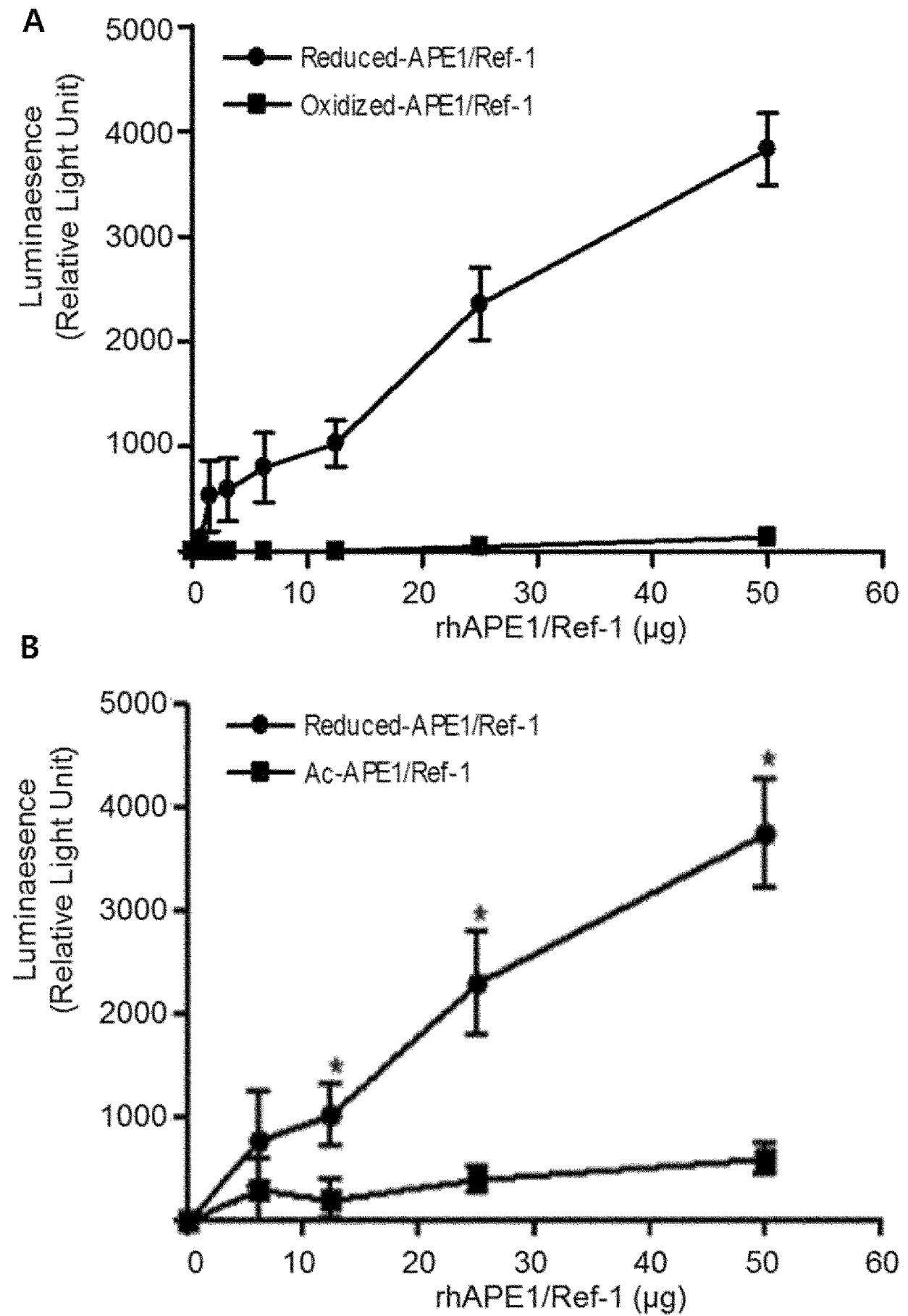
[도4]



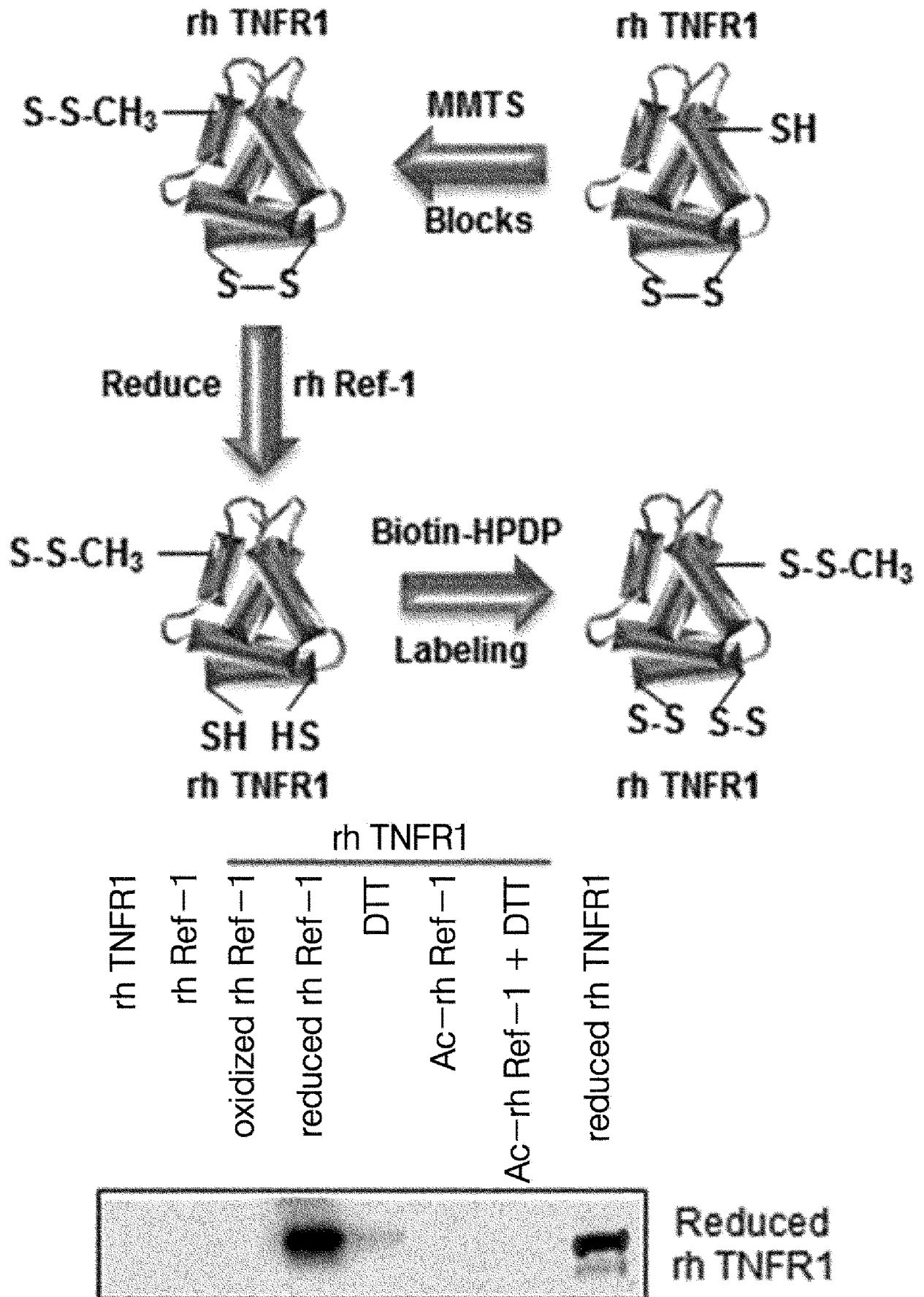
[도5]



[도6]

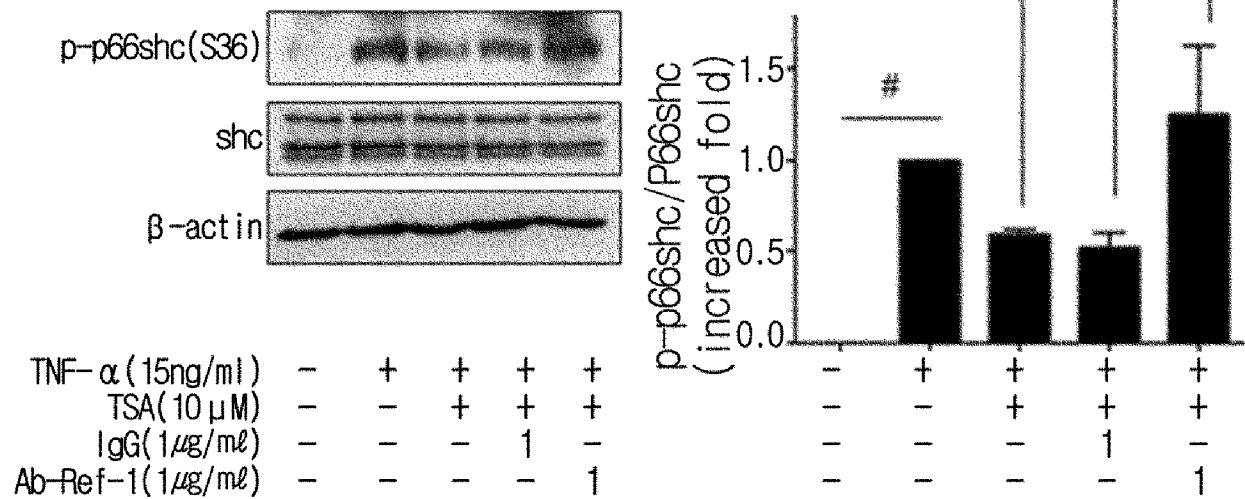


[도7]

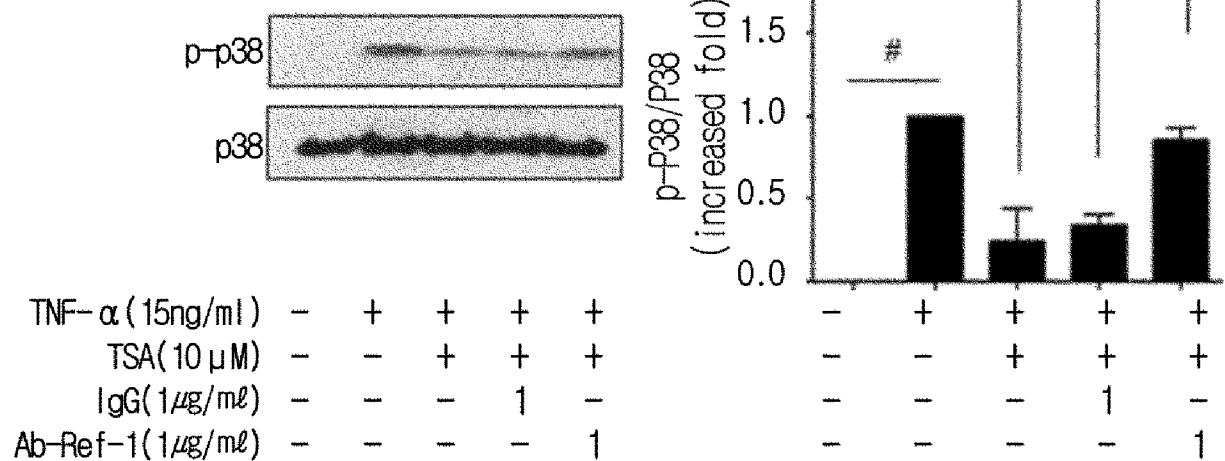


[도8]

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/011638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 9/48(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/17; A61K 31/195; A61K 31/13; A61K 38/16; A61K 9/00; A61K 9/20; A61K 9/48

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: reduced APE1/Ref-1, inflammation prevention, therapy, reducing agent

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1522499 B1 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) 22 May 2015 See abstract; paragraph [0025]; and claims 1, 4.	1-6
Y	LUO et al., "Role of the Multifunctional DNA Repair and Redox Signaling Protein Ape1/Ref-1 in Cancer and Endothelial Cells: Small-Molecule Inhibition of the Redox Function of Ape1", Antioxidants & Redox Signaling, 2008, vol. 10, no. 11, pages 1853-1867 See abstract; pages 1854, 1859; materials and methods section; and figure 1.	1-6
A	TELL et al., "The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme", Antioxidants & Redox Signaling, 2009, vol. 11, no. 3, pages 601-619 See pages 604, 612; and figure 1.	1-6
A	KR 10-2010-0084522 A (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 26 July 2010 See abstract; claims 1-3; and figure 1.	1-6
A	TELL et al., "The Intracellular Localization of APE1/Ref-1: More than a Passive Phenomenon?", Antioxidants & Redox Signaling, 2005, vol. 7, nos. 3-4, pages 365-382 See abstract.	1-6



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

13 FEBRUARY 2017 (13.02.2017)

Date of mailing of the international search report

14 FEBRUARY 2017 (14.02.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/011638

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1522499 B1	22/05/2015	NONE	
KR 10-2010-0084522 A	26/07/2010	AU 2008-304619 A1	02/04/2009
		AU 2008-304619 B2	24/09/2015
		CA 2700274 A1	02/04/2009
		CA 2700365 A1	02/04/2009
		CA 2700365 C	05/07/2016
		CN 102215833 A	12/10/2011
		CN 102215833 B	05/11/2014
		CN 104666286 A	03/06/2015
		EP 2203161 A1	07/07/2010
		EP 2203162 A1	07/07/2010
		IL 204675 A	30/11/2010
		JP 2010-540544 A	24/12/2010
		JP 2010-540545 A	24/12/2010
		JP 2015-017091 A	29/01/2015
		JP 5628674 B2	19/11/2014
		JP 5646327 B2	24/12/2014
		KR 10-1572688 B1	27/11/2015
		KR 10-2015-0038712 A	08/04/2015
		US 2010-0285008 A1	11/11/2010
		US 2010-0297113 A1	25/11/2010
		US 9040505 B2	26/05/2015
		US 9089605 B2	28/07/2015
		WO 2009-042542 A1	02/04/2009
		WO 2009-042544 A1	02/04/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 9/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17; A61K 31/195; A61K 31/13; A61K 38/16; A61K 9/00; A61K 9/20; A61K 9/48

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: 환원형 APE1/Ref-1, 염증 예방, 치료, 환원제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1522499 B1 (중남대학교산학협력단) 2015.05.22 요약; 단락 [0025]; 및 청구항 1, 4 참조.	1-6
Y	LUO 등, 'Role of the Multifunctional DNA Repair and Redox Signaling Protein Ape1/Ref-1 in Cancer and Endothelial Cells: Small-Molecule Inhibition of the Redox Function of Ape1', Antioxidants & Redox Signaling, 2008, 10권, 11호, 페이지 1853-1867 요약; 페이지 1854, 1859; materials and methods section; 및 도면 1 참조.	1-6
A	TELL 등, 'The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme', Antioxidants & Redox Signaling, 2009, 11권, 3호, 페이지 601-619 페이지 604, 612; 및 도면 1 참조.	1-6
A	KR 10-2010-0084522 A (인디애나 유니버시티 리서치 앤드 테크놀로지 코퍼레이션) 2010.07.26 요약; 청구항 1-3; 및 도면 1 참조.	1-6
A	TELL 등, 'The Intracellular Localization of APE1/Ref-1: More than a Passive Phenomenon?', Antioxidants & Redox Signaling, 2005, 7권, 3-4호, 페이지 365-382 요약 참조.	1-6

☐ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 02월 13일 (13.02.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 02월 14일 (14.02.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1522499 B1

2015/05/22

없음

KR 10-2010-0084522 A

2010/07/26

AU 2008-304619 A1	2009/04/02
AU 2008-304619 B2	2015/09/24
CA 2700274 A1	2009/04/02
CA 2700365 A1	2009/04/02
CA 2700365 C	2016/07/05
CN 102215833 A	2011/10/12
CN 102215833 B	2014/11/05
CN 104666286 A	2015/06/03
EP 2203161 A1	2010/07/07
EP 2203162 A1	2010/07/07
IL 204675 A	2010/11/30
JP 2010-540544 A	2010/12/24
JP 2010-540545 A	2010/12/24
JP 2015-017091 A	2015/01/29
JP 5628674 B2	2014/11/19
JP 5646327 B2	2014/12/24
KR 10-1572688 B1	2015/11/27
KR 10-2015-0038712 A	2015/04/08
US 2010-0285008 A1	2010/11/11
US 2010-0297113 A1	2010/11/25
US 9040505 B2	2015/05/26
US 9089605 B2	2015/07/28
WO 2009-042542 A1	2009/04/02
WO 2009-042544 A1	2009/04/02