

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 2월 15일 (15.02.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/035035 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/011582

(22) 국제출원일:

2023년 8월 7일 (07.08.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0098653 2022년 8월 8일 (08.08.2022) KR

(71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR

INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).

(72) 발명자: 이사민 (LEE, Sahmin); 06070 서울특별시 강남구 도산대로92길 10, 101동 1404호, Seoul (KR). 지은혜 (JI, Eunhye); 04990 서울특별시 광진구 능동로 28길 17, 201호, Seoul (KR).

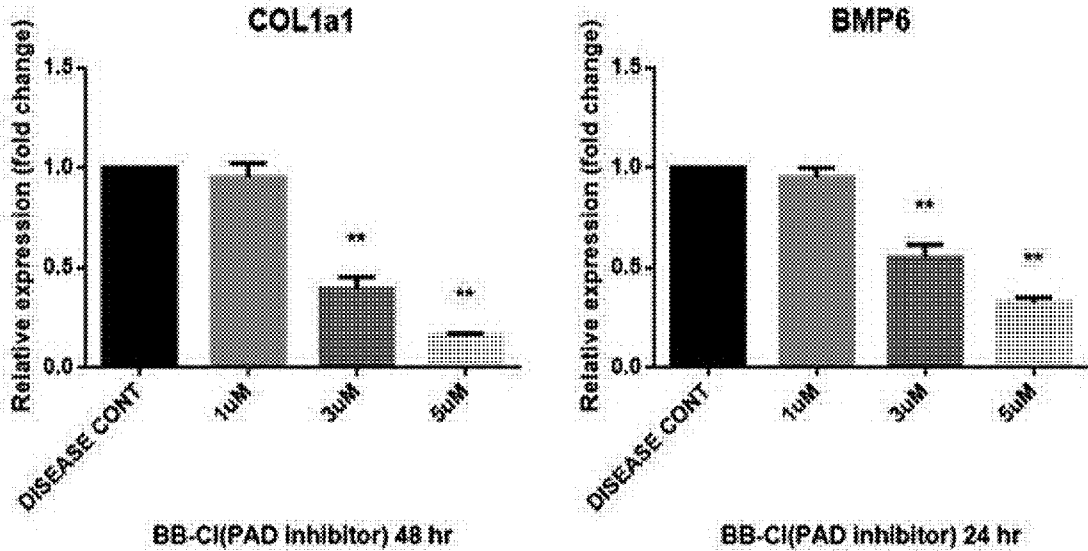
(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(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, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING DEGENERATIVE VALVULAR DISEASE COMPRISING PAD INHIBITOR

(54) 발명의 명칭: PAD 저해제를 포함하는 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 조성물

CALCIFICATION MARKER



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating a degenerative valvular disease such as aortic stenosis, and has been completed by confirming that, when protein-arginine deiminase (PAD) proteins are inhibited in valve cells derived from an aortic stenosis patient, calcification or osteogenic differentiation, fibrosis, inflammation, etc., are effectively inhibited. That is, according to the present invention, calcification or osteogenic differentiation, fibrosis, and inflammation of valve tissue, which are the major pathological mechanisms for degenerative valvular disease, are simultaneously inhibited, thus enabling the fundamental treatment or prevention of progress of degenerative valvular disease. Therefore, the present invention is expected to be available as a therapeutic agent for various diseases caused by degenerative deformation of valves.

[다음 쪽 계속]

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
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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,
ME, 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))

(57) 요약서: 본 발명은 대동맥판막 협착증을 비롯한 퇴행성 판막 질환의 예방 내지 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것으로서, 대동맥판막 환자 유래 판막세포에서 PAD (protein-arginine deiminase) 단백질을 억제하였을 때, 석회화 또는 골분화, 섬유화, 염증 등이 효과적으로 억제되는 것을 확인하여 완성된 것이다. 즉, 본 발명은 퇴행성 판막 질환의 주요 병리기전인 판막 조직의 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증을 동시에 억제하므로 퇴행성 판막 질환의 근본적인 치료 또는 진행의 예방이 가능한 바, 판막의 퇴행성 변형으로 유발되는 다양한 질환의 치료제로 활용 가능할 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: PAD 저해제를 포함하는 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 PAD 저해제를 포함하는 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2022년 08월 08일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0098653호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

배경기술

- [3] 최근 인구의 고령화가 급격히 진행되면서 판막의 퇴행성 변화(예컨대, 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및/또는 염증 등)에 의한 판막 질환이 증가하고 있다. 정상적으로 기능하던 판막에 구조적 이상이 발생하면 판막의 개폐 기능이 저하되므로, 혈액 순환이 원활히 일어나지 못하고 심장을 포함한 다양한 기관에 2차적인 기능 이상을 초래할 수 있다.
- [4] 퇴행성 판막 질환의 대표예인 대동맥판막 협착증 (Aortic stenosis, AS)은 주로 판막의 석회화로 인하여 대동맥판막의 직경이 좁아져 좌심실에서 대동맥으로 혈류가 충분히 나가지 못하는 질환으로, 고령화 인구 비율이 높아지는 현대 사회에서 흔히 발견되는 판막성 심장 질환이다. 대동맥판막 협착증은 기계적 스트레스 (mechanical stress)로 인한 내피세포의 손상에 따른 염증, 지질 침투 (lipid penetration)으로 인한 엽 (leaflet) 섬유화, 비후 (thickening), 및 석회화 (calcification) 등에 의해 발생하며, 특히 대동맥판막 석회화를 주된 병리기전으로 한다. 대동맥판막 협착증은 경도인 경우에는 무증상인 경우가 많고 따라서 무증상 기간 (subclinical period)이 길지만, 중증도 이상으로 진행되고 나면 전신으로 혈액이 순조롭게 나가지 못하므로 현기증, 흉통, 실신 등을 유발하며 치명적이다. 대동맥판막을 치료하지 않고 방치하는 경우 연간 사망률은 25%에 달하며, 평균 생존 기간은 2 내지 3년에 불과한 것으로 알려져 있다.
- [5] 대동맥판막 협착증을 근본적으로 개선해주는 약물은 아직까지 개발되지 않았으며, 따라서 대동맥판막 협착증의 치료는 대개 손상된 판막을 제거하고 인공판막을 삽입하는 인공판막 치환술로 이루어진다. 그러나 판막 치환을 위해서는 심장을 여는 개심술을 시행해야 하며, 특히 개심술을 받는 동안에는 심장을 정지시키고 심폐 기능을 대신하는 인공 심폐기를 사용하여야 하므로 환자에게 부담이 된다. 또한 기계 판막으로 치환하는 경우 혈액 응고를 막기 위해 항응고제를 평생 복용해야 하는 문제가 있다. 최근에는 수술 위험도가 높은 환자를 대상으로 비수술적 치료인 경피적 대동맥판막 삽입술을 시행하고 있으나, 인위적으로 제조한 조직 판막을 삽입하는 것으로서, 결국 대동맥판막 협착증의 근본적인 치료

는 여전히 불가능한 실정이다. 따라서, 대동맥판막 협착증의 발병 기전을 개선하여 상기 질환을 근본적으로 치료하거나 중증으로의 진행을 예방하기 위한 새로운 치료법의 발굴이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 단백질의 시트룰린화 (citrullination)에 관여하는 단백질인 PAD (protein-arginine deiminase)의 활성 혹은 발현을 억제하였을 때 대동맥판막의 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증 등이 효과적으로 억제되는 것을 확인하여 완성된 것이다.
- [7] 따라서, 본 발명의 목적은 PAD (protein-arginine deiminase) 저해제를 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 PAD (protein-arginine deiminase) 저해제를 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.
- [9]
- [10] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 PAD (protein-arginine deiminase) 저해제를 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 PAD 저해제 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 PAD 저해제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 PAD 저해제의 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 퇴행성 판막 질환 치료용 약제의 제조를 위한 PAD 저해제의 용도를 제공한다.
- [16] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 저해제는 PAD 단백질의 활성 억제제 또는 PAD 유전자의 발현 억제제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [17] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 활성 억제제는 PAD 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 펩티드, 펩티드모방체, 기질 유사체, 앵타머, 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 발현 억제제는 PAD 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 작

은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로RNA (miRNA), 및 RNA 간섭 (RNAi) 분자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [19] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 판막은 대동맥판막일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [21] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 퇴행성 판막 질환은 심장판막질환 (valvular heart disease), 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis), 대동맥판막 폐쇄부전증 (aortic insufficiency), 승모판막 협착증 (mitral stenosis), 및 승모판 기능부전 (mitral insufficiency)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [22] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:
- [23] (a) 판막 조직의 석회화 또는 골분화를 억제함;
- [24] (b) 판막 조직의 섬유화를 억제함; 및
- [25] (c) 판막 조직의 염증을 억제함.
- [26] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 MCP1, CTGF, COL1A1, COL3A1, α -SMA, RUNX2, 및 BMP6로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준이 증가된 환자의 퇴행성 판막 질환을 치료하기 위한 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

발명의 효과

- [27] 본 발명은 대동맥판막 협착증을 비롯한 퇴행성 판막 질환의 예방 내지 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것으로서, 대동맥판막 환자 유래 판막세포에서 PAD (protein-arginine deiminase) 단백질을 억제하였을 때, 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및/또는 염증 등이 효과적으로 억제되는 것을 확인하여 완성된 것이다. 즉, 본 발명은 퇴행성 판막 질환의 주요 병리기전인 판막 조직의 석회화 (또는 골분화), 섬유화, 및 염증을 동시에 억제하므로 퇴행성 판막 질환의 근본적인 치료가 가능한 바, 판막의 퇴행성 변형으로 유발되는 다양한 질환의 치료제로 활용 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1a 및 1b는 PAD2 타겟 siRNA에 의한 PAD 발현 억제 효과를 확인하기 위해, 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포에 상기 siRNA를 처리한 후 PAD2 단백질 수준을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 (도 1a) 및 이의 정량 결과 (도 1b)를 나타낸다.

- [29] 도 2a 및 2b는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포에 PAD 저해제를 다양한 농도로 처리한 후 석회화 또는 골분화 마커의 수준을 비교한 결과를 나타낸다 (DISEASE CONT: 미처리 대조군).
- [30] 도 3a 및 3b는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포에 PAD 저해제를 다양한 농도로 처리한 후 염증 마커의 수준을 비교한 결과를 나타낸다.
- [31] 도 4a 및 4b는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포에 PAD 저해제를 다양한 농도로 처리한 후 섬유화 마커의 수준을 비교한 결과를 나타낸다.

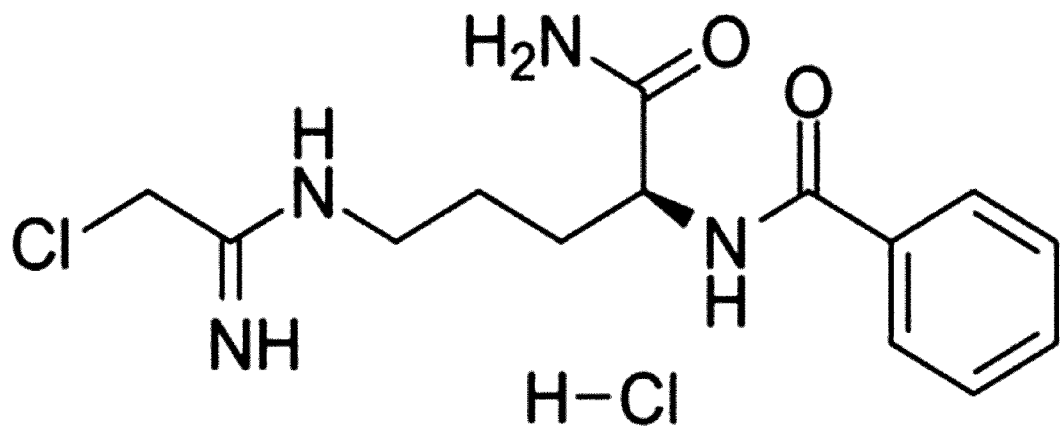
발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [32] 본 발명은 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 단백질 시트룰린화에 관여하는 단백질인 PAD (protein-arginine deiminase)의 발현 또는 활성을 억제하였을 때 퇴행성 판막 질환의 주요 병리기전인 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증 등이 현저하게 감소하는 것을 확인하여 완성된 것이다.
- [33] 따라서, 본 발명은 PAD (protein-arginine deiminase) 저해제를 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [34] 본 발명에 있어서, “PAD (protein-arginine deiminase)”은 단백질의 번역 후 변형 (post translational modification)인 아르기닌 탈이미네이션 (arginine deimination) 및 시트룰린화 (citrullination)를 촉매하는 가수분해효소를 지칭한다. PAD 단백질의 이상은 일부 자가면역질환이나 관절염 등과 연관이 있는 것으로 알려져 있으나, PAD 단백질과 판막 질환의 연관성에 대해서는 알려진 바가 없다. PAD 단백질은 PAD1, PAD2, PAD3, PAD4, 및 PAD6의 5가지 아이소자임 (isozymes)을 갖는다. 바람직하게는, 본 발명에 있어서 PAD는 PAD2를 지칭할 수 있다. PAD 단백질 또는 유전자에 대한 구체적인 정보는 Uniprot과 같은 공개 데이터베이스에서 확인할 수 있으며, 예컨대 등록번호 Q9ULC6 (PAD1), Q9Y2J8 (PAD2), Q9ULW8 (PAD3), Q9UM07 (PAD4), Q6TGC4 (PAD6) 등으로 확인할 수 있다.
- [35] 본 발명에 있어서, “PAD 저해제 (PAD inhibitors)”란 PAD 단백질의 활성을 억제하거나 혹은 PAD 유전자의 발현을 억제하는 물질을 지칭한다. 상기 PAD 저해제는 PAD 유전자, 이의 mRNA, 및/또는 PAD 단백질에 직접 작용하여 PAD 단백질의 수준 혹은 활성을 저해할 수도 있고, 다른 매개인자를 통해 간접적으로 PAD 유전자, 이의 mRNA, 및/또는 PAD 단백질에 작용함으로써 결과적으로 이들의 수준 혹은 활성을 저해하는 물질을 포함한다. 또한, 상술한 바와 같이 PAD 단백질은 단백질의 시트룰린화를 유도하는 효소인 바, 상기 PAD 저해제는 PAD의 활성 혹은 수준을 억제함으로써 단백질들의 시트룰린화를 감소시킬 수 있다. 즉, 본 발명의 PAD 저해제는 PAD 억제를 통해 결과적으로 시트룰린화 단백질들의 수준도 감소시킬 수 있으며, 이를 통해 퇴행성 판막 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료 효과를 달성하는 것일 수 있다. 실제로, 본 발명자들은 이전 연구에서 시트룰

린화 단백질 및 항-시트룰린화 펩티드 항체의 수준의 증가가 대동맥판막 협착증의 예후를 악화시킬 수 있음을 확인한 바 있다.

- [36] 본 발명에 있어서, “PAD 단백질의 활성화”는 번역과정을 통해 생산된 PAD 단백질을 혹은 이미 세포 내에 생산되어 존재하는 PAD 단백질의 활성을 의미한다. 본 발명에 있어서, PAD 단백질의 활성을 억제한다는 것은 PAD 단백질이 본래의 기능을 정상적으로 수행하지 못하도록 방해하는 것을 의미하며, 이는 PAD 단백질의 화학적 및/또는 구조적 변형을 일으키거나, PAD 단백질의 활성부위 (active site)를 차단함으로써 이루어질 수 있다. 또한, PAD 단백질의 활성 억제는 번역 후 변형 (post translational modification) 등의 과정을 거치거나 혹은 함께 상호작용하는 단백질들의 활성/불활성에 의해 PAD 단백질의 활성이 감소하는 것을 모두 포함한다.
- [37] 구체적으로, 본 발명에 있어서 PAD 단백질의 활성 억제제는 PAD 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 앵타머, 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [38] 바람직하게는, 본 발명에 있어서 PAD 단백질의 활성 억제제는 PAD 단백질의 활성부위에 결합하여 이의 기능을 차단하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있다. 예컨대, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 Cl-아미딘 (Cl-amidine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있다. 상기 Cl-아미딘은 PAD의 비가역적 억제제로, PAD의 활성부위를 변형시켜 이를 불활성화시킨다. Cl-아미딘은 PAD1, PAD2, PAD3, 및 PAD4를 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. Cl-아미딘은 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 가질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [39]
- [40] [화학식 1]

[41]



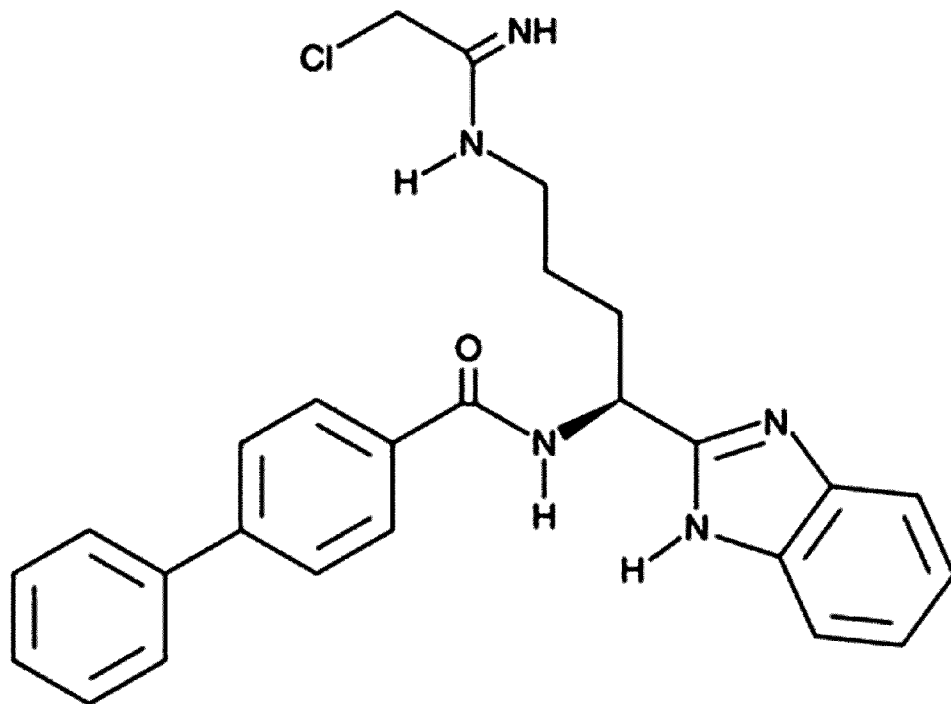
[42] 상기 Cl-아미딘은 다양한 변이체가 종류한다. 예컨대, BB-Cl 아미딘은 Cl-아미딘의 기능적 요소들을 유지하면서 C-말단 아미드의 단백질 분해를 제한하기 위해 C-말단이 벤즈이미다졸 그룹 (benzimidazole group)으로 대체되어 있는 Cl-아

미딘 변이체이다. 상기 BB-C1 아미딘은 하기 화학식 2로 표시되는 구조를 가질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[43]

[44] [화학식 2]

[45]



[46] 본 명세서에서 사용된 용어, “약학적으로 허용 가능한”이라는 용어는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점이나 합병증 없이 이득/위험 비가 합리

적이어서 대상체 (예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 건전한 의학적 판단의 범위 이내인 화합물 또는 조성물을 의미한다.

- [47] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [48] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [49] 본 발명의 화합물의 범위에는 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 이성질체, 수화물 및 용매화물이 모두 포함될 수 있다.
- [50] 본 발명에 있어서, PAD 유전자의 발현을 억제한다는 것은 최종적으로 PAD 단백질의 수준을 감소시키는 모든 현상을 포함하는 것으로서, PAD 코딩 유전자의 전사 단계에서 mRNA의 발현을 억제하거나, 또는 상기 mRNA의 번역 (translation)을 억제하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 본 발명에 있어서, mRNA의 발현 억제는 PAD 코딩 유전자의 상위 작용기전에서 PAD 유전자의 전사를 억제할 수 있는 작용기전이 활성화되거나, 반대로 PAD 유전자의 전사를 증가시킬 수 있는 상위 작용기전이 억제되는 것일 수 있고, 또한, PAD 유전자 프로모터 부위의 메틸화 (methylation), 또는 PAD 유전자 발현과 관련된 히스톤 단백질의 변형 (histone modification) 등 직간접적으로 PAD 발현을 감소시킬 수 있는 개념이 모두 본 발명에 포함된다. 본 발명에서 PAD mRNA의 번역 감소는 생산된 PAD mRNA의 번역을 감소시킬 수 있는 모든 기전들이 포함될 수 있으며, 예컨대 PAD mRNA의 번역을 촉진시키는 기타 단백질 혹은 핵산분자의 발현 또는 활성을 억제하거나, PAD mRNA의 번역 관련 효소들의 활성을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51] 구체적으로, 본 발명에 있어서 PAD 유전자의 발현 억제제는 PAD 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로RNA

(miRNA), 및 RNA 간섭 (RNAi) 분자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [52] 본 명세서에서 사용된 용어 “siRNA”는 센스 가닥 (예를 들어, PAD 유전자의 mRNA 서열에 상응하는 (corresponding) 서열)과 안티센스 가닥 (예를 들어, PAD 유전자의 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 자기-상보성 (self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치 (대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지 (일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 구체적으로는, 전체 길이는 10 내지 100 염기, 보다 구체적으로는 15 내지 80 염기, 그리고 보다 더 구체적으로는 20 내지 70 염기이다.
- [53] 본 발명에 있어서, PAD 유전자의 발현을 억제하는 siRNA, 즉, PAD 타겟 siRNA는 서열번호 1 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 예컨대, 상기 PAD 타겟 siRNA는 서열번호 1 내지 8 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 siRNA 단일 분자를 지칭할 수도 있고, 혹은 상기 siRNA 단일 분자들의 조합을 지칭할 수도 있다.
- [54] 본 발명에 있어서 특정 서열번호로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드는 해당 핵산 서열에만 제한되지 않으며, 상기 핵산 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 핵산 서열의 폴리뉴클레오티드 분자는 이를 구성하는 폴리뉴클레오티드 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자의 일부 염기 서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 해당 폴리뉴클레오티드와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체 (variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 본 발명에 개시된 폴리뉴클레오티드는 특정 서열번호로 표시되는 핵산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열(핵산 서열)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드에 대한 “서열 상동성의 %”는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [55] 바람직하게는, 본 발명에 따른 PAD 억제제는 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있다:
- [56] (a) 판막 조직의 석회화 또는 골분화를 억제함;
- [57] (b) 판막 조직의 섬유화를 억제함; 및

- [58] (c) 판막 조직의 염증을 억제함.
- [59] 상기 판막 조직은 바람직하게는 대동맥판막 조직일 수 있다. 또한, 상기 판막 세포는 바람직하게는 대동맥판막 간질세포일 수 있다.
- [60] 본 발명에 있어서, “퇴행성 판막 질환 (degenerative valve diseases)”은 판막의 퇴행성 변화로 인해 발생하는 모든 질환을 포함한다. 퇴행성 변화란 몸의 기관 등이 반복적으로 사용되거나 노화하여 그 기능이나 구조가 퇴화한 것을 의미한다. 즉, 퇴행성 판막 질환은 노화 등으로 인해 판막의 구조나 기능이 퇴화하는 것으로서, 선천적인 판막 이상이나 류마티스 열 등에 의한 심장 판막의 손상 (즉, 류마티스성 판막 질환), 세균감염에 의한 판막 손상 (예컨대 패혈증 혹은 패혈성 쇼크 등으로 유발되는 패혈성 판막 손상) 등과 구분되는 개념이다. 바람직하게는, 본 발명에 있어서 퇴행성 판막 질환은 특히 노화 등으로 인해 판막 조직에서 석회화 (calcification) 또는 골분화 (osteogenic differentiation), 섬유화 (fibrosis), 및 염증 (inflammation)이 축적되면서 유도되는 퇴행성 판막 질환을 의미할 수 있다.
- [61] 이와 같이, 본 발명에 따른 퇴행성 판막 질환은 판막의 석회화 또는 골세포화, 섬유화, 염증 등이 축적되면서 판막에 구조적, 기능적 이상이 발생하는 것으로서, 혈관 (blood vessels)의 섬유화, 석회화, 염증 등으로 인해 발생하는 질환 (예컨대, 죽상동맥경화증)과는 구별되어야 한다. 실제로, 퇴행성 판막 질환 및 죽상동맥경화증은 조직병리학적 특징 및 임상적 요인들이 일부 일치하기도 하지만, 명확한 차이가 존재하는 별개의 질환이다. 예를 들어, 죽상동맥경화증은 주로 평활근 세포의 이상과 관련이 있으나, 퇴행성 판막 질환은 분화된 섬유모세포 (differentiated fibroblasts)의 아형인 섬유모세포 (fibroblasts) 및 근섬유모세포 (myofibroblasts)의 이상과 연관이 있다. 또한, 죽상동맥경화증은 성별이나 당뇨와 같은 임상적 요인과의 관련이 높은 것으로 알려져 있으나, 퇴행성 판막 질환은 성별이나 당뇨 등과 관련성이 크지 않다 (Circulation. 2005;111:3316-3326).
- [62] 특히, 대동맥판막 협착증과 같은 퇴행성 판막 질환에 가장 크게 기여하는 인자는 판막 두께의 점진적인 증가 및 유출 폐색 (outflow obstruction)과 함께 일어나는 높은 수준의 석회화이다. 석회화는 대동맥판막 질환의 진행 초기부터 관찰되는 주요 병리기전이며, 따라서 퇴행성 판막 질환은 석회화 판막 질환 (calcific valve disease)으로 지칭되기도 한다. 반면, 죽상동맥경화증은 혈전증, 혈관 폐색 등과 관련된 플라크 (plaque)의 파열을 특징으로 하며, 급성으로 발생한다. 따라서, 죽상동맥경화증의 치료에서는 플라크의 안정화 및 항혈전 치료가 주로 사용되지만, 이와 같은 접근 방식은 석회화를 주요 원인으로 하는 판막 질환에는 큰 치료 효과를 기대할 수 없다.
- [63] 대동맥판막은 좌심실 출구 (outlet)의 섬유성 고리 (fibrous ring)에 부착된 3개의 콜라겐성 소엽 (collagenous leaflets)으로 이루어져 있으며, 3개 층 모두 판막간질세포 (valve interstitial cells)로 이루어지고, 전체적으로는 판막내피세포 (valve endothelial cells)로 덮여있다. 반면, 대동맥과 같은 혈관의 경우 평활근 세포를 주요 세포로 한다. 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 대동맥판막 협착증 환자

로부터 분리된 판막간질세포에서의 PAD 저해제의 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증 억제 효과를 확인하였다. 즉, 상기 결과는 PAD 저해제가 퇴행성 판막 질환의 대표적인 병리기전들을 억제하여 퇴행성 판막 질환을 치료할 수 있음을 보여주는 것이다.

- [64] 본 발명에 있어 상기 “판막 (cardiac valve)”은, 바람직하게는 대동맥판막이다. 판막은 심장 내에 위치하여 피가 역류하는 것을 막고, 일정하게 흘러갈 수 있도록 도와주는 역할을 하는 막으로서, 삼첨판막, 승모판막, 폐동맥판막, 및 대동맥판막으로 구성된다. 이 중 대동맥판막은 좌심실과 대동맥 사이에 위치하는 판막으로 3개의 첨판으로 이루어져 있으며, 삼첨판막 혹은 승모판막과 달리 인대나 유두근을 포함하지 않는다. 대동맥판막은 좌심실에서 대동맥으로 흐르는 혈액의 역류를 막는 역할을 한다. 따라서, 대동맥판막의 퇴행성 변화가 발생하는 경우, 대동맥판막이 기능을 정상적으로 수행하지 못해 대동맥의 혈액이 좌심실로 역류할 수 있다.
- [65] 본 발명에 따른 퇴행성 판막 질환에는 판막의 퇴행성 변화로 인해 유도되는 임상증상 내지 질환이라면 제한 없이 포함되고, 구체적인 종류로 제한되는 것은 아니나, 심장판막질환 (valvular heart disease), 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis), 대동맥판막 폐쇄부전증 (aortic insufficiency), 승모판막 협착증 (mitral stenosis), 및 승모판 기능부전 (mitral insufficiency) 등으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 퇴행성 판막 질환은 특히 판막 조직의 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및/또는 염증 등을 억제함으로써 개선 내지 치료되는 것일 수 있다.
- [66] 또한, 본 발명에 따른 퇴행성 판막 질환은 특히 MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), CTGF (connective Tissue Growth Factor), COL1A1 (collagen type I alpha 1 chain), COL3A1 (collagen type III alpha 1 chain), α -SMA (α -smooth muscle actin), RUNX2 (runt-related transcription factor 2), 및 BMP6 (bone morphogenetic protein 6)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준이 증가된 환자의 퇴행성 판막 질환을 의미할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 PAD 억제제는 특히 판막 조직의 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및/또는 염증 등의 억제 효과가 우수하므로, MCP1, CTGF, COL1A1, COL3A1, α -SMA, RUNX2, 및 BMP6로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준이 증가된 환자의 퇴행성 판막 질환에 대해 특히 우수한 치료 효과를 보일 수 있다.
- [67] 본 발명에 있어서, 퇴행성 판막 질환은, 바람직하게는 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis)은 대동맥판막이 좌심실이 수축할 때 잘 열리지 않는 질환을 의미한다. 대동맥판막 협착증 환자는 좌심실에서 대동맥으로 혈류가 충분히 나가지 못하므로 흉통, 실신, 호흡 곤란 등을 겪는다. 대동맥판막 협착증의 주요 원인으로 노화, 판막 석회화 (퇴행), 류마티스, 선천적/구조적 이상, 및 감염성 심내막염 등이 있으나, 본 발명에 있어서 대동맥판막 협착증은 바람직하게는 퇴행성 (degenerative) 대동맥판막 협착증이다. 대동맥판막 협착증은 전신의 혈류의 장애를 유발하므로 이로 인해 심장의 수축력이 과하게 증가하면서 심비대로 이어질

수 있으며, 과도한 심장 수축이 지속되면 오히려 심장 근육의 수축력이 저하되어 심부전 증세가 나타날 수 있다.

- [68] 본 발명의 조성물 내의 상기 PAD 억제제의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [69] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [70] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [71] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [72] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [73] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수 전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타

치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무 (Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 젤화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골 (Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

- [74] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스로류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [75] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [76] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [77] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [78] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민,

디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스 (N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비설파이드 0.1%, 소듐 포름알데히드 설펍실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비설파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[79] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[80] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[81] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[82] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배

출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[83] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[84] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[85] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[86] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[87] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[88] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[89] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 PAD 억제제를 포함하는 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[90] 본 발명에 있어서, “키트(kit)”는 구체적인 형태나 종류에 제한이 없으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형태의 키트를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 키트는 상기 PAD 억제제 외에도 상기 PAD 억제제의 보관 용액, 투여 도구, 투여용 현탁액 등을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 PAD 억제제의 특성 등에 관한 지시서를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[91] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 또는 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[92]

[93] [실시예]

[94] 실시예 1. PAD 저해제의 사용

[95] PAD 저해제의 판막퇴행성 질환 치료 효과를 확인하기 위해, PAD 저해제의 대표예로서 BB-Cl amidine (BB-Cl) 및 PAD2 siRNA를 사용하였다. PAD2 siRNA의 서열은 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

[96]

[97] [표1]

명칭		서열	서열번호
PAD2 siRNA_1	Sense	GACGTATCTTGAAGTCCATT	1
	Antisense	TGGCAGTTCA AGATACGTCTA	2
PAD2 siRNA_2	Sense	CGTTCTTCGGCCAACGCTATT	3
	Antisense	TAGCGTTGGCC GAAGAACGGG	4
PAD2 siRNA_3	Sense	CGGCGTTGGG CTCTGCAAATT	5
	Antisense	TTTGCAGAGCC CAACGCCGTG	6
PAD2 siRNA_4	Sense	AGGTCACCGT CAACTACTATT	7
	Antisense	TAGTAGTTGAC GGTGACCTTG	8

[98]

[99] 상기 PAD2 siRNA의 PAD 발현 억제 효과를 확인하기 위해 대동맥판막 협착증 환자의 판막 조직으로부터 분리된 세포에 상기 PAD2 siRNA (PAD2 siRNA_2 또는 PAD2 siRNA_3)를 처리한 후 PAD2 단백질에 대한 웨스턴 블롯을 수행하였다. 도 1a 및 1b에 나타낸 바와 같이, 상기 siRNA에 의해 PAD2의 단백질 발현이 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[100]

[101] 실시예 2. 인간 대동맥판막 조직의 확보

[102] 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis, AS)이 있는 환자의 대동맥판막 조직은 대동맥판막 교체술이 이루어질 때 수득하였다. 본 발명의 실시예는 헬싱키 선언 (Declaration of Helsinki)을 준수하였으며, 서울아산병원 임상연구심의위원회 (Institutional Review Board, IRB)가 인체 시료 수득을 위한 연구 프로토콜을 승인하였고, 모든 환자로부터 서면 동의를 얻었다.

[103]

[104] 실시예 3. 일차 대동맥판막 간질세포 (primary aortic valve interstitial cells)의 분리

[105] 실시예 2에서 확보된 인간 대동맥판막의 한 개 엽 (leaflet)을 4 내지 5 조각으로 절단한 후 콜라겐분해효소 (collagenase)와 37°C에서 30분간 반응시켜 대동맥판막 내피세포 (endothelial cells)를 제거하였다. 이어서, 조직을 더 작은 조각으로 세절하여 37°C에서 1.5시간 동안 추가 반응시켜 대동맥판막 간질세포 (aortic valve interstitial cells, AVICs)를 수득하였다. 단리된 인간 AVIC은 1% 항세균-항진균제 및 10% FBS가 함유된 DMEM/F12에서 배양하였다. 패시지 (passages)가 2 내지 5인 세포만을 웨스턴 블롯 등의 실험에 사용하였다.

[106]

[107] 실시예 4. 세포내 siRNA 도입

[108] 실시예 3에서 수득하여 배양한 대동맥판막 간질세포를 실험 전 1시간 동안 혈청과 항생제가 없는 배지에 노출시키고, 이 후 Lipofectamin 3000과 siRNA의 complex를 세포에 처치하였다. 6시간 후 항생제 없이 혈청만 포함되어 있는 배지로 교체하였고, 24시간 후 항생제와 혈청이 모두 포함되어 있는 배지로 교체하여 추가로 24시간 배양 후 다음 실험에 사용하였다.

[109]

[110] 실시예 5. 웨스턴 블롯 (Western blot)

[111] 수득한 대동맥판막 간질세포를 단백질분해효소 억제제와 혼합한 1X RIPA 용액으로 균질화 (homogenization)한 후, 용해물을 SDS-PAGE 젤에 로딩 (loading)하였다. 분리된 단백질은 PVDF 막에 트랜스퍼 (transfer) 하였으며, 이어서 PVDF 막을 상온에서 5% BSA로 1시간 동안 블로킹하였다. 이어서 PAD2 단백질 항체 (proteintech, 12110-1-AP, 1:1000 비율 희석) 및 HRP-결합 항-토끼 IgG 항체를 사용하여 검출하였다.

[112]

[113] 실시예 6. 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse transcription PCR) 및 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real time PCR)

[114] 수득하여 배양한 대동맥판막 간질세포를 TRIzol 용액으로 균질화한 후, 용해물에서 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA와 random hexamer, dNTP, RNase inhibitor, 역전사 중합효소 (Reverse transcriptase)를 혼합하고 37°C에서 1시간 반응시켜 AVICs cDNA를 제작하였다. 만들어진 cDNA를 주형으로 석회화 마커

(BMP6, Runx2, COL1a1), 염증 마커 (MCP1, IL6), 섬유화 마커 (CTGF, α -SMA, COL3a1) 유전자들의 primer로 PCR을 수행하였으며 이 때, 형광 값으로 발현양을 측정할 수 있는 SYBR을 사용하여 각 유전자들의 발현양의 변화를 측정하였다.

[115]

[116] [실험예]

[117] 실험예 1. PAD 저해제의 석회화 억제 효과 확인

[118] 석회화 (calcification)는 칼슘이 침착되는 상태를 의미하는데, 대동맥판막에 칼슘이 침착되면 판막이 두꺼워지고 딱딱해지면서 대동맥판막 협착증이 유발된다. 이에, PAD 저해제 처리에 따른 석회화 마커 수준의 변화를 측정하여 PAD 저해제가 대동맥판막 협착증의 대표적 병리기전인 석회화를 개선할 수 있는지 확인하였다. 이를 위하여 PAD 저해제로 화합물 BB-Cl, 및 siRNA를 각각 처리하여 실험을 수행하였다.

[119]

[120] 먼저, 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포에 PAD 저해제 중 화합물인 BB-Cl을 1 μ M, 3 μ M, 또는 5 μ M 농도로 처리하고, 24시간 또는 48시간 후에 석회화 마커들의 발현 수준을 확인하였다.

[121] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 미처리 대조군에 비해 BB-Cl을 처리한 그룹에서 BMP6 및 COL1A1의 수준이 감소하였으며, 특히 PAD 저해제가 3 μ M 이상의 농도로 처리된 그룹은 대조군에 비해 석회화 마커 수준이 절반 이하의 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 PAD 저해제가 판막 조직의 석회화를 개선할 수 있음을 보여준다.

[122]

[123] 또한, 동일한 판막간질세포에 PAD 타겟 siRNA를 48시간 동안 처리한 후 판막 석회화 마커 RUNX2 및 COL1A1의 발현 수준을 확인하였다.

[124] 그 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이, 미처리 대조군 대비 PAD 억제제가 처리된 그룹에서 석회화 마커들의 발현이 유의하게 감소하는 것으로 확인되었다.

[125]

[126] 상기 결과는 앞선 결과와 마찬가지로 PAD 저해제가 대동맥판막에서 판막 질환의 대표적 병리기전인 석회화를 효과적으로 억제할 수 있으며, 이를 통해 다양한 판막 질환을 개선할 수 있음을 보여준다. 또한, 석회화는 대동맥판막 조직을 구성하고 있는 세포층이 골세포화 되는 과정인 골분화 (osteogenic differentiation) 등에 의해 유도될 수 있다. 따라서, 상기 결과는 본 발명의 PAD 저해제가 골분화 억제 효과도 발휘할 수 있음을 시사한다.

[127]

[128] 실험예 2. PAD 저해제의 염증 억제 효과 확인

[129] 대동맥판막 협착증은 조직의 섬유화, 석회화, 및 염증이 복합적으로 축적되어 발생한다. 이에, 본 발명의 PAD 저해제가 대동맥판막 조직에서 항염 효과를 발휘하는지 확인하기 위해, 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막 조직 세포

에 본 발명의 PAD 저해제를 처리한 후 염증 인자의 수준에 변화가 있는지 확인하였다. 이 때, PAD 저해제로 화합물 BB-Cl, 및 siRNA를 각각 처리하여 실험을 수행하였다.

[130]

[131] 먼저, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 미처리 대조군에 비해 PAD 저해제 화합물 BB-Cl를 처리한 그룹에서 염증 마커인 MCP1의 수준이 확연히 감소하였으며, PAD 저해제가 3 μ M 이상의 농도로 처리된 그룹은 대조군에 비해 염증 마커 수준이 절반 이상 감소한 것으로 나타났다. 즉, 상기 결과는 본 발명의 PAD 억제제가 항염 효과가 있음을 의미한다. 나아가, MCP1은 면역세포를 유도하는 케모카인으로, 면역세포의 조직 침윤을 유도하는 기능을 수행한다. 따라서, PAD 억제제에 의한 MCP1 억제 효과는 상기 PAD 억제제가 면역세포의 조직 침윤 또한 감소시킬 수 있음을 시사한다.

[132]

[133] 또한, 실시예 1에 제시된 PAD2 siRNA를 처리한 그룹에서도 미처리 대조군 대비 염증 마커 (MCP1 및 IL-6)의 수준이 유의하게 감소하였다 (도 3b). 상기 결과는 PAD 저해제가 대동맥판막 조직의 염증을 억제하여 대동맥판막 협착증을 포함한 판막퇴행성 질환을 개선 내지 치료할 수 있음을 시사한다.

[134]

[135] **실험예 3. PAD 저해제의 섬유화 억제 효과 확인**

[136] 섬유화 (fibrosis)는 대동맥판막 협착증의 대표적인 증상 중 하나로, 장기 내 섬유질 결합조직이 과도하게 형성되면서 장기의 일부가 단단하게 굳는 현상을 지칭한다. 대동맥판막협착증 환자 중 심장 근육 섬유화를 가진 환자는 예후가 더욱 안 좋은 것으로 알려져 있다. 따라서, PAD 억제제가 판막조직 세포의 섬유화를 억제할 수 있는지 확인하였다. 이 때, PAD 저해제로 화합물 BB-Cl, 및 siRNA를 각각 처리하여 실험을 수행하였다.

[137]

[138] 구체적으로, 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막세포에 1 μ M, 3 μ M, 또는 5 μ M의 PAD 저해제 화합물 BB-Cl을 24시간 또는 72시간 동안 처리한 후, 판막 섬유화 마커인 CTGF, COL3A1, α -SMA의 발현 수준을 확인하였다.

[139] 그 결과, 본 발명의 PAD 저해제가 처리된 판막조직 판막세포는 미처리 대조군에 비해 섬유화 마커들의 수준이 모두 감소하였으며, 이와 같은 경향은 PAD 저해제의 처리 농도에 의존적이었다 (도 4a). 특히, PAD 저해제를 5 μ M의 농도로 처리한 그룹은 모든 섬유화 마커의 수준이 10 % 이하의 수준으로 감소한 것으로 나타났다.

[140]

[141] 또한, PAD2 타겟 siRNA를 처리한 후 섬유화 마커의 수준을 확인하였다. 그 결과, 앞선 결과와 마찬가지로, 미처리 대조군에 비해 PAD2 타겟 siRNA를 처리한 그룹에서 섬유화 마커인 CTGF 및 α -SMA의 수준이 유의하게 감소하였다 (도

4b). 상기 결과들은 PAD 저해제가 PAD 억제를 통해 판막의 석회화 또는 골분화 뿐만 아니라 섬유화도 효과적으로 억제하여 대동맥판막 협착증의 증상 및 예후를 개선할 수 있음을 보여준다.

[142]

[143] 대동맥판막 협착증은 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증을 주요 임상증상으로 하는 질환으로서, 이를 치료하기 위해서는 대동맥판막조직의 석회화, 섬유화, 및 염증을 모두 개선할 수 있어야 한다. 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해, PAD 억제제가 그 종류의 관계없이 PAD의 발현 또는 활성을 억제함으로써 대동맥판막 협착증 환자 유래 세포에서 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증을 억제할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 PAD 억제제는 대동맥판막 조직에서 주요 병리기전인 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증을 억제함으로써 대동맥판막 협착증을 비롯한 다양한 퇴행성 판막 질환의 치료제, 예후 개선용 제제로 활용될 것으로 기대된다.

[144]

[145] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

산업상 이용가능성

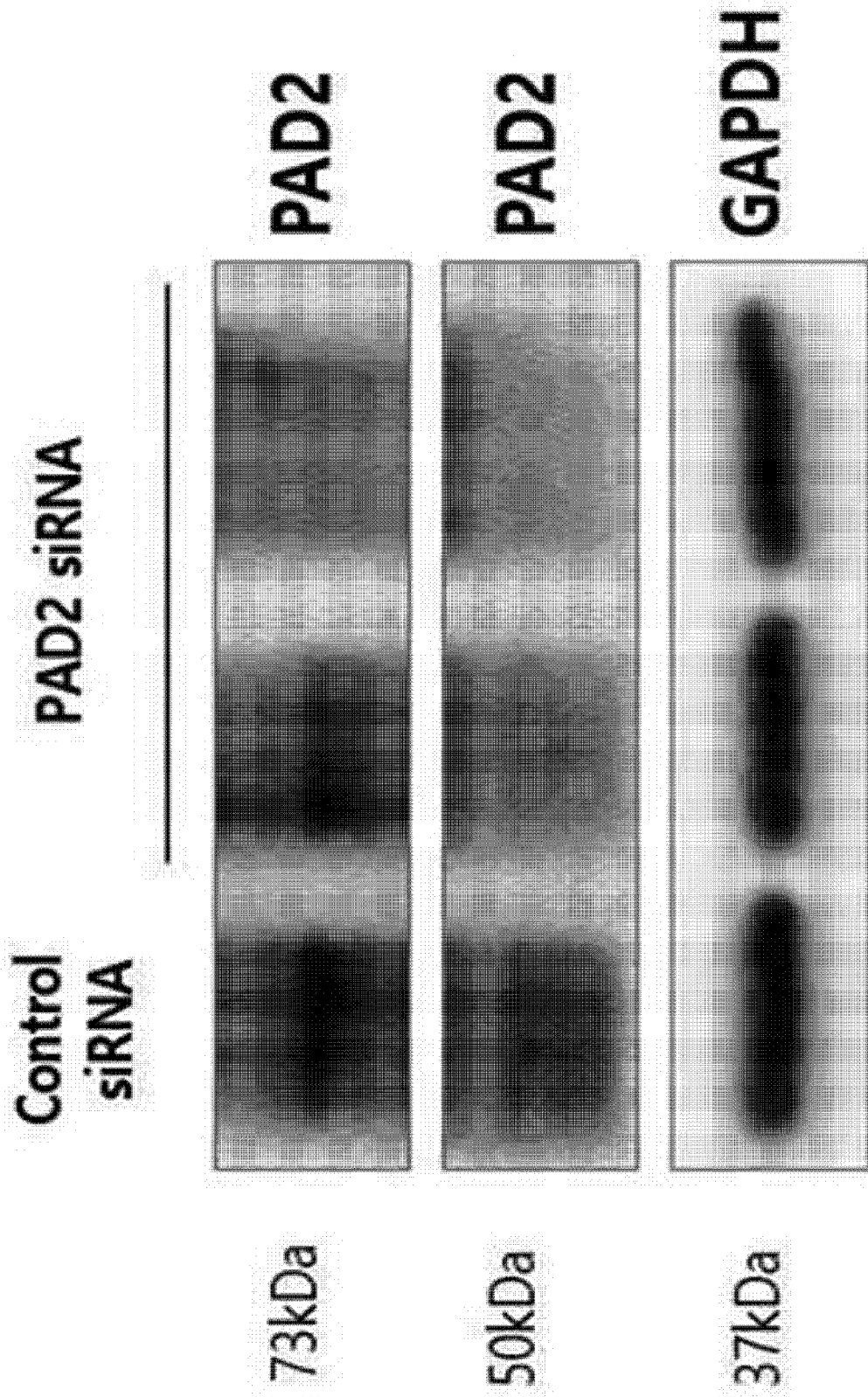
[146] 본 발명은 대동맥판막 협착증을 비롯한 퇴행성 판막 질환의 예방 내지 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것으로서, 대동맥판막 환자 유래 판막세포에서 PAD (protein-arginine deiminase) 단백질을 억제하였을 때 석회화 또는 골분화, 섬유화, 염증 등이 효과적으로 억제되는 것을 확인하여 완성된 것이다. 즉, 본 발명은 퇴행성 판막 질환의 주요 병리기전인 판막 조직의 석회화 또는 골분화, 섬유화, 및 염증을 동시에 억제하므로 퇴행성 판막 질환의 근본적인 치료 또는 진행의 예방이 가능하면서도 예후를 개선할 수 있는 바, 판막의 퇴행성 변형으로 유발되는 다양한 질환의 치료제로 활용 가능할 것으로 기대된다.

청구범위

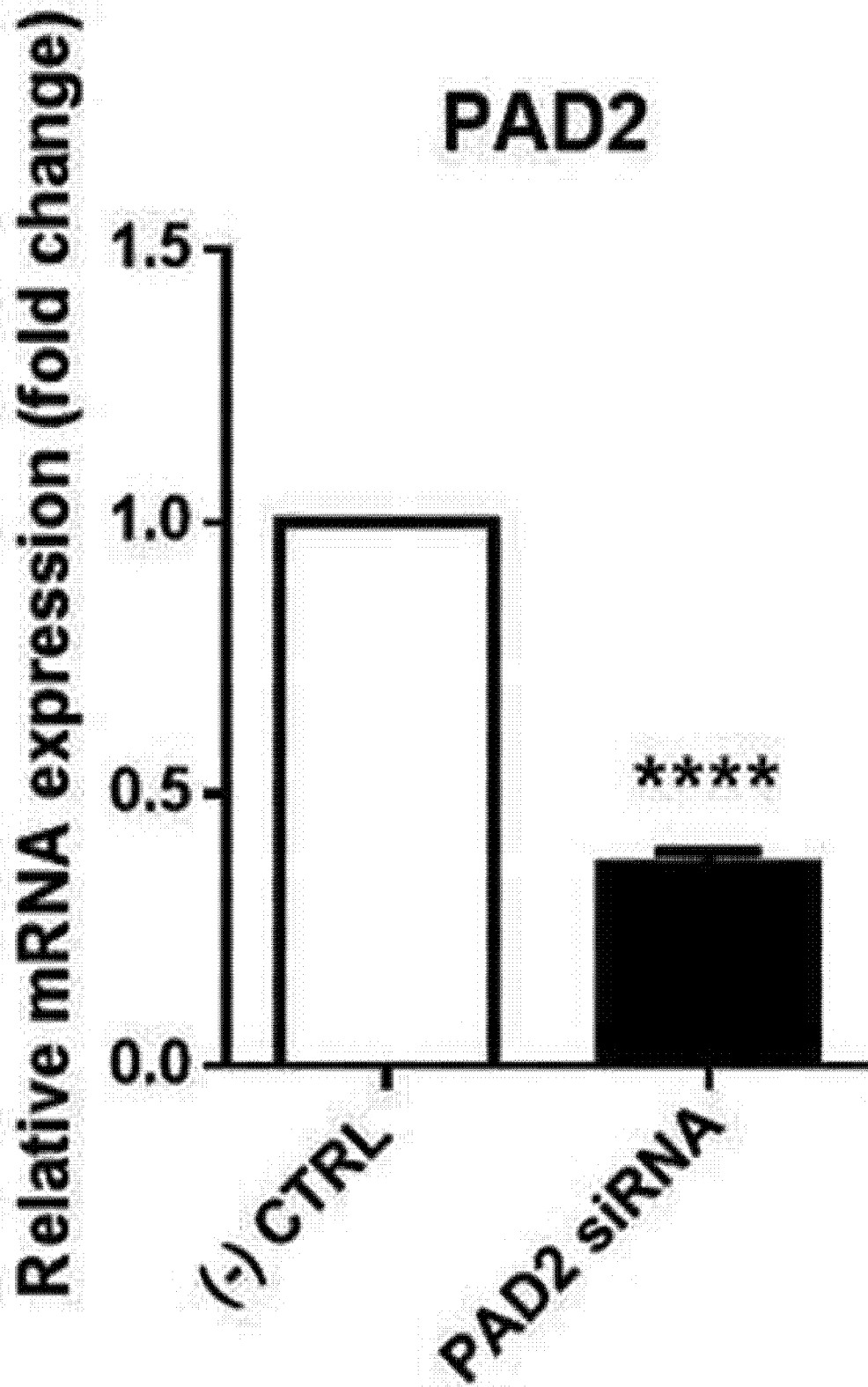
- [청구항 1] PAD (protein-arginine deiminase) 저해제를 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 저해제는 PAD 단백질의 활성 억제제 또는 PAD 유전자의 발현 억제제인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 활성 억제제는 PAD 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 앵타머, 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 발현 억제제는 PAD 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로RNA (miRNA), 및 RNA 간섭 (RNAi) 분자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 siRNA는 서열번호 1 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염기 서열을 포함하는 것인, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 판막은 대동맥판막인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 퇴행성 판막 질환은 심장판막질환 (valvular heart disease), 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis), 대동맥판막 폐쇄부전증 (aortic insufficiency), 승모판막 협착증 (mitral stenosis), 및 승모판 기능부전 (mitral insufficiency)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족하는 것인, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
(a) 판막 조직의 석회화 또는 골분화를 억제함;
(b) 판막 조직의 섬유화를 억제함; 및
(c) 판막 조직의 염증을 억제함.

- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 MCP1, CTGF, COL1A1, COL3A1, α -SMA, RUNX2, 및 BMP6로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준이 증가된 환자의 퇴행성 판막 질환을 치료하기 위한 것인, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료용 키트.
- [청구항 11] PAD (protein-arginine deiminase) 저해제를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 12] PAD (protein-arginine deiminase) 저해제의 퇴행성 판막 질환의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 13] 퇴행성 판막 질환 치료용 약제의 제조를 위한 PAD (protein-arginine deiminase) 저해제의 용도.

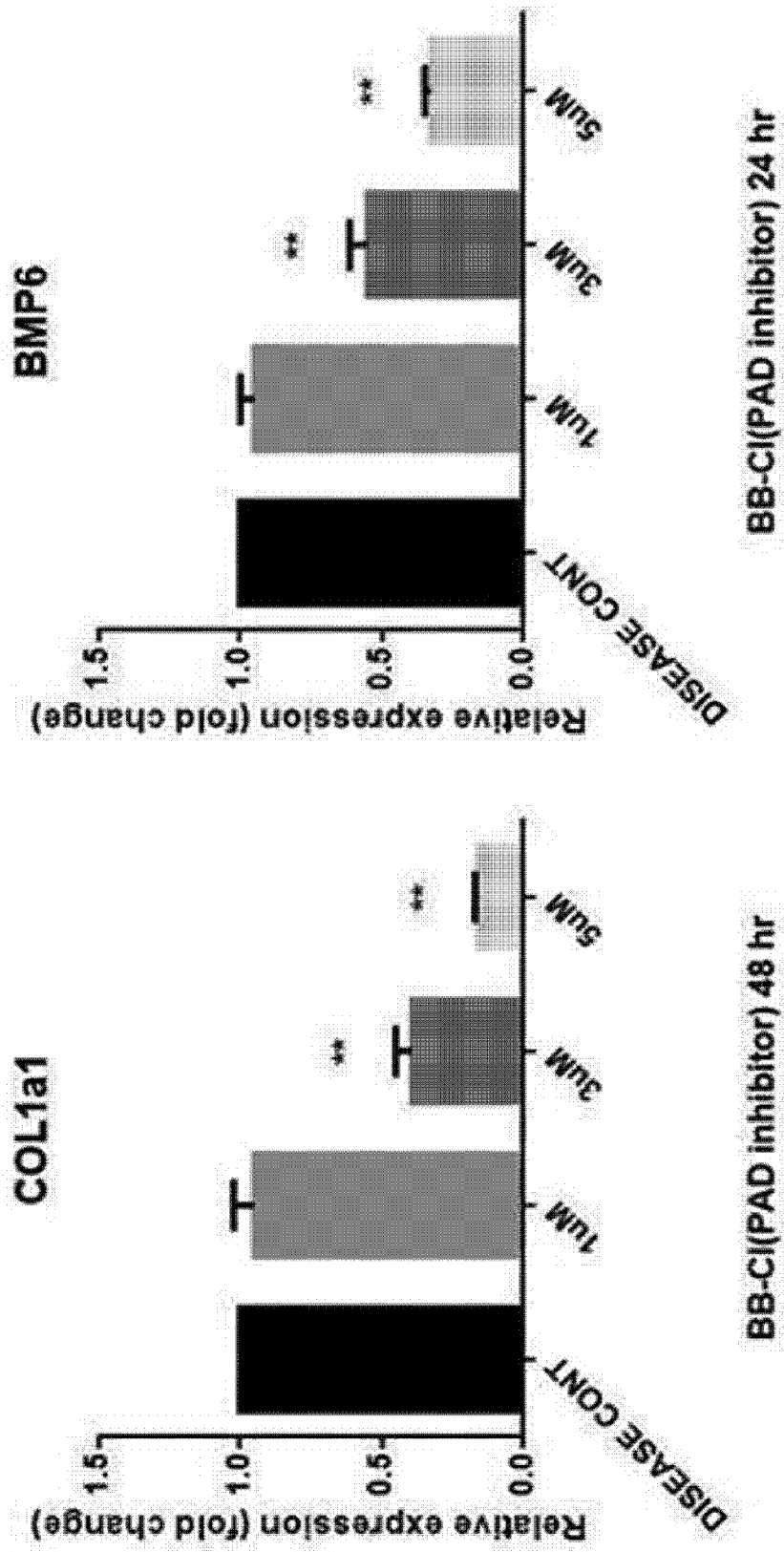
[도 1a]



[도 1b]

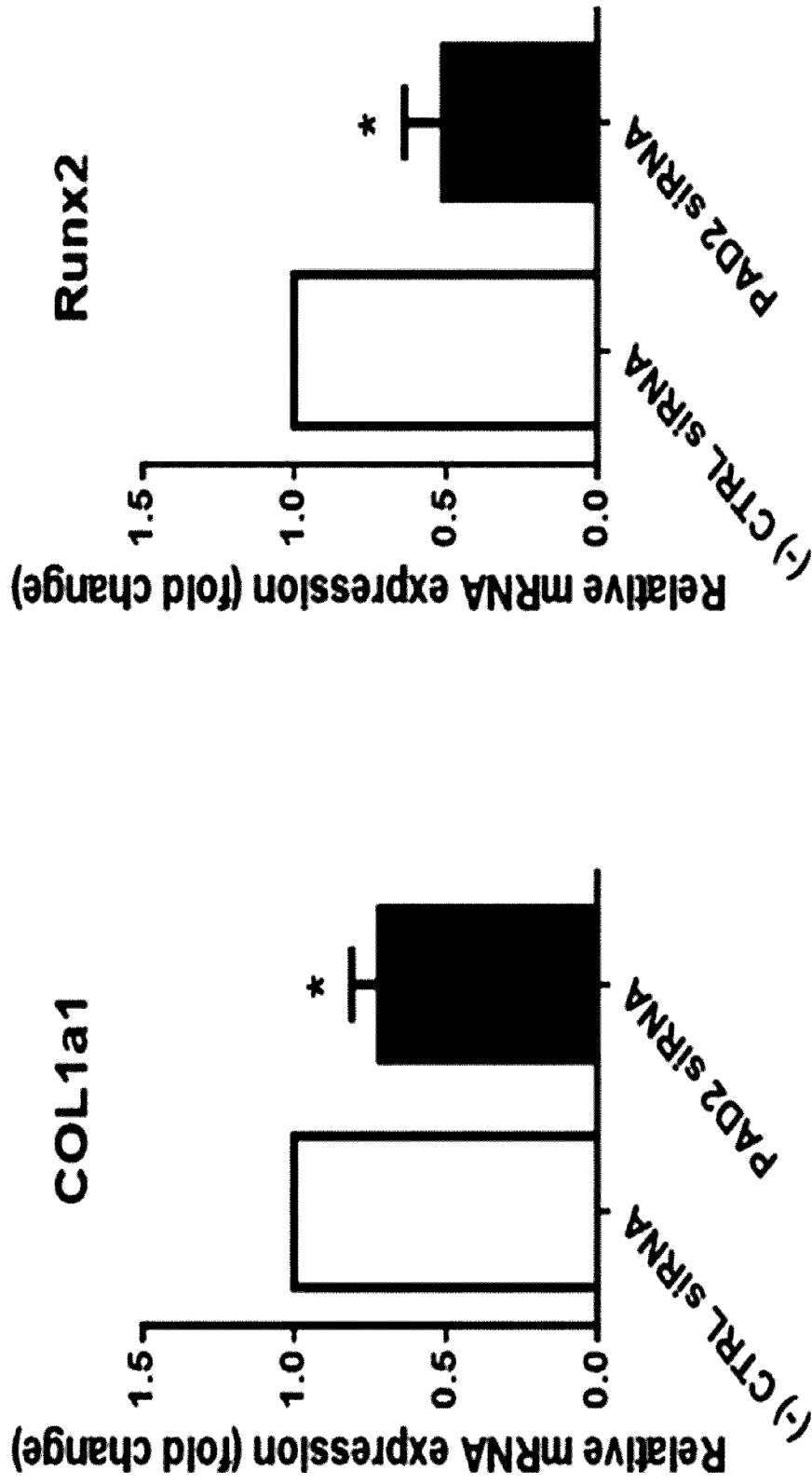


[도2a]

CALCIFICATION MARKER

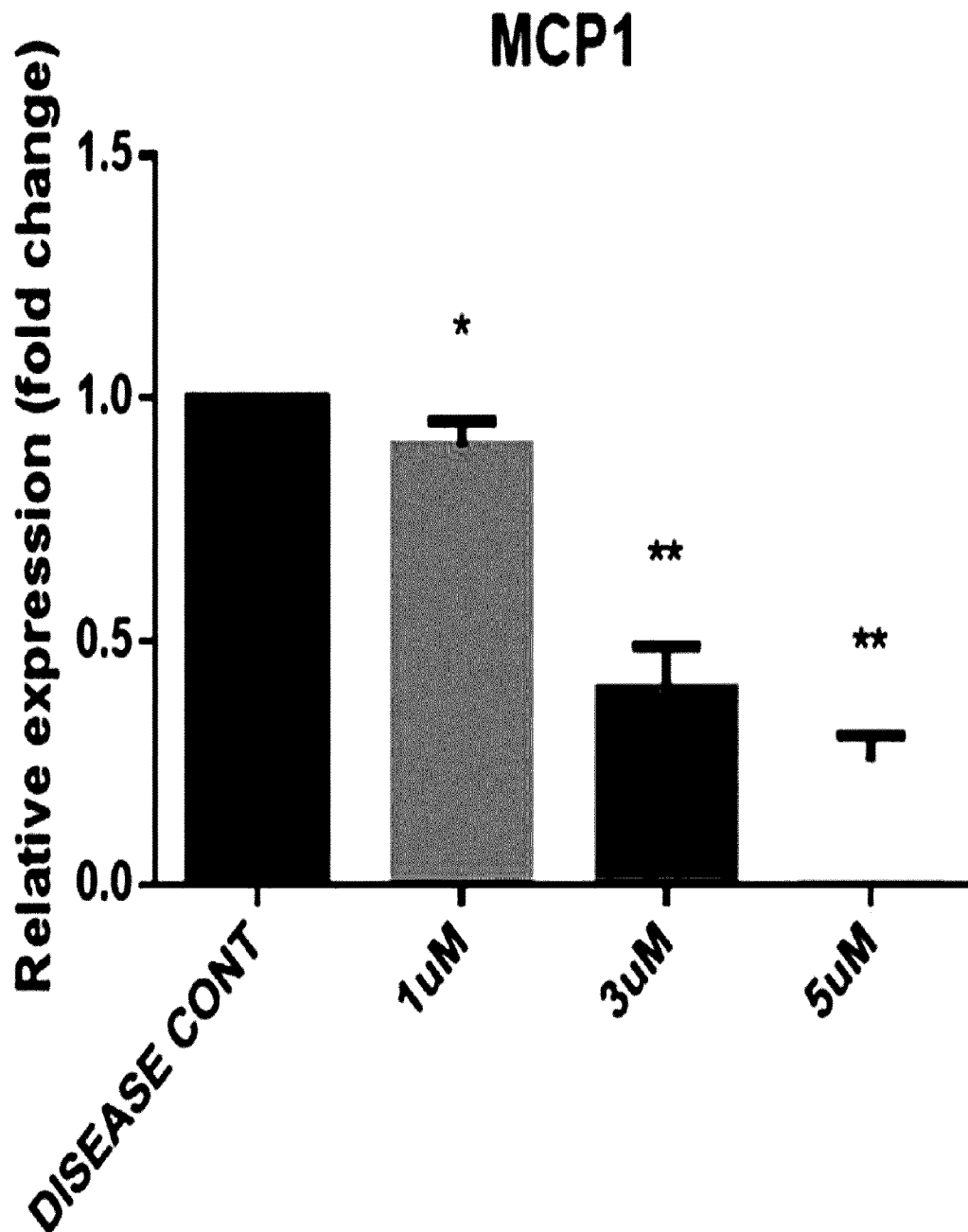
[도2b]

CALCIFICATION MARKER



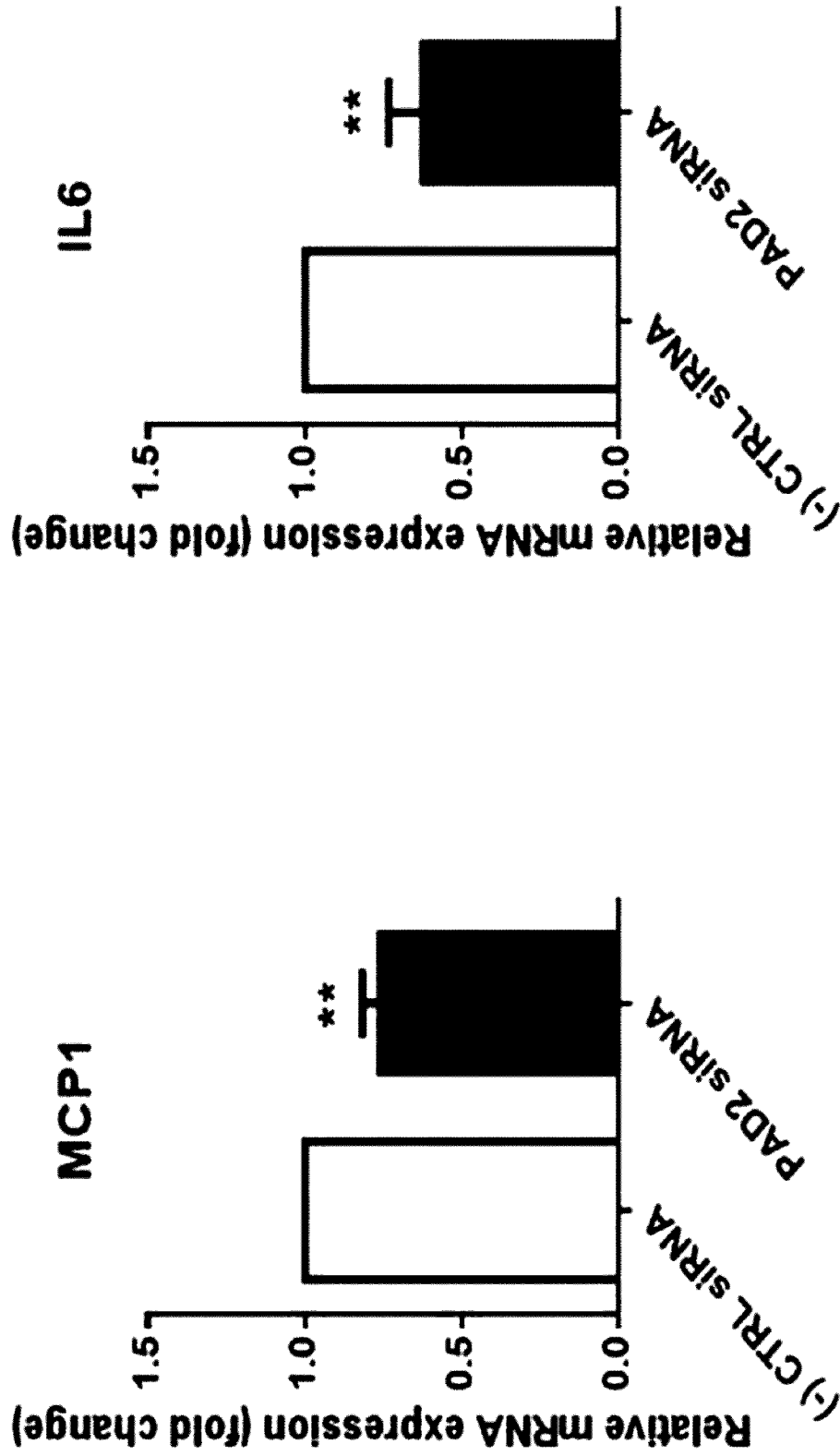
[도3a]

INFLAMMATION MARKER



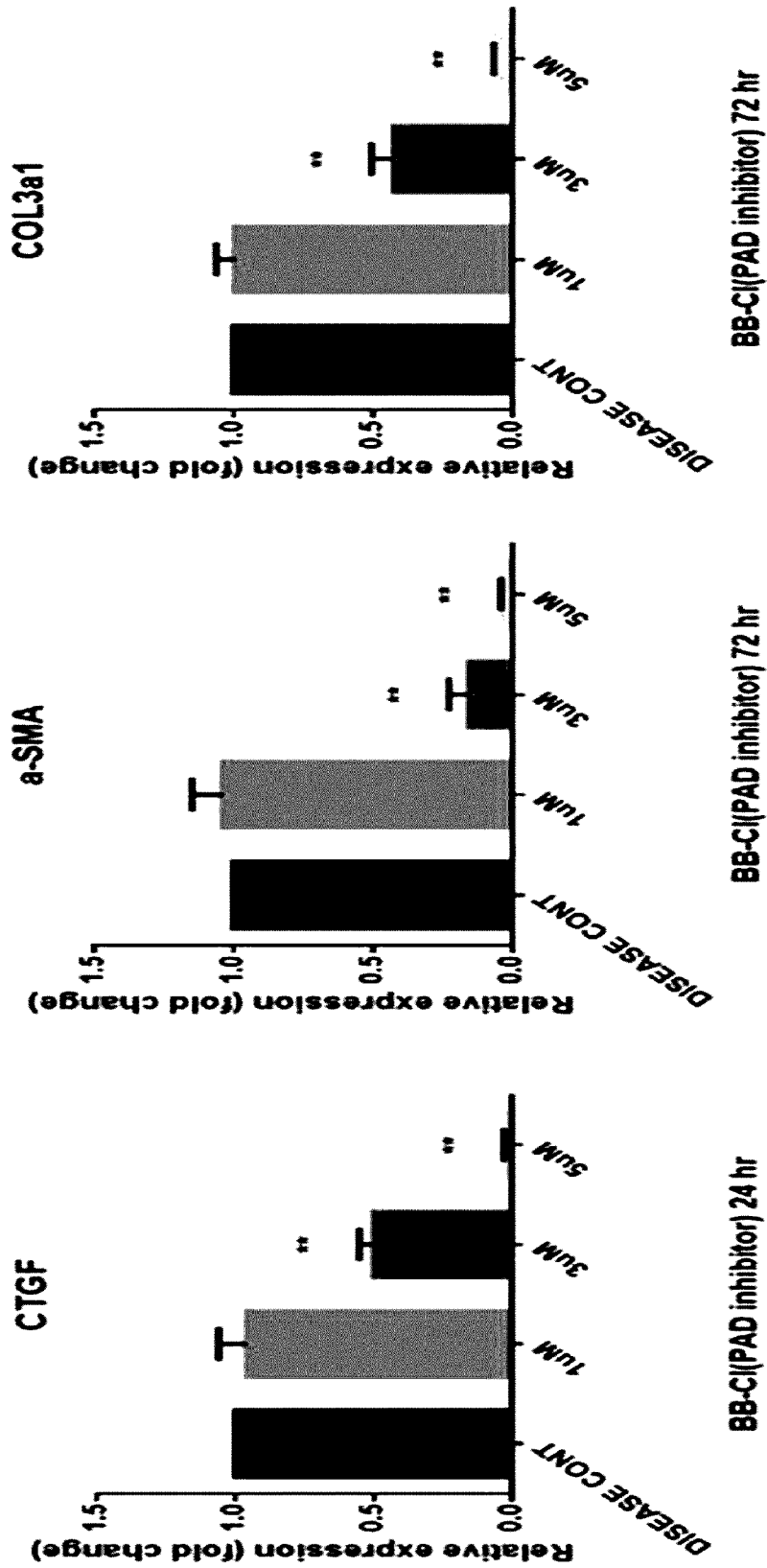
BB-CI(PAD inhibitor) 48 hr

[도3b]

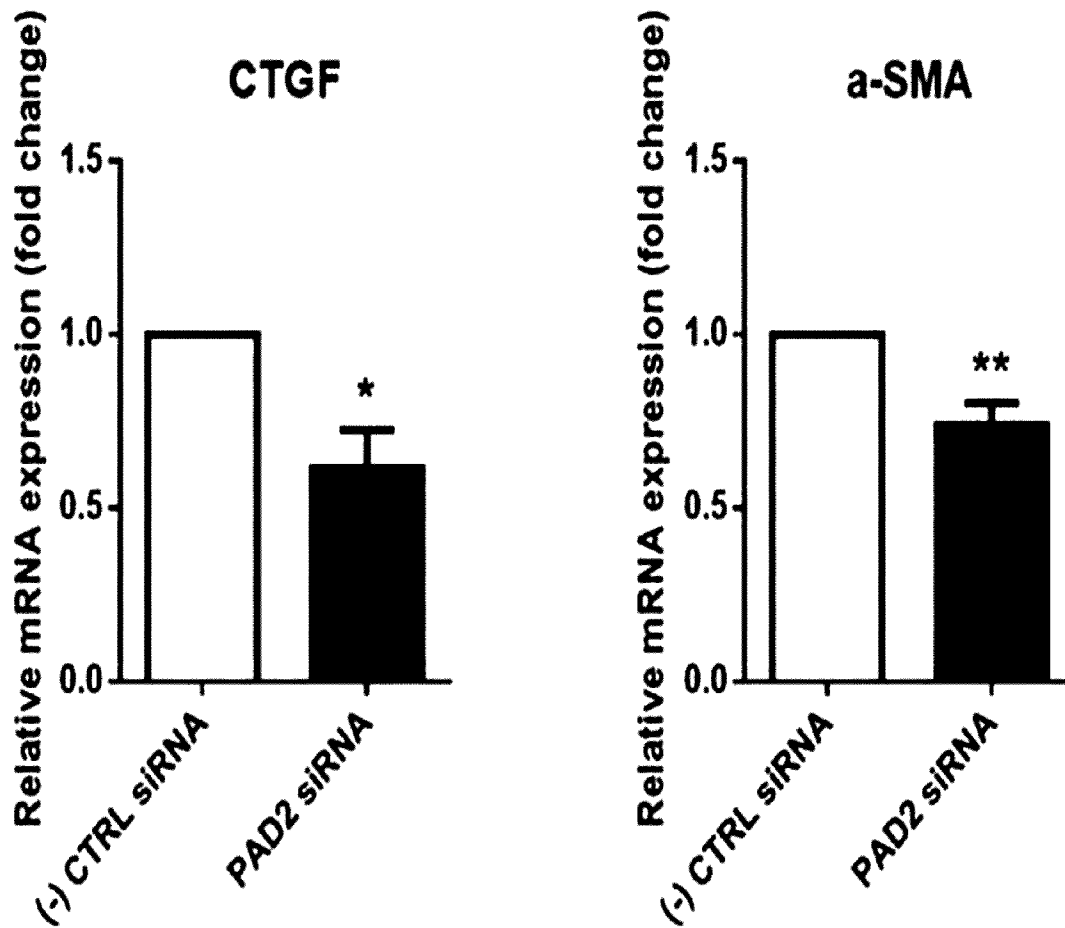
INFLAMMATION MARKER

[도4a]

FIBROSIS MARKER



[도4b]

FIBROSIS MARKER

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/011582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 9/00(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 48/00(2006.01); A61K 31/166(2006.01); A61K 38/50(2006.01); G01N 33/564(2006.01); G01N 33/68(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: PAD(protein-arginine deaminase), 저해제(inhibitor), siRNA, 퇴행성 판막 질환 (degenerative valve disease), 대동맥 판막(aortic valve)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2018-0136232 A1 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 17 May 2018 (2018-05-17) See abstract; claims 1-2 and 5; and paragraphs [0071], [0084], [0087] and [0208].	1-7,10,12,13 8,9
A	KNIGHT, J. S. et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. Circulation Research. 2014, vol. 114, pp. 947-956. See entire document.	1-10,12,13
A	DÖRING, Y. et al. Neutrophil extracellular traps participate in cardiovascular diseases: recent experimental and clinical insights. Circulation Research. 24 April 2020, vol. 126, pp. 1228-1241. See entire document.	1-10,12,13
A	LING, S. et al. NETosis as a pathogenic factor for heart failure. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 24 February 2021, vol. 2021, article ID 6687096, pp. 1-24. See entire document.	1-10,12,13
A	WO 2018-178935 A1 (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO) 04 October 2018 (2018-10-04) See entire document.	1-10,12,13
☐ 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 16 November 2023		Date of mailing of the international search report 16 November 2023
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/KR2023/011582

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

International application No.

PCT/KR2023/011582

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.: **11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to a method for treatment of the human body [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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/011582

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
US	2018-0136232	A1	17 May 2018	EP	2638401 A2	18 September 2013
				EP	2638401 A4	19 March 2014
				EP	2638401 B1	15 February 2017
				JP	2014-503795 A	13 February 2014
				JP	5701994 B2	15 April 2015
				US	10309974 B2	04 June 2019
				US	2014-0308676 A1	16 October 2014
				US	2017-0328915 A1	16 November 2017
				WO	2012-065176 A2	18 May 2012
				WO	2012-065176 A9	05 July 2012
WO	2018-178935	A1	04 October 2018	CN	108693282 A	23 October 2018
				CN	108693282 B	17 February 2023
				CN	108696804 A	23 October 2018
				CN	108696804 B	04 May 2021
				CN	110494512 A	22 November 2019
				CN	110494512 B	13 January 2023
				CN	110506146 A	26 November 2019
				CN	110520349 A	29 November 2019
				CN	110520373 A	29 November 2019
				CN	110520373 B	30 November 2021
				CN	110944770 A	31 March 2020
				CN	110944770 B	07 September 2021
				EP	3382388 A1	03 October 2018
				EP	3382566 A1	03 October 2018
				EP	3382566 B1	04 March 2020
				EP	3383066 A1	03 October 2018
				EP	3383066 B1	07 October 2020
				EP	3600386 A1	05 February 2020
				EP	3600719 A1	05 February 2020
				EP	3600719 B1	20 January 2021
				EP	3601028 A1	05 February 2020
				EP	3601091 A1	05 February 2020
				EP	3601091 B1	05 January 2022
				EP	3601122 A1	05 February 2020
				EP	3601122 B1	21 April 2021
				EP	3601454 A1	05 February 2020
				EP	3601454 B1	11 May 2022
				EP	3601695 A1	05 February 2020
				JP	2018-169395 A	01 November 2018
				JP	2018-170762 A	01 November 2018
				JP	2020-512233 A	23 April 2020
				JP	2020-512248 A	23 April 2020
				JP	7030836 B2	07 March 2022
				JP	7122844 B2	22 August 2022
				JP	7276981 B2	18 May 2023
				KR	10-2019-0129068 A	19 November 2019
				KR	10-2496989 B1	09 February 2023
				KR	10-2542151 B1	09 June 2023
				US	10387334 B2	20 August 2019
				US	10408952 B2	10 September 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/011582

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 10412497 B2	10 September 2019
		US 10458629 B2	29 October 2019
		US 10553297 B2	04 February 2020
		US 10774531 B2	15 September 2020
		US 10829328 B2	10 November 2020
		US 10901919 B2	26 January 2021
		US 11077491 B2	03 August 2021
		US 11150223 B2	19 October 2021
		US 11518896 B2	06 December 2022
		US 2018-0283661 A1	04 October 2018
		US 2018-0284076 A1	04 October 2018
		US 2018-0284299 A1	04 October 2018
		US 2018-0285284 A1	04 October 2018
		US 2018-0286488 A1	04 October 2018
		US 2018-0288529 A1	04 October 2018
		US 2019-0317902 A1	17 October 2019
		US 2020-0040572 A1	06 February 2020
		US 2020-0087091 A1	19 March 2020
		US 2021-0087416 A1	25 March 2021
		US 2021-0114682 A1	22 April 2021
		US 2021-0121946 A1	29 April 2021
		WO 2018-178130 A1	04 October 2018
		WO 2018-178178 A1	04 October 2018
		WO 2018-178889 A1	04 October 2018
		WO 2018-178890 A1	04 October 2018
		WO 2018-178917 A1	04 October 2018
		WO 2018-179016 A1	04 October 2018
		WO 2018-179020 A1	04 October 2018
		WO 2018-179021 A1	04 October 2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/166(2006.01); A61K 38/50(2006.01); G01N 33/564(2006.01); G01N 33/68(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: PAD(protein-arginine deaminase), 저해제(inhibitor), siRNA, 퇴행성 판막 질환(degenerative valve disease), 대동맥 판막(aortic valve)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	US 2018-0136232 A1 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 2018.05.17 요약; 청구항 1-2, 5; 단락 [0071], [0084], [0087], [0208]	1-7,10,12,13 8,9
A	KNIGHT, J. S. 등, 'Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis', Circulation Research, 2014, 114권, 947-956 페이지 전체 문헌	1-10,12,13
A	DÖRING, Y. 등, 'Neutrophil extracellular traps participate in cardiovascular diseases: recent experimental and clinical insights', Circulation Research, 2020.04.24, 126권, 1228-1241 페이지 전체 문헌	1-10,12,13
A	LING, S. 등, 'NETosis as a pathogenic factor for heart failure', Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021.02.24, 2021권, 아티클 ID 6687096, 1-24 페이지 전체 문헌	1-10,12,13
A	WO 2018-178935 A1 (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO) 2018.10.04 전체 문헌	1-10,12,13
☐ 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 2023년11월16일(16.11.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년11월16일(16.11.2023)
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:

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: **11**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11은 사람의 치료방법에 해당합니다 [PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)].
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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0136232 A1	2018/05/17	EP 2638401 A2	2013/09/18
		EP 2638401 A4	2014/03/19
		EP 2638401 B1	2017/02/15
		JP 2014-503795 A	2014/02/13
		JP 5701994 B2	2015/04/15
		US 10309974 B2	2019/06/04
		US 2014-0308676 A1	2014/10/16
		US 2017-0328915 A1	2017/11/16
		WO 2012-065176 A2	2012/05/18
WO 2018-178935 A1	2018/10/04	WO 2012-065176 A9	2012/07/05
		CN 108693282 A	2018/10/23
		CN 108693282 B	2023/02/17
		CN 108696804 A	2018/10/23
		CN 108696804 B	2021/05/04
		CN 110494512 A	2019/11/22
		CN 110494512 B	2023/01/13
		CN 110506146 A	2019/11/26
		CN 110520349 A	2019/11/29
		CN 110520373 A	2019/11/29
		CN 110520373 B	2021/11/30
		CN 110944770 A	2020/03/31
		CN 110944770 B	2021/09/07
		EP 3382388 A1	2018/10/03
		EP 3382566 A1	2018/10/03
		EP 3382566 B1	2020/03/04
		EP 3383066 A1	2018/10/03
		EP 3383066 B1	2020/10/07
		EP 3600386 A1	2020/02/05
		EP 3600719 A1	2020/02/05
		EP 3600719 B1	2021/01/20
		EP 3601028 A1	2020/02/05
		EP 3601091 A1	2020/02/05
		EP 3601091 B1	2022/01/05
		EP 3601122 A1	2020/02/05
		EP 3601122 B1	2021/04/21
		EP 3601454 A1	2020/02/05
		EP 3601454 B1	2022/05/11
		EP 3601695 A1	2020/02/05
		JP 2018-169395 A	2018/11/01
		JP 2018-170762 A	2018/11/01
		JP 2020-512233 A	2020/04/23
		JP 2020-512248 A	2020/04/23
		JP 7030836 B2	2022/03/07
		JP 7122844 B2	2022/08/22
		JP 7276981 B2	2023/05/18
		KR 10-2019-0129068 A	2019/11/19
		KR 10-2496989 B1	2023/02/09
		KR 10-2542151 B1	2023/06/09
		US 10387334 B2	2019/08/20
		US 10408952 B2	2019/09/10

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 10412497 B2	2019/09/10
		US 10458629 B2	2019/10/29
		US 10553297 B2	2020/02/04
		US 10774531 B2	2020/09/15
		US 10829328 B2	2020/11/10
		US 10901919 B2	2021/01/26
		US 11077491 B2	2021/08/03
		US 11150223 B2	2021/10/19
		US 11518896 B2	2022/12/06
		US 2018-0283661 A1	2018/10/04
		US 2018-0284076 A1	2018/10/04
		US 2018-0284299 A1	2018/10/04
		US 2018-0285284 A1	2018/10/04
		US 2018-0286488 A1	2018/10/04
		US 2018-0288529 A1	2018/10/04
		US 2019-0317902 A1	2019/10/17
		US 2020-0040572 A1	2020/02/06
		US 2020-0087091 A1	2020/03/19
		US 2021-0087416 A1	2021/03/25
		US 2021-0114682 A1	2021/04/22
		US 2021-0121946 A1	2021/04/29
		WO 2018-178130 A1	2018/10/04
		WO 2018-178178 A1	2018/10/04
		WO 2018-178889 A1	2018/10/04
		WO 2018-178890 A1	2018/10/04
		WO 2018-178917 A1	2018/10/04
		WO 2018-179016 A1	2018/10/04
		WO 2018-179020 A1	2018/10/04
		WO 2018-179021 A1	2018/10/04
