

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 8월 6일 (06.08.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/159331 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 36/346 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/7034 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/001584

(22) 국제출원일:

2020년 2월 3일 (03.02.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0013726 2019년 2월 1일 (01.02.2019) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

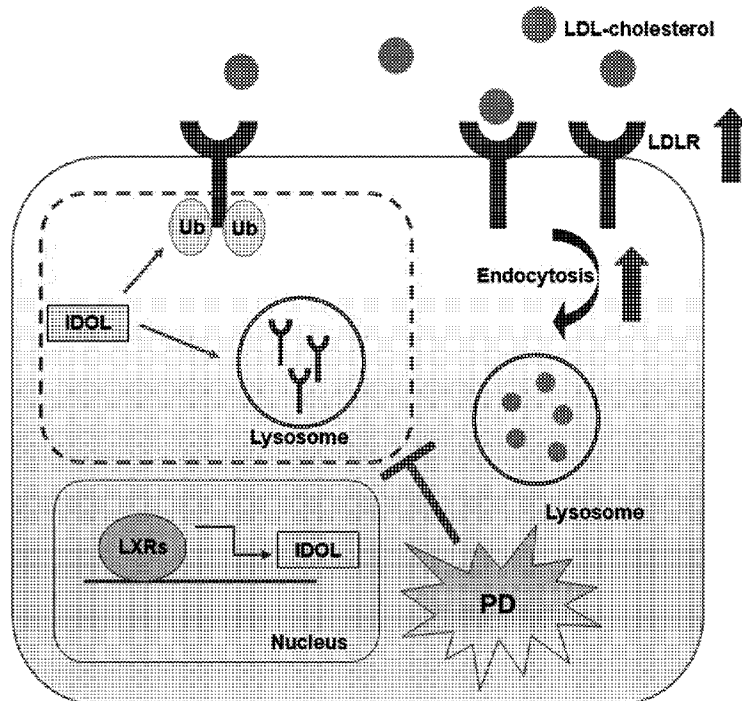
(72) 발명자: 고성규 (KO, Seong-Gyu); 06009 서울시 강남구 압구정로 401, 51동 606호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135 대명타워 6층, 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, 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, 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.

(54) Title: CO-ADMINISTRATION COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING HYPERCHOLESTEROLEMIA, CONTAINING BALLOON-FLOWER EXTRACT OR PLATYCODIN D DERIVED THEREFROM AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효 성분으로 포함하는 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 병용투여 조성물



(57) Abstract: The present invention pertains to: a co-administration pharmaceutical composition for preventing or treating hypercholesterolemia, the composition containing a balloon-flower extract, or platycodin D derived therefrom, and a statin-based drug as active ingredients; an anti-hypercholesterolemia adjuvant containing a balloon-flower extract or platycodin D derived therefrom as an active ingredient; a kit for preventing or treating hypercholesterolemia, the kit containing a balloon-flower extract, or platycodin D derived therefrom, and a statin-based drug as active ingredients; a method for preventing or treating hypercholesterolemia, the method comprising a step for co-administering a balloon-flower extract, or platycodin D derived therefrom, and a statin-based drug to a non-hu-

[다음 쪽 계속]



WO 2020/159331 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 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

man subject; a composition for treating or preventing hypercholesterolemia, the composition containing a balloon-flower extract or platycodin D derived therefrom as an active ingredient; and a method for enhancing the expression of a low-density lipoprotein receptor, the method comprising a step for treating liver cells in vitro with a balloon-flower extract or platycodin D derived therefrom. A balloon-flower extract or platycodin D contained therein according to the present invention can be administered in combination with conventional hypercholesterolemia treatment chemicals to effectively prevent or treat hypercholesterolemia through a novel molecular mechanism that induces the expression of a hepatocellular low-density lipoprotein receptor (LDLR).

(57) 요약서: 본 발명은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 병용투여 약학 조성물, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 항-고콜레스테롤 혈증 보조제, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 키트, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 인간을 제외한 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는, 고콜레스테롤 혈증의 예방 또는 치료방법, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 치료 또는 예방용 조성물, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 시험관의 간 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 저밀도 지단백질 수용체 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 길경 추출물 또는 이에 포함된 플라티코딘 D는 기존의 고콜레스테롤 혈증 치료 화합제와 병용투여되어, 간세포 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR) 발현을 유도하는 신규 분자 매커니즘으로 고콜레스테롤 혈증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효 성분으로 포함하는 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 병용투여 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 포함하는 병용투여 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 병용투여 약학 조성물, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 항-고콜레스테롤 혈증 보조제, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 키트, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 인간을 제외한 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는, 고콜레스테롤 혈증의 예방 또는 치료방법, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 치료 또는 예방용 조성물, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 시험관의 간 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 저밀도 지단백질 수용체 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 콜레스테롤은 세포막과 지단백질의 주요 구성성분이며 담즙산과 스테로이드 호르몬 및 비타민 D3의 전구체 등으로서, 뇌조직을 제외한 대부분의 조직에서 합성되며 그 중 간에서 가장 활발하게 일어난다. 체내의 콜레스테롤의 대부분은 간에서 만들어지며 콜레스테롤이 들어있는 저밀도 지단백 (low-density lipoprotein, LDL) 입자의 형태를 통해 다른 장기로 전달된다. 간은 LDL에 결합하는 세포 표면 단백질인 간의 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR)에 의한 순환으로 혈장 LDL-C를 제거하고 내포작용을 통해 세포 내로 LDL 입자의 흡수를 촉진시킨다.
- [4] 콜레스테롤과 관련된 질환들이 최근 서구화된 식습관으로 인하여 많은 현대인들에게 발생하고 있는 추세이다. 체내에서 이용 또는 배설되지 못한 과다의 혈장 콜레스테롤은 고콜레스테롤혈증 및 동맥경화를 초래하는 등 심장 순환기 계통의 질병에 대한 위험인자(risk factor)로 알려져 있다.
- [5] 이러한 질병에 걸린 환자들에게 화학요법은 널리 사용되어 왔다. 고콜레스테롤혈증의 화학요법 치료제로 이용되어 왔던 것은 대표적으로 스타틴계 약물로써, 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴 등이

있다. 화학요법은 일부 질환에 대해 효과적이지만, 다량을 지속적으로 투여할 경우, 환자들에게 부작용을 일으킨다. 더욱이, 현재의 화학요법제는 그들의 비특이적 세포독성으로 인해 수많은 유해 부작용을 가진다고 알려져 있다. 구체적으로는, 비정상 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 미치며, 악마다 다르지만 당뇨병, 근육통, 무기력증, 인지기능 저하, 성기능 장애, 백내장, 불면증, 면역력 약화, 잇몸 괴사, 공격적 성향 등이 생길 수도 있다고 보고된다. 이러한 부작용을 낮추기 위한 방법으로는 생체에 안전성이 입증된 천연 추출물을 화학제와 병용투여하는 방법이 있는데, 이는 환자에게 다량의 화학제가 지속적으로 투여됨을 방지할 뿐 아니라 화학제 자체의 효과를 상승시킬 수 있다고 알려져 있다.

[6]

[7]

한편, 도라지로 잘 알려져 있는 길경(*Platycodon grandiflorum*, PG)은 천연 추출물의 활용성이 높은 약제로, 길경근으로도 불리며 초롱꽃과 도라지의 뿌리 또는 주피를 제거하여 만든 약제이다. 또한, 길경에서 분리된 플라티코딘 D (*Platycodin D*, PD)는 세포 사멸, 염증, 산화 스트레스, 간독성과 관련된 수많은 생물학적 과정을 방해하는 것으로 알려져 있다. 또한, 최근 고콜레스테롤혈증 및 비만의 위험이 높아진 현대인들에게 플라티코딘 D는 콜레스테롤 함량을 감소시킴으로써 고콜레스테롤혈증 및 비만 치료로 유용하게 활용될 수 있음이 보고되고 있다.

[8]

특히, 고콜레스테롤 혈증으로 지칭되는 혈장 내 LDL- 콜레스테롤 (LDL-derived cholesterol, LDL-C)의 높은 수치는 죽상 동맥 경화성 심혈관 질환 (cardiovascular disease, CVD)의 중요한 위험 요소이므로, 일반적으로 LDL-C는 이 질환을 치료하기 위한 치료 전략으로 여겨져 왔다. 치료 전략 중 하나로서, 고콜레스테롤 혈증을 치료하기 위하여 간에서의 저밀도 지단백질 수용체 농도 조절 경로를 이용하는데, 저밀도 지단백질 수용체 발현 유도를 통해 혈액에서 LDL 입자를 제거하는 작용을 기반으로 한 약물 개발에 활용되어 왔다. 이러한 치료 전략과 관련하여, 종래 연구에서는 플라티코딘 D가 고콜레스테롤혈증을 유발하는 쥐 체내의 콜레스테롤을 낮추는 효과를 확인하였으나(*European journal of pharmacology*(2006)537;166-173), 플라티코딘 D를 이용한 고콜레스테롤 혈증 치료의 근본적인 분자 매커니즘은 아직 밝혀진 바 없으며, 기존 화학제와 병용 투여할 때 시너지 효과를 일으키는지는 아직 규명된 바 없다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10]

이러한 배경 하에, 본 발명자는 길경 또는 이부터 유래된 플라티코딘 D를 기존의 고콜레스테롤 혈증 치료 화학제와 병용투여하여 간세포 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR) 발현을 유도시켜 고콜레스테롤을 저하시킴을

확인함으로써, 구체적인 분자 매커니즘을 기반으로 한 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 하나의 목적은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 병용투여 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 하나의 목적은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용도를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 항-고콜레스테롤 혈증 보조제를 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 인간을 제외한 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는, 고콜레스테롤 혈증의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 시험관의 간 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 저밀도 지단백질 수용체 발현을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

[19]

발명의 효과

[20] 본 발명의 길경 추출물 또는 이에 포함된 플라티코딘 D는 기존의 고콜레스테롤 혈증 치료 화합제와 병용투여되어, 간세포 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR) 발현을 유도함으로써, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료를 효과적으로 할 수 있다.

[21]

도면의 간단한 설명

[22] 도 1a 및 1b는 HepG2 세포의 생존 능력에 있어 PG 및 PD의 영향에 대한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 1a는 HepG2 세포를 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 PG를 24시간 동안 처리한 결과를 나타낸다. 또한, 도 1b는 세포를 PD (1, 2.5, 5 μM)로 24시간 동안 처리한 결과를 나타낸다. 여기에서, 세포 생존력은 WST-8 분석을 이용하여 측정하였으며, 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차 (SD)로 표시된다.

- [23] 도 2a 내지 2c는 LDLR 발현 및 LDL 흡수를 유도하는 PG 및 PD에 대한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 2a는 PG 또는 PD로 24시간 동안 처리한 HepG2 세포에 대한 결과를 나타내며, 여기에서 단백질 발현은 웨스턴 블랏 분석에 의해 확인하였다. 또한, 도 2b는 HepG2 세포에 PG 및 PD를 24시간 동안 처리한 결과를 나타내며, 상기 세포 표면 LDLR 수준은 유세포 분석에 의해 확인하였다. 여기에서, LDLR의 평균 형광은 배수 변화로 나타냈으며, 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타내고, *, $P < 0.05$ 는 유의미한 차이를 나타낸다. 다음으로, 도 2c는 HepG2 세포에 PG (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 PD (2.5 μM)로 24시간 처리한 후 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BODYPI-FE-LDL로 1시간 배양한 결과를 나타낸다. 공초점 현미경 이미지는 LDL (녹색) 및 DAPI로 표지된 핵 얼룩 (파란색)에 표시되어 있다. 또한, 이미지 J. Data를 사용하여 LDL 형광 강도의 정량을 분석하였다. 여기에서, 데이터는 세포 당 LDL 총 밀도를 나타내며, 평균 $\pm$ 표준 편차 (SD)를 나타낸다. *, $P < 0.05$ 는 유의미한 차이를 나타낸다.
- [24] 도 3a 내지 3d는 PG 또는 PD에 의한 LDLR 단백질 안정성의 증가가 IDOL 억제에 의해 매개된다는 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 3a는 세포를 PG (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 PD (1, 2.5 μM)로 24 시간 처리한 결과를 나타낸다. RT-PCT를 사용하여 LDLR mRNA의 발현 수준을 검출하였고, 막대 그래프는 Image J를 사용하여 대조군으로 표준화된 배수 변화를 나타낸다. 결과는 세 번의 독립적인 실험으로부터 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 또한, 도 3b는 지시된 농도의 PG 또는 PD로 24시간 동안 처리 한 후, 세포를 웨스턴 블랏으로 분석한 결과를 나타낸다. 또한, 도 3c는 RT-PCT를 사용하여 IDOL mRNA의 발현 수준을 검출한 결과를 나타낸다. *, $P < 0.05$ 는 유의미한 차이를 나타낸다. 또한, 도 3d는 세포를 PD (2.5 μM)로 24시간 동안 처리한 다음 지시된 시간 동안 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX로 처리한 결과를 나타낸다. 여기에서, LDLR 단백질을 웨스턴 블랏으로 분석하고, 데이터는 Image J.를 사용하여 LDLR 강도의 정량화를 나타낸다.
- [25] 도 4a 및 4b는 IDOL의 발현은 억제 하지만 LXR α 의 발현은 억제하지 않는 PD에 대한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 4a는 HepG2 세포를 PD (2.5 μM) 및 T0901317 (10 μM)과 함께 24시간 동안 함께 처리한 결과를 나타낸다. 여기에서, IDOL mRNA는 RT-PCR로 측정하였다. GAPDH는 로딩 대조군으로서 사용되었다. 또한, 도 4b는 세포를 PG (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 PD (1, 2.5, 5 μM)로 24시간 처리한 결과를 나타낸다. 여기에서, LXR α 발현은 웨스턴 블랏에 의해 검출되었다.
- [26] 도 5는 LDLR 발현에 대한 심바스타틴의 효과를 향상시키는 PG 및 PD에 대한 결과를 나타낸다. HepG2 세포에 PG (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 PD (2.5 μM) 및 심바스타틴 (1 μM)를 함께 24시간 동안 함께 처리하였으며, LDLR 단백질은 웨스턴 블랏에 의해 검출하였다. 정량화 결과는 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타내고, *, $P < 0.05$ 는 유의미한 차이를 나타낸다.
- [27] 도 6은 LDL 흡수 활동에 대한 심바스타틴의 효과를 향상시키는 PG와 PD의

결과를 나타낸다. HepG2 세포에 PG (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 PD (2.5 μM)와 심바스타틴 (1 μM)을 24시간 처리한 후 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BODYPI-FE-LDL로 1시간 배양하였다.

데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차이고, *, $P < 0.05$ 는 유의미한 차이를 나타낸다.

- [28] 도 7은 HepG2 세포에서 LDL 흡수의 유도를 통한 PD의 고지혈증 작용을 나타낸 모식도이다. PG 및 PD는 IDOL 억제에 의해 야기되는 단백질 안정성 조절을 통해 LDLR 발현을 유도하며, HepG2 세포에서 혈장 LDL 섭취 수준을 증가시킴을 나타낸다. PD 또는 PG를 심바스타틴과 병용처리하였을 때, 심바스타틴에 의한 콜레스테롤 저하 효과가 현저히 향상됨을 나타낸다.

[29]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [30] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[31]

- [32] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 병용투여 약학 조성물을 제공한다.

- [33] 또한, 본 발명은 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용도를 제공한다.

- [34] 본 발명의 길경 추출물 또는 이에 포함된 플라티코딘 D는 기존의 고콜레스테롤 혈증 치료 화합제와 병용투여되어, 간세포 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR) 발현을 유도함으로써 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료제의 개발을 도모할 수 있다는 점에서 그 의의가 크다.

[35]

- [36] 본 발명의 용어, "길경"은 초롱꽃과의 도라지(Platycodon grandiflorum A. De Candolle)의 뿌리 또는 주피를 제거하여 만든 약재를 의미한다. 길경은 생약으로 주로 이용되며 한방에서 기침, 담석, 거담제, 코막힘, 감기, 편도선염, 농종의 약으로 이용되고 있다.

- [37] 상기 길경은 자연에서 채취하거나 재배, 또는 구매하여 사용할 수 있으며, 그 외 공지된 방법으로 수득하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 길경 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물로부터 추출될 수 있고, 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하다.

- [38] 본 발명의 용어, "추출물"은 길경의 추출 처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및

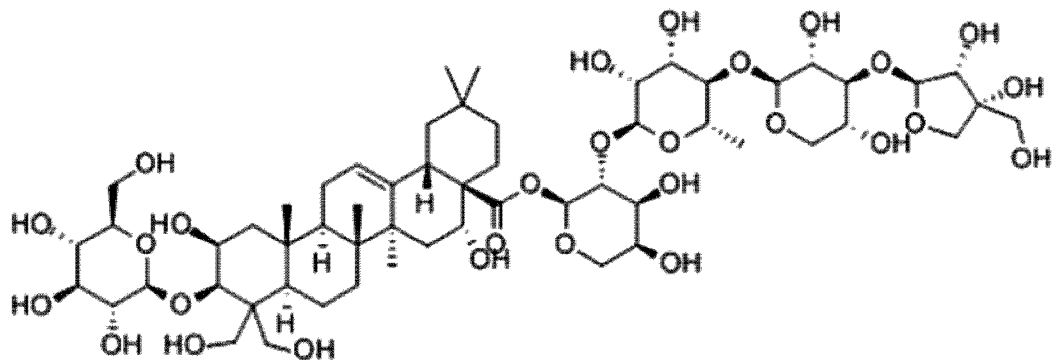
추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

- [39] 상기 길경 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 열수 추출물일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [40] 추출 방법은 특별히 제한되지 않고, 유효 성분이 파괴되지 않거나 최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 길경 추출물을 얻기 위한 방법은 다음과 같을 수 있다. 길경을 중량의 약 2 내지 20배, 구체적으로는 약 3 내지 5 배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올 등과 같은 C1 ~ C4의 알코올의 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매를 용출 용매로 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 추출 온도는 1 내지 100 °C, 구체적으로는 15 내지 35 °C일 수 있으며, 추출 기간은 약 1 시간 내지 10 일, 구체적으로는 2 내지 50 시간일 수 있고, 추출 방법은 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출, 또는 이들을 병합한 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [41] 상기 길경 추출물은 총 조성물 대비 0.01 내지 99 중량%, 구체적으로는 0.05 내지 90%, 보다 구체적으로는 0.1 내지 80 중량% 일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [42] 본 발명의 용어, "플라티코딘 D"는 플라티코딘 D는 하기와 같이 화학식 1로 표시되는 화합물로, 화학식은 $C_{57}H_{92}O_{28}$ 이며, 사포닌(saponin)의 한 종류이다.

[43]

[44] [화학식 1]

[45]



[46]

- [47] 본 발명에서 플라티코딘 D 화합물은 천연물로부터 추출된 것을 사용할 수 있으나, 화학적으로 합성된 것도 사용 가능하며, 천연물로부터 추출된 것과 동일한 효과를 나타내는 한, 이에 제한되지 않는다.

- [48] 본 발명의 플라티코딘 D 화합물은 구체적으로는 길경(*Platycodi radix*)으로부터 추출 및 정제될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않으며, 길경 외의 다양한 천연물에서도 추출될 수 있다. 상기 플라티코딘 D는 길경 추출물에서 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 분리 및 정제될 수 있는데, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리 및 정제할 수 있다.

- [49] 상기 사포닌은 트리테르펜(triterpene)류 및 스테로이드(steroid)류를 아글리콘(aglycone)으로 하고 당과 글리코시드(glycoside) 결합을 하고 있는 화합물 군으로 분류한다. 또한 이들 사포닌군은 사포제닌(sapogenin)에 따라 구별할 수 있는데, 이중 길경 사포닌은 5환성 올레아난(oleanane)형 트리테르펜 사포닌(triterpene saponin)에 속한다. 구체적으로, 길경에는 사포닌 성분으로 10여종의 트리테르펜 사포닌이 약 2% 함유되어 있으며, 이 사포닌 중, 플라티코디제닌 (platycodigenin)의 배당체로 플라티코딘 A, C, D, D2와 2종의 모노아세테이트(monoacetate), 플라티코딘 D3가 보고된 바 있다(Rossi M et al., Chem. Pharm. Bull 16(11): 2300, 1968).
- [50] 본 발명의 용어, "스타틴계 약제"는 HMG-CoA 환원효소 억제제 계열의 약물로, 고콜레스테롤 혈증 치료제로 이용되는 화학제를 의미하며, 구체적으로 상기 스타틴계 약제는 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 아토르바스타틴 및 세리바스타틴으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것이나,, 이에 한정된 것은 아니다.
- [51] 상기 HMG-CoA 환원효소 억제제는 주로 간세포의 마이크로솜분획에 존재하며, 초산을 콜레스테롤로 합성하는 과정에 있어서 β -하이드록시- β -메틸글루타릴 CoA에서 메바론산으로의 반응을 촉매하여, 콜레스테롤대사의 합성계(合成系)의 반응을 규제하는 율속효소(律速酵素)를 의미한다. 따라서 콜레스테롤합성계의 조절기구에 관여하고 있으며, 여러 가지 인자에 의해 억제나 촉진작용을 받는다.
- [52] 구체적으로, 콜레스테롤 대사 조절에 있어 두 가지 중요한 효소로 간조직에 존재하면서 콜레스테롤 합성과 그 저장량에 영향을 주는 효소로는 각각 HMG-CoA 환원효소(3-하이드록시-3-메틸글루타릴 코엔자임 A, EC 1.1.1.34)와 ACAT(acyl coenzymeA: cholesterol acyltransferase, EC 2.3.1.26)이 있다. HMG-CoA 환원효소는 간의 콜레스테롤 합성을 조절중요한 율속 효소(rate limiting enzyme)이며, ACAT은 소장, 간 및 타 조직의 유리 콜레스테롤을 에스테르화하는 효소로서 식이 콜레스테롤의 장내 흡수와 간장에서 VLDL(very low density lipoprotein)-콜레스테롤의 분비 및 동맥혈관의 콜레스테롤 축적에 관여한다(Helgerud, 1981; sucking & stange, 1985). 지금까지의 보고에 의하면 이들 두 효소의 저해들은 사람을 포함한 다양한 실험동물에서 콜레스테롤 저하 효과를 나타내었을 뿐만 아니라, 항동맥경화 효과를 발휘한다고 보고된다(Alberts et al., 1980; Amin et al., 1993; Alberts, 1988; Fujioka et al., 1995; Schnizer-polokoff et al., 1991; Largiset al., 1989; Heidner et al., 1983; William et al., 1989; Roth et al., 1992; Sugiyami et al., 1995).
- [53]
- [54] 본 발명에서 용어, "고콜레스테롤 혈증"은 혈액 속에 들어 있는 콜레스테롤이 정상치를 넘은 상태를 의미하는 질환으로, 고콜레스테롤증과 동일한 의미로 사용될 수 있다.

- [55] 상기 콜레스테롤은 스테로이드 물질의 전구체(precursor) 역할을 하며 특히 성호르몬·부신피질호르몬 등은 스테로이드 호르몬이기 때문에 콜레스테롤이 반드시 필요하나, 비만 등으로 인해 혈관에 지질단백질들이 많이 쌓이면 혈중 콜레스테롤 수치가 높아지므로 비만 등으로 인해 혈관에 지질단백질들이 많이 쌓이면 혈중 콜레스테롤 수치가 높아질 수 있다.
- [56] 본 발명에서 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 길경 추출물, 이로부터 유래된 유효성분 또는 상기 조성물의 투여로 상기 고콜레스테롤 혈증의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [57] 본 발명에서 용어 "치료"는 본 발명에 따른 길경 추출물, 이로부터 유래된 유효성분 또는 상기 조성물의 투여로 상기 고콜레스테롤 혈증의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [58] 본 발명에서 용어, "병용투여"는 동시 또는 순차적으로 사용하여 처리함을 의미한다.
- [59] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 병용투여하였을 때, 고콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히 병용투여시 그 치료 효과가 현저히 증가되는 것을 확인하였다 (도 5 및 도 6).
- [60]
- [61] 본 발명에서, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D는 스타틴계 약제와 병용투여되어, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료의 시너지 효과를 가질 수 있으며, 특히, 길경 추출물 또는 이에서 유래된 플라티코딘 D가 스타틴계 약제와 병용투여되어, 적은 용량의 스타틴계 약제만으로도 항-콜레스테롤혈증의 효과를 가지도록 할 수 있다.
- [62] 본 발명에서, 상기 약학 조성물은 저밀도 지단백질 수용체(LDLR)의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [63] 상기 용어 "저밀도 지단백질 수용체"는 저밀도 지단백질이 말초조직의 세포표면과 결합해서 세포내에 받아 들여져 대사과정에 있어, 이 저밀도 지단백질 결합세포표면을 저밀도리포 단백질수용체라고 한다. 따라서 말초조직의 콜레스테롤대사는 저밀도 지단백질을 받아들임으로써 조절되고 있는 것이 되며, 여기에 이상을 초래하면 콜레스테롤조절작용이 시행되지 않아 콜레스테롤생산과잉이 되어 고콜레스테롤혈증을 일으킨다.
- [64] 구체적으로, 상기 용어 "저밀도 지단백질"은 혈장리포단백을 구성하는 분획의 하나로 초저밀도 지단백증(VLDL)의 트라이글리세라이드(triglycerides) 등이 효소작용에 의하여 탈락한 결과 생성된 것을 의미한다.
- [65] 본 발명에서, 상기 약학 조성물은 LDL-콜레스테롤 (LDL-derived cholesterol, LDL-C)의 흡수를 촉진함으로써 고콜레스테롤혈증을 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.
- [66] 상기 LDL- 콜레스테롤은 LDL에 함유된 콜레스테롤을 의미하며, LDL

콜레스테롤이 170mg/이상이면 고 LDL혈증으로 간주된다.

[67]

[68] 본 발명에서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[69] 상기 용어 "담체"는 생물반응조 내부에 미생물이 잘 증식하고 성장하도록 하기 위하여 부착 표면을 제공하는 매체(medis)를 의미한다.

[70] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 길경추출물 또는 또는 이에 포함된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[71]

[72] 본 발명의 다른 양태는 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 항-고콜레스테롤 혈증 보조제를 제공한다.

[73] 상기 용어 "길경", "추출물", "플라티코딘 D", 및 "스타틴계 약제"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[74]

[75] 본 발명에서 용어, "항-고콜레스테롤 혈증 보조제"는 고콜레스테롤 혈증을 예방, 방지 또는 치료하는 것을 유도 또는 도와주는 약제를 의미한다.

[76] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 병용투여하였을 때, 고콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히 병용투여시 그 치료 효과가 현저히 증가되는 것을 확인함으로써, 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 항-고콜레스테롤혈증 보조제로 사용할 수 있음을 확인하였다 (도 5 및 도 6).

[77]

[78] 본 발명의 또 다른 양태는 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[79] 상기 용어 "길경", "추출물", "플라티코딘 D", "스타틴계 약제", "고콜레스테롤

혈증", "예방", 및 "치료"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

- [80] 본 발명에서 용어, "키트"는 조립을 해서 무엇을 바로 만들 수 있도록 부품들을 모아 놓은 것으로서, 본 발명에서는 상기 고콜레스테롤 혈증을 예방 또는 치료할 수 있도록 제공한 실험적 용품을 모아둔 것을 의미한다.

[81]

- [82] 본 발명의 또 다른 양태는 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는, 고콜레스테롤 혈증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

- [83] 상기 용어 "길경", "추출물", "플라티코딘 D", "스타틴계 약제", "병용투여", "고콜레스테롤 혈증", "예방", 및 "치료"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

- [84] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 상기 길경 추출물 또는 이에서 유래된 플라티코딘 D 및 스타틴계 약제를 포함하는 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

- [85] 본 발명의 용어, "개체"는 고콜레스테롤혈증이 유발되거나 유발될 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미하며, 특별히 제한되지는 않는다.

[86]

- [87] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

- [88] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 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.

- [89] 상기 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여할 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여할 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.

- [90] 또한, 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

- [91] 구체적인 예로, 상기 약학 조성물은 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg, 더욱 구체적으로 0.05 내지 200 mg/kg, 가장 구체적으로 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[92]

- [93] 본 발명의 또 다른 양태는 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [94] 상기 용어 "길경", "추출물", "플라티코딘 D", "고콜레스테롤 혈증", "예방", 및 "치료"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [95]
- [96] 본 발명의 또 다른 양태는 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 시험관의 간 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 저밀도 지단백질 수용체 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [97] 상기 용어 "길경", "추출물", "플라티코딘 D", 및 "저밀도 지단백질 수용체"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [98] 상기 용어 "발현 증가"는 본 발명에서 저밀도 지단백질 수용체의 mRNA 또는/및 단백질 발현을 증가시킬 수 있는 것이나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 발현 증가를 측정하는 것은 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있으며, 구체적으로는 웨스턴 블랏 분석에 의해 측정할 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[99]

발명의 실시를 위한 형태

- [100] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[101]

[102] 실시예 1. 세포 배양 및 화합물질

- [103] HepG2 세포주는 한국 세포주 은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 상기 세포를 10% FBS, 5% 항생제가 함유된 RPMI-1640에서 37°C 및 5% CO₂에서 배양하였다. 다음으로, 플라티코딘 D (Platycodin D, PD)는 Cayman Chemical Company(미국 미네소타 주 Ann Arbor 소재)에서 구입하여 DMSO에 10mM의 농도로 용해시켰다. 또한, 주식회사 한풍 제약 (전주)에서 생산된 길경 (Platycodon grandiflorum, PG)을 증류수 20mg/mL에 용해하였다.

[104]

[105] 실시예 2. 세포 생존율 분석

- [106] 세포를 96-웰 플레이트에 분주하고 상기 PG (10, 50, 100, 250, 500 µg/mL) 또는 PD (1, 2.5, 5 µM)를 24시간 동안 처리하였다. 배양 후 WST 용액 (Daeilab service, Co., Seoul, Korea)을 각 웰에 넣고 2시간 동안 배양하였다. 다음으로, 450nm에서 ELISA 판독기 (Molecular Devices, Palo Alto, CA)를 이용하여 배지 내 수용성 포르마잔(formazan)을 측정하였다.

[107]

[108] 실시예 3. Western blot 분석

[109] 세포에 PD와 PG를 24 시간 동안 처리하였다. 단백질을 10% SDS-PAGE에 분주하고 니트로 셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)으로 옮겼다. 막을 4 °C에서 밤새 항온처리하였다. 참고로, 항-LDLR, Mylip/IDOL 및 LXR α 는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였으며, 항-GAPDH는 세포 신호 전달 (MA, USA)에서 구입하였다. 또한, 항-PCSK9는 Proteintech (Chicago, USA)에서 구입하였다. 블롯(blot)을 HRP-접합 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 배양하고 Pierce 제 ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, MA, USA)을 사용하여 측정하였다.

[110]

[111] 실시예 4. 역전사 (RT)-PCR

[112] 세포를 6-웰 플레이트에 분주하고 PD 또는 PG로 24시간 동안 처리한 후, R&A-BLUE Total RNA 추출 키트 (iNtRON Biotechnology, Inc. Korea)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 다음으로, PrimeScript 제 1st strand cDNA 합성 키트 (Takara Biotechnology, Dalian, Liaoning, China)를 사용하여 1 μ g RNA로부터 상보적 DNA (cDNA)를 합성하고 Maxime PCR PreMix Kit (i-StarTaq) (iNtRON Biotechnology, Inc. 대한민국)로 RT-PCR을 수행하였다. 여기에서 사용된 프라이머의 서열은 표 1과 같으며, GAPDH를 내부 대조군으로 사용하였다.

[113]

[114] [표1]

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
LDLR	CAGATATCATCAACGAAGC	CCTCTCACACCAGTTCCTCC
MYLIP	TTGTGGACCTCGTTTCAAGA	GCTGCAGTTCATGCTGCT
GAPDH	CGTCTTCACCACCATGGAGA	CGGCCATCACGCCACAGTTT

[115]

[116] 실시예 5. LDL 흡수 분석

[117] 세포를 24-웰 플레이트에 분주하고 전술한 바와 같이 처리하였다. 약물 처리 후, 배지를 제거하고 37°C에서 1시간 동안 5 μ g/ml BODIPY-FL-LDL (Invitrogen, CA, USA)로 대체하였다. 세포를 0.3% BSA를 함유하는 PBS로 세척하고 4% 파라포름 알데히드 (paraformaldehyde, PFA)로 10분간 고정시켰다. 핵을 2% BSA 내에 1 μ g/ml DAPI로 1분 동안 염색하고 공초점 현미경을 사용하여 분석하였다.

[118]

[119] 실시예 6. 세포 표면 LDLR 분석

[120] 세포를 위와 같이 24시간 동안 처리하고 수확한 다음 5% BSA를 함유한 PBS 내에 1:60으로 희석된 anti-LDLR (Abcam, Cambridge, UK)과 37°C에서 30분간

항은 배양하였다. 세포를 PBS 중 1% BSA로 세척하고 1:250 희석액을 사용하여 Alexa Fluor 488 접합 염소 anti-토끼 IgG (Invitrogen, CA, USA)와 함께 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 세포를 0.5% PFA로 10분간 고정시키고, PBS에 재현탁시키고 유동 세포 계측법(flow cytometry) (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)으로 측정하였다. CellQuest Pro 소프트웨어 (BD Biosciences, USA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[121]

[122] 실시예 7. 통계 분석

[123] 데이터는 평균±표준 편차 (SD)로 표시하였으며, 통계 분석은 student's t-test를 사용하여 수행되었다. p 값 <0.05는 유의한 차이를 나타내는 것으로 간주하였다.

[124]

[125] 실험 결과 1. HepG2 세포에 대한 PG 및 PD의 세포 독성 효과

[126] PG와 PD가 HepG2 세포에 독성을 일으키는지를 조사하기 위하여 PG (10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 PD (1, 2.5, 5 μM)의 다른 농도로 처리한 후 WST1 분석으로 세포 생존력을 조사하였다. 그 결과, 도 1a 및 도 1b에서 확인할 수 있는 바와 같이, PG (10-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 PD (1-2.5 μM)는 HepG2 세포에 유의한 세포 독성 영향을 미치지 않았으나, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도의 PG와 5 μM PD를 처리시에는, 세포 생존율이 각각 85 %와 86 %로 측정됨을 확인하였다.

[127]

[128] 실험 결과 2. HepG2 세포에서 세포 표면의 LDLR 발현 및 LDL 흡수를 유도하는 PD

[129] LDLR은 혈장에서 LDL-유도된 콜레스테롤의 흡수를 매개하여 혈중 콜레스테롤 수치를 낮춘다고 보고된 바 있다. 따라서, PG 및 PD가 HepG2 세포에서 LDLR 발현을 상향 조절하는지 여부를 조사하였다. 그 결과, 도 2a에서 확인할 수 있는 바와 같이, 웨스턴 블롯 분석을 통해 PG와 PD가 HepG2 세포에서 LDLR 발현을 농도 의존적으로 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

[130] 비록 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PG와 5 μM PD에서 가장 높은 수준의 LDLR 발현이 관찰되었지만, 앞선 실험 결과 1을 통하여, 이 농도에서 세포 독성이 나타나는 것을 확인하였기 때문에, 향후 연구를 위해 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PG와 2.5 μM PD를 선택하였다.[131] 다음으로 PG와 PD가 세포 표면의 LDLR 발현DMF 증가시키는지 여부를 FACS 분석으로 조사한 결과, 도 2b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PG 및 2.5 μM PD의 처리시 대조군에 비해 세포 표면 LDLR 수준이 각각 1.2 ± 0.06 및 1.2 ± 0.07 만큼 향상됨을 확인하였다.

[132] PG와 PD가 LDL-C의 흡수를 증가시킬 수 있는지 여부를 더 조사하기 위해 PG 또는 PD 처리된 HepG2 세포를 BODYPI가 표지된 LDL 입자와 함께 1시간 동안 배양한 다음 공초점 현미경 검사를 수행하였다. 그 결과, 도 2c에서 확인할 수 있는 바와 같이, 처리되지 않은 대조군 세포와 비교하여 PG 또는 PD가 처리된

HepG2 세포에서 LDL 입자의 흡수가 1.7 배 증가함을 확인하였다.

[133]

[134] 실험 결과 **3. HepG2 세포에서 IDOL의 하향조절을 통해 LDLR 단백질 안정성을 증가시키는 PD**

[135] PG와 PD의 처리시 증가된 LDLR 발현의 기초가 되는 분자 메커니즘을 증명하기 위하여, IDOL과 PCSK9를 포함한 LDLR 단백질을 조절하는 것으로 알려진 유전자의 발현에 대한 PG와 PD의 효과를 조사하였다. 그 결과, 도 3a에서 확인할 수 있는 바와 같이, PG와 PD 모두 LDLR mRNA 발현에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[136] 또한, 도 3b에서 확인할 수 있는 바와 같이, PG와 PD가 LDLR에 결합하는 PCSK9의 단백질 분해 과정에 영향을 미치지 않는다는 것과 세포 표면으로의 재순환을 방지한다는 것을 확인하였다. 그러나 도 3c에서 확인할 수 있는 바와 같이, PG와 PD 모두 리소솜의 분해를 위해 LDLR을 표적으로 하는 E3 유비퀴틴 리가아제(E3 ubiquitin ligase)인 IDOL의 mRNA 수준을 현저히 감소시켰다.

[137] IDOL mRNA가 PG 및 PD 처리시 감소한다는 점을 감안할 때, PG 및 PD가 LDLR 단백질 안정성을 향상시킬 수 있다고 추론할 수 있었으며, 이에 따라, 새로운 단백질 합성을 차단하는 시클로헥사미드(cycloheximide, CHX)의 처리후에 남아있는 LDLR 단백질을 확인하였다. 그 결과, 도 3d에서 확인할 수 있는 바와 같이, 처리되지 않은 세포에 비해 PD가 처리된 세포에서 LDLR가 CHX 처리 후 상당히 안정하다는 것을 발견하였다.

[138]

[139] 실험 결과 **4. PD에 의해 억제된 Mylip/IDOL 발현에 따른 LDLR 단백질의 안정성**

[140] PD가 IDOL mRNA 발현을 억제하는지 확인하기 위해, T0901317 (LXR 작동제)을 PD와 함께 24시간 동안 공동 처리하였다. 상기 LXR은 지질 및 콜레스테롤 항상성에 관련된 표적 유전자를 활성화시키는 전사 인자이며, IDOL은 LXR의 대표적인 표적 유전자이다. 또한, T0901317은 LXR에 결합하여 IDOL의 발현을 증가시킨다.

[141] 그 결과, 도 4a에서 확인할 수 있는 바와 같이, T0901317이 IDOL 유전자의 mRNA 수준을 증가시키는 것을 발견했으나, 이 효과를 PD가 차단시키는 것을 확인하였다. 이는 PD가 활성화된 IDOL 전사를 억제함을 의미한다.

[142] 이러한 결과에 따라, PD가 IDOL의 억제에 대한 LXR 단백질 발현을 조절하는지 조사했다. 그 결과, 도 4b에서 확인할 수 있는 바와 같이, PD는 LXR- α 단백질 수준을 변화시키지는 않았다. 이러한 데이터는 PD가 LXR 전사의 활성화에는 기여하지만 단백질 발현에는 기여하지 않을 수 있음을 시사한다.

[143]

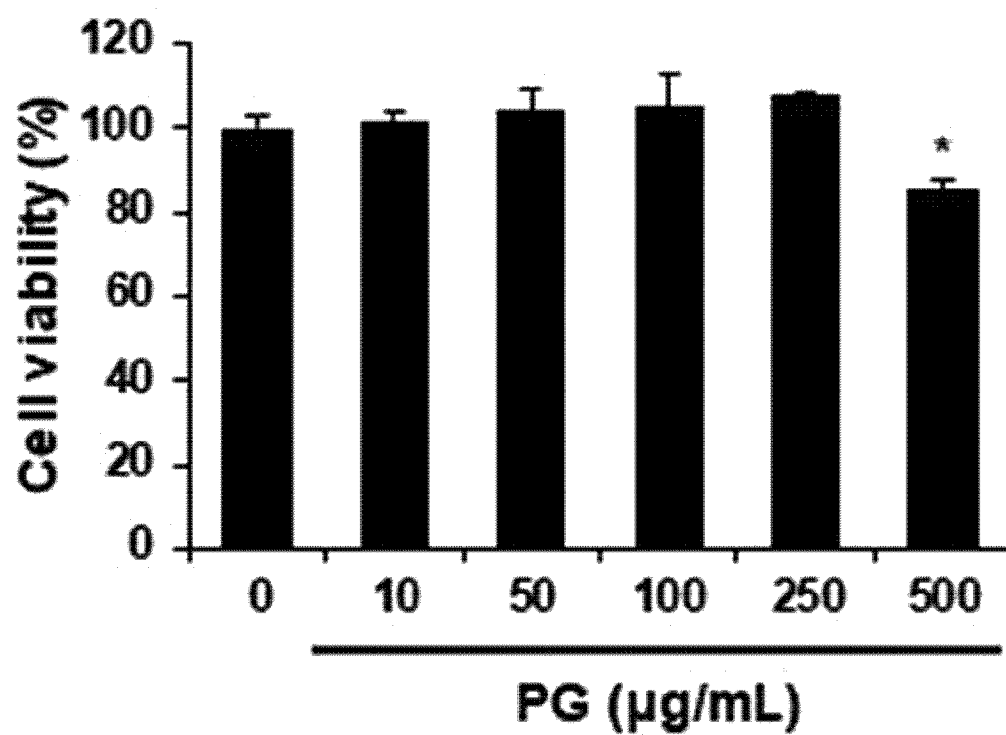
[144] 실험 결과 **5. 간의 LDLR 발현에 있어 심바스타틴 (simvastatin)과의 상승 효과를 나타내는 PG와 PD**

- [145] 일반적으로, 스타틴 (Statin)은 간의 LDLR 발현을 증가시키고 혈액 내 LDL-C 섭취를 증가시키기 때문에 LDL-C의 혈중 농도를 낮추는데 널리 사용된다. PG와 PD가 LDLR 발현에 대한 스타틴과의 시너지 효과가 있는지 알아보기 위해 심바스타틴과 함께 PG 또는 PD를 HepG2 세포에 24 시간 처리한 후 웨스턴 블롯으로 LDLR의 발현 정도를 조사하였다.
- [146] 그 결과 심바스타틴 단독 처리군에서 처리되지 않은 대조군 세포에 비해, 간의 LDLR 수준이 약 2.2 배 증가함을 보였다. 특히, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 심바스타틴과 PG 또는 PD와의 병용 처리는 대조군 세포에 비해 평균 5.5 및 4.19 배의 LDLR 수치를 상승적으로 현저히 증가시킴을 확인하였다.
- [147] 이러한 결과는, PD 또는 PG를 스타틴계 약제와 병용 투여하면, 고콜레스테롤 혈증을 현저히 우수한 시너지 효과로 치료할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [148]
- [149] 실험 결과 6. LDL 흡수에 있어 심바스타틴과 상승 효과를 나타내는 PG와 PD
- [150] PG와 PD가 LDL 흡수에 대한 시너지 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 증가된 LDLR 발현에 따라 심바스타틴과의 병용시 LDL 흡수의 상조적인 상승이 나타나는지를 관찰하였다. 그 결과, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 심바스타틴과 함께 PG 또는 PD를 병용 처리시 LDL 흡수를 각각 약 3 배 및 3.5 배 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [151]
- [152] 이상의 내용을 종합하면, 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에서는 PG와 PD가 LXR 발현과 무관하게 IDOL의 하향 조절에 의해 LDLR 발현 및 LDL-C 입자의 흡수를 유도한다는 것을 새롭게 규명한 것이며, 또한 LDLR의 증가와 LDL-C의 흡수와 관련하여 PG와 PD가 스타틴계 약제과 현저히 우수한 상승 효과를 가져 혈중 콜레스테롤 수치를 현저히 억제하는 약물로서 개발될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [153]
- [154] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

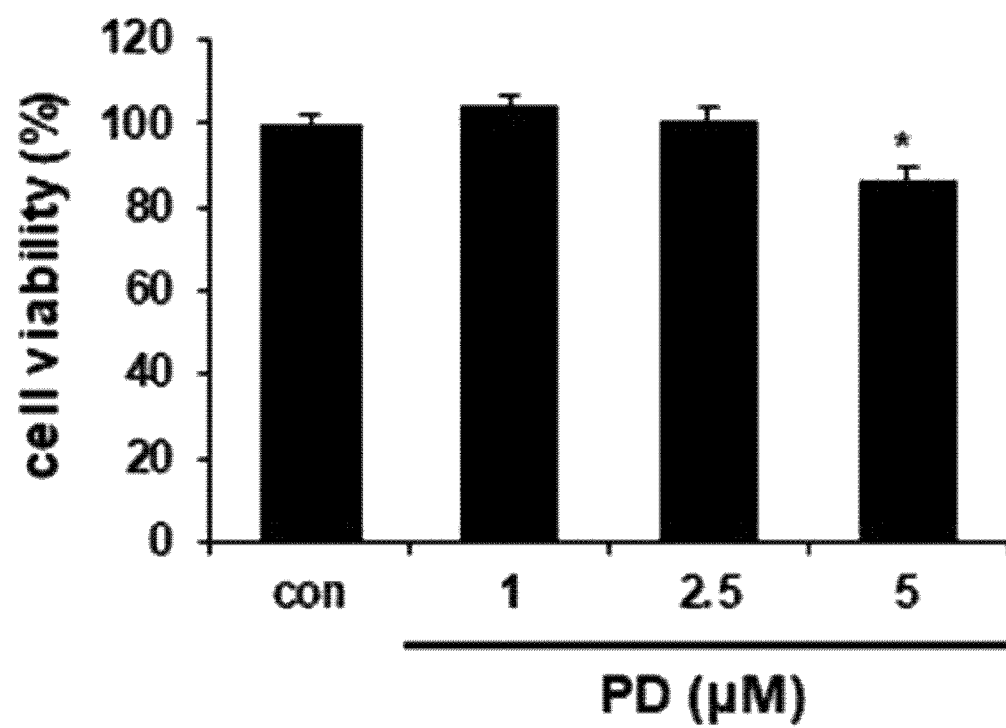
청구범위

- [청구항 1] 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D (Platycodin D); 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 병용투여 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 길경 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출되는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 스타틴계 약제는 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 아토르바스타틴 및 세리바스타틴으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D는 스타틴계 약제와 병용투여되어, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료에 대한 시너지 효과를 가지는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 저밀도 지단백질 수용체(LDLR)의 발현을 증가시키는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 LDL-콜레스테롤 (LDL-derived cholesterol, LDL-C)의 흡수를 촉진하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약학 조성물.
- [청구항 8] 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 항-고콜레스테롤 혈증 보조제.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 스타틴계 약제는 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 아토르바스타틴 및 세리바스타틴으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 항-고콜레스테롤 혈증 보조제.
- [청구항 10] 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 예방 또는 치료용 키트.
- [청구항 11] 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D; 및 스타틴계 약제를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는, 고콜레스테롤 혈증의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 12] 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 유효성분으로 포함하는, 고콜레스테롤 혈증 치료 또는 예방용 조성물.
- [청구항 13] 길경 추출물 또는 이로부터 유래된 플라티코딘 D를 시험관의 간 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 저밀도 지단백질 수용체 발현을 증가시키는 방법.

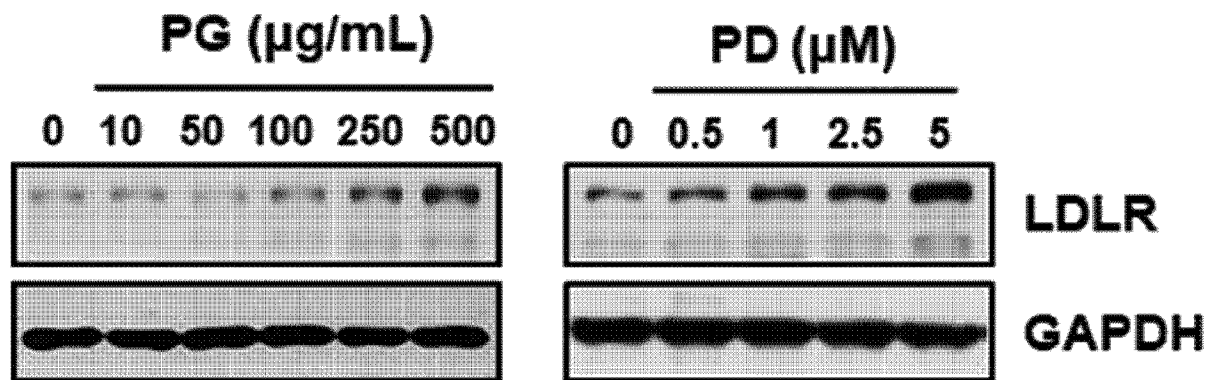
[도 1a]



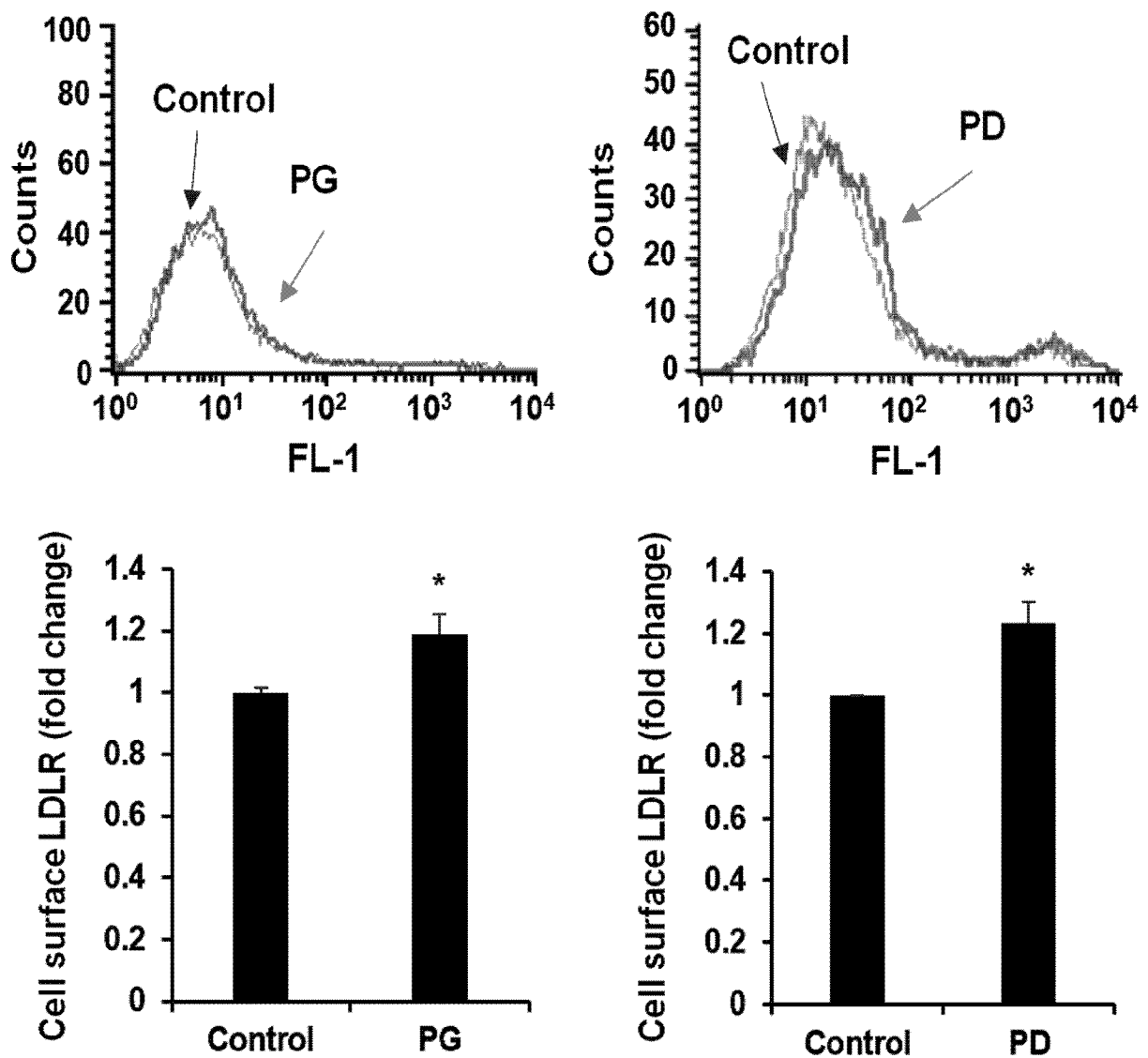
[도 1b]



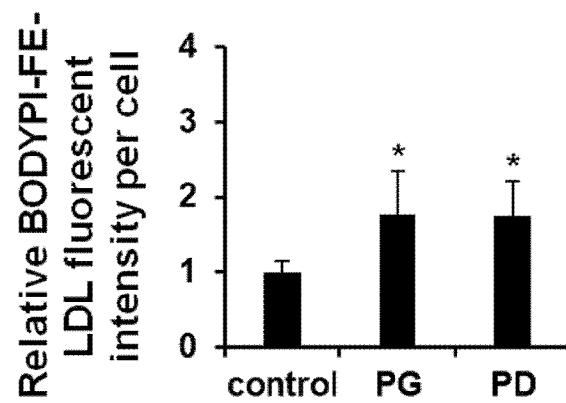
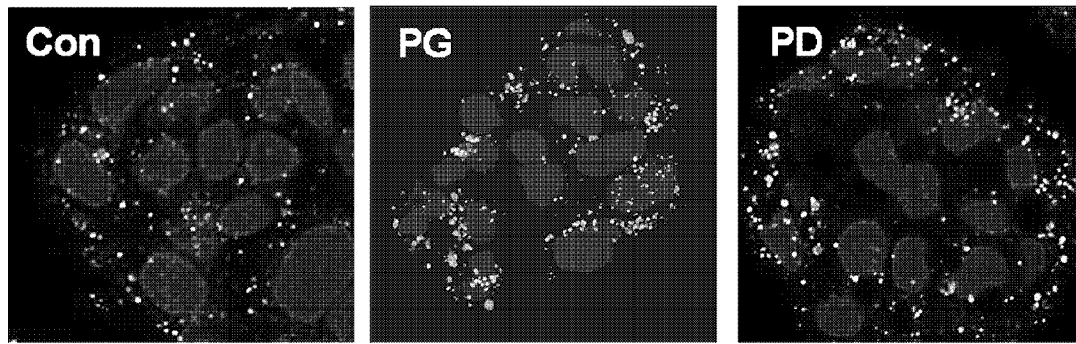
[도2a]



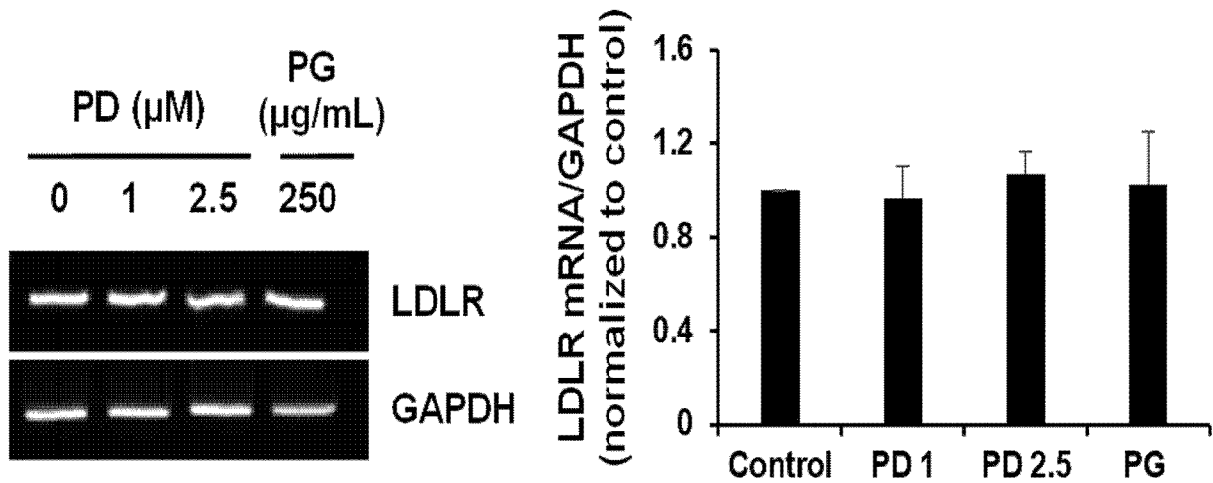
[도2b]



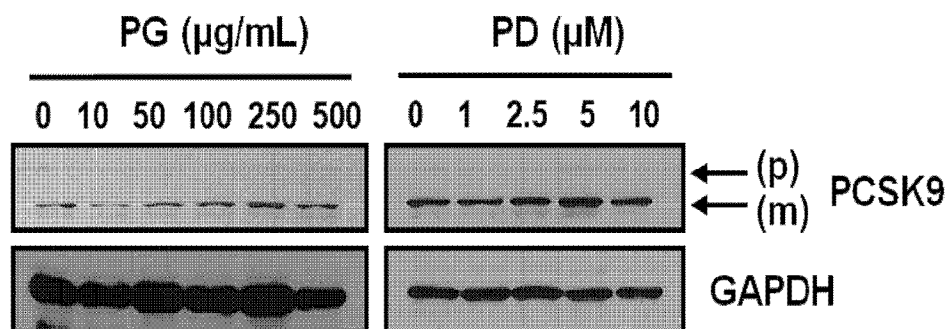
[도2c]



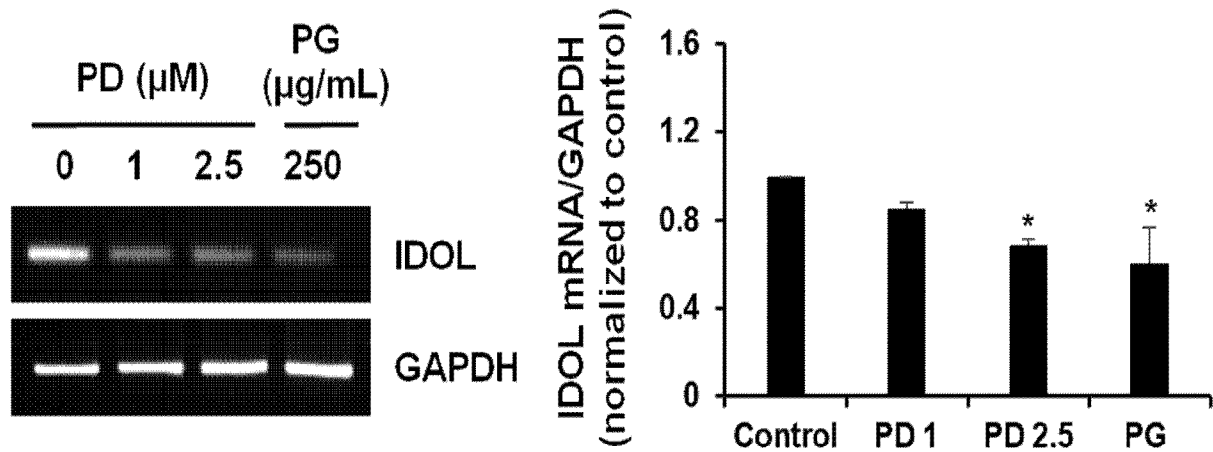
[도3a]



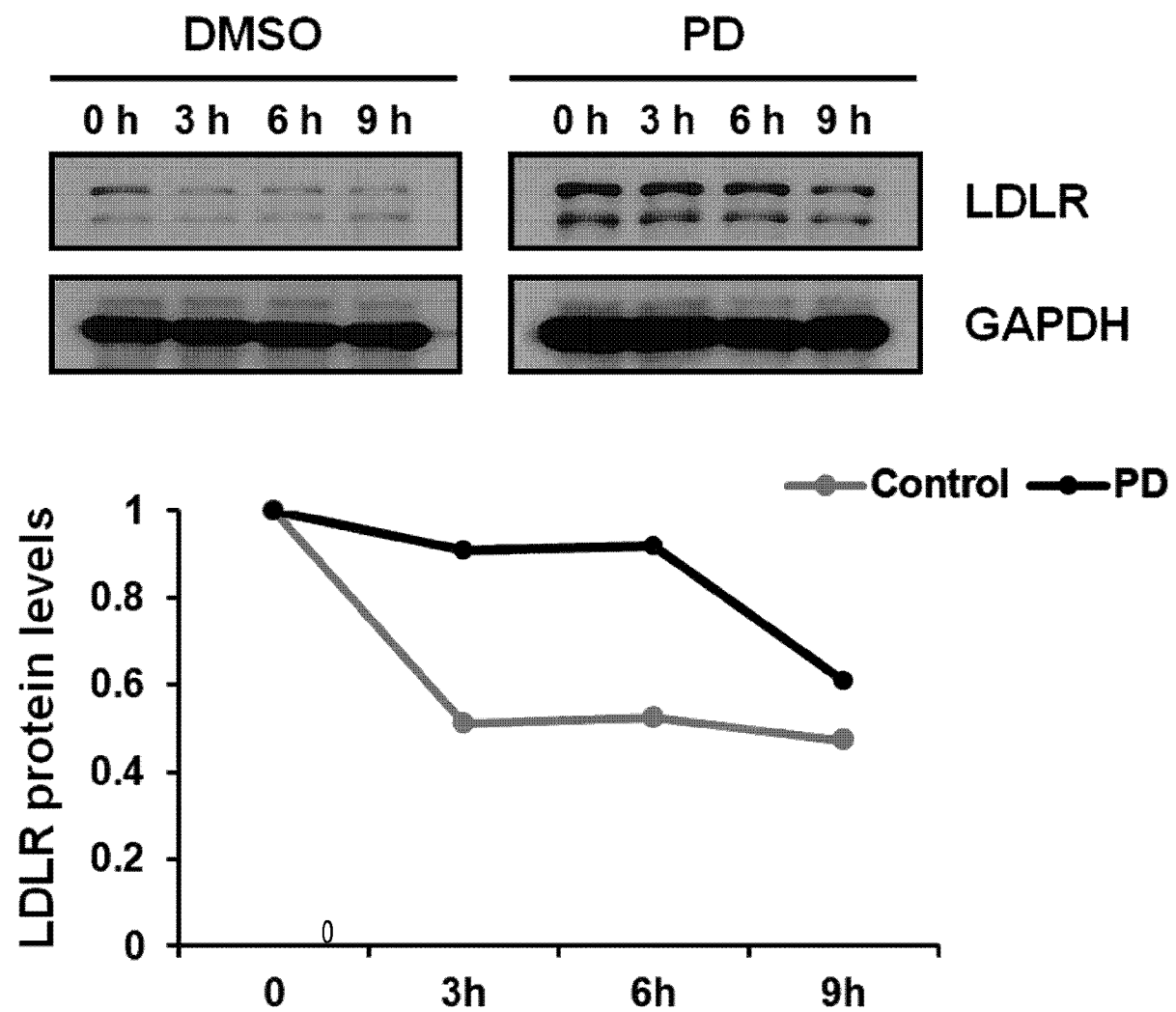
[도3b]



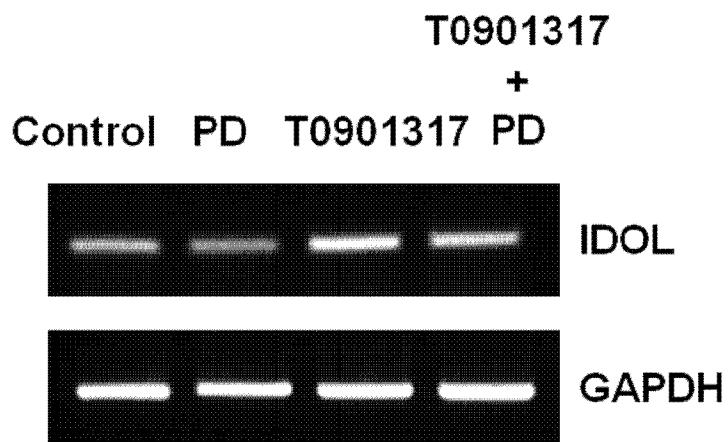
[도3c]



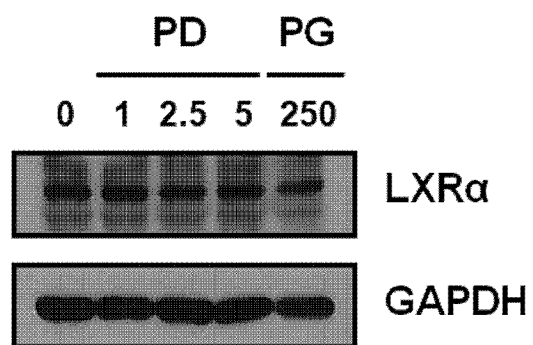
[도3d]



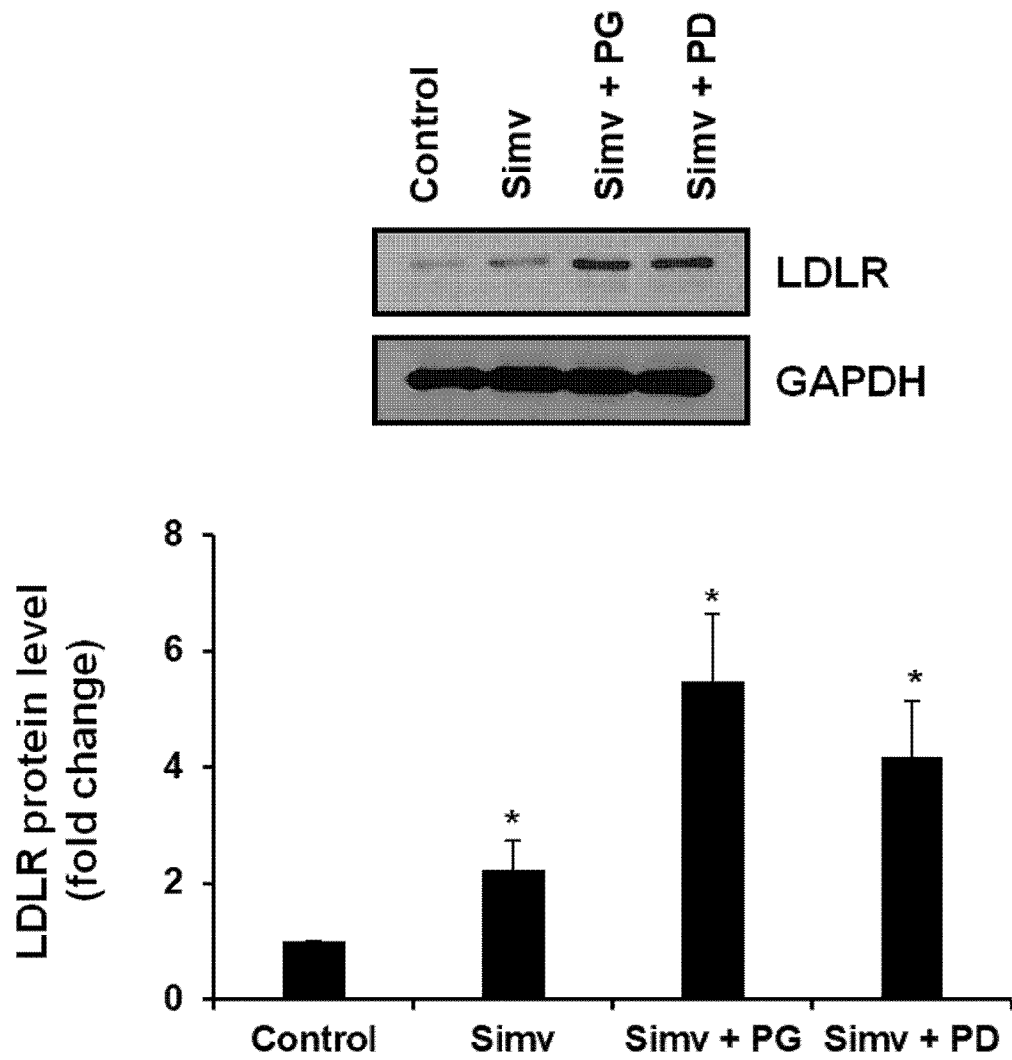
[도4a]



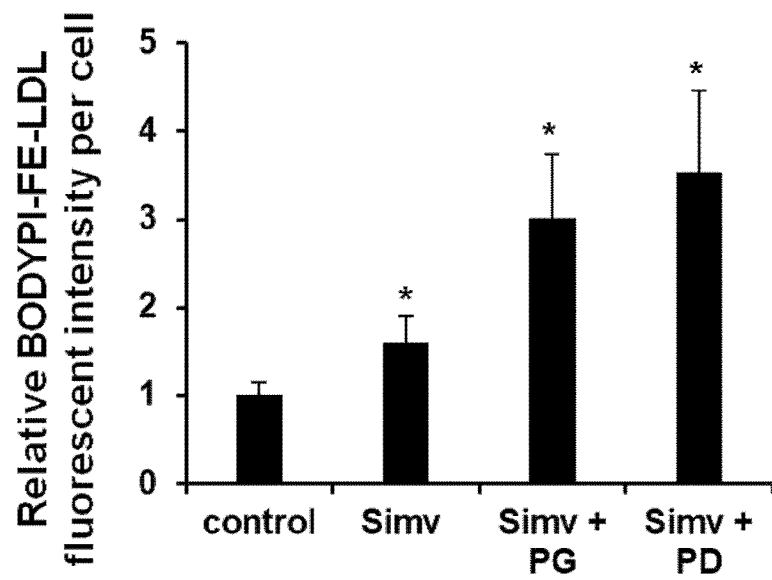
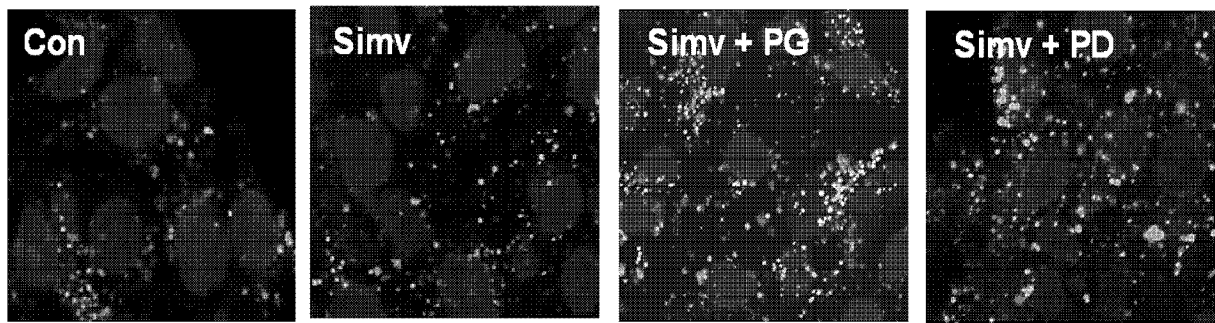
[도4b]



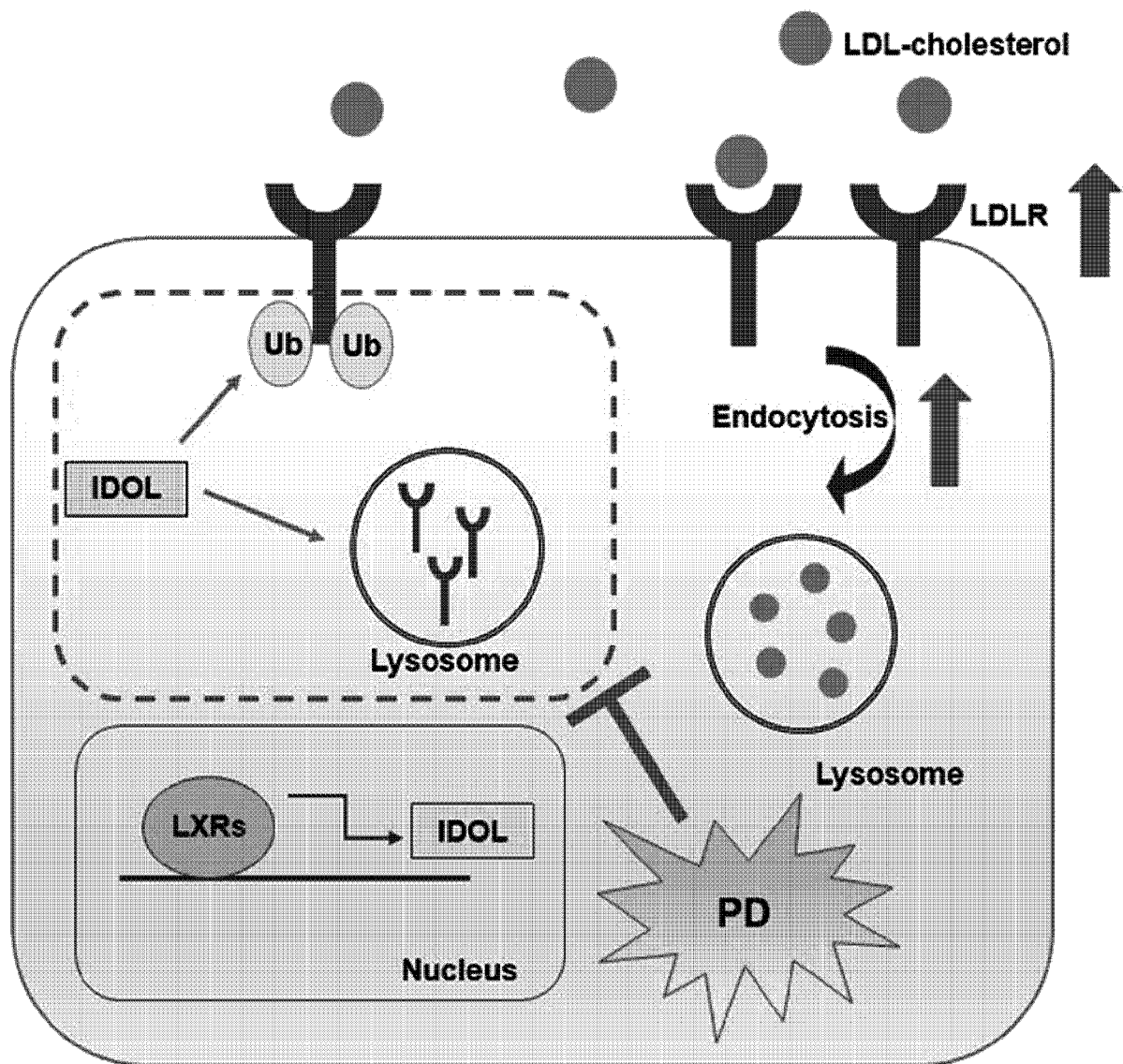
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/001584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/346(2006.01)i, A61K 31/7034(2006.01)i, A61K 31/366(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 3/06(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 36/346; A61K 31/704; A61P 3/06; C12P 19/44; A61K 31/7034; A61K 31/366; A61K 45/06

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: platycodi radix, platycodin D, statin, hypercholesterolemia, cholesterol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2006-0099015 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 19 September 2006 See pages 4-5; example 1; page 7, experimental example 2; table 2; claim 1.	8,9,12,13
Y		1-7,10,11
Y	JIANG, Q.-F. et al. Intervention effects of atorvastatin combined with Panax notoginseng saponins on rats with atherosclerosis complicated with hepatic injury. Pharmacognosy Magazine. 19 July 2017, vol. 13, pages 430-438 See page 430, "Abstract" and "Summary" sections.	1-7,10,11
X	ZHAO, H. L. et al. Cholesterol-lowering Effect of Platycodin D in Hypercholesterolemic ICR Mice. European Journal of Pharmacology. 2006(Electronic publication: 18 March 2006), vol. 537, pages 166-173 See abstract; page 167, left column, third paragraph.	8,9,12,13
Y		1-7,10,11
X	KR 10-2010-0120614 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 16 November 2010 See claims 1, 6, 9, 10.	8,9,12,13
Y		1-7,10,11
A	KR 10-2012-0117196 A (SAMCHOK CITY et al.) 24 October 2012 See the entire document.	1-13



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

"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

09 JUNE 2020 (09.06.2020)

Date of mailing of the international search report

09 JUNE 2020 (09.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/001584

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2006-0099015 A	19/09/2006	KR 10-0750333 B1	17/08/2007
KR 10-2010-0120614 A	16/11/2010	KR 10-1083045 B1	16/11/2011
KR 10-2012-0117196 A	24/10/2012	KR 10-1322719 B1	25/10/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/346(2006.01)i, A61K 31/7034(2006.01)i, A61K 31/366(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 3/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/346; A61K 31/704; A61P 3/06; C12P 19/44; A61K 31/7034; A61K 31/366; A61K 45/06

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: 길경(Platycodi Radix, Platycodon grandiflorum), 플라스티코딘 D(Platycodin D), 스타틴(statin), 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 콜레스테롤(cholesterol)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2006-0099015 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 2006.09.19 페이지 4-5; 실시예 1; 페이지 7, 실험예 2; 표 2; 청구항 1	8, 9, 12, 13
Y		1-7, 10, 11
Y	JIANG, Q.-F. 등, "Intervention effects of atorvastatin combined with Panax notoginseng saponins on rats with atherosclerosis complicated with hepatic injury", Pharmacognosy Magazine, 2017.07.19., 13권, 페이지 430-438 페이지 430, "Abstract " 및 " Summary " 섹션	1-7, 10, 11
X	ZHAO, H. L. 등, "Cholesterol-lowering Effect of Platycodin D in Hypercholesterolemic ICR Mice", European Journal of Pharmacology, 2006(전자공개:2006.03.18), 537권, 페이지 166-173 초록; 페이지 167, 왼쪽 칼럼, 3번째 단락	8, 9, 12, 13
Y		1-7, 10, 11
X	KR 10-2010-0120614 A (서울대학교산학협력단) 2010.11.16 청구항 1, 6, 9, 10	8, 9, 12, 13
Y		1-7, 10, 11
A	KR 10-2012-0117196 A (삼척시 등) 2012.10.24 전체 문헌	1-13

☐ 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 이후 "X"에 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

2020년 06월 09일 (09.06.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 06월 09일 (09.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



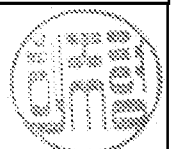
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2006-0099015 A	2006/09/19	KR 10-0750333 B1	2007/08/17
KR 10-2010-0120614 A	2010/11/16	KR 10-1083045 B1	2011/11/16
KR 10-2012-0117196 A	2012/10/24	KR 10-1322719 B1	2013/10/25