

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 4월 20일 (20.04.2023) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2023/063564 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/5025 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
A61K 31/713 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/012739
- (22) 국제출원일: 2022년 8월 25일 (25.08.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0135117 2021년 10월 12일 (12.10.2021)KR
- (71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (**INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY**)
[KR/KR]: 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 국현 (**KOOK, Hyun**); 61402 광주광역시 동구 필문대로 12-7, Gwangju (KR). 권덕화 (**KWON, Duk Hwa**); 61712 광주광역시 남구 화산로73번길 3, 102동 108호, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 윤대웅 (**YOON, Dae Woong**); 08793 서울특별시 관악구 남부순환로 1922 603호, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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).

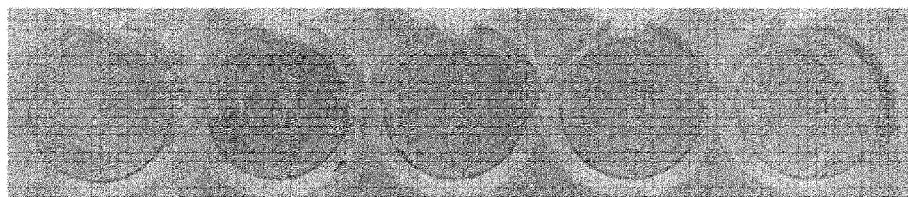
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING PCAF INHIBITOR FOR PREVENTING OR TREATING VASCULAR CALCIFICATION

(54) 발명의 명칭: PCAF 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

Pi	-	+	+	+	+
L-moses	-	-	10	30	100 (nM)



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing a pCAF inhibitor for preventing or treating vascular calcification. The inhibitor of the activity of the pCAF protein and the expression of a gene encoding the pCAF protein can be utilized as an agent for preventing and treating vascular calcification.

(57) 요약서: 본 발명은 pCAF 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 상기 pCAF 단백질의 활성, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 혈관 석회화 예방 및 치료제로써 활용될 수 있다.



WO 2023/063564 A1

명세서

발명의 명칭: PCAF 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2021년 10월 12일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2021-0135117호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 pCAF 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 pCAF 단백질 활성 억제제 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 이용한 혈관 석회화의 치료, 또는 진단 방법, 및 혈관 석회화 억제용 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 혈관 석회화는 뼈와 연조직에 인산 칼슘과 같은 무기질이 침착되는 현상을 말한다. 혈관, 신장, 뇌, 심장, 폐 등 연조직에서의 석회화는 비정상부위 석회화(ectopic calcification)라 하고, 뼈나 치아와 같은 정상적으로 석회화되는 부위와는 다르게 병적인 질환의 특징을 나타낸다.
- [4] 관상동맥을 포함한 광범위한 혈관 석회화는 만성신장병 환자에서 흔히 관찰된다. 전통적인 위험 요인인 고혈압, 당뇨, 이상지질혈증, 고령화, 그리고 흡연 등이 혈관석회화 발생에 영향을 미치며, 크게는 죽상경화성 석회화(atherosclerotic calcification) 및 내측동맥 석회화(medial artery calcification)의 두 종류로 분류된다.
- [5] 만성신장병 환자의 경우 신장 기능 저하로 인하여 칼슘-인 결합체 농도가 상승되어 있다. 이러한 현상이 지속될 경우 내측동맥을 구성하는 혈관 평활근 세포에 혈관 석회화가 발생하게 된다. 혈관 석회화를 조절하기 위해 인산염 결합제(phosphate binder), 활성 비타민 D 유사체(active vitamin D analog), 칼슘 유사체(calcimimetics) 등 여러 약제들이 개발되어 사용되고 있지만 치료 효과는 미비하며 만성신장병 환자에게서 혈관 석회화는 여전히 흔하게 나타나고 있다.
- [6] 이러한 혈관 석회화의 발병기전에는 여러 요소들이 영향을 미칠 수 있다. 혈관 석회화는 심혈관질환과 연관되어 있으며, 심혈관 질환은 현재 사망률이 매우 높은 질환 중 하나이다. 따라서 보다 더 효과적인 혈관석회화 치료를 위해서는 혈관 석회화 발생에 관여하는 새로운 기전을 찾을 필요가 있다.
- [7] pCAF(P300/CBP-associated fatcor)는 라이신 아세틸트랜스퍼라아제 2B로 알려져 있으며, 히스톤 및 비히스톤 단백질의 아세틸화에 관여하고 있으며, 유전자 및 단백질 발현을 활성화 및 촉진시킨다. 그러나 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제가 과도하게 활성화되어 히스톤 및 표적단백질을 과아세틸화시키게 되면, 암 유발 뿐 아니라 알츠하이머, 간질과 같은 퇴행성

뇌질환, 만성 신부전 및 다양한 질환 유발에 관여한다고 알려져 있다.

- [8] 한편, 혈관 조직에서 pCAF가 죽상경화증과 스텐트 시술 후 재발협착증에 관여하는 전사인자로 작용한다는 보고가 있었으나, 혈관 석회화 기전 및 이를 이용한 혈관 석회화 예방 및 치료 가능성에 대해 보고된 바는 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이에 본 발명자들은 혈관 석회화 유발 과정에 작용하는 pCAF(P300/CBP-associated factor)의 새로운 역할을 찾고 이를 이용한 pCAF 억제제를 통해 혈관 석회화 예방 및 치료제로써 활용할 수 있을 것으로 판단하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [10] 이에, 본 발명의 목적은 pCAF 단백질의 활성 억제제 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 pCAF 단백질의 활성 수준 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 혈관 석회화 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 pCAF 단백질의 활성 수준 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 혈관 석회화 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 시험 개체로부터 분리된 시료에서 pCAF 단백질의 활성, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 중 1종 이상의 수치가 정상 개체 대비 증가하는 경우, 시험 개체의 혈관 석회화 발병도가 높을 것으로 판단하는 것인 판단 단계를 포함하는 혈관 석회화의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 다음 단계를 포함하는 혈관 석회화 억제용 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다:
- [15] 혈관 석회화가 유도된 분리된 세포에 후보 물질을 접촉시키는 접촉 단계; 및
- [16] 상기 세포에서 후보 물질을 접촉시키지 않은 대조군 세포에 대비하여 pCAF 단백질의 활성, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 중 1종 이상의 수치가 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 혈관 석회화 억제용 물질로 판단하는 판단 단계.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 pCAF 단백질 활성 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제의 혈관 석회화 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.
- ### 과제 해결 수단
- [18] 본 발명은 pCAF 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 pCAF 억제제는 혈관 석회화 예방 및 치료제로써 활용할 수 있다.

- [19] 본 발명자들은 pCAF 단백질의 활성화 및 억제에 따라 혈관 석회화를 나타내는 양상이 변화하는 것을 확인하였고, 이에 근거하여 pCAF 단백질의 활성화 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 억제함으로써 혈관 석회화를 예방 또는 치료할 수 있음을 발견하였다.
- [20] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [21] 본 발명의 일 양태는 pCAF 단백질의 활성화 억제제 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.
- [22] 본 발명에 있어서 상기 pCAF 단백질의 활성화 억제제는 pCAF 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물인 것일 수 있다.
- [23] 상기 화합물은 L-moses인 것일 수 있다. 가르시놀(Galcinol)과 이소시아졸론(Isothiazolones)은 히스톤 아세틸라아제 p300와 pCAF 억제제로 작용하는 물질이며 Compound 1, Compound 2와 Compound 3는 pCAF 억제제로 보고되었으나, 비선택적 pCAF 억제제로 작용한다. 현재까지 보고된 pCAF 선택적 단백질 활성화 억제제로는 L-moses가 유일하게 적용 가능하다.
- [24] 본 발명에 있어서 상기 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA(small interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [25] 상기 siRNA는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍으로 이루어진 siRNA 쌍인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명의 다른 양태는 pCAF 단백질의 활성화 수준 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 혈관 석회화 진단용 조성물이다.
- [27] 본 발명에 있어서 상기 pCAF 단백질의 활성화 수준을 측정할 수 있는 제제는 pCAF 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [28] 본 발명에 있어서 상기 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 프라이머 및 프로브로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [29] 본 발명의 또 다른 양태는 pCAF 단백질의 활성화 수준 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 혈관 석회화 진단용 키트이다.
- [30] 본 발명에 있어서 상기 pCAF 단백질의 활성화 수준을 측정할 수 있는 제제는 pCAF 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

- [31] 본 발명에 있어서 상기 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 프라이머 및 프로브로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [32] 본 발명의 또 다른 양태는 시험 개체로부터 분리된 시료에서 pCAF 단백질의 활성, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 중 1종 이상의 수치가 정상 개체 대비 증가하는 경우, 시험 개체의 혈관 석회화 발병도가 높을 것으로 판단하는 것인 판단 단계를 포함하는 혈관 석회화의 진단을 위한 정보 제공 방법이다.
- [33] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 혈관 석회화 억제용 물질의 스크리닝 방법이다:
- [34] 혈관 석회화가 유도된 분리된 세포에 후보 물질을 접촉시키는 접촉 단계; 및
- [35] 상기 세포에서 후보 물질을 접촉시키지 않은 대조군 세포에 대비하여 pCAF 단백질의 활성, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 중 1종 이상의 수치가 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 혈관 석회화 억제용 물질로 판단하는 판단 단계.
- [36] 본 발명에 있어서 상기 세포는 혈관 평활근 세포인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [37] 본 발명은 pCAF 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 상기 pCAF 단백질의 활성, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 혈관 석회화 예방 및 치료제로써 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 석회화 모델에서 pCAF 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 사진이다.
- [39] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 석회화 모델에서 pCAF의 과발현에 의한 칼슘 분석(assay) 결과 그래프이다.
- [40] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 석회화 모델에서 pCAF siRNA의 처리에 의한 칼슘 분석 결과 그래프이다.
- [41] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 석회화 모델에서 pCAF siRNA의 처리에 의한 혈관 석회화 정도를 나타낸 알리자린 레드(Alizarin red) S 염색 사진이다.
- [42] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 고농도 무기인산 처리에 의해 제조된 혈관 석회화 모델에서 L-moses 처리에 의한 pCAF 활성을 나타낸 그래프이다.
- [43] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 고농도 무기인산 처리에 의해 제조된 혈관 석회화 모델에서 L-moses 처리에 의한 칼슘 분석 결과 그래프이다.
- [44] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 고농도 무기인산 처리에 의해 제조된 혈관 석회화 모델에서 L-moses 처리에 의한 혈관 석회화 정도를 나타낸 알리자린 레드 S 염색 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [45] pCAF 단백질의 활성 억제제 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 실시를 위한 형태

- [46] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [47] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[48]

- [49] 실시예 1: 혈관 석회화 모델의 제작

- [50] 8~9주령 랫트(Sprague Dawley)를 2,2,2-트리브로모에탄올(tribromoethanol)을 이용한 마취제로 안락사시킨 뒤 대동맥을 분리하였으며, 내피세포를 제거한 뒤에 콜라게네이즈(collagenase)를 포함하는 배양액(Ham's F12)에 넣고 혈관 평활근 세포를 분리하였다.

- [51] 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함한 둘베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)를 일반배지로 사용하여 분리한 혈관 평활근 세포를 대조군으로 배양하였다. 실험군으로는 동일한 일반배지에서 혈관 평활근 세포에 2 내지 5 mM 무기인산(Inorganic Phosphorus; Pi)을 2 내지 6일간 처리하며 배양하였으며, 실험군과 대조군 모두 2일에 1회 간격으로 배지를 교체하여 혈관 석회화 모델을 구축하였다.

[52]

- [53] 실시예 2: 혈관 석회화 모델에서의 pCAF 단백질 발현량의 확인

- [54] 상기 실시예 1에서 분리된 혈관 평활근 세포에 2 mM 무기인산을 3일 또는 6일간 처리한 혈관 석회화 모델로부터 trypsin-EDTA를 이용하여 혈관 평활근 세포를 수확한 뒤에 1% NP-40 완충액(150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, protease inhibitor)을 넣고 소니케이션하여 30분간 반응시켰다. 13,000 rpm으로 15분간 원심분리한 뒤에 상층액을 회수하여, 키트(BCA protein assay kit)를 이용하여 단백질을 정량하였다.

- [55] 상기 단백질 30 ug을 취하여 SDS-PAGE에 전기영동한 뒤에 폴리비닐리덴 플루오라이드(Polyvinylidene fluoride, PVDF membrane)으로 옮겨 검출 대상 단백질에 특이적인 1차 항체(α -pCAF(1:1000, Cell signaling), α -b-Actin(1:1000, Santa cruz))를 넣고 하루 동안 냉장 상태에서 반응시켰다. 이후 2차 항체(anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase(HRP)-linked antibody, 1:5000, Cell signaling)로 1시간 동안 상온에서 반응시키고 1xTBST

완충액으로 3회 이상 세척(washing)한 후 기질(Western Chemiluminescent HRP substrate)을 이용하여 대상 단백질 검출량을 확인하였다.

- [56] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 무기인산을 처리하지 않은(day 0) 대조군 대비 무기인산을 처리하여 제작된 혈관 석회화 모델(day 3, 6)에서 pCAF(P300/CBP-associated factor)의 발현량이 유의적으로 증가하였다.

[57]

[58] 실시예 3: pCAF의 발현량 조절에 의한 혈관 석회화 정도의 확인

[59] 3-1. pCAF의 과발현에 따른 칼슘 축적도의 확인

- [60] 혈관 평활근 세포에 pCAF를 과발현 시키기 위해 pCAF 과발현 벡터를 애드진(addgene #8941)에서 구입하여 사용하였다. 구체적으로, pCI 벡터(Promega)에 인간 pCAF 유전자의 코딩 부위 서열과 Flag 태그 서열을 유전자 재조합 방법으로 삽입하여 pCAF 과발현 벡터인 pCI-Flag pCAF 벡터가 제조되었다.

- [61] 24-웰(well) 플레이트에 세포를 접종(seeding)한 후 리포펙타민 LTX (lipofectamine LTX, ThermoFisher)를 사용하여 상기 pCI-Flag pCAF 과발현 벡터로 트랜스펙션(transfection)을 수행하였다. 다음날 10% FBS에 포함된 배지로 교체하였고 실험군에는 4 mM 무기인산을 3일간 처리하였으며 2일에 한번 배지를 교체하였다.

- [62] 세포의 칼슘 축적량을 확인하기 위해 이에 0.6 N HCl을 처리하여 24시간 동안 냉장상태에서 반응시킨 뒤, 키트(QuantiChrom Calcium Assay Kit)를 사용하여 칼슘 축적량을 측정하였고 pCAF 단백질의 발현량은 키트(BCA protein assay kit)를 사용하여 측정하였다. 칼슘 축적량(mg/mg protein)은 pCAF 단백질 발현량이 각각 0, 50, 100, 및 200 ng인 경우를 기준으로 보정하였다.

[63] [표1]

Pi	-	+	+	+	+
pCAF	-	-	50 ng	100 ng	200 ng
칼슘 축적량	0.016	0.141	0.093	0.396	1.289

[64]

- [65] 표 1 및 도 2에서 확인할 수 있듯이, 혈관 평활근 세포에 무기인산 처리에 의해 증가된 칼슘 축적은 pCAF 과발현 양을 증가시킬수록 칼슘의 축적량이 증가하였다.

[66]

[67] 3-2. pCAF의 발현 억제에 의한 칼슘 축적도의 확인

- [68] pCAF의 발현을 억제하기 위한 pCAF를 표적으로 하는 siRNA 올리고머(si-pCAF)와 대조군인 pCAF 비 특이적인 스크램블(scramble)

올리고머는 바이오니아에서 제작 및 구입하였다. siRNA는 랫트에서 추출한 혈관 평활근 세포에서 실험하였으므로 랫트(*Rattus Norvegicus*)의 pCAF 유전자를 타겟으로 하여 이중 가닥으로 디자인하였다.

[69] [표2]

서열번호	명칭	서열
1	pCAF siRNA sense	5'-GGGUAUCGAACUUGUGUU A-3'
2	pCAF siRNA antisense	5'-UAACACAAGUUCGAUACC C-3'

[70]

[71] 혈관 평활근 세포에서 스크램블 올리고머, pCAF siRNA, 및 리포펙타민 RNAiMAX(ThermoFisher) 시약을 이용하여 pCAF를 각각 농도별(50 및 100 nM)로 킥다운(knockdown) 시킨 뒤, 다음 날 10% 소태아혈청 포함한 배지로 교체한 후, 4 mM 무기인산을 3일 동안 처리하였다.

[72] 세포의 칼슘 축적량 확인은 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[73] [표3]

Pi	-	+	+	+
Si-pCAF	-	-	50 nM	100 nM
칼슘 축적량	0.003	0.018	0.011	0.0105

[74]

[75] 표 3 및 도 3에서 확인할 수 있듯이, 무기인산 처리에 의해 증가된 칼슘 축적량은 스크램블 대비 pCAF siRNA를 처리한 경우에서 칼슘의 축적량이 농도별로 차단되었다.

[76]

[77] **3-3. pCAF의 발현 억제에 의한 혈관 석회화 정도의 확인**

[78] pCAF의 발현 억제가 혈관 석회화에 미치는 영향을 알리자린 레드(Alizarin red) S 염색으로 확인하였다.

[79] 구체적으로, 상기 실시예 3-2의 방법에 따라 각각 리포펙타민 RNAiMAX 시약 및 pCAF siRNA 50 및 100 nM를 이용하여 pCAF를 킥다운시킨 혈관 평활근 세포에 4 mM 무기인산을 3일간 처리하였다. 배지를 제거한 세포를 PBS로 한번 행군 뒤 10% 포르말린을 넣고 상온에서 1시간 동안 고정시킨 후 포르말린을 제거하고 PBS로 세 번 행구고 세포를 살짝 건조시켰다. 이후 40 mM 알리자린 레드 S(pH 4.2) 염색약을 넣고 20분간 반응시켰다. 염색 후 비특이적으로 세포에 염색된 염료를 제거하기 위해 3차 증류수로 세척하였다.

[80] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 고농도 무기인산 처리에 의해 증가된 혈관

석회화가 pCAF siRNA의 처리에 의하여 차단되었다.

[81]

[82] 실시예 4: pCAF 활성 억제제에 따른 혈관 석회화 정도의 확인

[83] 4-1. pCAF 활성 억제제에 따른 pCAF 활성 억제 효과 확인

[84] 실시예 1에서 분리된 혈관 평활근 세포에 5 mM 무기인산을 2일간 처리한 후 pCAF 활성 억제제인 10 nM L-moses(TOCRIS)를 24시간 처리한 뒤에 1% NP-40 완충액 700 μ l를 넣고 소니케이션하였으며, 30분간 얼음위에서 반응시켰다. 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 회수한 다음 키트(BCA protein assay kit)를 사용하여 단백질량을 정량하였고 이 중 1 mg를 취해서 pCAF 항체를 이용해 냉장상태에서 오버나이트(overnight) 조건으로 면역침강반응을 수행하였다. A/G bead를 넣고 1시간 동안 냉장상태에서 반응시킨 뒤에 1% NP-40 완충액으로 세 번 세척한 뒤에 키트(Histone Acetyltransferase Activity Assay kit)를 이용하여 pCAF 활성도를 측정하였다.

[85] [표4]

Pi	-	+	+
L-moses	-	-	+
pCAF 활성	0.042	0.101	0.041

[86]

[87] 표 4 및 도 5에서 확인할 수 있듯이, 고농도 무기인산 처리에 의해 증가된 pCAF 활성이 L-moses 처리에 의해 억제되었다.

[88]

[89] 4-2. pCAF 활성 억제제에 따른 칼슘 축적도의 감소 확인

[90] 혈관 평활근 세포를 상기 실시예 4-1과 동일하게 준비하되, L-moses는 각각 10 및 30 nM 처리하여 칼슘 축적도의 변화를 확인하였다.

[91] [표5]

Pi	-	+	+	+
L-moses	-	-	10 nM	30 nM
칼슘 축적량	0.015	0.033	0.022	0.019

[92]

[93] 표 5 및 도 6에서 확인할 수 있듯이, 고농도 무기인산 처리에 의해 축적된 칼슘 축적량이 pCAF 활성 억제제인 L-moses 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다.

[94]

[95] 4-3. pCAF 활성 억제제에 따른 혈관 석회화 정도의 확인

- [96] 혈관 평활근 세포를 상기 실시예 4-1과 동일하게 준비하되, L-moses는 각각 10, 30 및 100 nM 처리하여 칼슘 축적도의 변화를 확인하였다.
- [97] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 고농도 무기인산 처리에 의해 증가된 혈관 석회화가 pCAF 활성 억제제인 L-moses 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다.

산업상 이용가능성

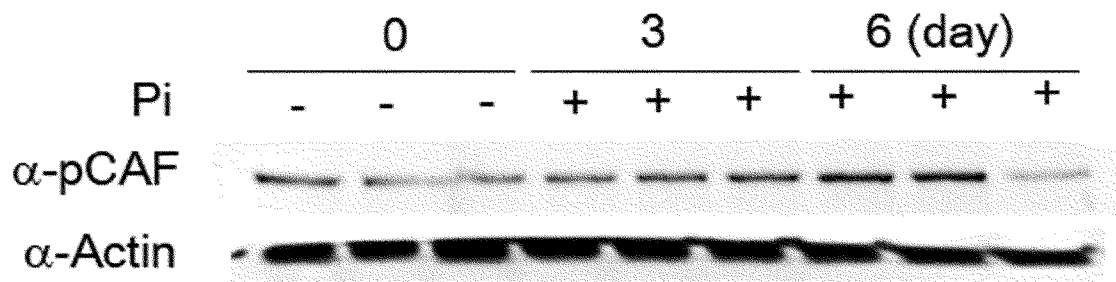
- [98] 본 발명은 pCAF 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 pCAF 단백질 활성 억제제 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 이용한 혈관 석회화의 치료, 또는 진단 방법, 및 혈관 석회화 억제용 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

청구범위

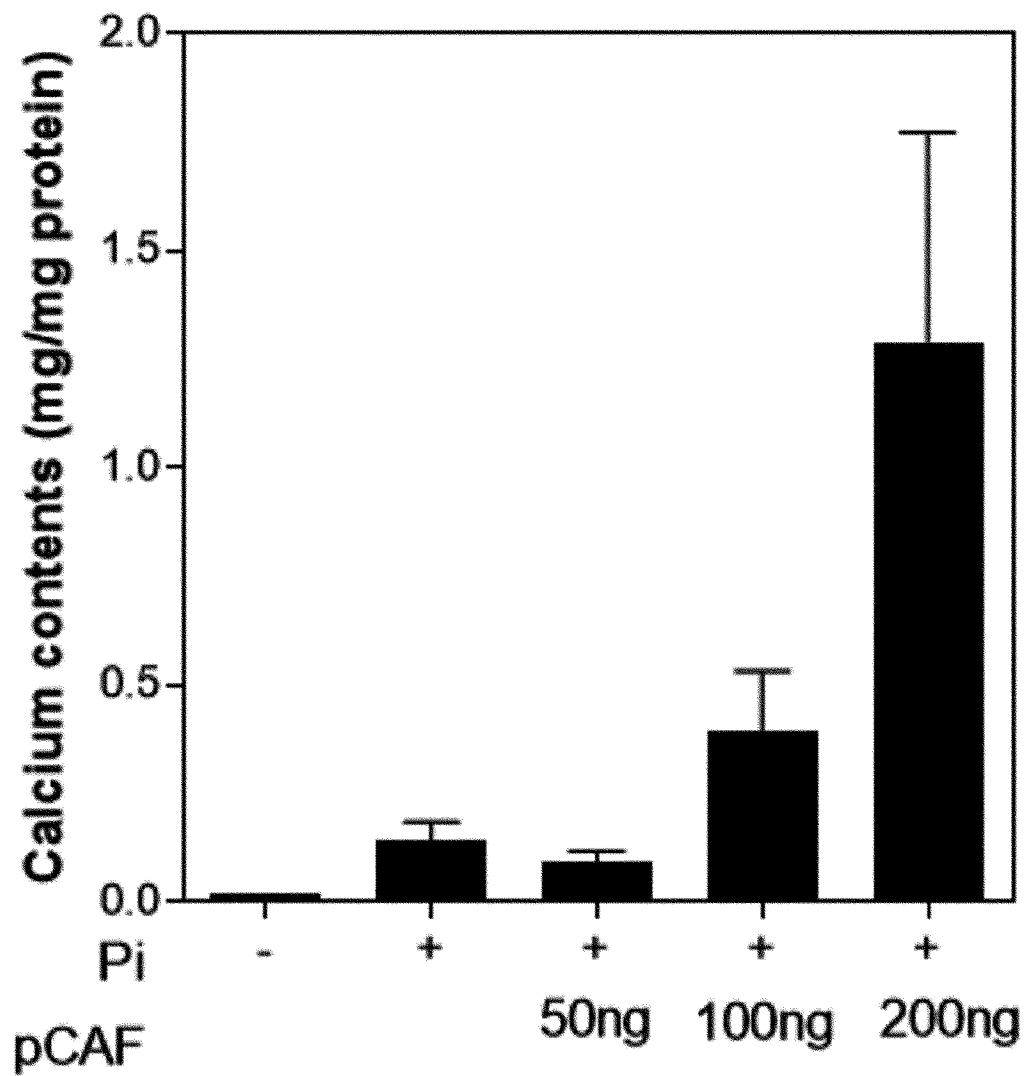
- [청구항 1] pCAF 단백질의 활성 억제제 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하는 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 pCAF 단백질의 활성 억제제는 pCAF 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 화합물은 L-moses인 것인, 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA(small interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍으로 이루어진 siRNA 쌍인 것인, 혈관 석회화 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 6] pCAF 단백질의 활성 수준 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 혈관 석회화 진단용 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 pCAF 단백질의 활성 수준을 측정할 수 있는 제제는 pCAF 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관 석회화 진단용 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 프라이머 및 프로브로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관 석회화 진단용 조성물.
- [청구항 9] pCAF 단백질의 활성 수준 또는 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 혈관 석회화 진단용 키트.
- [청구항 10] 시험 개체로부터 분리된 시료에서 pCAF 단백질의 활성, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 중 1종 이상의 수치가 정상 개체 대비 증가하는 경우, 시험 개체의 혈관 석회화 발병도가 높을 것으로 판단하는 것인 판단 단계를 포함하는 혈관 석회화의 진단을 위한 정보 제공 방법.
- [청구항 11] 다음 단계를 포함하는 혈관 석회화 억제용 물질의 스크리닝 방법:
혈관 석회화가 유도된 분리된 세포에 후보 물질을 접촉시키는 접촉 단계;
및
상기 세포에서 후보 물질을 접촉시키지 않은 대조군 세포에 대비하여

pCAF 단백질의 활성화, 및 pCAF 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 중 1종 이상의 수치가 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 혈관 석회화 억제용 물질로 판단하는 판단 단계.

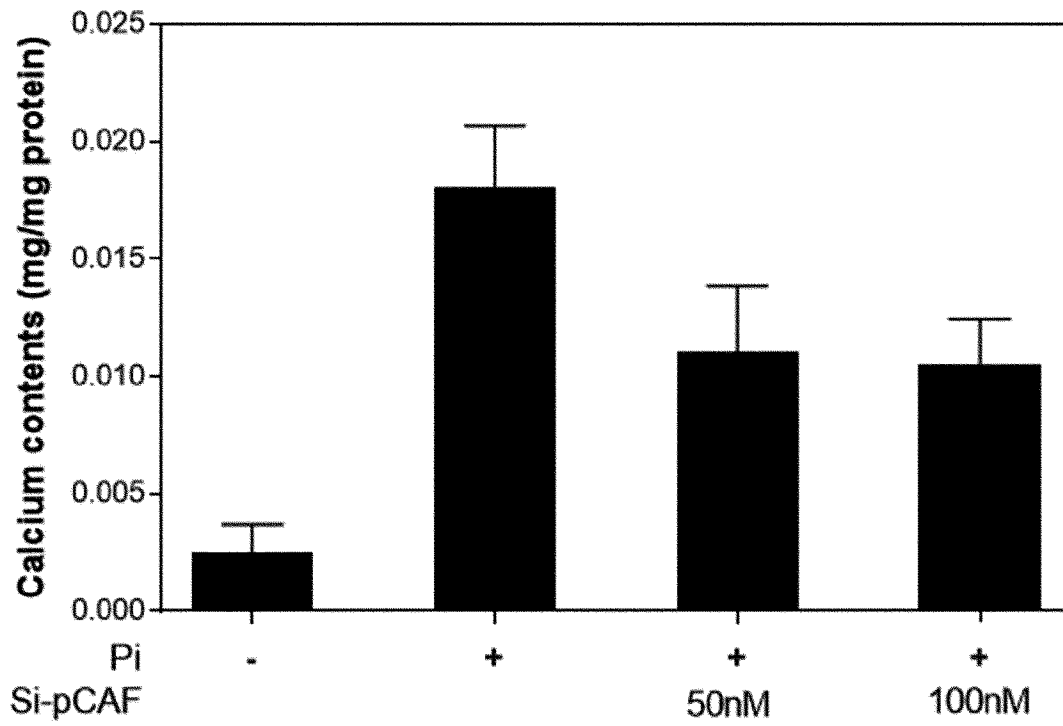
[도1]



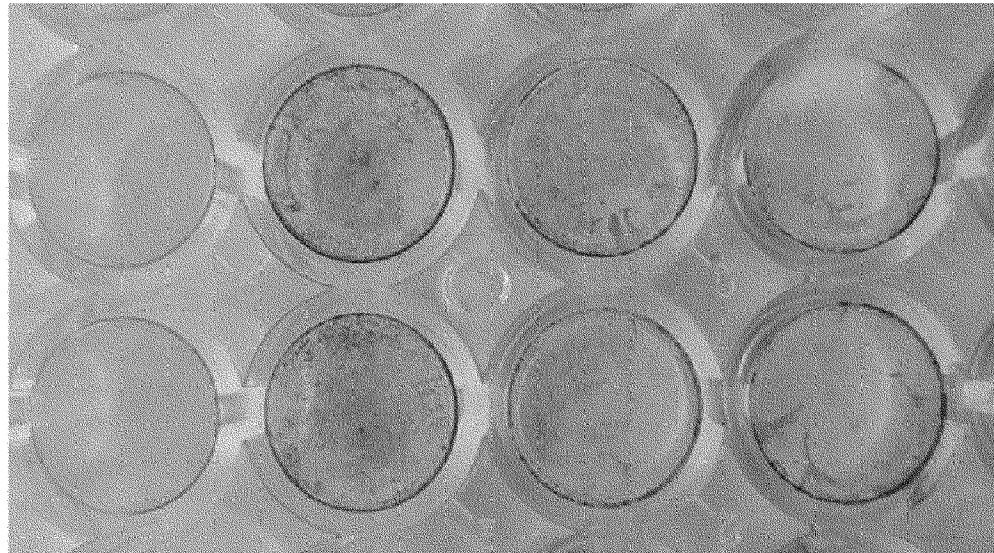
[도2]



[도3]

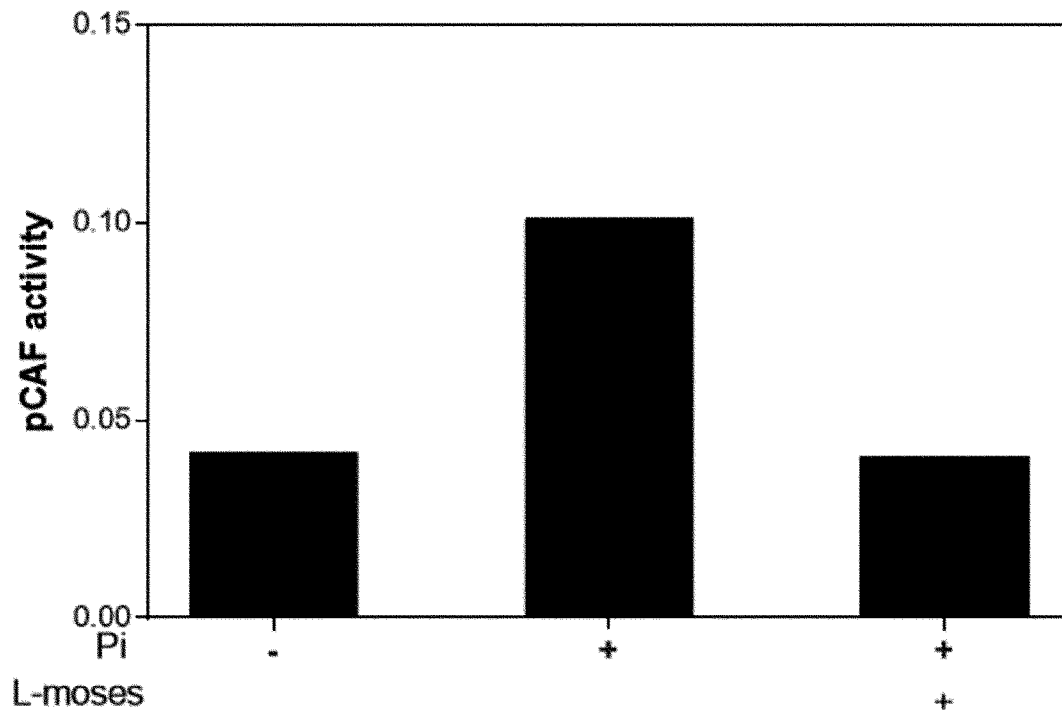


[도4]

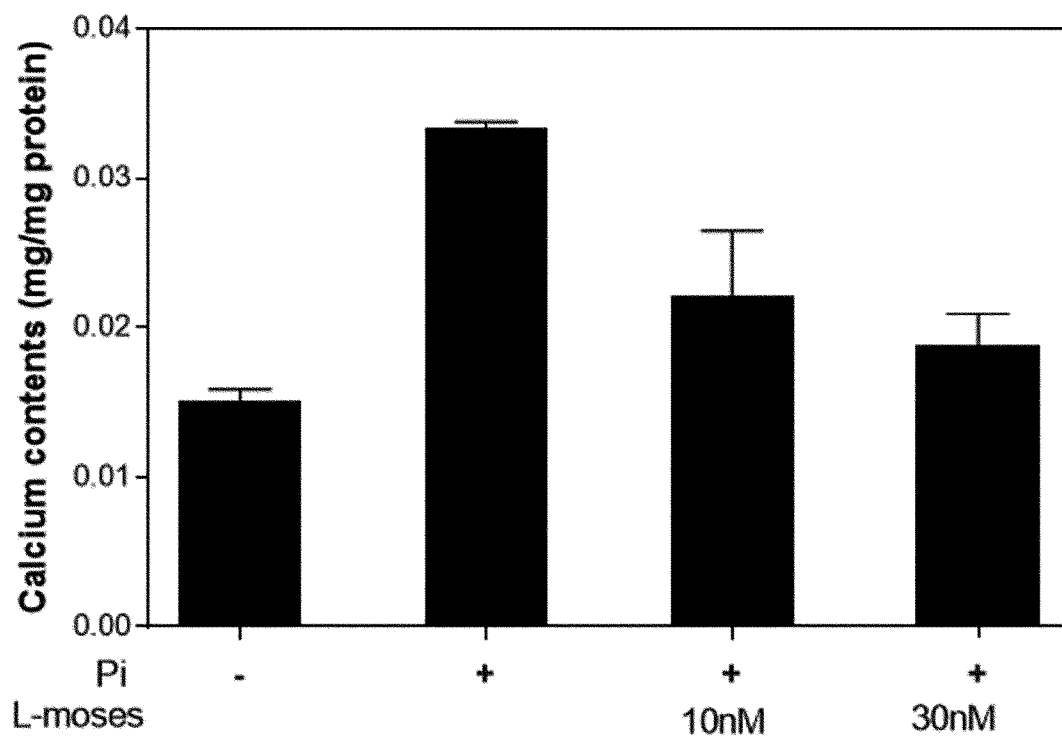


Pi 4mM	-	+	+	+
Si-pCAF	-	-	50nM	100nM

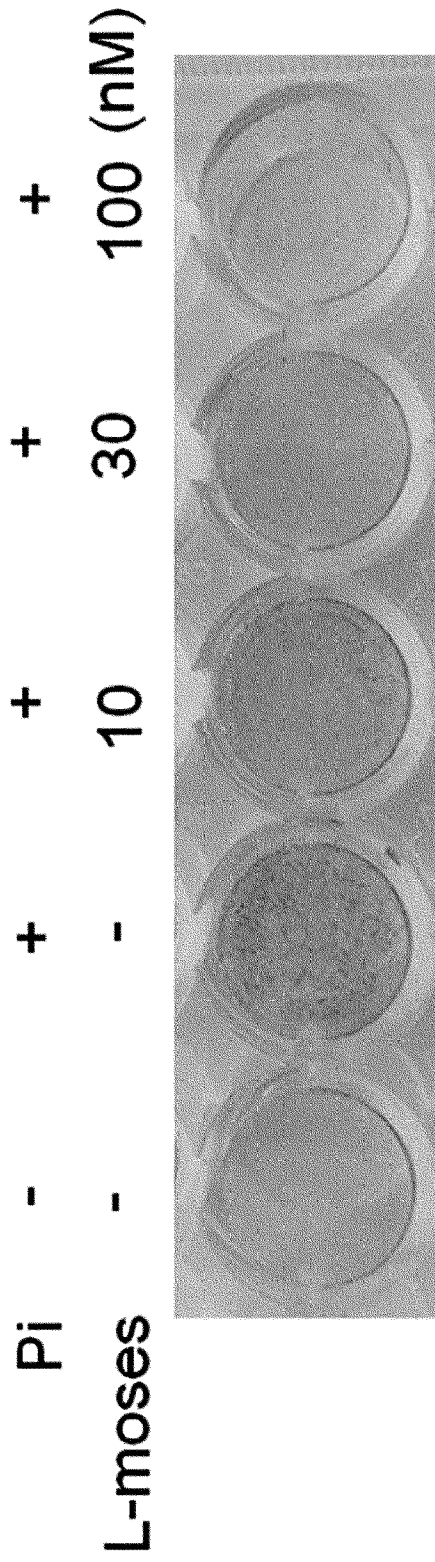
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/5025(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(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 31/5025(2006.01); A61K 31/075(2006.01); A61K 31/155(2006.01); A61K 31/4178(2006.01); A61K 31/497(2006.01); A61K 39/395(2006.01)

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: pCAF(= P300/CBP-Associated Factor), 억제제(inhibitor), 혈관 석회화(vascular calcification)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIM, Y. et al. P300/CBP-Associated Factor Activates Cardiac Fibroblasts by SMAD2 Acetylation. Int. J. Mol. Sci. 14 September 2021, vol. 22, thesis no. 9944, pp. 1-16. See abstract; pages 2-3; and figure 1.	1-11
A	KR 10-2016-0062517 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL et al.) 02 June 2016 (2016-06-02) See claims 1-10.	1-11
A	DE JONG, A. et al. P300/CBP Associated Factor (PCAF) Deficiency Enhances Diet-Induced Atherosclerosis in ApoE3*Leiden Mice via Systemic Inhibition of Regulatory T Cells. Front. Cardiovasc. Med. 15 January 2021, vol. 7, thesis no. 604821, pp. 1-10. See abstract; and pages 5-6.	1-11
A	KR 10-2010-0024182 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 05 March 2010 (2010-03-05) See claims 1-7.	1-11



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

08 December 2022

Date of mailing of the international search report

08 December 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012739

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0087037 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 21 July 2016 (2016-07-21) See entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012739

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/012739

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2016-0062517	A	02 June 2016	WO	2016-085030	A1	02 June 2016
KR	10-2010-0024182	A	05 March 2010	KR	10-1040486	B1	09 June 2011
KR	10-2016-0087037	A	21 July 2016	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/5025(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/5025(2006.01); A61K 31/075(2006.01); A61K 31/155(2006.01); A61K 31/4178(2006.01); A61K 31/497(2006.01); A61K 39/395(2006.01) 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: pCAF(= P300/CBP-Associated Factor), 억제제(inhibitor), 혈관 석회화(vascular calcification)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LIM, Y. 등, 'P300/CBP-Associated Factor Activates Cardiac Fibroblasts by SMAD2 Acetylation', Int. J. Mol. Sci., 2021.09.14, 22권, 논문번호 9944, 페이지 1-16 초록; 페이지 2-3; 도면 1	1-11
A	KR 10-2016-0062517 A (경북대학교병원 등) 2016.06.02 청구항 1-10	1-11
A	DE JONG, A. 등, 'P300/CBP Associated Factor (PCAF) Deficiency Enhances Diet-Induced Atherosclerosis in ApoE3*Leiden Mice via Systemic Inhibition of Regulatory T Cells', Front. Cardiovasc. Med., 2021.01.15, 7권, 논문번호 604821, 페이지 1-10 초록; 페이지 5-6	1-11
A	KR 10-2010-0024182 A (경북대학교 산학협력단) 2010.03.05 청구항 1-7	1-11
A	KR 10-2016-0087037 A (전남대학교 산학협력단) 2016.07.21 전체 문헌	1-11
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2022년12월08일(08.12.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년12월08일(08.12.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 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 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0062517 A	2016/06/02	WO 2016-085030 A1	2016/06/02
KR 10-2010-0024182 A	2010/03/05	KR 10-1040486 B1	2011/06/09
KR 10-2016-0087037 A	2016/07/21	없음	